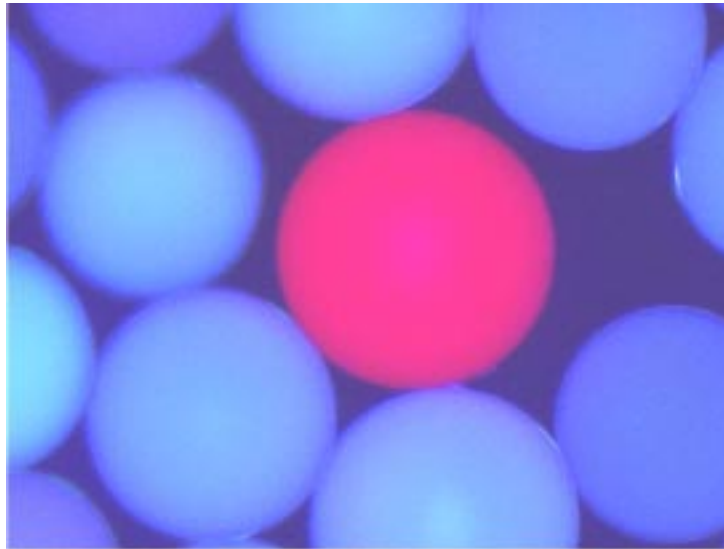


Kombinatorische *de novo* Synthese von künstlichen Phosphorsäurediesterasen



Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Rainer Riedl
aus Heppenheim

Köln 1998

Das Umschlagsbild zeigt ein positives Polymerkügelchen im Screening nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen. Bei der roten Färbung handelt es sich um die Fluoreszenz von Kresylviolett **36**, das als Sonde für polymergebundene phosphorylierte Liganden eingesetzt wurde.

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Rainer Riedl
aus Heppenheim

Köln 1998

Kombinatorische *de novo* Synthese von künstlichen Phosphorsäurediesterasen

Berichtersteller:

Prof. Dr. Albrecht Berkessel

Prof. Dr. Thomas Ziegler

Tag der mündlichen Prüfung:

7.12.1998

Jeder Mensch aber ist nicht nur er selber,
er ist auch der einmalige, ganz besondere,
in jedem Falle wichtige und merkwürdige Punkt,
wo die Erscheinungen der Welt sich kreuzen,
nur einmal so und nie wieder.

Hermann Hesse

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1995 bis August 1998 am Organisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Albrecht Berkessel angefertigt.

Herrn Prof. Dr. A. Berkessel danke ich für die interessante Themenstellung und die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Platsch, Herrn W. Weishaar und Herrn Th. Brugger, BASF AG, Ludwigshafen, für die Peptidsequenzierungen an einzelnen Polymerpartikeln.

Herrn Dr. G. Penzlin, Beilstein-Institut, Frankfurt am Main, danke ich für die wertvolle Beratung in Fragen bezüglich der Nomenklatur.

Herrn Dr. R. Devant, Merck KGaA, Darmstadt, danke ich für die HPLC-analytische Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse von **67** und **68**.

Herrn Prof. Dr. med. M. Paulsson und Herrn Dipl.-Chem. J. Stracke möchte ich für die Synthese des Peptides **178** danken.

Frau Fischer (Heidelberg), Frau K. Ermer (Köln) sowie Herrn Dr. H. Schmickler (Köln) danke ich für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren, Herrn Dr. R. Tappe (Köln) für die Aufnahme der HRMAS-NMR-Spektren.

Herrn Dr. J. Gross (Heidelberg) sei für die Aufnahme der Massenspektren gedankt.

Mein besonderer Dank gilt M. Schulze und meinem Laborkollegen Dr. D. Hérault für ihre Lektorentätigkeit sowie allen Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft.

Schließlich sei allen Mitarbeitern der Chemischen Institute der Universitäten Heidelberg und Köln gedankt.

Abschließend danke ich für ein Stipendium des Graduiertenkollegs „Selektivität in der Organischen und Metallorganischen Synthese und Katalyse“ der Institute für Organische und Anorganische Chemie der Universität Heidelberg und für ein Doktoranden-Stipendium der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
3	Kenntnisstand	6
3.1	Kombinatorische Chemie	6
3.1.1	Prinzipien der kombinatorischen Chemie	6
3.1.2	Techniken der kombinatorischen Chemie: Bibliothekssynthesen in flüssiger und an fester Phase	9
3.1.3	Festphasensynthese	10
3.1.3.1	Feste Träger und Linker für die organische Festphasensynthese	10
3.1.3.2	Synthesen an fester Phase	12
3.1.3.3	Analytik von Reaktionen an fester Phase	14
3.1.4	Screeningverfahren	15
3.1.4.1	Indizierte Bibliotheken	15
3.1.4.2	Affinitätsselektion	16
3.1.4.3	Dekonvolution	16
3.1.4.4	Positionsanalyse	17
3.1.5	Strukturaufklärung der aktivsten Verbindungen aus kombinatorischen Bibliotheken	17
3.1.5.1	Direkte Strukturaufklärung	17
3.1.5.2	Charakterisierung durch Codierungsmoleküle	17
3.1.6	Spezielle Formate von kombinatorischen Substanzbibliotheken	19
3.1.7	Design kombinatorischer Bibliotheken	20
3.1.8	Kombinatorische Methoden in der Katalysatorentwicklung	21
3.1.8.1	Parallele Festphasensynthese von 2-Pyrrolidinmethanol-Liganden und anschließendes Screening nach enantioselektiver Aktivität in der Diethylzink-Addition an Benzaldehyd	22
3.1.8.2	Kombinatorisch synthetisierte, strukturell undefinierte Polymere als Phosphorsäurediesterasen	23
3.2	Metallhaltige und metallfreie künstliche Phosphorsäurediesterasen	24

4	Konzeption	27
4.1	Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen	27
4.1.1	MAS-NMR-spektroskopische Verfolgung der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung an fester Phase	28
4.2	Künstliche Phosphorsäurediesterasen durch kombinatorische Chemie	29
4.2.1	Kombinatorische Synthese von dihydroxylierten Peptiden bzw. Peptiden mit Olefineinheit	29
4.2.1.1	Design und Synthese der Ligandenbibliotheken	30
4.2.1.2	Retrosynthetische Betrachtung	31
4.3	Screening der Ligandenbibliothek nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen	32
4.3.1	Absorptionsspektroskopisches Screening in Mikrotitrationsplatten	33
4.3.2	Batchweises Screening	33
4.3.2.1	Berlinerblau Test auf aktive Liganden	33
4.3.2.2	Anfärbung durch Kresylviolett	34
4.4	Entwicklung einer Fluoreszenz-Sonde für Phosphorsäurediesterase-Aktivität	35
5	Durchführung und Ergebnisse	38
5.1	Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen	38
5.1.1	Anknüpfen der Olefine an die Festphasen	38
5.1.2	Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung der festphasengebundenen Olefine	40
5.1.3	MAS-NMR-spektroskopische Verfolgung der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung	43
5.1.4	<i>On bead</i> Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von 63 durch MAS-NMR-Spektroskopie	44
5.2	Synthese eines Olefines an Polyethylenglycolmonomethylether durch Wittig-Reaktion	46
5.2.1	<i>Wittig</i> -Reaktion an Polyethylenglycolmonomethylether	46
5.3	Synthese von zwei mit Peptiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken an Amino-TentaGel™	47

5.3.1	Bibliothekssynthese mit <i>Wittig</i>-Reaktion	47
5.3.1.1	Synthese des Alanin- <i>spacers</i> und der Tripeptideinheit der Liganden	47
5.3.1.2	Synthese und Codierung der Olefineinheiten der Liganden	49
5.3.1.3	Modifizierung der olefinischen Liganden	53
5.3.1.3.1	Entschützung der polymergebundenen Silylester und anschließende Umsetzung der Carbonsäuren mit Aminosäureestern	53
5.3.1.3.2	Aufbau einer weiteren Tripeptideinheit an die olefinischen Liganden mit Aminofunktionen	55
5.3.1.4	Dihydroxylierung der polymergebundenen olefinischen Liganden und Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen	56
5.3.1.5	Überprüfung der Codierung	59
5.3.2	Bibliothekssynthese mit olefinischen Carbonsäuren	60
5.3.2.1	Anknüpfung der Olefine an die kombinatorischen Tripeptideinheiten	60
5.3.2.2	Umsetzung der Carbonsäuren mit Aminosäureestern	62
5.3.2.3	Dihydroxylierung der polymergebundenen olefinischen Liganden und Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen	63
5.3.2.4	Überprüfung der Codierung	66
5.4	Screening der beiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken nach künstlichen Phosphorsäure-diesterasen	68
5.4.1	Screening der Bibliothek 108 mit Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäure-diester 19 nach künstlichen Phosphorsäure-diesterasen in Mikrotitrationsplatten	68
5.4.2	Batchweises Screening nach künstlichen Phosphorsäure-diesterasen	70
5.4.2.1	Screening der Bibliothek 128 nach künstlichen Phosphorsäure-diesterasen mit dem Berlinerblau Test	70
5.4.2.1.1	Synthese des Testsubstrates 35 für den Berlinerblau Test auf künstliche Phosphorsäure-diesterase-Aktivität von polymergebundenen Substanzen	71
5.4.2.1.2	Einsatz des Testsubstrates 35 im Berlinerblau Test nach künstlicher Phosphorsäure-diesterase-Aktivität von polymergebundenen Substanzen	71
5.4.2.2	Kresylviolett als Sonde für polymergebundene phosphorylierte Liganden	73
5.4.2.2.1	Screening der Bibliothek 128 nach künstlichen Phosphorsäure-diesterasen mit Kresylviolett als Sonde für polymergebundene phosphorylierte Liganden	75

5.5	Aktivitätskontrolle der im Screeningverfahren positiven Liganden	76
5.5.1	Synthese der aus den Screeningverfahren ermittelten positiven Liganden und Überprüfung ihrer Phosphorsäurediesterase-Aktivität	77
5.5.2	Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19 mit den aus den Screeningverfahren ermittelten positiven Liganden	80
5.6	Identifizierung der kleinsten aktiven Einheiten der Liganden mit künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität	82
5.6.1	Detaillierte Untersuchung des Liganden 157 für die europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19	82
5.6.1.1	Verkürzung des Liganden 157 vom aminoterminalen Ende aus	82
5.6.2	Detaillierte Untersuchung des Liganden 153 für die zinkkatalysierte Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediester 19	85
5.6.2.1	Verkürzung des Liganden 153 vom aminoterminalen Ende aus	85
5.6.2.2	Verkürzung des Liganden 168 vom carboxyterminalen Ende aus	88
5.6.2.3	Variation des Liganden 168 zwischen dem Histidin- und dem Pentafluorphenylrest	89
5.6.2.3.1	Variation durch Deletion	90
5.6.2.3.2	Variation durch Substitution mit Alanin	91
5.6.3	Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19 in homogener Phase	93
5.6.3.1	Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19 in homogener Phase	93
5.6.3.1.1	Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19 in homogener Phase mit Histidin und Histidinamid	93
5.6.3.1.2	Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19 in homogener Phase mit an Polyethylenglycolmonomethylester immobilisiertem Histidin	94
5.6.3.2	Zinkkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19 in homogener Phase	96
5.7	Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität	97
5.7.1	Synthese der Fluoreszenz-Reporter 40 und 41 für Phosphorsäurediesterase-Aktivität	97

5.7.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Hydrolyse der Fluoreszenz-Reporter 40 und 41 durch verschiedene Phosphorsäurediesterasen	98
5.7.2.1	Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 40	98
5.7.2.2	Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 41	100
6	Diskussion und Ausblick	102
6.1	Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen	102
6.2	Kombinatorische Synthese von künstlichen Phosphorsäurediesterasen	105
6.2.1	Synthese von zwei mit Peptiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken an Amino-TentaGel™	105
6.2.2	Screening der beiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen	107
6.2.2.1	Screening der Bibliothek 108 in Mikrotitrationsplatten	107
6.2.2.2	Batchweises Screening der Bibliothek 128	108
6.2.2.2.1	Screening mit dem Berlinerblau Test	108
6.2.2.2.2	Screeningverfahren mit Kresylviolett	110
6.2.3	Identifizierung der kleinsten aktiven Einheiten der aktiven Liganden 153 und 157 mit künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität	112
6.3	Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität	115
6.4	Ausblick	117
7	Experimenteller Teil	118
7.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen	118
7.2	Generelle analytische Methoden	122
7.2.1	Quantifizierung der Anknüpfung von Fmoc-geschützten Aminosäuren an festen Trägern	122
7.2.2	Detektion von freien Aminofunktionen an polymeren Trägern	122
7.3	Synthese der Substrate für die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung an polymeren Trägern	123
7.3.1	Synthese von (<i>E</i>)-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]essigsäure 31	123
7.3.2	Synthese der [2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]essigsäure 33	124

7.4	Synthese der Triole <i>rac</i>-66, <i>rac</i>-67 und <i>rac</i>-68 sowie des cyclischen Carbonates <i>rac</i>-72	125
7.4.1	Synthese des (<i>R,R</i>)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiols 66 und des (<i>R,R</i>; <i>S,S</i>)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiols <i>rac</i>-66	125
7.4.1.1	Synthese von (<i>E</i>)-2-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]ethanol 54	126
7.4.1.2	Synthese von (<i>R,R</i>)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiol 66	127
7.4.1.3	Synthese von (<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiol <i>rac</i> -66	129
7.4.2	Synthese des (<i>R,S</i>)-1,2,11-Undecantriols <i>rac</i>-67	129
7.4.2.1	Synthese von 10-Undecen-1-ol 55	129
7.4.2.2	Synthese von (<i>R,S</i>)-1,2,11-Undecantriol <i>rac</i> -67	131
7.4.3	Synthese des (<i>R,S</i>)-3-[4-(2-Hydroxyethoxy)-3-methoxyphenyl]-1,2-propandiols <i>rac</i>-68	132
7.4.3.1	Synthese von 2-[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]ethanol 56	132
7.4.3.2	Synthese von (<i>R,S</i>)-3-[4-(2-Hydroxyethoxy)-3-methoxyphenyl]-1,2-propandiol <i>rac</i> -68	133
7.4.4	Synthese des (<i>R,S</i>)-[9-(2-Oxo-1,3-dioxolan-4-yl)nonyl]-1<i>H</i>-imidazol-1-carboxylats <i>rac</i>-72	135
7.5	Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung an fester Phase	137
7.5.1	Darstellung des [4-(Hydroxymethyl)phenoxy]methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) (<i>Wang</i> -Harz) 47	137
7.5.2	Anknüpfungen der Olefine an die festen Träger	138
7.5.2.1	Synthese des (<i>E</i>)-[4-[[[2-Phenylethenyl)phenoxy]acetyl]oxy]methyl]phenoxy]methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) 49	138
7.5.2.2	Synthese des an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisierten (<i>E</i>)- <i>O</i> -[[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]acetyl]oligoethylenglycols 50	139
7.5.2.3	Synthese des [4-[[[(1-Oxo-10-undecenyl)oxy]methyl]phenoxy]methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) 51	140
7.5.2.4	Synthese des an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisierten <i>O</i> -(1-Oxo-10-undecenyl)oligoethylenglycols 52	141

7.5.2.5	Synthese des [4-[[[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]acetyl]oxy]methyl]phenoxy]methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) 53	142
7.5.2.6	Quantifizierung der immobilisierten Alkene 31 , 32 und 33 an den polymeren Trägern 49 , 50 , 51 , 52 und 53	143
7.5.3	Dihydroxylierungen der am Polymer gebundenen Olefine	144
7.5.3.1	Dihydroxylierung von (<i>E</i>)-[4-[[[2-Phenylethenyl]phenoxy]acetyl]oxy]methyl]phenoxy]methyliertem Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) 49	144
7.5.3.2	Dihydroxylierung von an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisiertem (<i>E</i>)- <i>O</i> -[[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]acetyl]oligoethylenglycol 50	145
7.5.3.3	Dihydroxylierung von [4-[[[1-Oxo-10-undecenyl]oxy]methyl]phenoxy]methyl]phenoxy]methyliertem Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) 51	146
7.5.3.4	Dihydroxylierung von an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisiertem <i>O</i> -(1-Oxo-10-undecenyl)oligoethylenglycol 52	147
7.5.3.5	Dihydroxylierung von [4-[[[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]acetyl]oxy]methyl]phenoxy]methyliertem Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) 53	148
7.5.4	Allgemeine Vorschrift für die Freisetzung der Dihydroxylierungsprodukte von den polymeren Trägern	149
7.5.5	Synthese des Diastereomeregemisches von {4-[(<i>R</i>)-10,11-Bis((<i>R</i>)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyloxy)undecanoylmethyl]phenoxy}methyliertem Polymer 69 und {4-[(<i>S</i>)-10,11-Bis((<i>R</i>)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyloxy)undecanoylmethyl]phenoxy}methyliertem Polymer 70	152
7.5.6	Synthese der Bis-Mosher-Ester 183 und 184	154
7.5.6.1	Synthese von (<i>R,S</i>)-Undecan-1,2-diol <i>rac</i> - 185	154
7.5.6.2	Synthese des Diastereomeregemisches von (<i>R</i>)-1,2-Bis((<i>R</i>)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyloxy)undecan 183 und (<i>S</i>)-1,2-Bis((<i>R</i>)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyloxy)undecan 184	156
7.6	Synthese der Aldehydbausteine mit Carbonsäurefunktion für die Bibliothekssynthese	158
7.6.1	Synthese der (4-Formylphenoxy)essigsäure 74	158
7.6.2	Synthese der (4-Formyl-2-methoxyphenoxy)essigsäure 84	159
7.6.3	Synthese der (3-Formylphenoxy)essigsäure 86	160

7.7	Wittig-Reaktion an Polyethylenglycolmonomethylether	162
7.7.1	Synthese von <i>O</i> -[(4-Formylphenoxy)acetyl]- <i>O'</i> -methylpolyethylenglycol 75	162
7.7.2	Synthese von <i>O</i> -Methyl- <i>O'</i> -[(4-vinylphenoxy)acetyl]polyethylenglycol 76	163
7.8	Synthese von zwei mit Peptiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken an Amino-TentaGel™	164
7.8.1	Synthese der codierten Ligandenbibliothek 108	164
7.8.1.1	Synthese des Trialanin-Spacers 78	164
7.8.1.2	Aufbau der kombinatorischen Tripeptideinheit 83 der Liganden	165
7.8.1.3	Anknüpfen der codierten Aldehydbausteine 84, 85, 86 und 74	166
7.8.1.4	Aufbau der codierten Olefineinheit der Liganden	168
7.8.1.5	Modifizierung der Olefineinheiten der Liganden	170
7.8.1.5.1	Entschützung der Silylester 98	170
7.8.1.5.2	Anknüpfung verschiedener Aminosäureester an 100	172
7.8.1.5.3	Aufbau einer weiteren kombinatorischen Tripeptideinheit an die Liganden mit Aminofunktionen 102	174
7.8.1.6	Dihydroxylierung und Abspaltung der Schutzgruppen der Unterbibliotheken 97, 99, 101 und 103	176
7.8.2	Synthese der codierten Ligandenbibliothek 128	178
7.8.2.1	Anknüpfung und Codierung der Olefine an die kombinatorische Tripeptideinheit 83 der Liganden	178
7.8.2.2	Modifizierung der Olefineinheiten der Liganden	182
7.8.2.2.1	Anknüpfung verschiedener Aminosäureester an 125	182
7.8.2.3	Dihydroxylierung und Abspaltung der Schutzgruppen der Unterbibliotheken 125, 126 und 127	184
7.9	Screening der Hydroxyligandenbibliothek 108 nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen mit Bis(4-nitrophenyl)phosphat 19 in Mikrotitrationsplatten	188
7.10	Synthese des Testsubstrates 35 für das Berlinerblau Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen	191
7.10.1	Synthese des (4-Nitrophenyl)-phosphorodichloridats 142	191
7.10.2	Synthese von (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat 35	192

7.11	Berlinerblau Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen	193
7.11.1	Anknüpfung von 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl 136 an TentaGel™-COOH 137	193
7.11.2	Entwicklung des mit 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl beladenen TentaGels™ 138	194
7.11.3	Screening der Bibliothek 128 mit dem Testsubstrat 35	195
7.12	Kresylviolett Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen	198
7.12.1	Anknüpfung von 3-Phosphonopropionsäure 147 an Amino-TentaGel™ 77	198
7.12.2	Anknüpfung von (4-Nitrophenyl)-phosphorodichloridat 142 an Hydroxy-TentaGel™ 48	198
7.12.3	Anknüpfung von (2-Naphthyl)-phosphorodichloridat 43 an Hydroxy-TentaGel™ 48	199
7.12.4	Anfärben der polymergebundenen Phosphorsäurediester 149 und 150 sowie der polymergebundenen Phosphonsäure 148 mit Kresylviolett Acetat 36	200
7.12.5	Screening der Bibliothek 128 nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen mit dem Testsubstrat Bis(4-nitrophenyl)phosphat 19 und Kresylviolett Acetat 36	200
7.13	Synthese der positiven Liganden aus den beiden Screeningverfahren und deren photometrische Aktivitätskontrolle auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität	202
7.13.1	Synthese der positiven Liganden aus dem Berlinerblau Screeningverfahren an Amino-TentaGel™	202
7.13.1.1	Synthese von ($\{N^{\alpha}$ -[(2R,3S)-2,3-Dihydroxy-3-(pentafluorphenyl)propionyl]-L-arginyl-L-lysyl-L-histidyl}amino)-TentaGel™ 153	203
7.13.1.2	Synthese von ($\{N^{\alpha}$ -[(2S,3R)-2,3-Dihydroxy-3-(pentafluorphenyl)propionyl]-L-arginyl-L-arginyl-L-arginyl}amino)-TentaGel™ 154	204
7.13.1.3	Synthese von ($\{N^{\alpha}$ -[(2R,3R)-3-Carboxy-2,3-dihydroxypropionyl]-L-arginyl-L-histidyl-L-arginyl}amino)-TentaGel™ 155	206
7.13.1.4	Synthese von ($\{N^{\alpha}$ -[(2R,3S)-2,3-Dihydroxy-3-(pentafluorphenyl)propionyl]-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl}amino)-TentaGel™ 156	208

7.13.2	Synthese des positiven Liganden ($\{N^\alpha\text{-}[(2R,3S)\text{-}2,3\text{-Dihydroxy-}3\text{-}(3\text{-pyridyl})\text{propionyl}]\text{-L-histidyl-L-lysyl-L-histidyl}\}$ amino)-TentaGel™ 157 aus dem Kresylviolett Screeningverfahren	210
7.13.3	Photometrische Kontrolle der künstlichen Phosphorsäure-diesterase-Aktivität der Liganden aus den beiden Screeningverfahren	211
7.13.3.1	Aktivitätstest der Liganden 154 und 155 ohne Metall und des Liganden 156 in der kupferkatalysierten Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)-phosphat 19	211
7.13.3.2	Aktivitätstest der Liganden 153 und 157 in der zinkkatalysierten Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat 19	213
7.13.3.3	Aktivitätstest der Liganden 153, 154, 155, 156 und 157 in der europiumkatalysierten Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat 19	214
7.14	Synthese der vereinfachten Liganden an Amino-TentaGel™ und deren photometrische Aktivitätskontrolle auf künstliche Phosphorsäure-diesterase-Aktivität	215
7.14.1	Vereinfachung des Liganden ($\{N^\alpha\text{-}[(2R,3S)\text{-}2,3\text{-Dihydroxy-}3\text{-}(3\text{-pyridyl})\text{propionyl}]\text{-L-histidyl-L-lysyl-L-histidyl}\}$amino)-TentaGel™ 157	215
7.14.1.1	Vereinfachung des Liganden 157 vom aminoterminalen Ende aus	215
7.14.1.2	Aktivitätstest von an Amino-TentaGel™ 77 immobilisiertem Arginin und Lysin	218
7.14.2	Vereinfachung des Liganden ($\{N^\alpha\text{-}[(2R,3S)\text{-}2,3\text{-Dihydroxy-}3\text{-}(\text{pentafluorphenyl})\text{propionyl}]\text{-L-arginyl-L-lysyl-L-histidyl}\}$amino)-TentaGel™ 153	220
7.14.2.1	Vereinfachung des Liganden 153 vom aminoterminalen Ende aus	220
7.14.2.2	Vereinfachung des Liganden 168 vom carboxyterminalen Ende aus	223
7.14.2.3	Vereinfachung des Liganden 168 durch Deletion	226
7.14.2.4	Vereinfachung des Liganden 168 durch Substitution	229
7.15	Photometrische Aktivitätskontrolle der abgespaltenen Liganden auf künstliche Phosphorsäure-diesterase-Aktivität	232
7.15.1	Abgespaltene Liganden der europiumkatalysierten Hydrolyse	232
7.15.1.1	Photometrische Aktivitätskontrolle von Histidin 164 und Histidinamid 165 auf künstliche Phosphorsäure-diesterase-Aktivität	232
7.15.1.2	Synthese von α -Methyl- ω -(L-histidylamino)poly(oxyethylen) 166	234
7.15.2	Abgespaltener Ligand der zinkkatalysierten Hydrolyse	236

7.15.2.1	Photometrische Aktivitätskontrolle von N^{ϵ} -((<i>E</i>)-2,3,4,5,6-Pentafluor-cinnamoyl)-L-arginyl-L-lysyl-L-histidin 178 auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität	236
7.16	Synthese der beiden Fluoreszenz-Reporter 40 und 41 für Phosphorsäurediesterase-Aktivität	238
7.16.1	Synthese des Fluoreszenz-Reporters 40	238
7.16.1.1	Darstellung von (1-Naphthalinyl)-phosphorodichloridat 42	238
7.16.1.2	Synthese des (1-Naphthalenyl)[4-(phenylazo)phenyl]hydrogenphosphats 40	239
7.16.2	Synthese des Fluoreszenz-Reporters 41	241
7.16.2.1	Darstellung von (2-Naphthalinyl)-phosphorodichloridat 43	241
7.16.2.2	Synthese des (2-Naphthalenyl)[4-(phenylazo)phenyl]hydrogenphosphats 41	242
7.17	Enzymatische Spaltung der Fluoreszenz-Reporter 40 und 41 durch natürliche Phosphorsäurediesterasen	244
7.17.1	Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 40	244
7.17.1.1	Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 40 durch Phosphorsäurediesterase I (crotalus atrox venom)	244
7.17.1.2	Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 40 durch Phosphorsäurediesterase I (Rinderdarmmucosa)	246
7.17.2	Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 41 durch Phosphorsäurediesterase I (Rinderdarmmucosa)	247
7.17.3	Kinetik der Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 41 durch Phosphorsäurediesterase I (Rinderdarmmucosa)	248
8	Anhang	250
8.1	Literaturverzeichnis	250
8.2	Abkürzungsverzeichnis	256
9	Anlagen	
9.1	Erklärung	
9.2	Publikationsliste	
9.3	Lebenslauf	
9.4	Formelzusammenstellung	

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mehrere Themenkomplexe bearbeitet, die schließlich zum Auffinden von zwei neuen künstlichen Phosphorsäurediesterasen führten. Im einzelnen waren dies die **Übertragung der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung auf festphasengebundene Olefine (1)**, die **Synthese zweier Hydroxyliganden-Bibliotheken und deren Verschlüsselung mit Peptid-Codes (2)** sowie die **Entwicklung zweier neuer Hochdurchsatz-Screeningverfahren nach katalytisch aktiven Liganden (3)** und die **eingehende Untersuchung der dadurch identifizierten Verbindungen (4)**. Zusätzlich wurden **zwei Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität synthetisiert und auf ihre Funktion hin überprüft (5)**.

Themenkomplex 1: Die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung konnte mit bis zu quantitativen Ausbeuten auf festphasengebundene Olefine übertragen werden. Dabei war die Wahl des Lösungsmittels entscheidend für den Erfolg der Reaktion. Lediglich mit einem Gemisch aus THF : Wasser (1:1) konnte mit $K_3[Fe(CN)_6]$ als terminalem Oxidationsmittel ein Umsatz erreicht werden.

Die dabei erzielten Enantioselektivitäten zeigten, daß sich nur Olefine, die in Lösung nahezu enantiomerenrein dihydroxyliert werden können (z. B. (*E*)-Stilbene), auch an der Festphase mit sehr hohen Enantiomerenüberschüssen umsetzen lassen (Abbildung 1.1).

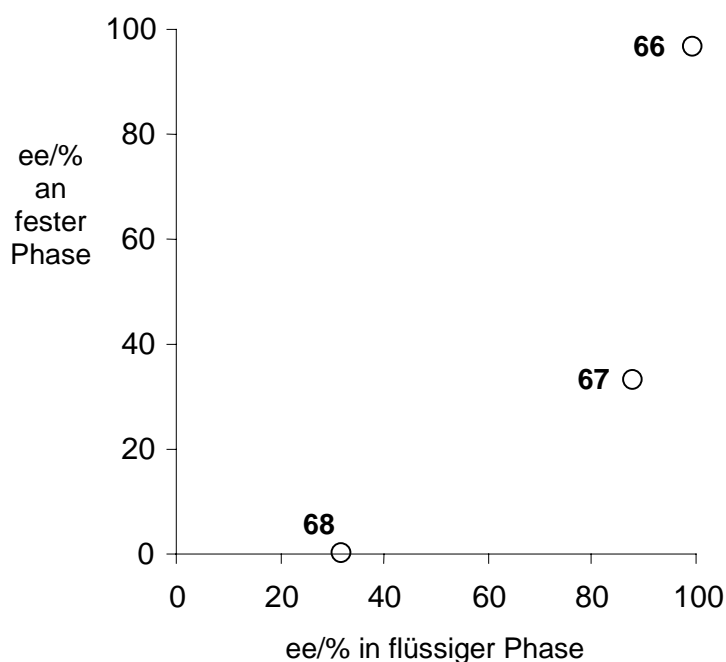


Abb. 1.1: Enantioselektivitäten der asymmetrischen Dihydroxylierung in Lösung und an fester Phase

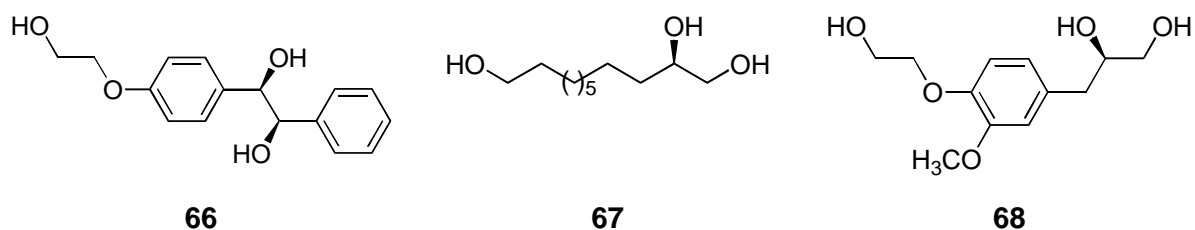


Abb. 1.2: Vom Polymer abgespaltene Produkte der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung an fester Phase

Themenkomplex 2: An Amino-TentaGel™ konnten zwei Hydroxyliganden-Bibliotheken synthetisiert und durch Peptid-Codes eindeutig verschlüsselt werden. Die beiden Bibliotheken bestanden formal aus 4320 (Bibliothek **108**) bzw. 1458 Verbindungen (Bibliothek **128**) und hatten folgenden Aufbau:

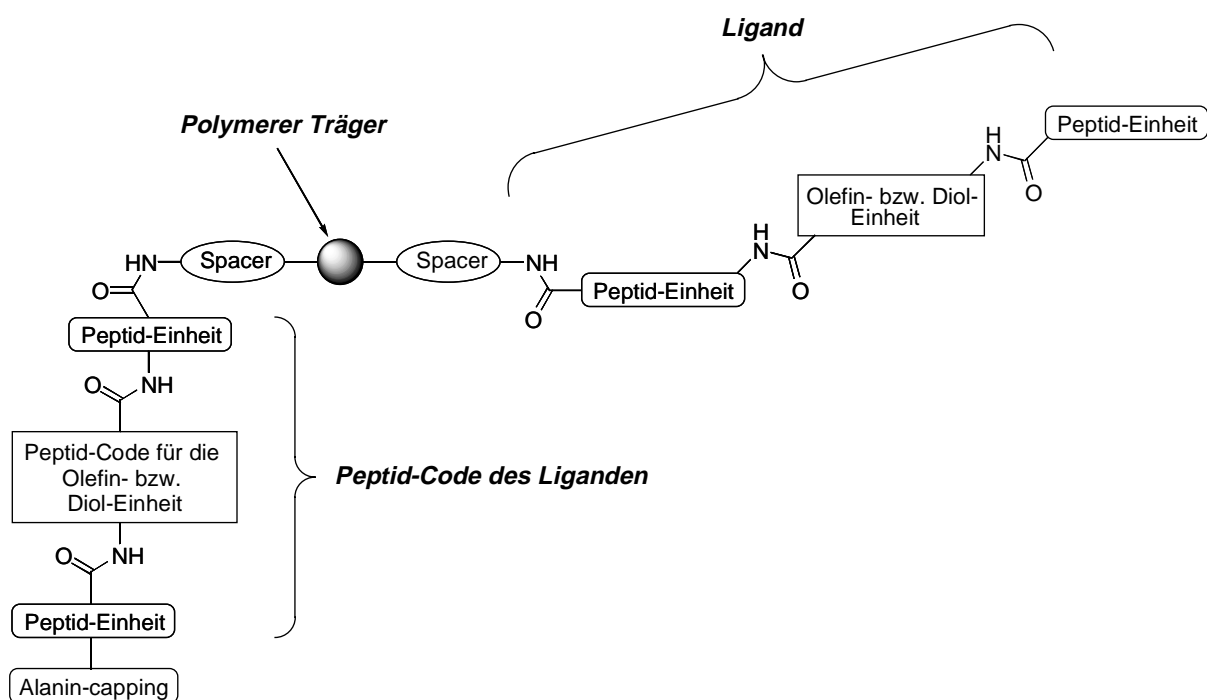


Abb. 1.3: Konzeptioneller Aufbau der Ligandenbibliotheken

Themenkomplex 3: Es wurden zwei Hochdurchsatz-Screeningverfahren entwickelt, die das batchweise Suchen nach Liganden mit künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität in kombinatorischen Verbindungsbibliotheken erlauben. Das Berlinerblau Screening ermöglichte das Isolieren von positiven Polymerpartikeln durch deren blaue Färbung, während beim Kresylviolett Screening zu der blauen Färbung noch die rote Fluoreszenz der positiven Polymerkügelchen zur Detektion genutzt wurde.

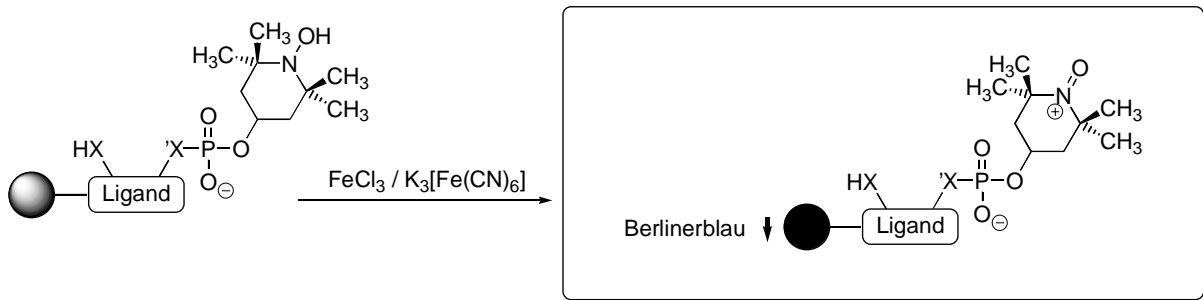


Abb. 1.4: Berlinerblau Test auf aktive Liganden, $X, X' = \text{nucleophile Gruppen, wie O, NH}$

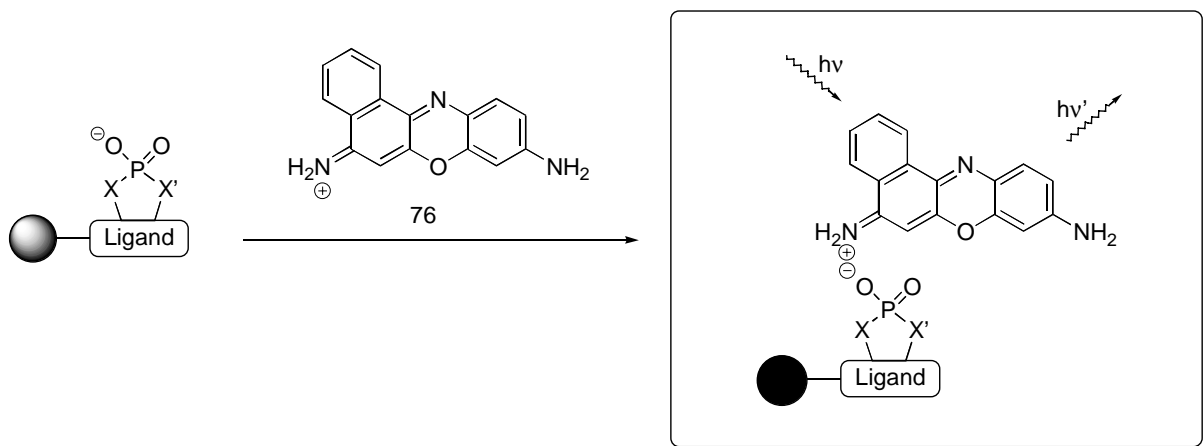


Abb. 1.5: Kresylviolett **76** als Sonde für aktive Liganden, $X, X' = \text{nucleophile Gruppen, wie O, NH}$

Themenkomplex 4: Aus der Bibliothek **128** konnten mit Hilfe der beiden neuen Hochdurchsatz-Screeningverfahren die zwei Liganden **143** und **151** ermittelt werden, die nach Komplexierung an Zn^{2+} (**143**) bzw. Eu^{3+} (**151**) künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität zeigten.

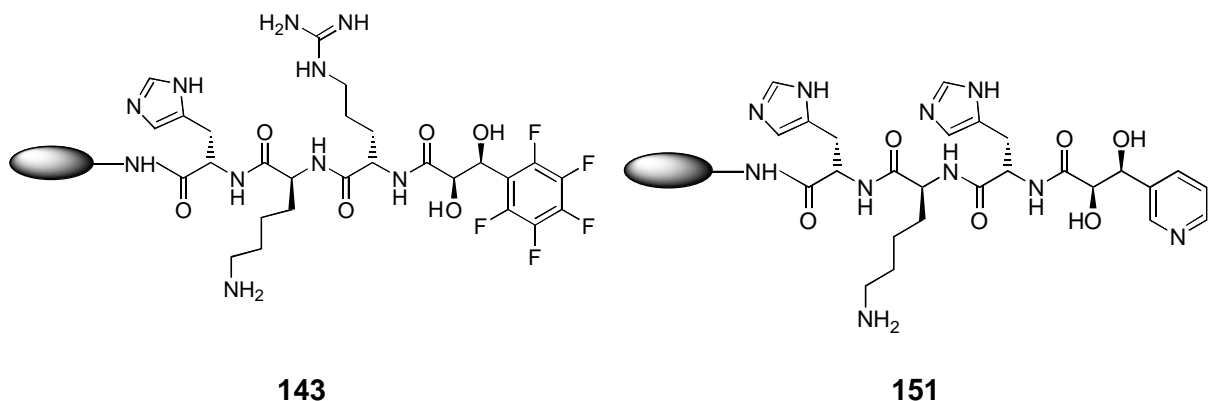


Abb. 1.6: Aktive Liganden für die zink- bzw. europiumkatalysierte Phosphorsäurediester-Hydrolyse

Diese Liganden wurden systematisch variiert, um die kleinsten für die Phosphorsäurediesterase-Aktivität nötigen Einheiten zu ermitteln. Dadurch konnten die beiden vereinfachten

Liganden **158** (aus **151**, Eu^{3+}) und **168** (aus **143**, Zn^{2+}) erhalten werden.

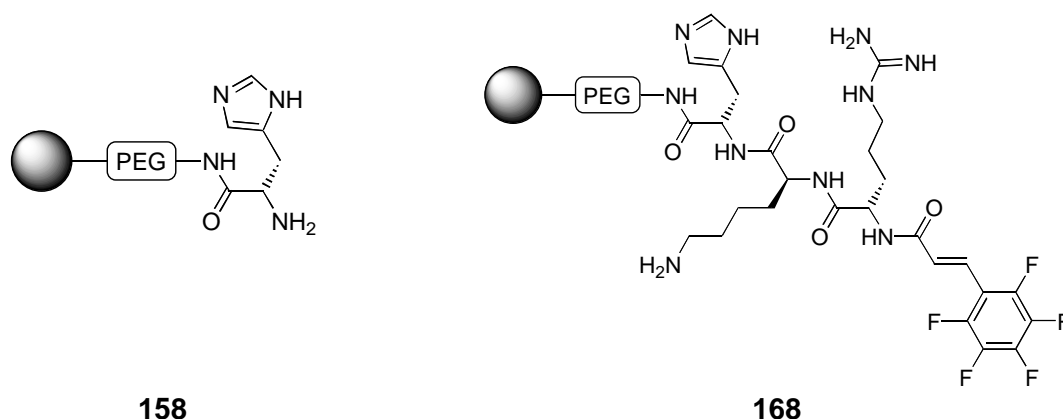


Abb. 1.7: Vereinfachte aktive Liganden für die zink- bzw. europiumkatalysierte Phosphorsäurediester-Hydrolyse

Die Beschleunigungen für die Hydrolyse des Phosphorsäurediesters Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** betragen im Falle des Liganden **168** den Faktor 2.5 bei $\text{pH} = 8.0$ für die zinkkatalysierte und im Falle des Liganden **158** den Faktor 4 bei $\text{pH} = 7.0$ für die europiumkatalysierte Variante. Im Vergleich zu der Hydrolyse des Testsubstrates **19** ohne Metallsalzzugabe ergaben sich durch die Zink- bzw. Europiumkomplexe Steigerungen der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 10 (Zn^{2+} mit **168**) bzw. 100 (Eu^{3+} mit **158**).

Themenkomplex 5: Es konnten zwei Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität synthetisiert und auf ihre Funktion hin untersucht werden. Die beiden Phosphorsäurediester **40** und **41** fluoreszieren wegen intramolekularer Fluoreszenzlöschung nicht. Während der Hydrolyse der Testsubstrate beginnen die Reaktionslösungen dagegen stark zu fluoreszieren, was im Falle von **41** zu einem mindestens tausendfachen Anstieg der Fluoreszenzintensität führt.

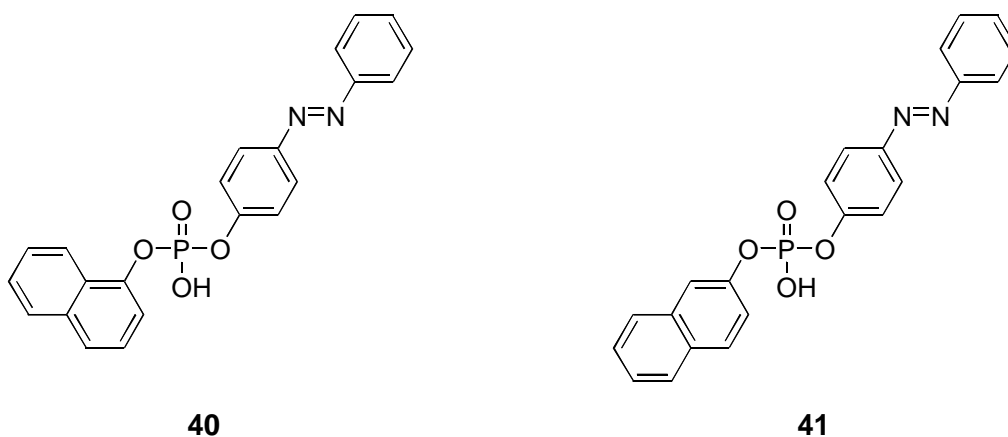


Abb. 1.8: Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität

2 Einleitung

Der weltweite Tagesumsatz des Koronartherapeutikums Nifedipin (Handelsname Adalat[™], Bayer AG, Leverkusen) beträgt derzeit rund 5.5 Millionen Mark. Bedenkt man, daß *Friedrich Bossert* in der Mitte unseres Jahrhunderts 16 Jahre (1948-1964) benötigte, um den Wirkstoff zu finden, und es danach noch zehn Jahre dauerte, bis das Medikament auf dem Markt war, so leuchtet es ein, daß vor allem Pharmaunternehmen aus ökonomischen Gründen daran interessiert sind, die Zeit für die Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen zu verkürzen.^[1]

Um dieses Ziel zu erreichen, bedienen sich Pharmaunternehmen dabei heute mehr und mehr Methoden, die unter dem Begriff „kombinatorische Chemie“ Einzug in die Laboratorien und die chemische Fachliteratur gehalten haben.^[2] Grundlage des kombinatorischen Ansatzes ist ein Paradigmenwechsel in der Wirkstoffsuche. Während die Suche nach neuen Wirkstoffen nach klassischem Verfahren (so auch zu Zeiten *Friedrich Bosserts*) darin bestand, einzelne Verbindungen nacheinander zu synthetisieren und auf ihren therapeutischen Nutzen hin zu untersuchen, werden heute mit kombinatorischen Methoden ganze Substanzbibliotheken hergestellt und diese danach mit Hilfe eines entsprechenden Screeningverfahrens nach interessanten Verbindungen durchsucht.

Neben dem rein ökonomischen Antrieb, kombinatorische Verbindungsbibliotheken herzustellen, sind diese aber auch unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten interessant. Durch die mitunter enorm hohe Anzahl an verschiedenen Verbindungen in einer solchen Substanzbibliothek lassen sich Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von einzelnen Vertretern dieser Bibliotheken für ein spezifisches Problem sehr viel schneller entdecken und optimieren, als dies durch Einzelsubstanzsynthese gelingt.

So konnten mit kombinatorischen Verbindungsbibliotheken bereits neue Supraleiter,^[3] Komplexbildner,^[4] Katalysatoren^[5-11] und Substanzen mit interessanten Lumineszenzeigenschaften^[12] entwickelt werden.

Da besonders die Entwicklung von neuen Katalysatoren einer zeit- und kostenintensiven Optimierung der Katalysatorstruktur bedarf, soll mit dieser Arbeit ein Beitrag zur schnellen Synthese von effizienten Katalysatoren mit Hilfe der kombinatorischen Chemie geleistet werden.

3 Kennnisstand

3.1 Kombinatorische Chemie

3.1.1 Prinzipien der kombinatorischen Chemie

Unter dem Begriff „kombinatorische Chemie“^[13] versteht man heute den Ansatz, bei der Suche nach Verbindungen, die eine bestimmte Eigenschaft aufweisen (z. B. Bindung an einen Rezeptor), nicht mehr Einzelverbindungen, sondern eine große Anzahl von Verbindungen (Substanzbibliotheken) zu synthetisieren und diese Bibliotheken danach nach Vertretern mit der gewünschten Eigenschaft zu durchsuchen.^[2a]

Die Herstellung solcher Substanzbibliotheken gelingt dadurch, daß man bei mehrstufigen Synthesen in einer Synthesestufe nicht nur einen Baustein, sondern viele verschiedene einsetzt. Die vier Bausteine A, B, C und D lassen sich klassisch zu einem Produkt ABCD umsetzen; verwendet man dagegen jeweils zehn verschiedene Bausteine der Typen A, B, C und D, so erhält man kombinatorisch die Substanzbibliothek $A^n B^n C^n D^n$, die nach vier Syntheseschritten bereits 10000 Verbindungen umfaßt.

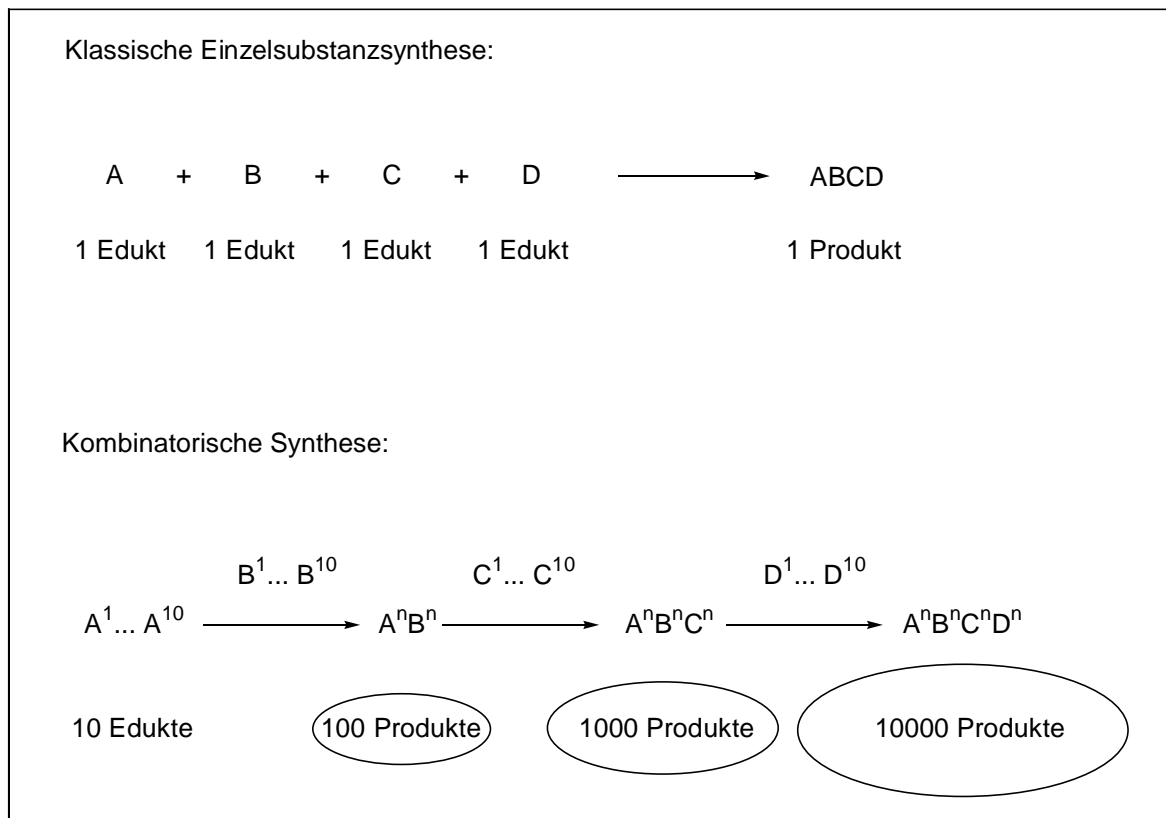


Abb. 3.1.1: Einzelsubstanz versus Substanzbibliothek^[2a]

Solche Substanzbibliotheken lassen sich sowohl in Lösung als auch an festen Trägermaterialien synthetisieren; die jeweiligen Vor- und Nachteile beider Methoden werden in Kapitel 3.1.2 noch eingehend erörtert.

Die kombinatorische Synthese im engeren Sinne ist ferner abzugrenzen von der „verwandten“ Methode, Bibliotheken parallel zu synthetisieren. Der entscheidende Unterschied dieser beiden Methoden liegt in der Anzahl der Reaktionsschritte, die zum Aufbau von gleich großen Bibliotheken nötig sind. Dies sei am Beispiel des Aufbaues einer Bibliothek von 16 Dipeptiden aus vier Aminosäuren A, B, C und D erläutert:

Bei der Parallelsynthese, die zuerst von Peptidchemikern wie *Geysen*^[14] und *Houghton*^[15] angewandt wurde, werden die Vertreter der Bibliothek räumlich voneinander getrennt hergestellt. Dies geschieht zum Beispiel - wie in Abbildung 3.1.2 dargestellt - in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten. Zuerst wird ein polymerer Träger vorgelegt, der danach reihenweise mit den vier Aminosäurebausteinen beladen wird. Nach der Reaktion werden überschüssige Reagenzien ausgewaschen und in der zweiten Synthesestufe die vier Aminosäurebausteine nun spaltenweise mit dem Polymer zur Reaktion gebracht. So entstehen 16 Dipeptide, die durch ihre Position auf der Mikrotiterplatte eindeutig charakterisiert sind. Dazu sind zwei Synthesestufen à 16 Reaktionen nötig, was 32 Reaktionsschritte für den Aufbau der Bibliothek ergibt.

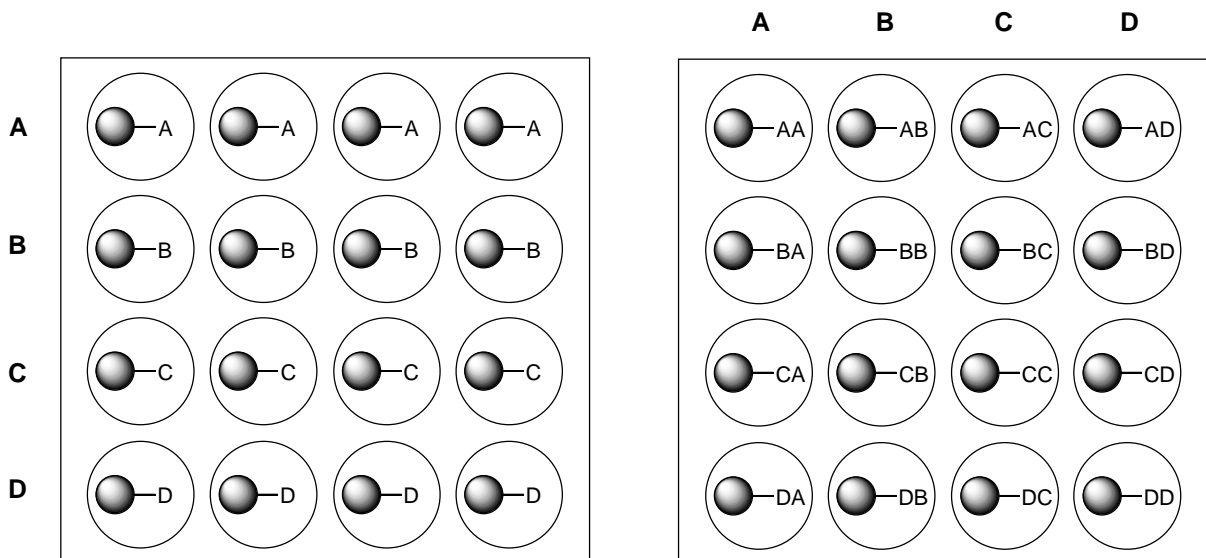


Abb. 3.1.2: Parallelsynthese

Furka^[13, 16] entwickelte dagegen eine Methode der Festphasensynthese, unter der man heute das kombinatorische Syntheseverfahren im engeren Sinne versteht. Es handelt sich dabei um die Split-Mix-Synthese.^[17, 18] Dabei werden wesentlich weniger Reaktionsschritte benötigt als bei der Parallelsynthese einer entsprechenden Bibliothek. Dies erreicht man

dadurch, daß man nach der Umsetzung mit den ersten Basismolekülen die gesamte Polymermenge mischt, danach aufteilt und nochmals mit den Basismolekülen umsetzt. An jedem Polymerkügelchen befindet sich am Ende der Synthese eine definierte Verbindung in mehrfacher Kopie („one bead - one compound approach“), wobei man für die untenstehende Bibliothek lediglich acht Reaktionsschritte benötigt (zwei Synthesestufen à vier Reaktionen). Bei entsprechend großen Sätzen von Basismolekülen lassen sich mit der Split-Mix-Synthese sehr schnell äußerst umfangreiche Substanzbibliotheken herstellen, allerdings sind die einzelnen Vertreter nicht durch ihre Position in den Reaktionsgefäßen definiert.

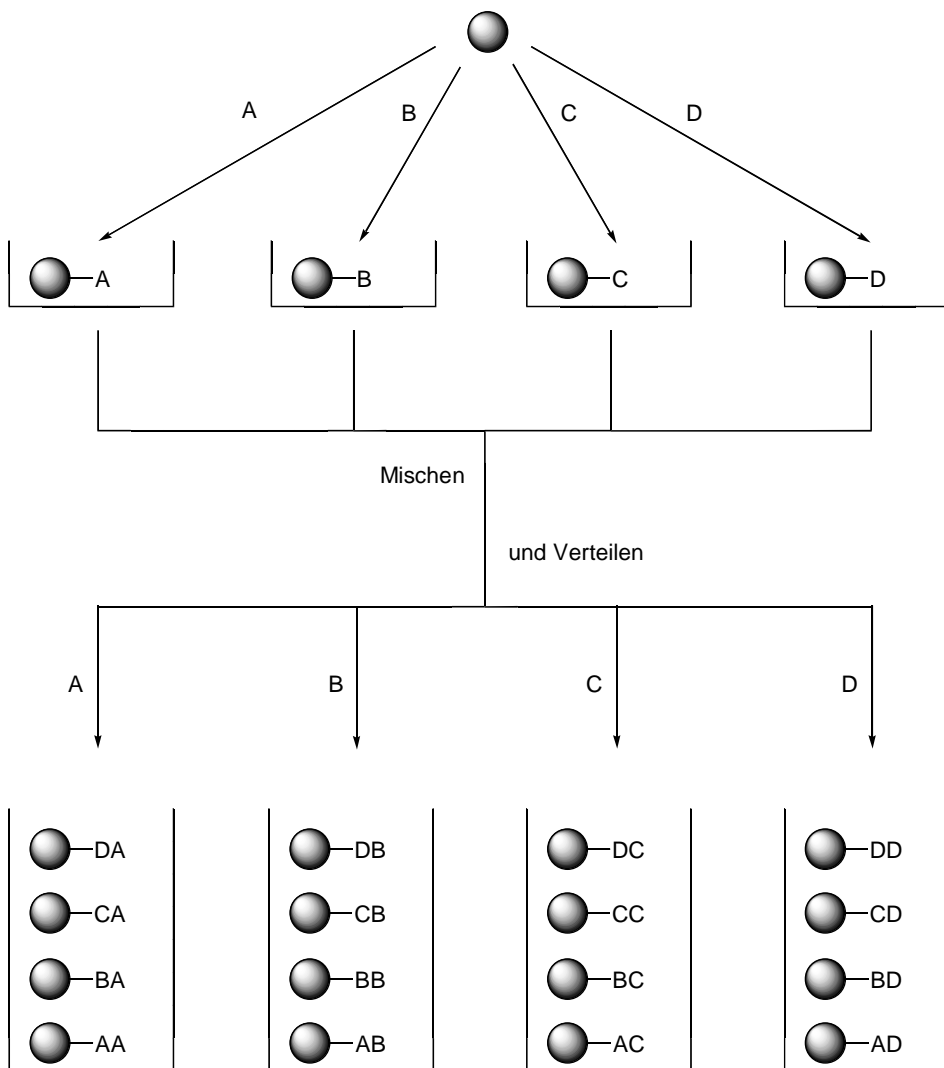


Abb. 3.1.3: *Split-Mix-Synthese*

3.1.2 Techniken der kombinatorischen Chemie: Bibliothekssynthesen in flüssiger und an fester Phase

Substanzbibliotheken lassen sich sowohl in Lösung als auch an fester Phase synthetisieren, wobei die Synthese an einem festen Träger bevorzugt wird, da dadurch leicht eine vollständige Automatisierung der kombinatorischen Synthese erreicht werden kann. Allerdings ist der Entwicklungsstand für die Synthese von niedermolekularen organischen Verbindungen an der Festphase noch weit von dem auf den Gebieten der Peptid- und Nucleotidchemie entfernt. In Tabelle 3.1.1 sind die wichtigsten Vor- und Nachteile von kombinatorischer Festphasen- und Flüssigphasensynthese aufgeführt.

Tab. 3.1.1: *Kombinatorische Synthese in Lösung bzw. an fester Phase^[2a]*

	Kombinatorische Synthese an fester Phase	Kombinatorische Synthese in flüssiger Phase
Vorteile	<p>Reagenzien können im Überschuß eingesetzt werden, um die Reaktion vollständig ablaufen zu lassen.</p> <p>Die Reaktionsprodukte werden durch einfaches Waschen des Trägers gereinigt.</p> <p>Die vollständige Automatisierung von Reaktionssequenzen ist leicht möglich.</p> <p>Die Split-Mix-Synthese kann angewendet werden.</p>	<p>Prinzipiell sind alle organischen Reaktionen einsetzbar.</p> <p>Die bekannten Reaktionsbedingungen können direkt auf die kombinatorische Synthese übertragen werden.</p> <p>Probleme durch Linker und polymere Träger entfallen.</p> <p>Die Substanzen lassen sich in beliebigen Mengen herstellen.</p>
Nachteile	<p>Der Entwicklungsstand von Reaktionen an festen Phasen ist im Vergleich zu Flüssigphasensynthesen gering.</p> <p>Es ergeben sich zusätzliche Reaktionschritte durch das Knüpfen an und das Abspalten vom Träger.</p> <p>Die Linker und die polymeren Träger schränken die Zahl der durchführbaren Reaktionen ein.</p> <p>Die analytischen Methoden sind bisher wenig ausgearbeitet.</p>	<p>Reagenzien können nicht ohne zusätzliche Aufarbeitung im Überschuß eingesetzt werden.</p> <p>Die Reinigung der Reaktionsprodukte durch Automatisierung ist schwierig.</p>

Für die kombinatorische Synthese von Substanzbibliotheken in Lösung^[19] bieten sich Eintopfreaktionen bzw. Mehrkomponentenreaktionen an. Diese ermöglichen einen schnellen Zugang zu sehr komplexen Mischungen, in denen die einzelnen Verbindungen aber in unterschiedlichen Konzentrationen entstehen können.

Pirrung^[20] synthetisierte aus 9 Alkoholen und 6 Isocyanaten eine indizierte kombinatorische Bibliothek von 54 Carbamaten (siehe Kapitel 3.1.4.2 „Indizierte Bibliotheken“) in flüssiger Phase.

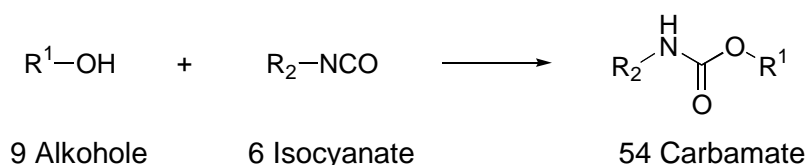


Abb. 3.1.4: Synthese einer Carbamat-Bibliothek

In dieser Bibliothek konnte er den neuen Acetylcholinesterase-Inhibitor **1** identifizieren.

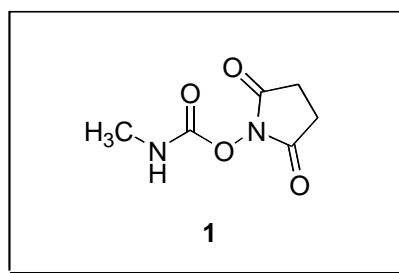


Abb. 3.1.5: Identifizierter Acetylcholinesterase-Inhibitor **1**^[20]

3.1.3 Festphasensynthese

3.1.3.1 Feste Träger und Linker für die organische Festphasensynthese

Bei der kombinatorischen Festphasensynthese sind die aufzubauenden Verbindungen während der Synthese über einen Linker an die feste Phase gebunden. Für das Gelingen einer Folge von Reaktionsschritten ist die Wahl sowohl des Trägers als auch des Linkers entscheidend.^[2a, 21] Das Trägermaterial bestimmt durch seine Quelleigenschaften vor allem das Spektrum der einsetzbaren Lösungsmittel, während der Linker die Bedingungen der Freisetzung der Reaktionsprodukte vom Träger vorgibt und damit auch die Reaktionsbedingungen, die während der Synthese zulässig sind.



Abb. 3.1.6: Organische Festphasensynthese

Als Trägermaterialien für die kombinatorische Chemie stehen mittlerweile eine Reihe fester Phasen zu Verfügung:^[22] Cellulose,^[23] Hexamethyldiaminpolyacryl-Harze,^[24] Glas^[25] oder mit Acrylsäure funktionalisierte Polyethylenstäbchen^[14a] wurden dabei ebenso verwendet, wie die weiter verbreiteten, mit 1% Divinylbenzol quervernetzten Polystyrol-Harze. Die ursprünglich von *Merrifield*^[26] eingeführten chlormethylierten, quervernetzten Polystyrol-Harze zeichnen sich durch gute Quelleigenschaften in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln aus und ergeben 500-1000 μmol Substanz pro Gramm Trägermaterial. Ein entscheidender Nachteil dieser Polystyrol-Harze ist allerdings die schlechte Quelleigenschaft in Wasser. Da das Screening nach bioaktiven Substanzen oft in Wasser durchgeführt wird, muß man einen anderen polymeren Träger verwenden, wenn die Bibliothek während des Screenings an der Festphase gebunden sein soll. Als Trägermaterial bietet sich hier ein mit Polyethylenglycol substituiertes, quervernetztes Polystyrol-Harz^[27] an, welches von der Firma *Rapp*, Tübingen, unter dem Handelsnamen TentaGel™ vertrieben wird. Dieser polymere Träger ist mit einer Reihe verschiedener funktioneller Gruppen (NH_2 , OH, SH, Br, COOH) erhältlich und quillt nicht nur in allen gängigen organischen Lösungsmitteln, sondern auch in Wasser. Die Beladung beträgt dabei etwa 200 μmol Substanz pro Gramm Träger.

Neben einem passenden Träger ist auch - entsprechend dem zu bearbeitenden Syntheseproblem - ein hierfür geeigneter Linker auszuwählen. In untenstehender Tabelle sind einige Linker exemplarisch aufgeführt:

Mit den Linkern von *Wang*, *Bachem* und *Rich* lassen sich jeweils Carbonsäuren am festen Träger immobilisieren. Die Abspaltung dagegen erfolgt unter jeweils unterschiedlichen Bedingungen. *Leznoff* konnte mit seinem Linker Aldehyde an die Festphase anknüpfen.

Ein interessanter Linker wurde von *Veber*^[32] entwickelt. Sein Arylsilyllinker **2** läßt nach der Abspaltung keine funktionelle Gruppe an der freigesetzten Substanz **3** zurück („traceless linker“).

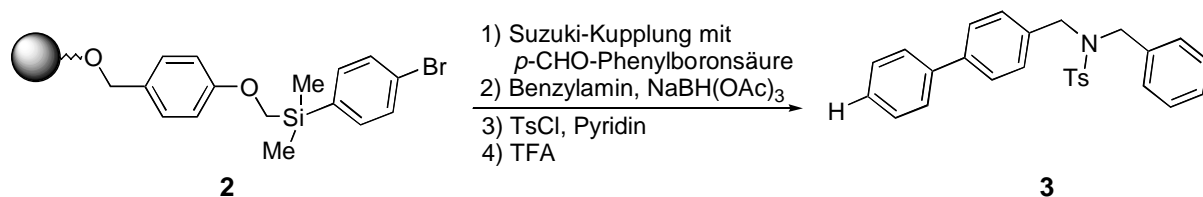


Abb. 3.1.7: „traceless linker“ nach Veber^[32]

Tab. 3.1.2: Diverse Linker für die organische Festphasensynthese

Autor	Wang ^[28]	Bachem ^[29]	Rich ^[30]	Leznoff ^[31]
Struktur				
Immobilisierung von	Carbonsäuren	Carbonsäuren	Carbonsäuren	Aldehyde
Abspaltung durch	95% TFA	1% TFA	<i>hν</i> (350 nm)	HCl/Dioxan

3.1.3.2 Synthesen an fester Phase

Die Oligonucleotid- und vor allem die von *Merrifield* eingeführte Peptidsynthese^[33] an festen Phasen haben einen sehr hohen Standard erreicht. Nachdem die Festphasensynthese als vorteilhaft für die kombinatorische Chemie entdeckt worden war, setzte eine Renaissance der Synthese von niedermolekularen Verbindungen an festen Trägern ein. Aufbauend auf den Arbeiten von *Frechet*^[34] und *Leznoff*^[35] sind in den letzten sechs Jahren fast alle gängigen organischen Reaktionen auf die Festphase übertragen worden, wenn auch teils nur in geringen Ausbeuten. Tabelle 3.1.3 gibt einen Überblick über die geleisteten Arbeiten.

Tab. 3.1.3: Auswahl von organischen Reaktionen an fester Phase^[36]

Auf die Festphasensynthese übertragene Reaktionstypen		
• Nichtpeptidische Amidierungen (z. B. Sulfonamide, Harnstoffe, Urethane)	• Kondensationsreaktionen (z. B. Aldol, <i>Knoevenagel</i>)	• Oxidationen (z. B. Epoxidierungen, Sulfoxidierungen)
• Aromatische Substitutionen (elektrophile und nucleophile)	• Diazotierungen	• Reduktionen (z. B. mit komplexen Borhydriden)
• Nukleophile Substitutionen	• Schutzgruppen-Techniken (z. B. Silylierungen)	• <i>Michael</i> -Additionen
• Enzymatische Reaktionen	• Grignard-Reaktionen	• Olefinierungen (<i>Horner-Emmons</i> , <i>Wittig</i>)
• Cycloadditionen (<i>Diels-Alder</i> , 1,3-dipolare)	• Mehrkomponentenreaktionen (<i>Ugi</i> , <i>Passerini</i>)	

Wie diese Reaktionen an der festen Phase zum Aufbau von Bibliotheken genutzt werden, zeigt die Pyrrolidinsynthese nach *Gallop*.^[37]

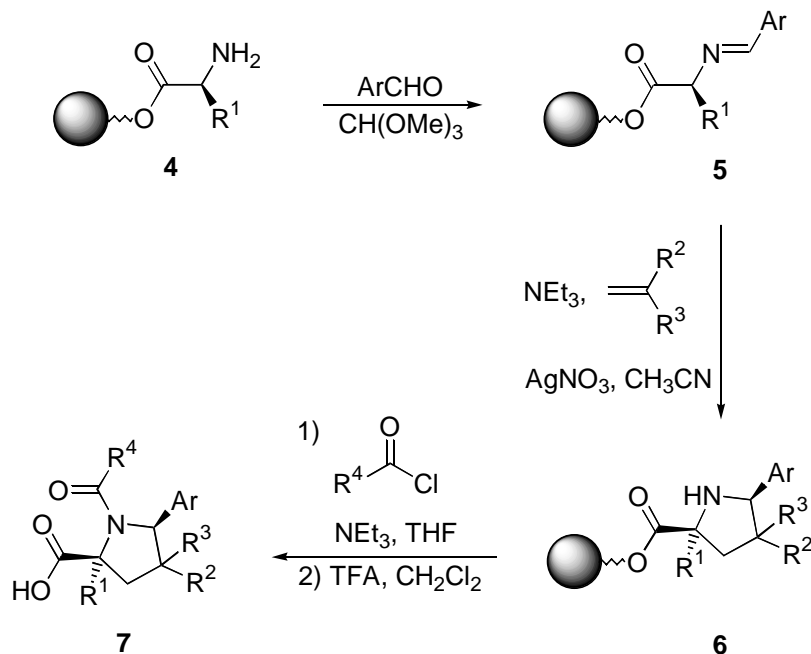


Abb. 3.1.8: Festphasensynthese von Pyrrolidinen nach *Gallop*.^[37]

Durch Kondensation von festphasengebundenen Aminosäuren **4** mit aromatischen und heteroaromatischen Aldehyden konnten Imine **5** gewonnen werden, die nach Deprotonierung

in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition mit Olefinen zu Pyrrolidinen **6** umgesetzt wurden. Diese konnten am Stickstoff noch nachträglich acyliert werden.

In dieser Bibliothek wurde ein neuer ACE¹-Inhibitor **8** identifiziert:

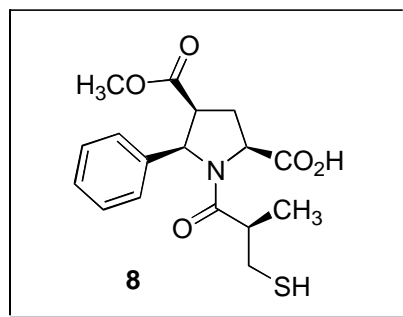


Abb. 3.1.9: Identifizierter ACE-Inhibitor **8**^[37]

3.1.3.3 Analytik von Reaktionen an fester Phase

Die zuverlässigste Methode, eine an der Festphase synthetisierte Substanz zu analysieren, ist die Abspaltung der Substanz vom festen Träger und die anschließende Charakterisierung mit den Standardmethoden der organischen Chemie. Da dies jedoch bei der Synthese einer Molekülbibliothek sehr zeitaufwendig werden kann, wurden verschiedene Methoden entwickelt, mit denen es möglich ist, die Umsetzung einer festphasengebundenen Substanz direkt am festen Träger zu analysieren.^[21]

Folgende Analysenmethoden stehen derzeit zu Verfügung:

- IR-Spektroskopie
- Elementaranalyse
- Gravimetrie
- Photometrie
- spezielle NMR-spektroskopische Techniken (z. B. ¹H-MAS²)^[38]
- Titration von reaktiven Gruppen
- Farbreaktionen auf spezielle funktionelle Gruppen (z. B. *Kaiser-Test*^[39] für Aminogruppen)

¹ Angiotensin-Konversionsenzym

² Magic Angle Spinning

Nach der Abspaltung vom festen Träger können ohne größeren Aufwand bestimmte Schutzgruppen photometrisch (z. B. die Fmoc-Schutzgruppe³) quantifiziert oder die synthetisierten Substanzen in Einzelfällen massenspektroskopisch (MALDI-TOF-MS⁴)^[40] analysiert werden.

3.1.4 Screeningverfahren

Zum Auffinden von aktiven Verbindungen in einer kombinatorischen Verbindungsbibliothek wurde eine Reihe von Screeningverfahren entwickelt:

3.1.4.1 Indizierte Bibliotheken

Für das Screening einer Bibliothek in flüssiger Phase bietet sich das Verfahren der indizierten (orthogonalen) Synthese an.^[20, 42] Dabei wird jedes Basismolekül A^n mit einer äquimolaren Mischung der Basismoleküle B^{1-x} und ebenso jedes Basismolekül B^m mit einer äquimolaren Mischung der Basismoleküle A^{1-y} umgesetzt. Da je zwei Mischungen somit eine Verbindung gemeinsam haben, ergibt sich die aktive Substanz als Schnittmenge der beiden aktiven Unterbibliotheken.

	B^1 A^{1-4}	B^2 A^{1-4}	B^3 A^{1-4}	B^4 A^{1-4}	B^5 A^{1-4}	B^6 A^{1-4}
A^1 B^{1-6}						
A^2 B^{1-6}						
A^3 B^{1-6}				A^3B^4		
A^4 B^{1-6}						

Abb. 3.1.10: Indizierte Substanzbibliothek

³ 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

⁴ Matrixunterstützte Laserdesorptions/-ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie

3.1.4.2 Affinitätsselektion

Bei der Suche nach Substanzen, die an einen Rezeptor binden, kann man die gesamte festphasengebundene Bibliothek mit dem entsprechenden Rezeptor inkubieren. Trägt der Rezeptor eine detektierbare Markierung (z. B. einen Farbstoff), so nehmen die Polymerpartikel an denen eine aktive Substanz gebunden ist, diese Markierung an und lassen sich somit isolieren.^[41]

3.1.4.3 Dekonvolution

Eine weitere Möglichkeit, aktive Substanzen in Mischungen zu identifizieren, bietet die iterative Dekonvolution.^[17] Dabei werden Unterbibliotheken der Gesamtbibliothek synthetisiert und diese Mischungen auf Aktivität getestet. In den Unterbibliotheken ist jeweils eine der zu besetzenden Positionen invariant. Die aktivste Unterbibliothek gibt somit das optimale Basismolekül an einer bestimmten Position an. Durch Wiederholung dieses Verfahrens kann man die optimale Kombination an Basismolekülen im Gesamtmolekül ermitteln.

Untersucht man zum Beispiel eine Bibliothek, die drei Variationsstellen A, B und C besitzt, die mit jeweils fünf Basismolekülen A^{1-5} , B^{1-5} und C^{1-5} besetzt werden können, so ergibt sich folgende iterative Dekonvolution nach der aktivsten Substanz:

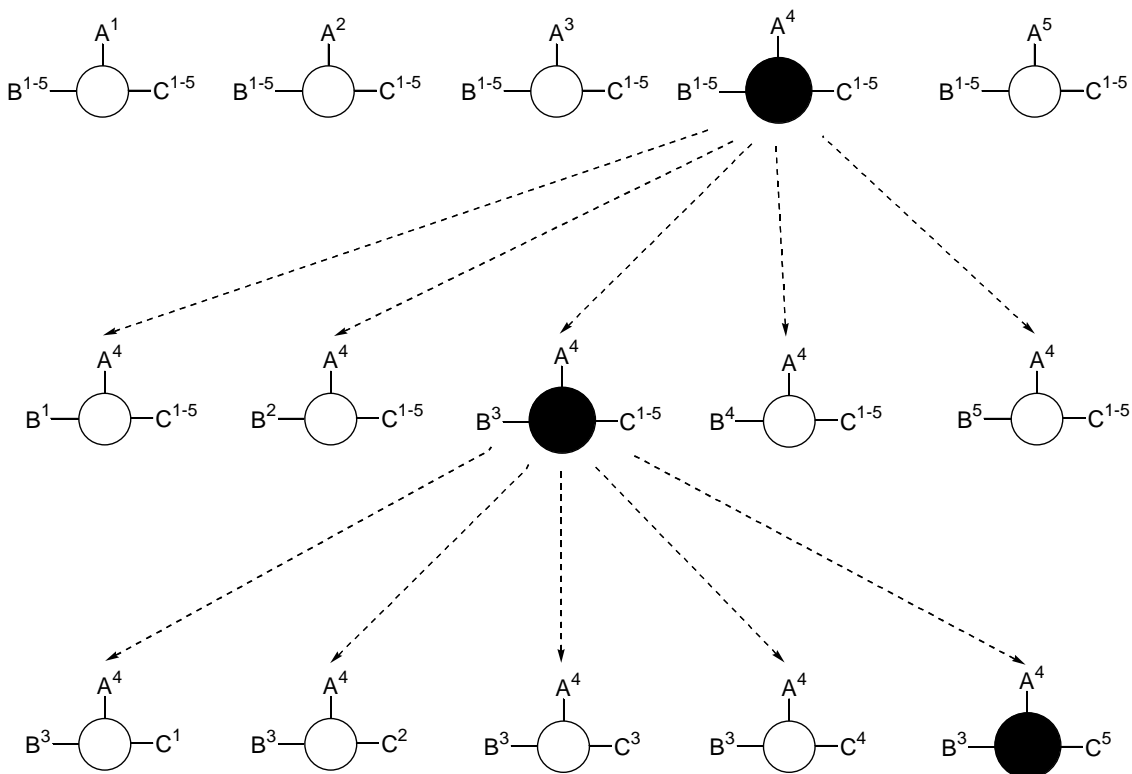


Abb. 3.1.11: Iterative Dekonvolution führt zur aktivsten Substanz $A^4B^3C^5$

3.1.4.4 Positionsanalyse

Anstatt die idealen Basismoleküle iterativ zu bestimmen, synthetisiert man bei der nichtiterativen Positionsanalyse^[43] die Gesamtbibliothek in Form von allen möglichen Unterbibliotheken, in denen jeweils ein Basismolekül konstant ist, während die anderen variiert werden. So erhält man für jedes Basismolekül eine aktivste Unterbibliothek; die aktivste Verbindung der Gesamtbibliothek setzt sich demnach aus den jeweils konstanten Basismolekülen der aktivsten Unterbibliotheken zusammen. Im Falle des obigen Beispiels würde die Gesamtbibliothek in 15 Unterbibliotheken der Form $A^1B^{1-5}C^{1-5}$, $A^2B^{1-5}C^{1-5}$... $A^5B^{1-5}C^{1-5}$; $B^1A^{1-5}C^{1-5}$, $B^2A^{1-5}C^{1-5}$... $B^5A^{1-5}C^{1-5}$; $C^1A^{1-5}B^{1-5}$, $C^2A^{1-5}B^{1-5}$... $C^5A^{1-5}B^{1-5}$ synthetisiert werden. Die aktivste Verbindung $A^4B^3C^5$ ergäbe sich aus den aktivsten Unterbibliotheken $A^4B^{1-5}C^{1-5}$, $B^3A^{1-5}C^{1-5}$ und $C^5A^{1-5}B^{1-5}$.

3.1.5 Strukturaufklärung der aktivsten Verbindungen aus kombinatorischen Bibliotheken

Nach der Identifizierung einer aktiven Verbindung aus einer Substanzbibliothek stellt sich das Problem ihrer Strukturaufklärung. Wurde die Substanz in einer parallel durchgeführten Synthese gefunden, so ist die Synthese-Geschichte dieser Substanz durch deren Synthesort eindeutig definiert. Stammt die Substanz allerdings aus einer nach der Split-Mix-Synthese aufgebauten kombinatorischen Bibliothek, so muß man zwei Fälle unterscheiden.

3.1.5.1 Direkte Strukturaufklärung

Die geringen Substanzmengen der aktiven Verbindungen auf einem Polymerpartikel (etwa 300 pm im Falle von TentaGelen™ mit einem Durchmesser von 130 µm bei einer Beladung von 0.3 mmol/g) erlauben nur in Ausnahmefällen die direkte Strukturaufklärung: Für Biomoleküle wie Peptide oder Nucleotide sind hochempfindliche Methoden der Strukturaufklärung vorhanden (Edman-Abbau und Massenspektrometrie für Peptide, Amplifizierung von Nucleotiden durch die Polymerase-Ketten-Reaktion und anschließende Sequenzierung).

3.1.5.2 Charakterisierung durch Codierungsmoleküle

Die Strukturen von niedermolekularen organischen Verbindungen lassen sich mit diesen geringen Mengen bisher nicht zuverlässig bestimmen. Diesem Problem begegnet man mit

Hilfe von codierten Bibliotheken (encoded combinatorial libraries). Dabei synthetisiert man im Laufe der Split-Mix-Synthese neben dem kombinatorischen Produkt auch einen molekularen Code auf jedem Polymerpartikel, der die Synthese-Geschichte aufzeichnet. Zuerst wurden Peptid^[44]- und Nucleotid-Sequenzen^[45] als molekulare Codes verwendet. Diese tolerieren allerdings nicht alle beliebigen Reaktionen während einer kombinatorischen Synthese, was ihre Zuverlässigkeit als Codierungsmoleküle einschränkt. *Still* verwendete dagegen nichtsequenzielle Codes von halogenierten Arenen **11**.^[46] Diese sind chemisch stabiler als Peptide und Oligonucleotide und lassen sich nach der Abspaltung vom festen Träger bequem durch Elektroneneinfang-GC analysieren.

Ist die Synthese-Geschichte einer aktiven Verbindung aus einer kombinatorischen Verbindungsbibliothek bekannt, so läßt sich die Synthese in größerem Maßstab wiederholen und die Struktur mit den Standardmethoden der organischen Chemie ermitteln.

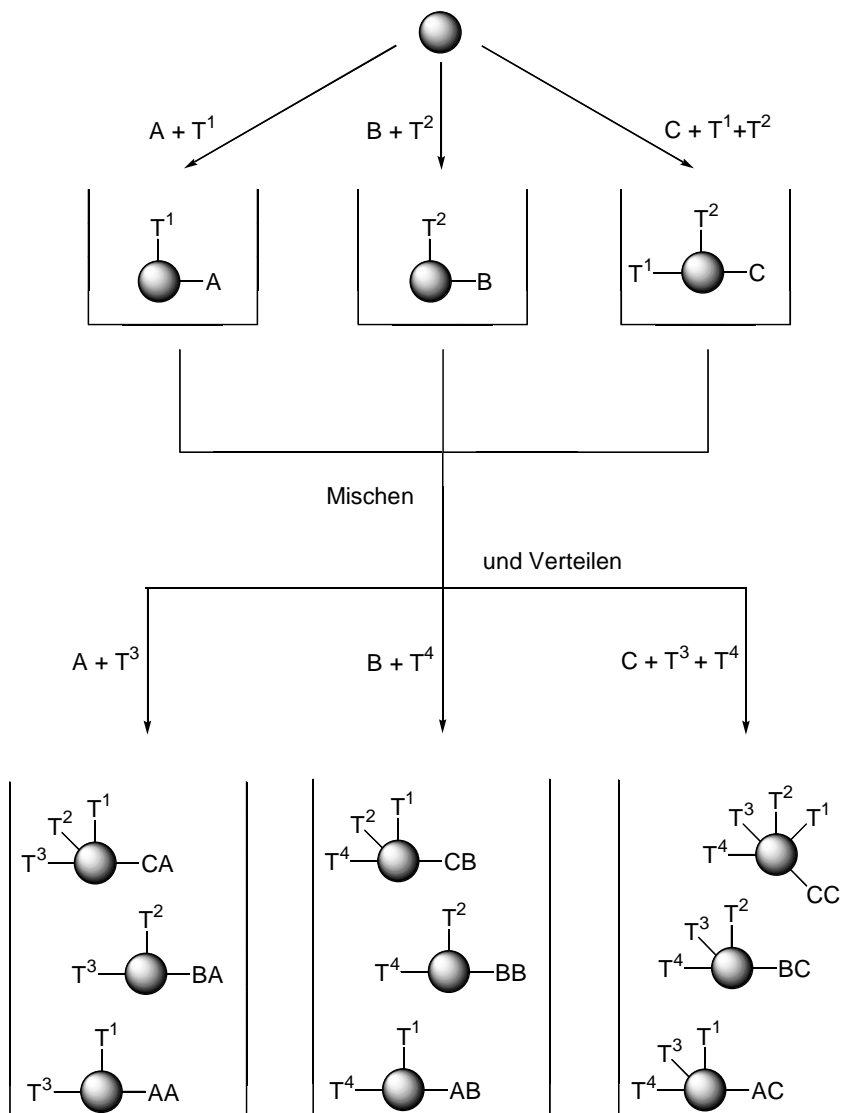


Abb. 3.1.12: Codierte kombinatorische Substanzbibliothek^[46]

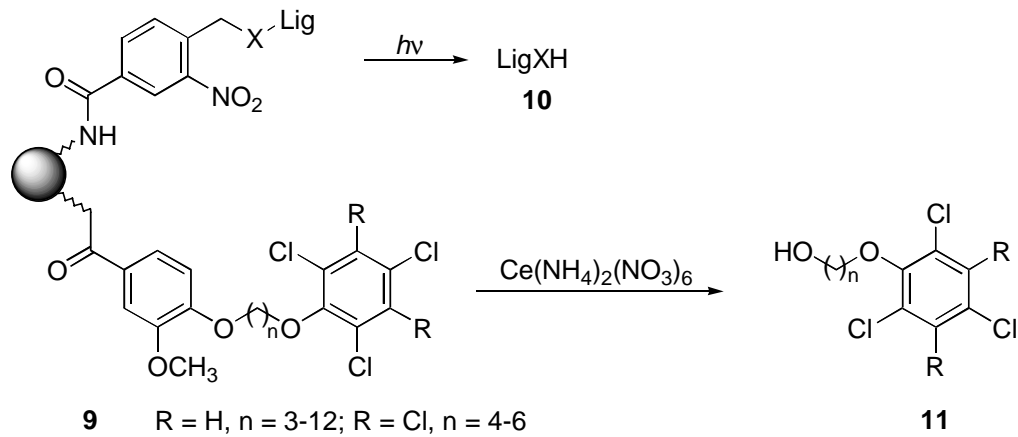


Abb. 3.1.13: Orthogonale Abspaltung des Liganden **10** und des Codierungsmoleküls **11** vom polymeren Träger^[46]

Auch eine nichtchemische Codierungsmethode wurde bereits eingesetzt. Die einzelnen Syntheseschritte wurden dabei mit Hochfrequenz-Signalen auf einem Speicherchip aufgezeichnet.^[47]

3.1.6 Spezielle Formate von kombinatorischen Substanzbibliotheken

Neben den Möglichkeiten, kombinatorische Bibliotheken in flüssiger oder an fester Phase aufzubauen, gibt es noch einige speziellere Formate.

Janda^[48] verband die Vorteile der Festphasensynthese mit denen der Synthese in Lösung, indem er ein lösliches Polymer einsetzte, welches schon von *Bayer*^[49] in der Synthese von Peptiden genutzt wurde. Es handelt sich dabei um Polyethylenglycolmonomethylether **12** (PEGMME) mit einer durchschnittlichen Molmasse von etwa 5000. Dieses Polymer ist in organischen Lösungsmitteln recht gut löslich, fällt aber durch Zugabe von größeren Mengen Diethylether aus. Dadurch lassen sich bekannte Reaktionsbedingungen aus Synthesen in Lösung direkt in der kombinatorischen Synthese anwenden, nach der Synthese kann das Reaktionsprodukt aber leicht durch Abfiltrieren isoliert werden, was eine Automatisierung des gesamten Prozesses erlaubt. Zudem lassen sich NMR-Spektren von an diesem Polymer gebundenen Substanzen ohne experimentellen Mehraufwand aufnehmen.

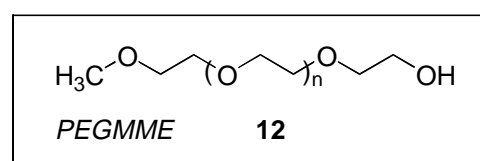


Abb. 3.1.14: Polyethylenglycolmonomethylether **12**

Peptid-Bibliotheken lassen sich auch mit biochemischen Methoden kombinatorisch herstellen.^[50] Dazu baut man synthetisch hergestellte DNA in das genetische Material von Phagen ein, welches deren Oberflächenproteine codiert. Exprimieren diese Phagen nun auf ihrer Oberfläche diese Fusionsproteine, so kann die Phagenbibliothek zum Beispiel gegen Antikörper gescreent werden. Positive Phagen werden isoliert und ihr genetisches Material für das entsprechende Protein analysiert. Mit der Phagen-Technik lassen sich Bibliotheken mit 10^8 - 10^9 verschiedenen Proteinen synthetisieren.

Fodor gelang ein wesentlicher Fortschritt in der Miniaturisierung von kombinatorischen Substanzbibliotheken.^[51] Er funktionalisierte eine Glasoberfläche mit Aminofunktionen und schützte diese mit einer photolabilen Schutzgruppe. Durch Abdecken dieser Glasoberfläche mit einer lichtundurchlässigen Maske und anschließender Bestrahlung von nicht abgedeckten Bereichen konnte er gezielt ausgewählte Aminogruppen entschützen. An diese knüpfte er Aminosäuren an, die ebenfalls die photolabile Schutzgruppe trugen, und wiederholte die Bestrahlung, nachdem er die Maske über der Glasoberfläche in eine andere Position gebracht hatte. Durch Wiederholen dieser Sequenz ließen sich kombinatorisch 1024 Peptide auf einer Fläche von 1.60 cm^2 synthetisieren. Die derzeitigen experimentellen Möglichkeiten der Photolithographie erlauben sogar die Synthese von etwa 250000 verschiedenen Substanzen pro Quadratzentimeter, was in Zukunft auch die Möglichkeit von Substanzbibliotheken auf Mikrochips ermöglichen könnte.

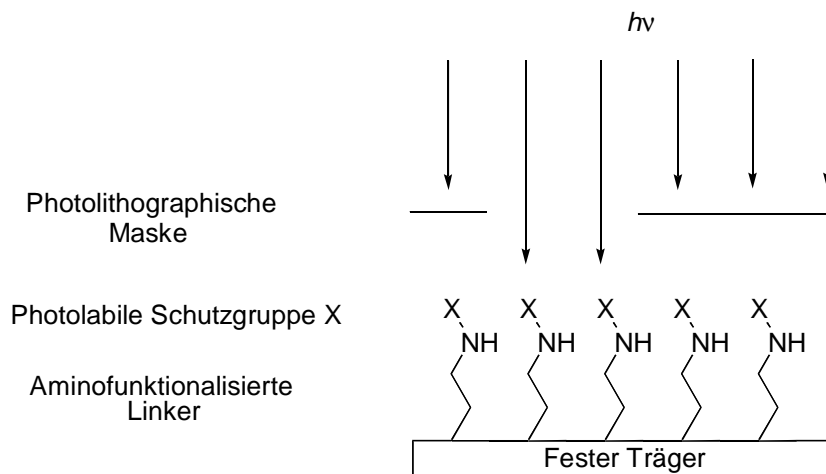


Abb. 3.1.15: *Photolithographische kombinatorische Synthese*

3.1.7 Design kombinatorischer Bibliotheken

Obwohl die kombinatorische Synthese ein hohes Potential zur Bereitstellung von großen Verbindungsbibliotheken besitzt, können nicht alle denkbaren Strukturen in einer Bibliothekssynthese hergestellt werden. Deshalb muß vor der Synthese eine Auswahl der herzu-

stellenden Produkte getroffen werden.^[52] Dabei ist zu unterscheiden, ob schon Informationen über die Leitstruktur vorliegen (Leitstrukturoptimierung) oder ob dies nicht der Fall ist (Leitstruktursuche). Bei der Leitstruktursuche ist die Wahrscheinlichkeit, in einer kombinatorischen Bibliothek eine aktive Verbindung zu finden, um so größer, je unterschiedlicher die Strukturen der einzelnen Verbindungen in dieser Bibliothek sind. Solche Bibliotheken weisen eine hohe Diversität unter den einzelnen Verbindungen auf. Diese Diversität besteht bei Pharmaka zum Beispiel in möglichst unterschiedlichen Anordnungen von Gruppen, die nichtkovalente Wechselwirkungen mit einem Rezeptormolekül eingehen können. Liegen dagegen bereits Informationen über eine Leitstruktur vor, so werden Bibliotheken von vergleichsweise geringer Diversität verwendet, um diese Leitstruktur zu optimieren.

Eine Auswahl der herzustellenden Produkte läßt sich auch mit Hilfe von virtuellen Bibliotheken treffen.^[53] Dabei erstellt man am Computer eine kombinatorische Substanzbibliothek und durchsucht diese mit verschiedenen Ausschlußkriterien nach potentiell aktiven Verbindungen. Anschließend werden dann nur noch diese Substanzen synthetisiert und gescreent.

3.1.8 Kombinatorische Methoden in der Katalysatorentwicklung

Die Entwicklung von Katalysatoren für die organische Synthese ist ein zeitintensiver Prozeß, da oft Optimierungsprozesse hinsichtlich der Struktur des Katalysators und der Reaktionsbedingungen durchgeführt werden müssen. Kleine Veränderungen in der Struktur des Katalysators haben oft große Auswirkungen auf seine katalytischen Eigenschaften. Deshalb ist es sinnvoll, die Suche nach einem neuen, optimalen Katalysator für ein gegebenes Syntheseproblem mit kombinatorischen Methoden zu unterstützen.

Es wurden bereits verschiedene kombinatorische Arbeiten in der Katalysatorforschung geleistet. In den meisten Fällen handelt es sich bei den synthetisierten Katalysatoren um Peptide oder um von Peptiden abgeleitete Verbindungen. *Lerner* nutzte die kombinatorische Chemie zum Aufbau von katalytischen Antikörperbibliotheken und isolierte daraus die aktivsten Vertreter.^[54] *Gilbertson* synthetisierte eine Bibliothek von Peptiden, die zusätzlich eine Phosphaneinheit enthielten, und screente die Bibliothek auf die durch Rhodium katalysierte asymmetrische Hydrogenierung von 2-Acetamidoacrylsäuremethylester.^[7] Wie *Gilbertson* erhielten auch *Hoveyda* und *Snapper* durch Parallelsynthese eine von Peptiden abgeleitete Ligandenbibliothek. Sie führten eine Schiff-Base-Einheit in die Liganden ein und screenten diese in der enantioselektiven, titankatalysierten Addition von Trimethylsilylcyanid an meso-Epoxide.^[8, 55] Bei der Arbeit von *Burgess* stand dagegen nicht die Synthese einer Liganden-

bibliothek im Vordergrund, sondern es wurden die Reaktionsbedingungen einer katalytischen C-H-Insertion kombinatorisch optimiert.^[5]

Im folgenden werden zwei publizierte Anwendungsmöglichkeiten der kombinatorischen Chemie in der Katalysatorentwicklung eingehender dargestellt.

3.1.8.1 Parallele Festphasensynthese von 2-Pyrrolidinmethanol-Liganden und anschließendes Screening nach enantioselektiver Aktivität in der Diethylzink-Addition an Benzaldehyd

Ausgehend von 4-Hydroxyprolin stellte *Ellman* durch parallele Festphasensynthese einige Vertreter aus der Ligandenklasse der 2-Pyrrolidinmethanole her.^[6]

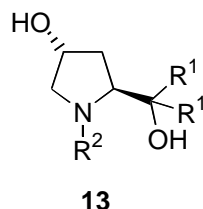


Abb. 3.1.16: 2-Pyrrolidinmethanol-Liganden

Als Stickstoffsubstituenten R^2 führte er durch Acylierung und anschließende Reduktion Methyl-, Ethyl- bzw. Benzyl-Reste ein. Für R^1 wählte er Phenyl- bzw. Ethyl-Reste, die er durch *Grignard*-Reaktionen einbaute. Anschließend testete er die chirale Induktion dieser Liganden bei der Addition von Diethylzink **14** an Benzaldehyd **15** (Tabelle 3.1.4).

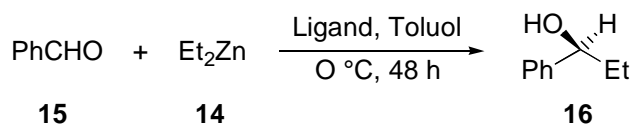


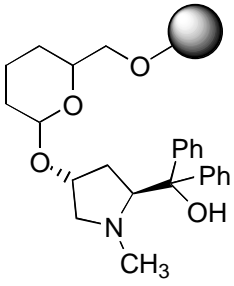
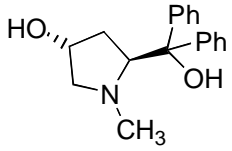
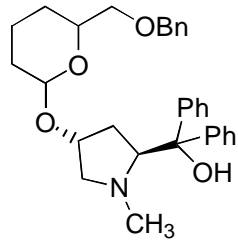
Abb. 3.1.17: Testreaktion für die 2-Pyrrolidinmethanol-Liganden

Anhand des effektivsten Liganden **13a** (R^1 = Phenyl, R^2 = Methyl) wurde untersucht, inwieweit der Tetrahydropyranyl-Linker bzw. der polymere Träger die Enantioselektivität der Diethylzink-Addition an Benzaldehyd beeinflusst (Tabelle 3.1.5). Es zeigte sich, daß die chirale Induktion direkt mit dem polymergebundenen Liganden getestet werden kann, da weder der Linker noch die chromatographische Reinigung des Liganden einen wesentlichen Einfluß auf die erreichten Enantiomerenüberschüsse hat.

Tab. 3.1.4: Erzielte Enantiomerenüberschüsse an **16** mit den 2-Pyrrolidinmethanol-Liganden in der Diethylzink-Addition an Benzaldehyd^[6]

R ¹	R ²	Nach Abspaltung (ohne weitere Reinigung)	Nach chromatographischer Reinigung
Phenyl	Methyl	93% ee (<i>S</i>)	94% ee (<i>S</i>)
Phenyl	Ethyl	83% ee (<i>S</i>)	84% ee (<i>S</i>)
Phenyl	Benzyl	89% ee (<i>S</i>)	85% ee (<i>S</i>)
Ethyl	Ethyl	0	0
Ethyl	Benzyl	30% ee (<i>R</i>)	45% ee (<i>R</i>)

Tab. 3.1.5: Chirale Induktion des festphasengebundenen Liganden **17** bei der Diethylzink-Addition an Benzaldehyd im Vergleich zu den Liganden **13a** und **18** in Lösung^[6]

Ligand			
	17	13a	18
ee	89% (<i>S</i>)	94% (<i>S</i>)	94% (<i>S</i>)

3.1.8.2 Kombinatorisch synthetisierte, strukturell undefinierte Polymere als Phosphorsäurediesterasen

Menger stellte durch einstufige Amidkondensationen von unterschiedlichen Gemischen aus acht - meist funktionalisierten - Carbonsäuren mit wasserlöslichem Polyallylamin verschiedene Polymere her, die er danach auf Phosphorsäurediesterase-Aktivität testete.^[56] Durch seine Synthese erhielt er Polymere, bei denen 5 bis 45 % der Aminogruppen des Polyallylamins mit Carbonsäuren besetzt waren.

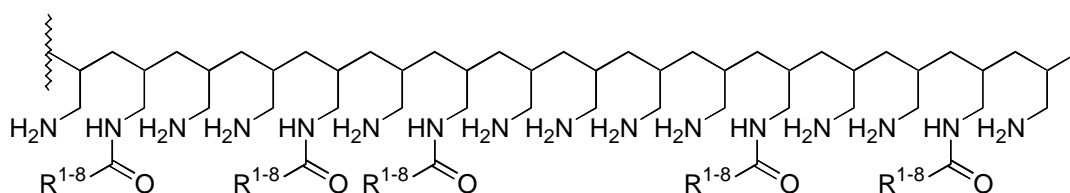


Abb. 3.1.18: Kombinatorisch funktionalisiertes Polyallylamin mit nicht definierter Struktur^[56]

Diese Polymere inkubierte er mit verschiedenen Konzentrationen einiger Metallsalze (Fe^{3+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+}) und verfolgte die Spaltung von Bis(4-nitro)phenylphosphat **19** bei Raumtemp. und neutralem pH-Wert durch die polymeren Komplexe.

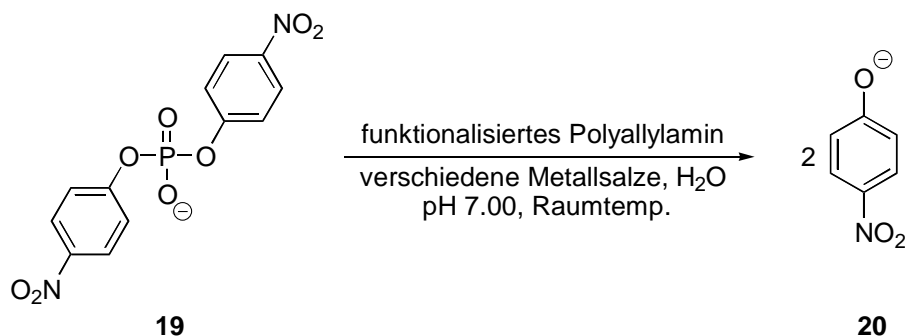


Abb. 3.1.19: Testreaktion auf Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Als effektivste Kombination ergab sich folgende Beladung der Aminofunktionen:

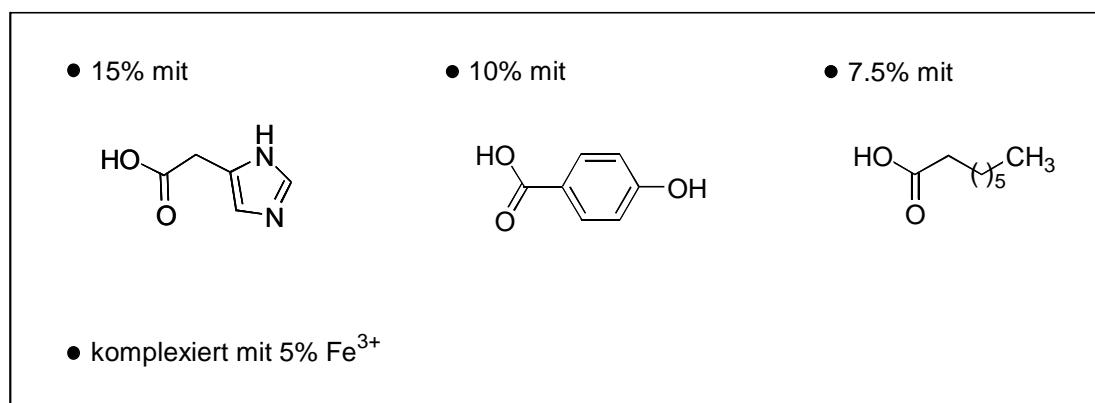


Abb. 3.1.20: Effektivste Beladung des Polyallylamins für Phosphorsäurediesterase-Aktivität^[56]

Mit diesem System konnte er eine Beschleunigung von 31400 für die Phosphorsäurediester-Hydrolyse im Vergleich zur Hintergrundreaktion feststellen. Allerdings ist es nicht möglich, die genaue Struktur der aktiven Verbindung anzugeben.

3.2 Metallhaltige und metallfreie künstliche Phosphorsäurediesterasen

Neben diesem kombinatorischen Ansatz zur Entwicklung von künstlichen Phosphorsäurediesterasen wurde bereits eine Reihe anderer Versuche unternommen, die Hydrolyse von Phosphorsäurediestern mit nichtnatürlichen Phosphorsäurediesterasen zu katalysieren.^[57] Im Bereich der biotechnologischen Forschung sollte diese Spaltung idealerweise bei $\text{pH} = 7$

und Raumtemp. hydrolytisch durchgeführt werden, damit Biomoleküle wie die DNA gespalten und die Bruchstücke danach in beliebiger Anordnung mit Hilfe von Ligasen wieder verbunden werden können.

Die oxidative Spaltung von DNA konnte von *Dervan* bereits mit einer sehr hohen Sequenzspezifität durchgeführt werden,^[58] allerdings lassen sich die so erhaltenen Bruchstücke nicht wieder zusammenfügen.

Zur Aktivierung der Phosphorsäurediestergruppe gegenüber einem nukleophilen Angriff (z. B. des Wassers) werden im wesentlichen zwei Ansätze verfolgt: *Hamilton*^[59] bzw. *Göbel*^[60] erreichten dies durch die Ausbildung supramolekularer Aggregate mit Amidinium- bzw. Guanidinium-Rezeptoren ohne weitere Metallionen, während andere Arbeitsgruppen Lewis-acide Übergangsmetallkomplexe verwendeten. Dabei wurden bisher sowohl mono- als auch dinucleare Zn^{2+} -, Co^{3+} - und Cu^{2+} -Komplexe als künstliche Phosphorsäurediesterasen eingesetzt.^[61]

Als Beispiele für metallfreie und metallhaltige künstliche Phosphodiesterasen seien zwei Vertreter aufgeführt:

Durch Einführung von zwei Guanidinium-Einheiten konnte *Göbel* eine Beschleunigung der Phosphorylierung seines Staphylokokken-Nuclease-Modells **21** mit dem cyclischen Phosphat **22** um den Faktor 380000 im Vergleich zur Phosphorylierung des strukturell ähnlichen Phenylethanol erreichen.^[60a]

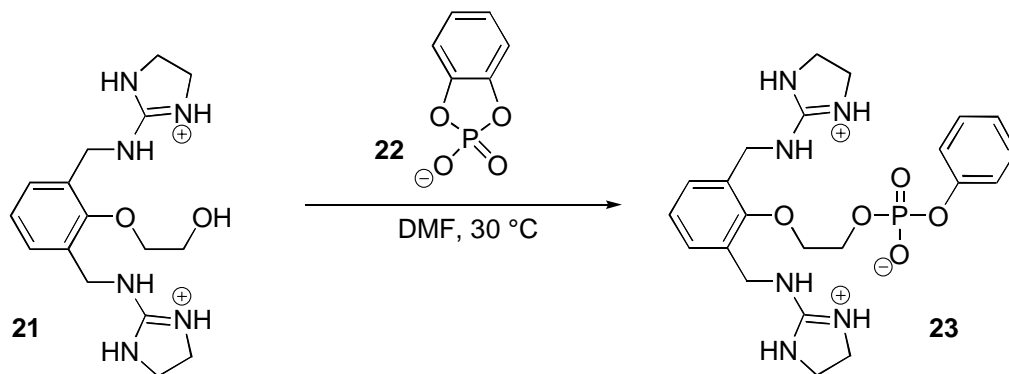


Abb. 3.2.1: Metallfreie künstliche Phosphorsäurediesterase nach Göbel^[60a]

Durch den dinuclearen Kupferkomplex **24** von *Chin* läßt sich die Spaltung von 2',3'-*cycloAMP*⁵ **25** in 2'-AMP **26** und 3'-AMP **27** um den Faktor 10^8 im Vergleich zur unkatalysierten Spaltung beschleunigen.^[61f]

⁵ Adenosinmonophosphat

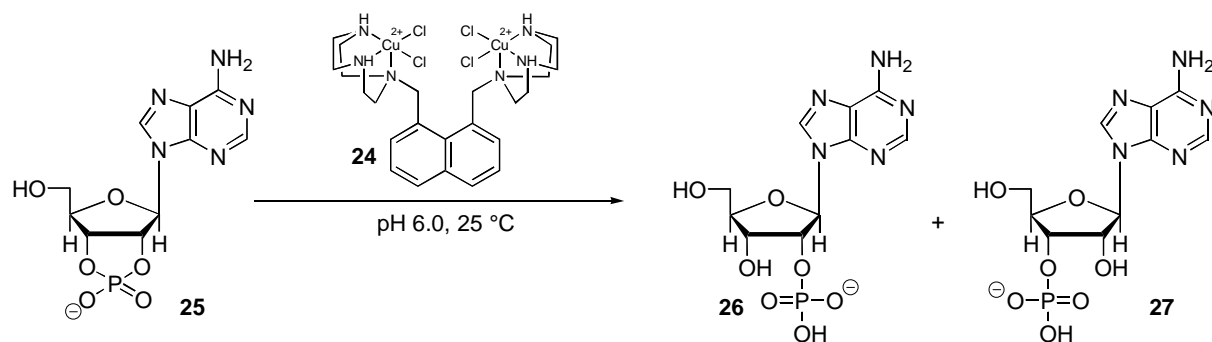


Abb. 3.2.2: Dinuclearer Kupferkomplex **24** von Chin als künstliche Phosphorsäurediesterase^[61f]

Ebenfalls sehr hohe Beschleunigungen der Phosphorsäurediester-Hydrolyse lassen sich mit Lanthanoidionen erzielen.^[62] *Schneider* stellte fest, daß sich diese Beschleunigungen durch Verwendung von Hydroxyliganden noch steigern lassen.^[63]

Für die europiumkatalysierte Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** konnte durch Zugabe von Hydroxyliganden die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante um die in der Tabelle angegebenen Faktoren beeinflusst werden:

Tab. 3.2.1: Einfluß verschiedener Hydroxyliganden auf die europiumkatalysierte Phosphorsäurediester-Hydrolyse^[63]

Testreaktion	<p style="text-align: center;"> $\text{EuCl}_3 + \text{Hydroxyliganden}$ $\text{H}_2\text{O}, \text{pH } 7.00, 50 \text{ } ^\circ\text{C}$ </p>		
Hydroxyliganden	<p style="text-align: center;">28</p>	<p style="text-align: center;">29</p>	<p style="text-align: center;">30</p>
Erreichte Beschleunigungen im Vergleich zur europiumkatalysierten Reaktion ohne Ligand	1.16	0.54	2.53

4 Konzeption

Ziel dieser Arbeit war es, mit kombinatorischen Methoden neue Katalysatoren zu entwickeln. Wegen der potentiellen Bedeutung von künstlichen Phosphorsäurediesterasen für die biotechnologische Forschung sollten neue Vertreter dieser Klasse von Katalysatoren kombinatorisch hergestellt werden. Dazu sollten Bibliotheken von dihydroxylierten Peptiden bzw. deren Vorläufern - Peptiden mit einer Olefineinheit - hergestellt und mit neuen Screeningverfahren nach Vertretern mit Phosphorsäurediesterase-Aktivität durchsucht werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche Enantioselektivitäten bei der asymmetrischen Dihydroxylierung von Olefinen an fester Phase erreicht werden können und ob die erzielten Enantiomerenüberschüsse durch MAS-NMR direkt am Polymer bestimmt werden können.

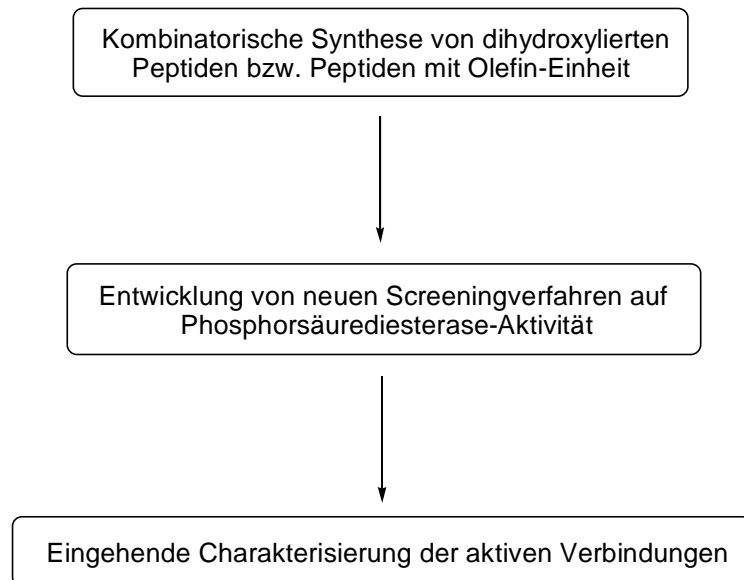


Abb. 4.1: Fließschema zur kombinatorischen Synthese von neuen künstlichen Phosphorsäurediesterasen

Es wurde folgende Konzeption erstellt:

4.1 Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen

Es soll die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von Olefinen auf die feste Phase übertragen werden, um Bibliotheken von vicinalen Diolen herstellen zu können. Diese Bibliotheken sollen anschließend nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen durchsucht werden. In diesem Zusammenhang soll auch untersucht werden, wie hoch die Enantioselek-

tivitäten bei der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen im Vergleich zur Umsetzung der Olefine in Lösung sind. Dazu sollen Vertreter von Olefin-Klassen, die in Lösung mit sehr guten (Stilbene, wie **31**, 99.8% ee)^[64], mittleren (langkettige aliphatische Olefine wie **32**, 92% ee)^[65] und moderaten (Allylbenzole, wie **33**, 78% ee)^[65] Enantioselektivitäten dihydroxyliert werden können, an verschiedenen Festphasen (TentaGel™, Wang-Harz) immobilisiert und katalytisch dihydroxyliert werden.

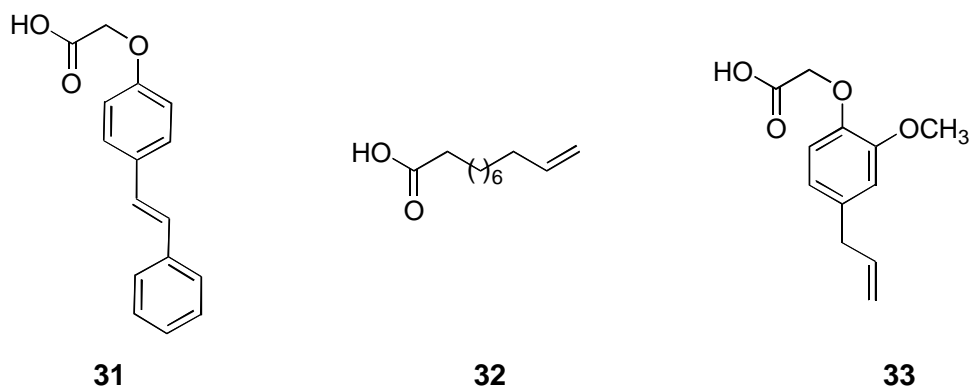
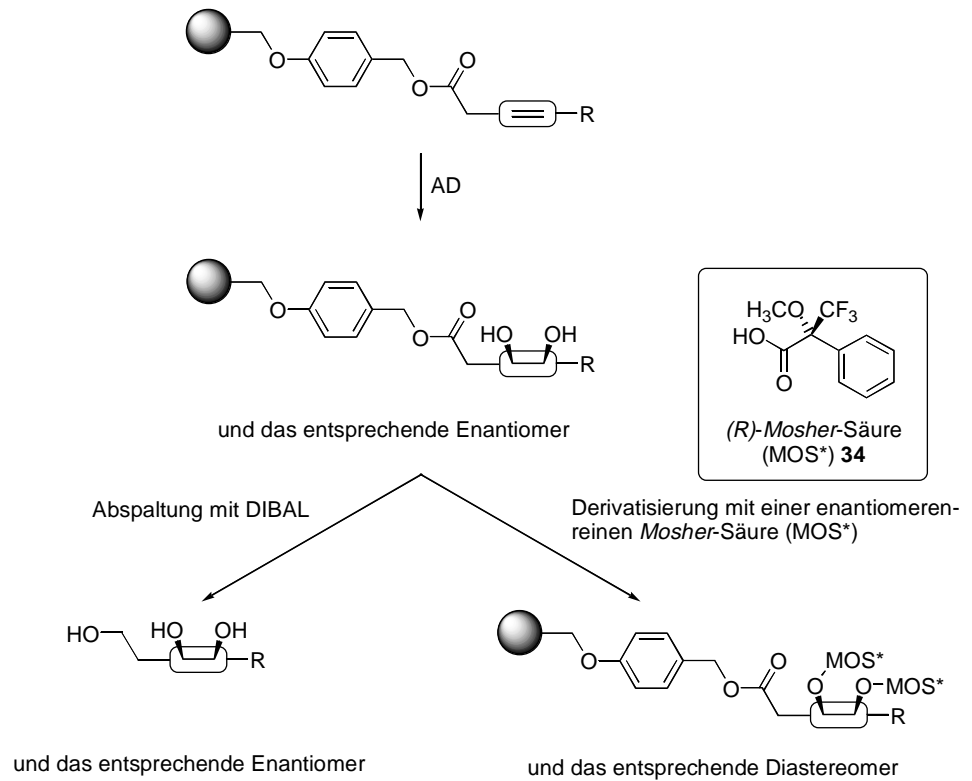


Abb. 4.1.1: Exemplarische Substrate mit unterschiedlichen Enantioselektivitäten bei der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung in Lösung

4.1.1 MAS-NMR-spektroskopische Verfolgung der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung an fester Phase

Sollte die Übertragung der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung (AD) auf die feste Phase gelingen, so soll diese Reaktion mit MAS-NMR-Spektroskopie an der Festphase verfolgt werden. Dabei soll vor allem untersucht werden, ob die Bestimmung der bei der asymmetrischen Dihydroxylierung erzielten Enantiomerenüberschüsse direkt an der festen Phase möglich ist.

Dazu soll alternativ zur reduktiven Abspaltung des Dihydroxylierungsproduktes mit DIBAL und anschließender Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse durch chirale HPLC versucht werden, die erhaltenen enantiomerenangereicherten Diole am Polymer durch Umsetzung mit einer enantiomerenreinen Säure ((*R*)-Mosher-Säure **34**) in diastereomerenangereicherte Bisester zu überführen. Durch Integration entsprechender Signale der beiden Diastereomere^[38c] sollten sich die erzielten Enantiomerenüberschüsse danach direkt am Polymer bestimmen lassen. Die Übertragung dieser quantitativen Analysenmethode der NMR-Spektroskopie von der flüssigen Phase auf die Festphase wäre ein entscheidender Fortschritt bei der Analyse von enantioselektiven Reaktionen an festen Trägern.



Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse durch

chirale HPLC

on bead MAS-NMR

Abb. 4.1.2: Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse nach Abspaltung vom Polymer bzw. direkt am Polymer

4.2 Künstliche Phosphorsäurediesterasen durch kombinatorische Chemie

4.2.1 Kombinatorische Synthese von dihydroxylierten Peptiden bzw. Peptiden mit Olefineinheit

Bibliotheken von potentiellen künstlichen Phosphorsäurediesterasen sollen durch die Komplexierung von verschiedenen Metallionen (wie z. B. Zn^{2+} , Eu^{3+} , Cu^{2+}) mit einer Vielzahl von Liganden erhalten werden. Die Liganden sollen dafür kombinatorisch synthetisiert werden und funktionelle Gruppen enthalten, die neben dem Metallion Phosphorsäurediester binden bzw. für eine Hydrolyse aktivieren können. Als Liganden bieten sich dabei Peptide an, die neben den funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren eine starre Olefineinheit in der Peptidkette enthalten. Diese soll nachträglich noch dihydroxyliert werden, was nukleophile Hydroxygruppen in den Liganden einführt.

4.2.1.1 Design und Synthese der Ligandenbibliotheken

- Die Ligandenbibliotheken sollen nach der Split-Mix-Synthese hergestellt werden, da diese eine sehr effiziente Methode der kombinatorischen Festphasensynthese von Substanzbibliotheken darstellt.
- Als feste Phase soll Amino-TentaGel™ verwendet werden. Dieser polymere Träger weist in Wasser gute Quelleigenschaften auf, was für das geplante *on bead* screening nach Phosphorsäurediesterase-Aktivität essentiell ist.
- Die Liganden sollen modular aus einer Peptid-Einheit und einer Olefineinheit aufgebaut werden.
- Die für die Ligandensynthese verwendeten Aminosäuren sollen funktionelle Gruppen enthalten, die Phosphorsäurediester binden und für die anschließende Spaltung aktivieren können (Arginin, Lysin, Histidin).
- Wenn das synthetisierte Olefin entsprechende funktionelle Gruppen enthält (Amino- bzw. Carbonsäurefunktionen), soll eine weitere Peptid-Einheit bzw. ein Aminosäureester an den Liganden angeknüpft werden.
- Da die Liganden eine Olefin- bzw. Diolineinheit enthalten, muß neben dem Liganden an jedem Polymerpartikel ein Peptid-Code für den Liganden synthetisiert werden. Das Stoffmengenverhältnis von Ligand zu Peptid-Code soll dabei etwa 9:1 betragen, was etwa 270 pmol Ligand und 30 pmol Peptid-Code pro Polymerpartikel entspricht. Die Sequenzierung der Peptid-Codes aktiver Liganden soll mit Hilfe eines Edman-Abbaues direkt von einzelnen polymeren Trägerpartikeln erfolgen.
- Um eine einwandfreie Sequenzierung des Peptid-Codes zu gewährleisten, soll ein Tripeptid aus drei Alanin-Einheiten als Spacer zwischen dem polymeren Träger und dem Peptid-Code eingeführt und der Peptid-Code mit einem Alanin-Molekül beendet werden. Da in der codierenden Einheit des Peptid-Codes keine Alanin-Moleküle verwendet werden, sollen die zwischen diesen Alanin-Markern stehenden Aminosäuren den Liganden codieren.

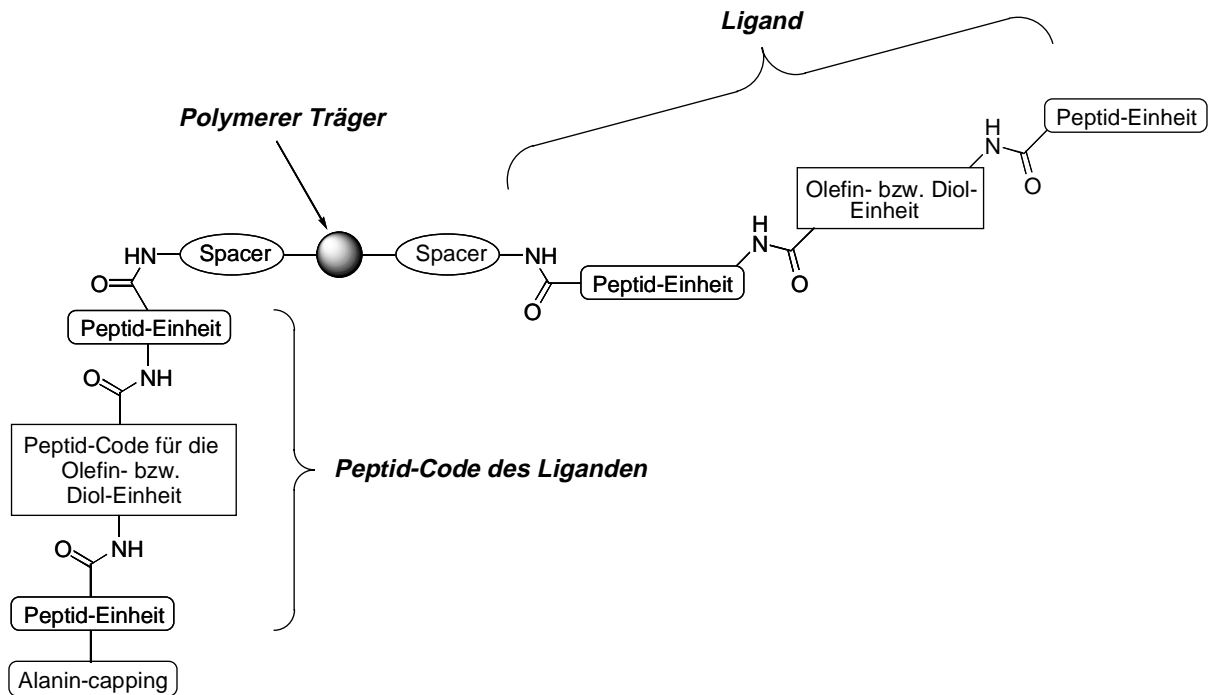


Abb. 4.2.1: Prinzipieller Aufbau einer codierten Ligandenbibliothek

4.2.1.2 Retrosynthetische Betrachtung

Die Verknüpfung der Aminosäuren im Liganden und im Peptid-Code soll nach standardisierten peptidsynthetischen Methoden durchgeführt werden.^[66] Die Einführung der Olefineinheit soll auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt werden: Zum einen sollen die Doppelbindungen durch *Wittig*-Reaktionen aufgebaut werden, nachdem carboxyfunktionalierte Benzaldehydderivate über Peptidbindungen an die Peptid-Einheiten immobilisiert worden sind. Wurden durch das *Wittig*-Reagenz Carbonsäure- bzw. Amino-Gruppen in den Liganden eingeführt, so sollten sich nochmals Aminosäuren bzw. Tripeptid-Einheiten anfügen lassen.

Zum anderen sollten sich Carbonsäuren, die neben einer Doppelbindung noch weitere funktionelle Gruppen enthalten, wie z. B. Zimtsäurederivate, unter den Bedingungen der Peptidsynthese an die Peptid-Einheit anknüpfen lassen.

Durch die abschließende asymmetrische Dihydroxylierung sollen dann die dihydroxylierten Peptide erhalten werden.

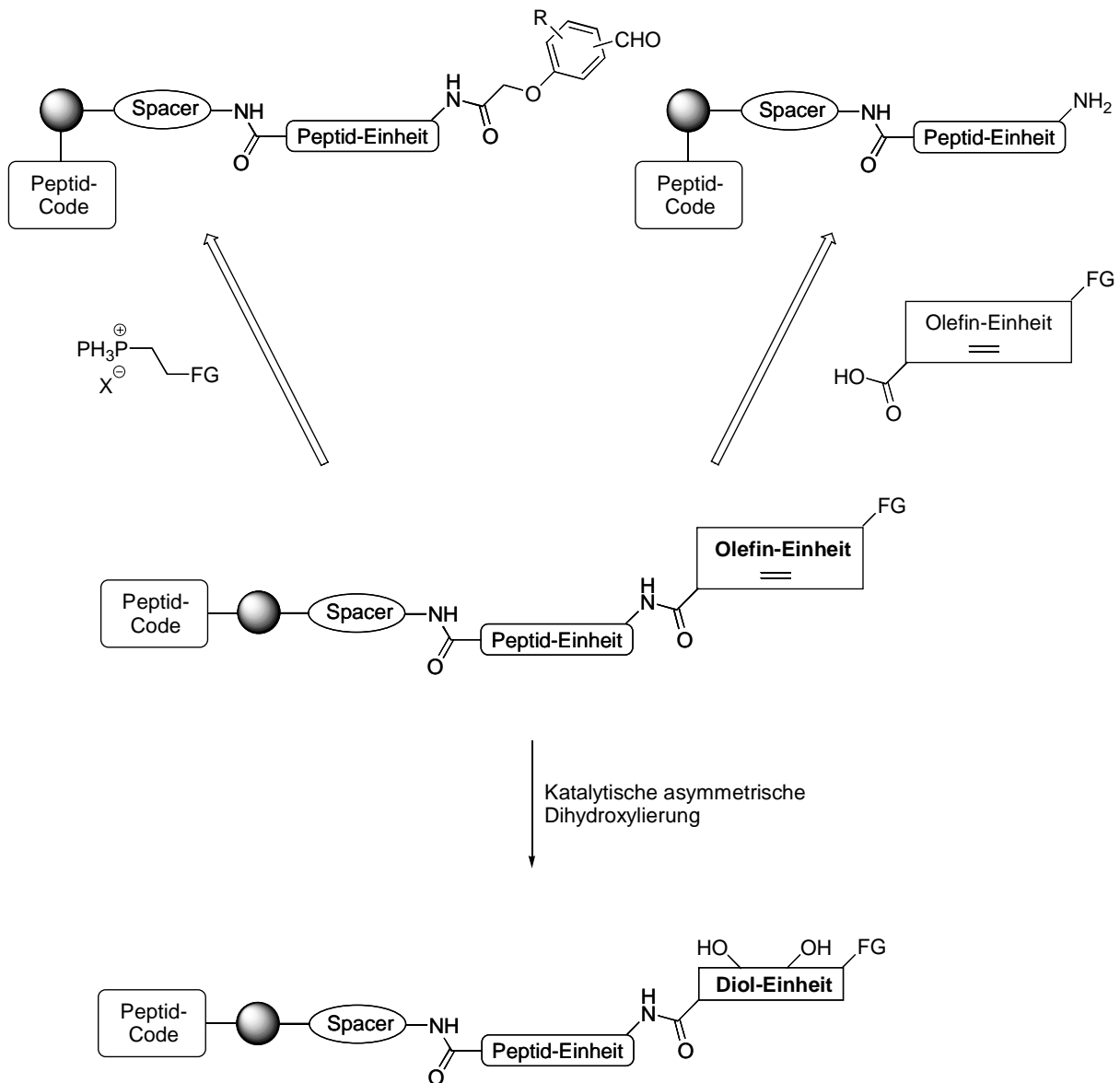


Abb. 4.2.2: Retrosynthetische Analyse der Olefin- bzw. Dioleinheiten der Liganden

4.3 Screening der Ligandenbibliothek nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen

Nach der Komplexierung mit den Metallionen soll die Ligandenbibliothek nach Komplexen mit künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität durchsucht werden. Dies kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten geschehen:

4.3.1 Absorptionsspektroskopisches Screening in Mikrotitrationsplatten

Die Polymerpartikel werden einzeln bzw. in Gruppen von etwa zehn Partikeln in die Vertiefungen von Mikrotitrationsplatten aufgeteilt und mit den Metallsalzlösungen sowie mit Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** versetzt. Die Spaltung des Phosphorsäurediesters **19** lässt sich dann mit Hilfe eines Scanning-Spektroskopes durch die Freisetzung des 4-Nitrophenolats **20** bei 405 nm verfolgen.

4.3.2 Batchweises Screening

Um die Suche nach aktiven Liganden zu beschleunigen, wird die gesamte Bibliothek **A** direkt mit einem entsprechenden Testsubstrat **B** inkubiert, ohne die Polymerpartikel vorher räumlich voneinander zu trennen. Nach der Reaktion sollen aktive Verbindungen durch spezifische Färbetechniken direkt am Polymerkügelchen sichtbar gemacht und die positiven Polymerpartikel **C** unter einem Mikroskop isoliert werden. Dazu sollen Färbetechniken entwickelt werden, die phosphorylierte Liganden **C** am Polymer sichtbar machen können, da diese phosphorylierten Liganden oft Zwischen- bzw. Endprodukte bei der durch Liganden beschleunigten Spaltung von Phosphorsäurediestern darstellen.^[61c, e]

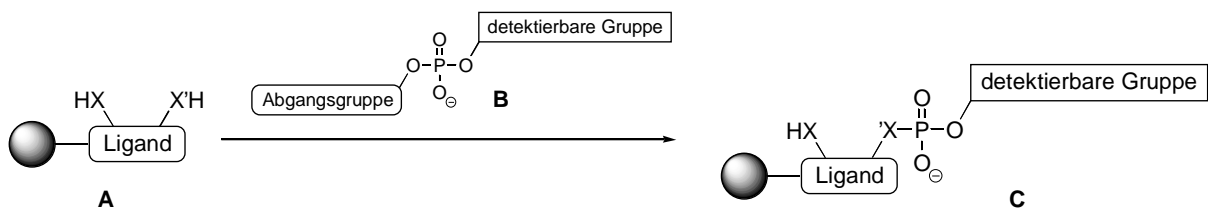


Abb. 4.3.1: Allgemeines Prinzip für das batchweise Screening nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen, $X, X' = \text{nucleophile Gruppen, wie O, NH}$

4.3.2.1 Berlinerblau Test auf aktive Liganden

Als Testsubstrat mit einer Abgangsgruppe und einer detektierbaren Gruppe soll der Phosphorsäurediester **35** synthetisiert werden, der 4-Nitrophenolat als Abgangsgruppe und ein cyclisches Hydroxylamin als detektierbare Gruppe besitzt. Das Anfärben der Polymerkügelchen soll dabei durch Oxidation des polymergebundenen Hydroxylamines mit einer Mischung aus Kaliumhexacyanoferrat(III) und Eisen(III)chlorid geschehen. Durch diese Oxidation sollten das entsprechende polymergebundene Oxammonium-Salz und Berlinerblau⁶ entstehen. Das Berlinerblau sollte dabei auch in der Polymermatrix entstehen und dort auf-

⁶ Bei Berlinerblau handelt es sich um einen schwerlöslichen anorganischen Farbstoff, der die Summenformel $\text{Fe(III)[Fe(III)Fe(II)(CN)}_6\text{]}_3$ aufweist.

grund seiner Schwerlöslichkeit fixiert bleiben, was die Polymerkügelchen blau anfärben sollte.

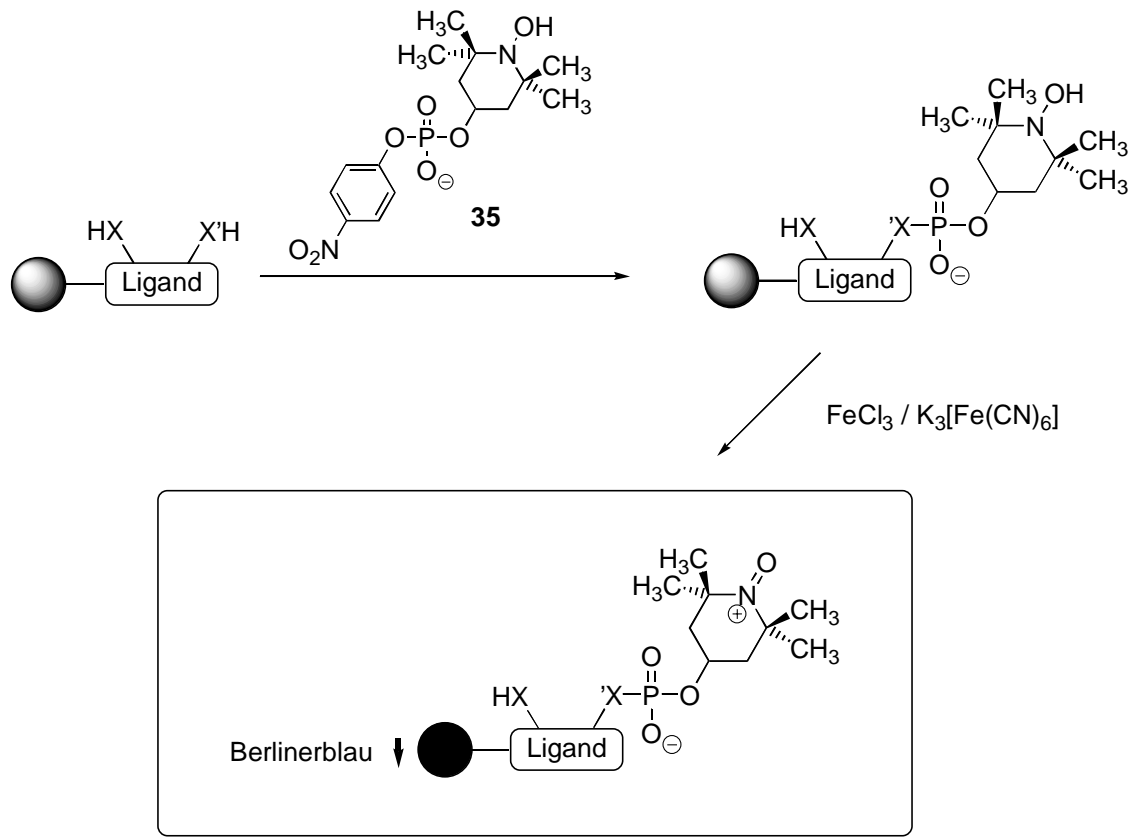


Abb. 4.3.2: Berlinerblau Test auf aktive Liganden, $X, X' = \text{nucleophile Gruppen, wie O, NH}$

4.3.2.2 Anfärbung durch Kresylviolett

Sollte die detektierbare Gruppe durch eine weitere Umesterung am aktiven Liganden, z. B. unter Bildung eines cyclischen Phosphates, abgespalten werden, dann soll die Detektion dieser phosphorylierten Liganden durch Anfärben der entsprechenden Polymerpartikel mit einem positiv geladenen Farbstoff geschehen, der sich über eine ionische Wechselwirkung an die negativ geladene Phosphatspezies bindet. Als Farbstoff soll Kresylviolett Acetat **36** verwendet werden, da dieser ein Absorptionsmaximum von 596 nm besitzt, was die Polymerkügelchen blau bis violett anfärben sollte. Darüber hinaus besitzt dieser Farbstoff eine rote Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex.}} = 575 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi.}} = 620 \text{ nm}$), was die Detektion von kleinen polymergebundenen Stoffmengen erlauben sollte.

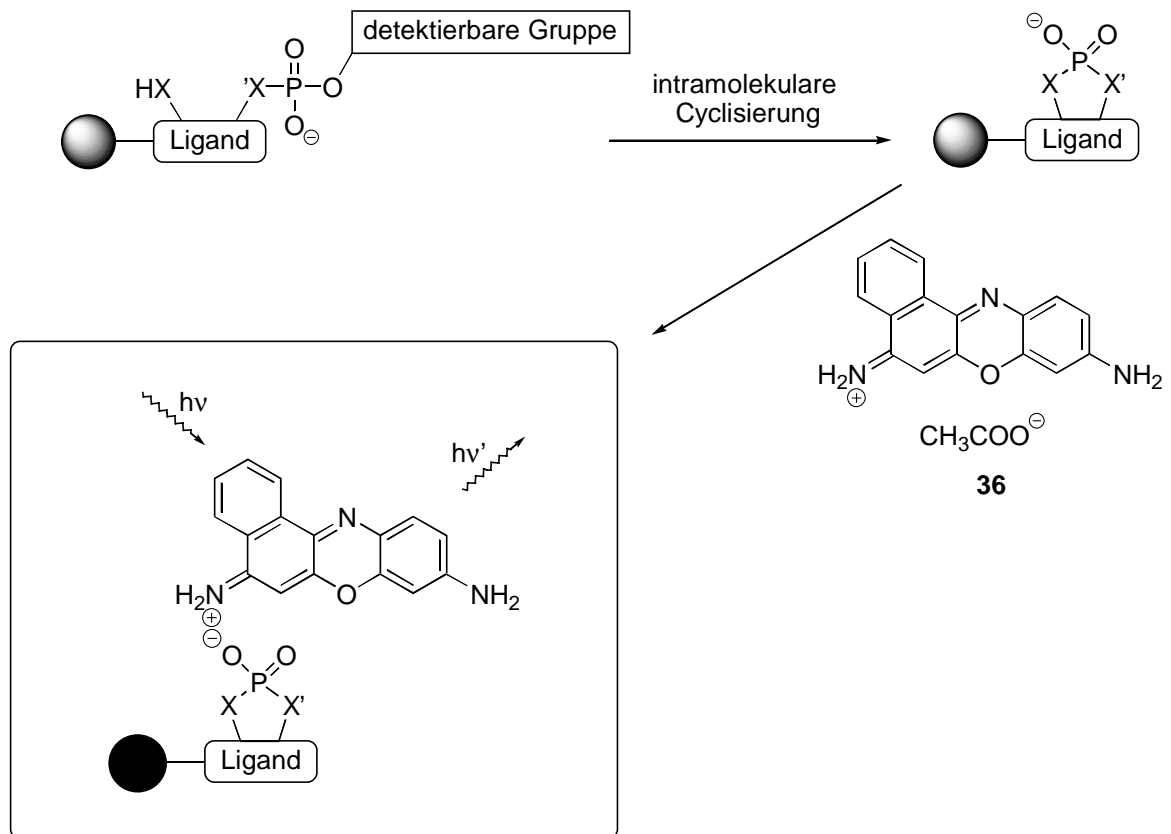


Abb. 4.3.3: Kresylviolett 36 als Sonde für aktive Liganden, X, X' = nucleophile Gruppen, wie O, NH

4.4 Entwicklung einer Fluoreszenz-Sonde für Phosphorsäure- diesterase-Aktivität

Die Stoffmengen der einzelnen Verbindungen an einem Polymerkugelchen sind in der Regel sehr gering (etwa 300 pmol). Deshalb soll neben der Möglichkeit einer absorptionsspektroskopischen Verfolgung der Phosphorsäurediester-Hydrolyse ein Testsubstrat entwickelt werden, das die Identifikation von Substanzen mit Phosphorsäurediesterase-Aktivität fluoreszenzspektroskopisch erlaubt, da dies eine wesentlich empfindlichere Analytik darstellt.

Dazu soll ein Testsubstrat für Phosphorsäurediesterase-Aktivität entwickelt werden, das durch intramolekulare Fluoreszenzlöschung bei Bestrahlung nicht fluoresziert. Dies sollte gelingen, indem in einem Phosphorsäurediester **A** ein Fluorophor und eine fluoreszenzlöschende Gruppe nahe beieinander gehalten werden. Nach der Spaltung einer Phosphorsäurediester-Bindung sollte die Fluoreszenz dagegen ansteigen, da sich nun Fluorophor (**B** bzw. **B'**) und Quencher (**C** bzw. **C'**) voneinander entfernen.

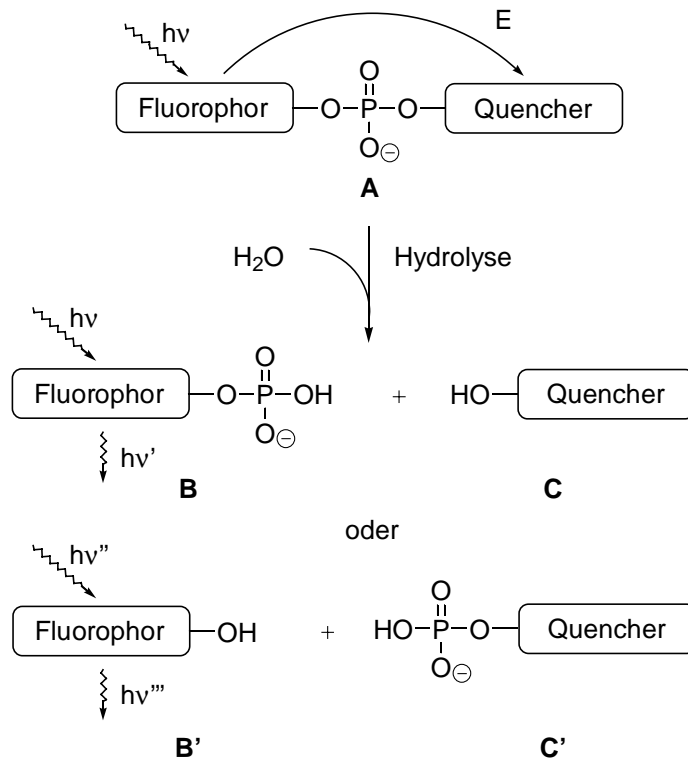


Abb. 4.4.1: Funktionsprinzip der Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Die Fluoreszenzlöschung ist besonders effizient, wenn das Emissionsmaximum der fluoreszierenden Gruppe in der Nähe des Absorptionsmaximums der fluoreszenzlöschenden Gruppe liegt.

Dies ist bei der Kombination 1-Naphthol **37** bzw. 2-Naphthol **38** (fluoreszierende Gruppe, $\lambda_{\text{emi.}} = 357 \text{ nm}$) und 4-Hydroxyazobenzol **39** (fluoreszenzlöschende Gruppe, $\lambda_{\text{abs.}} = 347 \text{ nm}$) der Fall, weswegen untenstehende Testsubstrate **40** und **41** synthetisiert und auf ihren Nutzen für die Detektion von Verbindungen mit Phosphorsäurediesterase-Aktivität hin untersucht werden sollen.

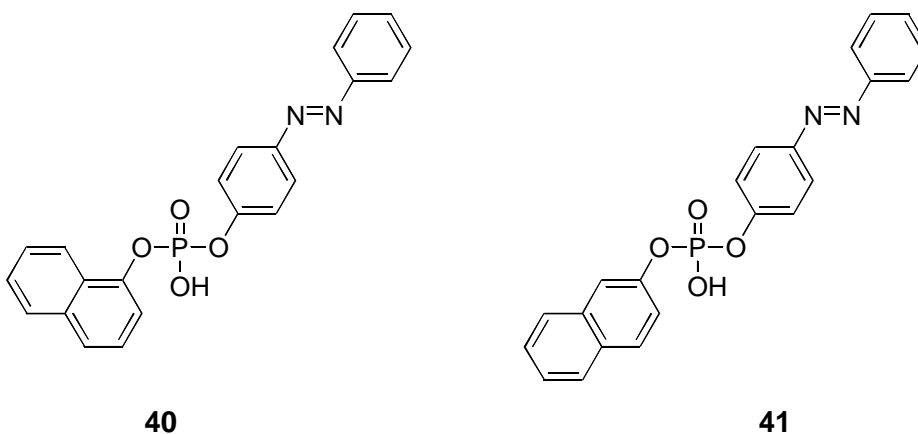


Abb. 4.4.2: Zu synthetisierende Fluoreszenz-Reporter **40** und **41**

Die Synthese sollte ausgehend von Phosphorylchlorid und 1- bzw. 2-Naphthol (**37** bzw. **38**) zu den entsprechenden Naphthalinyl-phosphorodichloridaten **42** und **43** führen, die anschließend mit 4-Hydroxyazobenzol **39** und nachfolgender Hydrolyse zu den Zielverbindungen **40** und **41** umgesetzt werden sollen.

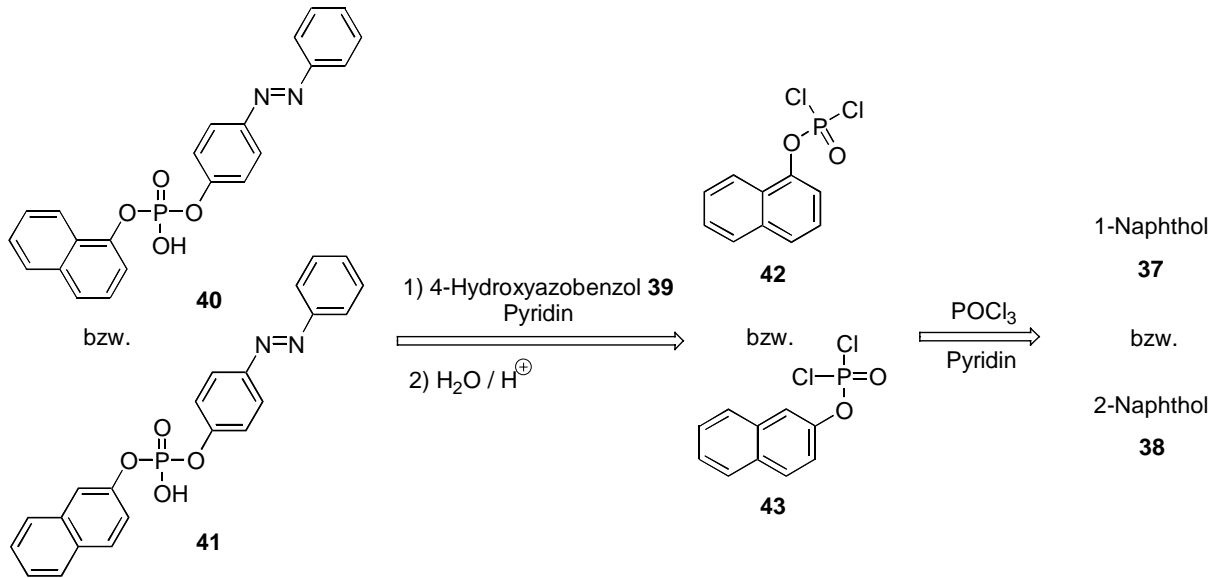


Abb. 4.4.3: Retrosynthese der Fluoreszenz-Reporter **40** bzw. **41**

5 Durchführung und Ergebnisse

5.1 Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen

Zielsetzung

Die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung sollte auf festphasengebundene Olefine übertragen werden, um Bibliotheken von vicinalen Diolen kombinatorisch herstellen zu können.

5.1.1 Anknüpfen der Olefine an die Festphasen

(*E*)-4-Hydroxystilben **44** und 2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenol **45** wurden zunächst mit Chloroessigsäure **46** umgesetzt, um freie Carbonsäurefunktionalitäten zu erhalten, die die Anknüpfung der Olefine an *Wang*-Harz **47** und Hydroxy-TentaGel™ **48** ermöglichen. Die Synthesen der Phenoxyessigsäuren **31** und **33** gelangen in Ausbeuten von 51% (**31**) bzw. 53% (**33**).

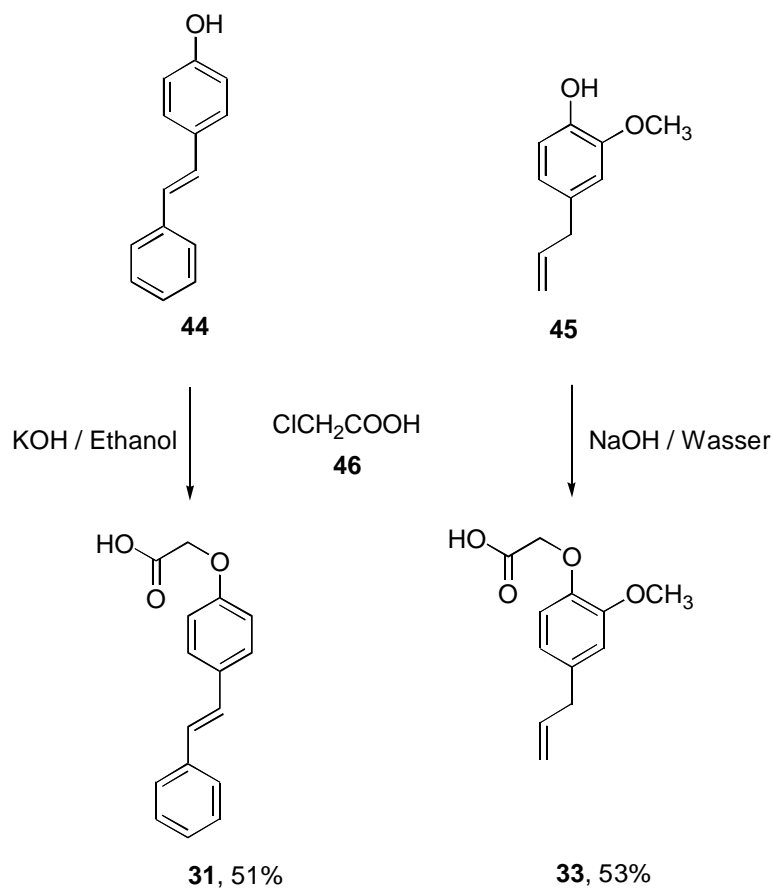


Abb. 5.1.1: Anbringen des Carbonsäurelinkers an die Olefine

Die Olefine **31**, **33** und 10-Undecensäure **32** wurden danach mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) an Wang-Harz **47** bzw. Hydroxy-Tenta-Gel™ **48** angeknüpft.

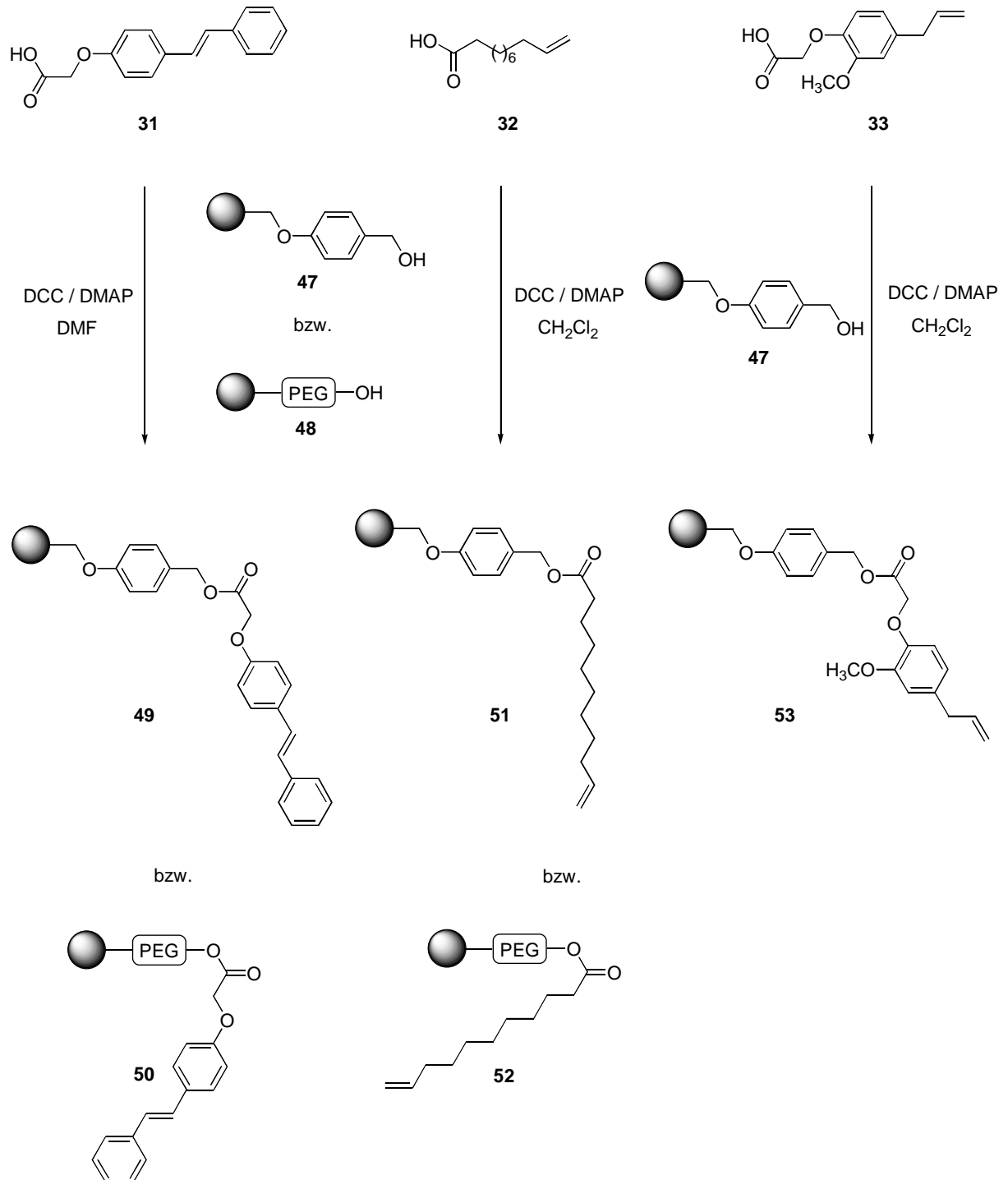


Abb. 5.1.2: Anknüpfung der Olefine an die polymeren Träger

Dies gelang in allen Fällen mit quantitativen Ausbeuten, was durch die gravimetrische Bestimmung der chromatographisch gereinigten, mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL) von

den jeweiligen festen Trägern reaktiv abgespaltenen Alkoholen **54**, **55** und **56** gezeigt werden konnte.

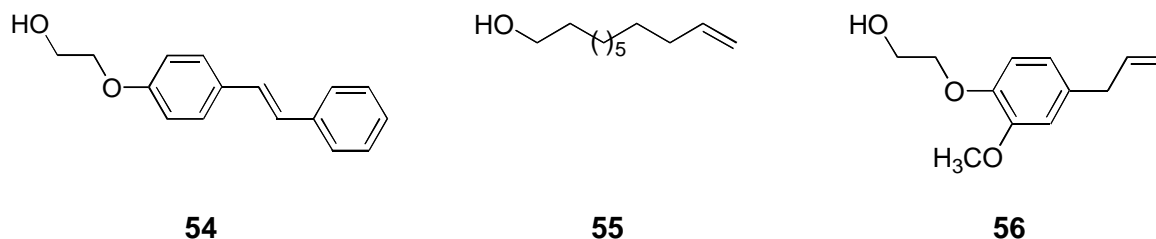


Abb. 5.1.3: Vom Polymer abgespaltene Alkohole

5.1.2 Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung der festphasengebundenen Olefine

Die an den polymeren Trägern fixierten Olefine wurden mit den drei gängigen Liganden für die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung ((DHQD)₂PHAL **57**, (DHQD)₂PYR **58** und (DHQD)₂AQN **59**; jeweils 1.00 mol-% bezogen auf das Olefin), K₂CO₃ (3.00 eq.), K₂OsO₂(OH)₄ (0.40 mol-% Os bezogen auf das Olefin) und K₃[Fe(CN)₆] (3.00 eq.) als terminalem Oxidationsmittel sowie MeSO₂NH₂ (1.00 eq.) in THF : Wasser (1:1) der Dihydroxylierung unterzogen. Mit anderen Lösungsmittelgemischen (*tert.*-Butanol : Wasser (1:1); DMF : Wasser (1:1); Dioxan : Wasser (1:1) oder CH₂Cl₂ : Wasser (1:1)) konnte kein Umsatz beobachtet werden. Zur Einschätzung der bei der Dihydroxylierung erzielten Ausbeuten und Enantioselektivitäten an der festen Phase wurden die Olefine **54**, **55** und **56** nach der von Sharpless standardisierten Dihydroxylierung in Lösung umgesetzt.^[64]

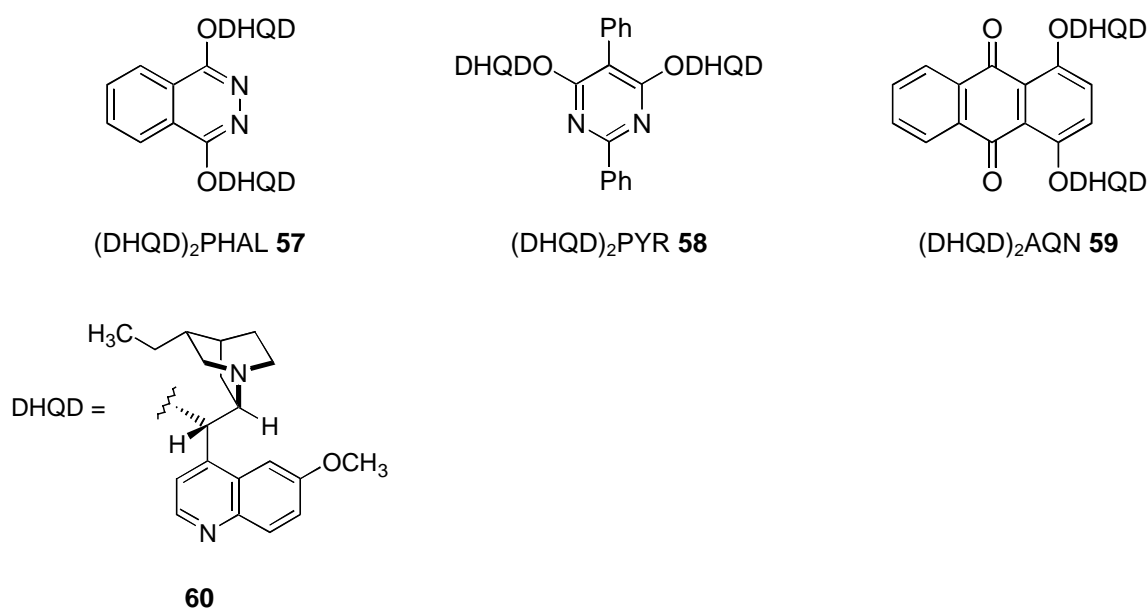


Abb. 5.1.4: Verwendete Liganden für die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung

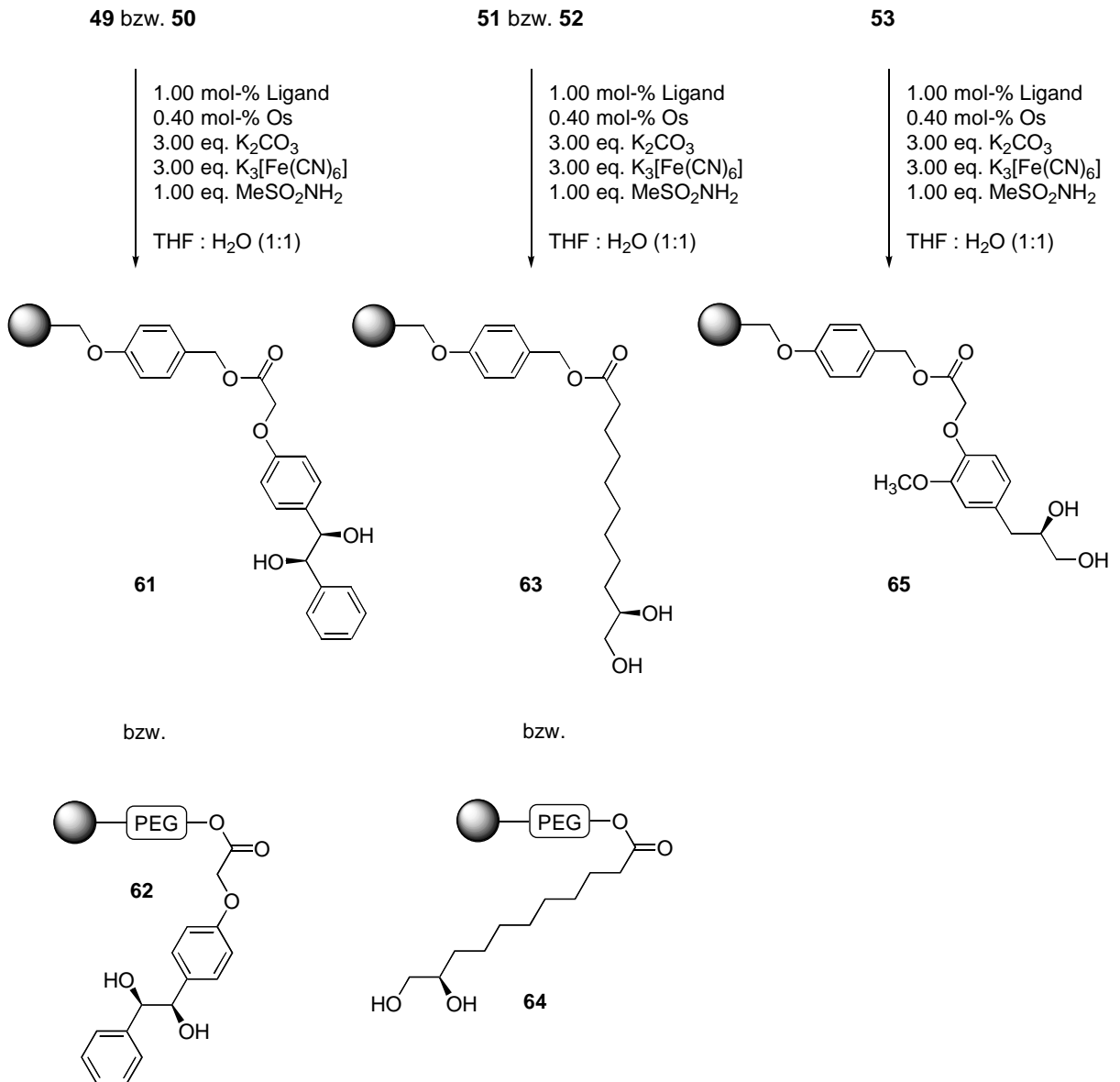


Abb. 5.1.5: Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung an fester Phase

Die in Tabelle 5.1.1 angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die chromatographisch gereinigten Trioole **66/ent-66**, **67/ent-67** und **68/ent-68**, die nach der reduktiven Abspaltung der Dihydroxylierungsprodukte mit DIBAL erhalten wurden.

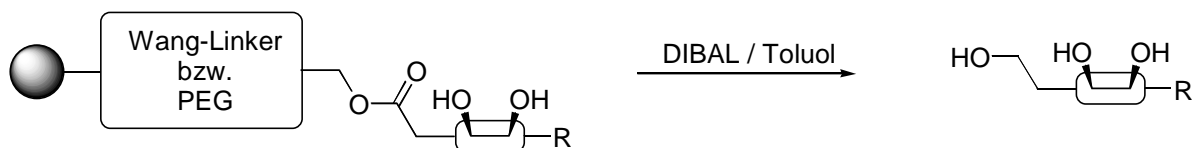


Abb. 5.1.6: Bestimmung der Ausbeute der Dihydroxylierung durch reduktive Abspaltung mit DIBAL

Tab. 5.1.1: Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung der polymergebundenen Olefine

Substrat	polymerer Träger	Ligand	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]	ee [%]
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ AQN ^a	18 h, Raumtemp.	83	0
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PYR ^b	18 h, Raumtemp.	62	0
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL ^c	12 h, Raumtemp.	73	3
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	1 d, 0°C	8	0
56	keiner ^d	(DHQD) ₂ AQN	18 h, Raumtemp.	75	32
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PYR	18 h, Raumtemp.	44	34
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ AQN	18 h, Raumtemp.	52	32
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	6 d, Raumtemp.	96	20
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	12 h, Raumtemp.	96	41
52	TentaGel™	(DHQD) ₂ PHAL	1 d, Raumtemp.	44	45
55	keiner	(DHQD) ₂ AQN	1 d, Raumtemp.	78	88
49	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	18 h, Raumtemp.	41	97
50	TentaGel™	(DHQD) ₂ PHAL	18 h, Raumtemp.	21	97
54	keiner	(DHQD) ₂ PHAL	18 h, Raumtemp.	61	>99

^a 1,4-Bis(dihydrochinidiny)anthrachinon **59**; ^b 4,6-Bis(dihydrochinidiny)-2,5-diphenylpyrimidin **58**; ^c 1,4-Bis(dihydrochinidiny)phthalazin **57**; ^d Die Dihydroxylierungen in Lösung wurden nach *Sharpless* in *tert.*-Butanol : Wasser (1:1) durchgeführt.

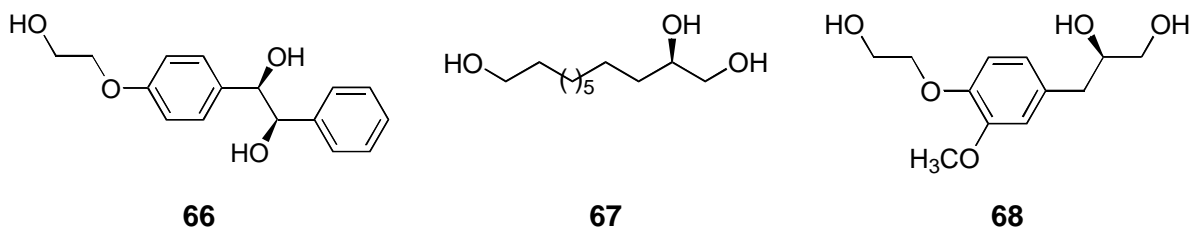


Abb. 5.1.7: Vom Polymer abgespaltene Produkte der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung an fester Phase

5.1.3 MAS-NMR-spektroskopische Verfolgung der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung

Die quantitative Dihydroxylierung von **51** zu **63/ent-63** konnte mit Hilfe der MAS-NMR-Spektroskopie direkt am Polymer verfolgt werden: Die olefinischen ^{13}C -Signale verschwanden vollständig, dafür traten die Signale der beiden hydroxylierten Kohlenstoffatome auf. Eine vollständige Zuordnung der Signale findet sich im experimentellen Teil (Kapitel 7.5.3.3).

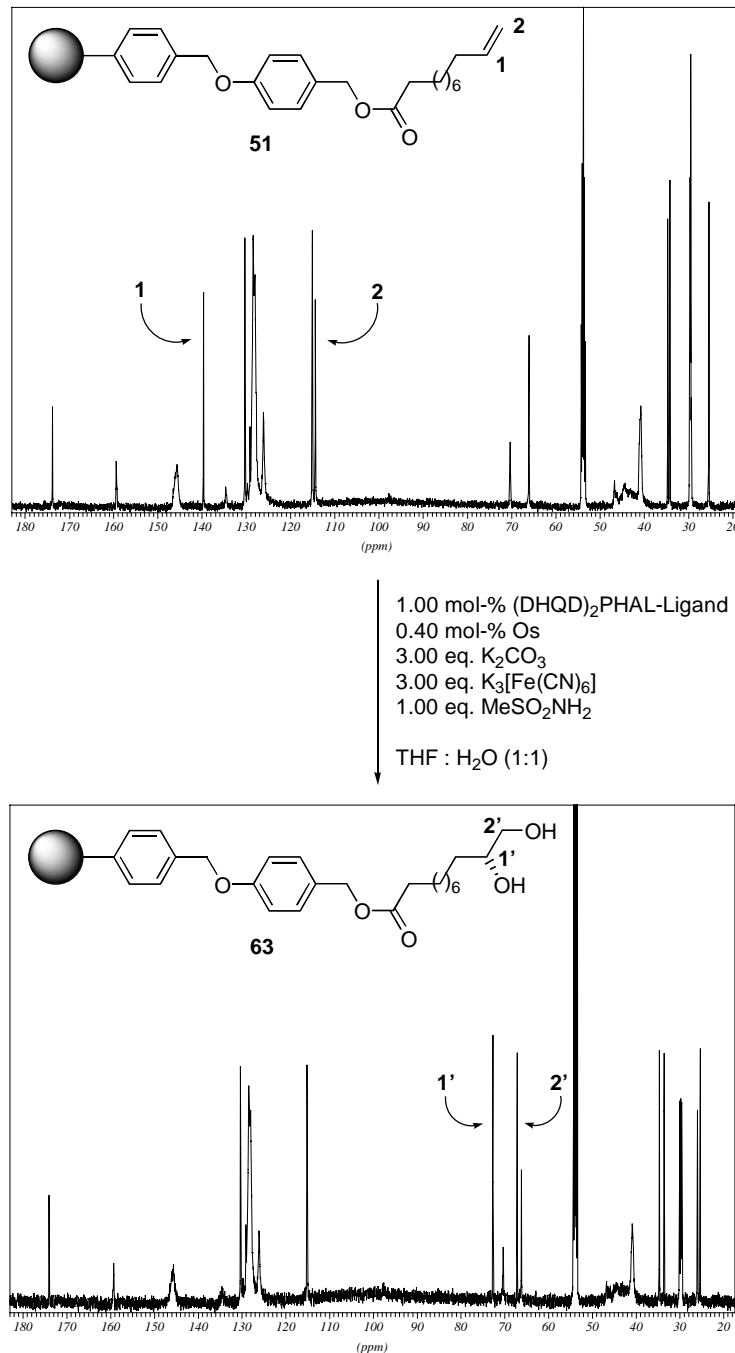


Abb. 5.1.8: MAS-NMR-spektroskopische Verfolgung der Dihydroxylierung an fester Phase

5.1.4 On bead Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von **63** durch MAS-NMR-Spektroskopie

Neben der Reaktionsverfolgung der Dihydroxylierung erlaubte die MAS-NMR-Spektroskopie auch die direkte Bestimmung der erzielten Enantioselektivitäten am Polymer, ohne das Reaktionsprodukt abzuspalten. Dazu wurde **63/ent-63** mit (*R*)- α -Methoxy- α -(trifluormethyl)-phenyllessigsäure ((*R*)-*Mosher*-Säure) **34** und DCC / DMAP in die diastereomeren Bis-*Mosher*-Ester **69** und **70** überführt und der Enantiomerenüberschuß durch Integration der ^{13}C -Signale von entsprechenden Kohlenstoffatomen (z. B. 1 und 1') der beiden diastereomeren Bisester bestimmt. Der so ermittelte Enantiomerenüberschuß von 20-21% stimmte mit dem Wert überein, der nach der reduktiven Abspaltung des Reaktionsproduktes **67/ent-67** mit DIBAL und der anschließenden Derivatisierung mit N,N'-Carbonyldiimidazol **71** zum cyclischen Carbonat **72/ent-72** HPLC-analytisch erhalten wurde.

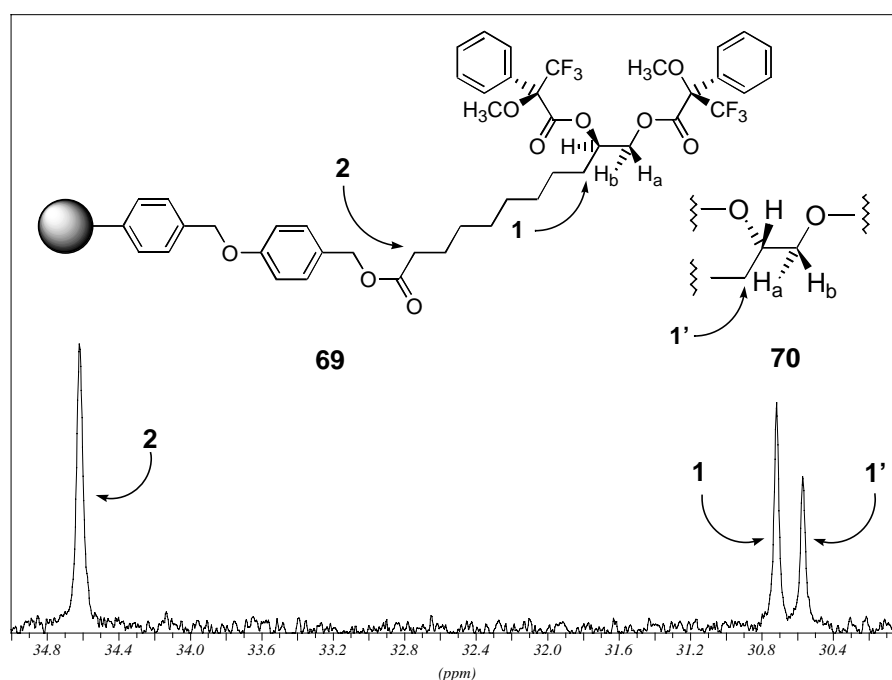


Abb. 5.1.9: Ausschnitt aus dem ^{13}C -MAS-NMR-Spektrum des Diastereomerengemisches von **69** und **70** zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von **63/ent-63**

Eine vollständige Interpretation des ^{13}C -MAS-NMR-Spektrums des Diastereomerengemisches von **69** und **70** findet sich im experimentellen Teil (Kapitel 7.5.5).

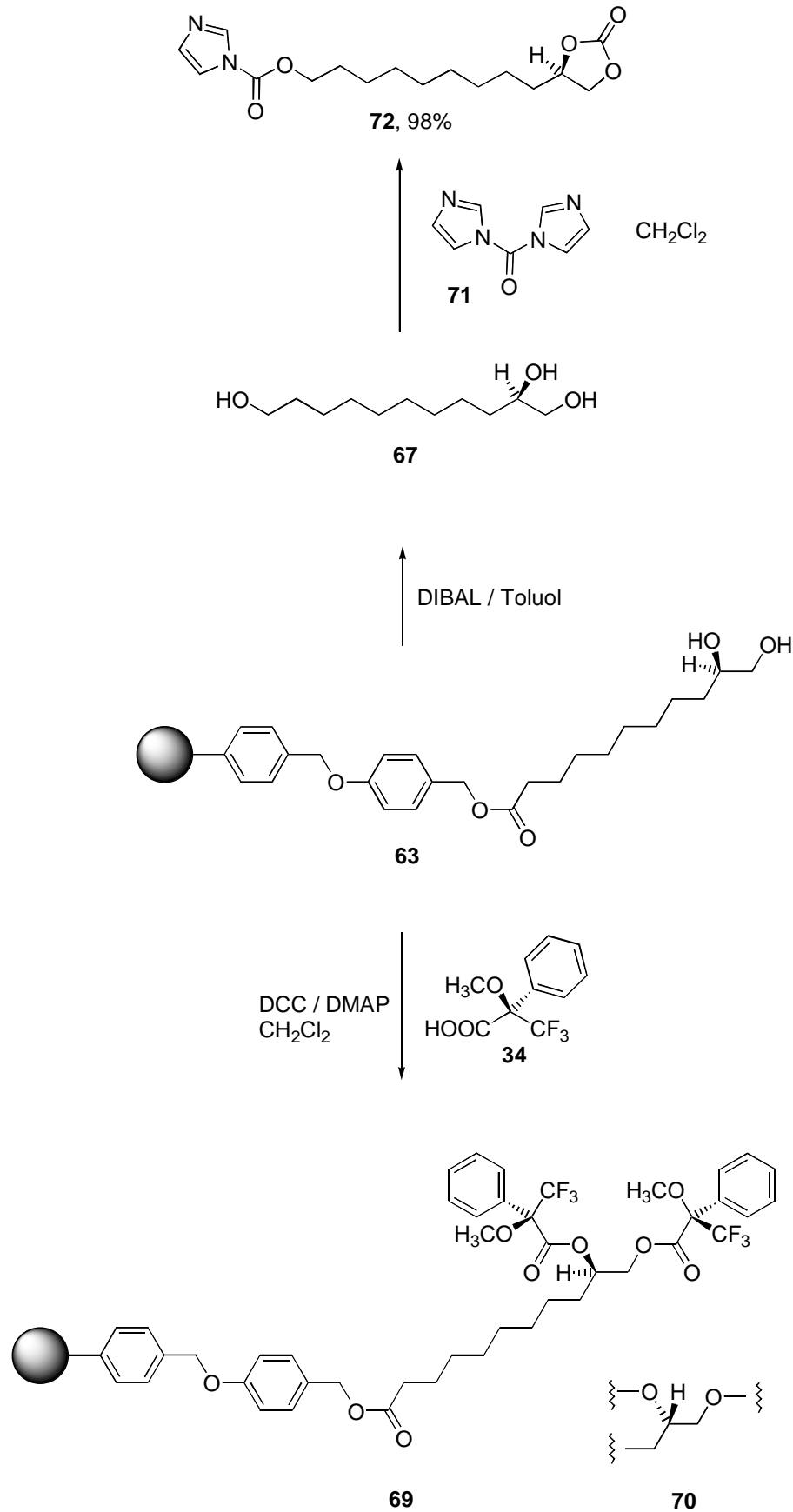


Abb. 5.1.10: Bestimmung der Enantioselektivität: Abspaltung und Derivatisierung versus direkte Bestimmung am Polymer

Ergebnis

Die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung konnte an festphasenimmobilisierten Olefinen durchgeführt werden. Die erhaltenen Enantioselektivitäten zeigen, daß sich für die kombinatorische Festphasensynthese von stark enantiomerenangereicherten Diolen nur Olefine eignen, die in Lösung mit sehr hohen Enantioselektivitäten dihydroxyliert werden können.

5.2 Synthese eines Olefines an Polyethylenglycolmonomethylether durch *Wittig*-Reaktion

Zielsetzung

Es sollte untersucht werden, ob sich *Wittig*-Reaktionen an TentaGel™ zum Aufbau von Olefinen eignen. Die dadurch synthetisierten festphasengebundenen Olefine sollten später als Substrate für die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung verwendet werden, um Bibliotheken von Diol-Liganden mit potentieller Phosphorsäurediesterase-Aktivität kombinatorisch zu synthetisieren.

5.2.1 *Wittig*-Reaktion an Polyethylenglycolmonomethylether

Als lösliches Polymer wurde Polyethylenglycolmonomethylether (PEGMME) **12** verwendet, da dieses die Reaktionskontrolle mit Hilfe der Standard-NMR-Spektroskopie in Lösung erlaubt und es den TentaGelen™ durch die Polyethylenglycolkette strukturell ähnlich ist. Zunächst wurde 4-Hydroxybenzaldehyd **73** mit Chloressigsäure **46** umgesetzt, um wieder eine Carbonsäurefunktion zur Anknüpfung an das Polymer zu erhalten. Die Phenoxyessigsäure **74** wurde in einer Ausbeute von 56% erhalten und darauf mit DCC / DMAP an das Polymer **12** angeknüpft. Die anschließende *Wittig*-Reaktion mit Methyltriphenylphosphoniumbromid in DMSO und Natriumhydrid ergab das Olefin **76**. Nach Aussage der NMR-Spektren wurde der Aldehyd **75** quantitativ in das Olefin **76** überführt.

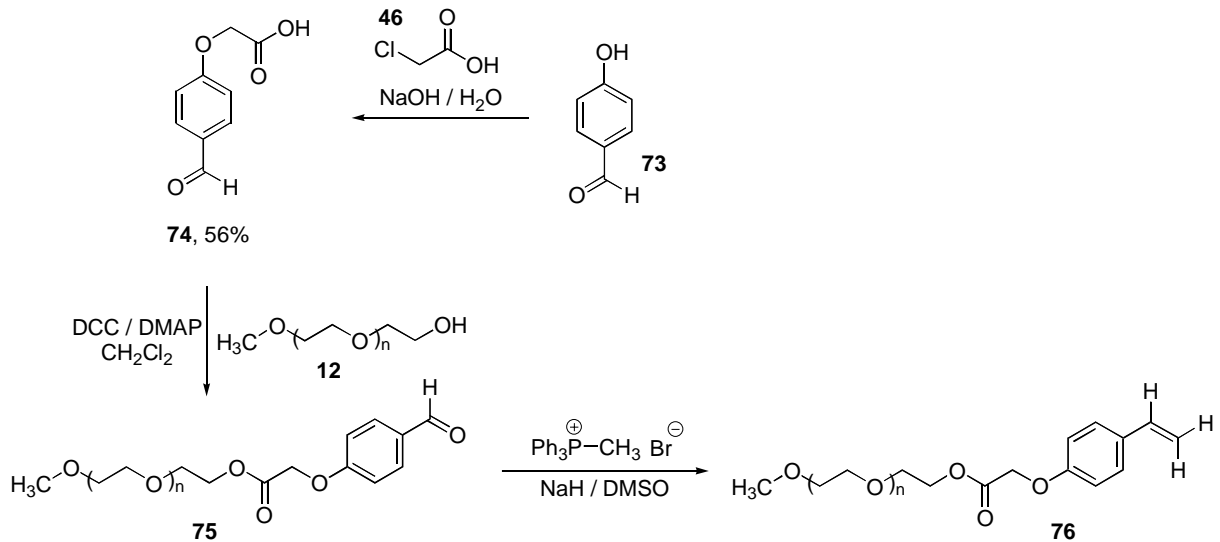


Abb. 5.2.1: Wittig-Reaktion am löslichen Polymer **75**

Ergebnis

Es konnte eine *Wittig*-Reaktion an Polyethylenglycolmonomethylether durchgeführt und die Bildung des Olefines NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

5.3 Synthese von zwei mit Peptiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken an Amino-TentaGel™

Zielsetzung

Nachdem an dem löslichen Polymer **75** eine *Wittig*-Reaktion erfolgreich durchgeführt werden konnte und auch die asymmetrische katalytische Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen zur Verfügung stand, sollten zwei mit Peptiden codierte Bibliotheken von Hydroxyliganden synthetisiert werden.

5.3.1 Bibliothekssynthese mit *Wittig*-Reaktion

5.3.1.1 Synthese des Alaninspacers und der Tripeptideinheit der Liganden

Da die Bibliothek polymergebunden auf Phosphorsäurediesterase-Aktivität gescreent werden sollte, wurde auf einen Linker verzichtet und Amino-TentaGel™ **77** (Durchmesser 130

μm , Beladung 300 pmol/bead) als polymerer Träger gewählt. Zuerst wurde der Trialanin-spacer **78** nach einer standardisierten Peptidsynthese-Vorschrift^[66] an Amino-TentaGel™ **77** aufgebaut. Dazu wurde zunächst FmocAla mit 1-Benzotriazolylloxy-tri-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBop) und 3%igem N-Methylmorpholin (NMM) in absolutem DMF an die polymergebundenen Aminofunktionen angeknüpft. Für die nächsten Kupplungen wurden danach die Fmoc-Schutzgruppen von den Aminofunktionen durch 20%iges Piperidin/DMF entfernt und die Umsetzung mit FmocAla sowie die anschließende Entschützung noch zweimal wiederholt. Die Ausbeuten der einzelnen Kupplungen konnten durch Quantifizierung der abgespaltenen Fmoc-Gruppen UV-spektroskopisch (siehe Kapitel 7.2.1) ermittelt werden und lagen im Bereich von 97-99%.

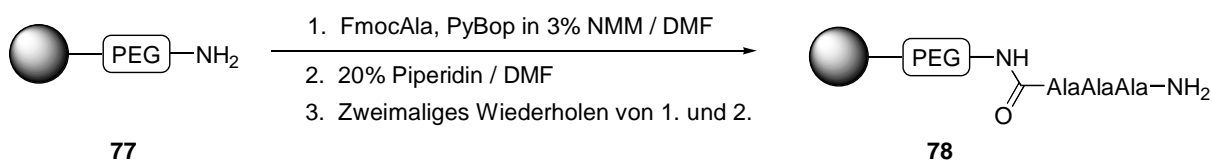


Abb. 5.3.1: *Synthese des Trialaninspacers 78*

In der graphischen Darstellung der weiteren Bibliothekssynthese entspricht dem mit dem Trialanin-spacer versehenen Amino-TentaGel™ **78** folgende Abbildung:

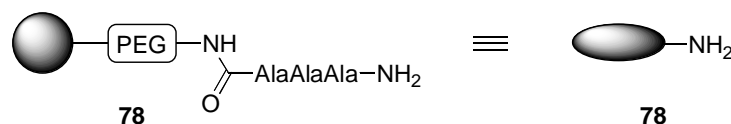


Abb. 5.3.2: *An Amino-TentaGel™ immobilisiertes Trialaninpeptid 78*

Aufbauend auf den Trialanin-spacer **78** wurden mit Hilfe der Split-Mix-Synthese 27 kombinatorische Tripeptideinheiten **83** hergestellt. Die Kupplungen der seitenkettengeschützten Fmoc-Aminosäuren FmocHis(Trt), FmocLys(Boc) und FmocArg(Pmc) an die polymergebundenen Aminofunktionen gelangen dabei wieder mit 1-Benzotriazolylloxy-tri-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBop) und 3%igem N-Methylmorpholin in absolutem DMF. Die Ausbeuten der einzelnen Kupplungen konnten UV-spektroskopisch (Fmoc-Bestimmung) ermittelt werden und lagen wiederum im Bereich von 97-99%.

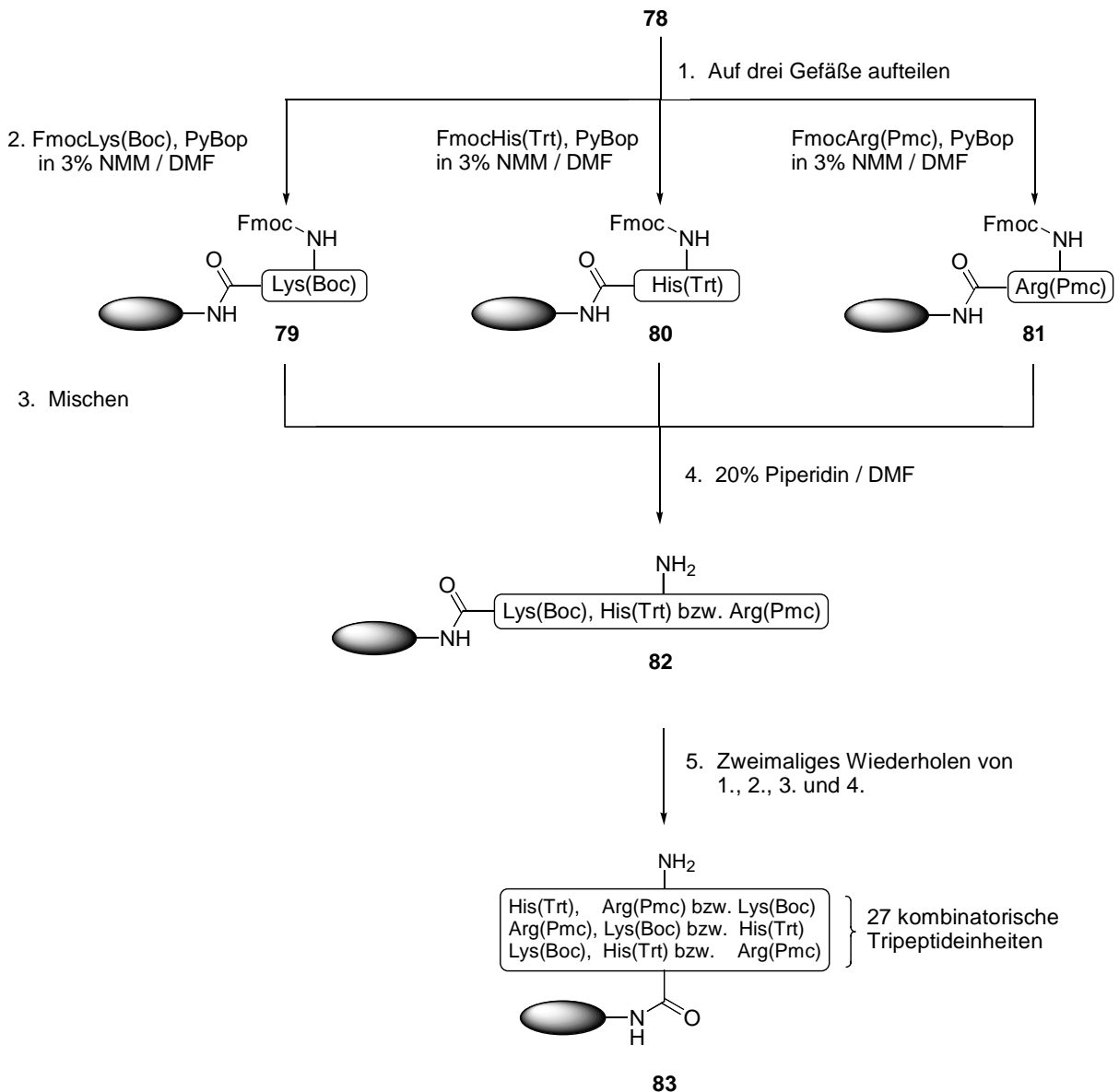


Abb. 5.3.3: Aufbau der kombinatorischen Tripeptideinheit **83** der Liganden

5.3.1.2 Synthese und Codierung der Olefineinheiten der Liganden

Die Tripeptideinheiten in den Liganden sind durch die identische Tripeptideinheit im Codierungsstrang verschlüsselt. Vor dem Anbringen der Aldehydbausteine **84**, **85**, **86** und **74** an den Ligandenstrang mußten diese dagegen durch Einführung einer jeweils codierenden Aminosäure in den Codierungsstrang verschlüsselt werden. Sowohl das Anbringen der Aldehyde als auch die Codierung mit den Aminosäuren wurden wieder mit PyBop in 3%igem NMM/DMF erreicht. Zunächst wurden 11% der codierenden Fmoc-Aminosäure an das Polymer angeknüpft, bevor die restlichen freien Aminofunktionen quantitativ mit den Aldehydbausteinen umgesetzt wurden. Die Menge der codierenden Aminosäuren konnte mit Hilfe der abgespaltenen Fmoc-Gruppen bestimmt werden und lag typischerweise bei einer

Stoffmenge von etwa 30 pmol pro bead. Die quantitative Umsetzung der restlichen Aminofunktionen mit den Aldehydbausteinen konnte durch einen negativen *Kaiser-Test*^[39] (siehe Kapitel 7.2.2) nachgewiesen werden.

Ebenso wie die Aldehyde **84**, **85**, **86** und **74** mußten auch die *Wittig*-Reagenzien **88** bis **93** durch Anknüpfung einer weiteren Aminosäure an den Codierungsstrang verschlüsselt werden; die Ausbeuten dieser Peptidsynthesen waren wiederum nahezu quantitativ (97-99%, was einer Stoffmenge von etwa 30 pmol pro bead entspricht). Danach erfolgte die Zugabe der entsprechenden *Wittig*-Reagenzien in absolutem DMSO.

Formal ließen sich nach der *Wittig*-Reaktion drei Gruppen von olefinischen Liganden unterscheiden:

1. Liganden ohne weitere funktionelle Gruppen
2. Liganden mit geschützten oder freien Carbonsäurefunktionen
3. Liganden mit Aminofunktionen

Liganden der ersten Gruppe konnten nun dihydroxyliert werden, wohingegen Liganden der zweiten Gruppe nach Entschützung der Carbonsäurefunktionen mit einem Aminosäureester umgesetzt und Liganden der dritten Gruppe mit einer weiteren kombinatorischen Tripeptid-einheit versehen werden konnten.

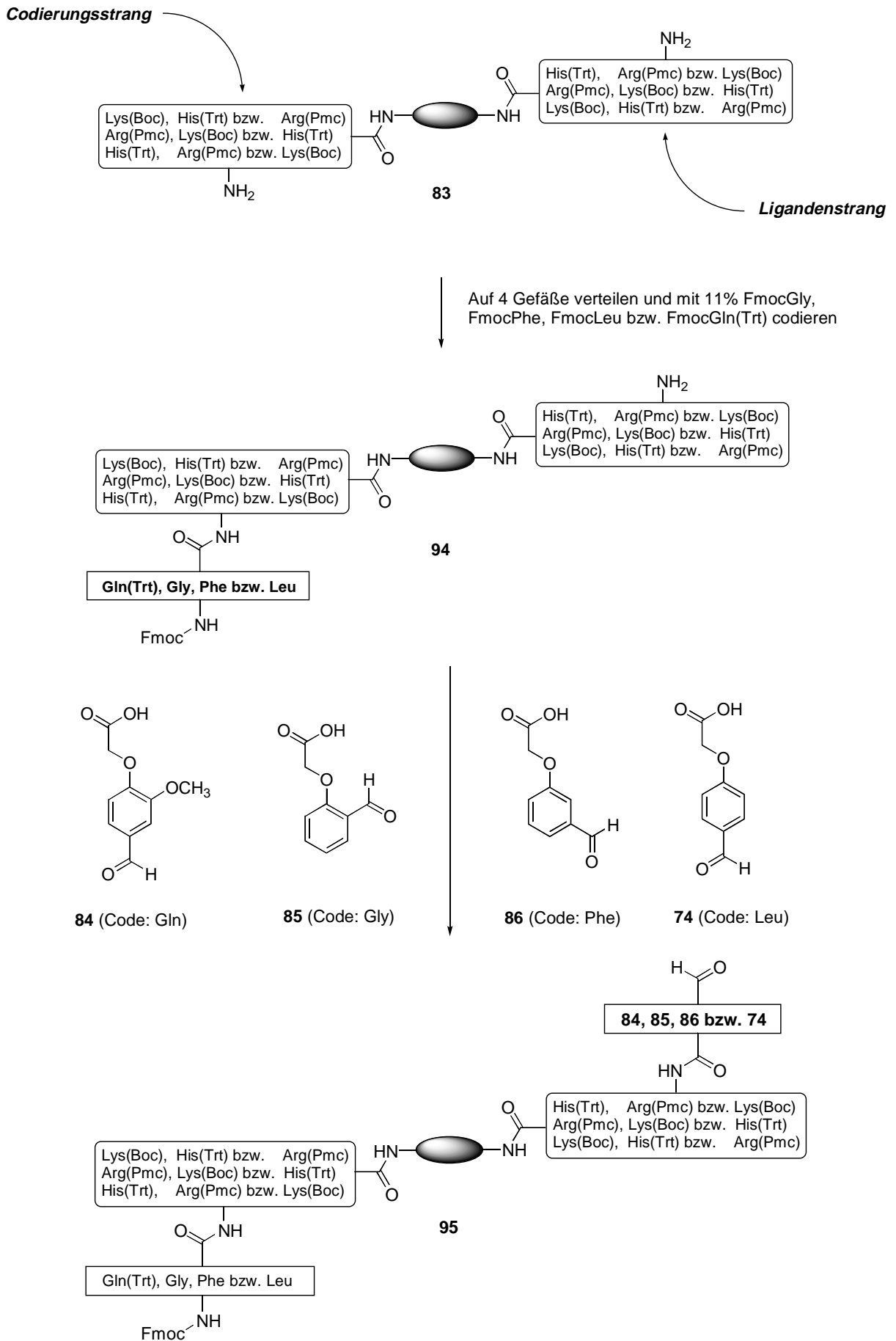


Abb. 5.3.4: Codieren und Anknüpfen der Aldehydbausteine

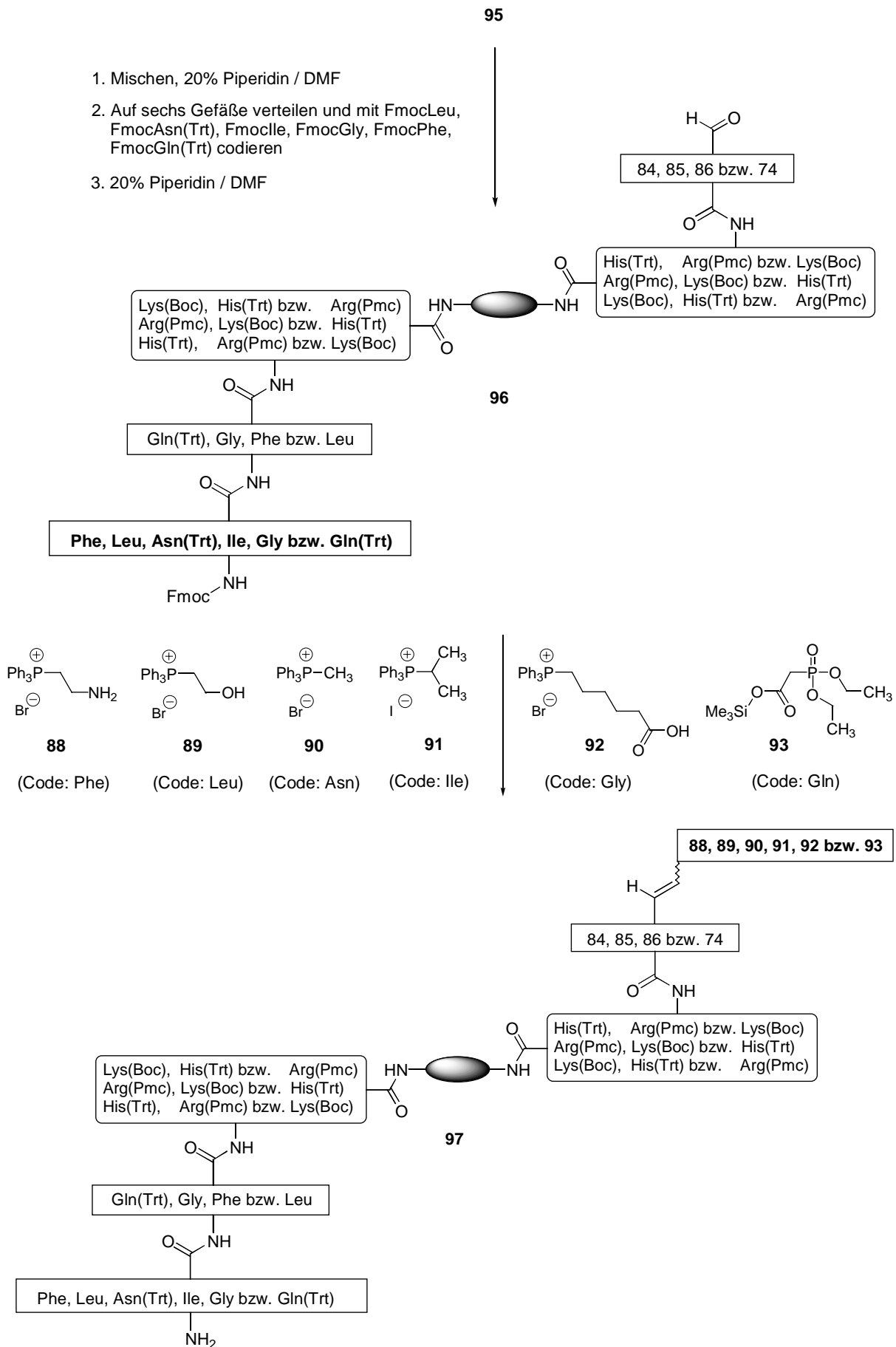


Abb. 5.3.5: Codierung mit Aminosäuren und Umsetzung mit den Wittig-Reagenzien

5.3.1.3 Modifizierung der olefinischen Liganden

5.3.1.3.1 Entschützung der polymergebundenen Silylester und anschließende Umsetzung der Carbonsäuren mit Aminosäureestern

Die polymergebundenen Silylester **98** wurden mit Tetrabutylammoniumfluorid in abs. THF zu **99** umgesetzt und anschließend mit dem Äquivalent aus **97** vereinigt, das durch die Wittig-Reaktion von **92** mit **96** entstanden ist. Das so erhaltene Polymer **100** wurde nach dem Aufteilen auf drei Gefäße und Codieren mit verschiedenen Aminosäuren mit drei Aminosäuremethylestern und PyBop / NMM in DMF umgesetzt.

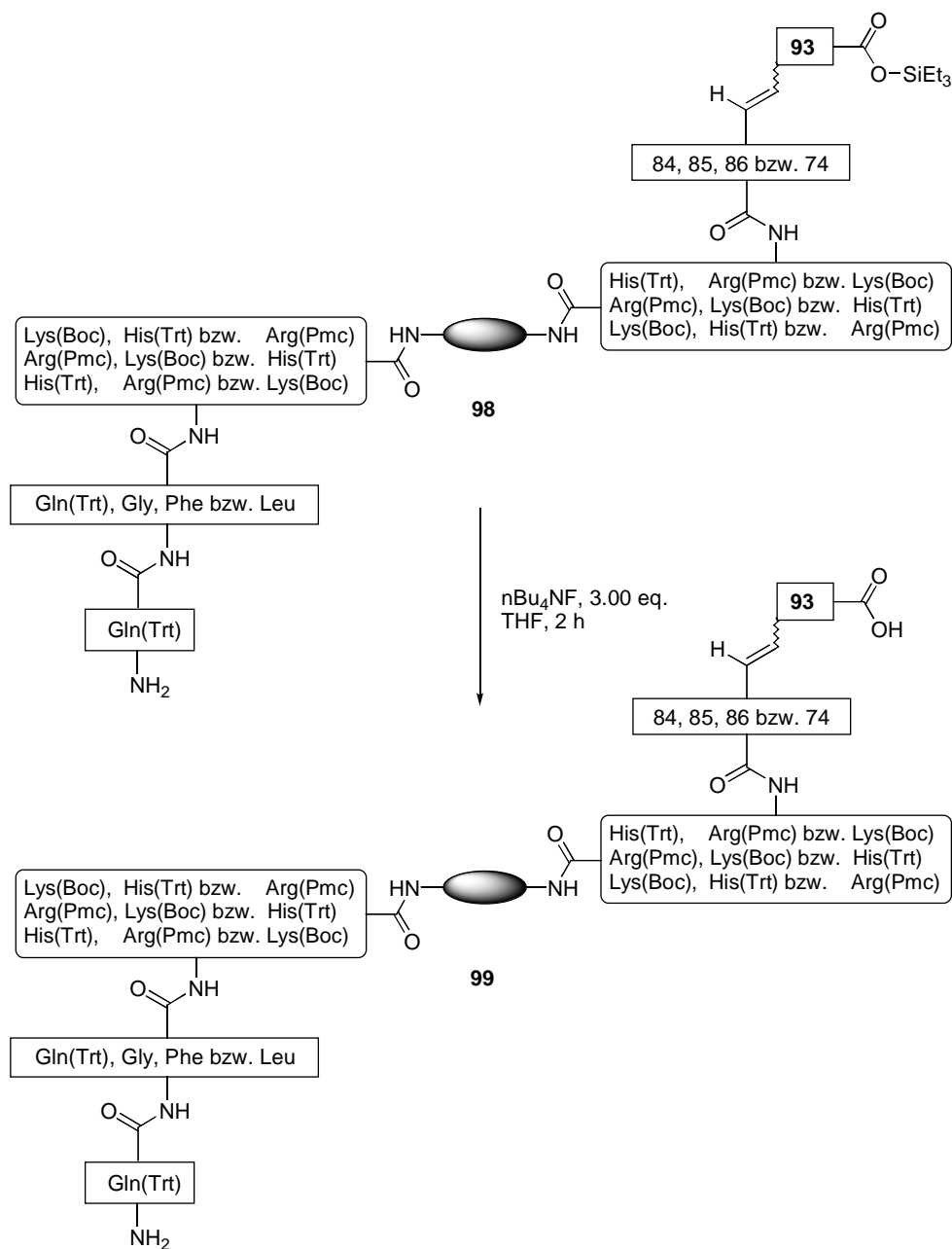


Abb. 5.3.6: Entschützung der Silylester **98**

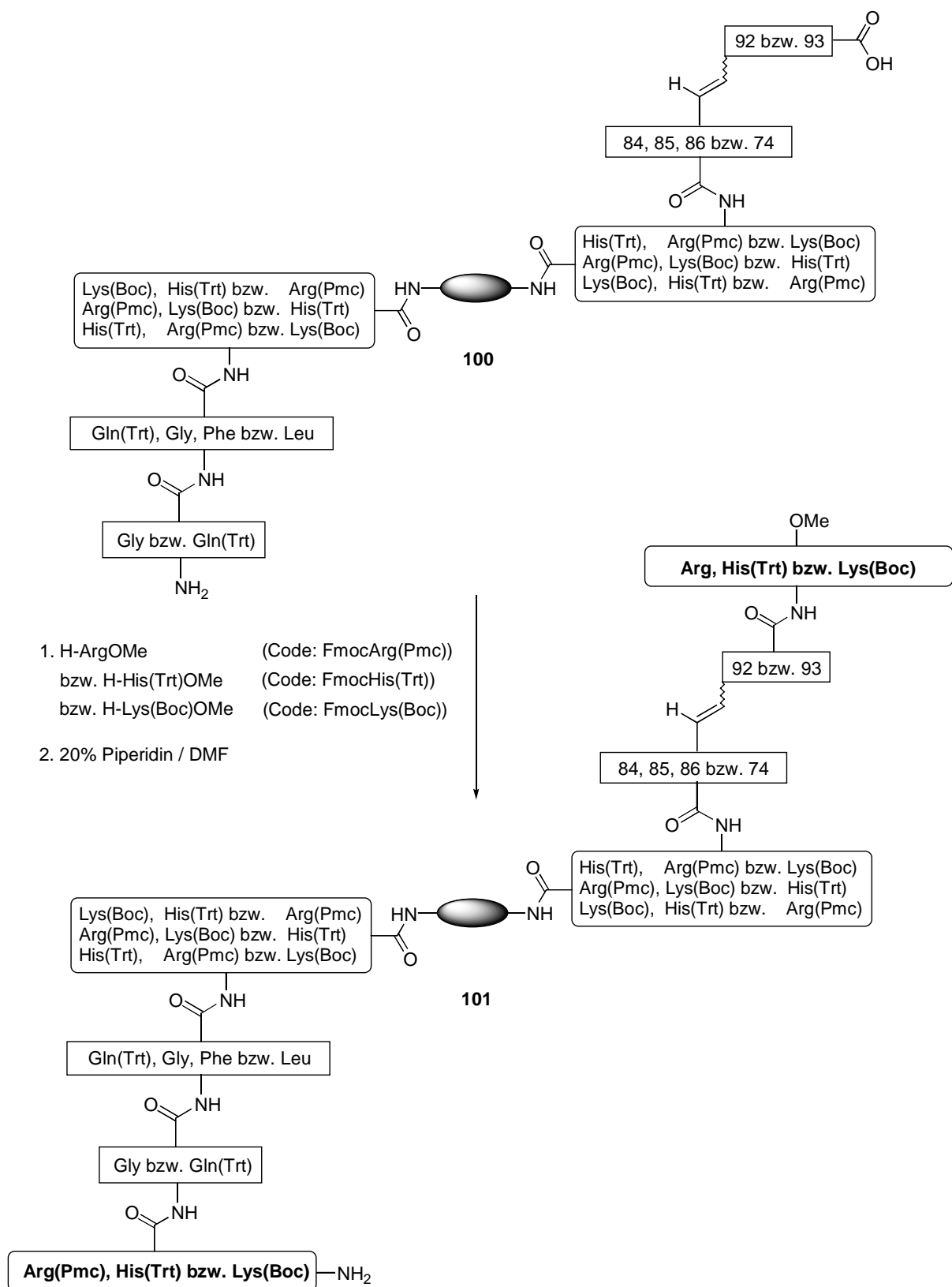


Abb. 5.3.7: Codieren und Anknüpfen der Aminosäureester an die Carbonsäurefunktion der Liganden

5.3.1.3.2 Aufbau einer weiteren Tripeptideinheit an die olefinischen Liganden mit Aminofunktionen

Die olefinischen Liganden **102** mit Aminofunktionen wurden mit Hilfe der Split-Mix-Synthese mit einer weiteren kombinatorischen Tripeptideinheit versehen. Die Quantifizierung der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen ergab jeweils einen Wert von 22%. Das weist auf eine Ausbeute der *Wittig*-Reaktion mit dem Amino-*Wittig*-Reagenz **88** von etwa 13% hin.

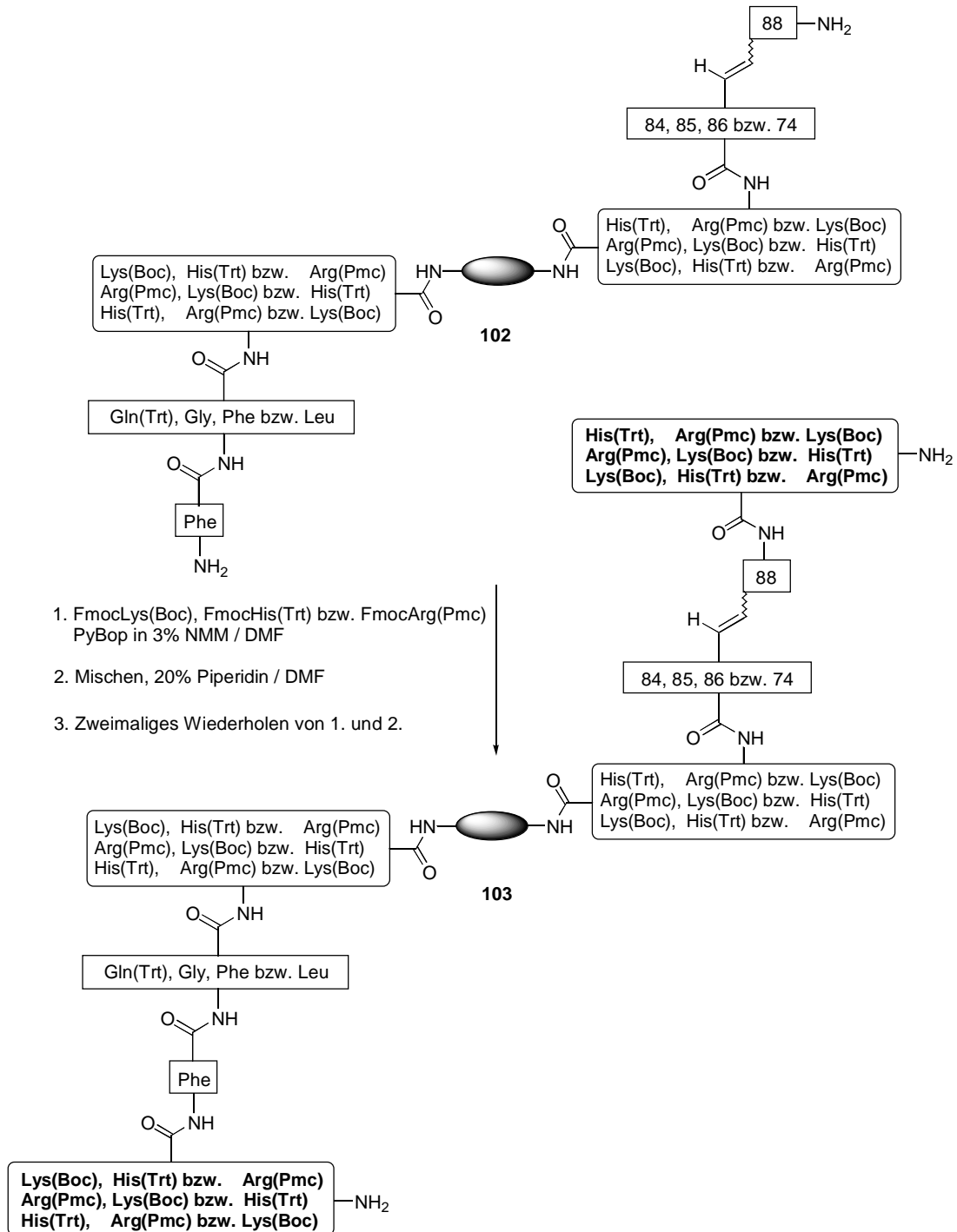


Abb. 5.3.8: Aufbau einer weiteren kombinatorischen Tripeptideinheit an die Aminofunktion der Liganden **102**

5.3.1.4 Dihydroxylierung der polymergebundenen olefinischen Liganden und Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Die erhaltenen Unterbibliotheken **97**, **99**, **101** und **103** der olefinischen Liganden wurden vereinigt und der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung unterworfen, nachdem die gesamte Bibliothek mit Alanin umgesetzt worden war. Die Dihydroxylierung wurde in THF : Wasser (1:1) mit AD-Mix- β ⁷ durchgeführt, die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen gelang mit Trifluoressigsäure.

So konnte eine formal aus den vier Unterbibliotheken **104** (648 Verbindungen), **105** (2916 Verbindungen), **106** (108 Verbindungen) und **107** (648 Verbindungen) bestehende Gesamtbibliothek **108** von dihydroxylierten Liganden synthetisiert werden, die anschließend auf Phosphorsäurediesterase-Aktivität durchsucht wurde. Die angegebenen Anzahlen von Verbindungen beziehen sich dabei lediglich auf die Diastereomere, welche nach den Regeln von *Sharpless* mit AD-Mix- β im Überschuß entstehen sollten.

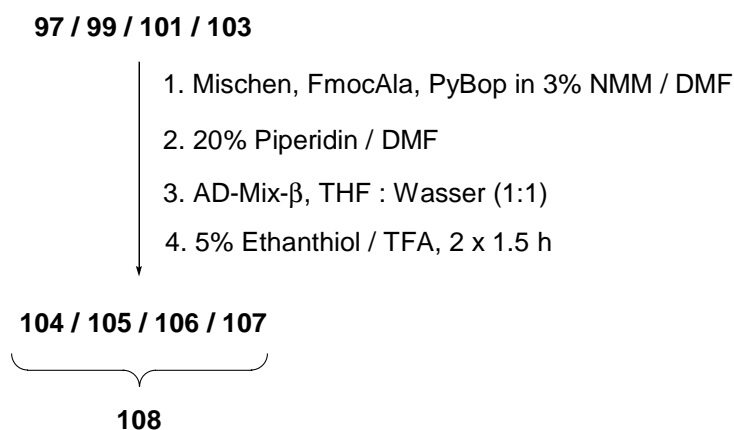


Abb. 5.3.9: Dihydroxylierung der Liganden und Entfernen der Schutzgruppen

⁷ Vorgefertigte Mischung für die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von Olefinen: 1.40 g AD-Mix- β enthalten 0.40 mol-% $K_2OsO_2(OH)_4$, 3.00 eq. K_2CO_3 , 3.00 eq. $K_3[Fe(CN)_6]$ sowie 1.00 mol-% (DHQD)₂PHAL-Ligand **57** für 1.00 mmol Olefin.

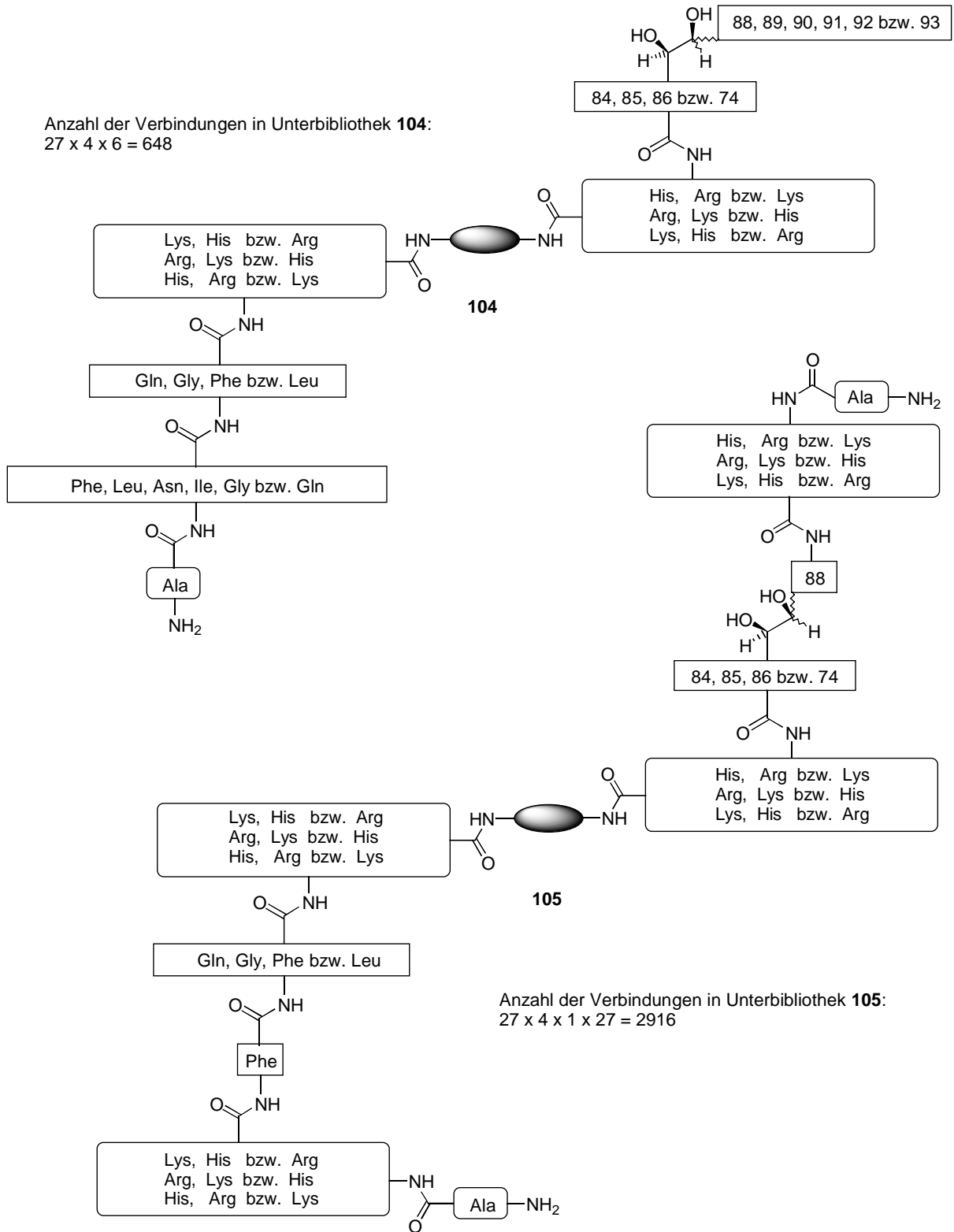


Abb. 5.3.10: Unterbibliotheken **104** und **105**

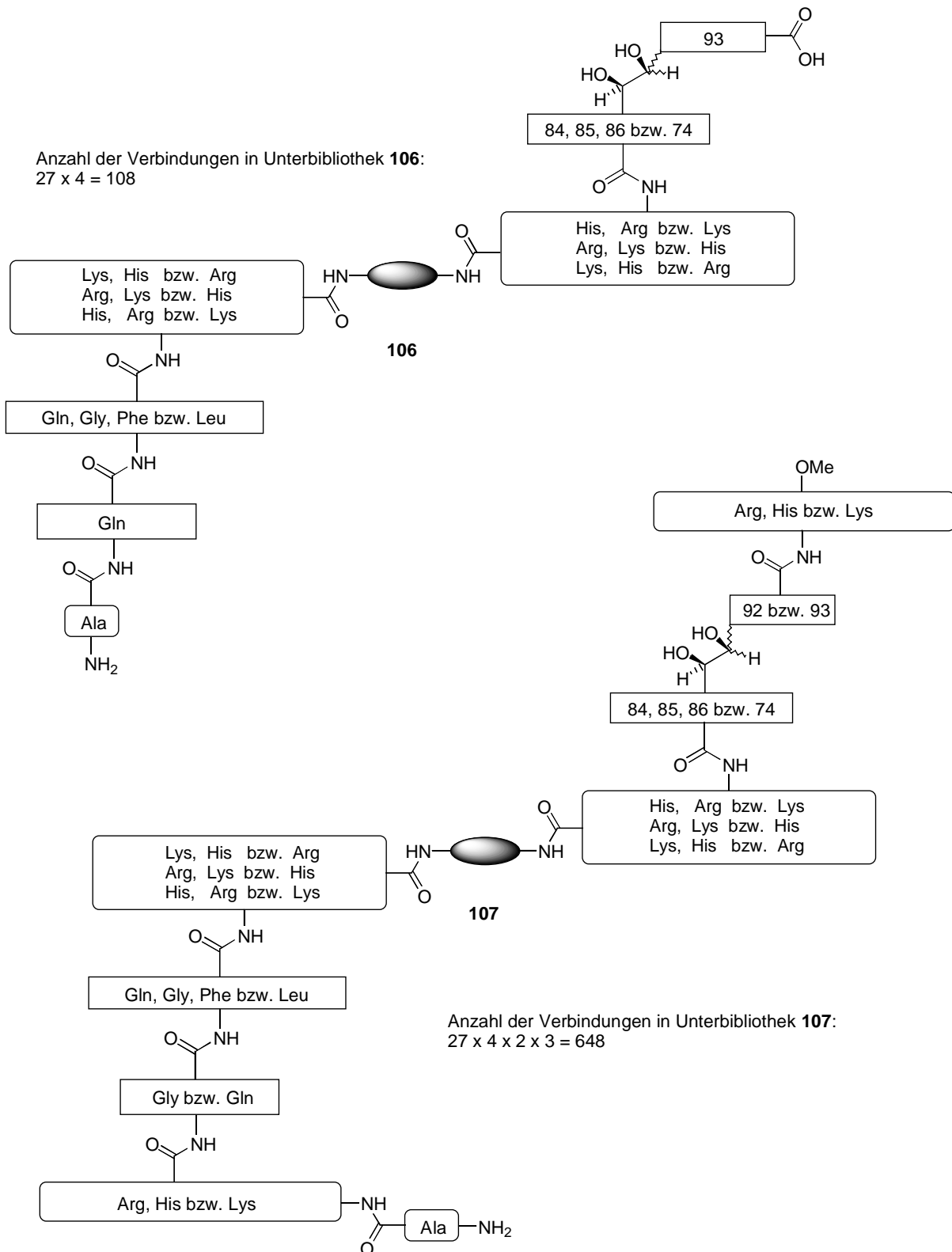


Abb. 5.3.11: Unterbibliotheken **106** und **107**

5.3.1.5 Überprüfung der Codierung

Um die Zuverlässigkeit der Codierungsmethode zu überprüfen, wurde aus der Gesamtbibliothek **108** willkürlich ein polymerer Träger **109** entnommen und die Aminosäuresequenz des Codierungsstranges durch einen Edman-Abbau bestimmt.

Dabei konnte folgende eindeutige Sequenz ermittelt werden, die neben dem Alaninspacer und dem aminoterminalen Alanin auch die eindeutig codierende Sequenz enthält:



Dieser Peptid-Code sollte folgenden polymeren Träger **109** aus der Bibliothek **108** verschlüsseln:

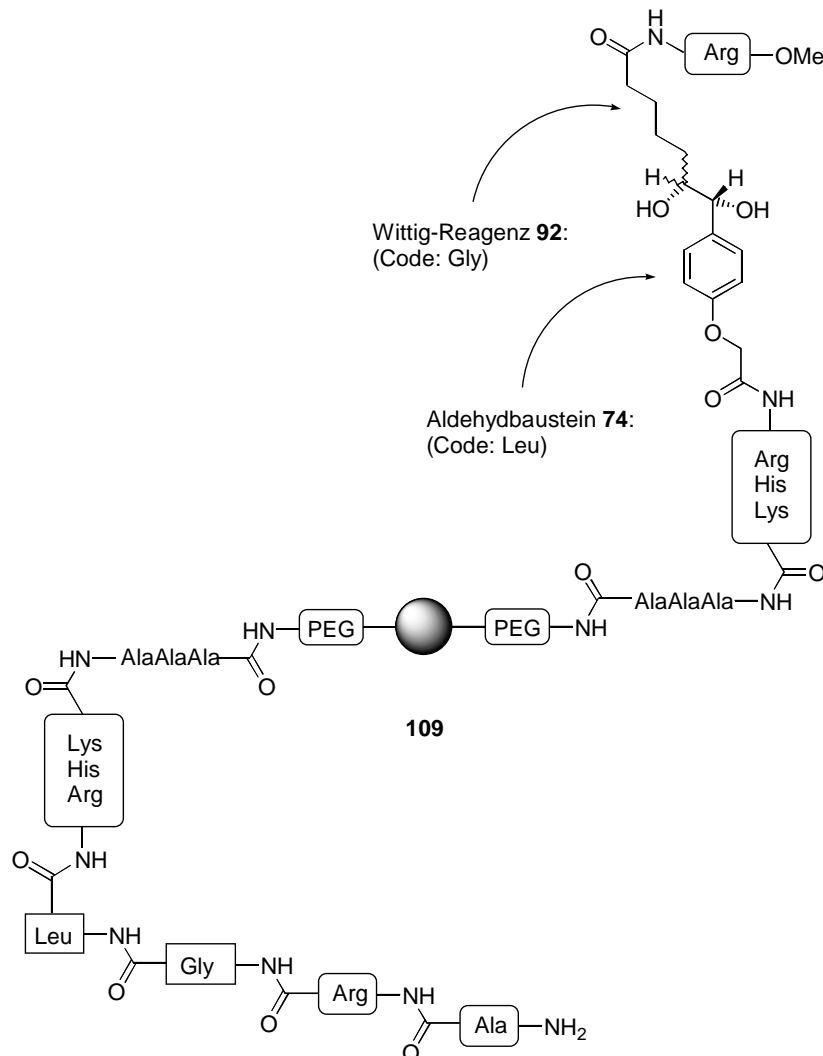


Abb. 5.3.12: Ligand und Peptid-Code

5.3.2 Bibliothekssynthese mit olefinischen Carbonsäuren

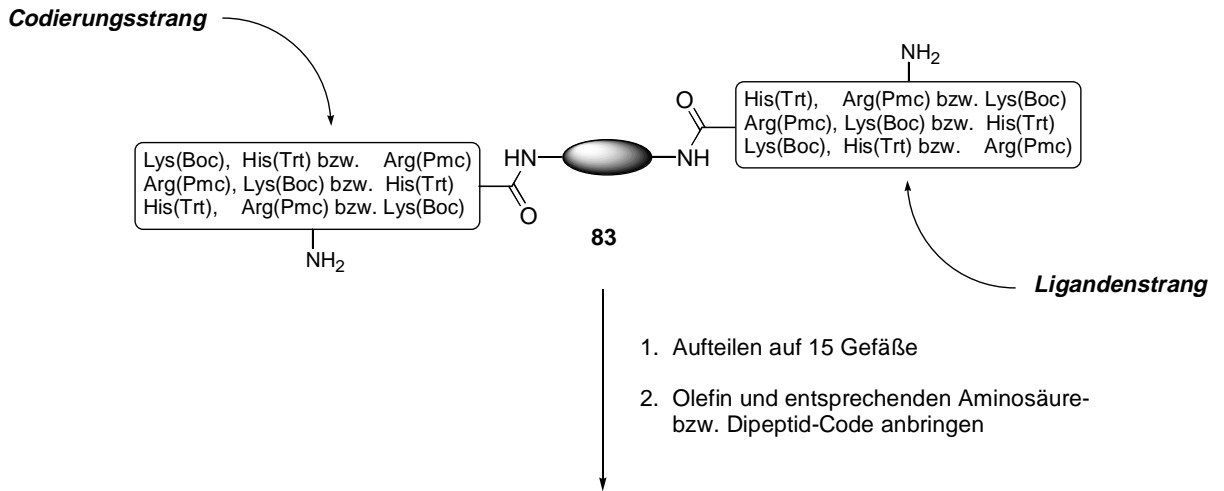
5.3.2.1 Anknüpfung der Olefine an die kombinatorischen Tripeptideinheiten

Das Polymer **83** wurde auf fünfzehn Gefäße verteilt und mit den in der Tabelle aufgeführten Olefinen und dem dazugehörigen Peptid-Code (ca. 11% der freien Aminofunktionen des festen Trägers, etwa 30 pmol pro bead) versehen. Dazu wurden zunächst die ersten Aminosäuren der Dipeptid-Codes angeknüpft, danach das Olefin und schließlich die zweiten Aminosäuren der Dipeptid-Codes. Diese Reaktionen wurden wieder mit PyBop / NMM als Kupplungsreagenz in abs. DMF durchgeführt. Die Ausbeuten der Peptidsynthesen zum Aufbau des Codierungsstranges wurden wieder mit der Fmoc-Methode bestimmt und lagen bei 98%; die quantitative Anknüpfung der Carbonsäure an den Ligandenstrang konnte jeweils durch einen negativen *Kaiser*-Test nachgewiesen werden.

So konnten wieder zwei Gruppen von Liganden erhalten werden:

1. Liganden mit freien Carbonsäurefunktionen **125**
2. Liganden mit keiner weiteren kupplungsfähigen Gruppe in der angeknüpften Carbonsäure **126**

Die Liganden der zweiten Gruppe konnten somit nicht weiter mit Aminosäuren modifiziert werden, während die Liganden der ersten Gruppe nach der Codierung mit der entsprechenden Aminosäure mit einem Aminosäuremethylester umgesetzt wurden.



<p>110</p> <p>Code 110: LeuLeu</p>	<p>111</p> <p>Code 111: LeuPhe</p>	<p>112</p> <p>Code 112: LeuGly</p>	<p>113</p> <p>Code 113: Ile</p>	<p>114</p> <p>Code 114: Leu</p>
<p>115</p> <p>Code 115: Phe</p>	<p>116</p> <p>Code 116: Gly</p>	<p>117</p> <p>Code 117: Asn</p>	<p>118</p> <p>Code 118: Val</p>	<p>119</p> <p>Code 119: GlyGly</p>
<p>120</p> <p>Code 120: GlyPhe</p>	<p>121</p> <p>Code 121: GlyLeu</p>	<p>122</p> <p>Code 122: PhePhe</p>	<p>123</p> <p>Code 123: PheGly</p>	<p>124</p> <p>Code 124: PheLeu</p>

125
(Bausteine 114-117)

+

126
(Bausteine 110-113 und
118-124)

Abb. 5.3.13: Codierung und Anknüpfung der Olefine an die Tripeptideinheiten der Liganden **83**

5.3.2.2 Umsetzung der Carbonsäuren mit Aminosäureestern

Die polymergebundenen Carbonsäuren **125** wurden nach dem Aufteilen auf drei Gefäße und dem Codieren mit den entsprechenden Aminosäuren mit drei Aminosäuremethylestern und PyBop / NMM in DMF umgesetzt.

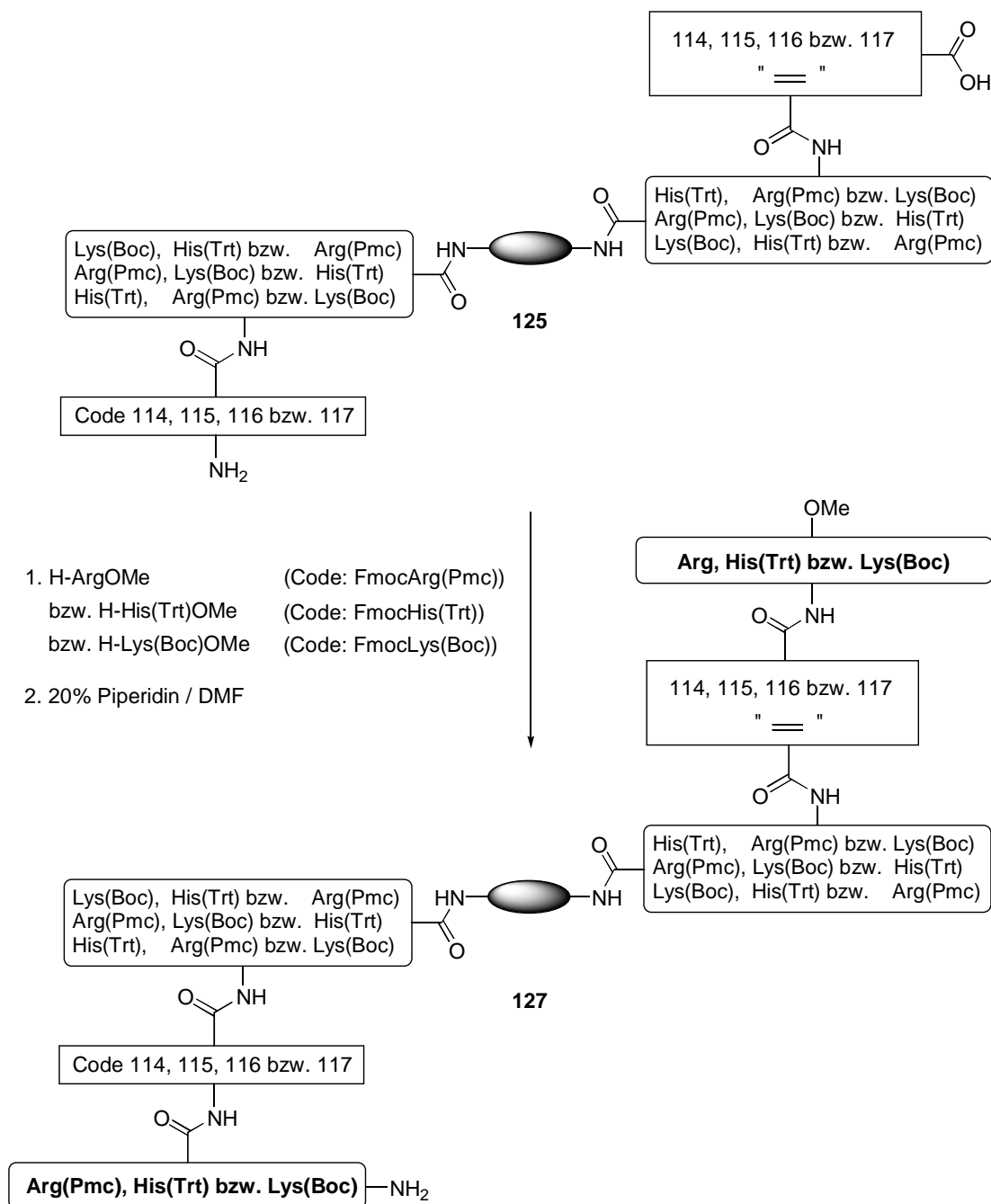


Abb. 5.3.14: Codieren und Anknüpfen der Aminosäureester an die Carbonsäurefunktion der Liganden **125**

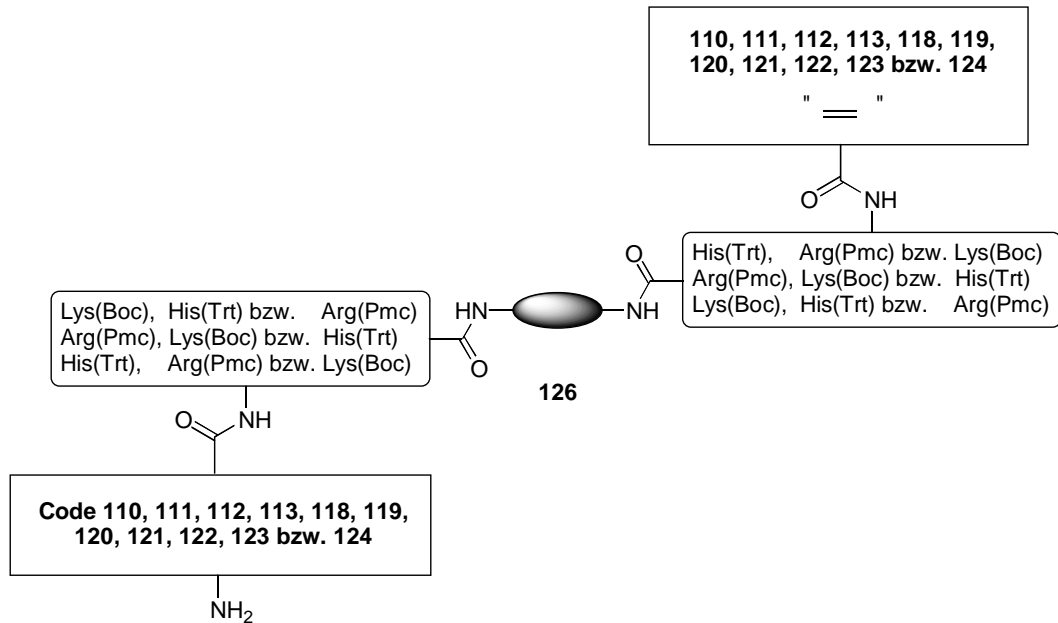


Abb. 5.3.15: Unterbibliothek 126

5.3.2.3 Dihydroxylierung der polymergebundenen olefinischen Liganden und Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Die drei Unterbibliotheken **125**, **126** und **127** wurden anschließend vereinigt und für die abschließende Dihydroxylierung codiert. Die Dihydroxylierung wurde wieder in THF : Wasser (1:1) durchgeführt, wobei sowohl AD-Mix- α ⁸ als auch AD-Mix- β verwendet wurde.

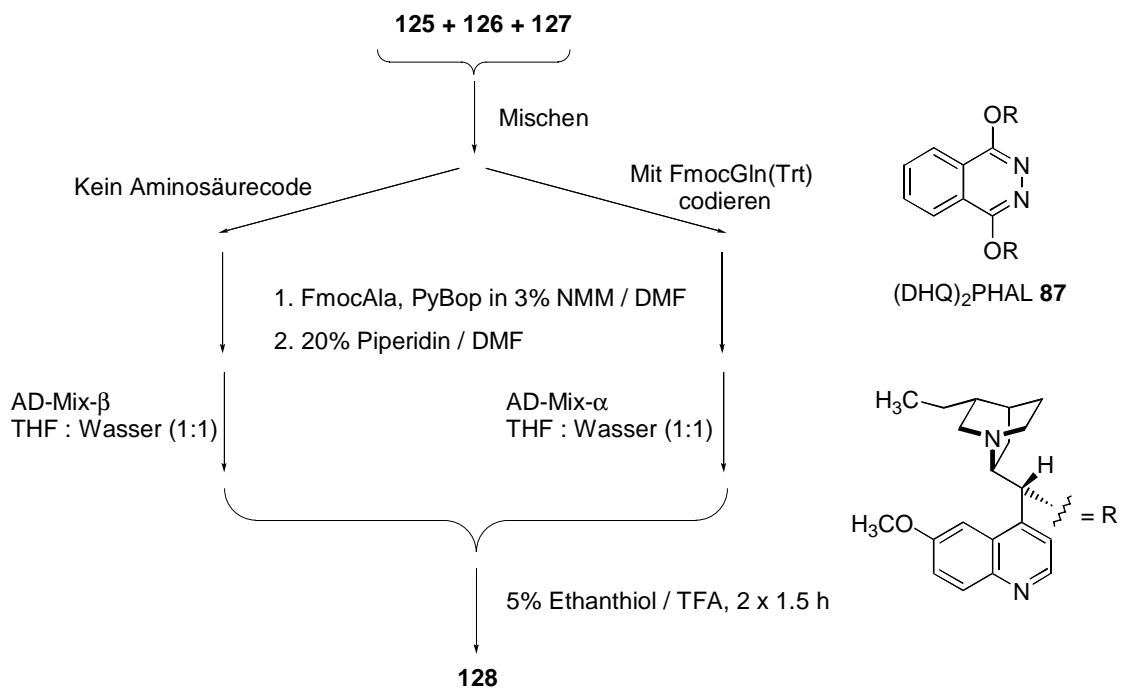
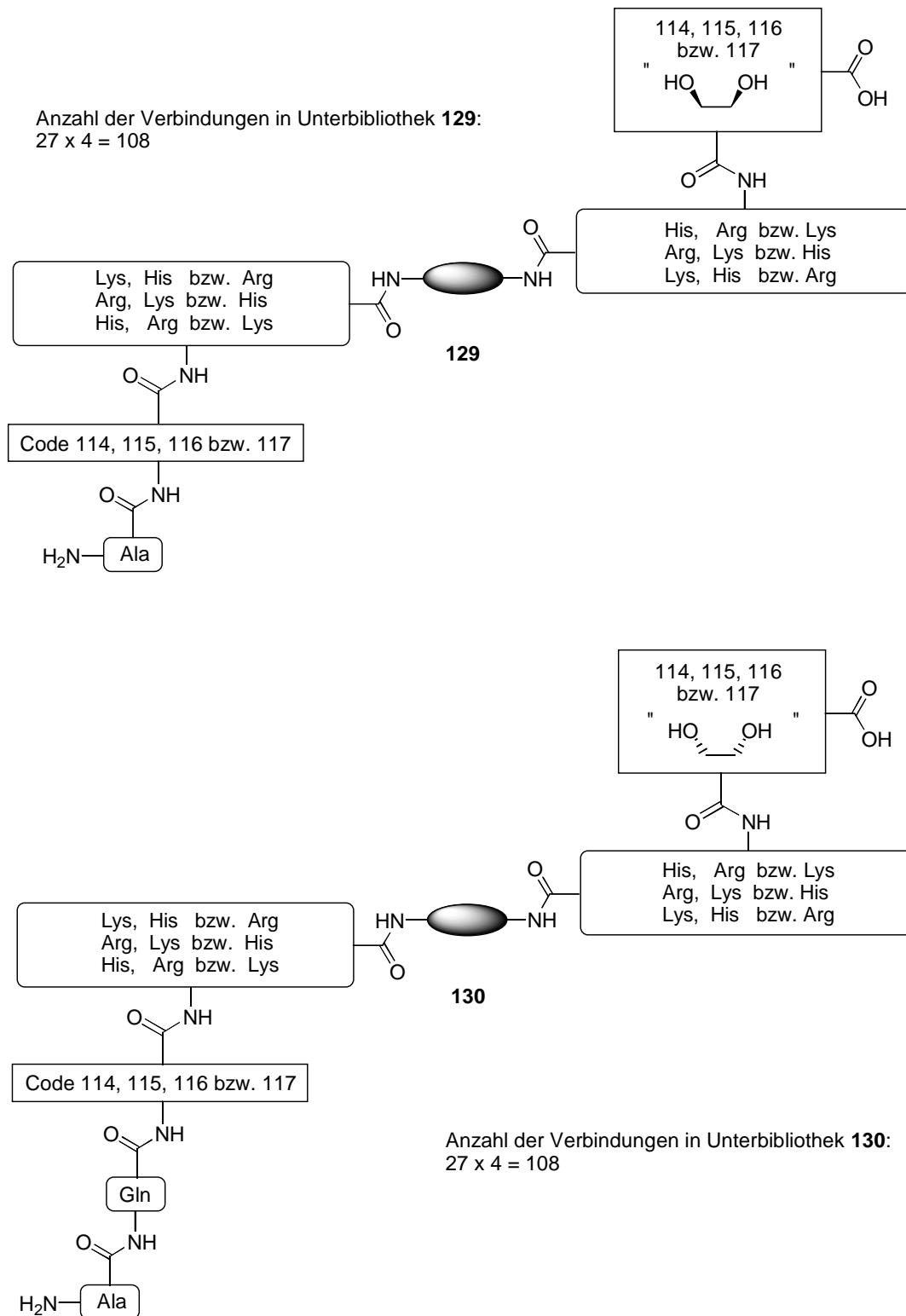


Abb. 5.3.16: Dihydroxylierung der Liganden und Abspaltung der Schutzgruppen

Nach Abspaltung der Aminosäureseitenkettenschutzgruppen mit Trifluoressigsäure lag somit eine Gesamtbibliothek **128** in Form von sechs Unterbibliotheken (jeweils drei Paare von diastereomeren Unterbibliotheken) für das Screening nach Phosphorsäurediesterase-Aktivität vor, die formal aus insgesamt 1458 Verbindungen bestand.



⁸ AD-Mix- α enthält im Gegensatz zu AD-Mix- β den Liganden (DHQ)₂PHAL **87** anstatt (DHQD)₂PHAL.

Abb. 5.3.17: Unterbibliotheken 129 und 130

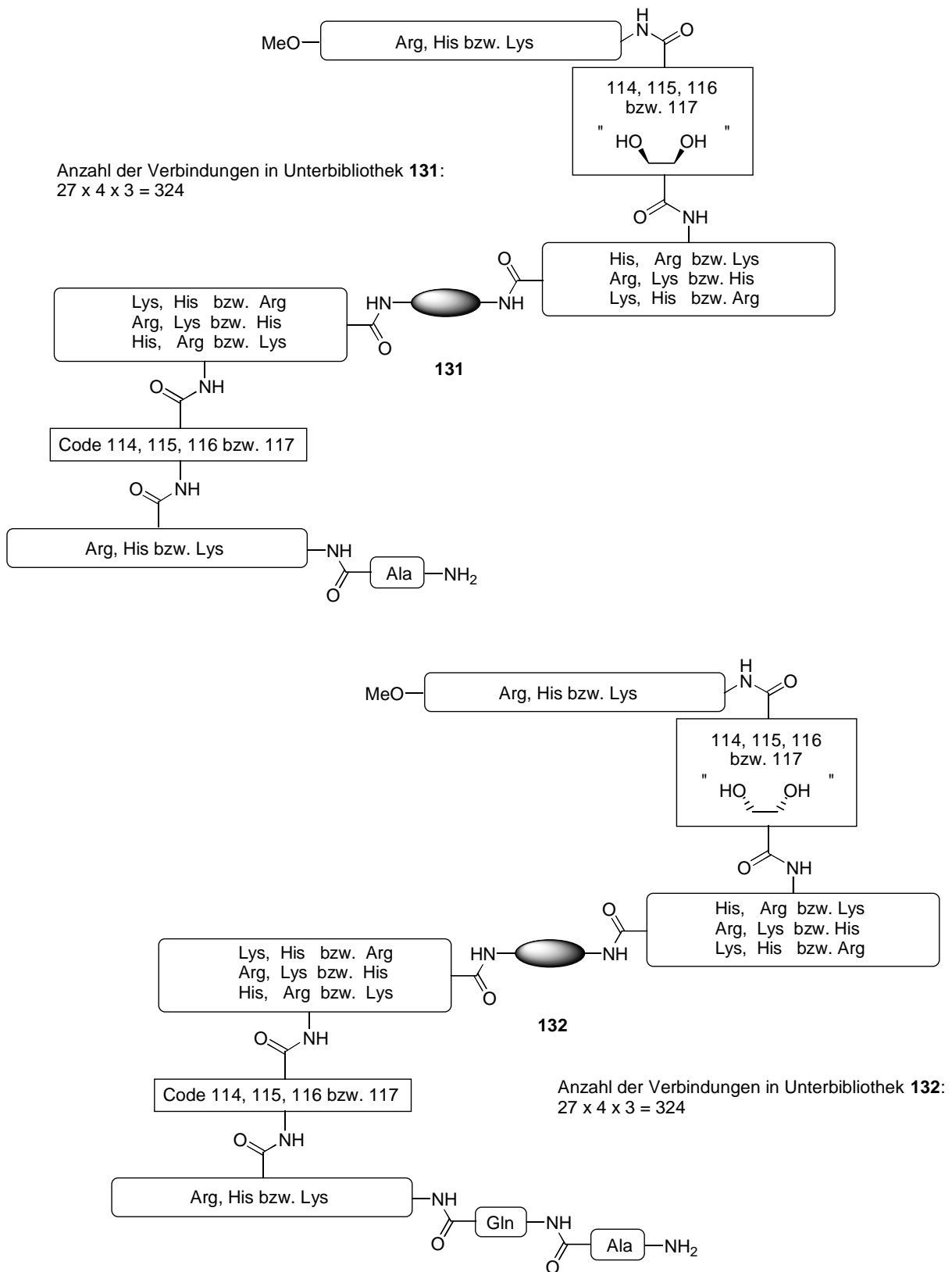


Abb. 5.3.18: Unterbibliotheken 131 und 132

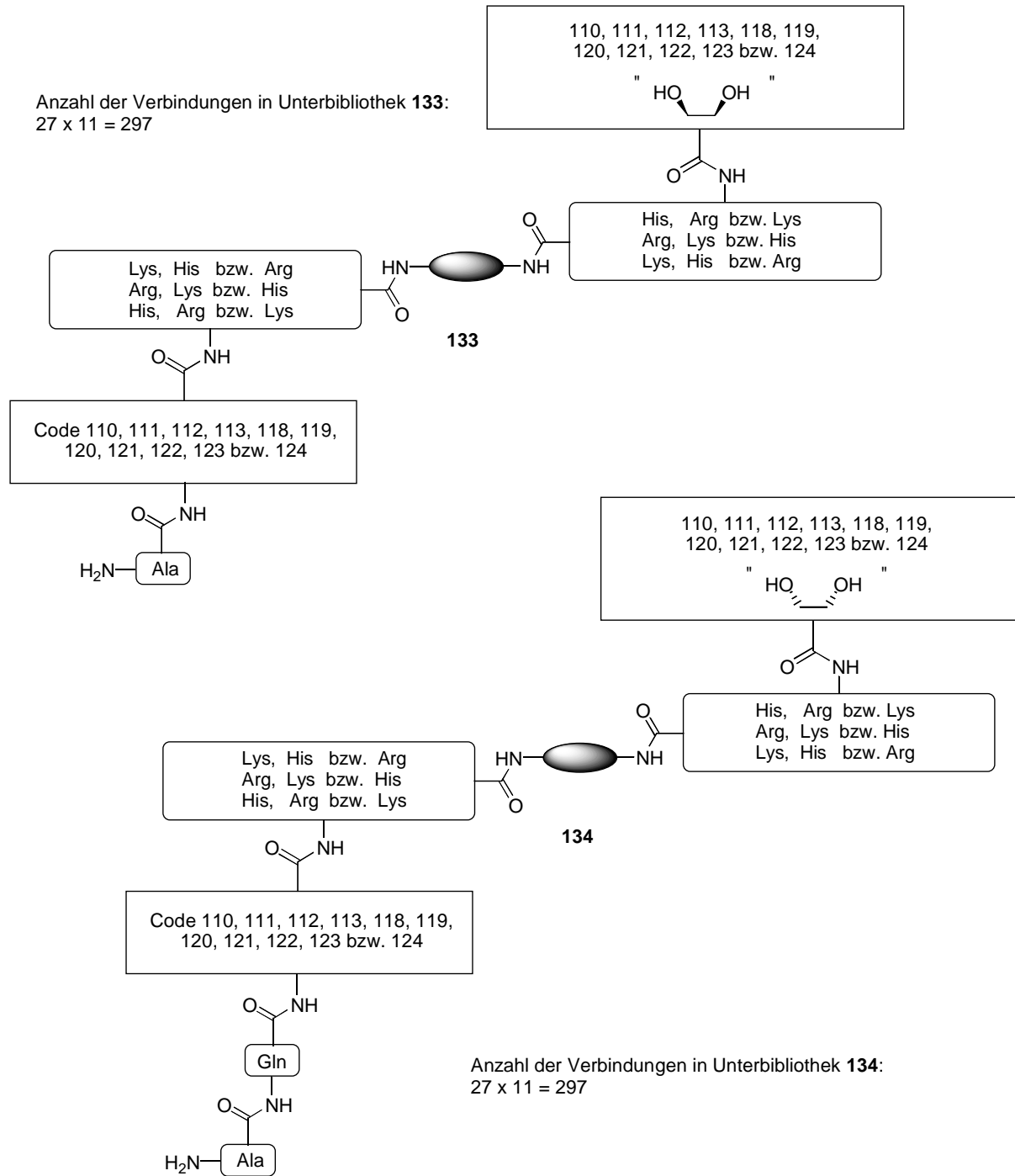


Abb. 5.3.19: Unterbibliotheken **133** und **134**

5.3.2.4 Überprüfung der Codierung

Aus den vereinigten Unterbibliotheken wurde wieder ein polymerer Träger **135** willkürlich herausgegriffen und seine Aminosäuresequenz des Peptid-Codes durch Edman-Abbau bestimmt, um die Zuverlässigkeit der Codierung zu überprüfen.

Die gefundene Aminosäuresequenz lautete:



Auch dieser Peptid-Code weist neben dem Alaninspacer und dem aminoterminalen Alanin eine eindeutig codierende Sequenz auf, die folgenden Vertreter der Bibliothek verschlüsseln sollte:

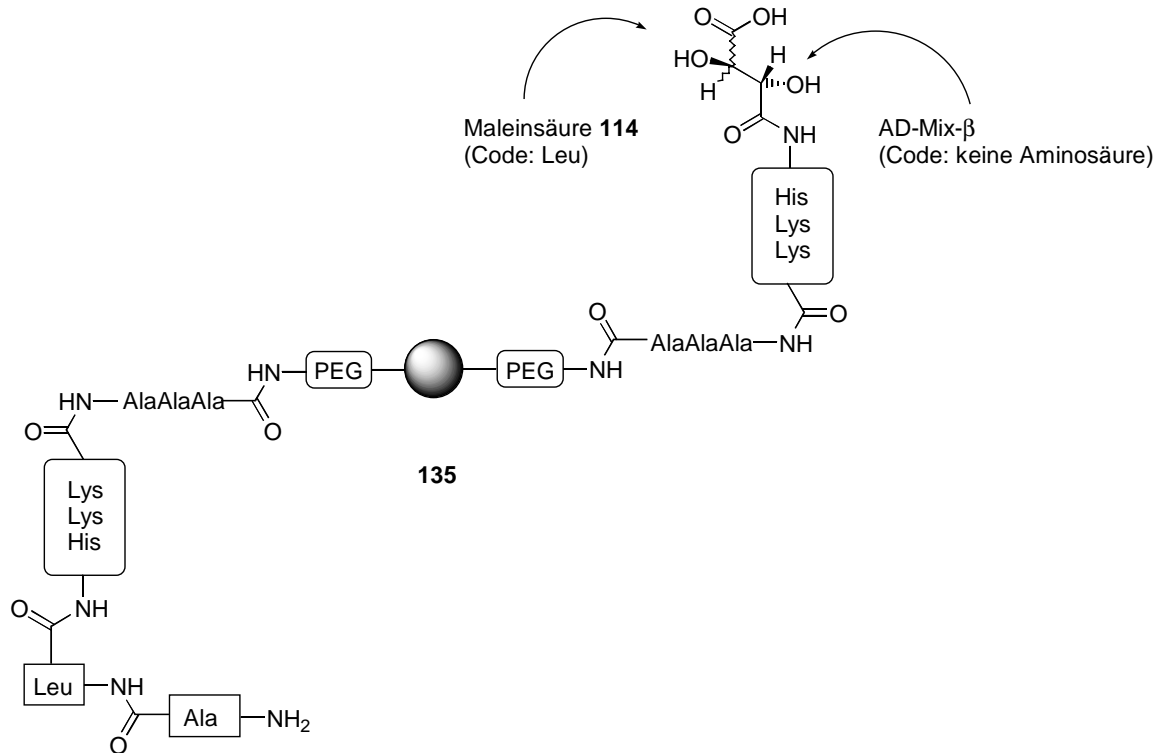


Abb. 5.3.20: Ligand und Peptid-Code

Ergebnis

Bibliotheken von dihydroxylierten Liganden lassen sich durch Peptide eindeutig codieren. Diese Codierungstechnik erlaubt auch die Verwendung von *Wittig*-Reaktionen zum Aufbau der Olefineinheiten (Bibliothek **108**). Allerdings zeigte sich, daß die *Wittig*-Reaktion aufgrund der stark variierenden Ausbeute nicht die quantitative Synthese von festphasengebundenen Olefinen in der kombinatorischen Synthese gewährleistet.

Der quantitative Aufbau der für die Dihydroxylierung nötigen Olefineinheit gelang dagegen durch die Anknüpfung von olefinischen Carbonsäuren an den Aminoterminus des Ligandenstranges (Bibliothek **128**).

5.4 Screening der beiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen

Zielsetzung

Die beiden Bibliotheken **108** und **128** sollten nach Vertretern mit künstlicher Phosphorsäure-diesterase-Aktivität untersucht werden. Neben dem gängigen Verfahren, das Screening nach aktiven Verbindungen in Mikrotitrationsplatten durchzuführen, sollten vor allem neue Screeningverfahren entwickelt werden, die ein schnelles batchweises Screening erlauben.

5.4.1 Screening der Bibliothek **108** mit Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäure-diester **19** nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen in Mikrotitrationsplatten

Die Bibliothek **108** wurde mit Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäure-diester **19** nach Vertretern mit künstlicher Phosphorsäure-diesterase-Aktivität durchsucht. Dazu wurden in 15 Mikrotitrationsplatten (96 Vertiefungen pro Platte) jeweils pro Vertiefung etwa 15 Polymerkügelchen gegeben (entspricht etwa 4.50 nmol festphasengebundenen Liganden, 2.25×10^{-5} M) mit dem Testsubstrat **19** (2.50×10^{-4} M) sowie Europiumchlorid (2.50×10^{-4} M) in MOPSO-Puffer⁹ (2.50×10^{-2} M, pH = 7.0) bzw. ohne Metallsalz bei pH = 8.0 in EPPS-Puffer¹⁰ (2.50×10^{-2} M) versetzt. Damit wurden etwa 21600 polymere Trägerpartikel untersucht, was bei einer Gesamtzahl von 4320 verschiedenen Verbindungen in der Bibliothek nach Burgess^[67] eine Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% ergibt, daß alle Vertreter der Bibliothek im Screeningverfahren getestet wurden.

Danach wurde die Extinktion in den einzelnen Vertiefungen beim Absorptionsmaximum des freigesetzten 4-Nitrophenolats **20** von 405 nm mit einem UV-Vis-Scanning-Spektroskop verfolgt. Die polymeren Träger in den Vertiefungen mit dem stärksten Anstieg der Extinktion sollten danach nochmals einzeln mit Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäure-diester **19** im UV-Vis-Scanning-Spektroskop untersucht werden, um den aktivsten Vertreter der Bibliothek zu ermitteln. In keiner der Mikrotitrationsplatten konnte ein überdurchschnittlicher Anstieg der Extinktion in einer Vertiefung detektiert werden. Wie die Abbildungen 5.4.2 und 5.4.3 zeigen, stiegen die Extinktionen sowohl bei den Reaktionen mit Europiumchlorid als auch bei denen ohne Metallsalzzugabe gleichmäßig an.

⁹ 3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure

¹⁰ 3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-propan-1-sulfonsäure

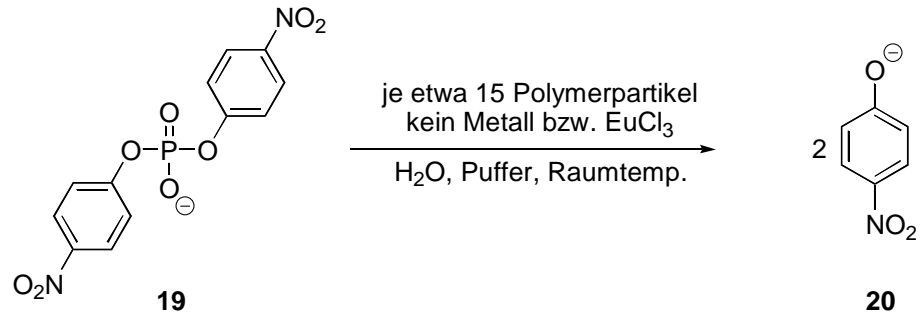


Abb. 5.4.1: Testreaktion in den Mikrotitrationsplatten

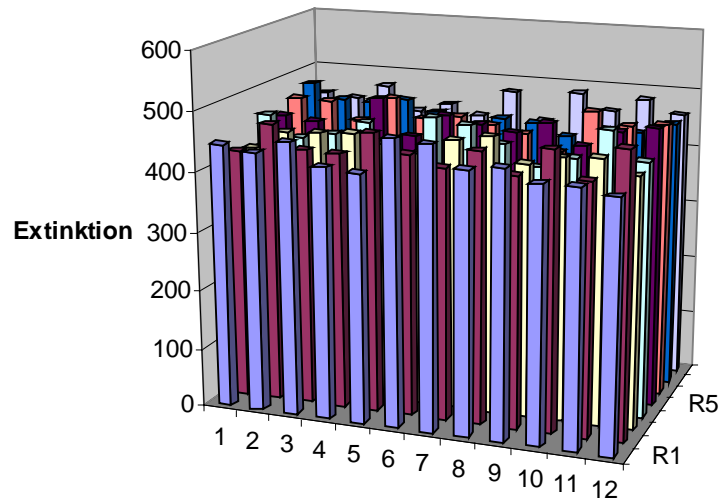


Abb. 5.4.2: Exemplarisches Screeningergebnis einer Mikrotitrationsplatte ohne Metallsalz, $\text{pH} = 8.0$, 2 d; Extinktion in willkürlichen Einheiten

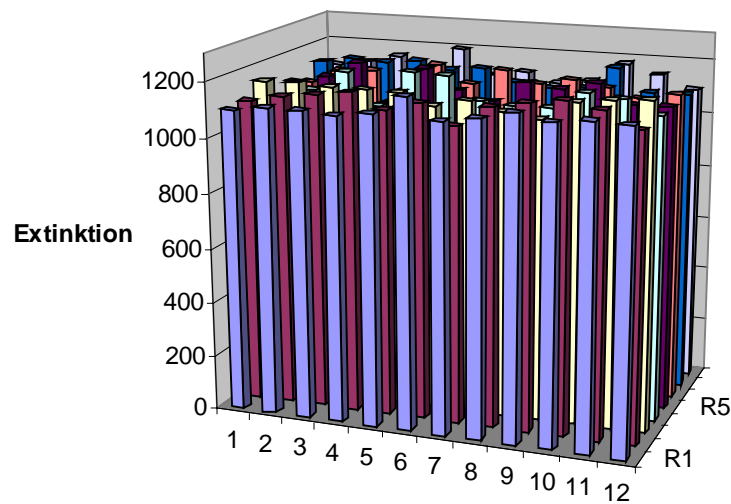


Abb. 5.4.3: Exemplarisches Screeningergebnis einer Mikrotitrationsplatte mit EuCl_3 , $\text{pH} = 7.0$, 20 h; Extinktion in willkürlichen Einheiten

5.4.2 Batchweises Screening nach künstlichen Phosphorsäurediestern

5.4.2.1 Screening der Bibliothek 128 nach künstlichen Phosphorsäurediestern mit dem Berlinerblau Test

Da es bei der Screeningmethode in den Mikrotitrationsplatten neben dem erheblichen Zeitaufwand für die Bestückung der einzelnen Vertiefungen mit den polymeren Trägern auch zu Meßungenauigkeiten durch in den Strahlengang gekommene Polymerkügelchen kam, wurde die Bibliothek **128** batchweise auf künstliche Phosphorsäurediesterasen gescreent.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß sich polymere Träger, die eine Aminoxyl-Gruppe bzw. das entsprechende Hydroxylamin tragen, mit einer Mischung aus FeCl_3 und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tiefblau anfärben lassen. Dazu wurde 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl **136** an TentaGel™-COOH **137** angeknüpft und das Produktpolymer **138** anschließend mit 10%iger HCl behandelt. Die Polymere **138** und **139** nahmen nach Behandlung mit dem Entwicklungsreagenz beide eine tiefblaue Färbung an. Ein entsprechendes Redox-Verhalten für Aminoxyl-Radikale in flüssiger Phase ist bereits bekannt.^[68] Negative Polymerkügelchen erschienen nach dem Anfärben bei diesem Test grünlich.

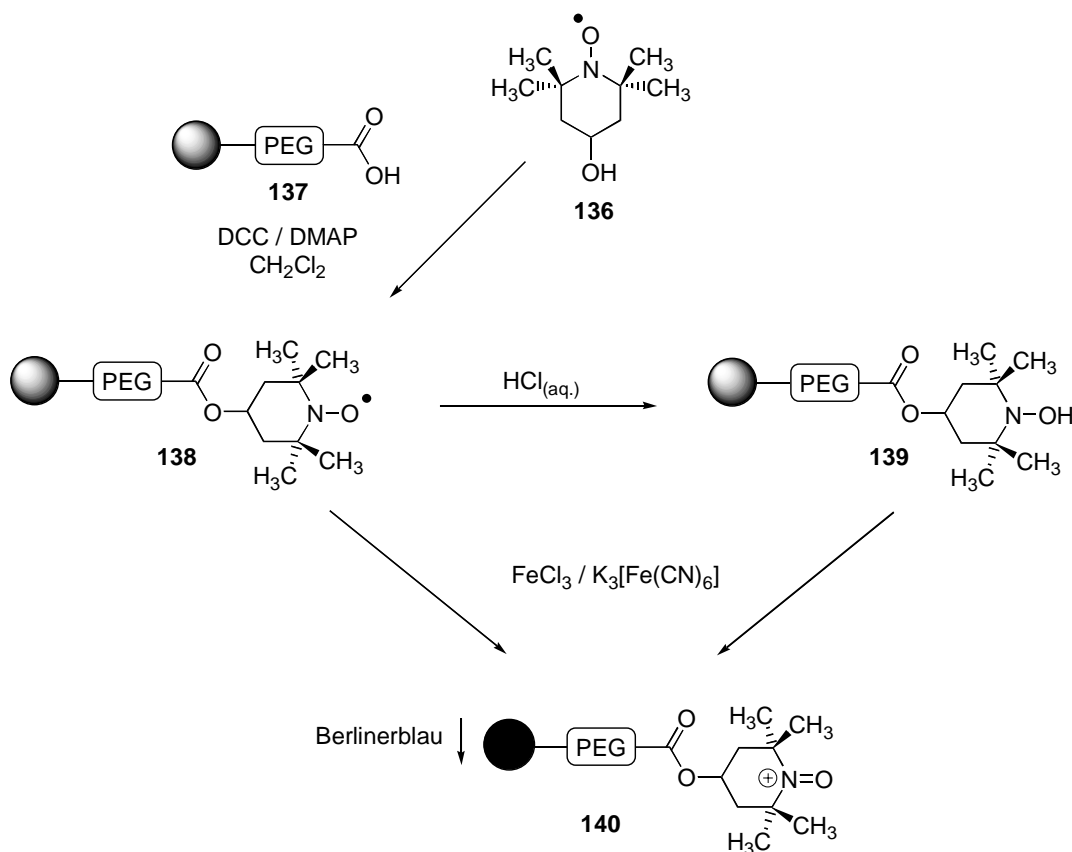


Abb. 5.4.4: Vorversuche zum Berlinerblau Test

5.4.2.1.1 Synthese des Testsubstrates **35** für den Berlinerblau Test auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität von polymergebundenen Substanzen

Aus 4-Nitrophenol **141** und Phosphorylchlorid konnte in 76%iger Ausbeute (4-Nitrophenyl)-phosphorodichloridat **142** erhalten werden, welches danach mit 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl **136** und Pyridin in Toluol und anschließender saurer Aufarbeitung zum Testsubstrat **35** umgesetzt wurde (81%). Dieses besitzt neben der aktivierten Abgangsgruppe 4-Nitrophenolat auch das cyclische Hydroxylamin, das nach einer Umesterung durch aktive Liganden aus der Bibliothek eine Anfärbung mit Berlinerblau erlaubt.

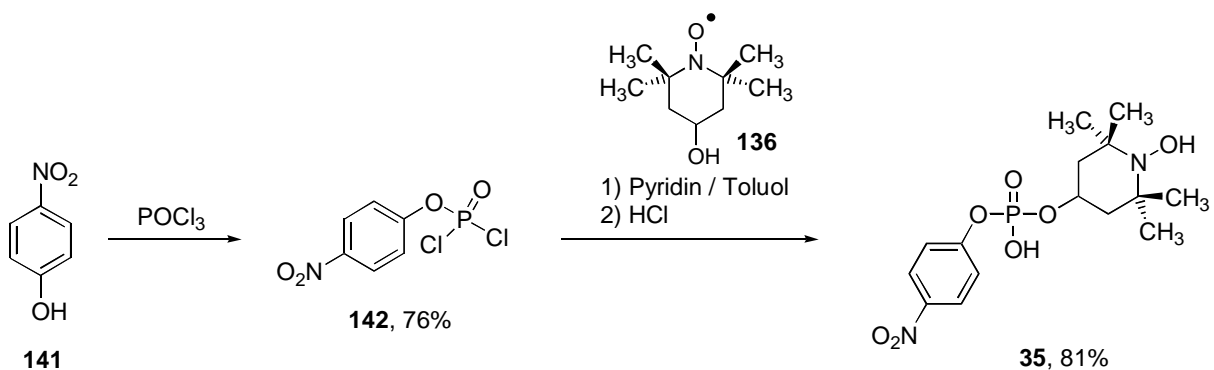


Abb. 5.4.5: Synthese des Testsubstrates **35**

5.4.2.1.2 Einsatz des Testsubstrates **35** im Berlinerblau Test nach künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität von polymergebundenen Substanzen

Ausreichend große Mengen (entsprechend 20 mg trockenem Polymer, etwa 18000 Polymerkügelchen) der Bibliothek **128** wurden einen Tag bzw. sieben Tage lang mit dem Testsubstrat **35** (1.00×10^{-3} M) und verschiedenen Metallsalzen (ZnCl₂, CuCl₂, EuCl₃, ZrCl₄, FeCl₃, (NH₄)₂Ce(NO₃)₆, Na₃[Co(NO₂)₆], jeweils 2.00×10^{-2} M) in gepufferten Lösungen (0.10 M MOPSO, pH = 7.0) bei Raumtemp. inkubiert. Es wurden auch Versuche ohne Metallsalzzugabe bei pH = 8.0 bei Raumtemp. bzw. 50 °C in 0.10 M EPPS-Puffer durchgeführt. Anschließend erfolgte die Umsetzung des durch Waschen mit 10%iger wässriger 2-Methoxyethylamin-Lösung, 10%iger wässriger Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Lösung sowie DMF, Wasser und THF : Wasser (1:1) gereinigten Polymers mit einer Mischung aus FeCl₃ und K₃[Fe(CN)₆], um Polymerkügelchen anzufärben, die durch ihre Phosphorsäurediesterase-Aktivität eine Umesterung des Testsubstrates **35** herbeigeführt hatten und damit die oxidierte

dierbare Hydroxylamineinheit trugen. Auf diese Weise konnten in allen Screeningansätzen mit der Bibliothek **128** etwa 20% aller Polymerkügelchen blau angefärbt werden; die am intensivsten blau gefärbten polymeren Träger wurden anschließend unter einem Mikroskop isoliert. Die Behandlung von Polymerkügelchen der Bibliothek **128** mit einer Lösung von FeCl_3 und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ führte zu etwa 1% ebenfalls zu einer blauen Färbung, wenn die Bibliothek nicht mit dem Testsubstrat **35** inkubiert worden war, während sich die restlichen Trägerpartikel grünlich färbten.

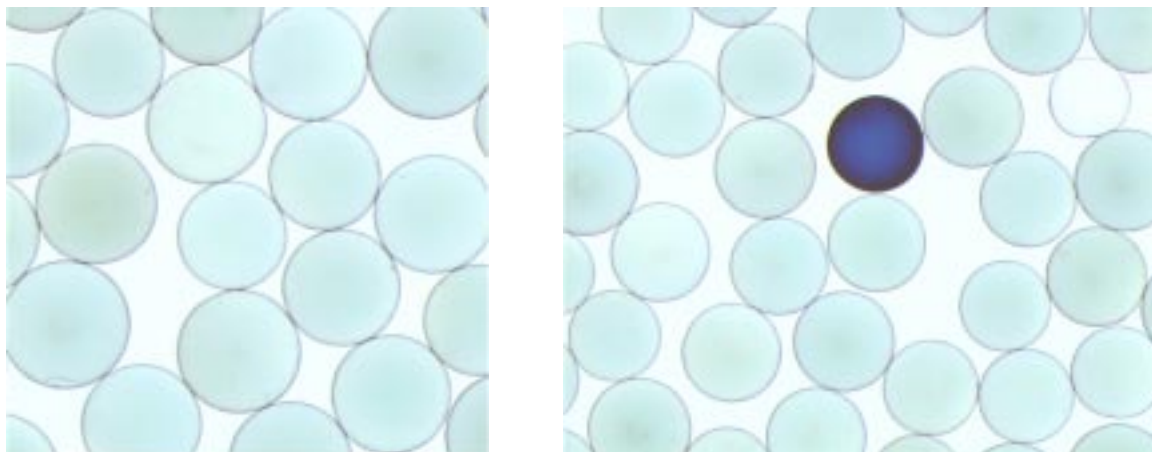


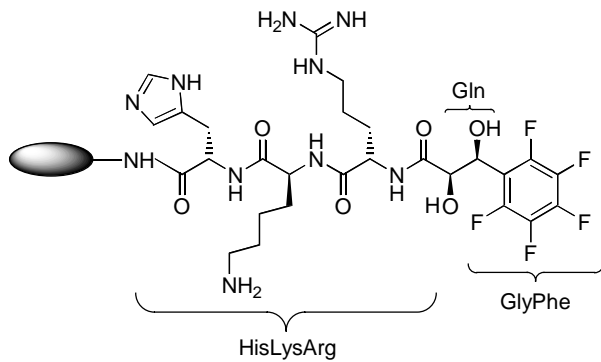
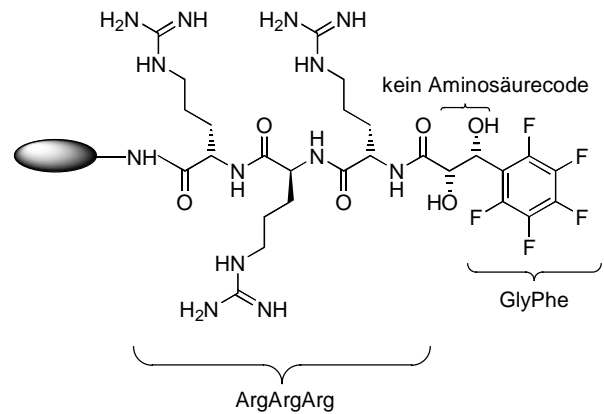
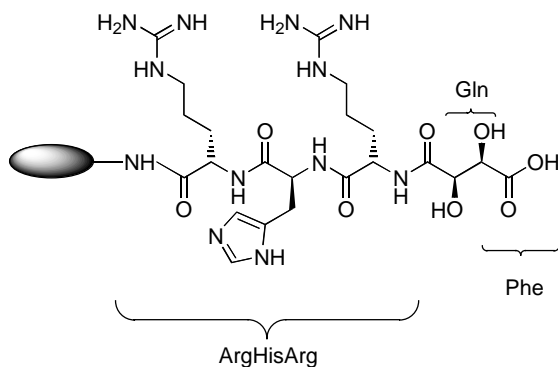
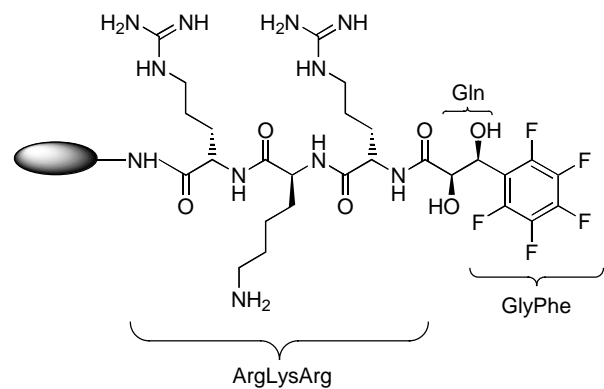
Abb. 5.4.6: Berlinerblau Screeningverfahren: Links: Negative Polymerpartikel (Bibliothek **128** nach der Entwicklung mit FeCl_3 / $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$); Rechts: Ein positives Polymerkügelchen aus der Bibliothek **128** während des Screenings

Die Analyse des Peptid-Codes durch Edman-Abbau ergab für die blau gefärbten Polymerpartikel aus den Proben ohne Metallsalzzusatz sowie denen mit ZnCl_2 und mit CuCl_2 zwischen dem Alaninspacer und dem aminoterminalen Alanin folgende eindeutig codierende Sequenzen:

Tab. 5.4.1: Peptid-Codes der positiven Polymerkügelchen

Codierende Sequenz	erhalten aus folgendem Screening
HO-HisLysArgGlyPheGln-H	Zn^{2+} / pH = 7.0 / Raumtemp. / 1d
HO-ArgArgArgGlyPhe-H	ohne Metallsalz / pH = 8.0 / 50 °C / 1d
HO-ArgHisArgPheGln-H	ohne Metallsalz / pH = 8.0 / Raumtemp. / 1d
HO-ArgLysArgGlyPheGln-H	Cu^{2+} / pH = 7.0 / Raumtemp. / 1d

Die codierenden Aminosäuresequenzen der positiven Polymerpartikel verschlüsseln folgende Liganden:

HO-HisLysArgGlyPheGln-H:**143****HO-ArgArgArgGlyPhe-H:****144****HO-ArgHisArgPheGln-H:****145****HO-ArgLysArgGlyPheGln-H:****146****Abb. 5.4.7:** Verschlüsselte Strukturen der im Berlinerblau Test positiven Liganden

Die Analysen der Peptid-Codes der positiven Polymerpartikel aus den Screeningansätzen mit Zugabe von EuCl_3 , ZrCl_4 , FeCl_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ und $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ ergaben dagegen keine eindeutigen Sequenzen. Hier konnten lediglich noch Fragmente des Peptid-Codes detektiert werden.

5.4.2.2 Kresylviolett als Sonde für polymergebundene phosphorylierte Liganden

Ähnlich dem batchweisen Screening mit anschließender Anfärbung durch Berlinerblau wurde Kresylviolett **36** als Sonde für polymergebundene phosphorylierte Liganden eingesetzt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß polymere Träger, die Phosphorsäurediester- bzw.

Phosphonsäure-Gruppen tragen, mit wässrigen Lösungen von Kresylviolett Acetat **36** tiefblau angefärbt werden können. Dazu wurde 3-Phosphonopropionsäure **147** mit DCC an Amino-TentaGel™ **77** angeknüpft bzw. die beiden Phosphordichloridate **142** und **43** mit Hydroxy-TentaGel™ **48** umgesetzt.

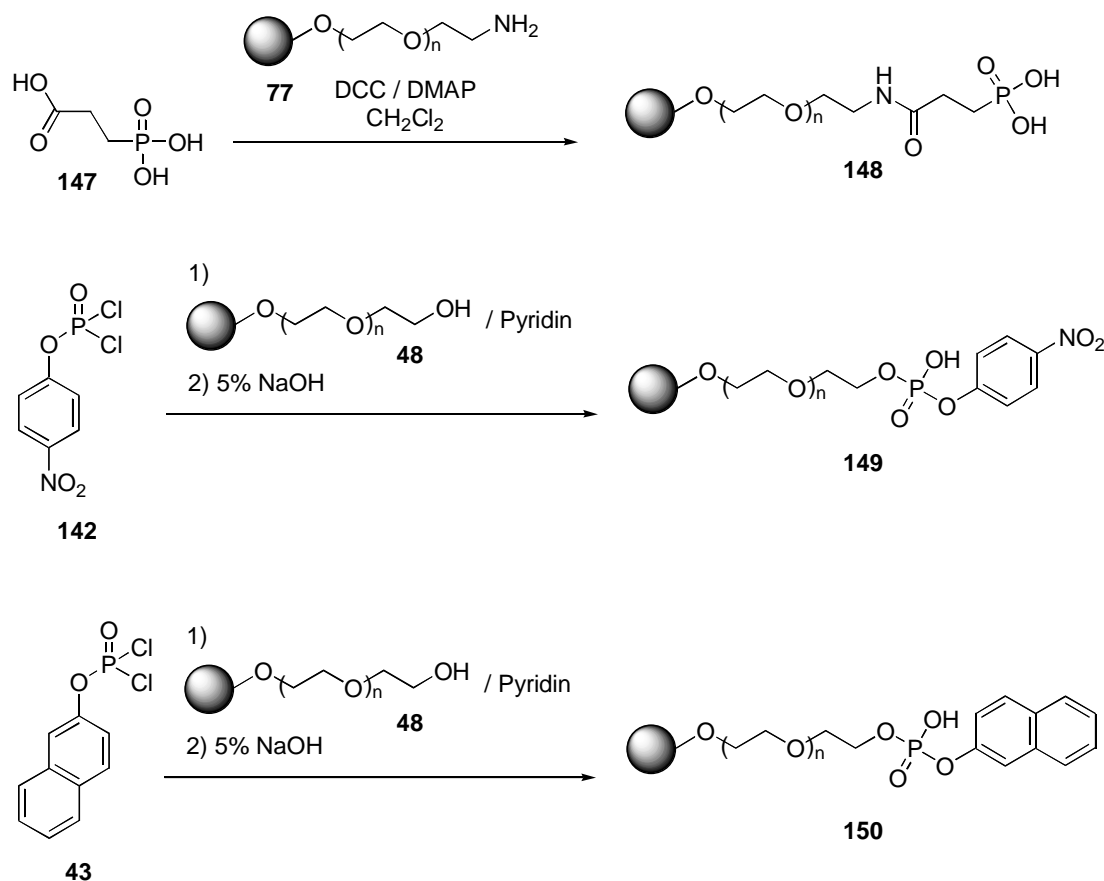


Abb. 5.4.8: Synthese der polymeren Phosphonsäure **148** bzw. der Phosphorsäurediester **149** und **150**

Die drei Polymere **148**, **149** und **150** ließen sich danach alle mit wässrigen Lösungen von Kresylviolett Acetat **36** blau anfärben, wohingegen Hydroxy-TentaGel™ **48** und Amino-TentaGel™ **77** keine Wechselwirkung zeigten. Zusätzlich zu der blauen Färbung fluoreszieren die angefärbten polymeren Träger rotviolett ($\lambda_{\text{ex.}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi.}} = 620 \text{ nm}$).

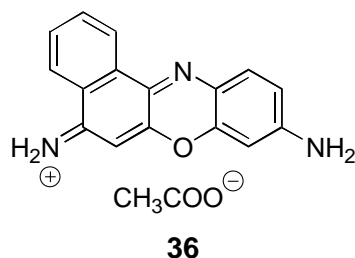


Abb. 5.4.9: Kresylviolett Acetat **36**

5.4.2.2.1 Screening der Bibliothek 128 nach künstlichen Phosphorsäure-diesterasen mit Kresylviolett als Sonde für polymergebundene phosphorylierte Liganden

Zunächst wurden ausreichende Mengen der Ligandenbibliothek **128** (entsprechend 20 mg trockenem Polymer, etwa 18000 Polymerkügelchen) mit Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediester **19** (1.00×10^{-3} M) und verschiedenen Metallsalzen (ZnCl_2 , CuCl_2 , EuCl_3 , FeCl_3 , jeweils 2.00×10^{-2} M) einen Tag bei Raumtemp. in EPPS-Puffer (0.10 M, pH = 8.0) inkubiert. Desweiteren wurden Versuche bei pH = 8.0 und Raumtemp. in 0.10 M EPPS-Puffer ohne Metallsalzzugabe durchgeführt. Der polymere Träger wurde anschließend vom Testsubstrat durch das Waschen mit 10%iger wässriger 2-Methoxyethylamin-Lösung, 10%iger wässriger EDTA-Lösung sowie DMF, Wasser und THF : Wasser (1:1) gereinigt, bevor er mit einer 0.05%igen wässrigen Lösung von Kresylviolett Acetat **36** behandelt wurde. In der Probe mit ZnCl_2 konnten nach einem Tag drei intensiv blau gefärbte Polymerkügelchen gefunden werden, die zusätzlich bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 360 nm rotviolett fluoreszieren. Die Bibliothek **128** zeigte vor der Inkubation mit dem Phosphorsäurediester **19** mit Kresylviolett **36** gar keine Wechselwirkung.

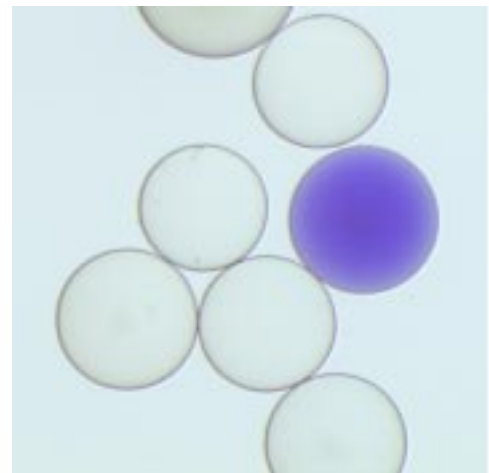


Abb. 5.4.10: Kresylviolett Screeningverfahren:
 Oben links: Negative Polymerkügelchen im Absorptionsmodus (Bibliothek **128** nach der Behandlung mit Kresylviolett **36**)

Oben rechts: Positives Polymerkügelchen in der Bibliothek **128** im Absorptionsmodus während des Screenings

Rechts: Positives Polymerkügelchen in der Bibliothek **128** im Fluoreszenzmodus während des Screenings



Die Analyse des Peptid-Codes ergab zwischen dem Alaninspacer und der Alaninkappe folgende eindeutig codierende Sequenz:



Dieser Peptid-Code entspricht folgendem Liganden:

HO-HisLysHisLeuPheGln-H:

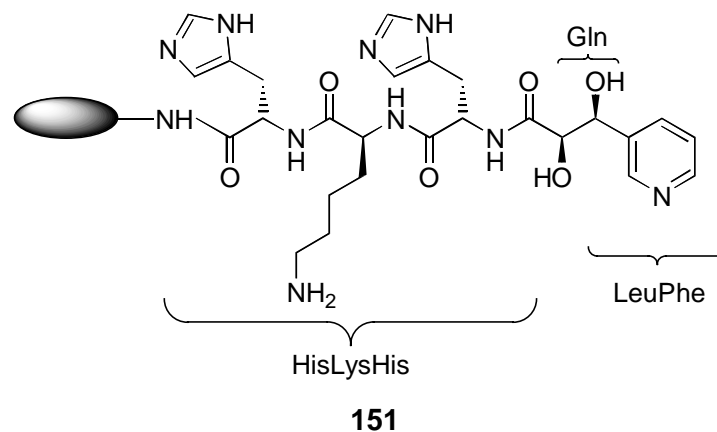


Abb.5.4.11: Verschlüsselte Struktur des im Kresylviolett Test positiven Liganden **151** (Code: HKHLFQ)

Ergebnis

Aus der Ligandenbibliothek **128** konnten mit den neu entwickelten batchweisen Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen (Berlinerblau Test bzw. Anfärben mit Kresylviolett **36**) mehrere Vertreter mit positivem Testergebnis isoliert und ihr Peptid-Code gelesen werden.

5.5 Aktivitätskontrolle der im Screeningverfahren positiven Liganden

Zielsetzung

Die entschlüsselten positiven Liganden aus den beiden Screeningverfahren sollten nochmals synthetisiert und ihre Aktivität überprüft werden.

5.5.1 Synthese der aus den Screeningverfahren ermittelten positiven Liganden und Überprüfung ihrer Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Die positiven Liganden aus den beiden Screeningverfahren wurden in größeren Mengen nochmals an der festen Phase synthetisiert und auf ihre Effizienz als künstliche Phosphorsäurediesterasen hin überprüft. Die Synthese wurde entsprechend der Bibliothekssynthese wieder an Amino-TentaGel™ **77** durchgeführt, wobei auf den Einbau des Alaninspacers verzichtet wurde. Zunächst wurde die Tripeptideinheit aufgebaut, danach das entsprechende Olefin angeknüpft und die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung durchgeführt. Nach dem Abspalten der Schutzgruppen wurden die polymeren Liganden **153**, **154**, **155**, **156** und **157** in einer Konzentration von 1.00×10^{-3} M mit dem gleichen Metallsalz wie im Screeningverfahren (5.00×10^{-4} M ZnCl_2 bei **153** und **157**, 5.00×10^{-4} M CuCl_2 bei **156**) bzw. ohne Metallsalzzusatz (**154** und **155**) in gepufferter Lösungen (0.10 M EPPS, pH = 8.0) bei Raumtemp. mit dem Testsubstrat Bis(4-nitrophenyl)-phosphorsäurediester **19** (5.00×10^{-3} M) inkubiert und die Zunahme der Extinktion bei 405 nm photometrisch über 20 h verfolgt.

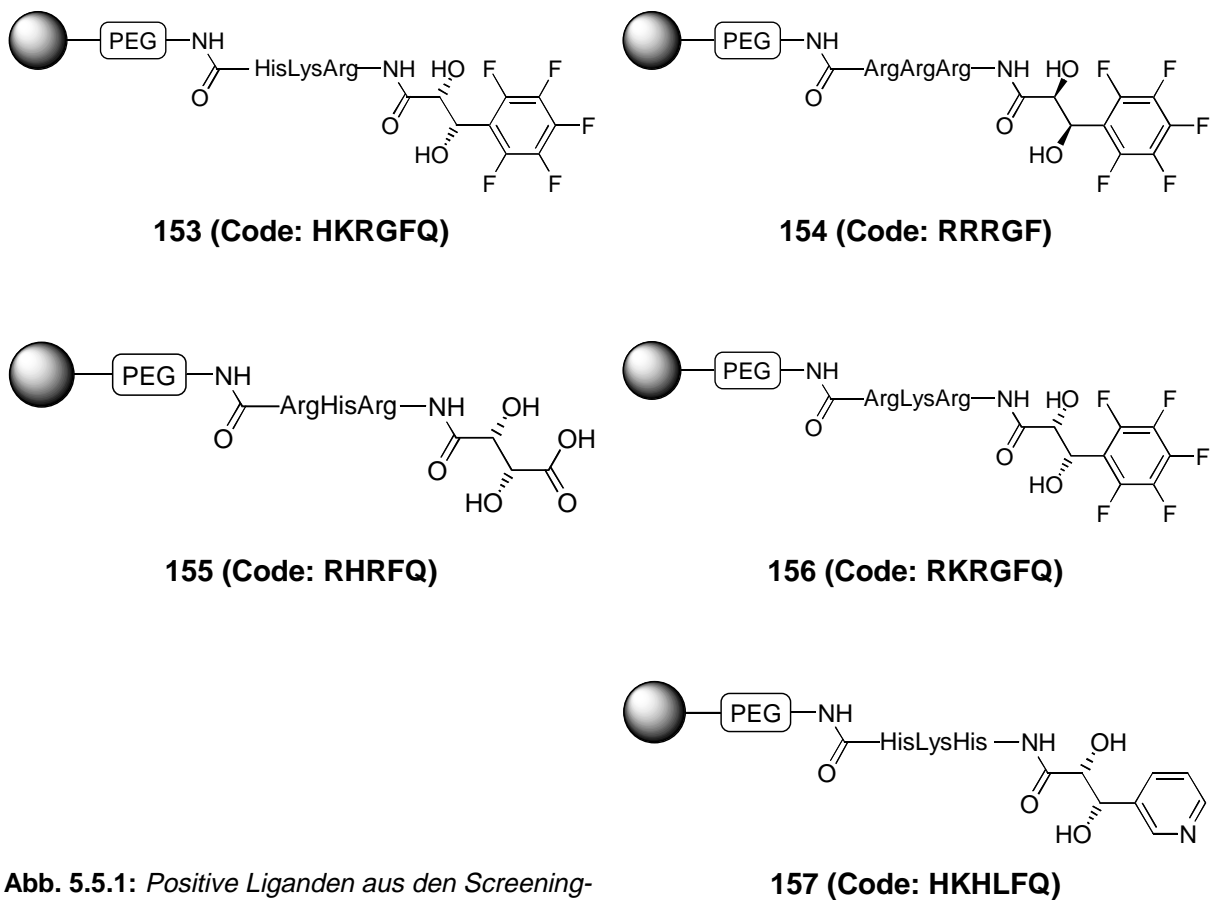


Abb. 5.5.1: Positive Liganden aus den Screeningverfahren

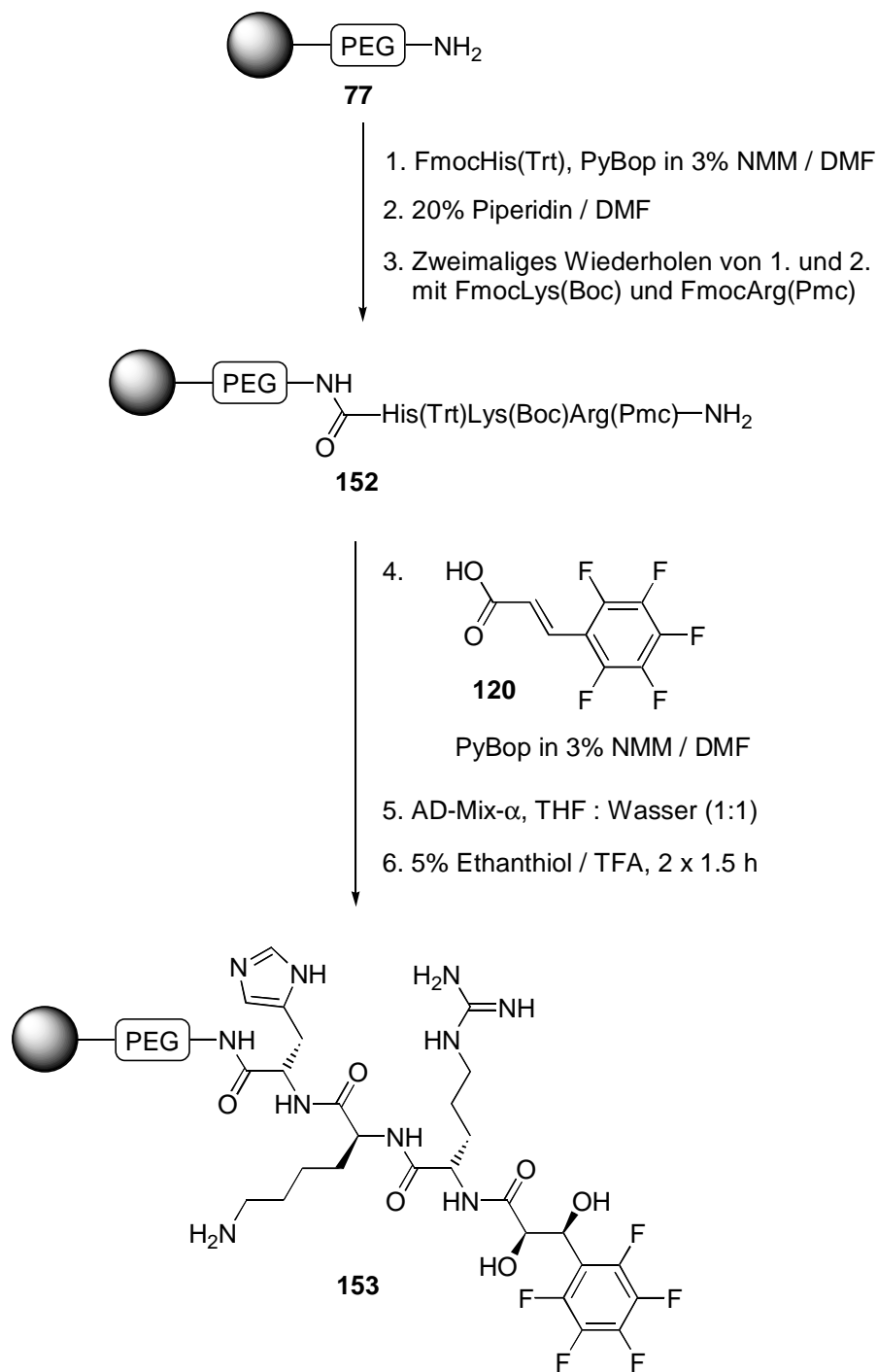
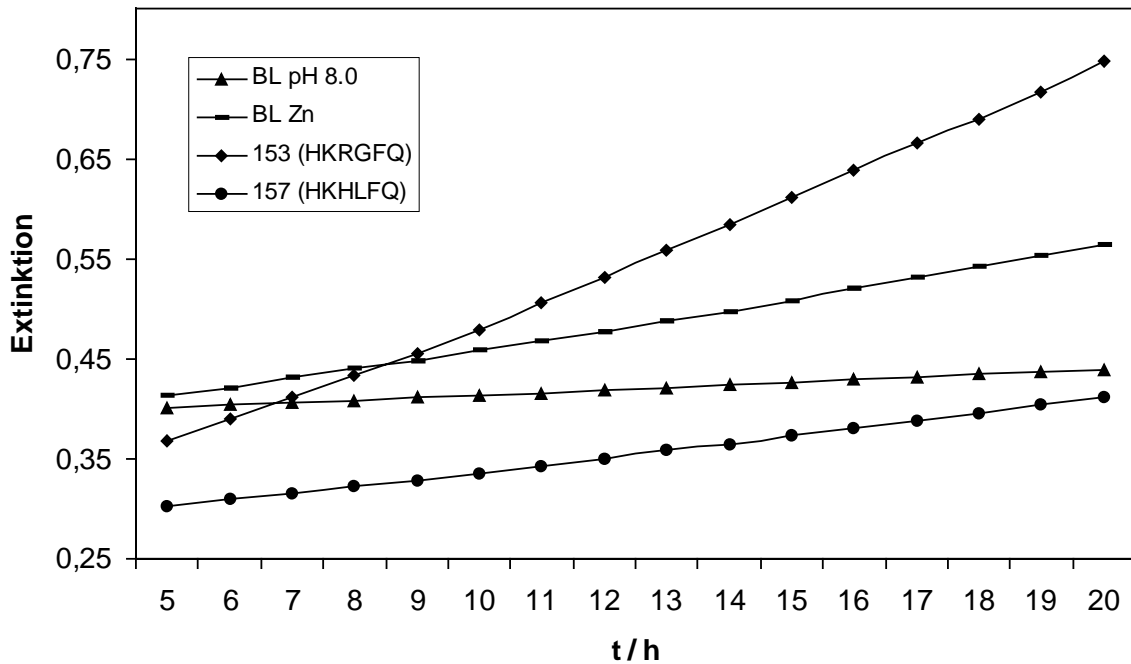


Abb. 5.5.2: Synthese des Liganden **153** (Code: HKRGFQ)

Es zeigte sich, daß die Liganden **154** (Code: ArgArgArgGlyPhe, Berlinerblau, ohne Metallsalzzugabe, Raumtemp., pH = 8.0), **155** (Code: ArgHisArgPheGln, Berlinerblau, ohne Metallsalzzugabe, Raumtemp., pH = 8.0), **156** (Code: ArgLysArgGlyPheGln, Berlinerblau, CuCl₂, Raumtemp., pH = 8.0) und **157** (Code: HisLysHisLeuPheGln, Kresylviolett, ZnCl₂, Raumtemp., pH = 8.0) keine Beschleunigungen im Vergleich zu den entsprechenden Blindwerten ergaben.

Der Ligand **153** (Code: HisLysArgGlyPheGln, Berlinerblau, ZnCl_2 , Raumtemp., pH = 8.0) zeigte dagegen eine Beschleunigung der Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäure-diester **19**. Diese betrug bei Raumtemp. den Faktor 2.5 im Vergleich zur Reaktion ohne Zusatz des Liganden (BL Zn). Die Umsätze des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäure-diester **19** lagen dabei unter 1% nach 20 h. Im Vergleich zur Hydrolyse des Testsubstrates **19** bei pH = 8.0 ohne Zusatz von ZnCl_2 (BL pH 8.0) ergibt sich eine Beschleunigung um den Faktor 10.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ohne Metall (BL pH 8.00)	0.0026 +/- 0.0001
Blindwert ZnCl_2 (BL Zn)	0.0101 +/- 0.0005
153 (Code: HKRGFQ)	0.0254 +/- 0.0010
157 (Code: HKHLFQ)	0.0072 +/- 0.0004

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

Abb. 5.5.3: Photometrischer Aktivitätstest der Liganden **153** und **154**

Die polymeren Liganden **153**, **154**, **155** und **156** wurden anschließend nochmals dem Berlinerblau Test unterworfen. Dazu wurden sie unter identischen Bedingungen (Zusatz des entsprechenden Metallsalzes, gleicher pH-Wert, gleiche Temperatur und ausgiebiges Waschen) wie im Screeningansatz mit dem Testsubstrat **35** umgesetzt und anschließend entwickelt. Dabei zeigten alle Proben wieder ein positives Testergebnis (blaue Färbung).

Der Ligand **157** wurde ebenfalls analog dem Kresylviolett Screeningverfahren nochmals unter Zugabe von Zinkchlorid bei pH = 8.0 mit Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** umgesetzt. Nach dem entsprechenden Waschen und der Zugabe von Kresylviolett **36** konnten keine intensiv blau gefärbten Polymerkügelchen gefunden werden. Es wiesen lediglich einige Polymerpartikel eine schwach rosafarbene Färbung auf.

5.5.2 Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** mit den aus den Screeningverfahren ermittelten positiven Liganden

Da der Peptid-Code des mit Europiumchlorid positiven Liganden aus dem Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen keine eindeutige Aminosäuresequenz ergeben hatte, wurden die positiven Liganden aus den Screeningansätzen ohne Metallsalzzugabe bzw. den wenig aktivierenden Metallionen Zn^{2+} und Cu^{2+} für die europiumkatalysierte Hydrolyse des Testsubstrates Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediester **19** eingesetzt. Dazu wurden die Liganden **153**, **154**, **155**, **156** und **157** wieder in einer Konzentration von 1.00×10^{-3} M mit 2.50×10^{-4} M Europiumchlorid in MOPSO-Puffer (0.10 M, pH = 7.0) bei Raumtemp. mit dem Testsubstrat Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediester **19** (2.50×10^{-3} M) inkubiert und die Zunahme der Extinktion photometrisch bei 405 nm über 20 h verfolgt. Dabei fiel der Ligand **157** auf, der die Hydrolyse des Phosphorsäurediesters **19** im Vergleich zum Blindwert (Testsubstrat **19** zusammen mit Europiumchlorid) um den Faktor 4 bei pH = 7.0 steigerte. Die Umsätze des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediester **19** lagen dabei zwischen 5 und 10% nach 20 h. Im Vergleich zur Spaltung des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** ohne Europiumchlorid bei neutralem pH-Wert und Raumtemp. ergibt sich eine Steigerung um den Faktor 100.

Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ohne Metall (BL pH 7.0)	0.0009 +/- 0.0001
Blindwert $EuCl_3$ (BL Eu)	0.0268 +/- 0.0020
153 (Code: HKRGFQ)	0.0469 +/- 0.0040
154 (Code: RRRGF)	0.0205 +/- 0.0020
155 (Code: RHRFQ)	0.0428 +/- 0.0040
156 (Code: RKRGFQ)	0.0486 +/- 0.0040
157 (Code: HKHLFQ)	0.1149 +/- 0.0100

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

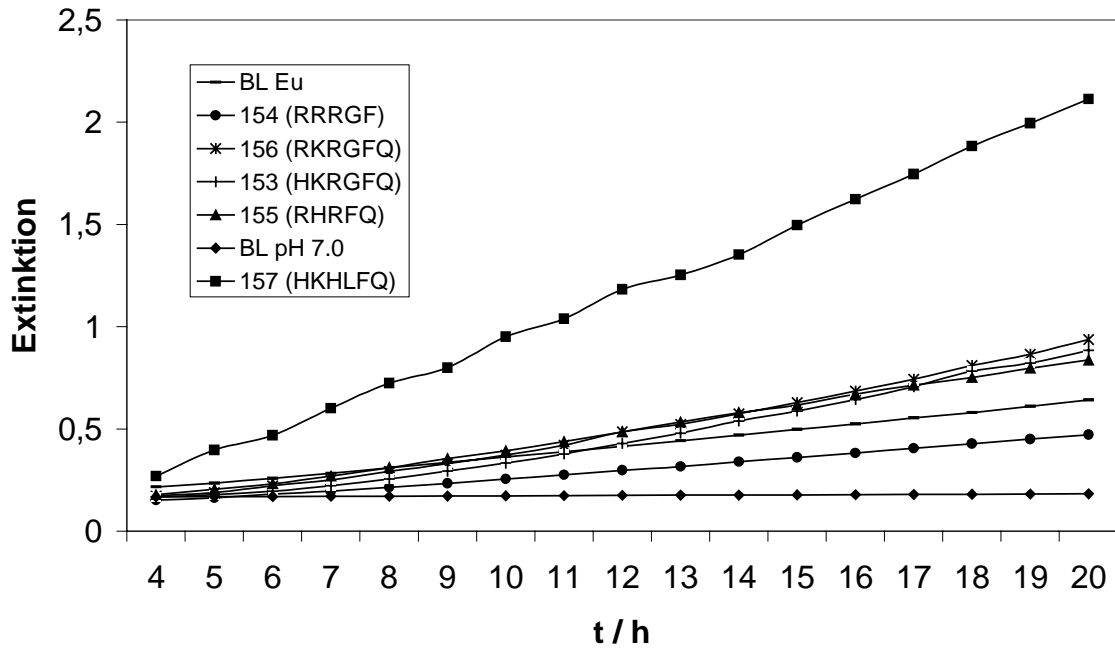


Abb. 5.5.4: Photometrischer Aktivitätstest der Liganden **153**, **154**, **155**, **156** und **157** in der europiumkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

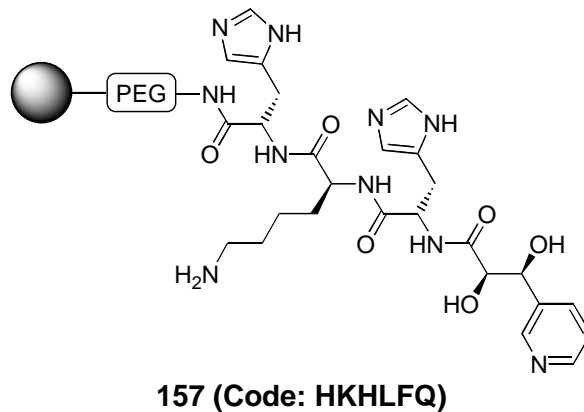


Abb. 5.5.5: Aktiver Ligand **157** für die europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Ergebnis

Von den fünf positiven Liganden aus den beiden Screeningverfahren bewirkten zwei tatsächlich eine Beschleunigung der Hydrolyse des Testsubstrates **19**. Der Ligand **153** beschleunigte die zinkkatalysierte Hydrolyse des Phosphorsäurediesters **19** um den Faktor 2.5, der Ligand **157** die europiumkatalysierte Variante um das Vierfache.

5.6 Identifizierung der kleinsten aktiven Einheiten der Liganden mit künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Zielsetzung

Da es sich bei den beiden aktiven Liganden **153** und **157** um modular aufgebaute Moleküle handelt, die eine Reihe von funktionellen Gruppen besitzen, sollten Untersuchungen unternommen werden, um die jeweils kleinsten aktiven Einheiten zu ermitteln, welche die Phosphorsäurediesterase-Aktivität aufweisen.

5.6.1 Detaillierte Untersuchung des Liganden **157** für die europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

5.6.1.1 Verkürzung des Liganden **157** vom aminoterminalen Ende aus

Bei der Synthese des Liganden **157** wurde nach jeder Anknüpfung einer Aminosäure bzw. des Olefins etwas Polymer entnommen. So konnten die folgenden vier Liganden **158**, **159**, **160** und **161** erhalten werden, die sich jeweils durch das Entfernen einer weiteren Aminosäure vom aminoterminalen Ende des Tripeptides bzw. des Olefins und in der Auslassung der Dihydroxylierung vom ursprünglichen Liganden **157** unterschieden.

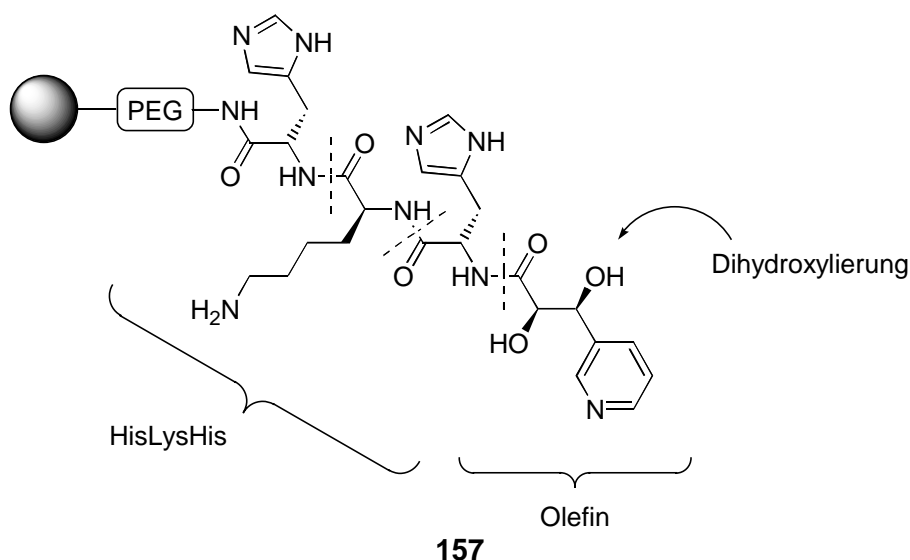


Abb. 5.6.1: Ursprünglich aktiver Ligand **157** (Code: HKHLFQ) für die europiumkatalysierte Phosphorsäurediester-Hydrolyse

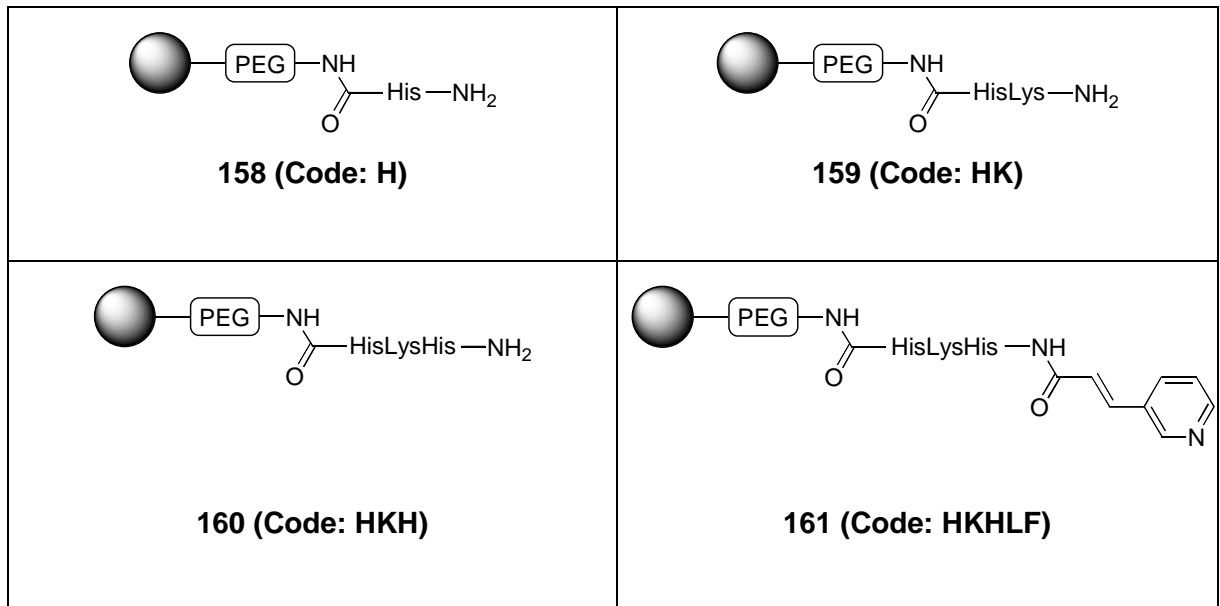
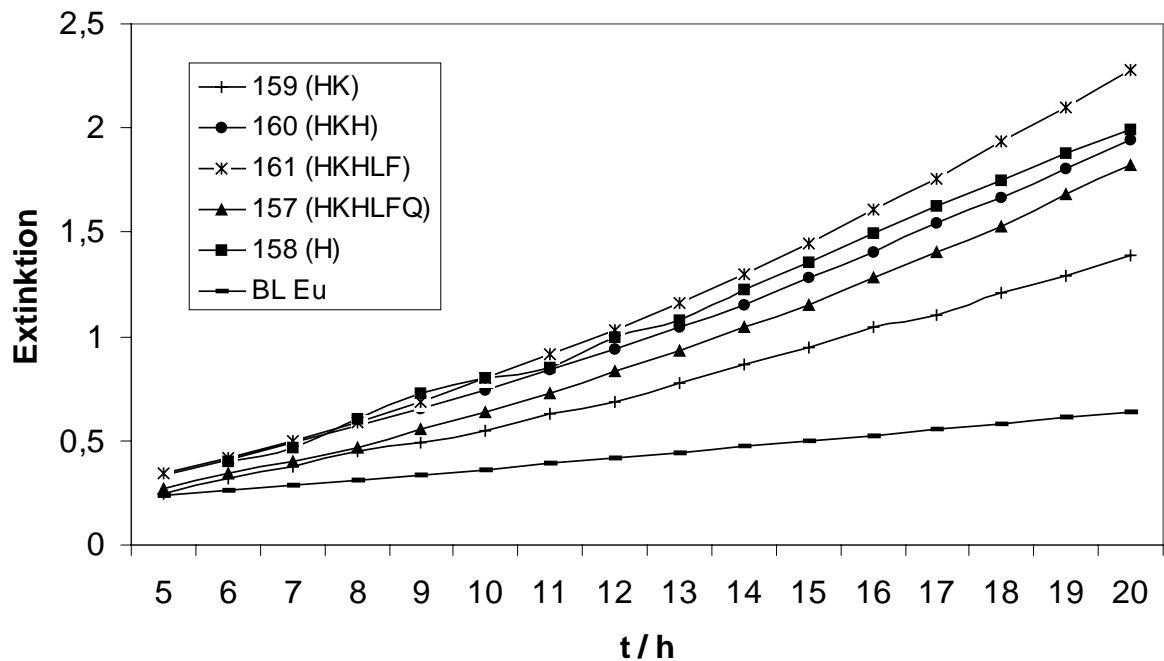


Abb. 5.6.2: Vereinfachte Liganden **158**, **159**, **160** und **161**

Diese vereinfachten Liganden **158**, **159**, **160** und **161** wurden in einer Konzentration von 1.00×10^{-3} M mit 2.50×10^{-4} M Europiumchlorid und dem Testsubstrat **19** (2.50×10^{-3} M) bei Raumtemp. in MOPSO-Puffer (0.10 M, pH = 7.0) inkubiert und die Extinktion der Reaktionslösung photometrisch bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl_3 (BL Eu)	0.0271 +/- 0.0020
157 (Code: HKHLFQ)	0.1032 +/- 0.0100
158 (Code: H)	0.1129 +/- 0.0100
159 (Code: HK)	0.0758 +/- 0.0080
160 (Code: HKH)	0.1072 +/- 0.0100
161 (Code: HKHLF)	0.1300 +/- 0.0100

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.996$.

Abb. 5.6.3: Photometrischer Aktivitätstest der vereinfachten Liganden **158**, **159**, **160** und **161** sowie des ursprünglichen Liganden **157** in der europiumkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Wie aus Abbildung 5.6.3 ersichtlich ist, genügt bereits ein an TentaGel™ immobilisiertes Histidin **158**, um eine Beschleunigung um den Faktor 4 bei der europiumkatalysierten Spaltung des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** zu erzielen. Mit Ausnahme des Liganden **159** ergab sich für die übrigen Liganden eine Schar von Geraden, bei denen die Steigungen alle im Bereich von 0.11 +/- 0.02 liegen, was der Beschleunigung durch den intakten Liganden **157** im ersten Screening entspricht. Weder die Anknüpfung weiterer Aminosäuren bzw. des Olefins noch die Dihydroxylierung führten zu einer weiteren Beschleunigung.

Amino-TentaGel™ **77** und an Amino-TentaGel™ immobilisiertes Lysin **162** bzw. Arginin **163** konnten die Beschleunigung des Liganden **158** in der europiumkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** im photometrischen Aktivitätstest nicht erreichen.

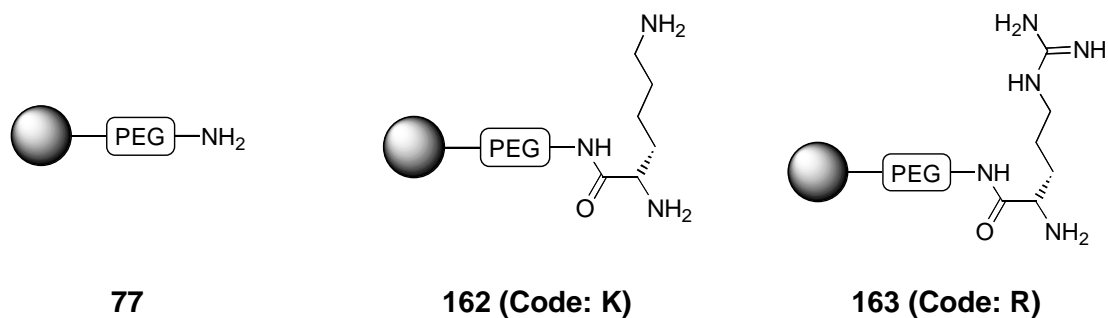
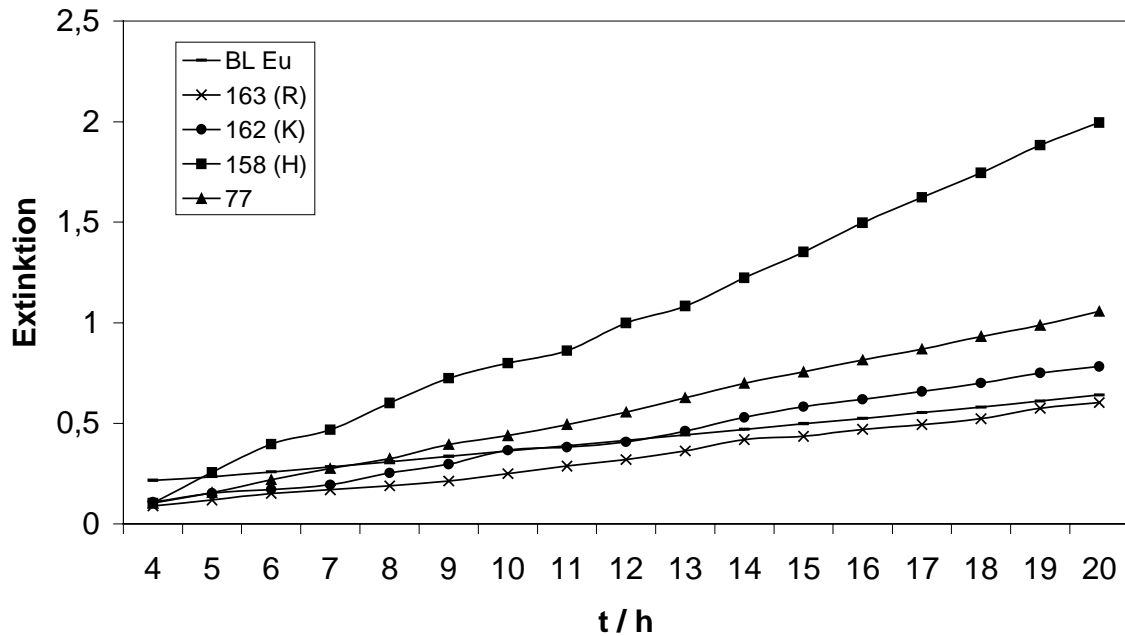


Abb. 5.6.4: Amino-TentaGel™ **77** und immobilisiertes Lysin **162** sowie Arginin **163**



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl_3 (BL Eu)	0.0268 +/- 0.0020
Amino-TentaGel™ 77	0.0598 +/- 0.0060
162 (Code: K)	0.0436 +/- 0.0040
163 (Code: R)	0.0327 +/- 0.0030
158 (Code: H)	0.1150 +/- 0.0100

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

Abb. 5.6.5: Photometrischer Aktivitätstest der Liganden **158**, **162**, **163** und **77** in der europiumkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

5.6.2 Detaillierte Untersuchung des Liganden **153** für die zinkkatalysierte Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediester **19**

5.6.2.1 Verkürzung des Liganden **153** vom aminoterminalen Ende aus

Zunächst wurde bei der Synthese des Liganden **153** wieder nach jeder Anknüpfung einer Aminosäure bzw. des Olefins etwas Polymer entnommen. Die somit erhaltenen vier Liganden **158**, **159**, **167** und **168** unterschieden sich damit jeweils durch das Fehlen einer weiteren Aminosäure bzw. des Olefins vom aminoterminalen Ende des Tripeptides und in der Auslassung der Dihydroxylierung vom ursprünglichen Liganden **153**.

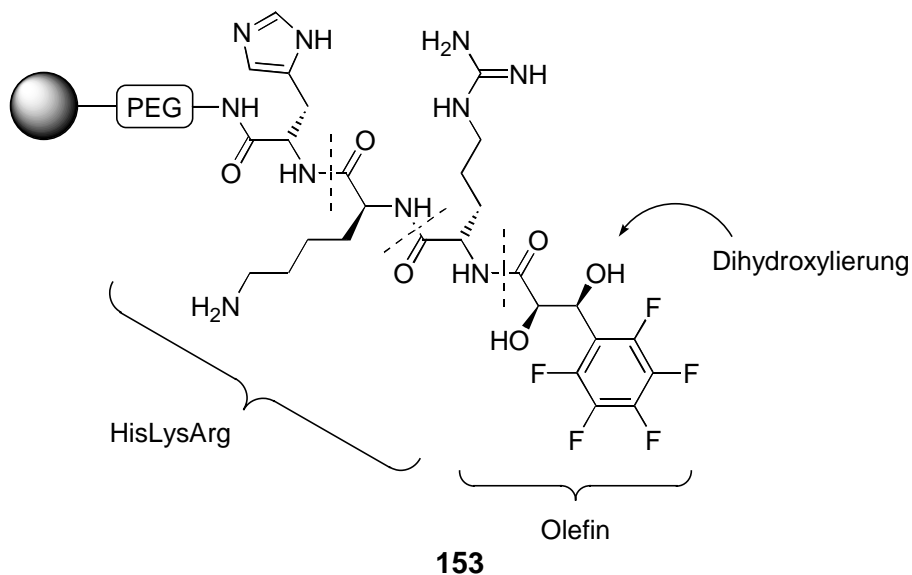


Abb. 5.6.6: Ursprünglich aktiver Ligand **153** (Code: HKRGFQ) für die zinkkatalysierte Phosphorsäure-diester-Hydrolyse

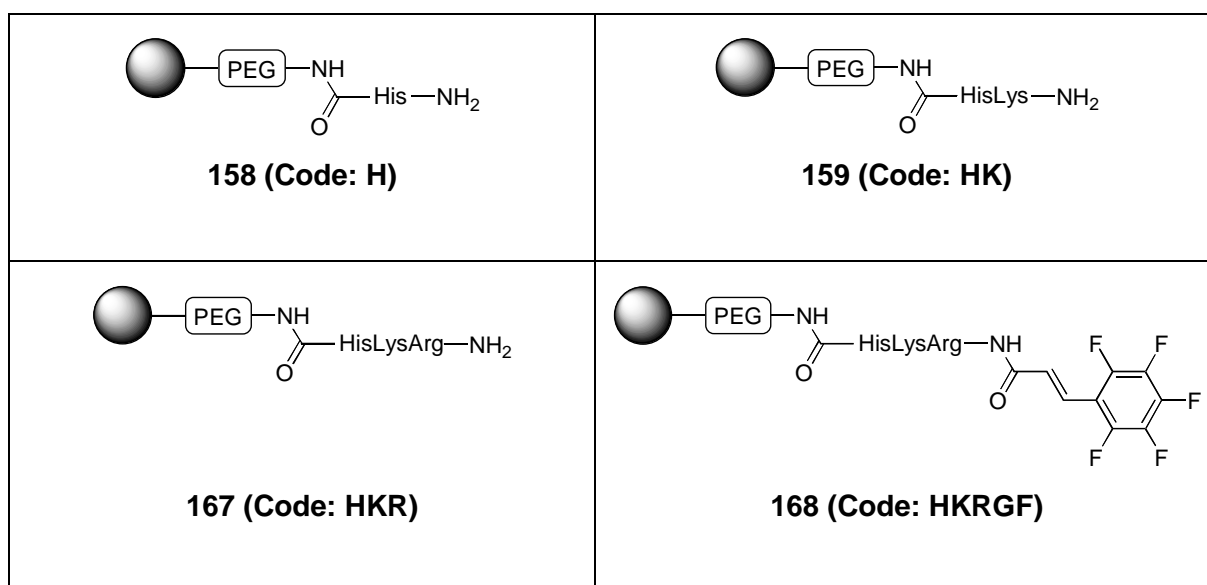
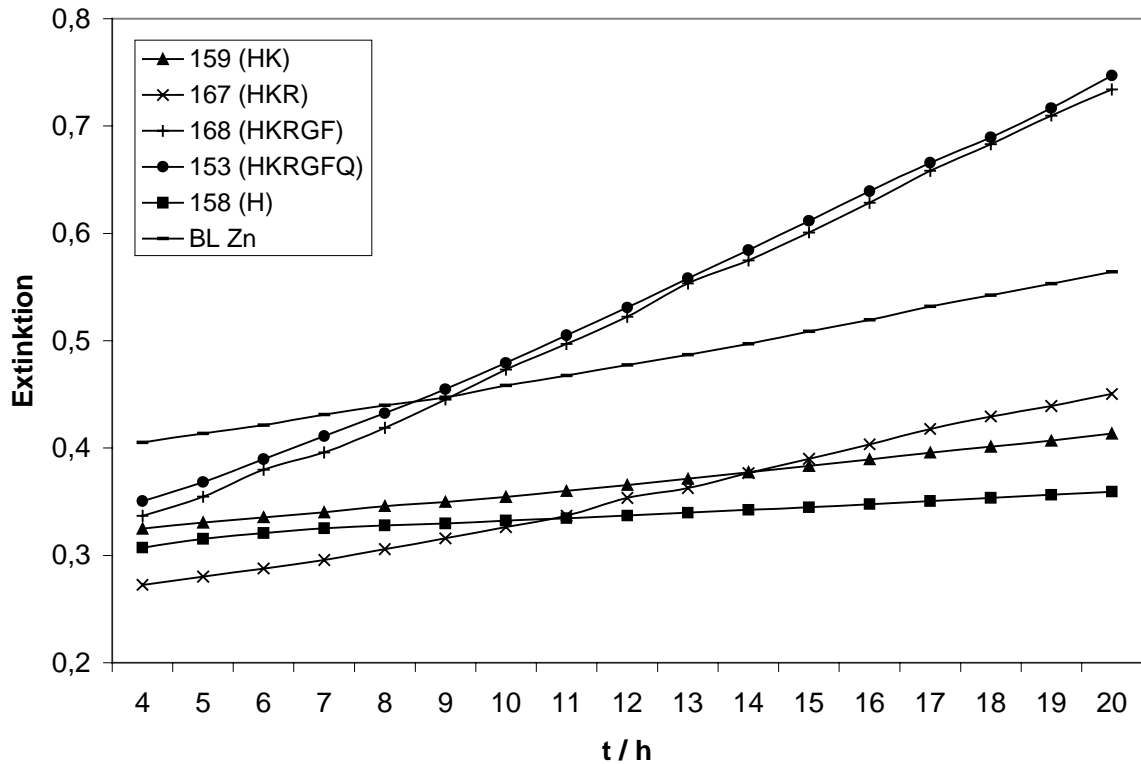


Abb. 5.6.7: Vereinfachte Liganden **158**, **159**, **167** und **168**

Diese vereinfachten Liganden **158**, **159**, **167** und **168** wurden in einer Konzentration von 1.00×10^{-3} M mit 5.00×10^{-4} M Zinkchlorid und dem Testsubstrat **19** (5.00×10^{-3} M) bei Raumtemp. in EPPS-Puffer (0.10 M, pH = 8.0) inkubiert und die Extinktion der Reaktionslösung bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl ₂ (BL Zn)	0.0100 +/- 0.0005
158 (Code: H)	0.0029 +/- 0.0002
159 (Code: HK)	0.0055 +/- 0.0003
167 (Code: HKR)	0.0116 +/- 0.0005
168 (Code: HKRGF)	0.0254 +/- 0.0010
153 (Code: HKRGFQ)	0.0251 +/- 0.0010

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

Abb. 5.6.8: Photometrischer Aktivitätstest der vereinfachten Liganden **158**, **159**, **167** und **168** sowie des ursprünglichen Liganden **153** in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Wie Abbildung 5.6.8 zeigt, kann auf die Dihydroxylierung verzichtet werden, um eine Beschleunigung der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** um den Faktor 2.5 zu erreichen. Allerdings müssen alle vier Bausteine im Liganden enthalten sein.

5.6.2.2 Verkürzung des Liganden 168 vom carboxyterminalen Ende aus

Es wurden weitere vereinfachte Olefinliganden an TentaGel™ synthetisiert, indem vom carboxyterminalen Ende des Tripeptides jeweils eine weitere Aminosäure entfernt wurde. Die erhaltenen Liganden **169**, **170** und **171** wurden danach wieder in einer Konzentration von 1.00×10^{-3} M mit 5.00×10^{-4} M Zinkchlorid und dem Testsubstrat **19** (5.00×10^{-3} M) bei Raumtemp. in EPPS-Puffer (0.10 M, pH = 8.0) inkubiert und die Extinktion der Reaktionslösung photometrisch bei 405 nm verfolgt.

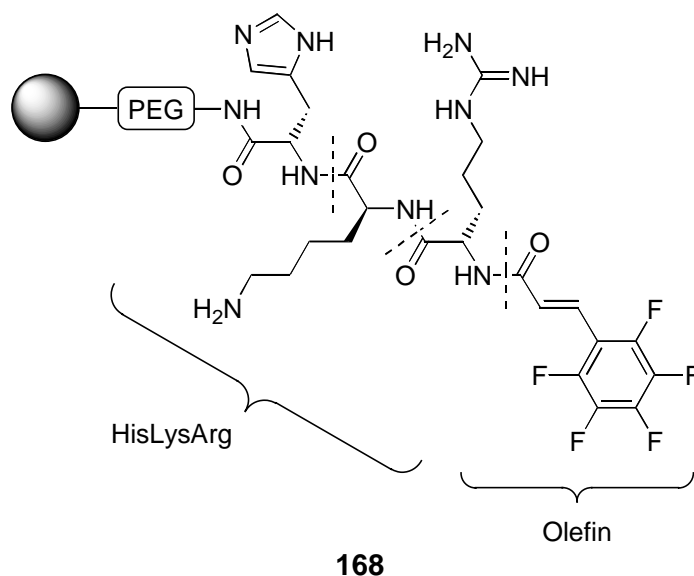


Abb. 5.6.9: Vereinfachter aktiver Ligand **168** (Code: HKRGF) für die zinkkatalysierte Phosphorsäure-*re*diester-Hydrolyse

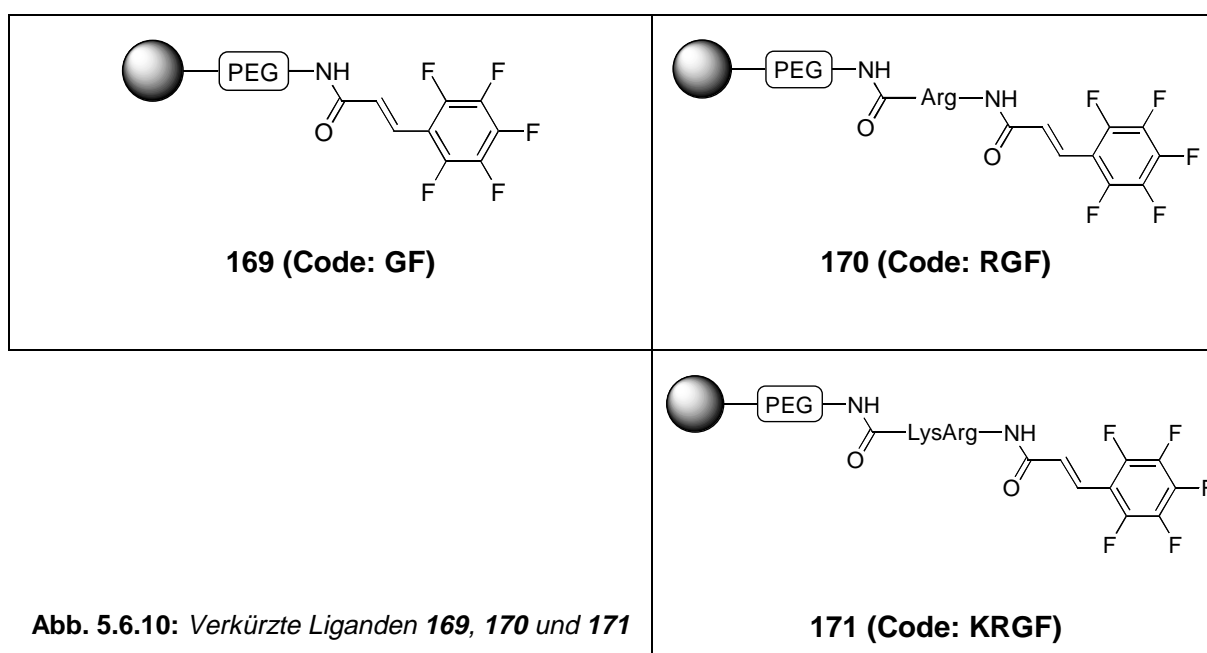
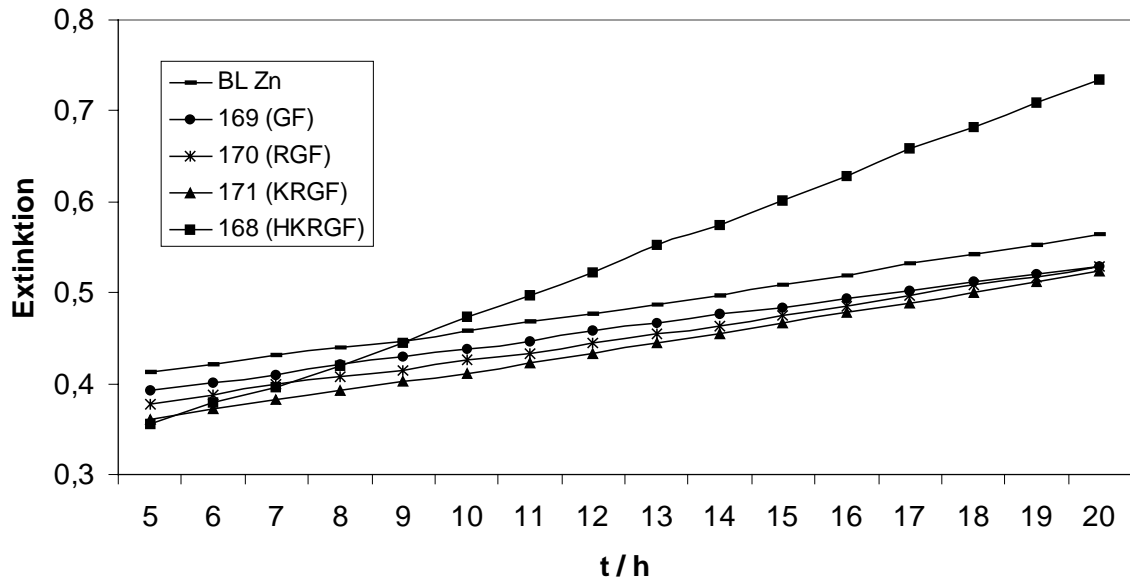


Abb. 5.6.10: Verkürzte Liganden **169**, **170** und **171**



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl ₂ (BL Zn)	0.0101 +/- 0.0005
169 (Code: GF)	0.0091 +/- 0.0005
170 (Code: RGF)	0.0100 +/- 0.0005
171 (Code: KRGF)	0.0108 +/- 0.0005
168 (Code: HKRGF)	0.0257 +/- 0.0010

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

Abb. 5.6.11: Photometrischer Aktivitätstest der weiter vereinfachten Liganden **169**, **170** und **171** in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Auch hier zeigte sich, daß alle vier Bausteine für eine Aktivität des Liganden in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** essentiell sind.

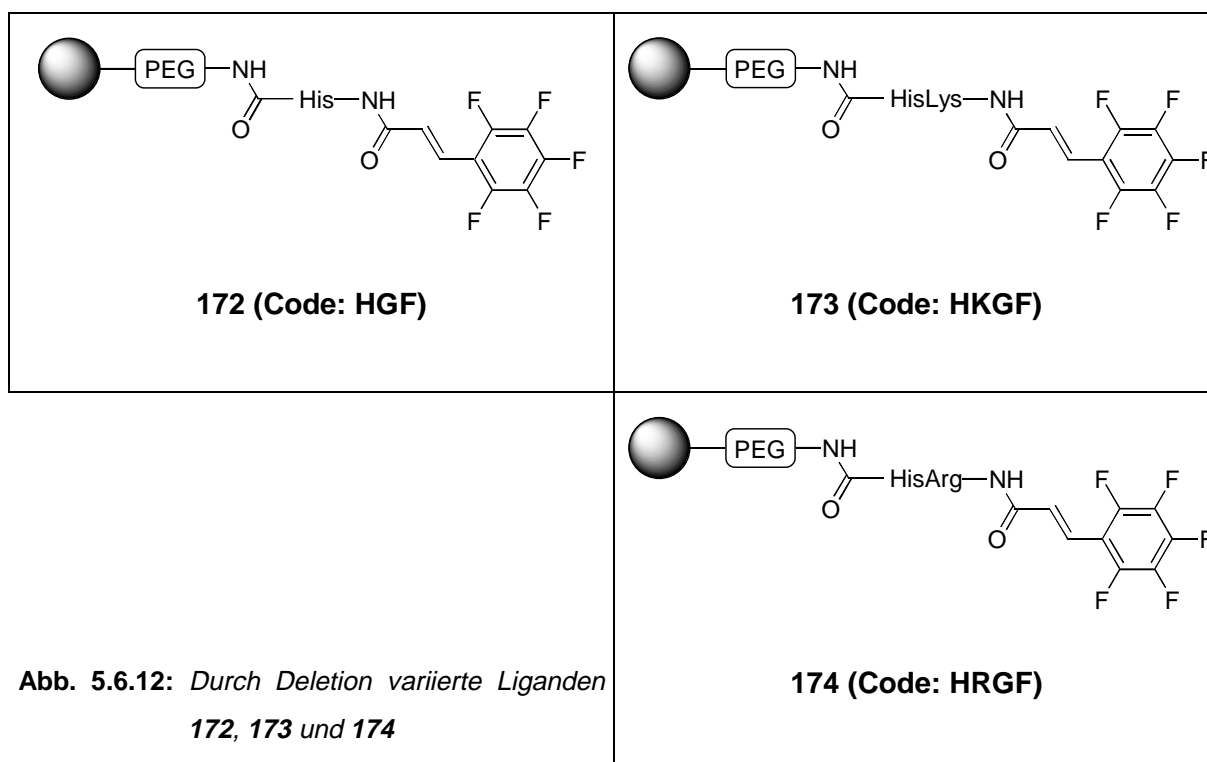
5.6.2.3 Variation des Liganden **168** zwischen dem Histidin- und dem Pentafluorphenylrest

Um die Frage zu beantworten, ob tatsächlich alle vier Bausteine für die Phosphorsäurediesterase-Aktivität nötig sind oder ob es lediglich der Verknüpfung des Pentafluorphenylrestes mit dem Histidin über eine Aminosäure oder eine Dipeptidbrücke bedarf, wurden weitere vereinfachte Liganden an TentaGel™ synthetisiert und deren Phosphorsäurediesterase-Aktivität photometrisch bestimmt.

5.6.2.3.1 Variation durch Deletion

Es wurden drei Liganden **172**, **173** und **174** synthetisiert, die im Vergleich zum aktiven Olefinliganden **168** zwischen dem Pentafluorphenylrest und dem Histidin eine oder zwei Aminosäuren weniger aufwiesen.

Deren Aktivität wurde anschließend bei einer Ligandenkonzentration von 1.00×10^{-3} M mit 5.00×10^{-4} M Zinkchlorid und dem Testsubstrat **19** (5.00×10^{-3} M) bei Raumtemp. in EPPS-Puffer (0.10 M, pH = 8.0) photometrisch bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl ₂ (BL Zn)	0.0100 +/- 0.0005
172 (Code: HGF)	0.0050 +/- 0.0002
173 (Code: HKGF)	0.0066 +/- 0.0003
174 (Code: HRGF)	0.0092 +/- 0.0005
168 (Code: HKRGF)	0.0254 +/- 0.0010

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

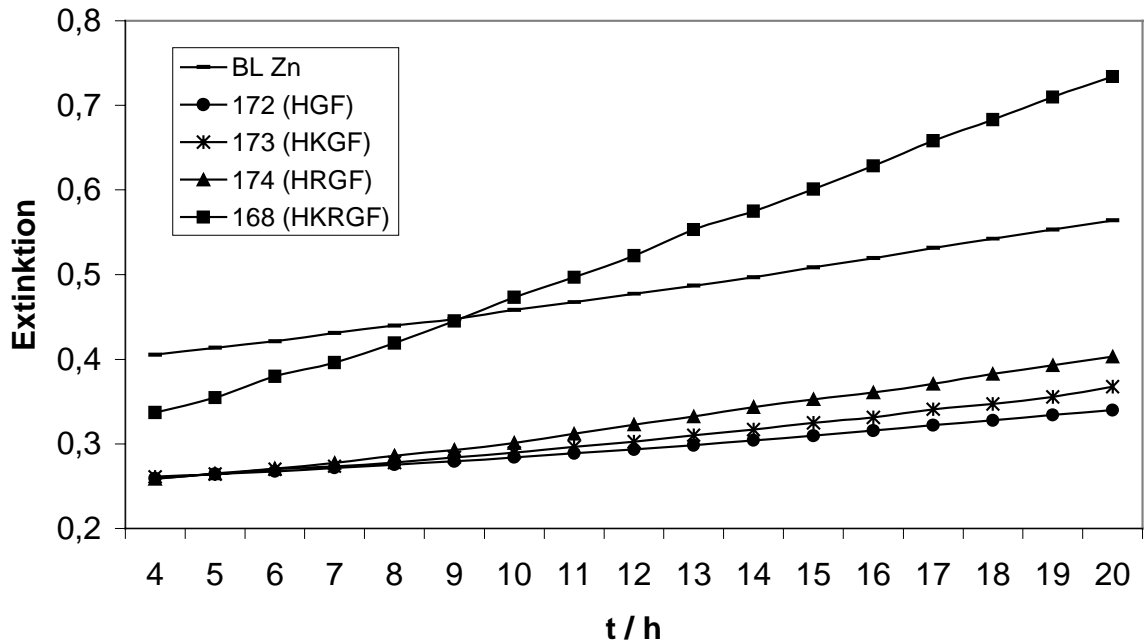


Abb. 5.6.13: Photometrischer Aktivitätstest der weiter vereinfachten Liganden **172**, **173** und **174** in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Es zeigte sich, daß keiner der weiter vereinfachten Liganden **172**, **173** oder **174** die Aktivität des Liganden **168** in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** erreichte.

5.6.2.3.2 Variation durch Substitution mit Alanin

Zusätzlich wurden drei weitere Liganden **175**, **176** und **177** synthetisiert, die im Vergleich zum aktiven Olefinliganden **168** zwischen dem Pentafluorphenylrest und dem Histidin Alaninreste anstelle der Lysin- bzw. Arginin-Reste enthielten. Auch deren Aktivität wurde wieder bei einer Konzentration von 1.00×10^{-3} M zusammen mit 5.00×10^{-4} M Zinkchlorid und dem Testsubstrat **19** (5.00×10^{-3} M) bei Raumtemp. in EPPS-Puffer (0.10 M, pH = 8.0) photometrisch bei 405 nm verfolgt.

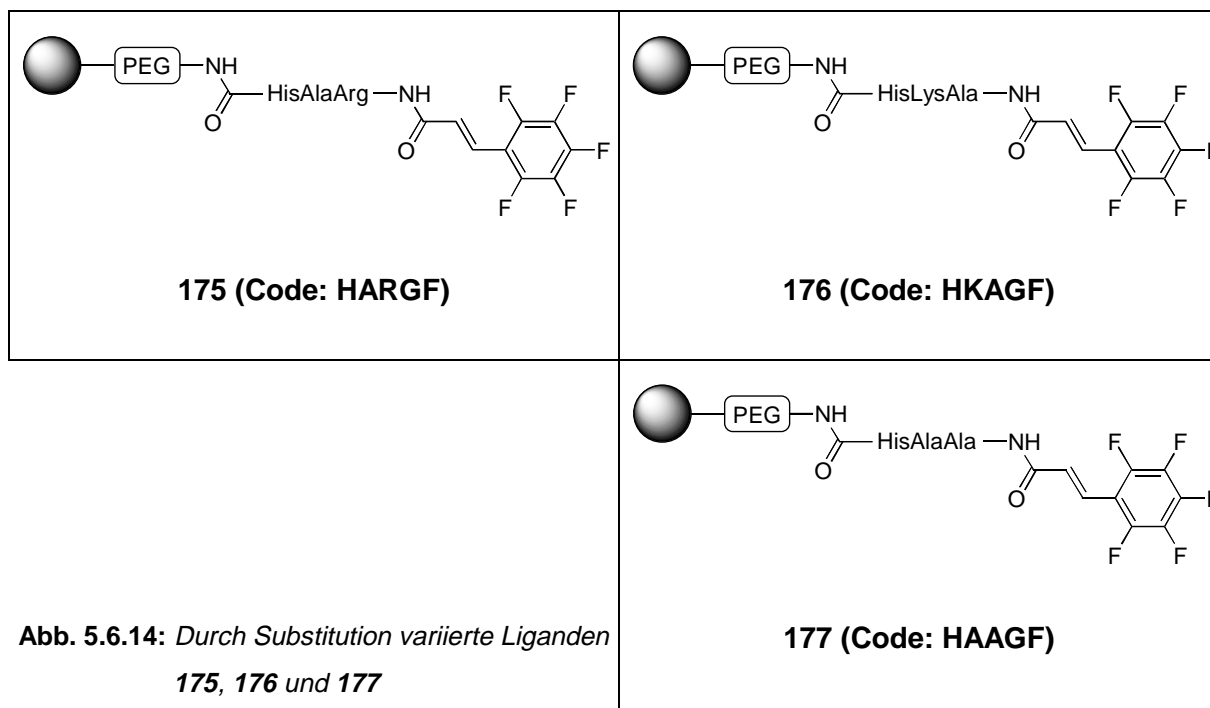
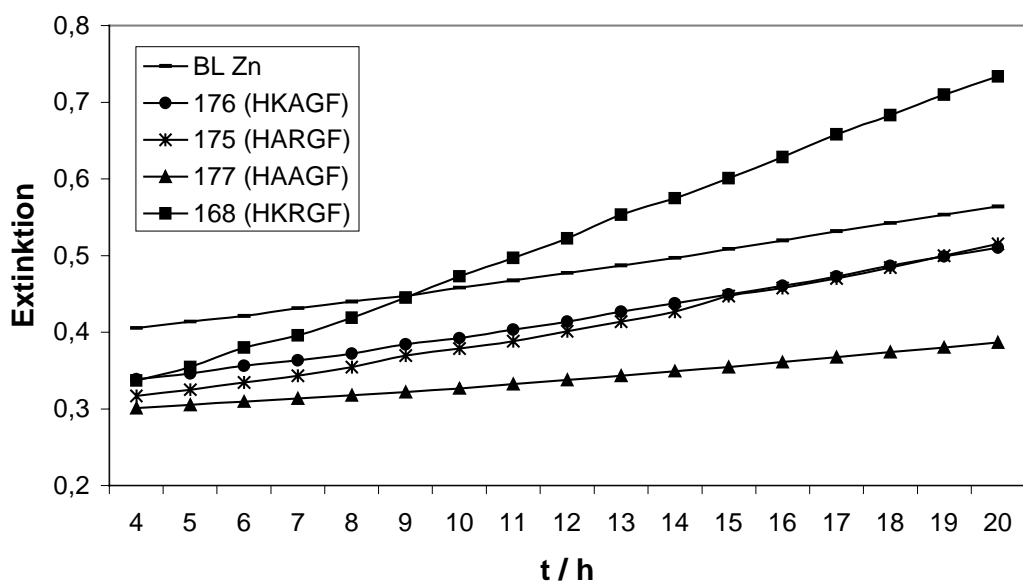


Abb. 5.6.14: Durch Substitution variierte Liganden
175, 176 und 177



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl_2 (BL Zn)	0.0100 +/- 0.0005
175 (Code: HARGF)	0.0125 +/- 0.0005
176 (Code: HKAGF)	0.0109 +/- 0.0005
177 (Code: HAAGF)	0.0054 +/- 0.0002
168 (Code: HKRGF)	0.0254 +/- 0.0010

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

Abb. 5.6.15: Photometrischer Aktivitätstest der weiter vereinfachten Liganden **175**, **176** und **177** in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Die Liganden **175**, **176** und **177** zeigten ebenfalls keine Beschleunigung in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**.

5.6.3 Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** in homogener Phase

5.6.3.1 Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** in homogener Phase

5.6.3.1.1 Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** in homogener Phase mit Histidin und Histidinamid

Es wurde untersucht, ob Histidin **164** bzw. Histidinamid **165** auch in Lösung zu einer Beschleunigung der Phosphorsäurediester-Hydrolyse führt. Dazu wurden jeweils 1.00×10^{-3} M Histidin **164** bzw. Histidinamid **165** mit 2.50×10^{-4} M Europiumchlorid und dem Testsubstrat **19** (2.50×10^{-3} M) bei Raumtemp. in MOPSO-Puffer (0.10 M, pH = 7.0) inkubiert und die Extinktion der Reaktionslösung bei 405 nm verfolgt.

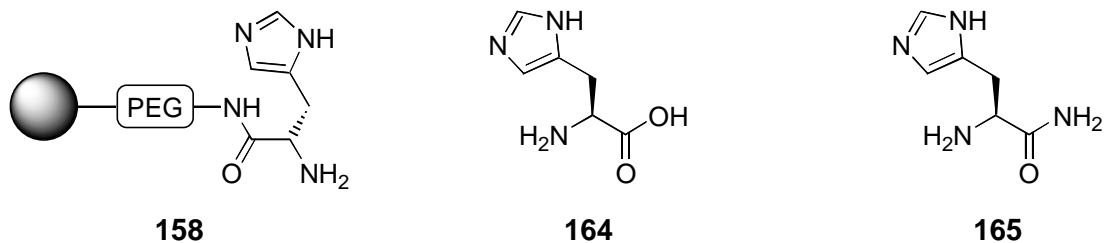


Abb. 5.6.16: Aktiver Ligand **158** und vom Polymer befreite Liganden

Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl_3 (BL Eu)	0.0271 +/- 0.0020
158 (Code: H)	0.1148 +/- 0.0100
164	0.0401 +/- 0.0040
165	0.0398 +/- 0.0040

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

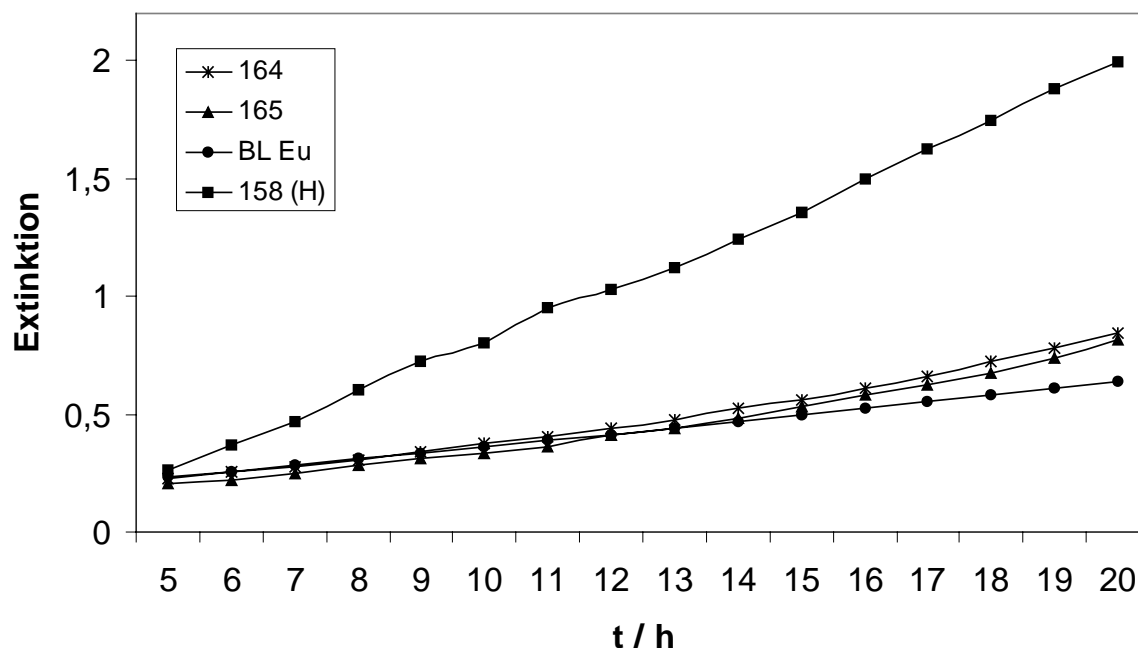


Abb. 5.6.17: Photometrischer Aktivitätstest von gelöstem Histidin **164** und Histidinamid **165** in der europiumkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Es zeigte sich, daß gelöstes Histidin **164** bzw. Histidinamid **165** zwar die europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** beschleunigt, dabei aber nicht den Wert des an TentaGel™ gebundenen Histidins **158** erreicht.

5.6.3.1.2 Europiumkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** in homogener Phase mit an Polyethylenglycolmonomethylester immobilisiertem Histidin

Es wurde untersucht, ob an Polyethylenglycolmonomethylether immobilisiertes Histidin **166** in Lösung zu einer Beschleunigung der Phosphorsäurediester-Hydrolyse führt. Dazu wurden jeweils 1.00×10^{-3} M an Polyethylenglycolmonomethylether immobilisiertes Histidin **166** mit 2.50×10^{-4} M Europiumchlorid und dem Testsubstrat **19** (2.50×10^{-3} M) bei Raumtemp. in MOPSO-Puffer (0.10 M, pH = 7.0) inkubiert und die Extinktion der Reaktionslösung bei 405 nm verfolgt.

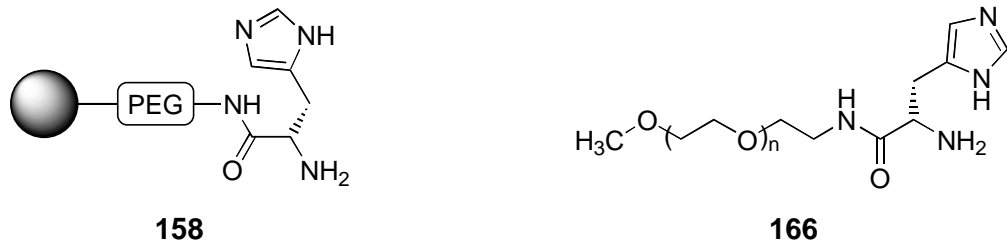
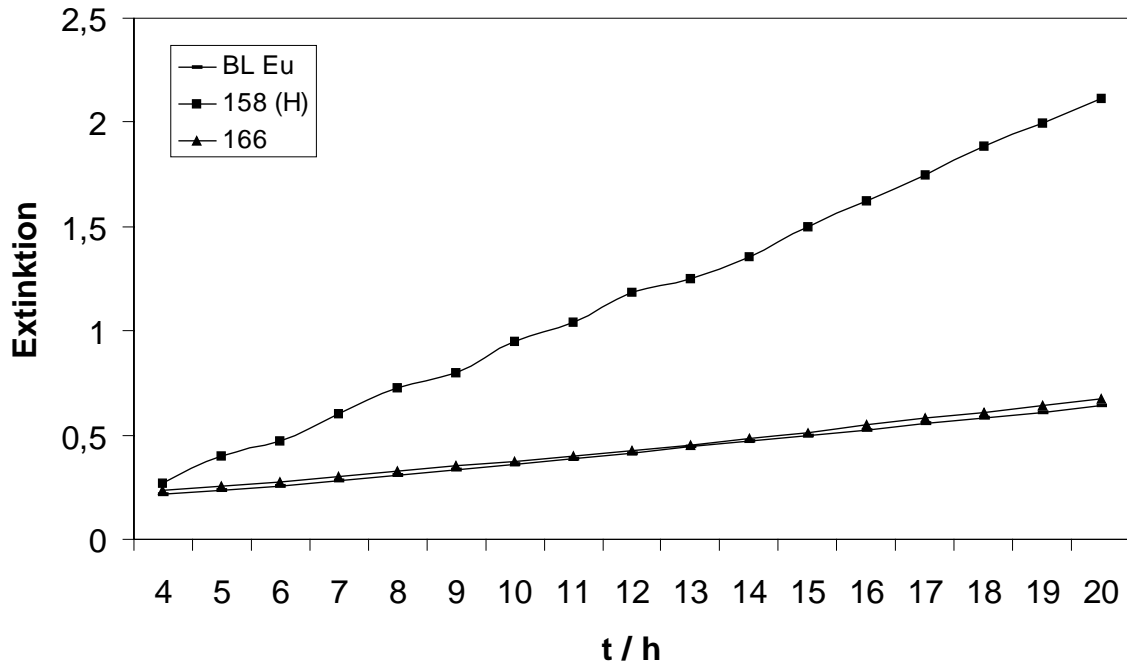


Abb. 5.6.18: Aktiver Ligand **158** und vom Polymer befreiter Ligand **166**



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl_3 (BL Eu)	0.0268 +/- 0.0020
166	0.0277 +/- 0.0020
158 (Code: H)	0.1149 +/- 0.0020

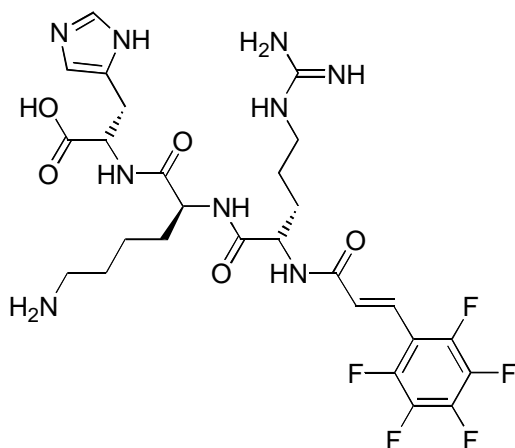
Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

Abb. 5.6.19: Photometrischer Aktivitätstest von **158** und **166** in der europiumkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19**

Dabei konnte keine Beschleunigung der Phosphorsäurediester-Hydrolyse durch das an Polyethylenglycol immobilisierte Histidin **166** beobachtet werden.

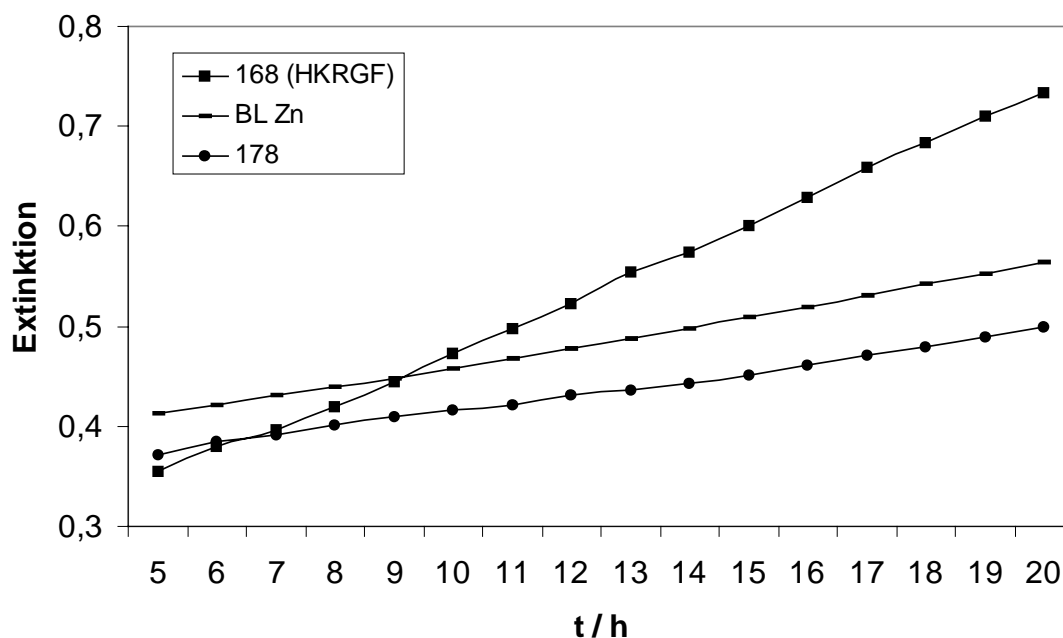
5.6.3.2 Zinkkatalysierte Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters **19** in homogener Phase

Der vom polymeren Träger abgespaltene Ligand **178** (unabhängige Synthese) wurde in einer Konzentration von 1.00×10^{-3} M mit 5.00×10^{-4} M Zinkchlorid und dem Testsubstrat **19** (5.00×10^{-3} M) bei Raumtemp. in EPPS-Puffer (0.10 M, pH = 8.0) inkubiert und die Extinktion der Reaktionslösung bei 405 nm verfolgt.



178

Abb. 5.6.20: Vom Polymer abgespaltener Ligand **178**



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl ₂ (BL Zn)	0.0101 +/- 0.0005
178	0.0081 +/- 0.0004
168 (Code: HKRGF)	0.0257 +/- 0.0010

Die Steigungen der Geraden hatten lineare Korrelationskoeffizienten $r > 0.998$.

Abb.5.6.21: *Photometrischer Aktivitätstest des abgespaltenen Liganden 178 in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters 19*

Auch hier zeigte sich, daß die polymere Matrix für eine Aktivität des Liganden **168** essentiell ist.

Ergebnis

Durch systematische Variation der mit den Screeningverfahren gefundenen Liganden konnten jeweils deren kleinste aktive Einheiten identifiziert werden. Die kleinste aktive Einheit des ursprünglichen Liganden **157** in der europiumkatalysierten Hydrolyse des Phosphorsäurediesters **19** ist demnach an TentaGel™ immobilisiertes Histidin **158**, während der aktive Ligand **168** für die zinkkatalysierte Reaktion alle vier Bausteine benötigt.

5.7 Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Zielsetzung

Es sollte eine auf Fluoreszenz basierende Detektionsmethode für Substanzen mit Phosphorsäurediesterase-Aktivität entwickelt und auf ihre Funktion hin überprüft werden.

5.7.1 Synthese der Fluoreszenz-Reporter 40 und 41 für Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Ausgehend von 1-Naphthol **37** und 2-Naphthol **38** wurden mit Phosphorylchlorid und Pyridin in Benzol die entsprechenden Naphthalinyl-phosphorodichloridate (71% **42** bzw. 77% **43**) synthetisiert und diese weiter mit 4-Hydroxyazobenzol **39** und Pyridin in Toluol zu den beiden Zielverbindungen umgesetzt (54% **40** bzw. 35% **41**).

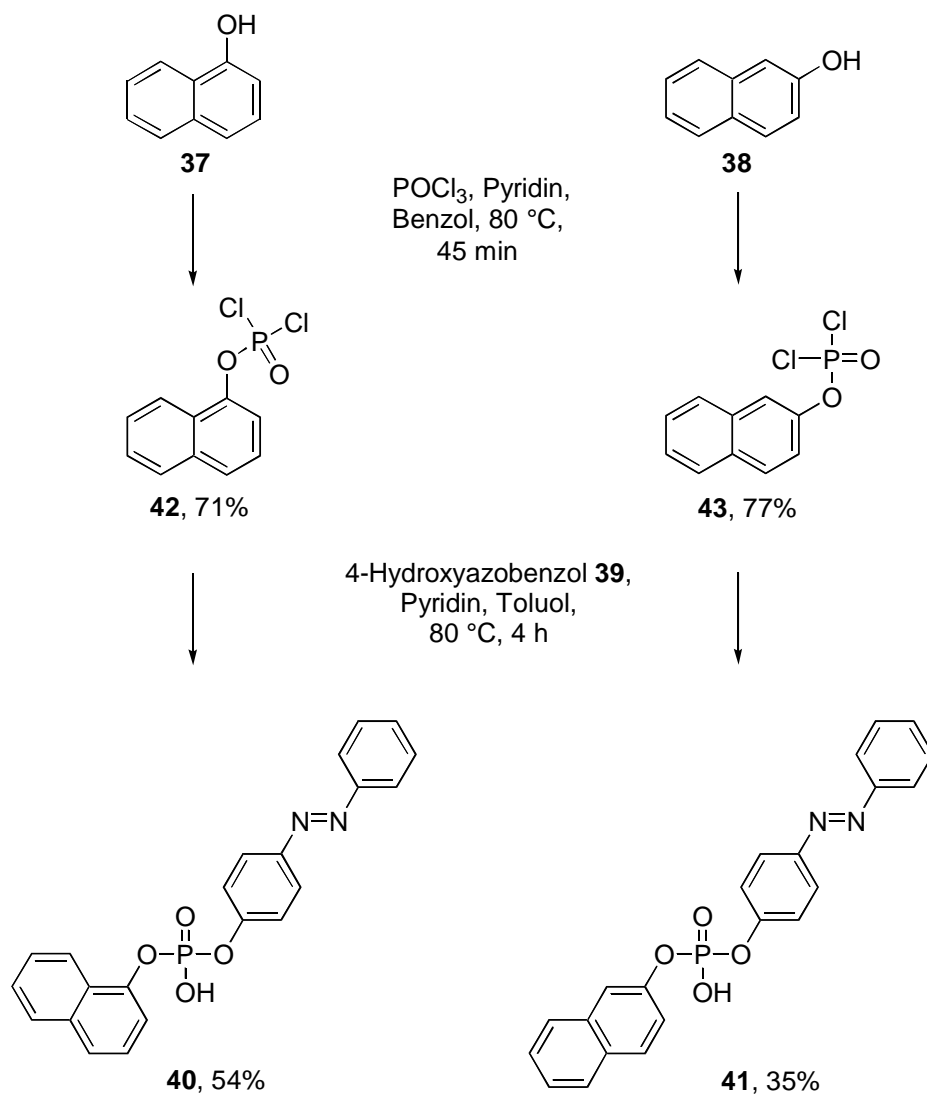


Abb. 5.7.1: Synthese der Fluoreszenz-Reporter **40** und **41**

5.7.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Hydrolyse der Fluoreszenz-Reporter **40** und **41** durch verschiedene Phosphorsäurediesterasen

5.7.2.1 Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters **40**

Zu einer 5.00×10^{-5} M Lösung von **40** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) wurden bei 37 °C in einer Küvette 0.05 u Phosphorsäurediesterase I (crotalus atrox venom) zugegeben und die Spaltung von **40** fluoreszenzspektroskopisch verfolgt ($\lambda_{\text{ex.}} = 290$ nm).

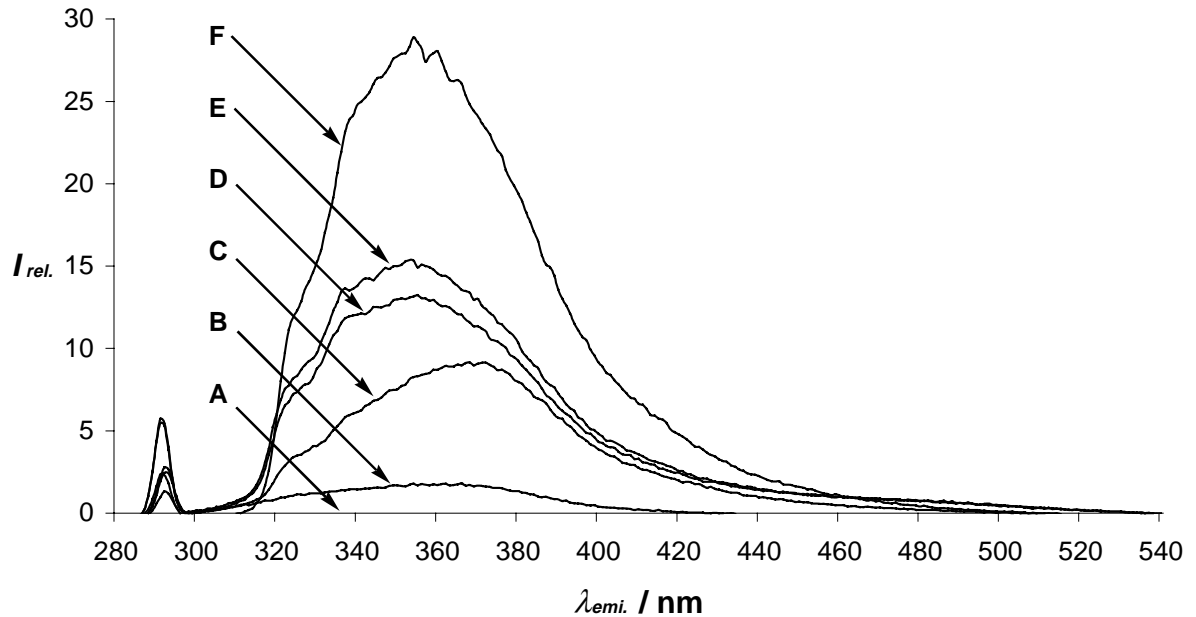


Abb. 5.7.2: Fluoreszenzspektren einer 5.00×10^{-5} M Lösung von **40** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8); **A:** Ohne Zusatz des Enzyms; **B:** Nach Zusatz von 0.05 u Phosphorsäurediesterase I (*crotalus atrox* venom); **C:** 30 min nach Enzymzugabe; **D:** 360 min nach Enzymzugabe; **E:** 240 min nach Enzymzugabe; **F:** Vergleich: 5.00×10^{-5} M 1-Naphthylphosphat **179** + 5.00×10^{-5} M 4-Hydroxyazobenzol **39**

Abbildung 5.7.2 zeigt, daß die Fluoreszenzintensität der Reaktionslösung sofort anzusteigen begann und daß die Form des Fluoreszenzspektrums der einer äquimolaren Kontrollmischung aus 1-Naphthylphosphat und 4-Hydroxyazobenzol (jeweils 5.00×10^{-5} M) entsprach. Jedoch wurde die Intensität der Kontrollmischung durch die enzymkatalysierte Spaltung von **40** nicht erreicht; nach etwa vier Stunden nahm die Fluoreszenzintensität wieder ab. Durch HPLC-Analyse konnte nachgewiesen werden, daß das primär gebildete 1-Naphthylphosphat **179** weiter zu 1-Naphthol **37** abgebaut wurde.

Wurde Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa als hydrolytisches Enzym eingesetzt, so konnte in der nicht fluoreszierenden Lösung HPLC-analytisch kein 1-Naphthylphosphat **179** nachgewiesen werden. Durch die im Vergleich zu der Phosphorsäurediesterase I aus *crotalus atrox* venom erhöhte Phosphatase-Aktivität dieses Enzyms konnte die direkte Dephosphorylierung von 1-Naphthylphosphat **179** zu 1-Naphthol **37** per HPLC verfolgt werden.

5.7.2.2 Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters **41**

Zu einer 5.00×10^{-5} M Lösung von **41** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) wurden bei 37 °C in einer Küvette 0.05 u Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa zugegeben und die Spaltung von **41** fluoreszenzspektroskopisch verfolgt ($\lambda_{\text{ex.}} = 326$ nm, $\lambda_{\text{emi.}} = 357$ nm).

Die Fluoreszenzintensität stieg dabei nach der Enzymzugabe wieder stark an und erreichte nach etwa einer Stunde einen stabilen Endwert. Die Anfangsgeschwindigkeiten waren dabei proportional zu der Enzymkonzentration.

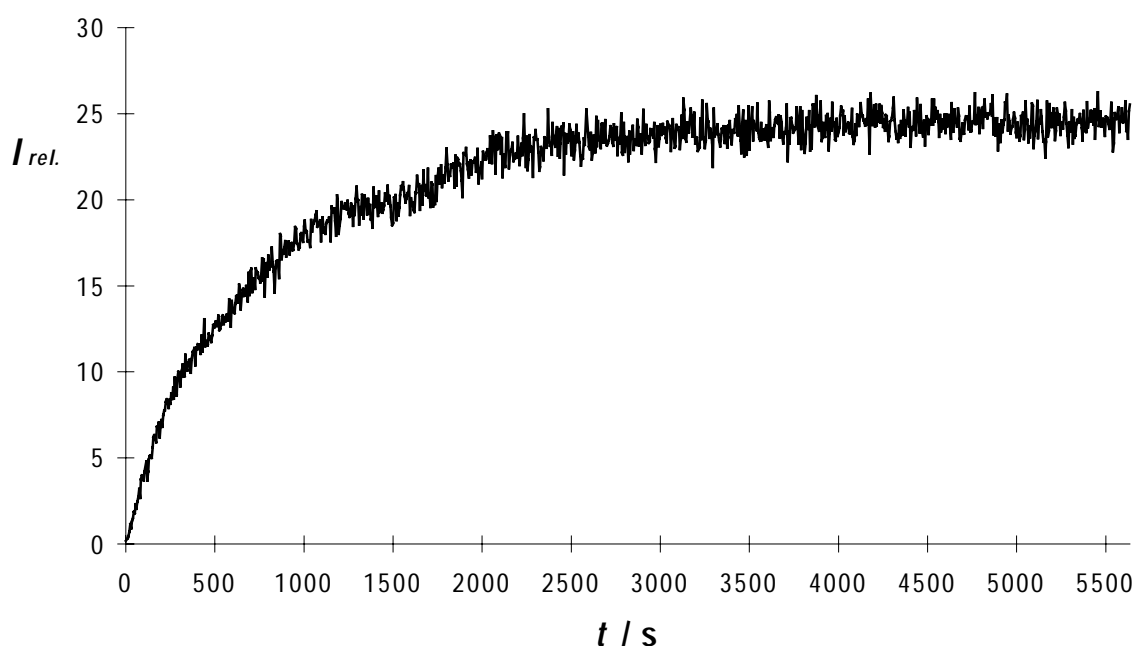


Abb. 5.7.3: Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Hydrolyse von 5.00×10^{-5} M **41** durch 0.05 u Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) bei 37 °C ($\lambda_{\text{ex.}} = 326$ nm, $\lambda_{\text{emi.}} = 357$ nm)

Die Intensität der Reaktionslösung erreichte dabei den Wert einer äquimolaren Kontrollmischung aus 2-Naphthol **38** und 4-Hydroxyazobenzol **39** (jeweils 5.00×10^{-5} M). Die Spaltung des Phosphorsäurediesters **41** konnte dabei durch die mindestens tausendfache Zunahme der Fluoreszenzintensität der Reaktionslösung detektiert werden. Durch HPLC-Analytik konnten auch hier die Spaltungsprodukte 2-Naphthol **38** und 4-Hydroxyazobenzol **39** nachgewiesen werden. Neben der fluoreszenzspektroskopischen Verfolgung der Spaltung von **40** und **41** bietet sich auch die absorptionsspektroskopische Detektion an, da das freigesetzte 4-Hydroxyazophenolat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 421$ nm besitzt, was die Reaktionslösung gelb färbt.

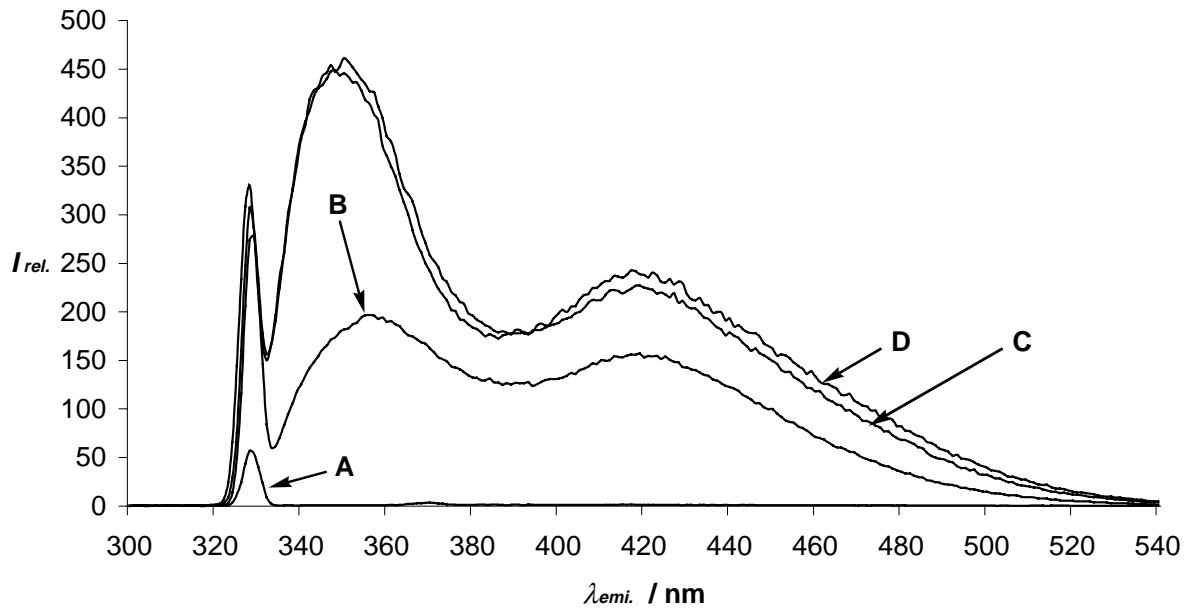


Abb. 5.7.4: Fluoreszenzspektren einer 5.00×10^{-5} M Lösung von **41** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8); **A:** Ohne Zusatz des Enzyms; **B:** 40 min nach Zugabe von 0.05 u Phosphorsäuredesterase I (Rinderdarmmucosa); **C:** 4 h nach Enzymzugabe (Ende der Reaktion); **D:** Vergleich: 5.00×10^{-5} M 2-Naphthol **38** + 5.00×10^{-5} M 4-Hydroxyazobenzol **39**

Ergebnis

Mit den beiden Phosphorsäurediestern **40** und **41** konnten zwei sehr empfindliche Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäuredesterase-Aktivität synthetisiert und ihr Nutzen gezeigt werden. Beide Verbindungen fluoreszieren wegen intramolekularer Fluoreszenzlöschung praktisch nicht, beginnen aber bei Spaltung der Phosphorsäuredesterbindung stark zu fluoreszieren, was mit dem Testsubstrat **41** zu einem mindestens tausendfachen Anstieg der Fluoreszenzintensität führt.

6 Diskussion und Ausblick

Für die kombinatorische Synthese von neuen künstlichen Phosphorsäurediesterasen wurden in dieser Arbeit Probleme der Festphasensynthese, der Synthese zweier Hydroxyliganden-Bibliotheken und deren Codierung mit Peptid-Codes, des *on bead* Screenings nach katalytisch aktiven Liganden in einer Verbindungsbibliothek bearbeitet sowie eine detaillierte Analyse der identifizierten aktiven Liganden durchgeführt. Zusätzlich wurden zwei Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität synthetisiert und auf ihre Funktion hin überprüft.

6.1 Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung von festphasengebundenen Olefinen

Die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung konnte auf festphasenimmobilisierte Olefine übertragen werden. Dabei war die Wahl des Lösungsmittels entscheidend für den Erfolg der Reaktion, wenn das hydrophobe Wang-Harz als fester Träger und $K_3[Fe(CN)_6]$ als terminales Oxidationsmittel verwendet wurden: Lediglich mit einem Gemisch aus THF : Wasser (1:1) konnte ein Umsatz erzielt werden. In diesem Lösungsmittelgemisch quillt der polymere Träger ausreichend, um die Diffusion der für die Reaktion nötigen polaren Reagenzien an die olefinischen Substrate zu erlauben.

Han und *Janda*^[69] berichteten ebenfalls, daß mit $K_3[Fe(CN)_6]$ als terminalem Oxidationsmittel kein Umsatz bei der Dihydroxylierung von an Wang-Harz gebundenen Olefinen erreicht werden kann, wenn die Standard-Vorschrift nach *Sharpless*^[64] angewandt wird. Das Lösungsmittel ist dabei ein Gemisch aus *tert.*-Butanol : Wasser (1:1). Die Autoren mußten deshalb N-Methylmorpholin-N-oxid (NMO) als terminales Oxidationsmittel in einem Aceton-Wasser-Gemisch verwenden.

Die erhaltenen Ausbeuten der Dihydroxylierungsprodukte an der Festphase sowie die erzielten Enantiomerenüberschüsse mit den in dieser Arbeit verwendeten exemplarischen Olefinen zeigen, daß die katalytische Dihydroxylierung zum Aufbau von kombinatorischen Verbindungsbibliotheken von Diolen an festen Trägern lediglich racemisch generell eingesetzt werden kann. Die Ausbeuten der isolierten Dihydroxylierungsprodukte waren befriedigend (41% für **66**) bis quantitativ (96% für **67**), wobei auf eine Optimierung bezüglich einer Ausbeutesteigerung im Falle von **66** verzichtet wurde. Hier ließe sich die weitere Oxidation

der Dihydroxylierungsprodukte zu den entsprechenden Benzaldehydderivaten durch eine verkürzte Reaktionsdauer unterdrücken.

Die erzielten Enantioselektivitäten sind bei den Dihydroxylierungen an fester Phase geringer als bei den Ansätzen in Lösung. Der Vergleich der Retentionszeiten der jeweils im Überschuß gebildeten enantiomeren Dihydroxylierungsprodukte ergab, daß bei der asymmetrischen Dihydroxylierung an den festen Trägern das gleiche Enantiomer wie bei der Reaktion in Lösung entsteht; es findet keine Umkehr der Enantioselektivität statt.

Substrate, die in Lösung nahezu enantiomerenrein dihydroxyliert werden können (>99% ee im Falle des Stilbensubstrates **54**), lassen sich auch an der Festphase mit sehr hohen Enantiomerenüberschüssen dihydroxylieren (97% ee). Im Falle des 10-Undecen-1-ols **55**, das sich in Lösung nur noch mit guten Enantiomerenüberschüssen dihydroxylieren läßt (88% ee), nimmt die Selektivität an der festen Phase weiter ab (maximal 45% ee), und bei dem Eugenol-Substrat **56**, das schon in Lösung nur schlechte Enantiomerenüberschüsse liefert (32% ee), bricht die Enantioselektivität der Dihydroxylierung an der festen Phase zusammen, und man erhält nur racemisches Produkt.

Somit eignen sich nur Olefine aus der ersten Gruppe ((*E*)-Stilbene, (*E*)-Zimtsäurederivate^[69]) für eine kombinatorische Festphasensynthese von stark enantiomerenangereicherten Polyolen durch repetitive Olefinierung/Dihydroxylierung.

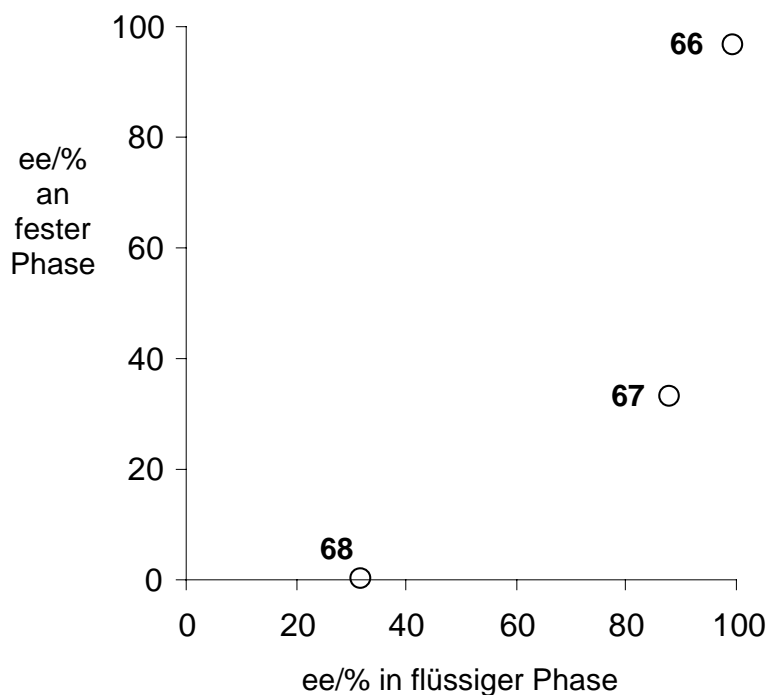


Abb. 6.1.1: Enantioselektivitäten der asymmetrischen Dihydroxylierung in Lösung und an fester Phase

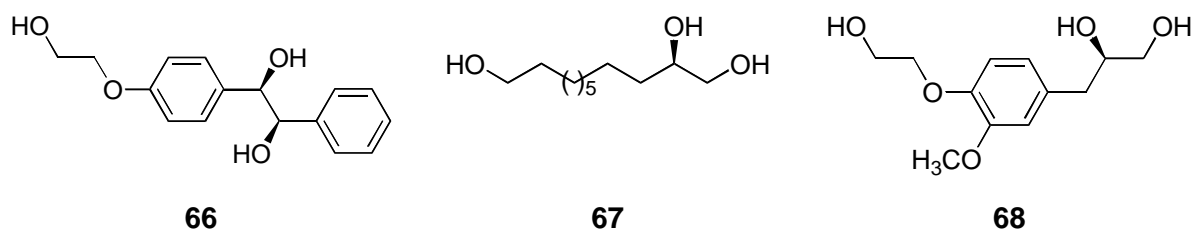


Abb. 6.1.2: Vom Polymer abgespaltene Produkte der katalytischen asymmetrischen Dihydroxylierung an fester Phase

Die Aufnahme hochaufgelöster homo- und heteronuclearer MAS-NMR-Spektren erlaubte die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses für die asymmetrische Dihydroxylierung von polymergebundener 10-Undecensäure **51**, ohne das Reaktionsprodukt von der Festphase abzuspalten. Dies stellt eine wesentliche Vereinfachung der Analytik einer enantioselektiven Umsetzung an einem festen Träger dar, da das enantiomerenangereicherte Dihydroxylierungsprodukt **63** lediglich mit einer enantiomerenreinen Mosher-Säure **34** in das Gemisch der festphasengebundenen diastereomeren Bis-Mosher-Ester **69** und **70** überführt werden mußte. Die Integration entsprechender ^{13}C -Signale ergab einen Enantiomerenüberschuß des Dihydroxylierungsproduktes, der innerhalb eines Fehlers von weniger als einem Prozent den gleichen Wert ergab wie die wesentlich aufwendigere Abspaltung und Derivatisierung des Produktes sowie dessen Analyse per chiraler HPLC. Unter der Voraussetzung, über die apparativen Möglichkeiten zu verfügen, werden hochaufgelöste MAS-NMR-Spektren sicherlich in Zukunft zur Routineanalytik von Umsetzungen an festen Phasen verwendet werden, wie dies bereits in der Pharmaindustrie der Fall ist.^[38c, f]

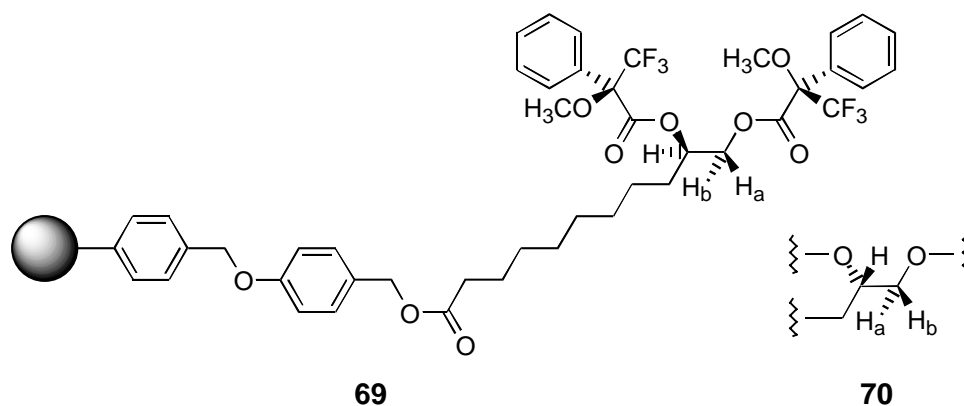


Abb. 6.1.3: Diastereomere Bis-Mosher-Ester **69** und **70**

6.2 Kombinatorische Synthese von künstlichen Phosphorsäurediesterasen

6.2.1 Synthese von zwei mit Peptiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken an Amino-TentaGel™

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß alle Reaktionen, die zum Aufbau zweier Bibliotheken von dihydroxylierten Liganden nach der Split-Mix-Synthese nötig waren, mit der Codierung durch Peptide kompatibel sind. Dabei handelte es sich neben Peptidkupplungen um *Wittig*-Reaktionen und die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung mit $K_2OsO_2(OH)_4$ und Kaliumhexacyanoferrat (III) als terminalem Oxidationsmittel.

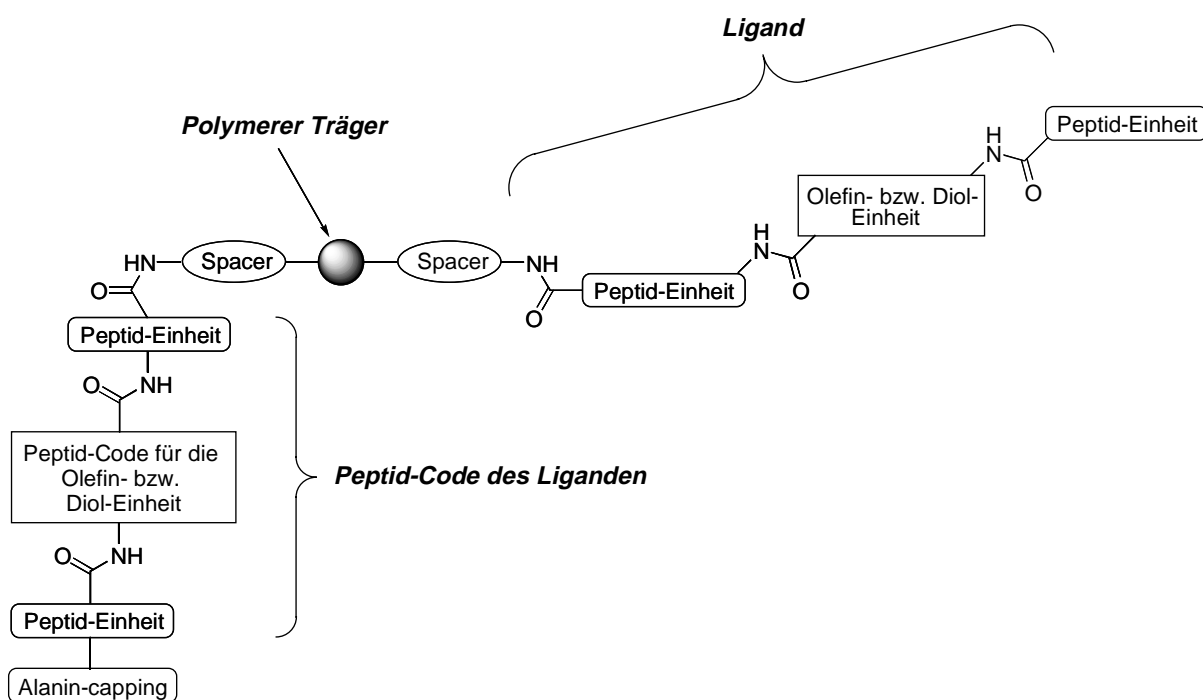


Abb. 6.2.1: Konzeptioneller Aufbau der Ligandenbibliotheken

Aus beiden Bibliotheken konnten nach der Synthese und vor dem anschließenden Screening eindeutige Aminosäuresequenzen der Peptid-Codes von einzelnen Polymerkügelchen erhalten werden.

Beim Aufbau der Olefineinheiten der Liganden durch *Wittig*-Reaktionen zeigte sich, daß diese Variante der Einführung der Substrate für die Dihydroxylierung mit stark schwankenden Ausbeuten verlief. Dies berichtete bereits *Scanlan*^[70] von *Wittig*-Olefinierungen an Polystyrol-Harz als polymerem Träger; die Verwendung von Amino-TentaGel™ änderte an diesem

Sachverhalt nichts. An Polyethylenglycolmonomethylether konnte eine Olefinierung nach *Wittig* mit Methyltriphenylphosphoniumbromid NMR-spektroskopisch mit quantitativem Umsatz nachgewiesen werden. Während der Synthese der Bibliothek **108** zeigte sich allerdings, daß *Wittig*-Reaktionen mit Aminoethyltriphenylphosphoniumbromid nur mit sehr schlechten Ausbeuten abliefen (13%).

In der Bibliothek **108**, bei der die Olefineinheiten durch *Wittig*-Reaktionen aufgebaut werden sollten, ließen sich im Screeningverfahren demnach auch keine künstlichen Phosphorsäure-diesterasen identifizieren.

Aufgrund der stark schwankenden Ausbeuten der Olefinierung nach *Wittig* in den Liganden der Bibliothek **108** wurden in der Bibliothek **128** die Substrate für die Dihydroxylierung durch Anknüpfung einer olefinischen Carbonsäure im Sinne einer Peptidkupplung an das aminoterminal Ende der Peptideinheiten in den Liganden eingeführt. Dies gelang laut Kaiser-Test in quantitativer Weise, womit die Grundlage für potentielle Liganden mit künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität gelegt war.

Aus dieser Bibliothek konnten dann schließlich auch in den Screeningverfahren positive Liganden isoliert werden.

Es zeigte sich, daß es für die mehrstufige kombinatorische Synthese von Verbindungsbibliotheken unerlässlich ist, Reaktionen einzusetzen, die jeweils mit nahezu quantitativen Ausbeuten ablaufen, da es - bedingt durch die Festphasensynthese - keine Möglichkeit gibt, das gewünschte Produkt von Nebenprodukten abzutrennen.

Es verwundert deshalb nicht, daß es sich bei den bisher publizierten Verbindungsbibliotheken, die zur Katalysatorsuche aufgebaut wurden, meist um von Peptiden abgeleitete Substanzen handelt, bei denen lediglich eine nichtpeptidische Komponente eingebaut wurde (Phosphineinheiten bei *Gilbertson*^[7] oder auch Schiff-Basen bei *Hoveyda*^[8, 55]).

Im Gegensatz zu der hier vorgestellten Arbeit handelte es sich bei den bisher veröffentlichten Ansätzen meist um Substanzbibliotheken, die durch Parallelsynthesen hergestellt wurden. In diesen Fällen ist eine Reaktion mit geringerer Ausbeute noch eher zu tolerieren als bei der hier verwendeten Split-Mix-Synthese, da größere Mengen der Liganden zu Verfügung stehen.

In dieser Arbeit erfolgte das anschließende Screening dagegen an einzelnen Polymerkügelchen, die bei jeweils quantitativer Ausbeute der einzelnen Reaktionsschritte über eine Stoffmenge des Liganden von nur etwa 270 pmol verfügten. Werden bei diesem Ansatz Reaktionen verwendet, die mit schlechten Ausbeuten ablaufen (z. B. *Wittig*-Reaktionen), so kann leicht die Nachweisgrenze der Screeningverfahren unterschritten werden, was dazu führt,

daß keine Vertreter aus der Bibliothek mit den gewünschten Eigenschaften gefunden werden, wie dies bei der Bibliothek **108** der Fall war.

Für den kombinatorischen Chemiker stellt sich somit weiterhin die Aufgabe, entweder Reaktionen mit quantitativen Ausbeuten an die feste Phase zu übertragen oder die bisher implementierten Umsetzungen kreativ zum Aufbau komplexer Substanzbibliotheken zu nutzen.

6.2.2 Screening der beiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen

6.2.2.1 Screening der Bibliothek **108** in Mikrotitrationsplatten

In der Bibliothek **108** konnten beim Screening in Mikrotitrationsplatten mit Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** als Testsubstrat keine Substanzen gefunden werden, die eine künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität aufwiesen.

Bei der formalen Gesamtzahl von 4320 verschiedenen Verbindungen in der Bibliothek **108** mußten mindestens 20000 Polymerkügelchen in die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten einsortiert werden, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % alle Verbindungen dem Screeningverfahren zu unterziehen.^[67] Auf eine Verteilung von einzelnen Polymerkügelchen in die Vertiefungen wurde verzichtet, da kein automatischer Sortierer zur Verfügung stand. Es wurden statt dessen Mischungen von jeweils etwa 15 Polymerkügelchen in den einzelnen Vertiefungen untersucht. Aktive Mischungen sollten anschließend weiter aufgeteilt werden, um die jeweils aktive Einzelverbindung zu isolieren. Es konnte allerdings in keiner Mischung eine überdurchschnittliche Spaltung des Testsubstrates **19** festgestellt werden.

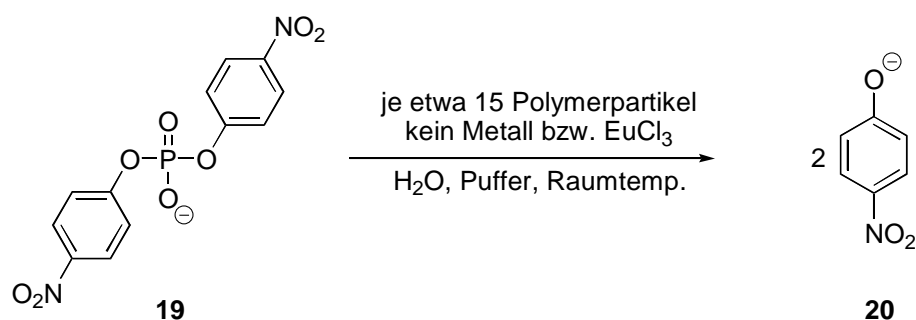


Abb. 6.2.2: Testreaktion für das Screening in Mikrotitrationsplatten

Hier zeigt sich eine Eigenart des Screenings von Mischungen, wenn in der Gesamtbibliothek viele Vertreter mit annähernd gleicher Aktivität vorhanden sind: In diesem Falle liegen in

jeder Mischung aktive Substanzen vor, was zu der oben beschriebenen gleichmäßigen Aktivitätsverteilung führt.

Bei den Untersuchungen an der Bibliothek **128** konnte gezeigt werden, daß an TentaGel™ immobilisiertes Histidin **158** bzw. histidinreiche Tripeptidsequenzen zu einer gleichstarken Beschleunigung der europiumkatalysierten Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** führen. Unter Berücksichtigung der teilweise schlechten Ausbeuten der *Wittig*-Olefinierung beim Aufbau der Bibliothek **108** ergibt sich ein hoher Anteil von histidinreichen Tripeptidliganden in der Bibliothek **108**, wodurch keine überdurchschnittlich aktiven Mischungen gefunden werden konnten.

6.2.2.2 Batchweises Screening der Bibliothek 128

Das batchweise Screening besitzt im Vergleich zum Screening in Mikrotitrationsplatten den Vorteil, daß auf das zeitintensive Einsortieren der Polymerkügelchen in die Vertiefungen der Platten verzichtet werden kann. Zusätzlich hat es den Vorteil, daß Aliquote der Bibliothek als Mischung gescreent werden können, daß aber trotzdem Einzelverbindungen getestet werden, da sich die positiven Polymerkügelchen nach dem Screening einzeln isolieren und analysieren lassen.

Entscheidend für die Durchführung solcher Screeningverfahren ist die Entwicklung von Testsystemen, bei denen sich die polymergebundenen aktiven Liganden in der Mischung durch absorptions- bzw. fluoreszenzspektroskopische Analysemethoden identifizieren lassen. Für das batchweise Screening nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen wurden deshalb in dieser Arbeit zwei neue Testsysteme entwickelt.

6.2.2.2.1 Screening mit dem Berlinerblau Test

Die Arbeitshypothese für das batchweise Screening nach aktiven Liganden im Berlinerblau Test war, daß sich polymergebundene aktive Liganden durch die Detektion von polymergebundenen Umesterungsprodukten eines Phosphorsäurediesters nachweisen lassen sollten. Dazu wurden Aliquote der Bibliothek **128** mit dem Testsubstrat **35** umgesetzt, das über eine detektierbare Gruppe (mit $K_3[Fe(CN)_6]$ / $FeCl_3$ oxidierbares cyclisches Hydroxylamin) und eine aktivierte Abgangsgruppe (4-Nitrophenolat) verfügt.

Die Identifikation von positiven Liganden erfolgte danach durch Anfärben der Polymerkügelchen mit Berlinerblau.

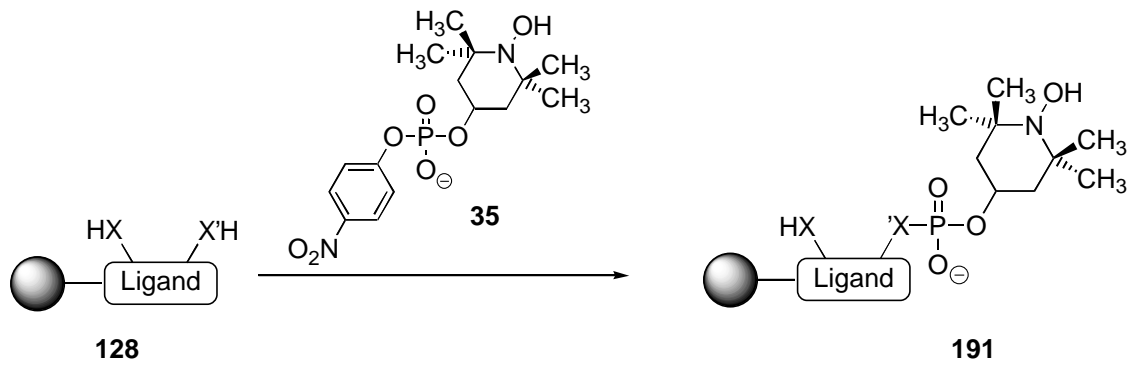


Abb. 6.2.3: Arbeitshypothese: Polymergebundene Umesterungsprodukte der aktiven Liganden, $X, X' = \text{nucleophile Gruppen, wie O, NH}$

Die Aktivitätsüberprüfung der mit diesem Screeningverfahren ermittelten positiven Liganden ergab, daß drei der vier Liganden keine Beschleunigung der Phosphorsäurediester-Hydrolyse zeigten. Der vierte positive Ligand dagegen wies tatsächlich eine künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität auf (**153** komplexiert an Zn^{2+}).

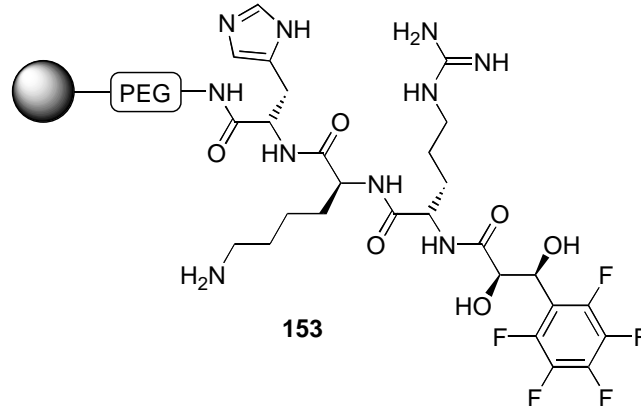


Abb. 6.2.4: Aktiver Zn^{2+} -Ligand **153**

Diese Diskrepanz zwischen der positiven Detektion im Screeningverfahren und der anschließenden negativen Aktivitätsüberprüfung läßt sich durch die strukturellen Eigenschaften der drei Liganden **154**, **155** und **156** erklären. Bei diesen Liganden handelt es sich um argininreiche Tripeptide, die im Falle von **154** und **156** zusätzlich noch einen Pentafluorphenylrest tragen (siehe Abbildung 6.2.5, Ligand **154**). Sowohl Arginin als auch der Pentafluorphenylrest führen zu einer starken nichtkovalenten Bindung des Testsubstrates **35** an die Liganden, was schließlich beim Anfärben durch Berlinerblau ein kovalentes Umesterungsprodukt vortäuscht. Zusätzlich läßt sich bereits vor dem Screening mit dem Testsubstrat **35** etwa 1% der Bibliothek anfärben.

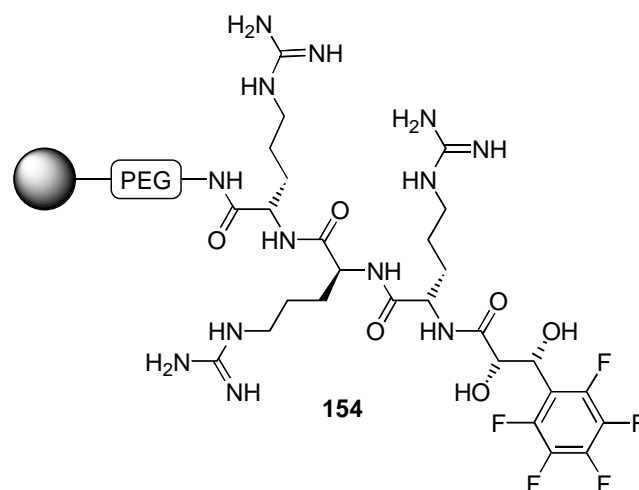


Abb. 6.2.5: Beispiel eines nicht aktiven Liganden

Trotz seiner Fehlerquellen erlaubte dieses Screeningverfahren aufgrund seiner einfachen und schnellen Durchführbarkeit das Auffinden des aktiven Liganden **153** in der Bibliothek **128**.

Die Labilität des Peptid-Codes führte dazu, daß nicht von allen im Screeningverfahren positiv aufgefallenen Liganden die Struktur ermittelt werden konnte. Dies konnte nur bei den Ansätzen ohne Metallsalzzugabe sowie denen mit ZnCl_2 und CuCl_2 erreicht werden. Wurden Metallsalze wie EuCl_3 , ZrCl_4 , FeCl_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ oder $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ zugesetzt, so konnten keine intakten Peptid-Codes mehr sequenziert werden. Dieses Problem ließe sich in Zukunft durch chemisch resistente Codierungstechniken, wie die von *Nicolaou*^[47] vorgestellte Codierung mit Hochfrequenzsignalen auf einem Mikrochip, umgehen.

Eine andere Möglichkeit ist das Screening der Ligandenbibliothek unter Zugabe eines Metallsalzes, welches mit dem Peptid-Code kompatibel ist, wie z. B. ZnCl_2 , und das anschließende Überprüfen der Aktivität dieser positiven Liganden mit stärker aktivierenden Metallsalzen, wie z. B. EuCl_3 , die nicht mit dem Peptid-Code vereinbar sind.

Diese Methode führte über das Screeningverfahren mit Kresylviolett in dieser Arbeit zu einem aktiven Liganden für die europiumkatalysierte Phosphorsäurediester-Hydrolyse.

6.2.2.2 Screeningverfahren mit Kresylviolett

Der Befund, daß sich polymerimmobilisierte Phosphorsäurediester wie **149** und **150** mit Kresylviolett **36** blau anfärben lassen, wurde für ein batchweises Screeningverfahren nach aktiven Liganden verwendet. Die Arbeitshypothese war dabei, daß sich aktive Liganden durch ihre polymergebundenen Umesterungsprodukte mit dem Testsubstrat Bis(4-nitrophenyl)-

phosphat **19** ähnlich den immobilisierten Phosphorsäurediestern **149** und **150** über eine ionische Wechselwirkung mit dem Farbstoff in der Bibliothek identifizieren lassen sollten.

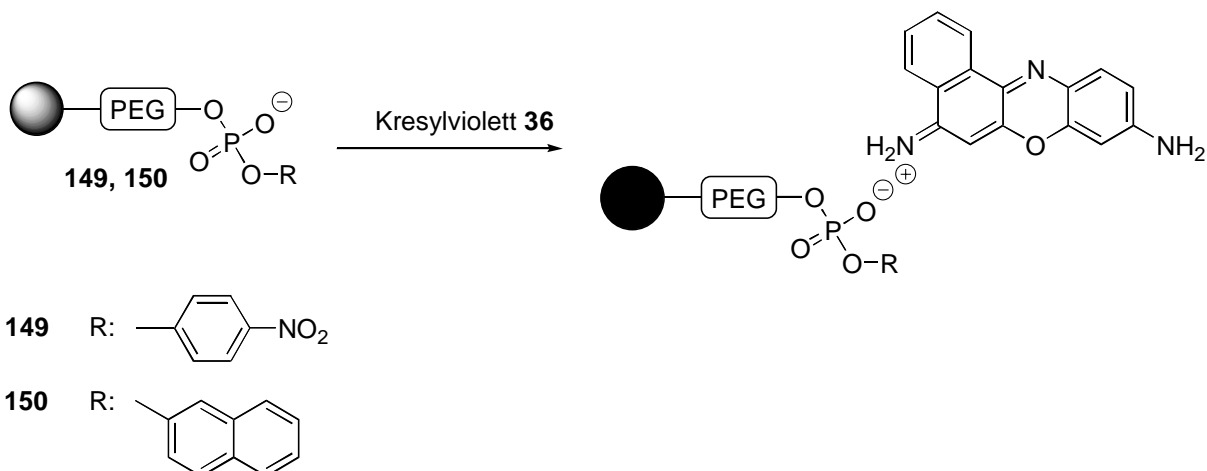


Abb. 6.2.6: Anfärben der polymeren Phosphorsäurediestern **149** und **150** mit Kresylviolett **36**

Mit diesem Screeningverfahren konnte tatsächlich ein positiver Ligand durch Komplexierung an mit dem Peptid-Code kompatibles Zn^{2+} gefunden werden, der bei der späteren photometrischen Aktivitätsüberprüfung eine künstliche Phosphorsäureesterase-Aktivität zusammen mit Eu^{3+} -Ionen zeigte (Ligand **157**, Abbildung 6.2.7). Auf diese Weise konnte die Unvereinbarkeit der Codierung durch Peptide mit einer Zugabe von EuCl_3 während des Screenings umgangen werden.

Die Zulässigkeit eines solchen Vorgehens gründet auf der Tatsache, daß verschiedene Ligandenklassen, wie z. B. cyclische Tri- und Tetramin-Liganden, bereits in verschiedenen Metallkomplexen (mit Cu^{2+} , Zn^{2+} und Eu^{3+})^[61c, d, f; 62c, d] als künstliche Phosphorsäureesterasen eingesetzt wurden.

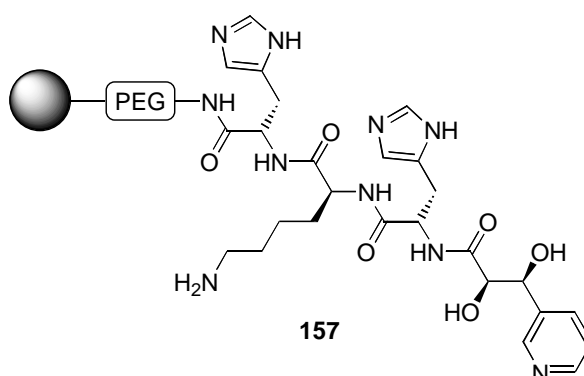


Abb.6.2.7: Aktiver Eu^{3+} -Ligand **157**

Die geringe Anzahl an im Screeningverfahren mit Kresylviolett bei Zugabe von ZnCl_2 positiv aufgefallenen Polymerpartikeln und die anschließende negative Aktivitätsüberprüfung eines

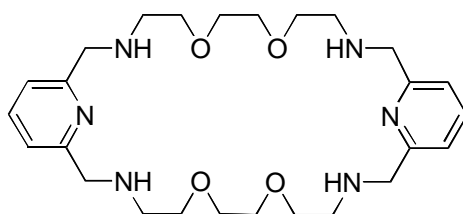
dieser positiven Liganden lassen darauf schließen, daß nur wenige polymere Trägerpartikel aufgrund ihres spezifischen dreidimensionalen Aufbaus zusammen mit diesem Liganden und durch Zugabe von ZnCl_2 eine künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität erreichen.

6.2.3 Identifizierung der kleinsten aktiven Einheiten der aktiven Liganden **153** und **157** mit künstlicher Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Mit den zwei neu entwickelten Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen in einer Ligandenbibliothek konnten zwei Liganden ermittelt werden, die eine Beschleunigung der zink- bzw. europiumkatalysierten Hydrolyse von Phosphorsäurediestern aufweisen. Die Beschleunigungen der Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphates **19** betragen im Falle des Liganden **153** den Faktor 2.5 für die zinkkatalysierte und im Falle des Liganden **157** den Faktor 4 für die europiumkatalysierte Variante.

Die mit Hilfe des Zinkliganden **153** erzielte Beschleunigung um den Faktor 2.5 bei Raumtemperatur liegt in der Größenordnung der Beschleunigungen, die *Breslow* mit Triazacyclen als Liganden in monomeren Zinkkomplexen bei der Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** bei 55 °C und pH = 8.36 erreichte (Faktor 1.6 bis 2.4).^[61d] Mit dimeren Zinkkomplexen des gleichen Ligandentyps erreichte er dagegen bei dieser Hydrolyse Beschleunigungen um den Faktor 13.^[61d]

Die Beschleunigung von **157** um den Faktor 4 in der europiumkatalysierten Hydrolyse von **19** ist im Vergleich mit einkernigen Europiumkomplexen mit Polyol-Liganden sehr hoch. *Schneider* berichtete für Polyol-Liganden eine Beschleunigung von höchstens 2.53 bei der Komplexbildung an Eu^{3+} (50 °C, pH = 7.0, siehe Kapitel 3.2).^[63] Mit zweikernigen Europiumkomplexen des Liganden **192** konnte er Beschleunigungen der europiumkatalysierten Hydrolyse von **19** um den Faktor 14 erzielen.^[62c]



192

Abb.6.2.8: Ligand **192**^[62c]

Die systematische Suche nach den jeweils kleinsten aktiven Einheiten in den modular aufgebauten Liganden ergab, daß für den Liganden **153** in der zinkkatalysierten Hydrolyse des Testsubstrates **19** alle vier Bausteine (die drei Aminosäuren und das Olefin, Ligand **168**) für eine Aktivität nötig sind, daß für die europiumkatalysierte Umsetzung dagegen nur ein immobilisiertes Histidin am festen Träger (Ligand **158**) für die Aktivität verantwortlich ist.

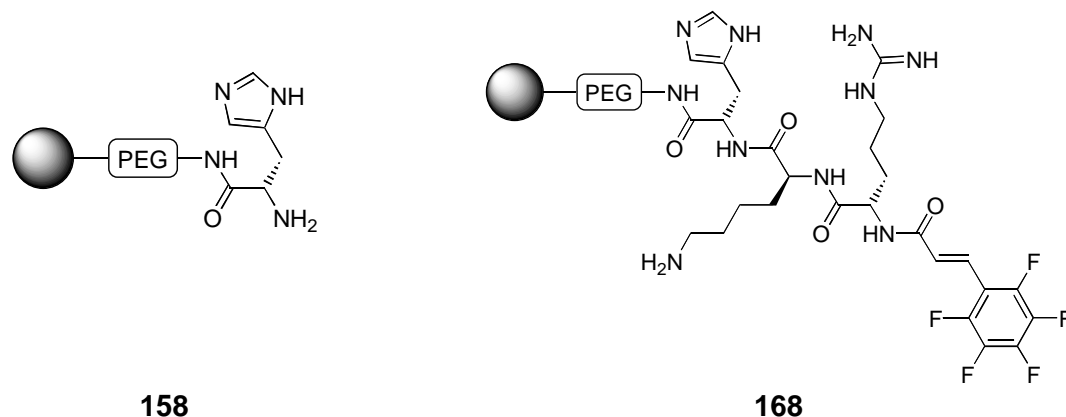


Abb.6.2.9: *Kleinste aktive Liganden 158 und 168*

Damit wurde in der Bibliothek **128** sowohl ein aktiver Ligand mit der minimalen Anzahl an Synthesebausteinen gefunden als auch ein Ligand, der über alle vier eingesetzten Bausteine verfügt.

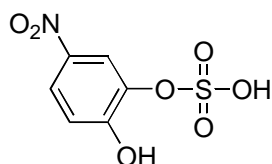
Dies zeigt den Vorteil der kombinatorischen Synthese von Katalysatoren: Da zu Beginn der Bibliothekssynthese nur gewisse Anhaltspunkte für die Synthese von Liganden mit künstlicher Phosphorsäureesterase-Aktivität vorlagen, wurde eine Bibliothek von Liganden synthetisiert, die die größtmögliche Komplexität unter Berücksichtigung der unten genannten strukturellen Eigenschaften aufwiesen. Die Liganden sollten funktionelle Gruppen enthalten, die auch beim natürlichen Enzym im aktiven Zentrum vorkommen (Arginin, Histidin, Lysin); zusätzlich sollten sie über nukleophile Hydroxyfunktionen, über metallkoordinierende Heterocyclen oder über zu starken π,π -Wechselwirkungen mit aromatischen Substraten fähige Pentafluorphenyleinheiten verfügen. Mit den Screeningverfahren wurden daraus aktive Liganden isoliert und diese anschließend bezüglich eines möglichst einfachen Katalysators optimiert.

Diese vereinfachten polymeren Liganden zeigen nach der Komplexbildung mit den entsprechenden Metallen eine Katalyse der Phosphorsäureester-Hydrolyse; die vom Polymer befreiten Liganden zeigen dagegen in Lösung keine bzw. nur eine geringe Aktivität. Dabei spielt es keine Rolle, ob der Ligand vollständig vom Polymer befreit wird (gelöstes Histidin **164**) oder ob lediglich das Polystyrol entfernt wird (gelöstes, an Polyethylenglycolmonomethylether immobilisiertes Histidin **166**).

Das polymere „Rückgrat“ des festen Trägers ist für die Aktivität notwendig. Offensichtlich erlaubt erst die dreidimensionale Fixierung der Liganden im Polymer zusammen mit den Metallen eine katalytische Aktivität. Dies läßt eventuell darauf schließen, daß zwei- oder mehrkernige Metallkomplexe den Phosphorsäurediester **19** für die hydrolytische Spaltung aktivieren.

Im Falle des polymeren Liganden **158** fällt dabei eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem zweikernigen Europiumkomplex des Liganden **192** auf: In diesem Komplex sind zwei Eu^{3+} -Ionen in der Kavität des Liganden **192** gebunden, wobei der Abstand zwischen den Metallzentren von der Größe der Kavität abhängt. Diese wird ihrerseits durch die Fixierung der beiden europiumkomplexierenden Ethylenglycoldiethereinheiten an den beiden Pyridinresten bestimmt. Im polymeren Liganden **158** sind ebenfalls europiumkomplexierende Polyethereinheiten (PEG) vorhanden, deren Wechselwirkung durch die Fixierung am polymeren „Rückgrat“ des festen Trägers ermöglicht wird. Entfernt man den polymeren Träger (Liganden **164** und **166**), so ist keine Beschleunigung der europiumkatalysierten Hydrolyse von **19** mehr festzustellen.

Die Imidazolgruppen des polymerfixierten Histidins **158** erlauben zusätzlich noch eine Aktivierung des für die Hydrolyse notwendigen Wassers.^[71] Mit Imidazolresten funktionalisierte Polymere wurden bereits als Enzymmodelle untersucht. Dabei erreichte *Klotz* eine Beschleunigung der Hydrolyse von 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat **193** um den Faktor 10^{12} im Vergleich zu freiem Imidazol.^[72]



193

Abb.6.2.10: 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat **193**

Die funktionalisierten, aber strukturell undefinierten Polymere von *Menger* zeigen ebenfalls eine katalytische Aktivität bezüglich der Phosphorsäurediester-Hydrolyse.^[56] Im Gegensatz zu diesen Substanzen läßt sich die Struktur der katalytisch aktiven Liganden **158** und **168** aber angeben.

6.3 Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Mit den beiden Phosphorsäurediestern **40** und **41** konnten zwei sehr empfindliche Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität synthetisiert sowie ihre Funktion untersucht werden. Lösungen der beiden Verbindungen fluoreszieren wegen intramolekularer Fluoreszenzlöschung praktisch nicht, beginnen aber bei Spaltung der Phosphorsäurediesterbindung stark zu fluoreszieren.

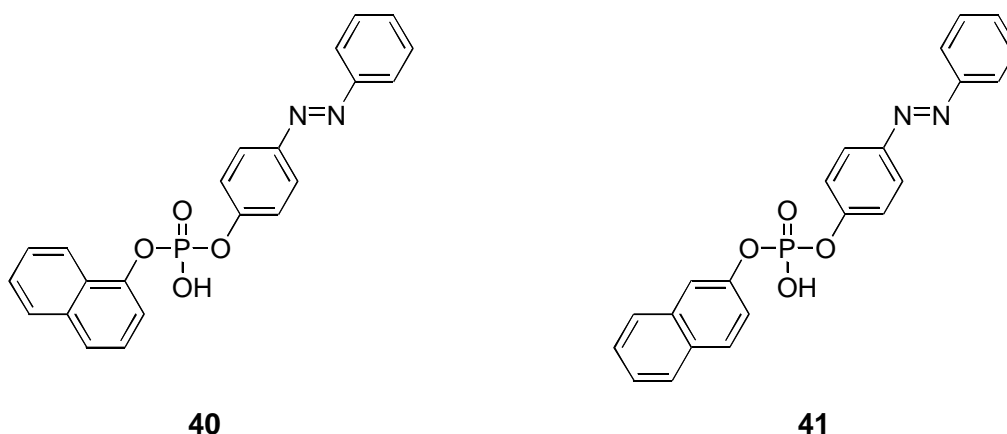


Abb. 6.3.1: Fluoreszenz-Reporter für Phosphorsäurediesterase-Aktivität

Der entscheidende Unterschied im Fluoreszenzverhalten der Reaktionslösungen bei der Hydrolyse der beiden Fluoreszenz-Reporter **40** und **41** liegt in den Fluoreszenzeigenschaften der Spaltungsprodukte 1-Naphthol **37** und 2-Naphthol **38**.

Während die Fluoreszenz des 1-Naphthols **37** bei 357 nm durch Wasser praktisch vollständig gelöscht wird, beeinflusst Wasser die Fluoreszenz von 2-Naphthol **38** bei 357 nm nicht.^[73] Dies erklärt, warum nach einer schnellen Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der enzymatischen Spaltung von **40** mit Phosphorsäurediesterase I aus *crotalus atrox* venom mit fortschreitender Reaktionsdauer ein langsamer Rückgang der Fluoreszenz zu verzeichnen war: Das primär gebildete fluoreszierende 1-Naphthylphosphat **179** wird durch eine geringe Phosphatase-Aktivität des eingesetzten Enzyms zu nicht fluoreszierendem 1-Naphthol **37** abgebaut.

Demgegenüber steigt die Fluoreszenz bei der enzymatischen Hydrolyse von **41** mit Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa stetig an und erreicht schließlich die Intensität

einer Kontrollösung der beiden Spaltungsprodukte 2-Naphthol **38** und 4-Hydroxyazobenzol **39**.

Die dabei gemessene, mindestens tausendfache Zunahme der Fluoreszenzintensität der Reaktionslösung sollte sich bei höherer Anregungsintensität noch steigern lassen.

Die sehr hohe Effizienz der intramolekularen Fluoreszenzlöschung um den Faktor 1000 resultiert dabei zum einen aus der günstigen Überlagerung des Absorptionsspektrums der fluoreszenzlöschenden Gruppe (4-Hydroxyazobenzol **39**, $\lambda_{\text{abs.}} = 347 \text{ nm}$) mit dem Emissionsspektrum der fluoreszierenden Gruppe (2-Naphthol **38**, $\lambda_{\text{emi.}} = 357 \text{ nm}$), zum anderen bedingt die relativ kurze Entfernung zwischen dem Donor und dem Akzeptor gemäß der Förster-Gleichung eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen intramolekularen Energietransfer.^[74]

$E = (1 + x^6)^{-1}$	<p>E = Wahrscheinlichkeit für einen intramolekularen Energietransfer</p> <p>x = Abstand zwischen Donor und Akzeptor</p>
----------------------	---

Abb. 6.3.2: Förster-Gleichung

Matayoshi berichtete über einen Anstieg der Fluoreszenz bei der Spaltung des Octapeptides **194** um den Faktor 40/mol.^[75] Im Vergleich zu den beiden Fluoreszenz-Reportern **40** und **41** ist der Abstand zwischen Donor (5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalin-1-sulfonsäure $\lambda_{\text{emi.}} = 490 \text{ nm}$) und Akzeptor (4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure $\lambda_{\text{abs.}} = 470\text{-}520 \text{ nm}$) größer als bei den Substraten **40** und **41**, was zu der geringeren Effizienz des Systems bezüglich der intramolekularen Fluoreszenzlöschung führt.

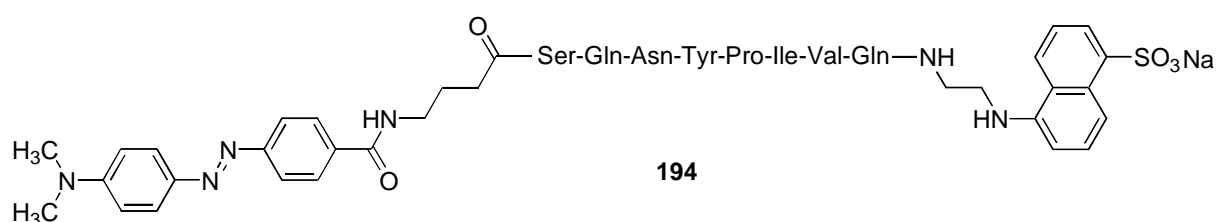


Abb. 6.3.3: Octapeptid **194**^[75]

Neben der fluoreszenzspektroskopischen Verfolgung der Spaltung der beiden Phosphorsäurediester **40** und **41** bietet sich auch die absorptionsspektroskopische Detektion an, da das freigesetzte 4-Hydroxyazophenolat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 421 \text{ nm}$ besitzt, was die Reaktionslösung gelb färbt.

Damit stehen mit den beiden Phosphorsäurediestern **40** und **41** zwei Testsubstrate zur Verfügung, die sowohl die Analysenmethode des Standardtestsubstrates Bis(4-nitrophenyl)-phosphat (absorptionsspektroskopisch) aufweisen als auch die sehr empfindliche Fluoreszenzanalytik erlauben. Die relativ einfache Synthese sollte zusätzlich zu einer breiten Akzeptanz führen.

6.4 Ausblick

Die Methoden der kombinatorischen Chemie werden mittlerweile nicht nur für Untersuchungen von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen genutzt, sondern sie finden in zunehmendem Maße in weiten Teilen der Chemie Anwendung, wo auch immer die geeignetste Struktur für ein gegebenes Problem gefunden werden soll. Vor allem auf dem Gebiet der Katalysator-entwicklung lassen sich weitere Fortschritte durch kombinatorische Methoden erwarten. Da es sich dabei um Multiparameter-Optimierungen handelt, die rational nur schwer zu bewältigen sind, bietet sich die Kombinatorik als experimentelle Alternative an, die ihre Stärke in der großen Anzahl von Variationen in einem Optimierungsprozeß besitzt.

Entscheidend für den Erfolg dieser Methode sind Hochdurchsatz-Screeningverfahren, um große Substanzbibliotheken analytisch bewältigen zu können. Deshalb müssen vor allem auf diesem Gebiet weitere Anstrengungen unternommen werden. Mit den beiden batchweisen Screeningverfahren, die in dieser Arbeit entwickelt worden sind, wurde dazu ein Beitrag geleistet.

Diese Arbeit zeigt auch, daß Katalysatoren, die an festen Trägern kombinatorisch entwickelt wurden, nicht zwangsläufig auch in Lösung aktiv sind. Solche polymeren Katalysatoren sind sicherlich für industrielle Anwendungen interessant, allerdings sollten nichtimmobilisierte Katalysatoren für die homogene Phase auch in homogener Phase kombinatorisch entwickelt werden, da sich Substanzen trägergebunden anders verhalten können als in Lösung.^[76]

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden destilliert. Wasserfreie Lösungsmittel wurden wie folgt erhalten: Tetrahydrofuran und Diethylether durch Einpressen von Natrium und Zusatz von Benzophenon mit anschließendem Refluxieren und Abdestillieren, Dichlormethan und Chloroform durch Rückflußkochen über Phosphorpentoxid und anschließendes Abdestillieren, Acetonitril, Pyridin und Triethylamin durch Rückflußkochen über Calciumhydrid und anschließendes Abdestillieren, Methanol durch Refluxieren über Magnesiumspänen und anschließendes Abdestillieren, Toluol durch Rückflußkochen über Natrium und anschließendes Abdestillieren, DMF durch Rückflußkochen über Calciumhydrid unter vermindertem Druck (20 mbar) und anschließendes Abdestillieren (ebenfalls bei 20 mbar, etwa 20 Volumenprozent wurden als Vorfraktion verworfen).

Schutzgas

Als Schutzgas wurde Argon 99.998% oder Stickstoff 99.996% - über Blaugel und Phosphorpentoxid getrocknet - verwendet.

Entfernen von Lösungsmitteln und Trocknen von Substanzen

Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer bei 40 °C Wasserbadtemperatur unter vermindertem Druck abdestilliert. Anschließend wurden die Substanzen im Ölpumpenvakuum ($p < 0.1$ mbar) getrocknet. Proben für die Elementaranalyse wurden an der Hochvakuumpumpe ($p < 10^{-4}$ mbar) oder im Ölpumpenvakuum in einer Trockenpistole in Gegenwart von Kaliumhydroxid, Phosphorpentoxid und Paraffin getrocknet.

Kugelrohrdestillation

Kugelrohrdestillationen wurden mit dem Gerät GRK-51, *Büchi*, durchgeführt. Die Siedetemperaturen beziehen sich auf die Temperatur des Heizmantels.

Siedepunkte (Kp)

Siedepunkte ohne Druckangabe beziehen sich auf Normaldruck. Alle Druckangaben erfolgen in mbar.

Schmelzpunkte (Schmp.)

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli, *Büchi*, bestimmt.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für Dünnschichtchromatographien wurden mit Kieselgel beschichtete Fertigfolien Polygram™ SIL G/UV₂₅₄ (Schichtdicke 0.25 mm) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Gerät der Firma *Konrad Benda* bei 254 nm, durch Einwirken von Jod oder durch Eintauchen in eine 3.5%ige Lösung von Molybdophosphorsäure in Ethanol und anschließende Entwicklung im Heißluftstrom. Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v:v) angegeben.

Säulenchromatographie

Chromatographien wurden an MN-Kieselgel 60, 0.040-0.063 mm/230-400 mesh, von *Macherey-Nagel* durchgeführt. Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v:v) angegeben.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Hochdruckflüssigkeitschromatographien wurden mit einer *Merck* Lichrograph L-6200A Gradienten-Pumpe, einem *Merck* L-4500A Diodenarray Detektor sowie der Software D-6500 DAD System-Manager Revision 1 durchgeführt.

Elementaranalysen (EA)

Diese wurden im mikroanalytischen Labor der chemischen Institute der Universität Heidelberg mit einem *Heraeus* CHN-O-RAPID oder einem *Elementar* vario EL Analysator sowie im Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln mit einem *Elementar* vario EL Analysator durchgeführt.

Spezifische Drehwerte

Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* 241 Polarimeter in einer 1.00 ml-Küvette (Länge: 10 cm) bei der angegebenen Temperatur gemessen. Die Konzentrationen c sind in [g / (100 ml)] angegeben.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit folgenden Geräten erhalten: *Bruker AC 200*, *Bruker AM 300* oder *Bruker DPX 300* mit Aspekt 3000-Computer.

Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden auf das jeweilige Lösungsmittel kalibriert. Die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz angegeben. Alle ^{13}C -NMR-Spektren sind breitbandentkoppelt, die Ermittlung der Multiplizität erfolgte mit Hilfe von DEPT-Spektren. Die Feinstruktur der Signale wird mit s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br. = breit angegeben. Diastereotope Protonen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Ha für das hochfeldverschobene Signal und mit Hb für das tieffeldverschobene Signal gekennzeichnet. Die Zuordnung erfolgte mittels Literatur.^[77]

Die Signalzuordnungen beziehen sich jeweils auf das in der Auswertung kursiv angegebene Atom.

HRMAS-NMR-Spektroskopie

Hochaufgelöste MAS-NMR-Spektren wurden mit dem Gerät *Bruker-Avance DRX 500* mit einem 4.00 mm ^1H -, ^{13}C -, ^{15}N -HRMAS-Kopf und einer Rotationsfrequenz von 5500 Hz gemessen. Die Signalzuordnung erfolgte unter Zuhilfenahme folgender Pulsfolgen der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie: ^1H , ^1H -DQF-COSY (H,H-Korrelation), ^1H , ^{13}C -HMBC (C,H-long-range Experimente) und ^1H , ^{13}C -HSQC (C,H-Korrelation).

Infrarotspektroskopie (IR)

IR-Spektren wurden mit den Geräten IFS 66 von *Bruker* oder FT-IR 1600 bzw. FT-IR 1605 von *Perkin-Elmer* gemessen.

Die Intensität der Banden wurde mit s = sehr, m = mittel und w = wenig intensiv, die Form der Banden gegebenenfalls mit br. = breit angegeben. ν = Valenzschwingung, ν_{sym} = symmetrische Valenzschwingung, ν_{asym} = asymmetrische Valenzschwingung, δ = Deformationsschwingung, γ = out-of-plane-Deformationsschwingung. TentaGelTM-Harze ergaben keine signifikanten IR-Spektren. Die Zuordnung erfolgte mittels Literatur.^[77, 78]

Massenspektrometrie (MS) und hochauflösende Massenspektrometrie (HMRS)

Massenspektren wurden auf folgenden Geräten gemessen: EI (Elektronenstoß-Ionisation): 70 eV; Quadrupol-Massenspektrometer *Finnigan 3200*, Sektorfeld-Massenspektrometer *VG-Micromass ZAB-2F* bzw. im hochaufgelösten Modus mit *Jeol JMS-700*; CI (Chemische Ionisation mit Isobutan): *Finnigan MAT H-SQ 30* bzw. im hochaufgelösten Modus mit *Jeol JMS-700*; FAB (Fast Atom Bombardment): Sektorfeld-Massenspektrometer *Jeol JMS-700*; LDI (Laser Desorption Ionisation): *Bruker Biflex Instrument*. Die Zuordnung erfolgte mittels Literatur.^[77]

Ultraviolettspektroskopie (UV)

Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren erfolgte mit einem *Beckmann* DU 640 Spektrometer und *Hellma* Quarzglasküvetten der Schichtdicke 10 mm.

Scanning UV-Vis-Fluoreszenz-Spektroskopie (SCAN)

Das Scannen von Ansätzen in Mikrotitrationsplatten wurde mit einem *SLT Tecan* SPECTRAFluor mit X-Fluor und Easywin Kinetics Software sowie 405 nm-Absorptionsfilter in MicroWell™-Mikrotitrationsplatten, 96-Well, der Firma *NUNC* durchgeführt.

Mikroskopie

Zum Mikroskopieren wurde ein *Zeiss* Axioplan 2 für Auflicht-Fluoreszenz, Durchlicht-Hellfeld und Phasenkontrast Spektroskopie mit Bildbearbeitungs-Software KS 100 Software Rel. 2.0 (D) und Farbkamera ½" 3-CCD, Typ MC-3250 (D), verwendet.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden mit einem RF-5000-Recording-Spektrofluorophotometer mit 150-W-Xenon-Lampe der Firma *Shimadzu* gemessen.

Schüttelapparatur

Als Schüttler wurde ein KS 125 basic Laborschüttler der Firma *IKA* verwendet.

Peptidsequenzierung (EDMAN)

Peptidsequenzierungen nach Edman wurden mit einem *Applied Biosystems* Procise 494 Protein Sequencer des Hauptlabors der *BASF AG*, Ludwigshafen, durchgeführt. Es wurde von einem Bead sequenziert. Die Detektion der einzelnen Aminosäuren erfolgte anhand der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie-Retentionszeiten der Kupplungsprodukte mit Phenylisothiocyanat nach Abspaltung mit Trifluoressigsäure. Aminosäuren, die nicht eindeutig bestimmt werden konnten, wurden in Klammern gesetzt.

Verwendete Chemikalien und spezielle Glasgeräte

Käufliche Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. *Merrifield*-Harz wurde von der Firma *Bachem* und TentaGel™-Harze wurden von *Rapp* bezogen.

Die Synthese von Peptiden erfolgte bei Raumtemp. in *Schlenk*-Kolben mit Fritte und Absaughahn.

Die bei den Versuchsvorschriften in Klammern aufgeführten Abkürzungen geben die Seitenzahlen im Laborjournal an.

7.2 Generelle analytische Methoden

7.2.1 Quantifizierung der Anknüpfung von Fmoc-geschützten Aminosäuren an festen Trägern

Um die an den Harzen gebundenen Fmoc-Aminosäuren quantifizieren zu können, wurde eine Eichgerade erstellt, die die Konzentration des Fmoc-Piperidin-Adduktes in DMF mit der Extinktion korreliert.

Es wurden 0.1 mmol Fmoc-L-Phenylalanin 10 min mit 10 ml 20% Piperidin in DMF geschüttelt und danach mit DMF auf 100 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung des Fmoc-Piperidin-Adduktes wurde mit DMF weiter verdünnt.

Bis zu einer Konzentration von 0.1 mmol/l ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Extinktion bei 301 nm von der Konzentration. Diese Eichung wurde regelmäßig durchgeführt.

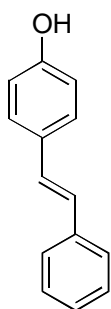
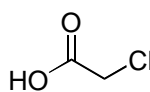
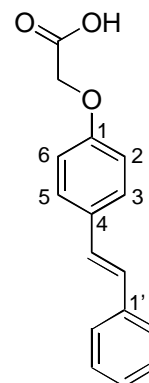
Aus dieser Eichgeraden konnte der molare Extinktionskoeffizient zu $\epsilon = 7560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt werden. Durch die Extinktion der Abspaltungslösung konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten aus der Eichgeraden die jeweilige Beladung des Harzes ermittelt werden.

7.2.2 Detektion von freien Aminofunktionen an polymeren Trägern (*Kaiser-Test*)^[39]

Zunächst wurden 1.00 g Ninhydrin in 10.0 ml Ethanol und 80.0 g Phenol in 20.0 ml Ethanol gelöst. Einige Kügelchen des zu analysierenden Polymers wurden mit jeweils 1.00 ml der beiden Lösungen versetzt und zwei Minuten auf 100 °C erhitzt. Polymerkügelchen mit freien Aminofunktionen färbten sich daraufhin tiefblau, und auch die überstehende Lösung nahm eine blaue Färbung an. Waren keine freien Aminofunktionen am Polymer vorhanden, so blieb das Polymer farblos und die überstehende Lösung gelblich gefärbt.

7.3 Synthese der Substrate für die katalytische asymmetrische Dihydroxylierung an polymeren Trägern

7.3.1 Synthese von (*E*)-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]essigsäure **31** [RAR-I-260]

**44****46****31**

In einem 250 ml Einhalskolben wurden 1.00 g (5.00 mmol, 1.00 eq.) (*E*)-4-Hydroxystilben **44** mit 945 mg (10.0 mmol, 2.00 eq.) Chloressigsäure **46** und 1.12 g (20.0 mmol, 4.00 eq.) KOH in 100 ml Ethanol fünf Stunden unter Rückfluß erhitzt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfiel. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert, in 500 ml Wasser unter Erhitzen gelöst und diese Lösung mit konz. HCl auf pH = 1 eingestellt. Über Nacht kristallisierten aus dieser Lösung bei Raumtemp. 650 mg (2.56 mmol, 51% der Theorie) farblose Kristallnadeln des Produktes **31** aus.

Schmp.: 207 °C (Lit.: 208 °C).^[79]

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3000-2500 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 3019 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2945 [m, $\nu(\text{C-H})$ CH₂]; 1706 [s, $\nu(\text{C=O})_{\text{Säure}}$]; 1610, 1582 [beide s, beide $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1433 [s, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1295 [s, $\delta(\text{OH})$]; 1239 [s, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1180 [s]; 1085 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 970, 831, 800, 758, 693 [alle s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

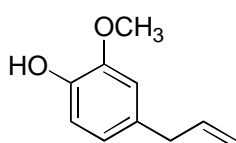
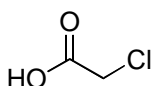
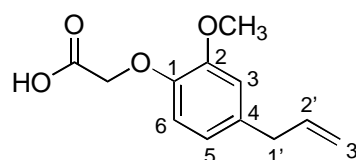
¹H-NMR: (300 MHz, d₆-DMSO) δ = 4.69 (s, 2H, CH₂OPh), 6.91 (d, ³J_{2-H-3-H}; _{6-H-5-H} = 8.8 Hz, 2H, aryl-2,6-H), 7.05-7.30 (m, 3H, 2 olefin. und 1 aryl-H), 7.31-7.40 (m, 2H, aryl-H), 7.50-7.70 (m, 4H, aryl-H), 13.00 (br. s, 1H, COOH, mit D₂O austauschbar).

¹³C-NMR: (75 MHz, d₆-DMSO) δ = 64.52 (t, CH₂OPh), 114.74 (d, aryl-CH-2,6), 126.23 (d, olefin.-CH), 126.43 (d, olefin.-CH), 127.29 (d, aryl-CH), 127.77 (d, aryl-CH), 127.93 (d, aryl-CH), 128.72 (d, aryl-CH), 130.19 (s, aryl-C-4), 137.34 (s, aryl-C-1'), 157.48 (s, aryl-C-1), 170.20 (s, COOH).

CI-MS: m/z (% Int.): 255 (100) [M+1⁺], 196 (40) [C₁₄H₁₂O⁺], 165 (15) [C₁₀H₁₃O₂⁺], 107 (20) [C₇H₇O⁺].

EA: C₁₆H₁₄O₃; M = 254.28 g/mol
ber.: C: 75.57% H: 5.55%
gef.: C: 75.39% H: 5.55%.

7.3.2 Synthese der [2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]essigsäure **33** [RAR-OHL-41]

**45****46****33**

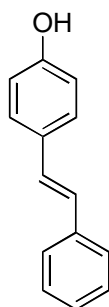
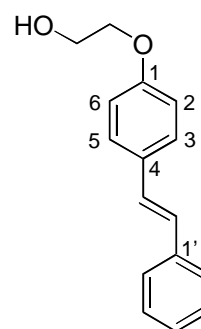
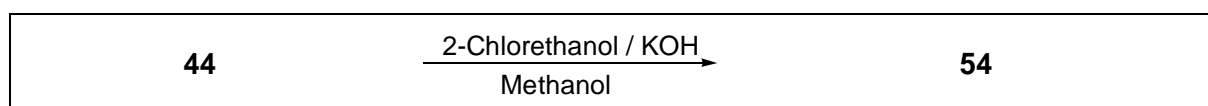
In einem 100 ml Einhalskolben wurden 9.85 g (60.0 mmol, 1.00 eq.) 2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenol (Eugenol) **45**, 5.67 g (60.0 mmol, 1.00 eq.) Chloressigsäure **46** und 5.28 g (132 mmol, 2.20 eq.) Natriumhydroxid in 30.0 ml Wasser gelöst und sechs Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung färbte sich dabei dunkelbraun. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wurde die freie Säure durch Zugabe von konz. Salzsäure bei pH = 1 ausgefällt und abfiltriert. Die Umkristallisation des Rohproduktes aus Wasser ergab 7.13 g (32.1 mmol) farblose Kristallnadeln **33** (53% der Theorie).

Schmp.:	97 °C (Lit.: 96.5-97.5 °C). ^[80]
FT-IR (KBr):	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3000-2500 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 3017 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2955 [m, $\nu(\text{C-H})$ CH ₂]; 1754 [br. s, $\nu(\text{C=O})_{\text{Säure}}$]; 1634, 1593, 1518 [alle s, alle $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1430 [s, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1300 [m, $\delta(\text{OH})$]; 1262 [s, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1151 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 1031 [s]; 912, 812 [beide s, beide $\gamma(\text{C-H})$ aryl].
¹H-NMR:	(300 MHz, d ₆ -DMSO) δ = 3.28 (d, ³ J _{PhCH₂-CH} = 6.6 Hz, 2H, PhCH ₂ CH), 3.74 (s, 3H, OCH ₃), 4.60 (s, 2H, CH ₂ OPh), 4.98-5.11 (m, 2H, olefin.-3'-H), 5.86-6.01 (m, 1H, olefin.-2'-H), 6.65 (dd, ³ J _{5-H-6-H} = 8.1 Hz, ⁴ J _{5-H-3-H} = 1.5 Hz, 1H, aryl-5-H), 6.74-6.82 (m, 2H, aryl-3,6-H), 12.98 (s, 1H, COOH, mit D ₂ O austauschbar).
¹³C-NMR:	(75 MHz, d ₆ -DMSO) δ = 39.02 (t, PhCH ₂ CH), 55.48 (q, OCH ₃), 65.25 (t, CH ₂ OPh), 112.77 (d, aryl-CH-3 oder aryl-CH-6), 113.56 (d, aryl-CH-3 oder aryl-CH-6), 115.50 (t, olefin.-CH ₂ -3'), 120.06 (d, aryl-CH-5), 133.08 (s, aryl-C-4), 137.84 (d, olefin.-CH-2'), 145.52 (s, aryl-C-1 oder aryl-C-2), 148.83 (s, aryl-C-1 oder aryl-C-2), 170.25 (s, COOH).
FAB-MS:	m/z (% Int.): 222.0 (100) [M ⁺], 163.0 (70) [C ₁₀ H ₁₁ O ₂ ⁺], 137.1 (54) [C ₈ H ₉ O ₂ ⁺], 91 (46) [C ₆ H ₃ O ⁺].
EA:	C ₁₂ H ₁₄ O ₄ ; M = 222.24 g/mol ber.: C: 64.85% H: 6.35% gef.: C: 64.70% H: 6.29%.

7.4 Synthese der Triole *rac*-66, *rac*-67 und *rac*-68 sowie des cyclischen Carbonates *rac*-72

7.4.1 Synthese des (*R,R*)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiols 66 und des (*R,R,S,S*)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiols *rac*-66

7.4.1.1 Synthese von (*E*)-2-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]ethanol **54** [RAR-I-293]

**44****54**

In einem 250 ml Einhalskolben wurden 580 mg (2.96 mmol, 1.00 eq.) (*E*)-4-Hydroxystilben **44**, 253 mg (4.44 mmol, 1.50 eq.) KOH und 715 mg (8.88 mmol, 3.00 eq.) 2-Chlorethanol in 100 ml Methanol gelöst und acht Stunden unter Rückfluß erhitzt, worauf sich ein weißer Niederschlag bildete. Nachdem die Reaktionsmischung abgekühlt worden war, wurde am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt. Der so erhaltene farblose Niederschlag wurde über Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Essigester), wodurch 275 mg (1.14 mmol, 39% der Theorie) analysenreines Produkt **54** als farbloses Puder erhalten werden konnten.

Schmp.: 148-149 °C.

DC: $R_f = 0.68$.
Kieselgel, Essigester

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3450-2500 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 3021 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2934 [m, $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1605, 1512 [beide m, $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1447 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1251, 1180 [beide s, beide $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1096, 1052 [beide s, beide $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 966, 924, 815, 693 [alle s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, d_6 -DMSO) $\delta = 3.68$ -3.75 (m, 2H, CH_2OH), 4.01 (m, 2H, CH_2OPh), 4.88 (t, $^3J_{\text{OH-CH}_2} = 5.5$ Hz, 1H, CH_2OH , mit D_2O austauschbar),

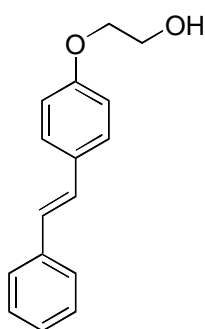
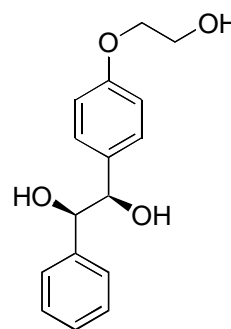
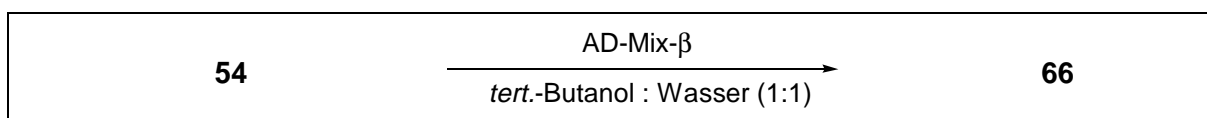
6.94 (d, ${}^3J_{2-H-3-H}; 6-H-5-H = 8.8$ Hz, 2H, aryl-2,6-H), 7.03-7.29 (m, 3H, 2 olefin. und 1 aryl-H), 7.30-7.41 (m, 2H, aryl-H), 7.47-7.58 (m, 4H, aryl-H).

${}^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, d_6 -DMSO) $\delta = 59.62$ (t, CH_2OH), 69.61 (t, CH_2OPh), 114.68 (d, aryl-2,6-CH), 126.12 (d, olefin.-CH), 126.19 (d, olefin.-CH), 127.20 (d, aryl-CH), 127.83 (d, aryl-CH), 128.11 (d, aryl-CH), 128.67 (d, aryl-CH), 129.59 (s, aryl-C-4), 137.42 (s, aryl-C-1'), 158.38 (s, aryl-C-1).

EI-MS: m/z (% Int.): 240 (99) [M^+], 196 (100) [$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}^+$], 165 (40) [$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_2^+$], 152 (30) [$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2^+$], 89 (20) [C_7H_5^+], 45 (28) [$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$].

EA: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2$; M = 240.30 g/mol
ber.: C: 79.97% H: 6.71%
gef.: C: 79.71% H: 6.87%.

7.4.1.2 Synthese von (*R,R*)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiol **66** [RAR-I-288]

**54****66**

252 mg AD-Mix- β (enthält 75.6 mg (0.54 mmol, 3.00 eq.) K_2CO_3 , 178 mg (0.54 mmol, 3.00 eq.) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1.40 mg (1.80 μmol , 1.00 mol-%) $(\text{DHQD})_2\text{PHAL}$ **57** und 0.25 mg (0.72 μmol , 0.40 mol-% Os) $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$) wurden in 4.00 ml *tert.*-Butanol : Wasser (1:1) gelöst. Anschließend wurden 43.3 mg (0.18 mmol, 1.00 eq.) (*E*)-2-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]-ethanol **54** zugegeben und die Reaktionslösung 18 h bei Raumtemp. gerührt. Nachdem die Reaktionsmischung fünfmal mit je 20.0 ml Methylenchlorid extrahiert worden war, wurden die vereinten organischen Fraktionen am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit

und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Laufmittel: Chloroform : Methanol (9:1)).

So wurden 30.0 mg (109 μ mol, 61% der Theorie) des Produktes **66** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 81 °C.

DC: $R_f = 0.23$.
Kieselgel, Chloroform : Methanol (9:1)

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3450-2500 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 3021 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2928 [m, $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1613, 1513 [beide m, beide $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1454 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1388 [s, $\delta(\text{OH})$]; 1249, 1177 [beide s, beide $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1080, 1052 [beide s, beide $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 915, 812, 726, 698 [alle s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.57$ (br. s, 1H, OH, mit D_2O austauschbar), 2.02 (br. s, 1H, OH, mit D_2O austauschbar), 2.85 (br. s, 1H, OH, mit D_2O austauschbar), 3.90-3.94 (m, 2H, CH_2OH), 3.99-4.02 (m, 2H, CH_2OPh), 4.65 (br. s, 2H, CHOH), 6.75 (d, $^3J_{3\text{-H-2-H}; 5\text{-H-6-H}} = 8.7$ Hz, 2H, aryl-3,5-H), 7.02 (d, $^3J_{2\text{-H-3-H}; 6\text{-H-5-H}} = 8.7$ Hz, 2H, aryl-2,6-H), 7.08-7.11 (m, 2H, aryl-H), 7.18-7.23 (m, 3H, aryl-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 61.32$ (t, CH_2OH), 69.02 (t, CH_2OPh), 78.61 (d, CHOH), 79.10 (d, CHOH), 114.08 (d, aryl-CH-3,5), 126.95 (d, aryl-CH), 127.80 (d, aryl-CH), 128.05 (d, aryl-CH), 128.20 (d, aryl-CH), 132.47 (s, aryl-C-1), 139.92 (s, aryl-C-1'), 158.17 (s, aryl-C-4).

CI-MS: m/z (% Int.): 274 (1) [M^+], 257 (100) [$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3^+$], 167 (70) [$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3^+$].

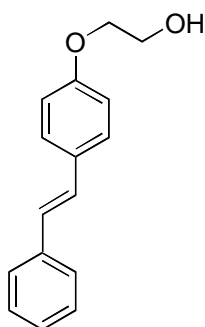
EA: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$; $M = 274.31$ g/mol
ber.: C: 70.06% H: 6.61%
gef.: C: 69.80% H: 6.55%.

$[\alpha]_D^{20}$: +108.5° ($c = 0.254$, CHCl_3).

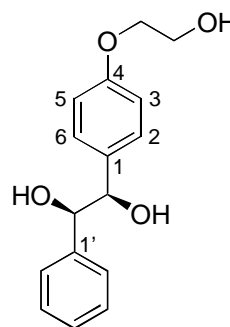
HPLC: $\tau_R = 21.0$ min.

(Chiralcel™ OD-H, Daicel, Hexan : 2-Propanol (80:20), 1.00 ml/min)

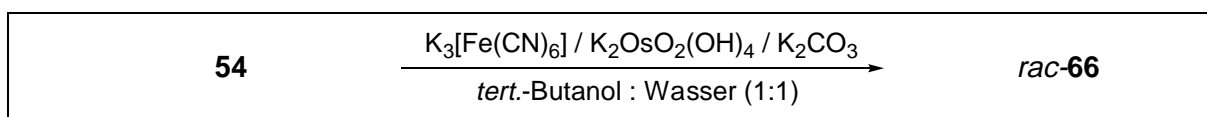
7.4.1.3 Synthese von (*R,R*; *S,S*)-1-[4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,2-ethandiol *rac*-66 [RAR-I-299]



54



66



43.3 mg (0.18 mmol, 1.00 eq.) (*E*)-2-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]ethanol **54** wurden zusammen mit 75.6 mg (0.54 mmol, 3.00 eq.) K₂CO₃, 178 mg (0.54 mmol, 3.00 eq.) K₃[Fe(CN)₆] und 0.25 mg (0.72 μmol, 0.40 mol-% Os) K₂OsO₂(OH)₄ in 4.00 ml *tert*-Butanol : Wasser (1:1) 18 h bei Raumtemp. in einem 10 ml Einhalskolben gerührt. Danach wurden 270 mg (2.14 mmol) Natriumsulfit zugegeben und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Die Aufarbeitung und die chromatographische Reinigung erfolgten analog der Vorschrift für **66** und ergaben 27.3 mg (99.0 μmol, 55% der Theorie) *rac*-**66** als farblosen Feststoff.

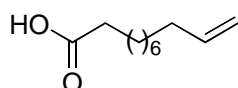
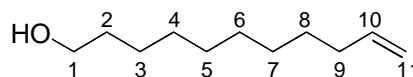
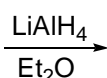
Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen von **66** überein.

Schmp.: 83 °C.

DC: R_f = 0.23.
Kieselgel, Chloroform : Methanol (9:1)

7.4.2 Synthese des (*R,S*)-1,2,11-Undecantriols *rac*-67

7.4.2.1 Synthese von 10-Undecen-1-ol **55** [RAR-I-100]^[81]

**32****55****32****55**

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter wurden unter Stickstoff 3.42 g (90.0 mmol, 1.50 eq.) Lithiumaluminiumhydrid in 150 ml abs. Diethylether suspendiert. Diese Suspension wurde auf 0 °C abgekühlt und anschließend 11.06 g (60.0 mmol, 1.00 eq.) in 20.0 ml abs. Diethylether gelöste 10-Undecensäure **32** unter Rühren langsam zugetropft. Nach der Zugabe der 10-Undecensäure wurde die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch 16 h gerührt. Nun wurde unter starkem Rühren Eis in den Reaktionsansatz gegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Durch Zugabe von 10% H₂SO₄ wurde der weiße Niederschlag aufgelöst, bevor im Scheidetrichter die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase dreimal mit je 50.0 ml Diethylether extrahiert wurde. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Destillation (0.35 mbar, 100 °C, Lit.^[81]: 8.08 mbar, 114 °C) des so erhaltenen Rohproduktes konnten 7.80 g (45.8 mmol, 76% der Theorie, Lit.^[81]: 88%) analytisch reines 10-Undecen-1-ol **55** als farblose Flüssigkeit erhalten werden.

FT-IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3450-2500 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 2926, 2855 [beide s, beide $\nu(\text{C-H})$ CH₂]; 1435 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1371 [m, $\delta(\text{OH})$]; 1056 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 994 (m), 909 (m), 722 (w).

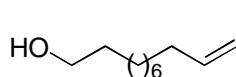
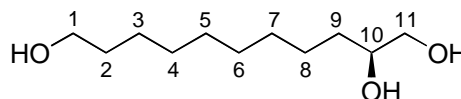
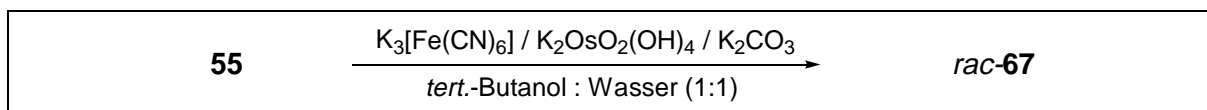
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 1.10-1.45 (br. m, 12H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H), 1.46-1.52 (m, 2H, 2-H), 1.72-1.95 (br. s, 1H, CH₂OH, mit D₂O austauschbar), 1.97-2.09 (m, 2H, 9-H), 3.63 (t, ³J_{CH₂-CH₂} = 6.6 Hz, 2H, 1-H), 4.87-5.03 (m, 2H, olefin.-11-H), 5.73-5.88 (m, 1H, olefin.-10-H).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ = 25.73, 28.93, 29.11, 29.40, 29.41, 29.54, 32.79, 33.79 (alle t, alle CH₂CH₂CH₂), 63.07 (t, C-1), 114.10 (t, olefin.-C-11), 139.21 (d, olefin.-C-10).

FAB-MS: m/z (% Int.): 151.9 (5.2) [M-H₂O⁺], 109.9 (95) [C₈H₁₄⁺], 108.9 (95) [C₈H₁₃⁺], 54.9 (85) [C₃H₃O⁺], 40.9 (100) [C₃H₅⁺].

EA: C₁₁H₂₂O; M = 170.29 g/mol
 ber.: C: 77.58% H: 13.02%
 gef.: C: 77.44% H: 13.01%.

7.4.2.2 Synthese von (*R,S*)-1,2,11-Undecantriol *rac*-**67** [RAR-I-114]

**55****67**

19.56 g (60.0 mmol, 3.00 eq.) K₃[Fe(CN)₆], 8.22 g (60.0 mmol, 3.00 eq.) K₂CO₃ und 29.5 mg (80.2 μmol, 0.40 mol-% Os) K₂OsO₂(OH)₄ wurden zusammen mit 3.40 g (20.0 mmol, 1.00 eq.) 10-Undecen-1-ol **55** in 200 ml *tert.*-Butanol : Wasser (1:1) in einem 500 ml Einhalskolben gelöst. Danach wurde die Reaktionsmischung einen Tag bei Raumtemp. gerührt, bevor 30.0 g Na₂SO₃ zugegeben und nochmals eine Stunde gerührt wurde. Die Reaktionsmischung wurde viermal mit je 200 ml Methylenchlorid extrahiert, die organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde über Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Chloroform : Methanol (9:1)), was 3.19 g (15.6 mmol, 78% der Theorie) des Produktes *rac*-**67** als farblosen Feststoff ergab.

Schmp.: 75 °C (Lit.: 74-75 °C).^[82]

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3290 [br. s, ν(O-H)]; 2917, 2850 [beide s, ν(C-H) aliphatic.]; 1471 [s, δ(CH₂)]; 1332 [m, δ(O-H)]; 1086, 1065 [beide s, beide ν_{sym}(C-O)]; 1009 [s]; 720 [m, δ_{rocking}(CH₂)].

¹H-NMR: (300 MHz, d₆-DMSO) δ = 1.22-1.48 (br. m, 16H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 3.16-3.28 (m, 2H, 1-H), 3.33-3.40 (m, 3H, 10-H, 11-H), 4.31-4.34 (m, 2H, CH₂OH, CHOH, mit D₂O austauschbar), 4.41 (t, ³J_{OH-CH₂} = 5.6 Hz, 1H, CH₂OH, mit D₂O austauschbar).

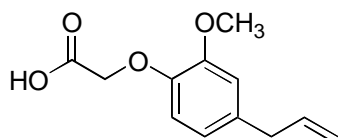
$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CD_3OD) δ = 26.68, 26.93, 30.57, 30.65, 30.68, 30.82, 33.66, 34.46 (alle t, alle $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 63.02 (t, C-1), 67.42 (t, C-11), 73.28 (d, C-10).

FAB-MS: m/z (% Int.): 205.1 (0.1) [$\text{M}+1^+$], 173.1 (7) [$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_2^+$], 137.1 (31) [$\text{C}_{10}\text{H}_{17}^+$], 95.1 (100) [$\text{C}_7\text{H}_{11}^+$], 81.1 (99) [C_6H_9^+], 55.0 (78) [C_4H_7^+], 41 (62) [C_3H_5^+].

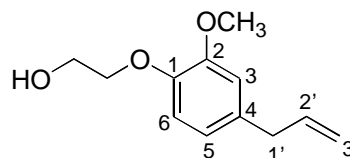
EA: $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_3$; M = 204.31 g/mol
ber.: C: 64.67% H: 11.84%
gef.: C: 64.53% H: 11.81%.

7.4.3 Synthese des (*R,S*)-3-[4-(2-Hydroxyethoxy)-3-methoxyphenyl]-1,2-propandiols *rac*-68

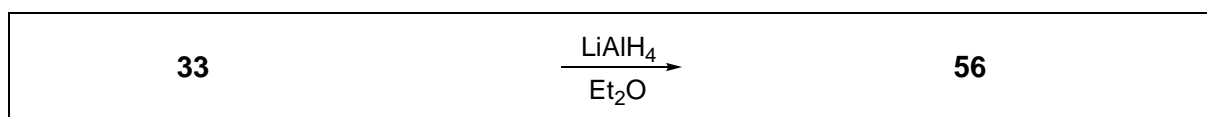
7.4.3.1 Synthese von 2-[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]ethanol 56 [RAR-I-169]



33



56



In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter wurden unter Stickstoff 0.51 g (13.5 mmol, 1.50 eq.) Lithiumaluminiumhydrid in 50.0 ml abs. Diethylether suspendiert und unter Eiskühlung eine Lösung von 2.00 g (9.00 mmol, 1.00 eq.) [2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]essigsäure **33** in 80.0 ml abs. Diethylether vorsichtig zugetropft. Danach wurde 16 h bei Raumtemp. gerührt.

Zur Aufarbeitung wurde unter Eiskühlung mit Eiswasser hydrolysiert und danach soviel 10%ige Schwefelsäure zugegeben, bis sich der zwischenzeitlich gebildete weiße Niederschlag aufgelöst hatte. Die Etherphase wurde abgetrennt, und die wäßrige Phase wurde dreimal mit je 50.0 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden

über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan : Methanol (9:1) über Kieselgel chromatographiert, was 870 mg (4.18 mmol, 46% der Theorie) eines farblosen Öles ergab, das sich nach Kühlung auf 4 °C verfestigte.

Schmp.: 31 °C (Lit.: 33-34 °C).^[83]

DC: $R_f = 0.72$.
Kieselgel, Dichlormethan : Methanol (9:1)

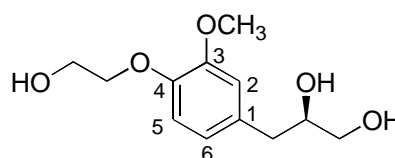
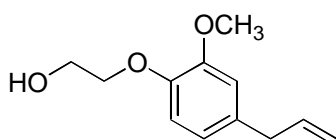
FT-IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3486 [s, $\nu(\text{O-H})$]; 3075, 3001 [beide s, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2935, 2873 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ CH₂]; 1636 [m], 1591 [m], 1514 [s, alle $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1456 [s]; 1420 [s, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1335 [m, $\delta(\text{OH})$]; 1261, 1232 [beide s, beide $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1140, 1034 [beide s, beide $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 914 [s], 806 [m, beide $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

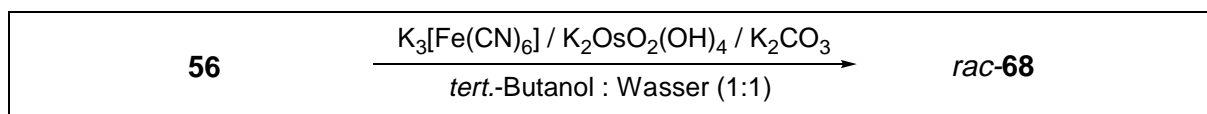
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 2.92$ (br. s, 1H, CH₂OH, mit D₂O austauschbar), 3.32 (d, $^3J_{\text{PhCH}_2\text{-CH}} = 6.7$ Hz, 2H, PhCH₂CH), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.88-3.96 (m, 2H, CH₂OH), 4.08 (t, $^3J_{\text{CH}_2\text{-CH}_2} = 4.1$ Hz, 2H, CH₂OPh), 5.05-5.14 (m, 2H, olefin.-3'-H), 5.89-6.04 (m, 1H, olefin.-2'-H), 6.71-6.75 (m, 2H, aryl-H), 6.85-6.89 (m, 1H, aryl-H).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) $\delta = 39.61$ (t, PhCH₂CH), 55.62 (q, OCH₃), 61.09 (t, CH₂OH), 71.71 (t, CH₂OPh), 112.26 (d, aryl-CH-3 oder aryl-CH-6), 115.43 (d, aryl-CH-3 oder aryl-CH-6), 115.50 (t, olefin.-CH₂-3'), 120.56 (d, aryl-CH-5), 134.00 (s, aryl-C-4), 137.26 (d, olefin.-CH-2'), 146.18 (s, aryl-C-1 oder aryl-C-2), 149.79 (s, aryl-C-1 oder aryl-C-2).

EI-HRMS m/z (% Int., Summenformel, Δ mmul): 208.1099 (100, C₁₂H₁₆O₃, 1.1) [M⁺], 164.0222 (74, C₁₂H₄O, 4.0).

7.4.3.2 Synthese von (*R,S*)-3-[4-(2-Hydroxyethoxy)-3-methoxyphenyl]-1,2-propandiol *rac*-68 [RAR-I-173]



56**68**

In einem 50 ml Einhalskolben wurden 0.23 g (1.10 mmol, 1.00 eq.) 2-[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]ethanol **56** in 12.0 ml *tert.*-Butanol : Wasser (1:1) gelöst und 1.10 g (3.30 mmol, 3.00 eq.) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0.46 g (3.30 mmol, 3.00 eq.) K_2CO_3 und 0.81 mg (2.20 μmol , 0.20 mol-% Os) $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ hinzugefügt. Es wurde ein Tag bei Raumtemp. gerührt. Danach wurden 1.68 g (13.3 mmol) Natriumsulfit zugegeben und nochmals eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nun wurde die Reaktionslösung fünfmal mit je 50.0 ml Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der so erhaltene Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Chloroform : Methanol (9:1)), was 200 mg (0.83 mmol, 75% der Theorie) des Produktes *rac*-**68** als farblosen Feststoff ergab.

Schmp.: 78 °C.

DC: $R_f = 0.21$.
Kieselgel, Chloroform : Methanol (9:1)

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3530, 3372 [beide s, beide $\nu(\text{O-H})$]; 3018 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2928, 2879, 2832 [alle m, alle $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1636 [w], 1592 [m], 1515 [s, alle $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1464 [s]; 1420 [s, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1333 [m, $\delta(\text{OH})$]; 1260, 1229 [beide s; beide $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1139, 1103 [beide s, beide $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 909 [s], 816, 640, 564 [alle m, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

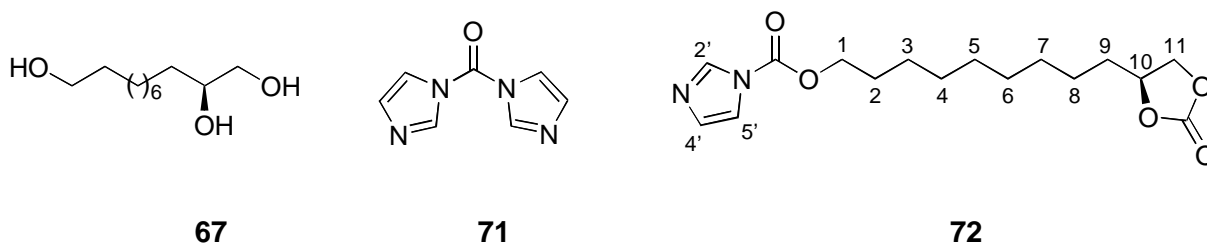
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, d_6 -DMSO) $\delta = 2.45$ (dd, $^2J_{\text{PhCH}_a\text{-H}_b} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{PhCH}_a\text{-OCH}} = 7.6$ Hz, 1H, PhCH_aH_b), 2.67 (dd, $^2J_{\text{PhCH}_b\text{-H}_a} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{PhCH}_b\text{-OCH}} = 5.5$ Hz, 1H, PhCH_bH_a), 3.24-3.28 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.55-3.65 (m, 1H, CHOH), 3.65-3.70 (m, 2H, OCHCH_2OH), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (t, $^3J_{\text{CH}_2\text{-CH}_2} = 4.8$ Hz, 2H, CH_2OPh), 4.48-4.53 (m, 2H, CHOH , CH_2OH , mit D_2O austauschbar), 4.80 (t, $^3J_{\text{OH-CH}_2} = 5.5$ Hz, 1H, CH_2OH , mit D_2O austauschbar), 6.68 (dd, $^3J_{\text{H-5-H}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{6-H-2-H}} = 1.9$ Hz, 1H, aryl-6-H), 6.80-6.84 (m, 2H, aryl-2-H und aryl-5-H).

¹³C-NMR: (75 MHz, d₆-DMSO) δ = 39.28 (t, PhCH₂), 55.42 (q, OCH₃), 59.71 (t, CH₂CH₂OH), 65.33 (t, OCHCH₂OH), 70.28 (t, CH₂OPh), 72.64 (d, CHOH), 113.17 (d, aryl-CH-2 oder aryl-CH-5), 113.48 (d, aryl-CH-2 oder aryl-CH-5), 121.22 (d, aryl-CH-6), 132.33 (s, aryl-C-1), 146.31 (s, aryl-C-3 oder aryl-C-4), 148.62 (s, aryl-C-3 oder aryl-C-4).

FAB-MS: m/z (% Int.): 242 (96.7) [M⁺], 211 (2.7) [C₁₁H₁₅O₄⁺], 198 (3.7) [C₁₀H₁₄O₄⁺], 181 (53.4) [C₁₀H₁₃O₃⁺], 167 (3.3) [C₉H₁₁O₃⁺], 137 (100.0) [C₈H₉O₂⁺], 107 (3.5) [C₇H₇O⁺], 77 (3.1) [C₆H₅⁺], 57 (3.8) [C₃H₅O⁺], 45 (8.8) [C₂H₅O⁺], 31 (34.3) [CH₃O⁺].

EA: C₁₂H₁₈O₅; M = 242.27 g/mol
ber.: C: 59.49% H: 7.49%
gef.: C: 59.41% H: 7.50%.

7.4.4 Synthese des (R,S)-[9-(2-Oxo-1,3-dioxolan-4-yl)nonyl]-1H-imidazol-1-carboxylats *rac-72* [RAR-I-199]



100 mg (0.49 mmol, 1.00 eq.) (R,S)-1,2,11-Undecantriol *rac-67* wurden in 20.0 ml abs. Methylchlorid zusammen mit 160 mg (0.98 mmol, 2.00 eq.) N,N'-Carbonyldiimidazol **71** fünf Stunden bei Raumtemp. in einem 50 ml Einhalskolben gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung zweimal mit je 10.0 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Laufmittel: Chloroform : Methanol (9:1)) gereinigt, was 156 mg (0.48 mmol, 98% der Theorie) des cyclischen Carbonates *rac-72* als farbloses Öl ergab.

FT-IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3048 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2928, 2856 [beide m, beide $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1798, 1761 [beide s, beide $\nu(\text{C=O})$]; 1471 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1405 (m); 1376 (m); 1318 (m); 1291 (m); 1241, 1174 [beide s, beide $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1061 (s), 1003 [beide s, beide $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 772 (m), 650 (m).

DC: $R_f = 0.75$.
Kieselgel, Chloroform : Methanol (9:1)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.20$ - 1.56 (br. s, 12 H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H), 1.60 - 1.90 (br. s, 4H, 2-H, 9-H), 4.02 (dd, $^2J_{11\text{-Ha-11-Hb}} = 8.3$ Hz, $^3J_{11\text{-Ha-10-H}} = 7.2$ Hz, 1H, 11- H_a), 4.37 (t, $^3J_{1\text{-H-2-H}} = 6.7$ Hz, 2H, 1-H), 4.48 (dd, $^2J_{11\text{-Hb-11-Ha}} = 8.3$ Hz, $^3J_{11\text{-Hb-10-H}} = 7.8$ Hz, 1H, 11- H_b), 4.62-4.71 (m, 1H, 10-H), 7.04 (s, 1H, Imidazol-4'-H), 7.39 (s, 1H, Imidazol-5'-H), 8.10 (s, 1H, Imidazol-2'-H).

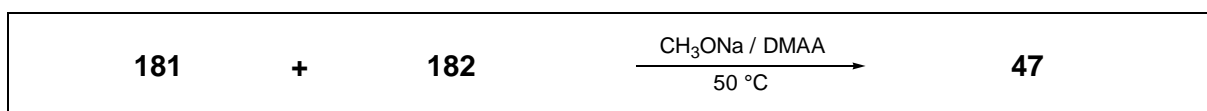
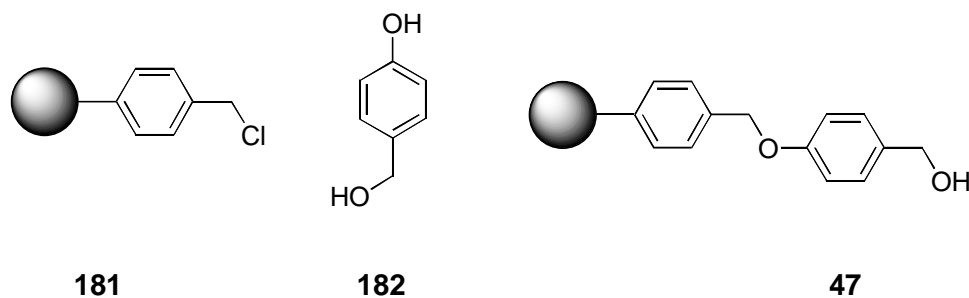
$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 24.30$, 25.60, 28.37, 28.99, 29.02, 29.16, 29.17, 33.82 (alle t, alle $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 68.22, 69.19 (beide t, beide CH_2OC), 76.95 (d, C-10), 116.87 (d, Imidazol-C-4'), 130.38 (d, Imidazol-C-5'), 136.84 (d, Imidazol-C-2'), 148.53 (s, C=O), 154.82 (s, C=O).

CI-MS: m/z (% Int.): 325 (100) [$\text{M}+1^+$].

EA: $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$; $M = 324.37$ g/mol
ber.: C: 59.24% H: 7.46% N: 8.64%
gef.: C: 59.16% H: 7.34% N: 8.57%.

7.5 Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung an fester Phase

7.5.1 Darstellung des [4-(Hydroxymethyl)phenoxy]methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) (*Wang*-Harz) **47** [RAR-I-52]^[84]



5.00 g (10.0 mmol Cl, 1.00 eq.) *Merrifield*-Harz **181** wurden in einem temperierbaren 250 ml Kolben unter Stickstoff in 70.0 ml abs. Dimethylacetamid (DMAA) suspendiert. Diese Suspension wurde bei 50 °C 30 min geschüttelt, bevor 1.86 g (15.0 mmol, 1.50 eq.) 4-Hydroxybenzylalkohol **182** und 0.81 g (15.0 mmol, 1.50 eq.) Natriummethanolat zugegeben wurden. Nun wurde drei Stunden bei 50 °C geschüttelt, bevor nochmals 1.86 g (15.0 mmol, 1.50 eq.) 4-Hydroxybenzylalkohol **182** und 0.81 g (15.0 mmol, 1.50 eq.) Natriummethanolat zugegeben wurden. Nach weiteren 19 h Schütteln bei 50 °C wurde das Produkt-Harz **47** abfiltriert und viermal mit je 50.0 ml Dioxan, Dioxan : Wasser (1:1), Dioxan und Methanol gewaschen. Die Trocknung im Ölpumpenvakuum ergab 5.33 g farbloses Produkt **47**.

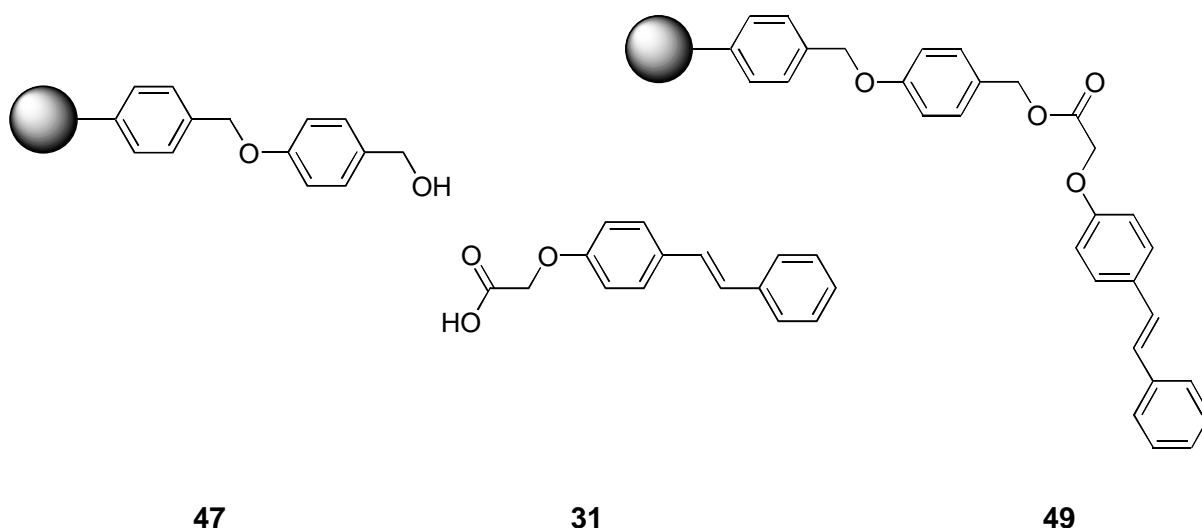
Um die vorhandenen Hydroxygruppen am *Wang*-Harz **47** quantifizieren zu können, wurden 20.0 mg des Produkt-Harzes **47** (maximal 0.04 mmol OH-Gruppen) mit 29.7 mg (0.10 mmol, 2.50 eq.) FmocGlycin, 20.6 mg (0.10 mmol, 2.50 eq.) N,N'-Diisopropylcarbodiimid und 1.00 mg 4-Dimethylaminopyridin drei Stunden bei Raumtemp. in abs. DMF umgesetzt. Danach wurde das Harz abfiltriert und anschließend dreimal mit 10 ml DMF gewaschen.

Das mit FmocGlycin beladene Harz wurde dreimal mit 5.00 ml 20%igem Piperidin in abs. DMF 10 min lang behandelt und viermal mit 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Aus der Extinktion der Abspaltungslösung konnte die vorhandene Fmoc-Stoffmenge am Polymer zu 22.2 µmol ermittelt werden. Damit ergab sich eine Funktionalisierung des *Wang*-Harzes **47** mit Hydroxyfunktionen zu 1.11 mmol/g.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3421 [br. s, $\nu(\text{O-H})$]; 3108, 3024 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2923, 2853 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1602, 1582, 1490 [alle m, $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1449 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1214 [m, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1179, 1115 [beide m]; 1000 [m, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 904 [m]; 838 [s], 754 [m], 696 [s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

7.5.2 Anknüpfungen der Olefine an die festen Träger

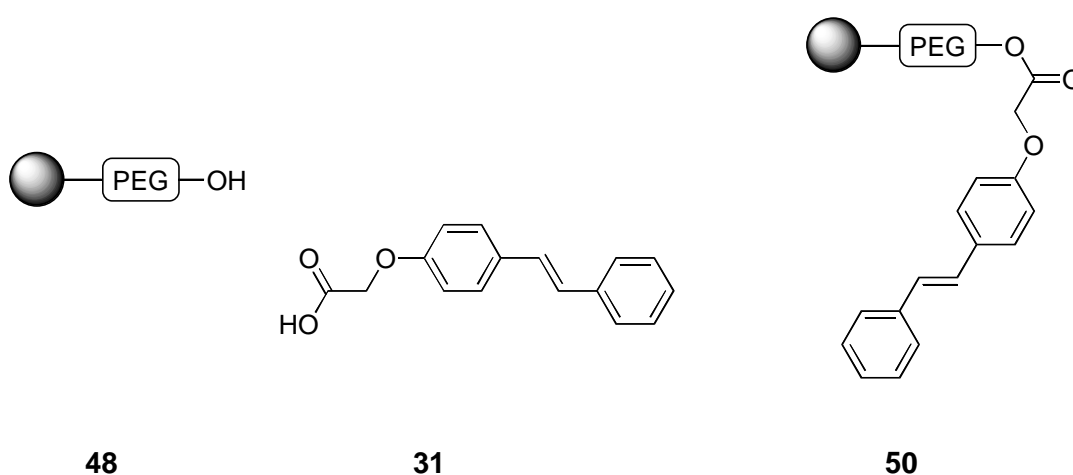
7.5.2.1 Synthese des (*E*)-[4-[[[2-Phenylethenyl]phenoxy]acetyl]oxy-methyl]phenoxy]methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) **49** [RAR-I-263]



1.28 g (1.42 mmol OH-Gruppen, 1.00 eq.) *Wang*-Harz **47** wurden in einem 100 ml Einhalskolben unter Stickstoff in 50.0 ml abs. DMF suspendiert. Hierauf wurden bei Raumtemp. 407 mg (1.60 mmol, 1.13 eq.) (*E*)-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]essigsäure **31**, 584 g (2.84 mmol, 2.00 eq.) DCC und 10.0 mg DMAP zugegeben, worauf sich die Reaktionsmischung kurze Zeit später trübte. Nachdem diese über Nacht bei Raumtemp. geschüttelt worden war, wurde das Produkt abfiltriert und mehrmals mit je 50 ml Methylenchlorid, Dioxan, THF, THF : Wasser (1:1), Wasser, Methanol und Ether gewaschen. Nach Trocknung an der Ölpumpe wurden 1.42 g eines fast farblosen Pulvers **49** erhalten.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3022 [m, ν (C-H) aryl]; 2911, 2888 [beide m, ν (C-H) CH₂]; 1740 [s, ν (C=O)]; 1648, 1509 [beide m, beide ν (C=C) aryl]; 1450 [m, δ (CH₂)]; 1222 [m], 1165 [s, beide ν_{asym} (C-O)]; 1061, 1011 [beide m, beide ν_{sym} (C-O)]; 815 [m], 751 [m], 691 [s, alle γ (C-H) aryl].

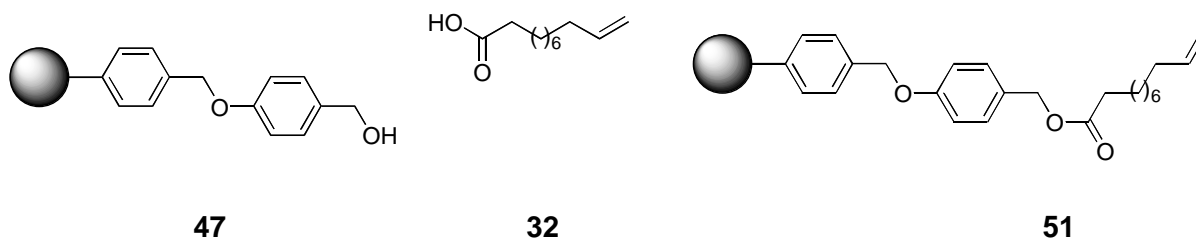
7.5.2.2 Synthese des an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisierten (*E*)-*O*-[[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]-acetyl]oligoethylenglycols 50 [RAR-I-264]



In einem 100 ml Einhalskolben wurden unter Stickstoff 1.50 g (0.45 mmol OH-Gruppen, 1.00 eq.) Hydroxy-TentaGel™ **48** in 50.0 ml abs. DMF suspendiert und anschließend bei Raumtemp. mit 173 mg (0.68 mmol, 1.50 eq.) (*E*)-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]essigsäure **31**, 280 mg (1.35 mmol, 3.00 eq.) DCC und 10.0 mg DMAP versetzt. Nach kurzer Zeit trübte sich die Reaktionsmischung. Sie wurde nun über Nacht bei Raumtemp. geschüttelt, dann wurde das Produkt abfiltriert und mehrmals mit je 50 ml Methylenchlorid, Dioxan, THF, THF : Wasser (1:1), Wasser, Methanol und Ether gewaschen. Die Trocknung an der Ölpumpe ergab 1.54 g eines farblosen Pulvers **50**.

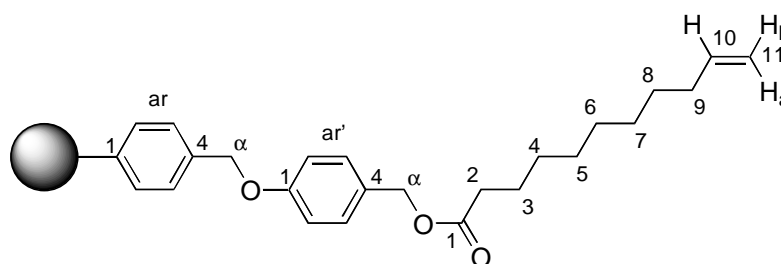
Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

7.5.2.3 Synthese des [4-[(1-Oxo-10-undecenyl)oxy]methyl]phenoxy]-methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) **51** [RAR-I-97]



4.00 g (4.44 mmol OH-Gruppen, 1.00 eq.) *Wang*-Harz **47** wurden in einem 250 ml Einhalskolben unter Stickstoff in 100 ml abs. CH_2Cl_2 suspendiert und anschließend bei Raumtemp. mit 1.63 g (8.88 mmol, 2.00 eq.) 10-Undecensäure **32**, 2.74 g (13.3 mmol, 3.00 eq.) DCC und 50.0 mg DMAP versetzt. Nach kurzer Zeit trübte sich die Reaktionsmischung. Nachdem diese über Nacht bei Raumtemp. geschüttelt worden war, wurde das Produkt abfiltriert und mehrmals mit je 50 ml Methylchlorid, Dioxan, THF, THF : Wasser (1:1), Wasser, Methanol und Ether gewaschen. Die Trocknung an der Ölpumpe ergab 4.43 g eines fast farblosen Pulvers **51**.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3108, 3024 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2923, 2853 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1734 [s, $\nu(\text{C=O})$]; 1611, 1582, 1512 [alle m, $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1449 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1223 [m, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1179, 1115 [beide m]; 1000 [m, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 904 [m]; 838 [s], 754 [m], 696 [s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2 , 5500 Hz Rotationsfrequenz) δ = 1.29 (8H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 1.37 (2H, 8-H), 1.60 (2H, 3-H), 2.04 (2H, 9-H), 2.30

(2H, 2-H), 4.91 (1H, 11-H_b), 4.94 (2H, ar- α -H), 4.97 (1H, 11-H_a), 5.02 (2H, ar'- α -H), 5.81 (1H, 10-H), 6.57 (sehr breit, 2H, ar-2,6-H), 6.94 (2H, ar'-2,6-H), 7.05 (sehr breit, 2H, ar-3,5-H), 7.27 (2H, ar'-3,5-H).

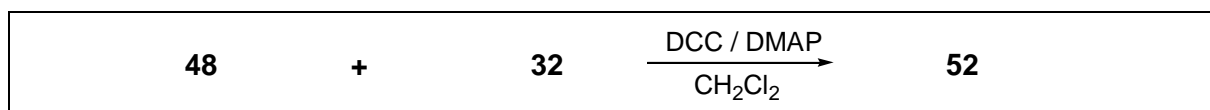
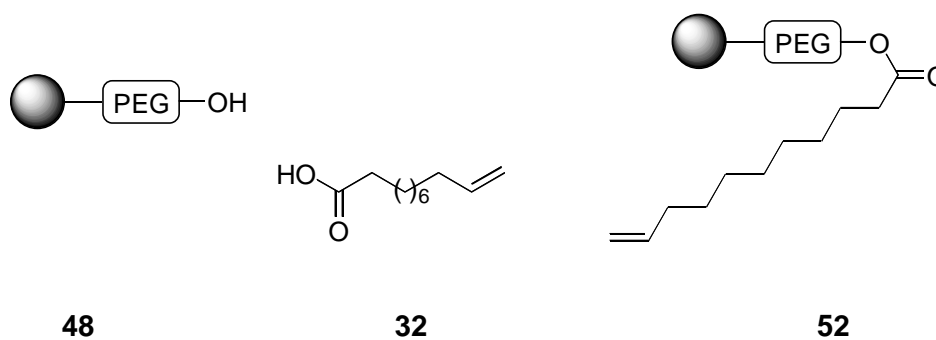
Die Feinstruktur der Signale kann aufgrund der Linienverbreiterung nicht angegeben werden. Die Zuordnung erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (^1H , ^1H -DQF-COSY, ^1H , ^{13}C -HMBC, ^1H , ^{13}C -HSQC).

^{13}C -HRMAS-NMR: (500 MHz, CD_2Cl_2 , 5500 Hz Rotationsfrequenz) δ = 25.4 (t, C-3), 29.3 (t, C-8), 29.5 (t, C-4), 29.5 (t, C-5), 29.6 (t, C-6), 29.7 (t, C-7), 34.2 (t, C-9), 34.7 (t, C-2), 66.1 (t, C-ar'- α), 70.3 (t, C-ar- α), 114.4 (t, C-11), 115.1 (d, C-ar'-2,6), 128.1 (d, C-ar-3,5), 129.1 (s, C-ar'-4), 130.3 (d, C-ar'-3,5), 134.6 (s, C-ar-4), 139.6 (d, C-10), 145.5 (s, C-ar-1), 159.3 (s, C-ar'-1), 173.8 (s, C-1).

Die Signale für C-ar-2,6 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

Die Zuordnung erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (^1H , ^{13}C -HMBC, ^1H , ^{13}C -HSQC).

7.5.2.4 Synthese des an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisierten O-(1-Oxo-10-undecenyl)oligoethylen-glycols **52** [RAR-I-249]

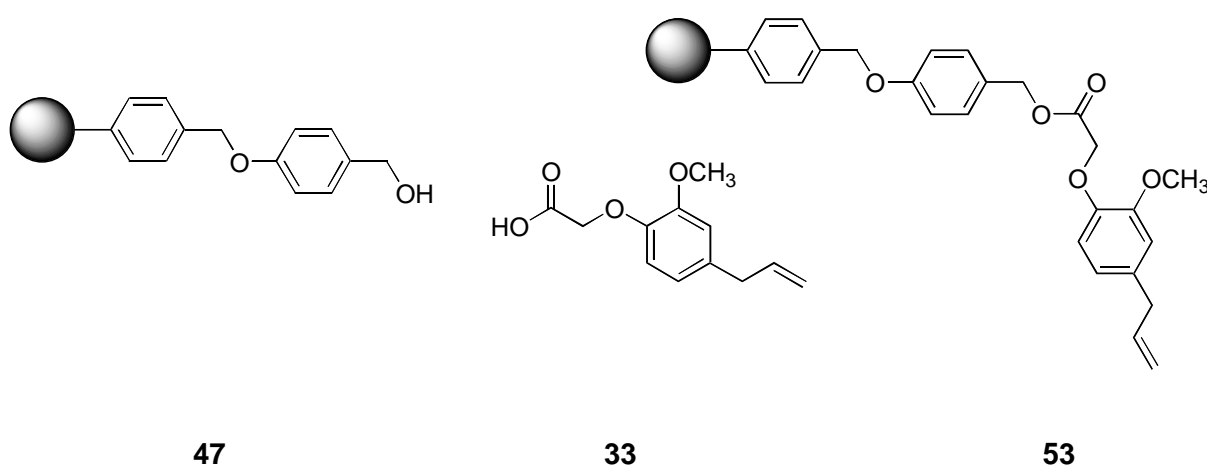


1.50 g (0.45 mmol OH-Gruppen, 1.00 eq.) Hydroxy-TentaGel™ **48** wurden in einem 100 ml Einhalskolben unter Stickstoff in 50.0 ml abs. CH_2Cl_2 suspendiert und anschließend bei Raumtemp. mit 165 mg (0.90 mmol, 2.00 eq.) 10-Undecensäure **32**, 280 mg (1.35 mmol, 3.00 eq.) DCC und 10.0 mg DMAP versetzt. Nach kurzer Zeit trübte sich die Reaktionsmischung. Diese wurde über Nacht bei Raumtemp. geschüttelt, das Produkt abfiltriert und

mehrmals mit je 50 ml Methylenchlorid, Dioxan, THF, THF : Wasser (1:1), Wasser, Methanol und Ether gewaschen. Die Trocknung an der Ölpumpe ergab 1.53 g eines farblosen Pulvers **52**.

Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

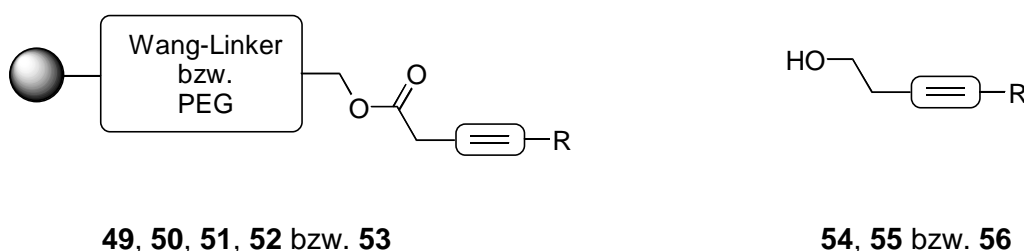
7.5.2.5 Synthese des [4-[[[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]acetyl]oxy]methyl]phenoxy]methylierten Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzols) (99:1) **53** [RAR-I-164]



In einem 250 ml Einhalskolben wurden 4.00 g (4.44 mmol OH-Gruppen, 1.00 eq.) Wang-Harz **47** unter Stickstoff in 100 ml abs. CH₂Cl₂ suspendiert und dann bei Raumtemp. mit 1.97 g (8.88 mmol, 2.00 eq.) [2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]essigsäure **33**, 2.73 g (13.3 mmol, 3.00 eq.) DCC und 50.0 mg DMAP versetzt. Kurze Zeit später trübte sich die Reaktionsmischung. Nachdem diese über Nacht bei Raumtemp. geschüttelt worden war, wurde das Produkt abfiltriert und mehrmals mit je 50 ml Methylenchlorid, Dioxan, THF, THF : Wasser (1:1), Wasser, Methanol und Ether gewaschen. Die Trocknung an der Ölpumpe ergab 4.88 g eines fast farblosen Pulvers **53**.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3421 [br. s, ν(O-H)]; 3108, 3020 [beide m, ν(C-H) aryl]; 2920, 2853 [beide m, ν(C-H) CH₂]; 1733 [s, ν(C=O)]; 1610, 1506 [beide m, beide ν(C=C) aryl]; 1450 [m, δ(CH₂)]; 1218 [m, ν_{asym}(C-O)]; 1170, 1115 [beide m]; 1015 [m, ν_{sym}(C-O)]; 906 [m]; 818 [s], 750 [m], 696 [s, alle γ(C-H) aryl].

7.5.2.6 Quantifizierung der immobilisierten Alkene **31**, **32** und **33** an den polymeren Trägern **49**, **50**, **51**, **52** und **53** [RAR-I-98]



49, 50, 51, 52 bzw. 53

DIBAL / Toluol

54, 55 bzw. 56

Zur Quantifizierung der Beladung der Polymere **49**, **50**, **51**, **52** und **53** mit den Olefinen **31**, **32** und **33** wurden Aliquote der Polymere **49**, **50**, **51**, **52** und **53** nach dem Trocknen in einem 50 ml Einhalskolben jeweils in 10.0 ml abs. Toluol suspendiert und im Eisbad gekühlt. Nach der Zugabe von 10.0 ml 1.00 M DIBAL in *n*-Hexan wurde drei Stunden geschüttelt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol abgebrochen und 1.00 M HCl bis zur Auflösung des zwischenzeitlich entstandenen gallertartigen Niederschlages zugegeben.

Die Polymere wurden abfiltriert und mit jeweils 50.0 ml Wasser, Wasser : THF (1:1), THF, Methanol und Ether gewaschen. Das Filtrat und die vereinigten Waschlösungen wurden mit Chloroform extrahiert, bis kein Produkt mehr in die organische Phase übergang (DC-Kontrolle jeweils auf Kieselgel, Laufmittel: Chloroform : Methanol (9:1)).

Nachdem das Chloroform am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurden die Rohprodukte säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Chloroform : Methanol (9:1)). Die spektralen Daten der so erhaltenen Triole stimmten jeweils mit denen der in Lösung synthetisierten entsprechenden Alkohole überein (**54** für die Abspaltung von **49** und **50**; **55** für die Abspaltung von **51** und **52** sowie **56** für die Abspaltung von **53**).

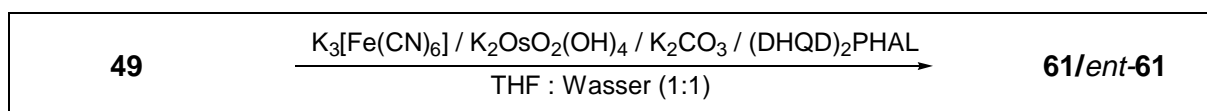
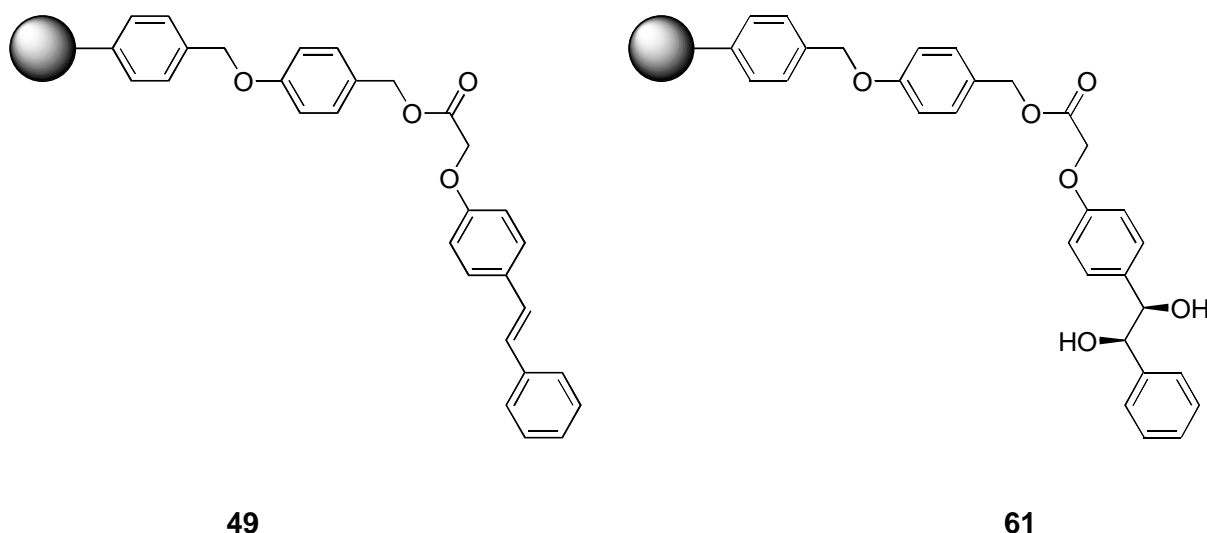
Für die Beladungen der Polymere **49**, **50**, **51**, **52** und **53** ergaben sich nach der gravimetrischen Bestimmung der im Ölpumpenvakuum getrockneten abgespaltenen Alkohole **54**, **55** und **56** folgende Werte:

- 49:** 1.08 mmol/g (38.9 mg (162 μ mol) (*E*)-2-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]ethanol **54**, abgespalten von 150 mg Polymer **49**);
- 50:** 0.27 mmol/g (6.48 mg (27.0 μ mol) (*E*)-2-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]ethanol **54**, abgespalten von 100 mg Polymer **50**);

- 51:** 1.04 mmol/g (31.9 mg (187 μ mol) 10-Undecen-1-ol **55**, abgespalten von 180 mg Polymer **51**);
- 52:** 0.28 mmol/g (7.16 mg (42.0 μ mol) 10-Undecen-1-ol **55**, abgespalten von 150 mg Polymer **52**);
- 53:** 1.01 mmol/g (31.5 mg (151 μ mol) 2-[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]ethanol **56**, abgespalten von 150 mg Polymer **53**).

7.5.3 Dihydroxylierungen der am Polymer gebundenen Olefine

7.5.3.1 Dihydroxylierung von (*E*)-[4-[[[2-Phenylethenyl]phenoxy]acetyl]oxy]methyl]phenoxy]methyliertem Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) **49** [RAR-I-268]

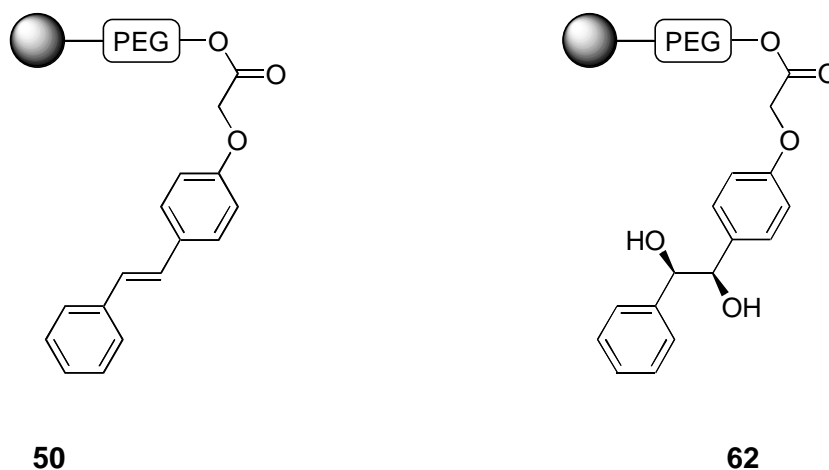
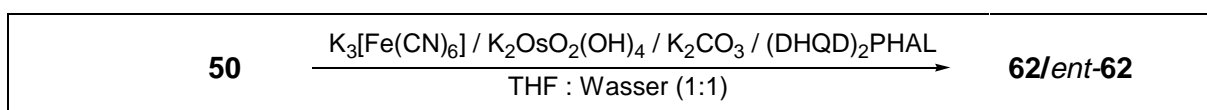


In einem 100 ml Einhalskolben wurden 990 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 420 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) K_2CO_3 , 1.40 mg (4.00 μ mol, 0.40 mol-% bezogen auf das Olefin) $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$, 95.0 mg (1.00 mmol, 1.00 eq.) Methansulfonsäureamid und 1.00 mol-% des Liganden (7.79 mg, 10.0 μ mol $(\text{DHQD})_2\text{PHAL}$ **57**) in 30.0 ml THF : Wasser (1:1) gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 888 mg (1.00 mmol, 1.00 eq.) polymergebundener (*E*)-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]essigsäure **49**. Nachdem die Suspension 18 h bei Raumtemp. gerührt worden war, wurde das Polymer abfiltriert und mit 300 ml THF : Wasser (1:1) und 100 ml Methylenchlorid gewaschen.

Die Trocknung im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid ergab 891 mg farbloses Produktpolymer **61/ent-61**.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3420 [br. s, $\nu(\text{O-H})$]; 3022 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2911, 2888 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1738 [m, $\nu(\text{C=O})$]; 1595, 1507 [beide m, beide $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1443 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1244, 1213 [beide m], 1156 [s, alle $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1066, 1014 [beide m, beide $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 815 [m], 755 [m], 693 [s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

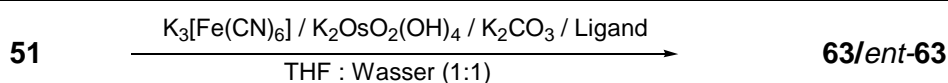
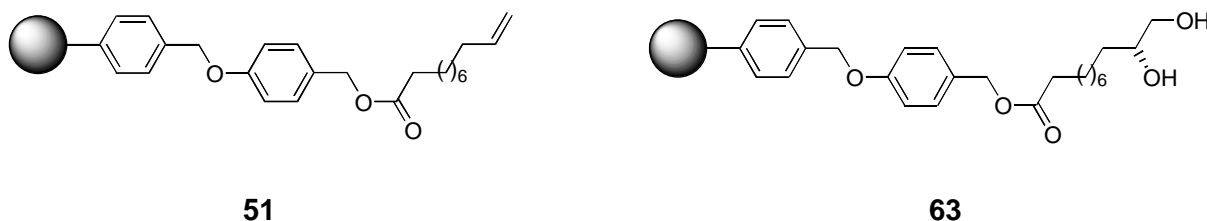
7.5.3.2 Dihydroxylierung von an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisiertem (*E*)-*O*-[[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]acetyl]oligoethylenglycol 50 [RAR-I-267]

**50****62**

In einem 100 ml Einhalskolben wurden 396 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 168 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) K_2CO_3 , 0.56 mg (1.60 μmol , 0.40 mol-% bezogen auf das Olefin) $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$, 38.0 mg (1.00 mmol, 1.00 eq.) Methansulfonsäureamid und 1.00 mol-% des Liganden (3.12 mg, 4.00 μmol) $(\text{DHQD})_2\text{PHAL}$ **57** in 30.0 ml THF : Wasser (1:1) gelöst. 1.32 g (0.40 mmol, 1.00 eq.) polymergebundene (*E*)-[4-(2-Phenylethenyl)phenoxy]essigsäure **50** wurden zugegeben und die Reaktionsmischung 18 h bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und mit 300 ml THF : Wasser (1:1) und 100 ml Methylenchlorid gewaschen. Durch Trocknung im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid wurden 1.32 g farbloses Produktpolymer **62/ent-62** erhalten.

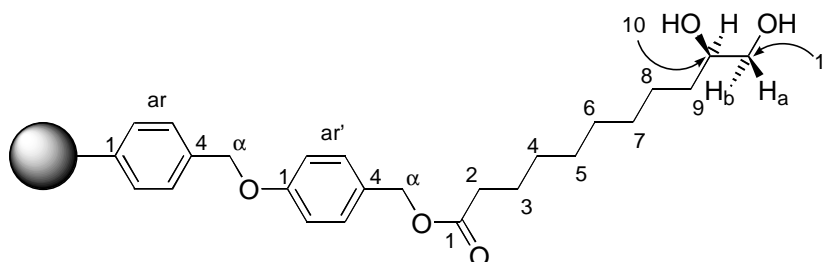
Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

7.5.3.3 Dihydroxylierung von [4-[(1-Oxo-10-undecenyl)oxy]methyl]-phenoxy]methyliertem Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) **51 [RAR-I-99]**



In einem 100 ml Einhalskolben wurden 990 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 420 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) K_2CO_3 , 1.40 mg (4.00 μmol , 0.40 mol-% bezogen auf das Olefin) $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$, 95.0 mg (1.00 mmol, 1.00 eq.) Methansulfonsäureamid und 1.00 mol-% (10.0 μmol) der entsprechenden Liganden (7.79 mg $(\text{DHQD})_2\text{PHAL}$ **57**; 8.81 mg $(\text{DHQD})_2\text{PYR}$ **58** oder 8.60 mg $(\text{DHQD})_2\text{AQN}$ **59**) in 30.0 ml THF : Wasser (1:1) gelöst. Nach der Zugabe von 910 mg (1.00 mmol, 1.00 eq.) polymergebundener 10-Undecensäure **51** wurde die Suspension die in der Tabelle 7.5.1 angegebenen Zeiten bei Raumtemp. gerührt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und mit 300 ml THF : Wasser (1:1) und 100 ml Methylenchlorid gewaschen. Durch Trocknung im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid wurden 935 mg farblores Produktpolymer **63/ent-63** erhalten.

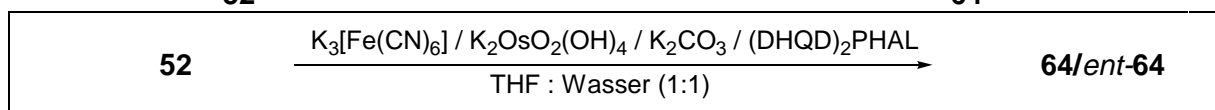
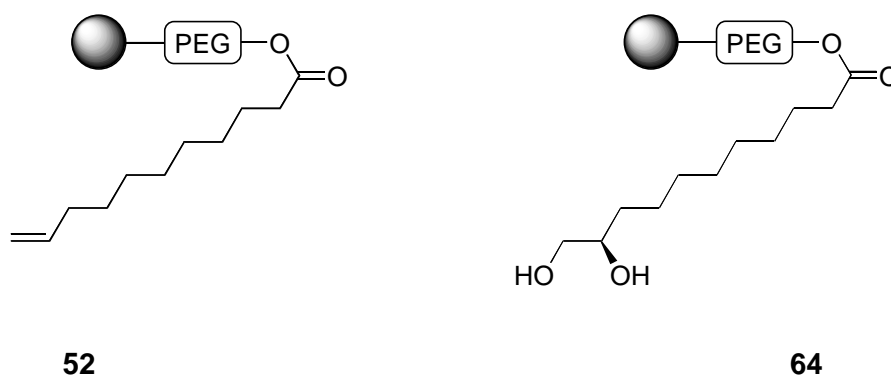
FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3421 [br. s, $\nu(\text{O-H})$]; 3058, 3024 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 2920, 2850 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1734 [s, $\nu(\text{C=O})$]; 1611, 1582, 1512 [alle m, $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1453 [s, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1220, 1170 [beide m, beide $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1016 [m, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 820 [m], 757 [m], 695 [s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].



¹H-HRMAS-NMR: (500 MHz, CD₂Cl₂, 5500 Hz Rotationsfrequenz) δ = 1.29 (8H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 1.39 (2H, 8-H), 1.39 (2H, 9-H), 1.60 (2H, 3-H), 2.30 (2H, 2-H), 3.36 (1H, 11-H_a), 3.57 (1H, 11-H_b), 3.63 (1H, 10-H), 4.94 (2H, ar- α -H), 5.02 (2H, ar'- α -H), 6.57 (sehr breit, 2H, ar-2,6-H), 6.94 (2H, ar'-2,6-H), 7.05 (sehr breit, 2H, ar-3,5-H), 7.27 (2H, ar'-3,5-H).
Die Feinstruktur der Signale kann aufgrund der Linienverbreiterung nicht angegeben werden. Die Zuordnung erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (¹H,¹H-DQF-COSY, ¹H,¹³C-HMBC, ¹H,¹³C-HSQC).

¹³C-HRMAS-NMR: (500 MHz, CD₂Cl₂, 5500 Hz Rotationsfrequenz) δ = 25.3 (t, C-3), 25.9 (t, C-8), 29.5 (t, C-5), 29.6 (t, C-6), 29.7 (t, C-7), 30.0 (t, C-4), 33.5 (t, C-9), 34.6 (t, C-2), 66.1 (t, C-ar'- α), 67.1 (t, C-11), 70.3 (t, C-ar- α), 72.6 (d, C-10), 115.1 (d, C-ar'-2,6), 128.1 (d, C-ar-3,5), 129.1 (s, C-ar'-4), 130.3 (d, C-ar'-3,5), 134.6 (s, C-ar-4), 145.5 (s, C-ar1), 159.3 (s, C-ar'-1), 174.0 (s, C-1).
Die Signale für C-ar-2,6 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Zuordnung erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (¹H,¹³C-HMBC, ¹H,¹³C-HSQC).

7.5.3.4 Dihydroxylierung von an Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisiertem *O*-(1-Oxo-10-undecenyl)oligoethylenglycol 52 [RAR-I-251]

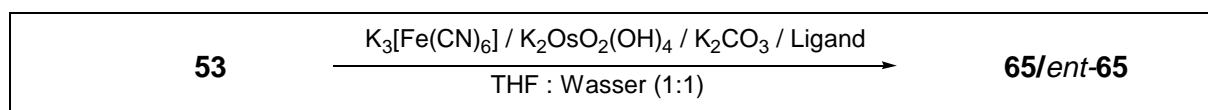
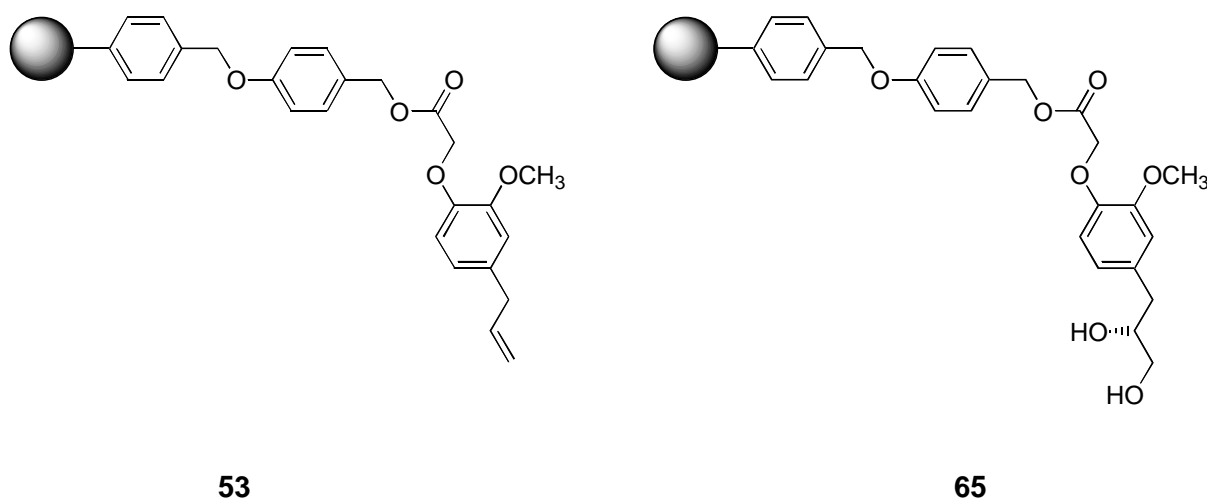


In einem 100 ml Einhalskolben wurden 396 mg (1.20 mmol, 3.00 eq.) K₃[Fe(CN)₆], 168 mg (1.20 mmol, 3.00 eq.) K₂CO₃, 0.56 mg (1.60 μ mol, 0.40 mol-% bezogen auf das Olefin) K₂OsO₂(OH)₄, 38.0 mg (0.40 mmol, 1.00 eq.) Methansulfonsäureamid und 1.00 mol-% des

Liganden (3.12 mg, 4.00 μmol (DHQD)₂PHAL **57**) in 30.0 ml THF : Wasser (1:1) gelöst. Hierauf wurden 1.33 g (0.40 mmol, 1.00 eq.) polymergebundene 10-Undecensäure **52** zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Polymer wurde abfiltriert und mit 300 ml THF : Wasser (1:1) und 100 ml Methylenchlorid gewaschen. Die Trocknung im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid ergab 1.35 g farbloses Produktpolymer **64/ent-64**.

Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

7.5.3.5 Dihydroxylierung von [4-[[[2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]acetyl]oxy]methyl]phenoxy]methyliertem Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) **53** [RAR-I-165]

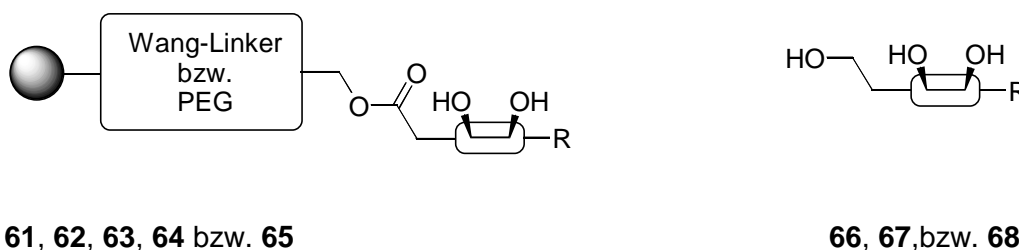


In einem 100 ml Einhalskolben wurden 990 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 420 mg (3.00 mmol, 3.00 eq.) K_2CO_3 , 1.40 mg (4.00 μmol , 0.40 mol-% bezogen auf das Olefin) $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$, 95.0 mg (1.00 mmol, 1.00 eq.) Methansulfonsäureamid und 1.00 mol-% (10.0 μmol) der entsprechenden Liganden (7.79 mg (DHQD)₂PHAL **57**; 8.81 mg (DHQD)₂PYR **58** oder 8.60 mg (DHQD)₂AQN **59**) in 30.0 ml THF : Wasser (1:1) gelöst. Anschließend wurden 910 mg (1.00 mmol, 1.00 eq.) polymergebundene [2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]essigsäure **53** zugegeben und die Suspension 12 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und mit 300 ml THF : Wasser (1:1) und 100 ml Methylenchlorid gewaschen.

Durch Trocknung im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid konnten 913 mg farbloses Produktpolymer **65/ent-65** erhalten werden.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3421 [br. s, ν (O-H)]; 3108, 3020 [beide m, ν (C-H) aryl]; 2921, 2853 [beide m, ν (C-H) CH₂]; 1733 [s, ν (C=O)]; 1609, 1511 [beide m, beide ν (C=C) aryl]; 1451 [s, δ (CH₂)]; 1374 [m, δ (OH)]; 1257, 1171 [beide m, beide ν_{asym} (C-O)]; 1142; 1034 [m, ν_{sym} (C-O)]; 820 [s], 754 [m], 696 [s, alle γ (C-H) aryl].

7.5.4 Allgemeine Vorschrift für die Freisetzung der Dihydroxylierungsprodukte von den polymeren Trägern [RAR-I-99]



61/ent-61, 62/ent-62, 63/ent-63,
64/ent-64 bzw. 65/ent-65

DIBAL / Toluol

66/ent-66, 67/ent-67
bzw. 68/ent-68

Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden die Polymere **61/ent-61**, **62/ent-62**, **63/ent-63**, **64/ent-64** bzw. **65/ent-65** in einem 100 ml Einhalskolben jeweils in 20.0 ml abs. Toluol suspendiert und im Eisbad gekühlt. Nach der Zugabe von 10.0 ml 1.00 M DIBAL in *n*-Hexan wurde drei Stunden geschüttelt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol abgebrochen und 1.00 M HCl bis zur Auflösung des zwischenzeitlich entstandenen gallertartigen Niederschlages zugegeben.

Die Polymere wurden abfiltriert und mit jeweils 50.0 ml Wasser, Wasser : THF (1:1), THF, Methanol und Ether gewaschen. Das Filtrat und die vereinigten Waschlösungen wurden mit Chloroform extrahiert, bis kein Produkt mehr in die organische Phase überging (DC-Kontrolle jeweils auf Kieselgel, Laufmittel: Chloroform : Methanol (9:1)).

Nachdem das Chloroform am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurden die Rohprodukte säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Chloroform : Methanol (9:1)). Die spektralen Daten der so erhaltenen Triole **66/ent-66**, **67/ent-67** und **68/ent-68** stimmten jeweils mit denen der in Lösung synthetisierten entsprechenden racemischen Triole überein

(*rac*-**66** für die Abspaltung von **61/ent-61** und **62/ent-62**; *rac*-**67** für die Abspaltung von **63/ent-63** und **64/ent-64** sowie *rac*-**68** für die Abspaltung von **65/ent-65**).

Die Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse sind untenstehender Tabelle zu entnehmen. Die in der Tabelle 7.5.1 aufgeführten Reaktionen ohne polymeren Träger wurden analog zu den Synthesen der entsprechenden racemischen Triole aufgearbeitet.

Die Enantiomerenüberschüsse konnten in den Fällen **61/ent-61**, **62/ent-62** und **65/ent-65** jeweils direkt durch chirale HPLC der abgespaltenen Triole **66/ent-66** und **68/ent-68** bestimmt werden. Im Falle von **63/ent-63** und **64/ent-64** mußten die abgespaltenen Triole **67/ent-67** zunächst in das cyclische Carbonat **72/ent-72** überführt werden, bevor mit chiraler HPLC der Enantiomerenüberschuß bestimmt werden konnte.

Tab. 7.5.1: Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung

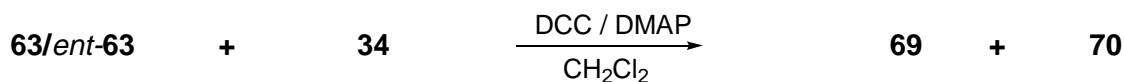
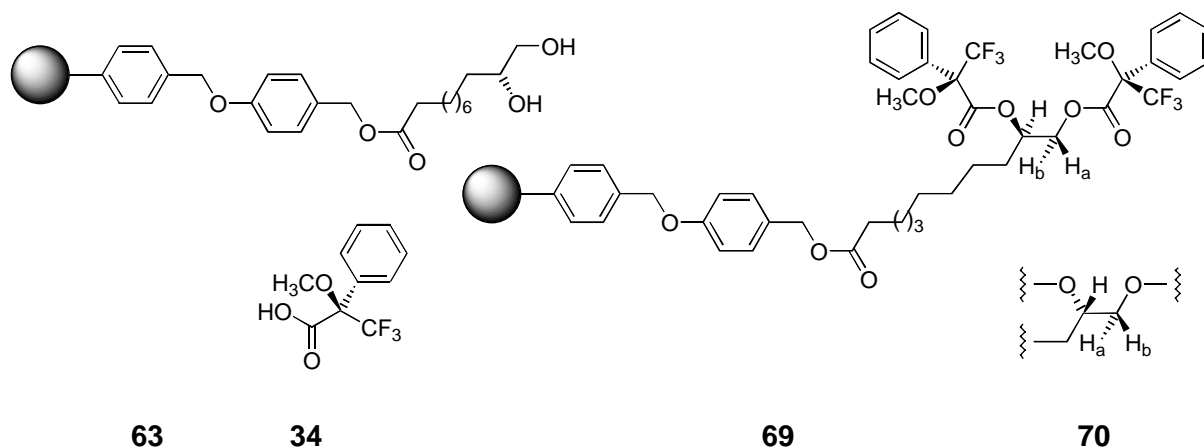
Substrat	polymerer Träger	Ligand	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]	ee [%]
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ AQN ^a	18 h, Raumtemp.	83	0 ^d
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PYR ^b	18 h, Raumtemp.	62	0 ^d
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL ^c	12 h, Raumtemp.	73	3 ^d
53	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	1 d, 0 °C	8	0 ^d
56	keiner ^g	(DHQD) ₂ AQN	18 h, Raumtemp.	75	32 ^d
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PYR	18 h, Raumtemp.	44	34 ^e
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ AQN	18 h, Raumtemp.	52	32 ^e
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	6 d, Raumtemp.	96	20 ^e
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	12 h, Raumtemp.	96	41 ^e
52	TentaGel™	(DHQD) ₂ PHAL	1 d, Raumtemp.	44	45 ^e
55	keiner ^g	(DHQD) ₂ AQN	1 d, Raumtemp.	78	88 ^e

Tab. 7.5.1: Katalytische asymmetrische Dihydroxylierung

Substrat	polymerer Träger	Ligand	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]	ee [%]
49	keiner ^g	(DHQD) ₂ PHAL	18 h, Raumtemp.	61	>99 ^f
50	TentaGel™	(DHQD) ₂ PHAL	18 h, Raumtemp.	21	97 ^f
51	Wang-Harz	(DHQD) ₂ PHAL	18 h, Raumtemp.	41	97 ^f

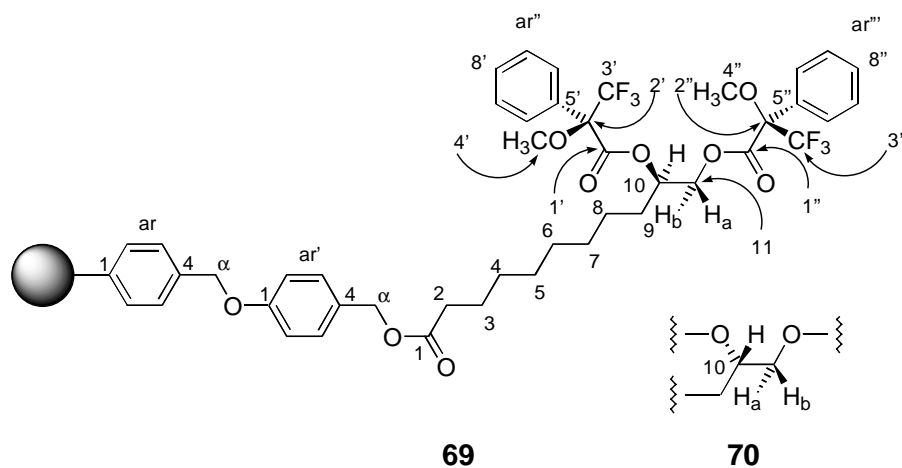
^a 1,4-Bis(dihydrochinidiny)anthrachinon; ^b 4,6-Bis(dihydrochinidiny)-2,5-diphenylpyrimidin; ^c 1,4-Bis(dihydrochinidiny)phthalazin; ^d Die Enantiomerenüberschüsse wurden bei Merck HPLC-analytisch auf einer Säule des ChiraSpher-Typs bestimmt (Laufmittel: Methyl-*tert.*-Butylether : THF (20:80)), Hauptenantiomer $\tau_R = 6.3$ min, Minderenantiomer $\tau_R = 8.0$ min, ^e Die Enantiomerenüberschüsse wurden bei Merck HPLC-analytisch auf einer Säule des ChiraSpher-Typs bestimmt (Laufmittel: Methyl-*tert.*-Butylether : THF (70:30)), Hauptenantiomer $\tau_R = 7.3$ min, Minderenantiomer $\tau_R = 11.3$ min, ^f Der Enantiomerenüberschuss wurde HPLC-analytisch auf einer Chiralcel™ OD-H Säule von *Daicel* bestimmt (Laufmittel: Hexan : 2-Propanol (80:20)), Hauptenantiomer $\tau_R = 21.0$ min, Minderenantiomer $\tau_R = 19.1$ min, ^g Die Dihydroxylierungen in Lösung wurden nach *Sharpless* in *tert.*-Butanol : Wasser 1:1 durchgeführt.

7.5.5 Synthese des Diastereomergemisches von {4-[(*R*)-10,11-Bis((*R*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyloxy)undecanoylmethyl]phenoxy}methyliertem Polymer **69 und {4-[(*S*)-10,11-Bis((*R*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyloxy)undecanoylmethyl]phenoxy}methyliertem Polymer **70** [RAR-I-269]**



In einem 10 ml Einhalskolben wurden 125 mg (0.13 mmol) des polymergebundenen Dihydroxylierungsproduktes **63/ent-63** in 3.00 ml abs. Methylenchlorid suspendiert. 120 mg (0.51 mmol, 4.00 eq.) (*R*)-Mosher-Säure **34**, 160 mg (0.78 mmol, 6.00 eq.) DCC und 5.00 mg DMAP wurden zu dieser Suspension gegeben und anschließend die Reaktionsmischung zehn Stunden bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und mit 50.0 ml Methylenchlorid gewaschen. Die Trocknung im Ölpumpenvakuum ergab 121 mg der Produkte **69** und **70** als farbloses Pulver.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3108, 3024 [beide m, ν (C-H) aryl]; 2915, 2833 [beide m, ν (C-H) CH₂]; 1750, 1734, 1700 [alle s, alle ν (C=O)]; 1600, 1582, 1507 [alle m, ν (C=C) aryl]; 1448 [m, δ (CH₂)]; 1228 [m, ν_{asym} (C-O)]; 1155 [s, ν (C-F)]; 1016 [m, ν_{sym} (C-O)]; 820 [m], 756 [m], 694 [s, alle γ (C-H) aryl].



$^1\text{H-HRMAS-NMR}$: (500 MHz, CD_2Cl_2 , 5500 Hz Rotationsfrequenz)

Tab. 7.5.2: $^1\text{H-NMR}$ -Daten (δ) des Diastereomerengemisches **69/70**.^a

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11a	11b
69/70	2.30	1.59	1.27	(1.25	/	1.18) ^b	1.27	1.57	5.32 ^c	4.30 ^c	4.62 ^c
							1.17		5.31	4.27	4.54
			4'/4''		6'/10' und 6''/10''		7'/9' und 7''/9''			8'/8''	
69/70^d		3.47			7.48		7.35			7.37	
		3.41			7.44						
		3.38									

- a) Die Feinstruktur der Signale kann aufgrund der Linienverbreiterung nicht angegeben werden. ar- und ar'-Signale wie bei **63/ent-63**.
- b) Eine exakte Zuordnung war hier nicht möglich.
- c) Hauptdiastereomer [*R*-Konfiguration am Chiralitätszentrum des Diols]
- d) Die Auflösung von 2D-Experimenten erlaubte keine vollständige Zuordnung der C-ar''- und C-ar'''-Signale zu den beiden Diastereomeren.

¹³C-HRMAS-NMR: (500 MHz, CD₂Cl₂, 5500 Hz Rotationsfrequenz)**Tab. 7.5.3:** ¹³C-NMR-Daten (δ) des Diastereomergemisches **69/70**.^a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
69/70	173.8	34.6	25.3	29.4	29.4	29.4	29.4	24.9	30.7 ^b	74.2 ^b	66.7 ^b
								25.3	30.6	74.4	66.3

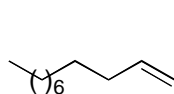
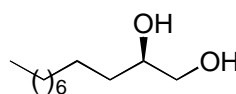
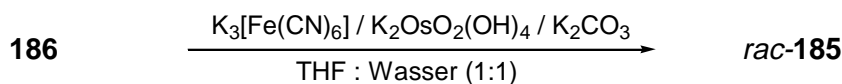
	1'/1''	2'/2''	3'/3''	4'/4''	5'/5''	6'/10' und 6''/10''	7'/9' und 7''/9''	8'/8''
69/70^c	166.7 ^b	85.0	123.7	55.8	132.6 ^b	127.78	128.91	130.19
	166.6			55.6	132.4	127.71	128.83	130.10
	166.4				132.3	127.59	128.78	130.08
	166.3 ^b				132.2 ^b	127.53	128.67	130.06

a) ar- und ar'-Signale wie bei **63/ent-63**.b) Hauptdiastereomer [*R*-Konfiguration am Chiralitätszentrum des Diols]

c) Die Auflösung von 2D-Experimenten erlaubte keine vollständige Zuordnung der C-ar''- und C-ar'''-Signale zu den beiden Diastereomeren.

7.5.6 Synthese der Bis-Mosher-Ester **183** und **184**

7.5.6.1 Synthese von (*R,S*)-Undecan-1,2-diol *rac*-**185** [RAR-I-329]

**186****185**

In einem 250 ml Einhalskolben wurden 2.68 g (19.4 mmol, 3.00 eq.) K₂CO₃, 6.39 g (19.4 mmol, 3.00 eq.) K₃[Fe(CN)₆] und 9.55 mg (25.9 μmol, 0.40 mol-% bezogen auf das Olefin) K₂OsO₂(OH)₄ in 150 ml THF : Wasser (1:1) gelöst und anschließend 1.00 g (6.48 mmol, 1.00 eq.) 1-Undecen **186** zugegeben. Nun wurde 20 h bei Raumtemp. gerührt, bevor 10.0 g Na₂SO₃ zugegeben und nochmals eine Stunde gerührt wurde. Die Reaktionsmischung wurde viermal mit je 200 ml Methylchlorid extrahiert, die organischen Phasen über MgSO₄

getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde über Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Chloroform : Methanol (9:1)), was 952 mg (5.05 mmol, 78% der Theorie) des Produktes *rac*-**185** als farblosen Feststoff ergab.

Schmp.: 49 °C.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3490-3000 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 2919, 2887 [beide s, beide $\nu(\text{C-H})$ CH₂]; 1470 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1333 [m, $\delta(\text{OH})$]; 1133 [m, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1071 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 1022 (m); 978 (m); 865 (m); 720 (m).

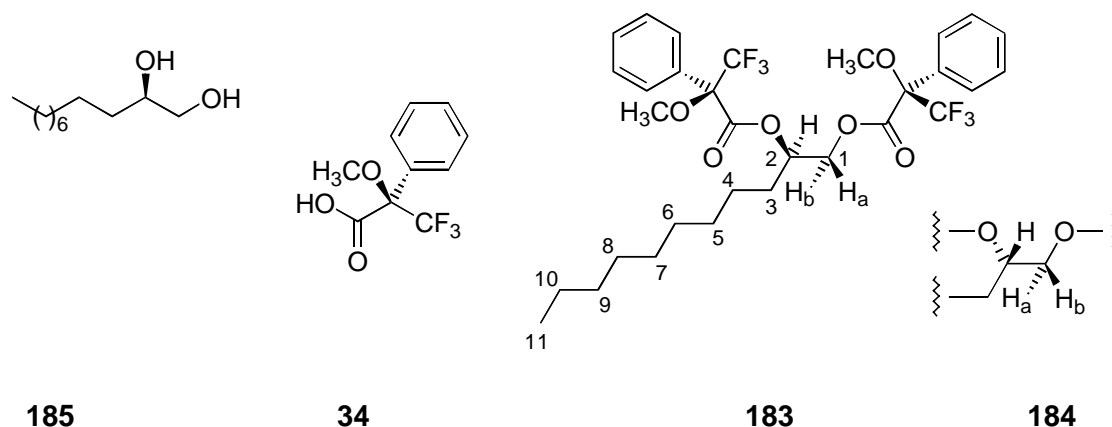
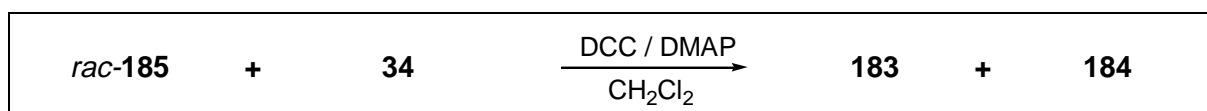
DC: R_f = 0.29.
Kieselgel, Chloroform : Methanol (9:1)

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.84 (t, ³J_{CH₃-CH₂} = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.10-1.45 (br. m, 16H, CH₂CH₂CH₂), 2.90 (br. s, 2H, OH, mit D₂O austauschbar), 3.32-3.45 (m, 1H, CHOH), 3.55-3.72 (m, 2H, CH₂OH).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ = 14.08 (q, CH₃), 22.65, 25.56, 29.30, 29.54, 29.64, 29.68, 31.86, 33.12 (alle t, alle CH₂CH₂CH₂), 66.78, (t, CH₂OH), 72.34 (d, CHOH).

EA: C₁₁H₂₄O₂; M = 188.31 g/mol
ber.: C: 70.16% H: 12.85%
gef.: C: 70.07% H: 12.87%.

7.5.6.2 Synthese des Diastereomergemisches von (*R*)-1,2-Bis((*R*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyloxy)undecan **183 und (*S*)-1,2-Bis((*R*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionyl-oxy)undecan **184** [RAR-I-335]**

**185****34****183****184**

In einem 25 ml Einhalskolben wurden 80.0 mg (0.42 mmol, 1.00 eq.) (*R,S*)-Undecan-1,2-diol *rac*-**185** zusammen mit 393 mg (1.68 mmol, 4.00 eq.) (*R*)-Mosher-Säure **34**, 520 mg (2.52 mmol, 6.00 eq.) DCC und 5.00 mg DMAP in 10.0 ml abs. Methylenchlorid gelöst und die Reaktionslösung zehn Stunden bei Raumtemp. gerührt. Danach wurde der ausgefallene weiße Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der so erhaltene Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Essigester), was 217 mg (0.35 mmol, 83% der Theorie) der Produkte **183** und **184** als farbloses Öl ergab.

FT-IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3065 [m, ν (C-H) aryl]; 2855 [m, ν (C-H) CH₂]; 1751 [s, ν (C=O)]; 1498 [m, ν (C=C) aryl]; 1452 [m, δ (CH₂)]; 1271 [s, ν_{asym} (C-O)]; 1170 [s, ν (C-F)]; 1017 [m, ν_{sym} (C-O)]; 765 [m], 718 [s], 697 [s, alle γ (C-H) aryl].

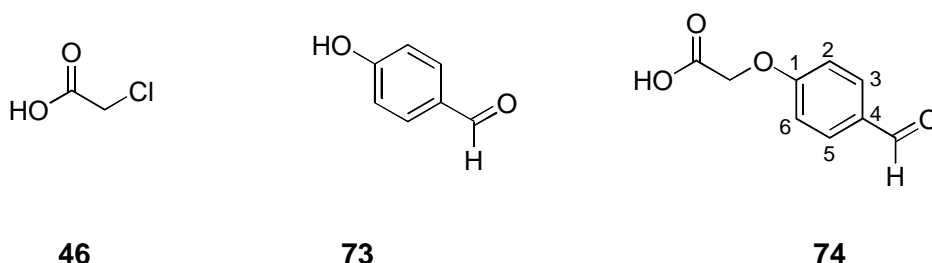
DC: $R_f = 0.58$.
Kieselgel, Essigester

- ¹H-NMR:**¹¹ (500 MHz, CD₂Cl₂) δ = 0.890* (t, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 0.892 (t, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.13-1.33 (m, 28H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H), 1.54-1.71 (m, 4H, 3-H), 3.37* (s, 3H, OCH₃), 3.41 (s, 6H, OCH₃), 3.48* (s, 3H, OCH₃), 4.27-4.30 (m, 1H, 1-H_a), 4.30-4.34* (m, 1H, 1-H_a), 4.55 (dd, ²J_{11-Hb-11-Ha} = 12.4 Hz, ³J_{11-Hb-10-H} = 2.6 Hz, 1H, 1-H_b), 4.64* (dd, ²J_{11-Hb-11-Ha} = 12.3 Hz, ³J_{11-Hb-10-H} = 2.6 Hz, 1H, 1-H_b), 5.32* (m, 1H, 10-H), 5.33 (m, 1H, 10-H), 7.31-7.52 (m, 20H, aryl-H).
- ¹³C-NMR:**¹ (75 MHz, CD₂Cl₂) δ = 14.24 (q, 2 CH₃), 23.05 (t, 2 CH₂), 24.96* (t, C-4), 25.30 (t, C-4), 29.51 (t, CH₂), 29.56 (t, CH₂), 29.63 (t, 3 CH₂), 29.67 (t, CH₂), 29.75 (t, CH₂), 29.78 (t, CH₂), 30.55 (t, C-3), 30.70* (t, C-3), 32.24 (t, 2 CH₂), 55.63 (q, OCH₃), 55.78 (q, 3 OCH₃), 66.30 (t, C-1), 66.70* (t, C-1), 74.22* (d, C-2), 74.37 (d, C-2), 85.09 (q, ²J_{C-F} = 29 Hz, 2 CCF₃), 85.11 (q, ²J_{C-F} = 28 Hz, 2 CCF₃), 123.65 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz, 2 CF₃), 123.68 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz, 2 CF₃), 127.50, 127.55, 127.67, 127.74 (alle d, alle aryl-CH), 128.74, 128.80, 128.81, 128.89 (alle d, alle aryl-CH), 130.03, 130.05, 130.08, 130.17 (alle d, alle aryl-CH), 132.14, 132.26, 132.32, 132.53 (alle s, alle aryl-C), 166.28, 166.31, 166.56, 166.73 (alle s, alle C=O).
Die Zuordnung erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (¹H, ¹³C-HMBC, ¹H, ¹³C-HSQC).
- FAB-HRMS:** m/z (% Int., Summenformel, Δmmul): 619.2487 (1, C₃₁H₃₇O₆F₆⁺, 0.7) [M-H⁺], 387.2241 (100, C₂₁H₃₀O₃F₃⁺, 5.5).

¹¹ Die mit * gekennzeichneten Verschiebungen entsprechen den Atomen des diastereomeren Bis-Mosher-Esters **183**, der bei der Dihydroxylierung von 1-Undecen **186** mit AD-Mix-β gemäß 7.5.6.1 und der anschließenden Veresterung des enantiomerenangereicherten Diols **185/ent-185** mit (*R*)-Mosher-Säure **34** im Überschuß gebildet wird.

7.6 Synthese der Aldehydbausteine 74, 84, und 86 mit Carbonsäurefunktion für die Bibliothekssynthese

7.6.1 Synthese der (4-Formylphenoxy)essigsäure 74 [RAR-OHL-33]



In einem 100 ml Einhalskolben wurden 7.25 g (59.4 mmol, 1.00 eq.) 4-Hydroxybenzaldehyd **73**, 5.61 g (59.4 mmol, 1.00 eq.) Chloressigsäure **46** und 5.20 g (130 mmol, 2.20 eq.) Natriumhydroxid in 20.0 ml Wasser gelöst und sechs Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung verfärbte sich dabei rot.

Zur Aufarbeitung wurde die freie Säure durch Zugabe von konz. Salzsäure bei pH = 1 ausgefällt, abgetrennt und danach aus Wasser umkristallisiert. Die Trocknung über Phosphorpentoxid ergab 5.99 g (33.3 mmol, 56% der Theorie) des Produktes **74** als farbloses Kristallpulver.

Schmp.: 197 °C (Lit.: 198 °C).^[85]

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3000-2500 [s, Kombinationen von ν(O-H)]; 1755 [s, ν(C=O)_{Säure}]; 1716 [s, ν(C=O)_{Aldehyd}]; 1651, 1588, 1574, 1512 [alle s, alle ν(C=C) aryl]; 1424 [s, δ(CH₂)], 1321 [s, δ(OH)]; 1226 [ν_{asym}(C-O)]; 1166 [s]; 1074 [s, ν_{sym}(C-O)]; 844 [s, γ(C-H) aryl].

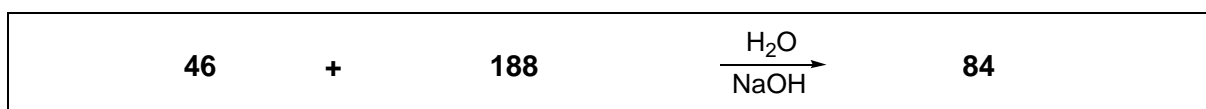
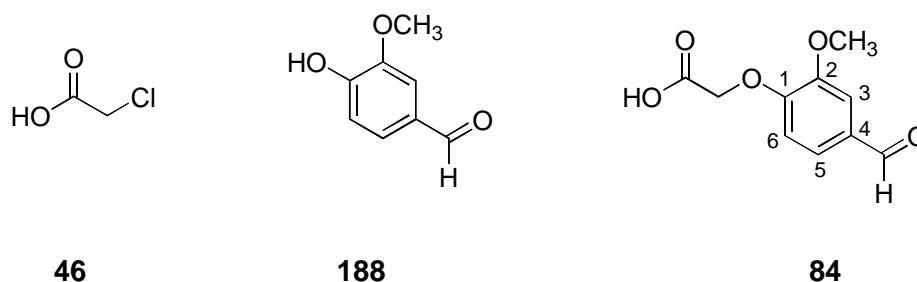
¹H-NMR: (300 MHz, d₆-DMSO) δ = 4.83 (s, 2H, OCH₂), 7.11 (d, ³J_{2-H-3-H}; _{6-H-5-H} = 8.8 Hz, 2H, aryl-2,6-H), 7.86 (d, ³J_{3-H-2-H}; _{5-H-6-H} = 8.8 Hz, 2H, aryl-3,5-H), 9.87 (s, 1H, CHO), 13.05 (br. s, 1H, COOH, mit D₂O austauschbar).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 64.69 (t, OCH_2), 115.05 (d, aryl-CH-2,6), 130.08 (s, aryl-C-4), 131.71 (d, aryl-CH-3,5), 162.71 (s, aryl-C-1), 169.61 (s, COOH), 191.32 (d, CHO).

FAB-MS: m/z (% Int.): 180.0 (100) [M^+], 135.0 (37) [$\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2^+$], 121.0 (37) [$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2^+$], 105.0 (47) [$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}^+$], 77.0 (54) [C_6H_5^+].

EA: $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$; M = 180.16 g/mol
ber.: C: 60.00% H: 4.48%
gef.: C: 59.90% H: 4.44%.

7.6.2 Synthese der (4-Formyl-2-methoxyphenoxy)essigsäure **84** [RAR-OHL-11]



In einem 100 ml Einhalskolben wurden 6.09 g (40.0 mmol, 1.00 eq.) 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd **188**, 3.78 g (40.0 mmol, 1.00 eq.) Chloressigsäure **46** und 3.52 g (88.8 mmol, 2.20 eq.) Natriumhydroxid in 20.0 ml Wasser gelöst und sechs Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung bis pH = 1 mit konz. HCl versetzt, worauf ein farbloser Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abgetrennt, aus Wasser umkristallisiert und schließlich über Phosphorpentoxid getrocknet, was 4.97 g (23.6 mmol, 59% der Theorie) des Produktes **84** in Form eines farblosen Kristallpulvers ergab.

Schmp.: 186 °C (Lit.: 188 °C).^[86]

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2970-2555 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 1762 [br. s, $\nu(\text{C=O})$ -Säure und $\nu(\text{C=O})_{\text{Aldehyd}}$]; 1644, 1580, 1507 [alle s, alle $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1467 [s];

1423 [s, $\delta(\text{CH}_2)$], 1356 [s, $\delta(\text{OH})$]; 1280, 1270 [beide s]; 1218 [$\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1160 [s]; 1070 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 916, 864, 810, 740, 681, 642, 576 [alle s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

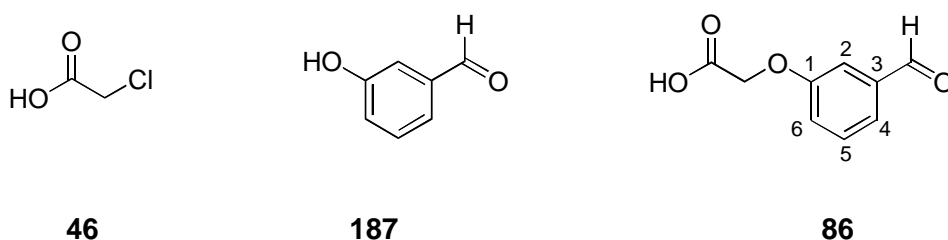
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 3.85 (s, 3H, OCH_3), 4.83 (s, 2H, OCH_2), 7.02-7.10 (d, $^3J_{6\text{-H-5H}} = 8.3$ Hz, 1H, aryl-6-H), 7.41 (d, $^4J_{3\text{-H-5H}} = 1.5$ Hz, 1H, aryl-3-H), 7.50-7.55 (dd, $^3J_{5\text{-H-6-H}} = 8.3$ Hz, $^4J_{5\text{-H-3-H}} = 1.5$ Hz, 1H, aryl-5-H), 9.82 (s, 1H, CHO), 13.00 (br. s, 1H, COOH, mit D_2O austauschbar).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 55.60 (q, CH_3), 64.86 (t, OCH_2), 110.17 (d, aryl-CH-3 oder aryl-CH-6), 112.38 (d, aryl-CH-3 oder aryl-CH-6), 125.46 (d, aryl-CH-5), 130.10 (s, aryl-C-4), 149.19 (s, aryl-C-1 oder aryl-C-2), 152.54 (s, aryl-C-1 oder aryl-C-2), 169.52 (s, COOH), 191.33 (d, CHO).

FAB-MS: m/z (% Int.): 210.0 (100) [M^+], 165.1 (20) [$\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3^+$], 151.0 (55) [$\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3^+$], 119.0 (17) [$\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_2^+$], 95.0 (49) [$\text{C}_5\text{H}_3\text{O}_2^+$], 77.0 (37) [C_6H_5^+].

EA: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$; $M = 210.18$ g/mol
ber.: C: 57.14% H: 4.80%
gef.: C: 57.03% H: 4.81%.

7.6.3 Synthese der (3-Formylphenoxy)essigsäure **86** [RAR-OHL-4]



4.75 g (39.0 mmol, 1.00 eq.) 3-Hydroxybenzaldehyd **187**, 3.69 g (39.0 mmol, 1.00 eq.) Chloroessigsäure **46** und 3.44 g (86.0 mmol, 2.20 eq.) Natriumhydroxid wurden in einem 100 ml Einhalskolben in 20.0 ml Wasser gelöst und sechs Stunden unter Rückfluß erhitzt.

Anschließend wurde die freie Säure durch Zugabe von konz. Salzsäure bei pH = 1 ausgefällt und abgetrennt. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser und der Trocknung über Phosphorpentoxid konnten 3.87 g (21.5 mmol, 55% der Theorie) des Produktes **86** als beigefarbenes Kristallpulver erhalten werden.

Schmp.: 145 °C (Lit.: 148 °C).^[85]

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3000-2500 [s, Kombinationen von $\nu(\text{O-H})$]; 1758 [s, $\nu(\text{C=O})_{\text{Säure}}$]; 1723 [s, $\nu(\text{C=O})_{\text{Aldehyd}}$]; 1663, 1610, 1582 [alle s, alle $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1436 [s, $\delta(\text{CH}_2)$], 1340 [s, $\delta(\text{OH})$]; 1257 [$\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1203, 1154 [beide s]; 1080 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 942, 856, 763, 667, 620 [alle s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl].

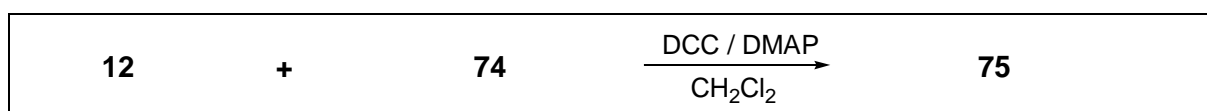
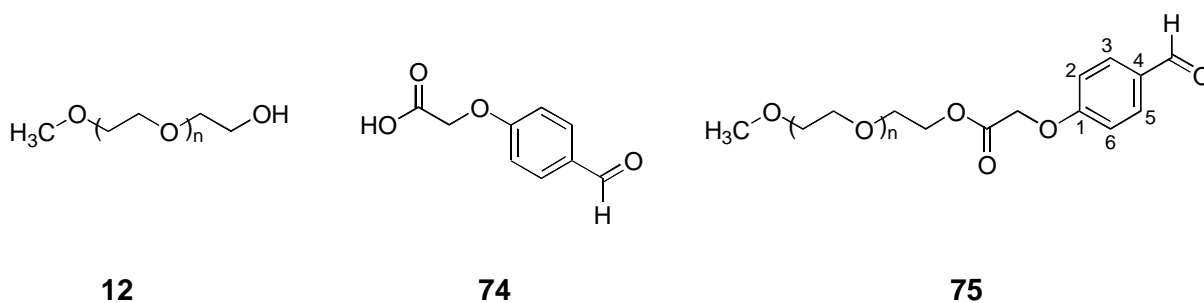
¹H-NMR: (300 MHz, d₆-DMSO) δ = 4.79 (s, 2H, OCH₂), 7.25-7.29 (m, 1H, aryl-5-H), 7.37-7.39 (m, 2H, aryl-H), 7.50-7.54 (m, 1H, aryl-H), 9.96 (s, 1H, CHO), 13.10 (br. s, 1H, COOH, mit D₂O austauschbar).

¹³C-NMR: (75 MHz, d₆-DMSO) δ = 65.61 (t, OCH₂), 113.64 (d, aryl-2-CH), 121.34 (d, aryl-CH-4 oder aryl-CH-6), 122.91 (d, aryl-CH-4 oder aryl-CH-6), 130.36 (d, aryl-CH-5), 137.56 (s, aryl-C-3), 158.30 (s, aryl-C-1), 169.88 (s, COOH), 192.83 (d, CHO).

EI-HRMS: m/z (% Int., Summenformel, Δ mmul): 180.0422 (100, C₉H₈O₄⁺, 0.1) [M⁺], 135.0438 (34, C₈H₇O₂⁺, 0.8), 121.0289 (39, C₇H₅O₂⁺, 0.1), 105.0324 (43, C₇H₅O⁺, 1.6).

7.7 Wittig-Reaktion an Polyethylenglycolmonomethylether

7.7.1 Synthese von *O*-[(4-Formylphenoxy)acetyl]-*O'*-methylpolyethylenglycol **75** [RAR-OHL-40]



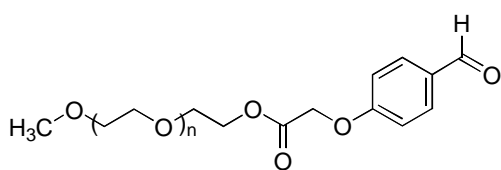
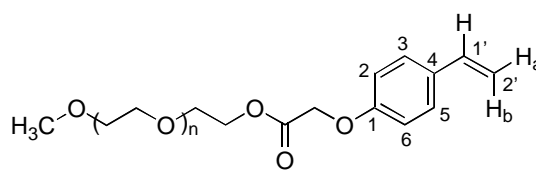
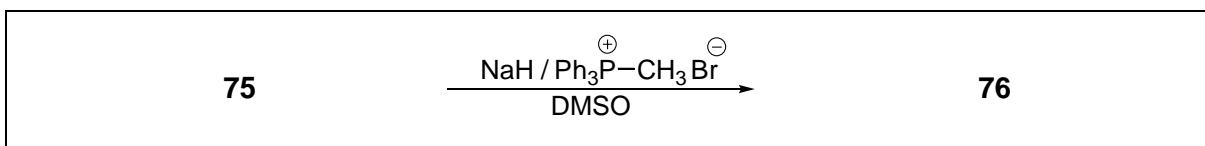
In einem 500 ml Einhalskolben wurden 2.88 g (16.0 mmol, 2.00 eq.) (4-Formylphenoxy)essigsäure **74** in 180 ml abs. Dichlormethan gelöst und zu dieser Lösung 40.0 g (0.20 mmol OH-Gruppen/g, 8.00 mmol, 1.00 eq.) Polyethylenglycolmonomethylether 5000 **12**, 3.30 g (16.0 mmol, 2.00 eq.) DCC und 50.0 mg DMAP hinzugefügt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei Raumtemp. 16 h gerührt, der ausgefallene Harnstoff abfiltriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und das Polymer durch Zugabe von Ether ausgefällt. Danach wurde aus Ethanol umkristallisiert. So konnten nach der Trocknung an der Ölpumpe 40.1 g farbloses Polymer **75** erhalten werden.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2886 [s, $\nu(\text{C-H})$ CH₂]; 1758 [m, $\nu(\text{C=O})$ Ester]; 1691 [m, $\nu(\text{C=O})$ Aldehyd]; 1599 [m, $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1468 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1351 [s, $\delta_s(\text{CH}_3)$]; 1280 [s, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1120 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 941 [s]; 839 [s].

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.35-3.60 (br. s, O[CH₂CH₂O]_n), 4.65 (s, 2H, CH₂OPh), 6.91 (d, ³J_{2-H-3-H; 6-H-5-H} = 8.8 Hz, 2H, aryl-2,6-H), 7.74 (d, ³J_{3-H-2-H; 5-H-6-H} = 8.8 Hz, 2H, aryl-3,5-H), 9.79 (s, 1H, CHO).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ = 57.90 (q, OCH₃), 65.02 (t, CH₂OPh), 70.50-70.80 (t, O[CH₂CH₂O]_n), 114.90 (d, aryl-CH-2,6), 115.36 (s, aryl-C-4), 131.90 (d, aryl-CH-3,5), 162.15 (s, aryl-C-1), 190.35 (d, CHO). Ester-C-Signal war nicht zu erkennen.

7.7.2 Synthese von *O*-Methyl-*O'*-[(4-vinylphenoxy)acetyl]polyethylenglycol **76** [RAR-OHL-19]

**75****76**

In einem 100 ml Schlenkkolben wurden unter Stickstoff 640 mg Natriumhydrid (60%ig in Weißöl, 16.0 mmol, 2.00 eq.) mit 40.0 ml Dimethylsulfoxid solange auf 50 °C erhitzt, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu erkennen war. Diese Lösung wurde nach dem Abkühlen unter Stickstoff zu 5.14 g Methyltriphenylphosphoniumbromid (14.4 mmol, 1.80 eq.) in einen 100 ml Schlenkkolben gegeben. Die Lösung färbte sich dabei gelb. In einem 250 ml Schlenkkolben wurden unter Stickstoff und Erwärmen auf 50 °C 40.0 g **75** (max. 0.20 mmol CHO-Gruppen/g, max. 8.00 mmol, 1.00 eq.) in 80.0 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Nachdem die Lösung Raumtemp. erreicht hatte, wurde über ein Septum das oben dargestellte *Wittig*-Reagenz hinzugegeben und vier Stunden bei Raumtemp. gerührt.

Zur Aufarbeitung wurden 400 ml Wasser zugegeben und so oft mit Dichlormethan ausgeschüttelt, bis aus den einrotierten Extrakten durch Zugabe von Ether keine nennenswerten Mengen an Produkt mehr ausfielen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis auf 50 ml eingengt. Danach erfolgte die Zugabe von 500 ml Diethylether, worauf das Produkt als gelblicher Niederschlag ausfiel. Die Umkristallisation aus Ethanol und die anschließende Trocknung unter Ölpumpenvakuum ergab 41.3 g fast farbloses Polymer **76**.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2886 [s, $\nu(\text{C-H})$ CH₂]; 1761 [w, $\nu(\text{C=O})$ Ester]; 1466 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1351 [s, $\delta(\text{CH}_3)$]; 1280 [s, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1120 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 941 [s]; 839 [s].

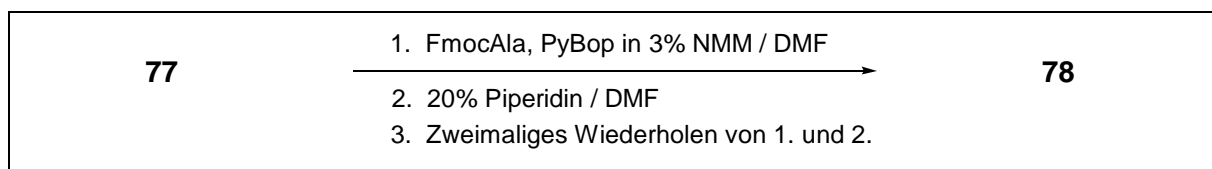
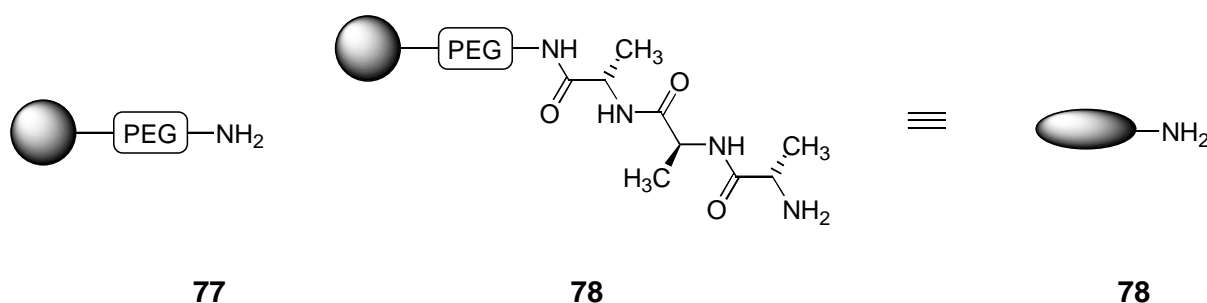
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.35-3.60 (br. s, O[CH₂CH₂O]_n), 4.59 (s, 2H, CH₂OPh), 5.06 (d, ³J_{2'-Ha-1'-H(Z)}} = 10.3 Hz, 1H, 2'-H_a), 5.53 (d, ³J_{2'-Hb-1'-H(E)}} = 17.7 Hz, 1H, 2'-H_b), 6.52-6.62 (m, 1H, 1'-H), 6.79 (d, ³J_{2-H-3-H; 6-H-5-H}} = 8.8 Hz, 2H, aryl-2,6-H), 7.27 (d, ³J_{3-H-2-H; 5-H-6-H}} = 8.8 Hz, 2H, aryl-3,5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 58.98$ (q, OCH_3), 65.17 (t, CH_2OPh), 70.50-70.80 (t, $\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$), 111.99 (t, olefin.- CH_2 -2'), 114.55 (d, aryl- CH -2,6), 120.89 (s, aryl- C -4), 127.24 (d, aryl- CH -3,5), 135.84 (d, olefin.- CH -1'), 156.30 (s, aryl- C -1). Ester- C -Signal war nicht zu erkennen.

7.8 Synthese von zwei mit Peptiden codierten Hydroxyliganden-Bibliotheken an Amino-TentaGelTM

7.8.1 Synthese der codierten Ligandenbibliothek 108

7.8.1.1 Synthese des Trialanin-Spacers 78 [RAR-I-287]



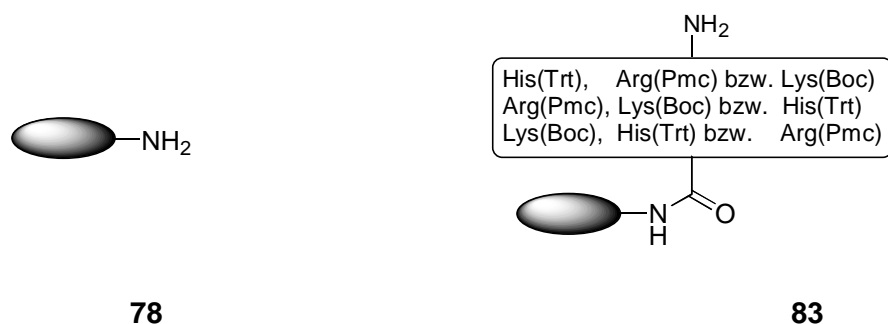
2.00 g Amino-TentaGelTM **77** (0.31 mmol/g, 620 μmol Aminofunktionen) wurden zweimal 10 min mit je 30.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt wurden:

Zunächst wurden 386 mg FmocAla (1.24 mmol, 2.00 eq.), 645 mg PyBop (1.24 mmol, 2.00 eq.) und 50.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben, die Reaktionsmischung darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Nun wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal wiederholt. Das feuchte Polymer **78** hatte danach eine Masse von 4.47 g.

1. Kupplung mit 386 mg FmocAla; Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 614 μmol , 99%.
2. Kupplung mit 386 mg FmocAla; Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 601 μmol , 97%.
3. Kupplung mit 386 mg FmocAla; Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 607 μmol , 98%.

7.8.1.2 Aufbau der kombinatorischen Tripeptideinheit **83** der Liganden [RAR-I-287]



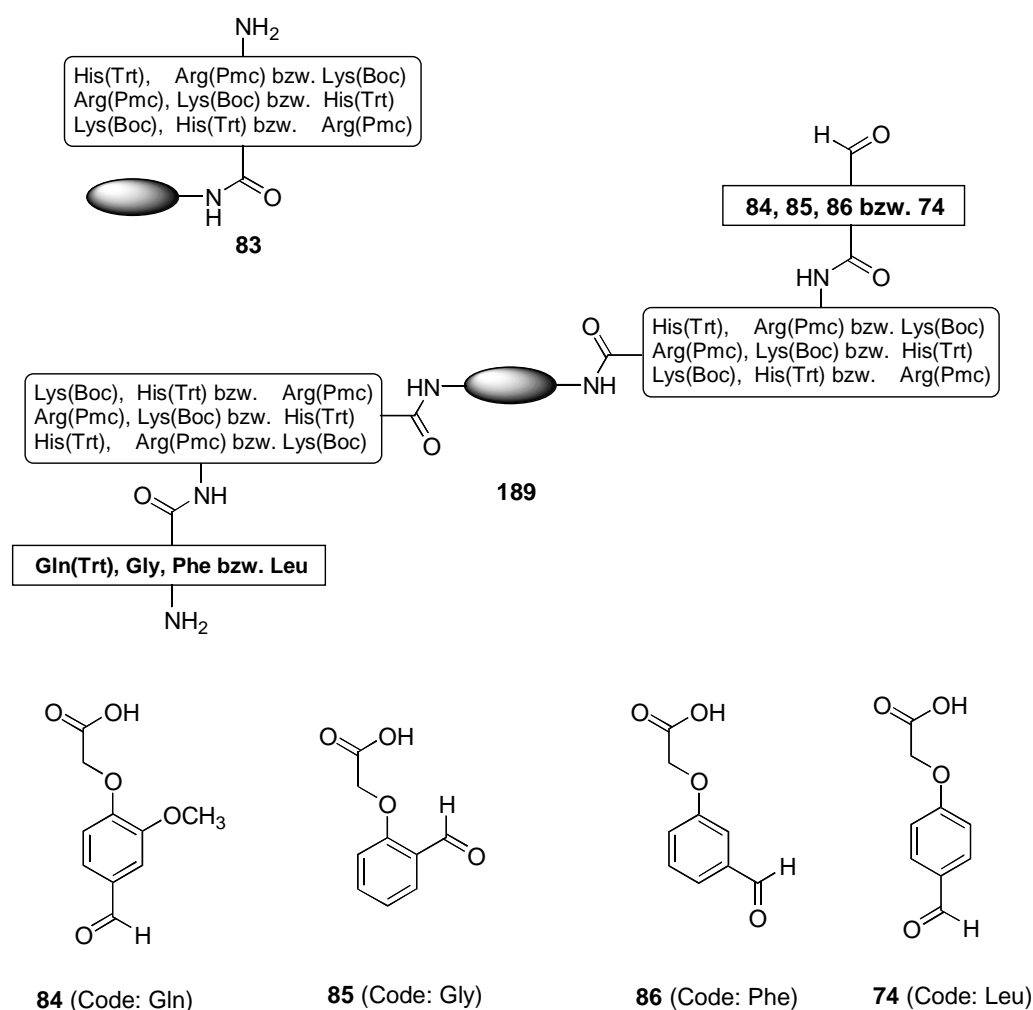
78	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aufteilen auf drei GefäÙe 2. FmocLys(Boc), FmocHis(Trt) bzw. FmocArg(Pmc) PyBop in 3% NMM / DMF <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/> <ol style="list-style-type: none"> 3. Mischen 4. 20% Piperidin / DMF 5. Zweimaliges Wiederholen von 1., 2., 3. und 4. 	83
-----------	---	-----------

Das gesamte feuchte Polymer **78** (4.47 g, 620 μmol Aminofunktionen) wurde auf drei GefäÙe verteilt und die Polymeräquivalente (jeweils 207 μmol Aminofunktionen) mit jeweils einer der drei Aminosäuren FmocHis(Trt), FmocLys(Boc) bzw. FmocArg(Pmc) (jeweils 414 μmol , 2.00 eq.) in 30.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 215 mg PyBop (414 μmol , 2.00 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischungen wurden darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Nun wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und anschließend vereinigt, worauf das gesamte Polymer zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen wurde. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen

Peptidkupplung zu bestimmen. Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal wiederholt. Das feuchte Polymer **83** hatte danach eine Masse von 7.30 g.

1. Kupplung mit 257 mg FmocHis(Trt), 194 mg FmocLys(Boc) bzw. 274 mg FmocArg(Pmc)
Ausbeute (Fmoc-Bestimmung des vereinigten Polymers): 606 μ mol, 98%.
2. Kupplung mit 257 mg FmocHis(Trt), 194 mg FmocLys(Boc) bzw. 274 mg FmocArg(Pmc)
Ausbeute (Fmoc-Bestimmung des vereinigten Polymers): 615 μ mol, 99%.
3. Kupplung mit 257 mg FmocHis(Trt), 194 mg FmocLys(Boc) bzw. 274 mg FmocArg(Pmc)
Ausbeute (Fmoc-Bestimmung des vereinigten Polymers): 603 μ mol, 97%.

7.8.1.3 Anknüpfen der codierten Aldehydbausteine **84**, **85**, **86** und **74** [RAR-I-287]



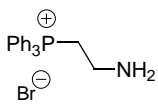
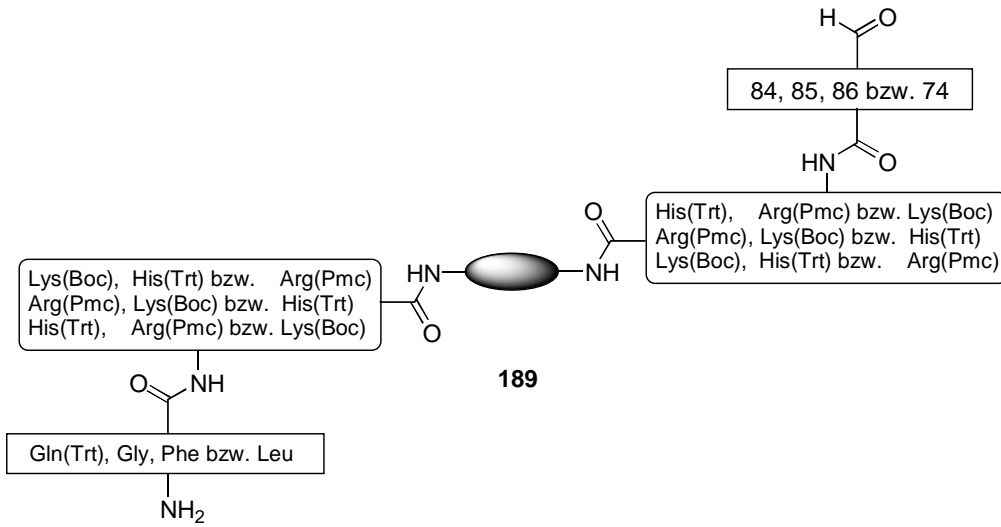
83	1. Aufteilen auf vier Gefäße	189
	2. 15% FmocGly, FmocPhe, FmocLeu bzw. FmocGln(Trt) PyBop in 3% NMM / DMF	
	3. Phenoxyessigsäure 84, 85, 86 bzw. 74 PyBop in 3% NMM / DMF	
	4. Mischen, 20% Piperidin / DMF	

2.19 g des feuchten Polymers **83** (entspricht 600 mg trockenem Amino-TentaGel™, 186 µmol Aminofunktionen) wurden auf vier Gefäße verteilt und die Polymeräquivalente (jeweils 46.5 µmol Aminofunktionen) mit jeweils einer der drei Aminosäuren FmocGly, FmocPhe, FmocLeu bzw. FmocGln(Trt) (jeweils 7.00 µmol, 0.15 eq.) in 10.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 7.29 mg PyBop (14.0 µmol, 0.30 eq.) versetzt, die Reaktionsmischungen darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Die Polymere wurden anschließend fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und mit den Phenoxyessigsäurederivaten **84, 85, 86** bzw. **74** (jeweils 93.0 µmol, 2.00 eq.) sowie 48.4 mg PyBop (95.0 µmol, 2.00 eq.) in 20.0 ml 3%igem NMM/DMF umgesetzt. Nach fünfmaligem Waschen der Polymere mit je 10.0 ml abs. DMF wurde die Anknüpfung der Phenoxyessigsäure noch einmal wiederholt. Schließlich wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und jeweils ein *Kaiser*-Test mit einigen Polymerkügelchen durchgeführt. Alle drei Polymeräquivalente wiesen hierbei keine freien Aminofunktionen mehr auf. Nun wurden die Polymere vereinigt, das gesamte Polymer zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF und die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

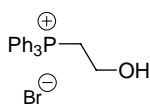
- | | |
|-----------------------|---|
| 1. Polymeräquivalent: | Kupplung mit 2.08 mg FmocGly; danach 19.5 mg 84 . |
| 2. Polymeräquivalent: | Kupplung mit 2.71 mg FmocPhe; danach 16.7 mg 85 . |
| 3. Polymeräquivalent: | Kupplung mit 2.47 mg FmocLeu; danach 16.7 mg 86 . |
| 4. Polymeräquivalent: | Kupplung mit 4.28 mg FmocGln(Trt); danach 16.7 mg 74 . |

Fmoc-Bestimmung des vereinigten Polymers: 21.0 µmol Fmoc-Gruppen, 11% Beladung der Aminofunktionen.

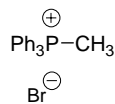
7.8.1.4 Aufbau der codierten Olefineinheit der Liganden [RAR-I-289]



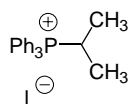
(Code: Phe)



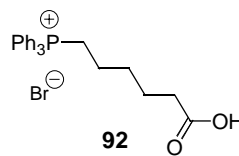
(Code: Leu)



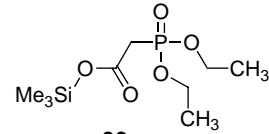
(Code: Asn)



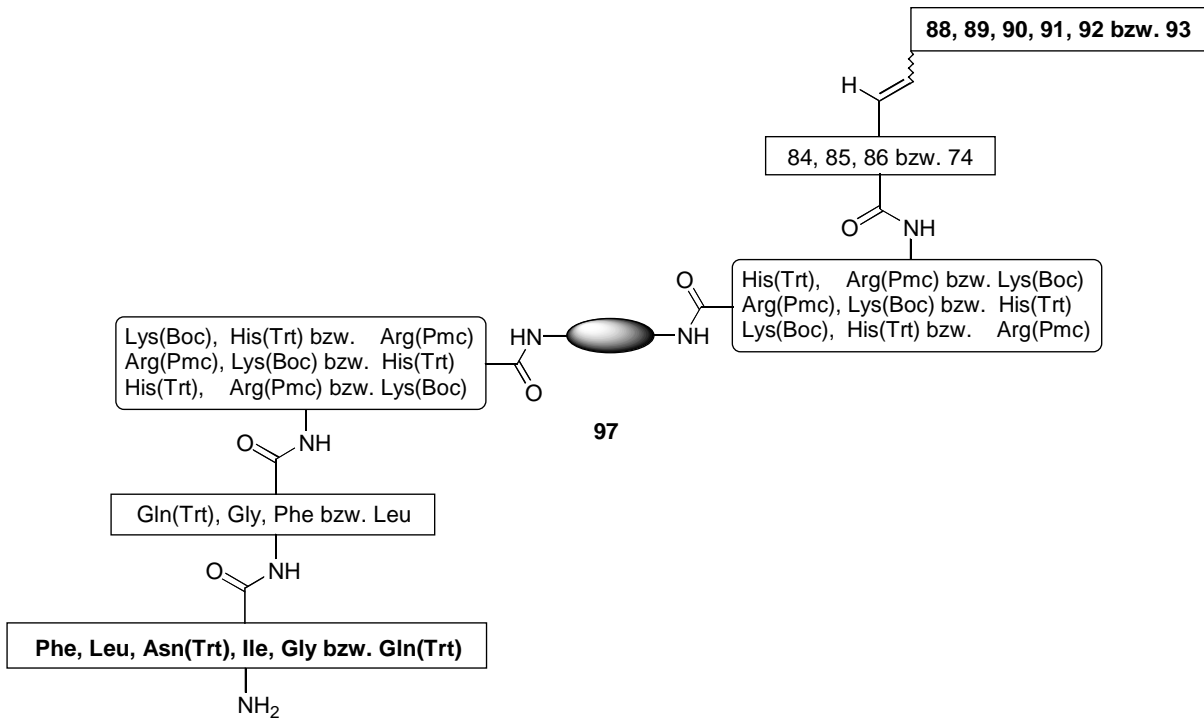
(Code: Ile)



(Code: Gly)



(Code: Gln)



189	1. Aufteilen auf sechs Gefäße	→	97
	2. FmocLeu, FmocAsn(Trt), FmocIle, FmocGly, FmocPhe bzw. FmocGln(Trt), PyBop in 3% NMM / DMF		
	3. 20% Piperidin / DMF		
	4. Wittig-Reagenzien 88, 89, 90, 91, 92 bzw. 93		
	5. Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid, DMSO		

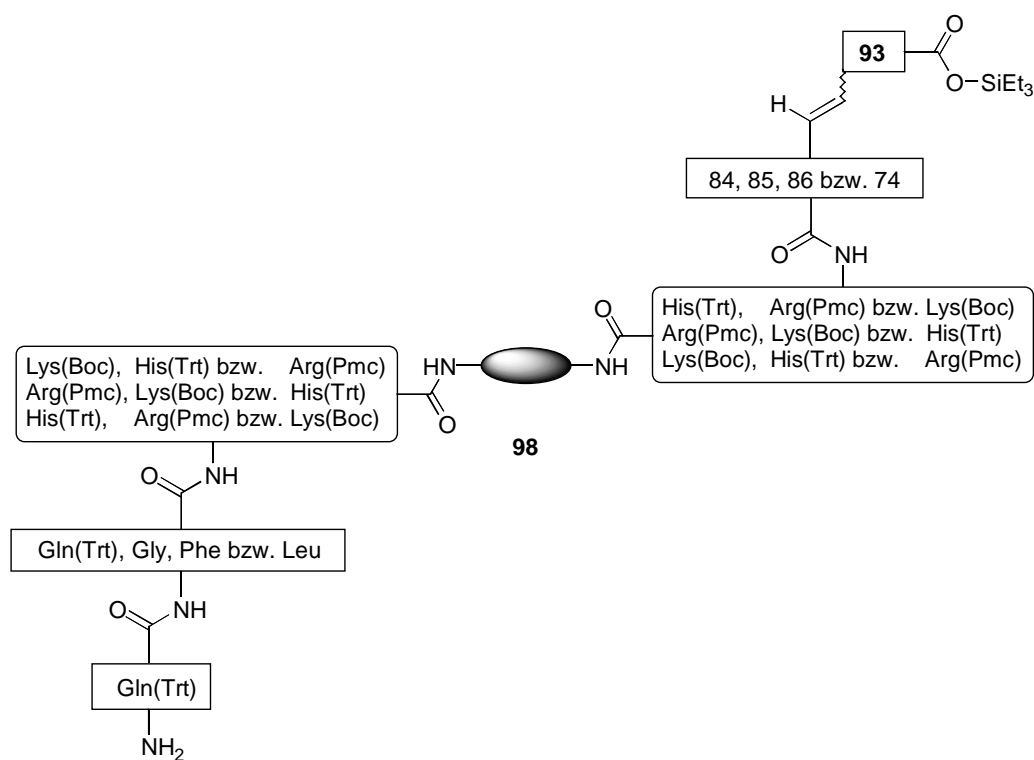
Das gesamte Polymer **189** wurde auf sechs Gefäße verteilt und die Polymeräquivalente (jeweils 3.50 μmol Aminofunktionen, 27.5 μmol Aldehydfunktionen) mit jeweils einer der sechs Aminosäuren FmocLeu, FmocAsn(Trt), FmocIle, FmocGly, FmocPhe bzw. FmocGln(Trt) (jeweils 7.00 μmol , 2.00 eq.) in 10.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 3.64 mg PyBop (7.00 μmol , 2.00 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischungen wurden zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Nun wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Sowohl die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF als auch die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen. Anschließend wurden die Polymere mit den *Wittig*-Reagenzien **88, 89, 90, 91, 92** bzw. **93** (jeweils 165 μmol , 6.00 eq. bezüglich der Aldehydfunktionen) und Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid (0.90 eq. pro abstrahierbare H-Atome der Phosphoniumsalze) umgesetzt. Die *Wittig*-Reagenzien wurden dafür direkt vor der Umsetzung frisch aus dem Phosphoniumsalz und der Base hergestellt. Danach wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und die Olefinierung noch einmal wiederholt. Die Polymere nach der Olefinierung mit den *Wittig*-Reagenzien **89, 90** und **91** wurden nun vereinigt, von den Polymeren nach der Olefinierung mit **88, 92** und **93** wurden jeweils 10% entnommen und zu den vereinigten Polymeren gegeben.

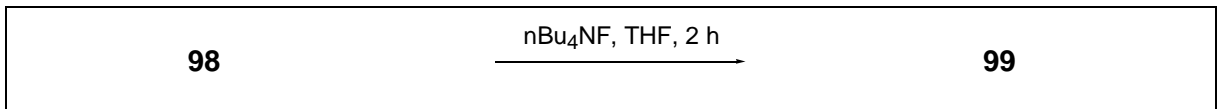
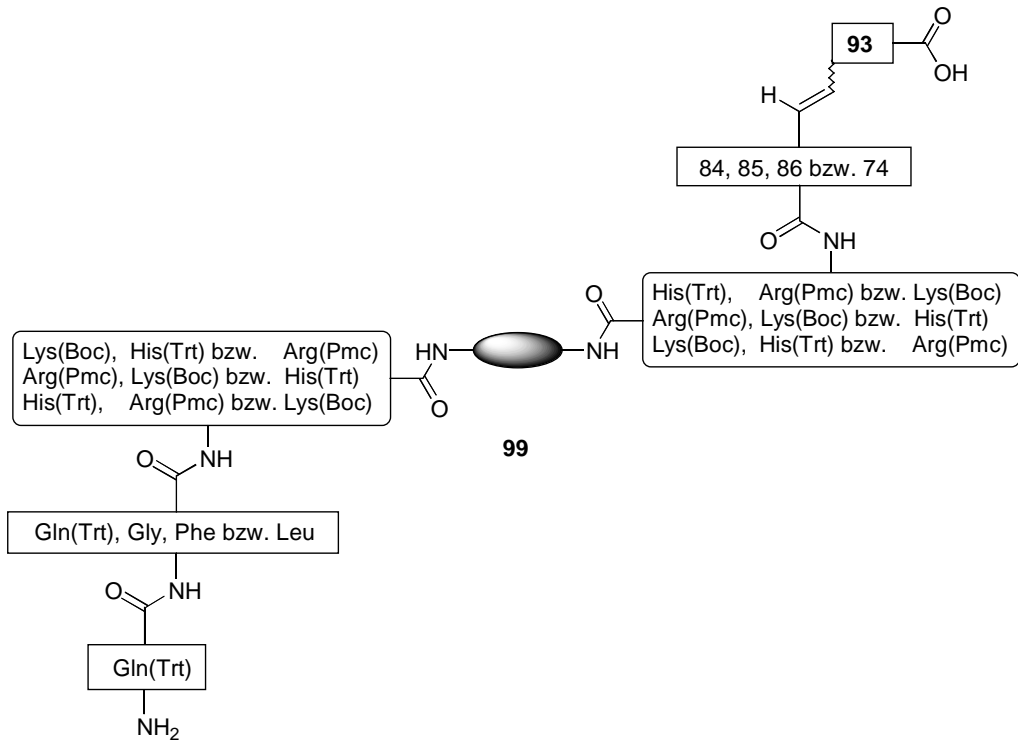
1. Polymeräquivalent: Kupplung mit 2.47 mg FmocLeu (Fmoc: 3.45 μmol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach 63.7 mg **88**, 88.8 mg Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid, 5.00 ml abs. DMSO.
2. Polymeräquivalent: Kupplung mit 4.18 mg FmocAsn(Trt) (Fmoc: 3.48 μmol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach 63.9 mg **89**, 59.2 mg Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid, 5.00 ml abs. DMSO.
3. Polymeräquivalent: Kupplung mit 2.47 mg FmocIle (Fmoc: 3.40 μmol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach 58.9 mg **90**, 29.6 mg Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid, 5.00 ml abs. DMSO.

4. Polymeräquivalent: Kupplung mit 2.08 mg FmocGly (Fmoc: 3.49 μ mol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach 71.3 mg **91**, 29.6 mg Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid, 5.00 ml abs. DMSO.
5. Polymeräquivalent: Kupplung mit 2.71 mg FmocPhe (Fmoc: 3.42 μ mol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach 75.4 mg **92**, 59.2 mg Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid, 5.00 ml abs. DMSO.
6. Polymeräquivalent: Kupplung mit 4.27 mg FmocGln(Trt) (Fmoc: 3.46 μ mol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach 44.2 mg **93**, 29.6 mg Bis-(trimethylsilyl)-kaliumamid, 5.00 ml abs. DMSO.

7.8.1.5 Modifizierung der Olefineinheiten der Liganden

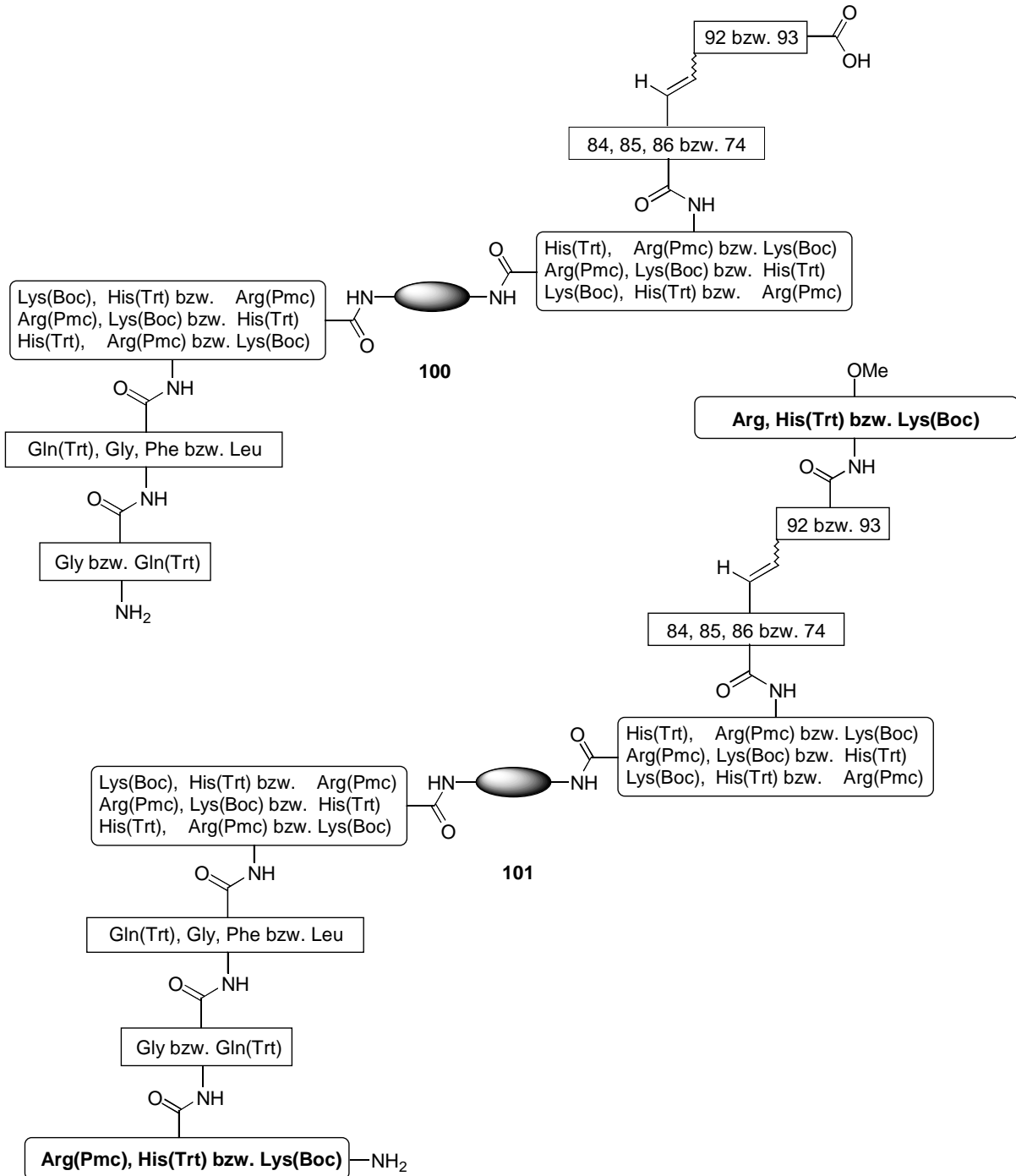
7.8.1.5.1 Entschützung der Silylester **98** [RAR-I-289]





Das Polymer **98** (maximal 27.5 μmol Silylesterfunktionen) wurde dreimal mit je 10.0 ml abs. THF gewaschen und anschließend mit 71.9 mg Tetrabutylammoniumfluoridhydrat (275 μmol , 10.0 eq.) in 10.0 ml abs. THF zwei Stunden bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und die Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid wiederholt. Abschließend wurde das Polymer **99** fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen.

7.8.1.5.2 Anknüpfung verschiedener Aminosäureester an 100 [RAR-I-289]



100

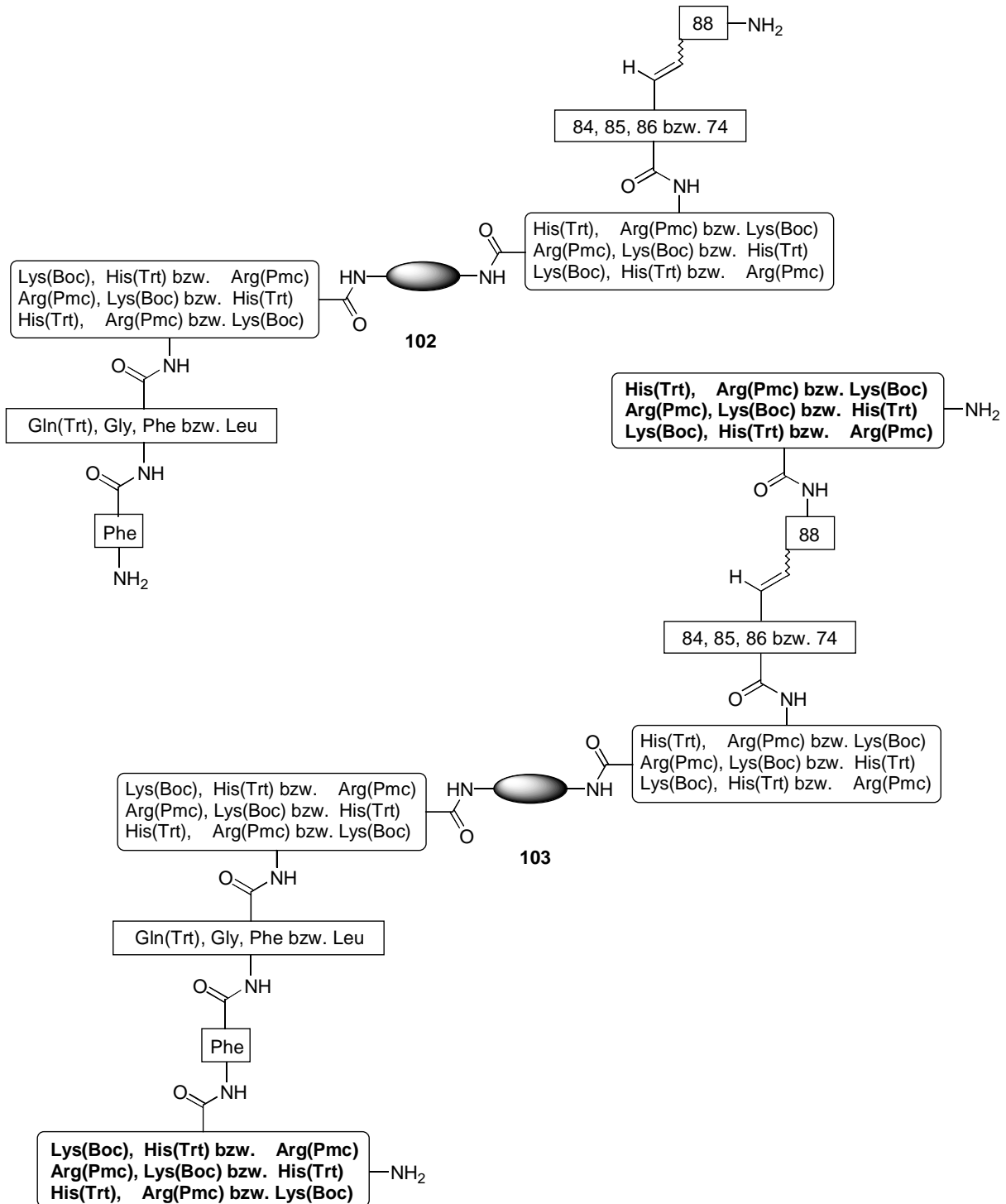
1. Aufteilen auf drei Gefäße
2. FmocArg(Pmc), FmocHis(Trt) bzw. FmocLys(Boc)
PyBop in 3% NMM / DMF
3. H-Arg(OMe), H-His(Trt)OMe bzw. H-Lys(Boc)OMe
PyBop in 3% NMM / DMF
4. 20% Piperidin / DMF

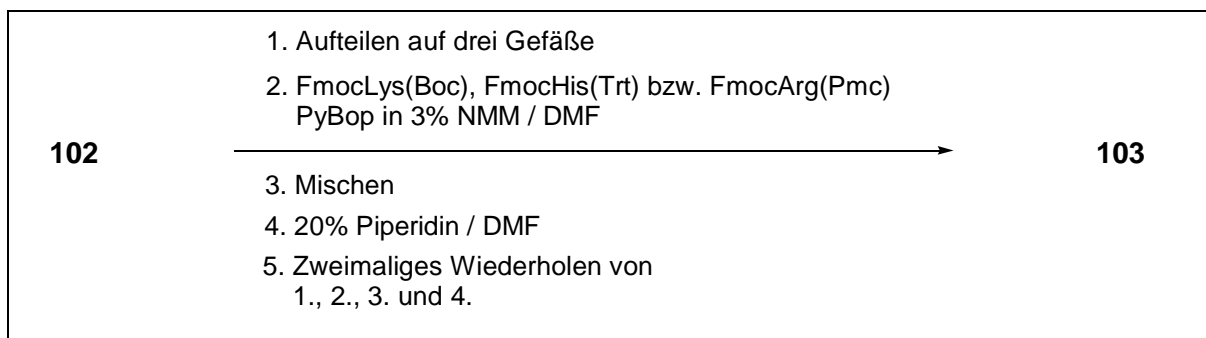
101

Das Polymer **100** wurde auf drei Gefäße verteilt und die Polymeräquivalente (jeweils maximal 2.33 μmol Aminofunktionen, maximal 18.3 μmol Carbonsäurefunktionen) mit jeweils einer der drei Aminosäuren FmocHis(Trt), FmocLys(Boc) bzw. Fmoc-Arg(Pmc) (jeweils 6.99 μmol , 3.00 eq.) in 10.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 3.64 mg PyBop (6.99 μmol , 3.00 eq.) versetzt. Nachdem die Reaktionsmischungen darauf zwei Stunden geschüttelt worden waren, wurden die Polymere abfiltriert und dreimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Nun wurde jeweils einer der Aminosäuremethylester (jeweils 36.6 μmol , 2.00 eq.) in 20.0 ml 3%igem NMM/DMF und 19.0 mg PyBop (36.6 μmol , 2.00 eq.) zugegeben, die Reaktionsmischungen darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Nun wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Mit Hilfe der UV-Spektroskopie wurden die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen. Das Polymer **101** wurde danach zu den vereinigten Polymeren gegeben.

1. Polymeräquivalent: Kupplung mit 4.33 mg FmocHis(Trt) (Fmoc: 2.28 μmol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach mit 16.4 mg H-His(Trt)OMe x 1 HCl.
2. Polymeräquivalent: Kupplung mit 3.28 mg FmocLys(Boc) (Fmoc: 2.33 μmol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach mit 10.9 mg H-Lys(Boc)OMe x 1 HCl.
3. Polymeräquivalent: Kupplung mit 4.63 mg FmocArg(Pmc) (Fmoc: 2.31 μmol Fmoc-Gruppen, 11% Peptid-Code); danach mit 9.56 mg H-ArgOMe x 2 HCl.

7.8.1.5.3 Aufbau einer weiteren kombinatorischen Tripeptideinheit an die Liganden mit Aminofunktionen 102 [RAR-I-289]

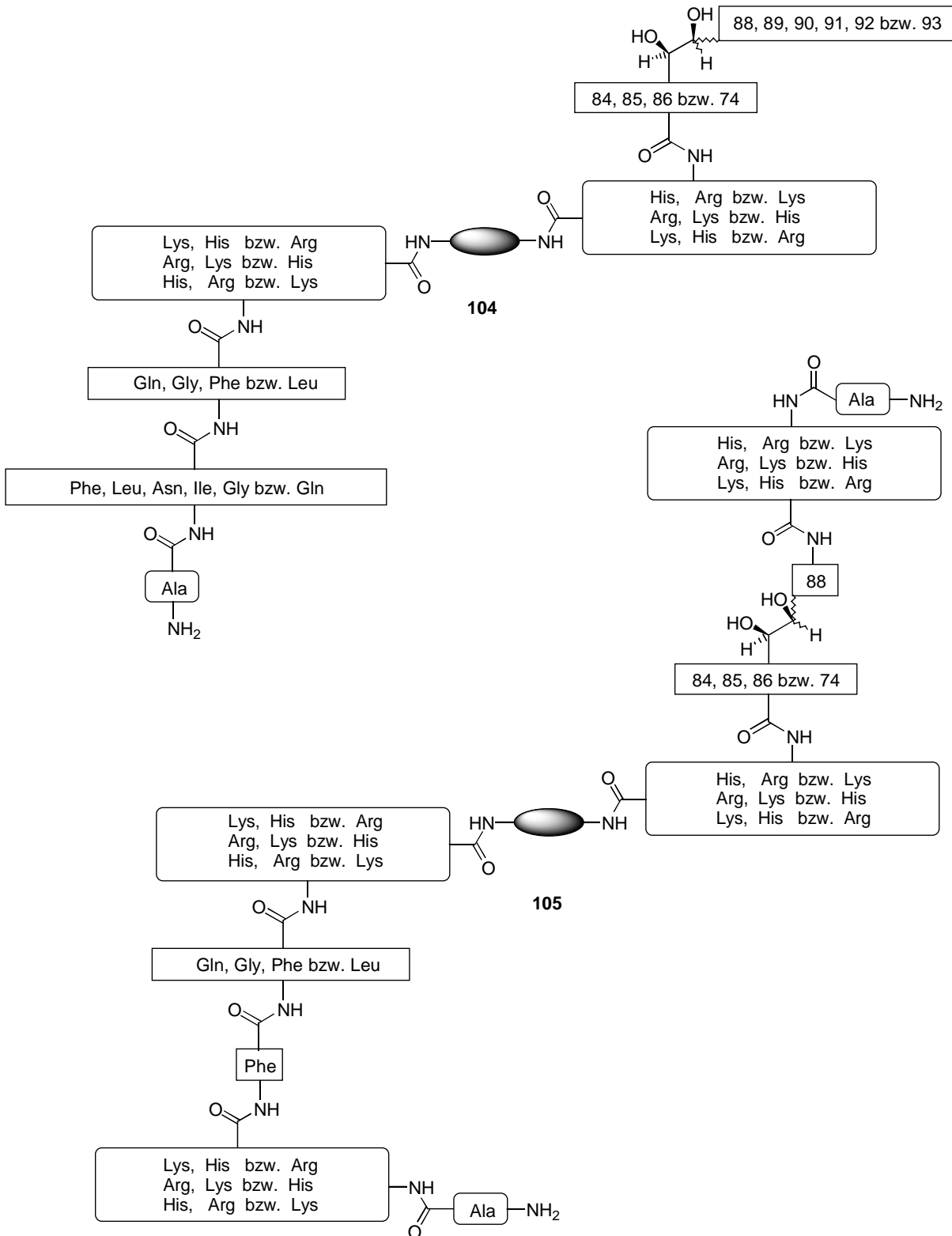


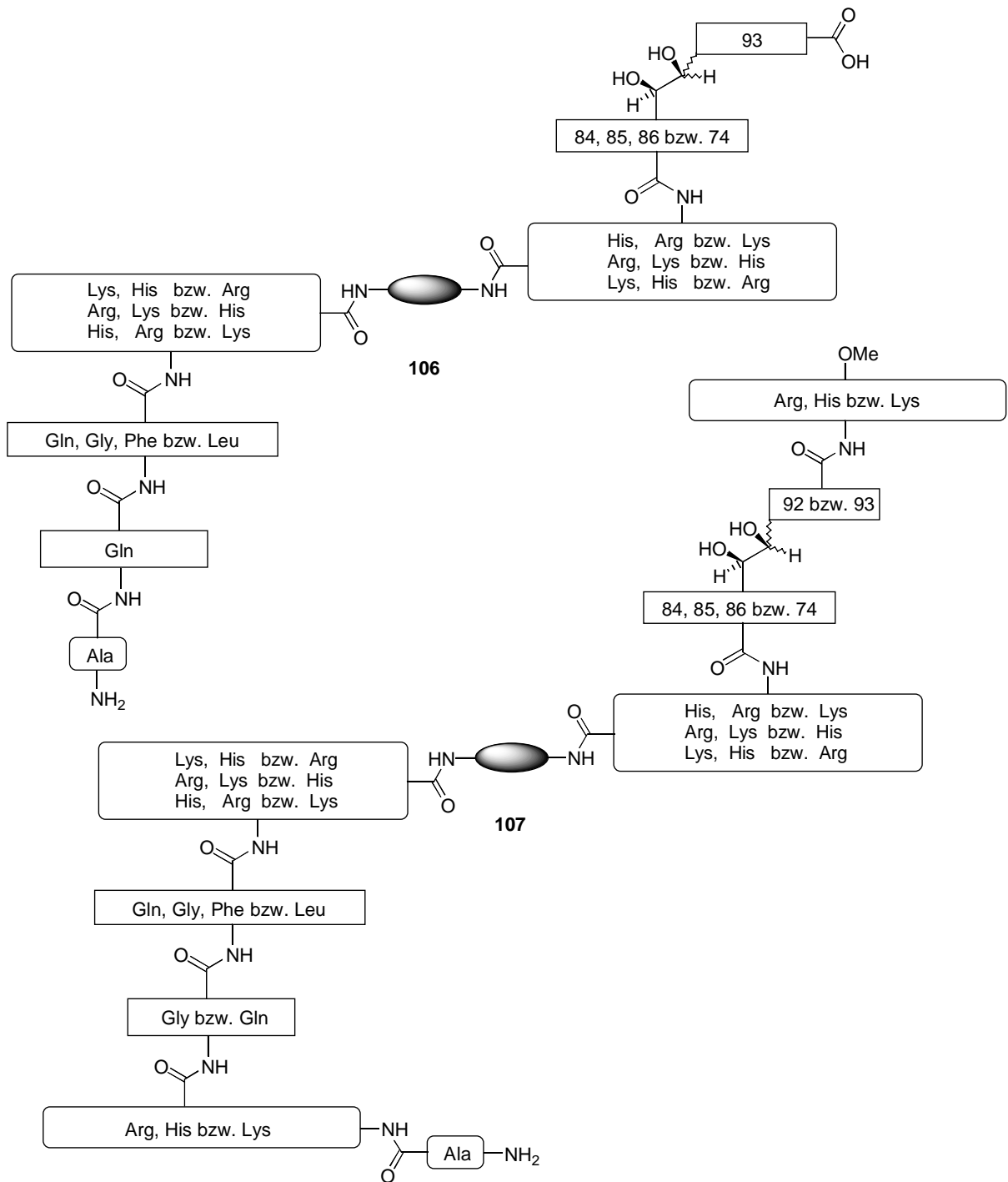


Das Polymer **102** (maximal 31.0 μmol Aminofunktionen) wurde auf drei Gefäße verteilt und die Polymeräquivalente (jeweils maximal 10.3 μmol Aminofunktionen) mit jeweils einer der drei Aminosäuren FmocHis(Trt), FmocLys(Boc) bzw. FmocArg(Pmc) (jeweils 20.6 μmol , 2.00 eq.) in 20.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 10.7 mg PyBop (20.6 μmol , 2.00 eq.) versetzt, die Reaktionsmischungen darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Nun wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und anschließend vereinigt. Danach wurde das gesamte Polymer zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen. Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal wiederholt.

1. Kupplung mit 12.8 mg FmocHis(Trt); 9.65 mg FmocLys(Boc) bzw. 13.7 mg Fmoc-Arg(Pmc). Fmoc-Bestimmung des vereinigten Polymers: 6.82 μmol , 22% Peptid-Code.
2. Kupplung mit 12.8 mg FmocHis(Trt); 9.65 mg FmocLys(Boc) bzw. 13.7 mg Fmoc-Arg(Pmc). Fmoc-Bestimmung des vereinigten Polymers: 7.10 μmol , 23% Peptid-Code.
3. Kupplung mit 12.8 mg FmocHis(Trt); 9.65 mg FmocLys(Boc) bzw. 13.7 mg Fmoc-Arg(Pmc). Fmoc-Bestimmung des vereinigten Polymers: 6.85 μmol , 22% Peptid-Code.

7.8.1.6 Dihydroxylierung und Abspaltung der Schutzgruppen der Unterbibliotheken 97, 99, 101 und 103 [RAR-I-290]





97, 99, 101 und 103	1. Mischen der Unterbibliotheken 97, 99, 101 und 103	→	104, 105, 106 und 107
	2. FmocAla, PyBop in 3% NMM / DMF		
	3. 20% Piperidin / DMF		
	4. AD-Mix-β / THF : Wasser (1:1)		
	5. 5% Ethanthiol / TFA		

Das gesamte Polymer (Unterbibliotheken **97, 99, 101 und 103**; maximal 186 μmol Aminofunktionen) wurde mit 116 mg FmocAla (372 μmol, 2.00 eq.) in 40.0 ml 3%igem NMM/DMF

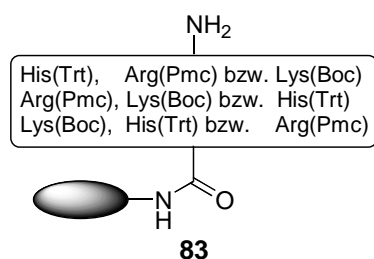
mit 193 mg PyBop (372 μmol , 2.00 eq.) versetzt, die Reaktionsmischungen darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Nun wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, darauf zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkuppelung zu bestimmen; Fmoc-Bestimmung: 24.2 μmol , 13% Peptid-Code.

Zur Dihydroxylierung wurde das gesamte Polymer in eine Lösung von 260 mg AD-Mix- β (0.40 mol-% Os und 1.00 mol-% (DHQD)₂PHAL **57**, jeweils bezogen auf die maximale Stoffmenge an Olefin von 186 μmol) und 17.7 mg (186 μmol , 1.00 eq. bezogen auf die maximale Stoffmenge an Olefin) Methansulfonsäureamid in 20.0 ml THF : Wasser (1:1) gegeben und 20 Stunden bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend wurde das Polymer abfiltriert und fünfmal mit je 30.0 ml THF, THF : Wasser (1:1) und Wasser gewaschen.

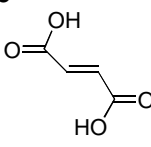
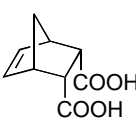
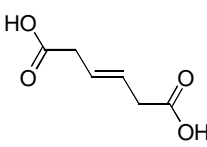
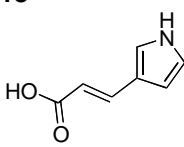
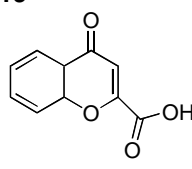
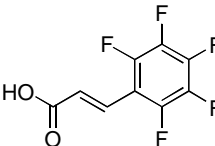
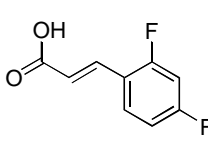
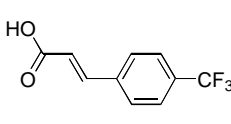
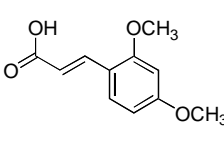
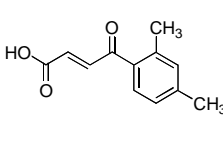
Die gesamte Bibliothek wurde nun zweimal für drei Stunden in 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol gegeben und bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und fünfmal mit je 20.0 ml THF, THF : Wasser (1:1) und Wasser gewaschen. Das feuchte Polymer hatte danach eine Masse von 2.96 g.

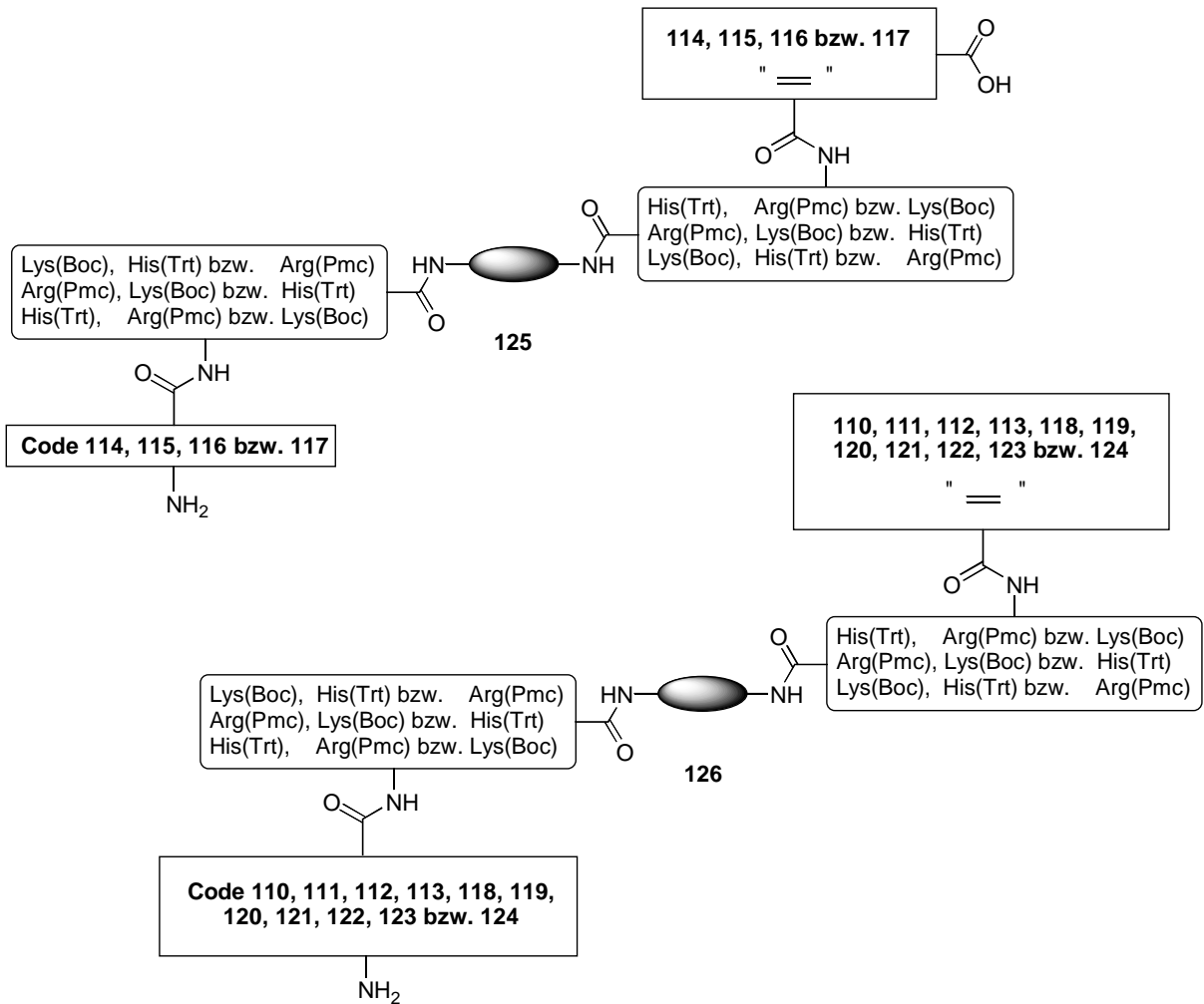
7.8.2 Synthese der codierten Ligandenbibliothek 128

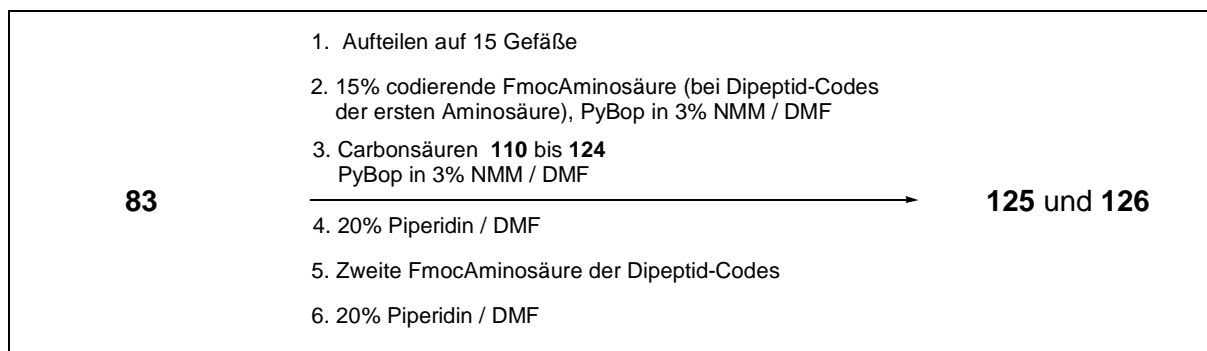
7.8.2.1 Anknüpfung und Codierung der Olefine an die kombinatorische Tripeptideinheit 83 der Liganden [RAR-I-302]



110 Code 110 : LeuLeu	111 Code 111 : LeuPhe	112 Code 112 : LeuGly	113 Code 113 : Ile	114 Code 114 : Leu
--	--	--	---	---

<p>115</p>  <p>Code 115: Phe</p>	<p>116</p>  <p>Code 116: Gly</p>	<p>117</p>  <p>Code 117: Asn</p>	<p>118</p>  <p>Code 118: Val</p>	<p>119</p>  <p>Code 119: GlyGly</p>
<p>120</p>  <p>Code 120: GlyPhe</p>	<p>121</p>  <p>Code 121: GlyLeu</p>	<p>122</p>  <p>Code 122: PhePhe</p>	<p>123</p>  <p>Code 123: PheGly</p>	<p>124</p>  <p>Code 124: PheLeu</p>





3.65 g des feuchten Polymers **83** (entspricht 1.00 g trockenem Amino-TentaGel™, 310 µmol Aminofunktionen) wurden auf fünfzehn Gefäße verteilt und die Polymeräquivalente (jeweils 20.7 µmol Aminofunktionen) mit jeweils einer der sechs Aminosäuren FmocGly, FmocIle, FmocVal, FmocPhe, FmocLeu bzw. FmocAsn(Trt) (jeweils 3.11 µmol, 0.15 eq.) in 10.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 3.24 mg PyBop (6.22 µmol, 0.30 eq.) versetzt. Nun wurden die Reaktionsmischungen zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Diese wurden fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und dann mit den Carbonsäuren **110** bis **124** (jeweils 41.4 µmol, 2.00 eq.) in 20.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 21.5 mg PyBop (41.4 µmol, 2.00 eq.) versetzt. Wieder wurden die Reaktionsmischungen zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Danach wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und im Anschluß daran die Anknüpfung der Carbonsäuren **110** bis **124** noch einmal wiederholt. Schließlich wurden die Polymere fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und jeweils ein *Kaiser*-Test mit einigen Polymerkügelchen durchgeführt. Alle Polymeräquivalente wiesen demnach keine freien Aminofunktionen mehr auf. Nun wurden die Polymere jeweils zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen, wurden die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF wie auch die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht. Die Beladung des Polymers mit den ersten Aminosäuren des Peptid-Codes lag dabei bei 11%.

Zur Anknüpfung der zweiten Aminosäure des Dipeptid-Codes der Carbonsäuren wurde jeweils eine der Aminosäuren FmocGly, FmocPhe, FmocLeu (jeweils 9.33 µmol, 3.00 eq.) in 10.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 4.86 mg PyBop (jeweils 9.33 µmol, 3.00 eq.) versetzt, die Reaktionsmischungen darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend die Polymere abfiltriert. Anschließend wurde wieder durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen mit 20%igem Piperidin/DMF die Ausbeute der Peptidkupplung bestimmt. Auch hier lag nach nahezu quantitativer Kupplung die Funktionalisierung des Polymers mit dem Peptid-Code bei 11%.

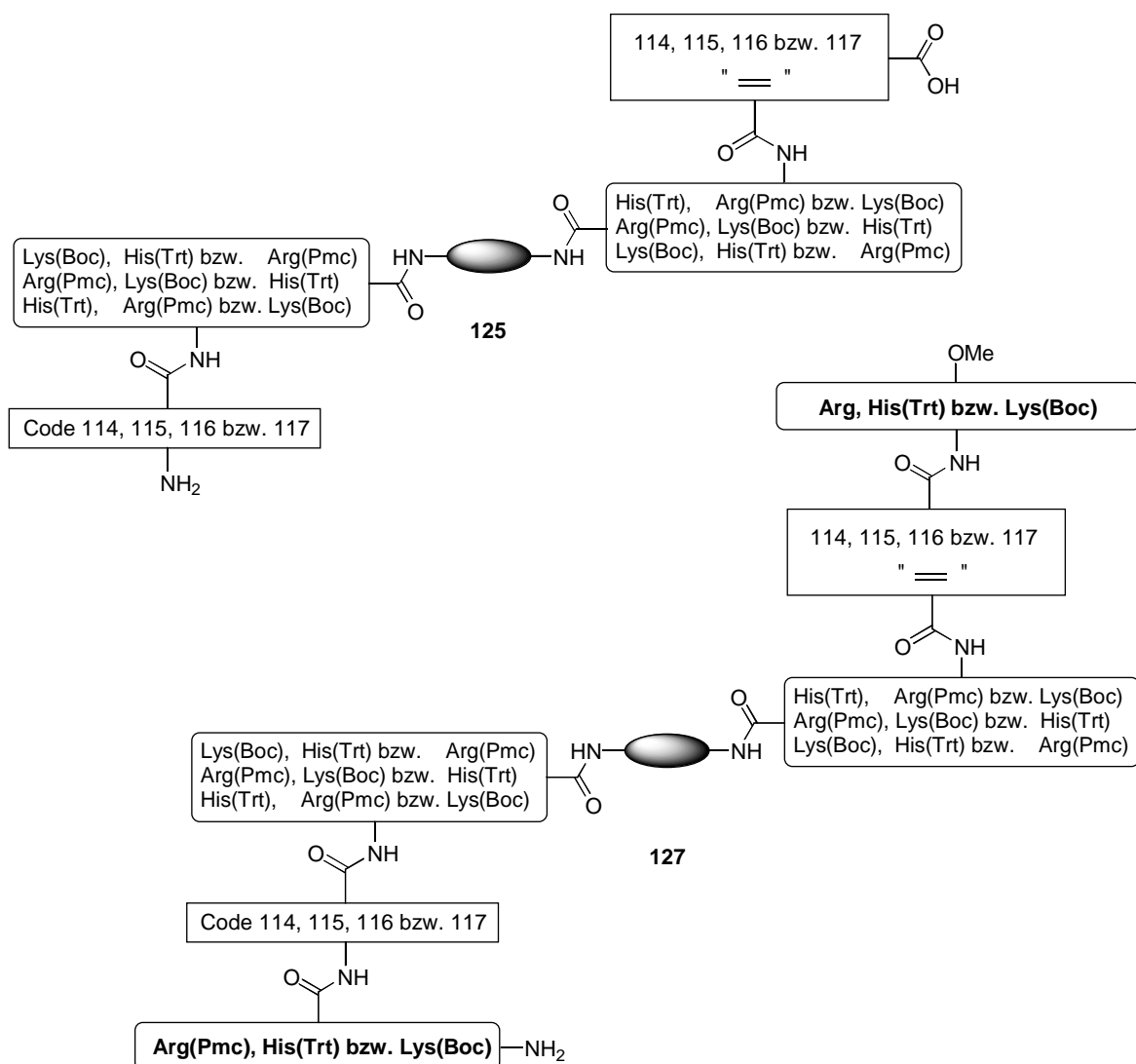
Tab 7.8.1: *Eingesetzte Mengen an den Olefinen und den codierenden Aminosäuren*

Polymeräquivalent	1	2	3
	1. 1.10 mg FmocLeu (Fmoc: 2.27 μ mol)	1. 1.10 mg FmocLeu (Fmoc: 2.29 μ mol)	1. 1.10 mg FmocLeu (Fmoc: 2.23 μ mol)
	2. 5.72 mg 110	2. 6.17 mg 111	2. 7.63 mg 112
	3. 3.30 mg FmocLeu (Fmoc: 2.25 μ mol)	3. 3.60 mg FmocPhe (Fmoc: 2.29 μ mol)	3. 2.76 mg FmocGly (Fmoc: 2.25 μ mol)
Polymeräquivalent	4	5	6
	1. 1.10 mg FmocIle (Fmoc: 2.22 μ mol)	1. 1.10 mg FmocLeu (Fmoc: 2.24 μ mol)	1. 1.20 mg FmocPhe (Fmoc: 2.20 μ mol)
	2. 5.80 mg 113	2. 4.80 mg 114	2. 4.80 mg 115
Polymeräquivalent	7	8	9
	1. 0.92 mg FmocGly (Fmoc: 2.24 μ mol)	1. 1.86 mg Fmoc- Asn(Trt) (Fmoc: 2.27 μ mol)	1. 1.06 mg FmocVal (Fmoc: 2.22 μ mol)
	2. 7.53 mg 116	2. 5.96 mg 117	2. 5.67 mg 118
Polymeräquivalent	10	11	12
	1. 0.92 mg FmocGly (Fmoc: 2.25 μ mol)	1. 0.92 mg FmocGly (Fmoc: 2.29 μ mol)	1. 0.92 mg FmocGly (Fmoc: 2.24 μ mol)
	2. 7.87 mg 119	2. 9.86 mg 120	2. 7.62 mg 121
	3. 2.76 mg FmocGly (Fmoc: 2.25 μ mol)	3. 3.60 mg FmocPhe (Fmoc: 2.26 μ mol)	3. 3.30 mg FmocLeu (Fmoc: 2.25 μ mol)
Polymeräquivalent	13	14	15
	1. 1.20 mg FmocPhe (Fmoc: 2.25 μ mol)	1. 1.20 mg FmocPhe (Fmoc: 2.28 μ mol)	1. 1.20 mg FmocPhe (Fmoc: 2.27 μ mol)
	2. 8.94 mg 122	2. 8.62 mg 123	2. 8.45 mg 124
	3. 3.60 mg FmocPhe (Fmoc: 2.27 μ mol)	3. 2.76 mg FmocGly (Fmoc: 2.26 μ mol)	3. 3.30 mg FmocLeu (Fmoc: 2.28 μ mol)

Aus den mit **114**, **115**, **116** und **117** umgesetzten Polymeräquivalenten wurden jeweils 10% des Trägers entnommen und zu den vereinigten restlichen Polymeräquivalenten gegeben.

7.8.2.2 Modifizierung der Olefineinheiten der Liganden

7.8.2.2.1 Anknüpfung verschiedener Aminosäureester an 125 [RAR-I-303]



125

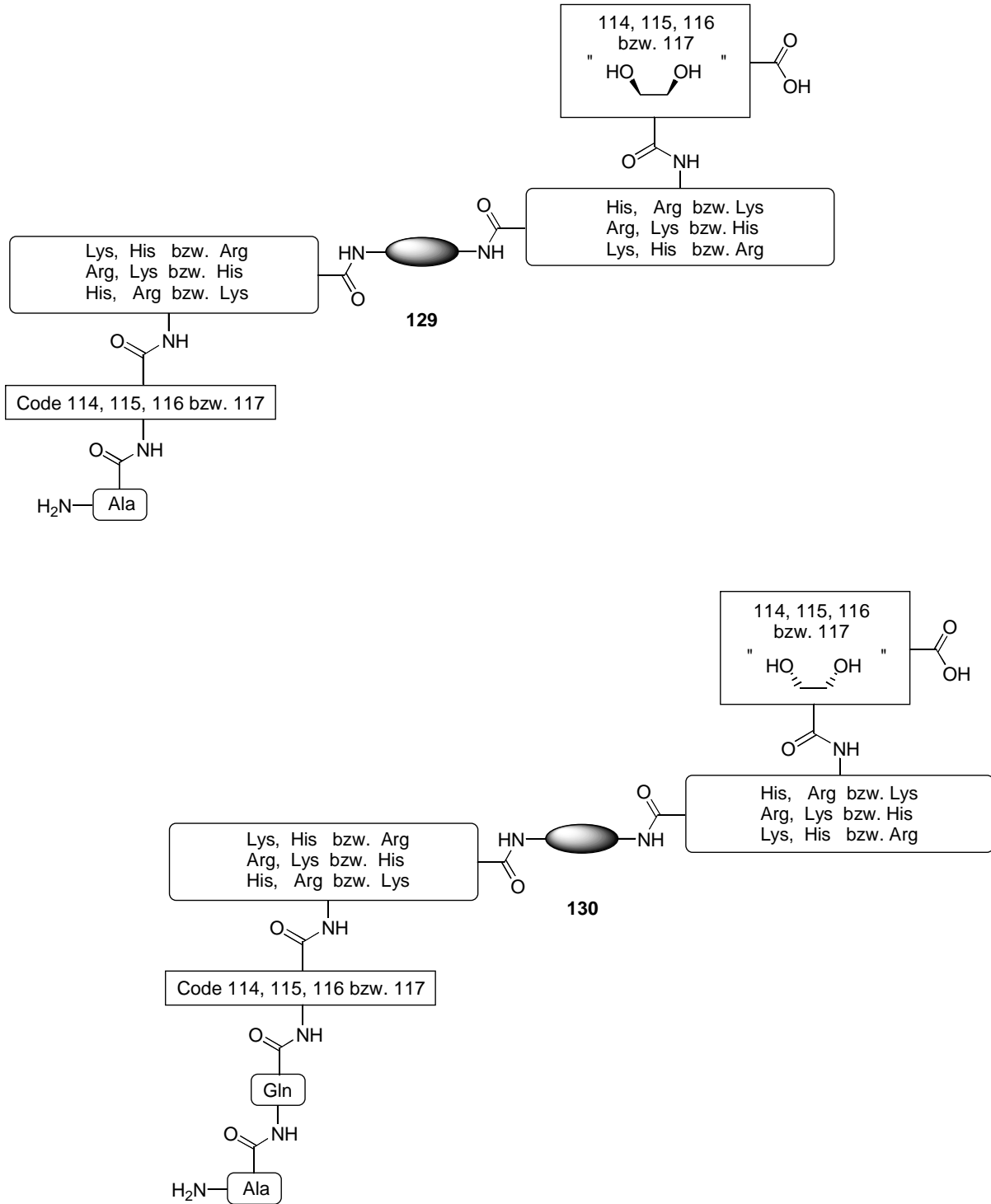
1. Aufteilen auf drei Gefäße
2. FmocArg(Pmc), FmocHis(Trt) bzw. FmocLys(Boc)
PyBop in 3% NMM / DMF
3. H-Arg(OMe), H-His(Trt)OMe bzw. H-Lys(Boc)OMe
PyBop in 3% NMM / DMF
4. Mischen, 20% Piperidin / DMF

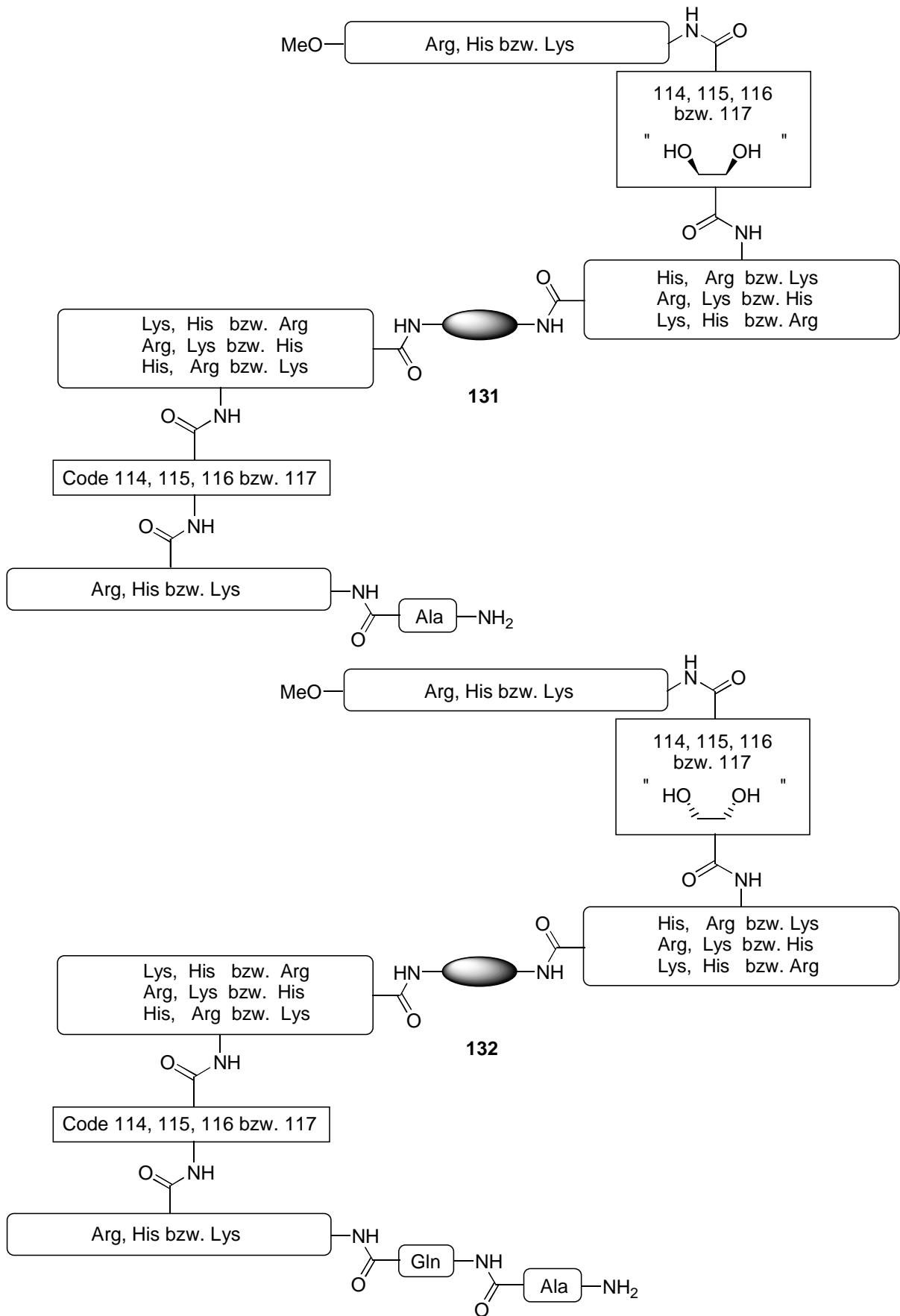
127

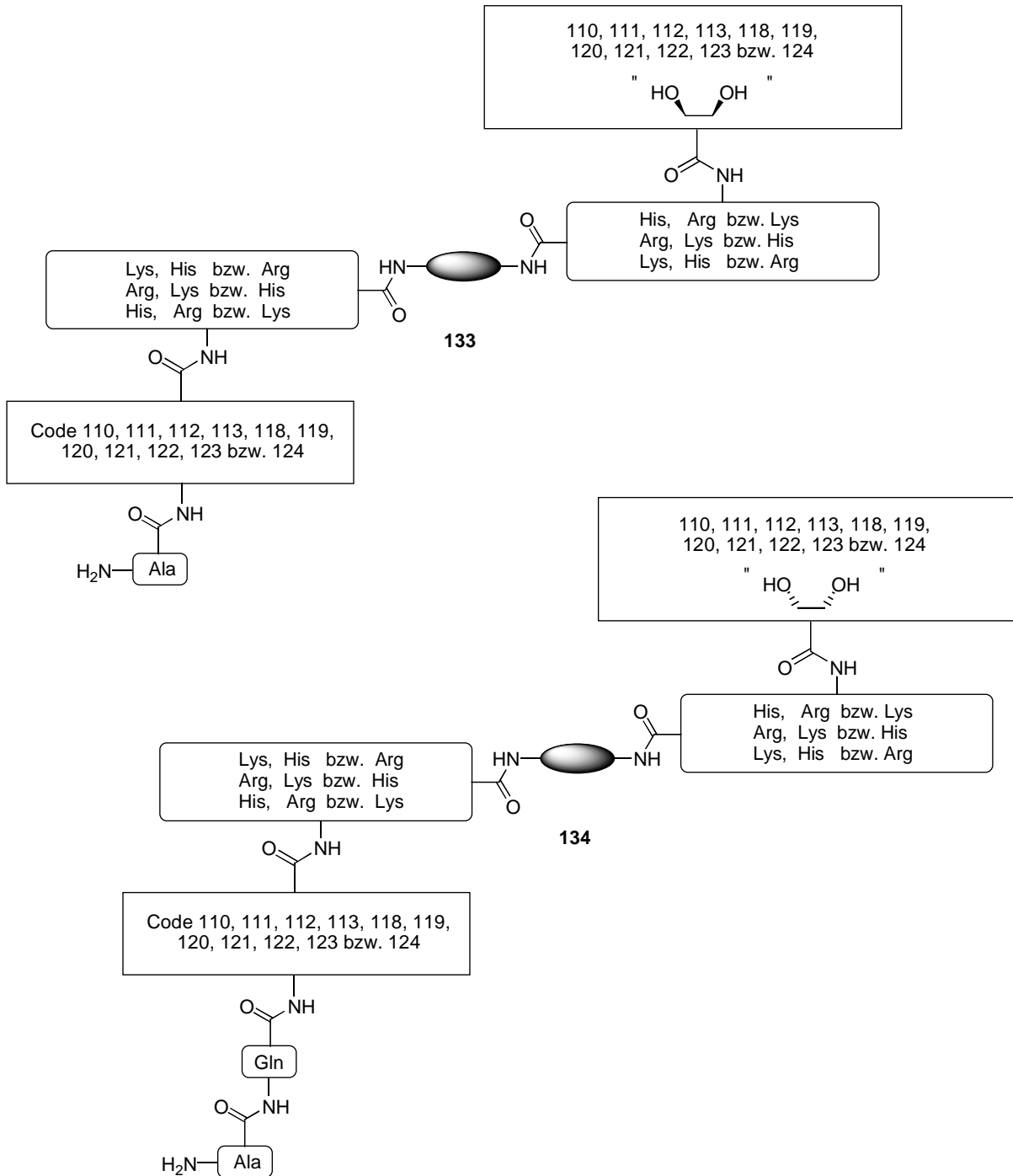
Das Polymer **125** wurde auf drei Gefäße verteilt und die Polymeräquivalente (jeweils maximal 3.03 μmol Aminofunktionen, maximal 24.5 μmol Carbonsäurefunktionen) mit jeweils einer der drei Aminosäuren FmocHis(Trt), FmocLys(Boc) bzw. Fmoc-Arg(Pmc) (jeweils 9.09 μmol , 3.00 eq.) in 10.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 4.73 mg PyBop (9.09 μmol , 3.00 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischungen wurden zwei Stunden geschüttelt, anschließend die Polymere abfiltriert und dreimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Nun wurde jeweils einer der Aminosäuremethylester (jeweils 49.0 μmol , 2.00 eq.) in 20.0 ml 3%igem NMM/DMF mit 25.5 mg PyBop (49.0 μmol , 2.00 eq.) versetzt und die Reaktionsmischungen wiederum zwei Stunden geschüttelt. Nun wurden die Polymere abfiltriert, fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF und die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen. Nach der letzten Kupplung wurden die Polymere zu **127** vereinigt.

1. Polymeräquivalent: Kupplung mit 5.64 mg FmocHis(Trt) (Fmoc: 3.01 μmol , 11% Peptid-Code); danach mit 22.0 mg H-His(Trt)OMe x 1 HCl.
2. Polymeräquivalent: Kupplung mit 4.26 mg FmocLys(Boc) (Fmoc: 2.96 μmol , 11% Peptid-Code); danach mit 14.5 mg H-Lys(Boc)OMe x 1 HCl.
3. Polymeräquivalent: Kupplung mit 6.03 mg FmocArg(Pmc) (Fmoc: 3.00 μmol , 11% Peptid-Code); danach mit 12.8 mg H-ArgOMe x 2 HCl.

7.8.2.3 Dihydroxylierung und Abspaltung der Schutzgruppen der Unterbibliotheken 125, 126 und 127 [RAR-I-305]







125, 126 und 127

1. Mischen der Unterbibliotheken **125**, **126** und **127** und Aufteilen auf zwei Gefäße
2. FmocGln(Trt), PyBop in 3% NMM / DMF bzw. kein FmocAminosäurecode
3. 20% Piperidin / DMF
4. FmocAla, PyBop in 3% NMM / DMF
5. 20% Piperidin / DMF
6. AD-Mix-β bzw. -α / THF : Wasser (1:1)
7. Mischen, 95% TFA / 5% Ethanthiol

129 / 130 / 131
132 / 133 / 134

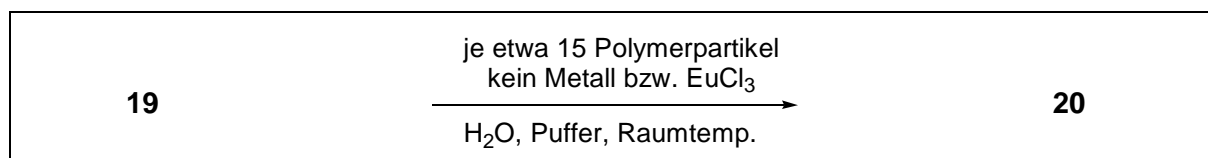
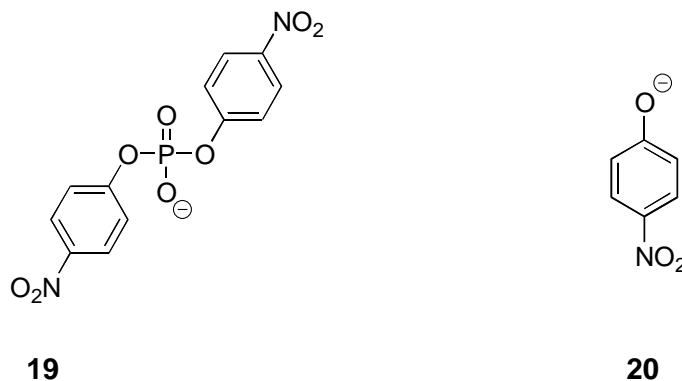
Das gesamte Polymer (Unterbibliotheken **125**, **126** und **127**; maximal 310 μmol Aminofunktionen) wurde auf zwei Gefäße verteilt. Das Polymer in einem der Gefäße (maximal 17.1 μmol Aminofunktionen) wurde mit 31.3 mg FmocGln(Trt) (51.3 μmol , 3.00 eq.) und 26.7 mg PyBop (51.3 μmol , 3.00 eq.) in 40.0 ml 3%igem NMM/DMF versetzt und die Reaktionsmischung zwei Stunden geschüttelt. Nachdem das Polymer abfiltriert worden war, wurde es fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, anschließend zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen; Fmoc-Bestimmung: 16.8 μmol ; 11% Peptid-Code.

Nun wurden beide Polymeräquivalente jeweils mit 96.5 mg FmocAla (310 μmol , 2.00 eq.) und 161 mg PyBop (310 μmol , 2.00 eq.) in 40.0 ml 3%igem NMM/DMF versetzt und die Reaktionsmischungen wieder zwei Stunden geschüttelt. Dann wurden die Polymere abfiltriert, fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, anschließend zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen, wurden die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht; Fmoc-Bestimmung: 1. Polymeräquivalent: 17.1 μmol , 11% Peptid-Code; 2. Polymeräquivalent: 16.9 μmol , 11% Peptid-Code.

Zur Dihydroxylierung wurde zu den beiden Polymeräquivalenten jeweils eine Lösung von 434 mg AD-Mix- β bzw. AD-Mix- α (0.40 mol-% Os und 1.00 mol-% der PHAL-Liganden **57** bzw. **87**, jeweils bezogen auf die maximale Stoffmenge an Olefin von 310 μmol) sowie 29.5 mg (310 μmol , 1.00 eq. bezogen auf die maximale Stoffmenge an Olefin) Methansulfonsäureamid in 20.0 ml THF : Wasser (1:1) gegeben und 20 Stunden bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend wurden die Polymere abfiltriert und fünfmal mit je 30.0 ml THF, THF : Wasser (1:1) und Wasser gewaschen.

Nachdem beide Polymeräquivalente vereinigt worden waren, wurde die gesamte Bibliothek zweimal für drei Stunden in 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol gegeben und bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und fünfmal mit je 20.0 ml THF, THF : Wasser (1:1) und Wasser gewaschen. Das feuchte Polymer **128** hatte danach eine Masse von 4.08 g.

7.9 Screening der Hydroxyligandenbibliothek 108 nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen mit Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** in Mikrotitrationsplatten [RAR-I-291]



Es wurden zweimal fünfzehn 96er Mikrotitrationsplatten mit jeweils 15 Polymerkügelchen der Bibliothek **108** pro Vertiefung bestückt.

Danach wurden in jeweils fünfzehn Mikrotitrationsplatten die Vertiefungen mit den nachfolgend aufgeführten Lösungen gefüllt. Das Gesamtvolumen betrug in jeder Vertiefung 200 μl , was einer Ligandenkonzentration von etwa 2.25×10^{-5} M (etwa 4.50 nmol) entspricht.

- 1) 100 μl 5.00×10^{-2} M MOPSO-Puffer, pH = 7.0
 50.0 μl 1.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** (50.0 nmol)
 50.0 μl 1.00×10^{-3} M EuCl_3 (50.0 nmol)

- 2) 100 μl 5.00×10^{-2} M EPPS-Puffer, pH = 8.0
 50.0 μl 1.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** (50.0 nmol)
 50.0 μl Wasser
 50.1

Zusätzlich wurden noch zwei Mikrotitrationsplatten entsprechend 1) und 2) als Kontrolle ohne die Liganden gefüllt.

Die Reaktionen wurden jeweils in einem UV-Vis-Scanning-Spektroskop absorptionspektroskopisch bei 405 nm verfolgt.

Dabei zeigte sich in den Ansätzen 1) und 2) ein gleichmäßiger Anstieg der Absorptionen in allen Vertiefungen. Es konnte in keiner Vertiefung eine überdurchschnittliche Zunahme der Extinktion beobachtet werden.

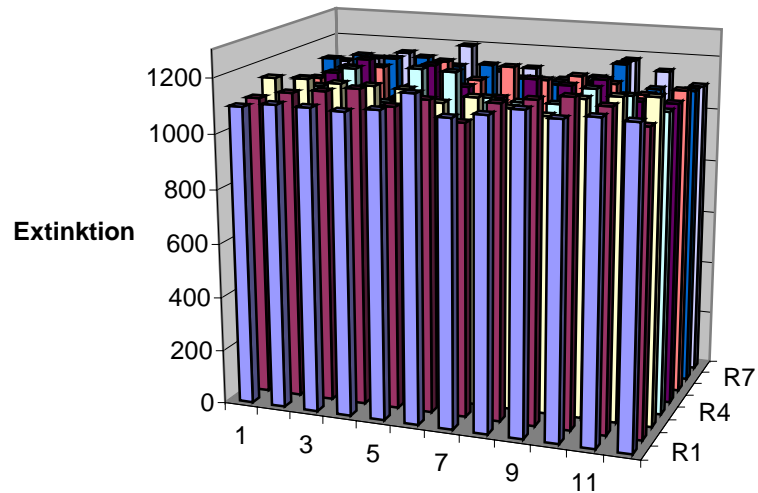


Abb. 7.9.1: Exemplarisches Screeningergebnis einer Mikrotitrationsplatte aus 1) mit EuCl_3 , $\text{pH} = 7.0$, 20 h; Extinktion in willkürlichen Einheiten

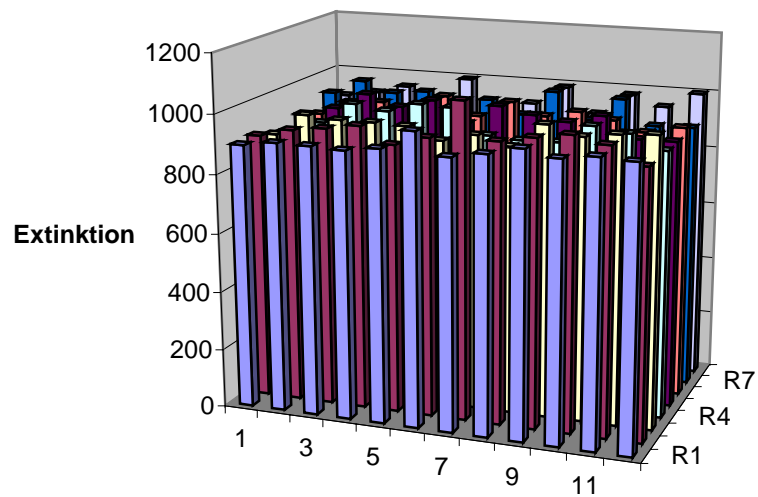


Abb. 7.9.2: Kontrolle ohne Liganden mit EuCl_3 , $\text{pH} = 7.0$, 20 h; Extinktion in willkürlichen Einheiten

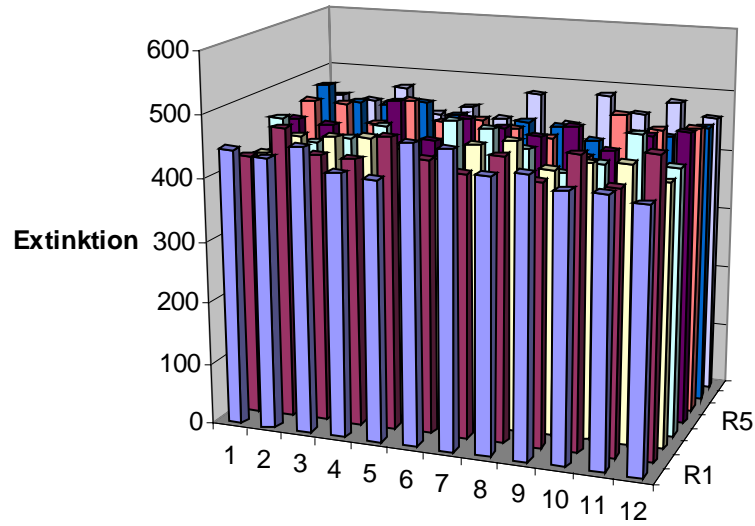


Abb. 7.9.3: Exemplarisches Screeningergebnis einer Mikrotitrationsplatte aus 2) ohne Metall, pH = 8.0, 2 d; Extinktion in willkürlichen Einheiten

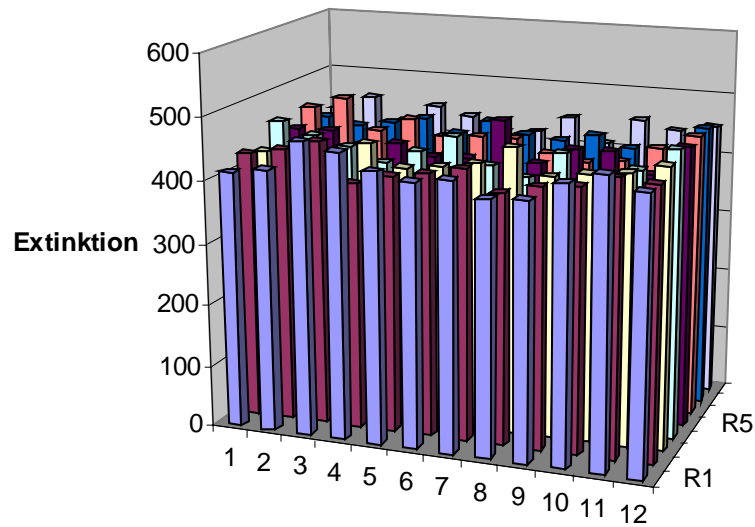
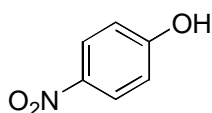
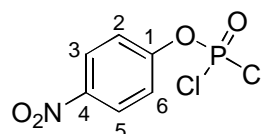
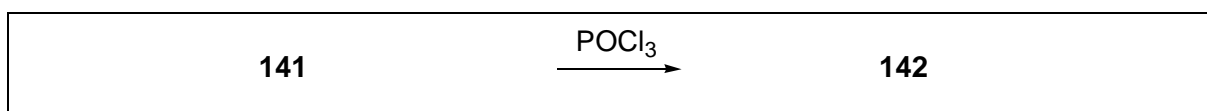


Abb. 7.9.4: Kontrolle ohne Ligand, pH = 8.0, 2 d; Extinktion in willkürlichen Einheiten

7.10 Synthese des Testsubstrates **35** für das Berlinerblau Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäureesterasen

7.10.1 Synthese des (4-Nitrophenyl)-phosphorodichloridats **142** [RAR-I-122]^[87]

**141****142**

20.9 g (150 mmol, 1.00 eq.) 4-Nitrophenol **141** und 138 g (900 mmol, 6.00 eq.) frisch destilliertes Phosphorylchlorid wurden in einem 250 ml Einhalskolben unter Stickstoff mit 500 mg Natriumchlorid versetzt und acht Stunden unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde das überschüssige Phosphorylchlorid abdestilliert, bevor der Rückstand im Ölpumpenvakuum hinter einer Explosionsschutzscheibe destilliert wurde. Bei einem Druck von 3.00 mbar und einer Temperatur von 175 °C konnten 29.1 g (114 mmol, 76% der Theorie) eines gelben Öles **142** isoliert werden, welches bei Raumtemp. kristallisierte (Lit.^[87]: 2.70 mbar, 154 °C, 88% Ausbeute).

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3116, 3084 [beide m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 1616 [m], 1590 [s, beide $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1529 [s, $\nu_{\text{asym}}(\text{N=O})$]; 1488 [s, $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1350 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{N=O})$]; 1303 [s, $\nu(\text{P=O})$]; 1198 [s, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1161 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{P-O-C})$]; 1107 [m, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 1012 [m], 943 [s, beide $\nu(\text{P-O})$]; 859 [s], 756 [s, beide $\gamma(\text{C-H})$ aryl]; 685, 621 [beide s]; 594 [s, $\delta(\text{P-O-C})$].

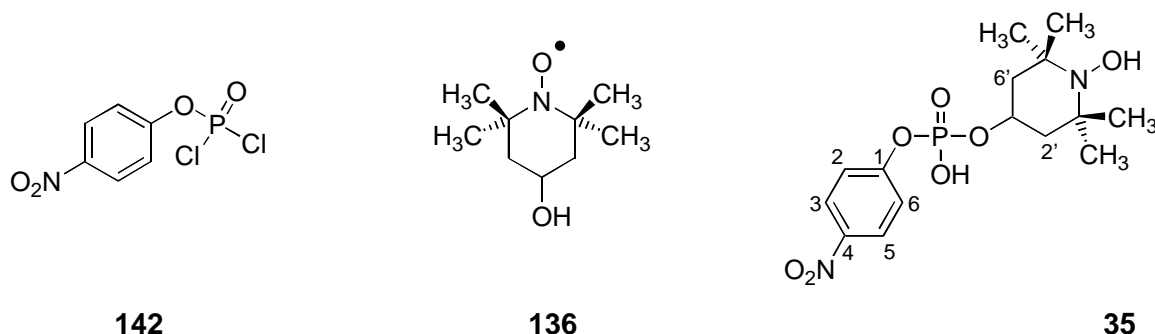
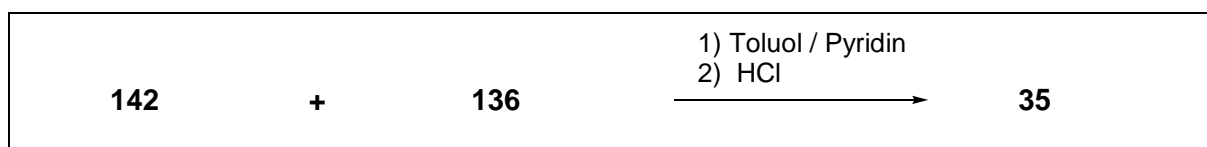
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.50 (d, $^3J_{2\text{-H-3-H}; 6\text{-H-5-H}} = 9.2$ Hz, 2H, aryl-2,6-H), 8.34 (d, $^3J_{3\text{-H-2-H}; 5\text{-H-6-H}} = 9.2$ Hz, 2H, aryl-3,5-H).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ = 121.51 (d, $^3J_{\text{C-2,6-P}} = 5.7$ Hz, aryl-CH-2,6), 126.11 (d, $^4J_{\text{C-3,5-P}} = 1.1$ Hz, aryl-CH-3,5), 146.25 (s, aryl-C-4), 153.61 (s, $^2J_{\text{C-1-P}} = 10.7$ Hz, aryl-C-1).

³¹P-NMR: (90 MHz, CHCl₃) δ = 3.2.

FAB-HRMS: m/z (% Int., Summenformel, Δmmul): 254.9261 (50, C₆H₄O₄³⁵Cl₂PN⁺, 0.6) [M⁺], 224.9266 (32, C₆H₄O₃³⁵Cl₂P⁺, 0.9), 208.9310 (15, C₆H₄O₂³⁵Cl₂P⁺, 1.6).

7.10.2 Synthese von (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyloxy)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat **35** [RAR-I-278]

**142****136****35**

2.00 g (7.81 mmol, 1.50 eq.) **142** und 1.23 g (15.63 mmol, 3.00 eq.) abs. Pyridin wurden in 40.0 ml abs. Toluol gelöst und bei Raumtemp. mit einer Lösung von 0.90 g (5.21 mmol, 1.00 eq.) 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl **136** in 50.0 ml abs. Toluol innerhalb von zwei Stunden unter Rühren versetzt. Es wurde über Nacht gerührt, anschließend das ausgefallene Pyridiniumchlorid abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der gelbliche Rückstand wurde in 30.0 ml Wasser aufgenommen und mit konz. HCl bis pH = 1 versetzt. Beim Erwärmen auf 50 °C bildete sich nach zwei Stunden ein weißer Niederschlag, der abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert wurde (1.58 g **35**, 4.22 mmol, 81% der Theorie).

Schmp.: 240 °C (Zersetzung).

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3421 [m, ν(O-H) in H-Brücken]; 3115, 3119 [beide m, ν(C-H) aryl]; 2998, 2956 [beide m, ν(C-H) aliphatic]; 2496 [br. s, ν(O-H)]; 1608; 1592 [beide s, ν(C=C) aryl]; 1513 [s, ν_{asym}(N=O)]; 1495 [s, ν(C=C) aryl]; 1391 [s, δ(OH)]; 1351 [s, ν_{sym}(N=O)]; 1257 [s, ν(P=O)]; 1225 [s, ν_{asym}(C-O)]; 1199 [s, ν_{sym}(C-O)]; 1087 [m, ν_{sym}(P-O-C)]; 1055 [s, ν_{sym}(P-O-C)]; 989 [m, ν(P-O)]; 896, 865, 811, 759 [alle s, γ(C-H) aryl]; 554 [s, δ(P-O-C)].

¹H-NMR: (300 MHz, D₂O und 1.00 eq. NaOH_(s)) δ = 1.17 (br. s, 12H, CH₃), 1.59-1.67 (m, 2H, 2'-H_a, 6'-H_a), 2.00-2.04 (m, 2H, 2'-H_b, 6'-H_b), 4.58 (br. s, 1H, CHOP), 7.35 (d, ³J_{2-H-3-H; 6-H-5-H} = 8.9 Hz, 2H, aryl-2,6-H), 8.27 (d, ³J_{3-H-2-H; 5-H-6-H} = 8.9 Hz, 2H, aryl-3,5-H).

¹³C-NMR: (75 MHz, D₂O und 1.00 eq. NaOH_(s)) δ = 20.77 (q, CH₃), 30.27 (q, CH₃), 45.04 (t, CH₂-2',6'), 60.96 (s, C(CH₃)₂), 69.82 (d, CHOP), 120.81 (d, ³J_{C-2,6-P} = 5.2 Hz, aryl-CH-2,6), 126.28 (d, aryl-CH-3,5), 143.82 (s, aryl-C-4), 157.92 (s, ²J_{C-1-P} = 6.7 Hz, aryl-C-1).

³¹P-NMR: (120 MHz, D₂O und 1.00 eq. NaOH_(s)) δ = -4.95.

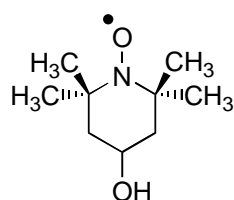
FAB-HRMS: m/z (% Int., Summenformel, Δmmul): 375.1311 (6.5, C₁₅H₂₄N₂O₇P⁺, 1.0) [M+H⁺].

EA: C₁₅H₂₃N₂O₇P; M = 374.33 g/mol

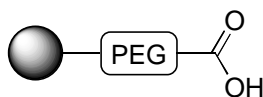
ber.:	C: 48.13%	H: 6.19%	N: 7.48%	P: 8.27%
gef.:	C: 48.02%	H: 6.12%	N: 7.40%	P: 8.03%

7.11 Berlinerblau Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen

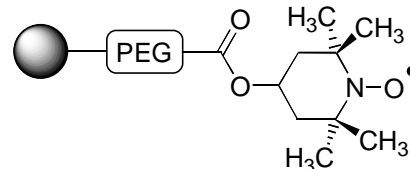
7.11.1 Anknüpfung von 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl 136 an TentaGel™-COOH 137 [RAR-I-168]



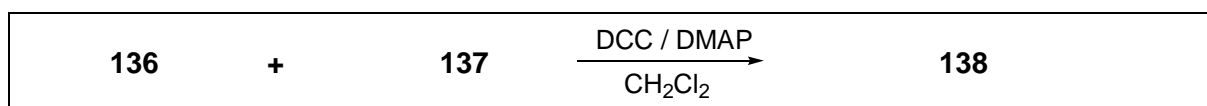
136



137



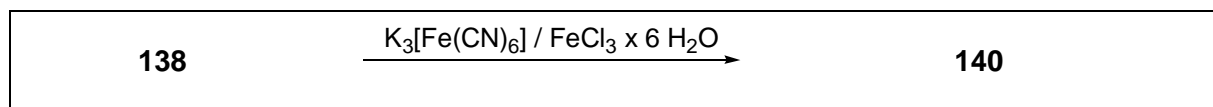
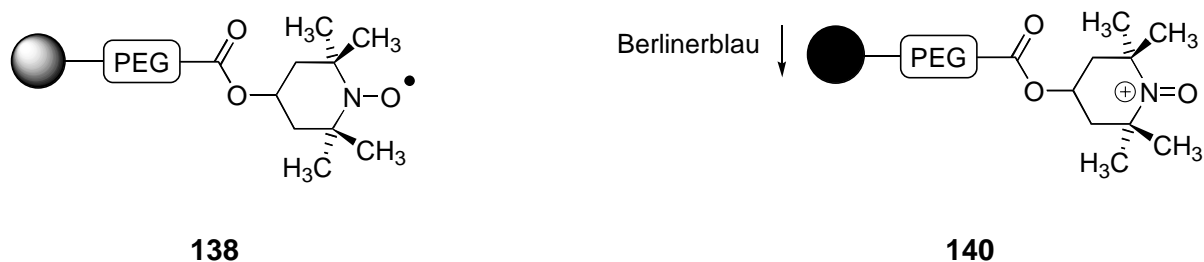
138



100 mg (26.0 μmol COOH-Gruppen, 1.00 eq.) TentaGelTM-COOH **137** wurden unter Stickstoff zu einer Lösung von 22.4 mg (130 μmol , 5.00 eq.) 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl **136**, 53.6 mg (260 μmol , 10.0 eq.) DCC und 1.00 mg DMAP in 1.00 ml abs. Methylenchlorid gegeben und anschließend 24 h bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde das Polymer abfiltriert und mit Wasser, THF, Methylenchlorid und nochmals Wasser gewaschen. Die Trocknung im Ölpumpenvakuum ergab 105 mg eines gelben Polymers.

Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

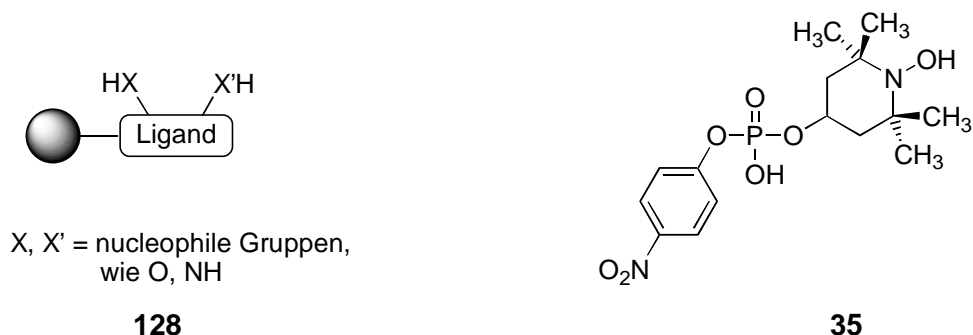
7.11.2 Entwicklung des mit 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl beladenen TentaGelsTM **138** [RAR-I-168]



In einer Fritte wurden 10.0 mg aminoxylbeladenes TentaGelTM **138** (2.60 μmol Aminoxylfunktionen) 30 s mit 10.0 ml einer Mischung (1:1) aus wässrigen Lösungen von 1%iger $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und 15%iger $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ versetzt, danach das Entwicklungsreagenz abgesaugt und die Polymerkügelchen mit Wasser gewaschen. Unter dem Mikroskop waren daraufhin deutlich dunkelblau gefärbte Polymerkügelchen zu sehen. Die blaue Färbung trat auch auf, wenn die aminoxylbeladenen Polymerkügelchen vor der Entwicklung mit 10%iger HCl behandelt wurden.

Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

7.11.3 Screening der Bibliothek 128 mit dem Testsubstrat 35 [RAR-I-306]



Es wurden jeweils 81.6 mg der feuchten Bibliothek **128** (entspricht 20 mg trockenem Polymer und damit etwa 18000 Polymerkügelchen) in 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben, der die in der Tabelle angegebenen Konzentrationen an Metallsalzen und Testsubstrat **35** aufwies. Die Reaktionsbedingungen sind ebenfalls der untenstehenden Tabelle zu entnehmen. Das Volumen betrug dabei 4.00 ml, was eine Ligandkonzentration von etwa 1.50×10^{-3} M ergibt. Zusätzlich wurden auch Untersuchungen ohne Metallsalzzusatz in 0.10 M EPPS-Puffer bei pH = 8.0 unternommen. In allen Reaktionslösungen mit Metallsalzzusatz kam es dabei mit fortschreitender Reaktionsdauer zum Ausfallen von farblosen Niederschlägen, die beim anschließenden Waschen mit Wasser entfernt wurden.

Tab. 7.11.1: Screening der Bibliothek **128** im Berlinerblau Test

Testsubstrat 35	Metallsalz	Reaktionsbedingungen
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M CuCl ₂	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M ZnCl ₂	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M FeCl ₃	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M EuCl ₃	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M ZrCl ₄	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M (NH ₄) ₂ Ce(NO ₃) ₆	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M Na ₃ [Co(NO ₂) ₆]	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	-	Raumtemp., 1 d und 7 d
1.00×10^{-3} M	-	50 °C, 1 d und 7 d

Nach der Reaktion wurden die Proben für das Anfärben mit der $K_3[Fe(CN)_6]$ / $FeCl_3$ -Mischung vorbereitet. Dazu wurden alle Proben folgendermaßen gewaschen:

- 1) Waschen mit Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und DMF; jeweils 5 x 5 ml
- 2) Waschen mit 10%iger wäßriger 2-Methoxyethylamin-Lösung, um ionisch gebundenen Phosphorsäurediester zu entfernen; jeweils 3 x 5 ml über 1 Tag verteilt
- 3) Waschen mit Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und DMF; jeweils 5 x 5 ml
- 4) Waschen mit 10%iger wäßriger EDTA-Lösung, um redoxaktive Metalle zu entfernen; jeweils 2 x 5 ml über 1 Tag verteilt
- 5) Waschen mit Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und DMF; jeweils 5 x 5 ml
- 6) Waschen mit wäßriger NaOH-Lösung (pH = 11); jeweils 5 ml über Nacht
- 7) Waschen mit Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und DMF; jeweils 5 x 5 ml

Entwicklung:

Die Polymerkügelchen wurden in eine Fritte gegeben, mit 10 ml Wasser gewaschen und anschließend 20 s mit 20.0 ml einer Mischung, die zu gleichen Teilen aus einer wäßrigen 1%igen $K_3[Fe(CN)_6]$ - und einer 15%igen wäßrigen $FeCl_3$ -Lösung direkt vor dem Entwickeln angesetzt wurde, versetzt. Danach wurde abfiltriert und nochmals mit Wasser (2 x 10 ml) gewaschen. Anschließend wurden die Polymerkügelchen auf einem Objektträger verteilt und unter dem Mikroskop nach auffällig blaugefärbten Vertretern durchsucht.

So konnten aus jedem der obigen Ansätze einige blaue Polymerkügelchen isoliert werden. Von den positiven Polymerkügelchen, die nach einem Tag Reaktionsdauer isoliert wurden, wurde danach jeweils durch Edman-Abbau die Aminosäuresequenz des Peptid-Codes bestimmt:

Tab. 7.11.2: *Peptid-Codes der positiven Polymerkügelchen*

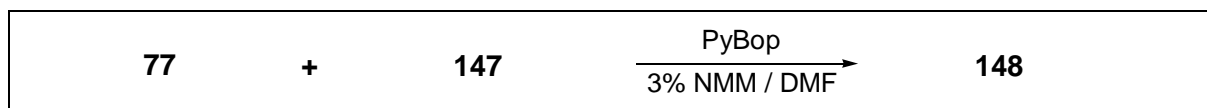
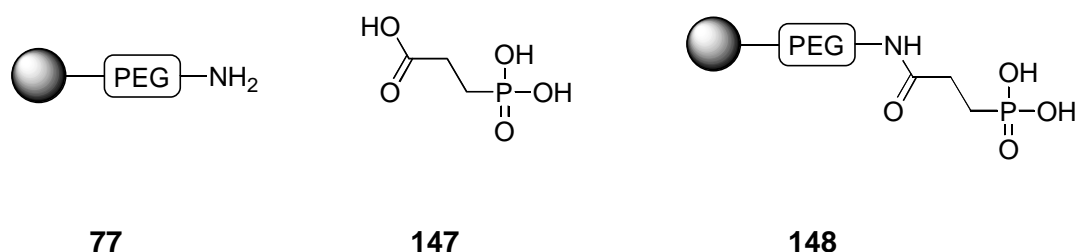
Screening- ansatz	Peptid-Code des positiven Polymerkügelchens									
CuCl ₂ , Raumtemp.	H-Ala	Gln	Phe (Arg)	Gly	Arg (Ala)	Lys	Arg (Ala)	Ala	Ala	Ala-OH
ZnCl ₂ , Raumtemp.	H-Ala	Gln	Phe	Gly	Arg	Lys	His	Ala	Ala	Ala-OH
FeCl ₃ , Raumtemp.		H-Ala	Gln	Val	(Ala)	(Arg)	(Arg)	(Ala)	Ala	Ala-OH
EuCl ₃ , Raumtemp.	H-Ala	Gln	Val	Ala (Gln)	Gly (Ala)	(Ala)	(Ala)	(Ala)	(Ala)	(Ala-OH)
ZrCl ₄ , Raumtemp.	H-Ala	Gln	Val	Lys Ala (Gly)	His (Ala)	Ala (Gln)	Ala	Ala	Ala	(Ala-OH)
ohne Metall, 50 °C	H-Ala	Phe	Gly	Ala Arg	Ala Arg	Ala Arg	Ala	Ala	Ala	(Ala-OH)
ohne Metall, Raumtemp.	H-Ala	Gln	Phe	Arg	His Ala	Arg His Ala	Ala	Ala	Ala	(Ala-OH)

Die Stoffmengen der sequenzierten Aminosäuren betragen in der Regel 5-15 pmol; Angaben in Klammern beziehen sich auf Stoffmengen kleiner 5 pmol.

Wurde die Bibliothek nach der Synthese in der oben beschriebenen Weise mit der K₃[Fe(CN)₆] / FeCl₃-Mischung behandelt, ohne vorher mit dem Testsubstrat umgesetzt worden zu sein, so färbten sich etwa 1% der Polymerkügelchen dunkel an. Dabei handelte es sich aber nicht um das leuchtende Blau, welches sich für positive Polymerkügelchen ergab, sondern um eine türkisfarbene bis schwarze Färbung.

7.12 Kresylviolett Screeningverfahren nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen

7.12.1 Anknüpfung von 3-Phosphonopropionsäure **147** an Amino-TentaGel™ **77** [RAR-I-319]

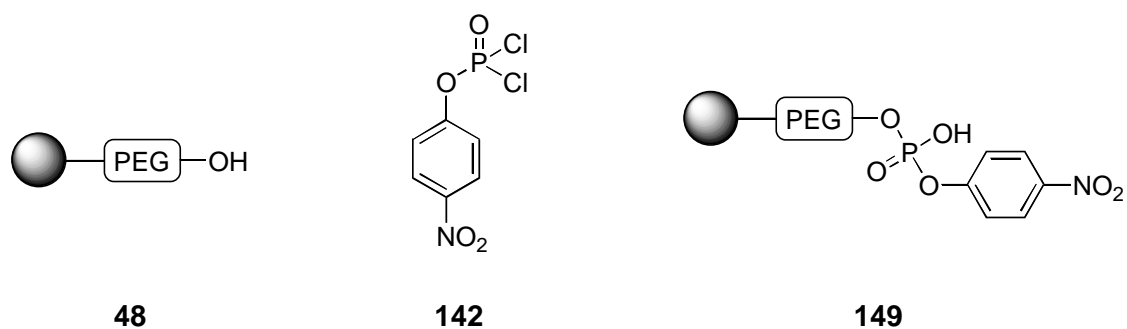


50.0 mg (15.5 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor 5.78 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) 3-Phosphonopropionsäure **147**, 16.1 mg PyBop (31.0 μmol , 2.00 eq.) und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben, die Reaktionsmischung darauf zwei Stunden bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert wurde. Zur Reinigung wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen.

Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

Kaiser-Test: negativ

7.12.2 Anknüpfung von (4-Nitrophenyl)-phosphorodichloridat **142** an Hydroxy-TentaGel™ **48** [RAR-I-310]



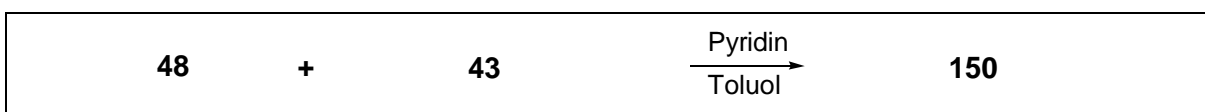
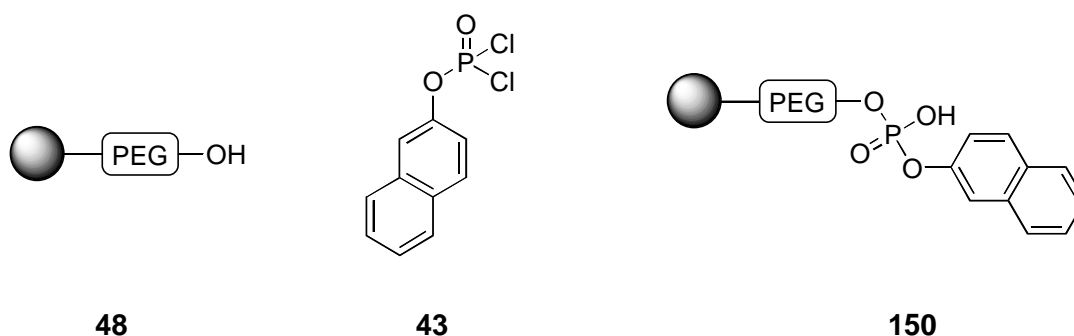


50.0 mg (15.5 μmol Hydroxyfunktionen, 1.00 eq.) Hydroxy-TentaGel™ **48** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. Toluol gewaschen, bevor 15.9 mg (62.0 mmol, 4.00 eq.) (4-Nitrophenyl)-phosphorodichloridat **142** und 19.6 mg (248 mmol, 16.0 eq.) abs. Pyridin zugegeben, die Reaktionsmischung einen Tag bei Raumtemp. geschüttelt und darauf das Polymer abfiltriert wurde. Anschließend wurde das Polymer mit 5.00 ml 5%iger wässriger NaOH-Lösung versetzt, 18 h bei 50 °C belassen und schließlich abfiltriert.

Zur Reinigung wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und Toluol gewaschen.

Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

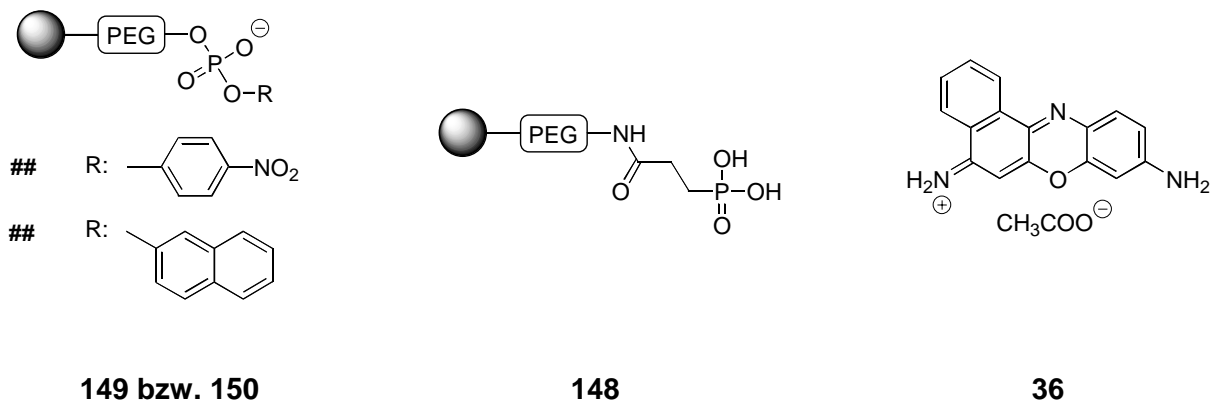
7.12.3 Anknüpfung von (2-Naphthyl)-phosphorodichloridat **43** an Hydroxy-TentaGel™ **48** [RAR-I-311]



50.0 mg (15.5 μmol Hydroxyfunktionen, 1.00 eq.) Hydroxy-TentaGel™ **48** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. Toluol gewaschen, dann wurden 16.2 mg (62.0 mmol, 4.00 eq.) (2-Naphthyl)-phosphorodichloridat **43** und 19.6 mg (248 mmol, 16.0 eq.) abs. Pyridin zugegeben, die Reaktionsmischung einen Tag bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Das Polymer wurde nun mit 5.00 ml 5%iger wässriger NaOH-Lösung versetzt, 18 h bei 50 °C belassen und schließlich abfiltriert, bevor es fünfmal mit je 10.0 ml Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und Toluol gewaschen wurde.

Das IR-Spektrum war nicht aussagekräftig.

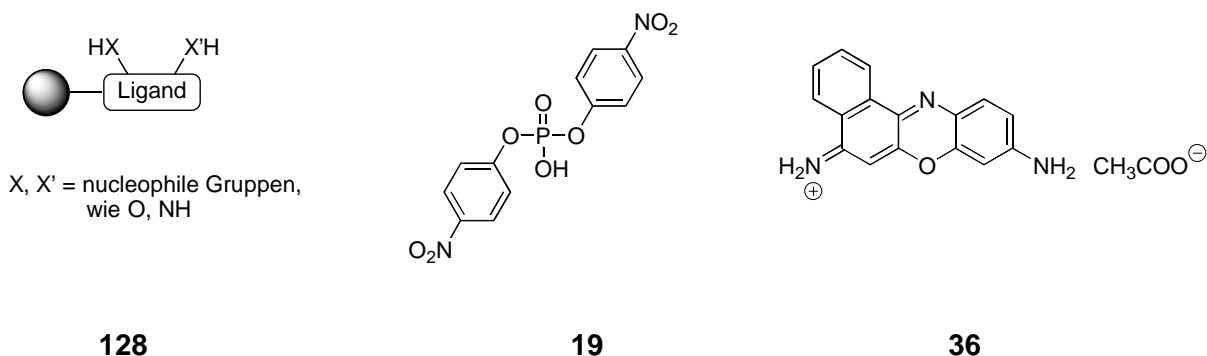
7.12.4 Anfärben der polymergebundenen Phosphorsäurediester **149** und **150** sowie der polymergebundenen Phosphonsäure **148** mit Kresylviolett Acetat **36** [RAR-I-312]



Zunächst wurden 5.00 mg Kresylviolett Acetat **36** in 10.0 ml Wasser gegeben und nach 30 min der unlösliche Rückstand abfiltriert.

Das Filtrat wurde zu jeweils 5.00 mg (1.55 μ mol polymergebundene Phosphonsäure bzw. Phosphorsäurediester) der Polymere **148**, **149** bzw. **150** gegeben und diese nach einer Stunde abfiltriert. Danach wurden die Polymerkügelchen mit Wasser (2 x 10 ml) gewaschen. Alle Polymerkügelchen der drei Proben hatten danach eine violette Färbung angenommen und fluoreszierten zusätzlich bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 360$ nm rot.

7.12.5 Screening der Bibliothek **128** nach künstlichen Phosphorsäurediesterasen mit dem Testsubstrat Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** und Kresylviolett Acetat **36** [RAR-I-314]



Es wurden jeweils 81.6 mg der feuchten Bibliothek **128** (entspricht 20 mg trockenem Polymer und damit etwa 18000 Polymerkügelchen) in 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben,

der die in der Tabelle angegebenen Konzentrationen an Metallsalzen und Testsubstrat **19** aufwies. Die Reaktionsbedingungen sind ebenfalls der untenstehenden Tabelle zu entnehmen. Das Volumen betrug dabei 4.00 ml, was einer Ligandkonzentration von 1.50×10^{-3} M entspricht. Zusätzlich wurden auch Untersuchungen ohne Metallzusatz in 0.10 M EPPS-Puffer bei pH = 8.0 unternommen. Während der Reaktion fielen in den Ansätzen mit Metallsalzzugabe farblose Niederschläge aus, die beim anschließenden Waschen mit Wasser entfernt wurden.

Tab. 7.12.1: *Screening der Bibliothek 128 im Kresylviolett Test*

Testsubstrat 19	Metallsalz	Reaktionsbedingungen
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M CuCl ₂	Raumtemp., 1 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M ZnCl ₂	Raumtemp., 1 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M FeCl ₃	Raumtemp., 1 d
1.00×10^{-3} M	2.00×10^{-2} M EuCl ₃	Raumtemp., 1 d
1.00×10^{-3} M	-	Raumtemp., 1 d

Nach der Reaktion wurden die Proben für das Anfärben mit Kresylviolett Acetat **36** vorbereitet. Dazu wurden alle Proben folgendermaßen gewaschen:

- 1) Waschen mit Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und DMF; jeweils 5 x 5 ml
- 2) Waschen mit 10%iger wäßriger 2-Methoxyethylamin-Lösung, um ionisch gebundenen Phosphorsäurediester zu entfernen; jeweils 3 x 5 ml über 1 Tag verteilt
- 3) Waschen mit Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und DMF; jeweils 5 x 5 ml
- 4) Ansäuern mit 3.00 ml Trifluoressigsäure
- 5) Waschen mit Wasser, THF : Wasser (1:1), THF und DMF; jeweils 5 x 5 ml

Entwicklung:

5.00 mg Kresylviolett Acetat **36** wurden in 10.0 ml Wasser gegeben. Nach 30 min wurde der unlösliche Rückstand abfiltriert.

Das Filtrat wurde zu den gewaschenen Polymerkügelchen gegeben und nach einer Stunde abfiltriert. Danach wurden die Polymerkügelchen mit Wasser (2 x 10 ml) gewaschen und auf einem Objektträger verteilt. Unter dem Mikroskop erfolgte danach die Suche nach violett gefärbten Polymerkügelchen, die zusätzlich bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 360$ nm rot fluoreszierten.

Aus dem Screeningansatz mit ZnCl_2 konnte auf diese Weise ein positiver Vertreter der Bibliothek isoliert und dessen Aminosäuresequenz des Peptid-Codes bestimmt werden.

Tab. 7.12.2: *Peptid-Code des positiven Polymerkügelchens*

Screening- ansatz	Peptid-Code des positiven Polymerkügelchens									
ZnCl_2 , Raumtemp.	H-Ala	Gln	Phe	Leu	His	Lys	His	Ala	Ala	Ala-OH

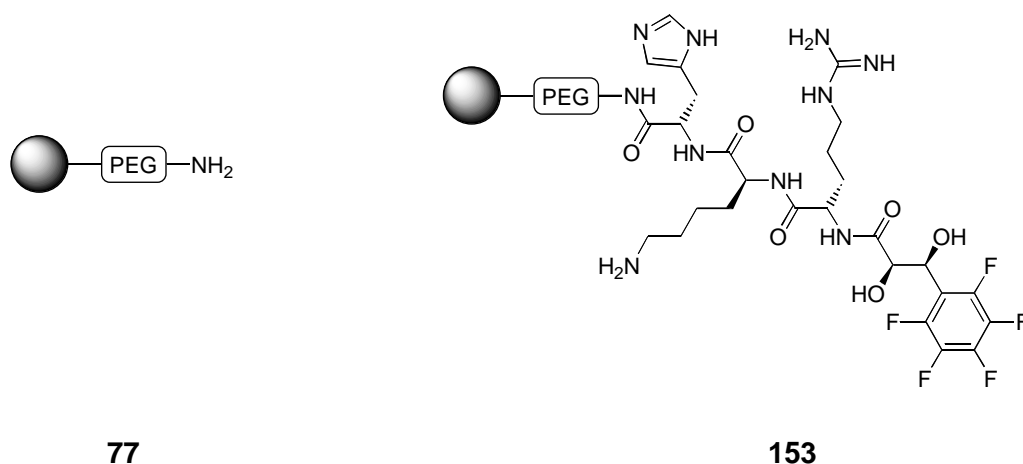
Die Stoffmengen der sequenzierten Aminosäuren betragen in diesem Fall 25 pmol.

Die Bibliothek **128** zeigte nach der Synthese (ohne Reaktion mit dem Testsubstrat **19**) bei diesem Farbttest auch nach einem Tag keinerlei positive Reaktion; die Polymerkügelchen blieben absolut farblos.

7.13 Synthese der positiven Liganden aus den beiden Screeningverfahren und deren photometrische Aktivitätskontrolle auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität

7.13.1 Synthese der positiven Liganden aus dem Berlinerblau Screeningverfahren an Amino-TentaGel™

**7.13.1.1 Synthese von (N^α -[(2*R*,3*S*)-2,3-Dihydroxy-3-(pentafluorphenyl)propionyl]-L-arginyl-L-lysyl-L-histidyl)amino)-TentaGel™
153 [RAR-I-320]**



77	<ol style="list-style-type: none"> 1. FmocHis(Trt), PyBop in 3% NMM / DMF 2. 20% Piperidin / DMF 3. Zweimaliges Wiederholen von 1. und 2. mit FmocLys(Boc) und FmocArg(Pmc) <hr style="width: 60%; margin: 10px auto;"/> <ol style="list-style-type: none"> 4. Pentafluorphenylzimtsäure, PyBop in 3% NMM / DMF 5. AD-Mix-α / THF : Wasser (1:1) 6. 95% TFA / 5% Ethanthiol 	153
-----------	---	------------

50.0 mg (15.5 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt wurden:

Zunächst wurden die Fmoc-Aminosäure (31.0 μmol , 2.00 eq.), 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben, dann die Reaktionsmischung zwei Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Nun wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

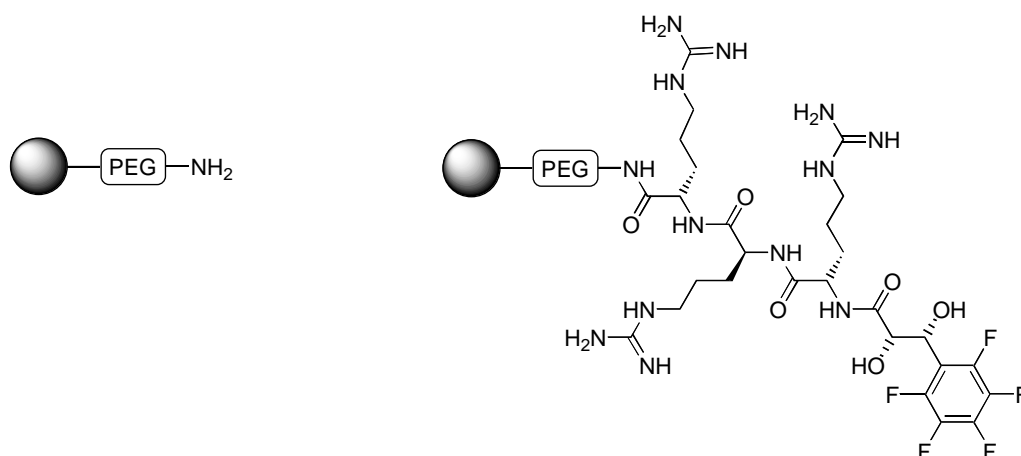
Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal durchgeführt.

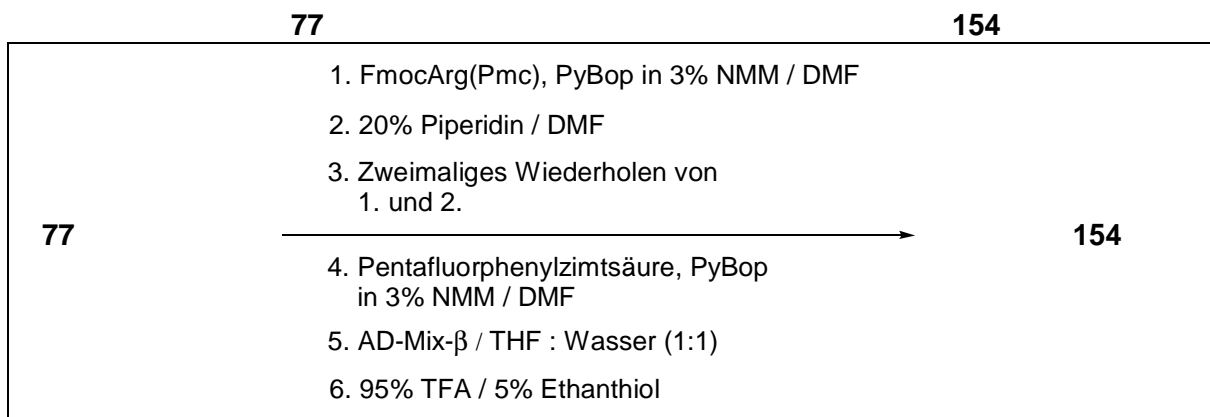
1. Kupplung mit 19.2 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.2 μmol , 98%.
2. Kupplung mit 14.5 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 14.9 μmol , 96%.
3. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.0 μmol , 97%.

Nun erfolgte die Zugabe von 7.38 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) (*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorphenylzimtsäure **120**, 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%igem NMM/DMF. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden geschüttelt, anschließend das Polymer abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Nun wurde die Anknüpfung des Olefines nochmals wiederholt, das Polymer schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und ein *Kaiser*-Test durchgeführt, welcher ergab, daß keine freien Aminofunktionen mehr vorhanden waren.

Schließlich wurde das Polymer zur Dihydroxylierung in 20.0 ml THF : Wasser (1:1) mit 21.7 mg AD-Mix- α (0.40 mol-% Os und 1.00 mol-% (DHQ)₂PHAL **57**, bezüglich 15.5 μmol Olefin) und 1.47 mg Methansulfonsäureamid (15.5 μmol , 1.00 eq. bezüglich des Olefins) 18 h bei Raumtemp. geschüttelt. Es erfolgte die Reinigung des Polymers durch fünfmaliges Waschen mit je 20.0 ml THF, THF : Wasser (1:1), Wasser und abs. DMF. Zum Abspalten der Seitenschutzgruppen wurde das Polymer in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol zweimal drei Stunden bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen. Das feuchte Polymer **153** hatte danach eine Masse von 103 mg.

7.13.1.2 Synthese von ($\{N^\alpha$ -[(2*S*,3*R*)-2,3-Dihydroxy-3-(pentafluorphenyl)propionyl]-L-arginyl-L-arginyl-L-arginyl}amino)-TentaGel™ **154** [RAR-I-320]





50.0 mg (15.5 μ mol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt wurden:

Zunächst wurden die Fmoc-Aminosäure (31.0 μ mol, 2.00 eq.), 16.1 mg (31.0 μ mol, 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Dieses wurde nun fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch bezüglich ihres Gehaltes an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal wiederholt.

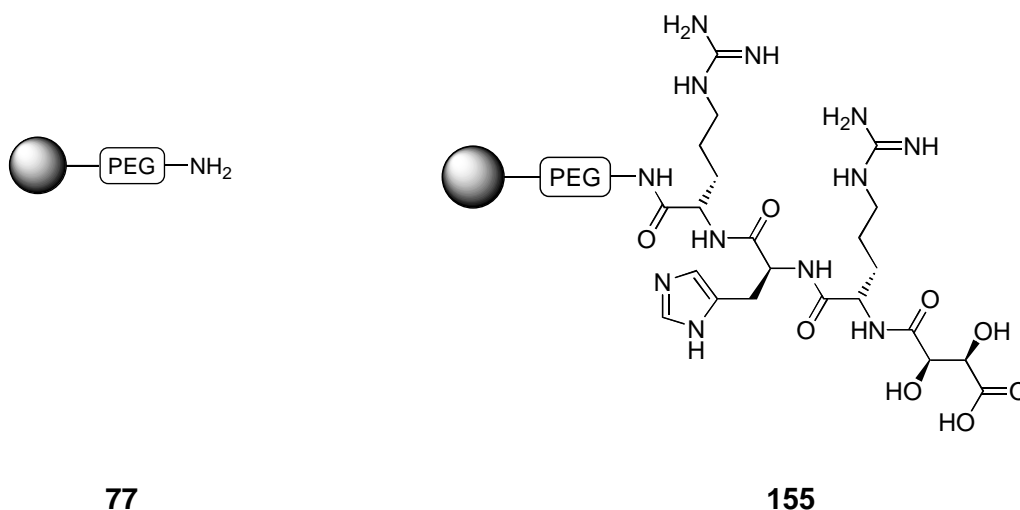
1. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.3 μ mol, 99%.
2. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.0 μ mol, 97%.
3. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.2 μ mol, 98%.

Nun erfolgte die Zugabe von 7.38 mg (31.0 μ mol, 2.00 eq.) (*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorphenylzimtsäure **120**, 16.1 mg (31.0 μ mol, 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%igem NMM/DMF. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden geschüttelt, anschließend das Polymer abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Die Anknüpfung des Olefines wurde nochmals wiederholt, das Polymer schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und ein *Kaiser*-Test durchgeführt, welcher keine freien Aminofunktionen mehr anzeigte.

Danach wurde das Polymer zur Dihydroxylierung in 20.0 ml THF : Wasser (1:1) mit 21.7 mg AD-Mix- β (0.40 mol-% Os und 1.00 mol-% (DHQD)₂PHAL **57**, jeweils bezogen auf die maxi-

male Stoffmenge an Olefin von 15.5 μmol) und 1.47 mg Methansulfonsäureamid (15.5 μmol , 1.00 eq. bezogen auf die maximale Stoffmenge an Olefin) 18 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend erfolgte die Reinigung des Polymers durch fünfmaliges Waschen mit je 20.0 ml THF, THF : Wasser (1:1), Wasser und abs. DMF. Zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen wurde das Polymer zweimal drei Stunden in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen. Das feuchte Polymer **154** hatte danach eine Masse von 105 mg.

7.13.1.3 Synthese von (N^α -[(2*R*,3*R*)-3-Carboxy-2,3-dihydroxypropionyl]-L-arginyl-L-histidyl-L-arginyl)amino)-TentaGel™ **155** [RAR-I-320]

**77**

1. FmocArg(Pmc), PyBop in 3% NMM / DMF
2. 20% Piperidin / DMF
3. Zweimaliges Wiederholen von 1. und 2. mit FmocHis(Trt) und FmocArg(Pmc)
4. Fumarsäure, PyBop in 3% NMM / DMF
5. AD-Mix- α / THF : Wasser (1:1)
6. 95% TFA / 5% Ethanthiol

155

50.0 mg (15.5 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Dann wurden die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt:

Zunächst wurden die Fmoc-Aminosäure (31.0 μmol , 2.00 eq.), 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben. Darauf wurde die Reaktionsmischung zwei Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert, welches darauf fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen wurde. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch bezüglich ihres Gehaltes an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

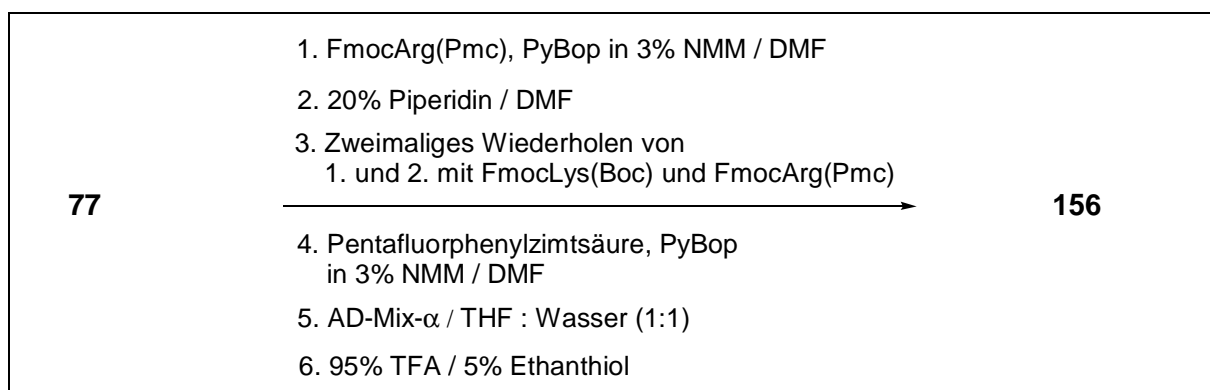
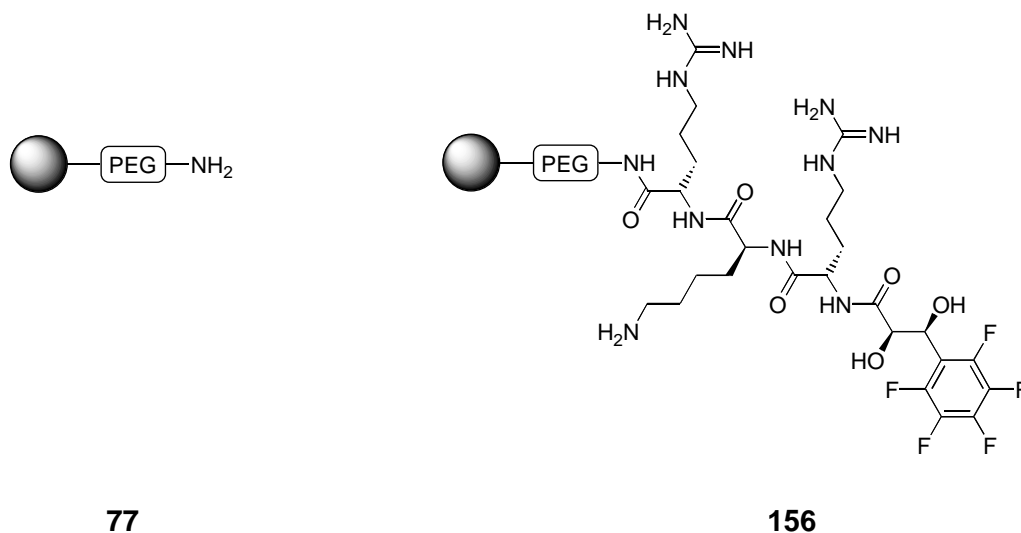
Diese Reaktionsfolge wurde anschließend noch zweimal durchlaufen.

1. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.2 μmol , 98%.
2. Kupplung mit 19.2 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.0 μmol , 97%.
3. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.3 μmol , 98%.

Nach dieser Reaktionsfolge wurden 3.60 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) Fumarsäure **115**, 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben. Nach dreistündigem Schütteln der Reaktionsmischung wurde das Polymer abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Dann wurde die Anknüpfung des Olefines noch einmal wiederholt, das Polymer schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und ein *Kaiser*-Test durchgeführt, welcher keine freien Aminofunktionen mehr anzeigte.

Danach wurde das Polymer zur Dihydroxylierung in 20.0 ml THF : Wasser (1:1) mit 21.7 mg AD-Mix- α (0.40 mol-% Os und 1.00 mol-% (DHQ)₂PHAL **87**, bezüglich 15.5 μmol Olefin) und 1.47 mg Methansulfonsäureamid (15.5 μmol , 1.00 eq. bezüglich des Olefins) 18 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend erfolgte die Reinigung des Polymers durch fünfmaliges Waschen mit je 20.0 ml THF, THF : Wasser (1:1), Wasser und abs. DMF. Zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen wurde das Polymer zweimal drei Stunden in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen. Das feuchte Polymer **155** wog danach 119 mg.

**7.13.1.4 Synthese von (N^α -[(2*R*,3*S*)-2,3-Dihydroxy-3-(pentafluorphenyl)propionyl]-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl)amino)-TentaGel™
156 [RAR-I-320]**



50.0 mg (15.5 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, dann wurden die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt:

Nach der Zugabe der Fmoc-Aminosäure (31.0 μmol , 2.00 eq.), 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%igem NMM/DMF wurde die Reaktionsmischung zwei Stunden geschüttelt. Das Polymer wurde abfiltriert, fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt sowie fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Zur Bestimmung der Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung wurden die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen analysiert.

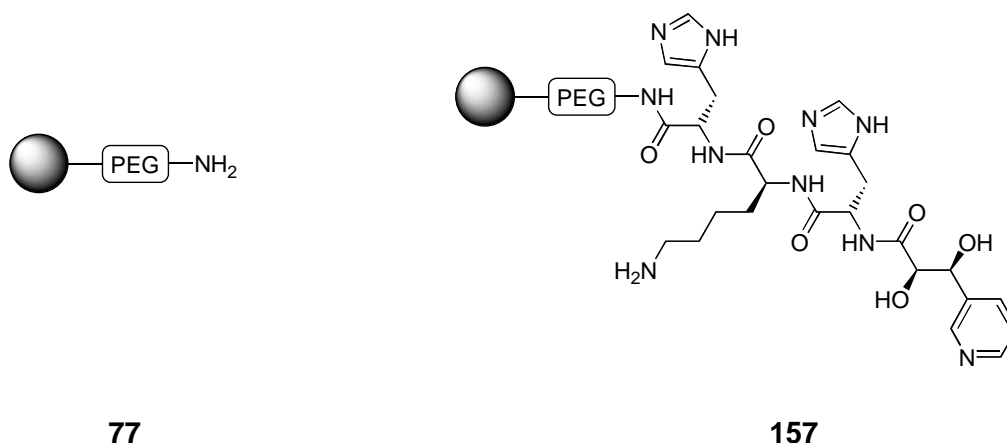
Diese Reaktionsfolge wurde anschließend noch zweimal durchlaufen.

1. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.4 μmol , 99%.
2. Kupplung mit 14.5 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.2 μmol , 98%.
3. Kupplung mit 20.5 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.3 μmol , 99%.

Nach dieser Reaktionsfolge wurden 7.38 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) (*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorphenylzimtsäure **120**, 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden geschüttelt, anschließend das Polymer abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Nachdem die Anknüpfung des Olefines nochmals wiederholt worden war, wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und einem *Kaiser*-Test unterzogen, der keine freien Aminofunktionen mehr anzeigte.

Zur Dihydroxylierung wurde das Polymer in 20.0 ml THF : Wasser (1:1) mit 21.7 mg AD-Mix- α (0.40 mol-% Os und 1.00 mol-% (DHQ)₂PHAL **87**, bezüglich 15.5 μmol Olefin) und 1.47 mg Methansulfonsäureamid (15.5 μmol , 1.00 eq. bezüglich des Olefins) 18 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend erfolgte die Reinigung des Polymers, indem es fünfmal mit je 20.0 ml THF, THF : Wasser (1:1), Wasser und abs. DMF gewaschen wurde. Um die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten, wurde das Polymer zweimal drei Stunden in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen. Das feuchte Polymer **156** wog danach 115 mg.

7.13.2 Synthese des positiven Liganden ($\{N^\alpha\text{-}[(2R,3S)\text{-}2,3\text{-Dihydroxy-3-(3\text{-pyridyl})\text{propionyl}]\text{-L-histidyl-L-lysyl-L-histidyl}\}\text{amino})\text{-TentaGel}^{\text{TM}} 157$ aus dem Kresylviolett Screeningverfahren [RAR-I-320]



77	<ol style="list-style-type: none"> 1. FmocHis(Trt), PyBop in 3% NMM / DMF 2. 20% Piperidin / DMF 3. Zweimaliges Wiederholen von 1. und 2. mit FmocLys(Boc) und FmocHis(Trt) <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> <ol style="list-style-type: none"> 4. (<i>E</i>)-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure, PyBop in 3% NMM / DMF 5. AD-Mix-α / THF : Wasser (1:1) 6. 95% TFA / 5% Ethanthiol 	157
-----------	--	------------

50.0 mg (15.5 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGelTM **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt wurden:

Es wurden zunächst die Fmoc-Aminosäure (31.0 μmol , 2.00 eq.), 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF hinzugefügt und die Reaktionsmischung darauf zwei Stunden geschüttelt. Das anschließend abfiltrierte Polymer wurde fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, hierauf zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen. Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal durchgeführt.

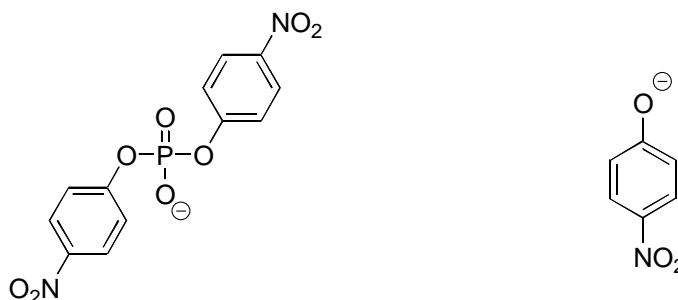
1. Kupplung mit 19.21 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.2 μmol , 98%.
2. Kupplung mit 14.53 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 14.7 μmol , 95%.
3. Kupplung mit 19.21 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 14.9 μmol , 96%.

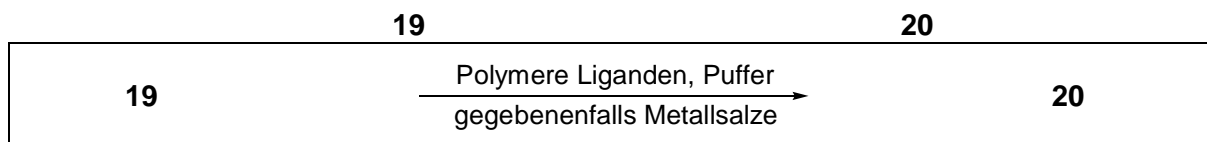
Nun wurden 4.62 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) (*E*)-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure **111**, 16.1 mg (31.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden geschüttelt, darauf das Polymer abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Die Anknüpfung des Olefines wurde wiederholt und das Polymer schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Die Durchführung eines *Kaiser*-Testes zeigte, daß keine freien Aminofunktionen mehr vorhanden waren.

Anschließend wurde das Polymer zur Dihydroxylierung in 20.0 ml THF : Wasser (1:1) mit 21.7 mg AD-Mix- α (0.40 mol-% Os und 1.00 mol-% (DHQ)₂PHAL **87**, bezüglich 15.5 μmol Olefin) und 1.47 mg Methansulfonsäureamid (15.5 μmol , 1.00 eq. bezüglich des Olefins) 18 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend wurde das Polymer abfiltriert und durch fünfmaliges Waschen mit je 20.0 ml THF, THF : Wasser (1:1), Wasser und abs. DMF gereinigt. Zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen wurde das Polymer zweimal drei Stunden in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen. Die Masse des feuchten Polymers **157** betrug danach 109 mg.

7.13.3 Photometrische Kontrolle der künstlichen Phosphorsäureesterase-Aktivität der Liganden aus den beiden Screeningverfahren

7.13.3.1 Aktivitätstest der Liganden **154** und **155** ohne Metall und des Liganden **156** in der kupferkatalysierten Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** [RAR-I-322]

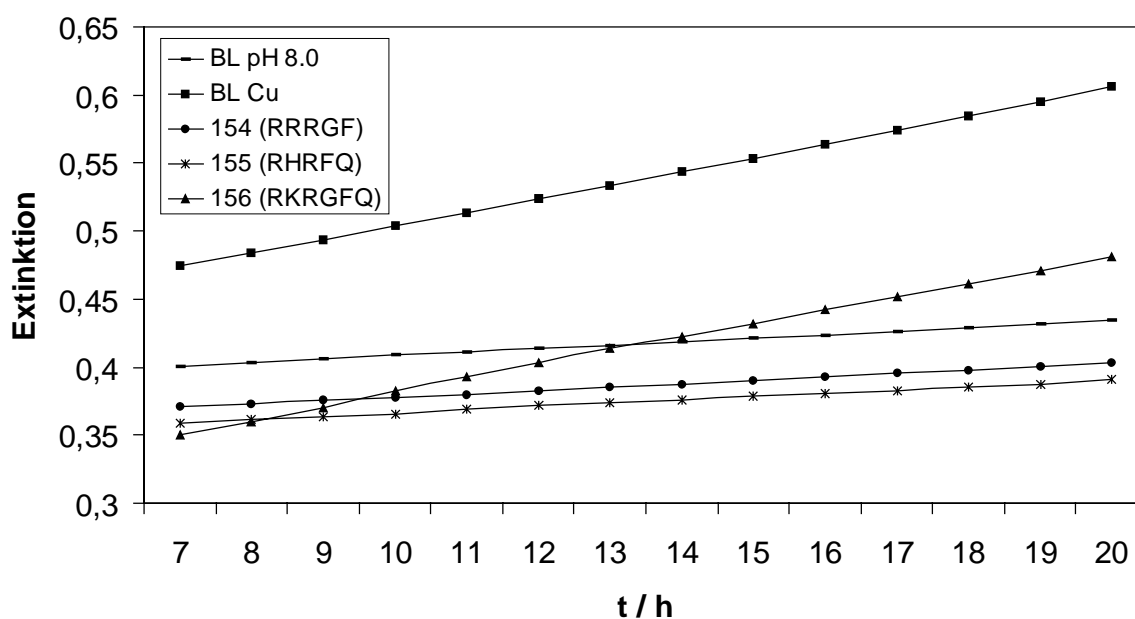




In einer Küvette wurden 12.9% des feuchten Polymers **156** (14.8 mg) (entspricht 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M CuCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Zusätzlich wurden in zwei weiteren Küvetten jeweils 12.9% der feuchten Polymere **154** (13.5 mg) und **155** (15.4 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben.

Die entsprechenden Blindwerte hatten jeweils die gleiche Zusammensetzung, allerdings fehlte der Ligand.

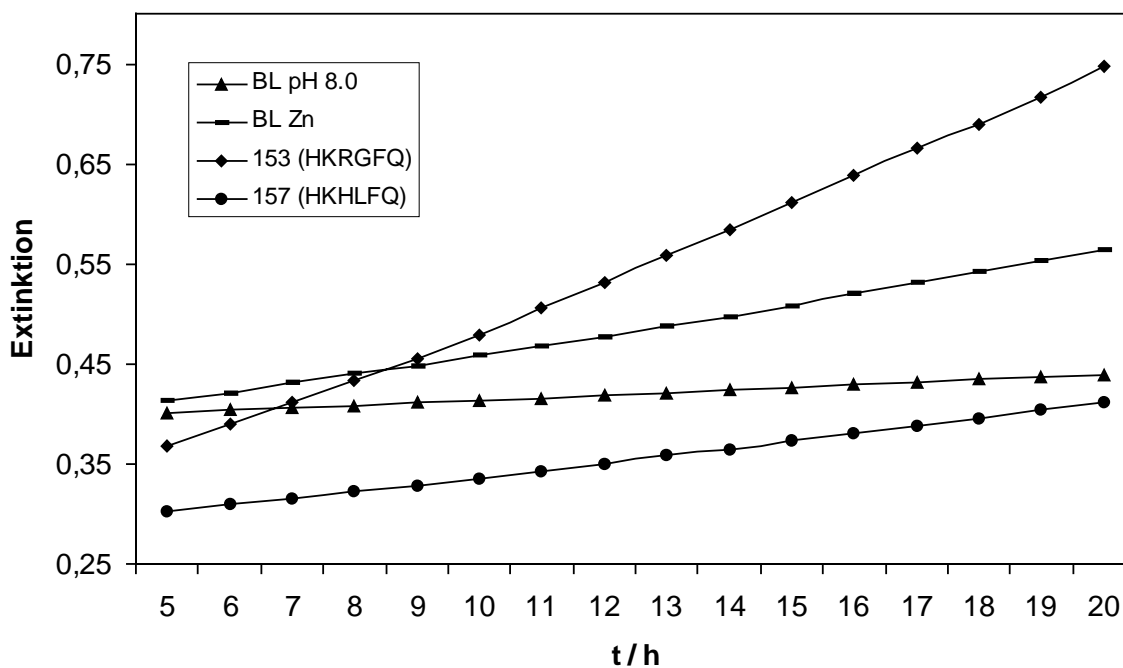


Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ohne Metall (BL pH 8.0)	0.0026 +/- 0.0003
Blindwert CuCl_2 (BL Cu)	0.0101 +/- 0.0010
154 (Code: RRRGF)	0.0025 +/- 0.0003
155 (Code: RHRFQ)	0.0024 +/- 0.0003
156 (Code: RKRGFQ)	0.0101 +/- 0.0010

7.13.3.2 Aktivitätstest der Liganden **153** und **157** in der zinkkatalysierten Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** [RAR-I-323]

Je 12.9% der feuchten Polymere **153** (13.3 mg) und **157** (14.1 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) wurden in zwei Küvetten mit jeweils 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben. Darauf wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Der entsprechende Blindwert hatte die gleiche Zusammensetzung, jedoch fehlte der Ligand. Zusätzlich wurde die Hydrolyse einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** in 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) bei 405 nm verfolgt (Blindwert ohne Metall).

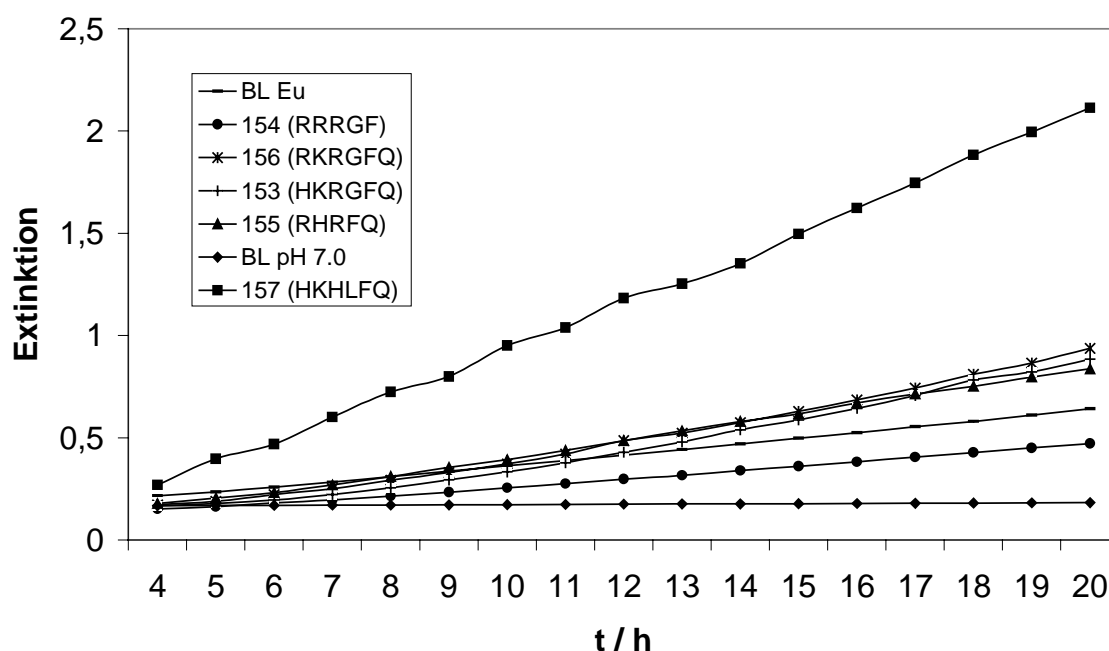


Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ohne Metall (BL pH 8.00)	0.0026 +/- 0.0001
Blindwert ZnCl_2 (BL Zn)	0.0101 +/- 0.0005
153 (Code: HKRGFQ)	0.0254 +/- 0.0010
157 (Code: HKHLFQ)	0.0072 +/- 0.0004

7.13.3.3 Aktivitätstest der Liganden 153, 154, 155, 156 und 157 in der europiumkatalysierten Hydrolyse von Bis(4-nitrophenyl)phosphat 19 [RAR-I-324]

In fünf Küvetten wurden jeweils 12.9% der feuchten Polymere **153** (13.3 mg), **154** (13.5 mg), **155** (15.4 mg), **156** (14.8 mg) und **157** (14.1 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl_3 und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Die Reaktionslösung des zugehörigen Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings fehlte der Ligand. Darüber hinaus wurde die Hydrolyse einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19** in 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) bei 405 nm verfolgt (Blindwert ohne Metall).

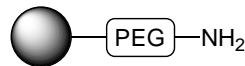


Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ohne Metall (BL pH 7.0)	0.0009 +/- 0.0001
Blindwert EuCl_3 (BL Eu)	0.0268 +/- 0.0020
153 (Code: HKRGFQ)	0.0469 +/- 0.0040
154 (Code: RRRGF)	0.0205 +/- 0.0020
155 (Code: RHRFQ)	0.0428 +/- 0.0040
156 (Code: RKRGFQ)	0.0486 +/- 0.0040
157 (Code: HKHLFQ)	0.1149 +/- 0.0100

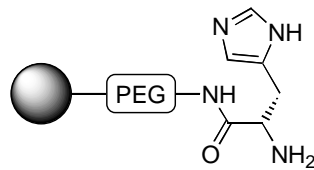
7.14 Synthese der vereinfachten Liganden an Amino-Tenta-Gel™ und deren photometrische Aktivitätskontrolle auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität

7.14.1 Vereinfachung des Liganden ($\{N^\alpha\text{-}[(2R,3S)\text{-}2,3\text{-Dihydroxy-3-(3\text{-pyridyl})\text{propionyl}]\text{-L-histidyl-L-lysyl-L-histidyl}\}\text{amino})\text{-Tenta-Gel}^{\text{TM}}$ 157

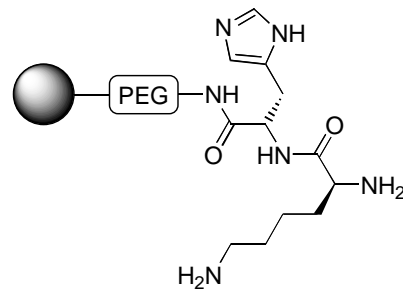
7.14.1.1 Vereinfachung des Liganden 157 vom aminoterminalen Ende aus [RAR-I-324]



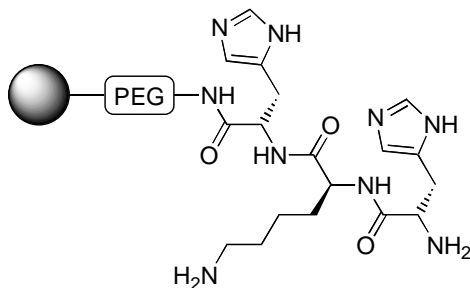
77



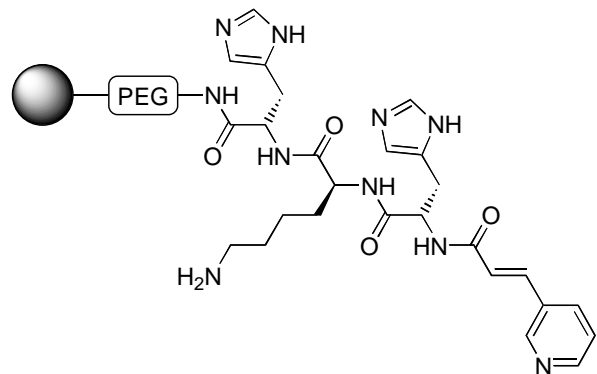
158 (Code: H)



159 (Code: HK)



160 (Code: HKH)



161 (Code: HKHLF)

77	1. FmocHis(Trt), PyBop in 3% NMM / DMF	→	158 / 159 / 160 / 161
	2. 20% Piperidin / DMF		
	3. Zweimaliges Wiederholen von 1. und 2. mit FmocLys(Boc) und FmocHis(Trt)		
	4. (<i>E</i>)-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure, PyBop in 3% NMM / DMF		
	5. 95% TFA / 5% Ethanthiol		

100 mg (31.0 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt wurden:

Zunächst wurden die Fmoc-Aminosäure (62.0 μmol , 2.00 eq.), 32.3 mg (62.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 20.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben, die Reaktionsmischung darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Nun wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen. Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal durchlaufen, wobei nach der ersten Kupplung 25% (78.5 mg), nach der zweiten Kupplung 33% (82.1 mg) und nach der dritten Kupplung 50% (85.0 mg) des jeweils vorhandenen feuchten Polymers entnommen wurden.

1. Kupplung mit 38.42 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 30.4 μmol , 98%.
2. Kupplung mit 29.06 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 22.8 μmol , 98%.
3. Kupplung mit 38.42 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 14.9 μmol , 96%.

Nachdem diese Reaktionsfolge dreimal durchlaufen worden war, wurden 4.62 mg (*E*)-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure **111** (31.0 μmol , 2.00 eq. bezogen auf die anfängliche Stoffmenge der Aminofunktionen), 32.3 mg (62.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 20.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben und die Reaktionsmischung drei Stunden geschüttelt. Das Polymer wurde abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Die Anknüpfung des Olefines wurde nochmals wiederholt, das Polymer schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und ein *Kaiser*-Test durchgeführt. Dieser zeigte keine freien Aminofunktionen mehr an.

Zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen wurden die vier Polymeräquivalente getrennt jeweils zweimal drei Stunden in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend jeweils fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen.

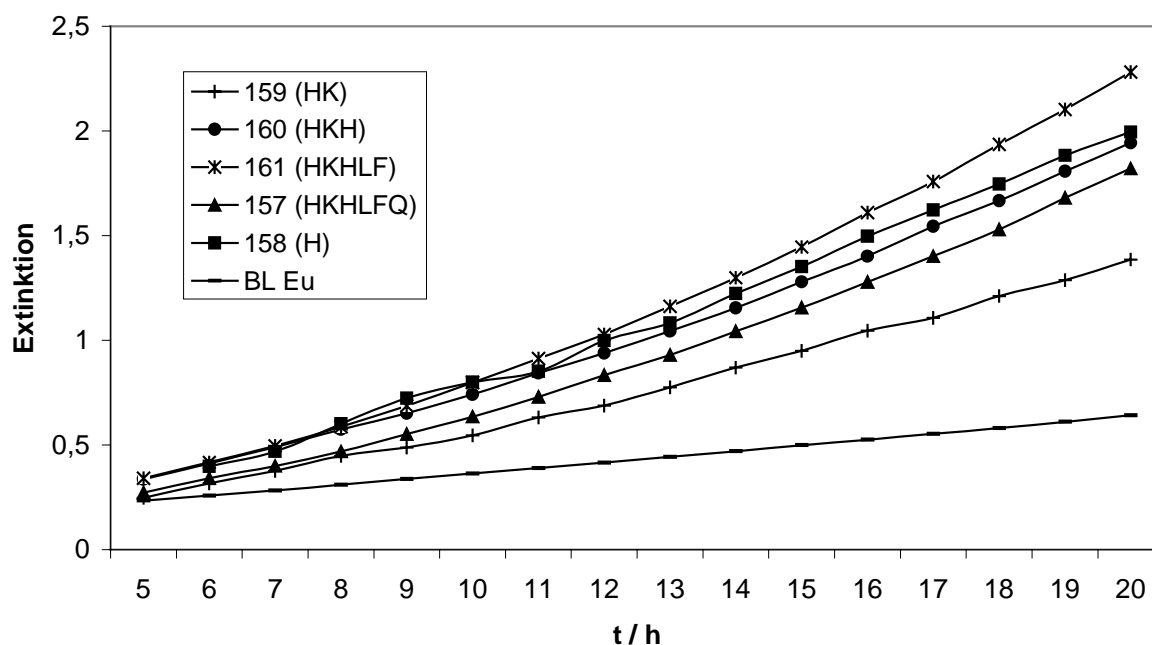
Die feuchten Polymere **158**, **159**, **160** und **161** hatten danach folgende Massen:

158: 82.1 mg, **159**: 81.5 mg, **160**: 83.4 mg und **161**: 85.6 mg.

Photometrischer Aktivitätstest:

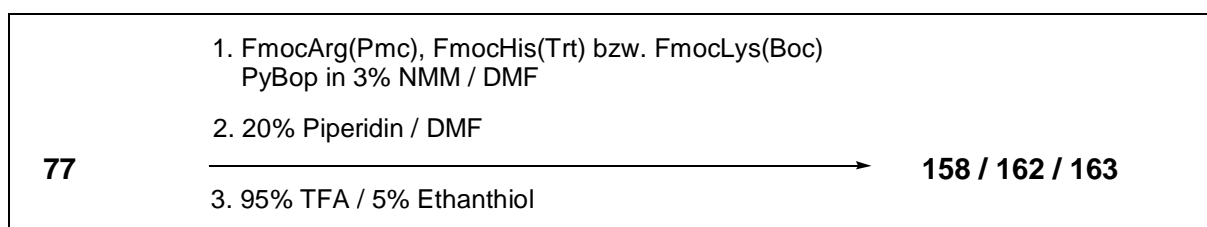
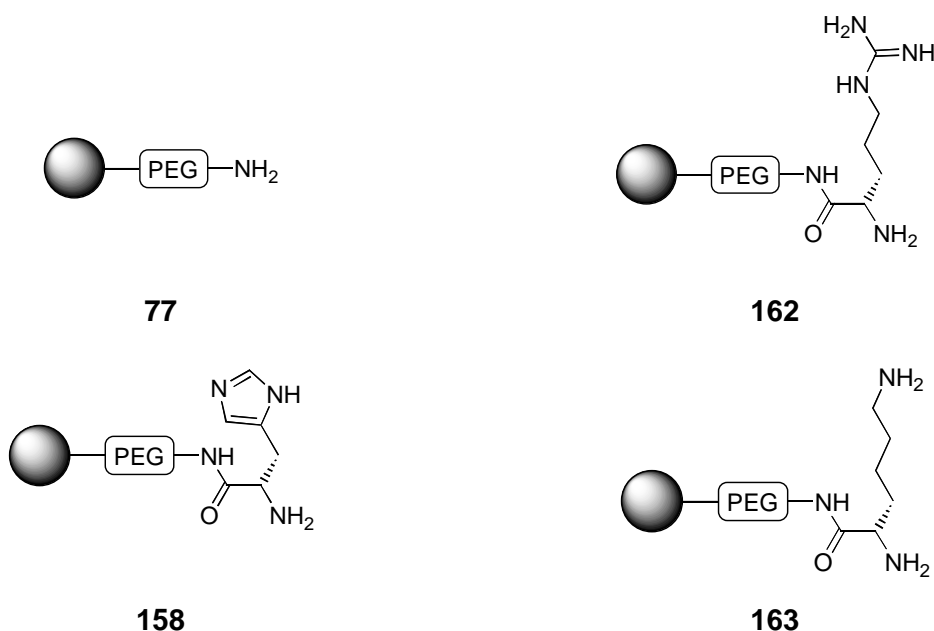
In vier Küvetten wurden jeweils 25.8% der feuchten Polymere **158** (21.2 mg), **159** (21.0), **160** (21.5 mg) und **161** (22.1 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl_3 und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Die Reaktionslösung des entsprechenden Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings fehlte der Ligand. Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μmol des Liganden **157** in eine Küvette mit 2.00 ml einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl_3 und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl ₃ (BL Eu)	0.0271 +/- 0.0020
157 (Code: HKHLFQ)	0.1032 +/- 0.0100
158 (Code: H)	0.1129 +/- 0.0100
159 (Code: HK)	0.0758 +/- 0.0080
160 (Code: HKH)	0.1072 +/- 0.0100
161 (Code: HKHLF)	0.1300 +/- 0.0100

7.14.1.2 Aktivitätstest von an Amino-TentaGel™ **77** immobilisiertem Arginin und Lysin [RAR-I-326]



Jeweils 30.0 mg (9.30 µmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt wurden:

Zunächst wurde die Fmoc-Aminosäure (18.6 µmol, 2.00 eq.), 9.68 mg (18.6 µmol, 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben, die Reaktionsmischung darauf zwei

Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Nun wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

Zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen wurden die drei Polymeräquivalente getrennt jeweils zweimal drei Stunden in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend jeweils fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen.

Die feuchten Polymere **158**, **162** und **163** hatten danach folgende Massen:

158: 65.3 mg, **162**: 61.9 mg und **163**: 67.1 mg.

Polymeräquivalent 1:

1. Kupplung mit 12.3 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 8.95 μmol , 96%.

Polymeräquivalent 2:

2. Kupplung mit 11.5 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 8.93 μmol , 96%.

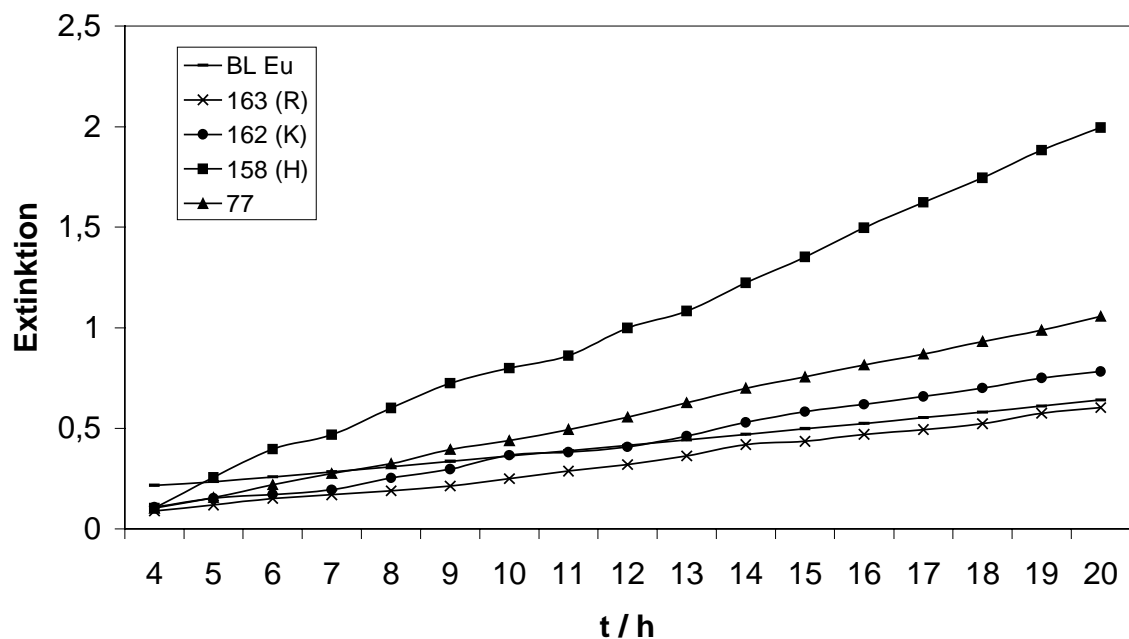
Polymeräquivalent 3:

1. Kupplung mit 8.72 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.11 μmol , 98%.

Photometrischer Aktivitätstest:

In drei Küvetten wurden jeweils 21.5% der feuchten Polymere **158** (14.0 mg), **162** (13.3 mg) und **163** (14.2 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl_3 und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben. In eine weitere Küvette wurden 6.45 mg (2.00 μmol Aminofunktionen) Amino-TentaGel™ **77** in 2.00 ml einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl_3 und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Die Reaktionslösung des entsprechenden Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings fehlte der Ligand.



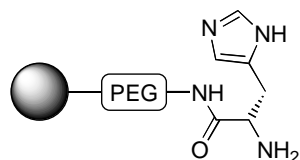
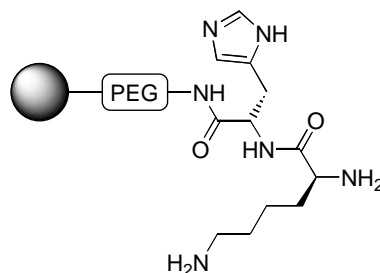
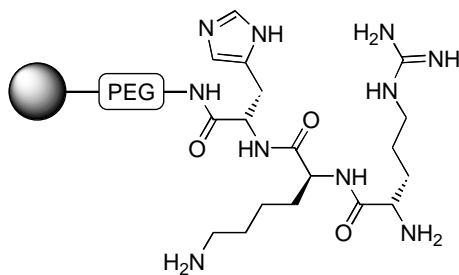
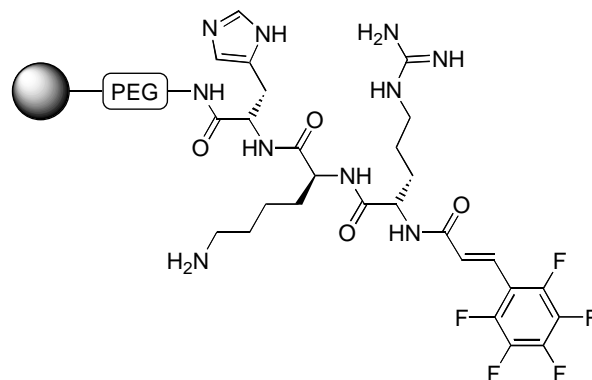
Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl_3 (BL Eu)	0.0268 +/- 0.0020
Amino-TentaGel™ 77	0.0598 +/- 0.0060
162 (Code: K)	0.0436 +/- 0.0040
163 (Code: R)	0.0327 +/- 0.0030
158 (Code: H)	0.1150 +/- 0.0100

7.14.2 Vereinfachung des Liganden ($\{N^\alpha\text{-}[(2R,3S)\text{-}2,3\text{-Dihydroxy-3-(pentafluorphenyl)propionyl]}\text{-L-arginyl-L-lysyl-L-histidyl}\}$ amino)-TentaGel™ 153

7.14.2.1 Vereinfachung des Liganden 153 vom aminoterminalen Ende aus [RAR-I-324]



77

**158 (Code: H)****159 (Code: HK)****167 (Code: HKR)****168 (Code: HKRGF)****77**

1. FmocHis(Trt), PyBop in 3% NMM / DMF
2. 20% Piperidin / DMF
3. Zweimaliges Wiederholen von
1. und 2. mit FmocLys(Boc) und FmocArg(Pmc)
4. Pentafluorphenylzimtsäure, PyBop
in 3% NMM / DMF
5. 95% TFA / 5% Ethanthiol

158 / 159 / 167 / 168

100 mg (31.0 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Danach wurden die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt:

Im ersten Schritt wurden die Fmoc-Aminosäure (62.0 μmol , 2.00 eq.), 32.3 mg (62.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 20.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben, die Reaktionsmischung darauf zwei Stunden geschüttelt und anschließend das Polymer abfiltriert. Dieses wurde fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und danach fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch bezüglich ihres Gehaltes an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen analysiert, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupp-

lung zu bestimmen. Diese Reaktionsfolge wurde noch zweimal durchgeführt, wobei nach der ersten Kupplung 25% (71.3 mg), nach der zweiten Kupplung 33% (69.6 mg) und nach der dritten Kupplung 50% (68.4 mg) des jeweils vorhandenen Polymers entnommen wurden.

1. Kupplung mit 38.4 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 30.4 μmol , 98%.
2. Kupplung mit 29.1 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 22.6 μmol , 97%.
3. Kupplung mit 41.1 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 15.2 μmol , 98%.

Nach dreimaliger Durchführung dieser Reaktionsfolge wurden 14.8 mg (*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorphenylzimtsäure **120** (62.0 μmol , 2.00 eq. bezogen auf die anfängliche Stoffmenge der Aminofunktionen), 32.3 mg (62.0 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 20.0 ml 3%iges NMM/DMF hinzugefügt und die Reaktionsmischung drei Stunden geschüttelt. Das anschließend abfiltrierte Polymer wurde zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Nachdem die Anknüpfung des Olefines nochmals wiederholt worden war, wurde das Polymer fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und ein *Kaiser*-Test durchgeführt, der keine freien Aminofunktionen mehr anzeigte.

Um die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten, wurden die vier Polymeräquivalente getrennt jeweils zweimal drei Stunden in 20.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und darauf jeweils fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen.

Die feuchten Polymere **158**, **159**, **167** und **168** hatten danach folgende Massen:

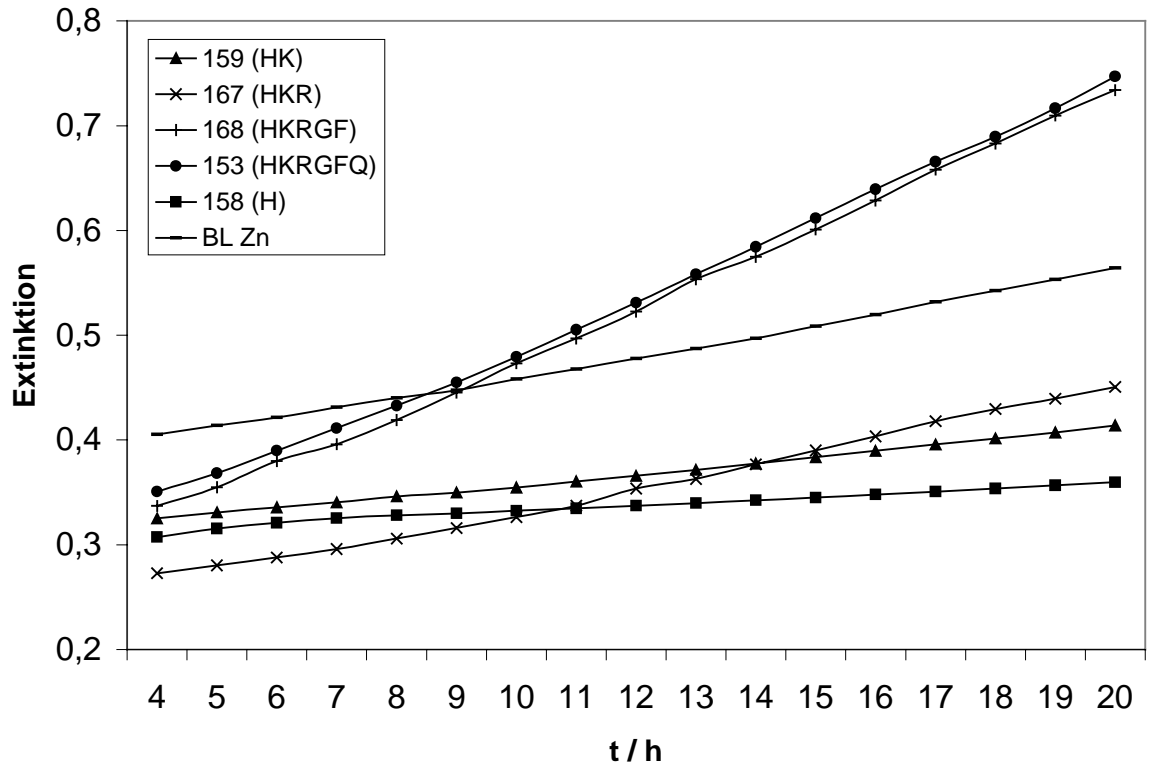
158: 73.5 mg, **159**: 70.2 mg, **167**: 69.3 mg und **168**: 70.2 mg.

Photometrischer Aktivitätstest:

In vier Küvetten wurden jeweils 25.8% der feuchten Polymere **158** (19.0 mg), **159** (18.1 mg), **167** (17.9 mg) und **168** (18.1 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Die Reaktionslösung des entsprechenden Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, jedoch fehlte der Ligand.

Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μmol des Liganden **153** in eine Küvette mit 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

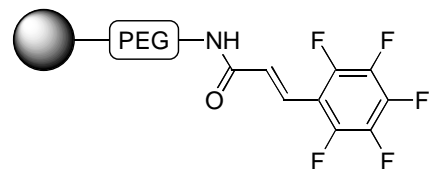


Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl ₂ (BL Zn)	0.0100 +/- 0.0005
158 (Code: H)	0.0029 +/- 0.0002
159 (Code: HK)	0.0055 +/- 0.0003
167 (Code: HKR)	0.0116 +/- 0.0005
168 (Code: HKRGF)	0.0254 +/- 0.0010
153 (Code: HKRGFQ)	0.0251 +/- 0.0010

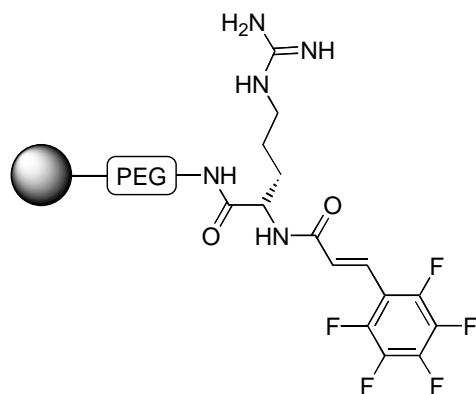
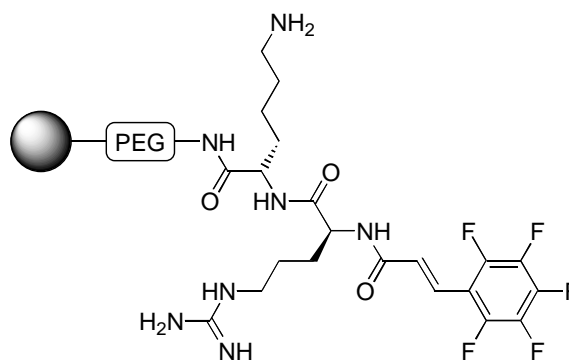
7.14.2.2 Vereinfachung des Liganden 168 vom carboxyterminalen Ende aus [RAR-I-326]



77



169 (Code: GF)

**170 (Code: RGF)****171 (Code: KRGF)****77**

1. FmocLys(Boc) bzw. FmocArg(Pmc), PyBop in 3% NMM / DMF oder keine Aminosäure
2. 20% Piperidin / DMF
3. Wiederholen von 1. und 2. mit FmocArg(Pmc) oder keine Aminosäure
4. Pentafluorphenylzimtsäure, PyBop in 3% NMM / DMF
5. 95% TFA / 5% Ethanthiol

169 / 170 / 171

Drei Äquivalente à 30.0 mg (9.30 μ mol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, bevor nach folgender Vorschrift die einzelnen Peptidkupplungen durchgeführt wurden:

Es wurden die Fmoc-Aminosäure (18.6 μ mol, 2.00 eq.), 9.68 mg (18.6 μ mol, 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben und nach zweistündigem Schütteln der Reaktionsmischungen die Polymere abfiltriert. Diese wurden nun fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

Polymeräquivalent 1:

1. Kupplung mit 8.72 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.11 μ mol, 98%.

Polymeräquivalent 2:

1. Kupplung mit 8.72 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.13 μ mol, 98%.

2. Kupplung mit 12.33 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 8.93 μmol , 96%.

Polymeräquivalent 3:

keine Kupplung mit einer Fmoc-Aminosäure

Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 4.43 mg (18.6 μmol , 2.00 eq.) (*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorphenylzimtsäure **120**, 9.68 mg (18.6 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%igem NMM/DMF. Die Reaktionsmischungen wurden drei Stunden geschüttelt, hierauf die Polymere abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Die Anknüpfung der Olefine wurde nochmals wiederholt, die Polymere schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und ein *Kaiser*-Test durchgeführt, welcher keine freien Aminofunktionen mehr anzeigte.

Die drei Polymeräquivalente wurden getrennt jeweils zweimal drei Stunden in 10.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt, um die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten, und anschließend jeweils fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen.

Die feuchten Polymere **169**, **170** und **171** hatten danach folgende Massen:

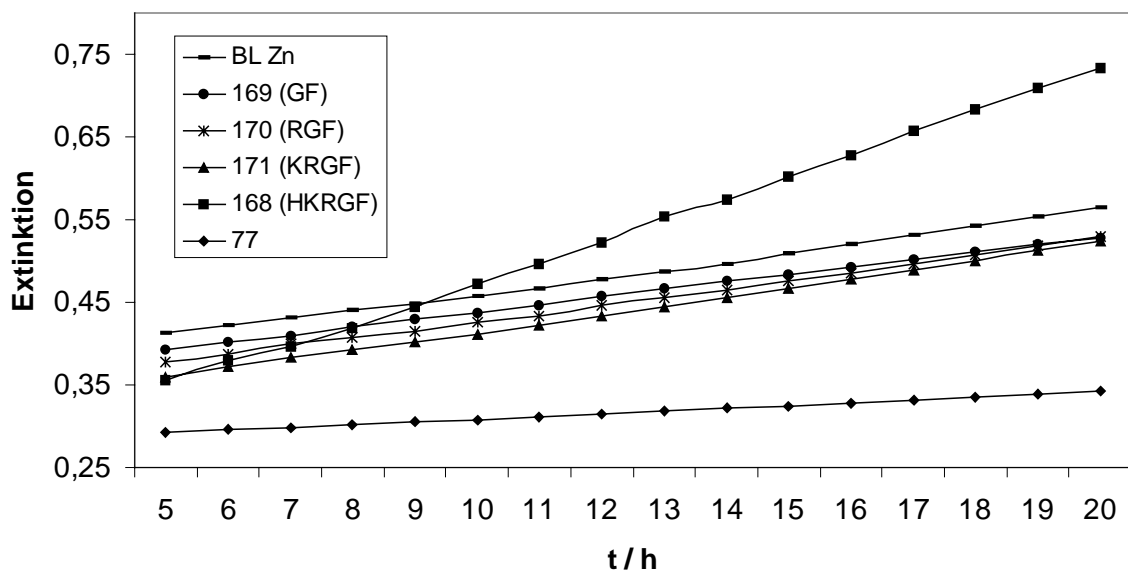
169: 69.2 mg, **170**: 72.4 mg, **171**: 71.5 mg.

Photometrischer Aktivitätstest:

In drei Küvetten wurden jeweils 21.5% der feuchten Polymere **169** (14.9 mg), **170** (15.6 mg) und **171** (15.4 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben. In eine weitere Küvette wurden 6.45 mg (2.00 μmol Aminofunktionen) Amino-TentaGel™ **77** in 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

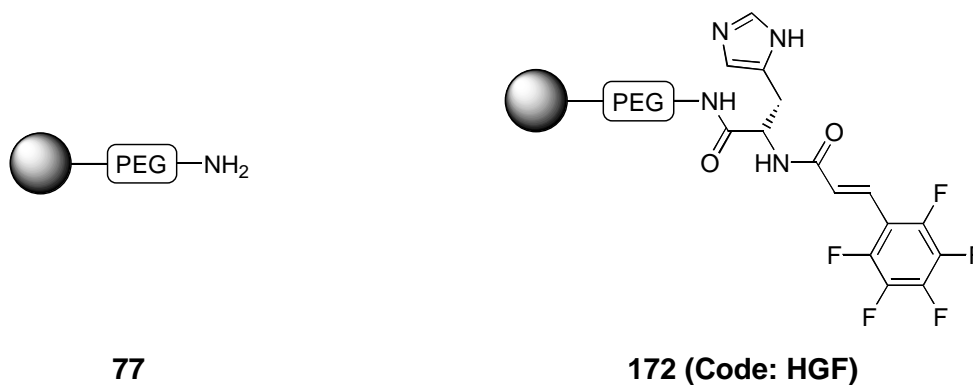
Die Reaktionslösung des zugehörigen Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings fehlte der Ligand.

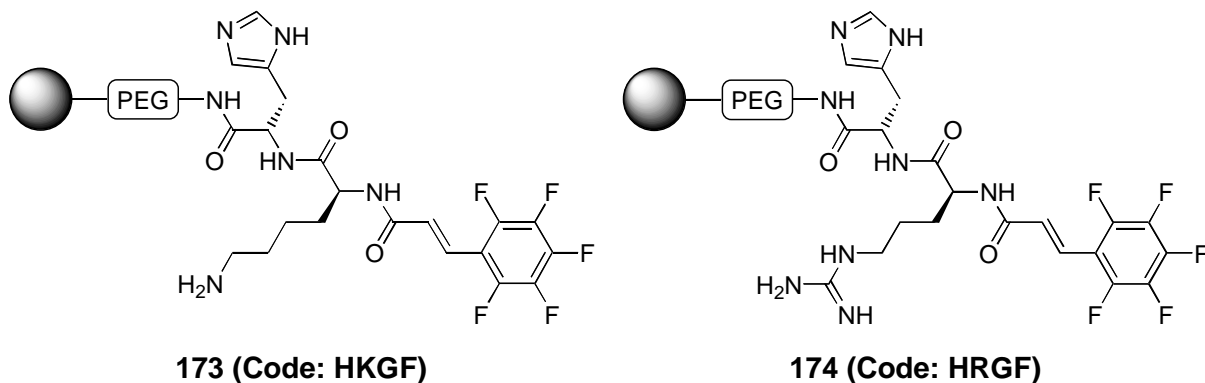
Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μmol des Liganden **168** in eine Küvette mit 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl ₂ (BL Zn)	0.0101 +/- 0.0005
169 (Code: GF)	0.0091 +/- 0.0005
170 (Code: RGF)	0.0100 +/- 0.0005
171 (Code: KRGF)	0.0108 +/- 0.0005
77	0.0033 +/- 0.0002
168 (Code: HKRGF)	0.0257 +/- 0.0010

7.14.2.3 Vereinfachung des Liganden 168 durch Deletion [RAR-I-326]





77	<ol style="list-style-type: none"> 1. FmocHis(Trt), PyBop in 3% NMM / DMF 2. 20% Piperidin / DMF 3. Wiederholen von 1. und 2. mit FmocLys(Boc) bzw. FmocArg(Pmc) oder keine Aminosäure 	→	172 / 173 / 174
	<ol style="list-style-type: none"> 4. Pentafluorphenylzimtsäure, PyBop in 3% NMM / DMF 5. 95% TFA / 5% Ethanthiol 		

Drei Äquivalente à 30.0 mg (9.30 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden jeweils zweimal 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und anschließend die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt:

Zunächst wurden die Fmoc-Aminosäure (18.6 μmol , 2.00 eq.), 9.68 mg (18.6 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben, die Reaktionsmischungen darauf zwei Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Polymere abfiltriert und fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch bezüglich ihres Gehaltes an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

Polymeräquivalent 1:

1. Kupplung mit 11.5 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.04 μmol , 97%.

Polymeräquivalent 2:

1. Kupplung mit 11.5 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.13 μmol , 98%.

2. Kupplung mit 8.72 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.05 μmol , 97%.

Polymeräquivalent 3:

1. Kupplung mit 11.5 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 8.96 μmol , 96%.

2. Kupplung mit 12.3 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.02 μmol , 97%.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 4.43 mg (18.6 μmol , 2.00 eq.) (*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorphenylzimtsäure **120**, 9.68 mg (18.6 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben und die Reaktionsmischungen drei Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Polymere abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Es erfolgte eine nochmalige Anknüpfung der Olefine, bevor die Polymere schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen wurden. Ein *Kaiser*-Test zeigte keine freien Aminofunktionen mehr an.

Zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen wurden die drei Polymeräquivalente getrennt jeweils zweimal drei Stunden in 10.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und darauf jeweils fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen.

Die feuchten Polymere **172**, **173** und **174** hatten danach folgende Massen:

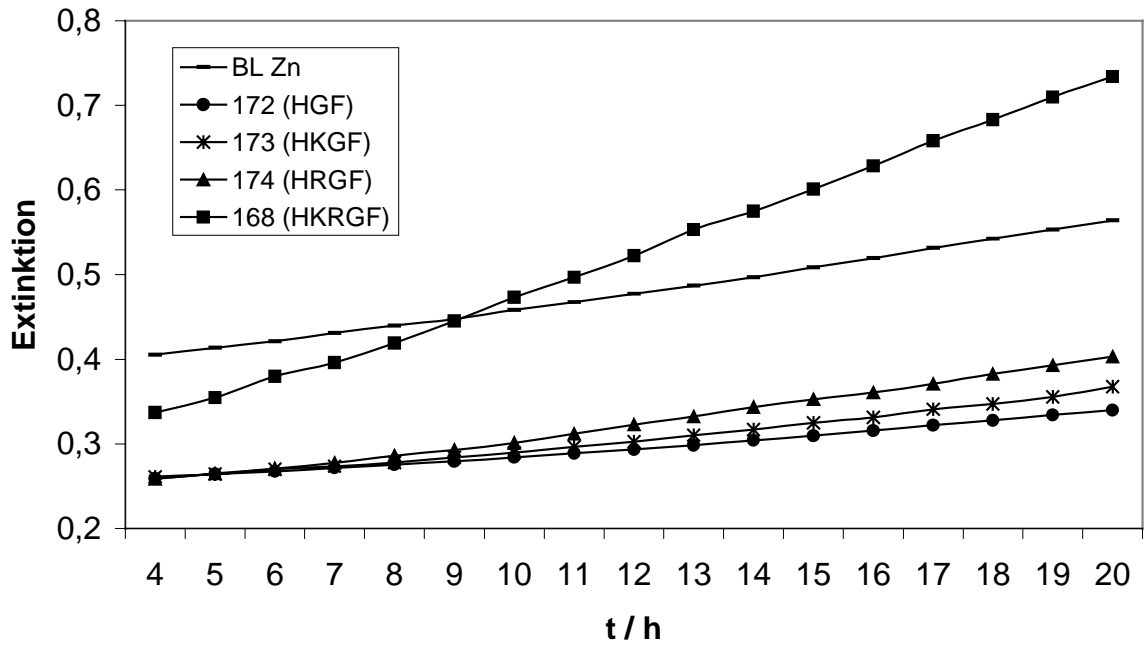
172: 76.3 mg, **173**: 78.1 mg, **174**: 77.8 mg.

Photometrischer Aktivitätstest:

Jeweils 21.5% der feuchten Polymere **172** (16.4 mg), **173** (16.8 mg) und **174** (16.7 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) wurden in drei Küvetten gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

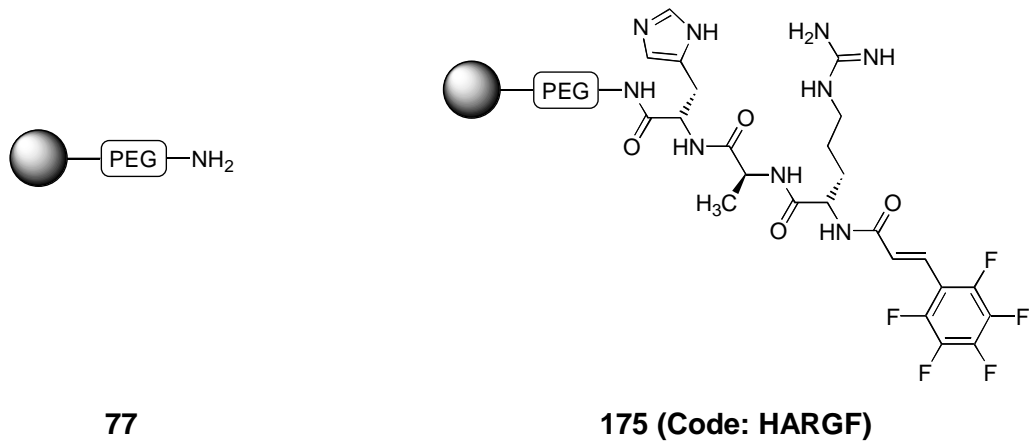
Die Reaktionslösung des entsprechenden Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, es fehlte jedoch der Ligand.

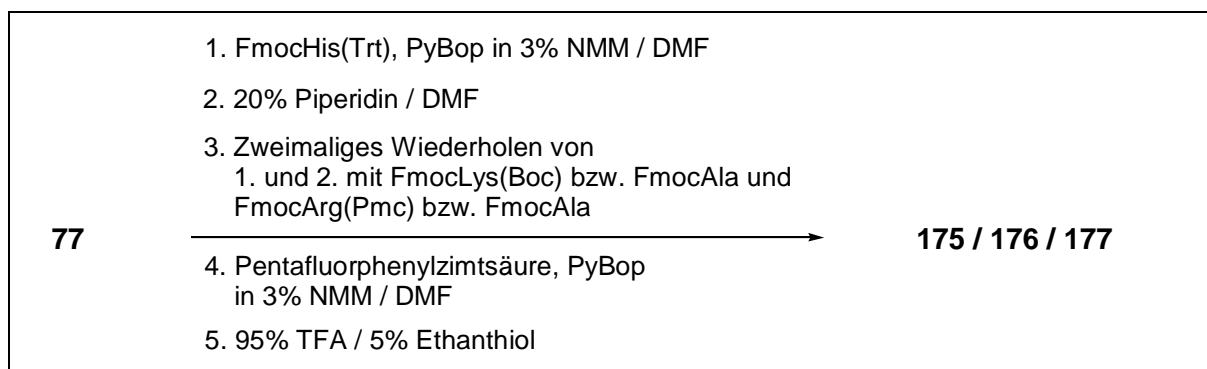
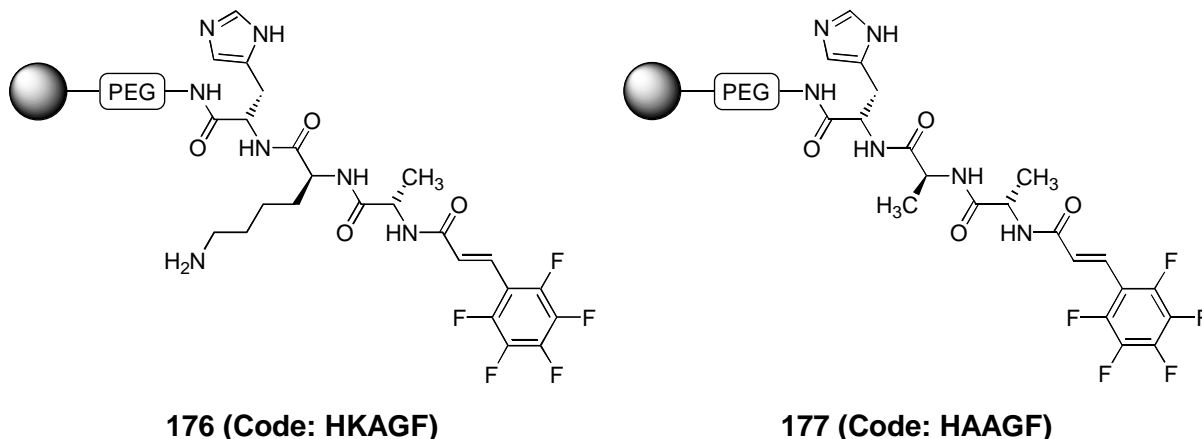
Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μmol des Liganden **168** in eine Küvette mit 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl ₂ (BL Zn)	0.0100 +/- 0.0005
172 (Code: HGF)	0.0050 +/- 0.0002
173 (Code: HKGF)	0.0066 +/- 0.0003
174 (Code: HRGF)	0.0092 +/- 0.0005
168 (Code: HKRGF)	0.0254 +/- 0.0010

7.14.2.4 Vereinfachung des Liganden 168 durch Substitution [RAR-I-326]





Drei Äquivalente à 30.0 mg (9.30 μmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) Amino-TentaGel™ **77** wurden jeweils 10 min mit je 10.0 ml abs. DMF zweimal gewaschen, bevor die einzelnen Peptidkupplungen nach folgender Vorschrift durchgeführt wurden:

Zunächst wurden die Fmoc-Aminosäure (18.6 μmol , 2.00 eq.), 9.68 mg (18.6 μmol , 2.00 eq.) PyBop und 10.0 ml 3%iges NMM/DMF zugegeben. Dann wurden die Reaktionsmischungen zwei Stunden geschüttelt und die Polymere abfiltriert, welche anschließend fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen, danach zweimal 10 min mit je 10.0 ml 20%igem Piperidin/DMF behandelt und schließlich fünfmal mit je 5.00 ml abs. DMF gewaschen wurden. Die gesammelten Waschlösungen nach der Behandlung mit Piperidin/DMF sowie die Piperidin/DMF-Abspaltungslösungen wurden UV-spektroskopisch auf ihren Gehalt an abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen untersucht, um die Ausbeute der vorangegangenen Peptidkupplung zu bestimmen.

Polymeräquivalent 1:

1. Kupplung mit 11.5 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.09 μmol , 98%.
2. Kupplung mit 5.79 mg FmocAla; Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 8.95 μmol , 96%.
3. Kupplung mit 12.3 mg FmocArg(Pmc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.04 μmol , 97%.

Polymeräquivalent 2:

1. Kupplung mit 11.5 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.06 μmol , 97%.
2. Kupplung mit 8.72 mg FmocLys(Boc); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.13 μmol , 98%.
3. Kupplung mit 5.79 mg FmocAla; Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.05 μmol , 97%.

Polymeräquivalent 3:

1. Kupplung mit 11.5 mg FmocHis(Trt); Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 8.92 μmol , 96%.
2. Kupplung mit 5.79 mg FmocAla; Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 8.90 μmol , 96%.
3. Kupplung mit 5.79 mg FmocAla; Ausbeute (Fmoc-Bestimmung): 9.01 μmol , 97%.

Nachdem diese Reaktionsfolge dreimal durchlaufen worden war, erfolgte die Zugabe von jeweils 4.43 mg (18.6 μmol , 2.00 eq.) (*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorphenylzimtsäure **120**, 9.68 mg PyBop (18.6 μmol , 2.00 eq.) und 10.0 ml 3%igem NMM/DMF. Die Reaktionsmischungen wurden drei Stunden geschüttelt, anschließend die Polymere abfiltriert und zweimal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen. Die Anknüpfung der Olefine wurde nochmals wiederholt, die Polymere schließlich fünfmal mit je 10.0 ml abs. DMF gewaschen und ein *Kaiser*-Test durchgeführt, welcher keine freien Aminofunktionen mehr anzeigte.

Zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen wurden die drei Polymeräquivalente getrennt jeweils zweimal drei Stunden in 10.0 ml 95% Trifluoressigsäure / 5% Ethanthiol bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend jeweils fünfmal mit je 10.0 ml DMF, THF, THF : Wasser (1:1) sowie Wasser gewaschen.

Die feuchten Polymere **175**, **176** und **177** hatten danach folgende Massen:

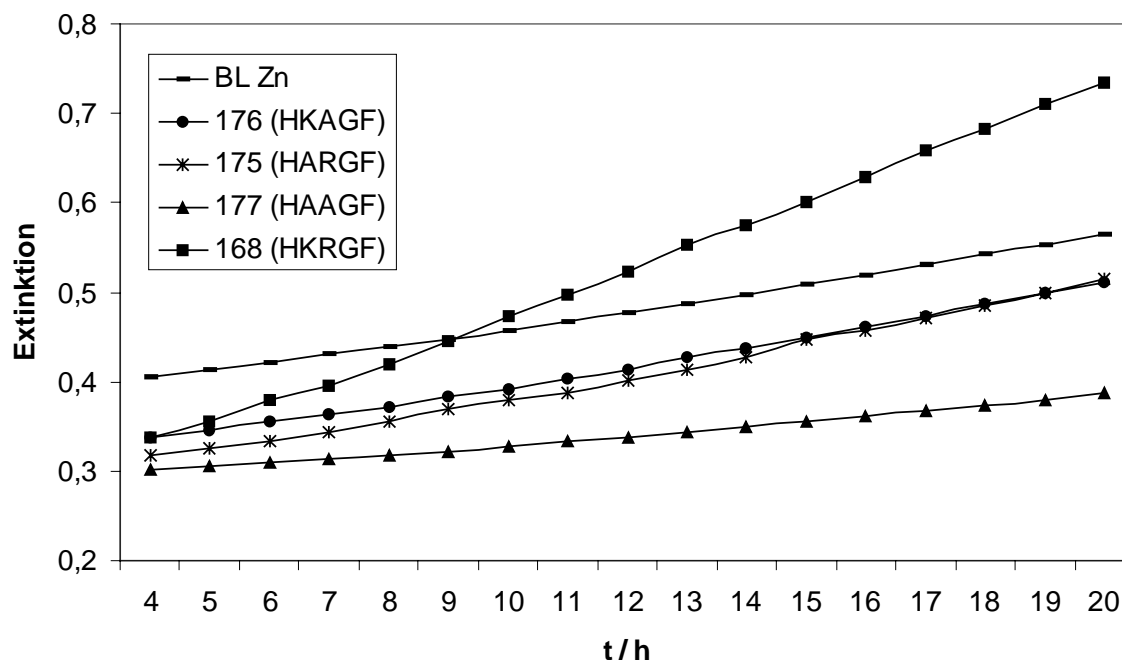
175: 68.4 mg, **176**: 66.1 mg und **177**: 66.8 mg.

Photometrischer Aktivitätstest:

In drei Küvetten wurden jeweils 21.5% der feuchten Polymere **175** (14.7 mg), **176** (14.2 mg) und **177** (14.4 mg) (entspricht jeweils 6.45 mg trockenem Polymer, 2.00 μmol Ligand, 1.00×10^{-3} M) in 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Die Reaktionslösung des entsprechenden Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings fehlte der Ligand.

Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μmol des Liganden **168** in eine Kuvette mit 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

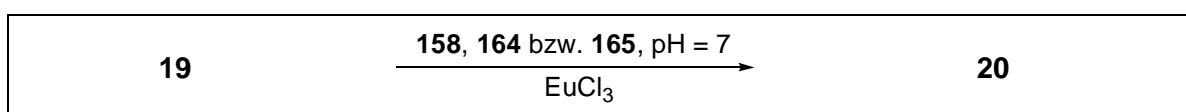
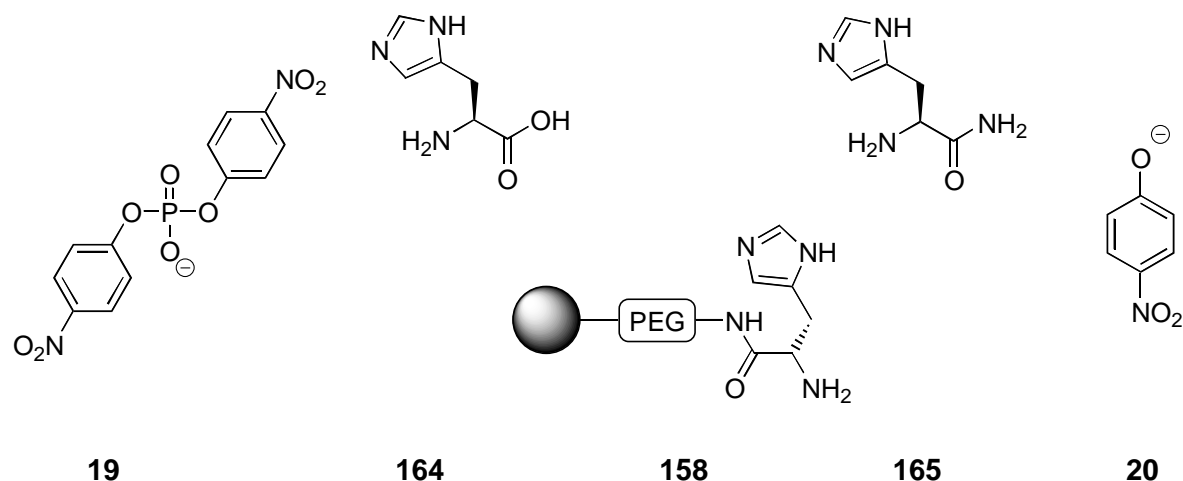


Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl_2 (BL Zn)	0.0100 +/- 0.0005
175 (Code: HARGF)	0.0125 +/- 0.0005
176 (Code: HKAGF)	0.0109 +/- 0.0005
177 (Code: HAAGF)	0.0054 +/- 0.0002
168 (Code: HKRGF)	0.0254 +/- 0.0010

7.15 Photometrische Aktivitätskontrolle der abgespaltenen Liganden auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität

7.15.1 Abgespaltene Liganden der europiumkatalysierten Hydrolyse

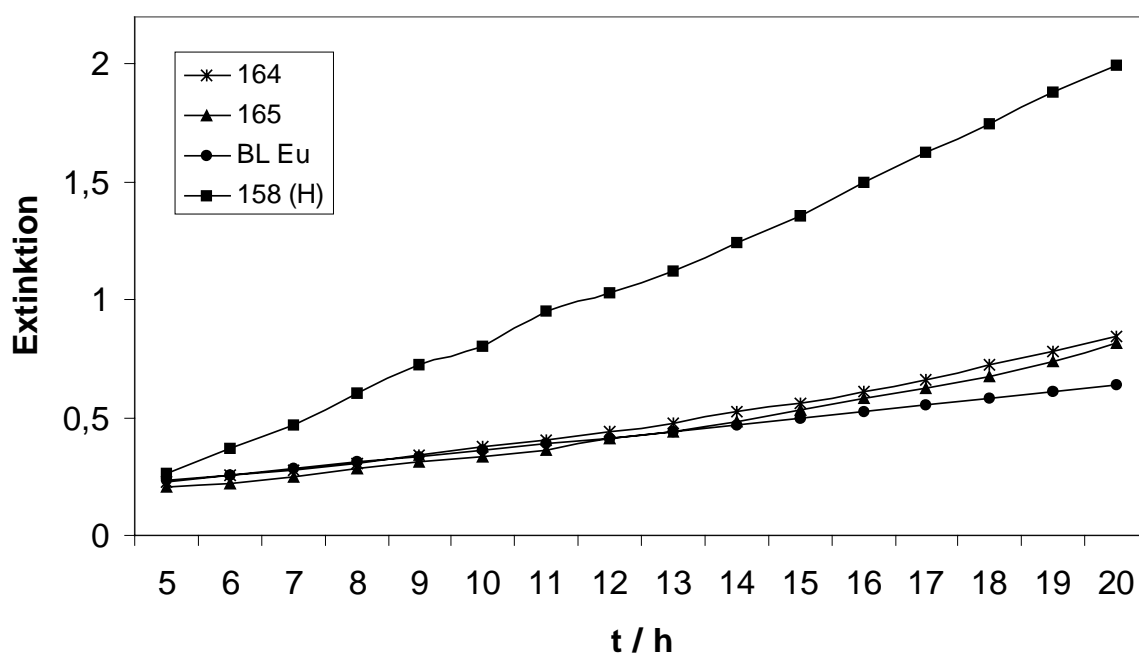
7.15.1.1 Photometrische Aktivitätskontrolle von Histidin 164 und Histidinamid 165 auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität [RAR-I-327]



In zwei Küvetten wurden jeweils 2.00 ml einer Lösung gegeben, die folgende Konzentrationen aufwies: 1.00×10^{-3} M an den Liganden **164** bzw. **165**, 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)-phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl₃ und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0). Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

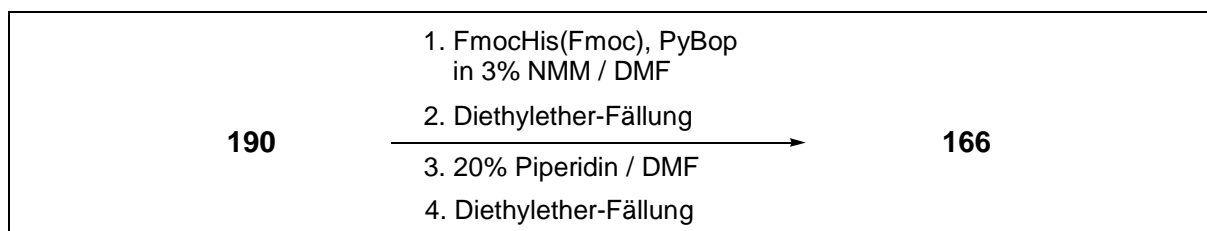
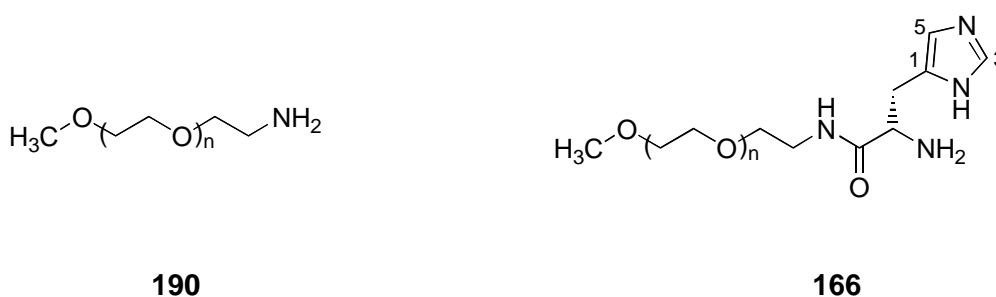
Die Reaktionslösung des zugehörigen Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, jedoch fehlte der Ligand.

Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μ mol des Liganden **158** in eine Küvette mit 2.00 ml einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl₃ und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl ₃ (BL Eu)	0.0271 +/- 0.0020
158 (Code: H)	0.1148 +/- 0.0100
164	0.0401 +/- 0.0040
165	0.0398 +/- 0.0040

7.15.1.2 Synthese von α -Methyl- ω -(L-histidylamino)poly(oxyethylen) **166** [RAR-I-340]



3.50 g (0.60 mmol Aminofunktionen, 1.00 eq.) des löslichen Polymers *O*-(2-Aminoethyl)-*O'*-methylpolyethylenglycol **190** wurden in 50.0 ml abs. Methylenchlorid gelöst und mit 720 mg (1.20 mmol, 2.00 eq.) FmocHis(Fmoc) sowie 1.24 g (6.00 mmol, 10.0 eq.) DCC versetzt. Nun wurde die Reaktionslösung zehn Stunden bei Raumtemp. gerührt, danach der ausgefallene farblose Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit 500 ml Diethylether versetzt, worauf das Polymer auszufallen begann. Nach drei Stunden wurde das Polymer abfiltriert, in 30.0 ml 20%iges Piperidin in DMF gegeben und eine Stunde gerührt. Durch die erneute Zugabe von 500 ml Ether konnte das Polymer wieder ausgefällt werden. Dieses wurde abfiltriert und aus 10.0 ml abs. Ethanol umkristallisiert. Nach dem Trocknen an der Ölpumpe lagen 3.41 g farbloses Polymer vor. Die Bestimmung der abgespaltenen Fmoc-Stoffmenge ergab einen Wert von 0.94 mmol, womit die Beladung des Polymers **166** 78% betrug.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2895 [s, $\nu(\text{C-H})$ CH_2]; 1650 [w, $\nu(\text{C=O})$ Amid]; 1467 [m, $\delta(\text{CH}_2)$]; 1343 [s, $\delta_s(\text{CH}_3)$]; 1280 [s, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1107 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 963, 842 [beide s].

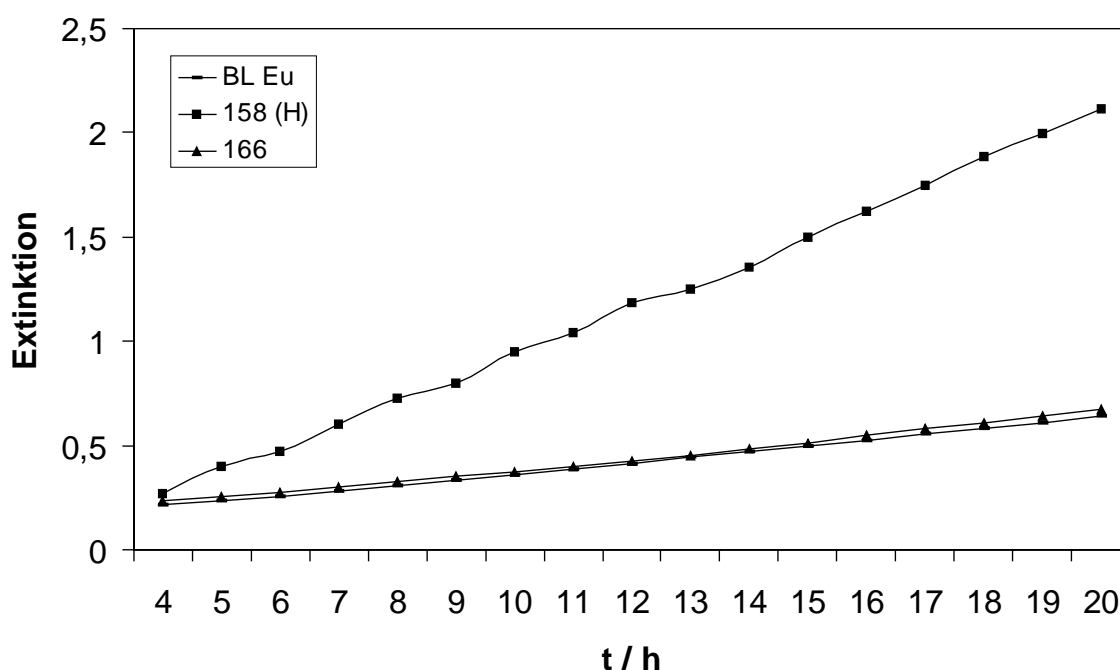
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ = 3.33 (s, 3H, OCH_3), 3.35-3.80 (br. m, $\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ und $\text{CH}_2\text{C}_{\text{Imidazol}}$), 4.38 (br. m, 1H, CHNH_2), 6.81 (s, 1H, Imidazol-5-CH), 7.59 (s, 1H, Imidazol-3-CH), 7.98 (br. s, 1H, Imidazol-NH, mit D_2O austauschbar).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ = 24.23 (t, $\text{CH}_2\text{C}_{\text{Imidazol}}$), 56.60 (d, CHNH_2), 60.79 (q, OCH_3), 71.40-74.10 (t, $\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$), 120.15 (d, Imidazol-5-CH), 134.32 (s, Imidazol-1-C), 136.98 (d, Imidazol-3-CH), 174.45 (s, CONH).

Photometrischer Aktivitätstest:

In eine Küvetten wurden 2.00 ml einer Lösung gegeben, die folgende Konzentrationen aufwies: 1.00×10^{-3} M Ligand **166**, 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl_3 und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0). Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt. Die Reaktionslösung des entsprechenden Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings fehlte der Ligand.

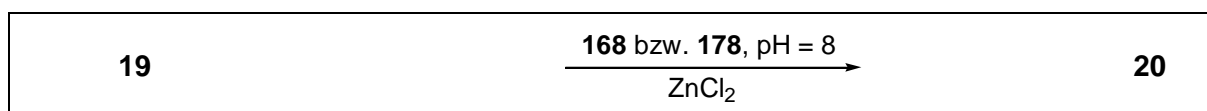
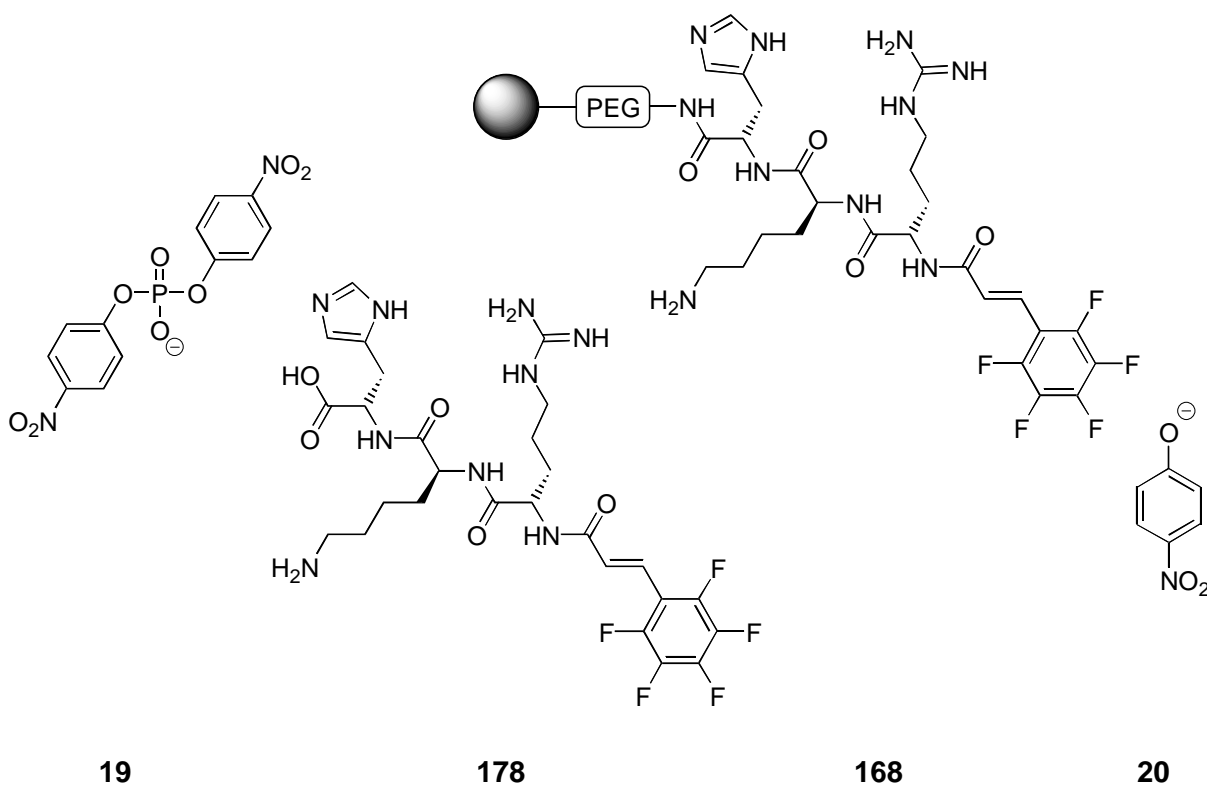
Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μmol des Liganden **158** in eine Küvette mit 2.00 ml einer Lösung von 2.50×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 2.50×10^{-4} M EuCl_3 und 0.10 M MOPSO-Puffer (pH = 7.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.



Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert EuCl_3 (BL Eu)	0.0268 +/- 0.0020
166	0.0277 +/- 0.0020
158 (Code: H)	0.1149 +/- 0.0020

7.15.2 Abgespaltener Ligand der zinkkatalysierten Hydrolyse

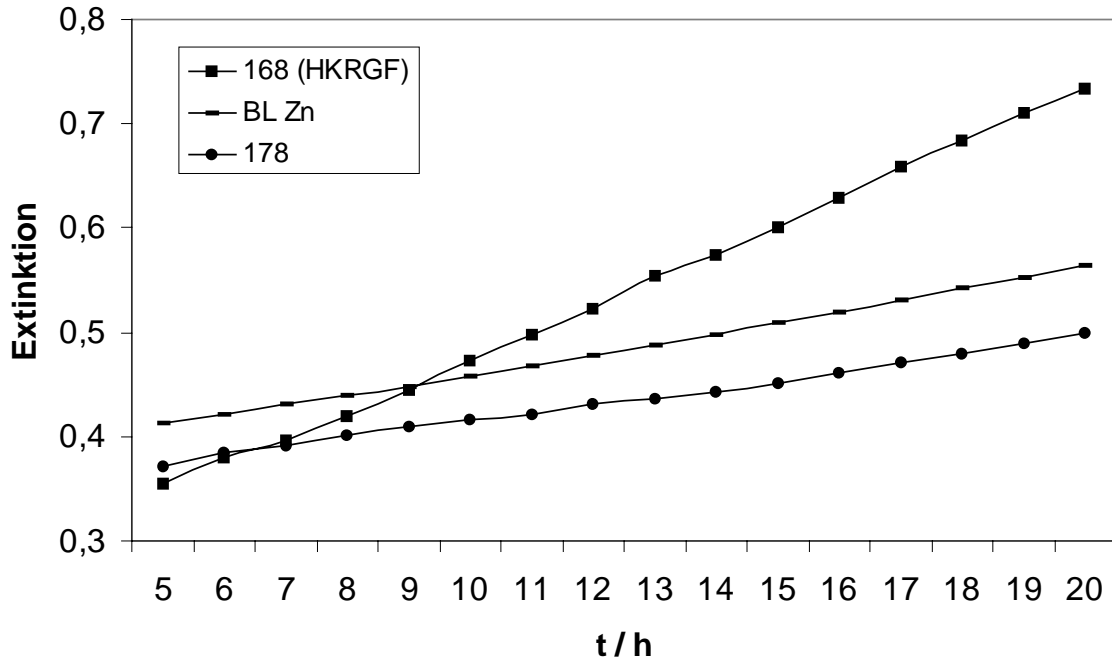
7.15.2.1 Photometrische Aktivitätskontrolle von N^α -((*E*)-2,3,4,5,6-Pentafluorcinnamoyl)-L-arginyl-L-lysyl-L-histidin **178** auf künstliche Phosphorsäurediesterase-Aktivität [RAR-I-336]



In eine Küvetten wurden 2.00 ml einer Lösung gegeben, die folgende Konzentrationen aufwies: 1.00×10^{-3} M Ligand **178**, 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0). Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

Die Reaktionslösung des entsprechenden Blindwertes hatte die gleiche Zusammensetzung, jedoch fehlte der Ligand.

Zum Vergleich wurden nochmals 2.00 μmol des Liganden **168** in eine Küvette mit 2.00 ml einer Lösung von 5.00×10^{-3} M Bis(4-nitrophenyl)phosphat **19**, 5.00×10^{-4} M ZnCl_2 und 0.10 M EPPS-Puffer (pH = 8.0) gegeben und die Extinktion bei 405 nm verfolgt.

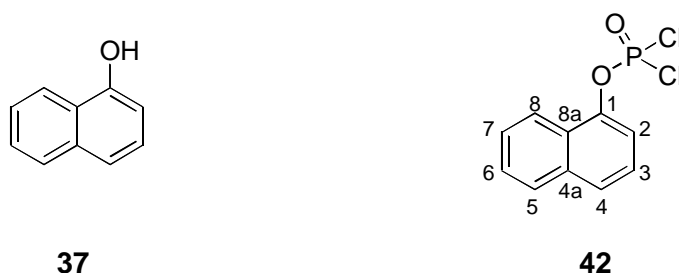


Ligand	Steigung der Geraden
Blindwert ZnCl_2 (BL Zn)	0.0101 +/- 0.0005
178	0.0081 +/- 0.0004
168 (Code: HKRGF)	0.0257 +/- 0.0010

7.16 Synthese der beiden Fluoreszenz-Reporter 40 und 41 für Phosphorsäurediesterase-Aktivität

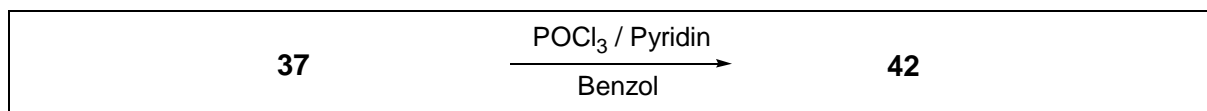
7.16.1 Synthese des Fluoreszenz-Reporters 40

7.16.1.1 Darstellung von (1-Naphthalinyl)-phosphordichloridat 42 [RAR-D-I-28]^[88]



37

42



Eine siedende Lösung von 25.0 g (174 mmol, 1.00 eq.) 1-Naphthol **37** und 26.7 g (174 mmol, 1.00 eq.) Phosphorylchlorid in 90.0 ml abs. Benzol wurde unter Stickstoff in einem 250 ml Kolben während 30 min mit 13.7 g (174 mmol, 1.00 eq.) abs. Pyridin versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde noch weitere 15 min erhitzt, bevor das ausgefallene Pyridiniumchlorid abfiltriert wurde. Danach wurde das Benzol abdestilliert und der verbliebene Rückstand fraktioniert destilliert. So konnten 32.0 g (123 mmol, 71% der Theorie) des Produktes **42** bei einem Druck von 0.06 mbar und einer Temperatur von 125 °C als farbloses Öl isoliert werden (Lit. ^[88]: 27 mbar, 200 °C, 93% Ausbeute).

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3060 [m, $\nu(\text{C-H})$ aryl]; 1629 [m]; 1595, 1507 [beide s, beide $\nu(\text{C=C})$ aryl]; 1461 [s]; 1356 [m]; 1317 [s]; 1239 [m, $\nu_{\text{asym}}(\text{C-O})$]; 1207 [s, $\nu(\text{P=O})$]; 1147 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{P-O-C})$]; 1117 [s, $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O})$]; 981 [s], 944 [m, beide $\nu(\text{P-O})$]; 883 [m]; 823 [s], 754 [s, alle $\gamma(\text{C-H})$ aryl]; 684, 641 [beide m]; 617 [s, $\delta(\text{P-O-C}_{\text{aryl}})$].

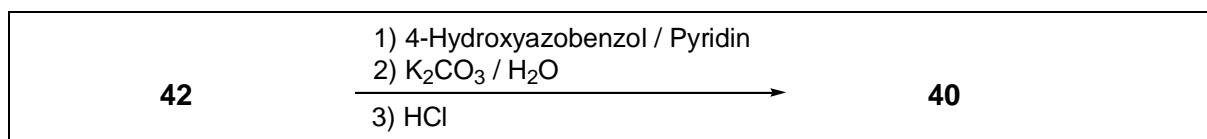
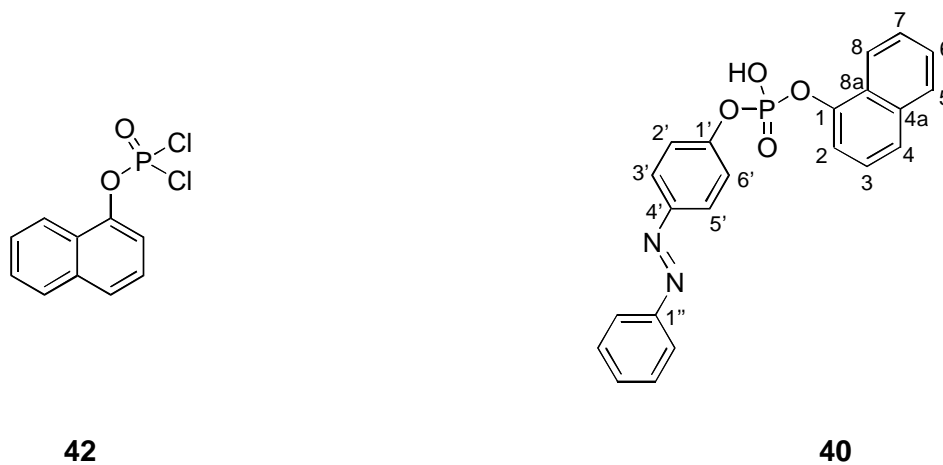
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.26-7.63 (m, 4H, aryl-H), 7.81 (d, ³J_{2-H-3-H} = 8.2 Hz, 1H, aryl-2-H), 7.91 (d, ³J_{4-H-3-H} = 7.2 Hz, 1H, aryl-4-H), 8.10 (d, ³J_{8-H-7-H} = 7.5 Hz, 1H, aryl-8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 116.24$ (d, $^3J_{\text{C-2-P}} = 4.9$ Hz, aryl-CH-2), 121.30 (d, $^5J_{\text{C-4-P}}$ oder $\text{C-7-P} = 1.5$ Hz, aryl-CH-4 oder aryl-CH-7), 125.25 (d, $^4J_{\text{C-3-P}}$ oder $\text{C-8-P} = 2.9$ Hz, aryl-CH-3 oder aryl-CH-8), 125.85 (s, $^3J_{\text{C-8a-P}} = 7.5$ Hz, aryl-C-8a), 127.10 (d, $^4J_{\text{C-3-P}}$ oder $\text{C-8-P} = 2.6$ Hz, aryl-CH-3 oder aryl-CH-8), 127.25 (d, aryl-CH), 127.29 (d, aryl-CH), 127.99 (d, aryl-CH), 135.02 (s, aryl-C-4a), 146.11 (s, $^2J_{\text{C-1-P}} = 12.5$ Hz, aryl-C-1).

$^{31}\text{P-NMR}$: (90 MHz, Acetonitril) $\delta = 3.44$.

EI-HRMS: m/z (% Int., Summenformel, Δmmol): 259.9558 (90, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_2^{35}\text{Cl}_2\text{P}^+$, 0.3) [M^+], 223.9789 (7.1, $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_2^{35}\text{ClP}^+$, 0.5), 143.0529 (8.4, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}^+$, 3.2), 126.0424 (42, $\text{C}_{10}\text{H}_6^+$, 4.6), 115.0551 (100, C_9H_7^+ , 0.3).

7.16.1.2 Synthese des (1-Naphthalenyl)[4-(phenylazo)phenyl]hydrogenphosphats **40** [RAR-I-44]



In einem 250 ml Kolben wurden unter Stickstoff in 30.0 ml abs. Toluol 2.64 g (10.1 mmol, 1.00 eq.) (1-Naphthalinyl)-phosphorodichloridat **42** und 3.19 g (40.4 mmol, 4.00 eq.) abs. Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei Raumtemp. innerhalb von 30 min eine Lösung von 2.00 g (10.1 mmol, 1.00 eq.) 4-Hydroxyazobenzol **39** in 150 ml abs. Toluol zugetropft. Danach wurde vier Stunden bei 80 °C und anschließend 14 h bei Raumtemp. gerührt. Das ausgefallene Pyridiniumchlorid wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer auf

20 ml eingeeengt. Zu dieser öligen Flüssigkeit wurden 20.0 ml Pyridin : Wasser (1:1) gegeben und bei Raumtemp. eine Stunde gerührt, bevor die Reaktionsmischung mit 100 ml Wasser versetzt wurde. Zu dieser orangefarbenen Reaktionslösung wurden 15.0 g K_2CO_3 und 150 ml Chloroform gegeben und dieses Zweiphasensystem stark geschüttelt, worauf das Kaliumsalz des Produktes auszufallen begann. Nach drei Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert.

Dieses Kaliumsalz wurde in 150 ml Wasser erhitzt, von etwas unlöslichem Rückstand abfiltriert und das rote Filtrat mit 10.0 ml konz. HCl versetzt, worauf sofort ein orangefarbener Niederschlag ausfiel. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert und aus Aceton umkristallisiert. So konnten 2.22 g (5.49 mmol, 54% der Theorie) des Produktes **40** als orangefarbenes Kristallpulver gewonnen werden.

Schmp.: 167 °C.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3048 [m, $\nu(C-H)$ aryl]; 2700-2000 [br. w, $\nu(O-H)$]; 1635 [br. m, $\delta(O-H)$]; 1598, 1496 [beide s, $\nu(C=C)$ aryl]; 1391 [s]; 1222 [s, $\nu(P=O)$]; 1204 [s, $\nu_{asym}(C-O)$]; 1087 [m, $\nu_{sym}(C-O)$]; 1046, 989 [beide s, beide $\nu(P-O)$]; 850, 797, 768, 744 [alle s, alle $\gamma(C-H)$ aryl]; 564 [s, $\delta(P-O-C_{aryl})$].

1H -NMR: (300 MHz, d_6 -DMSO) δ = 7.34-7.51 (m, 4H, aryl-H), 7.51-7.64 (m, 5H, aryl-H), 7.70-7.78 (m, 1H, aryl-H), 7.81-8.00 (m, 5H, aryl-H), 8.03-8.13 (m, 1H, aryl-H), 11.20 (br. s, 1H, OH, mit D_2O austauschbar).

^{13}C -NMR: (75 MHz, d_6 -DMSO) δ = 115.10 (d, $^3J_{C-2-P}$ = 2.8 Hz, aryl-CH-2), 121.00 (d, $^3J_{C-2',6'-P}$ = 5.1 Hz, aryl-CH-2',6'), 121.70 (d, aryl-CH), 122.64 (d, aryl-CH), 124.32 (d, aryl-CH), 124.38 (d, aryl-CH), 125.97 (d, $^4J_{C-3-P}$ oder $C-3',5'-P$ = 1.7 Hz aryl-CH-3 oder aryl-CH-3',5'), 126.32 (s, $^3J_{C-8a-P}$ = 6.2 Hz, aryl-C-8a), 126.44 (d, aryl-CH), 126.81 (d, aryl-CH), 127.87 (d, aryl-CH), 129.60 (d, aryl-CH), 131.55 (d, aryl-CH), 134.47 (s, aryl-C-4a), 147.16 (s, $^2J_{C-1-P}$ = 7.4 Hz, aryl-C-1), 148.64 (s, aryl-C-4'), 152.06 (s, aryl-C-1''), 153.96 (s, $^2J_{C-1'-P}$ = 6.8 Hz, aryl-C-1').

^{31}P -NMR: (80 MHz, d_6 -DMSO) δ = -11.68.

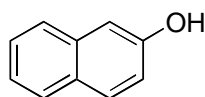
UV/VIS: $\lambda_{max.}$ = 220 nm (ϵ = 54300 l x mol $^{-1}$ x cm $^{-1}$), 290 nm (ϵ = 9385 l x mol $^{-1}$ x cm $^{-1}$), 330 nm (ϵ = 14910 l x mol $^{-1}$ x cm $^{-1}$), 417 nm (ϵ = 1322 l x mol $^{-1}$ x cm $^{-1}$).

LDI-MS: m/z (% Int.): 403.4 (100) [M⁻-H], 298 (5) [C₁₆H₁₁O₄P⁻], 222.8 (450) [C₁₀H₈O₄P⁻], 197.1 (12) [C₁₂H₉N₂P⁻], 142.9 (50) [C₁₀H₇O⁻].

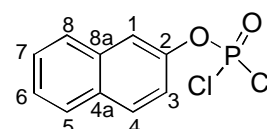
EA: C₂₂H₁₇N₂O₄P; M = 404.36 g/mol
 ber.: C: 65.35% H: 4.24% N: 6.93% P: 7.66%
 gef.: C: 65.50% H: 4.47% N: 6.95% P: 7.62%.

7.16.2 Synthese des Fluoreszenz-Reporters 41

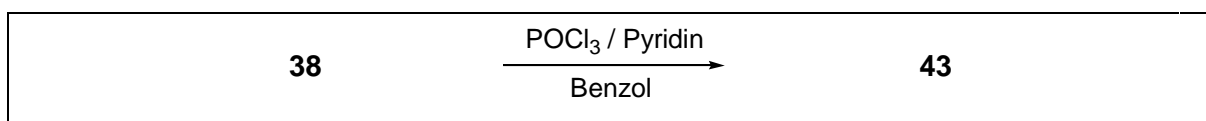
7.16.2.1 Darstellung von (2-Naphthalinyl)-phosphorodichloridat 43 [RAR-I-109]^[88]



38



43



Eine siedende Lösung von 25.0 g (174 mmol, 1.00 eq.) 2-Naphthol **38** und 26.7 g (174 mmol, 1.00 eq.) Phosphorylchlorid in 90.0 ml abs. Benzol wurde in einem 250 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter unter Stickstoff während 30 min mit 13.7 g (174 mmol, 1.00 eq.) abs. Pyridin versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde noch weitere 15 min erhitzt, bevor das ausgefallene Pyridiniumchlorid abfiltriert wurde. Danach wurde das Benzol abdestilliert und der verbliebene Rückstand fraktioniert destilliert. So konnten 35.0 g (134 mmol, 77% der Theorie) des Produktes **43** bei einem Druck von 0.16 mbar und einer Temperatur von 120 °C (Lit.^[88]: 27 mbar, 204 °C, 75% Ausbeute) als farbloses Öl isoliert werden, welches sich bei Raumtemp. verfestigte.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3060 [m, ν (C-H) aryl]; 1632 [m]; 1598, 1510 [beide m, ν (C=C) aryl]; 1463 [m]; 1359 [m]; 1302 [s]; 1267 [m]; 1240 [m, ν_{asym} (C-O)]; 1208 [s, ν (P=O)]; 1152 [s, ν_{sym} (P-O-C)]; 1120 [s, ν_{sym} (C-O)]; 976 [s], 942 [m, beide ν (P-O)]; 884 [m]; 862 [m], 811 [s], 751 [s, alle γ (C-H) aryl]; 684, 641 [beide m]; 605 [s, δ (P-O-C_{aryl})]; 557, 522, 476 [alle m].

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.37-7.44 (m, 1H, aryl-H), 7.48-7.61 (m, 2H, aryl-H), 7.69-7.80 (m, 1H, aryl-H), 7.81-7.95 (m, 3H, aryl-H).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ = 117.86 (d, ³J_{C-1-P} oder C-3-P = 6.2 Hz, aryl-CH-1 oder aryl-CH-3), 119.50 (d, ³J_{C-1-P} oder C-3-P = 5.1 Hz, aryl-CH-1 oder aryl-CH-3), 126.65 (d, aryl-CH), 127.40 (d, aryl-CH), 127.86 (d, aryl-CH), 127.90 (d, aryl-CH), 130.66 (d, aryl-CH), 131.82 (s, aryl-C-4a), 133.62 (s, aryl-C-8a), 147.35 (s, ²J_{C-2-P} = 11.9 Hz, aryl-C-2).

³¹P-NMR: (90 MHz, Essigester) δ = 1.40.

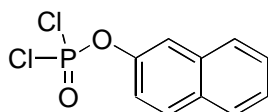
EI-MS: m/z (Int.): 260.0 (100) [C₁₀H₇O₂³⁵Cl₂P⁺, M⁺], 224.0 (8.7) [C₁₀H₆O₂³⁵ClP⁺], 190.0 (5.0) [C₁₀H₇O₂P⁺], 143.0 (8.0) [C₁₀H₇O⁺], 126.0 (20.6) [C₁₀H₆⁺], 115.1 (41.6) [C₉H₇⁺].

EA: C₁₀H₇Cl₂O₂P; M = 261.04 g/mol

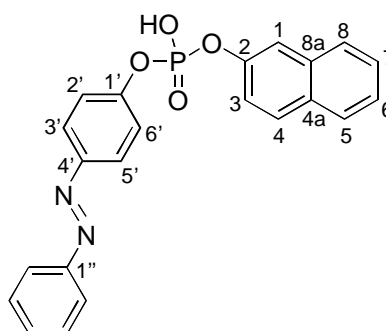
ber.: C: 46.01% H: 2.70% Cl: 27.16% P: 11.87%

gef.: C: 45.99% H: 2.76% Cl: 26.94% P: 11.94%.

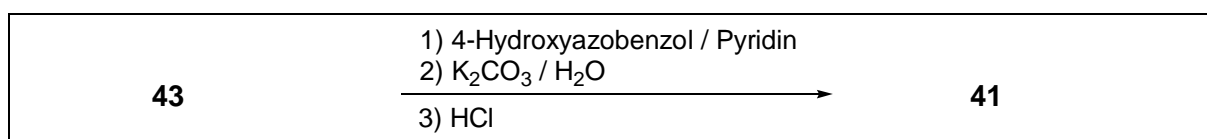
7.16.2.2 Synthese des (2-Naphthalenyl)[4-(phenylazo)phenyl]hydrogenphosphats 41 [RAR-I-110]



43



41



In einem 500 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter wurden unter Stickstoff 5.90 g (22.6 mmol, 1.00 eq.) (2-Naphthalinyl)-phosphorodichloridat **43** und 4.47 g (22.6 mmol, 1.00 eq.) 4-Hydroxyazo-benzol **39** in 300 ml abs. Toluol unter Erhitzen gelöst. Zu dieser Lösung wurden nun innerhalb von 30 min 7.14 g (90.4 mmol, 4.00 eq.) abs. Pyridin zugetropft. Danach wurde vier Stunden auf 80 °C erhitzt und über Nacht bei Raumtemp. nachgerührt, anschließend das ausgefallene Pyridiniumchlorid abfiltriert und das Toluol am Rotationsverdampfer auf 20 ml eingengt. Zu dem öligen Rückstand wurden 20.0 ml Pyridin : Wasser (1:1) gegeben und bei Raumtemp. eine Stunde stark gerührt.

Die Reaktionsmischung wurde dann mit konz. Salzsäure auf pH = 1 eingestellt. Nach 14 h fiel ein dunkelroter Niederschlag aus, der abfiltriert und aus Aceton umkristallisiert wurde. So konnten 3.22 g (7.96 mmol, 35% der Theorie) des Produktes **41** in Form orangefarbener Plättchen erhalten werden.

Schmp.: 146 °C.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3422 [br. w, ν (O-H)]; 3059 [w, ν (C-H) aryl]; 1633 [m]; 1596, 1497 [beide m, beide ν (C=C) aryl]; 1465 [m]; 1274 [m]; 1228 [s, ν_{asym} (C-O)]; 1208 [s, ν (P=O)]; 1160 [m, ν_{sym} (P-O-C)]; 1102 [m, ν_{sym} (C-O)]; 1008 [m], 976, 946 [beide s, beide ν (P-O)]; 851 [s], 743 [m, beide γ (C-H) aryl]; 687 [m]; 551 [m, δ (P-O-C_{aryl})]; 476 [m].

¹H-NMR: (300 MHz, d₆-DMSO) δ = 5.05 (br. s, 1H, OH, mit D₂O austauschbar), 7.32-7.51 (m, 5H, aryl-H), 7.52-7.63 (m, 3H, aryl-H), 7.68-7.73 (br. s, 1H, aryl-H), 7.78-7.94 (m, 7H, aryl-H).

¹³C-NMR: (50 MHz, d₆-DMSO) δ = 115.79 (d, ³J_{C-3-P} = 4.6 Hz, aryl-CH-3), 120.77 (d, ³J_{C-1-P} oder C-2',6'-P = 4.6 Hz, aryl-CH-1 oder aryl-CH-2',6'), 121.08 (d, ³J_{C-1-P} oder C-2',6'-P = 5.3 Hz, aryl-CH-1 oder aryl-CH-2',6'), 122.56 (d, aryl-CH), 124.20 (d, aryl-CH), 124.90 (d, aryl-CH), 126.59 (d, aryl-CH), 127.28 (d, aryl-CH), 127.69 (d, aryl-CH), 129.34 (d, aryl-CH), 129.58 (d, aryl-CH), 129.93 (s, aryl-C-4a), 131.32 (d, aryl-CH), 133.81 (s, aryl-C-8a), 147.91 (s, aryl-C-2), 150.21 (s, ²J_{C-4'-P} = 6.9 Hz, aryl-C-4'), 152.11 (s, aryl-C-1''), 155.38 (s, ²J_{C-1'-P} = 6.9 Hz, aryl-C-1').

³¹P-NMR: (80 MHz, d₆-DMSO) δ = -11.98.

UV/VIS: $\lambda_{\max.} = 220 \text{ nm}$ ($\epsilon = 63090 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 276 nm ($\epsilon = 6735 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 286 nm ($\epsilon = 7480 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 329 nm ($\epsilon = 15280 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 419 nm ($\epsilon = 1195 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

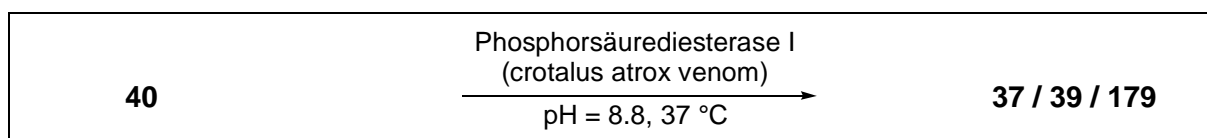
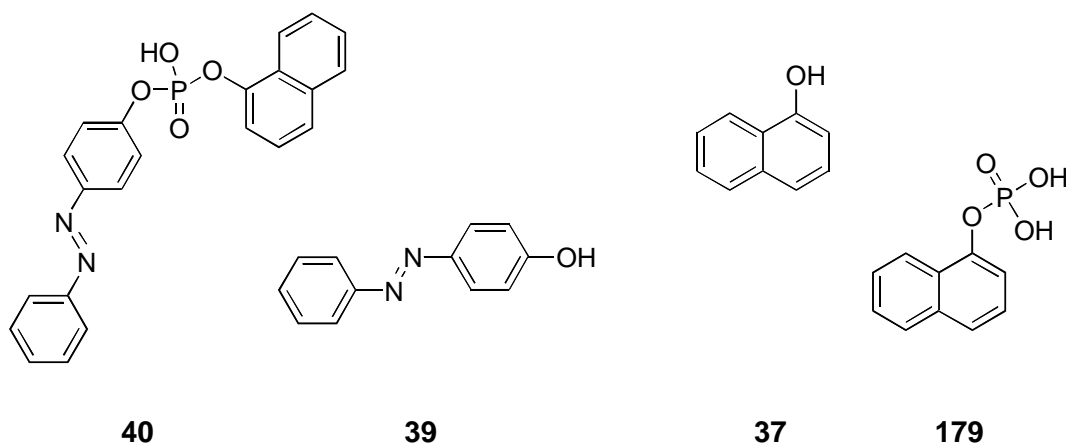
LDI-MS: m/z (Int.): 403.6 (100) [$M-H$], 298.4 (7) [$C_{16}H_{11}O_4P^-$], 197.4 (7) [$C_{12}H_9N_2O^-$].

EA: $C_{22}H_{17}N_2O_4P$; $M = 404.36 \text{ g/mol}$
 ber.: C: 65.35% H: 4.24% N: 6.93% P: 7.66%
 gef.: C: 65.24% H: 4.23% N: 6.91% P: 7.68%.

7.17 Enzymatische Spaltung der Fluoreszenz-Reporter 40 und 41 durch natürliche Phosphorsäurediesterasen

7.17.1 Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 40

7.17.1.1 Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters 40 durch Phosphorsäurediesterase I (crotalus atrox venom) [RAR-I-144]



Zu einer $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ Lösung von **40** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Küvette 0.05 u Phosphorsäurediesterase I (50.0 μl einer Lösung von 5.00 mg Phosphorsäurediesterase I aus crotalus atrox venom, *Sigma*, 0.10 u/mg, in 500 μl AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8), alkalische Phosphatase-Aktivität: < 0.001 u/mg) gegeben und die Spal-

tion von **40** fluoreszenzspektroskopisch ($\lambda_{\text{ex.}} = 290 \text{ nm}$) in einem temperierbaren Fluoreszenzspektroskop verfolgt. Das Gesamtvolumen betrug dabei 1.50 ml.

Zum Vergleich wurde zusätzlich das Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{ex.}} = 290 \text{ nm}$) einer Mischung von $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ 1-Naphthylphosphat **179** und $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ 4-Hydroxyazobenzol **39** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen. Das Gesamtvolumen betrug dabei ebenfalls 1.50 ml.

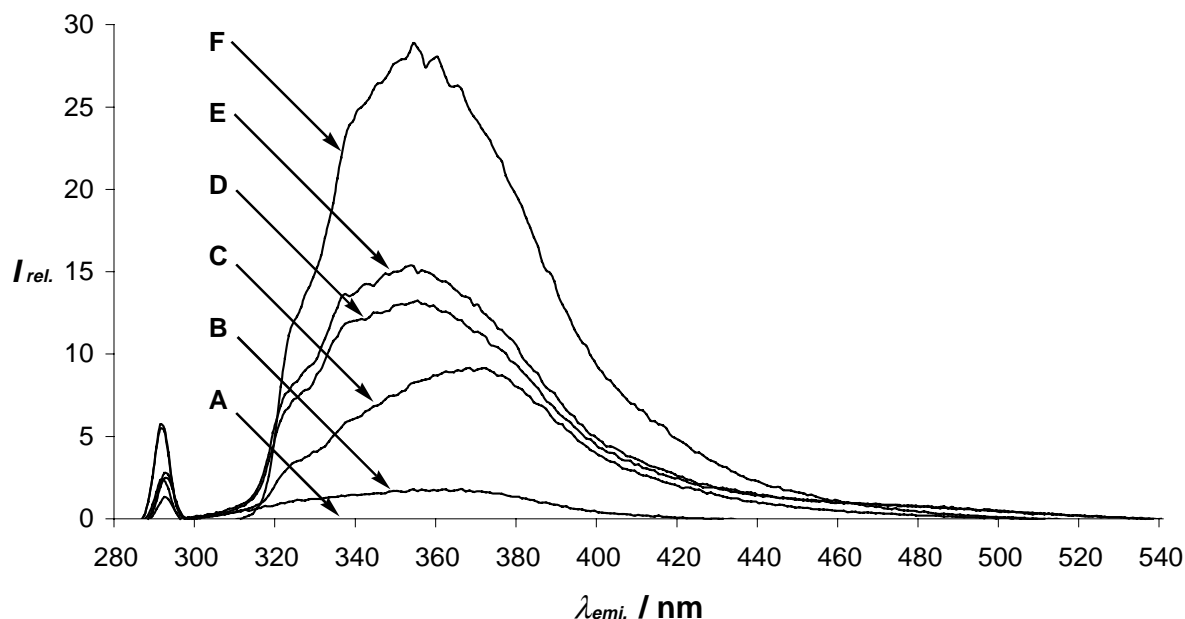
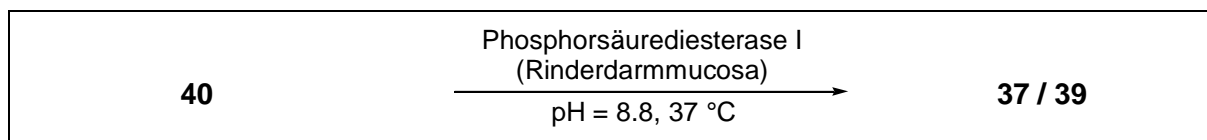
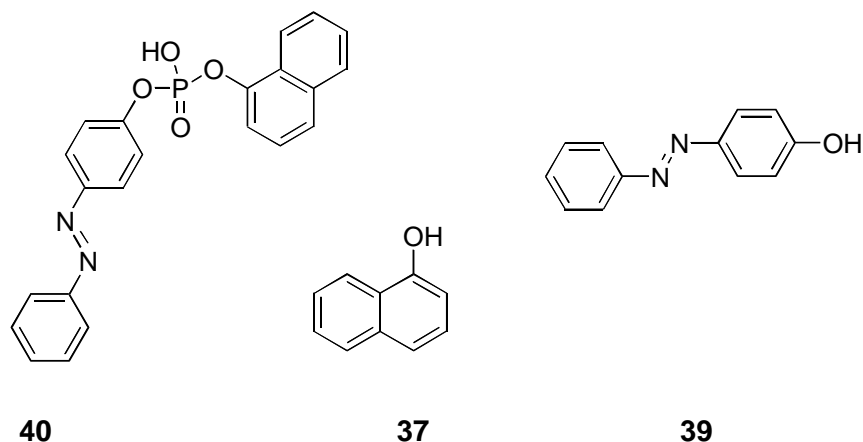


Abb. 7.17.1: Fluoreszenzspektren einer $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ Lösung von **40** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8); **A:** Ohne Zusatz des Enzyms; **B:** Nach Zusatz von 0.05 u Phosphorsäurediesterase I (*crotalus atrox* venom); **C:** 30 min nach Enzymzugabe; **D:** 360 min nach Enzymzugabe; **E:** 240 min nach Enzymzugabe; **F:** Vergleich: $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ 1-Naphthylphosphat **179** + $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ 4-Hydroxyazobenzol **39**

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurde HPLC-analytisch (Probenmenge: 10.0 μl ; Säule: LiChroCART™, Superspher™ 60, RP-select B; Laufmittel: Methanol : Wasser (80:20); Fluß: 0.70 ml/min) parallel zur fluoreszenzspektroskopischen Reaktionsverfolgung ermittelt. Folgende Substanzen konnten durch Koinjektion 30 min nach Enzymzugabe identifiziert werden: Phosphorsäurediester **40** ($\tau_{\text{R}} = 11.2 \text{ min}$), 4-Hydroxyazobenzol **39** ($\tau_{\text{R}} = 34.2 \text{ min}$), 1-Naphthol **37** ($\tau_{\text{R}} = 23.4 \text{ min}$) und 1-Naphthylphosphat **179** ($\tau_{\text{R}} = 17.3 \text{ min}$).

7.17.1.2 Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters **40** durch Phosphorsäurediesterase I (Rinderdarmmucosa) [RAR-I-144]



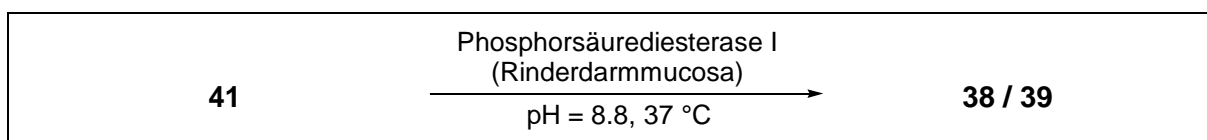
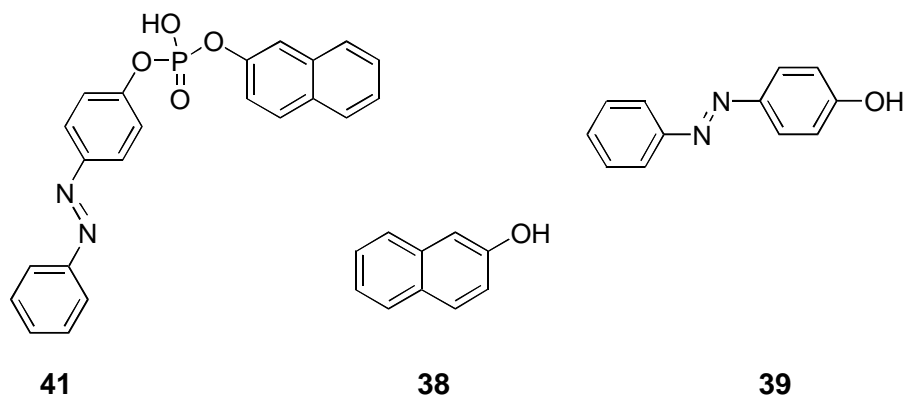
Zu einer 5.00×10^{-5} M Lösung von **40** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) wurden bei 37 °C in einer Küvette 0.05 u Phosphorsäurediesterase I (25.0 µl einer Lösung von 1.00 mg Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa, *Sigma*, 1.00 u/mg, in 500 µl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.20 M, pH = 7.0)) mit nicht quantifizierter unspezifischer Phosphatase-Aktivität gegeben und die Spaltung von **40** fluoreszenzspektroskopisch ($\lambda_{\text{ex.}} = 290$ nm) in einem temperierbaren Fluoreszenzspektroskop verfolgt. Das Gesamtvolumen betrug dabei 1.50 ml.

Es konnte kein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurde HPLC-analytisch (Probenmenge: 10.0 µl; Säule: LiChroCART™, Superspher™ 60, RP-select B; Laufmittel: Methanol : Wasser (80:20); Fluß: 0.70 ml/min) parallel zur fluoreszenzspektroskopischen Reaktionsverfolgung ermittelt. Folgende Substanzen konnten durch Koinjektion 30 min nach Enzymzugabe identifiziert werden: Phosphorsäurediester **40** ($\tau_{\text{R}} = 11.2$ min), 4-Hydroxyazobenzol **39** ($\tau_{\text{R}} = 34.2$ min) und 1-Naphthol **37** ($\tau_{\text{R}} = 23.4$ min).

1-Naphthylphosphat **179** ($\tau_{\text{R}} = 17.3$ min) konnte im Reaktionsansatz nicht nachgewiesen werden.

7.17.2 Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters **41** durch Phosphorsäure- diesterase I (Rinderdarmmucosa) [RAR-I-144]



Zu einer 5.00×10^{-5} M Lösung von **41** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) wurden bei 37 °C in einer Küvette 0.05 u Phosphorsäurediesterase I (25.0 μ l einer Lösung von 1.00 mg Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa, *Sigma*, 1.00 u/mg, in 500 μ l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.20 M, pH = 7.0)) mit nicht quantifizierter unspezifischer Phosphatase-Aktivität gegeben und die Spaltung von **41** fluoreszenzspektroskopisch ($\lambda_{\text{ex.}} = 326$ nm, $\lambda_{\text{emi.}} = 357$ nm) in einem temperierbaren Fluoreszenzspektroskop verfolgt. Das Gesamtvolumen betrug dabei 1.50 ml.

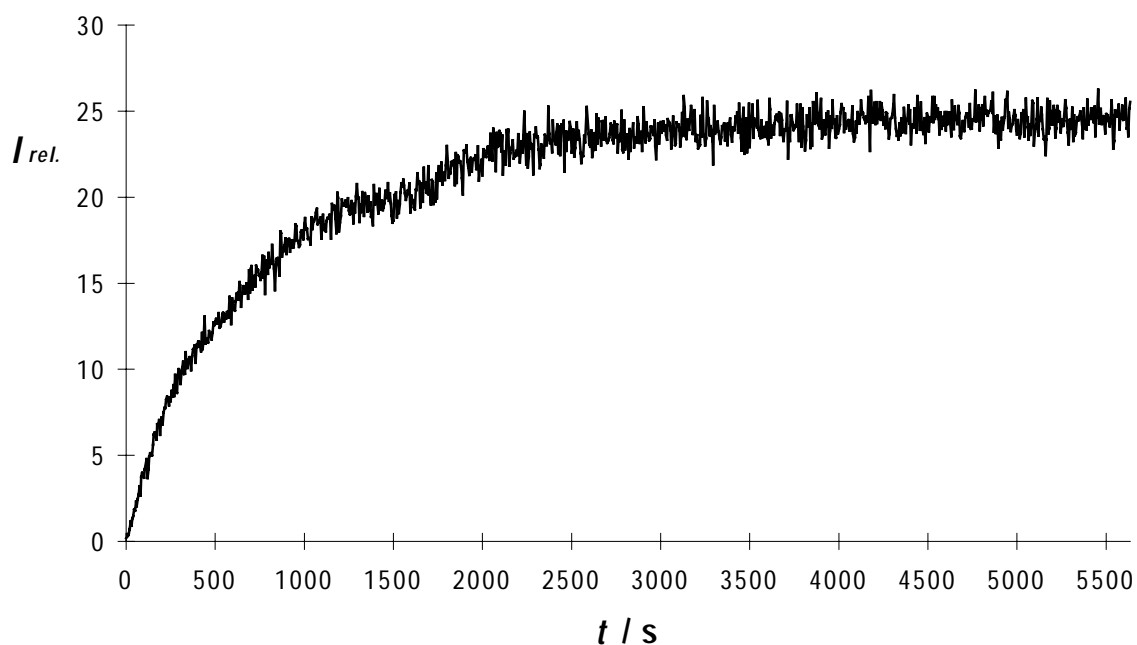


Abb. 7.17.2: Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Hydrolyse von $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ **41** durch 0.05 u Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) bei 37 °C ($\lambda_{\text{ex.}} = 326 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi.}} = 357 \text{ nm}$)

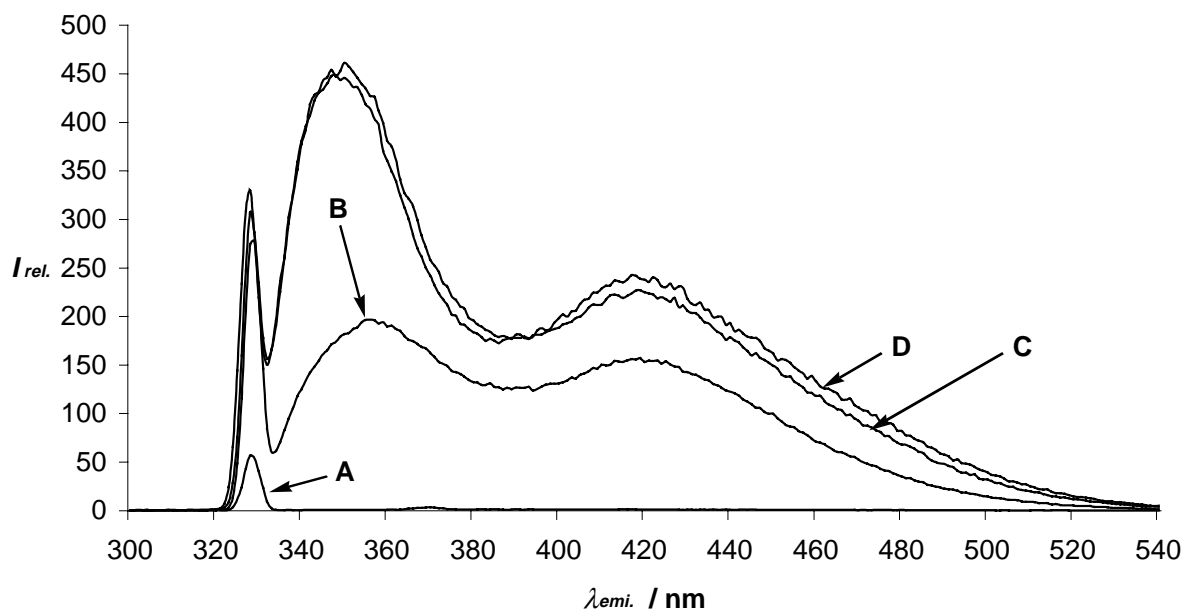


Abb. 7.17.3: Fluoreszenzspektren einer $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ Lösung von **41** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8); **A:** Ohne Zusatz des Enzyms; **B:** 40 min nach Zugabe von 0.05 u Phosphorsäurediesterase I (Rinderdarmmucosa); **C:** 4 h nach Enzymzugabe (Ende der Reaktion); **D:** Vergleich: $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-Naphthol **38** + $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ 4-Hydroxyazobenzol **39**

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurde HPLC-analytisch (Probenmenge: 10.0 µl; Säule: LiChroCART™, Superspher™ 60, RP-select B; Laufmittel: Methanol : Wasser (80:20); Fluß: 0.70 ml/min) parallel zur fluoreszenzspektroskopischen Reaktionsverfolgung ermittelt. Folgende Substanzen konnten durch Koinjektion 40 min nach Enzymzugabe identifiziert werden: Phosphorsäurediester **41** ($\tau_{\text{R}} = 14.5 \text{ min}$), 4-Hydroxyazobenzol **39** ($\tau_{\text{R}} = 34.2 \text{ min}$) und 2-Naphthol **38** ($\tau_{\text{R}} = 24.8 \text{ min}$).

2-Naphthylphosphat **180** ($\tau_{\text{R}} = 17.7 \text{ min}$) konnte im Reaktionsansatz nicht nachgewiesen werden.

7.17.3 Kinetik der Hydrolyse des Fluoreszenz-Reporters **41** durch Phosphorsäurediesterase I (Rinderdarmmucosa) [RAR-I-144]

Zu einer $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ Lösung von **41** in AMPSO-Puffer (0.10 M, pH = 8.8) wurden bei 37 °C in einer Küvette unterschiedliche Mengen (0.025 - 0.10 u) Phosphorsäurediesterase I (10.0,

25.0 bzw. 40.0 μl einer Lösung von 1.25 mg Phosphorsäurediesterase I aus Rinderdarmmucosa, *Sigma*, 1.00 u/mg, in 500 μl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.20 M, pH = 7.0)) mit nicht quantifizierter unspezifischer Phosphatase-Aktivität gegeben und die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{ex.}} = 326 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi.}} = 357 \text{ nm}$) zu Beginn der Reaktion (bis zwei Minuten nach Enzymzugabe) ermittelt. Das Gesamtvolumen betrug dabei 1.50 ml.

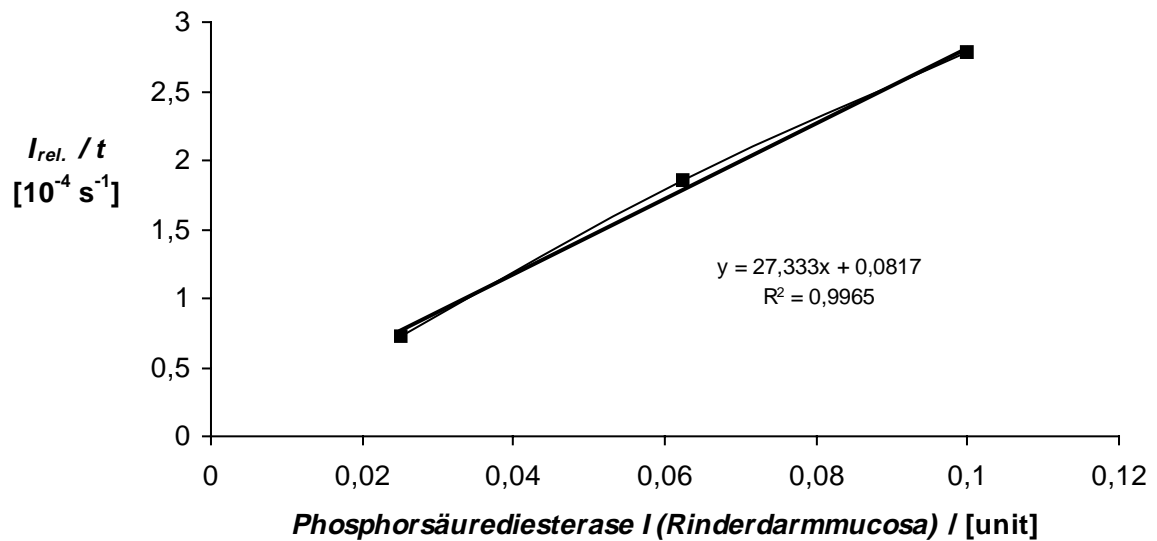


Abb. 7.17.4: Änderungen der relativen Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- 1 M. J. Plunkett, J. A. Ellman *Spektrum der Wissenschaft, Spezial: Pharma-forschung*, November **1997**, *Spezial 6*, 28-35.
- 2 (a) F. Balkenhohl, C. v. Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288-2337.
(b) *Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries - A Handbook* (Hrsg.: G. Jung), VCH, Weinheim, **1996**.
(c) S. R. Wilson, A. W. Czarnik *Combinatorial Chemistry - Synthesis and Application*, Wiley, New York, **1997**.
(d) M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233-1251 und 1385-1401.
(e) *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 111-170 (special issue on combinatorial chemistry).
(f) *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 347-510 (special issue on combinatorial chemistry).
- 3 L. C. Hsieh-Wilson, X.-D. Xiang, P. G. Schultz *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 164-170.
- 4 M. B. Francis, N. S. Finney, E. N. Jacobsen *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8983-8984.
- 5 K. Burgess, H.-J. Lim, A. M. Porte, G. A. Sulikowski *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 192-194; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 220-222.
- 6 G. Liu, J. A. Ellman *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7712-7713.
- 7 S. R. Gilbertson, X. Wang *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6475-6478.
- 8 B. M. Cole, K. D. Shimizu, C. A. Krueger, J. P. A. Harrity, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1776-1779; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1668-1671.
- 9 E. Reddington, A. Sapienza, B. Gurau, R. Viswanathan, S. Sarangapani, E. S. Smotkin, T. E. Mallouk *Science* **1998**, *280*, 1735-1737.
- 10 S. M. Senkan *Nature* **1998**, *394*, 350-353.
- 11 S. J. Taylor, J. P. Morken *Science* **1998**, *280*, 267-270.
- 12 E. Danielson, J. H. Golden, E. W. McFarland, C. M. Reaves, W. H. Weinberg, W. D. Wu *Nature* **1997**, *389*, 944-948.

- 13 (a) Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem., Prag, 1988, 5, 47.*
(b) Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo *Abstr. 10th Int. Symp. Med. Chem., Budapest, 1988, 9, 288.*
- 14 (a) H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 178-182.*
(b) G. Jung, A. G. Beck-Sickinger *Angew. Chem. 1992, 104, 375-391; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31, 367-383.*
- 15 R. A. Houghten *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 5131-5135.*
- 16 Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo *Int. J. Pept. Prot. Res. 1991, 37, 487-493.*
- 17 R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo *Nature 1991, 354, 84-86.*
- 18 K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmiersky, R. J. Knapp *Nature 1991, 354, 82-84.*
- 19 (a) R. W. Armstrong, A. P. Combs, P. A. Tempest, S. D. Brown, T. A. Keating *Acc. Chem. Res. 1996, 29, 123-131.* (b) *Tetrahedron 1998, 54, 3955-4150* (Tetrahedron Symposia-in-print number 70 „Solution Phase Combinatorial Chemistry“).
- 20 M. C. Pirrung, J. Chen. *J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 1240-1245.*
- 21 J. S. Früchtel, G. Jung *Angew. Chem. 1996, 108, 19-46; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1996, 35, 17-42.*
- 22 M. Winter in Ref. 1c, 465-510.
- 23 R. Frank *Tetrahedron 1992, 48, 9217-9232.*
- 24 E. Atherton, M. Caviezel, H. Over, R. C. Sheppard *J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1977, 819-821.*
- 25 M. D. Matteucci, M. H. Caruthers *J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 3185-3191.*
- 26 R. B. Merrifield *J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 2149-2154.*
- 27 W. Rapp in Ref. 1b, 425-464.
- 28 S. S. Wang *J. Am. Chem. Soc. 1973, 95, 1328-1333.*
- 29 M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg *Tetrahedron Lett. 1988, 29, 4005-4008.*
- 30 D. H. Rich, S. K. Gurwara *J. Am. Chem. Soc. 1975, 97, 1575-1579.*
- 31 C. C. Leznoff, S. Greenberg *Can. J. Chem. 1976, 54, 3824-3829.*
- 32 B. Chenera, J. A. Finkelstein, D. F. Veber *J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 11999-12000.*

- 33 E. Atherton, R. C. Sheppard *Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- 34 J. M. Fréchet *Tetrahedron* **1981**, *37*, 663-683.
- 35 C. C. Leznoff *Acc.Chem. Res.* **1978**, *11*, 327-333.
- 36 (a) P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4527-4554. (b) P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5643-5678.
- 37 M. M. Murphy, J. R. Schullek, E. M. Gordon, M. A. Gallop *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7029-7030.
- 38 (a) G. C. Look, C. P. Holmes, J. P. Chinn, M. A. Gallop *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7588-7590. (b) W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, J. N. Shoolery, P. A. Keifer *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955-7956. (c) R. C. Anderson, M. A. Jarema, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, M. Ziliox *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650-2651. (d) R. C. Anderson, M. J. Stokes, M. A. Shapiro *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311-5314. (e) P. A. Keifer *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1558-1559. (f) S. K. Sarkar, R. S. Garigipati, J. L. Adams, P. A. Keifer *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2305-2306.
- 39 E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook *Analyt. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- 40 B. J. Egner, G. J. Langley, M. Bradley *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2652-2653.
- 41 S. S. Yoon, W. C. Still *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8557-8560.
- 42 B. Déprez, X. Williard, L. Bourel, L. H. Coste, F. Hyafil, F. A. Tartar *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5405-5406.
- 43 S. M. Freier, D. A. M. Konings, J. R. Wyatt, D. J. Ecker *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 344-352.
- 44 J. M. Kerr, S. C. Banville, R. N. Zuckermann *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2529-2531.
- 45 S. Brenner, R. A. Lerner *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381-5383.
- 46 H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723-4724.
- 47 K. C. Nicolau, X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2476-2479; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2289-2292.
- 48 H. Han, M. Wolfe, S. Brenner, K. D. Janda *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6419-6423.
- 49 E. Bayer, M. Mutter *Nature* **1972**, *237*, 512-513.

- 50 M. Famulok, D. Faulhammer *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1911-1914; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1827-1830.
- 51 S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- 52 M. Rinnová, M. Lebl *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 171-231.
- 53 P. W. Finn, J. S. Mason *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 363-370.
- 54 Y.-C. Chen, T. Danon, L. Sastry, M. Mubarak, K. D. Janda, R. A. Lerner *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 357-358.
- 55 B. M. Cole, K. D. Shimizu, C. A. Krueger, K. W. Kuntz, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1782-1785; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *36*, 1668-1671.
- 56 F. M. Menger, A. V. Eliseev, V. A. Migulin *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6666-6667.
- 57 (a) D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295-2316. (b) K. Kurz *Chemie in unserer Zeit* **1998**, *32*, 94-103. (c) P. B. Dervan *Science* **1986**, *232*, 464-471.
- 58 D. P. Mack, P. B. Dervan *Biochemistry* **1992**, *31*, 9399-9405.
- 59 V. Jubian, R. P. Dixon, A. D. Hamilton *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1120-1121.
- 60 (a) M.-S. Muche, M. W. Göbel *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2263-2265; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2126-2129. (b) M. W. Göbel, J. W. Bats, G. Dürner *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 217-218; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 207-209.
- 61 (a) B. Linkletter, J. Chin *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 529-531; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 472-474. (b) D. Wahnnon, A. M. Lebus J. Chin, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2594-2597; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2412-2414. (c) E. Kimura, Y. Kodama, T. Koike, M. Shiro *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8304-8311. (d) W. H. Chapman Jr., R. Breslow *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5462-5469. (e) M. J. Young, D. Wahnnon, R. C. Hynes, J. Chin *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9441-9447. (f) M. J. Young, J. Chin *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10577-10578. (g) R. Hettich, H.-J. Schneider *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5638-5647.
- 62 (a) B. K. Takasaki, J. Chin *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8582-8585. (b) M. Komiyama, N. Takeda, Y. Takahashi, H. Uchida, T. Shiiba, T. Kodama, M. Yashiro *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 269-274. (c) K. G. Ragu-nathan, H.-J. Schneider *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1314-1316; *Angew.*

- Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1219-1221. (d) K. O. A. Chin, J. R. Morrow
Inorg. Chem. **1994**, *33*, 5036-5041.
- 63 H.-J. Schneider, J. Rammo, R. Hettich *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1773-
1776; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1716-1720.
- 64 H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze, K. B. Sharpless *Chem. Rev.* **1994**, *94*,
2483-2547.
- 65 H. Becker, K. B. Sharpless *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 447-449; *Angew.*
Chem. Int. Ed. Engl. **1996**, *35*, 448-451.
- 66 D. Hudson *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 617-624.
- 67 K. Burgess, A. I. Liaw, N. Wang *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2985-2987.
- 68 A. K. Hoffmann, A. T. Henderson *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4671-4672.
- 69 H. Han, K. D. Janda *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1835-1837; *Angew. Chem.*
Int. Ed. Engl. **1997**, *36*, 1731-1733.
- 70 R. Williard, V. Jammalamadaka, D. Zava, C. C. Benz, C. A. Hunt, P. J. Kus-
hner, T. S. Scanlan *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 45-51.
- 71 D. M. Perreault, E. V. Anslyn *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 470-490; *Angew.*
Chem. Int. Ed. Engl. **1997**, *36*, 432-450.
- 72 H. C. Kiefer, W. I. Congdon, I. S. Scarpa, I. M. Klotz *Proc. Nat. Acad. Sci.*
USA **1972**, *69*, 2155-2159.
- 73 A. Weller *Z. Elektrochem.* **1952**, *56*, 662-668.
- 74 P. Woolley, K. G. Steinhäuser, B. Epe *Biophys. Chem.* **1987**, *26*, 367-374.
- 75 E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson *Science*, **1990**, *247*,
954-958.
- 76 P. Hodge *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 417-424.
- 77 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organi-*
schen Chemie, 3. Auflage, Georg Thieme, Stuttgart, **1987**.
- 78 G. Sokrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies*, Wiley Interscience,
1980.
- 79 G. Cavallini, E. Massarani, D. Nardi, R. D'Ambrosio *J. Am. Chem. Soc.*
1957, *79*, 3514-3517.
- 80 M. J. Hickey *J. Org. Chem.* **1948**, *13*, 443-446.
- 81 H. Bunnel, D. A. Shirley *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 1545-1550.
- 82 K. Sisido, M. Kawanisi, K. Kondo, T. Morimoto, A. Saito, N. Hukue *J. Org.*
Chem. **1962**, *27*, 4073-4076.
- 83 T. F. West *J. Chem. Soc.* **1945**, 490.

- 84 G. Lu, S. Mojsov, J. Tam, R. B. Merrifield *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3443-3436.
- 85 T. Elkan *Chem. Ber.* **1886**, *19*, 3041-3054.
- 86 T. Elkan *Chem. Ber.* **1886**, *19*, 3054-3064.
- 87 V. V. Katyshkina, M. J. Kraft *Ž. obšč. chim.* **1956**, *26*, 3060-3066.
- 88 O. Friedman, A. Seligman *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 624-625.

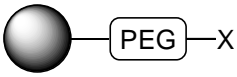
8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
AD	Asymmetrische Dihydroxylierung
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPSO	3-[(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-amino]-2-hydroxypropan-1-sulfonsäure
Arg	Arginin
ber.	Berechnet
BL	Blindwert
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
d	Tag(e)
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
(DHQ) ₂ PHAL	1,4-Bis(dihydrochininyl)phthalazin
(DHQD) ₂ AQN	1,4-Bis(dihydrochinidiny)anthrachinon
(DHQD) ₂ PHAL	1,4-Bis(dihydrochinidiny)phthalazin
(DHQD) ₂ PYR	4,6-Bis(dihydrochinidiny)-2,5-diphenylpyrimidin
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAA	Dimethylacetamid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuß
EPPS	3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-propan-1-sulfonsäure
eq.	Äquivalente
FG	funktionelle Gruppe
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
His	Histidin
HRMAS-NMR	hochaufgelöstes Magic Angle Spinning-NMR

Ile	Isoleucin
konz.	konzentriert
$\lambda_{\text{abs.}}$	Absorptionswellenlänge
$\lambda_{\text{emi.}}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{ex.}}$	Excitationswellenlänge
Leu	Leucin
Lit.	Literatur
Lys	Lysin
MAS	Magic Angle Spinning
min	Minute(n)
MOPSO	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
NMM	N-Methylmorpholin
olefin.	olefinisch
PEG	Polyethylenglycol
PEGMME	Polyethylenglycolmonomethylether
Phe	Phenylalanin
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
Pro	Prolin
PyBop	1-Benzotriazolyl-oxo-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
R	Rest
R_f	Retentionsfaktor
rac	racemisch
Raumtemp.	Raumtemperatur
Ser	Serin
τ_R	Retentionszeit
t	Zeit
<i>tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Trt	Trityl
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

Polymere:

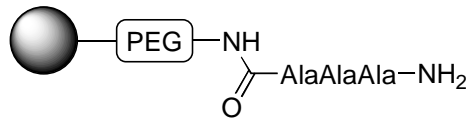
Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1)

X = OH, NH₂ bzw. COOH

Funktionalisierte TentaGele™: An Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1) immobilisiertes Polyethylenglycol, funktionalisiert mit Amino- bzw. Carbonsäurefunktionen



An Amino-TentaGel™ immobilisiertes Trialaninpeptid:

*Wang-Harz*

[4-(Hydroxymethyl)phenoxy]methyliertes Copoly(ethenylbenzol/diethenylbenzol) (99:1)

9.1 Erklärung

Erklärung

„Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. A. Berkessel betreut worden.“

Köln, den 21.09.1998

(Rainer Riedl)

9.2 Publikationsliste

Aus dieser Arbeit gingen bis zum Zeitpunkt der Abgabe folgende Veröffentlichungen hervor:

Oktober 1996 Vortrag im Rahmen eines Symposiums der Stipendiaten des Fonds der Chemischen Industrie, Karlsruhe, Titel: „Kombinatorische Katalysatorsynthese“

Juli 1997 A. Berkessel, R. Riedl „Fluoreszenz-Reporter für Phosphodiesterase-Aktivität“ *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1518-1520; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1481-1483.

Dieser Artikel wurde von N. Freestone als Highlight in *Chemistry & Industry* **1997**, 876-878 erwähnt.

August 1998 R. Riedl, R. Tappe, A. Berkessel „Probing the Scope of the Asymmetric Dihydroxylation of Polymer-Bound Olefins. Monitoring by HRMAS NMR Allows for Reaction Control and On-Bead Measurement of Enantiomeric Excess“ *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8994-9000.

9.3 Tabellarischer Lebenslauf

Deutsch, geboren am 19.08.1970 in Heppenheim, Kreis Bergstraße, ledig

Schulische Ausbildung:

1977 - 1981	Grundschule: Nibelungenschule Heppenheim
1981 - 1990	Starkenburger-Gymnasium Heppenheim

Studium:

Oktober 1990	Beginn des Chemiestudiums an der Ruprecht-Karls Universität in Heidelberg
November 1992	Diplom-Vorprüfung
Oktober 1994	Diplom-Hauptprüfung
Juli 1995	Abschluß der Diplomarbeit im 10. Semester (Arbeitskreis Prof. Dr. A. Berkessel, Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg, Gesamtnote: „mit Auszeichnung“); Titel der Diplomarbeit: „Zur kombinatorischen Synthese von künstlichen Phosphorsäurediesterasen“
August 1995- März 1997	Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. A. Berkessel, Universität Heidelberg, Thema: Kombinatorische Katalysatorsynthese
seit April 1997-	Fortführung der Dissertation bei Prof. Dr. A. Berkessel am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln

Stipendien und Auszeichnungen:

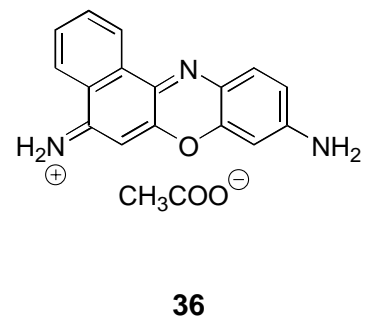
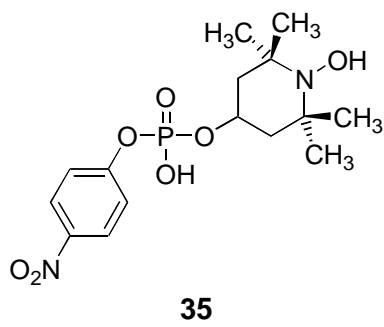
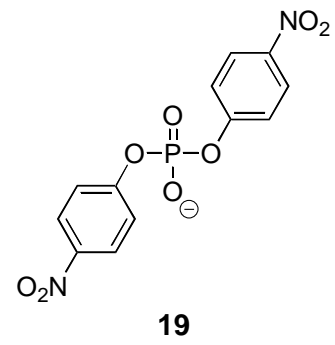
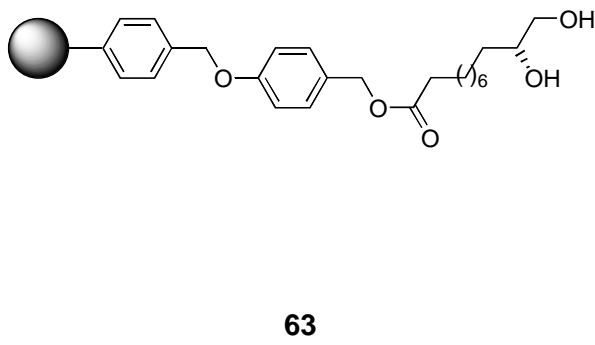
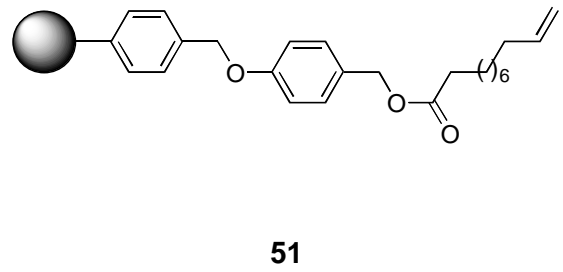
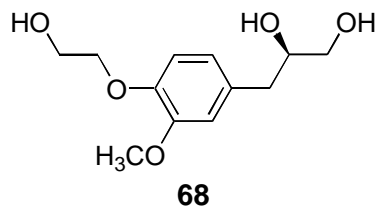
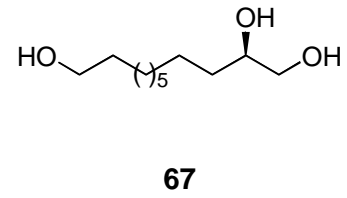
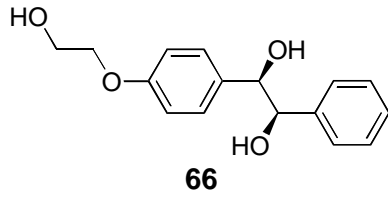
Juli 1990	Buchpreis des Fonds der Chemischen Industrie
Juli 1990	Gewinn der Bronzemedaille für die Bundesrepublik Deutschland bei der Internationalen Chemie-Olympiade 1990 in Paris
Oktober 1990- Juli 1995	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
Dezember 1993	1. Preisträger des Förderpreises für die chemischen Institute der Universität Heidelberg, gestiftet von der Firma Procter & Gamble für die beste Vordiplom-Prüfung

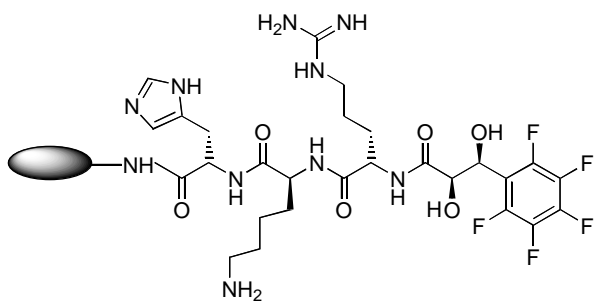
- August 1995-
Januar 1996 Stipendiat im Graduiertenkolleg „Selektivität in der Organischen und Metallorganischen Synthese und Katalyse“ der Institute für Organische und Anorganische Chemie der Universität Heidelberg
- Dezember 1995 Dr. Sophie-Bernthsen-Preis der Fakultät für Chemie der Universität Heidelberg für die beste Diplom-Hauptprüfung
- Februar 1996 Doktoranden-Stipendium der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie
- Mai 1998 Kurt-Alder-Preis, Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln

Sonstige Aktivitäten:

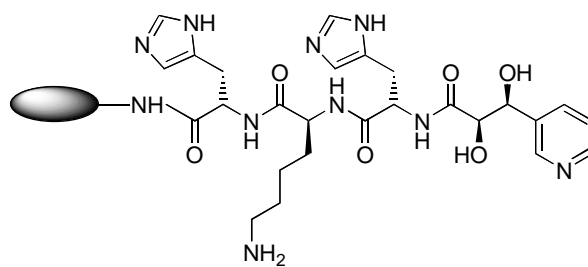
- Juni 1989 und
Juni 1990 Praktikum bei Merck, Darmstadt, für qualifizierte Schüler hessischer Gymnasien
- Januar 1990
und
April 1990 Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN), Universität Kiel: Auswahl- und Vorbereitungsseminare zur Internationalen Chemie-Olympiade (IChO) 1990, Paris, Frankreich
- August 1995-
März 1997 Mitglied des Graduiertenkollegs „Selektivität in der Organischen und Metallorganischen Synthese und Katalyse“ der Institute für Organische und Anorganische Chemie der Universität Heidelberg
- Juli 1995 Teilnahme am Combinatorial Synthesis Symposium, University of Exeter, Exeter, Großbritannien
- September 1995 Teilnahme am Workshop „Kombinatorische Chemie“, Universität Münster
- September 1995 Teilnahme am Doktorandenkurs 1995 der Bayer AG, Leverkusen
- Oktober 1997 Teilnahme am Workshop „Paradigmenwechsel in der Wirkstoffentwicklung“ des Fonds der Chemischen Industrie bei der Bayer AG, Leverkusen

9.4 Formelzusammenstellung

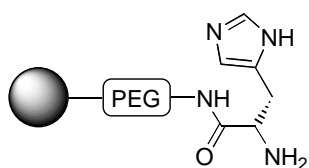




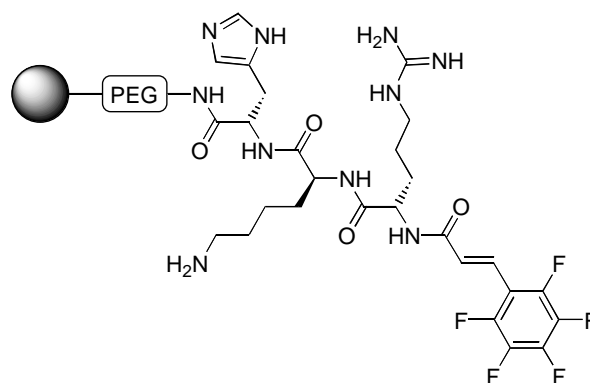
143



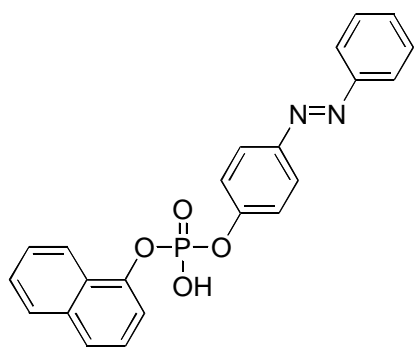
151



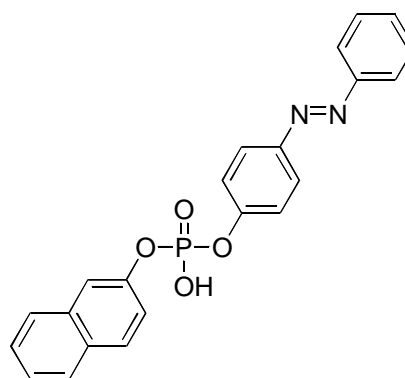
158



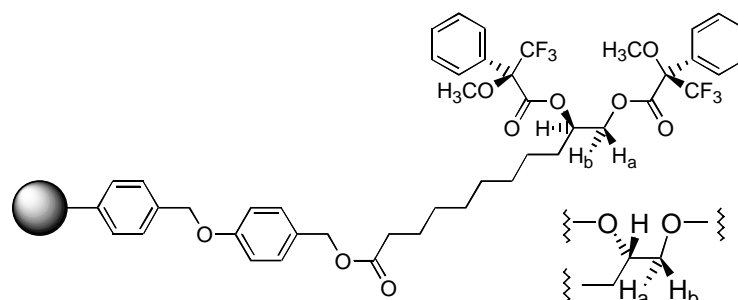
168



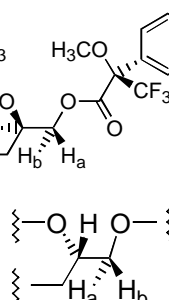
40



41



69



70