

Synthese von Stickstoffmonoxid-modulierenden L-Arginin-Derivaten und Prodrugs für Hydroxyguanidine



Dissertation

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

vorgelegt von

Dennis Schade

Kiel 2008

Referent:	Prof. Dr. B. Clement
Korreferent:	Prof. Dr. D. Heber
Tag der mündlichen Prüfung:	28. November 2008
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 10. Januar 2009

Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

Meiner Familie

VORBEMERKUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd Clement an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische & Medizinische Chemie, im Zeitraum von April 2005 bis Oktober 2008 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen bereits veröffentlicht:

Fachzeitschriften:

1. SCHADE, D.; TÖPKER-LEHMANN, K.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.
"Synthetic approaches to N^δ -methylated L-arginine, N^ω -hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and N^δ -cyano-L-ornithine."
The Journal of Organic Chemistry **2008**, 73 (3), 1025-1030.
2. SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.
"Efficient synthesis of optically pure N^ω -alkylated L-arginines."
Synthesis **2008**, 15, 2391-2397.
3. KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; TÖPKER-LEHMANN, K.; BEITZ, E.; CLEMENT, B.
" N^δ -Methylated L-arginine derivatives and their effects on the nitric oxide generating system."
Bioorganic and Medicinal Chemistry **2008**, 16 (5), 2305-2012.
4. KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; MUSCHICK, N.; BEITZ, E.; CLEMENT, B.
"Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: alkenyl-amidines as new leads."
Bioorganic and Medicinal Chemistry **2008**, 16 (24), 10205-10209

Patente:

1. CLEMENT, B.; KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.
"Inhibitoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase"
Anmeldetag: 11.12.**2008**, DE 10 2008 061. 247.2
2. CLEMENT, B.; KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.
"Derivate von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin zur Behandlung von Krankheiten"
Anmeldetag: 09.01.**2009**, DE 10 2009 004 203.2
3. CLEMENT, B.; SCHADE, D.
"Verfahren zur verbesserten Bioaktivierung von Arzneistoffen"
Anmeldetag: 09.01.**2009**, DE 10 2009 004 204.0

Posterbeiträge:

1. "Synthesis and testing of N^{δ} -methyl-L-citrulline as a novel inhibitor of nitric oxide synthases"
XIXth International Symposium on Medicinal Chemistry, Istanbul, Türkei, **2006**.
2. "Synthetic approaches to N^{δ} -methylated L-arginine, N^{ω} -hydroxy-L-arginine, L-citrulline and N^{δ} -cyano-L-ornithine"
3rd Summer School Medicinal Chemistry, Regensburg, Deutschland, **2006**.
3. "Boron complexes: A tool for the synthesis of N^{δ} -methylated L-arginine and its metabolites"
DPhG Jahrestagung, Erlangen, Deutschland, **2007**.
4. "Synthesis and SARs of novel and known inhibitors of human DDAH: alkenyl-amidines and -guanidines as promising leads"
4th International Symposium on ADMA, Bregenz, Österreich, **2008**.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Stickstoffmonoxid (NO)	1
1.1.1	Geschichte, Eigenschaften und Vorkommen von NO	1
1.1.2	Regulation endogener NO-Konzentrationen	3
1.1.2.1	Allgemeines	3
1.1.2.2	NO-Synthasen (NOSs)	5
1.1.2.3	Arginase	9
1.1.2.4	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) und ADMA	10
1.1.3	Therapeutische Bedeutung	12
1.1.3.1	Pharmakologische Beeinflussung niedriger NO-Verfügbarkeit	12
1.1.3.2	Pharmakologische Beeinflussung hoher NO-Konzentrationen	17
1.2	Prodrugs	19
1.2.1	Allgemeines	19
1.2.2	Moleküleigenschaften und Bioverfügbarkeit	20
1.2.3	Prodrug-Prinzipien für Amidine und Guanidine	22
1.2.3.1	Amidoxime und Hydroxyguanidine	22
1.2.3.2	O-Substituierte Amidoxime und Hydroxyguanidine	24
2	ZIELSETZUNG	26
2.1	Entwicklung von NO-modulierenden Substanzen	26
2.1.1	N^{δ} -methylierte Derivate des L-Arginins	26
2.1.2	Neue Hemmstoffe der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)	27
2.1.3	NO-freisetzende Prodrugs von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin	28
2.2	Untersuchung neuer Bioaktivierungsmöglichkeiten	30
3	SYNTHESEN	32
3.1	Synthese von N^{δ}-methyliertem L-Arginin, N^{δ}-Cyan-L-ornithin, L-Citrullin und N^{ω}-Hydroxy-L-arginin	32
3.1.1	Einleitung	32
3.1.2	Synthesestrategien	32
3.1.3	N^{δ} -Methyl-L-ornithin als Ausgangsverbindung	35
3.1.4	Boroxazolidinon-geschütztes N^{δ} -Methyl-L-ornithin	36
3.1.4.1	Synthese	36

3.1.4.2	Spektroskopische Aspekte der Bor-Komplexe	38
3.1.4.3	Stabilität bei verschiedenen pH-Werten	40
3.1.5	N^{δ} -Methyl-L-arginin	41
3.1.6	N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin	42
3.1.7	N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin	44
3.1.8	N^{δ} -Methyl-L-citrullin	45
3.1.9	Zusammenfassung	46
3.1.10	Testergebnisse und Ausblick	49
3.2	Synthese neuer Hemmstoffe der DDAH	51
3.2.1	Einleitung	51
3.2.2	Synthesestrategien	54
3.2.3	N^{ω} -substituierte L-Arginin-Analoga	57
3.2.4	N -(2-Methoxyethyl)-basierte Guanidine	60
3.2.5	Amidin-basierte L-Arginin-Analoga	61
3.2.6	Zusammenfassung	63
3.2.7	Testergebnisse	63
3.2.8	Ausblick	67
3.3	Synthese von N^{ω}-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs	69
3.3.1	Einleitung	69
3.3.2	Synthesestrategien	70
3.3.3	O -Alkylierte N^{ω} -Hydroxy-L-arginine	72
3.3.3.1	O -Methyl-Derivate	72
3.3.3.2	O -Carboxymethyl-Derivate	74
3.3.3.3	O -Acetalische Derivate	76
3.3.4	Versuche zur Synthese O -acylierter N^{ω} -Hydroxy-L-arginine	82
3.3.5	Versuche zur Synthese von 1,2,4-Oxadiazol-5-on-basiertem N^{ω} -Hydroxy-L-arginin	84
3.3.6	Zusammenfassung und Ausblick	86
3.4	Synthese von O-carboxymethylierten Modellsubstanzen	89
3.4.1	Einleitung	89
3.4.2	Amidoxim-Derivate	89
3.4.3	Hydroxyguanidin-Derivate	90
3.4.4	Zusammenfassung und Ausblick	92
3.5	Zusammenfassung	93

4	BESTIMMUNG DER ENANTIOMERENREINHEIT ZENTRALER SYNTHESPRODUKTE	97
<hr/>		
4.1	Einleitung	97
4.2	Ergebnisse und Diskussion	99
4.2.1	<i>N</i> ^δ -Methyliertes L-Arginin, <i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin, L-Citrullin und L-Ornithin	99
4.2.1.1	HPLC unter Verwendung eines chiralen Eluenten	99
4.2.1.2	HPLC unter Verwendung chiraler stationärer Phasen	100
4.2.1.3	Polarimetrie	105
4.2.2	<i>N</i> ^ω -Substituierte L-Arginin-Derivate	106
4.2.3	<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs	108
4.3	Zusammenfassung	112
5	UNTERSUCHUNG DER BIOAKTIVIERUNG O-CARBOXYMETHYLIERTER PRODRUGS	114
<hr/>		
5.1	Einleitung	114
5.2	Testungen mit der Peptidylglycin α-Amidierenden Monooxygenase (PAM) und Cytochrom-P450-Enzymquellen	116
5.2.1	Einleitung	116
5.2.1.1	Vorkommen, Funktion und Katalyse von PAM	116
5.2.1.2	Das Cytochrom-P450-Enzymsystem	118
5.2.1.3	Zielsetzung	118
5.2.2	Ergebnisse und Diskussion	119
5.2.2.1	Enzyminkubationen für PAM-Substratstudien	119
5.2.2.2	Enzyminkubationen für CYP450-Substratstudien	119
5.2.2.3	Substratstudien mit <i>O</i> -Carboxymethylbenzamidoxim (6)	120
5.2.2.4	Substratstudien mit <i>N</i> -Carboxymethoxy- <i>N'</i> , <i>N''</i> -diphenylguanidin (7)	123
5.2.2.5	<i>O</i> -Carboxylierte Sulphydroxamsäuren	125
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	127
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	129

7	EXPERIMENTELLER TEIL	134
7.1	Synthesen	134
7.1.1	Geräte und Materialien	134
7.1.2	Synthesevorschriften	137
7.1.2.1	Synthese von N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivaten	137
7.1.2.1.1	N^{δ} -Methyl-L-ornithin (18)	137
7.1.2.1.2	Boroxazolidinon-geschütztes N^{δ} -Methyl-L-ornithin	140
7.1.2.1.3	N^{δ} -Methyl-L-arginin (1)	142
7.1.2.1.4	N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin (4)	146
7.1.2.1.5	N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin Dihydrochlorid (2)	149
7.1.2.1.6	N^{δ} -Methyl-L-citrullin Hydrochlorid (3)	150
7.1.2.2	Synthese neuer Hemmstoffe der DDAH	151
7.1.2.2.1	<i>N</i> -Benzyloxycarbonylthiocyanat (32a)	151
7.1.2.2.2	<i>N</i> -Benzyloxycarbonylthioharnstoffe	151
7.1.2.2.3	<i>N</i> -Benzyloxycarbonylguanidine (36a-i, 40a-e)	154
7.1.2.2.4	N^{ω} -alkylierte L-Arginine (37a-i)	168
7.1.2.2.5	<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)guanidine (41a-e)	175
7.1.2.2.6	<i>N</i> -(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin (45)	180
7.1.2.3	Synthese von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs und analoger Modellsubstanzen	183
7.1.2.3.1	<i>N</i> -Ethoxycarbonylthioharnstoffe (50, 69)	183
7.1.2.3.2	N^{ω} -Methoxy-L-arginin-Prodrugs	185
7.1.2.3.3	N^{ω} -Carboxymethoxy-L-arginin-Prodrugs	189
7.1.2.3.4	N^{ω} -(β -D-Galactosyl)oxy-L-arginin-Prodrug (72) und analoge Modellverbindung (66)	196
7.1.2.3.5	Vorstufen zu 3- <i>N</i> -substituierten 3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-onen	203
7.1.2.4	<i>O</i> -carboxymethylierte Modellsubstanzen	206
7.1.2.4.1	Natriumsalz des <i>O</i> -Carboxymethylbenzamidoxims Monohydrat (6)	206
7.1.2.4.2	Hydroxyguanidin-Prodrugs (7, 87)	207
7.2	Überprüfung der Enantiomerenreinheit	210
7.2.1	Geräte und Materialien	210
7.2.1.1	HPLC mit chiralen stationären Phasen	210
7.2.1.2	Polarimetrie	210
7.2.2	Methoden	211
7.2.2.1	Crownpak Cr(+)-Analytik	211

7.2.2.1.1	<i>N</i> ^δ -Methyl-L-arginin (1), <i>N</i> ^ω -Hydroxy- <i>N</i> ^δ -methyl-L-arginin (2) und <i>N</i> ^δ -Methyl-L-citrullin (3)	211
7.2.2.1.2	<i>N</i> ^δ -Methyl-L-ornithin (18)	211
7.2.2.1.3	<i>N</i> ^ω -alkylierte L-Arginine (37a-i)	212
7.2.2.1.4	<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs	212
7.2.2.2	(<i>R,R</i>)-Whelk O1-Analytik	213
7.3	Untersuchung der Bioaktivierung	214
7.3.1	Geräte und Materialien	214
7.3.2	Testung mit Peptidylglycin α -Amidierender Monooxygenase	216
7.3.2.1	Methoden	216
7.3.2.1.1	Inkubationsbedingungen	216
7.3.2.1.2	Kolorimetrische Bestimmung von Glyoxylat	217
7.3.2.1.3	HPLC-Analytik zur Trennung von <i>O</i> -Carboxymethylbenzamidoxim (6) und Benzamidoxim (84)	217
7.3.2.1.4	HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Carboxymethoxy- <i>N'</i> , <i>N''</i> -diphenylguanidin (7) und <i>N</i> -Hydroxy- <i>N'</i> , <i>N''</i> -diphenylguanidin (91)	218
7.3.2.1.5	HPLC-Analytik zur Trennung der Celecoxib-Prodrugs 92a,b und Celecoxib	219
7.3.3	Testung mit Cytochrom P450-Enzymquellen	220
7.3.3.1	Methoden	220
7.3.3.1.1	Inkubationsbedingungen	220
7.3.3.1.2	HPLC-Analytik zur Trennung von <i>O</i> -Carboxymethylbenzamidoxim (6), Benzamidoxim (84) und Benzamidin	220
7.3.3.1.3	HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Carboxymethoxy- <i>N'</i> , <i>N''</i> -diphenylguanidin (7), <i>N</i> -Hydroxy- <i>N'</i> , <i>N''</i> -diphenylguanidin (91) und <i>N,N'</i> -Diphenylguanidin	221
8	LITERATURVERZEICHNIS	222

9	ANHANG	248
<hr/>		
	Abkürzungsverzeichnis	248
	Strukturformelverzeichnis	251
	Erklärung zu §10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Kurzfassung	
	Abstract	

1 EINLEITUNG

1.1 STICKSTOFFMONOXID (NO)

1.1.1 Geschichte, Eigenschaften und Vorkommen von NO

Schon im Jahre 1847 beschrieb der Chemiker Sobrero nach organoleptischer Prüfung von Glyceroltrinitrat typische, auf eine Gefäßerweiterung zurückzuführende Effekte.¹ Im gleichen Jahr veranlasste dies den Arzt Hering zur Entwicklung eines homöopathischen Behandlungsansatzes zur Therapie von Kopfschmerzen mit Glyceroltrinitrat-haltigen Zuckerpellets.² Auch Alfred Nobel – der Erfinder des Dynamits – wurde später selbst mit dessen Hauptbestandteil Glyceroltrinitrat gegen Angina pectoris behandelt.³ Seither stellte sich die Frage, über welchen Mechanismus dieser Stoff seine Wirkung entfaltet. Mit der Entdeckung, dass der sog. "*endothelium-derived relaxing factor*" (EDRF) mit dem Stickstoffmonoxid-Radikal (NO) identisch ist, wurde eines der am stärksten beforschten Arbeitsgebiete in der Pharmakologie bzw. Medizinischen Chemie begründet.⁴⁻⁶ Aufgrund seiner überragenden biologischen Bedeutung wurde NO 1992 von der Zeitschrift Science mit dem Titel "Molekül des Jahres" ausgezeichnet sowie 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin für die Entdecker Furchgott, Murad und Ignarro.⁷

Das NO-Radikal ist unter Normalbedingungen ein farbloses Gas und wird in die Klasse der Luftschadstoffe eingereiht. Umso bemerkenswerter ist die große physiologische Bedeutung. In seiner Struktur ist es besonders gut in einem Molekül-Orbital-Schema darstellbar, aus dem formal eine 2,5fach-Bindung resultiert. Es wird bei Blitzentladungen in der Atmosphäre, im Lichtbogen und in Verbrennungsmotoren durch die Reaktion von Stickstoff mit Sauerstoff gebildet. Großtechnisch wird es nach dem Ostwald-Verfahren gewonnen, das eigentlich der Herstellung von Salpetersäure dient. Ebenso kann es aus den Elementen synthetisiert werden, wobei die Ausbeuten selbst unter extremen Bedingungen lediglich bei 4 % liegen.⁸

Stickstoffmonoxid wird in Säugetieren vorwiegend aus L-Arginin durch die NO-Synthasen (NOSs, s. Kap. 1.1.2.2) gebildet. Weiterhin sind enzymatische Freisetzungen unter anaeroben Bedingungen durch Xanthin-Oxidasen beschrieben worden.^{9,10} Nicht-enzymatisch kann NO aus Nitrit gebildet werden sowie aus einer Vielzahl organischer Verbindungen (vgl. Kap. 1.1.3.1), die damit aus pharmakologischer Sicht interessant sind.^{11,12}

Wegen der hohen Reaktivität von NO liegt die beobachtete biologische Halbwertszeit, je nach physiologischen Bedingungen, konzentrationsabhängig im Millisekunden- bis Sekundenbereich.^{13,14} Diese kurze Zeitspanne reicht jedoch zur Diffusion im Gewebe und es überwindet durch seine hydrophoben Eigenschaften ungehindert Membranen.¹⁴ Mit organischen Zielmolekülen reagiert es nur langsam, fast diffusionskontrolliert hingegen mit anderen Radikalen. Schnell reagiert es auch mit Übergangsmetallen zu stabilen NO-Komplexen wie z.B. in Hämproteinen. Diese Reaktion bildet die chemische Basis für eine der wichtigsten Signalfunktionen von NO, die Aktivierung der Guanylylcyclase (vgl. Kap. 1.1.2.2). Allerdings werden nicht alle biologischen Effekte direkt auf NO zurückgeführt, sondern auch auf dessen Metabolite, wie z.B. N_2O_3 oder NO^+ , die starke Nitrosierungsreagenzien darstellen. Die Reaktion von NO mit dem Superoxidradikalanion ($\cdot O_2^-$) zum Oxidationsmittel Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist ein wichtiger Mechanismus zur Erklärung NO-vermittelter zytotoxischer Effekte.¹⁵ Unter physiologischen Bedingungen ist der dominierende Abbauweg die schrittweise Oxidation zu Nitrit und Nitrat, welche über unterschiedlichste Zwischenstufen ablaufen kann.

1.1.2 Regulation endogener NO-Konzentrationen

1.1.2.1 Allgemeines

Die natürliche Quelle für Stickstoffmonoxid ist die semi-essenzielle Aminosäure L-Arginin, die metabolisch vielseitigste aller Aminosäuren, wie Abbildung 1-1 verdeutlichen soll.

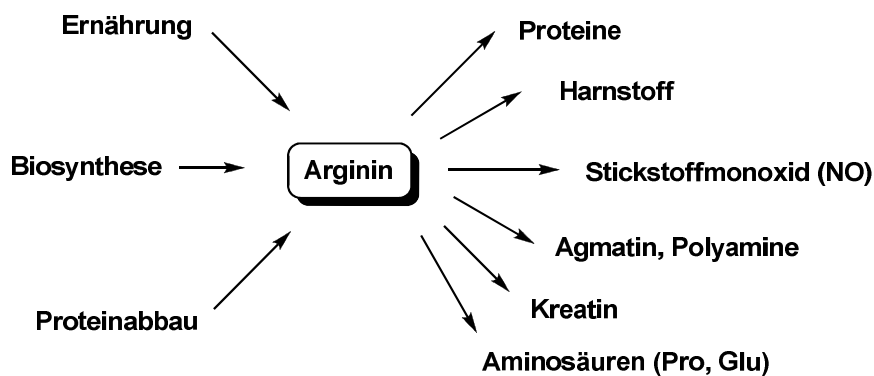


Abbildung 1-1: Metabolismus von L-Arginin: Quelle endogenen Stickstoffmonoxids (modifiziert in Anlehnung an Morris)¹⁶

Ungefähr 40 % des über die Nahrung aufgenommenen Arginins wird im Darm verstoffwechselt bevor es systemisch verfügbar ist. Während des Fastens stammen ca. 85 % des Arginins aus dem Proteinabbau, der Rest wird aus der *de novo*-Synthese zur Verfügung gestellt. Damit ist Arginin nicht-essenziell für gesunde Erwachsene, jedoch essenziell für Kinder und für Erwachsene unter metabolischem Stress.¹⁶ Nur 1,2 % des Plasma-Argininstoffwechsels ist mit der NO-Bildung assoziiert, was ca. 60 % der gesamten NO-Biosynthese im Körper ausmacht.¹⁷

An der Modulation des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels ist eine Vielzahl an Enzymen direkt und indirekt beteiligt. Die Zusammenhänge sind in Abbildung 1-2 zur Übersicht vereinfacht dargestellt, da z.B. das Vorkommen von Isoenzymen oder unterschiedliche Expressionslevel in verschiedenen Geweben unberücksichtigt bleiben.

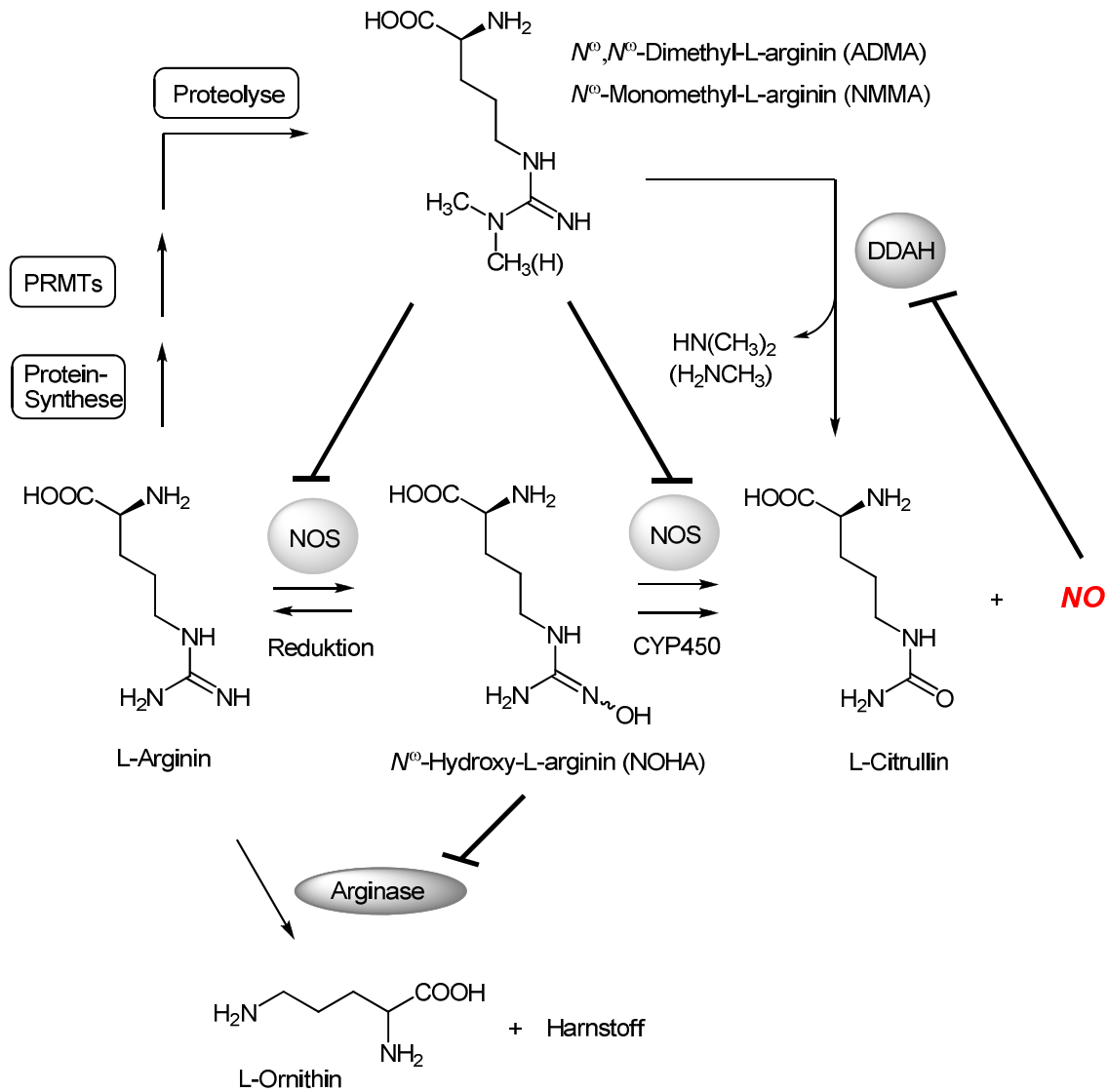


Abbildung 1-2: Regulation des Stickstoffmonoxid (NO)-Stoffwechsels. ADMA, asymmetrisches N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin; NOS, NO-Synthase; CYP450, Cytochrom P450; DDAH, Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase; NMMA, N^{ω} -Monomethyl-L-arginin; PRMT, Protein-Arginin-Methyltransferase; ohne Angabe von Kosubstraten (modifiziert in Anlehnung an die Literatur)¹⁸

Das zentrale Enzym des NO-Stoffwechsels ist die NO-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39), die in einer Fünf-Elektronen-Oxidation von L-Arginin die Freisetzung von NO und L-Citrullin über das Intermediat N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) katalysiert.¹⁹ Als Kosubstrate werden für diese Reaktion Sauerstoff und Nikotinamidadenin-dinukleotidphosphat (NADPH) benötigt. Des Weiteren konnte auch mit Cytochrom P450-Enzymquellen unter bestimmten Bedingungen eine Umsetzung von NOHA gezeigt werden, die zur Bildung von NO führt.²⁰ Die Aktivität der NO-Synthasen kann u.a. durch endogene Inhibitoren wie die N^{ω} -methylierten L-Arginine (ADMA, NMMA),

die durch Proteolyse von methylierten Proteinen freigesetzt werden, beeinflusst werden.¹⁸ Weiterhin besitzt NOHA selbst einen regulativen Einfluss auf die NO-Produktion, indem es den Abbau von L-Arginin durch Hemmung der Arginase (EC 3.5.3.1) verhindert.^{21,22} Einen anderen negativen "Feedback"-Mechanismus stellt die Hemmung der DDAH durch NO dar, die zu einer Anreicherung an NOS-hemmenden ADMA und NMMA führt.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Funktionen und Eigenschaften dieser Enzyme als potenzielle Zielstrukturen zur Entwicklung NO-modulierender Substanzen zusammengefasst werden.

1.1.2.2 NO-Synthasen (NOSs)

Zum ersten Mal beschrieben wurde die Stickstoffmonoxid-Synthase, die zu den hämhaltigen Monooxygenasen zählt, im Jahre 1989. Bis 1994 wurden die drei hauptsächlichen Isoformen geklont, gereinigt und charakterisiert.²³ Zu diesen gehören die neuronale NOS (nNOS, NOS-I), die induzierbare NOS (iNOS, NOS-II) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS-III), die sich in ihrer Lokalisierung, Regulation, katalytischen Aktivität und Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren unterscheiden.^{24,25} Die Bezeichnung richtete sich dabei nach dem Gewebe- oder Zelltyp, in dem das entsprechende Isoenzym zuerst identifiziert wurde. Die Sequenzhomologie zwischen den humanen Isoenzymen liegt bei 51-57 %, wobei das katalytische Zentrum hochkonserviert ist.^{26,27} Neben den genannten NOS-Isoenzymen wird die Existenz einer weiteren NOS beschrieben, die in der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiert ist (mtNOS) und an der Regulation der Zellatmung beteiligt sein soll. Bislang ist nicht geklärt, ob es sich bei dieser Form um ein eigenes Isoenzym handelt.²⁸⁻³⁰

Die NOS liegt in aktiver Form nur als Homodimer vor, während die Monomere inaktiv sind, möglicherweise da der Elektronenfluss bei der Katalyse über Kreuz verläuft.²³ Ein Monomer wiederum besteht aus zwei Domänen:

- a) der C-terminalen Reduktasedomäne, die Bindungsstellen für die Kofaktoren NADPH, Flavinadenindinukleotid und Flavinmononukleotid enthält;

- b) der N-terminalen Oxygenasedomäne mit Bindungsstellen für die weiteren Kofaktoren Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Häm sowie für das Substrat L-Arginin.

Die Domänen werden durch eine Bindungsstelle für Calmodulin verbunden, so dass streng genommen ein Tetramer aus zwei NOS-Monomeren und zwei Calmodulin-Einheiten vorliegt.²⁵ Bei den konstitutiv exprimierten nNOS und eNOS wird Calmodulin Ca²⁺-abhängig an das Enzym gebunden, während es an der iNOS fest gebunden vorliegt.

Neuronale NOS (nNOS)

Diese zuerst beschriebene Isoform der NO-Synthase wird v.a. im Nervensystem und der Skelettmuskulatur exprimiert,^{24,31} ist aber auch in anderen Geweben gefunden worden, wie z.B. in den Bronchien, den Nieren, den Hoden und der Plazenta.³²⁻³⁴ Die vorwiegenden physiologischen Funktionen bestehen im ZNS in der Regulation der lokalen Durchblutung und in der Beteiligung an der Gedächtnisbildung.^{35,36} In peripheren Nervenzellen erfolgt die nNOS-vermittelte NO-Freisetzung in sog. NANC-Neuronen (*nonadrenergic-noncholinergic*; auch: nitreger Neuronen) und ist somit hauptverantwortlich für die Relaxation glatter Muskeln, wie z.B. die des *Corpus cavernosum*.³⁷

Eine übermäßige Produktion an NO durch die nNOS wird mit der Pathogenese eines Schlaganfalls³⁸ und Migräne³⁹ in Verbindung gebracht sowie mit neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer oder M. Parkinson.⁴⁰

Endotheliale NOS (eNOS)

Im Gefäßsystem trägt Stickstoffmonoxid zur vaskulären Homöostase bei, indem es einen funktionellen Antagonisten zu den Vasokonstriktoren des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems darstellt. Die dafür verantwortliche eNOS liegt im Endothel und in Thrombozyten konstitutiv exprimiert vor. Sie kann aber auch durch Scherstress induziert werden, der durch regelmäßige Bewegung (körperliches Training) hervorgerufen wird.^{24,41}

Eine Ca^{2+} -vermittelte Aktivierung der eNOS erfolgt über die Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren des Endothels, wie z.B. solche für Acetylcholin (ACh), Histamin, Serotonin, Bradykinin, ADP oder ATP. In der Folge diffundiert NO in benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen und das Gefäßlumen, wo es seine Wirkungen entfaltet. In der glatten Muskelzelle aktiviert NO die lösliche Guanylylcyclase (sGC), die cGMP-vermittelt wiederum Proteinkinasen aktiviert. Diese modulieren weitere Zielstrukturen, wodurch es insgesamt zu einer Erniedrigung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen und damit zur Relaxation der Gefäßmuskulatur führen (s. Abb. 1-3).

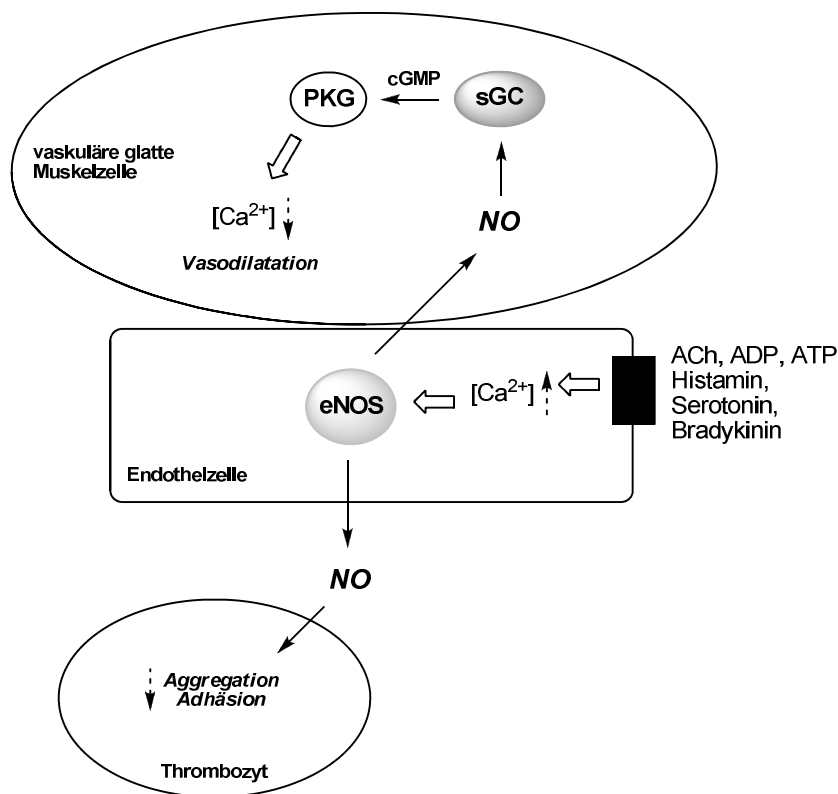


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) im Gefäßsystem. ACh, Acetylcholin; ADP (ATP), Adenosindi(tri)phosphat; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat; eNOS, endotheliale NO-Synthase; PKG, Proteinkinase G; sGC, lösliche Guanylylcyclase (Schema modifiziert in Anlehnung an die Literatur)^{42,43}

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch NO erfolgt ebenso über die cGMP-vermittelte Aktivierung von Kinasen und damit synergistisch mit der analogen cAMP-vermittelten Beeinflussung von Thrombozyten durch Prostacyclin.

Aufgrund der genannten Effekte auf das Gefäßsystem überrascht es nicht, dass eine Dysregulation oder verminderte NO-Verfügbarkeit in Zusammenhang mit diversen kardiovaskulären Erkrankungen gebracht wird. Eine eingeschränkte NO-Verfügbarkeit wird daher mit der sog. endothelialen Dysfunktion assoziiert – ein Zustand multifaktorieller Genese – die mit Bluthochdruck,^{44,45} Atherosklerose,⁴⁶ arterieller Thrombose,⁴⁷ koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt,⁴⁸ Hypercholesterolämie⁴⁹ und Diabetes⁵⁰ in Verbindung gebracht wird.

Induzierbare NOS (iNOS)

Im Gegensatz zu den oben vorgestellten NOS-Isoenzymen wird die iNOS durch bakterielle Toxine und Zytokine in Makrophagen induziert. Sie produziert NO in sehr viel höheren Konzentrationen, was physiologisch für die unspezifische Immunabwehr von großer Bedeutung ist. Mikrobielle Erreger, Viren und Tumorzellen werden v.a. über die Hemmung der Atmungskette und der DNA-Synthese bekämpft, wobei die Mechanismen sehr komplex sind. Die meisten zytotoxischen Effekte von Stickstoffmonoxid sind dabei weniger auf NO selbst sondern eher auf seine Oxidationsprodukte zurückzuführen. Direkte Nitrosierungen von Protein-Thiolen durch NO^+ (oder daraus gebildetes N_2O_3) sind bekannt, jedoch ist besonders die Reaktion mit Superoxidradikalanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) zum Peroxynitrit (ONOO^-) eine für die Zytotoxizität sehr wichtige Reaktion. Peroxynitrit vermag hierbei Lipide, Proteine und DNA auf unterschiedlichste Weise zu oxidieren.^{15,51} Eine weitere physiologische Funktion der iNOS scheint – zusammen mit der eNOS – die Beteiligung an der Wundheilung zu sein, wobei der Mechanismus nicht vollständig geklärt ist.⁵²

Eine längerfristige iNOS-Induktion und damit konstant hohe NO-Konzentrationen, sind auf der anderen Seite in einer Reihe inflammatorischer Erkrankungen involviert, wie z.B. dem septischen Schock,^{53,54} rheumatoider Arthritis,⁵⁵ *Colitis ulcerosa* und akuter Lungenentzündung.⁵⁶

1.1.2.3 Arginase

Die Arginase (EC 3.5.3.1) katalysiert die Hydrolyse von L-Arginin zur nicht-proteinogenen Aminosäure L-Ornithin und Harnstoff. Diese Reaktion stellt den finalen Schritt des Harnstoffzyklus in der Leber dar und unterstreicht die wichtige Funktion dieses Enzyms im Stickstoff-Stoffwechsel und damit der Detoxifizierung von Ammoniak. Die zytosolisch vorkommende Arginase I wird v.a. in der Leber – dort mit der höchsten spezifischen Aktivität unter den Arginasen – sowie im Endothel und der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert.⁵⁷ Daneben wird die Arginase II, die mitochondrial lokalisiert ist, in vielen extrahepatischen Geweben exprimiert und erfüllt dort eher sog. "Housekeeping"-Funktionen anaboler Prozesse.^{58,59}

In nicht-hepatischem Gewebe außerhalb des Harnstoffzyklus ist z.B. die Bereitstellung von Ornithin als Precursor von Prolin und Glutamat wichtig für die Biosynthese vieler Proteine (z.B. Collagen). Als Precursor von Polyaminen ist Ornithin wichtig für das Zellwachstum und damit für alle schnellproliferierenden Gewebe. Insbesondere die Koexpression mit NO-Synthasen hat die Frage aufgeworfen, inwiefern ein regulatorischer Zusammenhang besteht, da beide Enzyme um das gleiche Substrat konkurrieren. N^{ω} -Hydroxy-L-arginin – das Intermediat in der NOS-Katalyse – stellt zudem einen potenten Inhibitor der Arginase dar ($K_i = 30-42 \mu\text{M}$).^{21,60} Es wurde nachgewiesen, dass signifikante Mengen dieses Intermediates vom aktiven Zentrum der NOS abdissoziieren und als endogener Hemmstoff der Arginase in Makrophagen und Endothelzellen fungieren können.^{61,62}

Mittlerweile ist die pathophysiologische Bedeutung der Arginase in den Blickpunkt pharmazeutischen Interesses gerückt, da es viele Hinweise gibt, die auf eine Beteiligung an der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion hindeuten.⁶³ *In vivo* konnte z.B. eine erhöhte Aktivität bei Bluthochdruck,^{64,65} atherosklerotischen Gefäßveränderungen⁶⁶ und erektiler Dysfunktion^{67,68} nachgewiesen werden. Interessant sind auch Studien, die eine altersbedingte Hochregulierung der Arginase mit endothelialer Dysfunktion in Verbindung bringen konnten.^{69,70} Eine erhöhte

Arginase-Aktivität wird außerdem mit Magenkrebs und Brustkrebs in Zusammenhang gebracht und wurde bei bestimmten Darmkrebs-Zelllinien entdeckt.⁵⁸

1.1.2.4 Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) und ADMA

Die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH, EC 3.5.3.18) ist ein weiteres wichtiges Enzym des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels, das offensichtlich einen entscheidenden Einfluss auf (patho-)physiologische Prozesse ausübt. Es katalysiert den Abbau von N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA), die wiederum unspezifisch NO-Synthasen in kompetitiver Weise hemmen. Das ebenfalls N^{ω} -methylierte symmetrische N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (SDMA) wird nicht durch die DDAH abgebaut, sondern ausschließlich renal eliminiert.^{18,71}

Gebildet werden ADMA, NMMA und SDMA durch den Abbau posttranslational methylierter Proteine. Für die Methylierung verantwortlich sind die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs, EC 2.1.1.23), die als Kosubstrat S-Adenosylmethionin verwenden und in vier Klassen eingeteilt werden. Die PRMT des Typ I ist für die Bildung von ADMA und NMMA verantwortlich und Typ II für SDMA und NMMA.^{72,73} Bisher nur in Hefezellen wurde die Existenz eines Typ III gezeigt, der im Gegensatz zu den anderen Formen eine Methylierung am N^{δ} -Atom katalysieren kann.⁷⁴ Obwohl alle Funktionen der PRMTs nicht vollständig bekannt sind, scheint die Regulation von mRNA-Prozessierung und -Reifung über eine Modulation der Aktivität von RNA-bindenden Proteinen eine wichtige Aufgabe zu sein.

Von der humanen DDAH sind mittlerweile zwei Isoenzyme beschrieben worden, die sich in ihrer Gewebeverteilung und Substratspezifität unterscheiden: Beide Isoenzyme katalysieren die Umsetzung von ADMA und NMMA, SDMA wird jedoch nicht als Substrat akzeptiert und hydrolysiert. Die Gewebeverteilung der Isoenzyme wird nicht einheitlich beschrieben. Die DDAH-1 scheint vorwiegend in Gehirn und Nieren und damit v.a. zusammen mit der nNOS vorzukommen. Die DDAH-2 ist weiter verbreitet, zeigt aber höchste Aktivität in Herz, Nieren und Plazenta und ist damit eher mit der eNOS vergesellschaftet.^{18,75,76} In Immunzellen wurde sie auch nachgewiesen, so dass

hier eine Verbindung mit der iNOS hergestellt werden kann. Außerdem wird von einer unterschiedlichen Expression der Isoenzyme im Zuge der Entwicklung berichtet, da die DDAH-2 in größerer Menge in fetalem Gewebe vorkommt und im Alter weniger stark exprimiert wird.⁷⁶

Dementsprechend besteht ganz offensichtlich ein regulativer Zusammenhang zwischen DDAH und NOS, der NO-abhängige Funktionen entscheidend beeinflusst. Dieser Sachverhalt konnte mittlerweile in verschiedenen Studien demonstriert werden, indem eine Modulation der DDAH-Aktivität durch z.B. veränderte Expression oder Enzymhemmung NO-vermittelte Effekte aufweist.⁷⁷⁻⁷⁹ Im Fokus solcher Studien stehen meist die erhöhten ADMA-Konzentrationen, die mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind.⁸⁰ Zoccali *et al.* stuften sogar erhöhte ADMA-Spiegel als zweitwichtigsten Risikofaktor kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit Niereninsuffizienz ein.⁸¹ Ito *et al.* schlugen die Fehlregulation der DDAH als Mechanismus der endothelialen Dysfunktion in Patienten mit Hypercholesterolämie oder Atherosklerose vor.⁸²

Auf der anderen Seite werden auch erhöhten DDAH-Aktivitäten, bzw. niedrigen Konzentrationen methylierter Arginine eine pathophysiologische Bedeutung zugeschrieben. Bei an M. Alzheimer erkrankten Patienten sind z.B. um ca. 48 % niedrigere ADMA-Konzentrationen festgestellt worden, verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen.⁸³

1.1.3 Therapeutische Bedeutung

Wie aus den oben dargestellten mannigfaltigen Funktionen von Stickstoffmonoxid und seiner komplexen physiologischen Regulation hervorgeht, ist es eine große Herausforderung Wirkstoffe zu entwickeln, die gezielt nur bestimmte NO-vermittelte Effekte beeinflussen sollen. Dabei erschweren nicht nur die vielen Funktionen von NO das Erreichen einer selektiven Wirkung, sondern auch die Tatsache, dass die Unterscheidung zwischen günstigen und schädlichen Effekten vom jeweiligen physiologischen Zustand, wie z.B. Redoxstatus, NO-Konzentration und reaktiven Sauerstoffspezies der betreffenden Zellen und Gewebe abhängt.⁸⁴

Im Folgenden sollen mögliche Ansätze zur Beeinflussung einer NO-Fehlregulation vorgestellt werden.

1.1.3.1 Pharmakologische Beeinflussung niedriger NO-Verfügbarkeit

Verschiedene Mechanismen können zu einer nicht ausreichenden Verfügbarkeit bioaktiven Stickstoffmonoxids beitragen. Dies kann ein einfacher Mangel aufgrund unzureichender Biosynthese durch NO-Synthasen, z.B. durch Enzymhemmung, verminderte Expression, Substrat- oder Kosubstrat-Mangel sein. Aber auch eine verstärkte Inaktivierung von NO durch bestimmte physiologische Bedingungen, wie z.B. oxidativer Stress, kann zu einer NO-Insuffizienz führen.⁸⁴

NO-Donoren

Die Stoffklassen von NO-freisetzenden Substanzen sind sehr heterogen und reichen von anorganischen bis hin zu organischen Verbindungen, von einfachen Salpetersäureestern und diversen Stickstoff-Sauerstoff-haltigen funktionellen Gruppen zu komplexen Heterozyklen und weiter zu ausgefeilten Prodrugs sowie Konjugaten mit etablierten Arzneistoffen. So unterschiedlich die Substanzklassen sind, so unterschiedlich ist auch ihr Mechanismus der Freisetzung von Stickstoffmonoxid.

Zu den direkten NO-Donoren gehören solche, die spontan unter physiologischen Bedingungen NO freisetzen. In diese Klasse gehören u.a. Nitroprussid-Natrium (s. Abb. 1-4), die Diazeniumdiolate (NONOate), Furoxane und S-Nitrosothiole.

Metabolismus-abhängige NO-Donoren, wie z.B. die organischen Nitrate (Glyceroltrinitrat, Isosorbid(mono)dinitrat usw.) oder Molsidomin bedürfen hingegen der Bioaktivierung zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (s. Abb. 1-4).¹²

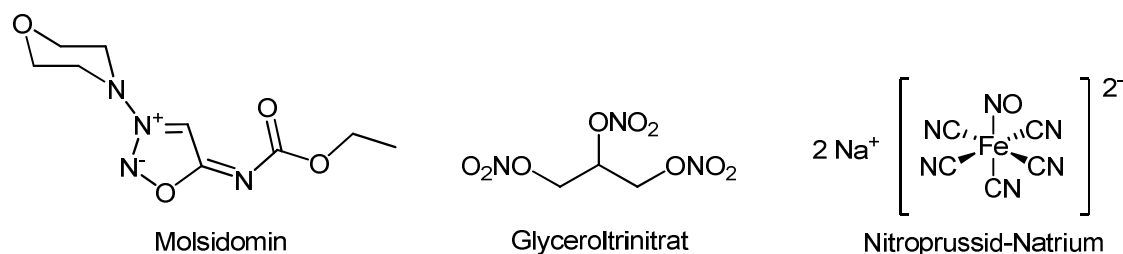


Abbildung 1-4: NO-freisetzende Arzneistoffe verschiedener Stoffklassen, die in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen etabliert sind.

L-Arginin

Eine Therapie mit L-Arginin – der natürlichen Quelle endogenen Stickstoffmonoxids – wird als Strategie zur Behandlung mit endothelialer Dysfunktion assoziierter Krankheiten in der Fachliteratur in jüngster Zeit kontrovers diskutiert. In vielen kleineren Studien mit hypercholesterolemischen Patienten,⁸⁵ Typ II-Diabetikern,⁸⁶ Rauchern,⁸⁷ älteren Patienten (> 70 Jahre),⁸⁸ Patienten mit Herzinsuffizienz,^{89,90} *Angina pectoris*^{91,92} u.v.m. konnten positive Effekte einer L-Arginin-Therapie – meist in Dosierungen von 6-9 g pro Tag – verzeichnet werden. Demgegenüber stehen vergleichbare Studien, die keine solchen Effekte aufzeigen konnten (z.B. bei koronarer Herzkrankheit).^{93,94} Aufsehen hatte eine länger angelegte klinische Studie (153 Patienten mit koronarer Herzkrankheit) erregt, die keine positiven Wirkungen unter Arginin-Supplementation feststellte und wegen erhöhter Mortalität in der Arginin-Gruppe vorzeitig abgebrochen wurde.⁹⁵

Aus den konträren Ergebnissen dieser Studien kann man allerdings ableiten, dass Patienten, die bestimmte kardiovaskuläre Risikofaktoren (z.B. erhöhte ADMA-Konzentrationen) tragen, von einer L-Arginin-Therapie profitieren können. Patienten mit manifesten atherosklerotischen Erkrankungen und/oder optimal medikamentös eingestellte Patienten scheinen den geringsten Nutzen zu haben.⁹⁶ Viele Mechanismen werden diskutiert, die für das Ausbleiben einer Wirkung oder für unerwünschte

Wirkungen verantwortlich sein könnten (vgl. Kap. 2.1.3).^{96,97} Zum jetzigen Zeitpunkt erscheint es jedoch wichtig festzuhalten, dass eine diätetische Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen mit L-Arginin nur nach differenzialdiagnostischer Betrachtung des individuellen Patienten erfolgen sollte. Insbesondere die Langzeitanwendung von Arginin in solch hohen Dosen muss in weiteren klinischen Studien evaluiert werden.

Alternative Substrate für NO-Synthasen

Aufgrund der hohen Substratspezifität werden nur sehr wenige Verbindungen von den NOSs unter NO-Freisetzung umgesetzt. Der Arbeitskreis um Boucher und Mansuy hat eine Reihe von Hydroxyguanidinen beschrieben, die als Substrate akzeptiert werden und enzymatisch-katalysiert NO freisetzen.⁹⁸ Interessanterweise wurde auch ein einfaches Guanidin beschrieben, das umgesetzt wird und keine α -Aminosäure-Struktur aufweist (s. Abb. 1-5).⁹⁹ Die Umsetzungsraten des natürlichen Substrates NOHA werden allerdings von keiner der Substanzen erreicht.

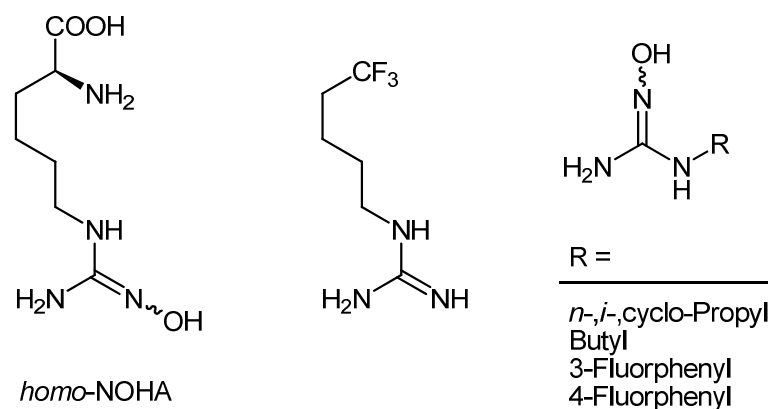


Abbildung 1-5: Alternative NO-freisetzende Substrate der NO-Synthasen. *homo*-NOHA, *N*^o-Hydroxy-*homo*-L-arginin

Arginase-Inhibitoren

Die Hemmung desjenigen Enzyms, welches um dasselbe Substrat konkurriert, scheint eine sinnvolle Strategie zu sein, um die NO-Verfügbarkeit zu erhöhen. Als eine Erklärung für die NO-Insuffizienz bei endothelialer Dysfunktion wurde die pathophysiologische Bedeutung der erhöhten Arginase-Aktivität schon in Kap. 1.1.2.3

diskutiert. Die Wirksamkeit der Arginase-Hemmung konnte z.B. bei erektiler Dysfunktion in *ex vivo*-Studien mit dem Inhibitor (S)-2-Amino-6-borohexansäure (ABH) demonstriert werden (s. Abb. 1-6).¹⁰⁰ Ein ähnlich potenter Inhibitor ist *N*⁰-Hydroxy-*nor*-L-arginin (*nor*-NOHA), der erfolgreich an hypertensiven Ratten getestet wurde.¹⁰¹

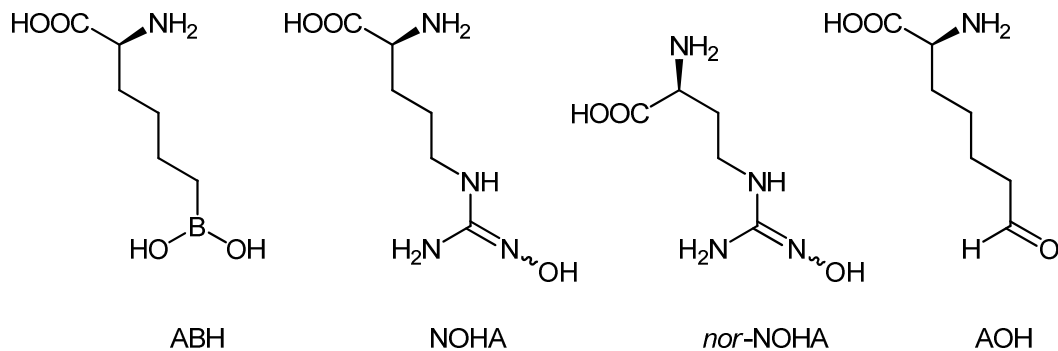


Abbildung 1-6: Strukturformeln der potentesten literaturbekanntesten Arginase-Hemmstoffe. ABH, (S)-2-Amino-6-borohexansäure;¹⁰² NOHA, *N*⁰-Hydroxy-L-arginin;^{21,60} *nor*-NOHA, *N*⁰-Hydroxy-*nor*-L-arginin;¹⁰³ AOH, (S)-2-Amino-7-oxoheptansäure¹⁰⁴

DDAH-Modulation

*N*⁰,*N*⁰-Dimethyl-L-arginin (ADMA) ist zu einer wichtigen Zielstruktur für pharmakologische Eingriffe geworden.¹⁰⁵ Wie in Kap. 1.1.2.4 angedeutet, werden erhöhte ADMA-Spiegel mit einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Der Arbeitskreis um Leiper hat mit *knock-out*-Mäusen (DDAH-1) und mittels DDAH-selektiver Inhibitoren zeigen können, dass eine fehlende oder verminderte Aktivität dieses Enzyms zu endothelialer Dysfunktion und erhöhtem Blutdruck führt.⁷⁸ Eine Überexpression der DDAH-1 in Endothelzellen führt hingegen zu einer ca. doppelten NOS-Aktivität und NO-Produktion.¹⁰⁶

Schwierig ist es jedoch, einen Wirkstoff zu entwickeln, der die Aktivität oder Expression der DDAH erhöht. Eine direkte Erhöhung der Aktivität wäre über allosterische Effektoren oder Beeinflussung posttranskriptioneller Prozesse denkbar, worüber bisher allerdings nichts bekannt ist. Was die Expression betrifft, sind wenige Verbindungen beschrieben, die in der Promotorregion der DDAH an sog. responsive Elemente binden und zu einer erhöhten Transkription führen.¹⁰⁷ Die Selektivität eines

solchen Ansatzes ist allerdings fraglich. Eine Gentherapie mit DDAH-1 wird z.Zt. von Leiper *et al.* in einigen *in vivo*-Modellen getestet (unveröffentlichte Ergebnisse, ADMA-Tagung 2008).¹⁰⁸

Weitere Strategien

Als alternative Ansätze, um indirekt in den NO-Stoffwechsel einzugreifen, kommen Enzyme in Frage, die in der NO-Kaskade den NOSs nachgeschaltet sind. So sind z.B. Aktivatoren der löslichen Guanylylcyclase (sGC, vgl. Abb. 1-3) eine vielversprechende Strategie zur Erhöhung der NO-Verfügbarkeit. Viele positive hämodynamische Effekte konnten mit dem ersten beschriebenen sGC-Aktivator YC-1 sowie einigen Bayer-Verbindungen wie BAY 41-2272 (s. Abb. 1-7) *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.¹⁰⁹⁻¹¹¹

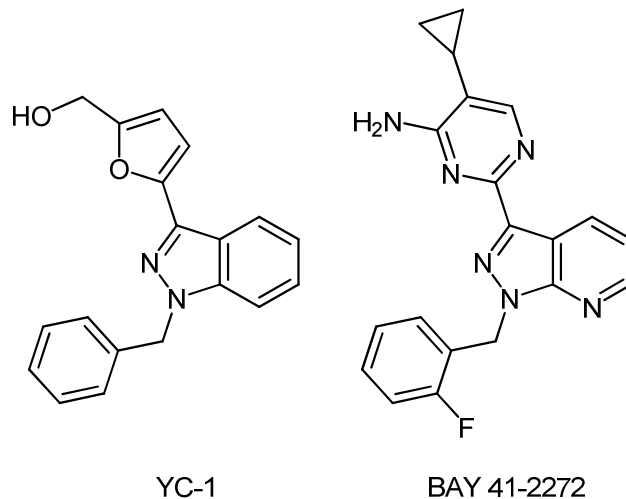


Abbildung 1-7: Strukturformeln NO-unabhängiger Aktivatoren der löslichen Guanylylcyclase (sGC).

Eine indirekte Erhöhung der NO-Verfügbarkeit wird für einige Vertreter etablierter Arzneistoffe in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen beschrieben, wie z.B. bei ACE-Hemmern, Statinen, Betablockern und Calcium-Antagonisten. Auch die Wirkung der zur Therapie erektiler Dysfunktion eingesetzten Phosphodiesterase-Hemmer beruht auf einer stärkeren NO-Wirkung durch Hemmung des Abbaus von cGMP.⁸⁴

1.1.3.2 Pharmakologische Beeinflussung hoher NO-Konzentrationen

Neben den vorwiegend nützlichen Wirkungen von Stickstoffmonoxid im Herz-Kreislauf-System kann eine übermäßige Produktion von NO auch schädliche Effekte haben. Wie in Kap. 1.1.2.2 erläutert, können dies, im Zusammenhang mit der nNOS, neurodegenerative Erkrankungen und Migräne sein. Die iNOS wird in pathophysiologischen Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen und dem septischen Schock gebracht. Daher ist es nicht verwunderlich, dass in den letzten zwei Jahrzehnten ein großer Aufwand betrieben wurde, Wirkstoffe zur möglichst selektiven Senkung hoher NO-Konzentrationen zu entwickeln.

Inhibitoren der NO-Synthasen

Die Entwicklung von Isoform-selektiven Hemmstoffen lag folglich auf der Hand, war jedoch eine schwere Aufgabe unter Berücksichtigung der hohen Konservierung des aktiven Zentrums der Isoenzyme. Die bekannten Klassen an NOS-Hemmstoffen reichen von Substrat-basierten Aminosäuren, Dipeptiden und Isothioharnstoffen bis hin zu einfacheren Guanidinen, Amidinen sowie diversen Stickstoff-haltigen Heterozyklen.¹¹² Gerade in den letzten 5-6 Jahren wurden sehr selektive Verbindungen (*in vitro*) beschrieben, die jedoch häufig den Nachteil toxischer Nebenwirkungen, unzureichender Selektivität *in vivo* oder schlechter pharmakokinetischer Eigenschaften aufweisen. Neuere Entwicklungen zielen v.a. darauf ab, alternative Bindungsstellen zum L-Arginin anzugreifen, wie z.B. solche, die die Dimerisierung oder die Interaktion mit Zielproteinen der NOSs beeinflussen.¹¹³

DDAH-Hemmstoffe

Vallance und Leiper schlagen durch Hemmung der DDAH einen alternativen Mechanismus zur direkten NOS-Hemmung vor, über den eventuell eine sanftere und gewebspezifische Senkung der NO-Konzentration möglich sein soll. Es ist anzunehmen, dass die Konzentrationen an ADMA und NMMA nicht so weit steigen, dass diese Hemmung 30 % überschreiten wird.¹¹⁴

Der bislang potenteste Hemmstoff der DDAH wurde von Rossiter *et al.* [2005] entwickelt und stellt ein Derivat des natürlichen Substrates NMMA dar, bei dem die Methylgruppe durch einen 2-Methoxyethyl-Rest ersetzt wurde (L-257, s. Abb. 1-8).¹¹⁵ Ungefähr zeitgleich hatten Knipp *et al.* S-Nitroso-homo-L-cystein (HcyNO) als irreversiblen Inhibitor identifiziert, der kovalent im aktiven Zentrum gebunden wird.¹¹⁶ Aus einem virtuellen Screening wurde später von Hartzoulakis *et al.* [2007] die Stoffklasse der Indolthiobarbitursäuren (z.B. SR445) als neue potente Hemmstoffe der *Pseudomonas aeruginosa* DDAH (*PaDDAH*) entwickelt.¹¹⁷ Weiterhin beschrieben ist die Klasse der Pentafluorphenylsulfonsäuren, die sowohl die *PaDDAH* als auch ein verwandtes Enzym – die bakterielle Arginin-Deiminase – hemmen.

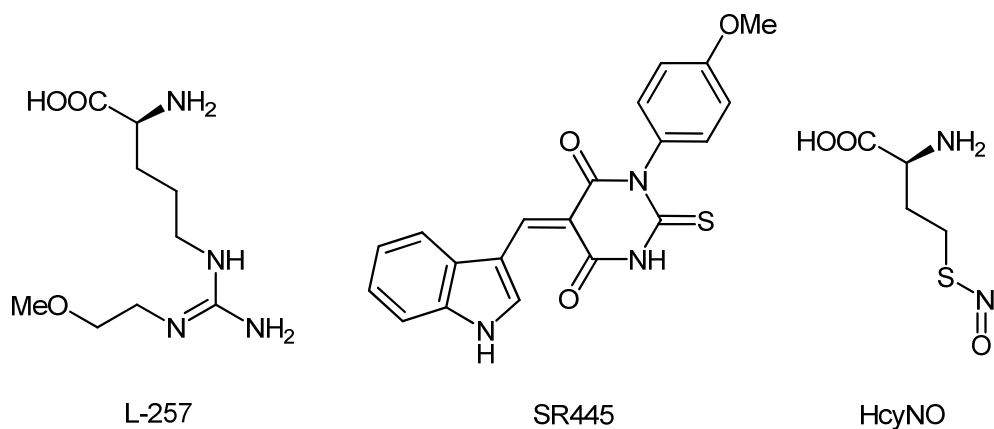


Abbildung 1-8: Strukturformeln der potentesten DDAH-Inhibitoren. L-257, *N*^ω-(2-Methoxyethyl)-L-arginin; SR445, potentester Vertreter der Indolylbarbitursäuren; HcyNO, S-Nitroso-homo-L-cystein

Eine Wirksamkeit der DDAH-Hemmung konnte von Leiper *et al.* bereits *in vivo* in einem Modell zur Untersuchung des septischen Schocks in Ratten demonstriert werden. Viele weitere Indikationen kommen in Frage, die mit erhöhten NO-Konzentrationen in pathophysiologischem Zusammenhang stehen, wie z.B. Schlaganfall, chronisch-entzündliche Erkrankungen, Migräne und neurodegenerative Erkrankungen (vgl. Kap. 1.1.2.2 und 1.1.2.4).

1.2 PRODRUGS

1.2.1 Allgemeines

In den letzten Jahrzehnten der Arzneistoffentwicklung ist das Konzept des gezielten *Prodrug-Designs* in den Blickpunkt pharmazeutischen Interesses gerückt. Nach IUPAC-Definition handelt es sich bei Prodrugs um Verbindungen, die vor Ausübung ihres pharmakologischen Effektes biotransformiert werden.¹¹⁸

Prodrugs bieten die Möglichkeit, physikochemische, pharmakokinetische- und/oder pharmakodynamische Eigenschaften des Arzneistoffs zu verbessern. Konkret können das z.B. eine chemische Instabilität, schlechte Löslichkeit, unangenehmer Geruch oder Geschmack, eine unzureichende orale Bioverfügbarkeit sowie schlechte Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit sein. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung von Prodrugs zum gezielten Angriff bestimmter Zellen oder Gewebe, um so eine selektive Wirkung zu erzielen. Allgemein klassifizieren lassen sie sich einerseits nach dem Mechanismus ihrer Aktivierung, d.h. nicht-enzymatisch oder enzymatisch, hier weiter nach z.B. oxidativer, reduktiver oder hydrolytischer Aktivierung. Andererseits kann eine Klassifizierung nach chemischer Stoffklasse vorgenommen werden, wie z.B. Ester-Prodrugs oder Acetal-Prodrugs.¹¹⁹

Zu den "Blockbuster-Prodrugs" gehören z.B. die allgemein bekannten Arzneistoffe Aciclovir, Omeprazol oder Lovastatin. Auch bei dem schon in Kap. 1.1.3.1 vorgestellten NO-Donor Molsidomin handelt es sich um ein Carbamat-Prodrug, welches mittels Esterasen in die eigentliche Wirkform überführt wird.

1.2.2 Moleküleigenschaften und Bioverfügbarkeit

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist, oral applizierbare Arzneimittel zu erhalten, bei denen u.a. die Therapietreue (*Compliance*) größer ist als z.B. bei injizierbaren Arzneimitteln. Dazu müssen die Arzneistoffe jedoch eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit aufweisen, welche durch viele Faktoren bestimmt wird. Das sog. Biochemische Klassifikationssystem (BCS, *Biochemical Classification System*) erlaubt es, über Permeabilitäts- und Löslichkeitseigenschaften einer Substanz Aussagen zu ihrem Absorptionsverhalten aus dem Gastrointestinaltrakt zu treffen (s. Tab. 1-1).¹²⁰

Tabelle 1-1: Biochemisches Klassifikationssystem¹²⁰

BCS-Klasse ^a	Löslichkeit	Permeabilität
I	gut	gut
II	gering	gut
III	gut	gering
IV	gering	gering

^a Klasse I = gute Absorption, Klasse II = löslichkeitsbedingtes Absorptionsverhalten, Klasse III = permeabilitätsabhängiges Absorptionsverhalten, Klasse IV = schlechte Absorption.

Eine konkretere Charakterisierung der Eigenschaften, die eine Substanz haben sollte, um passiv biologische Membranen zu passieren, haben Lipinski *et al.* [2001] mit ihrer *rule of five* vorgenommen.¹²¹ Diese Regel besagt, dass eine schlechte Absorption zu erwarten ist, wenn zwei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Summe Wasserstoffbrücken-Donatoren > 5
- Summe der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren > 10
- Molekulargewicht > 500 g/mol
- clogP-Wert > 5

Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass man stets eine Balance zwischen der benötigten Lipophilie für die passive Diffusion und der erforderlichen Löslichkeit eines Arzneistoffkandidaten anstreben sollte.

Das Ausmaß der Absorption hängt natürlich von vielen weiteren Faktoren ab, wie z.B. den physiologischen Verhältnissen im Gastrointestinaltrakt, die u.a. durch Art und Menge der aufgenommenen Nahrung oder durch Erkrankungen beeinflusst werden können.¹²²

Neben der Betrachtung von Moleküleigenschaften und passiver Diffusion spielt die Aufnahme von Substanzen über Transportmechanismen eine wichtige Rolle für die Bioverfügbarkeit sowie das gezielte Einschleusen in bestimmte Zellen oder Gewebe. Für eine Vielzahl von Substanzen unterschiedlichster Stoffklassen existieren mehr oder weniger spezifische Transporter, die mittels erleichterter Diffusion oder aktiv die Aufnahme in Zellen ermöglichen. Daneben existieren effektive Effluxsysteme, die Verbindungen aus Zellen heraus schleusen, was sowohl für die weitere Aufnahme in den Körper, als auch zur Elimination diverser körpereigener und -fremder Stoffe wichtig ist. Grob einteilen lassen sich die Transporter nach ihren Substraten, den Aminosäuren, Nucleosiden, Zuckern, Peptiden, organischen Anionen und Kationen, Gallensäuren, Fettsäuren und diversen Vitaminen.¹²³

1.2.3 Prodrug-Prinzipien für Amidine und Guanidine

Stark basische funktionelle Gruppen wie Amidine und Guanidine liegen unter physiologischen Bedingungen in protonierter Form vor. Eine passive Diffusion durch Biomembranen als geladene Teilchen ist so nicht möglich, weshalb Arzneistoffe mit diesen Funktionalitäten meist eine schlechte orale Bioverfügbarkeit aufweisen, sofern sie keine Substrate für Transporter darstellen.

Dennoch sind Amidin- oder Guanidin-haltige Strukturen aufgrund ihrer Bioisosterie zum Arginin in Wirkstoffmolekülen beliebt. Arginin vermag über die geladene Seitenkette starke Wechselwirkungen (ionische, Wasserstoffbrücken) zum Zielprotein auszubilden. Daher stellen sie häufig ein wichtiges Pharmakophor dar, welches meist nur unter Affinitätsverlust durch andere Gruppen ersetzt werden kann.¹²⁴

Zahlreiche Wirkstoffklassen tragen eine Amidin- oder Guanidin-Funktion:

- Hemmstoffe der Blutgerinnung (viele Peptidomimetika, z.B. Faktor VIIa-, Xa- und Thrombin-Inhibitoren)¹²⁵
- Antiparasitika (z.B. Pentamidin)¹²⁶
- Antihypertonika (z.B. Clonidin oder Moxonidin)¹²⁷
- Hemmstoffe der NO-Synthase (diverse Arginin-Analoga)¹¹²
- Chemotherapeutika (z.B. Matriptase-Hemmstoffe)¹²⁸

Aus diesem Grund ist es wichtig, den stark basischen Charakter von Amidinen und Guanidinen mit einem geeigneten Prodrug-Konzept so zu maskieren, dass eine passive Diffusion ermöglicht und damit die orale Bioverfügbarkeit erhöht wird.

1.2.3.1 Amidoxime und Hydroxyguanidine

Die Basizität von Amidinen und Guanidinen lässt sich durch *N*-Substitution mit elektronenziehenden Resten so weit senken, dass keine Protonierung unter physiologischen Bedingungen erfolgt und damit eine passive Permeation von Biomembranen möglich wird. Zwei Prodrug-Konzepte sind in diesem Zusammenhang entwickelt worden: *N*-Hydroxy-Derivate sowie *N*-Acyl-Derivate (s. Abb. 1-9).

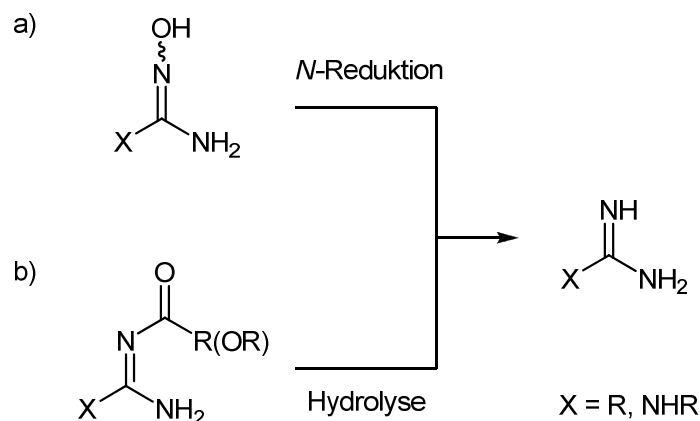


Abbildung 1-9: Übersicht der Bioaktivierung unterschiedlicher Prodrugs von Amidinen und Guanidinen. a) *N*-reduktiver Metabolismus von Amidoximen ($\text{X} = \text{R}$) und Hydroxyguanidinen ($\text{X} = \text{NHR}$); b) Esterasen-katalysierte Aktivierung (Hydrolyse) von *N*-Acyl-Derivaten (Amide, Carbamate) von Amidinen ($\text{X} = \text{R}$) und Guanidinen ($\text{X} = \text{NHR}$)

Unter den *N*-Acylderivaten sind es v.a. die Carbamate, die für Arzneistoffkandidaten Anwendung gefunden haben. Ein aktuelles Beispiel aus dieser Klasse ist der kürzlich zugelassene Thrombin-Inhibitor Dabigatran etexilat.

Clement *et al.* konnten erstmalig zeigen, dass die *N*-Reduktion von Amidoximen gegenüber der *N*-Oxidation von Amidinen überwiegt und als Prodrug-Strategie ausgenutzt werden kann.^{129,130} Dass dieses Konzept tatsächlich die orale Bioverfügbarkeit von Amidinen verbessert, konnte anhand von Modellverbindungen (Benzamidin) und Arzneistoffkandidaten (Pentamidin, Melagatran) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert werden.¹³¹⁻¹³⁴

In vivo wurde die Bioverfügbarkeit und allgemeine Anwendung von Hydroxyguanidinen als Prodrugs von Guanidinen zwar noch nicht getestet, *in vitro* ist aber die *N*-Reduktion an dem *N*-Hydroxyamidinohydrazon Guanoxabenz (Metabolit des Antihypertonikums Guanabenz) mit Lebermikrosomen beschrieben.^{135,136} Ebenso wird *N*-Hydroxydebrisoquin mit humanen und porcinen Hepatozyten zu Debrisoquin (Antihypertonikum) reduziert.¹³⁷ Verschiedene *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine, die als nicht-physiologische NOS-Substrate entwickelt wurden,¹³⁸ werden *in vitro* effektiv zu den korrespondierenden Guanidinen reduziert, wie Kanzow [2007] mit unterschiedlichen Mikrosomenpräparationen demonstrieren konnte.¹³⁹ Interessant

sind weiterhin Untersuchungen mit N^0 -Hydroxy-L-arginin, welches von humanen und porcinen Lebermikrosomen zu L-Arginin umgesetzt wird.¹⁴⁰

Die Identität und Zusammensetzung des für die N -Reduktion verantwortlichen Enzymsystems wird im Arbeitskreis seit einiger Zeit erforscht. Nach jetzigem Kenntnisstand besteht das mikrosomale System aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einer dritten Komponente, deren Identität bis heute noch nicht vollständig geklärt ist. Im mitochondrialen Enzymsystem wurde diese Komponente von Havemeyer *et al.* [2006] als ein Molybdoprotein identifiziert.¹⁴¹

1.2.3.2 O -Substituierte Amidoxime und Hydroxyguanidine

Weitergehende Prodrug-Konzepte zielen darauf ab, die chemische und metabolische Stabilität der N -hydroxylierten Amidine und Guanidine zu erhöhen, bzw. spezifische Transportersysteme auszunutzen, die die Bioverfügbarkeit und/oder Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit zusätzlich optimieren sollen.

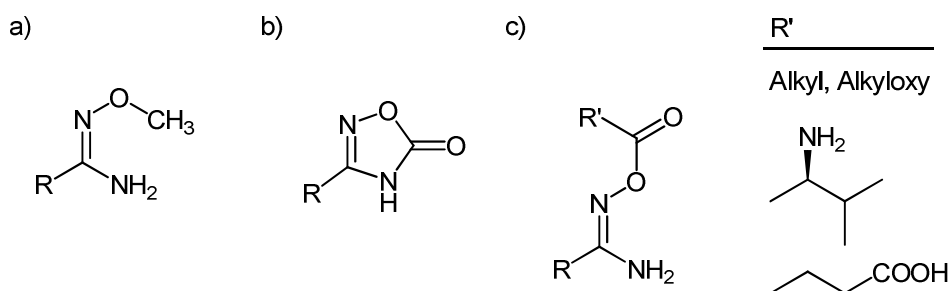


Abbildung 1-10: O -substituierte Prodrugs von Amidoximen. a) O -Methylamidoxime; b) zyklisierte Amidoxime (1,2,4-Oxadiazol-5-one); c) verschiedene O -acylierte Amidoxime

In Abbildung 1-10 sind solche Modifikationen auf Amidin-Basis dargestellt. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass entsprechend substituierte Hydroxyguanidine als Prodrugs derzeit nicht bekannt sind.

Ein O -methyliertes Amidin ist z.B. für das Antiparasitikum DB844 mit ausgezeichneter Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit gegen Trypanosomen-Infektionen beschrieben worden.¹⁴² Hierbei findet vor der N -Reduktion eine oxidative O -Desalkylierung durch Cytochrom P450-Enzyme statt. Aufgrund der Beteiligung von CYP450 kann es zu

Interaktionen mit anderen Substraten oder Inhibitoren dieser Enzyme kommen, so dass hier gewisse Nachteile gesehen werden.

Die zyklisierte Form eines Amidoxims (1,2,4-Oxadiazol-5-on) als Prodrug fand bereits Anwendung für ein Antimalariamittel, welches *in vivo* eine ausgezeichnete Wirksamkeit zeigte und damit offensichtlich gut absorbiert sowie bioaktiviert wurde.¹⁴³

Im Arbeitskreis wurde v.a. das Konzept der *O*-acylierten Amidoxime verfolgt, wobei z.B. Bürenheide *et al.* [2006] die gute orale Bioverfügbarkeit vom Diacetyldiamidoximester des Pentamidins demonstrieren konnten.¹⁴⁴ Da die Löslichkeit mit der *O*-Substitution verschlechtert wird, wurden weitere Ansätze verfolgt, die besser lösliche Substanzen liefern und gleichzeitig spezielle Transportersysteme ausnutzen. So konnte Reeh [2008] mit der Modellsubstanz Benzamidoxim zwei verschiedene Konzepte erfolgreich umsetzen, die neben verbesserter Löslichkeit sehr gute orale Bioverfügbarkeiten aufwiesen. Dabei wurde Benzamidoxim, in Anlehnung an das Virustatikum Valaciclovir – einem Prodrug des Aciclovirs –, mit der Aminosäure Valin verestert, um Peptidtransporter auszunutzen. Für dieses Konjugat konnte an Ratten eine orale Bioverfügbarkeit von 88 % bestimmt werden. Der Ester aus Benzamidoxim und Bernsteinsäure war ebenso gut löslich, jedoch mit 32 % oraler Bioverfügbarkeit dem Valin-Konjugat unterlegen.¹⁴⁵

In Hinblick auf Hydroxyguanidine ist die weitergehende *N,O*-Substitution v.a. nötig, um eine ausreichende chemische Stabilität zu gewährleisten, damit sie als Prodrugs eingesetzt werden können (vgl. Kap. 2.1.3).

2 ZIELSETZUNG

2.1 ENTWICKLUNG VON NO-MODULIERENDEN SUBSTANZEN

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Konzepte zur Beeinflussung endogener Stickstoffmonoxid-Konzentrationen verfolgt werden. Die wichtigsten Enzyme für die Regulation der NO-Konzentration sind in der Einleitung beschrieben worden und stellen Zielstrukturen potenzieller NO-Modulatoren dar. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nahezu alle diese Enzyme L-Arginin oder Arginin-Analoga als Substrate umsetzen, sollten im Sinne einer Substrat-basierten Wirkstoffentwicklung vor allen Dingen weitere Arginin-Derivate synthetisiert werden.

2.1.1 N^δ -methylierte Derivate des L-Arginins

Methylierte L-Arginine wie N^ω, N^ω -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und N^ω -Monomethyl-L-arginin (NMMA) sind als endogene Hemmstoffe der NO-Synthasen in ihrer (patho)physiologischen Bedeutung gut untersucht worden (vgl. Kap. 1.1.2.4). Die Existenz eines N^δ -methylierten L-Arginins ist im Menschen allerdings bislang nicht beschrieben. Basierend auf der Entdeckung von N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) in Hefezellen und Identifizierung des für die N^δ -Methylierung verantwortlichen Enzyms (identifiziert in *Candida albicans*), stellte sich die Frage, ob diese posttranslationale Modifikation ebenso von (patho)physiologischer Bedeutung im Menschen sein könnte.^{74,146,147}

Die Beeinflussung des NO-generierenden Systems durch N^δ -Methyl-L-arginin sollte im Arbeitskreis untersucht werden. Dafür musste nicht nur N^δ -Methyl-L-arginin synthetisiert werden, sondern auch alle denkbaren Metabolite aus der NOS-Katalyse (s. Abb. 2-1). Es sollte ein gemeinsamer Syntheseweg, der zu allen Derivaten führt und optisch reine Substanzen liefert, entwickelt werden.

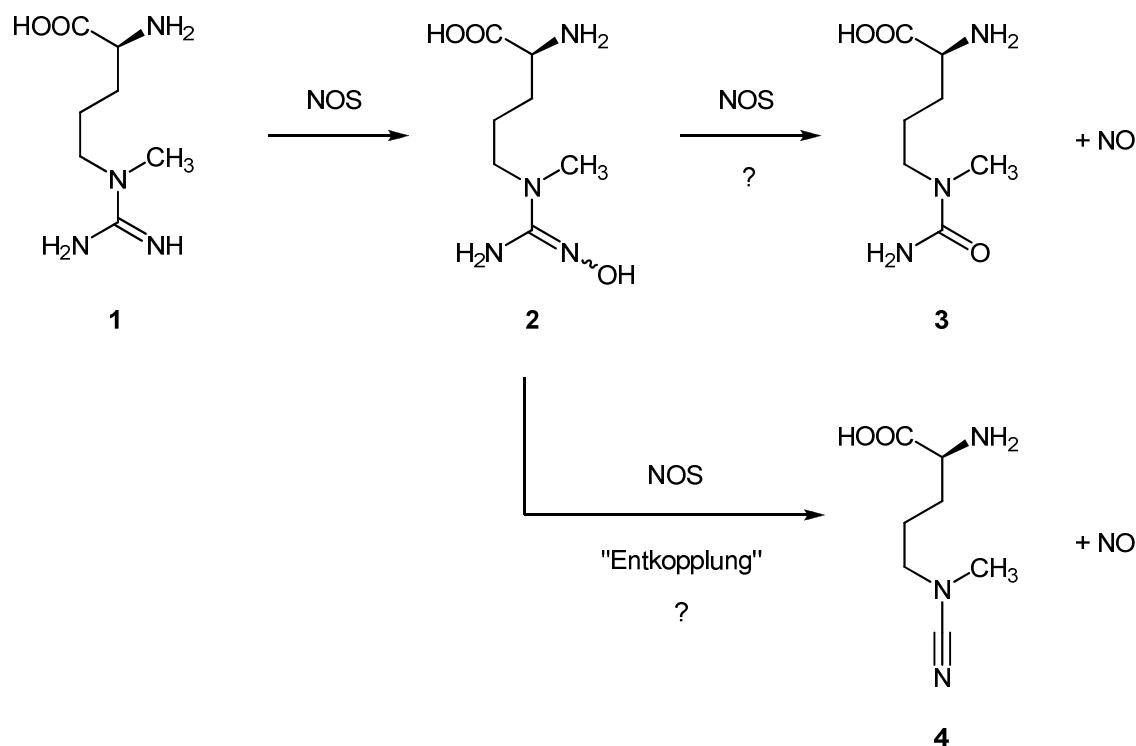


Abbildung 2-1: Postulierte Metabolisierung von N^δ -Methyl-L-arginin (1) mit N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (2) als Intermediat der NO-Synthase (NOS)-katalysierten Reaktion und N^δ -Methyl-L-citrullin (3) als Endprodukt. Ebenso beschrieben für Hydroxyguanidine ist die Freisetzung von NO über einen Entkopplungsmechanismus unter Bildung des entsprechenden Cyanamids, hier N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin (4).

2.1.2 Neue Hemmstoffe der Dimethylarginin Dimethylamino-hydrolase (DDAH)

Die DDAH ist ein vergleichsweise neues und attraktives Zielprotein zur Entwicklung von Wirkstoffen, die in pathophysiologischen Situationen erhöhter NO-Konzentrationen Anwendung finden könnten (vgl. Kap. 1.1.2.4 und 1.1.3.2). Bis heute sind nur wenige potente Inhibitoren beschrieben worden, von denen z.B. die Indolthiobarbitursäuren (s. Abb. 1-8) lediglich an der bakteriellen, jedoch nicht an der humanen DDAH wirksam sind.¹⁴⁸ Daher sollte mit N^ω -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257, s. Abb. 1-8) als Leitstruktur eine Reihe weiterer N^ω -substituierter L-Arginin-Derivate, bzw. Arginin-Mimetika synthetisiert werden, um Aussagen über Struktur-Aktivitätsbeziehungen treffen zu können. Die Synthesestrategie sollte so gewählt werden, dass möglichst viele unterschiedlich substituierte Derivate in guter Ausbeute und optischer Reinheit zugänglich werden.

2.1.3 NO-freisetzende Prodrugs von N^0 -Hydroxy-L-arginin

Die Behandlung von Erkrankungen, die mit endothelialer Dysfunktion assoziiert sind, mit den konventionellen NO-Donoren bringt einige Nachteile mit sich. Bei den Nitraten wären in diesem Zusammenhang z.B. die kurze therapeutische Halbwertszeit, die geringe orale Bioverfügbarkeit, teilweise adverse hämodynamische Effekte und Toleranzerscheinungen zu nennen. Um möglichst nebenwirkungsarme NO-freisetzende Wirkstoffe einsetzen zu können, wurden mittlerweile sehr viele unterschiedliche Stoffklassen entwickelt.^{12,84}

Auch die Supplementation mit L-Arginin als natürliche Quelle für Stickstoffmonoxid wurde lange Zeit als ultimatives Heilmittel aller NO-defizienten Erkrankungen angepriesen (vgl. Kap. 1.1.3.1). Wie aus Abbildung 1-1 hervorgeht ist dieser Ansatz allein schon durch die Tatsache limitiert, dass Arginin vielseitig metabolisiert wird und nur ein geringer Anteil im NO-generierenden System verfügbar wird. Es sind sehr hohe Tagesdosen (> 6-9 g) nötig, um die gewünschten Effekte zu erzielen. Im Zusammenhang mit einigen kürzlich publizierten klinischen Studien haben mehrere Autoren darauf hingewiesen, dass für die Therapie von Herz-Kreislauf-Krankheiten nur Patienten in frühen Stadien der Erkrankung und mit bestimmten atherosklerotischen Risikofaktoren in Frage kommen.^{96,97}

Daher lag die Überlegung nahe, den natürlichen Metaboliten aus der NOS-Katalyse als NO-Donor einzusetzen: N^0 -Hydroxy-L-arginin (NOHA, 5). Alternative Substrate der NO-Synthasen auf Hydroxyguanidin-Basis wurden zwar von Mansuy und Boucher beschrieben, setzen aber NO nicht besser frei als NOHA selbst, insbesondere bezüglich der für das Endothel wichtigen eNOS.⁹⁸

Neben der Tatsache, dass über diese Strategie Stickstoffmonoxid ausschließlich dort freigesetzt wird, wo es benötigt und in zu geringem Ausmaß gebildet wird, könnte ausgenutzt werden, dass NOHA einen der potentesten Arginase-Hemmstoffe darstellt (vgl. Kap. 1.1.3.1). Gerade eine erhöhte Arginase-Aktivität wird als Mechanismus der verminderten NO-Verfügbarkeit und damit als beteiligter Faktor bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion diskutiert.⁶³

Nachteilig sind jedoch die schlechten Arzneistoffqualitäten von N^0 -Hydroxy-L-arginin, die den direkten Einsatz dieser Aminosäure limitieren:

Chemische Instabilität: Unter dem Aspekt der Stabilität ist die Hydroxyguanidin-Funktion als problematisch einzustufen. Hydroxyguanidine zersetzen sich bei Raumtemperatur und sollten bei 4-8 °C, besser -20 °C gelagert werden. Am stabilsten sind sie in Form ihrer Salze starker Säuren.^{149,150} Sie sind hydrolyse- sowie oxidationsempfindlich, wobei die Zersetzungsprodukte in Abhängigkeit vom Oxidationsmittel unterschiedlich sein können.¹⁵⁰⁻¹⁵² Hier muss durch geeignete Substitution die Stabilität dahingehend erhöht werden, dass biologische Halbwertszeiten nicht durch rein chemische Zersetzungsprozesse begrenzt werden.

Mangelhaftes pharmakokinetisches Profil: Der bevorzugte Mechanismus für eine orale Absorption ist die passive Diffusion. Diese ist für eine äußerst hydrophile Aminosäure, die unter physiologischen Bedingungen zwitterionischen Charakter hat, sehr unwahrscheinlich (vgl. Kap. 1.2.2). Eventuell können jedoch Aminosäure-Transporter ausgenutzt werden, weshalb auch Substanzen mit freier Aminosäure-Funktion zu synthetisieren waren. Ansonsten sollten die Modifikationen so gestaltet werden, dass lipophilere NOHA-Derivate resultieren, die möglichst einfach und effizient bioaktiviert werden (s. Abb. 2-2).

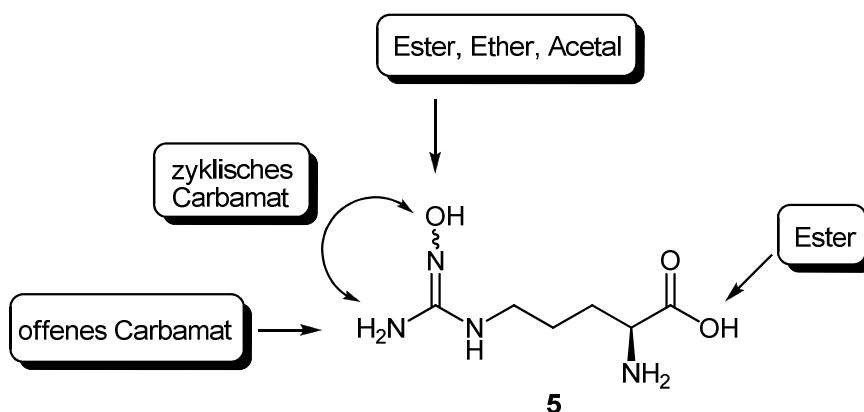


Abbildung 2-2: Geplantes Design verschiedener Prodrugs von N^0 -Hydroxy-L-arginin (NOHA, 5).

Es sollte daher ein Syntheseweg entwickelt werden, der die Darstellung sehr unterschiedlich substituierter Derivate des N^0 -Hydroxy-L-arginins ermöglicht.

2.2 UNTERSUCHUNG NEUER BIOAKTIVIERUNGSMÖGLICHKEITEN

Die Entwicklung neuer Prodrugs, die hauptsächlich der Verbesserung chemischer und pharmakokinetischer Eigenschaften potenzieller Arzneistoffkandidaten dienen, beinhaltet auch die Entdeckung neuer Möglichkeiten der Bioaktivierung. Dies kann einerseits die Entwicklung neuer Stoffklassen sein, die rein chemisch-kontrolliert unter physiologischen Bedingungen zerfallen. Andererseits sollte man auch versuchen, neue Enzyme zu identifizieren, die für Bioaktivierungsreaktionen ausgenutzt werden könnten.

So stellte sich die Frage, ob es alternative Wege der *O*-Desalkylierung für *O*-substituierte Hydroxyguanidine zur klassischen Cytochrom P450-katalysierten Reaktion gibt, ohne dass CYP450 konkurrierend diese Reaktion durchzuführen vermag. *O*-Alkylierte Amidoxime haben ihr ausgezeichnetes Permeationsverhalten für einige antiparasitär wirksame Prodrugs^{142,153} unter Beweis gestellt und sind sehr stabil, was ebenso für Hydroxyguanidine zu erwarten ist. Es bleibt lediglich der nachteilige Aspekt der Involvierung von CYP450-Enzymen zur Bioaktivierung.

Interessant erschien in diesem Zusammenhang die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM, EC 1.14.17.3), die ähnlich den CYP450-Enzymen über eine Monooxygenase-Reaktion oxidative Desalkylierungen katalysiert (s. Abb. 5-1).¹⁵⁴

Diese posttranslationale Modifikation stellt für einige physiologisch vorkommende Peptidhormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren (z.B. Substanz P, Neuropeptid Y, Oxytocin, Vasopressin, Calcitonin) einen Mechanismus der Aktivierung dar. Erstaunlich ist jedoch die geringe Substratspezifität, so dass auch von einer Reihe nicht-peptidischer Substrate berichtet wurde, die *N*- und *O*-desalkyliert werden.¹⁵⁵

In dieser Arbeit sollten einige Modellverbindungen hauptsächlich auf Basis von Amidoximen und Hydroxyguanidinen synthetisiert werden und an PAM auf Substrateigenschaft getestet werden (s. Abb. 2-3).

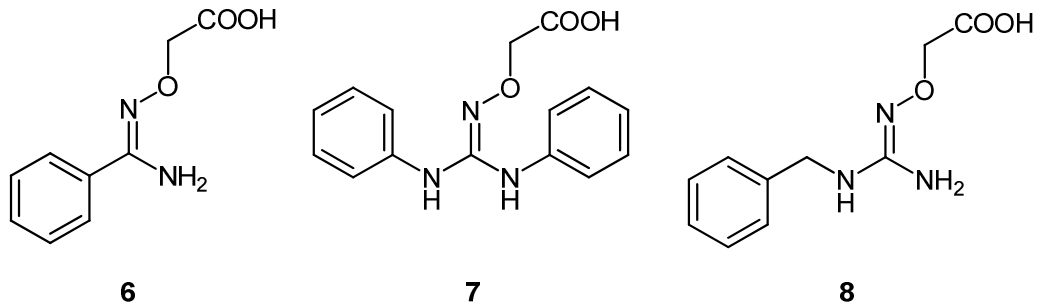


Abbildung 2-3: O-Carboxymethylierte Amidoxime (**6**) und Hydroxyguanidine (**7, 8**) als Modellsubstanzen für die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM).

3 SYNTHESSEN

3.1 SYNTHESE VON N^δ -METHYLIERTEM L-ARGININ, N^δ -CYAN-L-ORNITHIN, L-CITRULLIN UND N^ω -HYDROXY-L-ARGININ

3.1.1 Einleitung

Eine physiologische Bedeutung von N^δ -methylierten Arginin-Derivaten – neben den gut charakterisierten N^ω -methylierten Argininen – sollte im Arbeitskreis untersucht werden, nachdem es Hinweise auf Existenz solcher Aminosäuren in Hefen (*Candida albicans*) gibt.^{74,146,147} Insbesondere den Einfluss auf das NO-generierende System galt es zu untersuchen, weshalb neben N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) auch alle denkbaren Metabolite der NOS-Katalyse synthetisiert werden sollten (vgl. Kap. 2.1.1).

3.1.2 Synthesestrategien

Die Herausforderung in der Darstellung N^δ -methylierter L-Arginin-Derivate (s. Abb. 3-1) ist die Einführung einer einzigen Methyl-Gruppe selektiv in die N^δ -Position.

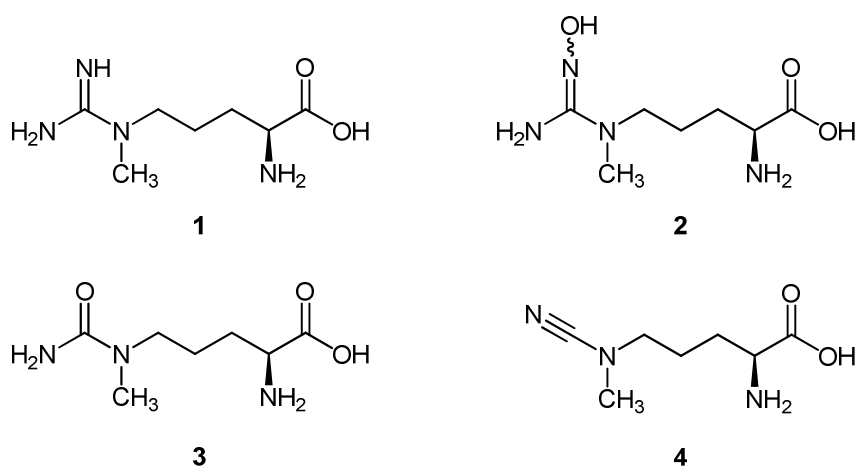


Abbildung 3-1: Übersicht der N^δ -methylierten L-Arginin-Derivate, die in dieser Arbeit synthetisiert werden sollten: N^δ -Methyl-L-arginin (**1**), N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**), N^δ -Methyl-L-citrullin (**3**), N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin (**4**)

Im Arbeitskreis wurden schon einige Versuche unternommen, einen gemeinsamen Syntheseweg zu finden, der alle vier Aminosäuren (**1-4**) liefert. In der Arbeit von Schnörwangen [1994] wurde erstmalig N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (**2**) ausgehend von N^{α} -Boc-L-ornithin-*t*-butylester (**9**) in einer Dreistufenreaktion erfolgreich dargestellt.¹⁵⁶

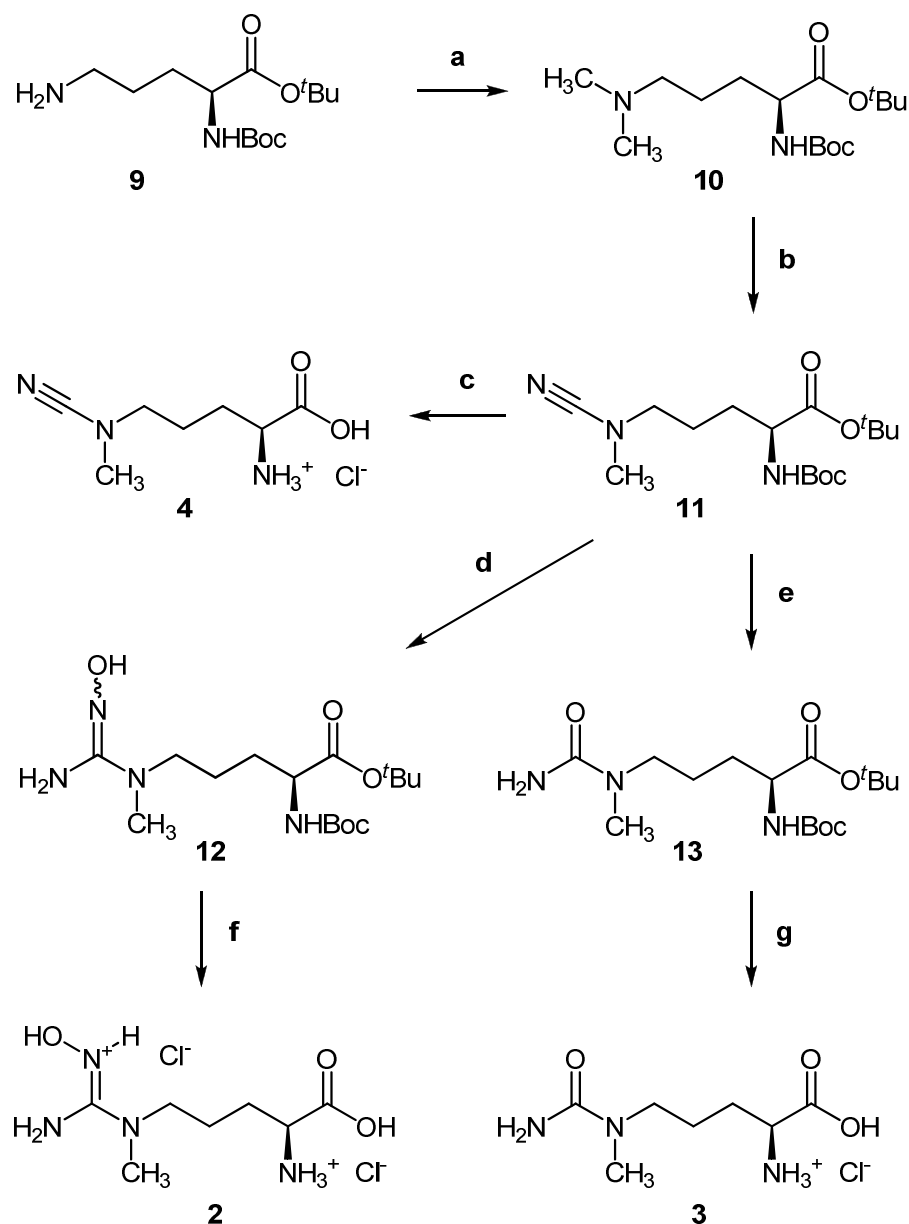


Abbildung 3-2: Synthese von N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivaten nach Töpker [1997]. a) $[\text{CH}_2\text{O}]_n$, Na_2CO_3 , NaBH_4 , MeOH, 85 %; b) BrCN , Na_2CO_3 , Dioxan, 94 %; c) HCl , Dioxan, 91 %; d) NH_2OH , Dioxan, 35 %; e) H_2O_2 (3 %), 1 M NaOH , EtOH, 86 %; f) HCl , Dioxan, 63 %; g) HCl , Dioxan, 90 %

Schlüsselreaktion in dieser Synthesesequenz war der von Braun-Abbau des tertiären Amins mit Bromcyan, der das monomethylierte Cyanamid (**11**) lieferte (vgl. Abb. 3-2).

Töpker [1997] baute diesen Weg aus, um zu zwei weiteren Verbindungen, nämlich N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin (**4**) und N^δ -Methyl-L-citrullin (**3**) zu gelangen.¹⁵⁷ Versuche, über diesen Ansatz N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) darzustellen, scheiterten jedoch. So war es z.B. nicht möglich das Cyanamid **11** mit Ammoniak unter Druck zum Guanidin umzusetzen. Auch Versuche zur selektiven N^δ -Monomethylierung von **9** über ein Sulfonamid und anschließendem Aufbau der Guanidin-Funktion mit S- oder O-Methylisothioharnstoff als Guanidierungsreagenzien waren nicht erfolgreich.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Syntheseweg entwickelt werden, der alle vier Arginin-Derivate zugänglich macht. Luzzi und Marletta [2006] haben die Darstellung von N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) und N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**) ausgehend von N^δ -Methyl-L-ornithin realisiert, ohne auf konventionelle Aminosäure-Schutzgruppenchemie zurückzugreifen.¹⁵⁸ Stattdessen überführten sie die α -Aminosäure-Funktion in einen Diethylboryl-Komplex, welcher nach entsprechender Modifikation in der Seitenkette und Schutzgruppen-Abspaltung **1** und **2** lieferte.

Diese Strategie war vielversprechend für die eigene Aufgabenstellung, neben Guanidin **1** und Hydroxyguanidin **2** auch das Citrullin **3** und Cyanamid **4** darstellen zu können. Einige wichtige Aspekte sollten in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden:

- Die Reaktionsbedingungen sollten so gewählt werden, dass das optisch reine Ausgangsmaterial nicht racemisiert. Dieses Kriterium wurde von Luzzi und Marletta nicht überprüft.¹⁵⁸
- Eine alternative Komplexierung sollte in Hinblick auf Optimierung dieser Strategie getestet und mit den Diethylboryl-Komplexen verglichen werden.

3.1.3 N^δ -Methyl-L-ornithin als Ausgangsverbindung

Zunächst wurde die selektive N^δ -Monomethylierung in Anlehnung an verschiedene Literaturvorschriften durchgeführt. Durch Überführung von L-Ornithin **14** in den Kupfer(II)-Komplex konnte selektiv die Seitenkette tosyliert werden.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Die von Gut *et al.* beschriebene Variante erschien bezüglich der Aufarbeitung mit $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ weniger kompliziert als die Verwendung von Schwefelwasserstoff zum Entfernen von Kupfer(II).¹⁵⁹ Anschließend wurde die N^α -Amino-Gruppe benzoyliert, um die selektive Methylierung mit Dimethylsulfat am N^δ -Atom durchführen zu können.^{158,161-163}

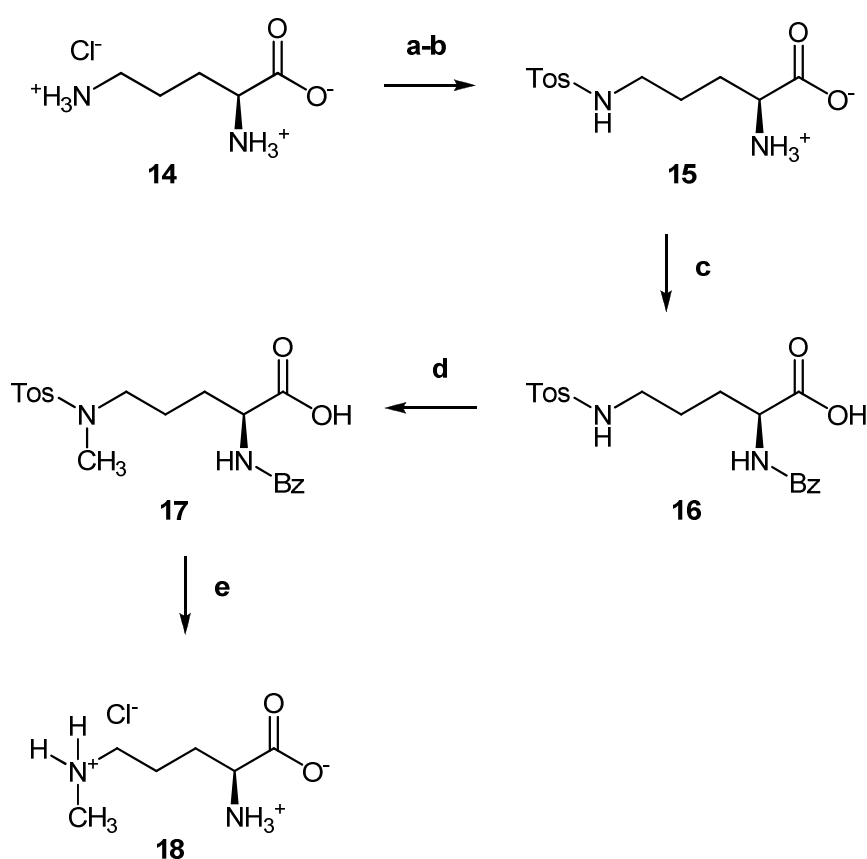


Abbildung 3-3: Synthese von N^δ -Methyl-L-ornithin (**18**). Tos, Tosyl; Bz, Benzoyl; a) basisches CuCO_3 ; b) Tosylchlorid in Et_2O , 2 N NaOH, 71 % für beide Schritte; c) Benzoylchlorid, 2 N NaOH, 79 %; d) Dimethylsulfat, NaOH, 90 %; e) HBr (47 % in Eisessig), 1,5 h Rückfluss, 85 %

Problematisch war die Abspaltung der Tosyl- und Benzoyl-Schutzgruppe mit Bromwasserstoffsäure (47 % HBr in Eisessig),^{158,161,162} da einerseits – bei zu langen Reaktionszeiten – L-Ornithin als Nebenprodukt entstand sowie andererseits die

enantiomerenreine Ausgangsverbindung **17** zu einem signifikanten Anteil racemisierte (s. Kap. 4.2.1).

Bislang wurde keine der Verbindungen aus der Synthesesequenz zum N^δ -Methyl-L-ornithin auf Enantiomerenreinheit getestet. Einige Autoren geben lediglich Drehwerte an, die nur bedingt aussagekräftig sind. Die beiden Vorstufen **16** und **17** sowie N^δ -Methyl-L-ornithin (**18**) wurden auf Enantiomerenreinheit mittels HPLC auf chiralen stationären Phasen untersucht (s. Kap. 4.2.1). Bei strikter Einhaltung der Vorschriften von Luzzi und Marletta sowie Benoiton wurde **18** nach zwei Stunden Kochen mit HBr unter Rückfluss, Abdestillieren von HBr und Aufreinigung mittels Kationenaustauscher-Chromatographie mit einem L-Enantiomerenüberschuss von 71-72 % erhalten. Erst das Verkürzen der Reaktionszeit auf 1,5 Stunden und das vorsichtige Abdestillieren von HBr bei möglichst niedrigen Temperaturen (50-60 °C, < 1 mbar) lieferte kaum racemisiertes N^δ -Methyl-L-ornithin (98 %ee).

3.1.4 Boroxazolidinon-geschütztes N^δ -Methyl-L-ornithin

3.1.4.1 Synthese

Zur weiteren Modifizierung der Seitenkette von N^δ -Methyl-L-ornithin (**18**) musste nun die α -Aminosäure geschützt werden. Klassisch wird hierfür die Amino-Gruppe als Carbamat und die Carbonsäure als Ester geschützt. Die selektive Einführung dieser Schutzgruppen bei Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette bedarf allerdings wiederum mehrerer Schritte.^{164,165}

Elegant erscheint das simultane Schützen in einer einzigen Reaktion über eine Komplexbildungsreaktion. Im Prinzip wurde dieses Konzept schon im ersten Schritt der Darstellung von **15** angewandt, indem L-Ornithin in seinen Kupfer(II)-Komplex überführt wurde (s. Abb. 3-3). Solche Kupfer-Aminosäure-Komplexe können jedoch nur in Wasser als Lösungsmittel und in basischem Milieu verwendet werden, was die Anwendung gerade in mehrstufigen Synthesen limitiert. Nefkens und Zwanenburg [1983] waren die ersten, die verschiedene Bor-Komplexe als Schutzgruppen für Aminosäuren beschrieben haben.¹⁶⁶ Mit dieser Synthesestrategie

sind einige vielseitig funktionalisierte Aminosäuren dargestellt und in der Literatur beschrieben worden, wie z.B. (S)-5-Hydroxynorvalin,¹⁶⁷ Fmoc-D-Hydroxyvalin(O-TBDMS)¹⁶⁸ oder 3-Ethynyl-L-tyrosin.¹⁶⁹

Luzzi und Marletta haben in Anlehnung an Garcia *et al.* N^{δ} -Methyl-L-ornithin (**18**) in den Diethylboryl-Komplex **19** überführt, indem die freie Aminosäure mit Triethylboran (1 M Lösung in THF) in trockenem 1,2-Dimethoxyethan (DME) für 72 Stunden unter Rückfluss und Inertgasatmosphäre gekocht wurde (s. Abb. 3-4). Nach Aufarbeitung ist das Produkt zu ca. 95 % rein (DC, NMR) und kann in den folgenden Synthesen eingesetzt werden. Nachteilig waren hierbei die langen Reaktionszeiten zur Darstellung von **19** und die mäßigen Ausbeuten bei der Guanidierung zu **21** (s. Abb. 3-7) sowie bei der Umsetzung mit Bromcyan zu **23** (s. Abb. 3-8). Daher sollte ein alternativer Komplex verwendet werden, der schnell und einfach zu synthetisieren ist sowie eine bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aufweist. Gerade die begrenzte Löslichkeit der Diethylboryl-Komplexe war eine mögliche Erklärung für die mäßigen Ausbeuten.

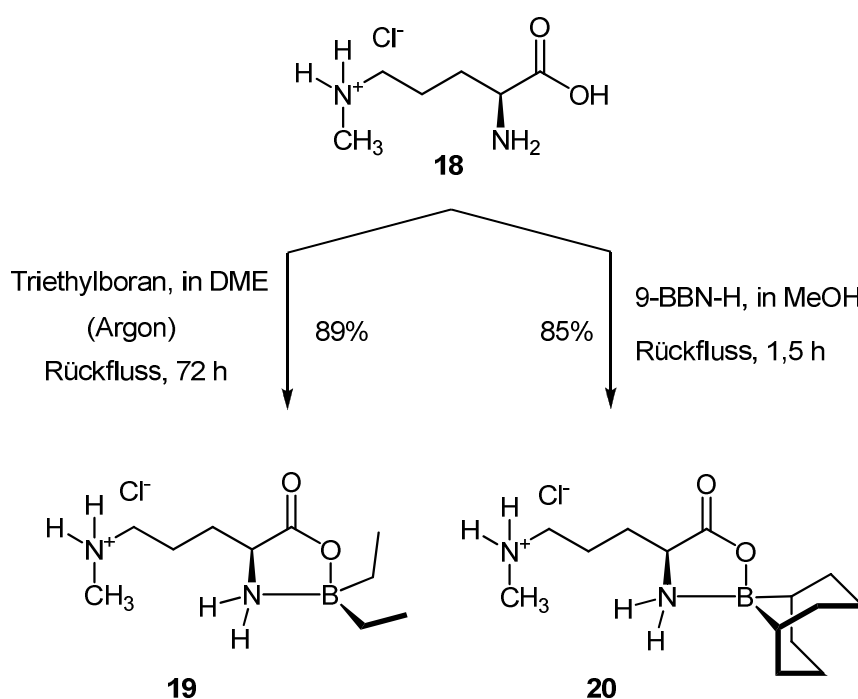


Abbildung 3-4: Darstellung von Boroxazolidinon-geschütztem N^{δ} -Methyl-L-ornithin.

Dent *et al.* [2002] haben Bis(9-borabicyclo[3.3.1]nonan) (9-BBN-H) als Komplexierungsreagenz für einige Aminosäuren vorgestellt und neben der Stabilität

gegenüber vielen Reaktionsbedingungen besonders die verbesserte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln diskutiert.¹⁷⁰

9-BBN-Komplexe werden in guten Ausbeuten nach 1-2-stündigem Kochen in Methanol erhalten. Für die Darstellung von **20** konnte sogar auf die Durchführung in Stickstoffatmosphäre verzichtet werden, was auf die ausgesprochene Stabilität dieser Stoffklasse hindeutet (vgl. Abb. 3-4). In diesem Zusammenhang ist weiterhin praktisch, dass 9-BBN-H als gut handhabbare kristalline Substanz eingesetzt werden kann. Die schnelle, unkomplizierte und effiziente Komplexierung mit 9-BBN-H kann als entscheidende Optimierung der Synthesen von Luzzi und Marletta angesehen werden.

3.1.4.2 Spektroskopische Aspekte der Bor-Komplexe

Aufgrund der Chiralität der Bor-Komplexe werden diese auch aus spektroskopischer Sicht interessant. Einige Charakteristika sollen an den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von **19** und **20** an dieser Stelle beispielhaft erläutert werden.

In Abbildung 3-5 ist das ¹H-NMR Spektrum des Diethylboryl-Komplexes **19** gezeigt. Die Protonen der α -Amino-Gruppe befinden sich in räumlicher Nachbarschaft verschiedener Dipole. Als freies Amin würde dies durch Stickstoffinversion nicht weiter auffallen. Aufgrund der Komplexierung ist eine Stickstoffinversion allerdings erschwert bzw. nicht möglich. Die Folge ist ein charakteristisches ABX-System für diese Protonen durch Nachbarschaft zur chiralen α -CH-Gruppe: Zwei breite Dubletts eines Dubletts bei 5.67 ppm und 6.59 ppm.

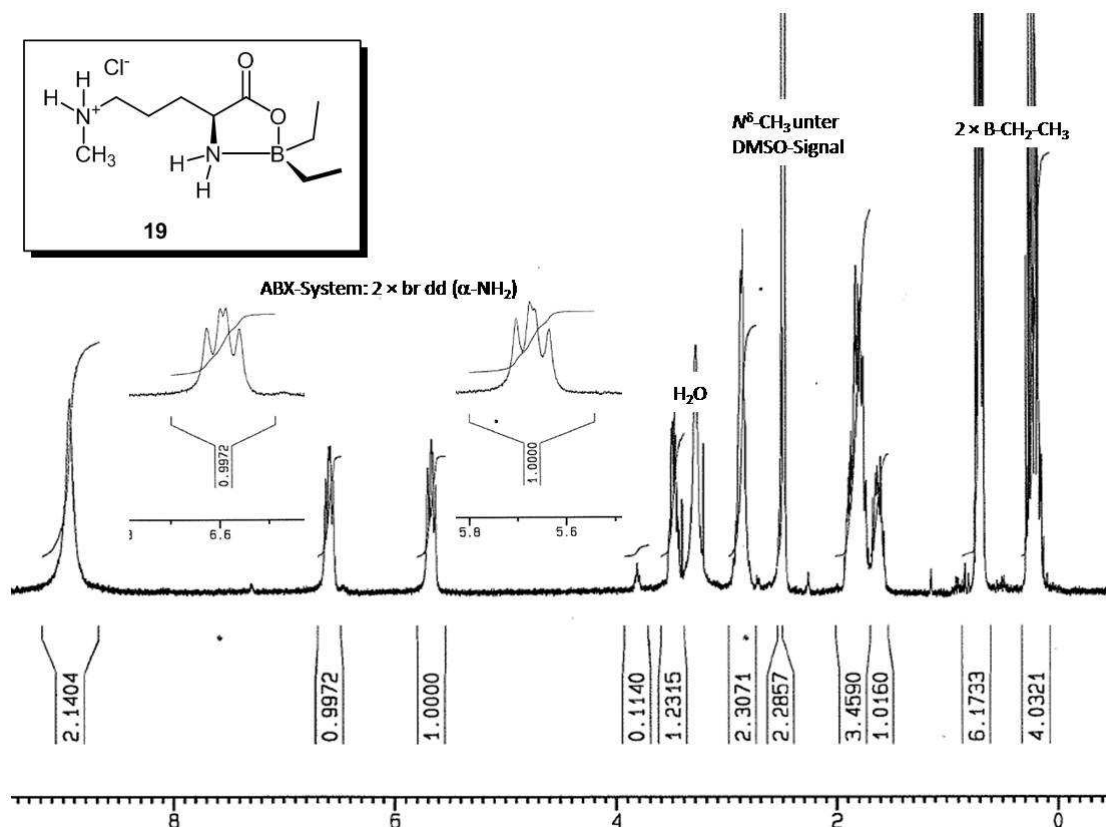


Abbildung 3-5: ^1H -NMR-Spektrum von Diethyl[N^{δ} -methyl-L-ornithinato- O,N]borat (**19**). Messfrequenz, 300 MHz; Lösungsmittel, DMSO- d_6 ; interner Standard, TMS

Ebenso eindrucksvoll belegt wird die Existenz unterschiedlicher Dipolräume durch das Auftreten von jeweils zwei verschiedenen Resonanzen für die beiden peripheren Methylen-Gruppen sowie die beiden Methin-Gruppen im 9-BBN-Teil von **20** (s. Abb. 3-6).

Für die Methylen-Gruppen B-CH-CH $_2$ -CH $_2$ sind sogar vier verschiedene Signale im ^{13}C -Spektrum zu beobachten, da neben den unterschiedlichen Dipolräumen die Chiralität der Verbindung diese Methylen-Gruppen nicht äquivalent erscheinen lässt. Die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen der 9-BBN-Komplexe erfolgte mit Hilfe zweidimensionaler Aufnahmetechniken (C,H-Korrelation). Hier konnte zudem die magnetische Nicht-Äquivalenz der beide Protonen der β -CH $_2$ -Gruppe beobachtet werden (nicht abgebildet).

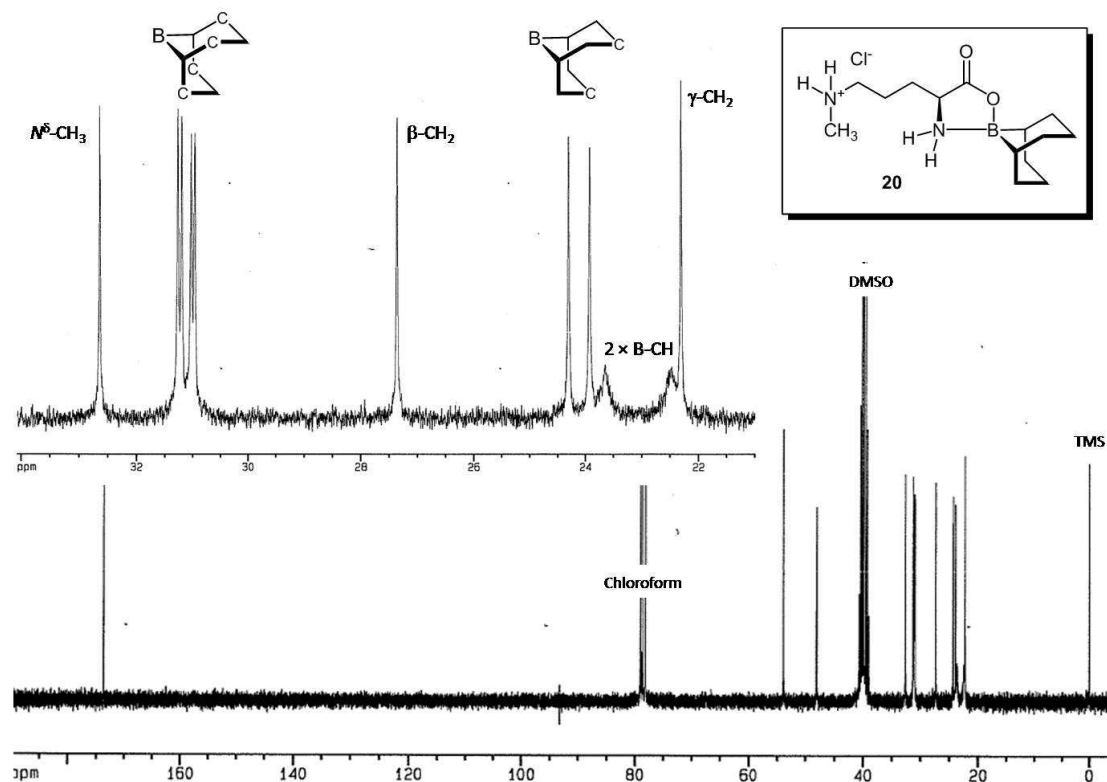


Abbildung 3-6: Protonenkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von 9-Borabicyclo[3.3.1]non-9-yl[N^δ -methyl-L-ornithinato- O,M]borat (**20**). Messfrequenz, 75 MHz; Lösungsmittel, $\text{DMSO-}d_6$: CDCl_3 (1:1), interner Standard, TMS; In reinem $\text{DMSO-}d_6$ waren ursprünglich wegen der hohen Viskosität des Lösungsmittels nur zwei Signale für $\text{B-CH-CH}_2\text{-CH}_2$ zu sehen. Durch Zumischen von CDCl_3 wurde diese gesenkt und alle vier Resonanzen sichtbar. In reinem CDCl_3 waren die Bor-Komplexe nicht löslich.

3.1.4.3 Stabilität bei verschiedenen pH-Werten

In Anbetracht der folgenden Umsetzungen, die mit den Boroxazolidinonen geplant waren, erschien es sinnvoll, vorab die Stabilität der Komplexe bei unterschiedlichen pH-Werten zu untersuchen. So wurde mittels *High Performance Thin Layer Chromatography*-Experimenten die Stabilität von **20** in verschiedenen wässrigen Puffersystemen von pH 2-11 überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die größte Stabilität war bei pH 2-4 zu verzeichnen, wobei nach vier Stunden weniger als 3 % Zersetzung zu beobachten war. Bei pH 6,5 waren hingegen nach einer Stunde ca. 15 % und nach zwei Stunden schon ca. 80 % zersetzt. Strang *et al.* [1989] berichteten für Diphenylboryl-Komplexe verschiedener Aminosäuren ebenso von größter Stabilität bei pH 2-5.¹⁷¹

3.1.5 N^{δ} -Methyl-L-arginin

Für den Aufbau einer Guanidin-Funktion stehen verschiedene Guanylierungs-Reagenzien zur Verfügung, von denen einige in Kap. 3.2.2 besprochen werden. Mit N,N' -Bis(*t*-butyloxycarbonyl)thioharnstoff und Quecksilber(II)-chlorid als Entschwefelungsreagenz konnten die Guanidine **21** und **22** dargestellt werden (s. Abb. 3-7).¹⁵⁸ Vorteilhaft war hierbei, dass die Guanidine zunächst in geschützter Form vorlagen und aufgrund der geringeren Basizität besser aufzuarbeiten waren. So konnten sie mittels Säulenchromatographie über Kieselgel aufgereinigt werden. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass direkte Vorstufen von Aminosäuren in sehr reiner Form isoliert werden sollten, um bei der Abspaltung der Schutzgruppen möglichst keine weitere Aminosäure als Nebenprodukt zu erhalten. Die anschließende Abtrennung weiterer freier Aminosäuren wäre dann praktisch nur noch mittels kostspieliger (halb)präparativer HPLC auf Umkehrphasen möglich. Diese Vorgehensweise wurde bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Aminosäure-Synthesen berücksichtigt.

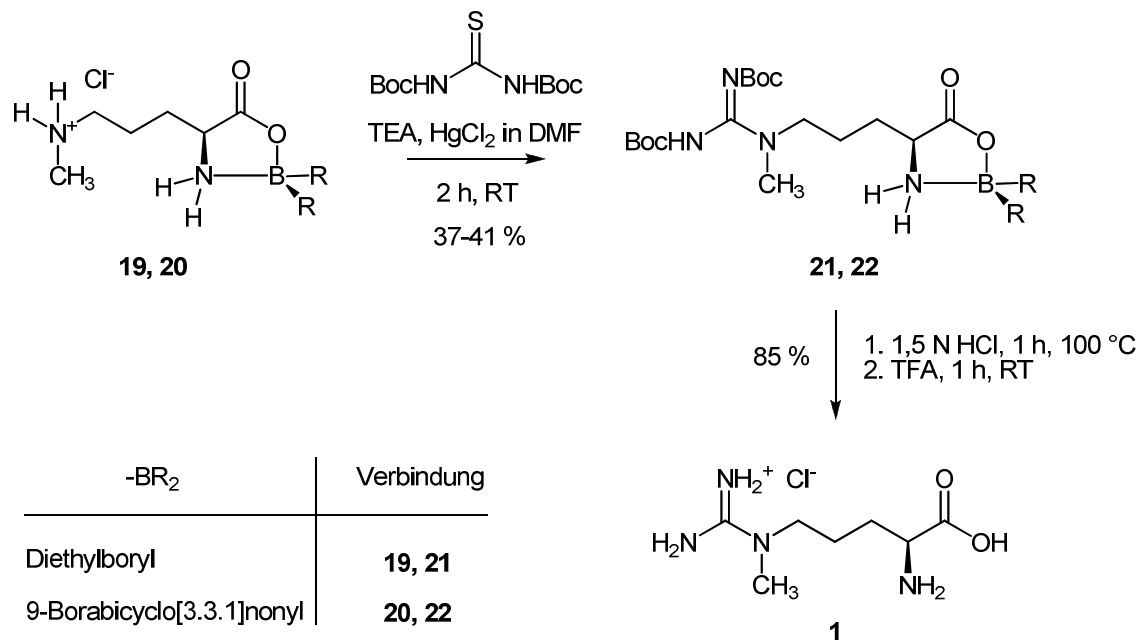


Abbildung 3-7: Synthese von N^{δ} -Methyl-L-arginin (**1**). -BR₂ = Diethylboryl (**19, 21**), 9-BBN (**20, 22**)

Der Bor-Komplex und die Boc-Gruppen wurden in Anlehnung an Luzzi und Marletta abgespalten, indem **21** bzw. **22** zuerst mit verdünnter Salzsäure und anschließend mit

Trifluoressigsäure (TFA) behandelt wurden.¹⁵⁸ Zur Aufreinigung wurde N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) über eine Kationenaustauscher-Säule gegeben und als Monohydrochlorid bei pH 5,8 isoliert. Die Ausbeuten waren für beide Boroxazolidinone in den zwei Schritten vergleichbar.

Eine alternative Darstellung von N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) wurde zusätzlich verfolgt, nachdem einige Autoren die Reduktion von Hydroxyguanidinen beschrieben. So ist für die Synthese eines Guanidin-Derivates von Pergolid (Dopamin-Agonist) im letzten Schritt die Reduktion der Hydroxyguanidin-Vorstufe mit Zink in Eisessig/Wasser erfolgreich gewesen.¹⁷² Während diese Arbeit angefertigt wurde, ist von Martin *et al.* [2008] die Reduktion von einem vollständig geschützten N^ω -Hydroxy-L-arginin-Derivat durch katalytische Hydrierung für die Darstellung des korrespondierenden Arginins ausgenutzt worden.¹⁷³

Eine direkte Reduktion von N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**) gelang unter Druck mit Wasserstoff in Methanol (5 % Eisessig) und Palladium-Kohle (10 %) als Katalysator. Mit diesem Schritt wäre nun N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) sehr einfach auch über den von Töpker gewählten Syntheseweg zugänglich.

3.1.6 N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin

Die Cyanamide **23** und **24** stellten zentrale Zwischenstufen für drei der weiteren N^δ -methylierten Aminosäuren dar.

Allgemein werden Cyanamide v.a. über die Reaktion von Aminen mit Halogencyanen – vorwiegend Bromcyan (BrCN) – in aprotischen Lösungsmitteln erhalten, wobei die entstehende Halogenwasserstoffsäure durch Zugabe von Basen abgefangen wird.¹⁷⁴ Verschiedene Autoren hatten auf diesem Weg schon geschütztes N^δ -Cyan-L-ornithin dargestellt, welches weiter zu NOHA (**5**) umgesetzt werden konnte.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸

Luzzi und Marletta haben mit ihrem Boroxazolidinon **19** in 1,2-Dimethoxyethan (DME) das Cyanamid **23** in mäßigen Ausbeuten (25 %) erhalten.¹⁵⁸ Gerade für diesen Schritt wurde angestrebt, mit dem größeren und lipophileren 9-BBN-Komplex **20** die

Ausbeuten durch eine verbesserte Löslichkeit in etherischen Lösungsmitteln signifikant zu erhöhen, um ausreichend Material für die folgenden Stufen zu Verfügung zu haben.

Cyanamid **24** wurde jedoch in vergleichbaren Ausbeuten wie der entsprechende Diethylboryl-Komplex **23** erhalten (s. Abb. 3-8). Verschiedene alternative Lösungsmittel wie Dioxan, THF oder Diethylether brachten keine Verbesserung. Außerdem wurde erfolglos versucht, den 9-BBN-Komplex **20** als freies Amin darzustellen, was nach Dent *et al.* die Löslichkeit entscheidend verbessern soll.¹⁷⁰

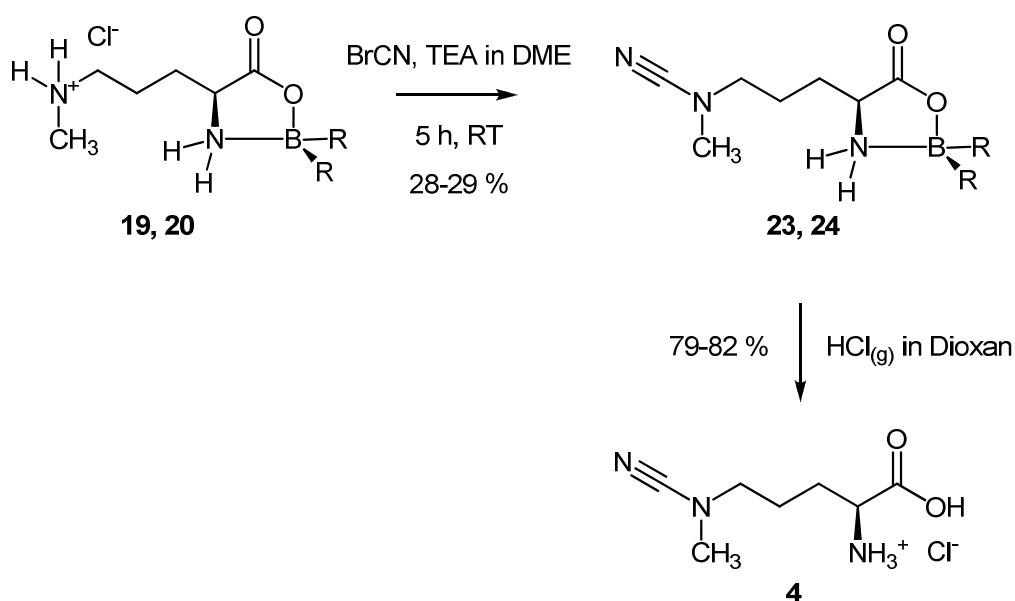


Abbildung 3-8: Synthese von *N*^δ-Cyan-*N*^δ-methyl-L-ornithin (**4**). $-\text{BR}_2 = \text{Diethylboryl (19, 23)}$, 9-BBN (**20, 24**)

Für die Synthese des freien Cyanamids **4** musste unter Feuchtigkeitsausschluss in absolutem Dioxan gearbeitet werden, um v.a. eine hydrolytische Zersetzung zu vermeiden. Durch Überleiten von HCl -Gas über eine Dispersion der Boroxazolidinone **23, 24** in absolutem Dioxan konnte *N*^δ-Cyan-*N*^δ-methyl-L-ornithin als Hydrochlorid gefällt und unter Stickstoffbegasung isoliert werden. Aufgrund der bekannten Gefahr der Polymerisation von Cyanamiden, wurde **4** bei -20 °C unter Stickstoff gelagert.^{176,179} Vom freien primären Cyanamid *N*^δ-Cyan-L-ornithin ist z.B. bekannt, dass es lediglich in Form seiner Natriumacetat-gepufferten wässrigen Lösung (pH 4) bei -80 °C gelagert werden kann und beim Versuch der Isolierung polymerisiert.¹⁸⁰

3.1.7 N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, N -Hydroxyguanidine zu synthetisieren. Ein Großteil der Autoren geht von Cyanamiden bzw. Carbodiimiden aus und setzt diese mit Hydroxylamin – meist als Hydrochlorid vorliegend – in Alkoholen oder etherischen Lösungsmitteln um.^{176-178,181-185} Alternativ können S -Methylisothioharnstoffe mit Hydroxylamin umgesetzt werden, eine Strategie, die für die Synthese von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (**5**) von Feldman [1991] beschrieben wurde.¹⁸⁶ Auf einen weiteren Weg ausgehend von Carbamoylthioharnstoffen wird in den Kapiteln 3.2.2 und 3.3.2 eingegangen.

Für die Synthese von N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (**2**) wurde zunächst versucht die Reaktion mit freiem Hydroxylamin¹⁸⁷ in verschiedenen etherischen Lösungsmitteln durchzuführen, da in diesen der Angriff des ambidenten Hydroxylamins v.a. über den Stickstoff abläuft. In protischen Lösungsmitteln hingegen ist zu einem gewissen Teil die Bildung eines instabilen Aminoxyformamidins durch Angriff über den Sauerstoff möglich.¹⁸⁸⁻¹⁹¹ Solche Aminoxyformamide können dann weiter zu den entsprechenden Harnstoffen zerfallen.¹⁸⁸

Die Ausbeuten waren mit den etherischen Lösungsmitteln allerdings niedrig, so dass auf die Variante in Methanol mit Hydroxylammoniumchlorid als Reagenz und Triethylamin (TEA) als Hilfsbase zurückgegriffen wurde (s. Abb. 3-9).¹⁵⁸

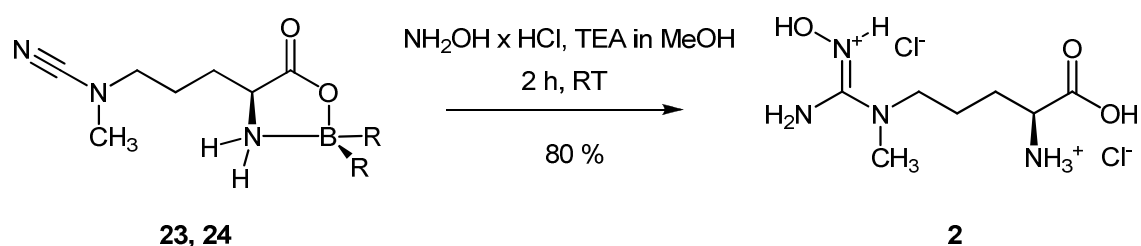


Abbildung 3-9: Synthese von N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (**2**). -BR₂ = Diethylboryl (**23**), 9-BBN (**24**)

Unter diesen Bedingungen konnte die Bildung von 1-1,5 % N^{δ} -Methyl-L-citrullin (**3**) nicht vermieden werden, was wahrscheinlich auf den oben angesprochenen Mechanismus zurückzuführen ist. Je länger die Reaktionszeit war, umso mehr

Citrullin **3** wurde gebildet. Somit wurden zwei Stunden als Kompromiss zwischen der Ausbeute und der Menge an gebildetem Nebenprodukt gewählt. Kotthaus hat in seiner Arbeit für *in vitro*-Testungen eine HPLC-Analytik mit *o*-PA-Vorsäulenderivatisierung entwickelt, mit der die Verunreinigung quantifiziert wurde.^{148,192}

Die Boroxazolidinone wurden unter den Reaktionsbedingungen gleichzeitig gespalten, so dass direkt die Aufarbeitung von *N*^ω-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin (**2**) folgte. Dafür wurde es über Cellulose aufgereinigt und als Öl in Form der freien Aminosäure erhalten. Da Hydroxyguanidine am stabilsten in Form ihrer Salze sind,^{149,150} wurde **2** als Hydrochlorid aus einer Dispersion in trockenem Dioxan durch Überleiten von HCl-Gas isoliert. Ebenso wie *N*^δ-Cyan-*N*^δ-methyl-L-ornithin (**4**) wurde es unter Stickstoff bei -20 °C gelagert.

Die Ausbeuten und der Anteil des gebildeten Citrullins **3** (1-1,5 %) als Nebenprodukt waren für beide Boroxazolidinone (**23**, **24**) vergleichbar. Töpker und Schnörwangen hatten unter Verwendung des konventionell geschützten Cyanamids **11** das Hydroxyguanidin **2** zwar in deutlich niedrigeren Ausbeuten erhalten (20-22 % für zwei Schritte), dafür jedoch keine Kontamination mit Citrullin **3** beschrieben.^{156,157}

3.1.8 *N*^δ-Methyl-L-citrullin

Töpker hatte in ihren Synthesen eine partielle Hydrolyse des geschützten *N*^δ-Cyan-*N*^δ-methyl-L-ornithins **11** realisiert, indem dieses mit verdünnter Wasserstoffperoxid-Lösung und Natronlauge in Ethanol behandelt wurde.¹⁵⁷ Analoge Cyanamid-Hydrolysen zu Harnstoff-Derivaten sind auch unter sauren Bedingungen beschrieben, wie z.B. mit 50 %-iger Schwefelsäure,^{193,194} TFA/Wasser in THF¹⁹⁵ oder mit 20 %-iger Salzsäure.¹⁹⁶

Die Möglichkeit der alkalischen Verseifung konnte für Boroxazolidinone **23** und **24** nicht angewendet werden, da sie sich bei pH > 6 rasch zersetzen (vgl. Kap. 3.1.4.3). Bei pH 2 sind sie hingegen für viele Stunden stabil, so dass eine Hydrolyse unter sauren Bedingungen mit 60 %-iger Trifluoressigsäure (TFA) in Aceton durchgeführt wurde (s. Abb. 3-10).

Nachdem die Umsetzung nahezu quantitativ erfolgte (DC), wurde das geschützte Intermediat direkt mit verdünnter HCl behandelt, um den Bor-Komplex abzuspalten. N^δ -Methyl-L-citrullin (**3**) konnte anschließend mittels Chromatographie über Cellulose aufgereinigt werden. Hier fielen die Ausbeuten für den 9-BBN-Komplex **24** mit 80 % ($n = 1$) besser aus als für den Diethylboryl-Komplex **23** mit 60 % ($n = 2$).

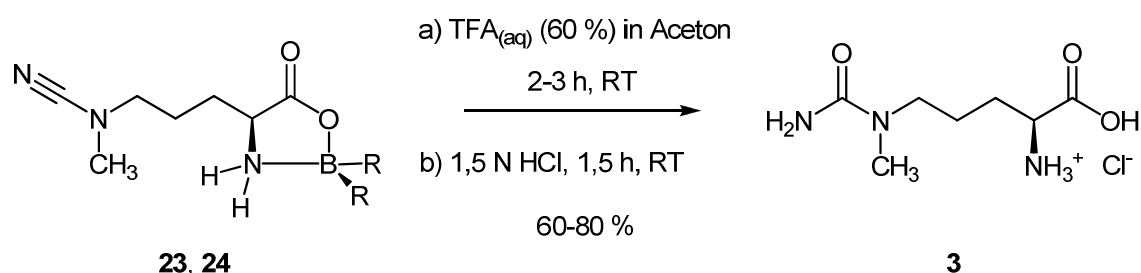


Abbildung 3-10: Synthese von N^δ -Methyl-L-citrullin (**3**). -BR₂ = Diethylboryl (**23**), 9-BBN (**24**)

3.1.9 Zusammenfassung

Es war die Aufgabe, im Rahmen dieser Arbeit einen gemeinsamen Syntheseweg für N^δ -methylierte Derivate des L-Arginins zu entwickeln, welche an verschiedenen Enzymen des Stickstoffmonoxid-generierenden Systems getestet werden sollten.

Ausgehend von konventionell geschütztem L-Ornithin – als *t*-Butylester und Boc-Amin – ist Töpker die Synthese von N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**), N^δ -Methyl-L-citrullin (**3**) und N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin (**4**) in mäßig bis guten Ausbeuten gelungen. Nicht zugänglich war allerdings N^δ -Methyl-L-arginin (**1**), weshalb eine alternative Strategie nötig war.

Nach selektiver Monomethylierung an der N^δ -Position von L-Ornithin, welches als freie Aminosäure nach Literaturvorschrift dargestellt wurde, konnte durch Ausbildung von Bor-Komplexen die α -Aminosäure-Funktion in einem Schritt geschützt werden. Luzzi und Marletta hatten diesen Weg für die Darstellung von **1** und **2** erfolgreich nutzen können. Der dabei verwendete *B,B*-Diethylboryl-Komplex sollte, neben der Synthese von **1** und **2**, auch für die Darstellung von **3** und **4** dienen. Durch Verwendung von Bis(9-borabicyclo[3.3.1]nonan) (9-BBN-H) als alternativen Bor-Komplex wurde

insbesondere das Einführen dieser Schutzgruppe erheblich vereinfacht, indem die Reaktion in Methanol unter Rückfluss nach eineinhalb Stunden beendet war. Nach geeigneter Modifikation in der Seitenkette waren alle N^δ -methylierten Aminosäuren in guten bis mäßigen Ausbeuten über diesen Syntheseweg zugänglich (s. Abb. 3-11 und Tab. 3-1). Die weiterhin erhoffte Verbesserung der Löslichkeit der 9-BBN-Komplexe im Vergleich zu den Diethylboryl-Verbindungen – und damit der Ausbeuten – konnte nicht erzielt werden.

Tabelle 3-1: Gesamtausbeuten für N^δ -methylierte L-Arginin-Derivate aus verschiedenen Synthesewegen

Verbindung	Weg A ^a (%)	Weg B ^b (%)
1	12,6	N.A.
2	8,4	17,6 (7,5)
3	8,4	61,8 (26,2)
4	8,9	72,7 (30,8)

^a Boroxazolidinon-Strategie; Gesamtausbeuten ausgehend von L-Ornithin (**14**).

^b Syntheseweg nach Töpker; Gesamtausbeuten ausgehend von N^α -Boc-L-ornithin-*t*-butylester (**9**). Da **9** in vier Schritten aus L-Ornithin (**14**) mit einer durchschnittlichen Gesamtausbeute von 42,4 % dargestellt wird,^{150,186,197} sind die Ausbeuten in Klammern zwecks Vergleichbarkeit auf **14** bezogen.

Interessant ist die Möglichkeit, Hydroxyguanidin **2** hydrogenolytisch zum N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) umsetzen zu können, so dass auch der Syntheseweg von Töpker zu allen Derivaten führen kann.

3.1.10 Testergebnisse und Ausblick

Für Testungen der N^δ -methylierten Derivate an den wichtigen Enzymen des NO-generierenden Systems wurden von Kotthaus verschiedene *in vitro*-Testsysteme und HPLC-Analytiken entwickelt. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse kurz zusammengefasst werden.^{148,198}

Hemmstudien mit rekombinanten humanen NO-Synthasen zeigten, dass alle Verbindungen, mit IC_{50} -Werten im millimolaren Bereich, äußerst schwache Inhibitoren darstellen. N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) und N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**) wurden weiterhin auf ihre Substrateigenschaften getestet. Ebenso wie Luzzi und Marletta konnte Kotthaus zeigen, dass lediglich das Guanidin **1** in geringem Ausmaß hydroxyliert wird, während Hydroxyguanidin **2** nicht unter NO-Freisetzung von den NOSs weiter umgesetzt werden kann.¹⁵⁸ Der Wegfall der Wasserstoffbrücke zwischen N^δ -Atom und einem Glutamat-Rest im aktiven Zentrum führt offensichtlich zu einem erheblichen Affinitätsverlust.^{25,26}

Testungen mit rekombinanter humaner Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) konnten keine Hemm- oder Substrateigenschaften aufzeigen. Die bisher veröffentlichten Kristallstrukturen der DDAH zeigen, dass asymmetrisches N^ω, N^ω -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und L-Citrullin eine Wasserstoffbrücke vom N^δ -Atom zu einem Aspartat-Rest im aktiven Zentrum ausbilden.^{199,200} Es scheint als würde die N^δ -Methylierung – wie bei den NO-Synthasen – diese wichtige Interaktion verhindern und damit den Affinitätsverlust verursachen.

Interessant war jedoch, dass N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**) mit einem K_i -Wert von $17 \pm 2 \mu\text{M}$ einen potenten Inhibitor der bovinen Arginase I darstellt. In der Literatur wird der K_i -Wert von N^ω -Hydroxy-L-arginin (NOHA, **5**) – dem physiologischen Intermediat der NOS-Katalyse – als Arginase-Hemmstoff zwischen $30\text{--}42 \mu\text{M}$ angegeben.^{21,201,202} Somit scheint die N^δ -Methylierung die Affinität zu diesem Enzym im Vergleich zu erhöhen und stellt eine Möglichkeit dar, Selektivität gegenüber den NO-Synthasen zu erzielen.

Weitere Modifikationen an der N^δ -Position wären interessant, um zu untersuchen, ob tatsächlich eine hydrophobe Kavität erreicht wird und alternative Reste die Affinität weiter erhöhen können. Das um eine Methylene-Gruppe verkürzte N^ω -Hydroxy-*nor*-L-arginin (s. Abb. 1-6) ist mit einem K_i -Wert von 0,5 μM unter physiologischen Bedingungen der beste bekannte Arginase-Inhibitor und um den Faktor 60-80 potenter als NOHA. Es wäre daher interessant, N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**) ebenso um eine Methylene-Gruppe zu verkürzen und eine ähnliche Erhöhung der Hemmwirkung zu erreichen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die postulierte physiologische Bedeutung von N^δ -Methyl-L-arginin – zumindest im NO-generierenden System – nicht gegeben zu sein scheint. Die Untersuchungen im Arbeitskreis konnten keine entscheidenden regulativen Zusammenhänge der N^δ -methylierten Arginin-Derivate mit den NOSs, der DDAH und Arginase aufzeigen. N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin stellt allerdings eine neue potenzielle Leitstruktur zur Entwicklung selektiver Arginase-Inhibitoren dar.

3.2 SYNTHESE NEUER HEMMSTOFFE DER DDAH

3.2.1 Einleitung

Wie schon in Kap. 1.1.3.2 angedeutet, sind vergleichsweise wenige potente Inhibitoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) beschrieben:

Aus der Klasse der Indolthioarbitursäuren, die Hartzoulakis *et al.* [2007] anhand der Kristallstruktur der *Pa*DDAH über ein virtuelles Screening entwickelt haben,¹¹⁷ wurden die potentesten Kandidaten (u.a. SR445, s. Abb. 1-8) im Arbeitskreis getestet. An der humanen DDAH konnte jedoch von Kotthaus keine Hemmwirkung festgestellt werden, so dass hier offensichtlich eine speziesspezifische Stoffklasse vorliegt.¹⁴⁸ Die Pentafluorphenylsulfonate wurden auch als Hemmstoffe der *Pa*DDAH entwickelt ($IC_{50} = 16 \mu M$), sind aber nicht selektiv.²⁰³

Rossiter *et al.* [2005] haben einige Arginin-Derivate synthetisiert, die Substrat-basierte kompetitive Hemmstoffe darstellen.¹¹⁵ Der potenteste Vertreter ist dabei N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257, **37b**) mit einem K_i -Wert von $13 \pm 2 \mu M$ (Daten von Kotthaus).

Neben der Kristallstruktur der *Pa*DDAH sind mittlerweile die der bovinen und humanen DDAH veröffentlicht worden.^{78,199,200} Aus der Struktur der bovinen DDAH mit gebundenem L-Citrullin geht hervor, dass die α -Aminosäure-Funktion mit insgesamt sechs Wasserstoffbrücken einen wichtigen Beitrag zur Bindung im aktiven Zentrum liefert. Ebenso werden Wasserstoffbrücken vom N^{δ} -Atom und der freien Amino-Gruppe (N^{ω} -Atom) ausgebildet. Vergleichbar bindet L-Citrullin in der humanen DDAH. Auch L-257 (**37b**) wurde mit der humanen DDAH kokristallisiert, erfährt jedoch im aktiven Zentrum eine andere Orientierung als L-Citrullin (s. Abb. 3-12). Der N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-Rest scheint eine Kavität in der Guanidin-Bindungsregion zu erreichen, die offensichtlich einen so wichtigen Beitrag zur Bindung leistet, dass das Molekül sich im aktiven Zentrum leicht dreht, das Arginin 144 verschiebt und damit dessen Interaktion mit der Carboxy-Funktion von L-257 beeinträchtigt oder sogar verhindert.

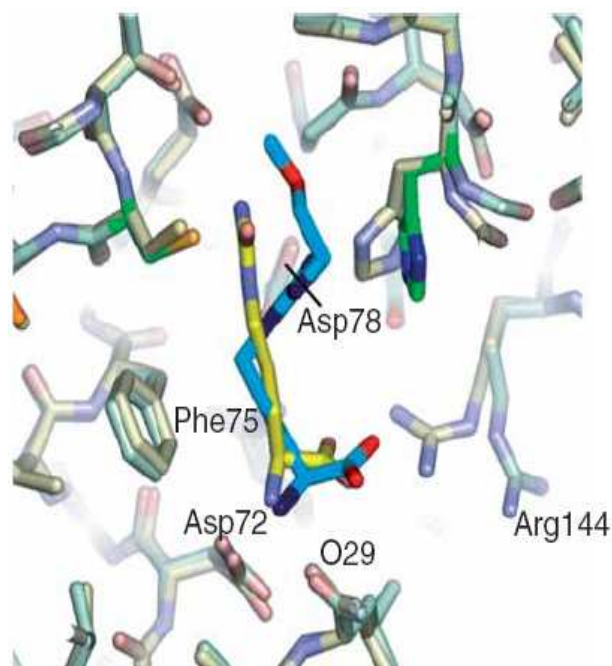


Abbildung 3-12: Kristallstruktur der humanen DDAH-1 mit L-Citrullin (gelb) und N^ω -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257, **37b**) (blau) im aktiven Zentrum (mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd.).⁷⁸

Auf der Suche nach neuen potenziellen Leitstrukturen hat Kotthaus eine größere Anzahl an Substanzen gescreent und neben einigen einfachen Guanidinen und Amidinen auch solche auf Aminosäure-Basis an der DDAH untersucht. Dabei hat er N^δ -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-L-NIO, **25**) – einen literaturbekannten NOS-Hemmstoff – mit einem K_i -Wert von $2 \pm 1 \mu\text{M}$ als den bisher potentesten Inhibitor der DDAH identifizieren können. Auch andere Alkenyl-Amidine dieser Reihe zeigten gute Hemmeigenschaften.¹⁴⁸

Aus diesen Daten können die folgenden Schlüsse gezogen werden:

- Ein N^ω -Atom und das N^δ -Atom müssen unsubstituiert bleiben.
- Die α -Aminosäure-Funktion ist sehr wichtig für eine Affinität. Sie könnte aber, aufgrund der veränderten Orientierung von L-257 im aktiven Zentrum, evtl. nicht mehr essenziell für Guanidine mit 2-Methoxyethyl-Gruppe sein.

- In Hinblick auf die starke Hemmwirkung von Vinyl-L-NIO und Analoga, scheinen Alkenyl-Reste ebenso gut oder sogar besser in der Guanidin-Bindungstasche der DDAH akzeptiert zu werden.

Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer DDAH-Hemmstoffe, die in dieser Arbeit synthetisiert werden sollten. In Abbildung 3-13 sind die angedachten Modifikationen zusammengefasst.

- So sollten mit **25** als Leitstruktur verschiedene N^{ω} -Alken(in)yl-Reste an Stelle des 2-Methoxyethyl-Restes von L-257 gesetzt werden.
- Mit L-257 (**37b**) als Leitstruktur sollte nach alternativen N^{ω} -Alkyl-Resten ähnlicher Größe gesucht werden.
- Eine Reihe weiterer Guanidine sollte synthetisiert werden, bei denen der 2-Methoxyethyl-Rest erhalten bleibt und die Aminosäure-Kette von **37b** variiert wird. Es galt zu klären, welche Wechselwirkungen der Aminosäure-Funktion im aktiven Zentrum der DDAH entscheidend sind.

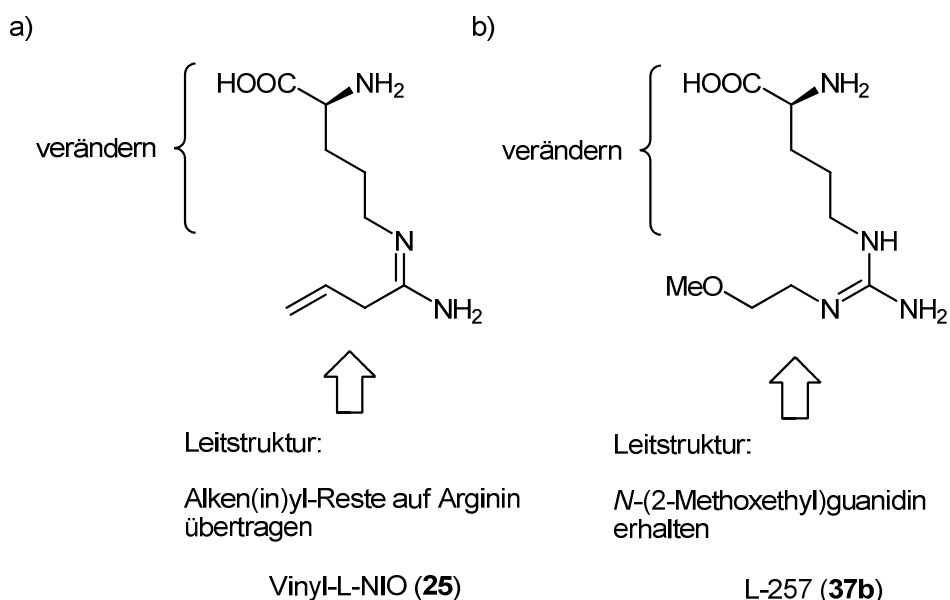


Abbildung 3-13: Inhibitor-Optimierung mit Vinyl-L-NIO (**25**) und L-257 (**37b**) als Leitstrukturen.

3.2.2 Synthesestrategien

In der Literatur sind einige Guanidin-Synthesen beschrieben, die verschiedenste Guanylierungs-Reagenzien ausnutzen: Thioharnstoffe, Isothioharnstoffe, Pyrazol-1-carboxamidine, Di(benzotriazol-1-yl)methanimine, Cyanamide oder Carbodiimide und viele mehr.^{204,205} Für die Synthese von N^{δ} -Methyl-L-arginin (**1**) wurde in dieser Arbeit bereits N,N' -Bis(*t*-butyloxycarbonyl)thioharnstoff für den Aufbau der Guanidin-Funktion eingesetzt (s. Kap. 3.1.5).

Einige literaturbekannte N^{ω} -substituierte L-Arginin-Derivate sind kommerziell nicht erhältlich gewesen, passten allerdings sehr gut in das Konzept der geplanten Leitstruktur-Optimierung:

N^{ω} -Propargyl-L-arginin (**37e**) wurde von Fast *et al.* [1997] ausgehend vom geschützten Cyanamid **26** mit Propargylamin in einer Ausbeute von knapp 3 % dargestellt, wobei die Guanidin-Funktion in 32 %-iger Ausbeute aufgebaut werden konnte (s. Abb. 3-14).²⁰⁶ Die mäßige Ausbeute in diesem Schritt als auch die sehr lange Reaktionszeit von ca. fünf Tagen machen deutlich, dass Cyanamide nicht das ideale Ausgangsmaterial sind, um unsymmetrisch-substituierte Guanidine schnell und effizient aufzubauen. Dies deckt sich mit ähnlichen Ergebnissen bei den ersten eigenen Versuchen der Darstellung von N^{ω} -Methoxy-L-arginin (**37a**) (vgl. Kap. 3.3.3.1).

N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L257, **37b**) wurde von Rossiter *et al.* [2005] mittels N,N' -Bis-Boc- N -(2-methoxyethyl)-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (**28**) als Guanylierungs-Reagenz dargestellt (s. Abb. 3-14).¹¹⁵ Neben der mäßigen Gesamtausbeute von 44 % ist v.a. nachteilig, dass bei dieser Strategie für verschiedene N^{ω} -substituierte Arginine jeweils die entsprechenden Boc-geschützten Pyrazol-1-carboxamidine über eine Mitsunobu-Reaktion dargestellt werden müssen.

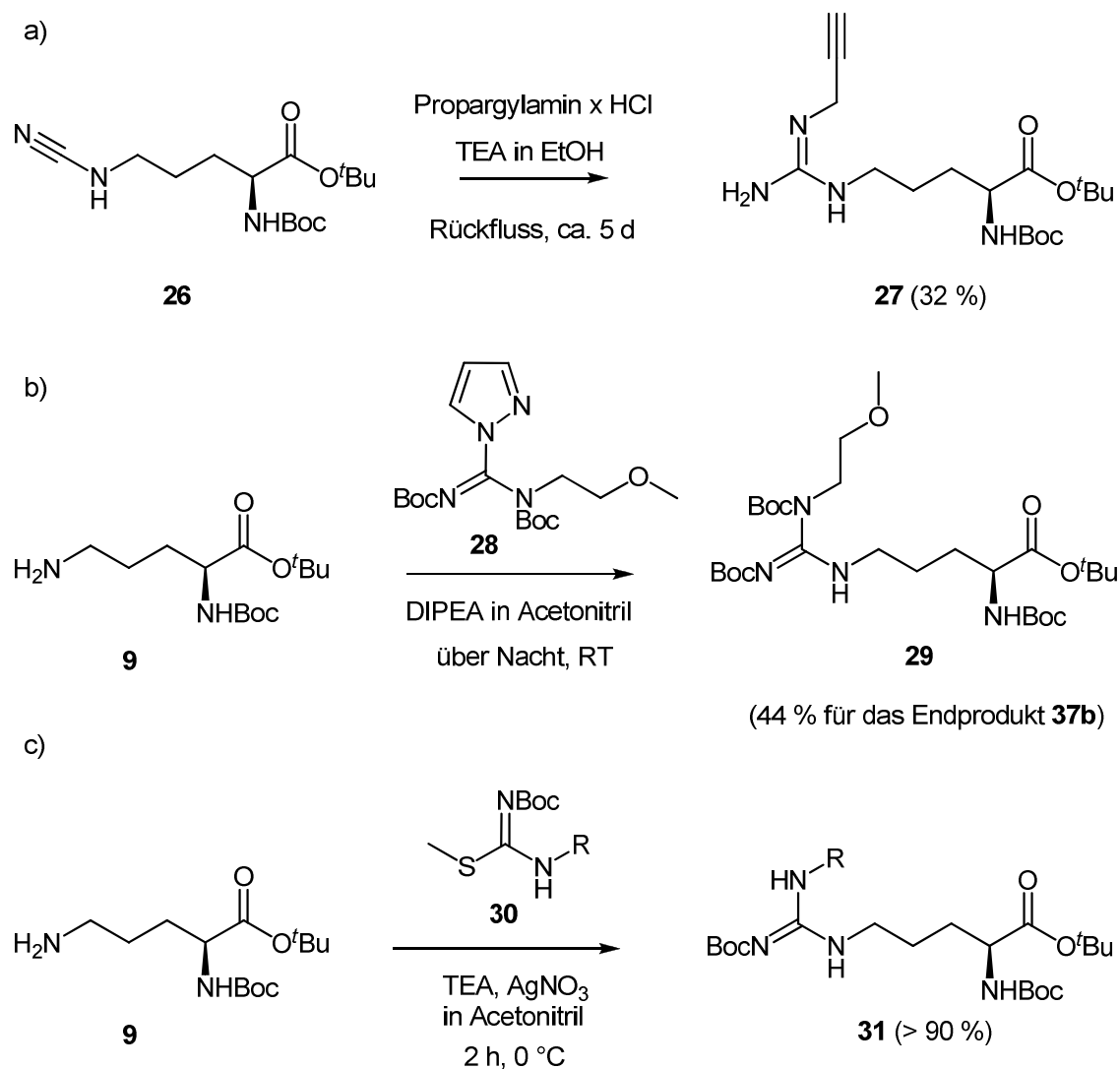


Abbildung 3-14: Aufbau der Guanidin-Funktion in Synthesen literaturbekannter N^0 -substituierter L-Arginin-Derivate. a) Cyanamid-basierte Strategie;²⁰⁶ b) Pyrazol-1-carboxamidin **28** als Guanylierungs-Reagenz;¹¹⁵ c) S-Methylisothioharnstoffe **30** als Guanylierungs-Reagenzien²⁰⁷

Chen *et al.* [1998] haben für die Synthese einer Reihe N^0 -substituierter L-Arginine *N*-Alkyl(Aryl)-*N'*-Boc-S-methylisothioharnstoffe (**30**) als Guanylierungs-Reagenzien verwendet (s. Abb. 3-14). Diese mussten über drei Schritte ausgehend von den entsprechenden *N*-Alkyl(Aryl)isothiocyanaten dargestellt werden.²⁰⁷ Neben der aufwendigen Darstellung der Reagenzien ist dieser Ansatz v.a. durch die begrenzte Verfügbarkeit kommerziell erhältlicher Isothiocyanate begrenzt.

Bei den eigenen Synthesen sollte vermieden werden, dass zunächst viele verschiedene, über mehrere Stufen passend modifizierte Guanilyierungs-Reagenzien hergestellt werden müssen. Vielmehr erschien es effizienter, den N^0 -Rest mit den entsprechenden kommerziell verfügbaren Aminen über eine gemeinsame Zwischenstufe einzuführen. Außerdem sollte die Aufarbeitung der Guanidine möglichst einfach gestaltet werden, indem sie bis zum letzten Schritt der Synthesesequenz Carbamoyl-geschützt und damit wenig basisch vorliegen.

Linton *et al.* [2000] haben mit Carbamoylthioharnstoffen (**33**), die mit einem Amin in Gegenwart von *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDCI) als Entschwefelungsreagenz zu Guanidinen umgesetzt werden, einen sehr effizienten Weg gefunden, hochsubstituierte Guanidine (**34**) schnell und einfach aufzubauen (s. Abb. 3-15).²⁰⁸ Dieses Konzept wurde bereits von Martin *et al.* für verschiedene Hydroxyguanidine und N^0 -Amino-L-arginine angewandt, während die vorliegende Arbeit angefertigt wurde.^{209,210}

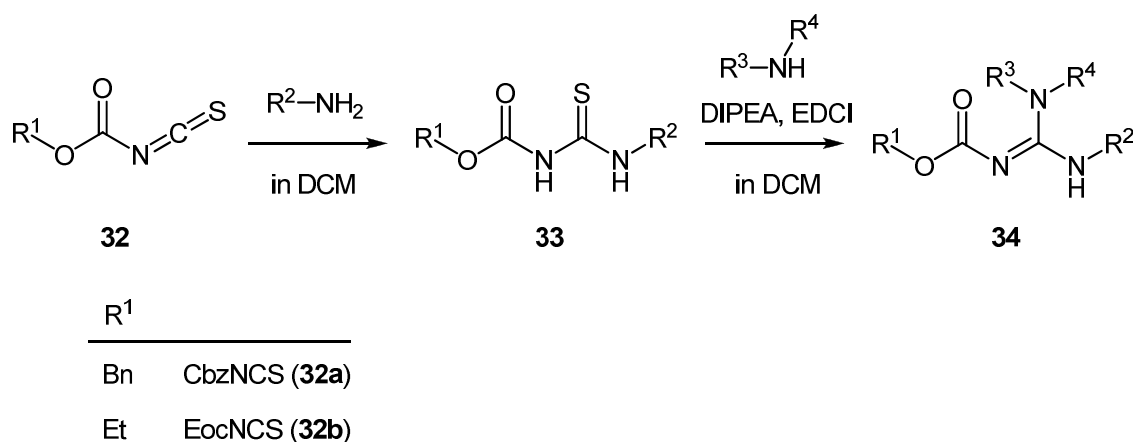


Abbildung 3-15: Synthese von hochsubstituierten Carbamoylguanidinen (**34**) nach Linton *et al.*²⁰⁸ CbzNCS (**32a**), Benzyloxycarbonylisothiocyanat; EocNCS (**32b**), Ethoxycarbonylisothiocyanat

3.2.3 N^{ω} -substituierte L-Arginin-Analoga

In Anlehnung an die Vorschrift von Linton *et al.* erfolgte zunächst die Synthese des Cbz-geschützten Thioharnstoffs **35** als zentrale Zwischenstufe für alle N^{ω} -substituierten Arginine.²⁰⁸ Dafür wurde das Isothiocyanat **32a** benötigt, welches aus Chlorameisensäurebenzylester und Kaliumisothiocyanat mit 18-Krone-6 als Katalysator in Perchlorethylen nach Literatur dargestellt werden konnte.²⁰⁹ Das Rohprodukt war zu ca. 90-95 % rein (NMR), wurde als 0,5 M Vorratslösung in Dichlormethan im Kühlschrank gelagert und in dieser Form eingesetzt.

Die anschließende Umsetzung mit verschiedensten Aminen (1,5 Äquivalente), EDCI als Entschwefelungsreagenz und DIPEA als Hilfsbase (beide 1,5 Äquivalente) erfolgte über Nacht in Dichlormethan in nahezu quantitativer Ausbeute (s. Abb. 3-16). Lediglich **36f** erforderte die weitere Zugabe von Amin (β -Alaninamid) nach Rühren über Nacht, wahrscheinlich aufgrund der schlechteren Löslichkeit in Dichlormethan, verglichen mit den anderen eingesetzten Aminen. Der Überschuss Amin sowie EDCI und DIPEA konnten größtenteils durch Ausschütteln mit verdünnter Salzsäure entfernt werden, ohne dass die vollständig geschützten Arginine **36a-i** in die wässrige Phase überführt wurden. Trotzdem wurden diese Vorstufen noch einmal säulenchromatographisch aufgearbeitet und analysenrein gewonnen.

In Anlehnung an die von Kiso *et al.* [1980] beschriebene *N*-Benzyloxycarbonyl-Deprotektion mit einem Trifluoressigsäure-Thioanisol-Gemisch wurden die Arginine **36** für 30 min bei Raumtemperatur gerührt.^{209,211} Die freien Aminosäuren **37a-i** konnten im Anschluss mittels Flashchromatographie über eine RP-18-Säule in hoher Reinheit (> 99 %) als Trifluoracetate gewonnen werden (s. Tab. 3-2). Lediglich **37f** fiel in niedrigerer Reinheit (96 %) an, was allerdings für die ersten orientierenden *in vitro*-Testungen akzeptabel war.

Im Vergleich mit den literaturbekannten Synthesen solcher N^{ω} -substituierter L-Arginine stellen v.a. die sehr guten Ausbeuten eine deutliche Optimierung dar. In Tabelle 3-2 sind die Gesamtausbeuten und Reinheit der in dieser Arbeit synthetisierten N^{ω} -alkylierten L-Arginine zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Gesamtausbeuten und Reinheit der *N*^ω-substituierten L-Arginine (**37**)

Verbindung (37)	Gesamtausbeute (%) ^a	Reinheit (%) ^b
a	87 (29 ¹⁷⁸) ^c	99,2
b	89 (44 ¹¹⁵)	99,6
c	87 (70 ²¹² , 86 ²⁰⁷)	99,4
d	89	99,5
e	85 (3 ²⁰⁶)	99,5
f	81	96,0
g	88	99,4
h	82	99,6
i	90	99,6

^a In Klammern sind Literaturausbeuten aus alternativen Synthesewegen angegeben. ^b Reinheitsbestimmung mittels RP-HPLC (*o*-PA-Vorsäulenderivatisierung, ± 0,1 %);^{148,213} Auch die HPLC-Analytik auf chiraler stationärer Phase (Crownpak Cr(+)-Säule, s. Kap. 4.2.2) bestätigte diese Reinheiten; Generell ist die Elementaranalyse solcher hygroskopischer Substanzen schwierig, so dass hochauflösende Massenspektren von **37a-i** aufgenommen wurden. ^c Die Ausbeute von 29 % war unter den Bedingungen von Wagenaar und Kerwin nicht reproduzierbar (vgl. Kap. 3.3.3.1).

Die optische Reinheit der synthetisierten Arginine **37a-i** wurde mittels HPLC auf einer Crownpak Cr(+)-Säule untersucht, wobei für alle Verbindungen ein L-Enantiomerenüberschuss von 99,9 % (± 0,1 %) ermittelt wurde (vgl. Kap. 4.2.2). Es besteht mit den gewählten Reaktionsbedingungen dieser Synthesesequenz folglich keine Gefahr der Racemisierung.

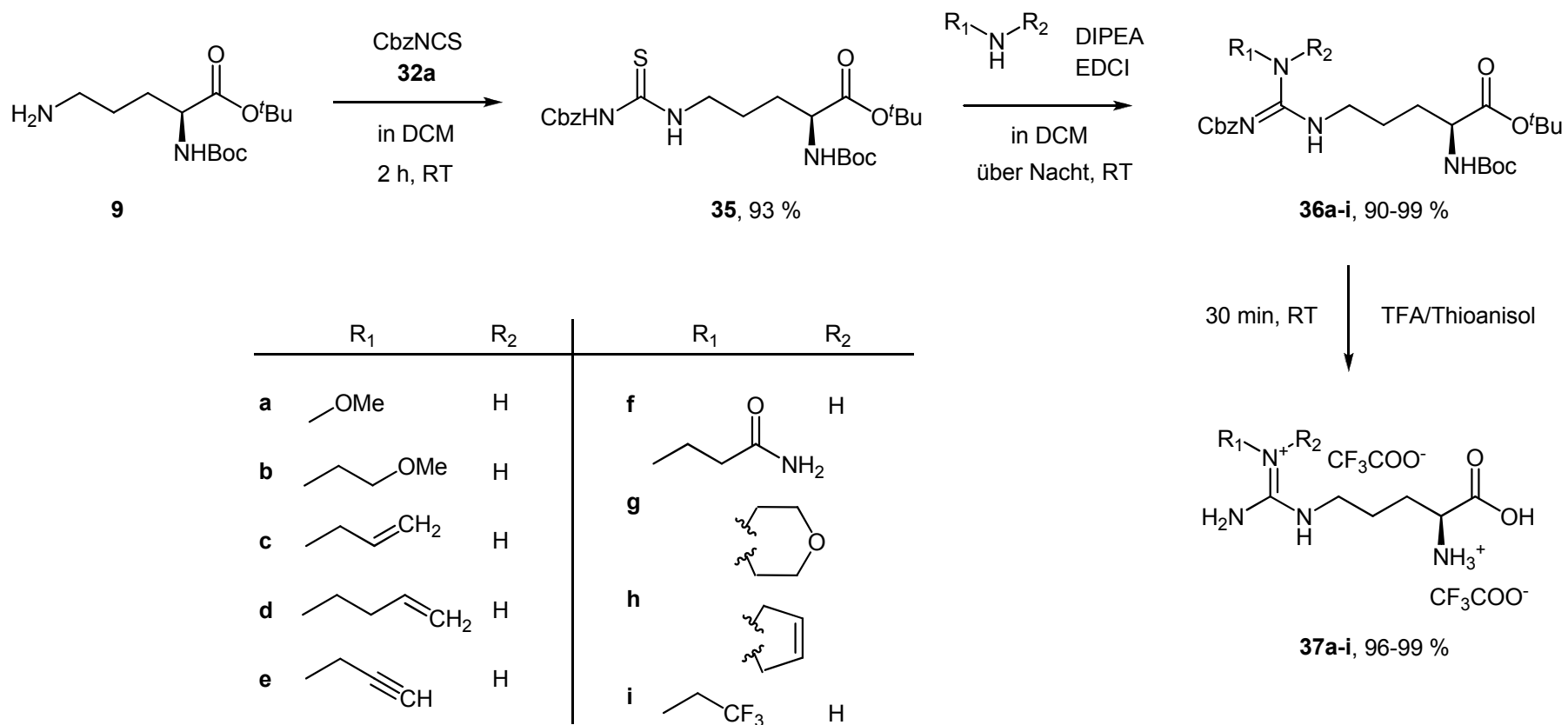


Abbildung 3-16: Synthese von N^{ω} -alkylierten L-Arginin-Derivaten (**37**). CbzNCS (**32a**), Benzyloxycarbonylisothiocyanat

3.2.4 N-(2-Methoxyethyl)-basierte Guanidine

Zur Darstellung unterschiedlicher Guanidine mit 2-Methoxyethyl-Rest wurde prinzipiell der gleiche Syntheseweg wie für die N^{ω} -substituierten Arginine angewandt.

Als zentrale Ausgangsverbindung wurde zunächst der Thioharnstoff **39** ausgehend von 2-Methoxyethylamin **38** dargestellt (s. Abb. 3-17). Durch Umsetzung mit den jeweiligen Aminen konnten die geschützten Guanidine **40** in sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Die benötigten Amine zur Darstellung von **40a,b** wurden so gewählt, dass ihre 4-Carboxy-Funktion als Benzylester, bzw. die 4-Amino-Funktion als Boc-Amin vorlagen.

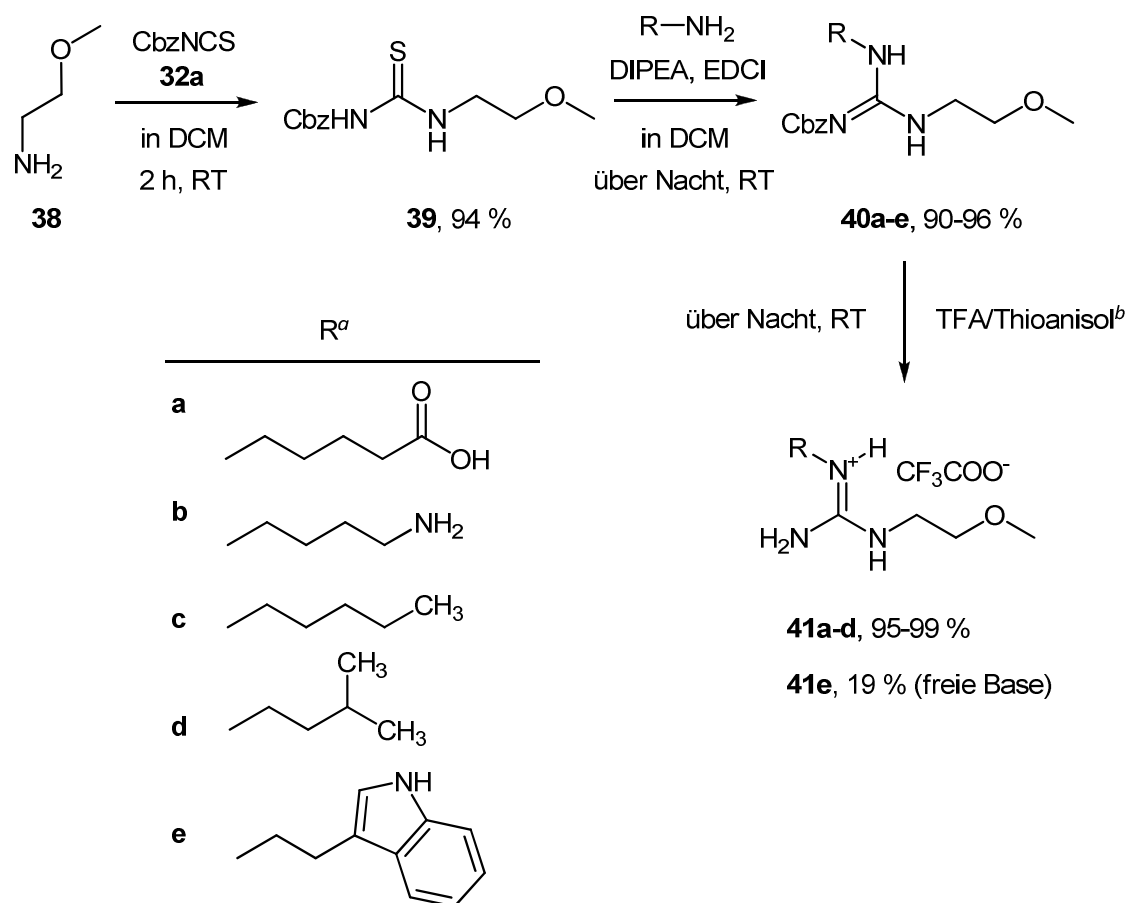


Abbildung 3-17: Synthese von 2-Methoxyethyl-substituierten Guanidinen (**41**). ^a In **40a** als Benzylester, in **40b** als Boc-Amin; ^b Für die Deprotektion von **40e**: H₂/Pd-C, 3 bar, 3 Tage

So konnten sie zusammen mit den Cbz-Gruppen mit dem bewährten TFA-Thioanisol-Gemisch im nächsten Schritt abgespalten werden. Einzig **41e** wurde auf diesem Weg nicht erhalten, zumindest nicht in analysenreiner Form. Daher wurde hier die

Cbz-Gruppe hydrogenolytisch entfernt, indem **40e** einige Tage mit H₂/Pd-C in Methanol hydriert wurde.

Nach extraktiver Aufarbeitung folgte die chromatographische Reinigung der Guanidine **41a-e**. Insbesondere **41a** und **41e** waren wegen mangelnder Möglichkeiten der Visualisierung auf DC-Platten schwer aufzuarbeiten. Während **41b** sehr gut mit dem Ninhydrin-Reagenz zu sehen war und **41c,d** eine sehr gute Dragendorff-Reaktion zeigten, ließ sich **41a** so nicht anfärben. Es wurde letztendlich mit einem 0,1 % TFA_(aq)/Methanol-Stufengradient auf Umkehrphase ohne Visualisierung aufgearbeitet, indem, vergleichbar mit den Aminosäuren **37a-i**, von einer sehr frühen Elution ausgegangen wurde. Fraktionen zwischen Totvolumen der Säule und Auftreten der ersten Verunreinigung (= Spaltprodukt aus Cbz-Deprotektion) wurden gepoolt und enthielten das Produkt **41a**.

Verbindung **41e** wurde schließlich auch auf Umkehrphase gereinigt, indem ein Wasser/Methanol-Stufengradient verwendet wurde. UV-Löschung durch **41e** war nur in stark konzentrierten Proben zu beobachten, wodurch die Verlaufskontrolle der präparativen Chromatographie nicht möglich war. Schwach anfärben ließ es sich allerdings mit dem Dragendorff-Reagenz.

Problemlos ließen sich **41c,d** über Kieselgel aufreinigen sowie **41b** auf Umkehrphase mit 0,1 %-iger TFA in Wasser als Fließmittel.

3.2.5 Amidin-basierte L-Arginin-Analoga

Pinner [1892] hat in seinen Arbeiten eine Reihe Imidoester (Imidate) ausgehend von Nitrilen synthetisiert und unter anderem zur Darstellung von Amidinen eingesetzt.²¹⁴ Unter den vielen synthetischen Möglichkeiten Amidine zu erhalten,²¹⁵ ist dies eine in der Literatur häufig angewandte, wie z.B. für die Synthese von Vinyl-L-NIO und analogen Verbindungen.^{216,217}

In Anlehnung an diese Synthesen sollte ein decarboxyliertes Vinyl-L-NIO-Derivat **45** synthetisiert werden, um die Bedeutung der Carboxy-Funktion für die Affinität zur DDAH untersuchen zu können.

Die Darstellung des Imidates **43** erfolgte in Anlehnung an die Literatur, indem Allylcyanid mit 2 Äquivalenten Methanol unter HCl-Begasung umgesetzt wurde.^{217,218}

Es war wichtig, die Reaktion in einer Argon-Atmosphäre durchzuführen und diese zu gewährleisten, bis das Produkt mit Ether ausgefällt wird. So konnte **43** in 90 %-iger Ausbeute erhalten werden und wurde im Kühlschrank unter Argon gelagert.

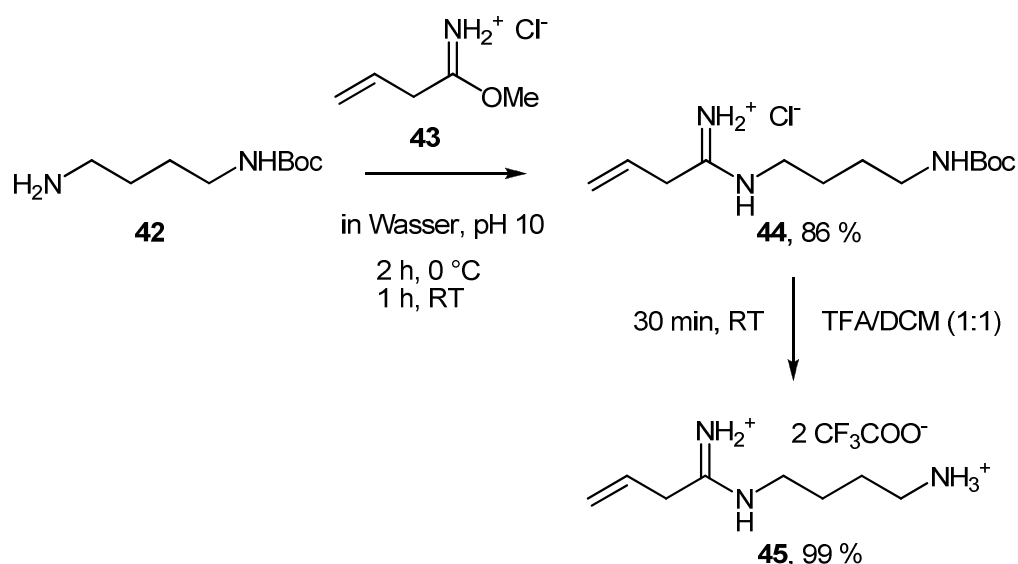


Abbildung 3-18: Synthese von *N*-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin (**45**), einem decarboxylierten Derivat von Vinyl-L-NIO (**25**).

Zum Aufbau der Amidin-Funktion wurde das Imidat **43** in dreifachem Überschuss mit Amin **42** bei pH 10 umgesetzt (s. Abb. 3-18). Das geschützte Intermediat **44** konnte mittels Säulenchromatographie über Kieselgel unter Verwendung eines Ethylacetat/Methanol-Gradienten aufgereinigt werden. Die abschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte quantitativ und das Endprodukt **45** wurde über Umkehrphase gesäult.

3.2.6 Zusammenfassung

Für die Leitstruktur-Optimierung der beiden potentesten derzeit bekannten DDAH-Hemmstoffe sollte eine Reihe bekannter und neuer N^{ω} -substituierter L-Arginine sowie diverse unsymmetrisch-substituierte Guanidine synthetisiert werden.

In der Literatur sind viele Möglichkeiten zur Darstellung von Guanidinen beschrieben, die entweder nur geringe Ausbeuten liefern oder die mehrstufige Synthese spezieller Guanylierungs-Reagenzien erfordern. In dieser Arbeit wurde ein von Linton *et al.* beschriebenes Konzept auf die eigenen Substanzen übertragen.²⁰⁸ Dabei lieferte die Umsetzung von Carbamoylthioharnstoffen mit verschiedensten Aminen, in Gegenwart von EDCI als Entschwefelungsreagenz, eine ganze Reihe unsymmetrisch-substituierter Guanidine (**37a-i**, **41a-e**) in sehr guten Ausbeuten. In Bezug auf die N^{ω} -substituierten L-Arginine konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die gewählten Reaktionsbedingungen kein Racemisierungsrisiko beinhalten.

Auch die Aufarbeitung der meisten erhaltenen Guanidin-Salze war unproblematisch, da sie bereits in hoher Reinheit anfielen und mittels Flashchromatographie – ähnlich einer Filtration – über Umkehrphase schnell aufgereinigt werden konnten.

3.2.7 Testergebnisse

In Anlehnung an die Leitstrukturen N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257, **37b**) und N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-L-NIO, **25**), das im Arbeitskreis als bislang potentester Inhibitor der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) identifiziert wurde, sollten eine Reihe weiterer Arginine, einfacher Guanidine und Amidine synthetisiert und von Kotthaus getestet werden (vgl. Tabelle 3-3).¹⁴⁸

- Aus der Reihe N^{ω} -substituierter L-Arginine zeigten besonders die Alken(in)yl-substituierten Verbindungen eine gute Hemmwirkung:

N^{ω} -Propargyl-L-Arginin (**37e**, $K_i = 17 \pm 5 \mu\text{M}$) ist sogar vergleichbar potent wie L-257 (**37b**, $K_i = 13 \pm 2 \mu\text{M}$). Eine Mehrfachbindung scheint besonders wichtig für die Affinität zu sein, da die Hemmwirkung in der Reihenfolge Propyl<Allyl<Propargyl (**Propyl-Arg**<**37c**<**37e**) zunimmt.

Die Wichtigkeit von Größe und Rotationsfreiheit der N^{ω} -Substituenten wird deutlich, wenn man die schlechte Hemmung der Morpholinyl- (**37g**, als 2-Methoxyethyl-Analogon) und Pyrrolinyl- (**37h**, als Allyl-Analogon) substituierten Arginine berücksichtigt.

Eine Substitution mit alternativen Resten, wie z.B. 2,2,2-Trifluorethyl- (**37i**) oder (2-Carbamoyl)ethyl- (**37f**), verschlechterte die Hemmwirkung, so dass offensichtlich hydrophobe Wechselwirkungen oder zusätzliche Wasserstoffbrücken keinen Beitrag zur Bindung leisten.

- Mit der Reihe der 2-Methoxyethyl-substituierten Guanidine wurde v.a. versucht, die Wichtigkeit der α -Aminosäure-Funktion zu untersuchen:

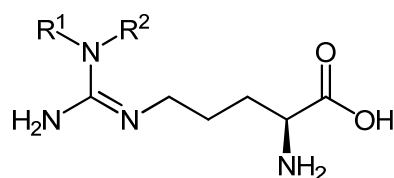
N-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin (**41b**) ist erstaunlicherweise mit einem K_i -Wert von $18 \pm 6 \mu\text{M}$ noch beinahe so potent wie sein Aminosäure-Derivat L-257 (**37b**). Die in Kap. 3.2.1 beschriebene Annahme, dass durch die spezielle Anordnung im aktiven Zentrum Arg 144 so weit verschoben wird, dass keine Interaktion mit der Carboxy-Funktion von L-257 mehr möglich ist, scheint hiermit bestätigt. Auf die Amino-Funktion kann allerdings nicht verzichtet werden, wie die Hemmdaten von **41a**, **41c** und **41d** verdeutlichen. Ein erster Versuch, mit dem Indol-Derivat **41e** die essenzielle 4-Aminobutyl-Kette zu imitieren und gleichzeitig weitere Wechselwirkungen des Aromaten auszunutzen, war nicht erfolgreich.

- Die Ergebnisse von **41b** sollten weiterhin auf Vinyl-L-NIO (**25**) übertragen werden und somit ein entsprechend decarboxyliertes Derivat untersucht werden:

Die schlechte Hemmwirkung von *N*-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin (**45**) war zunächst überraschend, da mit einem ähnlichen Anstieg des K_i -Wertes (ca. Faktor 1,5) gerechnet wurde, wie es bei L-257 (**37b**) und **41b** der Fall war. Eine Erklärung dafür wäre, dass sich **45** (sowie Vinyl-L-NIO) ebenso im aktiven Zentrum anlagert wie L-Citrullin und damit der Wegfall der Wasserstoffbrücken, die von der Carboxy-Funktion ausgingen, den Aktivitätsverlust ausmacht.

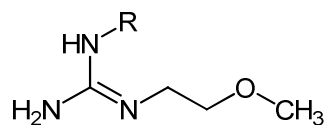
Tabelle 3-3: Zusammenfassende Übersicht der Hemmdaten aus *in vitro*-Testungen mit der humanen DDAH-1. Diese Experimente wurden von Kotthaus durchgeführt.¹⁴⁸ Hemmungen bei 1 mM sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens vier separaten Experimenten, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmung von IC_{50} - und K_i -Werten wurde mindestens doppelt durchgeführt. n. b. = nicht bestimmt; # = kommerziell bezogene Testsubstanz

N^0 -substituierte L-Arginine



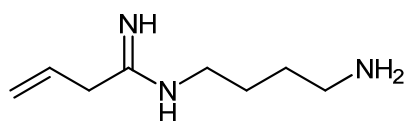
Verbindung	R^1	R^2	Hemmung		
			bei 1 mM (%)	IC_{50} (μM)	K_i (μM)
L-257, 37b		H	89 \pm 2	29 \pm 7	13 \pm 2
37e		H	83 \pm 7	55 \pm 8	17 \pm 5
37d		H	71 \pm 3	189 \pm 10	57 \pm 9
37c		H	70 \pm 3	207 \pm 10	58 \pm 9
Propyl-Arg [#]		H	60 \pm 6	283 \pm 12	90 \pm 5
37f		H	43 \pm 2	n. b.	n. b.
37i		H	41 \pm 1	n. b.	n. b.
37g			23 \pm 3	n. b.	n. b.
37h			10 \pm 4	n. b.	n. b.
Nitro-Arg [#]		H	6 \pm 4	n. b.	n. b.

2-Methoxyethyl-substituierte Guanidine

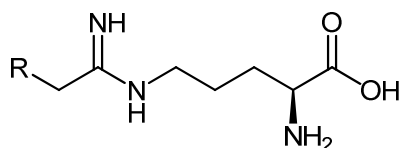


Verbindung	R	Hemmung bei 1 mM (%)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
41b		80 ± 5	70 ± 16	18 ± 6
41a		42 ± 6	n. b.	n. b.
41d		25 ± 6	n. b.	n. b.
41e		19 ± 3	n. b.	n. b.
41c		11 ± 9	n. b.	n. b.

Vinyl-L-NIO (25)-Derivate



Verbindung	Hemmung bei 1 mM (%)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
45	40 ± 6	n. b.	n. b.



Verbindung	R	Hemmung bei 1 mM (%)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
Vinyl-L-NIO (25) [#]		97 ± 3	13 ± 3	2 ± 1
Ethyl-L-NIO [#]		78 ± 7	70 ± 21	32 ± 6
ENIPO [#]		73 ± 8	79 ± 25	36 ± 3
Methyl-L-NIO [#]		65 ± 8	300 ± 104	145 ± 15
L-NIO [#]	H	24 ± 3	n. b.	n. b.

3.2.8 Ausblick

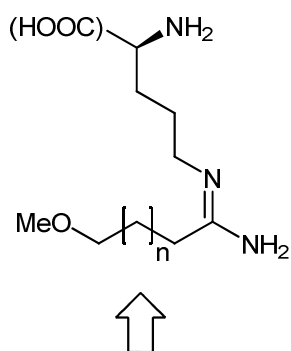
Das Hauptproblem der synthetisierten und im Arbeitskreis getesteten Verbindungen ist, dass die potentesten *N*⁰-substituierten L-Arginine sowie Vinyl-L-NIO-Derivate ebenso die NO-Synthasen zu hemmen vermögen (Daten von Muschick, s. auch Kotthaus).^{148,219} Keine NOS-Hemmung hingegen zeigt *N*⁰-(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257, **37b**) sowie das in dieser Arbeit synthetisierte *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin (**41b**).

Die große Herausforderung wird also sein, die Hemmpotenz zu erhöhen, ohne an Selektivität gegenüber NO-Synthasen zu verlieren:

Der 2-Methoxyethyl-Rest scheint aufgrund seiner Länge diese Selektivität über die Guanidin-Bindungstasche der NOS zu erzielen, welche Reste einer Länge von ca. drei C-Atomen noch toleriert. Damit könnte *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin

(41b) – als "Nicht-Aminosäure" und Kandidat mit besseren Arzneistoffqualitäten – weiter in der 4-Aminobutyl-Kette modifiziert werden, um die Affinität zu erhöhen. Weiterhin könnte versucht werden, in Anlehnung an Vinyl-L-NIO (25) einen Methoxyalkyl-Rest auf diverse Amidine zu übertragen. In Abbildung 3-19 sind diese neuen Leitstrukturen zusammenfassend dargestellt.

a)

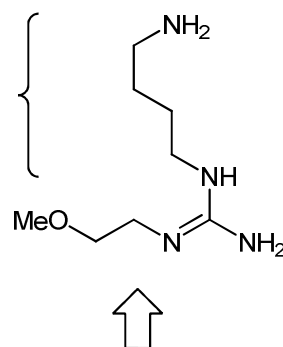


Methoxyalkyl-Reste auf Amidine übertragen

b)

verändern, aber:

Erhalt des Abstands zwischen Guanidin- und Amino-Gruppe!



N-(2-Methoxyethyl)guanidin erhalten

41b

Abbildung 3-19: Vorgeschlagene Optimierung von *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)-guanidin (**41b**) als Leitstruktur eines selektiven DDAH-Hemmstoffs.

3.3 SYNTHESE VON N^{ω} -HYDROXY-L-ARGININ-PRODRUGS

3.3.1 Einleitung

Als natürliches Intermediat der NOS-Katalyse und damit physiologische Quelle von Stickstoffmonoxid, wäre N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA, **5**) ein guter Kandidat zur Behandlung NO-defizienter Erkrankungen. Dabei ist nicht nur die vorrangige Freisetzung von NO durch NO-Synthasen, bevorzugt an dem Ort, an dem es benötigt wird, von Vorteil. Auch die Inhibition von Arginasen, deren erhöhte Aktivität mit endothelialer Dysfunktion assoziiert wird, könnte ausgenutzt werden (vgl. Kap. 2.1.3).

Die Arzneistoffqualität dieser Aminosäure ist allerdings in Hinblick auf Stabilität und pharmakokinetische Eigenschaften optimierungsbedürftig. Folglich sollten in dieser Arbeit verschiedene Prodrugs von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin synthetisiert werden, die vor allem die Hydroxyguanidin-Funktion stabilisieren und passive Diffusionsvorgänge durch Biomembranen ermöglichen. Eine übersichtliche Darstellung denkbarer Modifikationen sowie der Problematik hinsichtlich Stabilität und Pharmakokinetik erfolgte bereits in der Zielsetzung (s. Kap. 2.1.3).

Als allgemeine Vorgehensweise zum Prodrug-Design war zum einen die *O*-Substitution der Hydroxyguanidin-Funktion geplant:

Gemeinsam haben alle angedachten NOHA-Prodrugs, dass sie in der Hydroxyguanidin-Funktion *O*-substituiert werden sollten. Dadurch wird erhofft, v.a. die Empfindlichkeit gegenüber Hydrolyse- und Oxidationsvorgängen zu erniedrigen (vgl. Kap. 1.2.3.2 und Kap. 2.1.3). Konkrete Stabilitätsuntersuchungen mit *O*-substituierten Hydroxyguanidinen existieren bislang nicht. Aus diesem Grund sollten zusätzlich entsprechende einfache Modellverbindungen für Stabilitäts- und Metabolismusstudien synthetisiert werden.

Aus metabolischer Sicht hingegen ist bereits die Reduktion von Hydroxyguanidinen beschrieben (vgl. Kap. 1.2.3.1), die im Sinne eines Prodrug-Designs für Guanidine erwünscht ist. Unerwünscht ist diese Reduktion für das hier interessierende Hydroxyguanidin NOHA, welches als eigentliches "Drug" auf diese Weise inaktiviert

würde. Damit stellt die *N*-Reduktion von NOHA zu Arginin eine Konkurrenzreaktion zur NOS-katalysierten NO-Freisetzung dar. Da Arginin wiederum von den NOSs zu NOHA oxidiert wird, ist es an dieser Stelle schwer einzuschätzen, welche Prozesse *in vivo* dominieren. Durch *O*-Substitution wird in diesem Zusammenhang erhofft, die metabolische Stabilität von NOHA so weit zu erhöhen, dass der *first-pass*-Effekt durch *N*-Reduktion möglichst klein gehalten wird.

Des Weiteren war eine Derivatisierung zu Carbamaten und Estern für eine verbesserte Permeation geplant:

Die Hydroxyguanidin-Funktion sollte neben *O*- auch *N*-substituiert werden, um einerseits eine zusätzliche Stabilisierung zu erzielen und andererseits die Permeationseigenschaften zu verbessern. Ein etablierter Ansatz, die unter physiologischen Bedingungen geladene Carboxy-Funktion einer passiven Diffusion zugänglich zu machen, ist die Veresterung. Carbonsäureester werden in der Regel sehr schnell und effizient nach Absorption durch Esterasen gespalten und damit bioaktiviert. Carbamate werden meist langsamer hydrolysiert und weisen daher eher lange Plasmahalbwertszeiten auf, was insbesondere hinsichtlich einer verlängerten Wirkung interessant ist.²²⁰

Weitere Hintergründe zu der Auswahl, den Eigenschaften, der Bioaktivierung und den erhofften biologischen Effekten bestimmter NOHA-Prodrugs werden in den jeweiligen Kapiteln besprochen.

3.3.2 Synthesestrategien

Nachdem 1987 von Moncada sowie Ignarro herausgefunden wurde, dass es sich bei dem *endothelium-derived relaxing factor* um Stickstoffmonoxid handelt,^{5,6} wurde schnell *N*^ω-Hydroxy-L-arginin als biologische Vorstufe identifiziert.¹⁹

Darauf folgte die erste Synthese dieser Aminosäure von Feldman *et al.* [1991] mit einem Isothioharnstoff als wichtigstem Intermediat in zehn Stufen und 18 % Gesamtausbeute.¹⁸⁶ Wallace und Fukuto [1991] beschrieben eine Sechsstufen-Synthese über ein geschütztes *N*^δ-Cyan-L-ornithin (**26**, Struktur s. Abb. 3-21) in 28 %

Gesamtausbeute. Dieses Konzept wurde von vielen Autoren in den folgenden Jahrzehnten übernommen.

Jirgensons *et al.* [1997] berichteten mit *N*-Benzyloxy-*N'*-Cbz-thioharnstoff (**46**) von einem Reagenz, mit dem man Hydroxyguanidine sehr einfach erhalten soll, indem es mit einem Amin in Gegenwart eines Entschwefelungsreagenzes umgesetzt wird.²²¹ Für die abschließende Abspaltung der Schutzgruppen unter hydrogenolytischen Bedingungen sind jedoch keine detaillierten Vorschriften gegeben. Martin *et al.* [2006] versuchten diesen Ansatz zu übernehmen, hatten jedoch Probleme mit der katalytischen Hydrierung in Form einer quantitativen Reduktion zum Guanidin.²⁰⁹

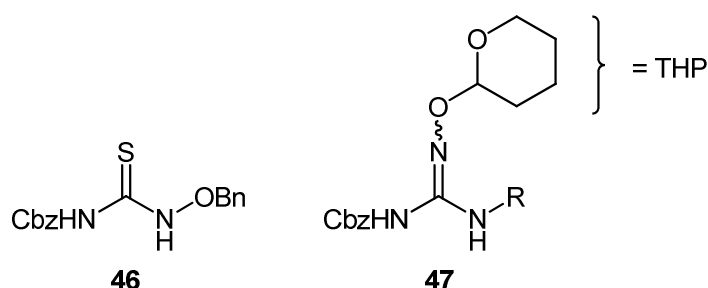


Abbildung 3-20: Literaturbekannte Reagenzien zur Darstellung von Hydroxyguanidinen.

Die Autoren erarbeiteten trotzdem eine signifikante Optimierung der Synthese von Hydroxyguanidinen, indem sie ebenso von Carbamoylthioharnstoffen ausgingen und die erstmalig von Linton *et al.* [2000] vorgestellte Strategie anwendeten (vgl. Kap. 3.2.2).²⁰⁸ *N*-Cbz- und *O*-THP-geschützte Hydroxyguanidine **47** konnten in exzellenten Ausbeuten synthetisiert und quantitativ zu den gewünschten Verbindungen entschützt werden.

Für die eigenen Synthesen sollte dieselbe Strategie genutzt werden, um unterschiedlichste *O*-Substituenten in die Hydroxyguanidin-Funktion von NOHA einzubauen, die im Sinne einer Prodrug-Aktivierung wieder abgespalten werden können.

3.3.3 O-Alkylierte N⁰-Hydroxy-L-arginine

3.3.3.1 O-Methyl-Derivate

Eine Möglichkeit der Stabilisierung von Hydroxyguanidinen, hinsichtlich chemischer sowie metabolischer Stabilität, ist die O-Alkyl-Substitution. Für Amidoxime wurde dieses Konzept bereits mit einigen antiparasitär wirksamen Substanzen umgesetzt (z.B. DB844) und hier von der guten Bioverfügbarkeit berichtet.¹⁴² Einziger Nachteil ist die Involvierung von CYP450-Enzymen für die Bioaktivierung, da damit ein gewisses Interaktionspotenzial mit anderen endogenen und exogenen Substanzen besteht, die durch dieses Enzymsystem metabolisiert werden.

Im Rahmen der ersten Synthesen von NOHA-Prodrugs wurde in dieser Arbeit versucht, ausgehend vom geschützten Cyanamid **26** mit Methoxylamin Hydrochlorid ein O-methyliertes Hydroxyguanidin in Anlehnung an Wagenaar und Kerwin [1993] aufzubauen.¹⁷⁸ Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen mit Triethylamin als Hilfsbase wurde lediglich eine Ausbeute von ca. 40 % erzielt (gegenüber 97 % der Literatur). Durch Verwendung von Kaliumcarbonat konnte die Ausbeute auf 80 % erhöht werden (s. Abb. 3-21).

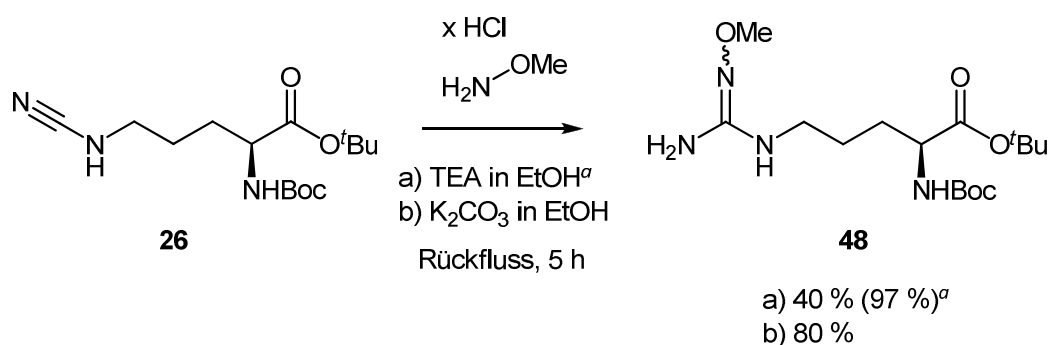


Abbildung 3-21: Erste Versuche der Synthese von N⁰-Methoxy-L-arginin (**37a**) über die "Cyanamid-Guanidin"-Strategie. Cyanamid **26** wurde in Anlehnung an die Literatur dargestellt.¹⁷⁷ $^\alpha$ Literaturbedingungen und -ausbeute¹⁷⁸

Aufgrund der mäßigen Reaktivität von Cyanamiden gegenüber N-Nucleophilen (vgl. Abb. 3-14 und Abb. 3-21) und der begrenzten Möglichkeit, hochsubstituierte Hydroxyguanidine darstellen zu können, wurde auf die in Kap. 3.3.2 angesprochene Strategie zurückgegriffen.

Die erfolgreiche Synthese des freien *N*⁰-Methoxy-L-arginins (**37a**) als einfachstes *O*-methyliertes NOHA-Prodrug wurde bereits in Kap. 3.2.3 (Abb. 3-16) vorgestellt.

Der nächste Schritt zur Erweiterung des Prodrug-Konzepts war die Veresterung mit Ethanol (s. Abb. 3-22). Hierzu wurde eine ethanolische Lösung der Aminosäure **37a** vorsichtig bei -10 °C mit HCl gesättigt, für eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt und zur vollständigen Reaktion über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

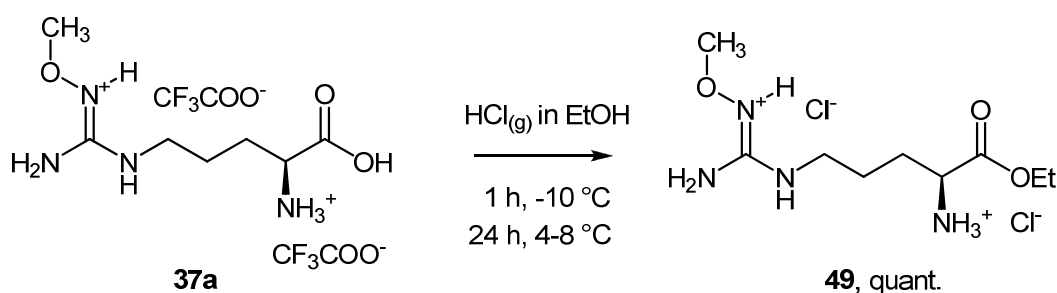


Abbildung 3-22: Veresterung von *N*⁰-Methoxy-L-arginin (**37a**) zum NOHA-Prodrug **49**.

Für die Darstellung einer Reihe *O*-methylierter *N*⁰-Hydroxy-L-arginine mit Carbamoyl-Prodrugstruktur wurde Ethoxycarbonylthiocyanat (EocNCS, **32b**, s. Abb. 3-15) anstelle von CbzNCS (**32a**) als Edukt zur Thioharnstoff-Synthese eingesetzt. Mit dem resultierenden Eoc-Thioharnstoff **50** war somit die Prodrug-Struktur im Molekül enthalten und sollte in den folgenden Schritten erhalten bleiben.

Analog zur Synthese von **36a** war die Umsetzung des Eoc-Thioharnstoffs **50** mit Methoxylamin zu **51** in sehr guten Ausbeuten möglich (s. Abb. 3-23). Das anschließende Entfernen der Aminosäure-Schutzgruppen war kritisch, da saure Reaktionsbedingungen gefordert sind. Unter milden Bedingungen und Ausschluss von Wasser sollte jedoch die Ethoxycarbonyl-Funktion erhalten bleiben. Sehr einfach und in kurzer Zeit wurde eine vollständige Abspaltung zur freien Aminosäure **52**, ohne Beeinträchtigung der Eoc-Gruppe, mit konzentrierter Trifluoressigsäure erreicht.

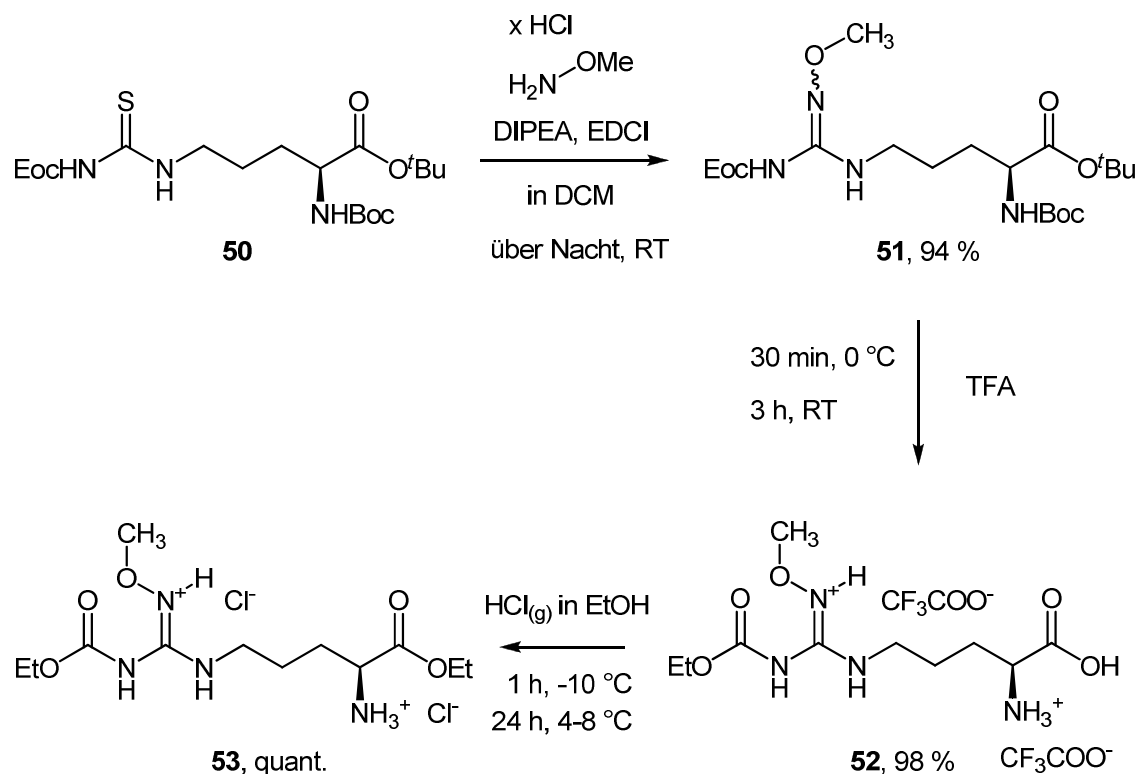


Abbildung 3-23: Synthese verschiedener *O*-methylierter Prodrugs von N^ω -Hydroxy-L-arginin.

Mit dem NOHA-Derivat **52** stand somit zunächst ein Prodrug zur Verfügung, dessen Hydroxyguanidin-Funktion vollständig substituiert ist, welches aber noch die freie Aminosäure-Gruppe aufweist. Durch Veresterung mit Ethanol, unter denselben Bedingungen wie für das einfache N^ω -Methoxy-L-arginin beschrieben, war auch das NOHA-Prodrug **53** zugänglich.

3.3.3.2 *O*-Carboxymethyl-Derivate

Unter Ausnutzung eines neuen Bioaktivierungs-Mechanismus über eine oxidative *O*-Desalkylierung durch die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (vgl. Kap. 2.2 und Kap. 5), sollte eine geeignete Prodrug-Struktur auf N^ω -Hydroxy-L-arginin übertragen werden. In Anlehnung an physiologische Substrate (Peptide), die *N*-carboxymethyliert (Glycin-verlängert) sind, sollte folglich die Hydroxyguanidin-Funktion *O*-carboxymethyliert werden.

Zur Darstellung dieser Verbindungen wurde prinzipiell die gleiche Chemie angewandt, wie für die Prodrugs der *O*-Methyl-Reihe in Kap. 3.3.3.1 beschrieben. So konnte die

Carboxymethyl-Gruppe in die Hydroxyguanidin-Funktion eingebaut werden, indem die Thioharnstoffe **35** oder **50** mit Aminoxyessigsäureestern **54** umgesetzt wurden. Die letzteren sind nicht kommerziell erhältlich und wurden ausgehend von Aminoxyessigsäure durch Veresterung erhalten.

Für die Synthese von N^{ω} -Carboxymethoxy-L-arginin (**56**), als Referenzverbindung für geplante Stabilitäts- und Pharmakokinetikstudien, wurde der Cbz-geschützte Thioharnstoff **35** und Aminoxyessigsäuremethylester **54a** in Gegenwart von EDCI in 92 %-iger Ausbeute erhalten (s. Abb. 3-24). Bei diesen Schutzgruppen wurde davon ausgegangen, dass sie unter den Standardbedingungen mit TFA/Thioanisol (vgl. Abb. 3-16 und Abb. 3-17) abgespalten werden. Jedoch blieb der Methylester selbst nach mehreren Stunden bei 60 °C erhalten. Durch Behandlung mit halbkonzentrierter Salzsäure für fünf Stunden bei 50-60 °C wurden jedoch alle Schutzgruppen abgespalten und **56** nach Aufreinigung über Umkehrphase analysenrein erhalten.

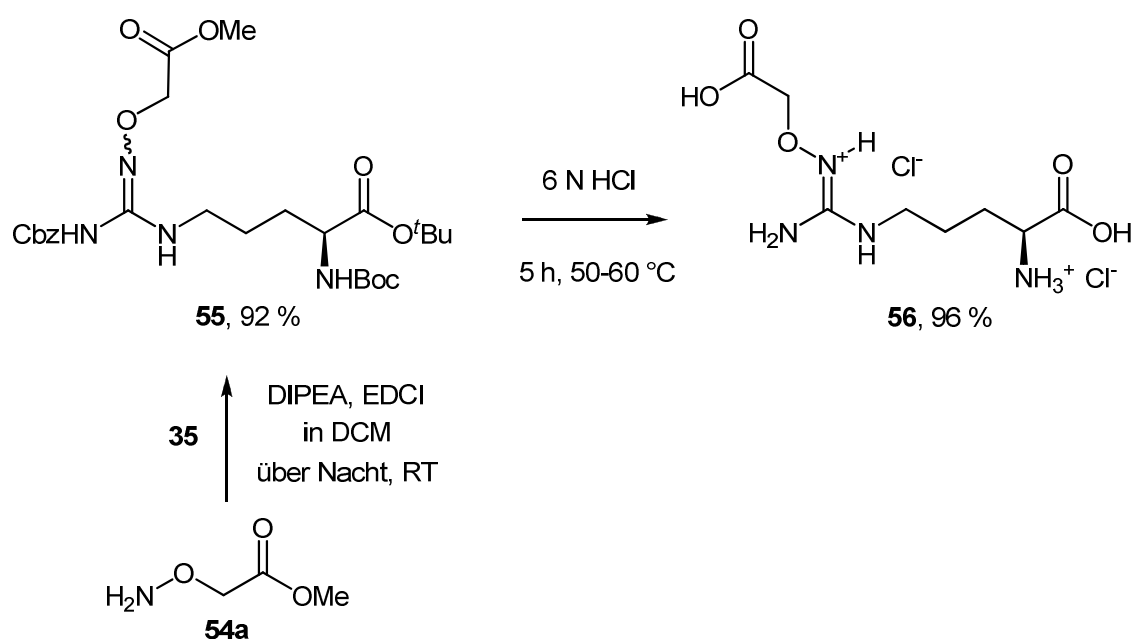


Abbildung 3-24: Synthese von N^{ω} -Carboxymethoxy-L-arginin (**56**) als Referenzverbindung für Stabilitäts- und Metabolismus-Untersuchungen.

Die eigentlichen Prodrugs der *O*-Carboxymethyl-Reihe wurden ausgehend vom Ethoxycarbonyl-geschützten Thioharnstoff **50** synthetisiert und in analoger Weise entschützt sowie verestert (s. Abb. 3-25), wie es für die Derivate der *O*-Methyl-Reihe bereits beschrieben wurde.

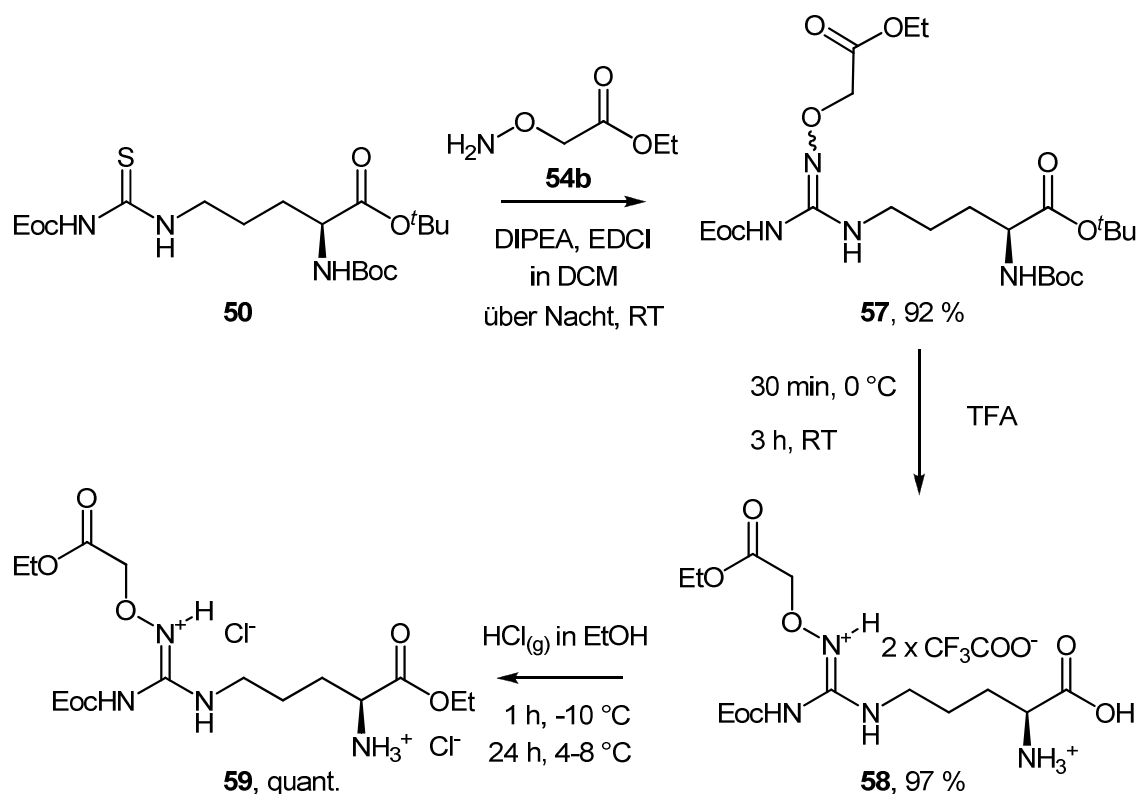


Abbildung 3-25: Synthese *O*-carboxymethylierter Prodrugs von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin.

3.3.3.3 *O*-Acetalische Derivate

Unter dem Aspekt, dass eine *O*-Alkylierung von Hydroxyguanidinen wahrscheinlich zur größten Stabilisierung führt, sollte eine weitere Modifikation dieser Art realisiert werden. Das Einbinden der *N*-Hydroxy-Funktion in ein Acetal könnte zu stabilen *O*-alkylierten Hydroxyguanidinen führen, die unabhängig von Monooxygenase-katalysierten Desalkylierungen bioaktiviert würden.

Derartige Prodrug-Konzepte wurden bereits auf einige Arzneistoffe übertragen, wie z.B. auf die Carboxy-Funktion von Ampicillin (Pivampicillin, **60**) oder die Phosphonsäure des Tenofovirs (Tenofovir disoproxil, **61**) (s. Abb. 3-26).

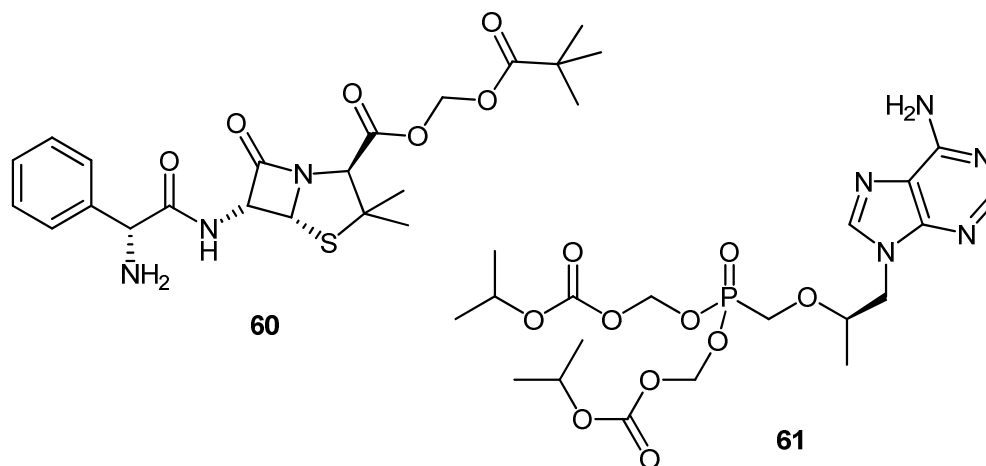


Abbildung 3-26: Esterase-aktivierbare Acetal-Prodrugs: Pivampicillin (**60**), Antibiotikum; Tenofovir disoproxil (**61**), Virustatikum

Nach Esterase-katalysierter Hydrolyse zerfallen die zurückbleibenden instabilen Halbacetale unter Freisetzung des entsprechenden Aldehyds (meist Formaldehyd) und der Hydroxy-tragenden funktionellen Gruppe, welche eine Säure oder ein Alkohol sein kann.

Besondere Acetale stellen *O*-Glycoside dar, die als Konjugate mit Hydroxyguanidinen ebenfalls für ein Prodrug-Design in Frage kommen. Die Rationale hinter der Auswahl eines Zuckers als Prodrug-Gruppe war, dass sie

- Hydroxyguanidine in acetalisch-konjugierter Form chemisch stabilisieren könnten,
- durch Glycosidasen effektiv bioaktiviert werden könnten,
- aus toxikologischer Sicht mit Monosacchariden unbedenkliche Spaltprodukte liefern und
- über Zucker-Transporter in Zellen aufgenommen werden könnten.

Dieses spezielle Konzept der Entwicklung von Zucker-Konjugaten wurde in der Arzneistoffentwicklung schon häufig verfolgt. In Hinblick auf die gezielte und damit nebenwirkungsärmere Chemotherapie wird von verschiedenen Zucker-Konjugaten berichtet.^{222,223} Aber auch im Sinne einer allgemein optimierten Pharmakinetik, durch Ausnutzen des erleichterten Zucker-Transports mittels Transportern der GLUT-Familie, sind verschiedenste Wirkstoffklassen als Zucker-Konjugate weiterentwickelt worden.²²⁴

Auf dem Gebiet der Stickstoffmonoxid-Donoren sind z.B. für Diazeniumdiolate (NONOate), S-Nitrosothiole und sogar für Arginin selbst einige Zucker-Konjugate entwickelt worden (s. Abb. 3-27).^{12,225}

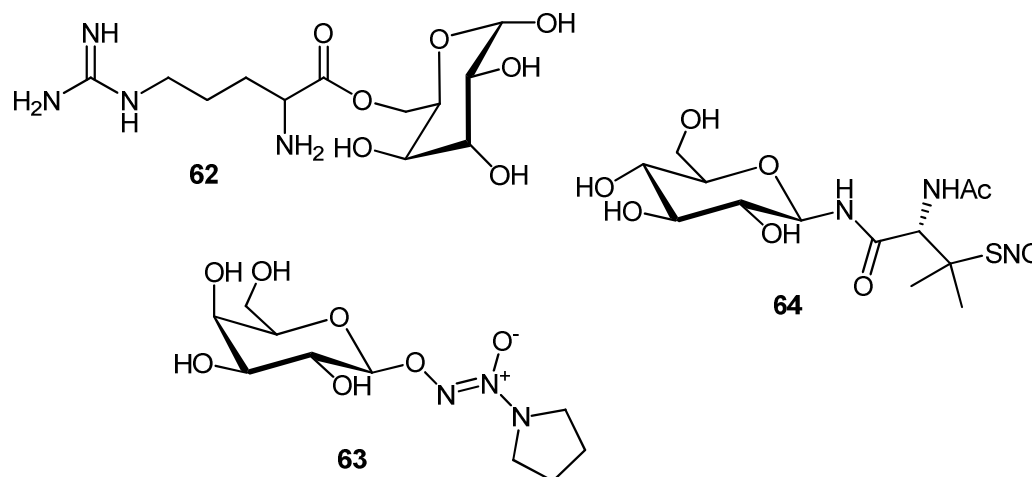


Abbildung 3-27: Zucker-Konjugate verschiedener NO-Donoren: D,L-Arginin-Konjugat (**62**),²²⁵ NONOat-Konjugat (**63**),¹² S-Nitrosothiol-Konjugat (**64**)²²⁶

Mit Galactosyl-Konjugaten des D- und L-Arginins (**62**) konnten Melisi *et al.* [2006], im Vergleich zu den nicht-konjugierten Aminosäuren, eine höhere Permeation und NO-Freisetzung in einer Hypophysen-Zelllinie demonstrieren.²²⁵ Bei den Diazeniumdiolaten konnte mit dem β -Galactose-NONOat **63** eine deutlich höhere Stabilität des Aglycons erzielt werden. Unter den verschiedenen getesteten Konjugaten dieser Stoffklasse wurde das β -Galactose-Konjugat **63** am besten enzymatisch gespalten.²²⁶

Für Guanidine bzw. Hydroxyguanidine haben derartige Strategien jedoch bisher keine Anwendung gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Modellverbindungen sowie *N*^o-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs synthetisiert werden, die verschiedenartige Acetal-Strukturen enthalten. Die Prototypen, die für *in vitro*-Testungen entwickelt sowie zur Etablierung der Synthesen herangezogen werden sollten, sind in Abbildung 3-28 dargestellt.

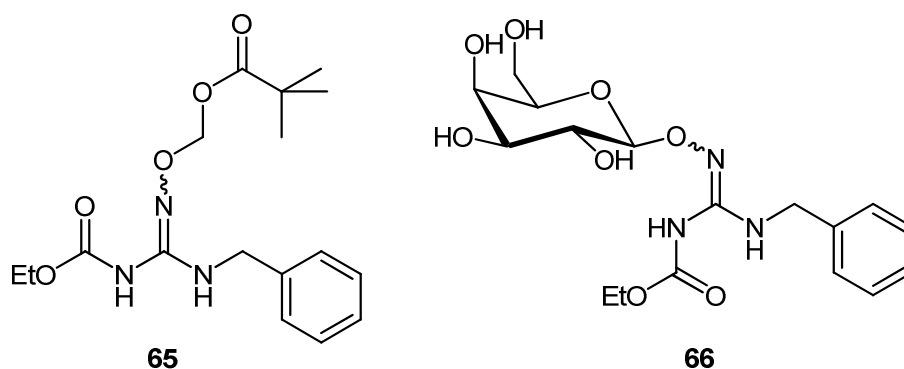


Abbildung 3-28: *O*-Acetale als Prodrugs von Hydroxyguanidinen: Modellverbindungen auf der Basis von *N*-Benzyl-*N'*-hydroxyguanidin.

Die einzig bekannte Synthese eines *O*-Glycosids von Hydroxyguanidinen erfolgte im Arbeitskreis Clement von Fröhlich *et al.* [2005].¹³⁷ Hierfür wurde das *O*-Glucuronid von *N*-Hydroxydebrisoquin als HPLC-Standard für Metabolismusstudien in einer Zweistufen-Synthese dargestellt, wobei die eigentliche Zuckerkonjugation lediglich in 0,2 %-iger Ausbeute verlief.

In Anlehnung an die erfolgreichen Synthesen aus der *O*-Carboxymethyl- und *O*-Methyl-Reihe (vgl. Kap. 3.3.3.1 und 3.3.3.2) erschien die Verwendung von passend *O*-substituierten Hydroxylaminen als der schonendste und effizienteste Weg.

Für die Modellverbindung **65** scheiterte dieser Ansatz bereits an der Darstellung des benötigten Hydroxylamins. Es wurde erfolglos versucht, *N*-Hydroxyphtalimid unter verschiedensten Bedingungen mit Pivalinsäurechlormethylester umzusetzen. Dieses sollte anschließend durch Hydrazinolyse das Hydroxylamin liefern. Stattdessen wurde meist das pivaloylierte *N*-Hydroxyphtalimid erhalten.

Die Synthese der geschützten 1-aminooxylierten β -Galactose **68** als Reagenz erfolgte modifiziert in Anlehnung an verschiedene Literaturvorschriften. In einer Phasen-Transfer-Katalyse wurde *N*-Hydroxyphtalimid mit dem Bromid **67** umgesetzt.^{223,227} Es folgte die Abspaltung der Schutzgruppe mit Methylhydrazin, wobei hier – im Widerspruch zu den angegebenen vier Stunden in der Literatur – eine Reaktionszeit von 25 Minuten nicht überschritten werden durfte.²²⁷ Andernfalls wurden nach ca. 30 Minuten bereits die ersten Acetyl-Gruppen gespalten.

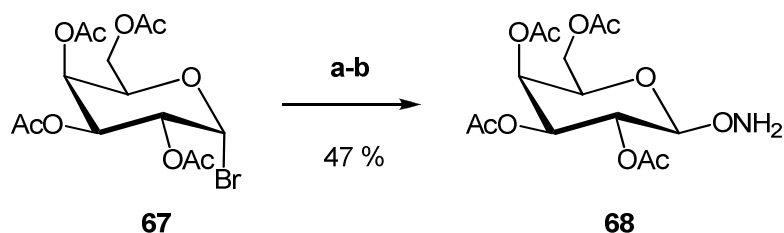


Abbildung 3-29: Synthese von 1-Aminooxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**68**). a) *N*-Hydroxyphthalimid, TBAHS, DCM/1 M NaOH (1:1), 4 h, RT, 70 %; b) Methylhydrazin, DCM/MeOH (1:1), 25 min, RT, 67 %

Aus synthetischer Sicht war es wichtig zu gewährleisten, dass der Zucker als β -Anomer vorlag, da solche von den β -Galactosidasen als Substrate akzeptiert werden.²²⁸ In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **68** und der Phtalimid-geschützten Zwischenstufe wurde kein α -Anomer beobachtet.

Das noch geschützte Konjugat **70** war in guten Ausbeuten ausgehend vom Thioharnstoff **69** zugänglich (s. Abb. 3-30). Die Acetyl-Gruppen wurden abschließend mit einem Anionenaustauscher in Methanol abgespalten. Das Rohprodukt war, nach Abfiltrieren des Austauscherharzes, an dieser Stelle schon > 98 % rein (DC) und wurde weiter über Kieselgel aufgereinigt.

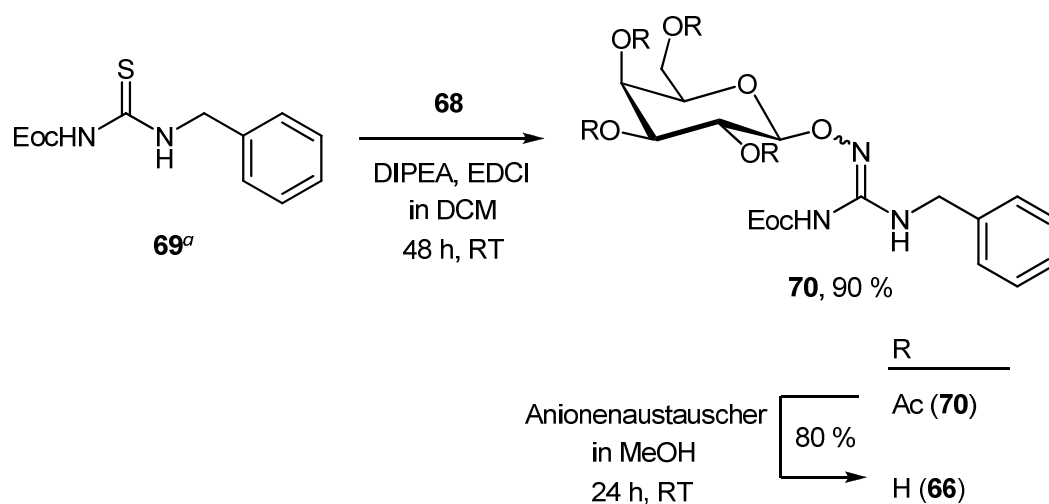


Abbildung 3-30: Synthese des *O*-glycosylierten Hydroxyguanidins **66** als Modellverbindung.
^a Thioharnstoff **69** wurde aus Benzylamin und EocNCS (**32b**) dargestellt

Ausgehend vom Thioharnstoff **69** und dem Hydroxylamin **68** konnte somit die Modellverbindung **66** in zwei Schritten und einer Gesamtausbeute von 72 % dargestellt werden.

Für das entsprechende NOHA-Prodrug wurde zunächst in analoger Weise der Thioharnstoff **50** mit dem Hydroxylamin **68** zum vollständig geschützten Intermediat **71** umgesetzt (s. Abb. 3-31). Eine Herausforderung an dieser Stelle war es, die Aminosäure-Funktion zu entschützen, während die säurelabile glycosidische Funktion unversehrt bleibt. In absolutem Diethylether unter Argon-Atmosphäre war diese Deprotektion jedoch durch vorsichtige Einleitung von HCl-Gas möglich, wobei das Hydrochlorid der Aminosäure **72** präzipitierte.

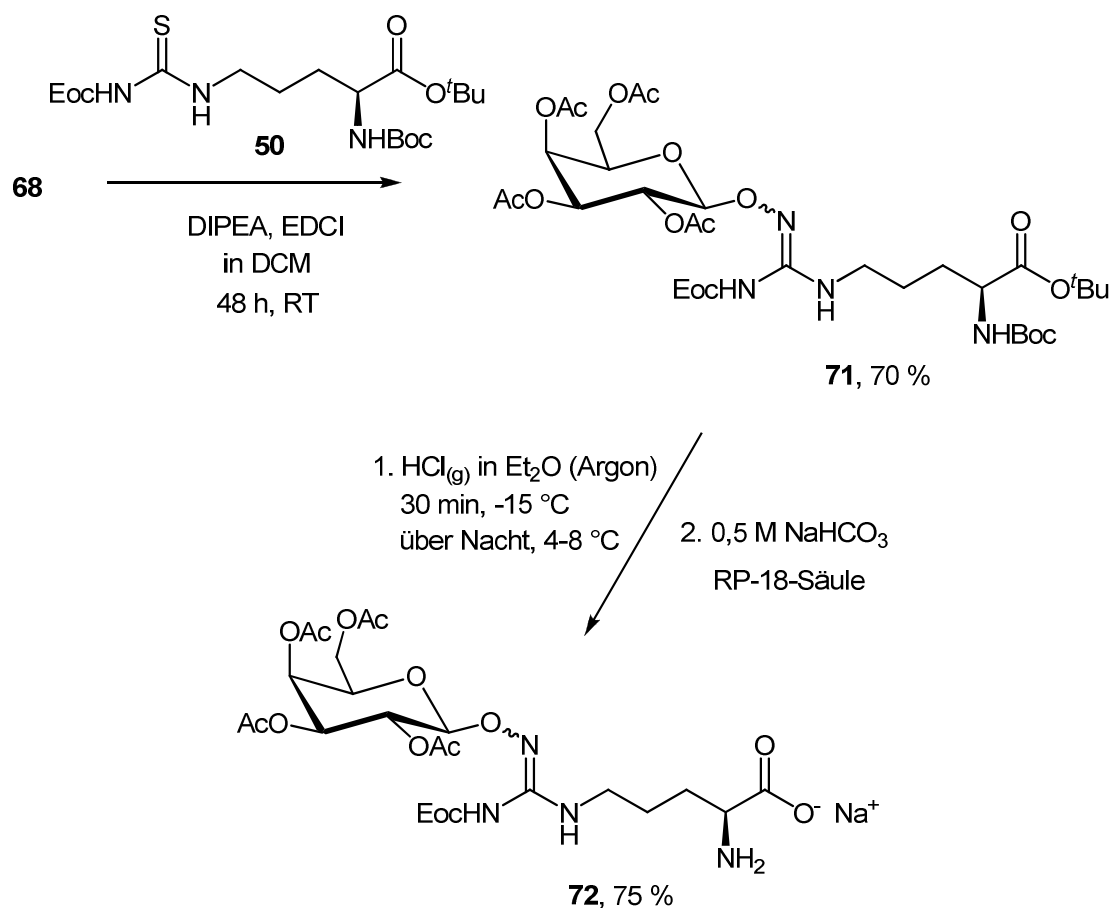


Abbildung 3-31: Synthese des *O*-glycosylierten Hydroxyguanidins **72** als Prodrug von *N*⁰-Hydroxy-L-arginin.

Eine autokatalysierte Hydrolyse dieses Hydrochlorids bei Kontakt mit Wasser sollte vermieden werden, weshalb die Isolierung als Natriumsalz bevorzugt wurde. So konnte

sowie reines Acetanhydrid als Lösungsmittel bei verschiedenen Temperaturen (-30 °C bis RT) eingesetzt.

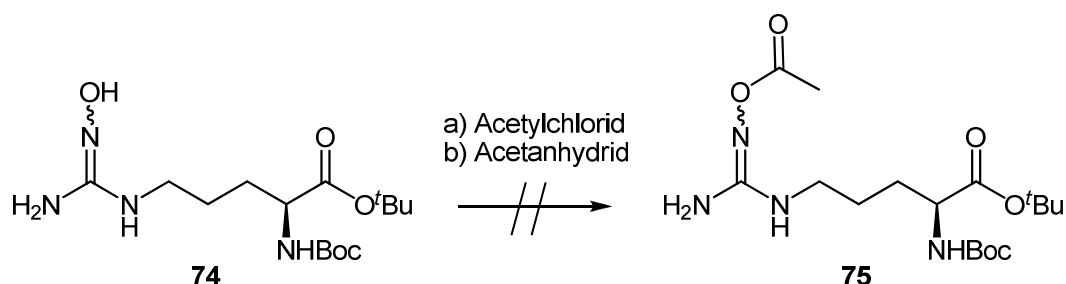


Abbildung 3-32: Versuche zur direkten *O*-Acetylierung der Hydroxyguanidin-Funktion im geschützten *N*^ω-Hydroxy-L-arginin **74**.

Meist resultierte ein sehr komplexes Produktgemisch, dessen erfolgreiche säulenchromatographische Aufarbeitung zur Isolierung der gewünschten Verbindung unwahrscheinlich erschien.

Mit dieser Strategie sind eine selektive Monoacylierung der OH-Gruppe neben der freien NH₂-Gruppe und die Zyklisierung zu einem 1,2,4-Oxadiazol problematisch zu sehen. Tatsächlich berichteten Belzecki *et al.* neben der angesprochenen Zyklisierung von einer Peracylierung solcher Hydroxyguanidine.²³⁰⁻²³² Die selektive *O*-Acetylierung gelang nur für wenige hochsubstituierte Hydroxyguanidine.

Folglich sollte ein alternatives Schutzgruppen-Konzept mit milden Reaktionsbedingungen angewendet werden. In Analogie zu den bisher beschriebenen erfolgreichen Prodrug-Synthesen wurde daher versucht, *O*-acylierte Hydroxylamine als Reagenzien darzustellen, die dann mit dem Ethoxycarbonyl-Thioharnstoff **50** umgesetzt werden könnten.

Im Arbeitskreis Zinner sind eine Reihe aliphatischer *O*-Acylhydroxylamine dargestellt worden, die durch Schutzgruppen-Abspaltung zugänglich sein sollen (s. Abb. 3-33).²³³⁻²³⁵ Hierfür wurden sowohl ein *N*-Boc-geschütztes Hydroxylamin **76**, als auch *O*-acylierte Acethydroximsäureethylester **77** eingesetzt.

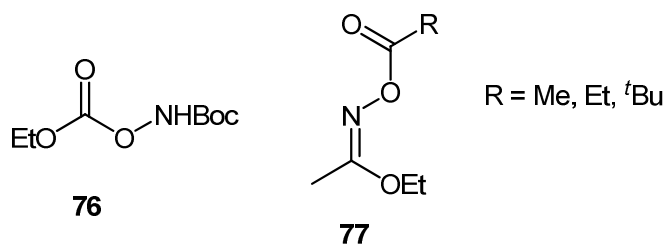


Abbildung 3-33: Geschützte *O*-Acylhydroxylamine, die nach Schutzgruppen-Abspaltung Reagenzien zur Prodrug-Synthese liefern sollten.

In den eigenen Versuchen gelangen zwar die Synthesen von **76** und **77**, die Deprotektion in den von den Autoren verwendeten Lösungsmitteln Nitromethan, Dioxan oder Diethylether war jedoch erfolglos.

3.3.5 Versuche zur Synthese von 1,2,4-Oxadiazol-5-on-basiertem *N*⁰-Hydroxy-L-arginin

Eine Erweiterung des Prodrug-Prinzips der *O*-acylierten Hydroxyguanidine stellt die Zyklisierung zu 1,2,4-Oxadiazol-5-onen dar, welche in diesem Zusammenhang schon von Bade und Rehse [1996] angewandt wurde.^{236,237} Verschiedene, meist aliphatisch-substituierte Oxadiazolone wurden dabei als Prodrugs von Hydroxyguanidinen *in vivo* auf ihre antithrombotische Wirksamkeit getestet. Die vielversprechendsten Hydroxyguanidine sind von den Autoren leider nicht getestet worden, da solche erst in den Jahren 2001 und 2002 als alternative Substrate der NO-Synthasen identifiziert wurden.^{99,138,184,185}

Das interessanteste Oxadiazolon von Rehse und Bade stellte das *N*⁰-Hydroxy-D,L-arginin-Prodrug **78** dar (s. Abb. 3-34).

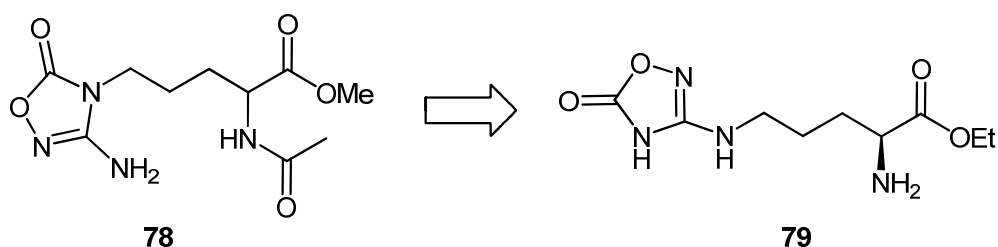


Abbildung 3-34: Geplante Optimierung des 1,2,4-Oxadiazol-5-on-basierten *N*⁰-Hydroxy-D,L-arginin-Prodrugs **78** von Rehse und Bade.²³⁶

Für die eigentliche Zyklisierung war angedacht, die THP-Schutzgruppe *in situ* abzuspalten, um so den intramolekularen Angriff der freien Hydroxy-Funktion auf die Carbonyl-Gruppe des Carbamates zu ermöglichen, welches – einem Additions-/Eliminations-Mechanismus folgend – Ethanol eliminiert (s. Abb. 3-35).

So wurden mit **81** als Modellverbindung verschiedene THP-abspaltende Reagenzien, wie z.B. Ameisen- oder Essigsäure sowie Magnesiumbromid, getestet.¹⁶⁵ In unterschiedlichsten Lösungsmitteln (Ethanol, DMF, DMSO, DCM) konnte weder unter konventionellen Bedingungen, noch in der Mikrowelle die gewünschte Umsetzung erzielt werden.

Des Weiteren wurde mit *N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonylthioharnstoff (**69**) erfolglos versucht, eine direkte Umsetzung mit Hydroxylamin (als freie Base sowie als Hydrochlorid) unter Freisetzung von Schwefelwasserstoff zu erzielen. Mit *N*-Ethoxycarbonylthioamiden als analoge Stoffklasse wurde von George und Papadopoulos [1976] eine Zyklisierung auf diesem Weg beschrieben.²³⁹

3.3.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedenartige Prodrugs von *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA) synthetisiert werden, mit denen die Arzneistoffqualitäten dieser Verbindung verbessert werden. So wurde durch geeignete Substitution einerseits versucht, die Hydroxyguanidin-Funktion aus rein chemischer Sicht zu stabilisieren. Andererseits wurden Modifikationen vorgenommen, die pharmakokinetische Eigenschaften von NOHA beeinflussen, v.a. in Hinblick auf passive Diffusionsvorgänge für eine gute orale Bioverfügbarkeit.

Als besonders effizient hat sich die Synthesestrategie bewährt, die von Linton *et al.* zur Darstellung hochsubstituierter Guanidine angewandt und im Rahmen dieser Arbeit schon erfolgreich für die Synthese der *N*^ω-substituierten L-Arginine übernommen wurde (s. Kap. 3.2.3). Ausgehend von entsprechend *O*-substituierten Hydroxylaminen, Carbamoylthioharnstoffen und EDCI als Entschwefelungsreagenz konnten einfach und in sehr guten Ausbeuten unterschiedlichste *N*^ω-Hydroxy-L-arginin-Derivate als Prodrug-

Kandidaten erhalten werden. Eine zusammenfassende Übersicht der auf diesem Weg erhaltenen Prodrugs sowie möglicher Metabolite, als Standards für geplante Stabilitäts- und Metabolismusstudien, ist in Abbildung 3-36 dargestellt.

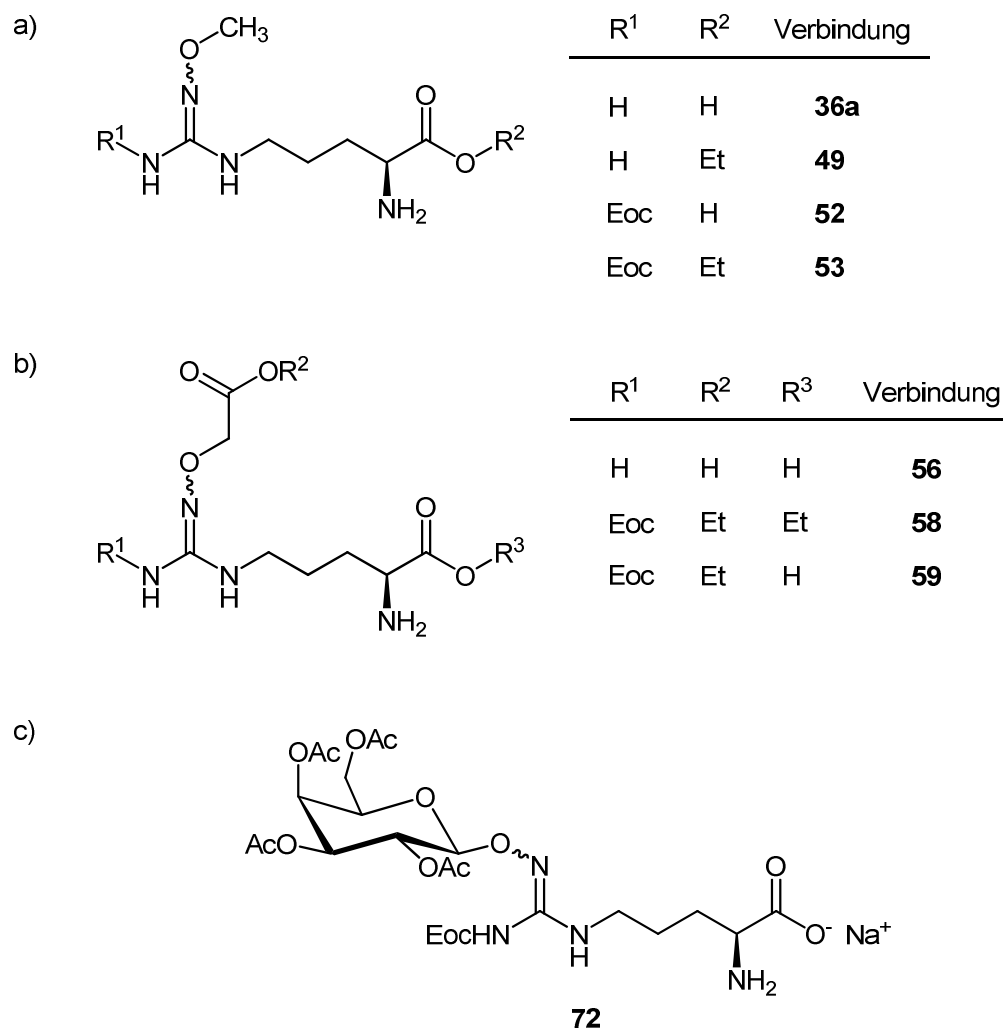


Abbildung 3-36: Zusammenfassende Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Prodrugs von *N*⁰-Hydroxy-L-arginin. a) *O*-methylierte Prodrugs; b) *O*-carboxymethylierte Prodrugs; c) β -Galactose-Konjugat als Prodrug-Kandidat

Aus der *O*-Methyl-Reihe wurden die Prodrugs **49**, **52** und **53** dargestellt, die sich in ihrem Substitutionsgrad und damit wahrscheinlich in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften unterscheiden. Diese sollen in künftigen Arbeiten untersucht werden. Mit der höchstsubstituierten Verbindung **53** resultiert wahrscheinlich die größte chemische und metabolische Stabilität, was zu einer hohen biologischen Halbwertszeit und somit langen Wirksamkeit als NO-Donor führen könnte. Es bliebe der eventuelle

Nachteil einer Bioaktivierung durch CYP450-Enzyme, die die Hydroxyguanidin-Funktion durch *O*-Desalkylierung freisetzen, in Analogie zur bekannten Metabolisierung von *O*-Methylamidoxim-Prodrugs.¹⁴²

Aus diesem Grund wurden die *O*-carboxymethylierten NOHA-Prodrugs **58** und **59** synthetisiert, die unabhängig von CYP450 oxidativ desalkyliert werden könnten und damit ein geringeres Interaktionspotenzial besäßen. Die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase könnte in diesem Zusammenhang ausgenutzt werden, da sie physiologischerweise oxidative *N*-Desalkylierungen von Glycin-verlängerten (*N*-carboxymethylierten) Peptiden katalysiert (s. Kap. 2.2 und Kap. 5).

Als Erweiterung der *O*-alkylierten NOHA-Prodrugs sollten *O*-acetalisch-substituierte Derivate synthetisiert werden, die durch enzymatisch-katalysierte Hydrolyse bioaktiviert würden. Solche Substanzen wurden sowohl mit dem β -Galactose-Konjugat **72** als auch der Modellverbindung **66** erfolgreich dargestellt. Die Eignung dieser Verbindungen als Prodrug-Kandidaten muss in weiteren Arbeiten untersucht werden. Im Falle von **72** sollten jedoch weiterführende Modifikationen, wie Entschützen des Zuckerteils und Veresterung der Carboxy-Funktion, vorgenommen werden. Es konnte allerdings demonstriert werden, dass der Aufbau des *O*-glycosidischen Hydroxyguanidins mit dem gewählten Syntheseweg in sehr guten Ausbeuten möglich ist. Weitergehende Derivatisierungen waren selbst für empfindliche Strukturen auf Aminosäure-Basis möglich. So konnte **72** in 75 %-iger Ausbeute und hoher Reinheit gewonnen werden, nachdem es mit HCl-Gas in Ether behandelt wurde, ohne dass das *O*-Glycosid gespalten wurde. Auch basische Bedingungen, wie bei der Abspaltung der Acetyl-Gruppen von **70**, beeinträchtigten die glycosidische Funktion sowie das zu Grunde liegende Hydroxyguanidin nicht.

Die Verfügbarkeit eines passend *O*-substituierten Hydroxylamins war der einzig limitierende Faktor für die Darstellung aller angedachten Prodrugs von *N*^ω-Hydroxy-L-arginin und entsprechender Modellverbindungen. Daher waren *O*-acylierte und *O*-pivaloyloxymethylierte NOHA-Derivate auf diesem Weg nicht zugänglich.

3.4 SYNTHESE VON O-CARBOXYMETHYLIERTEN MODELLSUBSTANZEN

3.4.1 Einleitung

Die Suche nach neuen Möglichkeiten der Bioaktivierung ist ein wichtiger Bestandteil der Prodrug-Entwicklung. Mit der Peptidylglycin α -Amidierenden Monooxygenase stünde ein Enzym zur Verfügung, welches – ähnlich den CYP450-Enzymen – oxidative O-Desalkylierungen zu katalysieren vermag (vgl. Kap. 2.2 und Kap. 5). Die eigentliche Funktion von PAM ist eine N-Desalkylierung Glycin-verlängerter Peptide, die auf diese Weise C-terminal amidiert und damit aktiviert werden. Somit sollten Modellverbindungen verschiedener Stoffklassen mit einer Carboxymethyl-Gruppe versehen werden, um sie auf ihre PAM-Substrateigenschaften testen zu können (s. Kap. 5).

3.4.2 Amidoxim-Derivate

Für Metabolismusstudien mit Amidinen bzw. Amidoximen wurde Benzamidoxim im eigenen Arbeitskreis häufig als Modellverbindung verwendet. Aus diesem Grund sollte für das angedachte PAM-Prodrug-Konzept O-Carboxymethylbenzamidoxim synthetisiert werden. Hierfür wurde eine Vorschrift von Koch [1889] in modifizierter Form übernommen und das Natriumsalz **6** in guten Ausbeuten erhalten (s. Abb. 3-37).²⁴⁰

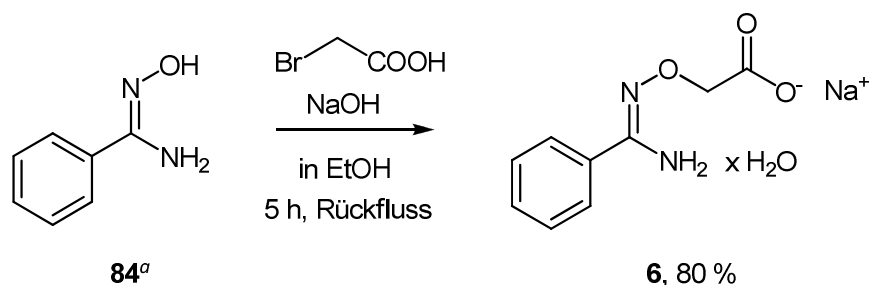


Abbildung 3-37: Synthese von O-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) als Modellverbindung für Amidoxim-Prodrugs.^a Darstellung in Anlehnung an die Literatur²⁴¹

3.4.3 Hydroxyguanidin-Derivate

Auf Basis der Hydroxyguanidine sollten aromatisch- und aliphatisch-substituierte Modellverbindungen als *O*-carboxymethylierte Prodrugs synthetisiert werden. Eine direkte *O*-Alkylierung mit Bromessigsäure, in Analogie zum Amidoxim-Prodrug **6**, erschien aufgrund der Instabilität von Hydroxyguanidinen nicht vielversprechend.

Daher wurde versucht, die *O*-carboxymethylierten Hydroxyguanidine ausgehend von den entsprechenden Carbodiimiden und Aminoxyessigsäure, aufzubauen. Für das aromatisch-substituierte Hydroxyguanidin-Prodrug **7** wurde zunächst *N,N'*-Diphenylcarbodiimid (**85**) nach einer Vorschrift von Fell und Coppola [1995] aus *N,N'*-Diphenylthioharnstoff mit Methylsulfonylchlorid als Entschwefelungsreagenz dargestellt.²⁴² Dieses konnte mit Aminoxyessigsäure, welches mit Triethylamin in die freie Base überführt wurde, in DMF nach vier Stunden quantitativ (laut DC) zu **7** umgesetzt werden (s. Abb. 3-38). Das Umkristallisieren aus Ethanol resultierte jedoch in einer mäßigen Ausbeute von 20 %.

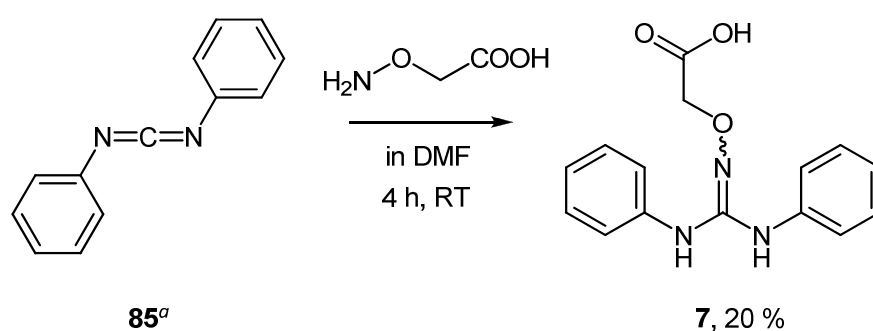


Abbildung 3-38: Synthese von *N*-Carboxymethoxy-*N',N''*-diphenylguanidin (**7**) als Modellverbindung für aromatisch-substituierte Hydroxyguanidin-Prodrugs. ^a Darstellung in Anlehnung an die Literatur²⁴²

Die Synthese des aliphatisch-substituierten Prodrugs **8** (Struktur s. Abb. 2-4) wurde zunächst auf gleichem Wege unternommen. Ausgehend von Benzylcyanamid wurde erfolglos versucht, eine Umsetzung mit Aminoxyessigsäure in verschiedenen Lösungsmitteln bei unterschiedlichen Temperaturen zu erreichen. Das Ausbleiben einer Reaktion unterstreicht ein weiteres Mal die mangelnde Reaktivität von Cyanamiden bzw. ihrer tautomeren Carbodiimide gegenüber *N*-Nucleophilen (vgl. Abb. 3-14 und Abb. 3-21). Alternativ wurde an die erfolgreichen Synthesen der

O-carboxymethylierten NOHA-Prodrugs – speziell von N^{ω} -Carboxymethoxy-L-arginin (**56**) – angeknüpft. Hierfür wurde der Cbz-geschützte Thioharnstoff **86** mit **54a** in Gegenwart von EDCI umgesetzt und das vollständig geschützte Prodrug **87** in 92 %-iger Ausbeute erhalten (s. Abb. 3-39).

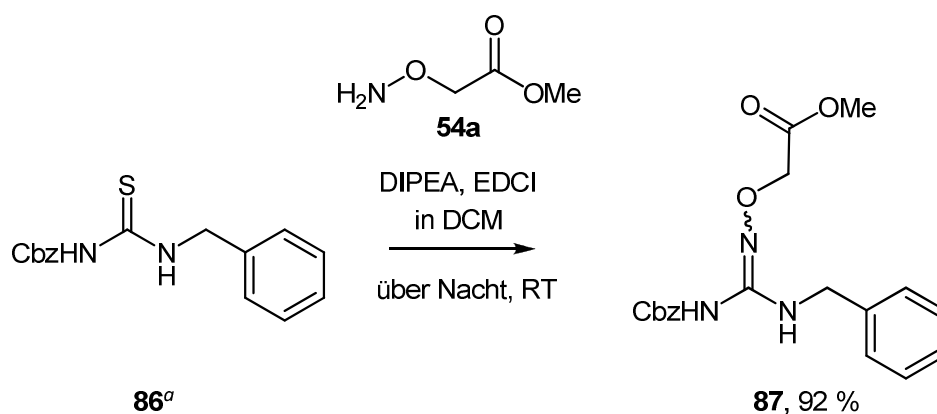


Abbildung 3-39: Synthese der geschützten Modellverbindung **87** als Vorstufe des aliphatisch-substituierten Hydroxyguanidin-Prodrugs **8**. ^a Thioharnstoff **86** wurde aus Benzylamin und CbzNCS (**32a**) dargestellt

In der Folge wurden die Schutzgruppen mit 6 N HCl abgespalten, was laut DC nach fünf Stunden bei 50-60 °C quantitativ erfolgte. Auch LC/MS-Experimente mit dem Rohprodukt zeigten eindeutig die Existenz der gewünschten Verbindung **8**. Die erfolgreiche Isolierung gelang jedoch, wegen mangelnder Möglichkeiten der Visualisierung, mittels chromatographischer Aufreinigungen nicht. Eine UV-Löschung auf der DC war so schwach, dass der Verlauf der Säulenchromatographie auf diese Weise nicht nachvollzogen werden konnte.

3.4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ähnlich den CYP450-Enzymen katalysiert die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase oxidative *O*-Desalkylierungen, die zur Bioaktivierung von *O*-carboxymethylierten Prodrugs ausgenutzt werden könnten. Zur Untersuchung dieses neuen Prodrug-Konzepts wurden in der vorliegenden Arbeit – neben den eigentlichen NOHA-Prodrugs – *O*-Carboxymethyl-benzamidoxim (**6**) und *N*-Carboxymethoxy-*N,N'*-diphenylguanidin (**7**) erfolgreich als Modellverbindungen für Amidoxime bzw. Hydroxyguanidine synthetisiert.

Während das Prodrug **6** durch eine einfache *O*-Alkylierung von Benzamidoxim zugänglich war, musste für die Hydroxyguanidin-Verbindungen aus Stabilitätsgründen eine alternative Strategie angewandt werden. So konnte ausgehend von *N,N'*-Diphenylcarbodiimid (**85**) mit Aminoxyessigsäure das aromatisch-substituierte Prodrug **7** erhalten werden. Auch die Darstellung der geschützten Vorstufe **87** der aliphatisch-substituierten Modellverbindung **8** konnte in sehr guten Ausbeuten erzielt werden. Als problematisch erwies sich jedoch die Isolierung des Prodrugs **8** nach Abspaltung der Schutzgruppen mit 6 N HCl. In diesem Zusammenhang müssten alternative chromatographische und/oder extraktive Aufarbeitungen durchgeführt werden.

3.5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Konzepte zur Beeinflussung endogener Stickstoffmonoxid-Level verfolgt werden. Viele Enzyme, die einen regulativen Einfluss auf die NO-Konzentrationen ausüben, setzen L-Arginin oder -Analoge als Substrate um. Aus diesem Grund sollten im Sinne einer Substrat-basierten Wirkstoffentwicklung vor allen Dingen weitere Arginin-Derivate synthetisiert werden:

- N^δ -methylierte Derivate des L-Arginins
- N^ω -substituierte L-Arginine sowie unsymmetrisch-substituierte Guanidine
- Prodrug-Kandidaten von N^ω -Hydroxy-L-arginin

Basierend auf der Entdeckung von N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) in Hefezellen, stellte sich die Frage, ob eine solche Methylierung als posttranslationale Modifikation ebenso von (patho)physiologischer Bedeutung im Menschen sein könnte, wie sie es im Zusammenhang mit den N^ω -methylierten L-Argininen ADMA und NMMA ist. Die Beeinflussung des NO-generierenden Systems durch **1** sollte im Arbeitskreis untersucht werden, wofür nicht nur **1**, sondern auch alle denkbaren Metabolite aus der NOS-Katalyse synthetisiert werden mussten.

Es war das Ziel, einen gemeinsamen Syntheseweg zu entwickeln, der zu N^δ -Methyl-L-arginin (**1**), N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**), N^δ -Methyl-L-citrullin (**3**) und N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin (**4**) führt. Ausgehend von N^δ -Methyl-L-ornithin (**18**) konnte durch Ausbildung verschiedener Bor-Komplexe die α -Aminosäure-Funktion in einem Schritt geschützt werden. Der für die Darstellung von **1** und **2** bereits in der Literatur verwendete *B,B*-Diethylboryl-Komplex **19** konnte auch für die Synthese von **3** und **4** erfolgreich eingesetzt werden. Durch Verwendung von Bis(9-borabicyclo[3.3.1]nonan) als alternatives Komplexierungsreagenz wurde der Syntheseweg optimiert, indem insbesondere das Einführen dieser Aminosäure-Schutzgruppe stark vereinfacht wurde. Die erhoffte Verbesserung der Löslichkeit der 9-BBN-Komplexe im Vergleich zu den Diethylboryl-Verbindungen – und damit der Ausbeuten – konnte nicht erzielt werden.

Im eigenen Arbeitskreis wurden von Kotthaus die Arginin-Derivate der N^δ -Methyl-Reihe an NO-Synthasen, Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase und Arginase getestet. Wegen der geringen Effekte dieser Substanzen auf die NOS und DDAH liegt der Schluss nahe, dass die postulierte physiologische Bedeutung von N^δ -Methyl-L-arginin – zumindest im NO-generierenden System – nicht gegeben ist. Interessant ist jedoch, dass N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin mit einem K_i -Wert von $17 \pm 2 \mu\text{M}$ einen potenten Inhibitor der bovinen Arginase 1 darstellt. Die N^δ -Methylierung scheint die Affinität zu diesem Enzym, im Gegensatz zu NOS und DDAH, zu erhöhen und stellt eine Möglichkeit dar, eine Selektivität gegenüber NO-Synthasen zu erzielen.

Die DDAH ist ein attraktives Zielprotein zur Entwicklung von Hemmstoffen, die zur selektiven Senkung pathophysiologisch erhöhter NO-Konzentrationen, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen oder septischem Schock vorkommen, eingesetzt werden könnten. Bis heute sind vergleichsweise wenige potente Inhibitoren dieses Enzyms beschrieben worden. Für die Leitstruktur-Optimierung der beiden potentesten DDAH-Hemmstoffe N^ω -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257, **37b**) und N^δ -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-L-NIO, **25**) sollte eine Reihe bekannter und neuer N^ω -substituierter L-Arginine sowie diverse unsymmetrisch-substituierte Guanidine synthetisiert werden.

Durch die Umsetzung von Carbamoylthioharnstoffen mit verschiedensten Aminen, in Gegenwart von EDCI als Entschwefelungsreagenz, war eine ganze Reihe unsymmetrisch-substituierter Guanidine einfach und in sehr guten Ausbeuten zugänglich. So wurden diverse L-Arginin-Derivate (**37a-i**) und Guanidine der 2-Methoxyethyl-Reihe (**41a-e**) auf diesem Weg erfolgreich dargestellt.

Aus den von Kotthaus generierten Hemmdaten dieser Substanzen lassen sich eine Reihe neuer Struktur-Aktivitätsbeziehungen ableiten. Das Hauptproblem stellt die mangelnde Selektivität der meisten Substanzen gegenüber den NO-Synthasen dar. Mit N -(4-Aminobutyl)- N' -(2-methoxyethyl)guanidin (**41b**, $K_i = 18 \pm 6 \mu\text{M}$) steht jedoch eine neue Leitstruktur zur Verfügung, da die Hemmwirkung auf die DDAH vergleichbar mit der des L-257 (**37b**) ist und gleichzeitig die NOSs nicht beeinflusst werden.

Als "Nicht-Aminosäure" weist es vorteilhafte Arzneistoffqualitäten auf, die es, zusammen mit einer zusätzlichen Erhöhung der Hemmpotenz, durch weitere Modifikationen in künftigen Arbeiten zu optimieren gilt.

Weiterhin sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedenartige Prodrugs von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin synthetisiert werden, die als potenzielle NO-Donoren zur Behandlung NO-defizienter Erkrankungen eingesetzt werden könnten. Die Übertragung verschiedener Prodrug-Konzepte auf NOHA zielte darauf ab, die Arzneistoffqualitäten dieser Aminosäure zu verbessern. So wurde durch geeignete Substitution versucht, die Hydroxyguanidin-Funktion aus chemischer und metabolischer Sicht zu stabilisieren, als auch die pharmakokinetischen Eigenschaften in Hinblick auf passive Diffusionsvorgänge zu verbessern.

Als besonders effizient hat sich die Synthesestrategie bewährt, die im Rahmen dieser Arbeit schon erfolgreich für die Darstellung der N^{ω} -substituierten L-Arginine und anderer Guanidine angewandt wurde. Ausgehend von Carbamoylthioharnstoffen, passend *O*-substituierten Hydroxylaminen und EDCI als Entschwefelungsreagenz konnten einfach und in sehr guten Ausbeuten unterschiedlichste N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Derivate als Prodrug-Kandidaten erhalten werden. Diverse *O*-methylierte (**49**, **52** und **53**), *O*-carboxymethylierte (**58** und **59**) Prodrugs sowie ein *O*-acetalisch-substituiertes Prodrug (**72**) konnten auf diesem Wege erfolgreich synthetisiert werden. Die Verfügbarkeit des entsprechend *O*-substituierten Hydroxylamins war der einzig limitierende Faktor für die Darstellung weiterer angedachter NOHA-Prodrugs und korrespondierender Modellverbindungen. Daher konnten *O*-acylierte und *O*-pivaloyloxymethylierte Hydroxyguanidine mit dieser Strategie nicht erhalten werden.

Für eine weitergehende Untersuchung der Bioaktivierung *O*-carboxymethylierter Prodrugs durch die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase wurden neben den NOHA-Verbindungen **58** und **59** Modellverbindungen auf Amidoxim- und Hydroxyguanidin-Basis synthetisiert. Eine oxidative *O*-Desalkylierung solcher Prodrugs durch PAM hätte den Vorteil, dass eine interaktionsreiche Bioaktivierung durch

CYP450-Enzyme umgangen würde. Als aliphatisch-substituiertes Hydroxyguanidin-Prodrug konnte *N*-Benzyl-*N'*-carboxymethoxyguanidin (**8**) nicht isoliert werden. Jedoch gelang die Synthese von *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) und *N*-Carboxymethoxy-*N',N''*-diphenylguanidin (**7**) als aromatisch-substituierte Amidoxim- und Hydroxyguanidin-Vertreter, die im Rahmen dieser Arbeit auf PAM-Substrateigenschaften getestet werden sollten.

4 BESTIMMUNG DER ENANTIOMERENREINHEIT ZENTRALER SYNTHESPRODUKTE

4.1 EINLEITUNG

Bei der Entwicklung neuer Substanzen, die eine pharmakologische Wirksamkeit aufweisen sollen, ist die Überprüfung ihrer Enantiomeren- oder Diastereomerenreinheit unerlässlich. Das in den 50er Jahren als Schlafmittel – wegen guter Verträglichkeit besonders bei schwangeren Frauen – eingesetzte Arzneimittel Contergan® mit dem Wirkstoff Thalidomid erlangte in einem solchen Zusammenhang traurige Aufmerksamkeit. Aufgrund der teratogenen Wirkung des *S*(-)-Enantiomers im racemischen Thalidomid kam es zu embryonalen Missbildungen und Fehlgeburten, wohingegen die gewünschte Wirkung ausschließlich auf das *R*(+)-Enantiomer zurückzuführen ist. Dies ist der denkbar schlimmste Fall, bei dem das eine Enantiomer eine schwerwiegende Nebenwirkung aufweist, während das andere für die Wirksamkeit verantwortlich ist. Aber auch die biologische Inaktivität oder reduzierte Aktivität eines Enantiomers (Distomer) gegenüber dem aktiven Enantiomer (Eutomer) muss in der Arzneistoffentwicklung berücksichtigt werden.

Auch in der präklinischen Entwicklung neuer Wirkstoffe ist es zur korrekten Bestimmung von IC_{50} - oder K_i -Werten wichtig, enantiomerenreine Verbindungen einzusetzen. Von der NOS, DDAH und der Arginase ist bekannt, dass sie eine hohe Substratspezifität für die natürlich vorkommenden L-Aminosäuren aufweisen und die entsprechenden D-Enantiomere nicht als Substrate akzeptieren.^{78,243,244}

Für die stereochemische Charakterisierung von optisch aktiven Substanzen werden für die Routineanalytik prinzipiell chiroptische Methoden (v.a. Polarimetrie) und chromatographische Verfahren angewandt. Die einfache Bestimmung der optischen Drehung mittels Polarimetrie liefert zunächst allerdings keine Information darüber, in welchem Verhältnis zwei Enantiomere vorliegen. Selbst kleine Drehwerte lassen nicht

den Schluss zu, dass ein nahezu racemisches Gemisch vorliegt. Die genaue Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses ist mittels chromatographischer Methoden (v.a. HPLC und GC) möglich, wobei ein chiraler Selektor die Diskriminierung zwischen den optischen Antipoden ermöglicht. Die universellste Methode, in kurzer Zeit die Enantiomerenzusammensetzung zu bestimmen, ist die mittels HPLC. Hierbei kann der chirale Selektor entweder dem Fließmittel zugesetzt werden oder er liegt auf der stationären Phase gebunden vor. Unterschiedlichste Formen der Chiralität können mittlerweile auf diese Art untersucht werden, u.a. bedingt durch die Vielzahl an chiralen stationären Phasen, die kommerziell erhältlich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine enantioselektiven oder -spezifischen Synthesen durchgeführt, da die chirale Information schon in den Ausgangsverbindungen enthalten war. Es galt daher möglichst schonende Reaktionsbedingungen zu wählen, die ein geringes Racemisierungsrisiko bergen. Problematisch zu beurteilen sind bei Synthesen von und mit Aminosäuren stark saure oder basische Bedingungen bei erhöhten Temperaturen, wobei die Substitution der α -Aminosäure-Funktion entscheidenden Einfluss haben kann.¹⁶⁴ Insbesondere bei der Darstellung der N^δ -methylierten L-Arginin-Analoga (vgl. Kap. 3.1) gab es einige Reaktionsbedingungen, die unter diesem Aspekt als bedenklich einzustufen waren und daher eine Untersuchung der optischen Reinheit wichtig erschien.

4.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.2.1 N^{δ} -Methyliertes L-Arginin, N^{ω} -Hydroxy-L-arginin, L-Citrullin und L-Ornithin

4.2.1.1 HPLC unter Verwendung eines chiralen Eluenten

Die von Töpker [1997]¹⁵⁷ verwendete Methode zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (**1**) sollte für die Analyse aller im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten N^{δ} -Methyl-Derivate übernommen werden. Hierbei wurde ein chiraler Eluent, bestehend aus L-Prolin (8 mM) und Kupfer(II)-acetat (4 mM), verwendet. Die diastereomeren Komplexe wurden auf einer RP-18 Säule getrennt und die Aminosäuren mittels Nachsäulenderivatisierung (*o*-PA) detektiert. Diese Bedingungen wurden in Anlehnung an eine von Gil-Av *et al.* [1980]²⁴⁵ beschriebene Methode zur Enantiomerentrennung von Aminosäuren gewählt. Es wurden Retentionszeiten von 18,14 min für das D-Enantiomer und 23,16 min für das L-Enantiomer beschrieben.

Eigene Versuche, die Analytik von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin zu reproduzieren, waren nicht erfolgreich. Ein einziger chromatographischer Lauf unter diesen Bedingungen brachte zunächst vergleichbare Ergebnisse, jedoch führte jede weitere Injektion von **1** zu starken Basisliniendrifts und Anstiegen des HPLC-System-Drucks. Es stellte sich heraus, dass der alkalische pH des Nachsäulenreagenz (pH 9,5), der für eine möglichst quantitative Umsetzung mit den Analyten wichtig ist, inkompatibel mit dem Kupfer(II)-haltigen Fließmittel ist. Die Folge war ein Verstopfen der HPLC-Kapillaren nach Zumischen des Nachsäulenreagenzes durch das Ausfallen von Kupfersalzen wie $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Dies war nicht verwunderlich unter Berücksichtigung der hohen Flussrate (1,2 mL/min), mit der das *o*-PA-Reagenz dem Fließmittel (pH 5; 0,5 mL/min) zugemischt wurde.

Wagner *et al.* [1987]²⁴⁶ haben vermutlich aus diesem Grund die Flussraten von Eluent und Nachsäulenreagenz so abgestimmt, dass ein pH von 8-9 resultiert. Außerdem wurde von diesen Autoren dem Fließmittel zusätzlich ein Tensid (Brij 35) zugesetzt.

Eigene Versuche, die Analytik auf diese Weise zu optimieren, brachten nicht die gewünschten Verbesserungen, da noch immer die HPLC-Drücke nach mehrfachen Injektionen stark anstiegen. Erst der Zusatz von EDTA (4 mM) zum Nachsäulenreagenz verhinderte das Ausfallen der Kupfersalze und störte die Derivatisierung nicht. Damit konnte auch auf die Anwesenheit des Tensids verzichtet werden, da dieses häufig Luftblasen im HPLC-System verursachte. Trotzdem wurde diese Analytik als wenig robust beurteilt und deshalb nicht weiter auf die Trennung anderer Aminosäuren übertragen. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass mit der Verwendung von Fließmitteln mit chiralem Selektor bisher D,L-Ornithin nicht getrennt werden konnte und die Trennung von N^{δ} -Methyl-D,L-ornithin (**18**) eine wichtige Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit darstellte, war es nötig, eine alternative Analytik zu entwickeln.

4.2.1.2 HPLC unter Verwendung chiraler stationärer Phasen

Für die Untersuchung der Enantiomerenreinheit von Aminosäuren findet die Verwendung eines auf Kieselgel adsorbierten, chiralen Kronenethers in Form der kommerziell erhältlichen Crownpak Cr(+)-Säule sehr breite Anwendung. Praktisch alle natürlichen Aminosäuren können mit diesem chiralen Selektor in ihre Enantiomere getrennt werden. Auch viele unnatürliche Aminosäuren sowie einfache Amine mit benachbartem Chiralitätszentrum konnten so analysiert werden.^{247,248}

Alle Endverbindungen der N^{δ} -Methyl-Reihe konnten mit diesem System auf ihre optische Reinheit untersucht werden. N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin (**4**) wurde nicht analysiert, da eine Hydrolyse des Cyanamids unter den chromatographischen Bedingungen (pH des Fließmittels = 1,5) wahrscheinlich erschien. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst (s. auch Abb. 4-1).

Tabelle 4-1: Crownpak Cr(+)-Analytik N^{δ} -methylierter L-Arginine und Analoga

Verbindung	k_D	k_L	α	%ee ^a
1	1,98	5,12	2,59	98,0 (70,6)
2	2,21	6,27	2,83	98,1 (70,8)
3	2,16	5,88	2,72	98,1 (70,9)

^a In Klammern sind die Werte der Substanzen angegeben, die ausgehend von N^{δ} -Methyl-L-ornithin (71,2 %ee) dargestellt wurden. Die angegebenen Werte wurden mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ % bestimmt.

Unerfreulich erschien zunächst die Tatsache, dass alle Endverbindungen, die auf dem Boroxazolidinon-Weg (vgl. Kap. 3.1) erhalten wurden, einen L-Enantiomerenüberschuss von nur 71 % aufwiesen.

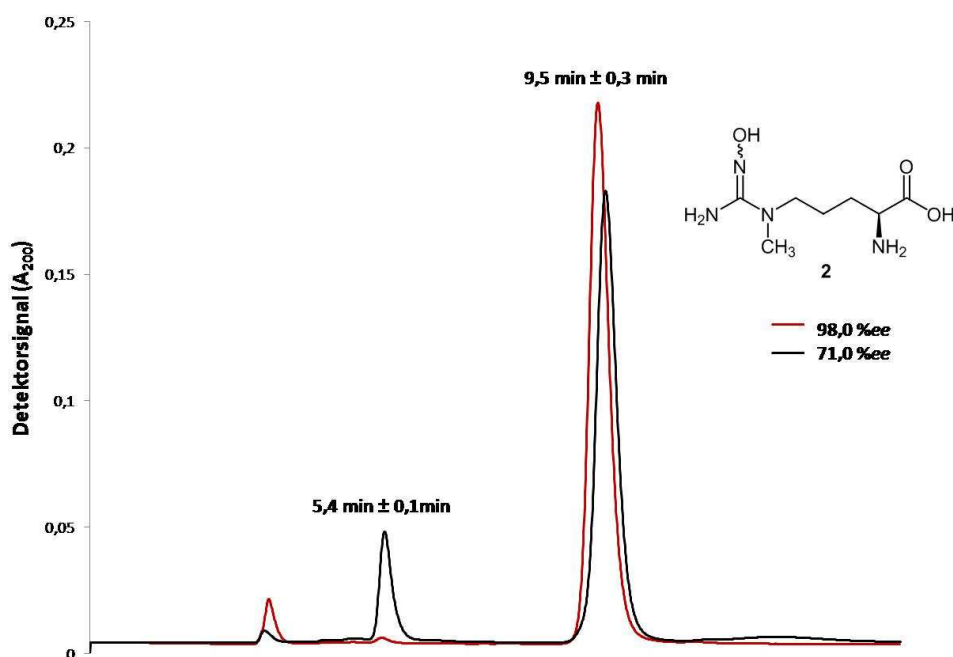


Abbildung 4-1: Repräsentative Chromatogramme verschiedener N^{δ} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (**2**)-Chargen auf einer Crownpak Cr(+)-Säule. Säulentemperatur: 15 °C; Fließmittel: HClO₄ in *Aqua bidest.*, pH 1,5; Flussrate: 0,4 mL/min; Detektion: 200 nm

Es musste also auf diesem Syntheseweg teilweise eine Racemisierung des optisch reinen Ausgangsmaterials L-Ornithin – überprüft mittels Polarimetrie (s. Tab. 4-3) und HPLC (Daten nicht gezeigt) – stattgefunden haben. Gerade die Darstellung des

N^δ-Methyl-L-ornithins (**18**) beinhaltet verschiedene Syntheseschritte, bei denen ein größeres Racemisierungsrisiko vorliegt. Daher sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, welche Schritte dafür verantwortlich sind und wie eine Umgehung dieser Problematik möglich ist.

Zunächst musste eine Crownpak Cr(+)-Analytik für *N*^δ-Methyl-L-ornithin entwickelt werden, die eine alternative Detektionsmethode zur Absorptionsmessung bei 200 nm bietet, da diese Aminosäure einen sehr kleinen Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge aufweist. Eine Derivatisierung mit *o*-PA nach erfolgter Trennung auf chiraler stationärer Phase ermöglichte eine Fluoreszenzdetektion und damit eine quantitative Auswertung bezüglich der Enantiomerenreinheit (s. Abb. 4-2). Um eine ausreichende Trennung der Enantiomere zu erzielen, musste außerdem die Säulentemperatur auf 0 °C thermostatisiert werden. Gerade niedrige Temperaturen beeinflussen die Trennleistung der HPLC auf chiraler stationärer Phase positiv.²⁴⁷

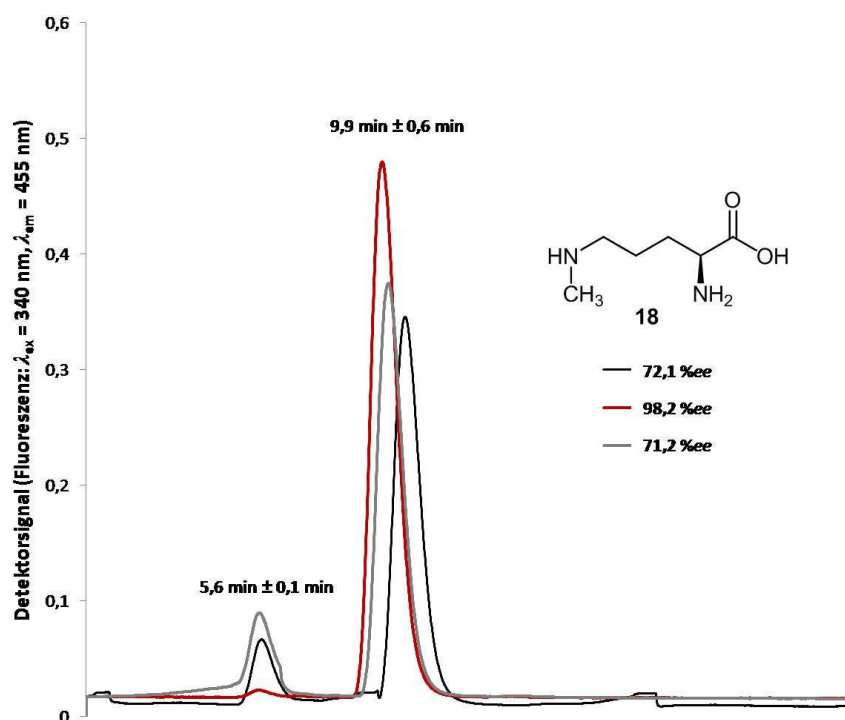


Abbildung 4-2: Repräsentative Chromatogramme verschiedener *N*^δ-Methyl-L-ornithin (**18**)-Chargen auf einer Crownpak Cr(+)-Säule. Säulentemperatur: 0 °C; Fließmittel: HClO₄ in *Aqua bidest.*, pH 1,5; Flussrate: 0,5 mL/min; Detektion: Fluoreszenzmessung, *o*-PA-Nachsäulenderivatisierung ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$)

Die für die ersten Synthesen verwendeten Chargen N^{δ} -Methyl-L-ornithin hatten diesen Ergebnissen nach einen 71-72 %-igen L-Enantiomerenüberschuss. Da die mit diesen Chargen hergestellten Endverbindungen auch in diesem Bereich lagen (vgl. Tab. 4-1), scheint die Einführung der Boroxazolidinon-Schutzgruppe, der Aufbau der Guanidin-, Hydroxyguanidin-, Cyanamid- und Harnstoffstruktur, als auch die Entfernung der Schutzgruppe(n) in Hinblick auf Racemisierung unproblematisch zu sein.

Die Frage, welche Syntheseschritte für die Racemisierung verantwortlich sind, wurde über die Untersuchung der Enantiomerenreinheit der direkten synthetischen Vorstufen von **18** angegangen. Da die Crownpak Cr(+)-Analytik auf die Anwesenheit einer freien Amino-Gruppe in Nachbarschaft zu einem chiralen Zentrum beruht, konnte diese Analytik nicht für die geschützten Vorstufen genutzt werden. Stattdessen wurde die (R,R)-Whelk O1-Säule, eine stationäre Phase des sogenannten "Pirkle-Typs", gewählt. Bei dieser Säule tragen π -Donor-, π -Akzeptorwechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen Analyt und chiralem Selektor – (3R, 4R)-4-(3,5-Dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren – zur Enantiomerentrennung bei. Weiterhin ist hier vorteilhaft, dass der chirale Selektor kovalent am Kieselgel gebunden ist und somit eine große Toleranz gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln besitzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: (R,R)-Whelk O1-Analytik der synthetischen Vorstufen von N^{δ} -Methyl-L-ornithin (18)

Verbindung	k_D	k_L	α	%ee ^a
16	8,62	10,42	1,21	99,2
17	9,48	11,39	1,20	98,8

^a Die angegebenen Werte wurden mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ % bestimmt.

Es wurde darauf verzichtet, die entsprechenden D-Enantiomere als Standards zu synthetisieren. Da die Verbindungen elementaranalysenrein vorlagen (s. Kap. 7.1.2.1) und daher Verunreinigungen von höchstens 0,4 % möglich sind, konnte man beim Auftreten eines Signals mit einer Intensität $> 0,4$ % davon ausgehen, dass es sich um das D-Enantiomer handeln muss. Eine Variation der Flussrate, der Temperatur als auch

der Zusammensetzung des Fließmittels ergab stets einen symmetrischen Peak, so dass eine Überlagerung beider Enantiomere sehr unwahrscheinlich ist. Für N^α -Benzoyl- N^δ -methyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (**17**), der direkten Vorstufe des N^δ -Methyl-L-ornithins, wurde so eine Enantiomerenreinheit von 98,8 %*ee* bestimmt (s. Abb. 4-3).

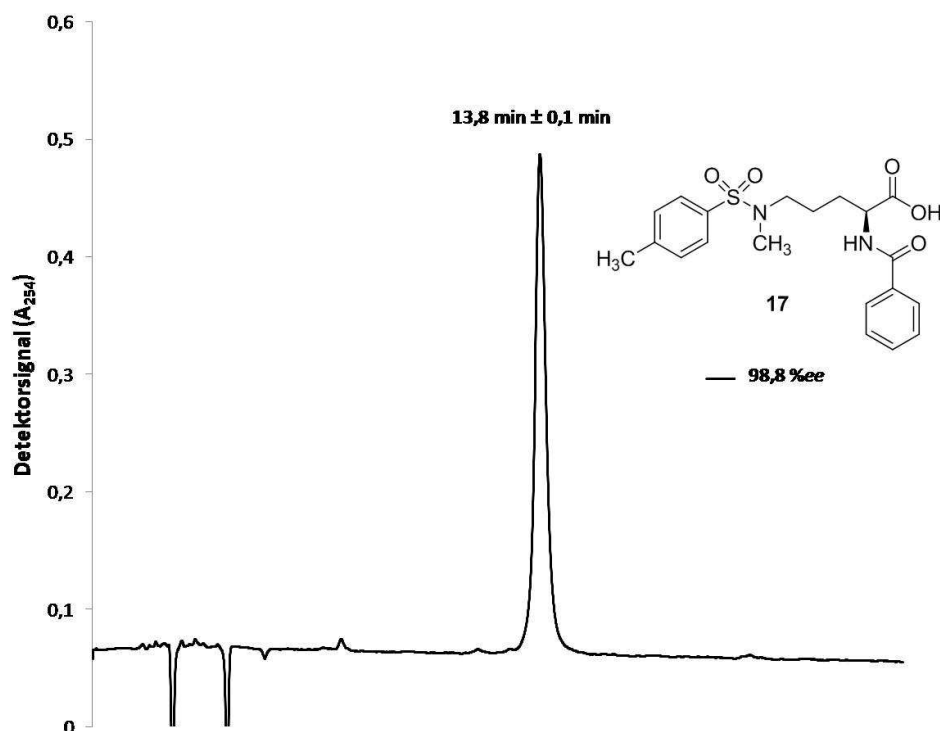


Abbildung 4-3: Repräsentatives Chromatogramm von N^α -Benzoyl- N^δ -methyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (**17**), der direkten synthetischen Vorstufe von N^δ -Methyl-L-ornithin (**18**), auf einer (*R,R*)-Whelk O1-Säule. Säulentemperatur: 20 °C; Fließmittel: *n*-Hexan/Ethanol/Eisessig (85:15:5); Flussrate: 1,0 mL/min; Detektion: 254 nm

Unter identischen Bedingungen wurde die Enantiomerenreinheit von N^α -Benzoyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (**16**) bestimmt (99,2 %*ee*).

Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Reaktionsbedingungen der letzten Stufe in der Synthese von **18** zu einer Racemisierung führten, d.h. die Abspaltung der Schutzgruppen mit HBr (47 %) in Eisessig unter Rückfluss für zwei Stunden^{158,162,249} (vgl. Kap. 3.1.3). Ein Kompromiss zwischen guten Ausbeuten und geringer Racemisierung wurde gefunden, indem eine Reaktionszeit von 1,5 Stunden unter Rückfluss nicht überschritten wurde. Auch das anschließende Abdestillieren von HBr wurde bei möglichst gutem Vakuum (< 1 mbar) durchgeführt, wobei die Temperatur

bei 80-90 °C gehalten wurde. Auf diese Weise war es wiederholt möglich, N^{δ} -Methyl-L-ornithin in einer Ausbeute von 84 % (letzter Schritt der Synthese) und 98,2 %ee darzustellen.

4.2.1.3 Polarimetrie

Nachdem die ersten Ergebnisse mit der Crownpak Cr(+)-Analytik zeigten, dass N^{δ} -methyliertes L-Arginin, N^{ω} -Hydroxy-L-arginin und L-Citrullin einen L-Enantiomerenüberschuss von nur 71 %ee haben, sollte die optische Reinheit von N^{δ} -Methyl-L-ornithin untersucht werden. Wie schon die Ergebnisse der chiralen HPLC gezeigt haben (s. Kap. 4.2.1.2), ist eine Racemisierung des optisch reinen Ausgangsmaterials bei der Darstellung dieser zentralen Zwischenstufe am wahrscheinlichsten. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist hilfreich zur Beurteilung der eigenen Ergebnisse sowie der Qualität literaturbeschriebener Synthesen/Substanzen und soll die Daten der synthetisierten Verbindungen vervollständigen (s. Tab. 4-3).

Tabelle 4-3: Optische Drehung $[\alpha]$ von N^{δ} -Methyl-L-ornithin und seiner synthetischen Vorstufen

Verbindung	$[\alpha]^{20}$ bei verschiedenen Wellenlängen [°]				
	587,3 nm (Literatur)	578 nm	546 nm	436 nm	365 nm
L-Orn^a	+23,9 (+23,7) ²⁵⁰	+24,4	+28,7	+51,8	+89,3
15^a	+21,0 (+20,8) ^c 160,161	+21,8	+25,1	+44,4	+72,7
16^b	-5,0 (-3,0) ^c 162	-4,2	-4,7	-5,7	-2,1
17^b	-4,2 (-3,0) ^c 162	-3,4	-3,8	-5,4	-3,4
18^a	+23,2 (+19,7) ^c 162	+25,0	+28,6	+50,8	+88,8

^a 2 % in 6 N HCl; ^b 2 % in DMF; ^c bestimmt bei 23 °C

Beim Vergleich der ermittelten Drehwerte mit den Literaturdaten ist eine stärkere Abweichung für N^δ -Methyl-L-ornithin auffällig. Hier wäre denkbar, dass Benoiton, welcher auch HBr im letzten Schritt einsetzte, schon leicht racemisiertes Produkt vorliegen hatte.¹⁶²

4.2.2 N^0 -Substituierte L-Arginin-Derivate

Die N^0 -substituierten L-Arginin-Derivate, die v.a. für die Testungen an der DDAH synthetisiert wurden, sollten auf ihren L-Enantiomerenüberschuss getestet werden. Zwar erscheint eine Gefahr der Racemisierung bei der Darstellung eher gering, da keine starken Basen oder kritische Temperaturen zum Einsatz kamen. Dennoch wurde zumindest im letzten Schritt konzentrierte Trifluoressigsäure eingesetzt (vgl. Kap. 3.2.3) und so sollten diese Syntheseprodukte ebenfalls vor ihrer Testung auf Enantiomerenreinheit überprüft werden.

Auch für diese Substanzklasse wurde auf die Synthese der zugehörigen D-Enantiomere als HPLC-Standards verzichtet. Es wurden jedoch alle Parameter, die die Trennung zweier Enantiomere auf der Crownpak Cr(+)-Säule beeinflussen können, systematisch variiert. Dies waren v.a. der pH des Fließmittels, die Temperatur der Säule und die Flussrate. Für alle getesteten Aminosäuren resultierte jeweils ein einziger, symmetrischer Peak, der eine Überlappung beider Enantiomere unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Des Weiteren lässt die Tatsache, dass D,L-Arginin mit einem Separationsfaktor von $\alpha = 2,83$ auf der Crownpak Cr(+)-Säule getrennt wurde (eigene nicht gezeigte Daten, identisch mit Herstellerangaben), N^δ -Methyl-D,L-arginin mit $\alpha = 2,59$ und N^0 -Hydroxy- N^δ -methyl-D,L-arginin mit $\alpha = 2,83$ (s. Tab. 4-1) den Schluss zu, dass durch die N-Substitution v.a. die generelle Retentionszeit beeinflusst wird, nicht jedoch die Trennung der D,L-Enantiomere. Tatsächlich wurden die N^0 -substituierten L-Arginine im Durchschnitt – je nach Substituent – länger auf der Säule zurückgehalten (7-15 min, bei 0,6 mL/min) als unsubstituiertes L-Arginin (8,8 min \pm 0,1 min, bei 0,6 mL/min).

Die chromatographischen Bedingungen wurden nun so gewählt, dass das L-Enantiomer lange genug auf der Säule verweilt, um die Detektion des D-Enantiomers zu ermöglichen (s. Abb. 4-4). Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die D-Enantiomere von α -Aminosäuren auf der Crownpak Cr(+)-Säule immer zuerst eluiert werden.²⁴⁷ Die Injektion einer 1 μ M Lösung der synthetisierten Verbindungen konnte noch quantifiziert werden, so dass 1 mM Lösungen injiziert wurden, um die optische Reinheit auf $\pm 0,1$ % genau bestimmen zu können.

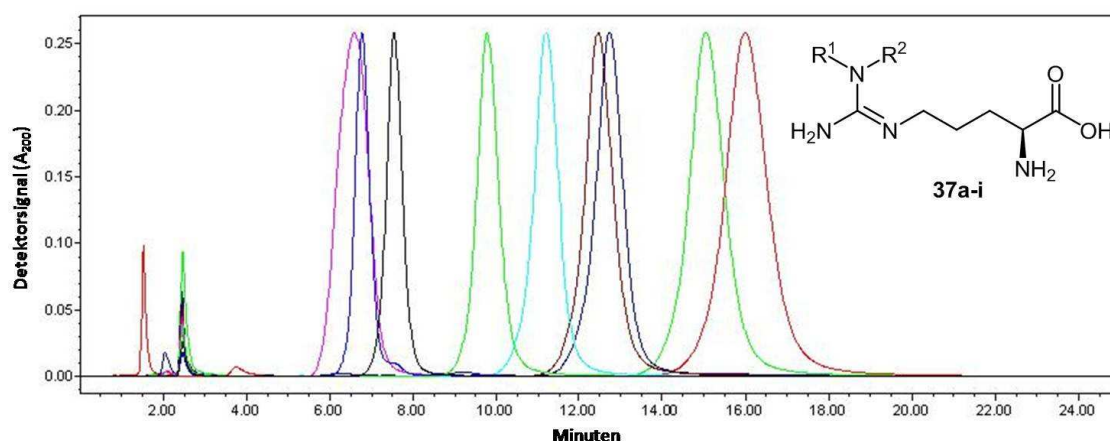


Abbildung 4-4: Repräsentative Chromatogramme N^0 -substituierter L-Arginine (**37**) auf einer Crownpak Cr(+)-Säule. Fließmittel: HClO_4 in *Aqua bidest.*, pH 1,5; Retentionszeiten bei 0,6 mL/min: 6,6 min (**37a**), 6,8 min (**37f**), 7,5 min (**37g**), 9,8 min (**37e**), 11,2 min (**37b**), 12,5 min (**37c**), 12,7 min (**37h**), 15,1 min (**37i**); Retentionszeit bei 1 mL/min: 16,0 min (**37d**); Detektion: 200 nm (Injektionspeaks: 1,8-3,0 min)

Der Enantiomerenüberschuss wurde für alle dargestellten N^0 -substituierten L-Arginine auf 99,9 %*ee* bestimmt. Dieses Ergebnis unterstreicht die besonders milden Reaktionsbedingungen, denen die Aminosäuren in den verschiedenen Umsetzungen unterliegen.

4.2.3 *N*^ω-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs

N^ω-Methoxy-L-arginin (**37a**) wurde bereits in Kap. 4.2.2 vorgestellt und für enantiomerenrein befunden (s. Abb. 4-4). Aber auch Vertreter aus den Klassen der Carbamoyl- und *O*-Carboxymethyl-substituierten Prodrugs sollten untersucht werden. Im Rahmen dieser Synthesen gab es nur wenige Schritte, bei denen eine Racemisierung des optisch reinen Ausgangsmaterials denkbar war.

Zur Untersuchung der NOHA-Prodrugs wurden die chromatographischen Bedingungen – analog zur Untersuchung der *N*^ω-alkylierten L-Arginine – so gewählt, dass die L-Enantiomere möglichst lange auf der Säule verweilen. Damit würde den D-Enantiomeren genügend Zeit zur Detektion gegeben, da sie im Vergleich kürzer retiniert werden. Auf die Synthese der korrespondierenden D-Enantiomere als HPLC-Standards wurde verzichtet, so dass zur Berechnung der Enantiomerenreinheit alle Peaks berücksichtigt wurden, die vor dem L-Enantiomer auftraten und innerhalb eines angenommenen Separationsfaktors von 1,8-2,8 lagen. Wie schon in Kap. 4.2.2 beschrieben, ist dies die typische Trennleistung für D,L-Arginin-Derivate. Zur eigentlichen Bestimmung des Enantiomerenüberschuss wurden dann 1 mM Lösungen der betreffenden Aminosäuren bestimmt. Da eine 1 μM Lösung noch zu quantifizieren war, konnte die Angabe der %*ee*-Werte mit einer Genauigkeit von ± 0,1 % erfolgen.

Für die Derivate der *O*-Methyl-Reihe wurde auf diese Weise eine Reinheit von > 99,5 %*ee* für die L-Enantiomere bestimmt (s. Tab. 4-4 und Abb. 4-5). Es sei dabei angemerkt, dass für die Analytik des Ethylesters und *N*^ω-Carbamates dem Fließmittel 2 % Methanol zugesetzt werden musste, da die Substanzen ansonsten > 25 min auf der Säule verweilen (auch bei höheren Flussraten) und damit eine starke Peakverbreiterung erfahren.

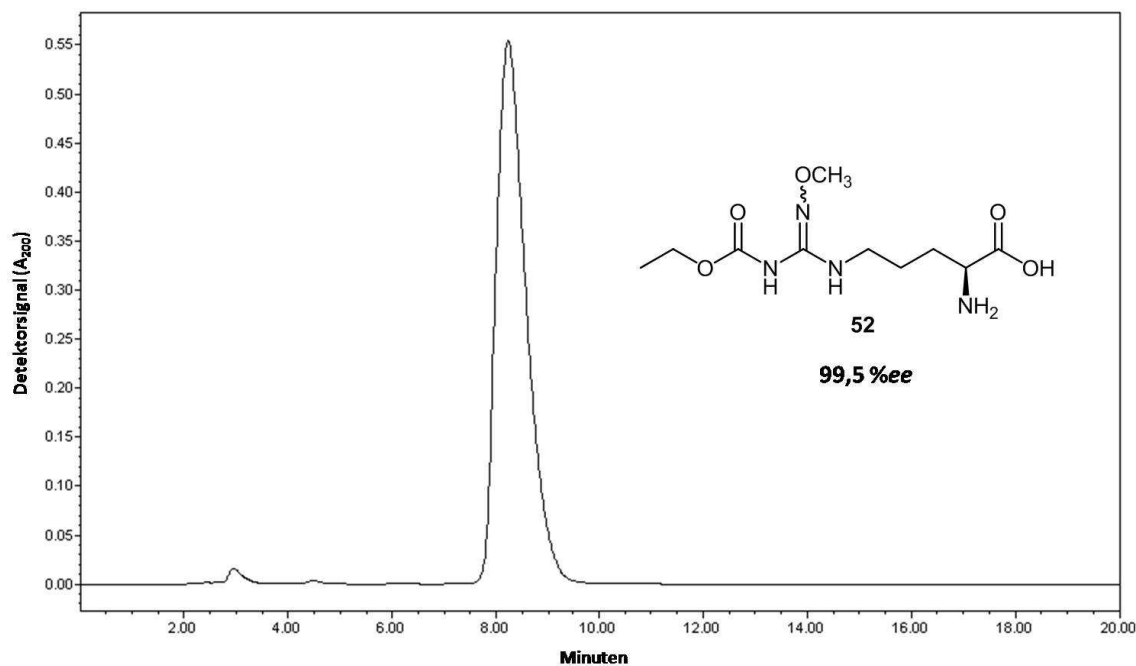


Abbildung 4-5: Repräsentatives Chromatogramm von N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -methoxy-L-arginin (**52**) auf einer Crownpak Cr(+)-Säule. Fließmittel: HClO_4 in *Aqua bidest.*, pH 1,5, 2 % Methanol; Flussrate: 0,4 mL/min; Detektion: 200 nm (Injektionspeak bei 3,1 min)

Tabelle 4-4: Crownpak Cr(+)-Analytik verschiedener N^{ω} -Methoxy-L-arginin Prodrugs

Verbindung	Methanol-Anteil ^a (%, v/v)	Flussrate (mL/min)	Retentionszeit (min)	%ee ^b
37a	0	0,6	6,6 ± 0,1	99,9
52	2	0,4	8,2 ± 0,2	99,5
49	2	0,4	9,1 ± 0,1	99,6

^a im Fließmittel = HClO_4 in *Aqua bidest.*, pH 1,5; ^b Die angegebenen Werte wurden mit einer Genauigkeit von ± 0,1 % bestimmt.

Aus der Reihe der *O*-carboxymethylierten Prodrugs wurde von N^{ω} -Carboxymethoxy-L-arginin (**56**) und N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin (**58**) die Enantiomerenreinheit bestimmt (s. Tab. 4-5). Die Reaktionsbedingungen der vollständigen Deprotektion in 6 N wässriger HCl (vgl. Kap. 3.3.3.2) für **56** haben

wahrscheinlich zu einer geringfügigen Racemisierung geführt, da 99,1 %*ee* für das L-Enantiomer bestimmt wurde (s. Abb. 4-6). Erstaunlich sind die bestimmten 99,0 %*ee* L-Enantiomer für *N*⁰-Ethoxycarbonyl-*N*⁰¹-(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin. Hier wäre denkbar, dass Verunreinigungen von 0,4-0,5 % zusammen mit dem D-Enantiomer eluieren und das Ergebnis verfälschen.

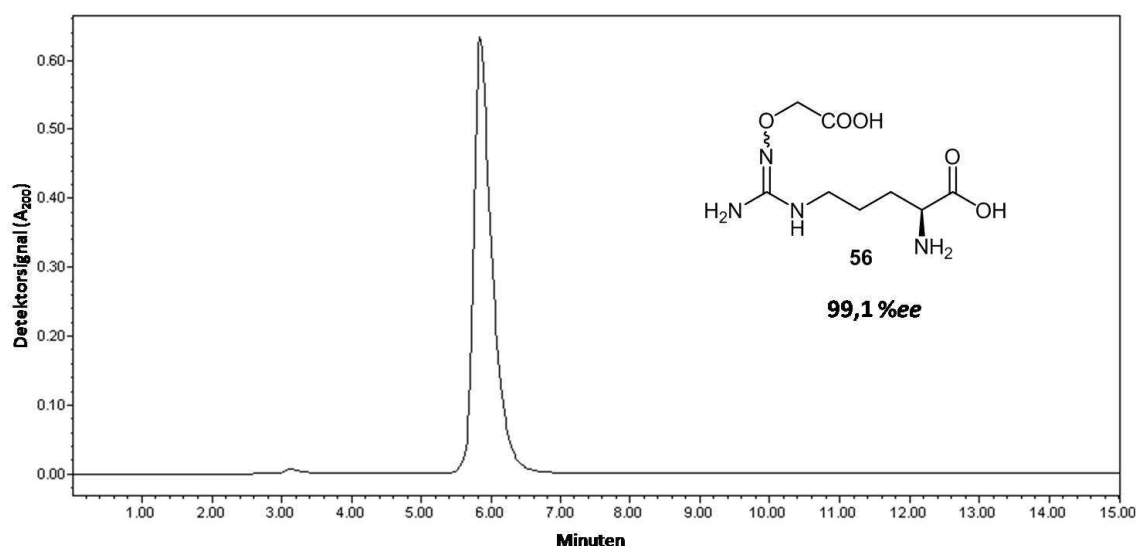


Abbildung 4-6: Repräsentatives Chromatogramm von *N*⁰-Carboxymethoxy-L-arginin (**56**) auf einer Crownpak Cr(+)-Säule. Fließmittel: HClO₄ in *Aqua bidest.*, pH 1,5; Flussrate: 0,4 mL/min; Detektion: 200 nm (Injektionspeak bei 3,1 min)

Tabelle 4-5: Crownpak Cr(+)-Analytik verschiedener *N*⁰-Carboxymethoxy-L-arginin-Prodruks

Verbindung	Methanol-Anteil ^a (%, v/v)	Flussrate (mL/min)	Retentionszeit (min)	% <i>ee</i> ^b
56	0	0,4	5,6 ± 0,2	99,1
58	10	1,0	8,8 ± 0,2	99,0

^a im Fließmittel = HClO₄ in *Aqua bidest.* (pH 1,5); ^b Die angegebenen Werte wurden mit einer Genauigkeit von ± 0,1 % bestimmt.

Die am höchsten substituierten Prodrugs N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -methoxy-L-arginin-ethylester (**53**) und N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin-ethylester (**59**) konnten mit dieser Analytik nicht auf ihre Enantiomerenreinheit geprüft werden, da die Verbindungen selbst mit einem Methanol-Anteil von 10 % und einer Flussrate von 1,0 mL/min zu lange auf der Säule verweilten. Höhere Methanol-Anteile werden von der Säule nicht toleriert (Herstellerangaben), da der chirale Selektor lediglich adsorptiv am Kieselgel gebunden ist.

4.3 ZUSAMMENFASSUNG

Für alle in dieser Arbeit synthetisierten Aminosäuren, bzw. Vertreter aller Derivate, wurden verschiedene HPLC-Methoden etabliert, die die Bestimmung der Enantiomerenreinheit ermöglichten.

Aus der Reihe der N^{δ} -methylierten Arginin-Derivate wurde eine HPLC-Analytik auf chiraler stationärer Phase (Crownpak Cr(+)-Säule) angewandt, nachdem Versuche unter Verwendung eines chiralen Fließmittels keine robuste Methode lieferten. Da von optisch reinem L-Ornithin ausgegangen wurde und die zunächst ermittelte Enantiomerenreinheit von N^{δ} -Methyl-L-arginin (**1**), N^{δ} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (**2**) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (**3**) bei 71 %ee lag, musste der Schritt der Racemisierung ermittelt und optimiert werden. Hierfür wurden N^{δ} -Methyl-L-ornithin (**18**) und seine direkten synthetischen Vorstufen – diese mit einer (R,R)-Whelk O1-Säule – untersucht. Der letzte Schritt der Tosyl- und Benzoylabspaltung mit HBr (47 % in Eisessig) erwies sich hierbei als problematisch, da **18** mit 71-72 %ee und die direkte Vorstufe **17** mit 98,8 %ee bestimmt wurden. Nach Optimierung von Reaktionszeit und -temperatur konnte N^{δ} -Methyl-L-ornithin jedoch mit einer Enantiomerenreinheit von 98,2 %ee gewonnen werden und damit auch alle N^{δ} -methylierten Endverbindungen.

Im Rahmen der Untersuchungen der N^{ω} -alkylierten L-Arginine, die v.a. als DDAH-Hemmstoffe getestet werden sollten, wurde ebenso auf die Crownpak Cr(+)-Analytik zurückgegriffen. Alle Substanzen konnten erwartungsgemäß als enantiomerenrein bestimmt werden (99,9 %ee), da die angewandte Dreistufensynthese unter vergleichsweise milden Bedingungen durchgeführt wurde.

Die N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs wurden prinzipiell auf dem gleichen Weg dargestellt wie die N^{ω} -alkylierten L-Arginine. Gewisse Unterschiede in Reaktionsbedingungen zur Schutzgruppenabspaltung – insbesondere bei der Synthese des N^{ω} -Carboxymethoxy-L-arginins (**56**) – könnten jedoch zu Racemisierungserscheinungen beigetragen haben und sollten untersucht werden. Die Crownpak Cr(+)-Analytik musste für diese Stoffklasse z.T. leicht modifiziert werden, da die Prodrugs lipophiler sind als die freien Aminosäuren und daher länger auf der Säule

zurückgehalten werden. Ein geringer Anteil an Methanol im Fließmittel wird von der Säule toleriert und brachte die gewünschten Ergebnisse. Für alle untersuchten Prodrugs wurde ein L-Enantiomerenüberschuss von > 99 % bestimmt und damit kein großes Racemisierungspotenzial in dieser Synthesesequenz gefunden.

5 UNTERSUCHUNG DER BIOAKTIVIERUNG O-CARBOXYMETHYLIERTER PRODRUGS

5.1 EINLEITUNG

Die Überführung eines Arzneistoffs in ein Prodrug bietet die Möglichkeit, seine physikochemischen, pharmakokinetischen und/oder pharmakodynamischen Eigenschaften zu verbessern. Auch ein gezielter Angriff bestimmter Zellen oder Gewebe kann mittels geeigneter Prodrug-Strategien erreicht werden.^{119,251} Aus diesen Gründen ist das sog. *Prodrug-Design* aus pharmazeutischer Sicht zu einem interessanten und wichtigen Aspekt der Arzneimittelforschung geworden (vgl. Kap. 1.2).

Innerhalb dieses Forschungsbereiches wird sich meist auf eine Verbesserung chemischer und pharmakokinetischer Eigenschaften potenzieller Arzneistoffkandidaten konzentriert. Dies führt einerseits zur Entwicklung neuer Stoffklassen, die rein chemisch-kontrolliert unter physiologischen Bedingungen zerfallen. Andererseits ist die Aufdeckung neuer Möglichkeiten der Bioaktivierung ebenso wichtig für die Entwicklung neuer Prodrug-Konzepte.

Im Arbeitskreis Clement wurde bereits die *N*-Reduktion erfolgreich zur Bioaktivierung diverser Amidoxime angewandt, wodurch für die zu Grunde liegenden Amidine eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit erzielt werden konnte (vgl. Kap. 1.2.3.1).^{130,133} Auch für Hydroxyguanidine sind solche Reduktionen beschrieben, wobei ihr Einsatz als Prodrugs für Guanidine aufgrund mangelnder chemischer Stabilität fraglich ist.^{135,136,139,140}

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unter anderem Prodrugs für das Hydroxyguanidin *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA, **5**) synthetisiert werden, die als Arzneistoffkandidaten zur Behandlung NO-defizienter Erkrankungen eingesetzt werden könnten (s. Abb. 2-2). Es war das Ziel, durch geeignete Substitution die Hydroxyguanidin-Funktion aus rein

chemischer Sicht zu stabilisieren sowie die pharmakokinetischen Eigenschaften von NOHA zu beeinflussen (vgl. Kap. 3.3). In diesem Zusammenhang sollte durch *O*-Substitution der Hydroxyguanidin-Einheit die Empfindlichkeit gegenüber Hydrolyse- und Oxidationsvorgängen erniedrigt werden.

Als weiterführende Prodrug-Konzepte für Amidoxime wurden bereits einige *O*-alkylierte und *O*-acylierte Derivate beschrieben (vgl. Kap. 1.2.3.2), während *O*-substituierte Hydroxyguanidine in einem solchen Kontext bislang nicht untersucht wurden. Besonders mittels *O*-Alkyl-Derivatisierung wurde für die eigenen NOHA-Prodrugs eine Stabilisierung erwartet.

Mit dem antiparasitär wirksamen *O*-Methylamidoxim DB844 konnte eine ausgezeichnete Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit gegen Trypanosomen-Infektionen erreicht werden.¹⁴² Hierbei findet vor der *N*-Reduktion eine oxidative *O*-Desalkylierung durch Cytochrom P450-Enzyme statt. In der Beteiligung von CYP450 zur Bioaktivierung wird allerdings ein gewisser Nachteil gesehen, da es zu Interaktionen mit anderen Substraten oder Inhibitoren dieser Enzyme kommen kann.

So stellte sich die Frage, ob es alternative Wege zur klassischen CYP450-katalysierten *O*-Desalkylierung gibt, die zur Bioaktivierung entsprechend substituierter Amidoxime und Hydroxyguanidine ausgenutzt werden könnten. In diesem Zusammenhang erschien die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM) interessant, die über eine Monooxygenase-Reaktion oxidative Desalkylierungen zu katalysieren vermag (s. Abb. 2-3).¹⁵⁴ In Anlehnung an deren physiologische Substrate (Peptide), die *N*-carboxymethyliert (Glycin-verlängert) sind, sollten in dieser Arbeit verschiedene *O*-carboxymethylierte Substanzen auf ihre PAM-Substrateigenschaften untersucht werden.

5.2 TESTUNGEN MIT DER PEPTIDYLGLYCIN α -AMIDIERENDEN MONOOXYGENASE (PAM) UND CYTOCHROM-P450-ENZYMQUELLEN

5.2.1 Einleitung

5.2.1.1 Vorkommen, Funktion und Katalyse von PAM

Die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase stellt in höheren Organismen (Wirbeltieren) ein bifunktionelles Enzym dar, welches aus einer Monooxygenase-Domäne (PHM, Peptidylglycin α -Hydroxylierende Monooxygenase, EC 1.14.17.3) und einer Lyase-Domäne (PAL, Peptidyl- α -hydroxyglycin α -Amidierende Lyase, EC 4.3.2.5) besteht. Beide Domänen sind in einer mRNA codiert und werden als ein einziges Protein translatiert, wobei sie in einigen Fällen – als Folge posttranslationaler Modifikation – separat isoliert wurden.^{252,253} Detaillierte Studien des PAM-Gens der Ratte deuten darauf hin, dass gewebespezifisches alternatives *Splicing* einige mRNAs generiert, die für mehr als sieben verschiedene PAM-Proteine codieren.¹⁵⁴ So resultiert z.B. ein lösliches PAM-Protein als Folge einer Deletion der transmembranären Domäne.

Insgesamt ist PAM einer stark gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen Regulation durch *Splicing* und Expression unterworfen. Wand *et al.* [1985] haben PAM-Aktivitäten in verschiedenen humanen Geweben untersucht und die höchste Aktivität in Geweben des ZNS (v.a. in der Hypophyse) detektiert. Keine Aktivität konnte hingegen in den klassischen Fremdstoff-metabolisierenden Organen Leber und Niere festgestellt werden.²⁵⁴ In Plasma, Herz und Lunge wurden ebenfalls Aktivitäten nachgewiesen, die für das angedachte Prodrug-Konzept ausgenutzt werden könnte.^{154,254} Im Sinne einer posttranslationalen Modifikation vermag PAM diverse physiologisch vorkommende Peptidhormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren (z.B. Substanz P, Neuropeptid Y, Oxytocin, Vasopressin, Calcitonin) zu aktivieren. Dabei werden die Peptide C-terminal amidiert, indem ein endständiges Glycin mittels oxidativer *N*-Desalkylierung in einer Monooxygenase-Reaktion abgespalten wird (s. Abb. 5-1).¹⁵⁴

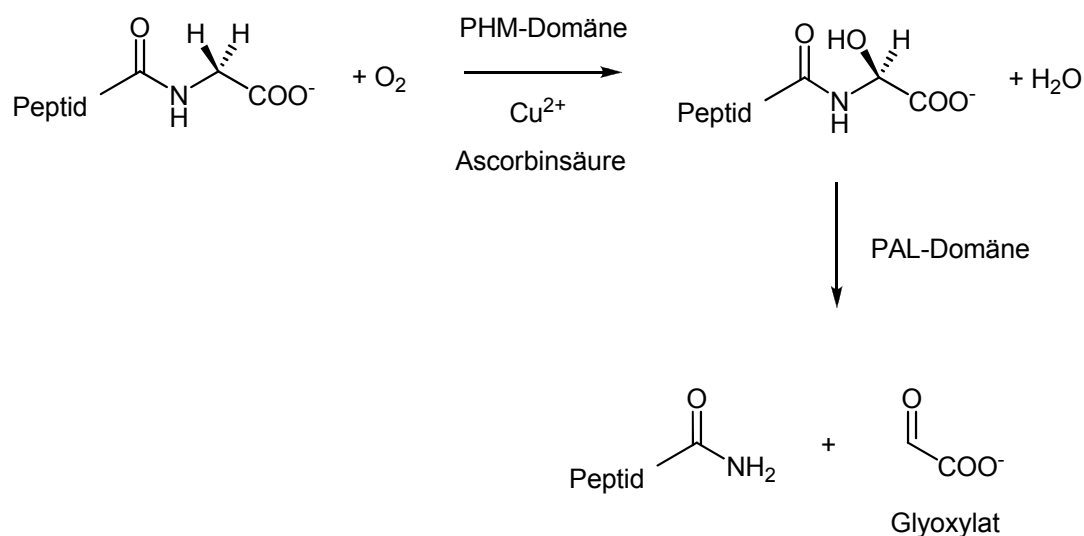


Abbildung 5-1: Katalysierte Reaktion der Peptidylglycin α -Amidierenden Monooxygenase. PHM, Peptidylglycin α -Hydroxylierende Monooxygenase; PAL, Peptidyl- α -hydroxyglycin α -Amidierende Lyase

Die PHM-Domäne benötigt Ascorbinsäure und Kupfer(II) für ihre katalytische Aktivität. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht vollständig geklärt, unterscheidet sich aber deutlich von den CYP450-katalysierten Monooxygenierungen.^{154,255-257} Für die PAL-katalysierte Spaltung des intermediären Halbaminals wird ein Zink-abhängiger basenkatalysierter Mechanismus postuliert.^{154,258}

Erstaunlich ist die geringe Substratspezifität dieses Enzyms, so dass auch von einer Reihe nicht-peptidischer Substrate berichtet wurde, die *N*- und *O*-desalkyliert sowie sulfoxidiert werden (Strukturen s. Abb. 5-2).¹⁵⁵ Interessant ist die von DeBlassio *et al.* [2000] beschriebene Bildung von Salicylamid aus Salicylursäure (**89**), einem Metaboliten von Acetylsalicylsäure.

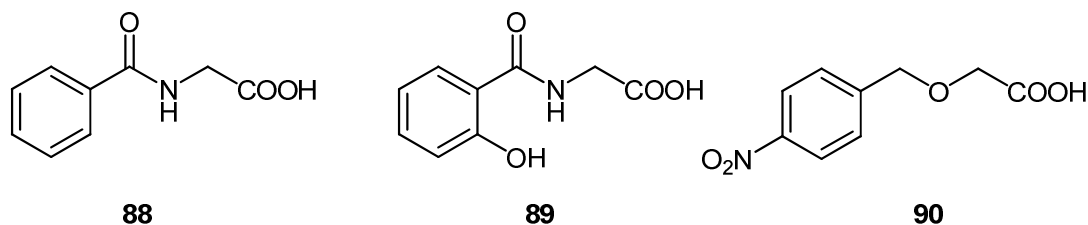


Abbildung 5-2: Auswahl an nicht-peptidischen Substraten der Peptidylglycin α -Amidierenden Monooxygenase: Hippursäure (**88**), Salicylursäure (**89**), 2-(4-Nitrobenzyloxy)essigsäure (**90**)

5.2.1.2 Das Cytochrom-P450-Enzymsystem

Der Großteil aller Oxidationen von Arzneistoffen und anderen körperfremden Substanzen wird von Enzymen der Cytochrom P450-Familie katalysiert, die damit im Zusammenhang mit den sog. Phase I-Reaktionen der Biotransformation die größte Bedeutung erlangen. Eine Einteilung der unterschiedlichen Enzyme erfolgt aufgrund von Homologie der Aminosäuresequenz in Familien, Subfamilien und in die entsprechende Isoform. CYP450-Enzyme sind hauptsächlich in der Leber lokalisiert, kommen aber auch in extrahepatischen Geweben vor. Wichtige Funktionen besitzen sie neben den Fremdstoff-metabolisierenden Reaktionen bei der Biosynthese verschiedener endogener Substanzen wie z.B. Steroide.²⁵⁹

Cytochrom P450-Enzyme bestehen aus einem Apoprotein und einem Häm-Gerüst als prosthetische Gruppe. Durch CYP450-Monooxygenasen wird die Einführung eines Sauerstoffatoms in ein Substrat unter gleichzeitiger Reduktion von molekularem Sauerstoff katalysiert. Neben dieser Aktivität sind sie aber auch in der Lage, Peroxidase- und Oxidase-Reaktionen zu katalysieren.²⁵⁹

5.2.1.3 Zielsetzung

Aufgrund der offensichtlich geringen Substratspezifität von PAM und seiner umfangreichen Expression in verschiedensten Geweben war die Überlegung, eine Carboxymethyl-Gruppe auf Amidoxime und Hydroxyguanidine zu übertragen, die somit möglicherweise von PAM als Substrate akzeptiert und bioaktiviert werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit für *in vitro*-Testungen *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) und *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) als Modellverbindungen synthetisiert (s. Kap. 3.4). Des Weiteren sollten verschiedene Substanzen auf Basis von Sulfhydroxamsäuren getestet werden, die für die Erklärung der *in vivo*-Wirksamkeit von *O*-carboxyalkylierten Derivaten des *N*-Hydroxy-Celecoxibs wichtig sein könnten (s. Kap. 5.2.2.5). Zudem erschien es wichtig, die *O*-carboxymethylierten Modellsubstanzen **6** und **7** mit verschiedenen CYP450-Enzymquellen auf eine mögliche Desalkylierung zu untersuchen und damit ausführliche Informationen über die Bioaktivierung dieser Prodrugs zu erhalten.

5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.2.1 Enzyminkubationen für PAM-Substratstudien

Für *in vitro*-Testungen wurde von der Firma Unigene Laboratories rekombinant exprimiertes PAM der Ratte zur Verfügung gestellt und die Inkubationsbedingungen in Anlehnung an verschiedene Literaturstellen gewählt.^{155,254,260,261} Eine Standardinkubation enthielt somit 25000 U/mL PAM, 250 U/mL Katalase, 1 µM Kupfer(II), 2 mM Ascorbinsäure und 5 mM Kaliumiodid. Kupfer(II) und Ascorbinsäure waren als Kosubstrate für die PAM-katalysierte Reaktion nötig. Der Zusatz von Katalase und Kaliumiodid sollte PAM vor einer Ascorbinsäure-vermittelten Inaktivierung schützen.²⁶⁰

Die ersten orientierenden Tests auf Substrateigenschaften wurden so durchgeführt, dass zunächst Glyoxalsäure als generelles Spaltprodukt aus der PAM-katalysierten Reaktion nachgewiesen wurde. Dazu wurde der von Katopodis und May [1990] entwickelte kolorimetrische Nachweis verwendet und auf ein Plattenreader-Format übertragen.¹⁵⁵

Für alle Verbindungen, die mittels kolorimetrischem Assay als Substrate identifiziert werden konnten, wurden zusätzlich HPLC-Methoden entwickelt, die zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter verwendet wurden.

5.2.2.2 Enzyminkubationen für CYP450-Substratstudien

Die Fremdstoff-metabolisierenden Cytochrom P450-Enzyme liegen im endoplasmatischen Retikulum membrangebunden vor und können somit mikrosomal isoliert werden. Mikrosomale Enzympräparationen eignen sich daher gut, um *in vitro*-Biotransformationsstudien durchzuführen. Für die Untersuchung der oxidativen *O*-Desalkylierung von *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) und *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) wurden daher Inkubationen mit Schweine- und Humanlebermikrosomen sowie den jeweiligen 9000 *g*-Überständen durchgeführt.

Die Inkubationsbedingungen wurden im Arbeitskreis Clement etabliert und unverändert übernommen.^{133,262} Die Aktivität der Enzympräparationen wurde durch Standardinkubationen mit Benzamidoxim sichergestellt. Obwohl oxidative Reaktionen von CYP450-Enzymen bevorzugt bei pH 7,4 mit NADPH als Kosubstrat ablaufen, wurden zusätzlich Inkubationen bei pH 6,0 mit NADH als Kosubstrat durchgeführt. Die Inkubation bei beiden pH-Werten liefert besonders aussagekräftige Informationen zum Metabolismus der Testverbindungen. Um sicherzustellen, dass selbst geringste Umsetzungen noch detektiert werden, wurden **6** und **7** in Konzentrationen bis 1 mM eingesetzt und bis zu 180 Minuten mit den jeweiligen Enzymquellen inkubiert.

Für die Vermessung der Inkubationsansätze musste die HPLC-Analytik so entwickelt werden, dass die Prodrugs (**6**, **7**), die möglichen desalkylierten Metabolite (**84**, **91**) sowie Benzamidin bzw. *N,N*-Diphenylguanidin – als mögliche *N*-Reduktionsprodukte – voneinander getrennt werden können.

5.2.2.3 Substratstudien mit *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**)

Als Modellverbindung für Amidoxime wurde *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) auf seine PAM-Substrateigenschaften getestet (s. Abb. 5-3).

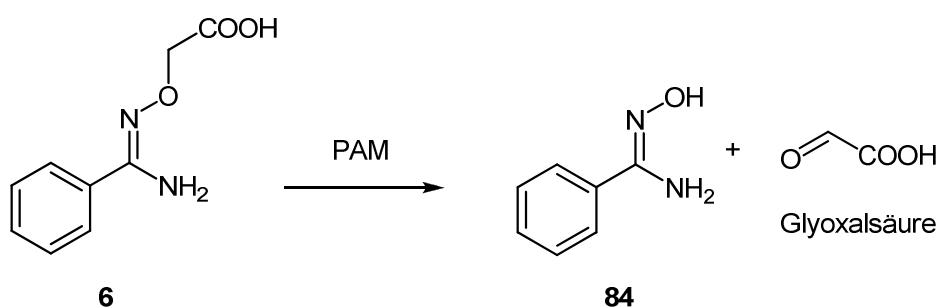


Abbildung 5-3: PAM-katalysierte Bioaktivierung von *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) zu Benzamidoxim (**84**) unter gleichzeitiger Freisetzung von Glyoxalsäure.

Im kolorimetrischen Assay erfolgte eine 5-Punkt-Kalibrierung von Glyoxylat parallel zur Testung von **6**. Die Kalibrierung war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 1,000$).

Wie in Abbildung 5-4 zu sehen ist, konnte die Bildung von Glyoxylat als Spaltprodukt der PAM-Katalyse von **6** in einer konzentrationsabhängigen Weise nachgewiesen werden. Die Inkubationen bei dem pH-Optimum von PAM (pH 6,0) resultierten, im Vergleich zur Inkubation bei pH 7,4, in deutlich höheren Umsetzungen.

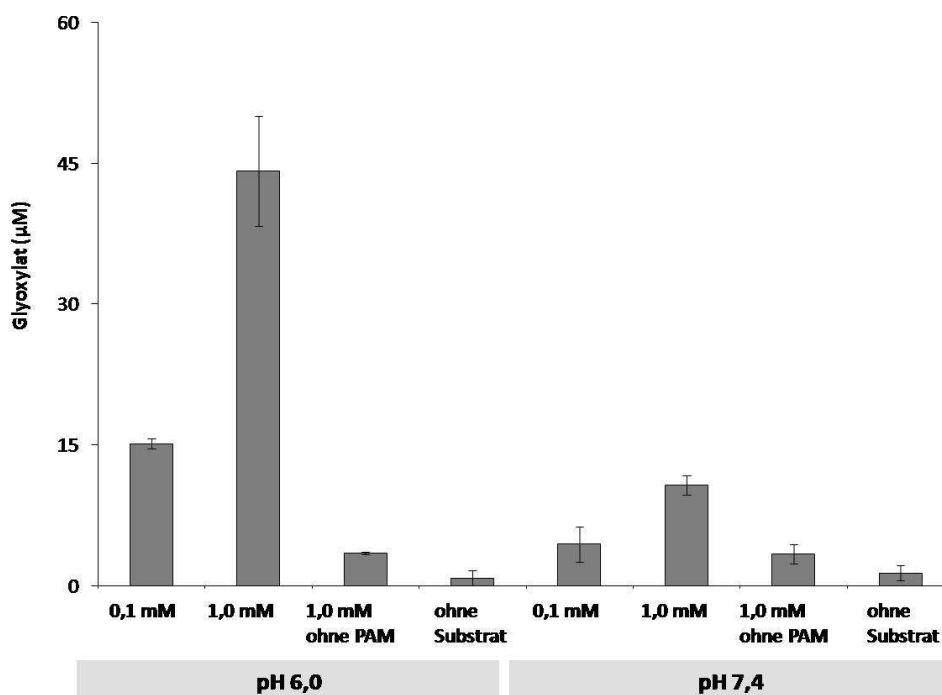


Abbildung 5-4: Kolorimetrische Bestimmung der PAM-katalysierten Glyoxylat-Bildung aus *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) bei unterschiedlichen pH-Werten und einer Inkubationszeit von 180 min. Die ermittelten Glyoxylat-Konzentrationen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Da *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) diesen Ergebnissen nach als Substrat von PAM akzeptiert wird, sollte die Reaktion durch Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte genauer charakterisiert werden. Für diesen Zweck wurde eine von Friedrich [2003] ursprünglich zur Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin entwickelte HPLC-Analytik in modifizierter Form übernommen.²⁶³ Die Kalibriergerade für Benzamidoxim war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 1,000$) und die Wiederfindungsrate betrug 130,6 % ($r^2 = 0,999$).

Aus zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$) ergab sich ein K_M -Wert von $307 \pm 80 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $393 \pm 40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PAM}$. In Abbildung 5-5 ist eine solche Bestimmung repräsentativ dargestellt.

Diesen Ergebnissen zur Folge ist *O*-Carboxymethylbenzamidoxim ein vergleichbar gutes Substrat wie die von Katopodis und May [1990] beschriebenen nicht-peptidischen Verbindungen.¹⁵⁵

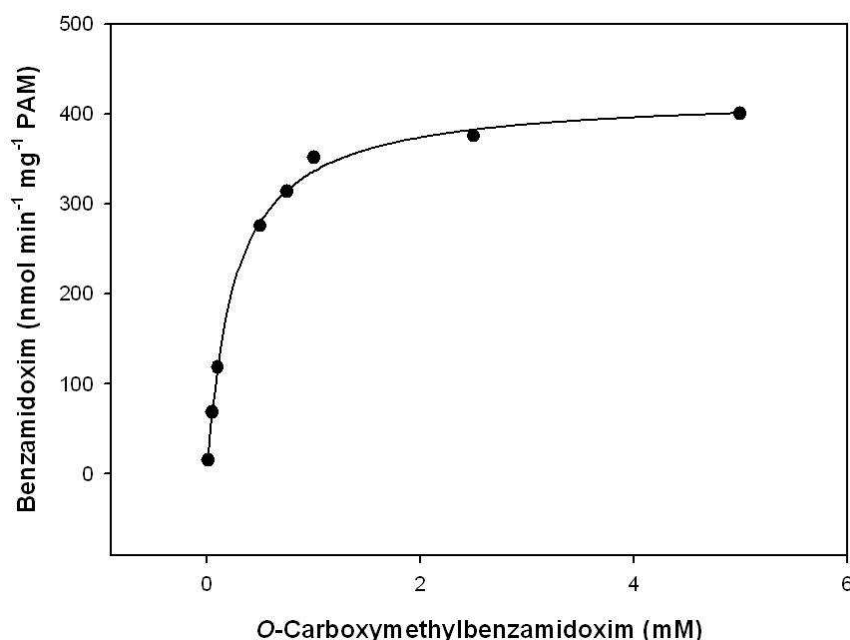


Abbildung 5-5: Repräsentative K_M - und V_{max} -Bestimmung für die PAM-katalysierte Umsetzung von *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) zu Benzamidoxim (**84**) mittels HPLC unter Standardinkubationsbedingungen bei pH 6,0 und einer Inkubationszeit von 30 min. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte aus zwei Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden ($r^2 = 0,998$, $n = 1$).

So wird z.B. für die *O*-Desalkylierung von 2-(4-Nitrobenzyloxy)essigsäure (**90**) ein K_M -Wert von 160 μM und ein V_{max} -Wert von 23 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PAM}$ beschrieben. Die *N*-Desalkylierung von Salicylurat (**89**) wird in der Literatur mit einem K_M -Wert von $860 \pm 23 \mu\text{M}$ und einem V_{max} -Wert von $4900 \pm 540 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PAM}$ angegeben.²⁶¹ Es sei an dieser Stelle jedoch angemerkt, dass der direkte Vergleich aufgrund der Verwendung unterschiedlicher PAM-Enzymquellen schwierig ist.

Für die CYP450-Substratstudien wurde die oben angesprochene HPLC-Analytik so abgeändert, dass zusätzlich die Detektion des denkbaren Metaboliten Benzamidin, als Produkt aus der *N*-Reduktion von Benzamidoxim (**84**), möglich ist. Bei pH 6,0 sowie pH 7,4 konnten mit allen verwendeten CYP450-Enzymquellen weder Benzamidoxim, noch Benzamidin nachgewiesen werden.

Auf Basis der Benzamidoxim-Modellverbindung **6** scheint die *O*-Carboxymethyl-Funktion nur von PAM, nicht jedoch von Cytochrom P450 im Sinne einer Monooxygenase-Reaktion entfernt zu werden.

5.2.2.4 Substratstudien mit *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**)

Als Modellverbindung für Hydroxyguanidine wurde *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) auf seine PAM-Substrateigenschaften getestet (s. Abb. 5-6).

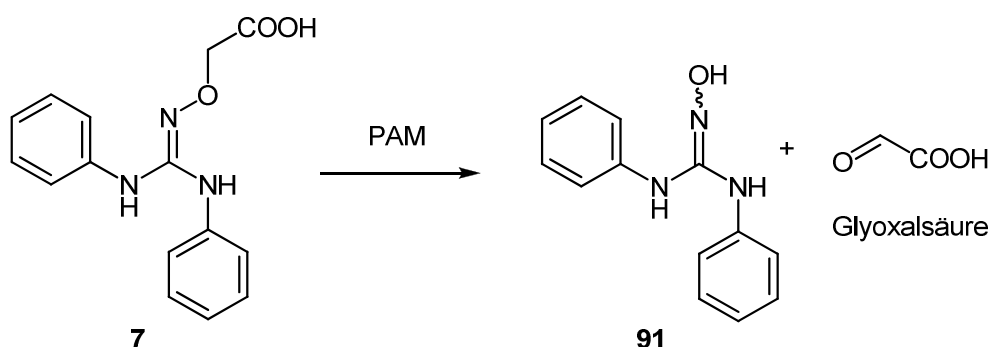


Abbildung 5-6: PAM-katalysierte Bioaktivierung von *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) zu *N,N'*-Diphenyl-*N''*-hydroxyguanidin (**91**) unter gleichzeitiger Freisetzung von Glyoxalsäure.

Die ersten Ergebnisse im kolorimetrischen Assay mit **7** (Daten nicht gezeigt) waren vergleichbar mit denen der Amidoxim-Modellverbindung **6**. Somit wurde zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte eine HPLC-Analytik entwickelt, die das Prodrug **7** und das Hydroxyguanidin **91** innerhalb von 15 Minuten auf einer RP-Säule zu trennen vermag. Die Kalibriergerade für *N,N'*-Diphenyl-*N''*-hydroxyguanidin (**91**) war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,999$) und die Wiederfindungsrate betrug 111,7 % ($r^2 = 0,999$).

Aus zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$) ergab sich ein K_M -Wert von $37 \pm 5 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $373 \pm 53 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ PAM. In Abbildung 5-7 ist eine solche Bestimmung repräsentativ dargestellt.

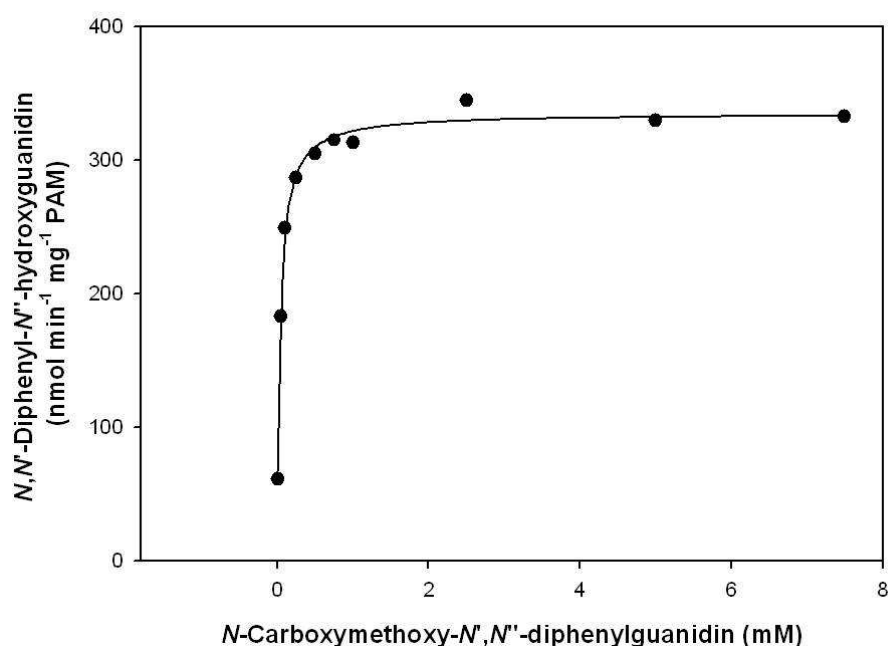


Abbildung 5-7: Repräsentative K_M - und V_{max} -Bestimmung für die PAM-katalysierte Umsetzung von *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) zu *N,N'*-Diphenyl-*N''*-hydroxyguanidin (**91**) mittels HPLC unter Standardinkubationsbedingungen bei pH 6,0 und einer Inkubationszeit von 30 min. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte aus zwei Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden ($r^2 = 0,993$, $n = 1$).

Aus dem ermittelten K_M -Wert lässt sich eine ca. 8-fach höhere Affinität zu PAM im Vergleich zum Amidoxim-Prodrug **6** ableiten, während die Umsetzungsrate vergleichbar ist. Wie schon für **6** in Kap. 5.2.2.3 diskutiert, sind diese enzymkinetischen Parameter vergleichbar mit literaturbekannten nicht-peptidischen PAM-Substraten.

Für die CYP450-Substratstudien wurde die für die PAM-Substratstudien entwickelte HPLC-Analytik so abgeändert, dass zusätzlich die Detektion des denkbaren Metaboliten *N,N'*-Diphenylguanidin, als Produkt aus der *N*-Reduktion vom Hydroxyguanidin **91**, möglich ist. Bei pH 6,0 sowie pH 7,4 konnten mit allen verwendeten CYP450-Enzymquellen nach 180 Minuten Inkubationszeit weder **91**, noch *N,N'*-Diphenylguanidin nachgewiesen werden.

In Analogie zu *O*-Carboxymethylbenzamidoxim scheint auch auf Basis der Hydroxyguanidin-Modellverbindung **7** die *O*-Carboxymethyl-Funktion nur von PAM, nicht jedoch von Cytochrom P450 im Sinne einer Monooxygenase-Reaktion entfernt zu werden.

5.2.2.5 *O*-Carboxylierte Sulfhydroxamsäuren

Szabo *et al.* [2008] haben neue Celecoxib-Derivate mit ausgezeichneter antiinflammatorischer Wirksamkeit beschrieben, die z.T. besser ist als die von Celecoxib selbst.²⁶⁴ Es handelt sich dabei um *O*-carboxyalkylierte Derivate des *N*-Hydroxy-Celecoxibs, die *in vitro* unwirksam sind, *in vivo* jedoch entzündungshemmende Effekte zeigen. Damit liegt der Schluss nahe, dass es sich bei diesen Substanzen um Prodrugs handelt, die erst nach Bioaktivierung ihre Wirkung entfalten.

Es sollten folglich zwei Vertreter dieser Celecoxib-Derivate (**92a,b**) an der Peptidylglycin α -Amidierenden Monooxygenase getestet werden. Des Weiteren sollte mit einer einfachen Modellverbindung (**93**) die Bioaktivierung solcher Sulfhydroxamsäure-Derivate untersucht werden (s. Abb. 5-8).

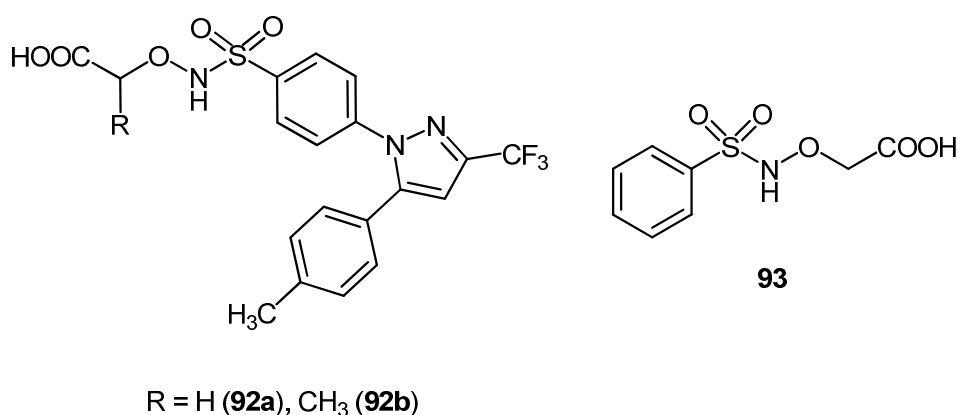


Abbildung 5-8: *O*-carboxylierte Sulfhydroxamsäuren als potenzielle PAM-Substrate: Celecoxib-Derivate (**92a,b**), *O*-Carboxymethylbenzylsulfhydroxamsäure (**93**) als Modellverbindung.

Analog zur Testung der Amidoxim- und Hydroxyguanidin-Prodrugs sollten die Sulfhydroxamsäure-Derivate zunächst im kolorimetrischen Assay auf die PAM-katalysierte Glyoxylat-Freisetzung getestet werden. Es erfolgte eine 5-Punkt-Kalibrierung von Glyoxylat parallel zur Testung von **92a** und **93**. Die Kalibrierung war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 1,000$). Prodrug **92b** wurde nicht auf diese Weise getestet, da bei dieser Verbindung nicht Glyoxylat, sondern Pyruvat freigesetzt würde. Stattdessen wurde es ausschließlich mittels HPLC-Analytik untersucht.

Wie in Abbildung 5-9 zu sehen ist, konnte für **92a** keine signifikante PAM-katalysierte Freisetzung von Glyoxylat detektiert werden. Ebenso verhielt es sich mit der Modellverbindung **93** (Daten nicht gezeigt).

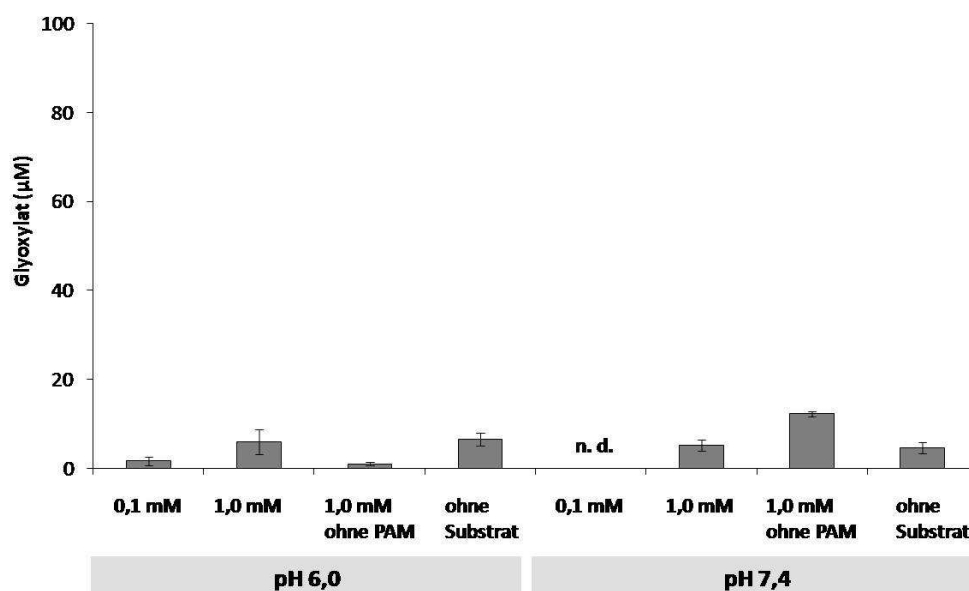


Abbildung 5-9: Kolorimetrische Bestimmung der PAM-katalysierten Glyoxylat-Bildung aus dem Celecoxib-Derivat **92a** bei unterschiedlichen pH-Werten und einer Inkubationszeit von 180 min. Die ermittelten Glyoxylat-Konzentrationen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden (n. d. = nicht detektiert).

Um die aus diesem Assay erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden für die Celecoxib-Derivate **92a** und **92b** zusätzlich HPLC-Analytiken entwickelt. Auf einer RP-8-Säule war die Trennung der Prodrugs **92a** bzw. **92b** und Celecoxib innerhalb von 15 Minuten möglich. Der direkte Metabolit *N*-Hydroxy-Celecoxib aus der postulierten PAM-Katalyse konnte nicht als Standard für diese Analytik verwendet werden, da er nach Angaben von Szabo *et al.* instabil ist und rasch zu Celecoxib zerfällt.²⁶⁴ In PAM-Inkubationen mit **92a** sowie mit **92b** konnte nach 60 und 180 Minuten Inkubationszeit jeweils kein Celecoxib nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Sulfhydroxamsäure-Derivate nicht als Substrate von der Peptidylglycin α -Amidierenden Monoxygenase akzeptiert werden. Für eine Erklärung der Wirksamkeit der Celecoxib-Derivate **92a,b** *in vivo* müssen somit andere Bioaktivierungsmechanismen untersucht werden, wie z.B. eine Metabolisierung durch Cytochrom P450.

5.3 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM), die physiologischerweise *N*-carboxymethylierte (Glycin-verlängerte) Peptide oxidativ *N*-desalkyliert, als ein neues Prodrug-aktivierendes Enzym untersucht.

Als Modellsubstanzen für Amidoxim- und Hydroxyguanidin-Prodrugs wurden *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) und *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) getestet. Verschiedene Sulfhydroxamsäure-Derivate (**92a,b**, **93**) wurden ebenfalls auf PAM-Substrateigenschaften untersucht, da die Celecoxib-Derivate **92a,b** *in vitro* unwirksam sind, *in vivo* jedoch eine entzündungshemmende Wirkung zeigen. Für die Testungen wurde, zusätzlich zu einem literaturbekannten kolorimetrischen Glyoxylat-Nachweis, für jede Substanz eine geeignete HPLC-Methode zur Trennung der denkbaren Metabolite entwickelt.

Für *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) wurde ein K_M -Wert von $307 \pm 80 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $393 \pm 40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ PAM bestimmt. Das Hydroxyguanidin-Prodrug **7** wird vergleichbar umgesetzt (V_{max} -Wert = $373 \pm 53 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ PAM), weist aber mit einem K_M -Wert von $37 \pm 5 \mu\text{M}$ eine höhere Affinität zum Enzym auf. Damit sind die getesteten Prodrugs vergleichbar gute Substrate wie verschiedene literaturbeschriebene nicht-peptidische Verbindungen und stellen die ersten Vertreter aus den Stoffklassen der Amidoxime und Hydroxyguanidine dar. Des Weiteren wurde ein Cytochrom P450-vermitteltes Interaktionspotenzial der beiden Prodrugs **6** und **7** untersucht, indem sie an unterschiedlichen CYP450-Enzymquellen getestet wurden. Es konnte jedoch keine *O*-Desalkylierung zu Benzamidoxim (**84**) bzw. *N,N'*-Diphenyl-*N''*-hydroxyguanidin (**91**) nachgewiesen werden, so dass offensichtlich eine CYP450-unabhängige Bioaktivierung durch PAM möglich ist.

Alle getesteten Sulfhydroxamsäure-Derivate werden hingegen nicht als PAM-Substrate akzeptiert, so dass gerade für die Erklärung der *in vivo*-Wirksamkeit der Celecoxib-Derivate **92a,b** weitere Bioaktivierungsmechanismen untersucht werden müssen.

In Anlehnung an diese Daten könnte eine *O*-Carboxymethylierung folglich zur Erweiterung des Prodrug-Konzeptes von Amidoximen Anwendung finden (vgl. Kap. 1.2.3.2). So könnten z.B. schlecht lösliche Verbindungen in besser lösliche Prodrugs überführt werden. Auch chemisch und metabolisch instabile Hydroxyguanidine könnten auf diese Weise in stabile Prodrugs überführt werden, wie es im Rahmen dieser Arbeit bereits mit **58** und **59** als *N*⁶-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs realisiert wurde (s. Kap. 3.3).

Weitergehende Untersuchungen mit den Modellverbindungen *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) und *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) oder sogar mit entsprechend substituierten Arzneistoffkandidaten sollten sich darauf konzentrieren, das neue Prodrug-Konzept *in vivo* zu testen und die Pharmakokinetik dieser Prodrugs zu untersuchen.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Unter Berücksichtigung der mannigfaltigen Funktionen von Stickstoffmonoxid ist die strenge Regulation endogener NO-Konzentrationen von großer physiologischer bzw. pathophysiologischer Bedeutung. So wird eine Dysregulation mit diversen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, sowohl aufgrund einer erniedrigten NO-Verfügbarkeit, als auch aufgrund pathologisch hoher NO-Spiegel. Deshalb ist es eine große Herausforderung, Wirkstoffe zu entwickeln, die gezielt nur bestimmte NO-vermittelte Effekte beeinflussen sollen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Konzepte zur pharmakologischen Beeinflussung von NO-Konzentrationen verfolgt werden. Einige wichtige Enzyme im NO-regulierenden System – NO-Synthasen, Arginase und Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) – stellen die Zielstrukturen zur Entwicklung neuer potenzieller Modulatoren dar. Unter Berücksichtigung, dass nahezu alle diese Enzyme L-Arginin oder -Analoge als Substrate umsetzen, sollten im Sinne einer Substrat-basierten Wirkstoffentwicklung vor allen Dingen weitere Arginin-Derivate synthetisiert werden:

- N^{δ} -methylierte Derivate des L-Arginins
- N^{ω} -substituierte L-Arginine sowie unsymmetrisch-substituierte Guanidine
- N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA)-Prodrugs sowie analoge Modellverbindungen zur Untersuchung neuer Prodrug-Konzepte

Methylierte L-Arginine wie N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) sind als endogene Hemmstoffe der NO-Synthasen in ihrer (patho)physiologischen Bedeutung gut untersucht. Basierend auf der Entdeckung von N^{δ} -Methyl-L-arginin (**1**) in Hefezellen, stellte sich die Frage, ob eine solche Methylierung als posttranslationale Modifikation ebenso von Bedeutung im Menschen sein könnte. Die Beeinflussung des NO-generierenden Systems durch N^{δ} -Methyl-L-arginin sollte im Arbeitskreis untersucht werden, wofür nicht nur **1**, sondern auch alle

denkbaren Metabolite aus der NOS-Katalyse über einen gemeinsamen Syntheseweg erfolgreich dargestellt wurden.

Ausgehend von N^δ -Methyl-L-ornithin (**18**) konnte durch Ausbildung verschiedener Bor-Komplexe die α -Aminosäure-Funktion in einem Schritt geschützt werden. Somit wurden neben N^δ -Methyl-L-arginin (**1**) auch N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**), N^δ -Methyl-L-citrullin (**3**) und N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin (**4**) durch entsprechende Modifikationen in der Seitenkette erhalten. Insbesondere die Verwendung von Bis(9-borabicyclo[3.3.1]nonan) als Komplexierungsreagenz erwies sich als vorteilhaft, da es schnell und effizient eingeführt werden konnte und die synthetischen Intermediate gut zu handhaben waren.

Von den NOSs, der DDAH und der Arginase ist bekannt, dass sie eine hohe Substratspezifität für die natürlich vorkommenden L-Aminosäuren aufweisen und die entsprechenden D-Enantiomere nicht als Substrate akzeptieren, so dass alle wichtigen Syntheseprodukte auf ihre Enantiomerenreinheit untersucht wurden. Für den letzten Schritt der Vierstufen-Synthesen von N^δ -Methyl-L-ornithin wurde ein Racemisierungspotenzial aufgedeckt und die Vorschrift so geändert, dass es mit einem L-Enantiomerenüberschuss von 98 %*ee* erhalten werden konnte. Alle folgenden Schritte waren so schonend, dass die erwünschten Produkte **1-3** enantiomerenrein (> 98 %*ee*) erhalten werden konnten.

Aus den Testergebnissen, die im Rahmen der gleichzeitig angefertigten Dissertation von J. Kotthaus mit den N^δ -Methyl-L-arginin-Derivaten (**1-4**) erhalten wurden, ging hervor, dass diese Substanzen auf die NOS-Isoenzyme und die DDAH-1 kaum Effekte ausüben. Damit ist die postulierte physiologische Bedeutung von N^δ -Methyl-L-arginin – zumindest im NO-generierenden System – wahrscheinlich nicht gegeben. Interessant ist jedoch, dass N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (**2**) einen potenten Inhibitor der bovinen Arginase 1 ($K_i = 17 \mu\text{M}$) darstellt. Eine N^δ -Methylierung scheint die Affinität zu diesem Enzym, im Gegensatz zu den NOSs und der DDAH, zu erhöhen und stellt somit eine Möglichkeit dar, eine Selektivität gegenüber NO-Synthasen zu erzielen. Da das um eine Methylengruppe verkürzte N^ω -Hydroxy-*nor*-L-arginin ein 60-80-fach besserer

Hemmstoff als N^{ω} -Hydroxy-L-arginin ist, könnte **2** in analoger Weise verkürzt werden, um die Hemmpotenz weiter zu erhöhen.

In pathophysiologischen Situationen erhöhter NO-Konzentrationen, wie sie z.B. bei neurodegenerativen oder entzündlichen Erkrankungen vorkommen, könnten Hemmstoffe der DDAH Anwendung finden. So konnte mittlerweile *in vivo* gezeigt werden, dass eine Hemmung zur Therapie von chronischen Schmerzen und dem septischen Schock ausgenutzt werden kann. Für die Leitstruktur-Optimierung der beiden potentesten Hemmstoffe der hDDAH-1 N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (**L-257**, **37b**; $K_i = 13 \mu\text{M}$) und N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-L-NIO, **25**; $K_i = 2 \mu\text{M}$) sollte eine Reihe bekannter und neuer N^{ω} -substituierter L-Arginine sowie diverse 2-Methoxyethyl-substituierte Guanidine synthetisiert werden.

Durch die Umsetzung von Carbamoylthioharnstoffen mit verschiedensten Aminen, in Gegenwart von EDCI als Entschwefelungsreagenz, war eine ganze Reihe unsymmetrisch-substituierter Guanidine einfach und in sehr guten Ausbeuten zugänglich. So wurden die L-Arginin-Derivate **37a-i** und die 2-Methoxyethyl-substituierten Guanidine **41a-e** auf diesem Weg erfolgreich dargestellt. Alle synthetisierten Aminosäuren (**37a-i**) konnten in enantiomerenreiner Form (> 99 %*ee*) erhalten werden, da die angewandte Dreistufen-Synthese unter vergleichsweise milden Bedingungen durchgeführt wurde.

Aus den Hemmdaten dieser Substanzen lassen sich eine Reihe neuer Struktur-Aktivitätsbeziehungen ableiten, da insbesondere über die Guanidinium-Bindungstasche der DDAH wenig bekannt war. Das Hauptproblem stellt jedoch die mangelnde Selektivität der meisten Verbindungen gegenüber den NO-Synthasen dar. Der interessanteste synthetisierte Hemmstoff ist *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin (**41b**, $K_i = 18 \mu\text{M}$), welcher vergleichbar potent ist wie L-257 und die NOS noch weniger beeinflusst. Als "Nicht-Aminosäure" weist dieses Guanidin zudem vorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften auf und stellt damit eine neue Leitstruktur für DDAH-Inhibitoren dar.

Die Behandlung der mit endothelialer Dysfunktion assoziierten Erkrankungen mit konventionellen Stickstoffmonoxid-Donoren kann Nachteile mit sich bringen, so dass mittlerweile viele Ansätze verfolgt werden, möglichst nebenwirkungsarme NO-freisetzende Wirkstoffe oder andere Konzepte zur Erhöhung der NO-Verfügbarkeit zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenartige Prodrugs von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin – dem natürlichen und besten Substrat der NO-Synthase – synthetisiert. Über diese Strategie würde NO dort freigesetzt, wo es benötigt und in zu geringem Ausmaß gebildet wird. Da eine erhöhte Arginase-Aktivität als Mechanismus der verminderten NO-Verfügbarkeit und damit als beteiligter Faktor bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion diskutiert wird, könnte gleichzeitig die sehr gute Arginase-Hemmung durch NOHA ausgenutzt werden.

Die Übertragung verschiedener Prodrug-Konzepte auf NOHA zielte darauf ab, die Arzneistoffqualitäten dieser Aminosäure zu verbessern. So wurde durch geeignete Substitution versucht, sowohl die Hydroxyguanidin-Funktion aus chemischer und metabolischer Sicht zu stabilisieren, als auch die pharmakokinetischen Eigenschaften hinsichtlich passiver Diffusionsvorgänge zu verbessern.

Als besonders effizient hat sich die Synthesestrategie bewährt, die schon erfolgreich für die Darstellung der N^{ω} -substituierten L-Arginine (**37a-i**) angewandt wurde. Ausgehend von Carbamoylthioharnstoffen, passend *O*-substituierten Hydroxylaminen und EDCI als Entschwefelungsreagenz konnten in sehr guten Ausbeuten diverse *O*-methylierte (**49**, **52** und **53**) und *O*-carboxymethylierte (**58** und **59**) Prodrugs sowie ein *O*-acetalisch-substituiertes Prodrug (**72**) erhalten werden. Einzig die Verfügbarkeit des entsprechend *O*-substituierten Hydroxylamins war der limitierende Faktor für die Darstellung weiterer angedachter Prodrugs. Künftige Arbeiten sollten sich deshalb auf die Synthese solcher Hydroxylamine konzentrieren, um von der hier entwickelten Synthesestrategie Gebrauch machen zu können. Für einige repräsentative Prodrugs wurde ein L-Enantiomerenüberschuss von > 99 % bestimmt und damit kein großes Racemisierungspotenzial in dieser Synthesesequenz gefunden.

Die Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften und *in vivo*-Wirksamkeit der sehr unterschiedlich substituierten Prodrugs soll in künftigen Arbeiten erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch die *in vitro*-Bioaktivierung von *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) und *N*-Carboxymethoxy-*N,N'*-diphenylguanidin (**7**), die als Modellsubstanzen für Amidoxim- und Hydroxyguanidin-Prodrugs synthetisiert wurden, untersucht. Interessant erschien in diesem Zusammenhang die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM), die physiologischerweise *N*-carboxymethylierte (Glycin-verlängerte) Peptide oxidativ *N*-desalkyliert. Beide getesteten Prodrugs wurden von PAM effektiv umgesetzt, mit K_M -Werten von 307 μM (**6**) und 37 μM (**7**) bei Umsetzungsraten von etwa 380 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ PAM. Damit sind sie die ersten Vertreter ihrer Stoffklassen, die von PAM als Substrate akzeptiert werden. Da keine *O*-Desalkylierung zu Benzamidoxim bzw. *N,N'*-Diphenyl-*N''*-hydroxyguanidin mit verschiedenen porcinen und humanen Leberenzymquellen nachgewiesen werden konnte, ist offensichtlich eine CYP450-unabhängige Bioaktivierung durch PAM möglich. Folglich könnte eine *O*-Carboxymethylierung zur Erweiterung des Prodrug-Konzeptes von Amidoximen Anwendung finden. Auch chemisch und metabolisch instabile Hydroxyguanidine könnten auf diese Weise in stabile Prodrugs überführt werden, wie es im Rahmen dieser Arbeit bereits mit **58** und **59** als *N*^ω-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs realisiert wurde.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 SYNTHESSEN

7.1.1 Geräte und Materialien

Elementaranalysen:

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

IR-Spektroskopie:

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurde das Perkin-Elmer 16 PC FT-IR Gerät verwendet.

NMR-Spektroskopie:

Kernresonanzspektrometer Bruker ARX 300

^1H -NMR: Messfrequenz = 300.13 MHz

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

Interne Standards: Tetramethylsilan (TMS), Natrium-3-(trimethylsilyl)-1-propan-sulfonat (TPS). Sind keine internen Standards angegeben, wurden die Verschiebungen auf die Lösungsmittelrestsignale bezogen.

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts, t = Triplett, dt = Dublett eines Triplets, q = Quartett, qn = Quintett, sp = Septett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal, J = Kopplungskonstante in Hz, Ar = Aromat

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

Massenspektrometrie:

Hewlett-Packard MS-Engine 5989 A, Elektronenstoßionisierung (EI) bei 70 eV, Direkteinlass: Schubstange IGT (Instrumente und Geräte Technik GmbH), Wolfram-Wendel, Temperatur der Ionenquelle: 250 °C, Quadrupol-Temperatur: 120 °C;

Bruker Esquire-LC, Elektrosprayionisierung (ESI), Direkteinlass als Methanol-Wasser-Lösung.

Hochauflösende Massenspektrometrie:

Bruker 7.4 Tesla FT-ICR Massenspektrometer BioApex II, Elektrosprayionisierung (ESI) am Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig.

Schmelzpunkte:

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

Dünnschichtchromatographie:

Es wurden die folgenden DC-Fertigplatten verwendet: Kieselgel, Polygram SIL G/UV₂₅₄ 0.25 mm (Fa. Macherey und Nagel); Cellulose UV₂₅₄ (Fa. Merck). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm. Substanzen, die so nicht detektierbar waren, wurden mit folgenden Sprüh- bzw. Tauchreagenzien sichtbar gemacht:

Reagenz A: Ninhydrin-Sprühlösung

150 mg Ninhydrin, 47,5 mL *i*-Propanol, 2,5 mL Eisessig

Reagenz B: Dragendorff-Reagenz R 2 (DAB 9)²⁶⁵

Das fertige Reagenz wird als Lösung zum Eintauchen der DC-Platten verwendet.

Reagenz C: unspezifisches Oxidanz (Sprühlösung)

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

Reagenz D: FCNP-Sprühlösung (*ferricyanide-nitroprusside*)²⁶⁶

10 % (m/v) NaOH in Wasser, 10 % (m/v) Nitroprussid-Natrium in Wasser, 10 % (m/v) $K_3[Fe(CN)_6]$ in Wasser, Wasser (1:1:1:3)

Vor Anwendung wird sie mit der gleichen Menge Aceton verdünnt.

Reagenz E: Iod-Kammer

Präparative Chromatographie:

Die Aufreinigung der Syntheseprodukte erfolgte über Kieselgel G₆₀, 0,063-0,2 mm (Fa. Macherey-Nagel und Roth);

Die Flashchromatographie auf Umkehrphasen wurde mit der CombiFlash®RETRIEVE durchgeführt. Hierfür wurde eine RP-18 RediSep®-Säule (43 g) verwendet.

Gefriertrocknung:

Zur Lyophilisation einiger Substanzen wurde die Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 (Fa. Christ GmbH) verwendet.

Chemikalien:

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen ABCR, Alfa-Aesar, Fluka, Sigma-Aldrich und Roth bezogen. EDCI und geschützte Aminosäuren wurden von der Firma Bachem bezogen.

Folgende Lösungsmittel, die für Synthesen und Chromatographie verwendet werden sollten, wurden vor Gebrauch destilliert: Aceton, Cyclohexan, Dichlormethan und Ethylacetat. Methanol und Ethanol wurden in HPLC-Qualität (Fa. Bruker) eingesetzt.

Etherische Lösungsmittel wie Diethylether, Dioxan, DME und THF, wurden über das Natrium-benzophenonketyl absolutiert und direkt eingesetzt.

Hydroxylamin (freie Base):

Es wurde die freie Base nach Steudel und Schenk [1975] durch Ausfrieren nach Neutralisation von Hydroxylamin-Hydrochlorid mit Natriumethanolat gewonnen.¹⁸⁷

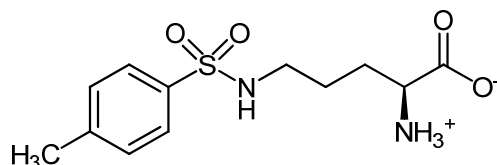
7.1.2 Synthesevorschriften

7.1.2.1 Synthese von N^δ -methylierten L-Arginin-Derivaten

7.1.2.1.1 N^δ -Methyl-L-ornithin (18)

N^δ -(*p*-Toluensulfonyl)-L-ornithin (15)¹⁵⁸⁻¹⁶¹

Synthesevorschrift in Anlehnung an Gut *et al.* [1968]:¹⁵⁹



10,1 g L-Ornithin (60 mmol) werden in 30 mL Wasser unter Rückfluss mit 7,0 g (70 mmol) basischem Kupfercarbonat (31,6 mmol) für 15 min gekocht. Nach dem Abkühlen wird diese Lösung in einen Dreihalskolben filtriert. Unter kräftigem Rühren bei Raumtemperatur werden gleichzeitig 7,75 g (40 mmol) Tosylchlorid in 15 mL Ether und 32 mL 2 N NaOH zugetropft. Nach kräftigem Rühren für 45 min werden dieselben Mengen nochmals zugegeben und der Ansatz zwei Stunden gerührt. Durch Zusatz von 6 N HCl_(aq) und Schütteln wird anschließend alles Feste in Lösung gebracht. Die wässrige Schicht wird mit Ether gewaschen, mit 23 g Na₂-EDTA (67,6 mmol) behandelt und mit 2 N NaOH neutralisiert. Der Ansatz wird über Nacht bei 0 °C stehen gelassen, das Produkt gesammelt und mit kaltem Wasser gewaschen. Zur weiteren Aufreinigung wird das Produkt aus Wasser umkristallisiert, wobei die Ausbeute durch Aufarbeitung der Mutterlauge erhöht werden kann.

Ausbeute: 12,2 g (71 %) (Lit.: 73 %, Racemat)¹⁵⁹

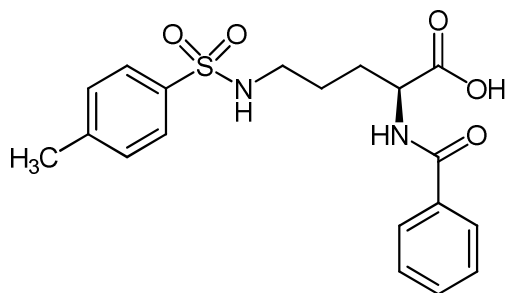
Schmp.: 223-232 °C (dec.) (Lit.: 223-229 °C¹⁵⁹, Racemat; 236-238 °C¹⁵⁹, L-Enantiomer; 212 °C^{160,161}, L-Enantiomer; 212-213 °C¹⁵⁸)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.¹⁵⁸

C₁₂H₁₈N₂O₄S (286.35)

Ber. C 50.33 H 6.34 N 9.78 S 11.20

Gef. C 50.32 H 6.47 N 9.76 S 11.18

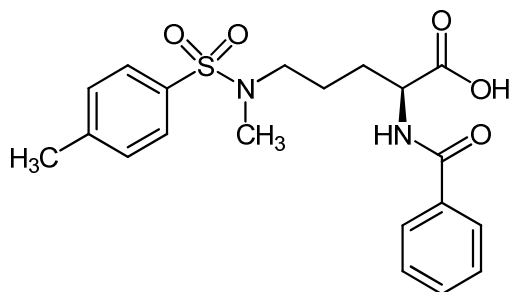
N^α -Benzoyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (16)^{158,161-163}Synthesevorschrift in Anlehnung an Benoiton [1964]:¹⁶²

11,44 g N^δ -(*p*-Toluensulfonyl)-L-ornithin (40 mmol) in 40 mL kalter 1 N NaOH lösen. Gegebenenfalls wird ein feiner Niederschlag vor der Reaktion abfiltriert. Anschließend erfolgt gleichzeitig die tropfenweise Zugabe von 5,29 mL (44,8 mmol) Benzoylchlorid und 22 mL 2 N NaOH über 30 min. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 6 N HCl_(aq) auf pH 3 gebracht und Ethylacetat zugeben. Das Produkt präzipitiert und wird abgetrennt.

Ausbeute: 12,34 g (79 %) (Lit.: 62 %)¹⁶²Schmp.: 187 °C (Lit.: 182 °C¹⁶¹, 184 °C¹⁵⁸, 188 °C¹⁶²)Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.¹⁵⁸C₁₉H₂₂N₂O₅S (390.45)

Ber. C 58.45 H 5.68 N 7.17 S 8.21

Gef. C 58.16 H 5.77 N 7.15 S 8.08

 N^α -Benzoyl- N^δ -methyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (17)^{158,161-163}Synthesevorschrift in Anlehnung an Thomas *et al.* [1923]:¹⁶³

3,9 g N^α -Benzoyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (10 mmol) werden in 10 mL 2 N NaOH gelöst. Über ein Septum werden 2,84 mL Dimethylsulfat (30 mmol) zügig zugetropft. Es

kommt zu einer leichten Erwärmung der Lösung. Nach einstündigem, kräftigem Rühren werden über einen Zeitraum von einer Stunde drei weitere Äquivalente NaOH zugegeben (30 mL 1 N NaOH). Anschließend wird der Ansatz eine Stunde auf 70 °C gehalten. Die noch heiße, klare Lösung wird mit 5,72 mL Eisessig (10 Äquivalente) versetzt und zum Abkühlen stehen gelassen. Der Niederschlag wird abgesaugt und zunächst mit Eisessig gewaschen. Aus der Mutterlauge fällt dann über Nacht weiteres Produkt aus, welches wie oben beschrieben gewaschen wird. Feinkristallines Produkt wird im Vakuum bei 100 °C vom Eisessig befreit. Es wird aus Ethanol/Wasser (1:1) umkristallisiert, sofern das Produkt noch nicht elementaranalysenrein vorliegt.

Ausbeute: 3,64 g (90 %) (Lit.: 94,6 %) ¹⁶³

Schmp.: 161 °C (Lit.: 160 °C ¹⁶¹, 163 °C ^{158,162}, 188-189 °C ¹⁶³)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur. ¹⁵⁸

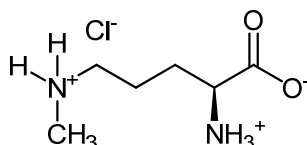
C₂₀H₂₄N₂O₅S (404.48)

Ber. C 59.39 H 5.98 N 6.93 S 7.93

Gef. C 59.41 H 6.11 N 6.95 S 7.90

N^δ-Methyl-L-ornithin Hydrochlorid (18) ^{158,161,162,267}

Synthesevorschrift in Anlehnung an Luzzi und Marletta [2005]: ¹⁵⁸



4,0 g N^α-Benzoyl-N^δ-methyl-N^δ-(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (9,90 mmol) werden in 32 mL HBr (47 % in Eisessig) gelöst und 1,5 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die resultierende Suspension wird nach dem Abkühlen filtriert und das Filtrat im Vakuum (< 1 mbar) destilliert. Das viskose, rotbraune Öl wird mit Wasser aufgenommen und auf eine Kationenaustauschersäule (32 g Dowex 50WX8) gegeben. Diese wird so lange mit demineralisiertem Wasser gespült, bis pH 6-7 erreicht wird. Die Elution erfolgt mit 2 N Ammoniak. Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel abrotiert, so dass ein braunes Öl zurückbleibt. Dieses wird mit ca. 25 mL Wasser aufgenommen und auf pH 5,8 eingestellt. Die Lösung wird mit Aktivkohle versetzt und kurz zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird filtriert und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Für die Elementaranalyse wurde die Substanz aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,54 g (85 %) (Lit.: 83 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 217-218 °C (Lit.: 217 °C) ¹⁵⁸

Die NMR-Daten entsprechen denen der Literatur. ¹⁵⁸

C₆H₁₄N₂O₂·1,1 HCl (186.30)

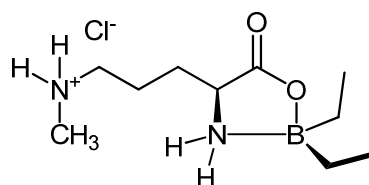
Ber. C 38.68 H 8.17 N 15.04

Gef. C 38.94 H 8.57 N 15.11

7.1.2.1.2 Boroxazolidinon-geschütztes *N*^δ-Methyl-L-ornithin

Diethyl[*N*^δ-methyl-L-ornithinato-*O,N*]borat Hydrochlorid (19) ¹⁵⁸

Synthesevorschrift in Anlehnung an Luzzi und Marletta [2005]: ¹⁵⁸



1,2 g *N*^δ-Methyl-L-ornithin Hydrochlorid (6,57 mmol) werden in 12 mL trockenem DME unter Stickstoffbegasung gelöst und 8 mL Triethylboran (als 1 M Lösung in THF) zugegeben. Die Suspension wird 48 Stunden unter Rückfluss und Stickstoffatmosphäre gekocht. Anschließend wird der Ansatz filtriert und der hellgraue Niederschlag dreimal mit 10 mL *n*-Hexan gewaschen. Das so erhaltene Produkt ist mit weniger als 5 % nicht reagiertem Ausgangsmaterial kontaminiert.

Ausbeute: 1,46 g (89 %) (Lit.: 50 %) ¹⁵⁸

Schmp.: 214 °C (dec.)

IR (KBr):

ν (cm⁻¹) = 3134, 3074, 2998, 2948, 1686, 1400, 1316, 1288, 934, 790.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

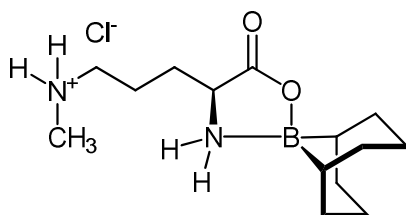
δ /ppm = 0.15-0.29 (m, 4H, 2 × B-CH₂-CH₃), 0.67-0.74 (m, 6H, B-CH₂-CH₃), 1.57-1.92 (m, 4H, β,γ-CH₂), 2.50 (s, 3H, N-CH₃), 2.88 (m, 2H, N-CH₂), 3.47 (m, 1H, α-CH), 5.67 (br t, 1H, α-NH), 6.59 (br dd, 1H, α-NH), 8.94 (br s, 2H, NH₂⁺).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , TMS):

$\delta/\text{ppm} = 8.8$ ($2 \times \text{B-CH}_2\text{-CH}_3$), 12.0, 12.7 ($2 \times \text{B-CH}_2\text{-CH}_3$), 22.2 ($\gamma\text{-CH}_2$), 27.5 ($\beta\text{-CH}_2$), 32.2 (N-CH₃), 47.4 (N-CH₂), 53.8 ($\alpha\text{-CH}$), 173.7 (CO).

9-Borabicyclo[3.3.1]non-9-yl[N^δ -methyl-L-ornithinato-*O,N*]borat Hydrochlorid (20)

Synthesevorschrift in Anlehnung an Dent *et al.* [2002]:¹⁷⁰



2,0 g N^δ -Methyl-L-ornithin Hydrochlorid (11 mmol) werden zu einer heißen Lösung von 1,61 g kristallinem, dimerem 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (13,2 mmol Monomer) in 24 mL trockenem Methanol unter Stickstoffbegasung gegeben und 1,5 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Suspension wird heiß filtriert und je zweimal mit wenig *n*-Hexan und abschließend mit Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 2,83 g (85 %)

Schmp.: 275 °C (dec.)

IR (KBr):

ν (cm⁻¹) = 3214, 3172, 3096, 2922, 2884, 2436, 1702, 1596, 962.

^1H -NMR (DMSO- d_6 /CDCl₃, 1:1; TMS):

$\delta/\text{ppm} = 0.51$ (br s, 1H, B-CH), 0.56 (br s, 1H, B-CH), 1.43, 1.58 ($2 \times$ m, 2H, B-CH-CH₂-CH₂), 1.62-2.07 (m, 12H, $\beta,\gamma\text{-CH}_2$, B-CH-CH₂-CH₂), 2.59 (s, 3H, N-CH₃), 2.94 (m, 2H, N-CH₂), 3.57 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 5.87 (br t, 1H, $\alpha\text{-NH}$), 6.45 (br dd, 1H, $\alpha\text{-NH}$), 9.02 (br s, 2H, NH₂⁺).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 /CDCl₃, 1:1; TMS):

$\delta/\text{ppm} = 22.3$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 22.5, 23.6 ($2 \times$ B-CH), 23.9, 24.3 ($2 \times$ B-CH-CH₂-CH₂), 27.4 ($\beta\text{-CH}_2$), 30.97, 31.04, 31.2, 31.3 ($4 \times$ B-CH-CH₂-CH₂), 32.6 (N-CH₃), 48.0 (N-CH₂), 53.9 ($\alpha\text{-CH}$), 173.7 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 533$ [$2 \times \text{M}$]⁺, 267 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 147 [$\text{M} - 9\text{-BBN}$]⁺.

$C_{14}H_{27}BN_2O_2 \cdot 0,9 HCl$ (299.01)

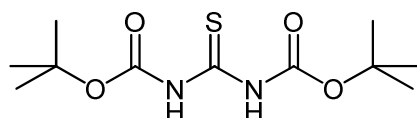
Ber. C 56.24 H 9.41 N 9.37

Gef. C 56.28 H 9.61 N 9.84

7.1.2.1.3 N^{δ} -Methyl-L-arginin (1)

N,N' -Bis(*t*-butyloxycarbonyl)thioharnstoff²⁶⁸

Modifizierte Vorschrift nach Exposito *et al.* [2001]:²⁶⁸



Es werden 571 mg Thioharnstoff (7,5 mmol) in 150 mL trockenem THF gelöst und 30 min bei 0 °C unter Argon gerührt. Anschließend werden 1,35 g Natriumhydrid (33,8 mmol, als 60 %-ige Dispersion in Mineralöl) und *n*-Hexan zugegeben und weitere 15 min gerührt. Es folgt die Zugabe von 3,6 g Di-*t*-butyldicarbonat (2,2 Äquivalente). Die Lösung wird 30 min bei 0 °C und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktion mit 10 mL gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung abgebrochen und in 250 mL Wasser gegeben. Anschließend wird dreimal mit 75 mL Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingeengt. Das Rohprodukt wird über Kieselgel weiter aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat, 85:25; $R_f = 0.30$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁶⁸

$C_{11}H_{20}N_2O_4S$ (276.35)

Ber. C 47.81 H 7.29 N 10.14

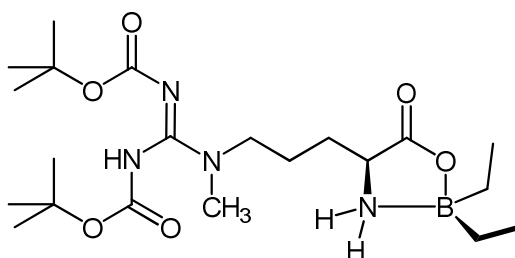
Gef. C 48.51 H 7.63 N 10.08

Guanidierung von Boroxazolidinon-geschütztem N^δ -Methyl-L-ornithin

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Luzzi und Marletta [2005]:¹⁵⁸

1,45 mmol des Bor-Komplexes **19** oder **20** werden in 3,15 mL trockenem DMF unter Stickstoffbegasung bei 0 °C zusammen mit 500 mg N,N' -Bis(*t*-butyloxycarbonyl)-thioharnstoff²⁶⁸ (1,81 mmol) und 819 μ L trockenem Triethylamin (5,9 mmol) dispergiert. Zu dieser Suspension werden 532 mg HgCl_2 (2,0 mmol) zugefügt, 30 min bei 0 °C und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 25 mL Ethylacetat zugegeben und das entstandene HgS durch Filtration über Celite entfernt. Die organische Phase wird mit einer NaCl-Lösung und demineralisiertem Wasser gewaschen und bis zur Trockene einrotiert. Das Rohprodukt wird über Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat).

Diethyl[$N^\omega, N^{\omega'}$ -bis(*t*-butyloxycarbonyl)- N^δ -methyl-L-argininato- O, N]borat (**21**)¹⁵⁸



Ausbeute: 245 mg eines farblosen Öls (37 %)

DC: $R_f = 0,41$ (Ethylacetat, Reagenz A)

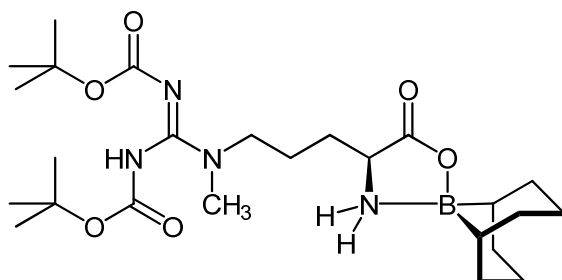
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

δ /ppm = 0.18-0.29 (m, 4H, 2 × B-CH₂-CH₃), 0.67-0.78 (m, 6H, B-CH₂-CH₃), 1.39 (s, 18H, C(CH₃)₃), 1.46-1.85 (m, 4H, β, γ -CH₂), 2.89 (s, 3H, N-CH₃), 3.34 (m, 2H, N-CH₂), 3.40-3.56 (m, 1H, α -CH), 5.54 (br dd, 1H, α -NH), 6.42 (br dd, 1H, α -NH), 9.51 (br s, 1H, NH-Boc).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

δ /ppm = 8.8 (2 × B-CH₂-CH₃), 12.0, 12.7 (2 × B-CH₂-CH₃), 23.6 (γ -CH₂), 27.5 (β -CH₂), 27.9 (C(CH₃)₃), 35.5 (N-CH₃), 48.8 (N-CH₂), 54.2 (α -CH), 76.9, 79.9 (2 × C(CH₃)₃), 151.0 (CO-Boc), 152.0 (C=N), 159.9 (CO-Boc), 173.7 (CO).

9-Borabicyclo[3.3.1]non-9-yl- $[N^{\omega},N^{\omega'}$ -bis(*t*-butyloxycarbonyl)- N^{δ} -methyl-L-argininato-*O,N*]borat (22)



Ausbeute: 302 mg eines farblosen Wachses (41 %)

Schmp.: 110 °C (Schaumbildung, 270 °C dec.)

DC: $R_f = 0,41$ (Ethylacetat, Reagenz A)

IR (KBr):

ν (cm⁻¹) = 3222, 3137, 2980, 2922, 2878, 2844, 1712, 1608, 1144, 964.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

δ /ppm = 0.48 (s, 1H, B-CH), 0.52 (s, 1H, B-CH), 1.27-1.50 (m, 20H, C(CH₃)₃, B-CH-CH₂-CH₂), 1.50-1.90 (m, 14H, β,γ -CH₂, 4 × B-CH-CH₂-CH₂, B-CH-CH₂-CH₂), 2.90 (s, 3H, N-CH₃), 3.33 (m, 2H, N-CH₂), 3.53 (m, 1H, α -CH), 5.81 (br dd, 1H, α -NH), 6.38 (br dd, 1H, α -NH), 9.52 (br s, 1H, NH-Boc).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

δ /ppm = 22.2, 23.4 (2 × B-CH), 23.5 (γ -CH₂), 23.8, 24.2 (2 × B-CH-CH₂-CH₂), 27.4 (β -CH₂), 27.9 (2 × C(CH₃)₃), 30.7, 31.1, 31.2 (4 × B-CH-CH₂-CH₂), 35.6 (N-CH₃), 48.9 (N-CH₂), 54.2 (α -CH), 76.6, 79.9 (2 × C(CH₃)₃), 151.1 (CO-Boc), 152.0 (C=N), 159.9 (CO-Boc), 173.3 (CO).

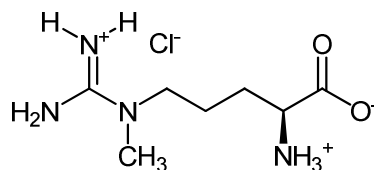
MS (ESI):

$m/z = 457$ [M + H]⁺.

C₂₅H₄₅BN₄O₆·0,5 H₂O (517.48)

Ber. C 58.03 H 8.96 N 10.83

Gef. C 58.12 H 9.35 N 10.86

***N*^δ-Methyl-L-arginin Hydrochlorid (**1**)**^{158,163,269}

Variante A: Synthesevorschrift in Anlehnung an Luzzi und Marletta [2005]:¹⁵⁸

0,98 mmol des Bor-Komplexes **21** oder **22** werden in 20 mL 1,5 N HCl gelöst und eine Stunde bei 100 °C gerührt. Der Ansatz wird einrotiert, mit 10 mL TFA versetzt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung i. Vak. eingengt und 20 mL demineralisiertes Wasser zugegeben. Diese Lösung wird auf eine Kationenaustauschersäule gegeben (30 g Dowex 50WX8), mit ca. dem fünffachen Säulenvolumen Wasser gespült und mit 1 N NH₃ eluiert. Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel abrotiert. Das leicht gefärbte Öl wird in 15 mL Wasser aufgenommen, mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzt und kurz aufgeköcht. Die Suspension wird filtriert und einrotiert. Das zurückbleibende Öl wird mit 15 mL Wasser versetzt, mit 1 N HCl auf pH 5,8 eingestellt (pH-Meter) und einrotiert.

Ausbeute: 187 mg eines weißen Feststoffes (85 %, vergleichbar für **21** und **22**)

Variante B: ausgehend von *N*^ω-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin (**2**) (s. u.)

In 5,5 mL Methanol (enthält 5 % Eisessig) werden 100 mg *N*^ω-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin (freie Base) gelöst und 50 mg Palladium-Kohle (10 %) zugegeben. Das Gemisch wird bei 3 bar hydriert, bis die DC eine vollständige Umsetzung anzeigt. Anschließend wird über Celite filtriert und mit Methanol nachgewaschen. Es erfolgte keine weitere Aufarbeitung und Isolierung sondern Identifizierung des Produktes **1** mittels DC und LC/MS.

DC: R_f = 0,45 (*i*-Propanol/Eisessig/Wasser, 6:3:1; Reagenz A)

IR (KBr):

ν (cm⁻¹) = 3313, 3203, 3013, 2944, 2345, 1654, 1639, 1595, 1538.

¹H-NMR (D₂O):

δ /ppm = 1.60-1.95 (m, 4H, β,γ-CH₂), 3.08 (s, 3H, N-CH₃), 3.44 (t, 2H, ³J = 6.7 Hz, N-CH₂), 3.82 (t, 1H, ³J = 5.8 Hz, α-CH).

^{13}C -NMR (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 21.8$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 26.8 ($\beta\text{-CH}_2$), 35.4 (N-CH_3), 49.2 (N-CH_2), 53.9 ($\alpha\text{-CH}$), 155.9 (C=N), 173.9 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 189.13460, gefunden: 189.13450.

$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 1.1 \text{ HCl}$ (228.34)

Ber. C 36.82 H 7.55 N 24.54

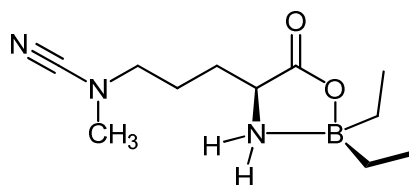
Gef. C 36.44 H 7.66 N 25.03

7.1.2.1.4 N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin (4)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Cyanamide in Anlehnung an Luzzi und Marletta [2005]:¹⁵⁸

Zu einer Suspension von 1,6 mmol des Bor-Komplexes **19** oder **20** und 419 μL Triethylamin (3,52 mmol) in 12 mL trockenem DME werden tropfenweise 254 mg Bromcyan (2,4 mmol), gelöst in 3 mL trockenem DME, zugegeben. Diese Suspension wird fünf Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffbegasung gerührt. Anschließend wird der Feststoff abfiltriert und auf diese Weise nicht reagiertes Ausgangsmaterial nach mehrmaligem Waschen mit Ethylacetat zurückgewonnen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und das Rohprodukt einer Säulenchromatographie über Kieselgel unterzogen (Ethylacetat).

Diethyl[N^δ -cyan- N^δ -methyl-L-ornithinato- O,N]borat (**23**)¹⁵⁸



Ausbeute: 107 mg eines weißen Feststoffes (28 %) (Lit.: 25 %)¹⁵⁸

Schmp.: 146-149 °C (dec.) (Lit.: 143-145 °C)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0,28$ (Ethylacetat, Reagenz A)

IR (KBr):

ν (cm^{-1}) = 3212, 3134, 2942, 2868, 2216, 1688.

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

$\delta/\text{ppm} = 0.24$ (m, 4H, $2 \times \text{B-CH}_2\text{-CH}_3$), 0.71 (m, 6H, $2 \times \text{B-CH}_2\text{-CH}_3$), $1.50\text{-}1.92$ (m, 4H, $\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 2.81 (s, 3H, N- CH_3), 3.00 (br t, 2H, N- CH_2), 3.49 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 5.58 (br t, 1H, $\alpha\text{-NH}$), 6.48 (br t, 1H, $\alpha\text{-NH}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 8.8$ ($2 \times \text{B-CH}_2\text{-CH}_3$), 12.0 , 12.8 ($2 \times \text{B-CH}_2\text{-CH}_3$), 23.7 ($\gamma\text{-CH}_2$), 27.5 ($\beta\text{-CH}_2$), 38.2 (N- CH_3), 51.6 (N- CH_2), 54.0 ($\alpha\text{-CH}$), 118.5 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 173.7 (CO).

MS (ESI):

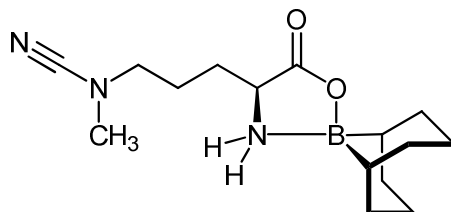
$m/z = 240$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 172 [$\text{M} - \text{Diethylboryl}$] $^+$.

$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{B} \cdot 0,1$ Ethylacetat (247.94)

Ber. C 55.23 H 9.27 N 16.95

Gef. C 54.74 H 10.00 N 17.06

9-Borabicyclo[3.3.1]non-9-yl[N^δ -cyan- N^δ -methyl-L-ornithinato- O,N]borat (24)



Ausbeute: 135 mg eines weißen Feststoffes (29 %)

Schmp.: 235 °C

DC: $R_f = 0,30$ (Ethylacetat, Reagenz A)

IR (KBr):

ν (cm^{-1}) = 3228, 3104, 2918, 2880, 2844, 2220, 1702, 1262, 962.

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

$\delta/\text{ppm} = 0.49$, 0.53 ($2 \times$ br s, 1H, B-CH), 1.42 (m, 2H, B-CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), $1.50\text{-}1.97$ (m, 14H, $\beta,\gamma\text{-CH}_2$, $4 \times \text{B-CH-CH}_2\text{-CH}_2$, B-CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.59 (s, 3H, N- CH_3), 3.00 (qt, 2H, N- CH_2), 3.54 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 5.84 (br t, $\alpha\text{-NH}$), 6.43 (br dd, 1H, $\alpha\text{-NH}$).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , TMS):

$\delta/\text{ppm} = 22.2$ (B-CH), 23.4 (B-CH), 23.6 (γ -CH $_2$), 23.8 (B-CH-CH $_2$ -CH $_2$), 24.1 (B-CH-CH $_2$ -CH $_2$), 27.3 (β -CH $_2$), 30.7, 31.1, 31.2 (4 \times B-CH-CH $_2$ -CH $_2$), 38.2 (N-CH $_3$), 51.7 (N-CH $_2$), 54.0 (α -CH), 118.5 (C \equiv N), 173.3 (CO).

MS (ESI):

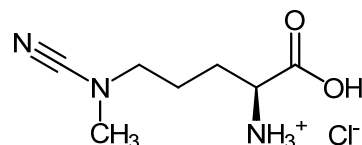
$m/z = 583$ [$2 \times M - H$] $^+$, 292 [$M + H$] $^+$.

$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2\text{B}$ (291.20)

Ber. C 61.87 H 9.00 N 14.43

Gef. C 61.54 H 9.39 N 14.42

N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin Monohydrochlorid (4**)¹⁵⁷**



In 14 mL trockenem Dioxan werden 0,288 mmol sorgfältig getrocknetes **23** oder **24** dispergiert und HCl-Gas für einige Minuten unter Rühren über die Flüssigkeit geleitet. Nach 24 Stunden im Kühlschrank wird zur vollständigen Präzipitation trockener Diethylether zugegeben und das Produkt unter Stickstoffbegasung abfiltriert.

Ausbeute: 49,0 mg (82 %, ausgehend **23**), 47,2 mg (79 %, ausgehend von **24**)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , TMS):

$\delta/\text{ppm} = 1.64$ -1.86 (m, 4H, β , γ -CH $_2$), 2.81 (s, 3H, N-CH $_3$), 3.01 (t, 2H, $^3J = 6.9$ Hz, N-CH $_2$), 3.90 (m, 1H, α -CH), 8.58 (br s, 3H, NH $_3^+$), 8.97 (br s, 1H, COOH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , TMS):

$\delta/\text{ppm} = 22.4$ (γ -CH $_2$), 26.8 (β -CH $_2$), 38.1 (N-CH $_3$), 51.4 (N-CH $_2$), 51.6 (α -CH), 118.4 (C \equiv N), 170.6 (CO).

MS (ESI):

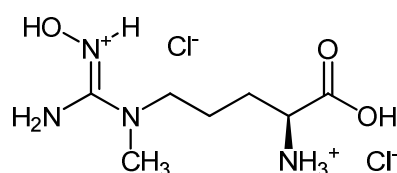
$m/z = 342$ [$2 \times M + H$] $^+$, 172 [$M + H$] $^+$.

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$ [$M + H$] $^+$: 172.10805, gefunden: 172.10805.

7.1.2.1.5 N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Dihydrochlorid (2)

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Luzzi und Marletta [2005]:¹⁵⁸



In 3 mL trockenem Methanol werden 0,346 mmol des Bor-Komplexes **23** oder **24** und 252 μ L Triethylamin (1,748 mmol) gelöst. 72 mg Hydroxylamin Hydrochlorid (1,036 mmol), gelöst in 3 mL trockenem Methanol, werden zugetropft und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt über Cellulose aufgereinigt (Acetonitril/0,1 % TFA_(aq), 5:3; $R_f = 0,18$). Ninhydrin-positive Fraktionen werden zusammengegeben und einrotiert. Das erhaltene klare Öl wird in trockenem Dioxan unter Rühren dispergiert und HCl-Gas über die Lösung geleitet. Das Dihydrochlorid präzipitiert und wird nach 24 Stunden im Kühlschrank unter Stickstoffbegasung abfiltriert. Mit trockenem Diethylether wird der Niederschlag nachgewaschen und das Produkt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Ausbeute: 76,4 mg (80 %, vergleichbar für **23** und **24**) (Lit.: 86 %, freie Base)¹⁵⁸

DC: $R_f = 0,48$ (*i*-Propanol/Eisessig/Wasser, 6:3:1, Reagenz A)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

$\delta/\text{ppm} = 1.62\text{-}1.79$ (m, 4H, $\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 2.92 (s, 3H, N-CH₃), 3.32 (m, 2H, N-CH₂), 3.91 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 7.71 (br s, 2H, NH₂), 7.90 (br s, 1H, NH), 8.47 (br s, 3H, NH₃⁺), 9.98 (br s, 1H, N-OH), 10.53 (br s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

$\delta/\text{ppm} = 22.2$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 26.6 ($\beta\text{-CH}_2$), 35.7 (N-CH₃), 48.5 (N-CH₂), 51.5 ($\alpha\text{-CH}$), 157.9 (C=N), 170.6 (CO).

MS (ESI):

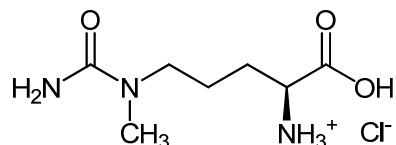
$m/z = 205$ [M + H]⁺, 188 [M - NH₃OH]⁺.

HRMS (m/z):

berechnet für C₇H₁₇N₄O₃ [M + H]⁺: 205.12952, gefunden: 205.12956.

7.1.2.1.6 N^{δ} -Methyl-L-citrullin Hydrochlorid (3**)¹⁵⁷**

Allgemeine Synthesevorschrift ausgehend von den Boroxazolidinon-geschützten Cyanamiden:



In 3,0 mL Aceton und 1,0 mL wässriger TFA (60 %, v/v) werden 0,144 mmol des Bor-Komplexes **23** oder **24** gelöst und für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wird mittels DC kontrolliert. Die Lösung wird im Vakuum einkonzentriert, 10 mL 1,5 M HCl zugegeben und weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt über Cellulose aufgereinigt (Acetonitril/Wasser, 5:3). Ninhydrin-positive Fraktionen werden zusammengegeben und einrotiert. Das erhaltene Öl wird in Dioxan dispergiert und über das Lösungsmittel HCl-Gas geleitet. Nach 24 Stunden im Kühlschrank wird das Hydrochlorid durch Filtration und Nachwaschen mit trockenem Diethylether isoliert.

Ausbeute: 122 mg (60 %, ausgehend von **23**), 163 mg (80 %, ausgehend von **24**)

DC: $R_f = 0,68$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 6:3:1; Reagenz A)

IR (KBr):

ν (cm⁻¹) = 3362, 2940, 2360, 1744, 1644, 1588, 1514, 1082.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

δ /ppm = 1.51-1.76 (m, 4H, β, γ -CH₂), 2.76 (s, 3H, N-CH₃), 3.18 (t, 2H, ³*J* = 6.7 Hz, N-CH₂), 3.90 (m, 1H, α -CH), 5.18 (s, 2H, CONH₂), 8.38 (br s, 3H, NH₃⁺), 13.68 (br s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, TMS):

δ /ppm = 22.8 (γ -CH₂), 27.0 (β -CH₂), 34.3 (N-CH₃), 47.3 (N-CH₂), 51.7 (α -CH), 159.0 (CONH₂), 170.8 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 190$ [M + H]⁺, 174 [M - NH₂]⁺, 147 [M - NH₂CO]⁺.

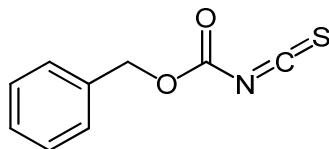
HRMS (m/z):

berechnet für C₇H₁₆N₃O₃ [M + H]⁺: 190.11862, gefunden: 190.11849.

7.1.2.2 Synthese neuer Hemmstoffe der DDAH

7.1.2.2.1 *N*-Benzyloxycarbonylisothiocyanat (**32a**)^{208,209}

Modifizierte Synthesevorschrift in Anlehnung an Martin *et al.* [2006]:²⁰⁹



Zu 100 mL Perchlourethylen werden 500 mg 18-Krone-6, 4,5 g frisch gepulvertes und gut getrocknetes KSCN²⁰⁸ sowie 5,0 mL Chlorameisensäurebenzylester gegeben und 12 Stunden bei 80-90 °C kräftig gerührt. Dem Reaktionsgemisch werden unter Eiskühlung 100 mL *n*-Hexan zugegeben und der Niederschlag wird über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt ist zu ca. 90 % rein (DC und ¹H-NMR) und wird ohne weitere Aufreinigung in den folgenden Synthesen als 0,5 M Lösung in Dichlormethan eingesetzt. Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.

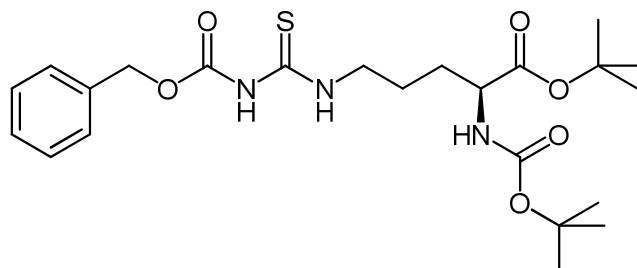
Ausbeute: 80-90 %

DC: R_f = 0,38 (Cyclohexan/Dichlormethan, 4:1)

7.1.2.2.2 *N*-Benzyloxycarbonylthioharnstoffe

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Linton *et al.* [2000]:²⁰⁸

7,0 mmol des betreffenden Amins werden in 250 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und 14 mL einer 0,5 M Lösung (in Dichlormethan) des Isothiocyanats **32a** (7,0 mmol) tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird zwei Stunden gerührt, wobei die Lösung auf Raumtemperatur aufwärmt. Anschließend wird das Gemisch am Rotationsverdampfer auf ca. ein Drittel des ursprünglichen Volumens i. Vak. eingeengt und mit jeweils 25 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Die Thioharnstoffe sind an dieser Stelle meist schon zu > 96 % rein (DC) und werden entweder durch Kristallisation oder Säulenchromatographie weiter aufgereinigt (s. jeweilige Substanz).

***N*^ω-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-L-thiocitrullin-*t*-butylester (35)²⁰⁹**

Nach Säulenchromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) wird ein hellgelbes Öl erhalten, welches im Kühlschrank fest wird.

Ausbeute: 3,13 g (93 %)

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

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.44, 1.46 (s, 9H, 2 × C(CH₃)₃), 1.64-1.75 (m, 4H, β,γ-CH₂), 3.66 (m, 2H, N-CH₂), 4.20 (m, 1H, α-CH), 5.08 (m, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, CH₂-Cbz), 7.36 (m, 5H, ArH), 8.15 (br s, 1H, NH), 9.65 (br s, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 24.8 (γ-CH₂), 28.7, 29.0 (2 × C(CH₃)₃), 30.9 (β-CH₂), 45.8 (N-CH₂), 54.2 (α-CH), 68.8 (CH₂-Cbz), 80.4, 82.8 (2 × C(CH₃)₃), 129.0, 129.4, 129.5 (ArCH), 135.2 (ArC), 153.2 (CO-Cbz), 156.0 (CO-Boc), 172.2 (COO^tBu), 179.8 (C=S).

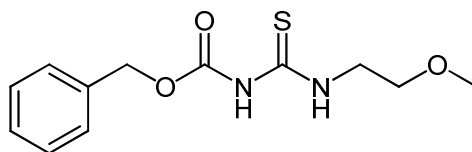
MS (ESI):

$m/z = 482$ [M + H]⁺, 426 [M - C₄H₈ + H]⁺, 370 [M - 2 × C₄H₈ + H]⁺, 326 [M - 2 × C₄H₈ - CO₂ + H]⁺.

C₂₃H₃₅N₃O₆S (481.61)

Ber. C 57.36 H 7.33 N 8.73

Gef. C 57.55 H 7.60 N 8.68

N-Benzoyloxycarbonyl-N'-(2-methoxyethyl)-thioharnstoff (39)

Das nach dem Einrotieren erhaltene Rohprodukt kristallisiert unter starker Wärmeentwicklung spontan aus. Es wird mit wenig kaltem Cyclohexan angerieben, filtriert und mit kleinen Portionen kaltem Cyclohexan gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1,76 g weiße Kristalle (94 %)

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

Schmp.: 88,5 °C

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

$\delta/\text{ppm} = 3.39$ (s, 3H, O-CH₃), 3.60 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, O-CH₂), 3.86 (q, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, N-CH₂), 5.19 (s, 2H, CH₂-Cbz), 7.32-7.61 (m, 5H, ArH), 8.11 (br s, 1H, NH), 9.84 (br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 46.2$ (N-CH₂), 59.6 (O-CH₃), 68.8 (O-CH₂), 70.4 (O-CH₂), 129.0, 129.4, 129.5 (ArCH), 135.2 (ArC), 153.0 (CO), 179.9 (C=S).

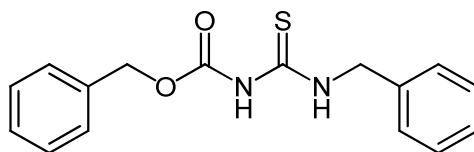
MS (ESI):

$m/z = 269$ [M + H]⁺, 225 [M – CO₂ + H]⁺, 91 [C₇H₇]⁺.

C₁₂H₁₆N₃O₂S (268.33)

Ber. C 53.71 H 6.01 N 10.44

Gef. C 53.93 H 6.19 N 10.61

N-Benzoyloxycarbonyl-N'-benzylthioharnstoff (86)^{208,209}

Das nach dem Einrotieren erhaltene Rohprodukt kristallisiert unter starker Wärmeentwicklung spontan aus, wird mit wenig kaltem Cyclohexan angerieben, filtriert und mit kleinen Portionen kaltem Cyclohexan gewaschen. Rekristallisation aus Cyclohexan liefert das Produkt in feinen weißen Nadeln.

Ausbeute: 1,87 g weiße Nadeln (89 %)

DC: $R_f = 0,46$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1)

Schmp.: 112-113 °C (Lit.: 108-110 °C)²⁰⁹

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.²⁰⁹

$C_{16}H_{16}N_2O_2S$ (300.38)

Ber. C 63.98 H 5.37 N 9.33

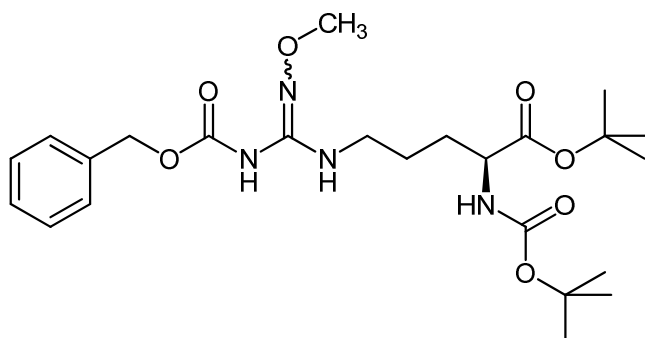
Gef. C 64.10 H 5.42 N 9.39

7.1.2.2.3 N-Benzoyloxycarbonylguanidine (36a-i, 40a-e)

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Linton *et al.* [2000]:²⁰⁸

Es werden 0,5 mmol des Thioharnstoffs **35** oder **39** in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 261 μ L DIPEA (1,5 mmol bzw. 3 mmol, wenn das Amin als Salz eingesetzt wird) sowie 1,5 mmol des jeweiligenamins zugegeben. Die Lösung wird für ca. 30 min auf 0 °C gebracht und 287 mg EDCI (1,5 mmol) zugegeben. Sofern nicht anders angemerkt, wird das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit ca. 10 mL Dichlormethan verdünnt und jeweils mit 5 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Es resultieren meist Öle, die mittels Flashchromatographie über Kieselgel weiter aufgereinigt werden. Die verwendeten Elutionsmittel und erzielten Ausbeuten sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

***N*^ω-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-*N*^{ω'}-methoxy-L-arginin-*t*-butylester
(36a)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (99:1) verwendet.

Ausbeute: 235 mg eines farblosen Öls (95 %)

DC: $R_f = 0,30$ (Dichlormethan/Methanol, 99:1; Reagenz A)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.44, 1.46 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.58-2.02 (m, 4H, β,γ-CH₂), 3.11 (m, 2H, N-CH₂), 3.66 (s, 3H, O-CH₃), 4.18 (m, 1H, α-CH), 5.11 (m, 1H, NH), 5.13 (s, 2H, CH₂-Cbz), 6.25 (m, 1H, NH), 7.36 (m, 5H, ArH), 7.91 (br s, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 25.6 (γ-CH₂), 28.7, 29.0 (2 × C(CH₃)₃), 30.9 (β-CH₂), 41.2 (N-CH₂), 54.5 (α-CH), 62.0 (O-CH₃), 68.3 (CH₂-Cbz), 80.3, 82.5 (2 × C(CH₃)₃), 129.0, 129.3, 129.4 (ArCH), 135.8 (ArC), 148.8 (C=N), 153.6 (CO-Cbz), 156.0 (CO-Boc), 172.5 (COO^tBu).

MS (ESI):

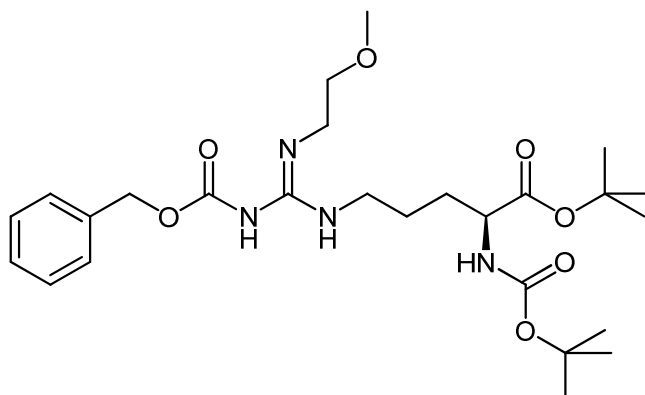
$m/z = 517 [M + Na]^+$, $495 [M + H]^+$, $439 [M - C_4H_8 + H]^+$.

C₂₄H₃₈N₄O₇ (494.58)

Ber. C 58.28 H 7.74 N 11.33

Gef. C 58.72 H 7.99 N 11.22

***N*^ω-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-*N*^{ω'}-(2-methoxyethyl)-L-arginin-*t*-butylester (36b)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (95:5) verwendet.

Ausbeute: 259 mg eines farblosen Öls (99 %)

DC: $R_f = 0,30$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.44, 1.45 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.51-1.93 (m, 4H, β,γ-CH₂), 3.29 (m, 2H, N-CH₂), 3.37 (s, 3H, O-CH₃), 3.42, 3.50 (2 × m, 2H, N-CH₂-CH₂-O), 4.16 (m, 1H, α-CH), 5.10 (br s, 3H, CH₂-Cbz, NH), 6.21 (br s, 1H, NH), 7.28 (m, 3H, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH), 9.11 (br s, 1H, NH-Boc).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 25.8 (γ-CH₂), 28.7, 29.0 (2 × C(CH₃)₃), 31.2 (β-CH₂), 41.3 (N-CH₂), 54.2 (α-CH), 59.6 (O-CH₃), 67.1 (CH₂-Cbz), 80.5, 82.8 (2 × C(CH₃)₃), 128.2, 128.6, 128.9 (ArCH), 138.5 (ArC), 156.2 (C=N), 162.0 (CO-Boc), 164.8 (CO-Cbz), 172.2 (COO^tBu).

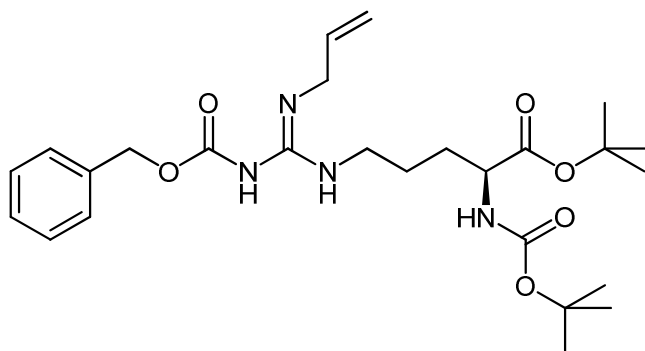
MS (ESI):

$m/z = 523$ [M + H]⁺.

C₂₆H₄₂N₄O₇ (522.63)

Ber. C 59.75 H 8.10 N 10.72

Gef. C 59.72 H 8.47 N 10.50

***N*^ω-Allyl-*N*^{ω'}-benzyloxycarbonyl-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-L-arginin-*t*-butylester (36c)**

Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (95:5) verwendet.

Ausbeute: 240 mg eines farblosen Öls (95 %)

DC: $R_f = 0,30$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.45, 1.47 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.59-1.92 (m, 4H, β,γ-CH₂), 3.37 (m, 2H, N-CH₂), 3.92 (m, 2H, N-CH₂-CH=CH₂), 4.18 (m, 1H, α-CH), 5.13 (s, 2H, CH₂-Cbz), 5.16-5.38 (m, 3H, CH=CH₂, NH), 5.89 (ddt, ³J = 17.2, 10.3, 5.2 Hz, 1H, CH=CH₂), 7.32 (m, 3H, ArH), 7.42 (m, 2H, ArH), 8.79 (br s, 1H, NH).

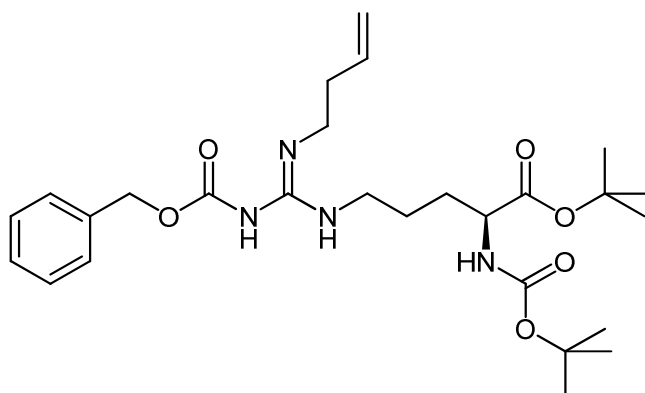
¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 25.8 (γ-CH₂), 28.7, 29.0 (2 × C(CH₃)₃), 31.5 (β-CH₂), 41.6 (N-CH₂), 44.5 (N-CH₂), 53.8 (α-CH), 67.3 (CH₂Ph), 80.6, 83.0 (2 × C(CH₃)₃), 117.7 (CH=CH₂), 128.3, 128.7, 129.0 (ArCH), 134.5 (CH=CH₂), 138.3 (ArC), 156.2 (C=N), 160.8 (CO-Cbz), 164.8 (CO-Boc), 172.2 (COO^tBu).

MS (ESI):

$m/z = 505$ [M + H]⁺.

***N*^ω-Benzyloxycarbonyl-*N*^{ω'}-(but-3-enyl)-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-L-arginin-*t*-butylester
(36d)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (93:7) verwendet.

Ausbeute: 251 mg eines farblosen Öls (97 %)

DC: $R_f = 0,17$ (Dichlormethan/Methanol, 93:7; Reagenz A)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.45, 1.47 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.57-1.92 (m, 4H, β,γ-CH₂), 2.35 (pseudo q, ³J = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 3.31 (m, 4H, 2 × N-CH₂), 4.17 (m, 1H, α-CH), 5.10-5.19 (m, 3H, CH=CH₂, NH), 5.12 (s, 2H, CH₂-Cbz), 5.80 (ddt, ³J = 17.1, 10.2, 6.8 Hz, 1H, CH=CH₂), 7.29 (m, 3H, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH), 8.91 (br s, 1H, NH).

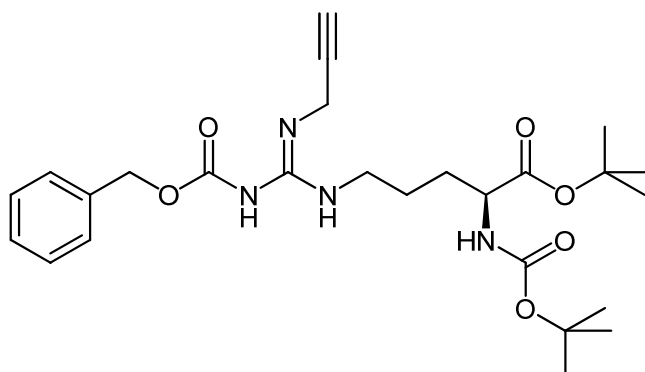
¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 25.7 (γ-CH₂), 28.7, 29.0 (2 × C(CH₃)₃), 31.5 (β-CH₂), 34.2 (CH₂-CH=CH₂), 41.0, 41.2 (2 × N-CH₂), 53.8 (α-CH), 67.1 (CH₂-Cbz), 80.6, 83.0 (2 × C(CH₃)₃), 118.3 (CH=CH₂), 128.2, 128.6, 128.9 (ArCH), 135.5 (CH=CH₂), 138.4 (ArC), 156.3 (C=N), 160.8 (CO-Cbz), 164.8 (CO-Boc), 172.1 (COO^tBu).

MS (ESI):

m/z = 519 [M + H]⁺.

***N*^ω-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-*N*^{ω'}-propargyl-L-arginin-*t*-butylester
(36e)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (97:3) verwendet.

Ausbeute: 233 mg eines weißen, schaumigen Wachses (93 %)

DC: $R_f = 0,21$ (Dichlormethan/Methanol, 97:3; Reagenz A)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.46, 1.48 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.54-1.90 (m, 4H, β,γ-CH₂), 2.30 (br s, 1H, C≡CH), 3.37 (m, 2H, N-CH₂), 4.12 (m, 3H, N-CH₂-C≡CH, α-CH), 5.13 (s, 2H, CH₂-Cbz), 5.18 (m, 1H, NH), 7.31 (m, 3H, ArH), 7.41 (m, 2H, ArH), 9.03 (br s, 1H, NH).

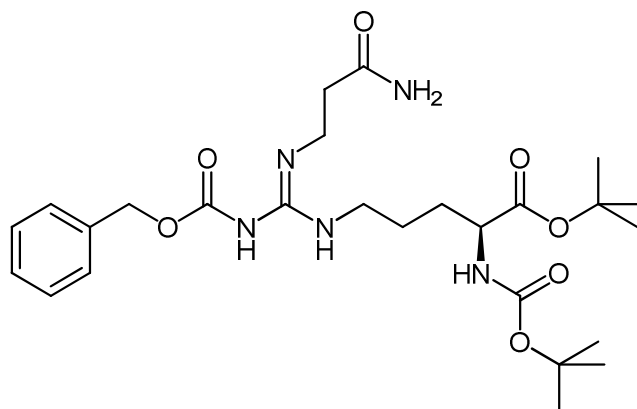
¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 25.8 (γ-CH₂), 28.7, 29.0 (2 × C(CH₃)₃), 31.6, 41.3 (2 × N-CH₂), 53.7 (α-CH), 67.3 (CH₂-Cbz), 73.0 (C≡CH), 80.7, 83.1 (2 × C(CH₃)₃), 128.2, 128.7, 128.9 (ArCH), 138.3 (ArC), 156.4 (C=N), 160.5 (CO-Cbz), 164.7 (CO-Boc), 172.1 (COO^tBu).

MS (ESI):

$m/z = 503$ [M + H]⁺.

***N*^ω-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-*N*^{ω'}-(2-carbamoylethyl)-L-arginin-*t*-butylester (36f)**



Nach dem Rühren über Nacht werden weitere 0,25 mmol β -Alaninamid Hydrochlorid (31,1 mg), EDCI (48 mg) zugegeben sowie 0,5 mmol DIPEA (87 μ L). Es wird vier Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (92:8) verwendet.

Ausbeute: 241 mg eines weißen, schaumigen Wachses (90 %)

DC: $R_f = 0,34$ (Dichlormethan/Methanol, 92:8; Reagenz A)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.45, 1.48 (2 \times s, 9H, C(CH₃)₃), 1.56-1.92 (m, 4H, β,γ -CH₂), 2.50 (t, ³J = 5.6 Hz, 2H, CH₂-CONH₂), 3.24, 3.28 (2 \times m, 2H, N-CH₂), 4.15 (m, 1H, α -CH), 5.12 (s, 2H, CH₂-Cbz), 5.36 (br s, 1H, NH), 6.11 (br s, 2H, CONH₂), 7.32 (m, 3H, ArH), 7.45 (m, 2H, ArH), 9.05 (br s, 1H, NH).

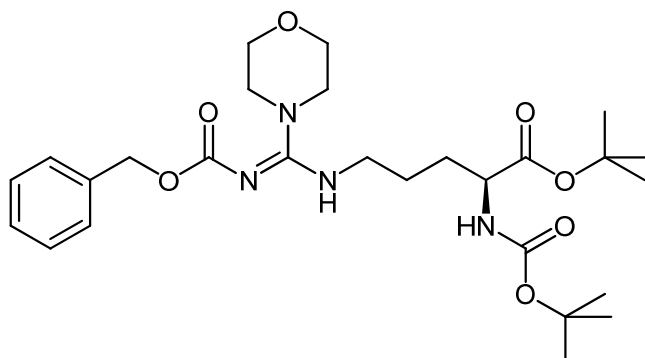
¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 25.7 (γ -CH₂), 28.6, 28.9 (2 \times C(CH₃)₃), 30.7 (β -CH₂), 36.2 (CH₂), 37.6 (CH₂), 41.3 (N-CH₂), 54.3 (α -CH), 67.1 (CH₂-Cbz), 80.5, 82.7 (2 \times C(CH₃)₃), 128.2, 128.5, 128.9 (ArCH), 138.3 (ArC), 156.3 (C=N), 160.9 (CO-Cbz), 164.5 (CO-Boc), 172.4 (COO^tBu), 175.5 (CONH₂).

MS (ESI):

$m/z = 536$ [M + H]⁺.

**N^{δ} -{[(N -Benzyloxycarbonylaminomorpholino)-methylenid]}- N^{α} -(t -butyloxycarbonyl)-
L-ornithin- t -butylester (36g)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (95:5) verwendet.

Ausbeute: 265 mg eines gelben Wachses (98 %)

DC: $R_f = 0,25$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.46, 1.48$ ($2 \times s, 9\text{H}, \text{C}(\text{CH}_3)_3$), $1.56\text{-}1.92$ ($m, 4\text{H}, \beta, \gamma\text{-CH}_2$), 3.23 ($m, 2\text{H}, \text{N-CH}_2$), 3.42 (pseudo $t, 4\text{H}, 2 \times \text{N-CH}_2$), 3.71 (pseudo $t, 4\text{H}, 2 \times \text{O-CH}_2$), 4.16 ($m, 1\text{H}, \alpha\text{-CH}$), 5.09 (br $s, 1\text{H}, \text{NH}$), 5.13 ($s, 2\text{H}, \text{CH}_2\text{-Cbz}$), 7.34 ($m, 3\text{H}, \text{ArH}$), 7.42 ($m, 2\text{H}, \text{ArH}$), 8.27 (br $s, 1\text{H}, \text{NH}$).

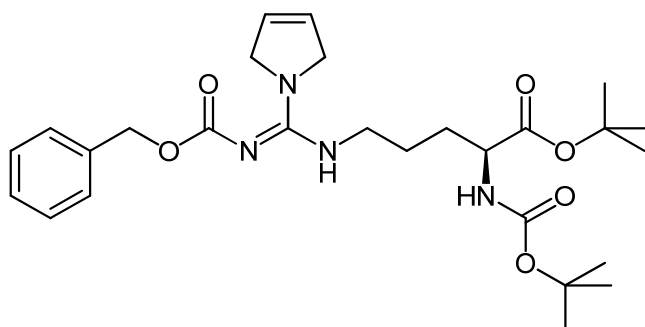
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 26.8$ ($\gamma\text{-CH}_2$), $28.7, 29.0$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.9 ($\beta\text{-CH}_2$), $45.8, 48.4$ ($2 \times \text{N-CH}_2$), 53.9 ($\alpha\text{-CH}$), $67.2, 67.5$ ($2 \times \text{O-CH}_2$), $80.6, 82.9$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), $128.4, 128.9, 129.0$ (ArCH), 138.0 (ArC), 155.4 (C=N), 163.2 (CO-Cbz), 165.0 (CO-Boc), 171.4 (COO^tBu).

MS (ESI):

$m/z = 535$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

**N^δ -{[(*N*-Benzyloxycarbonylamino-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)methyliden]}-
 N^α -(*t*-butyloxycarbonyl)-L-ornithin-*t*-butylester (36h)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (95:5) verwendet.

Ausbeute: 240 mg eines schwach gelben Öls (92 %)

DC: $R_f = 0,31$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.45, 1.47$ ($2 \times s, 9\text{H}, \text{C}(\text{CH}_3)_3$), $1.55\text{-}1.90$ ($m, 4\text{H}, \beta, \gamma\text{-CH}_2$), 3.23 ($m, 2\text{H}, \text{N-CH}_2$), 4.15 ($m, 1\text{H}, \alpha\text{-CH}$), 4.26 ($s, 4\text{H}, 2 \times \text{N-CH}_2\text{-CH=}$), 5.13 ($\text{br } s, 3\text{H}, \text{CH}_2\text{-Cbz}, \text{NH}$), 5.80 ($s, 2\text{H}, 2 \times \text{CH}_2\text{-CH=}$), 7.30 ($m, 3\text{H}, \text{ArH}$), 7.42 ($m, 2\text{H}, \text{ArH}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 26.4$ ($\gamma\text{-CH}_2$), $28.7, 29.0$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.0 ($\beta\text{-CH}_2$), 44.1 (N-CH_2), 54.0 ($\alpha\text{-CH}$), 55.6 ($\text{N-CH}_2\text{-CH=}$), 67.3 ($\text{CH}_2\text{-Cbz}$), $80.5, 82.9$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 125.8 ($\text{CH}_2\text{-CH=}$), $128.1, 128.6, 128.9$ (ArCH), 138.7 (ArC), 156.1 (C=N), $161.1, 161.7$ ($2 \times \text{CO}$), 172.2 (COO^tBu).

MS (ESI):

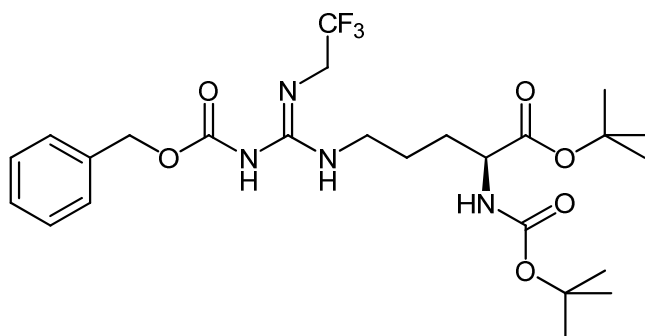
$m/z = 517$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_6$ (516.63)

Ber. C 62.77 H 7.80 N 10.84

Gef. C 62.23 H 8.10 N 10.56

***N*^ω-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-(*t*-butyloxycarbonyl)-*N*^{ω',ω'}-(2,2,2-trifluorethyl)-L-arginin-*t*-butylester (36i)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (98:2) verwendet.

Ausbeute: 271 mg eines farblosen Wachses (98 %)

DC: $R_f = 0,43$ (Dichlormethan/Methanol, 98:2; Reagenz A)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 1.45, 1.48 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.64-1.94 (m, 4H, β,γ-CH₂), 3.27 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 4.18 (m, 1H, α-CH), 4.36 (m, 1H), 5.14 (s, 2H, CH₂-Cbz), 5.26 (m, 1H), 5.99 (br s, 1H, NH), 7.31 (m, 3H, ArH), 7.41 (m, 2H, ArH), 9.19 (br s, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 25.1 (γ-CH₂), 27.9, 28.2 (2 × C(CH₃)₃), 31.2 (β-CH₂), 40.8 (N-CH₂), 42.4 (q, ²J_(C-F) = 34.5 Hz, CH₂CF₃), 52.7 (α-CH), 67.0 (CH₂-Cbz), 80.3, 82.6 (2 × C(CH₃)₃), 124.1 (q, ¹J_(C-F) = 278.9 Hz, CF₃), 127.8, 128.0, 128.3 (ArCH), 137.1 (ArC), 156.0 (C=N), 159.4 (CO-Cbz), 163.0 (CO-Boc), 171.3 (COO^tBu).

MS (ESI):

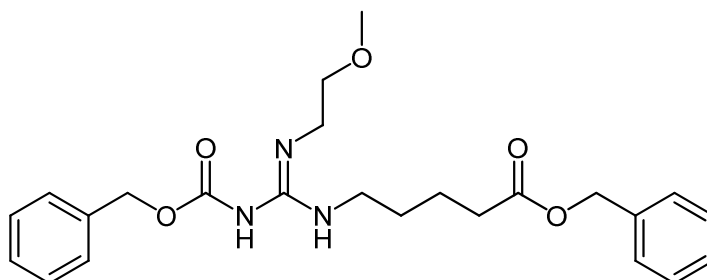
$m/z = 547$ [M + H]⁺.

C₂₅H₃₇F₃N₄O₆ (546.59)

Ber. C 54.94 H 6.82 N 10.25

Gef. C 54.73 H 7.67 N 10.40

***N*-[4-(*O*-Benzyl)carboxybutyl]-*N'*-benzyloxycarbonyl-*N''*-(2-methoxyethyl)guanidin
(40a)**



Das Rohprodukt wird zweimal säulenchromatographisch aufgereinigt. Für die erste Säule wird als Elutionsmittel Dichlormethan/Methanol (95:5) verwendet und für die zweite Ethylacetat.

Ausbeute: 198 mg eines leicht gelben Öls (90 %)

DC: $R_f = 0,40$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz C)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.56\text{-}1.79$ (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂), 2.39 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-CO), 3.26 (m, 2H, N-CH₂), 3.35 (s, 3H, O-CH₃), 3.36-3.50 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-O), 5.11 (br s, 3H, CH₂-Cbz, NH), 7.21-7.37 (m, 8H, ArH), 7.37-7.43 (m, 2H, ArH), 9.16 (br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 22.8$ (N-CH₂-CH₂-CH₂), 29.3 (N-CH₂-CH₂-CH₂), 34.4 (CH₂-CO), 41.4 (N-CH₂), 59.6 (O-CH₃), 66.9, 67.2 (2 × CH₂), 128.2, 128.6, 128.8, 128.9, 129.2 (ArCH), 136.6, 138.4 (2 × ArC), 158.7 (C=N), 161.4 (CO-Cbz), 173.7 (COOBn).

MS (ESI):

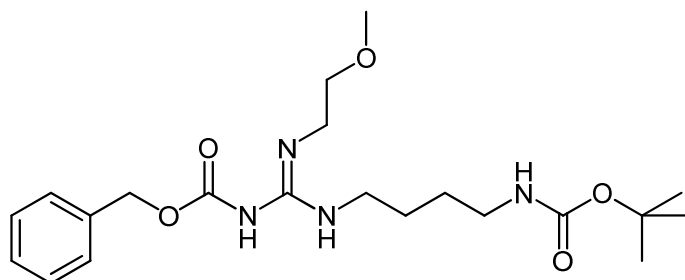
$m/z = 442$ [M + H]⁺.

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$ (441.52)

Ber. C 65.29 H 7.08 N 9.52

Gef. C 64.80 H 7.19 N 9.27

***N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-[4-(*t*-butyloxycarbonyl)aminobutyl]-
N''-(2-methoxyethyl)guanidin (40b)**



Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (95:5) verwendet.

Ausbeute: 198 mg eines farblosen Öls (94 %)

DC: $R_f = 0,41$ (Dichlormethan/Methanol, 96:4; Reagenz A und C)

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

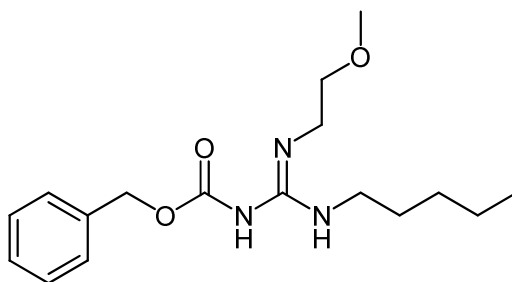
$\delta/\text{ppm} = 1.36$ (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.41-1.57 (m, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.06, 3.19 (2 \times m, 2H, N-CH_2), 3.30 (s, 3H, O-CH_3), 3.31-3.44 (m, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 4.56 (br s, 1H, NH), 5.04 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cbz}$), 7.24-7.36 (m, 3H, ArH), 7.39-7.43 (m, 2H, ArH), 9.19 (br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 27.1$, 28.2 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 29.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.7, 41.4 (3 \times N-CH_2), 59.6 (O-CH_3), 67.2 (O-CH_2 , $\text{CH}_2\text{-Cbz}$), 80.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.2, 128.6, 128.9 (ArCH), 138.5 (ArC), 156.7 (C=N), 164.8 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 423$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

***N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-(2-methoxyethyl)-*N''*-(*n*-pentyl)guanidin (40c)**

Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (98:2) verwendet.

Ausbeute: 155 mg eines klaren Öls (96 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 0.91$ (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.35 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.60 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.25 (m, 2H, N-CH_2), 3.39 (s, 3H, O-CH_3), $3.41\text{-}3.53$ (m, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 5.15 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cbz}$), $7.26\text{-}7.37$ (m, 3H, ArH), $7.39\text{-}7.43$ (m, 2H, ArH), 9.04 (br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 14.6$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 23.0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 29.5 , 29.7 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 41.8 (N-CH_2), 59.6 (O-CH_3), 67.1 (O-CH_2), 128.2 , 128.7 , 128.9 (ArCH), 138.5 (ArC), 164.9 (CO).

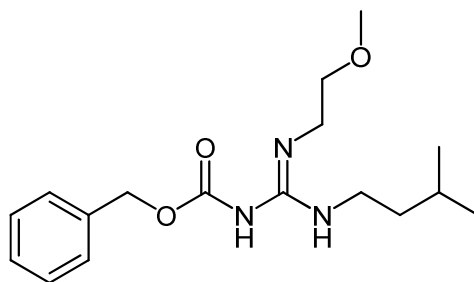
MS (ESI):

$m/z = 322$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 278 [$\text{M} - \text{CO}_2 + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 0,3 \text{H}_2\text{O}$ (326.83)

Ber. C 62.48 H 8.51 N 12.86

Gef. C 62.42 H 8.99 N 12.50

***N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-(2-methoxyethyl)-*N''*-(3-methylbutyl)guanidin (40d)**

Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (98:2) verwendet.

Ausbeute: 153 mg eines klaren Öls (95 %)

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

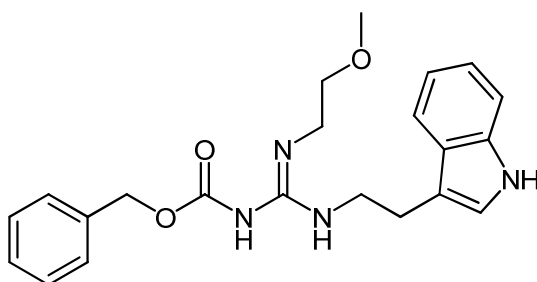
$\delta/\text{ppm} = 0.91, 0.94$ ($2 \times \text{s}, 3\text{H}, \text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 1.66 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.23 (m, 2H, N- CH_2), 3.37 (s, 3H, O- CH_3), $3.38\text{-}3.50$ (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 5.11 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cbz}$), $7.22\text{-}7.34$ (m, 4H, ArH), $7.37\text{-}7.41$ (m, 2H, ArH), 9.08 (br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 23.0$ ($\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 26.3 ($\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 38.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 40.1 (N- CH_2), 59.5 (O- CH_3), 67.2 (O- CH_2), $128.2, 128.6, 128.9$ (ArCH), 138.3 (ArC), 164.3 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 322$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

***N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-[2-(indol-3'-yl)ethyl]-*N''*-(2-methoxyethyl)guanidin (40e)**

Als Elutionsmittel wird Dichlormethan/Methanol (96:4) verwendet.

Ausbeute: 187 mg eines bräunlich-beigen Feststoffes (95 %)

DC: $R_f = 0,43$ (Dichlormethan/Methanol, 96:4; Reagenz C)

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

$\delta/\text{ppm} = 3.04$ (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, 3'-C-CH₂), 3.18, 3.23-3.43 (2 × m, 7H, 3'-C-CH₂-CH₂, N-CH₂, O-CH₃), 3.46-3.73 (m, 2H, O-CH₂), 5.15 (s, 2H, CH₂-Cbz), 7.04 (br d, 1H, 2'-CH), 7.13, 7.21 (2 × td, 2H, 5',6'-CH), 7.25-7.39 (m, 4H, ArH-Cbz, 7'-CH), 7.40-7.48 (m, 2H, ArH-Cbz), 7.61 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 4'-CH), 9.17 (br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 25.9$ (3'-C-CH₂), 42.3 (N-CH₂), 59.4 (O-CH₃), 67.2 (O-CH₂, CH₂-Cbz), 111.9, 119.2, 120.1, 122.8, 123.0, 128.2, 128.6, 128.9, 137.1, 138.5 (7'a-C, ArC-Cbz), 165.0 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 395$ [M + H]⁺.

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$ (394.48)

Ber. C 66.99 H 6.64 N 14.20

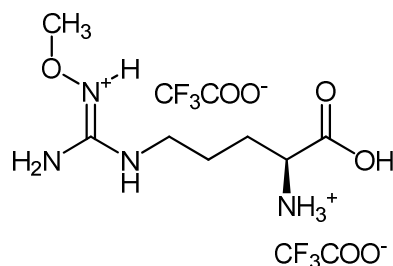
Gef. C 66.36 H 6.67 N 14.05

7.1.2.2.4 N^{ω} -alkylierte L-Arginine (37a-i)

Modifizierte, allgemeine Vorschrift zum Entschützen der vollständig geschützten N^{ω} -alkylierten L-Arginine in Anlehnung an Martin *et al.* [2006]:²⁰⁹

Die geschützten L-Arginine **36b-i** (0,4 mmol) werden in 8 mL TFA und 2,4 mL Thioanisol für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Großteil an TFA i. Vak. abdestilliert und 5 mL Wasser sowie 15 mL Diethylether werden zugegeben. Die organische Phase wird noch zweimal mit 5 mL Wasser extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen abschließend mit 5 mL Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer einkonzentriert (bei ca. 35 °C) und mit wenig 0,1 %-iger TFA (in *Aqua bidest.*) aufgenommen. Es folgt die Flashchromatographie über eine RP-18-Säule (Elutionsmittel: 0,1 % TFA_(aq)), wobei Ninhydrin-positive Fraktionen vereinigt werden. Die vereinigten Fraktionen werden bis zu einem Volumen von ca. 10 mL am Rotationsverdampfer eingengt und dann in der Gefriertrocknung lyophilisiert.

Die angegebenen R_f -Werte beziehen sich auf Normalphasen-DC (Kieselgel, *i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 6:3:1).

***N*^ω-Methoxy-L-arginin²⁷⁰ Bis(trifluoracetat) (37a)**

Ausbeute: 171 mg eines farblosen Öls (99 %), $R_f = 0,56$

¹H-NMR (D₂O):

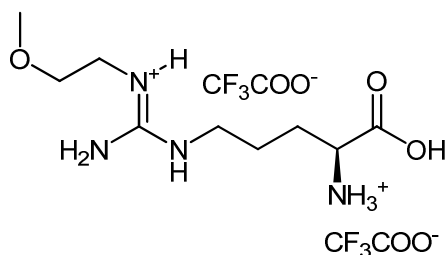
δ /ppm = 1.78 (m, 2H, γ -CH₂), 1.99 (m, 2H, β -CH₂), 3.31 (t, 2H, ³*J* = 6.8 Hz, N-CH₂), 3.75 (s, 3H, O-CH₃), 4.06 (t, ³*J* = 6.2 Hz, 1H, α -CH).

¹³C-NMR (D₂O, TPS):

δ /ppm = 26.4 (γ -CH₂), 29.7 (β -CH₂), 43.0 (N-CH₂), 55.5 (α -CH), 67.3 (O-CH₃), 160.1 (C=N), 174.8 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für C₇H₁₇N₄O₃ [M + H]⁺ = 205.12952, gefunden: 205.12951.

***N*^ω-(2-Methoxyethyl)-L-arginin¹¹⁵ Bis(trifluoracetat) (37b)**

Ausbeute: 179 mg eines farblosen Öls (97 %), $R_f = 0,50$

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

¹H-NMR (D₂O):

δ /ppm = 1.76 (m, 2H, γ -CH₂), 2.00 (m, 2H, β -CH₂), 3.29 (m, 2H, N-CH₂), 3.39 (s, 3H, O-CH₃), 3.40 (m, 2H, N^ω-CH₂), 3.62 (m, 2H, O-CH₂), 4.09 (m, 1H, α -CH).

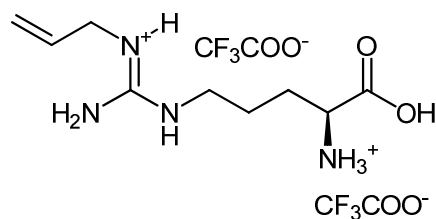
¹³C-NMR (D₂O, TPS):

$\delta/\text{ppm} = 26.6$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.7 ($\beta\text{-CH}_2$), 43.1 (N-CH_2), 43.8 (N-CH_2), 55.4 ($\alpha\text{-CH}$), 60.9 (O-CH_3), 73.1 (O-CH_2), 159.0 (C=N), 174.7 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+ = 233.16082$, gefunden: 233.16073 .

***N*^ω-Allyl-L-arginin²⁷¹ Bis(trifluoracetat) (37c)**



Ausbeute: 173 mg eines farblosen Öls (98 %), $R_f = 0,54$

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 1.74$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 2.00 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 3.30 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, N-CH_2), 3.87 (d, $^3J = 4.6$ Hz, 2H, $\text{N}^\omega\text{-CH}_2$), 4.11 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 5.25 (m, 1H, $\text{CH}=\underline{\text{CH}}_2$), 5.29 (m, 1H, $\text{CH}=\underline{\text{CH}}_2$), 5.90 (ddt, $^3J = 17.3, 10.4, 4.8$ Hz, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$).

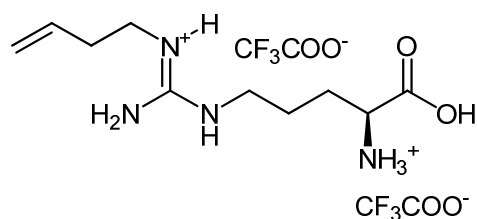
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 26.5$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.6 ($\beta\text{-CH}_2$), $43.0, 45.7$ ($2 \times \text{N-CH}_2$), 55.3 ($\alpha\text{-CH}$), 119.0 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 135.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 158.6 (C=N), 174.5 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+ = 215.15025$, gefunden: 215.15029 .

***N*^ω-(But-3-enyl)-L-arginin Bis(trifluoracetat) (37d)**



Ausbeute: 181 mg eines farblosen Öls (99 %), $R_f = 0,61$

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 1.76$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.98 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.34 (br pseudo q, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 3.27 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, N- CH_2), 3.29 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, N- CH_2), 4.11 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 5.16 (m, 2H, CH=CH_2), 5.84 (ddt, $^3J = 17.2, 10.3, 6.8$ Hz, 1H, CH=CH_2).

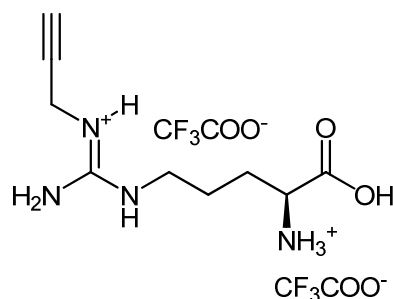
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 26.6$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.6 ($\beta\text{-CH}_2$), 35.1 ($\text{CH}_2\text{-CH=}$), $42.98, 43.0$ ($2 \times$ N- CH_2), 55.3 ($\alpha\text{-CH}$), 120.2 (CH=CH_2), 137.6 (CH=CH_2), 158.5 (C=N), 174.4 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+ = 229.16590$, gefunden: 229.16596 .

N^ω -Propargyl-L-arginin²⁰⁶ Bis(trifluoracetat) (37e)



Ausbeute: 173 mg eines farblosen Öls (98 %), $R_f = 0,57$

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 1.75$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.99 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.76 (m, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.28 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, N- CH_2), 4.03 (d, $^4J = 2.3$ Hz, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.08 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$).

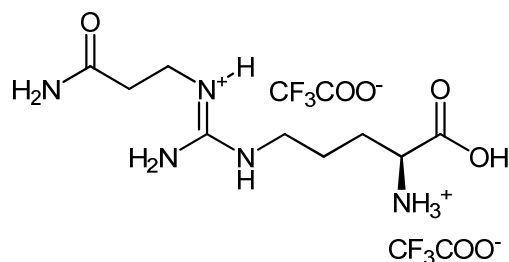
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 26.5$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.6 ($\beta\text{-CH}_2$), 33.3 (N- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 43.2 (N- CH_2), 55.3 ($\alpha\text{-CH}$), 76.4 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 80.6 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 158.4 (C=N), 174.6 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+ = 213.1346$, gefunden: 213.13448 .

N^ω -(2-Carbamoylethyl)-L-arginin Bis(trifluoracetat) (37f)



Ausbeute: 185 mg eines farblosen Öls (97 %), $R_f = 0,43$

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 1.73$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.98 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.57 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CONH}_2$), 3.26 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, N- CH_2), 3.48 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, $\text{N}^\omega\text{-CH}_2$), 4.07 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$).

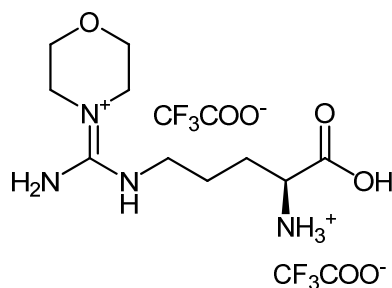
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 26.5$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.6 ($\beta\text{-CH}_2$), 36.8 ($\text{CH}_2\text{-CONH}_2$), 40.1, 43.1 ($2 \times \text{N-CH}_2$), 55.4 ($\alpha\text{-CH}$), 158.6 (C=N), 174.6 (CONH₂), 179.0 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 246.15607$, gefunden: 246.15587.

N^δ -[(Aminomorpholino)methyliden]-L-ornithin Bis(trifluoracetat) (37g)



Ausbeute: 184 mg eines farblosen Öls (97 %), $R_f = 0,38$

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 1.70$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.96 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 3.30 (t, 2H, $^3J = 6.8$ Hz, N- CH_2), 3.44 (t, $^3J = 4.9$ Hz, 4H, $2 \times \text{N-CH}_2$), 3.76 (t, $^3J = 4.9$ Hz, 4H, $2 \times \text{O-CH}_2$), 4.09 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$).

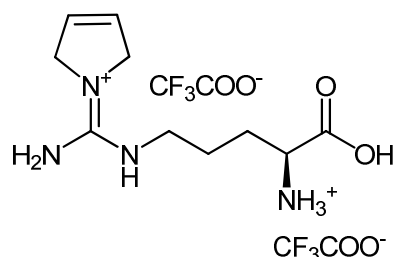
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 26.5$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.6 ($\beta\text{-CH}_2$), 43.9, 48.5 ($3 \times \text{N-CH}_2$), 55.1 ($\alpha\text{-CH}$), 68.3 ($2 \times \text{O-CH}_2$), 159.1 (C=N), 174.4 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 245.16082$, gefunden: 245.16070.

***N*^δ-[(Amino-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin Bis(trifluoracetat) (37h)**



Ausbeute: 175 mg eines schwach gelben Öls (96 %), $R_f = 0,44$

¹H-NMR (D₂O):

δ /ppm = 1.75 (m, 2H, γ -CH₂), 1.98 (m, 2H, β -CH₂), 3.33 (t, ³*J* = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂), 4.10 (t, ³*J* = 6.2 Hz, 1H, α -CH), 4.20 (s, 4H, 2 × N^o-CH₂), 5.90 (s, 2H, CH₂-CH=).

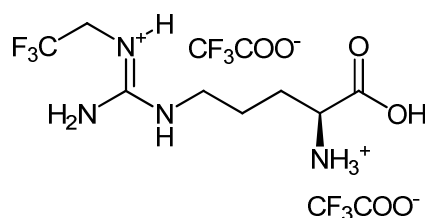
¹³C-NMR (D₂O, TPS):

δ /ppm = 26.7 (γ -CH₂), 29.6 (β -CH₂), 43.6 (N-CH₂), 55.3 (α -CH), 56.4 (CH₂-CH=), 127.4 (CH₂-CH=), 155.9 (C=N), 174.5 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für C₁₀H₁₉N₄O₂ [M + H]⁺ = 227.15025, gefunden: 227.15026.

***N*^o-(2,2,2-Trifluorethyl)-L-arginin Bis(trifluoracetat) (37i)**



Ausbeute: 192 mg eines farblosen Öls (99 %), $R_f = 0,70$

¹H-NMR (D₂O):

δ /ppm = 1.77 (m, 2H, γ -CH₂), 1.91 (m, 2H, β -CH₂), 3.31 (m, 2H, N-CH₂), 4.0 (q, ³*J*_(H-F) = 8.8 Hz, 2H, N^o-CH₂), 4.09 (m, 1H, α -CH).

¹³C-NMR (D₂O, TPS):

δ /ppm = 26.4 (γ -CH₂), 29.6 (β -CH₂), 45.1 (q, ²*J*_(C-F) = 34.9 Hz, CH₂-CF₃), 43.3 (N-CH₂), 55.2 (α -CH), 126.5 (q, ¹*J*_(C-F) = 278.8 Hz, CF₃), 158.9 (C=N), 174.4 (CO).

HRMS (m/z):

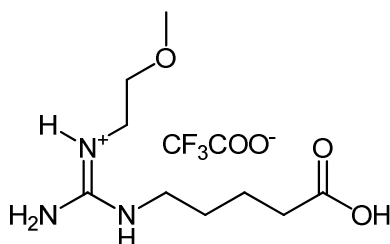
berechnet für $C_8H_{16}F_3N_4O_2$ $[M + H]^+ = 257.12199$, gefunden: 257.12193.

7.1.2.2.5 *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine (41a-e)

Allgemeine Vorschrift:

Die Cbz-geschützten Guanidine **40a-e** (0,5 mmol) werden mit 10 mL TFA und 3 mL Thioanisol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Großteil an TFA i. Vak. abdestilliert und 5 mL Wasser sowie 15 mL Diethylether werden zugegeben. Die organische Phase wird noch zweimal mit 5 mL Wasser extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen abschließend mit 5 mL Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wird i. Vak. einkonzentriert und die so erhaltenen Rohprodukte chromatographisch aufgereinigt.

N-(4-Carboxybutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin Trifluoracetat (41a)



Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie über eine RP-18-Säule gereinigt, wobei ein 0,1 % TFA_(aq)/Methanol (0-20 %)-Stufengradient verwendet wird. Es werden die folgenden Fraktionen gepoolt: Ab Totvolumen der Säule bis zur der Fraktion, in der die Detektion einer mit Reagenz B anfärbbaren Verunreinigung (Spaltprodukt aus Cbz-Deprotektion) erfolgt.

Ausbeute: 158 mg eines klaren Öls (95 %)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 1.50 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂), 2.23 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CO), 3.13 (pseudo q, 2H, N-CH₂), 3.27 (s, 3H, O-CH₃), 3.32 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-O), 3.42 (t, ³J = 5.1 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-O), 7.42 (br s, 2H, NH₂), 7.51 (br t, ³J = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.58 (br t, ³J = 5.4 Hz, 1H, NH), 10.64 (br s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆):

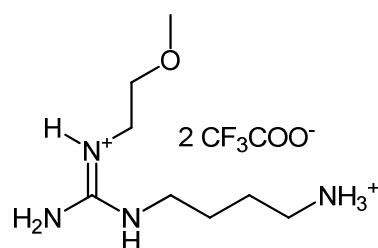
δ /ppm = 21.5 (CH₂-CH₂-CO), 27.9 (N-CH₂-CH₂-CH₂), 33.1 (CH₂-CO), 40.6, 40.7 (2 × N-CH₂), 58.0 (O-CH₃), 70.0 (O-CH₂), 155.9 (C=N), 174.2 (COOH).

MS (ESI):

 $m/z = 435 [2 \times M]^+, 218 [M + H]^+$. $C_9H_{19}N_3O_3 \cdot 1,5 CF_3COOH$ (388.31)

Ber. C 37.12 H 5.32 N 10.82

Gef. C 37.36 H 4.98 N 11.24

N-(4-Aminobutyl)-N'-(2-methoxyethyl)guanidin Bis(trifluoracetat) (41b)

Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie über eine RP-18-Säule gereinigt (Elutionsmittel: 0,1 % TFA_(aq)). Die Ninhydrin-positiven Fraktionen werden vereinigt und i. Vak. einkonzentriert.

Ausbeute: 234 mg eines klaren Öls (99 %)

DC: $R_f = 0,22$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 8:2+0,5; Reagenz A) 1H -NMR (DMSO- d_6):

$\delta/ppm = 1.54$ (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂), 2.80 (m, 2H, N-CH₂), 3.14 (m, 2H, N-CH₂), 3.27 (s, 3H, O-CH₃), 3.32, 3.42 (2 \times t, 4H, N-CH₂-CH₂-O), 7.47 (br s, 2H, NH₂), 7.61 (br t, 1H, NH), 7.71 (br t, 1H, NH), 7.87 (br s, 3H, NH₃⁺).

 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6):

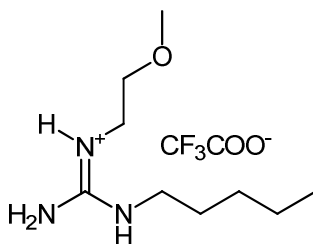
$\delta/ppm = 24.1$ (CH₂-CH₂-NH₃⁺), 25.4 (CH₂-CH₂-CH₂-NH₃⁺), 38.3 (N-CH₂), 40.3 (N-CH₂), 40.7 (N-CH₂), 58.0 (O-CH₃), 70.0 (O-CH₂), 155.9 (C=N).

MS (ESI):

 $m/z = 189 [M + H]^+$. $C_8H_{16}N_4O_5 \cdot 2,5 CF_3COOH$ (473.33)

Ber. C 32.99 H 4.79 N 11.84

Gef. C 32.86 H 4.80 N 11.50

***N*-(2-Methoxyethyl)-*N'*-(*n*-pentyl)guanidin Trifluoracetat (41c)**

Das Rohprodukt wird über Kieselgel aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol, 9:1).

Ausbeute: 152 mg eines farblosen Öls (98 %)

DC: $R_f = 0,27$ (Dichlormethan/Methanol, 9:1; Reagenz B)

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

$\delta/\text{ppm} = 0.86$ (br t, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.19-1.34 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.44 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.10 (m, 2H, N-CH_2), 3.26 (s, 3H, O-CH_3), 3.30 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.41 (t, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 7.41 (br s, 2H, NH_2), 7.52, 7.57 (2 \times br t, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 13.7$ (CH_3), 21.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 28.0, 28.1 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 40.7, 40.8 (2 \times N-CH_2), 58.0 (O-CH_3), 70.0 (O-CH_2), 155.9 (C=N).

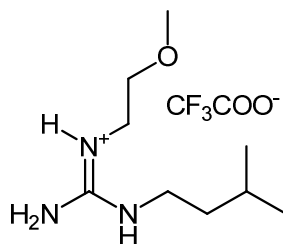
MS (ESI):

$m/z = 188$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O} \cdot 1,0 \text{ CF}_3\text{COOH} \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ (310.32)

Ber. C 42.58 H 7.47 N 13.54

Gef. C 42.51 H 7.37 N 13.43

***N*-(2-Methoxyethyl)-*N'*-(3-methylbutyl)guanidin Trifluoracetat (41d)**

Das Rohprodukt wird über Kieselgel aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol, 9:1).

Ausbeute: 158 mg eines farblosen Öls (99 %)

DC: $R_f = 0,27$ (Dichlormethan/Methanol, 9:1; Reagenz B)

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

$\delta/\text{ppm} = 0.88$ (d, $^3J = 6.6$ Hz, 6H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 1.38 (dt, $^3J = 7.0, 7.4$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}$), 1.60 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 3.13 (m, 2H, N- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.28 (s, 3H, O- CH_3), $3.31, 3.42$ ($2 \times$ t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, N- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 7.43 (br s, 2H, NH_2), 7.54 (br m, 2H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 22.1$ ($2 \times \text{CH}_3$), 24.9 (CH), 37.0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}$), 39.3 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 40.7 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 58.0 (O- CH_3), 70.0 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 155.9 (C=N).

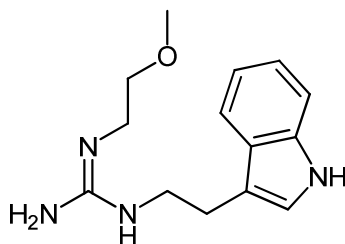
MS (ESI):

$m/z = 188$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 1,0 \text{ CF}_3\text{COOH} \cdot 1,0 \text{ H}_2\text{O}$ (319.33)

Ber. C 41.38 H 7.58 N 13.16

Gef. C 41.41 H 7.05 N 12.97

N-[2-(Indol-3'-yl)ethyl]-N'-(2-methoxyethyl)guanidin (41e)

Abweichend von der allgemeinen Vorschrift: 197 mg der Cbz-geschützten Ausgangsverbindungen (0,5 mmol) werden in 20 mL Methanol gelöst und 100 mg Palladium-Kohle zugegeben. Anschließend wird 3 Tage bei 3 bar hydriert, bis kein Edukt mehr per DC nachzuweisen ist. Der Ansatz wird über Celite filtriert, mit Methanol nachgewaschen, i. Vak. eingeengt und mit 1-2 mL *Aqua bidest.* aufgenommen. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie auf einer RP-18-Säule gereinigt, wobei ein Wasser/Methanol (0-20 %)-Stufengradient verwendet wird.

Ausbeute: 25 mg eines feinen weißen Pulvers (19 %)

$^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4):

δ/ppm = 3.03 (t, 3J = 6.8 Hz, 2H, 3'-C-CH₂), 3.25 (t, 3J = 5.2 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-O), 3.27 (s, 3H, O-CH₃), 3.40 (t, 3J = 5.2 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-O), 3.52 (t, 3J = 6.8 Hz, 2H, N-CH₂), 7.02 (td, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.1 Hz, 1H, 5',6'-CH), 7.10 (td, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.2 Hz, 1H, 5',6'-CH), 7.13 (s, 1H, 2'-CH), 7.35 (dt, 3J = 8.0 Hz, 1H, 7'-CH), 7.55 (dt, 3J = 7.9 Hz, 1H, 4'-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4):

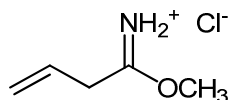
δ/ppm = 16.4 (3'-C-CH₂), 33.4 (N-CH₂), 33.9 (N-CH₂), 49.6 (O-CH₃), 62.9 (O-CH₂), 102.6 (3'-C), 102.9, 109.6, 110.3, 113.0 (4',5',6',7'-CH), 114.5 (2'-CH), 119.1 (3'a-C), 128.6 (7'a-C), 149.0 (C=N).

MS (ESI):

m/z = 261 [M + H]⁺.

7.1.2.2.6 N-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin (45)**But-3-enimidsäuremethylester Hydrochlorid^{217,218}**

Modifizierte Synthese in Anlehnung an Bretscher *et al.* [2003]:²¹⁷



Es werden 2,19 g Allylcyanid (32,6 mmol) in 2,641 mL trockenem Methanol (65,2 mmol) unter Argon-Begasung in einem Schlenk-Kolben gelöst und für 30 min auf -5 °C gekühlt. Anschließend wird HCl-Gas für ca. 15 min durch die Lösung geleitet, wobei durch gleichzeitige Argon-Begasung das Ausschließen von Luftfeuchtigkeit gewährleistet wird. Das Reaktionsgefäß wird dicht verschlossen über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Nach ca. 24 Stunden wird die Lösung auf 100 mL trockenen Diethylether gegossen, wobei das Produkt als feiner weißer Feststoff präzipitiert. Es wird scharf abfiltriert, mit Diethylether nachgewaschen, über Phosphorpentoxid getrocknet und unter Argon im Kühlschrank gelagert.

Ausbeute: 4,0 g eines feinen weißen Pulvers (90 %) (Lit.: 80 %)²¹⁷

Die Substanz hydrolysiert schnell in D₂O, so dass abweichend von der Literatur in CDCl₃ gemessen wurde.²¹⁸

¹H-NMR (CDCl₃):

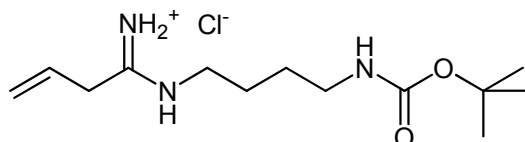
δ/ppm = 3.51 (d, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH-CH₂), 4.28 (s, 3H, O-CH₃), 5.30 (dd, ³J_{cis} = 10.0 Hz, ²J = 1.0 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.36 (dd, ³J_{trans} = 17.0 Hz, ²J = 1.0 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.83 (ddt, ³J = 6.9, 10.0, 17.0 Hz, 1H, CH=CH₂), 11.69, 12.57 (2 × br s, 1H, NH₂⁺).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ/ppm = 37.2 (CH-CH₂), 61.0 (O-CH₃), 122.4 (CH=CH₂), 126.8 (CH=CH₂), 178.2 (C=N).

***N*-[4'-(*t*-Butyloxycarbonyl)-aminobutyl]but-3-enamidin Hydrochlorid (44)**

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Bretscher *et al.* [2003]:²¹⁷



Es werden 188 mg *N*-(*t*-Butyloxycarbonyl)-1,4-diaminobutan (1 mmol) und 407 mg But-3-enimidsäuremethylester Hydrochlorid (3 mmol) in 10 mL Wasser bei 0 °C gelöst. Zu dieser Lösung wird 2,5 M NaOH zugegeben bis ca. pH 10 erreicht ist und anschließend zwei Stunden bei 0 °C, sowie eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit verdünnter HCl auf pH 7 gebracht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird bei ca. 30 °C am Rotationsverdampfer einkonzentriert und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel aufgearbeitet, wobei ein Ethylacetat/Methanol-Gradient (stufenweise: 20-40 % Methanol) verwendet wird.

Ausbeute: 250 mg eines weißgetrübten Öls (86 %)

DC: $R_f = 0,17$ (Ethylacetat/Methanol, 8:2; Reagenz A)

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

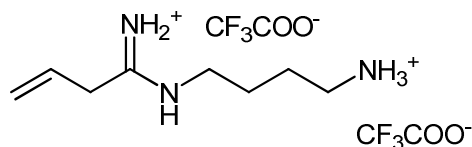
$\delta/\text{ppm} = 1.36$ (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.39-1.54 (m, 4H, 2',3'-CH₂), 2.91 (m, 2H, 4'-CH₂), 3.18-3.29 (m, 4H, 2,1'-CH₂), 5.20 (dd, $^3J_{\text{cis}} = 10.0$ Hz, $^2J = 1.3$ Hz, 1H, CH=CH₂), 5.30 (dd, $^3J_{\text{trans}} = 17.0$ Hz, $^2J = 1.5$ Hz, 1H, CH=CH₂), 5.91 (ddt, $^3J = 6.8, 10.0, 17.0$ Hz, 1H, CH=CH₂), 6.81, 8.87, 9.40, 9.98 (4 × br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 24.6, 26.6$ (2',3'-CH₂), 28.2 (C(CH₃)₃), 36.0 (2-CH₂), 39.2, 41.5 (1',4'-CH₂), 77.3 (C(CH₃)₃), 119.7 (CH=CH₂), 130.9 (CH=CH₂), 155.5 (CO), 164.7 (C=N).

MS (ESI):

$m/z = 278$ [M + Na]⁺, 256 [M + H]⁺, 200 [M - C₂H₈ + H]⁺.

N-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin Bis(trifluoracetat) (45)

220 mg des Boc-geschützten Amidins **44** (0,75 mmol) werden in 5 mL TFA/Dichlormethan (1:1) für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird i. Vak. einkonzentriert, mit 5 mL Wasser versetzt und zweimal mit Diethylether gewaschen. Die Lösung wird bis auf ca. 1-2 mL einrotiert und mittels Flashchromatographie über eine RP-18-Säule weiter aufgearbeitet. Als Elutionsmittel wird 0,1 %-ige TFA in *Aqua bidest.* verwendet.

Ausbeute: 285 mg eines farblosen Öls (99 %)

DC: $R_f = 0,35$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 8:2+0,5; Reagenz A)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.57$ (m, 4H, 2',3'-CH₂), 2.81 (m, 2H, 4'-CH₂), 3.17-3.26 (m, 4H, 2,1'-CH₂), 5.23-5.31 (m, 2H, CH=CH₂), 5.87 (ddt, $^3J = 17.0, 10.0, 6.7$ Hz, 1H, CH=CH₂), 7.86 (br s, 3H, NH₃⁺), 8.74, 9.16, 9.57 (3 × br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 24.1, 24.2$ (2',3'-CH₂), 36.5 (2-CH₂), 38.2, 41.2 (1',4'-CH₂), 120.0 (CH=CH₂), 130.4 (CH=CH₂), 165.1 (C=N).

MS (ESI):

$m/z = 156$ [M + H]⁺, 139 [M - NH₃ + H]⁺.

C₈H₁₇N₃·2,5 CF₃COOH·0,5 H₂O (449.31)

Ber. C 34.75 H 4.60 N 9.35

Gef. C 34.92 H 4.75 N 9.10

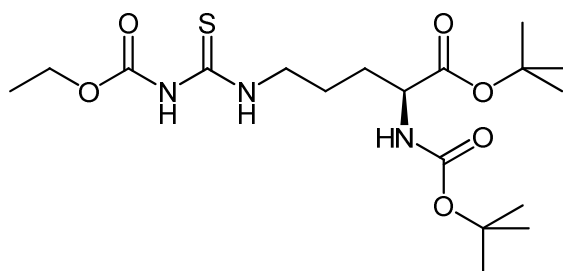
7.1.2.3 Synthese von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs und analoger Modellsubstanzen

7.1.2.3.1 N -Ethoxycarbonylthioharnstoffe (50, 69)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Ethoxycarbonylthioharnstoffe in Anlehnung an Linton *et al.* [2000]:²⁰⁸

8,0 mmol des betreffenden Amins werden in 250 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und 927 mg Ethoxycarbonylthioisocyanat (7,0 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Dichlormethan, tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Gemisch am Rotationsverdampfer auf ca. ein Drittel des ursprünglichen Volumens eingengt und mit jeweils 25 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Die Thioharnstoffe sind an dieser Stelle meist schon zu > 96 % rein (DC). Sie werden im Fließmittel angelöst, mit Aktivkohle versetzt und mittels Flashchromatographie über eine kurze Kieselgel-Säule gereinigt.

N^{α} -(*t*-Butyloxycarbonyl)- N^{ω} -ethoxycarbonyl-L-thiocitrullin-*t*-butylester (50)



Es wird eine Säule mit etwa 20 g Kieselgel und als Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (4:1) verwendet.

Ausbeute: 2,76 g eines farblosen Öls (94 %)

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

Schmp.: 81 °C

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

$\delta/\text{ppm} = 1.31$ (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.45, 1.47 (2 \times s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.61-1.90 (m, 4H, $\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 3.66 (pseudo q, 2H, N- CH_2), 4.22 (q, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.08 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 8.06, 9.70 (2 \times br s, 1H, NH).

^{13}C -NMR (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 14.9$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 24.9 ($\gamma\text{-CH}_2$), 28.7 , 29.0 ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.0 ($\beta\text{-CH}_2$), 45.8 (N-CH_2), 54.3 ($\alpha\text{-CH}$), 63.4 (O-CH_2), 82.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 153.4 (CO-Eoc), 156.2 (CO-Boc), 172.5 (CO^tBu), 180.1 (C=S).

MS (ESI):

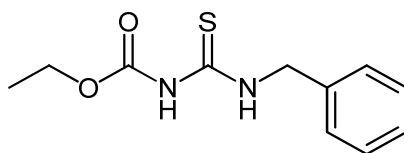
$m/z = 442$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 420 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 308 [$\text{M} - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}$] $^+$,
 264 [$\text{M} - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ (419.54)

Ber. C 51.53 H 7.93 N 10.02 S 7.64

Gef. C 51.68 H 7.97 N 10.06 S 7.62

***N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonylthioharnstoff (69)²⁰⁸**



Es wird eine Säule mit etwa 10 g Kieselgel und als Elutionsmittel Dichlormethan/Methanol (9:1) verwendet.

Ausbeute: 1,76 g eines weißen Pulvers (96 %)

DC: $R_f = 0,43$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1)

Schmp.: $103\text{ }^\circ\text{C}$

^1H -NMR (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.30$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.20 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, O-CH_2), 4.86 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, N-CH_2), $7.26\text{-}7.37$ (m, 5H, ArH), 8.23 , 9.95 ($2 \times$ s, 1H, NH).

^{13}C -NMR (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 14.8$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 50.3 (N-CH_2), 63.4 (O-CH_2), 128.8 , 129.2 , 129.5 (ArCH), 137.0 (ArC), 153.4 (CO), 180.1 (C=S).

MS (ESI):

$m/z = 261$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 239 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 91 [C_7H_7] $^+$.

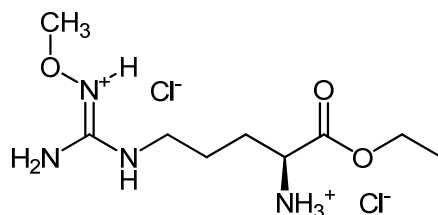
$C_{11}H_{14}N_2O_2S$ (238.31)

Ber. C 55.44 H 5.92 N 11.76 S 13.46

Gef. C 55.69 H 6.06 N 11.71 S 13.30

7.1.2.3.2 N^0 -Methoxy-L-arginin-Prodrugs

N^0 -Methoxy-L-arginin-ethylester Dihydrochlorid (49)



Zur Veresterung werden 238 mg der freien Aminosäure **37a** (0,55 mmol) in 5 mL absolutem Ethanol unter Argon-Atmosphäre gelöst. Die Lösung wird 30 min bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, bevor für ca. 5-10 min HCl-Gas in die Lösung eingeleitet wird. Anschließend wird der Ansatz für eine Stunde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ weitergerührt und 36 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Die Lösung wird vorsichtig i. Vak. bei Raumtemperatur einkonzentriert und lyophilisiert. Das so erhaltene Produkt fällt als sehr hygroskopischer, amorpher Feststoff an, welcher bei Luftkontakt verflüssigt.

Ausbeute: 168 mg eines klaren Öls (99 %)

DC: $R_f = 0,18$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 8:1:1; Reagenz A)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.24$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.47-1.90 (m, 4H, $\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 3.22 (m, 2H, N- CH_2), 3.64 (s, 3H, O- CH_3), 3.99 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 4.21 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 8.04 (br s, 2H, NH_2), 8.31 (br t, 1H, NH), 8.72 (br s, 3H, NH_3^+), 11.33 (br s, 1H, NH^+).

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

$\delta/\text{ppm} = 13.9$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 24.0 ($\gamma\text{-CH}_2$), 27.0 ($\beta\text{-CH}_2$), 40.0 (N- CH_2), 51.4 ($\alpha\text{-CH}$), 61.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 64.4 (O- CH_3), 157.2 (C=N), 169.2 (CO).

HRMS (m/z):

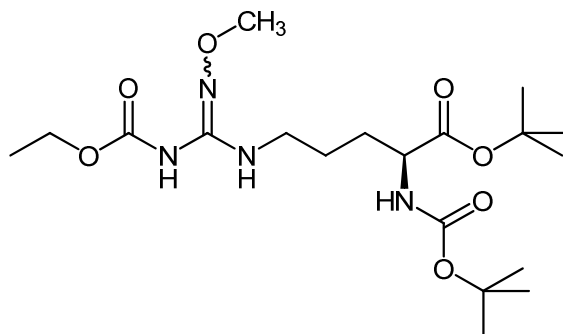
berechnet für $C_9H_{21}N_4O_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 233.16082$, gefunden: 233.16064.

$C_9H_{20}N_4O_3 \cdot 2,0 HCl \cdot 0,7 H_2O$ (317.82)

Ber. C 34.01 H 7.42 N 17.63

Gef. C 33.65 H 7.66 N 18.20

N^α -(*t*-Butyloxycarbonyl)- N^ω -ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -methoxy-L-arginin-*t*-butylester (51)



210 mg des Thioharnstoffs **50** (0,5 mmol) werden in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 261 μ L DIPEA (1,5 mmol) sowie 62,6 mg Methoxylamin Hydrochlorid (0,75 mmol) zugegeben. Die Lösung wird für ca. 30 min auf 0 °C gebracht und 143,5 mg EDCI (0,75 mmol) zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit ca. 10 mL Dichlormethan verdünnt und jeweils mit 5 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel weiter aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol, 98:2).

Ausbeute: 203 mg eines farblosen Öls (94 %)

DC: $R_f = 0,26$ (Dichlormethan/Methanol, 98:2; Reagenz A)

1H -NMR ($CDCl_3$):

δ /ppm = 1.27 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2-CH_3), 1.43, 1.45 (2 \times s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.56-1.89 (m, 4H, $\beta, \gamma-CH_2$), 3.09 (m, 2H, N- CH_2), 3.66 (s, 3H, O- CH_3), 4.16 (br q, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2-CH_3 , $\alpha-CH$), 5.10, 6.26 (2 \times br m, 1H, NH), 7.80 (br s, 1H, NH).

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

δ /ppm = 14.9 (CH_2-CH_3), 25.6 ($\gamma-CH_2$), 29.7 ($\beta-CH_2$), 29.0, 30.9 (2 \times $C(CH_3)_3$), 41.2 (N- CH_2), 54.5 ($\alpha-CH$), 62.0 (CH_2-CH_3), 62.6 (O- CH_3), 80.2, 82.5, (2 \times $C(CH_3)_3$), 149.0 (C=N), 153.8 (CO-Eoc), 156.0 (CO-Boc), 172.4 (COO^tBu).

MS (ESI):

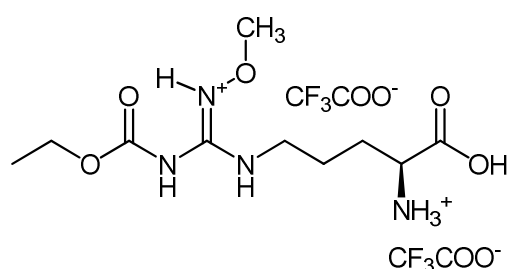
$m/z = 455 [M + Na]^+$, $433 [M + H]^+$, $377 [M - C_4H_8 + H]^+$.

$C_{19}H_{36}N_4O_7$ (432.52)

Ber. C 52.76 H 8.39 N 12.95

Gef. C 53.65 H 8.57 N 13.24

N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -methoxy-L-arginin Bis(trifluoracetat) (52)



200 mg des vollständig geschützten N^{ω} -Methoxy-L-arginins **51** (0,46 mmol) werden in 5 mL TFA zuerst 30 min bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. TFA wird vorsichtig bei möglichst niedriger Temperatur i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit wenig *Aqua bidest.* aufgenommen. Es folgt die weitere Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf einer RP-18-Säule (0,1 % TFA in *Aqua bidest.*). Die Ninhydrin-positiven Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bei etwa 30 °C auf ein Restvolumen von ca. 10 mL eingengt und lyophilisiert.

Ausbeute: 225 mg eines farblosen Öls (97 %)

DC: $R_f = 0,44$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 8:1:1, Reagenz A)

1H -NMR (DMSO- d_6):

$\delta/ppm = 1.22$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2-CH_3), 1.50-1.87 (m, 4H, $\beta, \gamma-CH_2$), 3.12 (br t, 2H, N- CH_2), 3.62 (s, 3H, O- CH_3), 3.90 (m, 1H, $\alpha-CH$), 4.13 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2-CH_3), 7.35 (br s, 1H, NH), 8.28 (br s, 3H, NH_3^+).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6):

$\delta/ppm = 14.1$ (CH_2-CH_3), 24.6 ($\gamma-CH_2$), 27.3 ($\beta-CH_2$), 40.6 (N- CH_2), 51.7 ($\alpha-CH$), 61.6 (CH_2-CH_3), 62.1 (O- CH_3), 149.0 (C=N), 153.5 (CO-Eoc), 170.9 (CO).

HRMS (m/z):

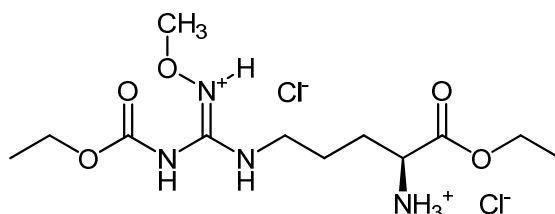
berechnet für $C_{10}H_{21}N_4O_5 [M + H]^+ = 277.15065$, gefunden: 277.15049.

$C_{10}H_{20}N_4O_5 \cdot 2,0 CF_3COOH \cdot 0,4 H_2O$ (513.56)

Ber. C 32.74 H 4.87 N 10.91

Gef. C 32.44 H 4.69 N 10.53

N^0 -Ethoxycarbonyl- N^{01} -methoxy-L-arginin-ethylester Dihydrochlorid (53)



Zur Veresterung werden 200 mg der freien Aminosäure **52** (0,397 mmol) in 5 mL absolutem Ethanol unter Argon-Atmosphäre gelöst. Die Lösung wird 30 min bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, bevor für ca. 5-10 min HCl-Gas in die Lösung eingeleitet wird. Anschließend wird der Ansatz für eine Stunde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ weitergerührt und 36 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Die Lösung wird vorsichtig i. Vak. bei Raumtemperatur einkonzentriert und lyophilisiert. Das so erhaltene Produkt fällt als sehr hygroskopischer, amorpher Feststoff an, welcher bei Luftkontakt verflüssigt.

Ausbeute: 150 mg eines farblosen Öls (99 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.23, 1.25$ ($2 \times t$, $^3J = 7.0\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), $1.55\text{-}1.88$ (m, 4H, $\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 3.32 (br t, 2H, N- CH_2), 3.71 (s, 3H, O- CH_3), 3.95 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 4.19 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-CH}_3$), 8.80 (br s, 4H, NH_3^+ , NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 13.9, 14.0$ ($2 \times \text{CH}_2\text{-CH}_3$), 24.0 ($\gamma\text{-CH}_2$), 26.9 ($\beta\text{-CH}_2$), 41.1 (N- CH_2), 51.4 ($\alpha\text{-CH}_2$), $61.7, 62.5$ ($2 \times \text{CH}_2\text{-CH}_3$), 63.9 (O- CH_3), 150.7 (C=N), 152.6 (CO-Eoc), 169.2 (COOEt).

HRMS (m/z):

berechnet für $C_{12}H_{25}N_4O_5$ $[M + H]^+ = 305.18195$, gefunden: 305.18176.

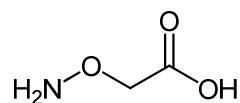
$C_{12}H_{24}N_4O_5 \cdot 2,0 HCl \cdot 0,6 H_2O$ (388.08)

Ber. C 37.14 H 7.06 N 14.44

Gef. C 36.67 H 7.59 N 15.00

7.1.2.3.3 *N*⁰-Carboxymethoxy-L-arginin-Prodrugs

Aminooxyessigsäure Semihydrochlorid²⁷²⁻²⁷⁴



x 0,5 HCl

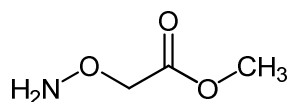
Dieses Reagenz wurde zunächst aus eigener Synthese gewonnen und verwendet. Hierzu wurde eine Dreistufensynthese ausgehend von Benzoesäureethylester beschrieben: Die Darstellung von Kalium-benzhydroxamat erfolgte nach der Vorschrift von Hauser und Renfrow [1943]²⁷⁵ und die anschließende Umsetzung mit Chloressigsäure zur *O*-Carboxymethylbenzhydroxamsäure nach Uohama und Tani [1989].²⁷² Abschließend wurde die Aminooxyessigsäure durch Kochen mit 6 N HCl als Semihydrochlorid erhalten.²⁷² Als ungünstig erwies sich die Rekrystallisation aus *i*-Propanol aufgrund großer Verluste, so dass die Substanz kommerziell von Sigma bezogen und für weitere Umsetzungen verwendet wurde.

Darstellung der Aminooxyessigsäureester (54)

Allgemeine Vorschrift:

Es werden 3,0 g Aminooxyessigsäure Semihydrochlorid (27,44 mmol) in 22 mL des betreffenden Alkohols gelöst. Die Lösung wird nach dem Kühlen auf 0 °C mit HCl gesättigt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird der Ansatz einrotiert, auf 0 °C gebracht und 10 mL Wasser werden zugegeben. Die Lösung wird mit Na₂CO₃ auf pH 8-9 gebracht und mit Diethylether zweimal extrahiert. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das Rohprodukt wird fraktioniert destilliert.

Aminooxyessigsäuremethylester (54a)²⁷⁶⁻²⁷⁸



Ausbeute: 2,0 g einer farblosen Flüssigkeit (70 %)

Sdp.: 86-89 °C (23 mbar) (Lit.: 69 °C, 18,7 mbar)²⁷⁸

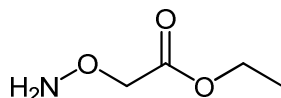
¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

δ/ppm = 3.66 (s, 3H, O-CH₃), 4.16 (s, 2H, O-CH₂), 6.30 (br s, 2H, NH₂).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6):

$\delta/\text{ppm} = 51.2$ (O-CH₃), 72.0 (O-CH₂), 170.8 (CO).

Aminooxyessigsäureethylester (54b)^{278,279}



Ausbeute: 2,5 g einer farblosen Flüssigkeit (76 %)

Sdp.: 95 °C (19 mbar) (Lit.: 89 °C, 18,7 mbar)²⁷⁸

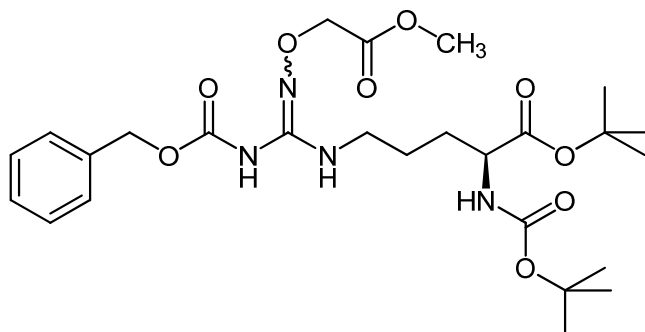
^1H -NMR (DMSO- d_6):

$\delta/\text{ppm} = 1.21$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂-CH₃), 4.13 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.14 (s, 2H, O-CH₂), 6.29 (br s, 2H, NH₂).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6):

$\delta/\text{ppm} = 14.0$ (CH₂-CH₃), 59.9 (CH₂-CH₃), 72.1 (O-CH₂), 170.3 (CO).

N^{ω} -Benzyloxycarbonyl- N^{α} -(*t*-butyloxycarbonyl)- $N^{\omega'}$ -(methoxycarbonyl)methoxy-L-arginin-*t*-butylester (55)



241 mg des Thioharnstoffs **35** (0,5 mmol) werden in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 261 μL DIPEA (0,75 mmol) sowie 79 mg von **54a** (0,75 mmol) zugegeben. Die Lösung wird für ca. 30 min auf 0 °C gebracht und 143,5 mg EDCI (0,75 mmol) werden zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit ca. 10 mL Dichlormethan verdünnt und jeweils mit 5 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird mittels Chromatographie über Kieselgel weiter aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:2).

Ausbeute: 254 mg eines farblosen Öls (92 %)

DC: $R_f = 0,48$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:2; Reagenz A)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.44, 1.46$ ($2 \times \text{s}, 9\text{H}, \text{C}(\text{CH}_3)_3$), $1.50-1.87$ (m, 4H, $\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 3.07 (m, 2H, N- CH_2), 3.73 (s, 3H, O- CH_3), 4.16 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 4.41 (s, 2H, O- CH_2), 5.08 (m, 1H, NH), 5.15 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cbz}$), 6.37 (br t, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, NH), $7.30-7.39$ (m, 5H, ArH), 8.23 (br s, 1H, NH).

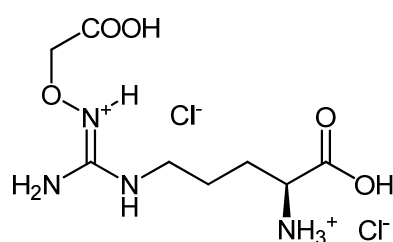
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 25.5$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 28.7 ($\beta\text{-CH}_2$), $29.0, 30.9$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.2 (N- CH_2), 52.4 (O- CH_3), 54.5 ($\alpha\text{-CH}$), 68.3 ($\text{CH}_2\text{-Cbz}$), 71.2 (O- CH_2), $80.3, 82.5$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), $129.0, 129.28, 129.34$ (ArCH), 135.9 (ArC), 150.8 (C=N), 153.7 (CO- Cbz), 156.0 (CO-Boc), $171.7, 172.4$ (CO- ^tBu , COOMe).

MS (ESI):

$m/z = 575$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 553 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 497 [$\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}$] $^+$.

N^0 -Carboxymethoxy-L-arginin Dihydrochlorid (56)



Es werden 270 mg des vollständig geschützten N^0 -Carboxymethoxy-L-arginins **55** (0,489 mmol) in 5 mL 6 N HCl für vier Stunden bei 50-60 °C gerührt. Der Ansatz wird i. Vak. eingengt, mit ca. 1-2 mL *Aqua bidest.* versetzt und anschließend mittels Flashchromatographie auf einer RP-18-Säule gereinigt (0,1 % TFA in *Aqua bidest.*). Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereinigt, bis auf wenige Milliliter am Rotationsverdampfer bei 30 °C eingengt und im Anschluss lyophilisiert.

Ausbeute: 150 mg eines weißen, amorphen Feststoffes (96 %)

DC: $R_f = 0,53$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 6:3:1; Reagenz A)

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 1.76-2.18$ (m, 4H, $\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 3.41 (br t, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, N- CH_2), 4.17 (br t, $^3J = 6.2$ Hz, $\alpha\text{-CH}$), 4.63 (s, 2H, O- CH_2).

^{13}C -NMR (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 26.3$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.6 ($\beta\text{-CH}_2$), 43.2 (N-CH_2), 55.3 ($\alpha\text{-CH}$), 75.5 (O-CH_2), 161.0 (C=N), 174.6 , 175.3 ($2 \times \text{CO}$).

MS (ESI):

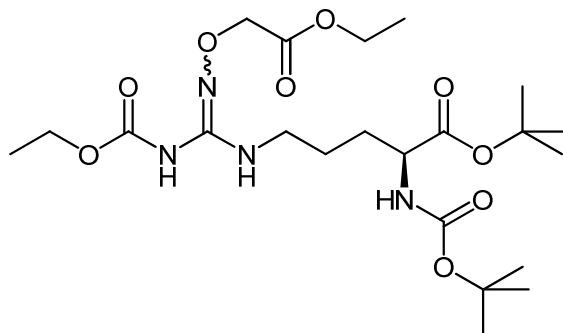
$m/z = 249$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2,0 \text{ HCl} \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ (330.17)

Ber. C 29.10 H 5.80 N 16.97

Gef. C 29.00 H 5.99 N 17.16

N^α -(*t*-Butyloxycarbonyl)- N^ω -ethoxycarbonyl- $\text{N}^{\omega'}$ -(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin-*t*-butylester (57)



Die Darstellung und Aufarbeitung erfolgt unter denselben Bedingungen wie sie für die analoge Verbindung **55** beschrieben sind, mit **50** und **54b** als Ausgangssubstanzen (Ansatzgröße: 1,0 mmol).

Ausbeute: 500 mg eines farblosen Öls (99 %)

DC: $R_f = 0,51$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:2; Reagenz A)

^1H -NMR (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.26$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.27 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.42 , 1.44 ($2 \times$ s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), $1.51\text{-}1.85$ (m, 4H, $\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 3.06 (m, 2H, N-CH_2), 4.16 (q, $^3J = 7.11$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.19 (q, $^3J = 7.17$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.39 (s, 2H, O-CH_2), 5.08 (m, 1H, NH), 6.40 (br t, 1H, NH), 8.19 (br s, 1H, NH).

^{13}C -NMR (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 14.1, 14.2 (2 \times \text{CH}_2\text{-CH}_3), 24.8 (\gamma\text{-CH}_2), 27.9, 28.3 (2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3), 30.2 (\beta\text{-CH}_2), 40.5 (\text{N-CH}_2), 53.7 (\alpha\text{-CH}), 60.8, 61.9 (2 \times \text{CH}_2\text{-CH}_3), 70.7 (\text{O-CH}_2), 79.5, 81.8 (2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3), 150.4 (\text{C=N}), 153.2 (\text{CO-Eoc}), 155.3 (\text{CO-Boc}), 170.7, 171.7 (\text{COOEt}, \text{COO}^t\text{Bu}).$

MS (ESI):

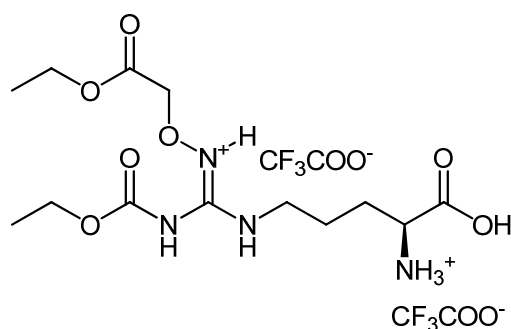
$m/z = 527 [\text{M} + \text{Na}]^+, 505 [\text{M} + \text{H}]^+, 449 [\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8]^+$.

$\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_9$ (504.59)

Ber. C 52.37 H 7.99 N 11.10

Gef. C 53.09 H 7.90 N 11.44

N^0 -Ethoxycarbonyl- N^{01} -(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin Bis(trifluoracetat) (58)



Es werden 252 mg der vollständig geschützten Vorstufe **57** (0,5 mmol) in 5 mL TFA zuerst 30 min bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. TFA wird vorsichtig bei möglichst niedriger Temperatur i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit wenig *Aqua bidest.* aufgenommen. Es folgt die weitere Aufreinigung mittels Flashchromatographie auf einer RP-18-Säule (0,1 % $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ /Methanol-Stufengradient, 5-30 %). Die Ninhydrin-positiven Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bei ca. 30 °C auf ein Restvolumen von ca. 10 mL eingengt und lyophilisiert.

Ausbeute: 277 mg eines klaren Öls (96 %)

DC: $R_f = 0,62$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 8:1:1; Reagenz A)

In DMSO- d_6 als Lösungsmittel liegt die Substanz als Isomerenmisch vor, im Verhältnis von ca. 8.6:1.4 (bei 300 K, bezogen auf das Singulett von CH₂ des Ethoxycarbonylmethoxy-Rests). Die angegebenen Verschiebungen beziehen sich auf das Hauptisomer.

¹H-NMR (DMSO- d_6):

δ /ppm = 1.19 (t, ³J = 7.10 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.21 (t, ³J = 7.08 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.48-1.87 (m, 4H, β,γ -CH₂), 3.02 (m, 2H, N-CH₂), 3.89 (m, 1H, α -CH), 4.10 (q, ³J = 7.04 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.12 (q, ³J = 7.13 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.37 (s, 2H, O-CH₂), 6.54 (br s, 1H, NH), 8.24 (br s, 3H, NH₃⁺), 10.64 (br s, COOH).

¹³C-NMR (DMSO- d_6):

δ /ppm = 14.0, 14.2 (2 × CH₂-CH₃), 27.4 (CH₂), 40.3 (N-CH₂), 51.8 (α -CH), 60.2, 61.3 (2 × CH₂-CH₃), 70.3 (O-CH₂), 169.9, 171.0 (3 × CO).

HRMS (m/z):

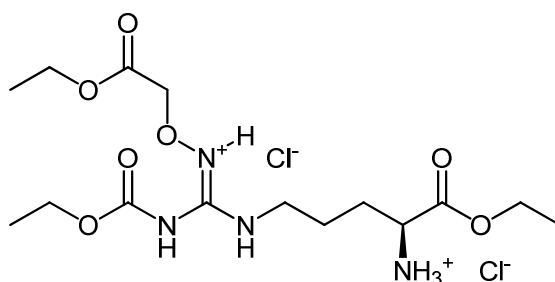
berechnet für C₁₃H₂₅N₄O₇ [M + H]⁺ = 349.17178, gefunden: 349.17155.

C₁₃H₂₄N₄O₇·3,2 CF₃COOH·1,5 H₂O (740.26)

Ber. C 31.48 H 4.11 N 7.57

Gef. C 31.52 H 4.24 N 7.40

***N*^ω-Ethoxycarbonyl-*N*^{ω'}-(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin-ethylester Dihydrochlorid
(59)**



Zur Veresterung werden 288 mg der freien Aminosäure **58** (0,5 mmol) in 5 mL absolutem Ethanol unter Argon-Atmosphäre gelöst. Die Lösung wird 30 min bei -10 °C gerührt, bevor für ca. 5-10 min HCl-Gas in die Lösung geleitet wird. Anschließend wird der Ansatz für eine Stunde bei 0 °C weitergerührt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die Lösung wird vorsichtig i. Vak. bei Raumtemperatur einkonzentriert, lyophilisiert und liefert einen stark hygroskopischen, amorphen Feststoff, der bei Luftkontakt verflüssigt.

Ausbeute: 222 mg eines farblosen Öls (99 %)

DC: $R_f = 0,57$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 8:1:1; Reagenz A)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 1.20 (t, ³*J* = 7.16 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.23 (t, ³*J* = 7.13 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.26 (t, ³*J* = 7.10 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.51-1.87 (m, 4H, β,γ-CH₂), 3.17 (m, 2H, N-CH₂), 3.95 (m, 1H, α-CH), 4.14 (q, ³*J* = 7.12 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.15 (q, ³*J* = 7.10 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.17-4.25 (m, 2H, CH₂-CH₃), 4.51 (s, 2H, O-CH₂), 7.80 (br s, 1H, NH), 8.55 (br s, 1H, NH), 8.72 (br s, 3H, NH₃⁺).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 13.9, 14.0, 14.1 (3 × CH₂-CH₃), 24.2 (γ-CH₂), 27.2 (β-CH₂), 40.8 (N-CH₂), 51.5 (α-CH), 60.5, 61.7, 61.9 (3 × CH₂-CH₃), 71.1 (O-CH₂), 150.3 (C=N), 153.0 (CO-Eoc), 169.1, 169.3 (2 × CO).

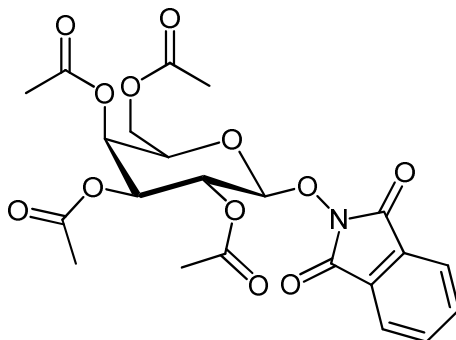
HRMS (m/z):

berechnet für C₁₅H₂₉N₄O₇ [M + H]⁺ = 377.20308, gefunden: 377.20287.

7.1.2.3.4 *N*^ω-(β-D-Galactosyl)oxy-L-arginin-Prodrug (72) und analoge Modellverbindung (66)

N-[(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yl)oxy]phthalimid^{223,227}

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an die Literatur:^{223,227}



Eine Lösung von 1,85 g 1-Brom-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranose (4,5 mmol), 3,66 g *N*-Hydroxyphthalimid (22,6 mmol) und 1,52 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 36 mL Dichlormethan wird mit 36 mL 1 M Natronlauge versetzt und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 40 mL Dichlormethan zugegeben und sechsmal mit jeweils 20 mL Wasser gewaschen. Dann wird zweimal mit jeweils 20 mL einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Die weitere Aufreinigung erfolgt durch zweimalige Chromatographie über Kieselgel, wobei die erste Säule sehr kurz ist (ca. 50 g Kieselgel; Cyclohexan/Ethylacetat, 1:3; R_f = 0,73). Die zweite Säulenchromatographie wird mit ca. 100 g Kieselgel und Toluol/Ethylacetat (1:1) als Elutionsmittel durchgeführt.

Ausbeute: 1,55 g eines weißen kristallinen Schaums (70 %) (Lit. 55 %²²³, 80 %²²⁷)

DC: R_f = 0,54 (Toluol/Ethylacetat, 1:1; Reagenz C)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ/ppm = 1.97, 1.99, 2.17, 2.20 (4 × s, 3H, COCH₃), 3.93 (td, ³J = 6.8, 1.0 Hz, 1H, 5'-CH), 4.19 (m, 2H, 6'-CH₂), 4.99 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, 1'-CH), 5.11 (dd, ³J = 10.4, 3.4 Hz, 1H, 3'-CH), 5.40 (dd, ³J = 3.4, 1.0 Hz, 1H, 4'-CH), 5.45 (dd, ³J = 10.4, 8.2 Hz, 1H, 2'-CH), 7.75-7.86 (m, 4H, ArH).

^{13}C -NMR (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 21.16, 21.18, 21.3, 21.4$ (COCH_3), 61.5 ($6'\text{-CH}_2$), $67.0, 67.7, 71.3, 72.1$ ($2',3',4',5'\text{-CH}$), 106.9 ($1'\text{-CH}$), 124.5 ($4,5\text{-CH}$), 129.4 ($2a,6a\text{-C}$), 135.4 ($3,6\text{-CH}$), 163.2 ($2 \times \text{CO}$), $170.4, 170.6, 170.86, 170.89$ (COCH_3).

MS (ESI):

$m/z = 516$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 511 [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$, 331 [$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9$] $^+$.

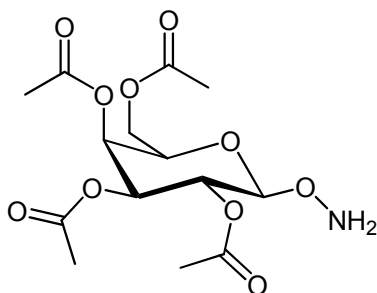
$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_{12}$ (493.42)

Ber. C 53.55 H 4.70 N 2.84

Gef. C 53.94 H 4.81 N 2.99

1-Aminooxy-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranose (68)^{223,227,280}

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Renaudet *et al.* [2001].²²⁷



Eine Lösung von 1,43 g der Phtalimid-geschützten 1-Aminooxygalactose (2,90 mmol) in 28 mL Dichlormethan/Methanol (1:1) wird mit 458 μL Methylhydrazin (8,70 mmol) versetzt und 25 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung abgebrochen und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Für die vollständige Charakterisierung wird das Rohprodukt mittels Flashchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:3), wobei ein weißer Schaum erhalten wird. Für die weiteren Umsetzungen kann aber auch das ölige Rohprodukt eingesetzt werden.

Ausbeute: 1,94 g eines farblosen Öls (67 %)

DC: $R_f = 0,43$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:3; Reagenz C)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.97, 2.04, 2.06, 2.14$ ($4 \times \text{s}, 3\text{H}, \text{COCH}_3$), 3.95 ($\text{td}, {}^3J = 6.7, 1.1 \text{ Hz}, 1\text{H}, 5'\text{-CH}$), 4.17 ($\text{d}, {}^3J = 6.7 \text{ Hz}, 2\text{H}, 6'\text{-CH}_2$), 4.68 ($\text{d}, {}^3J = 8.3 \text{ Hz}, 1\text{H}, 1'\text{-CH}$), 5.03 ($\text{dd}, {}^3J = 10.4, 3.4 \text{ Hz}, 1\text{H}, 3'\text{-CH}$), 5.24 ($\text{dd}, {}^3J = 10.4, 8.3 \text{ Hz}, 1\text{H}, 2'\text{-CH}$), 5.38 ($\text{dd}, {}^3J = 3.4, 1.0 \text{ Hz}, 1\text{H}, 4'\text{-CH}$), 5.74 ($\text{br s}, 2\text{H}, \text{NH}_2$).

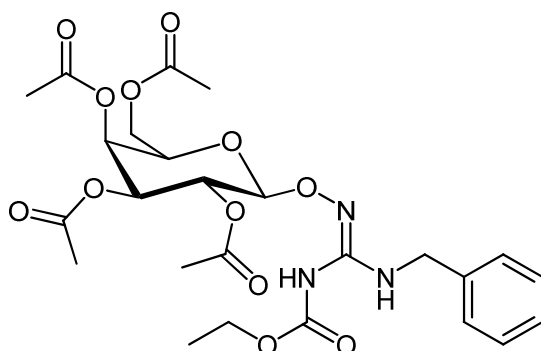
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 20.7, 20.75, 20.79, 20.9$ ($4 \times \text{COCH}_3$), 61.4 ($6'\text{-CH}_2$), $67.2, 67.5, 70.8, 71.2$ ($2', 3', 4', 5'\text{-CH}$), 104.0 ($1'\text{-CH}$), $169.8, 170.2, 170.3, 170.5$ (COCH_3).

MS (ESI):

$m/z = 726$ [$2 \times \text{M}$] $^+$, 386 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 364 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 331 [$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9$] $^+$.

***N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yl)oxy]guanidin (**70**)**



Es werden 119 mg des Thioharnstoffs **69** (0,5 mmol), 218 mg der geschützten 1-Aminooxygalactose **68** (0,6 mmol) und 104,5 μl DIPEA (0,6 mmol) in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Der Ansatz wird auf 0°C gekühlt, 115 mg EDCI (0,6 mmol) werden zugegeben und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit ca. 10 mL Dichlormethan verdünnt und jeweils mit 5 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel weiter aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1).

Ausbeute: 255 mg eines farblosen Öls (90 %)

DC: $R_f = 0,54$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz C)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.30$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.99, 2.02, 2.06, 2.15 (4 \times s, 3H, COCH_3), 3.98 (br t, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, 5'-CH), 4.10-4.30 (m, 6H, 6'- CH_2 , N- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.90 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, 1'-CH), 5.08 (m, 1H, 3'-CH), 5.29 (br t, $^3J = 9.6$ Hz, 1H, 2'-CH), 5.41 (m, 1H, 4'-CH), 6.79 (br t, 1H, NH), 7.22-7.35 (m, 5H, ArH), 7.72 (br s, 1H, NH).

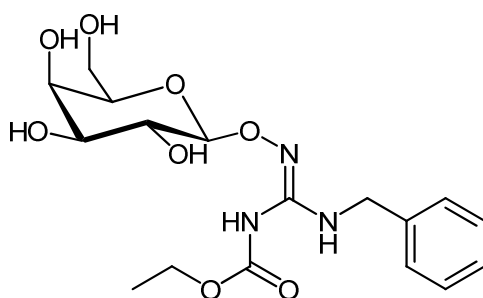
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 14.3$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 20.6, 20.7, 20.9 (4 \times COCH_3), 45.1 (N- CH_2), 61.1 (6'- CH_2), 62.2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 67.0, 68.1, 70.7, 71.0 (2',3',4',5'-CH), 102.7 (1'-CH), 127.4, 127.8, 128.6 (ArCH), 138.3 (ArC), 150.4 (C=N), 153.2 (CO-Eoc), 170.0, 170.2, 170.3 (4 \times COCH_3).

MS (ESI):

$m/z = 590$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 568 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 526 [$\text{M} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$, 331 [$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9$] $^+$.

***N*-Benzyl- *N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[(β -D-galactopyranos-1-yl)oxy]guanidin (**66**)**



Es werden 150 mg der geschützten Vorstufe **70** (0,26 mmol) zusammen mit ca. 30 mg Anionenaustauscher (Merck Ionenaustauscher III, OH^- -Form; sorgfältig mit Methanol gewaschen) in 5 mL Methanol gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird filtriert, mit Methanol nachgewaschen und i. Vak. einkonzentriert. Das Produkt wird anschließend mittels Säulenchromatographie über Kieselgel weiter aufgereinigt, wobei die Säule mit Ethylacetat/Methanol (9:1) gegossen und die eigentliche Chromatographie - nach Probenauftrag - mit einer 8:2-Mischung durchgeführt wird.

Ausbeute: 84 mg eines feinen weißen Pulvers (80 %)

DC: $R_f = 0,66$ (Ethylacetat/Methanol, 8:2; Reagenz C)

In Methanol- d_4 als Lösungsmittel liegt die Substanz als Isomerengemisch vor, im Verhältnis von ca. 8:2 (bei 300 K, bezogen auf das Triplett von CH_3 der Ethoxycarbonyl-Funktion). In DMSO- d_6 beträgt das Isomerenverhältnis ca. 6:4 (bei 300 K). Die angegebenen Verschiebungen beziehen sich auf das Hauptisomer.

$^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 1.38$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.58-3.67 (m, 2H, 6'- CH_2), 3.71-3.96 (m, 4H, 2',3',4',5'-CH), 4.28 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.36 (br s, 2H, N- CH_2), 4.61 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, 1'-CH), 7.31-7.44 (m, 5H, ArH).

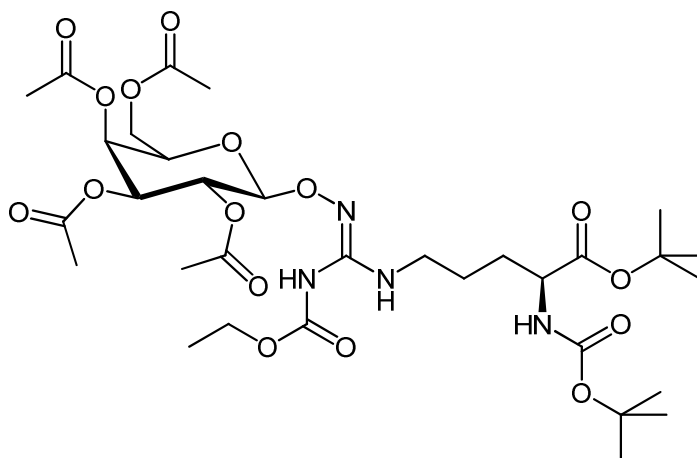
$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 14.6$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 45.8 (N- CH_2), 62.5 (6'- CH_2), 63.2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 70.2, 71.2, 75.0, 76.8 (2',3',4',5'-CH), 106.6 (1'-CH), 128.3, 128.6, 129.6 (ArCH), 139.8 (ArC), 152.8 (C=N), 155.1 (CO).

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 400.17144$, gefunden: 400.17147; berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 422.15339$, gefunden: 422.15327.

***N*^α-(*t*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-ethoxycarbonyl-*N*^{ω'}-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-
β-D-galactopyranos-1-yl)oxy-L-arginin-*t*-butylester (71)**



Es werden 210 mg des Thioharnstoffs **50** (0,5 mmol), 218 mg der geschützten 1-Aminooxygalactose **68** (0,6 mmol) und 104,5 µl DIPEA (0,6 mmol) in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Der Ansatz wird auf 0 °C gekühlt, 115 mg EDCl (0,6 mmol) werden zugegeben und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit ca. 10 mL Dichlormethan verdünnt und jeweils mit 5 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel weiter aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol, 97:3). Die vereinigten Fraktionen des gereinigten Produkts werden i. Vak. zu einem klaren Öl einkonzentriert. Wiederholte Zugabe und Entfernung von trockenem Dichlormethan liefert einen festen weißen Schaum, der bei Luftkontakt verflüssigt.

Ausbeute: 262 mg eines farblosen Öls (70 %)

DC: R_f = 0,35 (Dichlormethan/Methanol, 97:3; Reagenz A)

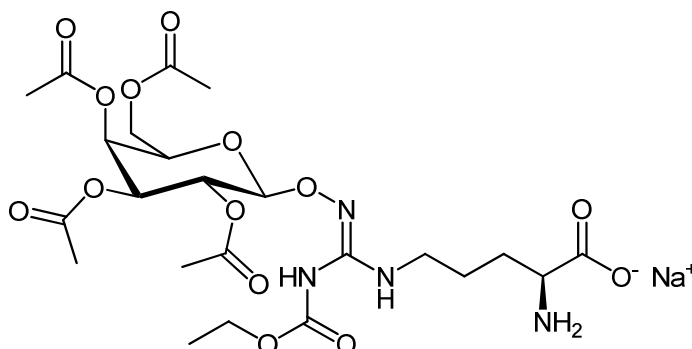
¹H-NMR (CDCl₃):

δ/ppm = 1.29 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.43, 1.45 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.52-1.86 (m, 4H, β,γ-CH₂), 1.98, 2.02, 2.05, 2.13 (4 × COCH₃), 3.08 (m, 2H, N-CH₂), 3.96 (br t, ³J = 6.8 Hz, 1H, 5'-CH), 4.11-4.21 (m, 5H, α-CH, CH₂-CH₃, 3'-CH, NH), 4.85 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, 1'-CH), 5.06 (m, 2H, 6'-CH₂), 5.25 (dd, ³J = 10.4, 8.3 Hz, 1H, 2'-CH), 5.39 (dd, ³J = 3.5, 1.0 Hz, 1H, 4'-CH), 6.47 (br t, 1H, NH), 7.65 (br s, 1H, NH).

MS (ESI):

m/z = 772 [M + Na]⁺, 750 [M + H]⁺, 707 [M - C₂H₂O + H]⁺.

Natriumsalz des N^{ω} -Ethoxycarbonyl- N^{ω} -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yl)oxy-L-arginins (72)



In einem Schlenk-Kolben werden 120 mg (0,16 mmol) der vollständig geschützten und sorgfältig getrockneten Vorstufe **71** unter Argon-Begasung in ca. 10 mL trockenem Diethylether gelöst. Die Lösung wird für ca. 30 min bei -15 °C gerührt und anschließend wird unter gleichzeitiger Argon-Begasung für ca. 5 min HCl-Gas vorsichtig in die Lösung geleitet. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht in den Kühlschrank gestellt und am folgenden Tag zur Aufarbeitung i. Vak. eingeengt. Der weiß-gelbe Feststoff wird dann mit ca. 1-2 mL 0,5 M NaHCO₃-Lösung aufgenommen und mittels Flashchromatographie über eine RP-18-Säule aufgereinigt (Fließmittel: *Aqua bidest.*/Methanol), wobei ein Stufengradient für die Elution verwendet wird. Es wird mit 10 % Methanol-Anteil begonnen, dann auf 25 % und abschließend auf 50 % Methanol erhöht. Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt, bei 30 °C auf ein Restvolumen von ca. 50 mL i. Vak. einkonzentriert und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 74 mg eines feinen weißen Pulvers (75 %)

In D₂O als Lösungsmittel liegt die Substanz als Isomerengemisch vor, im Verhältnis von ca. 6:4 (bei 300 K, bezogen auf das Triplett von CH₃ der Ethoxycarbonyl-Funktion). Die angegebenen Verschiebungen beziehen sich auf das Hauptisomer.

¹H-NMR (D₂O, TPS):

δ /ppm = 1.28 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.52-1.97 (m, 4H, β,γ -CH₂), 2.02, 2.08, 2.12, 2.23 (4 × s, 3H, COCH₃), 3.16 (br t, ³J = 6.8 Hz, 2H, 6'-CH₂), 3.75 (t, ³J = 6.3 Hz, 1H, 5'-CH), 4.15-4.30 (m, 5H, CH₂-CH₃, α -CH, N-CH₂), 5.07 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, 1'-CH), 5.21-5.33 (m, 2H, 2',3'-CH), 5.47 (m, 1H, 4'-CH).

^{13}C -NMR (D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 16.2$ ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22.7, 22.8, 22.9, ($4 \times \text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 26.6 ($\gamma\text{-CH}_2$), 30.6 ($\beta\text{-CH}_2$), 42.7 (N-CH_2), 57.2 ($\alpha\text{-CH}$), 64.6 ($6'\text{-CH}_2$), 65.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$), 70.6, 70.7, 73.4, 74.1 ($2',3',4',5'\text{-CH}$), 104.1 ($1'\text{-CH}$), 155.6 ($\text{C}=\text{N}$), 156.8 (CO-Eoc), 175.4, 175.8, 176.2, 177.1 ($4 \times \underline{\text{C}}\text{OCH}_3$).

MS (ESI):

$m/z = 615$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 593 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 551 [$\text{M} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$, 331 [$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9$] $^+$.

HRMS (m/z):

berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+ = 615.21202$, gefunden: 615.21164; berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{14}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+ = 593.23008$, gefunden: 593.23015.

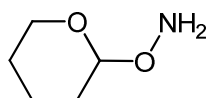
$\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{NaO}_{14}$ (614.53)

Ber. C 44.95 H 5.74 N 9.12

Gef. C 45.08 H 6.21 N 8.77

7.1.2.3.5 Vorstufen zu 3-*N*-substituierten 3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-onen

O-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin



Die Substanz wurde in einer Zweistufensynthese ausgehend von *N*-Hydroxyphthalimid nach einer Vorschrift von Haslanger und Karanewsky [1986] synthetisiert.²⁸¹ Die spektroskopischen Angaben und die Angaben zum Schmelzpunkt entsprechen denen der Literatur.

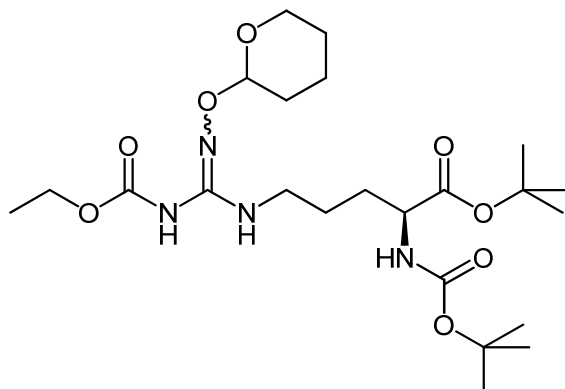
O-THP-geschützte *N*-Ethoxycarbonylhydroxyguanidine

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Linton *et al.* [2000]:²⁰⁸

2,0 mmol des betreffenden Thioharnstoffs werden in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 1,04 mL DIPEA (3,0 mmol) sowie 351 mg *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin²⁸¹ (3,0 mmol) werden zugegeben. Die Lösung wird für ca. 30 min auf 0 °C gebracht, 574 mg EDCI (3,0 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit ca. 10 mL Dichlormethan verdünnt und jeweils mit 10 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die

organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Es resultieren Öle, die mittels Säulenchromatographie über Kieselgel weiter aufgereinigt werden.

N^α -(*t*-Butyloxycarbonyl)- N^{ω} -ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(tetrahydro-2*H*-pyran-1-yl)oxy-L-arginin-*t*-butylester (80)



Als Elutionsmittel für die Säulenchromatographie wird Dichlormethan/Methanol (98:2) verwendet.

Ausbeute: 935 mg eines farblosen Öls (93 %)

DC: $R_f = 0,29$ (Toluol/Ethylacetat, 3:1; Reagenz A)

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

$\delta/\text{ppm} = 1.30$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.44, 1.46 (2 \times s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.50-1.89 (m, 10H, $\beta, \gamma\text{-CH}_2$, 4',5',6'- CH_2), 3.14 (m, 2H, N- CH_2), 3.58, 3.91 (2 \times m, 1H, 3'- CH_2), 4.18 (br q, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, NH), 4.94 (m, 1H, 1'-CH), 5.06, 6.35, 7.80 (3 \times br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 15.0$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 21.5 (5'- CH_2), 25.63, 25.69 ($\gamma\text{-CH}_2$), 25.9 (4'- CH_2), 28.7, 29.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.1 (6'- CH_2), 30.97, 31.02 ($\beta\text{-CH}_2$), 41.3 (N- CH_2), 54.5 ($\alpha\text{-CH}$), 62.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 64.7 (3'- CH_2), 80.5, 82.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102.1 (1'-CH).

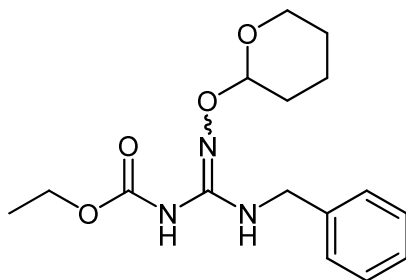
MS (ESI):

$m/z = 525$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 503 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 419 [$\text{M} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O} + \text{H}$] $^+$.

$\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_8$ (502.60)

Ber. C 54.96 H 8.42 N 11.15

Gef. C 54.73 H 8.50 N 11.27

***N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-1-yl)oxy]guanidin (81)**

Als Elutionsmittel für die Säulenchromatographie wird Dichlormethan/Methanol (98:2) verwendet.

Ausbeute: 580 mg eines weißen Feststoffes (90 %)

DC: $R_f = 0,51$ (Toluol/Ethylacetat, 3:1; Reagenz C)

Schmp.: 79 °C

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

$\delta/\text{ppm} = 1.30$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.50-1.70 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.71-1.90 (m, 2H, CH-CH_2), 3.60, 3.95 (2 \times m, 1H, O-CH₂), 4.18 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.34 (m, 2H, N-CH₂), 5.03 (dd, $^3J = 5.9, 2.4$ Hz, 1H, CH-CH_2), 6.65 (br t, 1H, NH), 7.22-7.39 (m, 5H, ArH), 7.87 (br s, 1H, NH).

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

$\delta/\text{ppm} = 14.9$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 21.5 (5'-CH₂), 25.9 (4'-CH₂), 30.1 (6'-CH₂), 45.8 (N-CH₂), 62.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 64.7 (3'-CH₂), 102.0 (1'-CH), 127.9, 128.5, 129.2 (ArCH), 139.2 (ArC), 149.7 (C=N), 153.7 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 665$ [$2 \times M + \text{Na}$]⁺, 322 [$M + \text{H}$]⁺, 238 [$M - \text{C}_5\text{H}_8\text{O} + \text{H}$]⁺.

$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ (321.37)

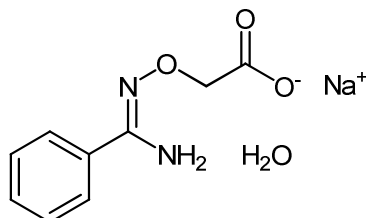
Ber. C 59.80 H 7.21 N 13.08

Gef. C 59.08 H 7.25 N 13.25

7.1.2.4 O-carboxymethylierte Modellsubstanzen

7.1.2.4.1 Natriumsalz des O-Carboxymethylbenzamidoxims^{240,282} Monohydrat (6)

Modifizierte Vorschrift nach Koch [1889]:²⁴⁰



Eine Lösung von 681 mg Benzamidoxim²⁴¹ (5,0 mmol), 1,04 g Bromessigsäure (7,5 mmol) und 500 mg Natronlauge-Plätzchen (12,5 mmol) in 5 mL Ethanol wird für 5 Stunden unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird das Lösungsmittel so lange i. Vak. entfernt, bis sich ein Niederschlag anfängt zu bilden. Dieser wird zur vollständigen Fällung stehen gelassen, abfiltriert und getrocknet. Das Produkt wird aus Ethanol (96 %)/Wasser (95:5) umkristallisiert.

Ausbeute: 937 mg weiße, feinfilzige Kristalle (80 %)

Schmp.: 226 °C (dec.)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

δ/ppm = 4.13 (s, 2H, O-CH₂), 6.09 (br s, 2H, NH₂), 7.37 (m, 3H, 3',4',5'-CH), 7.67 (m, 2H, 2',6'-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ/ppm = 73.6 (O-CH₂), 125.7, 128.0, 129.0 (ArCH), 132.8 (ArC), 151.4 (C=N), 173.2 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 217 [M + Na]^+$, $195 [M + H]^+$, $119 [M - C_4H_2 - C_2H_2 + H]^+$, $105 [C_6H_5N_2]^+$.

C₉H₉N₂NaO₃·1,0 H₂O (234.18)

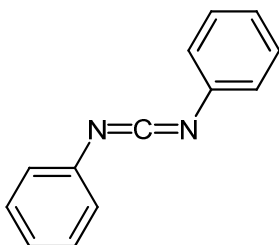
Ber. C 46.16 H 4.73 N 11.96

Gef. C 46.43 H 4.44 N 11.65

7.1.2.4.2 Hydroxyguanidin-Prodrugs (7, 87)

***N,N'*-Diphenylcarbodiimid (85)²⁴²**

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Fell und Coppola [1995]:²⁴²



In 100 mL trockenem Dichlormethan werden 2,28 g *N,N'*-Diphenylthioharnstoff (10 mmol), 3,0 g Triethylamin (30 mmol) und 50 mg 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridin (0,41 mmol) gelöst. Der Ansatz wird im Eisbad gekühlt und tropfenweise werden 2,3 g Methylsulfonylchlorid (20 mmol) zugetropft, wobei die Temperatur 15 °C nicht überschreiten sollte. Die Lösung wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt und auf ein Drittel des Volumens i. Vak. eingeengt. Die entstandene Suspension wird über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (ca. 15 g) und mit ca. 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Es folgt eine weitere Flashchromatographie über ca. 30 g Kieselgel unter Verwendung von Cyclohexan als Elutionsmittel, wobei die orange gefärbte Verunreinigung auf der Säule zurückbleiben soll. Nach Entfernen des Lösungsmittels resultiert ein hellgelbes Öl, das bei -20 °C als Feststoff vorliegt und so gelagert wird.

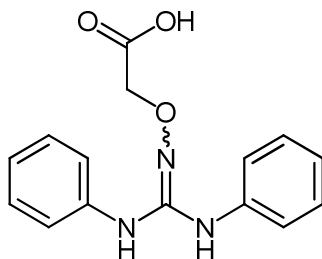
Ausbeute: 1,55 g eines hellgelben Öls (80 %) (Lit.: 95 %)²⁴²

¹H-NMR (CDCl₃, TMS):

δ/ppm = 7.13-7.19 (m, 6H), 7.28-7.35 (m, 4H).

¹³C-NMR (CDCl₃, TMS):

δ/ppm = 124.2, 125.5, 129.5 (ArCH), 135.2 (ArC), 138.5 (N=C=N).

***N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (7)**

546 mg Aminooxyessigsäure Semichlorid (5 mmol) und 697 μ l Triethylamin (5 mmol) werden für 30 min in 10 mL trockenem DMF gerührt. Das Präzipitat wird abfiltriert und zum Filtrat werden 970 mg *N,N'*-Diphenylcarbodiimid (5 mmol) zugegeben. Der Ansatz wird für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit Ethylacetat ausgeschüttelt und das Produkt aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 285 mg eines weißen Feststoffes (20 %)

Schmp.: 176 °C

DC: $R_f = 0,29$ (Dichlormethan/Methanol, 9:1)

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

$\delta/\text{ppm} = 4.37$ (s, 2H, O-CH₂), 6.75-6.87 (m, 2H, ArH), 7.03-7.20 (m, 8H, ArH), 8.02, 8.21 (2 \times br s, 1H, NH), 12.05 (br s, 1H, COOH).

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

$\delta/\text{ppm} = 70.0$ (O-CH₂), 116.7, 118.7, 119.8, 121.0, 128.5 (ArCH), 140.7, 142.3 (ArC), 147.5 (C=N), 171.8 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 308$ [M + Na]⁺, 286 [M + H]⁺, 210 [M - C₂H₄O₃]⁺.

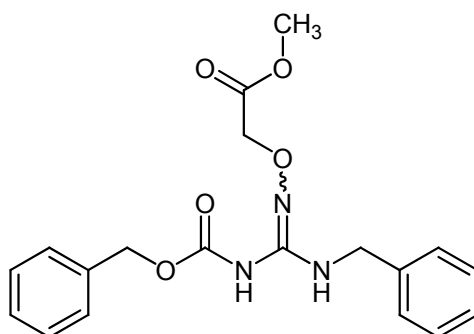
MS (EI):

m/z (%) = 209 (38), 208 (37), 119 (20), 118 (38), 93 (100), 91 (47), 77 (43), 66 (31), 51 (30).

C₁₅H₁₅N₃O₃·0,3 H₂O (290.71)

Ber. C 61.97 H 5.41 N 14.45

Gef. C 62.18 H 5.72 N 14.57

N-Benzyl-N'-(methoxycarbonyl)methoxyguanidin (87)

Es werden 451 mg des Thioharnstoffs **86** (1,5 mmol), 392 μ L DIPEA (2,25 mmol) und 236 mg von **54a** (2,25 mmol) in 15 mL trockenem Dichlormethan für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 432 mg EDCI (2,25 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit jeweils 5 mL 1 %-iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das erhaltene Öl wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 512 mg eines farblosen Öls (92 %)

DC: $R_f = 0,25$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz C)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 3.73 (s, 3H, O-CH₃), 4.27 (br d, ³J = 5.5 Hz, 2H, N-CH₂), 4.44 (s, 2H, O-CH₂), 5.16 (s, 2H, CH₂-Cbz), 6.73 (br t, 1H, NH), 7.22-7.41 (m, 10H, ArH), 8.30 (br s, 1H, NH-Cbz).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 45.7 (N-CH₂), 52.5 (CH₃), 68.4 (CH₂-Cbz), 71.3 (O-CH₂), 127.9, 128.4, 129.0, 129.2, 129.3, 129.4 (ArCH), 135.8, 139.1 (ArC), 150.6 (C=N), 153.7 (CO-Cbz), 171.7 (COOMe).

MS (ESI):

$m/z = 394$ [M + Na]⁺, 372 [M + H]⁺, 328 [M - CO₂ + H]⁺.

C₁₉H₂₁N₃O₅ (371.15)

Ber. C 61.45 H 5.70 N 11.31

Gef. C 61.49 H 6.19 N 11.27

7.2 ÜBERPRÜFUNG DER ENANTIOMERENREINHEIT

7.2.1 Geräte und Materialien

7.2.1.1 HPLC mit chiralen stationären Phasen

HPLC-Systeme:

(A)

Waters 510 Pumpen, Waters 484 Absorptionsdetektor, Waters 470 Fluoreszenzdetektor, Gynkotek STH 585 Säulenofen, Erma ERC-3512 Entgaser;

(B)

Waters Breeze HPLC-System mit Waters 1525 Pumpen, Waters 2487 Absorptionsdetektor, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30), Gynkotek STH 585 Säulenofen.

Stationäre Phasen:

Crownpak Cr(+), 250 × 4,6 mm (Fa. Daicel);

LiChroCART (*R,R*)-Whelk O1, 250 × 4,0 mm (Fa. Merck).

Chemikalien:

Perchlorsäure, Acetonitril, Methanol und *n*-Hexan (Fa. J. T. Baker); *Aqua bidest.* = zweifach destilliertes Wasser (Finnaqua 75-E-4).

Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht weiter vermerkt, von den Firmen ABCR, Alfa-Aesar, Fluka, Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

7.2.1.2 Polarimetrie

Die Drehwerte wurden an einem Perkin-Elmer 241 Polarimeter ermittelt, wobei die Temperatur bei den Messungen mit einem Lauda-Thermostat Typ K2-D bei 20 °C konstant gehalten wurde. Die verwendete Quarzküvette (Messvolumen = 1 mL) hatte eine Schichtdicke von 1,0002 dm. Die Drehwerte wurden bei 587,3 nm, 578 nm, 546 nm, 436 nm und 365 nm bestimmt.

7.2.2 Methoden

7.2.2.1 Crownpak Cr(+)-Analytik

7.2.2.1.1 N^{δ} -Methyl-L-arginin (1), N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (2) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (3)

HPLC-System (A)

Säulentemperatur: 15 °C
 Mobile Phase: HClO_4 in *Aqua bidest.*, pH 1,5
 Flussrate : 0,6 mL/min (1); 0,4 mL/min (2, 3)
 Detektion: Absorptionsmessung bei 200 nm
 Proben: 0,1-10 mM im Fließmittel
 Injektionsvolumen: 10 μL

Retentionszeiten:

N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (1)	4,1 min \pm 0,1 min (D); 7,3 \pm 0,1 min (L)
N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-D,L-arginin (2)	5,4 min \pm 0,1 min (D); 9,5 \pm 0,3 min (L)
N^{δ} -Methyl-D,L-citrullin (3)	3,6 min \pm 0,1 min (D); 6,0 \pm 0,1 min (L)

7.2.2.1.2 N^{δ} -Methyl-L-ornithin (18)

HPLC-System (A)

Säulentemperatur: 0 °C
 Mobile Phase: HClO_4 in *Aqua bidest.*, pH 1,5
 Flussrate : 0,5 mL/min
 Nachsäulenreagenz: 480 mg *o*-Phthalaldehyd (angelöst in 10 mL Ethanol) in 2,4 L Puffer (133 mM H_3BO_3 , 667 mM NaOH, pH 9,25); Flussrate: 0,8 mL/min
 Detektion: Fluoreszenzmessung bei λ_{ex} : 340 nm, λ_{em} : 455 nm
 Proben: 1-10 mM im Fließmittel
 Injektionsvolumen: 10 μL
 Retentionszeiten: 5,6 min \pm 0,1 min (D); 9,9 \pm 0,6 min (L)

7.2.2.1.3 *N*⁰-alkylierte L-Arginine (37a-i)

HPLC-System (B)

Säulentemperatur:	15 °C
Mobile Phase:	HClO ₄ in <i>Aqua bidest.</i> , pH 1,5
Flussrate :	0,6 mL/min (1,0 ml/min für 37d)
Detektion:	Absorptionsmessung bei 200 nm
Proben:	0,1-1 mM in <i>Aqua bidest.</i>
Injektionsvolumen:	10 µL

Retentionszeiten:

6,6 min ± 0,1 min (**37a**), 6,8 min ± 0,1 min (**37f**), 7,5 min ± 0,1 min (**37g**), 9,8 min ± 0,2 min (**37e**), 11,2 min ± 0,2 min (**37b**), 12,5 min ± 0,2 min (**37c**), 12,7 min ± 0,2 min (**37h**), 15,1 min ± 0,3 min (**37i**), 16,0 min ± 0,3 min (**37d**)

7.2.2.1.4 *N*⁰-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs

HPLC-System (B)

Säulentemperatur:	15 °C
Mobile Phase:	HClO ₄ in <i>Aqua bidest.</i> , pH 1,5 (mit unterschiedlichen Anteilen Methanol)
Flussrate :	0,4-1,0 mL/min
Detektion:	Absorptionsmessung bei 200 nm
Proben:	0,1-1 mM in <i>Aqua bidest.</i>
Injektionsvolumen:	10 µL

Die genauen Methanol-Anteile, Flussraten und Retentionszeiten sind in Kap. 4.2.3 in den Tabellen 4-4 und 4-5 angegeben.

7.2.2.2 (R,R)-Whelk O1-Analytik

Für N^α -Benzoyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (**16**) und N^α -Benzoyl- N^δ -methyl- N^δ -(*p*-toluensulfonyl)-L-ornithin (**17**), den direkten synthetischen Vorstufen des N^δ -Methyl-L-ornithins (**18**) wurden folgende chromatographischen Bedingungen gewählt:

HPLC-System (A)

Säulentemperatur: 20 °C

Mobile Phase: *n*-Hexan/Ethanol/Eisessig (85:15:5)

Flussrate : 1,0 mL/min

Detektion: Absorptionsmessung bei 254 nm

Proben: angelöst in Ethanol (**16**) bzw. Acetonitril (**17**) und mit Fließmittel auf 1 mM verdünnt

Injektionsvolumen: 10 µL

Retentionszeiten: 11,0 min ± 0,1 min (D); 12,9 ± 0,1 min (L) (**16**)

11,9 min ± 0,1 min (D); 13,8 ± 0,1 min (L) (**17**)

7.3 UNTERSUCHUNG DER BIOAKTIVIERUNG

7.3.1 Geräte und Materialien

HPLC-System:

Waters Breeze HPLC-System mit Waters 1525 Pumpen, Waters 2487 Absorptionsdetektor, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30), Gynkotek STH 585 Säulenofen.

HPLC-Säulen:

Synergi Max-RP 80 A (250 × 4.6 mm, 4 μm) mit Vorsäule C-18 (4 × 3 mm) (Fa. Phenomenex);

LiChroCART, LiChrospher 100, RP-8 (125 × 4 mm, 5 μm) mit Vorsäule LiChrospher 60, RP-select B (4 × 4 mm, 5 μm) (Fa. Merck);

LiChroCART, LiChrospher RP-select B (250 × 4.6 mm, 5 μm) mit Vorsäule LiChrospher 60, RP-select B (4 × 4 mm, 5 μm) (Fa. Merck).

Weitere Geräte und Materialien:

Cary 50 UV-Vis Photometer (Fa. Varian); 96-well Platten (Fa. Greiner); Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel); Mikroliter-Zentrifuge (Fa. Hettich GmbH); pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton); Vortexer VF2 (Janke und Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen); Reaktionsgefäße 1,5 mL (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht).

Enzymquellen:

Die verwendete rekombinante Peptidylglycin- α -Amidierende Monooxygenase (PAM, Ratte, EC 1.14.17.3) wurde von der Firma Unigene Laboratories, Inc. (New Jersey, USA) zur Verfügung gestellt (spezifische Aktivität = $5,8 \cdot 10^6$ U/mg Protein);

Bovine Leber-Katalase (EC 1.11.1.6), spezifische Aktivität = 12600 U/mg Feststoff (Fa. Aldrich);

Die Gewinnung der verwendeten Cytochrom P450-Enzymquellen erfolgte im Arbeitskreis Clement von Grünewald nach folgenden Vorschriften:²⁸³

Porcine Lebermikrosomen und 9000 *g* Überstände:

Die Schweinelebern wurden von einem lokalen Schlachter (Bordesholm) bezogen und die Organe direkt nach der Schlachtung in einem eisgekühlten 20 mM Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4) transportiert. Zur Weiterverarbeitung wurden die Leberlappen zunächst mit 50 mM Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4) perfundiert und gewaschen. Das Gewebe wurde in Stücke geschnitten und durch einen handelsüblichen Fleischwolf gegeben. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen Phosphatpuffer verdünnt und mit einem Durchflusshomogenisator homogenisiert. Die weitere Gewinnung der Mikrosomen und 9000 *g* Überstände erfolgte durch differentielle Ultrazentrifugation.¹³⁵ Zur Lagerung wurden die erhaltenen Präparationen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren;

Humane Lebermikrosomen und 9000 *g* Überstände:

Zur Gewinnung humaner Mikrosomen wurde humanes Lebergewebe von Karzinom-Patienten der Chirurgie des Uni-Klinikums der Christian-Albrechts-Universität erhalten, die sich einer Hemihepatektomie unterziehen mussten.

Die Lebergewebestücke wurden in einem Saccharose-haltigen Phosphatpuffer (10 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 250 mM Saccharose, 1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4, 4 °C) schockgefroren. Sobald eine ausreichende Anzahl an Organteilen (> 3) vorhanden war, wurden die entsprechenden Stücke aufgetaut und gepoolt, um Unterschiede durch interindividuelle Schwankungen auszugleichen. Die Gewebestücke wurden bei 4 °C in kleinere Teile geschnitten, mehrfach mit Puffer-Lösung (ohne EDTA) gewaschen und mit einem Homogenisator zu einer Suspension verarbeitet. Die Gewinnung der Mikrosomen und 9000 *g* Überstände erfolgte aus dieser Suspension durch differentielle Ultrazentrifugation.¹³⁵ Zur Lagerung wurden die erhaltenen Präparationen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Chemikalien:

Die beiden Celecoxib-Derivate [4-(5-*p*-Methylphenyl-3-trifluormethylpyrazol-1-yl)benz-sulfonylaminoxy]essigsäure (**92a**), (*R,S*)-2-[4-(5-*p*-Methylphenyl-3-trifluormethylpyrazol-1-yl)benz-sulfonylaminoxy]propionsäure (**92b**) und [4-(5-*p*-Methylphenyl-3-trifluormethylpyrazol-1-yl)benz-sulfonamid (Celecoxib) wurden von der Firma Gedeon Richter (Budapest) zur Verfügung gestellt;

O-Carboxymethylbenz-sulfhydroxamsäure (**93**),²⁸² Benzamidoxim (**84**)²⁴¹ und *N,N'*-Diphenyl-*N''*-hydroxyguanidin (**91**)¹⁸² wurden nach Literatur synthetisiert und elementaranalysenrein gewonnen; *Aqua bidest.* = zweifach destilliertes Wasser (Finnaqua 75-E-4);

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Alfa-Aesar, Fluka, Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

7.3.2 Testung mit Peptidylglycin α -Amidierender Monooxygenase

7.3.2.1 Methoden

7.3.2.1.1 Inkubationsbedingungen

Ein typischer Inkubationsansatz von 300 μL (Totalvolumen) enthielt 25000 U/mL Peptidylglycin- α -Amidierende Monooxygenase (PAM), 250 U/mL Katalase, 1 μM Kupfer(II) (eingesetzt als Acetat/Monohydrat), 2 mM Natriumascorbat, 5 mM Kaliumiodid und das jeweilige Substrat in 0,1 mM oder 1 mM Konzentration, in Puffer unterschiedlichen pH-Werts. Als Puffersystem wurden 30 mM MES für die Inkubation bei pH 6,0 und 50 mM HEPES für die Inkubation bei pH 7,4 verwendet. Der pH-Wert wurde jeweils mit verdünnter Natronlauge eingestellt. Es wurde bei 37 °C im Schüttelwasserbad 60 min inkubiert, 100 μL abgenommen und die Reaktion mit 50 μL 10 %-iger $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ /Acetonitril (2:3) abgestoppt. Der restliche Ansatz wurde weitere 180 min bei 37 °C inkubiert und mit 100 μL 10 %-iger $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ /Acetonitril (2:3) abgestoppt.

Die abgestoppten Proben wurden 5 min geschüttelt (Vortexer) und bei -80 °C eingefroren. Zur Analyse der Proben wurden diese aufgetaut, 5 min geschüttelt und das gefällte Protein bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die kolorimetrische Glyoxylat-Bestimmung und/oder HPLC-Vermessung verwendet.

Für die K_M - und V_{max} -Bestimmung wurden 100 μL -Ansätze bei pH 6,0 unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied einer Inkubationszeit von 30 min.

7.3.2.1.2 Kolorimetrische Bestimmung von Glyoxylat

200 μL des vom Protein befreiten Inkubationsansatzes (vgl. Kap. 7.3.2.1.1) wurden mit 20 μL einer Phenylhydrazin-Lösung (20 mg in 2 mL *Aqua bidest.*) versetzt und 5 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde für 15 min auf 0 °C gekühlt, 100 μL eiskalte 6 N HCl zugegeben und weitere 5 min bei 0 °C stehen gelassen. Abschließend erfolgte die Zugabe von 20 μL einer Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung (100 mg in 2 mL *Aqua bidest.*). Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und 200 μL für die Vermessung mit einem Plattenreader (Cary 50 UV-Vis Photometer, 520 nm) entnommen.

Kalibrierung:

Für eine 5-Punkt-Kalibrierung wurde Glyoxalsäure in Konzentrationen von 2, 5, 10, 50 und 100 μM in einem 2:1-Gemisch von Assay-Puffer (pH 6,0):10 %-iger TFA(aq)/Acetonitril (2:3) wie oben beschrieben vermessen. Diese Kalibrierung erfolgte parallel bei jedem durchgeführten Assay einer Testverbindung.

7.3.2.1.3 HPLC-Analytik zur Trennung von *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (**6**) und Benzamidoxim (**84**)

Säule:	Synergi Max-RP 80 A (250 × 4.6 mm, 4 μm)
Säulentemperatur:	20 °C
Mobile Phase:	79 % (v/v) 10 mM Octylsulfonat, pH 2,5 (H_3PO_4) 21 % (v/v) Acetonitril
Flussrate :	1,0 mL/min
Laufzeit:	20 min
Detektion:	Absorptionsmessung bei 229 nm
Injektionsvolumen:	20 μL
Retentionszeiten:	
<i>O</i> -Carboxymethylbenzamidoxim (6)	8,9 min \pm 0,2 min
Benzamidoxim (84)	14,4 min \pm 0,2 min

Kalibrierung und Wiederfindung:

Zur Kalibrierung wurde Benzamidoxim in acht Konzentrationen von 0,1-500 μM , gelöst in Assay-Puffer (30 mM MES, 1 μM Kupfer(II)-acetat, 2 mM Natriumascorbat, 5 mM Kaliumiodid, pH 6,0), mit der oben beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen in Assay-Puffer hergestellt (Endvolumen = 100 μL). Weiterhin wurde *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (0,5 mM) und 250 U/mL Katalase zugegeben sowie abschließend 50 μL 10 %-iger $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ /Acetonitril (2:3). Die Proben wurden mit dem Vortexer geschüttelt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zur Vermessung wurden die Proben aufgetaut, 5 min am Vortexer geschüttelt und 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert.

7.3.2.1.4 HPLC-Analytik zur Trennung von *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (7) und *N*-Hydroxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (91)

Säule: LiChrospher RP-select B (250 \times 4.6 mm, 5 μm)

Säulentemperatur: 20 $^{\circ}\text{C}$

Mobile Phase: 70 % (v/v) 40 mM Ammoniumacetat, pH 5,2
30 % (v/v) Acetonitril

Flussrate : 1,0 mL/min

Laufzeit: 15 min

Detektion: Absorptionsmessung bei 229 nm

Injektionsvolumen: 20 μL

Retentionszeiten:

N-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (7) 5,2 min \pm 0,1 min

N-Hydroxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (91) 9,0 min \pm 0,2 min

Kalibrierung und Wiederfindung:

Zur Kalibrierung wurde *N*-Hydroxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (91) in acht Konzentrationen von 0,1-500 μM , gelöst in Assay-Puffer (30 mM MES, 1 μM Kupfer(II)acetat, 2 mM Natriumascorbat, 5 mM Kaliumiodid, pH 6,0), mit der oben beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen in Assay-Puffer hergestellt (Endvolumen = 100 μL). Weiterhin wurde *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin (**7**) (0,5 mM) und 250 U/mL Katalase zugegeben sowie abschließend 50 μL 10 %-iger $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ /Acetonitril (2:3). Die Proben wurden mit dem Vortexer geschüttelt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zur Vermessung wurden die Proben aufgetaut, 5 min am Vortexer geschüttelt und 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert.

7.3.2.1.5 HPLC-Analytik zur Trennung der Celecoxib-Prodrugs **92a,b** und Celecoxib

Säule:	LiChrospher 100, RP-8 (125 \times 4 mm, 5 μm)
Säulentemperatur:	20 $^\circ\text{C}$
Mobile Phase:	55 % (v/v) 40 mM Ammoniumacetat, pH 4,5 45 % (v/v) Acetonitril
Flussrate :	1,0 mL/min
Laufzeit:	15 min
Detektion:	Absorptionsmessung bei 229 nm
Injektionsvolumen:	20 μL
Retentionszeiten:	
Celecoxib-Prodrug 92a	3,7 min \pm 0,1 min
Celecoxib-Prodrug 92b	4,6 min \pm 0,1 min
Celecoxib	13,4 min \pm 0,1 min

Kalibrierung und Wiederfindung:

Zur Kalibrierung wurde Celecoxib in acht Konzentrationen von 0,1-500 μM , gelöst in Assay-Puffer (30 mM MES, 1 μM Kupfer(II)acetat, 2 mM Natriumascorbat, 5 mM Kaliumiodid, pH 6,0), mit der oben beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen in Assay-Puffer hergestellt (Endvolumen = 100 μL). Weiterhin wurde entweder **92a** oder **92b** (0,5 mM) und 250 U/mL Katalase zugegeben sowie abschließend 50 μL 10 %-iger $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ /Acetonitril (2:3). Die Proben wurden mit dem Vortexer geschüttelt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zur Vermessung wurden die Proben aufgetaut, 5 min am Vortexer geschüttelt und 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert.

7.3.3 Testung mit Cytochrom P450-Enzymquellen

7.3.3.1 Methoden

7.3.3.1.1 Inkubationsbedingungen

Ein typischer Inkubationsansatz von 500 μL (Totalvolumen) enthielt 0,3 mg Protein (Schweine- oder Humanleberenzymquelle), 0,1 mM (oder 1 mM) Testverbindung in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0 oder pH 7,4) und 1 mM NADH (oder NADPH). Die Inkubation wurde nach einer 5-minütigen Vorinkubation von Enzym und Testverbindung in Puffer durch den Zusatz von NADH (bzw. NADPH) gestartet und 60 min bzw. 180 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad geschüttelt. Die Ansätze wurden durch Zusatz des gleichen Volumens Acetonitril gestoppt, auf dem Vortexer geschüttelt und bei -80 °C eingefroren.

Zur Analyse wurden die Proben aufgetaut, 5 min auf dem Vortexer geschüttelt und das Protein durch 5-minütige Zentrifugation bei 10000 U/min abgetrennt. Der Überstand wurde für die HPLC-Analytik verwendet.

7.3.3.1.2 HPLC-Analytik zur Trennung von *O*-Carboxymethylbenzamidoxim (6), Benzamidoxim (84) und Benzamidin

Säule:	Synergi Max-RP 80 A (250 × 4.6 mm, 4 μm)
Säulentemperatur:	20 °C
Mobile Phase:	82,5 % (v/v) 10 mM Octylsulfonat, pH 2,5 (H_3PO_4) 17,5 % (v/v) Acetonitril
Flussrate :	1,0 mL/min
Laufzeit:	35 min
Detektion:	Absorptionsmessung bei 229 nm
Injektionsvolumen:	20 μL
Retentionszeiten:	
<i>O</i> -Carboxymethylbenzamidoxim (6)	13,6 min \pm 0,1 min
Benzamidoxim (84)	22,8 min \pm 0,3 min
Benzamidin	26,0 min \pm 0,3 min

7.3.3.1.3 HPLC-Analytik zur Trennung von *N*-Carboxymethoxy-*N',N''*-diphenylguanidin (**7**), *N*-Hydroxy-*N',N''*-diphenylguanidin (**91**) und *N,N'*-Diphenylguanidin

Säule: LiChrospher RP-select B (250 × 4.6 mm, 5 μm)

Säulentemperatur: 20 °C

Mobile Phase: 80 % 20 mM Ammoniumacetat, pH 4,3
20 % Acetonitril

Flussrate : 1,25 mL/min

Laufzeit: 15 min

Detektion: Absorptionsmessung bei 205 nm

Injektionsvolumen: 30 μL

Retentionszeiten:

N,N'-Diphenylguanidin 6,7 min ± 0,2 min

N-Carboxymethoxy-*N',N''*-diphenylguanidin (**7**) 7,8 min ± 0,2 min

N-Hydroxy-*N',N''*-diphenylguanidin (**91**) 10,7 min ± 0,3 min

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. SOBRERO, M. A.
Sur plusieurs composés détonants produits avec l'acide nitrique et le sucre, la dextrine, la lactine, la mannite et la glycérine. *CR Acad Sci* **1847**, 25, 2.
2. AHLNER, J.; ANDERSSON, R. G.; TORFGARD, K.; AXELSSON, K. L.
Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol Rev* **1991**, 43, (3), 351-423.
3. SNYDER, S. H.; BREDT, D. S.
Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* **1992**, 266, (5), 68-71, 74-7.
4. FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V.
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **1980**, 288, (5789), 373-6.
5. PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S.
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **1987**, 327, (6122), 524-6.
6. IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G.
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, (24), 9265-9.
7. SORELLE, R.
Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. *Circulation* **1998**, 98, (22), 2365-6.
8. HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E.
Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 101. Auflage. 34 ed.; de Gruyter: Berlin, **1995**.
9. GODBER, B. L.; DOEL, J. J.; SARKOTA, G. P.; BLAKE, D. R.; STEVENS, C. R.; EISENTHAL, R.; HARRISON, R.
Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* **2000**, 275, (11), 7757-63.
10. GLADWIN, M. T.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P.
The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* **2004**, 36, (6), 707-17.

11. ZWEIER, J. L.; SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P.
Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1411, (2-3), 250-62.
12. WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J.
Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev* **2002**, 102, (4), 1091-134.
13. DUCHSTEIN, H.-J.; RIEDERER, S.; ERBACH, C.
Aktive Stickstoffspezies. Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Chemie. *Pharm Unserer Zeit* **1999**, 28, 197-207.
14. KELM, M.
Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1411, (2-3), 273-89.
15. PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L.
Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **2007**, 87, (1), 315-424.
16. MORRIS, S. M., JR.
Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* **2006**, 83, (2), 508S-512S.
17. CASTILLO, L.; BEAUMIER, L.; AJAMI, A. M.; YOUNG, V. R.
Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from ¹⁵N-arginine-to-¹⁵N-citrulline labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (21), 11460-5.
18. TRAN, C. T.; LEIPER, J. M.; VALLANCE, P.
The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* **2003**, 4, (4), 33-40.
19. STUEHR, D. J.; KWON, N. S.; NATHAN, C. F.; GRIFFITH, O. W.; FELDMAN, P. L.; WISEMAN, J.
N^o-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* **1991**, 266, (10), 6259-63.
20. BOUCHER, J. L.; GENET, A.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; HENRY, Y.; MANSUY, D.
Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of *N*^o-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, 187, (2), 880-6.
21. DAGHIGH, F.; FUKUTO, J. M.; ASH, D. E.
Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, *N*^o-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 202, (1), 174-80.
22. BOUCHER, J. L.; MOALI, C.; TENU, J. P.
Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors, and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* **1999**, 55, (8/9), 1015-28.

23. WHITE, K. A.; MARLETTA, M. A.
Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* **1992**, 31, (29), 6627-31.
24. KNOWLES, R. G.; MONCADA, S.
Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **1994**, 298 (Pt 2), 249-58.
25. ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G.
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **2001**, 357, (Pt 3), 593-615.
26. FISCHMANN, T. O.; HRUZA, A.; NIU, X. D.; FOSSETTA, J. D.; LUNN, C. A.; DOLPHIN, E.; PRONGAY, A. J.; REICHERT, P.; LUNDELL, D. J.; NARULA, S. K.; WEBER, P. C.
Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Biol* **1999**, 6, (3), 233-42.
27. FLINSPACH, M.; LI, H.; JAMAL, J.; YANG, W.; HUANG, H.; SILVERMAN, R. B.; POULOS, T. L.
Structures of the neuronal and endothelial nitric oxide synthase heme domain with D-nitroarginine-containing dipeptide inhibitors bound. *Biochemistry* **2004**, 43, (18), 5181-7.
28. GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E.
Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* **2005**, 26, (4), 190-5.
29. HAYNES, V.; ELFERING, S.; TRAASETH, N.; GIULIVI, C.
Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr* **2004**, 36, (4), 341-6.
30. ELFERING, S. L.; SARKELA, T. M.; GIULIVI, C.
Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **2002**, 277, (41), 38079-86.
31. MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R.
International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* **1997**, 49, (2), 137-42.
32. KOBZIK, L.; REID, M. B.; BREDT, D. S.; STAMLER, J. S.
Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **1994**, 372, (6506), 546-8.
33. MAYER, B.; ANDREW, P.
Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1998**, 358, (1), 127-33.
34. WANG, M.; ROBERTS, D. L.; PASCHKE, R.; SHEA, T. M.; MASTERS, B. S.; KIM, J. J.
Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, (16), 8411-6.

35. FARACI, F. M.; BRIAN, J. E., JR.
7-Nitroindazole inhibits brain nitric oxide synthase and cerebral vasodilatation in response to *N*-methyl-D-aspartate. *Stroke* **1995**, 26, (11), 2172-5; discussion 2176.
36. EISEL, U. L.
Cytokines in degenerative brain diseases: lessons from transgenic animals. *Curr Top Microbiol Immunol* **2002**, 265, 49-62.
37. TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T.
Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther* **2005**, 106, (2), 233-66.
38. SIMS, N. R.; ANDERSON, M. F.
Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochem Int* **2002**, 40, (6), 511-26.
39. NEEB, L.; REUTER, U.
Nitric oxide in migraine. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2007**, 6, (4), 258-64.
40. CHABRIER, P. E.; DEMERLE-PALLARDY, C.; AUGUET, M.
Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* **1999**, 55, (8-9), 1029-35.
41. MÜLLER, S.; GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G.
Vasoprotektion durch vaskuläres NO. Einfluss von körperlichem Training und Arzneistoffen. *Med Monatsschr Pharm* **2002**, 25, (3), 91-6.
42. MONCADA, S.; HIGGS, E. A.
The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* **2006**, 147 Suppl 1, S193-201.
43. MÜLLER, S.; GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G.
Vasoprotektion durch vaskuläres NO. Molekulare Grundlagen antiatherosklerotischer Wirkungen. *Med Monatsschr Pharm* **2002**, 25, (2), 45-51.
44. TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A.
Endothelial dysfunction in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **2001**, 38 Suppl 2, S11-4.
45. FERRONI, P.; BASILI, S.; PAOLETTI, V.; DAVI, G.
Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2006**, 16, (3), 222-33.
46. SACHAIS, B. S.
Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* **2001**, 3, (5), 412-6.

47. LOSCALZO, J.
Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* **2001**, 88, (8), 756-62.
48. RAIJ, L.
Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **2006**, 8, (12 Suppl 4), 30-9.
49. DREXLER, H.; ZEIHNER, A. M.
Endothelial function in human coronary arteries *in vivo*. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension* **1991**, 18, (4 Suppl), II90-9.
50. CALVER, A.; COLLIER, J.; VALLANCE, P.
Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* **1992**, 90, (6), 2548-54.
51. BRUCKDORFER, R.
The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* **2005**, 26, (1-2), 3-31.
52. SCHWENTKER, A.; VODOVOTZ, Y.; WELLER, R.; BILLIAR, T. R.
Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* **2002**, 7, (1), 1-10.
53. BREALEY, D.; BRAND, M.; HARGREAVES, I.; HEALES, S.; LAND, J.; SMOLENSKI, R.; DAVIES, N. A.; COOPER, C. E.; SINGER, M.
Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* **2002**, 360, (9328), 219-23.
54. BOVERIS, A.; ALVAREZ, S.; NAVARRO, A.
The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* **2002**, 33, (9), 1186-93.
55. BINGHAM, C. O., 3RD
The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl* **2002**, 65, 3-9.
56. SHANLEY, T. P.; ZHAO, B.; MACARIOLA, D. R.; DENENBERG, A.; SALZMAN, A. L.; WARD, P. A.
Role of nitric oxide in acute lung inflammation: lessons learned from the inducible nitric oxide synthase knockout mouse. *Crit Care Med* **2002**, 30, (9), 1960-8.
57. ZHANG, C.; HEIN, T. W.; WANG, W.; CHANG, C. I.; KUO, L.
Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J* **2001**, 15, (7), 1264-6.
58. ASH, D. E.
Structure and function of arginases. *J Nutr* **2004**, 134, (10, Suppl.), 2760S-2764S.

59. JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D.
Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **1996**, 114, (1), 107-32.
60. BOUCHER, J. L.; CUSTOT, J.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. P.; YAPO, A.; MANSUY, D.
*N*⁰-Hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Comm* **1994**, 203, (3), 1614-21.
61. HECKER, M.; SCHOTT, C.; BUCHER, B.; BUSSE, R.; STOCLET, J. C.
Increase in serum *N*⁰-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* **1995**, 275, (1), R1-3.
62. BUGA, G. M.; WEI, L. H.; BAUER, P. M.; FUKUTO, J. M.; IGNARRO, L. J.
*N*⁰-Hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am J Phys* **1998**, 275, (4, Pt. 2), R1256-R1264.
63. DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A.
Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2007**, 34, (9), 906-11.
64. ZHANG, C.; HEIN, T. W.; WANG, W.; MILLER, M. W.; FOSSUM, T. W.; McDONALD, M. M.; HUMPHREY, J. D.; KUO, L.
Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* **2004**, 44, (6), 935-43.
65. JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A.; PEYTON, K. J.; DURANTE, W.
Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Phys* **2005**, 288, (4, Pt. 2), R1057-R1062.
66. MING, X. F.; BARANDIER, C.; VISWAMBHARAN, H.; KWAK, B. R.; MACH, F.; MAZZOLAI, L.; HAYOZ, D.; RUFFIEUX, J.; RUSCONI, S.; MONTANI, J. P.; YANG, Z.
Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation* **2004**, 110, (24), 3708-14.
67. MASUDA, H.; YANO, M.; SAKAI, Y.; KIHARA, K.; YAMAUCHI, Y.; AZUMA, H.
Modulation of intrinsic cavernous tone and nitric oxide production by arginase in rabbit corpus cavernosum. *J Urol* **2004**, 171, (1), 490-4.
68. KIM, N. N.; COX, J. D.; BAGGIO, R. F.; EMIG, F. A.; MISTRY, S. K.; HARPER, S. L.; SPEICHER, D. W.; MORRIS, S. M., JR.; ASH, D. E.; TRAISH, A.; CHRISTIANSON, D. W.
Probing erectile function: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle relaxation in human penile corpus cavernosum. *Biochemistry* **2001**, 40, (9), 2678-88.

69. BERKOWITZ, D. E.; WHITE, R.; LI, D.; MINHAS, K. M.; CERNETICH, A.; KIM, S.; BURKE, S.; SHOUKAS, A. A.; NYHAN, D.; CHAMPION, H. C.; HARE, J. M.
Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* **2003**, 108, (16), 2000-6.
70. KATUSIC, Z. S.
Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I. *Circ Res* **2007**, 101, (7), 640-1.
71. OGAWA, T.; KIMOTO, M.; SASAOKA, K.
Purification and properties of a new enzyme, N^{ω},N^{ω} -dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* **1989**, 264, (17), 10205-9.
72. CLARKE, S.
Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* **1993**, 5, (6), 977-83.
73. KRAUSE, C. D.; YANG, Z. H.; KIM, Y. S.; LEE, J. H.; COOK, J. R.; PESTKA, S.
Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **2007**, 113, (1), 50-87.
74. ZOBEL-THROPP, P.; GARY, J. D.; CLARKE, S.
 N^{δ} -Methylarginine is a novel posttranslational modification of arginine residues in yeast proteins. *J Biol Chem* **1998**, 273, (45), 29283-6.
75. LEIPER, J. M.; SANTA MARIA, J.; CHUBB, A.; MACALLISTER, R. J.; CHARLES, I. G.; WHITLEY, G. S.; VALLANCE, P.
Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* **1999**, 343 Pt 1, 209-14.
76. TRAN, C. T.; FOX, M. F.; VALLANCE, P.; LEIPER, J. M.
Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* **2000**, 68, (1), 101-5.
77. DAYOUB, H.; ACHAN, V.; ADIMOOLAM, S.; JACOBI, J.; STUEHLINGER, M. C.; WANG, B. Y.; TSAO, P. S.; KIMOTO, M.; VALLANCE, P.; PATTERSON, A. J.; COOKE, J. P.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* **2003**, 108, (24), 3042-7.
78. LEIPER, J.; NANDI, M.; TORONDEL, B.; MURRAY-RUST, J.; MALAKI, M.; O'HARA, B.; ROSSITER, S.; ANTHONY, S.; MADHANI, M.; SELWOOD, D.; SMITH, C.; WOJCIAK-STOTHARD, B.; RUDIGER, A.; STIDWILL, R.; McDONALD, N. Q.; VALLANCE, P.
Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* **2007**, 13, (2), 198-203.

79. JACOBI, J.; SYDOW, K.; VON DEGENFELD, G.; ZHANG, Y.; DAYOUB, H.; WANG, B.; PATTERSON, A. J.; KIMOTO, M.; BLAU, H. M.; COOKE, J. P.
Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* **2005**, 111, (11), 1431-8.
80. CARDOUNEL, A. J.; CUI, H.; SAMOUILOV, A.; JOHNSON, W.; KEARNS, P.; TSAI, A. L.; BERKA, V.; ZWEIER, J. L.
Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem* **2007**, 282, (2), 879-87.
81. ZOCCALI, C.; BODE-BOGER, S.; MALLAMACI, F.; BENEDETTO, F.; TRIPEPI, G.; MALATINO, L.; CATALIOTTI, A.; BELLANUOVA, I.; FERMO, I.; FROLICH, J.; BOGER, R.
Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* **2001**, 358, (9299), 2113-7.
82. ITO, A.; TSAO, P. S.; ADIMOOLAM, S.; KIMOTO, M.; OGAWA, T.; COOKE, J. P.
Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* **1999**, 99, (24), 3092-5.
83. ABE, T.; TOHGI, H.; MURATA, T.; ISOBE, C.; SATO, C.
Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **2001**, 312, (3), 177-9.
84. NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J.
Nitric oxide-releasing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2003**, 43, 97-123.
85. CLARKSON, P.; ADAMS, M. R.; POWE, A. J.; DONALD, A. E.; MCCREDIE, R.; ROBINSON, J.; MCCARTHY, S. N.; KEECH, A.; CELERMAJER, D. S.; DEANFIELD, J. E.
Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* **1996**, 97, (8), 1989-94.
86. PIATTI, P. M.; MONTI, L. D.; VALSECCHI, G.; MAGNI, F.; SETOLA, E.; MARCHESI, F.; GALLI-KIENLE, M.; POZZA, G.; ALBERTI, K. G.
Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **2001**, 24, (5), 875-80.
87. ADAMS, M. R.; JESSUP, W.; CELERMAJER, D. S.
Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: reversibility with oral L-arginine but not vitamin C. *J Am Coll Cardiol* **1997**, 29, (3), 491-7.
88. BODE-BOGER, S. M.; MUKE, J.; SURDACKI, A.; BRABANT, G.; BOGER, R. H.; FROLICH, J. C.
Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years. *Vasc Med* **2003**, 8, (2), 77-81.

89. RECTOR, T. S.; BANK, A. J.; MULLEN, K. A.; TSCHUMPERLIN, L. K.; SIH, R.; PILLAI, K.; KUBO, S. H.
Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation* **1996**, 93, (12), 2135-41.
90. BEDNARZ, B.; JAXA-CHAMIEC, T.; GEBALSKA, J.; HERBACZYNSKA-CEDRO, K.; CEREMUZYNSKI, L.
L-arginine supplementation prolongs exercise capacity in congestive heart failure. *Kardiol Pol* **2004**, 60, (4), 348-53.
91. CEREMUZYNSKI, L.; CHAMIEC, T.; HERBACZYNSKA-CEDRO, K.
Effect of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris. *Am J Cardiol* **1997**, 80, (3), 331-3.
92. BEDNARZ, B.; WOLK, R.; CHAMIEC, T.; HERBACZYNSKA-CEDRO, K.; WINEK, D.; CEREMUZYNSKI, L.
Effects of oral L-arginine supplementation on exercise-induced QT dispersion and exercise tolerance in stable angina pectoris. *Int J Cardiol* **2000**, 75, (2-3), 205-10.
93. BLUM, A.; HATHAWAY, L.; MINCEMOYER, R.; SCHENKE, W. H.; KIRBY, M.; CSAKO, G.; WACLAWIW, M. A.; PANZA, J. A.; CANNON, R. O., 3RD
Oral L-arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation* **2000**, 101, (18), 2160-4.
94. WALKER, H. A.; MCGING, E.; FISHER, I.; BOGER, R. H.; BODE-BOGER, S. M.; JACKSON, G.; RITTER, J. M.; CHOWIENCZYK, P. J.
Endothelium-dependent vasodilation is independent of the plasma L-arginine/ADMA ratio in men with stable angina: lack of effect of oral L-arginine on endothelial function, oxidative stress and exercise performance. *J Am Coll Cardiol* **2001**, 38, (2), 499-505.
95. SCHULMAN, S. P.; BECKER, L. C.; KASS, D. A.; CHAMPION, H. C.; TERRIN, M. L.; FORMAN, S.; ERNST, K. V.; KELEMEN, M. D.; TOWNSEND, S. N.; CAPRIOTTI, A.; HARE, J. M.; GERSTENBLITH, G.
L-Arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* **2006**, 295, (1), 58-64.
96. BOGER, R. H.
L-Arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2008**, 11, (1), 55-61.
97. LOSCALZO, J.
L-arginine and atherothrombosis. *J Nutr* **2004**, 134, (10 Suppl), 2798S-2800S; discussion 2818S-2819S.
98. MANSUY, D.; BOUCHER, J. L.
Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radic Biol Med* **2004**, 37, (8), 1105-21.

99. DIJOLS, S.; BOUCHER, J. L.; LEPOIVRE, M.; LEFEVRE-GROBILLOT, D.; MOREAU, M.; FRAPART, Y.; REKKA, E.; MEADE, A. L.; STUEHR, D. J.; MANSUY, D.
First non- α -amino acid guanidines acting as efficient NO precursors upon oxidation by NO-synthase II or activated mouse macrophages. *Biochemistry* **2002**, 41, (30), 9286-92.
100. COX, J. D.; KIM, N. N.; TRAISH, A. M.; CHRISTIANSON, D. W.
Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat Struct Biol* **1999**, 6, (11), 1043-7.
101. BAGNOST, T.; BERTHELOT, A.; BOUHADDI, M.; LAURANT, P.; ANDRE, C.; GUILLAUME, Y.; DEMOUGEOT, C.
Treatment with the arginase inhibitor *N*⁰-hydroxy-*nor*-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* **2008**, 26, (6), 1110-8.
102. BAGGIO, R.; ELBAUM, D.; KANYO, Z. F.; CARROLL, P. J.; CAVALLI, R. C.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W.
Inhibition of Mn²⁺₂-arginase by borate leads to the design of a transition state analogue inhibitor, 2(S)-amino-6-boronohexanoic acid. *J Am Chem Soc* **1997**, 119, (34), 8107-8.
103. CUSTOT, J.; MOALI, C.; BROLLO, M.; BOUCHER, J. L.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D.; TENU, J. P.; ZIMMERMANN, J. L.
The new α -amino acid *N*⁰-hydroxy-*nor*-L-arginine: a high-affinity inhibitor of arginase well adapted to bind to its manganese cluster. *J Am Chem Soc* **1997**, 119, (17), 4086-7.
104. SHIN, H.; CAMA, E.; CHRISTIANSON, D. W.
Design of amino acid aldehydes as transition-state analogue inhibitors of arginase. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, (33), 10278-84.
105. BELTOWSKI, J.; KEDRA, A.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* **2006**, 58, (2), 159-78.
106. ACHAN, V.; HO, H. K.; HEESCHEN, C.; STUEHLINGER, M.; JANG, J. J.; KIMOTO, M.; VALLANCE, P.; COOKE, J. P.
ADMA regulates angiogenesis: genetic and metabolic evidence. *Vasc Med* **2005**, 10, (1), 7-14.
107. SINGH, J. P.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a new therapeutic target for the modulation of nitric oxide and angiogenesis. *Curr Opin Investig Drugs* **2007**, 8, (9), 736-41.
108. NANDI, M.; LEIPER, J.
Vorträge anlässlich des *4th International Symposium on ADMA*, Bregenz, Österreich, 28.-29.08. **2008**.

109. KO, F. N.; WU, C. C.; KUO, S. C.; LEE, F. Y.; TENG, C. M.
YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* **1994**, *84*, (12), 4226-33.
110. STASCH, J. P.; BECKER, E. M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; FEURER, A.; GERZER, R.; MINUTH, T.; PERZBORN, E.; PLEISS, U.; SCHRODER, H.; SCHROEDER, W.; STAHL, E.; STEINKE, W.; STRAUB, A.; SCHRAMM, M.
NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* **2001**, *410*, (6825), 212-5.
111. EVGENOV, O. V.; PACHER, P.; SCHMIDT, P. M.; HASKO, G.; SCHMIDT, H. H.; STASCH, J. P.
NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, (9), 755-68.
112. ERDAL, E. P.; LITZINGER, E. A.; SEO, J.; ZHU, Y.; JI, H.; SILVERMAN, R. B.
Selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Curr Top Med Chem* **2005**, *5*, (7), 603-24.
113. PAIGE, J. S.; JAFFREY, S. R.
Pharmacologic manipulation of nitric oxide signaling: targeting NOS dimerization and protein-protein interactions. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7*, (1), 97-114.
114. VALLANCE, P.; LEIPER, J.
Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, (12), 939-50.
115. ROSSITER, S.; SMITH, C. L.; MALAKI, M.; NANDI, M.; GILL, H.; LEIPER, J. M.; VALLANCE, P.; SELWOOD, D. L.
Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Med Chem* **2005**, *48*, (14), 4670-8.
116. KNIPP, M.; BRAUN, O.; VASAK, M.
Searching for DDAH inhibitors: S-nitroso-L-homocysteine is a chemical lead. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, (8), 2372-3.
117. HARTZOULAKIS, B.; ROSSITER, S.; GILL, H.; O'HARA, B.; STEINKE, E.; GANE, P. J.; HURTADO-GUERRERO, R.; LEIPER, J. M.; VALLANCE, P.; RUST, J. M.; SELWOOD, D. L.
Discovery of inhibitors of the ptein superfamily protein dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), by virtual screening and hit analysis. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, (14), 3953-6.
118. WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A.
Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl Chem* **1998**, *70*, (5), 1129-43.
119. ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B.
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* **2004**, *47*, (10), 2393-404.

120. AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R.
A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* **1995**, 12, (3), 413-20.
121. LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J.
Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46, (1-3), 3-26.
122. MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L.
A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol* **2002**, 42, (6), 620-43.
123. STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C. U.; BRODIN, B.; ERIKSSON, A. H.; ANDERSEN, R.; FROKJAER, S.
Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci* **2004**, 21, (1), 3-16.
124. MASIC, L. P.
Arginine mimetic structures in biologically active antagonists and inhibitors. *Curr Med Chem* **2006**, 13, (30), 3627-48.
125. PETERLIN-MASIC, L.; CESAR, J.; ZEGA, A.
Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* **2006**, 12, (1), 73-91.
126. WERBOVETZ, K.
Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Investig Drugs* **2006**, 7, (2), 147-57.
127. MUTSCHLER, E.; GEISSLINGER, G.; KROEMER, H. K.; SCHÄFER-KORTING, M.
Mutschler Arzneimittelwirkungen. 8 ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **2001**.
128. STEINMETZER, T.; SCHWEINITZ, A.; STURZEBECKER, A.; DONNECKE, D.; UHLAND, K.; SCHUSTER, O.; STEINMETZER, P.; MULLER, F.; FRIEDRICH, R.; THAN, M. E.; BODE, W.; STURZEBECKER, J.
Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2006**, 49, (14), 4116-26.
129. CLEMENT, B.; SCHMITT, S.; ZIMMERMANN, M.
Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* **1988**, 321, (12), 955-6.
130. CLEMENT, B.
Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as prodrugs of amidines. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, (3), 565-79.

131. CLEMENT, B.; IMMEL, M.; SCHMITT, S.; STEINMANN, U.
Biotransformation of benzamidine and benzamidoxime *in vivo*. *Arch Pharm (Weinheim)* **1993**, 326, (10), 807-12.
132. CLEMENT, B.; IMMEL, M.; TERLINDEN, R.; WINGEN, F. J.
Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine *in vivo*. *Arch Pharm (Weinheim)* **1992**, 325, (1), 61-2.
133. CLEMENT, B.; LOPIAN, K.
Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, (5), 645-51.
134. GUSTAFSSON, D.; NYSTROM, J.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K.; UNGELL, A.; SORENSEN, H.; NAGARD, S.; ABRAHAMSSON, A.; BYLUND, R.
The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* **2001**, 101, (3), 171-81.
135. CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M.; LINNE, S.
Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* **1996**, 9, (4), 682-8.
136. CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M.
Formation of guanoxabenz from guanabenz in human liver. A new metabolic marker for CYP1A2. *Drug Metab Dispos* **1997**, 25, (11), 1266-71.
137. FROELICH, A. K.; GIRRESER, U.; CLEMENT, B.
Metabolism of *N*-hydroxyguanidines (*N*-hydroxydebrisoquine) in human and porcine hepatocytes: reduction and formation of glucuronides. *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, (10), 1532-7.
138. RENODON-CORNIERE, A.; DIJOLS, S.; PEROLLIER, C.; LEFVRE-GROBOILLOT, D.; BOUCHER, J. L.; ATTIAS, R.; SARI, M. A.; STUEHR, D.; MANSUY, D.
N-Aryl *N'*-hydroxyguanidines, a new class of NO-donors after selective oxidation by nitric oxide synthases: structure-activity relationship. *J Med Chem* **2002**, 45, (4), 944-54.
139. KANZOW, S.
Charakterisierung der mikrosomalen Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen. *Dissertation Kiel*, **2007**.
140. CLEMENT, B.; KUNZE, T.; HEBERLING, S.
Reduction of *N*^ω-hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 349, (2), 869-73.

141. HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.; KUNZE, T.; CLEMENT, B.
Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* **2006**, 281, (46), 34796-802.
142. ANSEDE, J. H.; VOYKSNER, R. D.; ISMAIL, M. A.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E.
In vitro metabolism of an orally active *O*-methyl amidoxime prodrug for the treatment of CNS trypanosomiasis. *Xenobiotica* **2005**, 35, (3), 211-26.
143. OUATTARA, M.; WEIN, S.; CALAS, M.; HOANG, Y. V.; VIAL, H.; ESCALE, R.
Synthesis and antimalarial activity of new 1,12-bis(*N,N'*-acetamidinyl)dodecane derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, (3), 593-6.
144. CLEMENT, B.; BURENHEIDE, A.; RIECKERT, W.; SCHWARZ, J.
Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation. *ChemMedChem* **2006**, 1, (11), 1260-7.
145. REEH, C.
Neue Prodrug-Prinzipien für Amidine. *Dissertation* Kiel, **2008**.
146. NIEWMIERZYCKA, A.; CLARKE, S.
S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem* **1999**, 274, (2), 814-24.
147. McBride, A. E.; ZURITA-LOPEZ, C.; REGIS, A.; BLUM, E.; CONBOY, A.; ELF, S.; CLARKE, S.
Protein arginine methylation in *Candida albicans*: role in nuclear transport. *Eukaryot Cell* **2007**, 6, (7), 1119-29.
148. KOTTHAUS, J.
Substituierte L-Arginin Derivate als Modulatoren des Stickstoffmonoxid-generierenden Systems. *Dissertation* Kiel, in Vorbereitung.
149. WALKER, J. B.; WALKER, M. S.
The enzymatic reduction of hydroxyguanidine. *J Biol Chem* **1959**, 234, (6), 1481-4.
150. FUKUTO, J. M.
Chemistry of *N*⁰-hydroxy-L-arginine. *Methods Enzymol* **1996**, 268, 365-75.
151. CAI, T. B.; LU, D.; WANG, P. G.
N-hydroxyguanidines as substrates of nitric oxide synthases. *Curr Top Med Chem* **2005**, 5, (7), 721-36.

152. FUKUTO, J. M.; WALLACE, G. C.; HSZIEH, R.; CHAUDHURI, G.
Chemical oxidation of *N*-hydroxyguanidine compounds. Release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation. *Biochem Pharmacol* **1992**, 43, (3), 607-13.
153. BOYKIN, D. W.; KUMAR, A.; HALL, J. E.; BENDER, B. C.; TIDWELL, R. R.
Anti-pneumocystis activity of bis-amidoximes and bis-*O*-alkylamidoximes prodrugs. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, 6, (24), 3017-20.
154. PRIGGE, S. T.; MAINS, R. E.; EIPPER, B. A.; AMZEL, L. M.
New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci* **2000**, 57, (8-9), 1236-59.
155. KATOPODIS, A. G.; MAY, S. W.
Novel substrates and inhibitors of peptidylglycine α -amidating monooxygenase. *Biochemistry* **1990**, 29, (19), 4541-8.
156. SCHNÖRWANGEN, E.
N-Hydroxylierte Derivate physiologischer Guanidine: Synthesen und ihr Vermögen zur NO-Freisetzung durch NO-Synthasen oder Cytochrom-P450. *Dissertation Kiel*, **1994**.
157. TÖPKER, K.
 N^{δ} -Substituierte Argininderivate: Synthesen und ihre Umsetzungen mit NO-Synthasen und Cytochrom P450. *Dissertation Kiel*, **1997**.
158. LUZZI, S. D.; MARLETTA, M. A.
L-Arginine analogs as alternate substrates for nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, 15, (17), 3934-41.
159. GUT, V.; RUDINGER, J.; WALTER, R.; HERLING, P. A.; SCHWARTZ, I. L.
Derivatives of 1-tosyl-3-amino-2-piperidone: preparation and conversion to derivatives and peptides of ornithine. *Tetrahedron* **1968**, 24, (21), 6351-63.
160. ERLANGER, B. F. S., H.; BRAND, E.
The synthesis of peptides related to gramicidine S. *J Am Chem Soc* **1954**, 76, 1806-10.
161. YAMAMOTO, H.; YANG, J. T.
Syntheses and conformational studies of poly(*N*-epsilon-methyl-L-lysine), poly(*N*-delta-methyl-L-ornithine), poly(*N*-delta-ethyl-L-ornithine), and their carbobenzoxy derivatives. *Biopolymers* **1974**, 13, (6), 1093-107.
162. BENOITON, L.
Amino Acids and Peptides. II. Synthesis of ϵ -*N*-methyl-L-lysine and related compounds. *Can J Chem* **1964**, 42, 2043-7.

163. THOMAS, K. K., J.; FLASCHENTRÄGER, B.
Über δ -Methylornithin und δ -Methylarginin. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* **1923**, 125, 75-102.
164. BODANSZKY, M.
Peptide Synthesis: A Practical Textbook. 2 ed.; Springer-Verlag: New York **1993**.
165. KOCIENSKI, P. J.
Protecting Groups. 3 ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2005**.
166. NEFKENS, G. H. L.; ZWANENBURG, B.
Boroxazolidones as simultaneous protection of the amino and carboxyl group in α -amino acids. *Tetrahedron* **1983**, 39, (18), 2995-8.
167. GARCÍA, M.; SERRA, A.; RUBIRALTA, M.; DIEZ, A.; SEGARRA, V.; LOZOYA, E.; RYDER, H.; PALACIOS, J. M.
Efficient method for the preparation of (*S*)-5-hydroxynorvaline. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, (4), 991-4.
168. CUDIC, M.; MARI, F.; FIELDS, G. B.
Synthesis and solid-phase application of suitably protected γ -hydroxyvaline building blocks. *J Org Chem* **2007**, 72, (15), 5581-6.
169. WALKER, W. H. T.; ROKITA, S. E.
Use of a boroxazolidone complex of 3-iodo-L-tyrosine for palladium-catalyzed cross-coupling. *J Org Chem* **2003**, 68, (4), 1563-6.
170. DENT, W. H., 3RD; ERICKSON, W. R.; FIELDS, S. C.; PARKER, M. H.; TROMICZAK, E. G.
9-BBN: An amino acid protecting group for functionalization of amino acid side chains in organic solvents. *Org Lett* **2002**, 4, (8), 1249-51.
171. STRANG, C. J.; HENSON, E.; OKAMOTO, Y.; PAZ, M. A.; GALLOP, P. M.
Separation and determination of α -amino acids by boroxazolidone formation. *Anal Biochem* **1989**, 178, (2), 276-86.
172. NORDMANN, R.; LOOSLI, H.-R.
Synthesis and conformation of (5*R*,8*R*,10*R*)-8-(methylthiomethyl)ergoline-6-carboxamide. *Helv Chim Acta* **1985**, 68, 1025-32.
173. MARTIN, N. I.; WOODWARD, J. J.; WINTER, M. B.; BEESON, W. T.; MARLETTA, M. A.
Design and synthesis of C5 methylated L-arginine analogues as active site probes for nitric oxide synthase. *J Am Chem Soc* **2007**, 129, (41), 12563-70.
174. LANTZSCH, R.
Cyanamide und ihre Derivate. In *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, 4 ed.; Hagemann, H., Ed. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1983**; Vol. E4, pp 974-999.

175. WALLACE, G. C.; FUKUTO, J. M.
Synthesis and bioactivity of N^{ω} -hydroxy-L-arginine: a possible intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from arginine. *J Med Chem* **1991**, 34, (5), 1746-8.
176. PUFAHL, R. A.; NANJAPPAN, P. G.; WOODARD, R. W.; MARLETTA, M. A.
Mechanistic probes of N -hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages. *Biochemistry* **1992**, 31, (29), 6822-8.
177. CLEMENT, B.; SCHNORWANGEN, E.; KAMPCHEN, T.; MORDVINTCEV, P.; MULSCH, A.
Synthesis of $^{15}N^{\omega}$ -hydroxy-L-arginine and ESR and ^{15}N -NMR studies for the elucidation of the molecular mechanism of enzymic nitric oxide formation from L-arginine. *Arch Pharm (Weinheim)* **1994**, 327, (12), 793-8.
178. WAGENAAR, F. L.; KERWIN, J. F.
Methodology for the preparation of N -guanidino-modified arginines and related derivatives. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, (16), 4331-8.
179. AINLEY, A. D.; CURD, F. H. S.; ROSE, F. L.
Synthetic Antimalarials. Part XXXIII. An alternative route to N^1 -aryl- N^5 -alkyldiguanides and related compounds: the condensation of guanidines and cyanamides. *J Chem Soc* **1949**, 98-106.
180. CLAGUE, M. J.; WISHNOK, J. S.; MARLETTA, M. A.
Formation of N^{δ} -cyanoornithine from N^{ω} -hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: implications for mechanism. *Biochemistry* **1997**, 36, (47), 14465-73.
181. BAILEY, D. M.; DEGRAZIA, C. G.
Hydroxyguanidines. A new class of antihypertensive agents. *J Med Chem* **1973**, 16, (2), 151-6.
182. WILKERSON, C. J.; GREENE, F. D.
Structures of the 1:1:1 adducts of the nitroso-isonitrile-isocyanate reaction. Possible intermediacy of a carbodiimide N -oxide. *J. Org. Chem.* **1975**, 40, (21), 3112-8.
183. MOALI, C.; BROLLO, M.; CUSTOT, J.; SARI, M. A.; BOUCHER, J. L.; STUEHR, D. J.; MANSUY, D.
Recognition of α -amino acids bearing various C=NOH functions by nitric oxide synthase and arginase involves very different structural determinants. *Biochemistry* **2000**, 39, (28), 8208-18.
184. DIJOLS, S.; PEROLIER, C.; LEFEVRE-GROBOILLOT, D.; PETHE, S.; ATTIAS, R.; BOUCHER, J. L.; STUEHR, D. J.; MANSUY, D.
Oxidation of N^{ω} -hydroxy-L-arginine analogues by NO-synthase: the simple, non amino acid N -butyl- N^1 -hydroxyguanidine is almost as efficient an NO precursor as N^{ω} -hydroxy-L-arginine. *J Med Chem* **2001**, 44, (20), 3199-202.

185. XIAN, M.; FUJIWARA, N.; WEN, Z.; CAI, T.; KAZUMA, S.; JANCZUK, A. J.; TANG, X.; TELYATNIKOV, V. V.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; MIYAMOTO, Y.; TANIGUCHI, N.; WANG, P. G.
Novel substrates for nitric oxide synthases. *Bioorg Med Chem* **2002**, 10, (9), 3049-55.
186. FELDMAN, P. L.
Synthesis of the putative L-arginine metabolite L- N^0 -hydroxyarginine. *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, (7), 875-8.
187. STEUDEL, R.; SCHENK, P. W.
Handbuch der präparativen anorganischen Chemie. 3 ed.; Ferdinand Enke: Stuttgart, **1975**; Vol. 1.
188. ZINNER, G.; KLEINAU, V.
Addition von Hydroxylamin an monosubstituierte Cyanamide. *Chem-Z* **1977**, 10, 451-2.
189. BELZECKI, C.; HINTZE, B.; KWIATKOWSKA, S.
Synthesis of hydroxyguanidine derivatives from disubstituted cyanamides. *Bull Acad Pol Sci Chem* **1970**, 18, (7), 375-8.
190. BELZECKI, C.; PIOTROWSKA, K.; HINTZE, B.
1,3-Disubstituted 2-hydroxyguanidine derivatives. *Bull Acad Pol Sci Chem* **1971**, 19, (6-7), 367-70.
191. BELZECKI, C.; HINTZE, B.; KWIATKOWSKA, S.
A new type of reversible rearrangement: hydroxyguanidines-aminoxyformamidines. *Bull Acad Pol Sci Chem* **1970**, 18, (8), 431-6.
192. SCHADE, D.; TOPKER-LEHMANN, K.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.
Synthetic approaches to N^{δ} -methylated L-arginine, N^{ω} -hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and N^{δ} -cyano-L-ornithine. *J Org Chem* **2008**, 73, (3), 1025-30.
193. JUNG, S. H.; KOHN, H.
Stereoselective synthesis of vicinal diamines from alkenes and cyanamide. *J Am Chem Soc* **1985**, 107, (10), 2931-43.
194. JUNG, S. H.; PARK, K. L.; LEE, H. S.; WHANG, J. S.
Evaluation of the role of imidazolidinone motif of antineoplastic 4-phenyl-1-arylsulfonylimidazolidinones using 4-phenyl-2-arylsulfonyloxazolines. *Arch Pharm Res* **2001**, 24, (6), 499-502.
195. GARRATT, P. J.; THORN, S. N.; WRIGGLESWORTH, R.
Preparation of imidazolones from *N*-cyano-*N'*-methylcarboxyguanidines. An unusual C-N bond formation in the hydrogenolysis of a benzyl ester in an attempted synthesis of an inhibitor of carboxypeptidase A. *Tetrahedron* **1993**, 49, (31), 6885-98.

196. MALIK, A.; AFZA, N.; SIDDIQUI, S.
Some extensions of von Braun (BrCN) reaction on organic Bases. Part II. *Z Naturforsch* **1982**, 37b, 512-8.
197. NOWSHUDDIN, S.; REDDY, A. R.
Decomposition of copper-amino acid complexes by sodium sulfide. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, (29), 5159-61.
198. KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; TOPKER-LEHMANN, K.; BEITZ, E.; CLEMENT, B.
 N^{δ} -Methylated L-arginine derivatives and their effects on the nitric oxide generating system. *Bioorg Med Chem* **2008**, 16, (5), 2305-12.
199. FREY, D.; BRAUN, O.; BRIAND, C.; VASAK, M.; GRUTTER, M. G.
Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. *Structure* **2006**, 14, (5), 901-11.
200. MURRAY-RUST, J.; LEIPER, J.; MCALISTER, M.; PHELAN, J.; TILLEY, S.; SANTA MARIA, J.; VALLANCE, P.; McDONALD, N.
Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* **2001**, 8, (8), 679-83.
201. CUSTOT, J. B., J.-L.; VADON, S.; GUEDES, C.; DIJOLS, S.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D.
 N^{ω} -Hydroxyamino- α -amino acids as a new class of very strong inhibitors of arginases. *J Biol Inorg Chem* **1996**, 1, 73-82.
202. COX, J. D.; CAMA, E.; COLLELUORI, D. M.; PETHE, S.; BOUCHER, J.-L.; MANSUY, D.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W.
Mechanistic and metabolic inferences from the binding of substrate analogues and products to arginase. *Biochemistry* **2001**, 40, (9), 2689-701.
203. VALLANCE, P.; BUSH, H. D.; MOK, B. J.; HURTADO-GUERRERO, R.; GILL, H.; ROSSITER, S.; WILDEN, J. D.; CADDICK, S.
Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginine deiminase (ADI) by pentafluorophenyl (PFP) sulfonates. *Chem Commun (Camb)* **2005**, (44), 5563-5.
204. KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B. V.
Recent developments in guanylating agents. *ARKIVOC* **2005**, 4, 49-87.
205. KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B. V.; CHASSAING, C.; VVEDENSKY, V.
Di(benzotriazol-1-yl)methanimine: a new reagent for the synthesis of tri- and tetrasubstituted guanidines. *J Org Chem* **2000**, 65, (23), 8080-2.
206. FAST, W.; LEVSKY, M. E.; MARLETTA, M. A.; SILVERMAN, R. B.
 N^{ω} -Propargyl-L-arginine and N^{ω} -hydroxy- N^{ω} -propargyl-L-arginine are inhibitors, but not inactivators, of neuronal and macrophage nitric oxide synthases. *Bioorg Med Chem* **1997**, 5, (8), 1601-8.

207. CHEN, B.-C.; SHIU, S.; YANG, D.-Y.
A general procedure for synthesis of N^{ω} -alkyl, and N^{ω} -aryl-L-arginines as potential nitric oxide synthase inhibitors. *J Chin Chem Soc* **1998**, 45, (4), 549-53.
208. LINTON, B. R.; CARR, A. J.; ORNER, B. P.; HAMILTON, A. D.
A versatile one-pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates. *J Org Chem* **2000**, 65, (5), 1566-8.
209. MARTIN, N. I.; WOODWARD, J. J.; MARLETTA, M. A.
 N^{ω} -Hydroxyguanidines from primary amines. *Org Lett* **2006**, 8, (18), 4035-8.
210. MARTIN, N. I.; BEESON, W. T.; WOODWARD, J. J.; MARLETTA, M. A.
 N^{ω} -Aminoguanidines from primary amines and the preparation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem* **2008**, 51, (4), 924-31.
211. KISO, Y.; UKAWA, K.; AKITA, T.
Efficient removal of *N*-benzyloxycarbonyl group by a push-pull mechanism using thioanisole-trifluoroacetic acid, exemplified by a synthesis of Met-enkephalin. *J Chem Soc, Chem Comm* **1980**, (3), 101-102.
212. BERNATOWICZ, M. S.; MATSUEDA, G. R.
An improved synthesis of N^{ω} -allyl-L-arginine. *Synth Comm* **1993**, 23, (5), 657-61.
213. SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.
Efficient synthesis of optically pure N^{ω} -alkylated L-arginines. *Synthesis* **2008**, 15, 2391-7.
214. PINNER, A.
Die Imidoäther und ihre Derivate. Oppenheim: Berlin, **1892**.
215. SHRINER, R. L.; NEUMANN, F. W.
The chemistry of the amidines. *Chem Rev* **1944**, 35, 351-425.
216. BABU, B. R.; GRIFFITH, O. W.
 N^5 -(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **1998**, 273, (15), 8882-9.
217. BRETSCHER, L. E.; LI, H.; POULOS, T. L.; GRIFFITH, O. W.
Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N^5 -(iminoalkyl)- and N^5 -(iminoalkenyl)-ornithines. *J Biol Chem* **2003**, 278, (47), 46789-97.
218. HALLINAN, K. O.; CROUT, D. H. G.; ERRINGTON, W.
Simple synthesis of L- and D-vinylglycine (2-aminobut-3-enoic acid) and related amino acids. *J Chem Soc Perkin Trans I* **1994**, 24, 3537-43.
219. MUSCHICK, N.
Dissertation Kiel, in Vorbereitung.

220. TESTA, B.; MAYER, J. M.
Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. Chemistry, Biochemistry and Enzymology. Helvetica Chimica Acta: Zürich, **2003**; p 495-501.
221. JIRGENSONS, A.; KUMS, I.; KAUSS, V.; KALVINS, I.
A convenient reagent for *N*-hydroxyguanylation. *Synth Comm* **1997**, 27, (2), 315-22.
222. LEENDERS, R. G.; DAMEN, E. W.; BIJSTERVELD, E. J.; SCHEEREN, H. W.; HOUBA, P. H.; VAN DER MEULEN-MUILEMAN, I. H.; BOVEN, E.; HAISMA, H. J.
Novel anthracycline-spacer- β -glucuronide,- β -glucoside, and - β -galactoside prodrugs for application in selective chemotherapy. *Bioorg Med Chem* **1999**, 7, (8), 1597-610.
223. THOMAS, M.; RIVAULT, F.; TRANOY-OPALINSKI, I.; ROCHE, J.; GESSON, J. P.; PAPOT, S.
Synthesis and biological evaluation of the suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) β -glucuronide and β -galactoside for application in selective prodrug chemotherapy. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, (4), 983-6.
224. FERNANDEZ, C.; NIETO, O.; FONTENLA, J. A.; RIVAS, E.; DE CEBALLOS, M. L.; FERNANDEZ-MAYORALAS, A.
Synthesis of glycosyl derivatives as dopamine prodrugs: interaction with glucose carrier GLUT-1. *Org Biomol Chem* **2003**, 1, (5), 767-71.
225. MELISI, D.; SECONDO, A.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; RIMOLI, M. G.; MINALE, M.; DE CAPRARIIS, P.; ANNUNZIATO, L.
Galactosyl derivatives of L-arginine and D-arginine: synthesis, stability, cell permeation, and nitric oxide production in pituitary GH3 cells. *J Med Chem* **2006**, 49, (16), 4826-33.
226. WU, X.; TANG, X.; XIAN, M.; WANG, P. G.
Glycosylated diazeniumdiolates: a novel class of enzyme-activated nitric oxide donors. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, (23), 3779-82.
227. RENAUDET, O.; DUMY, P.
Expedient synthesis of aminoxyated-carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, (43), 7575-8.
228. TESTA, B.; MAYER, J. M.
Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. Chemistry, Biochemistry and Enzymology. Helvetica Chimica Acta: Zürich, **2003**; p 664-72.
229. TESTA, B.; MAYER, J. M.
Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. Chemistry, Biochemistry and Enzymology. Helvetica Chimica Acta: Zürich, **2003**; p 365-87.
230. BELZECKI, C.; TROJNAR, J.
Synthesis of cyclic derivatives of hydroxyguanidine. *Bull Acad Pol Sci Chem* **1970**, 18, (7), 379-83.

231. BELZECKI, C.; HINTZE, B.; KWIATKOWSKA, S.
Chemical properties of some hydroxyguanidines. *Bull Acad Pol Sci Chem* **1970**, 18, (10), 569-572.
232. BELZECKI, C.; HINTZE, B.; KWIATKOWSKA, S.
Synthesis of hydroxyguanidine and some of its properties. *Bull Acad Pol Sci Chem* **1970**, 18, (10), 573-6.
233. ZINNER, G.
Über *O*-acylierte Hydroximsäure-ester und ihre Spaltung zu unsubstituierten *O*-Acylhydroxylaminen. X. Mitteilung über Hydroxylamin-Derivate. *Arch Pharm (Weinheim)* **1960**, 293, (7), 657-61.
234. KETZ, E. U.; ZINNER, G.
Assignment of configurations of methyl *O*-acylacetohydroximates by determination of dipole moments (author's transl). *Arch Pharm (Weinheim)* **1978**, 311, (6), 525-9.
235. ZINNER, G.; NEBEL, G.; HITZE, M.
N-unsubstituted *O*-acyl-hydroxylamines. 41. Hydroxylamine derivatives. *Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges* **1970**, 303, (4), 317-20.
236. REHSE, K.; BADE, S.
New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, Part 16. 3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-ones as prodrugs for hydroxyguanidines. *Arch Pharm (Weinheim)* **1996**, 329, (12), 535-40.
237. BADE, S.
3-Amino- und 3-Arylazo-1,2,4-oxadiazol-5-one als neue NO-Donoren. *Dissertation* Berlin, **1996**.
238. TESTA, B.; MAYER, J. M.
Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. Chemistry, Biochemistry and Enzymology. Helvetica Chimica Acta: Zürich, **2003**; p 81-127.
239. GEORGE, B.; PAPADOPOULOS, E. P.
Heterocycles from *N*-ethoxycarbonylthioamides and dinucleophilic reagents. 1. Dihydro-1,2,4-triazolones and 1,2,4-oxadiazolones. *J Org Chem* **1976**, 41, (20), 3233-7.
240. KOCH, H.
Über die Einwirkung von Chloressigsäureäthyläther auf Benzenylamidoxim. *Ber Dtsch Chem Ges* **1889**, 22, 3161-3.
241. KRÜGER, P.
Über Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Ber Dtsch Chem Ges* **1885**, 18, 1053-60.
242. FELL, J. B.; COPPOLA, G. M.
A mild and efficient preparation of carbodiimides. *Synth Commun* **1995**, 25, (1), 43-7.

243. HRABAK, A.; BAJOR, T.; TEMESI, A.
Comparison of substrate and inhibitor specificity of arginase and nitric oxide (NO) synthase for arginine analogues and related compounds in murine and rat macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 198, (1), 206-12.
244. RECZKOWSKI, R. S.; ASH, D. E.
Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Arch Biochem Biophys* **1994**, 312, (1), 31-7.
245. GIL-AV, E.; TISHBEE, A.; HARE, P. E.
Resolution of underivatized amino acids by reversed-phase chromatography. *J Am Chem Soc* **1980**, 102, (15), 5115-7.
246. WAGNER, J.; GAGET, C.; HEINTZELMANN, B.; WOLF, E.
Resolution of the enantiomers of various α -substituted ornithine and lysine analogs by high-performance liquid chromatography with chiral eluant and by gas chromatography on Chirasil-Val. *Anal Biochem* **1987**, 164, (1), 102-16.
247. SHINBO, T.; YAMAGUCHI, T.; NISHIMURA, K.; SUGIURA, M.
Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings. *J Chromatogr* **1987**, 405, 145-53.
248. PETER, A.; LAZAR, L.; FULOP, F.; ARMSTRON, D. W.
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acids. *J Chromatogr A* **2001**, 926, (2), 229-38.
249. PAIK, W. K. P., K.P.; SANGDUK, K.
 δ -N-[methyl-14-C]arginine: a simplified preparation. *Anal Biochem* **1980**, 104, 343-6.
250. Shibuya, N.; YOSHINAGA, F.; KONISHI, S.; OKUMURA, S.
Production of L-ornithine by fermentation. *Patent* **1968**, JP 43010996
251. TESTA, B.; MAYER, J. M.
Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. Chemistry, Biochemistry and Enzymology. Helvetica Chimica Acta: Zürich, **2003**; p 3-8.
252. PERKINS, S. N.; HUSTEN, E. J.; EIPPER, B. A.
The 108-kDA peptidylglycine α -amidating monooxygenase precursor contains two separable enzymatic activities involved in peptide amidation. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**, 171, (3), 926-32.
253. KATO, I.; YONEKURA, H.; TAJIMA, M.; YANAGI, M.; YAMAMOTO, H.; OKAMOTO, H.
Two enzymes concerned in peptide hormone α -amidation are synthesized from a single mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**, 172, (1), 197-203.

254. WAND, G. S.; NEY, R. L.; BAYLIN, S.; EIPPER, B.; MAINS, R. E.
Characterization of a peptide α -amidation activity in human plasma and tissues. *Metabolism* **1985**, 34, (11), 1044-52.
255. PRIGGE, S. T.; KOLHEKAR, A. S.; EIPPER, B. A.; MAINS, R. E.; AMZEL, L. M.
Amidation of bioactive peptides: the structure of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase. *Science* **1997**, 278, (5341), 1300-5.
256. SIEBERT, X.; EIPPER, B. A.; MAINS, R. E.; PRIGGE, S. T.; BLACKBURN, N. J.; AMZEL, L. M.
The catalytic copper of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase also plays a critical structural role. *Biophys J* **2005**, 89, (5), 3312-9.
257. OWEN, T. C.; MERKLER, D. J.
A new proposal for the mechanism of glycine hydroxylation as catalyzed by peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase (PHM). *Med Hypotheses* **2004**, 62, (3), 392-400.
258. KOLHEKAR, A. S.; BELL, J.; SHIOZAKI, E. N.; JIN, L.; KEUTMANN, H. T.; HAND, T. A.; MAINS, R. E.; EIPPER, B. A.
Essential features of the catalytic core of peptidyl- α -hydroxyglycine α -amidating lyase. *Biochemistry* **2002**, 41, (41), 12384-94.
259. GUENGERICH, F. P.
Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **2001**, 14, (6), 611-50.
260. MERKLER, D. J.; KULATHILA, R.; TAMBURINI, P. P.; YOUNG, S. D.
Selective inactivation of the hydroxylase activity of bifunctional rat peptidylglycine α -amidating enzyme. *Arch Biochem Biophys* **1992**, 294, (2), 594-602.
261. DEBLASSIO, J. L.; DELONG, M. A.; GLUFKE, U.; KULATHILA, R.; MERKLER, K. A.; VEDERAS, J. C.; MERKLER, D. J.
Amidation of salicylic acid and gentisic acid: a possible role for peptidylglycine α -amidating monooxygenase in the metabolism of aspirin. *Arch Biochem Biophys* **2000**, 383, (1), 46-55.
262. KOTTHAUS, J.
Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Serinprotease Inhibitoren und ihren Amidoxim-Prodrugs. *Dissertation Kiel*, **2008**.
263. FRIEDRICH, S.
Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzyms. *Dissertation Kiel*, **2003**.
264. SZABO, G.; FISCHER, J.; KIS-VARGA, A.; GYIRES, K.
New celecoxib derivatives as anti-inflammatory agents. *J Med Chem* **2008**, 51, (1), 142-7.

265. HARTKE, K.; MUTSCHLER, E.
DAB 9 Kommentar. Govi-Verlag GmbH: Frankfurt, **1986**; Vol. 1.
266. BLOCK, R. J.; DURRUM, E. L.; ZWEIG, G.
A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. Academic Press Inc.: New York, **1955**.
267. BELYAEV, A. A.; KRASKO, E.V.
A novel synthetic route to N^6 -methyl-L-lysine and N^5 -methyl-L-ornithine via N^3 -protected (S)-3-aminolactams. *Synthesis* **1991**, 5, 417-9.
268. EXPOSITO, A.; FERNANDEZ-SUAREZ, M.; IGLESIAS, T.; MUNOZ, L.; RIGUERA, R.
Total synthesis and absolute configuration of minalemine A, a guanidine peptide from the marine tunicate *didemnum rodriguesi*. *J Org Chem* **2001**, 66, (12), 4206-13.
269. KLEIN, C. S., G.; STEGLICH, W.
Conversion of ω -guanidino- and ω -ureido- α -amino acids into α -keto acids and heterocycles derived therefrom. *Liebigs Ann Chem* **1983**, 1623-37.
270. KOMORI, Y.; WALLACE, G. C.; FUKUTO, J. M.
Inhibition of purified nitric oxide synthase from rat cerebellum and macrophage by L-arginine analogs. *Arch Biochem Biophys* **1994**, 315, (2), 213-8.
271. OLKEN, N. M.; MARLETTA, M. A.
 N^{ω} -Allyl- and N^{ω} -cyclopropyl-L-arginine: two novel inhibitors of macrophage nitric oxide synthase. *J Med Chem* **1992**, 35, (6), 1137-44.
272. UOHAMA, M.; TANI, Y.
Process for producing aminoxyacetic acid salts. *Patent* **1989**, EP 0306936A2.
273. ANKER, H. S.; CLARKE, H. T.
Organic Syntheses. Annual Volume 27 **1947**.
274. IMAI, T.; IMAI, K.
Process for production of O-substituted hydroxylamines. *Patent* **2005**, WO 2005023757
275. HAUSER, C. R.; RENFROW JR., W. B.
Organic Syntheses. Collective Volume 2. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1943**; Vol. 2.
276. SCHUMANN, E. L.; PAQUETTE, L. A.; HEINZELMAN, R. V.; WALLACH, D. P.; DAVANZO, J. P.; GREIG, M. E.
The synthesis and γ -aminobutyric acid transaminase inhibition of aminoxy acids and related compounds. *J Med Pharm Chem* **1962**, 91, 464-77.

277. WOULFE, S. R.; MILLER, M. J.
Synthesis and biological activity of substituted [[3(S)-(acylamino)-2-oxo-1-azetidinyloxy]acetic acids. A new class of heteroatom-activated beta-lactam antibiotics. *J Med Chem* **1985**, 28, (10), 1447-53.
278. UPJOHN CO.
Therapeutic compositions comprising α -aminoxy-alkanoic acids and derivatives thereof. *Patent* **1964**, GB 971164
279. ELOKDAH, H.; SULKOWSKI, T. S.; ABOU-GHARBA, M.; BUTERA, J. A.; CHAI, S. Y.; MCFARLANE, G. R.; MCKEAN, M. L.; BABIAK, J. L.; ADELMAN, S. J.; QUINET, E. M.
Design, synthesis, and biological evaluation of thio-containing compounds with serum HDL-cholesterol-elevating properties. *J Med Chem* **2004**, 47, (3), 681-95.
280. CAO, S.; TROPPER, F. D.
Stereoselective phase transfer catalyzed syntheses of glycosyloxysuccinimides and their transformations into glycoprobes. *Tetrahedron* **1995**, 51, (24), 6679-86.
281. HASLANGER, M. F.; KARANEWSKY, D. S.
Hydroxamates. *Patent* **1986**, US 4604407
282. FRANK, A. R., K.
Über einige Derivate der Aminoxyessigsäure. *Monatshefte für Chemie* **1961**, 92, 725-39.
283. GRÜNEWALD, S.
Dissertation Kiel, in Vorbereitung.

9 ANHANG

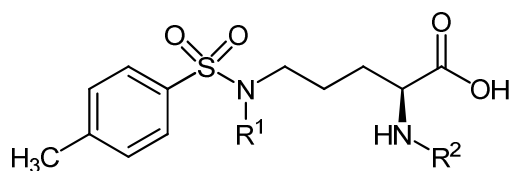
Abkürzungsverzeichnis

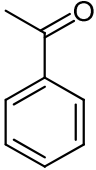

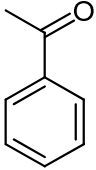
Ac	Acetyl-
ADMA	asymmetrisches N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonyl
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
Bn	Benzyl-
Bz	Benzoyl-
Cbz	Benzyloxycarbonyl-
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
clogP	berechneter Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
CYP450	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dec.	<i>decomposition</i>
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	vollständig deuteriertes Dimethylsulfoxid
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss)
Eoc	Ethoxycarbonyl-

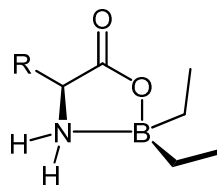
Et	Ethyl-
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
g	Gramm (mg = Milligramm)
gef.	gefunden
h	<i>hour(s)</i>
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>
IR	Infrarot
i. Vak.	im Vakuum
$k_{D(L)}$	Retentionsfaktor D-Enantiomer (L-Enantiomer)
K_i	Inhibitionskonstante (Dissoziationskonstante eines Inhibitors)
konz.	konzentriert
M	molar (mol/L; m = milli-, μ = micro-, n = nano-)
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
mL	Milliliter
mmol	Millimol
MS	Massenspektometrie
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
nm	Nanometer
NMMA	<i>N</i> ⁰ -Monomethyl-L-arginin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NOHA	<i>N</i> ⁰ -Hydroxy-L-arginin

NOS	NO-Synthase
<i>o</i> -PA	<i>ortho</i> -Phthalaldehyd
PAM	Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Wassertstoffionen-Konzentration)
ppm	<i>parts per million</i>
R _f	<i>ratio of front</i> , Retentionsfaktor (DC)
rpm	<i>rotation per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
<i>tert</i> , ^t	tertiär
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-1-yl-, Tetrahydropyran-yl-
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett
α	Separationsfaktor = $\frac{k_D}{k_L}$
δ /ppm	chemische Verschiebung in 10 ⁻⁶ der Resonanzfrequenz der Referenzverbindung
λ	Wellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
ν (cm ⁻¹)	Wellenzahl

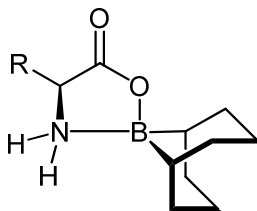
Strukturformelverzeichnis

 N^α - und N^δ -geschützte L-Ornithin-Derivate

Verbindung	Ziffer	R^1	R^2
N^δ -(<i>p</i> -Toluensulfonyl)-L-ornithin	15	-H	-H
N^α -Benzoyl- N^δ -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-L-ornithin	16	-H	
N^α -Benzoyl- N^δ -methyl- N^δ -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-L-ornithin	17		

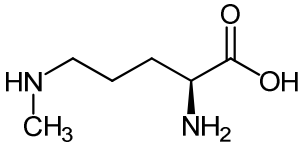
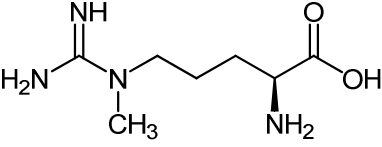
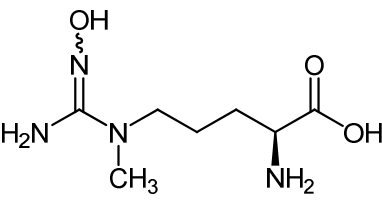
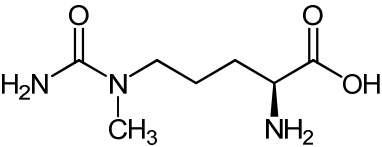
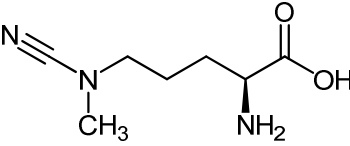
Diethylboryl-geschützte N^δ -Methyl-L-arginin-Derivate

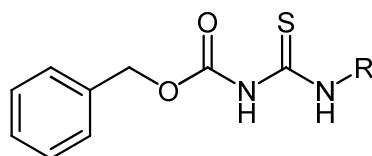
Verbindung	Ziffer	R
Diethyl[N^δ -methyl-L-ornithinato- <i>O,N</i>]borat	19	
Diethyl[$N^\omega, N^{\omega'}$ -bis(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- N^δ -methyl-L-argininato- <i>O,N</i>]borat	21	
Diethyl[N^δ -cyan- N^δ -methyl-L-ornithinato- <i>O,N</i>]borat	23	

9-BBN-geschützte N^δ -Methyl-L-arginin-Derivate

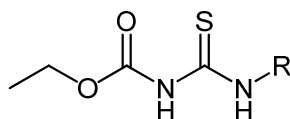
Verbindung	Ziffer	R
9-Borabicyclo[3.3.1]non-9-yl[N^δ -methyl-L-ornithinato- O,N]borat	20	
9-Borabicyclo[3.3.1]non-9-yl- [$N^\omega, N^{\omega'}$ -bis(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- N^δ -methyl-L-argininato- O,N]borat	22	
9-Borabicyclo[3.3.1]non-9-yl[N^δ -cyan- N^δ -methyl-L-ornithinato- O,N]borat	24	

N^{δ} -Methylierte L-Arginin-Derivate

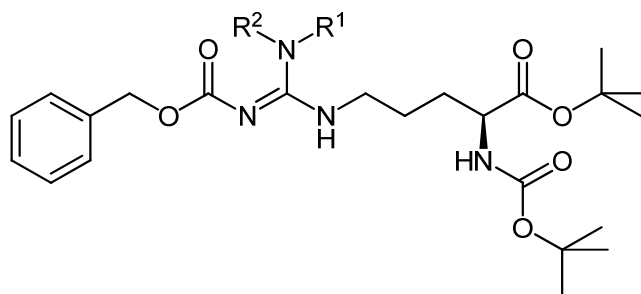
Verbindung	Ziffer	
N^{δ} -Methyl-L-ornithin	18	
N^{δ} -Methyl-L-arginin	1	
N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin	2	
N^{δ} -Methyl-L-citrullin	3	
N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin	4	

***N,N'*-Disubstituierte Thioharnstoffe**

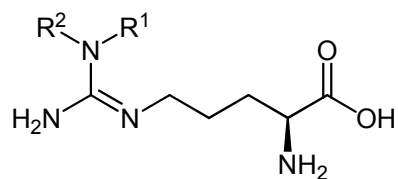
Verbindung	Ziffer	R
<i>N</i> ^ω -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^α -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-L-thiocitrullin- <i>t</i> -butylester	35	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)-thioharnstoff	39	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>N'</i> -benzylthioharnstoff	86	



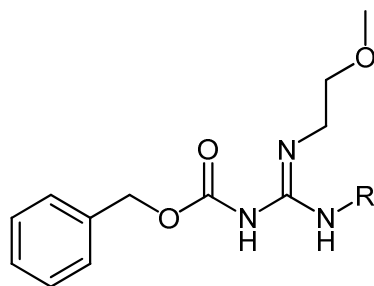
Verbindung	Ziffer	R
<i>N</i> ^α -(<i>t</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -ethoxycarbonyl-L-thiocitrullin- <i>t</i> -butylester	50	
<i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -ethoxycarbonylthioharnstoff	69	

Cbz-geschützte N^{ω} -Alkyl-L-arginine


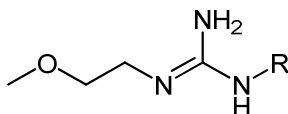
Verbindung	Ziffer	R ¹	R ²
N^{ω} -Benzyloxycarbonyl- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- $N^{\omega'}$ -(2-methoxyethyl)-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36b		-H
N^{ω} -Allyl- $N^{\omega'}$ -benzyloxycarbonyl- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36c		-H
N^{ω} -Benzyloxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(but-3-enyl)- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36d		-H
N^{ω} -Benzyloxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(but-3-enyl)- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36d		-H
N^{ω} -Benzyloxycarbonyl- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- $N^{\omega'}$ -propargyl-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36e		-H
N^{ω} -Benzyloxycarbonyl- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- $N^{\omega'}$ -(2-carbamoyl-ethyl)-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36f		-H
N^{δ} -{[(<i>N</i> -Benzyloxycarbonylamino-morpholino)-methyliden]}- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester	36g		
N^{δ} -{[(<i>N</i> -Benzyloxycarbonylamino-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)methyliden]}- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester	36h		
N^{ω} -Benzyloxycarbonyl- N^{α} -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- $N^{\omega',\omega'}$ -(2,2,2-trifluorethyl)-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36i		-H

***N*^ω-Alkyl-L-arginine**

Verbindung	Ziffer	R ¹	R ²
<i>N</i> ^ω -(2-Methoxyethyl)-L-arginin	37b		-H
<i>N</i> ^ω -Allyl-L-arginin	37c		-H
<i>N</i> ^ω -(But-3-enyl)-L-arginin	37d		-H
<i>N</i> ^ω -Propargyl-L-arginin	37e		-H
<i>N</i> ^ω -(2-Carbamoylethyl)-L-arginin	37f		-H
<i>N</i> ^δ -[(Aminomorpholino)methyliden]-L-ornithin	37g		
<i>N</i> ^δ -[(Amino-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin	37h		
<i>N</i> ^ω -(2,2,2-Trifluorethyl)-L-arginin	37i		-H

Cbz-geschützte *N*-(2-methoxyethyl)guanidine

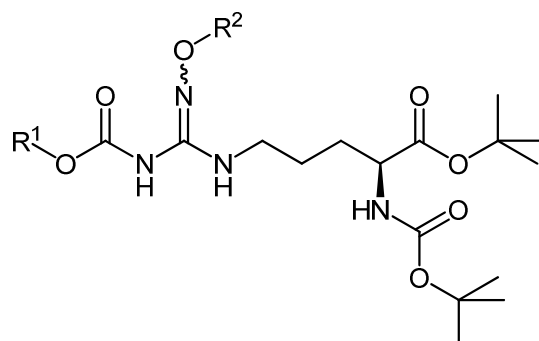
Verbindung	Ziffer	R
<i>N</i> -[4-(<i>O</i> -Benzyl)carboxybutyl]- <i>N'</i> -benzyloxycarbonyl- <i>N''</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	40a	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>N'</i> -[4-(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)aminobutyl]- <i>N''</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	40b	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)- <i>N''</i> -(<i>n</i> -pentyl)guanidin	40c	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)- <i>N''</i> -(3-methylbutyl)guanidin	40d	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>N'</i> -[2-(indol-3'-yl)ethyl]- <i>N''</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	40e	

N-(2-Methoxyethyl)guanidine

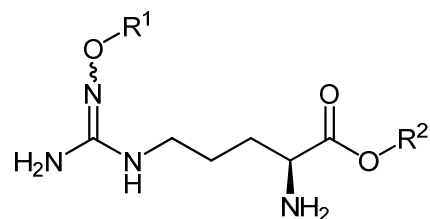
Verbindung	Ziffer	R
<i>N</i> -(4-Carboxybutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	41a	
<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	41b	
<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)- <i>N'</i> -(<i>n</i> -pentyl)guanidin	41c	
<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)- <i>N'</i> -(3-methylbutyl)guanidin	41d	
<i>N</i> -[2-(Indol-3'-yl)ethyl]- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	41e	

Amidin-basierte L-Arginin-Analoga

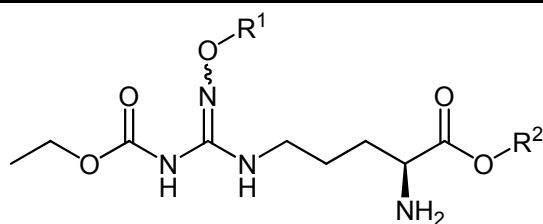
Verbindung	Ziffer
<i>N</i> -[4'-(<i>t</i> -Butyloxycarbonyl)-aminobutyl]but-3-enamidin	44
<i>N</i> -(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin	45

Geschützte Vorstufen *O*-alkylierter *N*^ω-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs


Verbindung	Ziffer	R ¹	R ²
<i>N</i> ^ω -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^α -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -methoxy-L-arginin- <i>t</i> -butylester	36a		
<i>N</i> ^α -(<i>t</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -ethoxycarbonyl- <i>N</i> ^ω -methoxy-L-arginin- <i>t</i> -butylester	51		
<i>N</i> ^ω -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^α -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -(methoxycarbonyl)methoxy-L-arginin- <i>t</i> -butylester	55		
<i>N</i> ^α -(<i>t</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -ethoxycarbonyl- <i>N</i> ^ω -(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin- <i>t</i> -butylester	57		

O-Alkylierte N^ω-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs

Verbindung	Ziffer	R ¹	R ²
N ^ω -Methoxy-L-arginin	37a		-H
N ^ω -Methoxy-L-arginin-ethylester	49		
N ^ω -Carboxymethoxy-L-arginin	56		-H

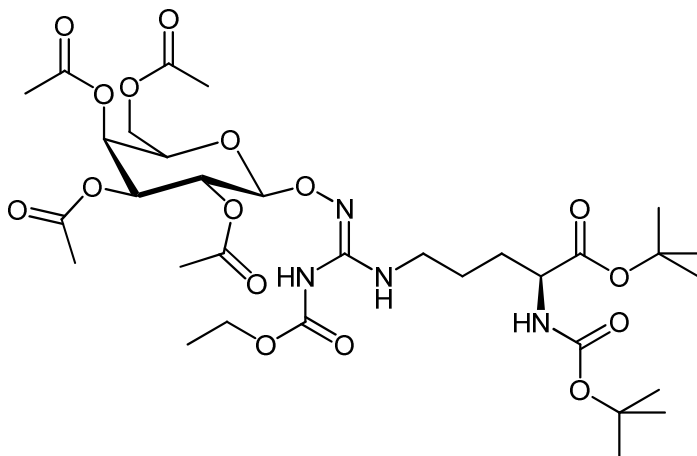


Verbindung	Ziffer	R ¹	R ²
N ^ω -Ethoxycarbonyl-N ^{ω'} -methoxy-L-arginin	52		-H
N ^ω -Ethoxycarbonyl-N ^{ω'} -methoxy-L-arginin-ethylester	53		
N ^ω -Ethoxycarbonyl-N ^{ω'} -(ethoxycarbonyl)-methoxy-L-arginin	58		-H
N ^ω -Ethoxycarbonyl-N ^{ω'} -(ethoxycarbonyl)-methoxy-L-arginin-ethylester	59		

O-Galactosyl-substituierte Hydroxyguanidine

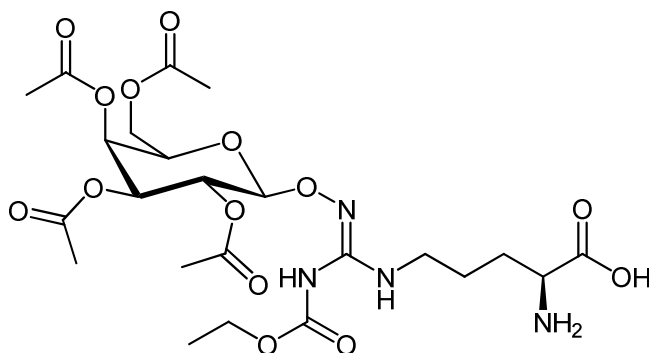
Verbindung

Ziffer



71

***N*^α-(*t*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-ethoxycarbonyl-*N*^{ω'}-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yl)oxy-L-arginin-*t*-butylester**

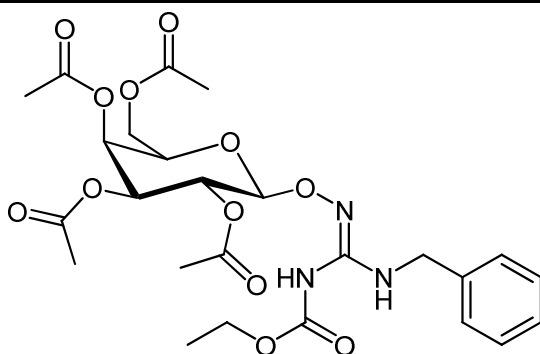


72

***N*^ω-Ethoxycarbonyl-*N*^{ω'}-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yl)oxy-L-arginin**

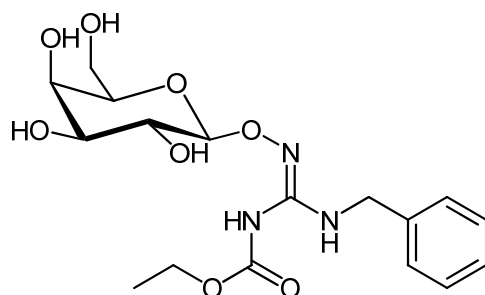
Verbindung

Ziffer



70

N-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yl)oxy]guanidin



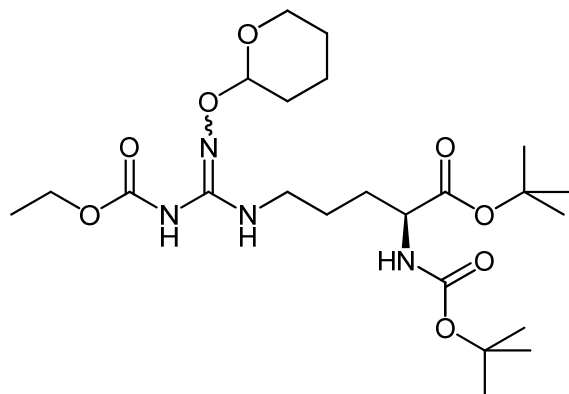
66

N-Benzyl- *N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[(β -D-galactopyranos-1-yl)oxy]guanidin

O-THP-geschützte N-Ethoxycarbonylhydroxyguanidine

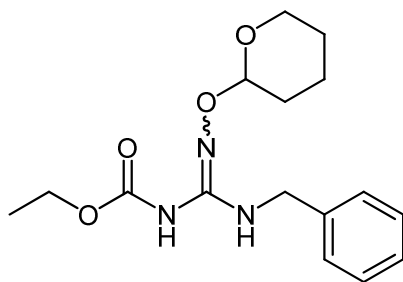
Verbindung

Ziffer



80

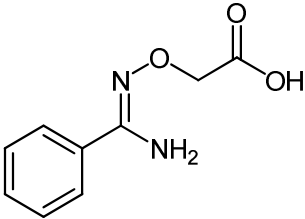
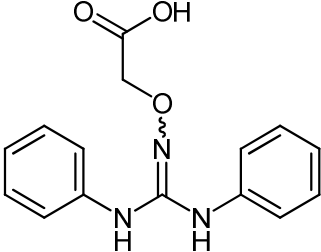
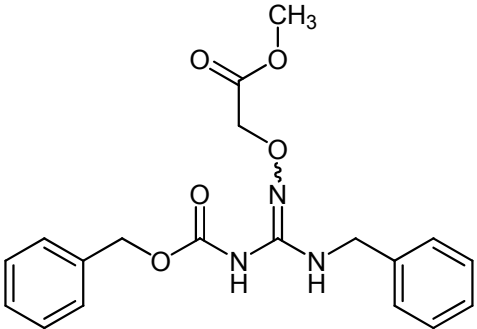
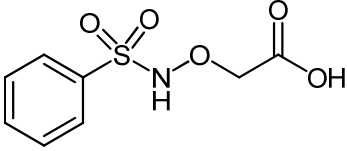
N^α-(*t*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-ethoxycarbonyl-
N^{ω'}-(tetrahydro-2*H*-pyran-1-yl)oxy-L-arginin-*t*-butylester



81

N-Benzyl-*N*¹-ethoxycarbonyl-*N*^{1'}-[(tetrahydro-2*H*-pyran-1-yl)oxy]guanidin

O-Carboxymethylierte Modellsubstanzen

Verbindung	Ziffer	
<i>O</i> -Carboxymethylbenzamidoxim	6	
<i>N</i> -Carboxymethoxy- <i>N'</i> , <i>N''</i> -diphenylguanidin	7	
<i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -(methoxycarbonyl)-methoxyguanidin	87	
<i>O</i> -Carboxymethylbenzulfhydroxamsäure	93	

Erklärung zu §10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Oktober 2008

Dennis Schade

Danksagung

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernd Clement sehr herzlich bedanken.

Jürke möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit in unserem gemeinsamen Projekt und die vielen Testungen der synthetisierten Verbindungen danken.

Herrn Dr. U. Girreser, Herrn Prof. Dr. D. Heber und Herrn HD Dr. T. Kunze danke ich für die zahlreichen Tipps und Diskussionen synthetischer und analytischer Problematiken. Dabei gilt Uli für die Durchführung der NMR-Experimente und Hilfestellungen bei der Auswertung spektroskopischer Daten ein besonderer Dank.

Melissa danke ich sehr herzlich für die überaus wertvolle Unterstützung bei den synthetischen Arbeiten.

Sven möchte ich für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik und seine ausgezeichnete Unterstützung bei technischen Problemen danken.

Ilka, Nikola und Joscha bin ich zu großem Dank verpflichtet, die vorliegende Arbeit so zügig und sorgfältig korrekturgelesen zu haben.

Bei Jürke und Lars möchte ich mich besonders für das stets heitere Arbeitsklima und die vielen lustigen Stunden im gemeinsamen Büro bedanken.

Bei Britta, Martin, Dirk, Jan, Jacek, Nadine, Julia, Hannes und Holger bedanke ich mich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 2. Semesters und die unterhaltsamen Stunden während der Praktikumszeiten.

Darüber hinaus möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Kollegen, besonders denen des Clement'schen Arbeitskreises, für die freundliche Zusammenarbeit und die tolle Atmosphäre bei der Arbeit danken.

Des Weiteren danke ich Joscha, Jürke, Andreas, Momme, Lars und Robert für die vielen gemeinsam bestrittenen Fussballabenteuer.

Kristina danke ich ganz besonders für die schönen gemeinsamen Jahre, die große Unterstützung und vor allem ihr Verständnis und ihre Ruhe, ohne die Vieles schwieriger gewesen wäre.

Mein letzter und innigster Dank gilt meiner Mutter und meinem Bruder, die immer an mich geglaubt und mich jederzeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dennis Schade
Geburtsdatum	19. September 1979
Geburtsort	Bremen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1985 bis 1989	Grundschule Oderstraße, Bremen
1989 bis 1995	Schulzentrum Butjadinger Straße, Bremen
1995 bis 1998	Schulzentrum Huckelriede, Bremen
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Jul. 1998 bis Jul. 1999	Altenheim AWO-Arbergen
-------------------------	------------------------

Studium

WS 1999 bis WS 2003	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jan. 2004 bis Jun. 2004	Pharmaziepraktikum bei Bayer HealthCare, West Haven, CT, USA
Jul. 2004 bis Dez. 2004	Pharmaziepraktikum in der Belvedere-Apotheke, Kiel
Februar 2005	Erteilung der Approbation als Apotheker

Promotion und Weiterbildung

seit April 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
Mai 2008	Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

Kurzfassung

Unter Berücksichtigung der mannigfaltigen Funktionen von Stickstoffmonoxid (NO) ist es nicht überraschend, dass eine Dysregulation endogener NO-Level zur Pathogenese vieler Erkrankungen beiträgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Konzepte verfolgt, neue Modulatoren des NO-generierenden Systems zu entwickeln.

Da N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) in ihrer (patho)physiologischen Bedeutung gut untersucht sind und von der Existenz des N^{δ} -Methyl-L-arginins in Hefezellen berichtet wurde, sollte dieses zusammen mit allen denkbaren Metaboliten aus der NO-Synthase (NOS)-Katalyse synthetisiert werden. Es wurde ein gemeinsamer Syntheseweg gefunden, der enantiomerenreines N^{δ} -Methyl-L-arginin, N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM), N^{δ} -Methyl-L-citrullin und N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin lieferte. Interessant ist die Arginase-Hemmung durch NHAM, die vergleichbar mit den besten bekannten Inhibitoren dieses Enzyms ist.

Für die Behandlung pathologisch hoher NO-Konzentrationen, wie sie bei neurodegenerativen und entzündlichen Erkrankungen vorkommen, stellt die Hemmung der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) eine therapeutische Option dar. Somit wurde eine Reihe N^{ω} -substituierter L-Arginine und einfacher Guanidine synthetisiert, die neue Erkenntnisse zu Struktur-Aktivitätsbeziehungen lieferten. Mit N -(4-Aminobutyl)- N' -(2-methoxyethyl)guanidin wurde ein neuer potenter und gegenüber NOSs selektiver DDAH-Inhibitor gefunden, der als Leitstruktur für eine weitere Erhöhung der Hemmwirkung genutzt werden kann.

Weiterhin wurden verschiedenartige Prodrugs von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin – dem natürlichen Intermediat der NOS-Katalyse – als potenzielle NO-Donoren bzw. Arginase-Hemmer synthetisiert. Durch das Prodrug-Design sollten die Arzneistoffqualitäten von NOHA hinsichtlich Stabilität und pharmakokinetischer Eigenschaften verbessert werden. In diesem Zusammenhang wurde ein neues Konzept der Bioaktivierung untersucht: Es konnte gezeigt werden, dass *O*-carboxymethylierte Amidoxim- und Hydroxyguanidin-Modellverbindungen effektiv durch die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase, die physiologischerweise *N*-carboxymethylierte (Glycin-verlängerte) Peptide *N*-desalkyliert, umgesetzt werden.

Abstract

Considering the versatile functions of nitric oxide (NO), it is not surprising that dysregulation of endogenous NO-levels contributes to the pathogenesis of various diseases. Within this work different concepts were pursued in order to modulate the NO-generating system.

While N^{ω},N^{ω} -dimethyl-L-arginine (ADMA) and N^{ω} -monomethyl-L-arginine (NMMA) are well characterized with respect to their (patho)physiological relevance, the existence of N^{δ} -methyl-L-arginine has only been reported in yeast cells. Thus, one common synthetic scheme was developed to afford optically pure N^{δ} -methyl-L-arginine besides N^{ω} -hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginine (NHAM), N^{δ} -methyl-L-citrulline und N^{δ} -cyano- N^{δ} -methyl-L-ornithine as possible metabolites of NO-synthase catalysis. Interestingly, NHAM turned out to be a selective arginase-inhibitor, comparably potent to the best inhibitors so far described.

Inhibition of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) is a therapeutic option for the treatment of pathologically high NO-concentrations which for instance can occur in neurodegenerative and inflammatory diseases. A series of N^{ω} -substituted L-arginines and simple guanidines were synthesized to gain new insights in structure-activity relationships of this enzyme. *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidine was found as a novel potent DDAH-inhibitor with selectivity over NOSs, and may serve as a lead for the development of even more potent compounds.

Furthermore, a number of different prodrugs of N^{ω} -hydroxy-L-arginine – the natural intermediate of NOS catalysis – were synthesized as potential NO-donors or arginase-inhibitors, respectively. The purpose was to design compounds with more drug-like properties regarding stability and pharmacokinetic profile. In this context a novel bioactivation concept was investigated. The peptidylglycine α -amidating monooxygenase physiologically catalyzes *N*-desalkylations of glycine-extended (*N*-carboxymethylated) peptides and was shown to be capable of metabolizing *O*-carboxymethylated model compounds of amidoximes and hydroxyguanidines.