

Entwicklung, Synthese und Charakterisierung makrozyklischer Plasmininhibitoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Simon Julian Arno Wiedemeyer, M. Sc.

aus Wittlich

Marburg, 2022

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum zwischen April 2018 und Februar 2022 unter der Leitung von Hr. Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am 17. August 2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Schlitzer

Tag der mündlichen Prüfung: 28. September 2022

Marburg 2022

Hochschulkennziffer 1180

Publikation

Koautorenschaft bei einem Übersichtsartikel:

„Fibrinolysis Inhibitors: Potential Drugs for the Treatment and Prevention of Bleeding”
Steinmetzer, T.; Pilgram, O.; Wenzel, B. M.; Wiedemeyer S. J. A. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*,
1445-1472.

Des Lebens Ruf an uns wird niemals enden...

(Hermann Hesse, *Stufen*)

Danksagung

Eine Promotion im naturwissenschaftlichen Bereich abzuschließen ist ohne das Zutun zahlreicher Wegbegleiter und lieb gewonnener Menschen kaum zu bewältigen, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

An erster Stelle ist mein Betreuer Prof. Dr. Torsten Steinmetzer zu nennen, der mir die Möglichkeit geboten hat, in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und fast jederzeit zur Diskussion fachlicher Fragen bereit war, wobei er mir mit einem beeindruckenden Fundus an Literaturkenntnissen und persönlichen Erfahrungen zur Seite stand.

Auch Prof. Martin Schlitzer und allen anderen Mitgliedern der Prüfungskommission gilt mein besonderer Dank, da sie sich die Zeit genommen haben, die vorliegende Dissertationsschrift zu bewerten und darüber hinaus meine Disputation zu ermöglichen.

Für die Bestimmung der Kristallstrukturen meiner Inhibitoren im Komplex mit Plasmin danke ich Dr. Jason Wu und Prof. Ruby Law von der Monash Universität in Melbourne, Australien.

Selbstverständlich sind auch die Mitarbeiter der Service-Abteilungen zu nennen, ohne die eine umfassende Charakterisierung der hergestellten Verbindungen nicht möglich gewesen wäre. Dr. Regina Ortmann und Stefan Newel danke ich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren und die Ratschläge zu deren Auswertung. Ein besonderer Dank gilt Nina Zitzer, die etliche Massenspektren flexibel und oft kurz vor Feierabend für mich gemessen hat und mir nicht selten in angenehmen Gesprächen bei der Lösung komplizierter Fragestellungen zur Seite stand. Frau Lins, Frau Schutte, Frau Buder und Fernanda Lorek danke ich für die Hilfe bei der Bewältigung der bürokratischen Angelegenheiten.

Einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag zum Gelingen dieser Promotion haben natürlich meine liebgewonnenen Kollegen aus der AG Steinmetzer geleistet, mit denen ich unsere Labore geteilt habe und tagtäglich nach Herzenslust herumblödeln konnte. Auch bei der Erarbeitung fachlicher Problemstellungen haben sie mir oft und gerne weitergeholfen und verständnisvoll zugehört, wenn etwas nicht so funktioniert hat wie es eigentlich sollte.

Niklas Braun, Simon Huber, Aline Keils, Tjard Köhler, Roman Lange, Heike Lang-Henkel, Sebastian Neumann, Oliver Pilgram, Luna Schmacke, Fabian Schneider, Thuy Van Lam van, Benjamin Wenzel, - ich danke Euch von Herzen für die schönen Gespräche, für euer stets offenes Ohr, eure Geduld mit meinen Marotten, eure *pep talks* und dass ihr all die Jahre für mich da wart. Bleibt genauso wie ihr seid, denn ihr seid die Besten!

Ein großes Extra-Dankeschön geht an Heike für ihre unermüdliche Hilfe bei den enzymkinetischen Messungen und für zahlreiche *pep talks* zur Bewältigung der damit verbundenen Probleme, die zahlreich waren.

Insbesondere Luna danke ich für den technischen *support* in Sachen *software*-Bedienung und auch für ihr allzeit offenes Ohr.

Ein ganz besonderer Dank geht an Oli, der in den letzten viereinhalb Jahren zu einem meiner besten Freunde geworden ist, meinen außergewöhnlichen Humor teilt, mir in allen möglichen und unmöglichen Situationen zur Seite steht und für mich da ist, wenn es mal wieder irgendwo brennt.

Meiner Familie danke ich für die bedingungslose Unterstützung während des langen Studiums und auch während der Promotionszeit. Auch ohne Euch wäre mein Dokortitel nicht möglich gewesen.

Milena, Du bist nun seit über drei Jahren ein Teil von mir und der wichtigste Mensch in meinem Leben. Danke dass ich immer auf Dich zählen kann, dass Du mir in schweren Stunden Halt gibst und meine schönen Stunden noch viel schöner machst. Zusammen können wir alles schaffen!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	vi
Abkürzungen	iv
Abbildungen	viii
Tabellen	x
Schemata	xi
1. Einleitung	1
1.1 Therapeutische Beeinflussung der Fibrinolyse.....	1
1.2. Trypsinartige Serinproteasen und Plasmin	2
1.2.1. Trypsinartige Serinproteasen	2
1.2.2. Plasmin.....	4
1.3. Plasmin/Antiplasmin-System	8
1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika.....	10
1.4.1. Liganden der Lysinbindestellen.....	10
1.4.2. Sonstige allosterische Inhibitoren.....	12
1.4.3. Liganden des aktiven Zentrums	12
2. Zielsetzung.....	26
2.1. Aufgabenstellung Teil A.....	26
2.2. Aufgabenstellung Teil B.....	28
3. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A).....	30
3.1. Synthesestrategien A - D.....	30
3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren	34
3.2.1. P3-P2-Makrozyklen mit symmetrischen Linkersegmenten	34
3.2.2. P3-P2-Makrozyklen mit asymmetrischen Linkersegmenten	44
3.2.3. P4-P2-Makrozyklen	50
3.3. Enzymkinetische Auswertung	53
3.3.1. Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten.....	54
3.3.2. Bestimmung der Hemmkonstanten	55
3.4. Charakterisierung der Inhibitoren.....	61
3.4.1. Inhibitorserie 1: K_i -Werte und Selektivität.....	61
3.4.2. Inhibitorserie 2: K_i -Werte und Selektivität.....	63
3.4.3. Kristallstrukturen	65
3.4.4. Inhibitorserie 3: Entwicklung der Strukturen und K_i -Werte.....	72

3.5. Diskussion (Teil A).....	75
4. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B).....	80
4.1. Inhibitorgrundstrukturen	80
4.2. Synthesestrategie E.....	80
4.3. Inhibitorsynthesen.....	82
4.4. Alternative Synthesestrategien	83
4.5. Hergestellte Inhibitoren	84
4.5.1. Strukturen der Inhibitorserie 4 (Verbindungen I9 - I27).....	84
4.5.2. Strukturen der Inhibitorserie 5 (Verbindungen I28 – I57).....	88
4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung	91
4.6.1. Entwicklung der makrozyklischen Startstruktur I9	91
4.6.2. K_i -Werte und Weiterentwicklung der Startstruktur (Inhibitorserien 4 und 5).....	94
4.6.3. Selektivität ausgewählter Inhibitoren der Serie 5.....	105
4.6.4. Kristallstruktur des Inhibitors I35	108
4.7. Diskussion (Teil B).....	110
5. Zusammenfassung	121
6. Material und Methoden.....	125
6.1 Allgemeines	125
6.2. Analytische HPLC.....	125
6.3. Präparative HPLC.....	126
6.4. Präparative MPLC	127
6.5. Lyophilisierung.....	127
6.6. Massenspektrometrie	127
6.7. NMR-Spektroskopie.....	127
6.8. Enzymkinetik	129
6.9. Röntgenkristallstrukturanalyse	131
6.10. Computermodelle	131
6.11. Mikrowellensynthesen	131
6.12. Anmerkungen zur Berechnung von Ansätzen und Ausbeuten	132
6.13. Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	132
6.13.1. Wässrige Aufarbeitung.....	132
6.13.2. Vorschrift A: Abspaltung von Boc-Gruppen.....	132
6.13.3. Vorschrift B: Hydrierung.....	132

6.13.4. Vorschrift C: Kupplung aktivierter Säurederivate	133
6.13.5. Vorschrift D: Fmoc-SPPS.....	133
6.13.6. Vorschrift E: Zyklisierung	135
6.13.7. Vorschrift F: Abspaltung von Tfa-Gruppen	135
6.14. Makrozyklische substrat analoge Inhibitoren (Teil A)	136
6.14.1. Linker-Segmente	136
6.14.2. Inhibitoren I1-I3.....	142
6.14.3. Inhibitoren I4-I6.....	157
6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138.....	168
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)	182
6.15.1. Nomenklatur und häufig verwendete Abkürzungen	182
6.15.2. Geschützte Txa-Derivate	183
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate	185
6.15.4. Fmoc-geschützte P2'-Bausteine	195
6.15.5. Linkersegmente	197
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)	202
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)	223
Referenzen.....	257
Summary in English	I
Verbindungen.....	III
Erklärung.....	V
Lebenslauf.....	VI

Abkürzungen

Aminosäuren wurden nach den Empfehlungen der *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) und des *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) mit dem Drei-Buchstaben-Code abgekürzt. Falls nicht anders angegeben, liegen alle genannten Aminosäuren in der L-Konfiguration vor. Bei der Beschreibung von Enzymen und Inhibitoren wird die Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER benutzt.¹

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)
Ac	Acetyl
Aca	ε-Aminocapronyl bzw. 6-Aminohexanoyl
AcOH	Essigsäure
aEt	Aminoethyl
βAla	β-Alanin
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
aMePhac	4-Aminomethylphenylacetyl
aNap	6-Amino-2-naphtoyl
aPC	aktiviertes Protein C
aPhac	Aminophenylacetyl
aq.	wässrig
AS	Aminosäure
Ava	5-Aminovaleryl bzw. 5-Aminopentanoyl
BK	Bradykinin
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
Bpa	Biphenylalanin
B ₂ pin ₂	Bis(pinakolato)diboron
But	Butanoyl
c[...]	Darstellung der Makrozyklisierung
Cbz	Benzyloxycarbonyl

CbzCl	Benzyloxycarbonylchlorid
CbzOSu	N-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimid
Cy	Cyclohexan
DCM	Dichlormethan
DEE	Diethylether
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
D _D Phe(4-NO ₂)	D-4-Nitrophenylalanin
EA	Ethylacetat
EI-Komplex	Enzym-Inhibitor-Komplex
eq.	Äquivalente
FIIa	Gerinnungsfaktor IIa, Thrombin
FXa	Gerinnungsfaktor Xa
FXIa	Gerinnungsfaktor XIa
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FmocCl	Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
FS	Feststoff
Gaba	γ-Aminobutyryl bzw. 4-Aminobutyryl
ges.	gesättigt
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hPhe	Homophenylalanin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IBCF	Chlorameisensäureisobutylester
Ipa	Isopropylamid
LM	Lösungsmittel
Lsg.	Lösung
<i>m</i>	<i>meta</i>

M	molar (Mol/L)
μ	Mikro
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeO	Methoxy
MeOH	Methanol
Mes	Methylsulfonyl
MI	Marburg-Inhibitor
MS	Massenspektrometrie
NEt ₃	Triethylamin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OBn	Benzylester
<i>p</i>	<i>para</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid
Pha	Phenylamid
Phs	Phenylsulfonyl
PhsCl	Phenylsulfonylchlorid
Piz	Piperazinyl
PK	Plasmakallikrein
Plm	Plasmin
Plg	Plasminogen
PPH	postpartale Blutungen, postpartum Hämorrhagie
Prop	Propanoyl
PTFE	Polytetrafluorethylen
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RS	Rückstand
RT	Raumtemperatur
<i>sc</i>	<i>single-chain</i>
SI	Selektivitätsindex

SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>tc</i>	<i>two-chain</i>
TFA	Trifluoressigsäure
Tfa	Trifluoracetyl
Tfa ₂ O	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
Tos	Tosyl
tPa	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXA	Tranexamsäure
Txa	Tranexamoyl
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
Xda	Xylylendiamin

Abbildungen

Abbildung 1: <i>Cartoon</i> -Darstellung des Trypsins.....	3
Abbildung 2: Struktur des humanen Plasminogens.	5
Abbildung 3: Aktives Zentrum des Plasmins.....	7
Abbildung 4: Funktion und Regulation des Plasmins.....	8
Abbildung 5: LBS-Liganden: Lys-Analoga, Verbindungen 2 - 5.	11
Abbildung 6: LBS-Liganden: Verbindungen 6 - 8.....	12
Abbildung 7: Entwicklung Txa-verknüpfter Plasmininhibitoren: Verbindungen 9 - 14.....	14
Abbildung 8: Kristallstrukturen: Inhibitoren 1, 11 und 12 in μ Plm.	15
Abbildung 9: Txa-verknüpfte Plasmininhibitoren: Verbindungen 15 - 19.....	17
Abbildung 10: Inhibitoren mit C-terminalem 4-Amba-Rest: Verbindungen 20 - 26.	18
Abbildung 11: Makrozyklische Inhibitoren: Verbindungen 27 - 31.....	20
Abbildung 12: Kristallstruktur: Verbindung 32 im Komplex mit Trypsin.	22
Abbildung 13: Verbesserte makrozyklische Inhibitoren: Verbindungen 32 - 44.....	23
Abbildung 14: Weitere Plasminhemmstoffe: Verbindungen 45 - 49.	24
Abbildung 15: Strukturvariationen des Plasmininhibitors 40.	27
Abbildung 16: Kristallstrukturen: Referenzinhibitoren 40 und 11 im Komplex mit μ Plm.....	28
Abbildung 17: Grundstruktur der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren.....	29
Abbildung 18: Bestimmung der kinetischen Konstanten V_{max} und K_M	54
Abbildung 19: Progresskurven mit initialer Krümmung: klassische Auswertung.....	55
Abbildung 20: Bestimmung der Hemmkonstanten.....	56
Abbildung 21: Progresskurven mit initialer Krümmung: <i>slow binding</i> -Auswertung.	60
Abbildung 22: Kristallstrukturen: Inhibitoren 40, I1, I4 und I5 im Komplex mit μ Plm.....	65
Abbildung 23: Kristallstruktur: Verbindung 40 im Komplex mit μ Plm.....	67
Abbildung 24: Kristallstruktur: Verbindung I1 im Komplex mit μ Plm.....	68
Abbildung 25: Kristallstruktur: Verbindung I4 im Komplex mit μ Plm.....	69
Abbildung 26: Kristallstruktur: Verbindung I5 im Komplex mit μ Plm.....	71
Abbildung 27: Thrombin- bzw. Plm-Inhibitoren: Verbindungen 139, 140 bzw. 40.....	73
Abbildung 28: Computermodell: Inhibitor I8 in μ Plm.	73
Abbildung 29: Strukturen und K_i -Werte: Inhibitoren I7 und I8 (Serie 3).	74
Abbildung 30: Bindungsmodi: Makrozyklische Inhibitoren in μ Plm und Trypsin.	78
Abbildung 31: P4-P2-Makrozyklen: Möglichkeiten zur Strukturoptimierung.	79
Abbildung 32: Grundstrukturen der Inhibitorserien 4 und 5.....	80
Abbildung 33: Txa-konjugierte Referenzinhibitoren: Verbindungen 11, 12 und 15.....	92
Abbildung 34: Entwicklung des Inhibitors I9 als Startstruktur der Serie 4.....	93
Abbildung 35: Modellierter Bindungsmodus: Inhibitor I26.....	96

Abbildung 36: Strukturen und Plm-Hemmwirkungen: Verbindungen I22 und I27.	97
Abbildung 37: Modellierter Bindungsmodus: Referenzinhibitor 15.	98
Abbildung 38: Entwicklung des Inhibitors I28 als Startstruktur der Serie 5.	99
Abbildung 39: Strukturen und K_i -Werte: Verbindungen I35, I56 und I57.	104
Abbildung 40: Kristallstruktur: Inhibitor I35 im Komplex mit μ Plm.	109
Abbildung 41: Entwicklung des Inhibitors I26.	111
Abbildung 42: Entwicklung des Inhibitors I38.	112
Abbildung 43: Kristallstrukturen: Inhibitoren I35 und 40 im Komplex mit μ Plm.	113
Abbildung 44: Adressierung der S3'- <i>subsite</i>	114
Abbildung 45: Inhibitoren mit verbesserter Löslichkeit.	115
Abbildung 46: Variation des P2'-Restes.	116
Abbildung 47: Selektivitätsvergleich: ausgewählte Inhibitoren der Serie 5.	118
Abbildung 48: Selektivitätsvergleich: Inhibitoren 40 und I38.	119
Abbildung 49: Mögliche Wirkungen des Inhibitors I38.	120
Abbildung 50: Strukturen und Hemmkonstanten: Inhibitoren 40 - 44 und I1 - I8.	122
Abbildung 51: Grundstrukturen und beste Inhibitoren der Serien 4 und 5.	124
Abbildung 52: Strukturen und Benennung ausgewählter Verbindungen des Teils B.	182
Abbildung 53: Separat synthetisierte Linkersegmente: Verbindungen 187 - 189.	197

Tabellen

Tabelle 1: Gleichungen: <i>slow binding</i> -Auswertung.	59
Tabelle 2: Hemmung trypsinartiger Serinproteasen: Inhibitoren der Serie 1.	62
Tabelle 3: Hemmung trypsinartiger Serinproteasen: Inhibitoren der Serie 2.	64
Tabelle 4: Strukturen und Ausbeuten: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 4.....	84
Tabelle 5: Strukturen und Ausbeuten: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 5.....	88
Tabelle 6: Plm-Hemmung: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 4.	95
Tabelle 7: Plm-Hemmung: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 5.	100
Tabelle 8: Selektivitätsbestimmung: Ausgewählte makrozyklische Inhibitoren der Serie 5.	106
Tabelle 9: Selektivitätsbestimmung: Azyklische Inhibitoren der Serie 5.	107
Tabelle 10: Verwendete Enzyme und Substrate.	129
Tabelle 11: Gleichungen: Enzymkinetische Charakterisierung der Inhibitoren.	130

Schemata

Schema 1: Bisher verwendete Synthesestrategien.....	30
Schema 2: Synthesestrategie A: Unselektiver Einbau asymmetrischer Linkersegmente.	32
Schema 3: Synthesestrategie D: Selektiver Einbau asymmetrischer Linkersegmente.....	33
Schema 4: Überblick zur Synthese der Inhibitoren I1 - I3 mit symmetrischen Linkern.	35
Schema 5: Synthese des symmetrisch dialkylierten Piperazin-Derivats 87.....	36
Schema 6: Die symmetrisch dialkylierten Piperazin-Derivate 87 - 89.	37
Schema 7: Synthese der geschützten P1-Bausteine 64 und 66.	38
Schema 8: Synthese der P2-P1-Segmente 66 und 70.	39
Schema 9: Synthese der P4-P3-Bausteine 75 - 77.....	40
Schema 10: Synthese der azyklischen P4-P1-Segmente 81 - 83.....	41
Schema 11: Finale Schritte zur Synthese der makrozyklischen Inhibitoren I1 - I3.	42
Schema 12: Überblick zur Synthese der Inhibitoren I4 - I6 mit asymmetrischen Linkern.	44
Schema 13: Synthese der monogeschützten Linkerbausteine 107a-e.....	45
Schema 14: Besonderheiten bei der Synthese asymmetrischer Linkersegmente.	46
Schema 15: Synthese der P2-P1-Segmente 109 - 111.	47
Schema 16: Synthese der P4-P1-Segmente 115 - 117.	47
Schema 17: Synthese der Inhibitoren I4 - I6.....	48
Schema 18: Modifizierte Synthesestrategien zur Herstellung von P4-P2-Makrozyklen.....	50
Schema 19: Synthese der P4-P2-Makrozyklen I7 und I8.....	51
Schema 20: Syntheseversuche zu den Verbindungen 137 und 138.....	52
Schema 21: <i>Slow binding</i> -Hemmung nach Mechanismus A.....	57
Schema 22: <i>Slow binding</i> -Hemmung nach Mechanismus B.	58
Schema 23: Synthesestrategie E: Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren.....	81
Schema 24: Synthese des Inhibitors I42 gemäß der Strategie E.	82
Schema 25: Synthese des azyklischen Inhibitors I27.	86
Schema 26: Synthese der azyklischen Inhibitoren I56 und I57.	90
Schema 27: Synthese der Fmoc-geschützten Biphenylalanin-Derivate 166, 172 und 176..	187
Schema 28: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung des Inhibitors I24.....	218
Schema 29: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung des Inhibitors I31.....	226
Schema 30: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung der Inhibitoren I39 und I40.	236
Schema 31: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung des Inhibitors I45.....	242

1. Einleitung

1.1 Therapeutische Beeinflussung der Fibrinolyse

Die überlebenswichtige Fähigkeit des menschlichen Körpers, Blutungen binnen kurzer Zeit zu stillen und dabei die Entstehung lebensbedrohlicher Thromben zu vermeiden, basiert auf einem komplexen Zusammenspiel gegenläufiger physiologischer Prozesse. Während die Hämostase den schnellen Verschluss verletzter Blutgefäße durch Gerinnsel ermöglicht, verhindert das fibrinolytische System die Thrombusbildung in nicht betroffenen Bereichen. Im Rahmen der Hämostase wird das im Blutkreislauf zirkulierende lösliche Protein Fibrinogen in unlösliches Fibrin überführt. Dieses aggregiert daraufhin zu größeren Gerinnseln, wodurch der Verschluss verletzter Blutgefäße ermöglicht und der Blutverlust verringert wird.² Um eine unkontrollierte Thrombusbildung zu vermeiden, werden Fibrinpolymere im Rahmen der Fibrinolyse zu löslichen Fragmenten abgebaut. Dieser Prozess wird durch die trypsinartige Serinprotease Plasmin (Plm) katalysiert, die daher auch als Gegenspielerin der Gerinnungskaskade angesehen wird.³ Zwischen der Fibrinolyse und der Hämostase besteht ein streng reguliertes Gleichgewicht. Beide Prozesse beinhalten die kaskadenartige Aktivierung trypsinartiger Serinproteasen, deren Aktivität durch *feedback*-Mechanismen und endogene Inhibitoren beeinflusst wird. Ein Ungleichgewicht zwischen diesen Systemen kann zu lebensbedrohlichen Zuständen wie Gefäßverschlüssen oder starken Blutungen führen, z. B. infolge hyperfibrinolytischer Zustände.^{4,5} Therapeutisch können die beiden gegenläufigen Prozesse durch die Verabreichung von Antikoagulanzen oder Hämostatika (z. B. Antifibrinolytika zur Verringerung der Plm-Aktivität) beeinflusst werden.

Im Bereich der Antikoagulanzen wurde in den letzten Jahren neue oral verfügbare Arzneistoffe entwickelt (*direct oral anticoagulants*, DOAC), zu denen unter anderem die Faktor Xa-Inhibitoren Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban und Betrixaban sowie das Thrombininhibitor-*prodrug* Dabigatranetexilat gehören.^{2,6} Durch eine Kombination mit Thrombozytenaggregationshemmern ist inzwischen eine verlässliche Kontrolle der Koagulation möglich. Seit einiger Zeit sind auch Antidote der DOAC verfügbar, die in Akutsituationen verabreicht werden können; dies sind der Dabigatran Antikörper Idarucizumab (PRAXBIND)⁷ und die proteolytisch inaktive FX-Variante Andexxanet alpha (Ondexxya).⁸ Im starken Kontrast zu diesen Neuentwicklungen gibt es aktuell nur sehr wenige klinisch zugelassene Antifibrinolytika,² zu deren wichtigsten Anwendungsgebieten die Verringerung des Blutverlustes bei chirurgischen Eingriffen und nach schweren Traumata gehört. Da die verfügbaren Wirkstoffe schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen können, ist die im Rahmen dieser Promotion angestrebte Entwicklung neuer Plasmininhibitoren von hoher Relevanz.

1.2. Trypsinartige Serinproteasen und Plasmin

1.2.1. Trypsinartige Serinproteasen

Etwa 2 - 4 % aller bekannten Gene codieren proteolytische Enzyme.⁹ In der MEROPS-Datenbank werden Proteasen in einem hierarchischen Klassifizierungssystem nach statistisch signifikanten Strukturmerkmalen geordnet.^{10,11} Anhand besonderer Identifizierungsmerkmale wird zwischen unterschiedlichen Proteasespezies unterschieden, die jeweils in verschiedene Familien und Clans unterteilt sind. Innerhalb der Clans wird nach Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur sortiert, während die Familienmitglieder verwandte Primärstrukturen aufweisen. Bei den Sequenzanalysen wird insbesondere jener Teil der Protease berücksichtigt, der für die proteolytische Aktivität verantwortlich ist.¹¹ Dieser Sequenzabschnitt wird als Proteasedomäne bzw. als *peptidase unit* bezeichnet und umfasst alle primären Substratbindungsstellen sowie die katalytisch aktiven Aminosäurereste.¹¹

Mehr als ein Drittel der über 1.1 Millionen hinterlegten Sequenzen in der MEROPS-Datenbank sind Serinproteasen, die an wichtigen physiologischen Prozessen wie der Verdauung, der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Befruchtung von Eizellen, der Apoptose und der Immunität gegenüber Pathogenen beteiligt sind (421.584 Sequenzen, Stand: 02. Juni 2022).^{9,11} Ihre Katalysemechanismen beinhalten den Angriff eines nucleophil aktivierten, konservierten Serin-Restes auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung.^{12,13} In der MEROPS-Datenbank werden die Serinproteasen in 15 Clans und 54 Familien unterteilt (Stand: 2. Juni 2022).¹¹ Dabei wurde für jede Familie und jeden Clan eine besonders gut charakterisierte, oft namensgebende Protease ausgewählt, die als *holotype* bezeichnet wird. Alle Mitglieder einer Familie oder eines Clans weisen statistisch signifikante Ähnlichkeiten mit ihren *holotypes* auf.¹¹

Die umfangreichste Proteasegruppe ist der 13 Familien umfassende PA-Clan, dessen größte Familie die chymotrypsinartigen Serinproteasen sind (Familie S1, 70.933 Sequenzen, Stand: 2. Juni 2022).^{11,14} Eine Untergruppe der Familie S1 sind die trypsinartigen Serinproteasen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden mehrere Kristallstrukturen von Serinproteasen beschrieben, in denen die Aminosäurereste zur besseren Vergleichbarkeit gemäß der *holotype*-Sequenz des Chymotrypsinogens nummeriert werden.¹⁵ Bei Plm-Strukturen wird in Klammern zusätzlich die Nummerierung der Plasminogen (Plg)-Volllängensequenz genannt. Die Bezeichnungen von Bindetaschen und Inhibitorbausteinen erfolgen nach SCHECHTER und BERGER.¹ Polare Wechselwirkungen mit Abständen ≤ 3.5 Å werden als gestrichelte, schwarze Linien und Wassermoleküle als rote Sphären dargestellt. Rot, blau bzw. gelb eingefärbte Atome kennzeichnen Sauerstoff (O), Stickstoff (N) bzw. Schwefel (S).

1.2. Trypsinartige Serinproteasen und Plasmin

Als namensgebendes Enzym der trypsinartigen Serinproteasen wird in der **Abbildung 1** die Kristallstruktur des Trypsins gezeigt. Die typische Proteinfaltung enthält zwei konservierte β -Fass-Motive, die eine Fixierung der katalytischen Triade aus Ser195, His57 und Asp102 ermöglichen.^{15–17} Chymotrypsinartige Proteasen spalten ihre peptidischen Substrate hinter großen, hydrophoben P1-Resten wie Phe, Trp oder Tyr, während trypsinartige Peptidasen trotz einer analogen Faltung ausschließlich basische P1-Aminosäuren wie Lys oder Arg akzeptieren. Für deren Erkennung ist der am Boden der S1-Tasche befindliche, konservierte Rest Asp189 verantwortlich, der eine ionische Wechselwirkung mit der P1-Aminosäure ausbildet und somit zur Substratspezifität beiträgt.⁹ In vielen Fällen sind N-terminal zur Proteasedomäne zusätzliche, regulatorisch wirkende Untereinheiten vorhanden, die unterschiedliche Funktionen ausüben und in der Regel durch Disulfidbrückenbindungen mit der Proteasedomäne verbunden sind.⁹ Diese Untereinheiten können zum Beispiel die Kolokalisation der Proteasen mit ihren Targets und Aktivatoren vermitteln, wodurch einerseits die katalytische Effizienz erhöht und andererseits die Proteaseaktivität streng auf den konkreten Wirkungsort beschränkt wird.¹⁸ Zudem wird dadurch die Substratselektivität der Peptidasen gesteigert. Die meisten trypsinartigen Serinproteasen liegen im Blutplasma als inaktive Proenzyme oder Zymogene vor und können durch eine proteolytische Prozessierung aktiviert werden.^{18,19} Diese bewirkt Konformationsänderungen, infolge derer die korrekte Ausbildung der aktiven Zentren ermöglicht wird.^{20,21}

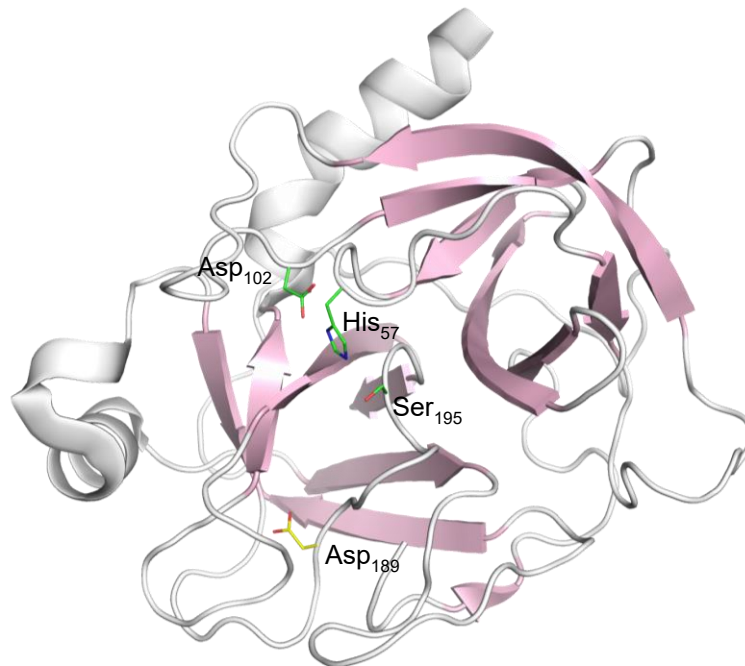


Abbildung 1: Cartoon-Darstellung des Trypsins. Die Struktur des namensgebenden Enzyms der trypsinartigen Serinproteasen wird in weiß dargestellt (PDB: 2PTN).²⁰ Die Reste der katalytischen Triade (grüne C-Atome) liegen zwischen den beiden charakteristischen β -barrel-Strukturen (rosa). Am Boden der S1-Tasche befindet sich der konservierte Rest Asp189 (gelbe C-Atome), der für die P1-Substratspezifität verantwortlich ist.⁹

1.2.2. Plasmin

Plm ist eine trypsinartige Serinprotease, die in der MEROPS-Datenbank unter der Nummer S01.233 hinterlegt ist.¹¹ Der Genlocus befindet sich auf dem Chromosom 6q26-6q27 und enthält 52.5 kbp mit 19 Exonen (Länge: 75 - 387 bp).²²⁻²⁴ Das einzelsträngige Glycoprotein besteht aus sieben Domänen und wird primär in der Leber als inaktives Zymogen (Plg) exprimiert.¹⁸ Nach der Abspaltung eines aus 19 Resten bestehenden Signalpeptids im Rahmen des Sekretionsprozesses enthält das reife Plg 791 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 90 kDa.²² Es zirkuliert im Blutkreislauf in einer geschlossenen aktivierungsresistenten Form, die teilweise in Assoziation mit dem *histidine-rich glycoprotein* (HRG) vorliegt.²⁵ Das HRG kann an verletzte Bereiche der Blutgefäße binden und scheint dabei als Rezeptor für die Immobilisierung des Plg zu wirken.²⁶ Die Plasmakonzentration des Enzyms liegt bei etwa 1.1 - 2.2 µM bzw. 100 - 200 mg/L.^{18,27,28}

Aktives Plm spaltet seine Substrate bevorzugt hinter basischen Aminosäuren (Lys / Arg)²⁹ und verfügt über ein sehr breites Substratspektrum, das unter anderem Fibrin(ogen),²⁷ die Gerinnungsfaktoren V, VIII und X^{30,31}, den VON-WILLEBRAND-Faktor (VWF)^{32,33}, Bestandteile der extrazellulären Matrix sowie zahlreiche weitere Proteine²⁷ umfasst.

Plm ist an wichtigen, physiologischen Prozessen wie z. B. Zell-Migration,³⁴ Wundheilung,^{35,36} Entzündungsreaktionen,^{37,38} Embryogenese,^{39,40} Umstrukturierung von Geweben,⁴¹ sowie der Immunität⁴² beteiligt.²⁷ Defekte oder Mutationen des Plg-Gens werden mit einer erhöhten Thromboseneigung (Thrombophilie),⁴³ Hypoplasminogenämie (HPG, Typ 1 Plg Defizienz)¹⁸ sowie einer verlangsamten Wundheilung⁴⁴ in Verbindung gebracht. Eine bedeutende physiologische Funktion des Plm ist der Abbau von Fibringerinnseln (Fibrinolyse), die im Rahmen der Hämostase einen effizienten Verschluss verletzter Blutgefäße ermöglichen. Durch die Lyse von Fibrinaggregaten im Blutkreislauf trägt es ferner zur Vermeidung der Thrombusbildung bei. Bei hyperfibrinolytischen Zuständen stört eine erhöhte Plm-Aktivität jedoch die Hämostase und geht bei Verletzungen oder chirurgischen Eingriffen mit einem gesteigerten Blutverlust einher. Daher können antifibrinolytisch wirkende Arzneistoffe die Stillung starker Blutungen unterstützen und den Bedarf an Blutkonserven im klinischen Rahmen verringern.^{2,27,45} Es wird vermutet, dass eine zelluläre Aufnahme von Fibrin-Abbauprodukten die Apoptose betroffener Zellen auslösen kann, wodurch sowohl die Wundheilung als auch die Geweberemodellierung beeinflusst werden.^{27,46}

Die Struktur des inaktiven Plg (**Abbildung 2A**) besteht aus sieben Domänen: einer N-terminalen *pan apple* (PAN)-Domäne,⁴⁷ fünf durch Disulfidbrückenbindungen stabilisierten Kringeldomänen⁴⁸ und der Proteasedomäne⁴⁹ mit der katalytischen Triade aus His57(603), Asp102(646) und Ser195(741). Vier der fünf Kringeldomänen enthalten funktionale Lys-Bindestellen (LBS), die aus einem typischen Asp-X-Asp/Glu-Motiv (X: hydrophobe

1.2. Trypsinartige Serinproteasen und Plasmin

Aminosäure)^{50,51} bestehen und die Bindung der Protease bzw. des Zymogens an Lys-reiche Regionen der Zielproteine ermöglichen (Kringel 1, 2, 4 und 5).^{18,52} Über diese LBS kann Plg zum Beispiel mit dem Substrat Fibrin(ogen)⁵³ und dem physiologischen Inhibitor α -2-Antiplasmin,^{54,55} aber auch mit Oberflächenrezeptoren von Bakterien-^{56,57} und Säugerzellen⁵⁸ sowie mit niedermolekularen Liganden wie z. B. dem Lys-Analogon ϵ -Aminocaprinsäure⁵⁹ interagieren.¹⁸ Im Gegensatz dazu enthält die Kringeldomäne 3 eine dysfunktionale LBS (Asp-X-Lys), in der eine saure durch eine basische Aminosäure ersetzt ist.^{60,61}

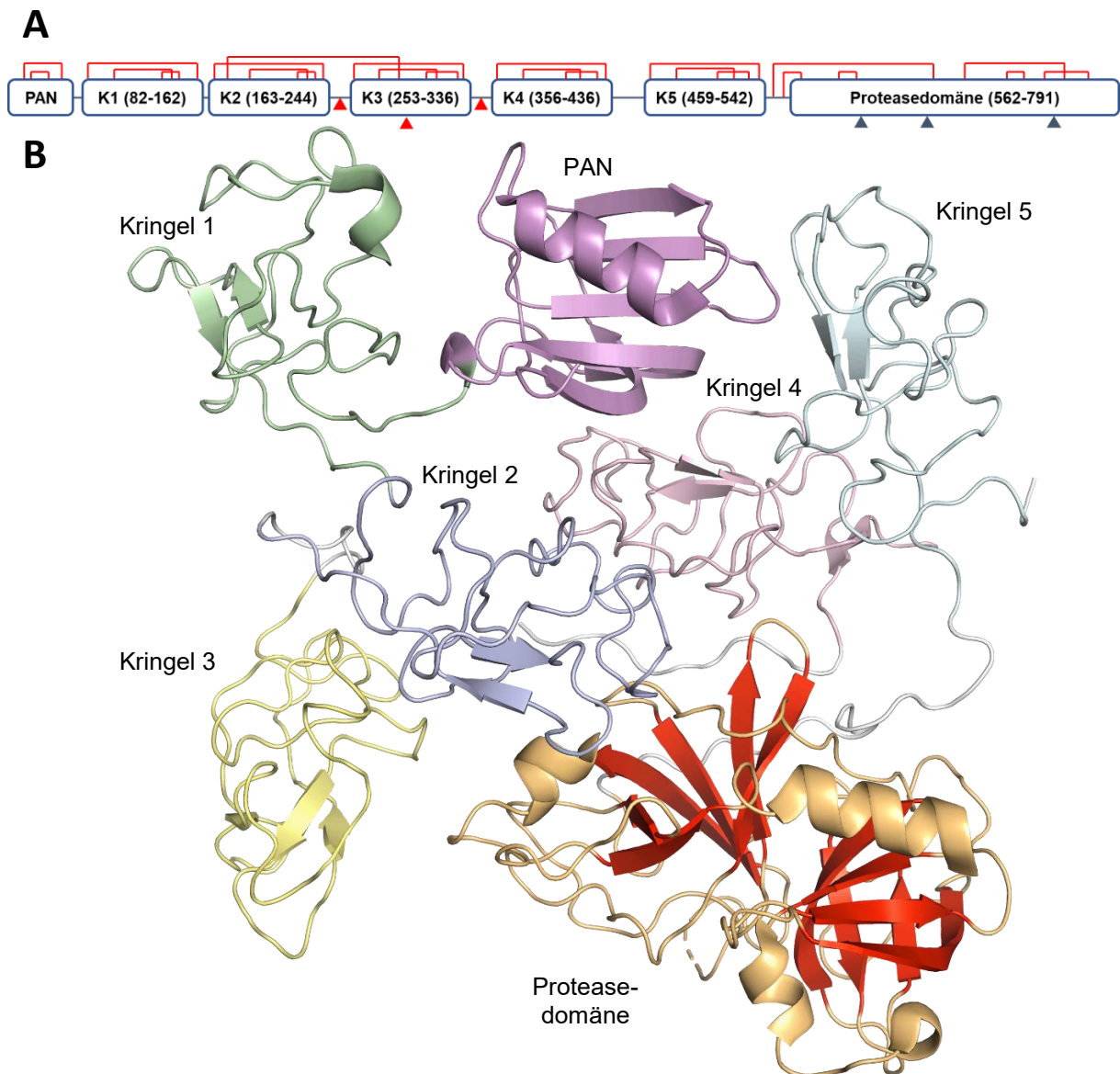


Abbildung 2: Struktur des humanen Plasminogens. A) Schematische Darstellung der Proteindomänen (Nummerierung: Volllängen-Plg, rote Linien: Disulfidbrücken, rote Dreiecke: Glycosylierungsstellen, blaue Dreiecke: Reste der katalytischen Triade). B) *Cartoon*-Darstellung der geschlossenen Konformation (Plg Typ II, PDB: 4DUR).⁵² Die beiden für trypsinartige Serinproteasen typischen β -barrel-Strukturen der Proteasedomäne sind rot hervorgehoben. Die Abbildung wurde in leicht veränderter Form aus einem Übersichtsartikel entnommen.²

1.2. Trypsinartige Serinproteasen und Plasmin

Durch partielle Glykosylierung an den Resten Ser(249), Asn(289) und Thr(346) kommt Plm hauptsächlich in den beiden Glycoformen I und II vor, die mittels Affinitätschromatographie voneinander separiert werden können.¹⁸ Es wird vermutet, dass die Glykosylierung die Affinität des Plm gegenüber zellulären Rezeptoren reguliert und darüber hinaus den physiologischen Abbau des Enzyms beeinflusst.⁴⁴ Am Rest Ser(587) wurde eine partielle Phosphorylierung beobachtet, deren Zweck bislang ungeklärt ist.⁶² Eine detaillierte, strukturelle Beschreibung der einzelnen Proteindomänen ist in Übersichtsartikeln von SCHALLER *et al.* und LAW *et al.* enthalten.^{18,27}

In der **Abbildung 2B** ist die Kristallstruktur des Plg in seiner globulären aktivierungsresistenten Form gezeigt,²⁷ die insbesondere durch Interaktionen zwischen der PAN-Domäne und den anderen Proteindomänen stabilisiert wird.⁵² In dieser geschlossenen Konformation ist lediglich die LBS der Kringeldomäne 1 frei zugänglich.

Unter physiologischen Bedingungen ist zur Aktivierung des Plm eine Kollokalisierung mit einem zellulären Oberflächenrezeptor oder einer geeigneten Targetoberfläche (z. B. Fibrin) erforderlich.²⁷ Im ersten Schritt bindet das Enzym über die LBS der Kringeldomäne 1 an einen Lys-Rest des Targetproteins, wodurch eine Öffnung der globulären Plg-Konformation erfolgt. Die dabei freigelegten LBS der Kringeldomänen 2, 4 und 5 binden danach ebenfalls an Lys-Reste des Targets, woraufhin auch der zuvor verborgene Aktivierungs-*loop* des Enzyms zugänglich wird.² Dieser kann dann von Plg-Aktivatoren wie dem *tissue-type Plg activator* (tPA) oder dem *urokinase-type Plg activator* (uPA) zwischen den Resten Arg(561) und Val(562) gespalten werden. In einer darauffolgenden Konformationsänderung wird die katalytisch aktive Proteasedomäne erhalten.²⁷ Nach der proteolytischen Aktivierung besteht das Enzym aus einer N-terminalen, schweren A-Kette (PAN und Kringeldomänen), und einer C-terminalen leichten B-Kette (Proteasedomäne), die durch zwei Disulfidbrückenbindungen kovalent miteinander verknüpft sind.¹⁸ Sowohl Plg, als auch Plm kommen im Blut in zwei unterschiedlich großen Formen vor: den Vollängenproteinen Glu(1)-Plg bzw. Glu(1)-Plm und den verkürzten Varianten Lys(78)-Plg bzw. Lys(78)-Plm.² Letztere entstehen durch die Plm-katalysierte Abspaltung der PAN-Domäne zwischen den Resten Lys(77) und Lys(78),⁶³ wodurch stabilisierende Interaktionen der PAN-Domäne mit den LBS der Kringel-Domänen 4 und 5 unterbrochen⁵² werden. Dies beschleunigt die Targetbindung und erleichtert den Übergang des Plg von der geschlossenen in eine offenere Konformation,⁶⁴ wodurch eine schnelle Steigerung der Plm-Aktivität im Blut erreicht wird.²

Die erste Kristallstruktur der Protease-Domäne im Komplex mit dem substratanalogen Inhibitor H-Glu-Gly-Arg-CMK (Verbindung **1**) wurde im Jahr 1998 bestimmt (**Abbildung 3A**).⁶⁵ Dabei wurde eine verkürzte Mikroplasmin (μ Plm)-Variante kristallisiert, deren Proteasedomäne über zwei Disulfidbrücken mit einem kurzen Fragment der N-terminalen A-Kette verbunden ist

1.2. Trypsinartige Serinproteasen und Plasmin

(Reste 542 - 562 der Plg-Sequenz). Die μ Plm-Sequenz zwischen den Resten 562 und 791 entspricht dabei den Aminosäuren 16 - 245 der Chymotrypsinogensequenz.¹⁵ Die Kristallstruktur offenbart eine Besonderheit des Plm, dessen Aminosäuresequenz im Vergleich mit Chymotrypsin eine Deletion von sechs Aminosäuren (95 - 100) enthält, sodass die Reste Arg94(644) und Lys101(645) direkt miteinander verknüpft sind (94-*shunt*).^{2,65} An dieser Stelle befindet sich bei allen verwandten trypsinartigen Serinproteasen die 99- β -Haarnadelschleife (99- β -*hairpin loop*), die einerseits die Größe der S2-Tasche beeinflusst und andererseits die S2-Tasche von der benachbarten S3/4-Bindungsregion abgrenzt. Aufgrund des 94-*shunt* gehen die S2- und S3/4-Taschen des Plm direkt ineinander über, sodass es ein besonders offenes aktives Zentrum besitzt.

Wie in der **Abbildung 3B** gezeigt wird, bindet der C-terminale Arg-Rest der Verbindung **1** am Boden der S1-Tasche über eine ionische Wechselwirkung an Asp189(735) sowie über weitere polare Interaktionen an Gly219(764) und Ser190(736). Dieses charakteristische Bindungsmuster wird bei zahlreichen Kristallstrukturen substratanaloger Inhibitoren im Komplex mit Plm beobachtet. Der P2-Gly-Rest liegt in der proximalen S2-Tasche, während der P3-Glu-Rest die distale S3/4-Bindungsregion oberhalb der Seitenkette des Trp215(761) besetzt und über seine Carbonylgruppe mit dem Amid-NH von Gly216(762) interagiert.

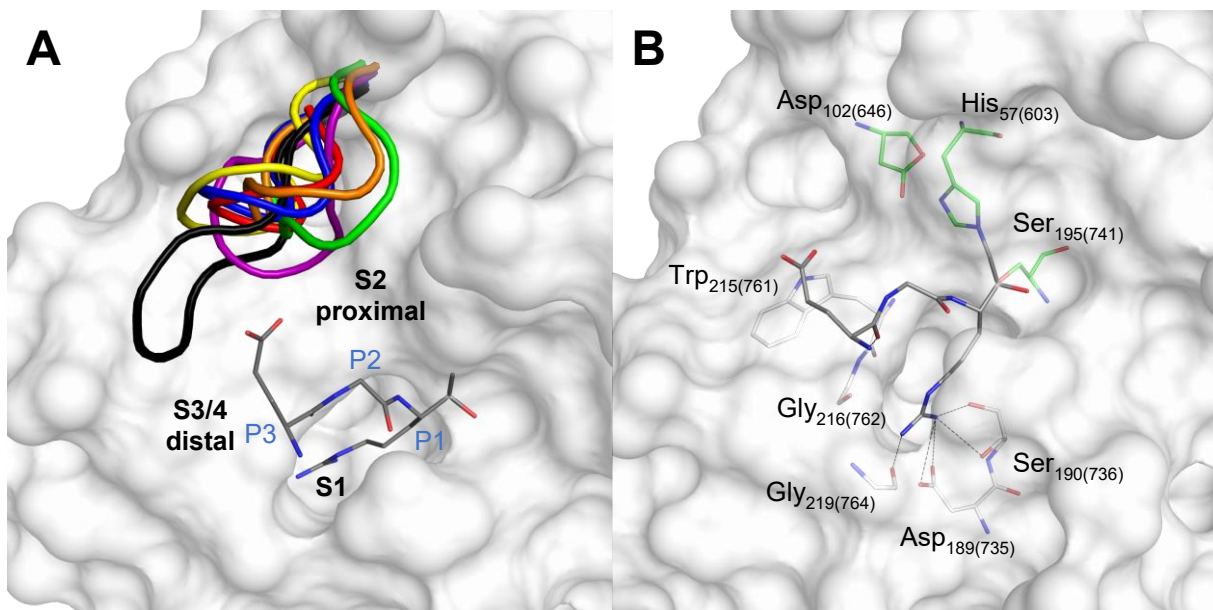


Abbildung 3: Aktives Zentrum des Plasmins. Kristallstruktur des kovalent-irreversiblen Inhibitors H-Glu-Gly-Arg-CMK (Verbindung **1**, graue C-Atome) im Komplex mit μ Plm (weiße Oberfläche und graue C-Atome, PDB: 1BUJ).^{65,66} A) Bindungsmodus des Inhibitors. Als Überlagerung sind die Kristallstrukturen verwandter trypsinartiger Serinproteasen abgebildet, von denen lediglich die 99-Schleifen als *Cartoon*-Darstellung gezeigt werden: aktiviertes Protein C (aPC, rot, PDB: 1AUT)⁶⁷, FVIIa (grün, PDB: 1KLJ)⁶⁸, FXa (blau, PDB: 2PR3)⁶⁹, FXIa (violett, 1ZSJ)⁷⁰, Plasmakallikrein (orange, PDB: 2ANY)⁷¹, Thrombin (gelb, PDB: 1K22)⁷², uPA (schwarz, PDB: 1VJA)⁷³. Aufgrund der fehlenden 99-Schleife besitzt μ Plm ein besonders offenes aktives Zentrum.² Die S2-Tasche wird auch als proximale-Tasche bezeichnet, während die offene Region oberhalb von Trp215(761) oft distale Tasche oder S3/4-Bindungsregion genannt wird. B) Polare Wechselwirkungen des Inhibitors **1** mit μ Plm (grüne C-Atome: katalytische Triade). Der basische P1-Rest wird in der S1-Tasche durch charakteristische Interaktionen stabilisiert.

1.3. Plasmin/Antiplasmin-System

Die Plm-katalysierte Auflösung von Fibrin-Aggregaten im Blutkreislauf wird als Fibrinolyse bezeichnet und gewährleistet die Durchlässigkeit der Blutgefäße. Im Gegensatz dazu bewirkt die Hämostase den schnellen Gefäßverschluss nach Verletzungen. Beide Prozesse basieren auf einer schrittweisen, kaskadenartigen Aktivierung trypsinartiger Serinproteasen, die durch endogene Inhibitoren beeinflusst werden. Die Regulation der Plm-Aktivität erfolgt durch das Plasmin/Antiplasmin-System, an dem die trypsinartigen Serinproteasen Plg/Plm, tPA und uPA, die Metalloprotease Carboxypeptidase B2 (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* oder TAFIa), sowie endogene peptidische Inhibitoren aus der Gruppe der Serpine und der endogene Breitband-Proteaseinhibitor α_2 -Macroglobulin beteiligt sind (**Abbildung 4A**).^{2,18}

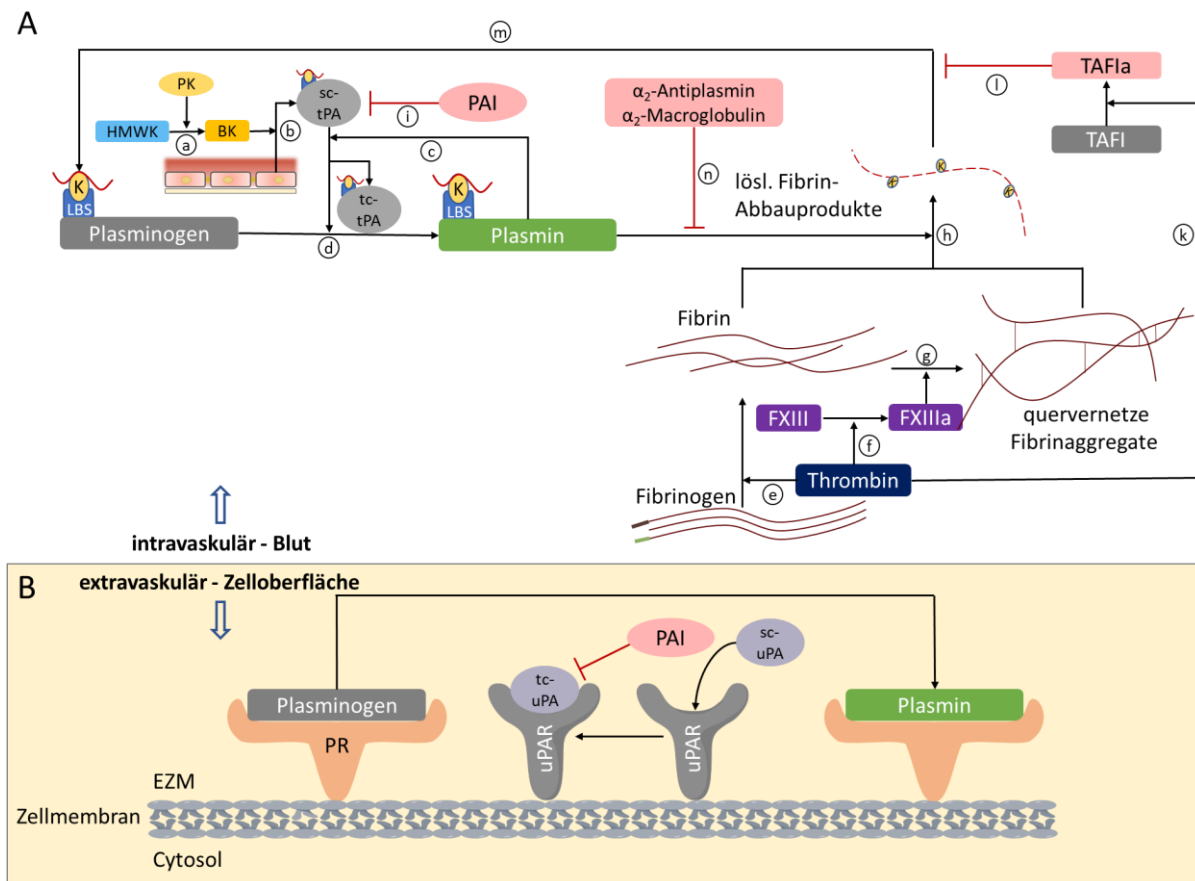


Abbildung 4: Funktion und Regulation des Plasmins. A) Fibrin-Antifibrin-System: durch die trypsinartige Serinprotease Plasmakallikrein (PK) wird zu Beginn der Plm-Aktivierungskaskade Bradykinin (BK) aus Kinogen (*high molecular weight kininogen*, HMWK) freigesetzt (Schritt a). Nach der Aktivierung von Bradykinin-B2-Rezeptoren durch BK wird die trypsinartige Serinprotease *single-chain tissue-type plasminogen activator* (sc-tPA) aus stimulierten Endothelzellen in den Blutkreislauf abgegeben (Schritt b). In einem *feedback*-Mechanismus wird das weniger aktive sc-tPA durch bereits aktives Plm in das hochaktive *two-chain* (tc)-tPA überführt, was die Plg-Aktivierung beschleunigt (Schritt c). Plg und sc-tPA oder tc-tPA binden gemeinsam über spezifische Lys-Bindestellen (LBS) an Fibrin; nach dieser Kolokalisation wird Plg durch tPA aktiviert (Schritt d). Am Ende der Blutgerinnungskaskade wird Fibrinogen durch Thrombin in Fibrin überführt (Schritt e). Thrombin aktiviert außerdem den Gerinnungsfaktor XIIIa, der die Quervernetzung des Fibrins katalysiert (Schritte f und g). Sowohl Fibrin als auch die vernetzten Fibrinaggregate werden im Prozess der Fibrinolyse durch Plm in lösliche Abbauprodukte überführt (Schritt h). Aktives tPA wird durch die Serpine Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 und -2 (PAI-1 und -2) gehemmt, was die Plg-Aktivierung verlangsamt (Schritt i). Die durch Thrombin aktivierbare Metalloprotease TAFIa spaltet C-terminale Lys-Reste von Fibrin ab, was die Bindung von tPA und Plg erschwert und somit Plg-Aktivierung verlangsamt (Schritte k, l und m). Zusätzlich erfolgt eine direkte Plm-Inhibition durch α_2 -Antiplasmin und durch

1.3. Plasmin/Antiplasmin-System

α_2 -Makroglobulin (Schritt n). B) Extravaskuläre Plm-Aktivität: außerhalb der Blutgefäße bindet Plg an zelluläre Oberflächenrezeptoren (PR), wo es durch die an uPA-Rezeptoren (uPAR) gebundene, trypsinartige Serinprotease uPA aktiviert wird. Eine Regulation kann wiederum durch PAI's erfolgen. Die Abbildung wurde aus einem Übersichtsartikel entnommen und adaptiert.²

In Abhängigkeit vom Wirkungsort des Plm wird zwischen der intra- und der extravaskulären Fibrinolyse unterschieden.² Bei Ersterer wird ein Komplex aus Plg, Fibrin (bzw. Fibrin-Abbauprodukten) und tPA gebildet, wodurch die noch inaktive Protease zusammen mit ihrem physiologischen Aktivator an ihr Substrat bindet. Durch diese Kolo-kalisation werden sowohl die tPA-vermittelte Plg-Aktivierung als auch der Plm-katalysierte Umsatz des Fibrins beschleunigt, der wiederum zur Auflösung von Fibringerinnseln im Blutkreislauf führt.² Durch die direkt am Gerinnsel lokalisierte Plm-Aktivierung kann trotz der breiten Substratspezifität des Plm eine relativ hohe Fibrin-Selektivität erreicht werden. Nach Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes wird freies Plm schnell durch das Serpin α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP)⁷⁴⁻⁷⁷ sowie durch α_2 -Makroglobulin⁷⁸ inaktiviert, die beide in hohen Konzentrationen von etwa 1 μ M bzw. 3.4 μ M im Blutkreislauf zirkulieren.⁷⁹ Somit ist der intravaskuläre Fibrinabbau unter physiologischen Bedingungen räumlich streng begrenzt.

Der Plm-Aktivator tPA kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor: Dem Zymogen *single-chain* (sc)-tPA und dem deutlich aktiveren, reifen Enzym *two-chain* (tc)-tPA, das in einem *feedback*-Mechanismus durch bereits aktives Plm gebildet wird.¹⁸ Im Gegensatz zu den meisten trypsinartigen Serinproteasen besitzt sc-tPA bereits eine basale proteolytische Aktivität, die eine initiale Plg-Aktivierung ermöglicht.⁸⁰ Daher können sc-tPA-Varianten in der Therapie akuter Herzinfarkte zur Gerinnselauflösung eingesetzt werden.⁸¹ Auch die mit fortschreitender Fibrinolyse freigesetzten Fibrin-Abbauprodukte tragen zur Erhöhung der Plm-Aktivität im Blut bei. Sie enthalten C-terminale Lys-Reste, die eine Bindung von Plg und tPA ermöglichen, woraus eine verstärkte Plg-Aktivierung resultiert;² diese Lys-Reste können durch die Metalloprotease TAFIa abgespalten werden, was die Rate der Plg-Aktivierung indirekt verlangsamt. Eine direkte Verringerung wird über eine tPA-Hemmung durch die Serpine *plasminogen activator inhibitor* (PAI)-1 und -2 erreicht.^{18,44}

In der **Abbildung 4B** ist eine stark vereinfachte Übersicht der extrazellulären Fibrinolyse dargestellt. Dabei wird rezeptorgebundenes Plg im Wesentlichen durch die trypsinartige Serinprotease uPA aktiviert, die ebenfalls im Komplex mit zellulären Rezeptoren vorliegt und zuvor selbst von Plm aktiviert wurde. Außerhalb der Blutgefäße ist Plm u. a. an der Zellmigration (Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix) und der Geweberemodulierung beteiligt,⁸² weshalb der extravaskuläre Plg-Aktivator uPA ein potenzielles Target in der Onkologie ist. Da dieser im Blutkreislauf jedoch nur in geringen Mengen vorkommt, sind uPA-Hemmstoffe zur Blutungsstillung ungeeignet.

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Eine pathologische Erhöhung der Plm-Aktivität (hyperfibrinolytischer Zustand) kann zu schwerwiegenden, hämorrhagischen Komplikationen führen und erfordert oft eine schnelle Behandlung mit Antifibrinolytika zur Wiederherstellung der Hämostase.² Ihre Anwendungsgebiete umfassen chirurgische Eingriffe wie Herzoperationen mit cardiopulmonarem Bypass (CPB)⁸³ oder Leber- und Lungentransplantationen,⁸⁴⁻⁸⁷ sowie die Behandlung von Traumata,^{88,89} hämorrhagischen Schocks,⁹⁰ postpartalen Blutungen (postpartum Hämorrhagie, PPH),⁹¹ Menorrhagie,⁹² starkem Nasenbluten (Epistaxis)⁹³ und thrombolyseinduzierten Blutungen.^{94,95} Chirurgische Eingriffe erfordern oft den Einsatz von Bluttransfusionen. Trotz intensiver Kontrollen zur Kontaminationsvermeidung mit Pathogenen wie dem Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) oder Hepatitis-C-Viren (HCV) können diese Transfusionen schwerwiegende Nebenwirkungen wie z. B. Sepsis oder Multiorganversagen verursachen; ferner werden sie mit verlängerten Krankenhaus-aufenthalten und einer erhöhten Mortalitätsrate in Verbindung gebracht.⁹⁶ Die Kosten für die Verabreichung einer einzelnen Blutkonserve wurden in den USA auf 720 - 1190 US-Dollar beziffert.^{97,98} Durch Antifibrinolytika kann der perioperative Verbrauch von Blutkonserven verringert und der Behandlungserfolg verbessert werden.⁸³ Zudem senkt der niedrigere Bedarf an Bluttransfusionen die Behandlungskosten, wodurch das Gesundheitssystem entlastet wird.⁹⁹

Eine antifibrinolytische Wirkung kann durch direkte Plm-Inhibition oder indirekt durch Hemmung der Plg-Aktivierung erzielt werden.² Dabei ist die klinische Verfügbarkeit von Fibrinolysehemmstoffen im Wesentlichen auf zwei Wirkstoffklassen beschränkt. Die Lys-Analoga Tranexamsäure (TXA) und ϵ -Aminocaprinsäure (EACA) blockieren die LBS des Plg und verhindern damit dessen effiziente Aktivierung, wodurch eine Verringerung der intravaskulären Fibrinolyse erreicht wird. Ein direkter Inhibitor des aktiven Plm ist das Protein Aprotinin (Trasylol). Da beide Wirkstoffklassen schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen können, ist die im Rahmen dieser Promotion angestrebte Entwicklung neuer Antifibrinolytika von hoher Relevanz. In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über die wichtigsten bekannten Plm-Inhibitoren und Antifibrinolytika gegeben.

1.4.1. Liganden der Lysinbindestellen

Wie oben beschrieben erfordert die intravaskuläre Plm-Bildung eine simultane Bindung von Plg und tPA an Lys-Reste des Fibrins, die über LBS in den Kringel-Domänen beider Proteasen vermittelt wird.²⁷ Durch die Blockade der LBS kann die Plg-Aktivierung gehemmt und eine antifibrinolytische Wirkung erreicht werden.

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Die ersten Wirkstoffe dieser Art sind die in den 1950er und 1960er Jahren entwickelten Lys-Analoga EACA und TXA (Verbindungen **2** und **3**),^{100–103} deren klinische Anwendung bis heute weit verbreitet ist (**Abbildung 5**).^{2,45}

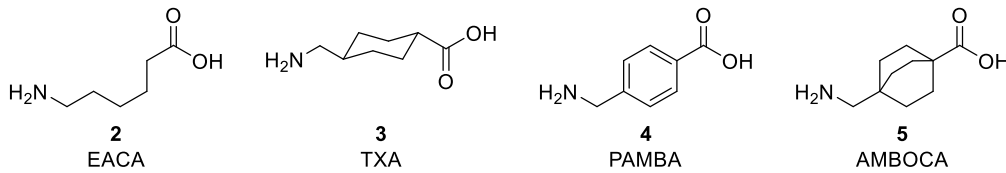


Abbildung 5: LBS-Liganden: Lys-Analoga, Verbindungen 2 - 5.

Erst viele Jahre nach ihrer Entwicklung wurde der vermutete Bindungsmodus der Lys-Analoga in den Kringel-Domänen des Plm anhand von Kristallstrukturen bestätigt.^{2,27} Die verfügbaren Daten bezüglich der Bindungsaffinitäten variieren stark und liegen für TXA gegenüber der Kringel-Domäne 1 im unteren, einstellig-milimolaren Bereich.¹⁰⁴ Gegenüber EACA weisen die Kringeldomänen unterschiedliche Affinitäten auf, die in folgender Reihenfolge abnehmen: $K1 > K4 > K5 > K2 \gg K3$.^{18,105–107}

EACA und insbesondere TXA haben sich als preisgünstige, sichere und verlässliche Wirkstoffe zur Verringerung perioperativer Blutungen bewährt.^{108–111} Durch deren Verabreichung kann der Blutverlust verringert und der Behandlungserfolg verbessert werden, wobei jedoch ein striktes, dreistündiges Zeitfenster einzuhalten ist.^{27,112–117} Weitere Anwendungsgebiete sind die Notfallbehandlung akuter Traumata^{118–122} sowie die PPH.² Für Letztere belegte eine aktuelle Studie den Nutzen einer intravenösen TXA-Gabe, die zur signifikanten Verringerung blutungsbedingter Todesfälle führte (*World Maternal Antifibrinolytic Trial, WOMAN*).¹²³ Beide Wirkstoffe können sowohl oral als auch intravenös verabreicht werden, wobei TXA eine bessere antifibrinolytische Wirksamkeit und ein überlegenes pharmakologisches Profil besitzt. Die therapeutisch wirksamen Plasmakonzentrationen betragen etwa 8 mM (EACA) bzw. 0.6 mM (TXA).¹²⁴ Aufgrund dieser hohen erforderlichen Dosierungen können Nebenwirkungen wie postoperative Schlaganfälle¹²⁵ oder Krampfanfälle während Herzoperationen auftreten;^{104,126–128} letztere werden vermutlich durch die Bindung an den GABA_B-Rezeptor verursacht. Dennoch bleibt TXA bis heute der wichtigste antifibrinolytische Wirkstoff weltweit.²

Bereits während der 1960er Jahre wurde nach alternativen Lys-Analoga gesucht. Im März 1963 wurde erstmals die 4-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA, Verbindung **4**) beschrieben,^{129,130} die später in der DDR und einigen anderen Ländern zugelassen wurde.² Die Verbindung 4-Aminomethylbicyclo-[2.2.2]-octan-1-carbonsäure (AMBOCA, Verbindung **5**)¹³⁰ weist zwar eine höhere antifibrinolytische Aktivität als TXA auf, wurde jedoch nicht weiterentwickelt.

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Später wurde mittels eines computerbasierten Ansatzes in Kombination mit einem Screening nach weiteren Verbindungen gesucht, die ähnliche sterische und elektrostatische Eigenschaften wie Lys und TXA besitzen.¹³¹ Dies führte zur Entwicklung der Verbindung **6** (AZD6564, **Abbildung 6**),¹³² die in einem Tierversuch mit Ratten eine deutliche Verringerung der tPA induzierten Blutungsdauer bewirkte und deutlich wirksamer war als TXA.² Verbindungen dieses Typs wurden vor einigen Jahren zur Verringerung von Blutungen bei chirurgischen Eingriffen sowie zur Behandlung von Menorrhagie und verschiedener Hautkrankheiten entwickelt. Jedoch gibt es keine Informationen bzgl. des aktuellen Entwicklungsstandes. Von der Firma BAYER wurden weitere LBS-Liganden mit einem substituierten Pyrimidinon-Rest patentiert. Exemplarisch sind die Verbindungen **7** und **8** gezeigt, deren antifibrinolytische Aktivität in humanem Plasma im unteren nanomolaren Bereich liegt.^{133–135}

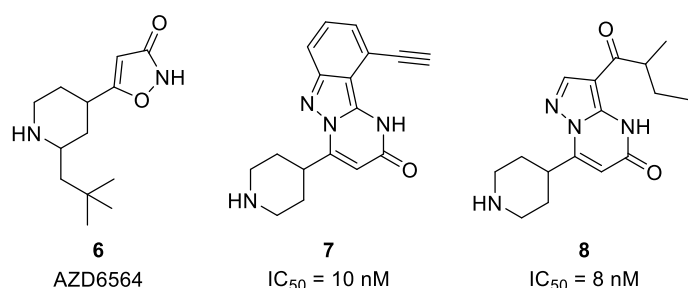


Abbildung 6: LBS-Liganden: Verbindungen 6 - 8. Struktur einer Verbindung der Firma ASTRAZENECA (Verbindung **6**)¹³² sowie zweier Pyrimidinon-basierter Substanzen der Firma BAYER (Verbindungen **7** und **8**)^{133,134} Die genannten IC₅₀-Werte geben die antifibrinolytische Aktivität in Plasma an.

1.4.2. Sonstige allosterische Inhibitoren

In der Literatur wurden auch zahlreiche Plm-Inhibitoren mit allosterischen Bindungsmechanismen beschrieben. Zu diesen zählen polysulfatierte Lignine, Dextrane und Mimetika von Glycosaminoglycanen.^{2,45} Da der Fokus dieser Dissertation auf der Entwicklung von *active-site*-Inhibitoren liegt, werden diese nur schwach wirksamen Verbindungen hier nicht näher beschrieben.

1.4.3. Liganden des aktiven Zentrums

1.4.3.1. Aprotinin

Das aus 58 Aminosäuren bestehende Protein Aprotinin (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*, BPTI, Trasylol) ist ein relativ unspezifischer Serinproteaseinhibitor aus der Familie der KUNITZ-Typ Proteaseinhibitoren.^{2,45} Diese kompakten Proteine sind meist tierischen Ursprungs und können durch kanonische Erkennungsschleifen (*recognition-loops*) die aktiven Zentren der Zielenzyme blockieren.^{2,45} Die Schleifen besitzen eine substratähnliche Konformation mit einem basischen P1-Rest, der die S1-Tasche der Zielprotease adressiert. Diese wird daraufhin

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

oft durch einen Kreislauf aus Spaltung und Religation der P1-P1'-Peptidbindung (LASKOWSKI-Mechanismus)¹³⁶ inaktiviert.^{137,138} Aprotinin besitzt eine starke Hemmwirkung gegenüber Plm ($K_i = 0.5$ nM) und anderen, trypsinartigen Serinproteasen wie PK ($K_i = 30$ nM) und Trypsin ($K_i < 1$ nM).^{139,140} Für viele Jahre wurde es als Antifibrinolytikum zur Verringerung perioperativer Blutungen bei chirurgischen Eingriffen verwendet, um die Menge an benötigten Bluttransfusionen zu reduzieren.^{110,111,141–143} Dadurch konnten damit einhergehende Risiken wie allergische Reaktionen oder Infektionen durch kontaminierte Blutkonserven verringert werden.^{2,98,143,144} Aufgrund erhöhter Mortalitätsraten¹¹² im Vergleich mit TXA und einer möglichen Beeinträchtigung der Nierenfunktion¹⁴⁵ wurde Aprotinin jedoch im Jahr 2008 weitestgehend vom Markt genommen.^{146,147} Einige Jahre später wurde es in mehreren Ländern unter Auflagen wie z. B. der Führung eines Anwendungsregisters erneut zugelassen, jedoch nicht in den USA.⁴⁵ Vorteile und potenzielle Risiken des Aprotinins wurden in mehreren Übersichtsartikeln beschrieben.^{45,83,143} Es wurden auch einige Derivate des Wirkstoffs entwickelt, die bei ähnlicher Plm-Hemmwirkung ($K_i = 0.6$ nM) eine deutlich gesteigerte PK-Inhibition zeigen ($K_i = 0.02$ nM).¹⁴⁸ Letztere könnte die vaskulären BK-Spiegel senken und damit die tPA-Ausschüttung verringern, wodurch die antifibrinolytische Wirkung *in vivo* verstärkt werden sollte.¹⁴⁹ In präklinischen Untersuchungen wurde auch eine verringerte Immunogenität in Schimpansen festgestellt.¹⁴⁸ Darüber hinaus wurde ein humanes Aprotinin-Analogon beschrieben, das Plm zwar etwas schwächer inhibiert ($K_i = 23$ nM), jedoch aufgrund seines humanen Ursprungs zu einer verringerten Immunantwort führen sollte.¹⁵⁰ Die Aprotininderivate wurden bislang nicht weiterentwickelt.

1.4.3.2. Txa-verknüpfte Inhibitoren

Aufbauend auf dem chromogenen *p*-Nitroanilin (*p*NA)-Substrat **S-2251**¹⁵¹ (H-DIle-Phe-Lys-*p*NA, Verbindung **9**), wurden Ende der 1980er Jahren *active site*-Inhibitoren des Plm entwickelt (**Abbildung 7**).^{151–153}

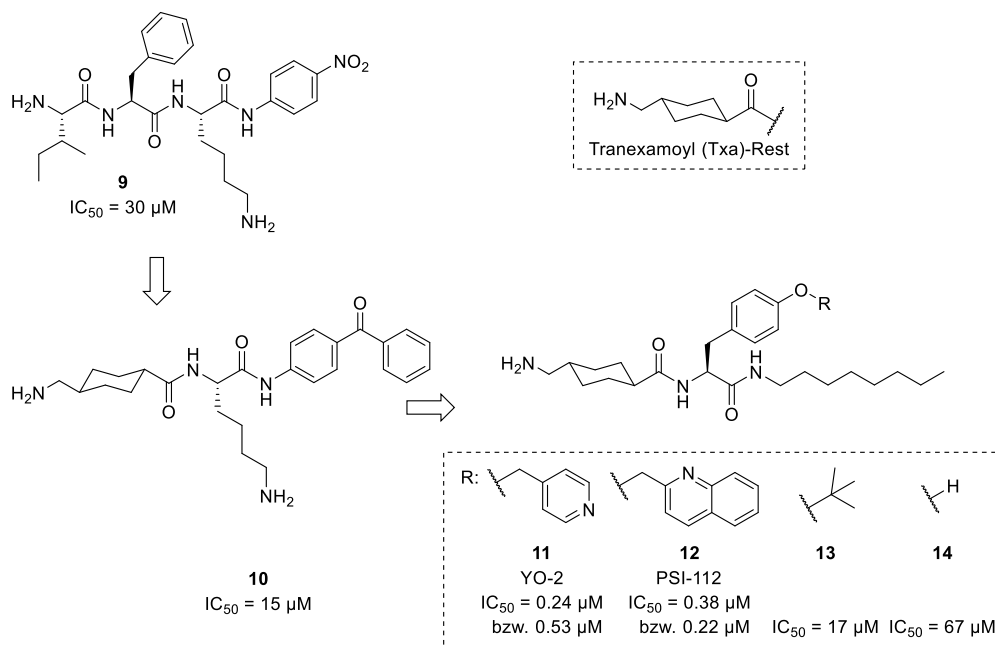


Abbildung 7: Entwicklung Txa-verknüpfter Plasmininhibitoren: Verbindungen 9 - 14. Falls nicht genauer spezifiziert, geben alle im Rahmen dieser Dissertation gezeigten K_i - oder IC_{50} -Werte die mittels chromogener oder fluorogener Substrate *in vitro* bestimmte Plm-Hemmwirkung an. Für die Verbindungen **11** und **12** wurden unterschiedliche IC_{50} -Werte publiziert.^{154,155}

Auf beiden Seiten des zentralen Lys-Restes der Verbindung **9** wurden Strukturvariationen durchgeführt, um die Plm-Affinität zu steigern und den proteolytischen Abbau der peptidischen Strukturen zu verhindern. Dabei wurden Verbindungen entwickelt, die einen C-terminalen *p*-Benzoylanilid-Rest sowie einen N-terminalen Tranexamoyl (Txa)-Baustein enthalten.¹⁵⁶ Unter Verwendung von Fibrinaggregaten wurde für den Inhibitor **10** *in vitro* eine antifibrinolytische Wirkung nachgewiesen ($IC_{50} = 6.1 \mu M$). Trotz intensiver Bemühungen ist keine signifikante Verbesserung der Plm-Hemmwirkung gelungen. Anhand von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) wurde jedoch gezeigt, dass anstelle der Lysin-Seitenkette vermutlich der Txa-Rest in der S1-Tasche bindet. Eine deutlich verbesserte Wirksamkeit zeigen die Verbindungen **11** (YO-2) und **12** (PSI-112),¹⁵⁵ deren Y-förmige Struktur aus einem N-terminalen Txa-Baustein zur Adressierung der S1-Tasche in Verbindung mit einem verlängerten Tyr-Rest und einem aliphatischen Octylamid-Segment besteht; zusätzliche Txa-Derivate wurden als Plm- und Plasmakallikrein (PK)-Hemmstoffe synthetisiert.^{157–160} Dabei war insbesondere die Verlängerung der Tyr-Seitenkette mit heteroaromatischen Substituenten entscheidend für eine starke Plm-Hemmwirkung.^{2,45} Ihr Austausch gegen eine *tert*-Butyl-Gruppe oder ein Wasserstoffatom bewirkte eine 30- bzw. 125-fache Verringerung der inhibitorischen Aktivität (Verbindungen **13** und **14**).¹⁵⁴

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Mögliche Ursachen dieser deutlichen Affinitätsverluste werden anhand der im Jahr 2017 bestimmten Kristallstrukturen der Verbindungen **11** und **12** im Komplex mit μ Plm offensichtlich (**Abbildung 8**).¹⁵⁵

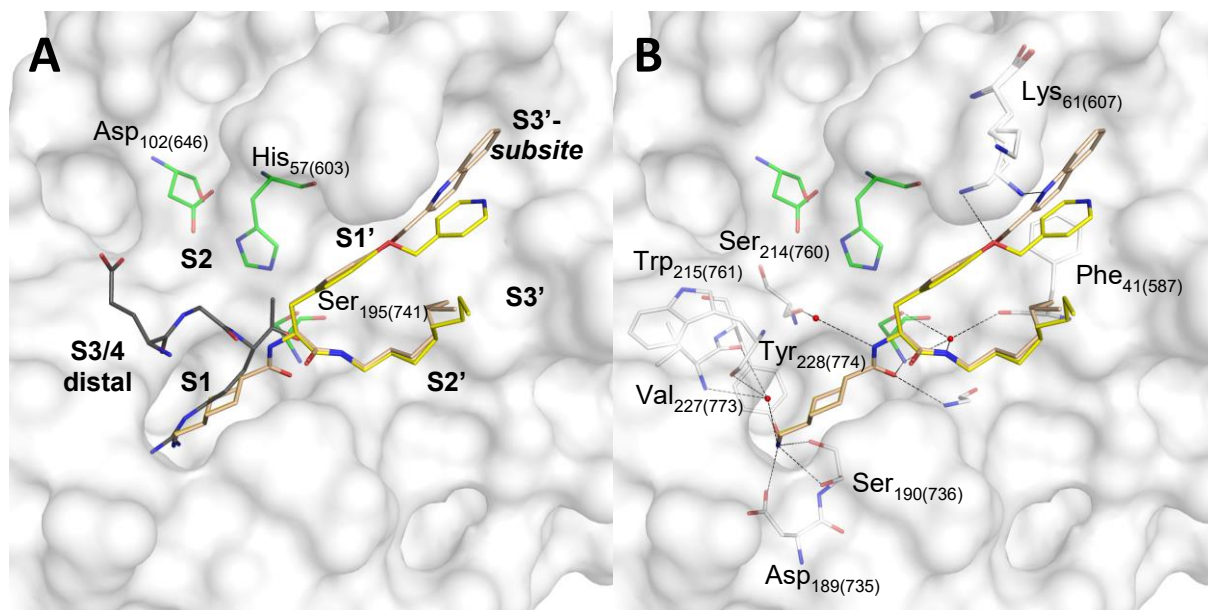


Abbildung 8: Kristallstrukturen: Inhibitoren 1, 11 und 12 in μ Plm. A) Überlagerte Strukturen der Verbindungen **11** (gelbe C-Atome, PDB: 5UGD) und **12** (beige C-Atome, PDB: 5UGG) im Komplex mit μ Plm (PDB: 5UGD, weiße Oberfläche und C-Atome, katalytische Triade: grüne C-Atome).¹⁵⁵ Die verlängerten Tyr-Reste adressieren eine oberhalb der S3'-Tasche gelegene Nebentasche. Im Gegensatz zum überlagerten Bindungsmodus des Inhibitors **1** in μ Plm (graue C-Atome, PDB: 1BUI)^{65,66,155} sind die Txa-Derivate in die S1'-S2'-Bindungsregion gerichtet. B) Darstellung der polaren Wechselwirkungen der Hemmstoffe **11** und **12** im Komplex mit μ Plm. Die verlängerten Tyr-Reste werden durch eine Interaktion mit der Seitenkette des Lys61(607) stabilisiert. Die aromatischen Substituenten bilden π - π -Wechselwirkungen mit dem Phenylring von Phe41(587) aus.

Beide Substanzen zeigen analoge Bindungsmodi mit einer Y-förmigen Konformation und besetzen neben der S1- auch die S1'- und S2'-Taschen des Plm. Dadurch unterscheidet sich ihre Orientierung vom Bindungsmodus des Inhibitors **1**, der an die ungestrichene Region des aktiven Zentrums bindet. Die verlängerten P1'-Tyr-Reste besetzen die S1'-Tasche sowie einen oberhalb davon liegenden Bereich, der in der Literatur als S3'-*subsite* bezeichnet wird.¹⁵⁵ Dabei bildet Lys61(607) eine polare Wechselwirkung mit dem Ether-O-Atom des Tyr-Restes der Verbindung **11** bzw. mit dem Chinolin-N-Atom der Verbindung **12** aus, während die aromatischen Substituenten beider Inhibitoren zusätzlich über π - π -Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Phe41(587) interagieren. Diese Wechselwirkungen können von den verkürzten Derivaten **13** und **14** nicht ausgebildet werden, was deren Affinitätsverlust erklären könnte. Wie bereits vor dem Erhalt der Kristallstrukturen vermutet bindet der Txa-Rest in der S1-Tasche, wobei charakteristische polare Wechselwirkungen mit den Resten Asp189(735) und Ser190(736) ausgebildet werden.¹⁵⁵

Ähnliche Verbindungen wurden auch von der BAYER AG entwickelt. Durch den Austausch des Tyr-Restes gegen substituierte Biphenylalanin-Bausteine wurden duale Inhibitoren des Plm und des Gerinnungsfaktors XIa (FXIa) mit K_i -Werten im nanomolaren bis subnanomolaren

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Bereich erhalten und patentiert.¹⁶¹⁻¹⁶⁷ Einige Beispiele sind in der **Abbildung 9** gezeigt (**15 - 19**). Für das Derivat **18** wurde in einem Lyseassay in Plasma eine signifikante antifibrinolytische Wirkung nachgewiesen ($IC_{50} = 1.7 \mu M$).¹⁶⁷ Eine duale Hemmwirkung gegenüber Plm und FXIa könnte bei bestimmten chirurgischen Eingriffen vorteilhaft sein, bei denen sowohl Antikoagulanzen zur Vermeidung einer Thrombusbildung als auch Antifibrinolytika zur Verringerung von Blutungen eingesetzt werden.² Für einige Verbindungen wurde auch die Hemmwirkung gegenüber PK angegeben,^{166,167} die zur Verringerung systemischer Entzündungen beitragen könnte.¹⁶⁸ Unter Verwendung einer ähnlichen Grundstruktur wurden von der Firma BRISTOL-MYERS SQUIBB auch FXIa-Inhibitoren entwickelt, die eine besonders geringe Plm-Affinität aufweisen (z. B. Verbindung **19**).¹⁶⁹ Vermutlich ist die fehlende Substitution des P1'-Restes für die stark reduzierte Plm-Hemmwirkung verantwortlich. Verbindungen, die im Rahmen dieser Promotion von den Referenzinhibitoren **11** und **15** abgeleitet wurden, werden im Folgenden auch als Txa-konjugierte Plm-Inhibitoren bezeichnet.

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

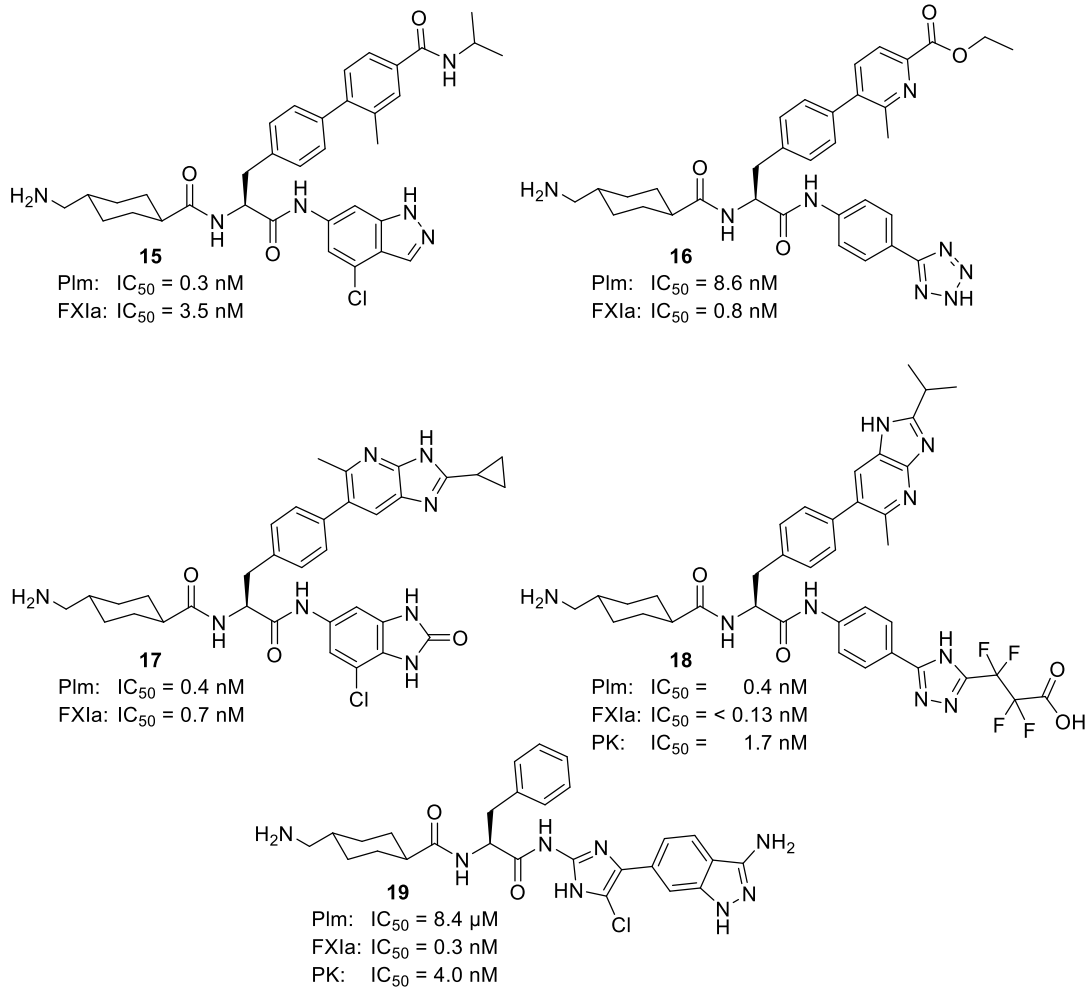


Abbildung 9: Txa-verknüpfte Plasmininhibitoren: Verbindungen 15 - 19. Die Verbindungen wurden von den Firmen BAYER (15,¹⁶¹ 16,¹⁶⁴ 17¹⁶⁵ und 18¹⁶⁷) und BRISTOL-MYERS SQUIBB (19¹⁶⁹) entwickelt.

1.4.3.3. Peptidische Inhibitoren mit C-terminalen 4-Amidinobenzylamid-Gruppen

Neben den oben beschriebenen Txa-Derivaten, die in der S1-Tasche und der gestrichenen Seite des aktiven Zentrums binden, wurden unterschiedliche Plm-Inhibitoren zur Adressierung der S4-S1-Bindungsregion des aktiven Zentrums entwickelt. Substanzen dieses Typs werden im Rahmen dieser Arbeit auch als substratanaloge Inhibitoren bezeichnet. Unter Verwendung des Arg-Mimetikums 4-Amidinobenzylamin (4-Amba) in Kombination mit einer substratanalogen Peptidstruktur wurde der Thrombininhibitor Melagatran (Verbindung **20**) erhalten, der eine moderate Hemmwirkung gegenüber Plm besitzt (Thrombin: $K_i = 0.002 \mu\text{M}$, Plm: $K_i = 0.7 \mu\text{M}$) und zudem die Plm-Aktivatoren tPA und uPA mit Hemmkonstanten von $0.9 \mu\text{M}$ und $6.3 \mu\text{M}$ inhibiert (**Abbildung 10**).¹⁷⁰ In P1-Position wurde der 4-Amba-Rest bereits zuvor zur Entwicklung von Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen verwendet.^{73,171,172} Ein weiteres charakteristisches Merkmal des Melagatrans ist dessen nichtproteinogene P3-Aminosäure, deren Seitenkette aufgrund ihrer R-Konfiguration in Richtung der Proteinoberfläche orientiert ist und die zur P2-Tasche benachbarte S3/4-Bindungsregion adressiert.²

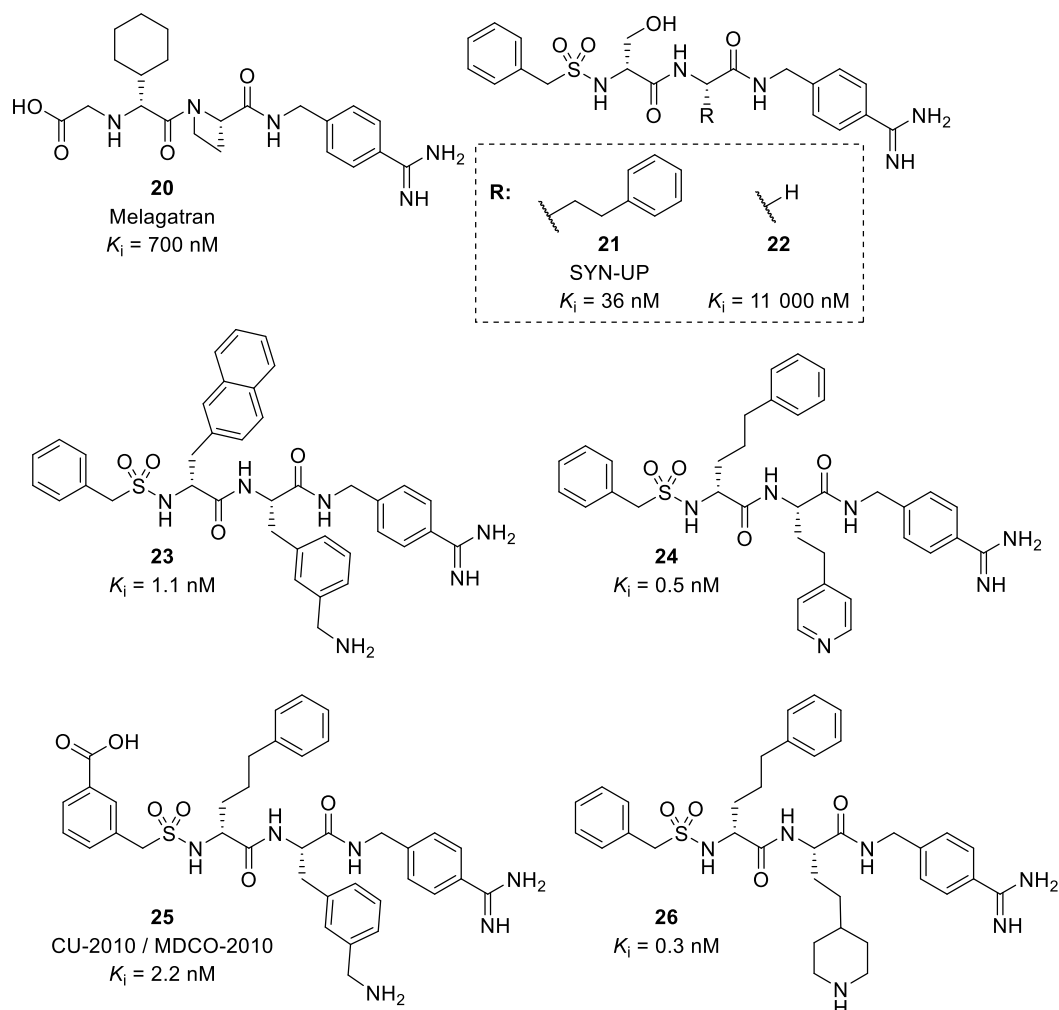


Abbildung 10: Inhibitoren mit C-terminalem 4-Amba-Rest: Verbindungen **20** - **26**. Strukturen und Plm-Hemmwirkungen der Verbindungen **20**,¹⁷⁰ **21** / **22**,¹⁷¹ **23** / **24**,¹⁷³ **25**^{173,174} und **26**.¹⁷⁵

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Basierend auf der Melagatran-Grundstruktur wurden Verbindungen mit einem N-terminalen Benzylsulfonamid-Rest entwickelt, die eine deutlich stärkere Plm-Hemmwirkung zeigen. Das Derivat **21** hemmt Plm und uPA mit K_i -Werten von 36 nM bzw. 28 nM⁷³ und wird als Additiv in kosmetischen Lotionen verwendet.¹⁷⁶ Der P3-D-Ser-Rest der Verbindung ist für Plm-Inhibitoren ungeeignet und trägt stattdessen zur hohen uPA-Affinität bei.² Im Gegensatz dazu verbessert der sterisch anspruchsvolle P2-hPhe-Rest die Plm-Affinität, da Plm aufgrund des 94-*shunt* eine besonders offene S2-Tasche und daher eine Präferenz für sterisch anspruchsvolle, aromatische P2-Aminosäuren aufweist (vgl. Verbindung **22**). Unter Verwendung größerer, aromatischer P2- und P3-Aminosäuren wurden potente Plm-Inhibitoren wie die Verbindungen **23** (Plm: $K_i = 1.1$ nM, PK: $K_i = 0.1$ nM) und **24** (Plm: $K_i = 0.5$ nM, PK: $K_i = 0.6$ nM) erhalten.¹⁷³ Die meisten Derivate dieser Serie besitzen eine relativ geringe Plm-Selektivität und inhibieren auch andere trypsinartige Serinproteasen wie PK und aktiviertes Protein C (aPC) mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich. Wie bereits für Aprotinin beschrieben, könnte deren mögliche antifibrinolytische Wirkung durch eine starke PK-Hemmung und eine möglicherweise damit einhergehende Verringerung der BK-Plasmaspiegel und tPA-Freisetzung unterstützt werden.²

Ein besonders gut untersuchtes 4-Amba-Derivat ist der Inhibitor **25** (CU-2010, Plm: $K_i = 2.2$ nM, PK: $K_i = 0.02$ nM),^{173,174} der als einziger direkter Plm-Inhibitor die klinische Entwicklungsphase II erreicht hat.^{174,177–179} Die Ergebnisse dieser Studien wurden in der Literatur ausführlich diskutiert und werden hier lediglich kurz zusammengefasst.² In Vollblut zeigte die Verbindung **25** eine stärkere antifibrinolytische Wirkung als Aprotinin und Txa ($IC_{50} = 150$ nM, 345 nM, bzw. 2750 nM).¹⁷⁴ Aufgrund einer Hemmwirkung gegenüber FXa und FXIa ($K_i = 45$ nM bzw. 18 nM) wurde zudem eine moderate antithrombotische Wirkung festgestellt.¹⁷⁸ Da bei operativen Eingriffen oftmals sowohl Antifibrinolytika als auch Antikoagulanzen verabreicht werden, könnte eine schwache Hemmung der Gerinnungsproteasen sogar vorteilhaft sein.² In einem Hundemodell wurde eine mit Aprotinin vergleichbare Verringerung des Blutverlustes bei Herzoperationen mit CPB festgestellt.¹⁷⁷ Diese Ergebnisse wurden in einer Phase IIa Studie mit 32 Patienten bestätigt, wobei ebenfalls eine signifikante Verringerung des perioperativen Blutverlustes bei Herzoperationen nachgewiesen wurde.¹⁸⁰ Die Entwicklung wurde jedoch in der Phase IIb abgebrochen, da bei zwei Patienten starke Nebenwirkungen auftraten, die jedoch nicht näher erläutert wurden.¹⁸¹

Durch den Einbau von Homo-4-piperidylalanin in P2-Position konnte das Selektivitätsprofil der 4-Amba-Derivate optimiert und die Wasserlöslichkeit verbessert werden. Beispielsweise inhibiert die Verbindung **26** Plm und PK mit Hemmkonstanten von 0.25 nM bzw. 1.5 nM, während die K_i -Werte für andere trypsinartige Serinproteasen oberhalb von 130 nM liegen.¹⁷⁵ Diese Verbindungen wurden jedoch nicht weiterentwickelt.

1.4.3.4. Makrozyklische Inhibitoren

In unserer Arbeitsgruppe wurden zur Verbesserung der Plm-Selektivität makrozyklische Derivate der Verbindung **25** hergestellt (**Abbildung 11A**).^{182–184} Sie besitzen eine gemeinsame Grundstruktur aus einem P4-Sulfonamid-Rest, einer aromatischen P3-D-Aminosäure, einer ebenfalls aromatischen P2-L-Aminosäure sowie einer 4-Amba-Gruppe in P1-Position.

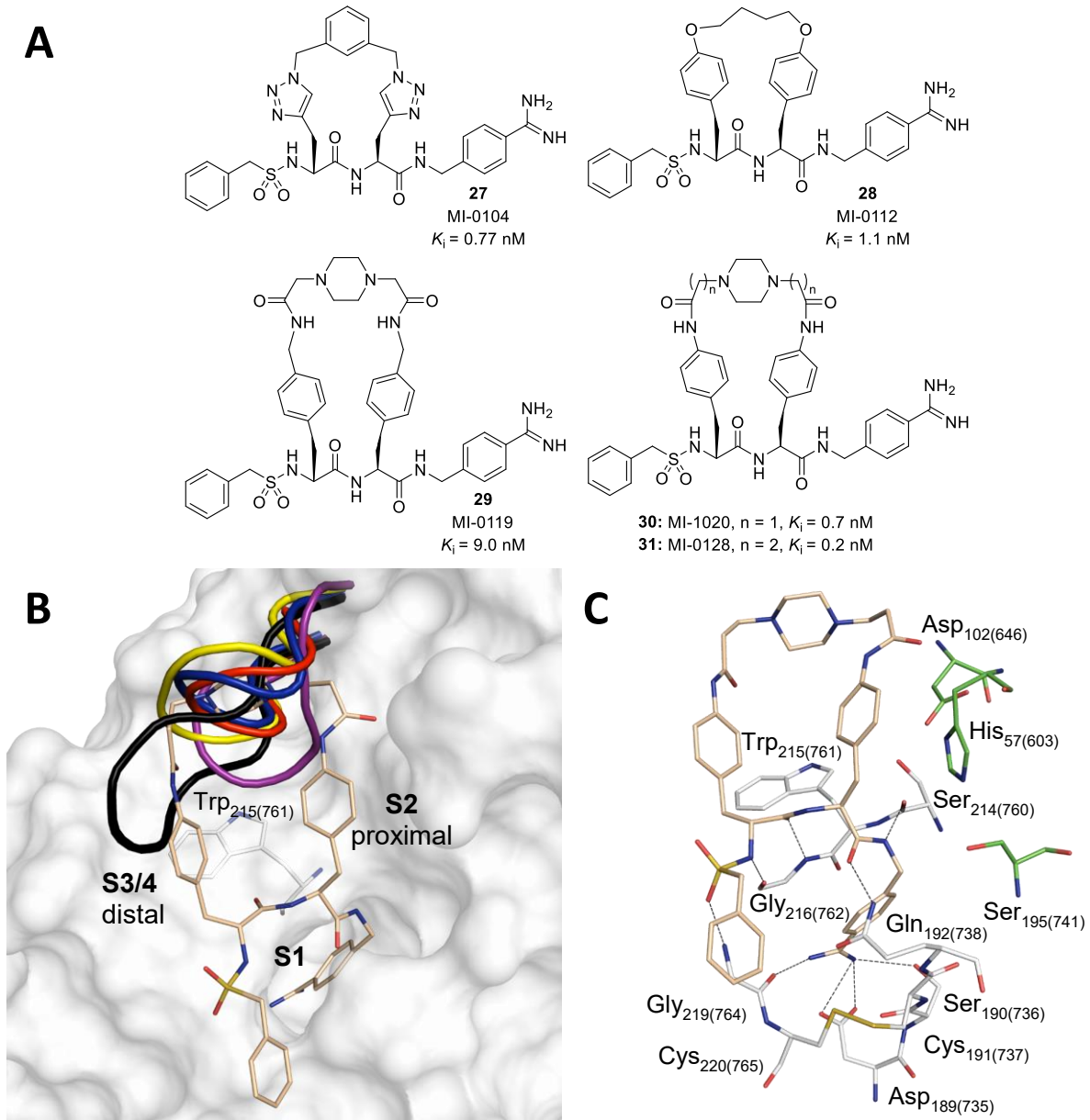


Abbildung 11: Makrozyklische Inhibitoren: Verbindungen 27 - 31. A) Strukturen und Hemmwirkungen der Plm-Hemmstoffe **27** - **29**,¹⁸⁴ sowie **30** und **31**.¹⁸² B) Computermodell des Inhibitors **31** im Komplex mit μ Plm (weiße Oberfläche und weiße C-Atome, PDB: 1BU1)^{65,66} Die überlagerten 99- β -hairpin-loops der verwandten, trypsinartigen Serinproteasen aktiviertes Protein C (aPC, rot, PDB: 1AUT),⁶⁷ FXa (blau, PDB: 2PR3),⁶⁹ FXIa (violett, 1ZSJ),⁷⁰ Thrombin (gelb, PDB: 1K22)⁷² und uPA (schwarz, PDB: 1VJA)⁷³ sind als *Cartoon* dargestellt. Durch das Fehlen des 99-Schleife besitzt Plm ein offenes aktives Zentrum und toleriert daher die Bindung des sterisch anspruchsvollen Inhibitors. C) Darstellung der potenziellen polaren Wechselwirkungen des Inhibitors **31** im Komplex mit μ Plm (grüne C-Atome: katalytische Triade).

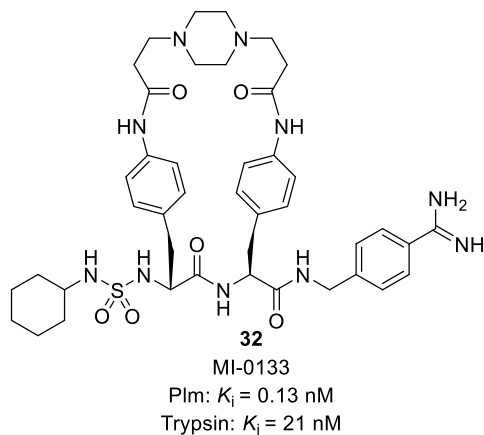
1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Die Seitenketten der P3- und P2-Reste wurden durch unterschiedliche Linkersegmente miteinander verknüpft, um einen sterisch anspruchsvollen zentralen Makrozyklus zur Adressierung der besonders offenen S4-S2-Bindungsregion des Plm zu erhalten. In einer ersten Inhibitorserie wurden die wirksamen Verbindungen **27** - **29** hergestellt, die bereits eine hohe Plm-Selektivität gegenüber Thrombin, FXa und aPC sowie mit Ausnahme der Verbindung **29** auch gegenüber PK besitzen.¹⁸⁴ Aufgrund der hydrophoben Linkersegmente war die Wasserlöslichkeit der Inhibitoren **27** und **28** jedoch relativ gering. Durch den Einbau eines *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linkers in den Hemmstoff **29** konnte die Löslichkeit jedoch signifikant verbessert werden. In einer Folgearbeit wurde der Makrozyklus weiter optimiert, wobei eine Abhängigkeit der Plm-Hemmwirkung von der Länge des Linkersegments festgestellt wurde.¹⁸² Die Verbindungen **30** und **31** besitzen eine besonders starke Plm-Affinität und sind ferner selektive Inhibitoren, da sie andere trypsinartige Serinproteasen lediglich mit K_i -Werten $> 10 \mu\text{M}$ hemmen (Thrombin, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, sowie tPA, uPA und aPC).¹⁸² Eine etwas geringere Selektivität wurde gegenüber PK ($K_i = 0.3 \mu\text{M}$ bzw. $1 \mu\text{M}$) und vor allem gegenüber Trypsin ($K_i = 63 \text{ nM}$ bzw. 38 nM) festgestellt.¹⁸² In einem tPA-induzierten Fibrinolyseassay wurde für beide Inhibitoren eine starke antifibrinolytische Aktivität erhalten ($\text{IC}_{50} = 280 \text{ nM}$ bzw. 180 nM), wobei keine Anzeichen für nennenswerte antithrombotische Effekte beobachtet wurden (*activated partial thromboplastin time* (aPTT), *thrombin time* (TT) und *prothrombin time* (PT) jeweils $> 100 \mu\text{M}$). Ferner erwiesen sich die Inhibitoren bei der Inkubation mit Leber-Mikrosomen als sehr stabil und zeigten darüber hinaus nur geringe Bindungsaffinitäten für die untersuchten Ionenkanäle und CYP-450-Enzyme.¹⁸² In der **Abbildung 11B** wird ein Computermodell der Verbindung **31** im Komplex mit μPlm gezeigt, deren Makrozyklus in den S3/4- und S2-Taschen bindet. Anhand der überlagerten 99- β -*hairpin-loops* anderer trypsinartiger Serinproteasen wurden abstoßende Wechselwirkungen mit dem Linkersegment postuliert, die zur Erklärung der hervorragenden Plm-Selektivität der makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren vorgeschlagen wurden. Wie in **Abbildung 11C** gezeigt wird, bindet der 4-Amba-Rest der computergenerierten Pose in der S1-Tasche und bildet zahlreiche polare Kontakte mit den Resten Gly219(764), Asp189(735), Ser190(736) und Gln192(738) aus,¹⁸² die von Kristallstrukturen anderer substratanaloger Inhibitoren im Komplex mit trypsinartigen Serinproteasen wie Thrombin, FXa, uPA und Trypsin bekannt sind. Der P2-Baustein wechselwirkt über das Carbonyl-O-Atom mit der Seitenkette des Gln192(738). Über das Peptidrückgrat interagiert der P3-Baustein in einer antiparallelen β -Faltblatt-Anordnung mit Gly216(764), während die Sulfonamidgruppe des P4-Restes eine Wechselwirkung mit Gly219(765) ausbildet.

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Der vermutete Bindungsmodus und die davon abgeleitete Selektivitätshypothese wurden von einer später veröffentlichten Kristallstruktur des Inhibitors **32** (Plm $K_i = 0.1$ nM, Trypsin $K_i = 21$ nM) im Komplex mit Trypsin gestützt, dessen 99-Schleife den Makrozyklus in eine rotierte Konformation zwingt (**Abbildung 12**); dies verringert die Bindungsaffinität im Vergleich zu Plm. Jedoch werden dabei vermutlich vorteilhafte VAN DER WAALS-Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Leu99 ausgebildet, die bei anderen trypsinartigen Serinproteasen aufgrund ihrer abweichenden Reste in dieser Position nicht möglich sind.¹⁸³ Dies könnte die noch relativ hohe Trypsinaffinität erklären.

A



B

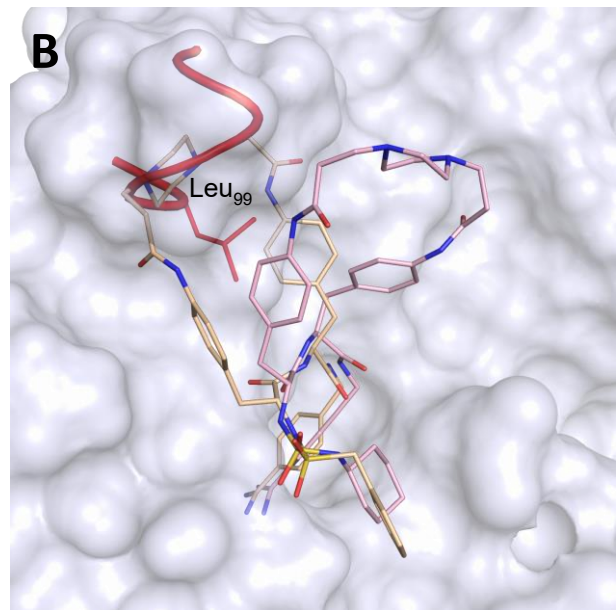


Abbildung 12: Kristallstruktur: Verbindung 32 im Komplex mit Trypsin. A) Struktur und Hemmwirkung des Inhibitors.¹⁸² B) Kristallstruktur des Inhibitors **32** (rosa C-Atome) im Komplex mit bovinem Trypsin (blaugraue Oberfläche, PDB:5EG4)¹⁸³ in Überlagerung mit dem Computermodell der Verbindung **31** (beige C-Atome)¹⁸² in μ Plm. Im Vergleich zum Hemmstoff **31** wird das makrozyklische Kernsegment des Inhibitors **32** durch den 99-loop des Trypsins (roter Cartoon und rote C-Atome) in eine rotierte Konformation gezwungen.¹⁸³

Unter physiologischen Bedingungen spielt Trypsin lediglich im Verdauungstrakt eine relevante Rolle. Daher ist es bei der Entwicklung intravenös verabreichter Antifibrinolytika nicht zwingend erforderlich eine hohe Trypsinselektivität zu erreichen. Dennoch wurde mit weiteren Strukturvariationen in P1- und P4-Position versucht die verbleibende Trypsinaffinität der makrozyklischen Inhibitoren zu senken.¹⁸³ Exemplarisch sind in der **Abbildung 13** die hochaktiven 4-Amba-Derivate **32 - 35** sowie die *p*-Xylylendiamin (*p*-Xda)-Analoge **36 - 40** gezeigt, die eine verringerte Trypsin-Hemmung aufweisen.^{183,185} Der Austausch der P1-Amidino-Gruppe gegen einen Aminomethyl-Rest wirkt sich generell nachteilig auf die Affinität gegenüber allen trypsinartigen Serinproteasen aus. Dieser Effekt ist jedoch für Plm etwas schwächer ausgeprägt. So konnte mit den *p*-Xda-Derivaten unter Erhalt einer starken Plm-Hemmung eine deutliche Selektivitätssteigerung erreicht werden. Die beste Kombination aus Plm-Hemmung und -Selektivität besitzt der Inhibitor **40** (MI-2011, Plm: $K_i = 0.6$ nM, Trypsin: $K_i = 1541$ nM, PK, Thrombin, FXa und aPC: $K_i > 36$ μ M).¹⁸⁵

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Bisher wurden die verbesserten makrozyklischen Inhibitoren noch nicht in Tiermodellen geprüft. Jedoch wurden in unserer Arbeitsgruppe vor dem Beginn dieser Promotion die in P4-Position modifizierten Derivate **41** - **44** im Rahmen einer Masterarbeit hergestellt, jedoch nicht vollständig enzymkinetisch charakterisiert.¹⁸⁶

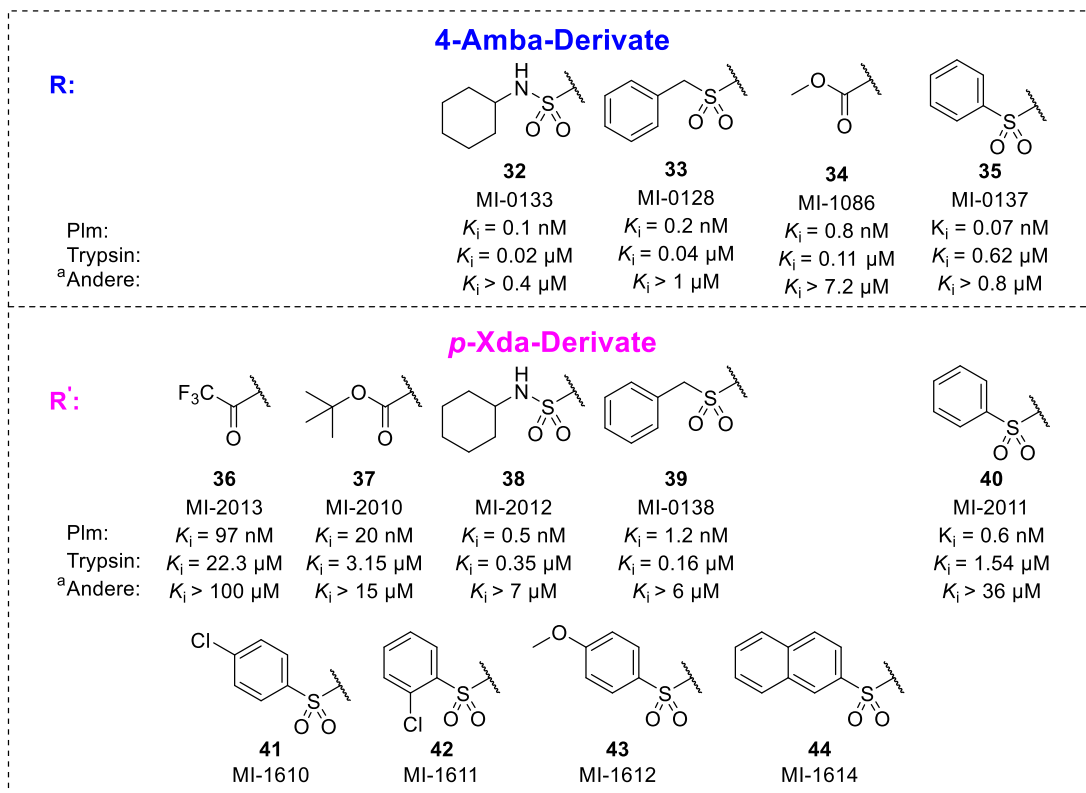
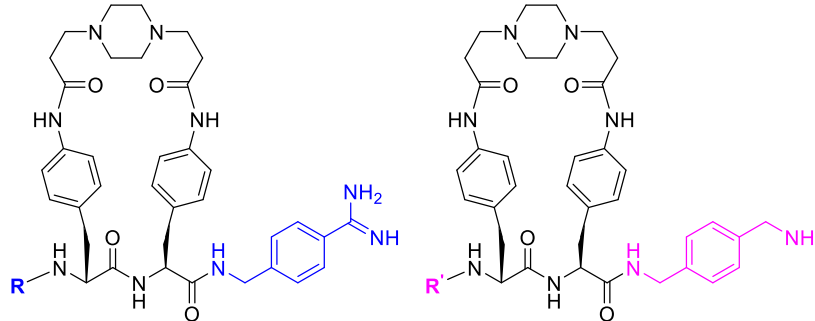


Abbildung 13: Verbesserte makrozyklische Inhibitoren: Verbindungen 32 - 44. Strukturen der P1-4-Amba-Derivate **32** - **35**^{182,183,185} und der P1-*p*-Xda-Derivate **36** - **40**,^{183,185} sowie **41** - **44**.¹⁸⁶ Die *p*-Xda-Derivate besitzen ein verbessertes Selektivitätsprofil. ^aPlasmakallikrein (PK), Gerinnungsfaktor Xa (FXa), Thrombin (FIIa), aktiviertes Protein C (aPC).

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

1.4.3.5. Weitere Plm-Inhibitoren

Neben den oben vorgestellten Verbindungen wurden weitere Plm-Inhibitoren unterschiedlicher Strukturtypen beschrieben, von denen hier nur einige wenige Beispiele übersichtshalber erwähnt werden. Für das zyklische Ketonderivat **45**,¹⁸⁷ das substituierte Lys-Nitril **46**¹⁸⁸ und das Arginal **47**¹⁸⁹ wurden kovalent-reversible Bindungsmodi postuliert, wobei letzteres ein Halbacetal mit dem katalytisch aktiven Ser-Rest des Plm ausbilden soll (**Abbildung 14**). Im Gegensatz dazu ist das Chlormethylketon **48**¹⁹⁰ ein irreversibler Inhibitor. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind Chlormethylketone jedoch für die Wirkstoffentwicklung ungeeignet.^{2,45}

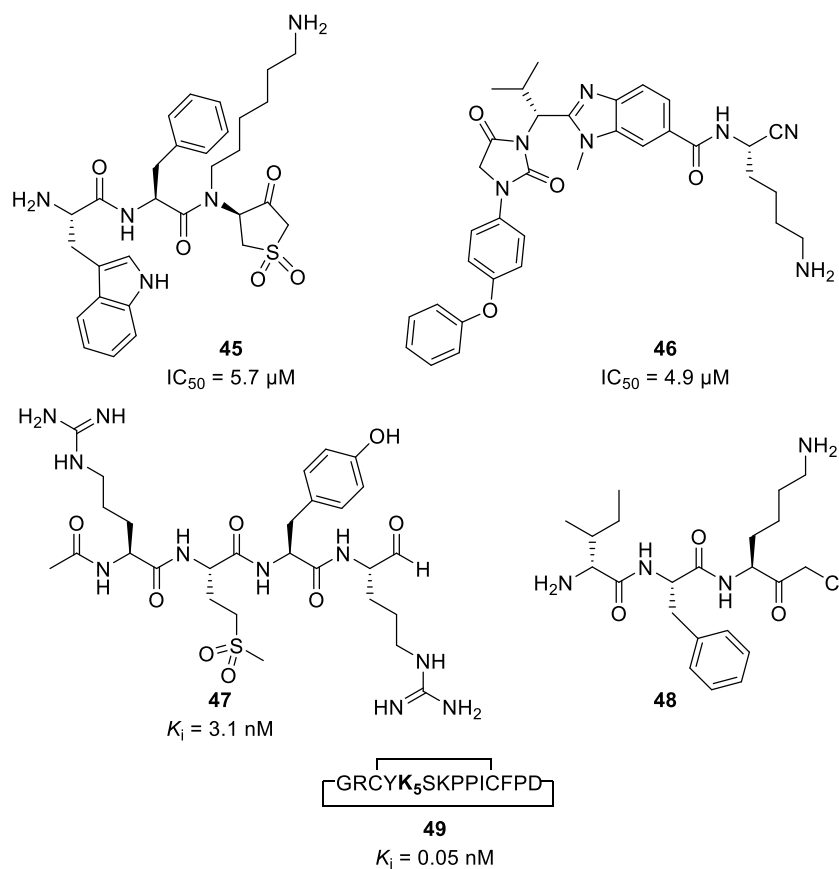


Abbildung 14: Weitere Plasminhemmstoffe: Verbindungen 45 - 49. Strukturen und Hemmwirkungen der Inhibitoren **45**,¹⁸⁷ **46**,¹⁸⁸ **47**¹⁸⁹ **48**,¹⁹⁰ und **49**.¹⁹¹ Die Primärstruktur der peptidischen bicyklischen Verbindung **49** ist im Einbuchstabencode angegeben. Die *head-to-tail*-Zyklisierung sowie die intramolekulare Disulfidbrücke sind als schwarze Linien dargestellt. Der hervorgehobene Lys-Rest K₅ bindet in der S1-Tasche des aktiven Zentrums.²

Der hochwirksame Plm-Inhibitor **49** ($K_i = 0.05 nM$) wurde von dem peptidischen bicyklischen *sunflower trypsin inhibitor* (SFTI) abgeleitet, der zur BOWMAN-BIRK-Familie der Serinproteaseinhibitoren gehört.¹⁹¹ Er besteht aus 14 Aminosäuren und besitzt neben einer *head-to-tail*-Zyklisierung eine zusätzliche intramolekulare Disulfidbrücke. Im Komplex mit μPlm wird seine Konformation durch eine Vielzahl unterschiedlicher intra- und intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Er ist ein sehr selektiver Plm-Hemmstoff und besitzt eine deutlich reduzierte Hemmwirkung auf Trypsin und verwandte trypsinartige

1.4. Plasmininhibitoren und Antifibrinolytika

Serinproteasen ($K_i > 50 \mu\text{M}$ für FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, Thrombin, tPA, uPA, PK und Matriptase).¹⁹¹ In humanem Plasma wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 200 nM oder 400 nM eine 90 %ige bzw. vollständige Fibrinolyseinhibierung erreicht. Im Gegensatz dazu zeigte die Referenzsubstanz Aprotinin unter identischen Bedingungen lediglich eine 25 %ige bzw. 70 %ige Fibrinolysehemmung. Die Kristallstruktur des Inhibitors **49** im Komplex mit μPlm (PDB: 6D3X)¹⁹¹ zeigt dessen komplexen Bindungsmodus auf, der hier jedoch nicht diskutiert wird.² Weitere unselektive Plm-Inhibitoren wurden von AL-HORANI *et al.* in einem umfassenden Übersichtsartikel beschrieben.⁴⁵

2. Zielsetzung

2.1. Aufgabenstellung Teil A

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits vor Beginn dieser Promotion makrozyklische Plm-Inhibitoren entwickelt, die in der S4-S1-Region des aktiven Zentrums binden (auch als ungestrichene Seite oder *non-primed site* bezeichnet) und aufgrund ihrer sterisch anspruchsvollen Struktur eine hohe Plm-Selektivität zeigen. Unter diesen Hemmstoffen besitzt die im Abschnitt 1.4.3.4. vorgestellte Verbindung **40** (MI-2011) das beste Gesamtprofil bezüglich ihrer Plm-Hemmwirkung und -Selektivität (**Abbildung 15**).¹⁸³ Darauf aufbauend wurden im Rahmen einer Masterarbeit bereits die in P4-Position substituierten Derivate **41 - 44** hergestellt, jedoch nicht vollständig enzymkinetisch charakterisiert.¹⁸⁶ Zur Ergänzung dieser Inhibitorserie sollten zusätzliche Analoga (*m*-Cl- und *m*-Methoxy) synthetisiert und dabei die Eignung einer neuen Schutzgruppenstrategie untersucht werden.

Um den Einfluss der Linkerlänge auf die Plm-Hemmwirkung zu ermitteln, sollten in einer zweiten Serie wiederum ausgehend vom Referenzinhibitor **40** zusätzliche Derivate mit verlängerten oder verkürzten Linkersegmenten hergestellt werden. Bislang wurden ausschließlich symmetrische *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linker verwendet, mit denen die Größe des makrozyklischen Kernsegments lediglich in Schritten von mindestens zwei Methylengruppen variiert werden konnte.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Daher sollte eine neuartige Synthesestrategie entwickelt werden, die den selektiven Einbau asymmetrischer *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linker ermöglicht und somit eine Variation der Linkerlänge um eine einzelne Methylengruppe erlaubt. Darüber hinaus sollten neuartige Makrozyklen synthetisiert werden, deren P4- und P2-Reste durch die beiden o. g. Linker-Typen miteinander verknüpft sind.

Die bereits vorhandenen Verbindungen **41 - 44** sowie alle im Rahmen dieser Promotion synthetisierten Inhibitoren sollten enzymkinetisch charakterisiert werden. Außerdem sollte in Zusammenarbeit mit einer australischen Gruppe (AG LAW, MONASH UNIVERSITY, Melbourne, AU) der im Jahr 2013 mittels Docking vorgeschlagene Bindungsmodus der Inhibitorklasse durch Röntgenkristallstrukturanalysen bestätigt werden.¹⁸²

2. Zielsetzung

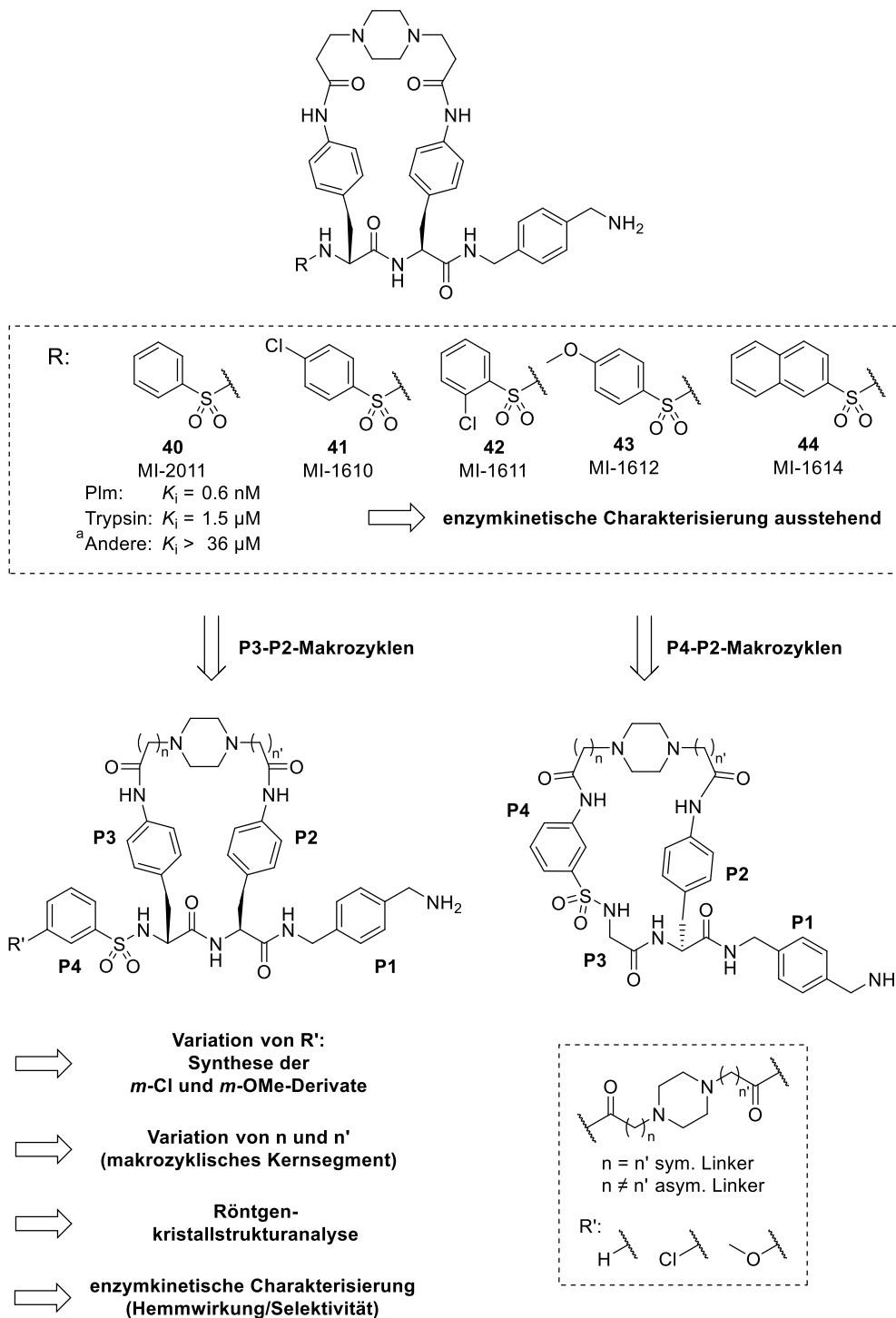


Abbildung 15: Strukturvariationen des Plasmininhibitors 40. Unter Variation des P4-Restes und des Linkersegments sollten makrozyklische Derivate der Referenzverbindung **40** synthetisiert und darüber hinaus erstmals Kristallstrukturen ausgewählter Inhibitoren im Komplex mit μPlm bestimmt werden; ferner sollten neuartige Hemmstoffe hergestellt werden, die mittels eines *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linkers zwischen den P4- und P2-Resten zyklisiert sind. Die vor Beginn dieser Arbeit hergestellten Verbindungen **41** - **44** sowie alle neuen Derivate sollten unter Verwendung von Plm und verwandten trypsinartigen Serinproteasen enzymkinetisch charakterisiert werden. ^aPlasmakallikrein (PK), Gerinnungsfaktor Xa (FXa), Thrombin (FIIa), aktiviertes Protein C (aPC).

2.2. Aufgabenstellung Teil B

Der Teil B dieser Arbeit beschreibt die Entwicklung von Plm-Inhibitoren, die in der S1-S3'-Region des katalytischen Zentrums binden. Da die im Teil A beschriebenen Hemmstoffe aufgrund ihrer sterisch anspruchsvollen Strukturen eine hohe Plm-Selektivität zeigen, sollte das Konzept der makrozyklischen Inhibitoren auf die S1'-S3'-Taschen übertragen werden (auch als gestrichene Seite oder *primed site* bezeichnet). Als Ausgangspunkt sollte der relativ unselektive Hemmstoff **11** (**YO-2**) dienen, dessen Kristallstruktur im Komplex mit μ Plm im Jahr 2017 bestimmt wurde. Zusätzlich zur S1-Tasche adressiert dieser die S1'-S2'-Region des aktiven Zentrums (**Abbildung 16**, vgl. Kapitel 1.4.3.2.).¹⁵⁵

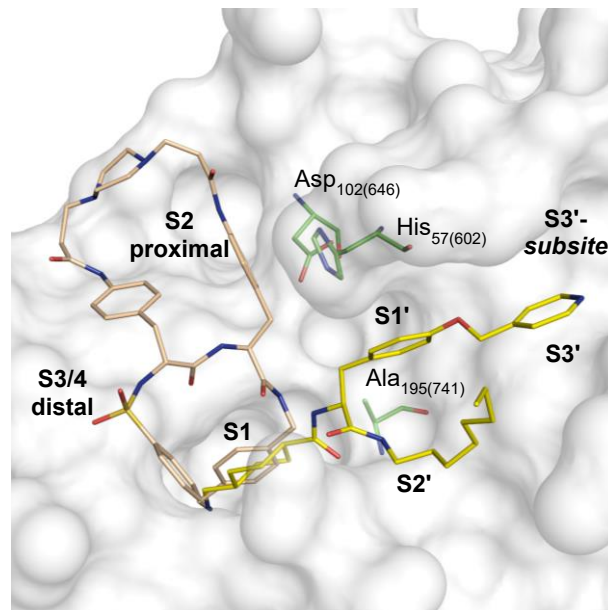


Abbildung 16: Kristallstrukturen: Referenzinhibitoren 40 und 11 im Komplex mit μ Plm. Es wird die im Rahmen dieser Promotion bestimmte Kristallstruktur des Inhibitors **40** (beige C-Atome) im Komplex mit einer stabilisierten Ser195(741)Ala-Mutante des μ Plm (weiße Oberfläche, grüne C-Atome: mutierte katalytische Triade) gezeigt. Als Überlagerung ist die Kristallstruktur des Referenzinhibitors **11** (gelbe C-Atome, PDB: 5UGD)¹⁹² im Komplex mit μ Plm abgebildet. Die beiden Hemmstoffe adressieren unterschiedliche Regionen des aktiven Zentrums, wobei lediglich die P1-Reste auf ähnliche Weise in der S1-Tasche binden.

Basierend auf der Verbindung **11** wurde die in **Abbildung 17** gezeigte makrozyklische Grundstruktur entwickelt. Da der P1-Txa-Rest der Referenzsubstanz mehrere polare Interaktionen mit Plm ausbildet und die Adressierung der S1'-S2'-Region ermöglicht, sollte dieser übernommen werden.¹⁵⁵ Im Gegensatz dazu sollte der verlängerte P1'-Tyr-Rest durch *p*-substituierte Phe-Derivate ersetzt werden, um eine Zyklisierung mittels Peptidkupplung zwischen einer Aminogruppe an deren Seitenkette und dem Carboxyl-Terminus eines geeigneten Linkers zu ermöglichen.

Alle hergestellten Inhibitoren sollten enzymkinetisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte der Bindungsmodus der Hemmstoff-Klasse in Zusammenarbeit mit der AG LAW mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt werden. Die neuen Verbindungen werden zur

2. Zielsetzung

Abgrenzung von den makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren des Teils A im Folgenden als makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren bezeichnet.

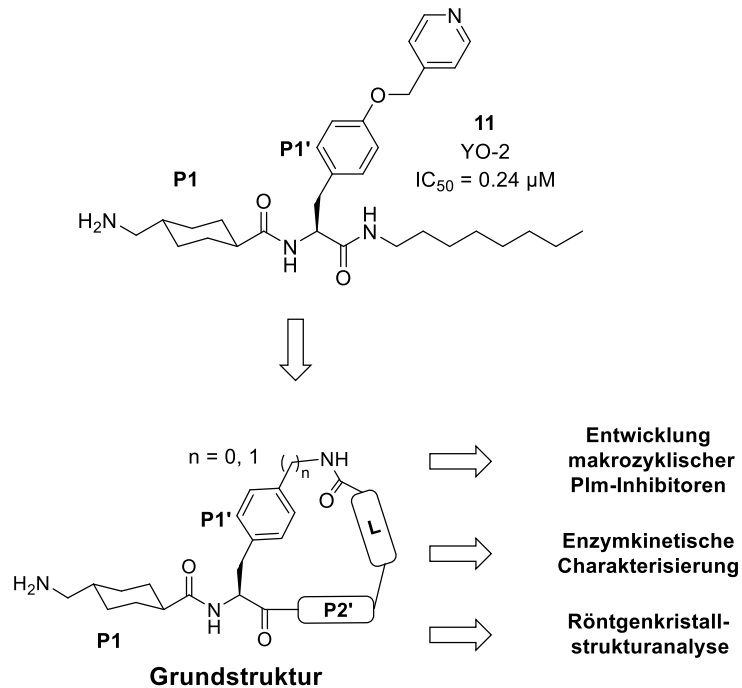


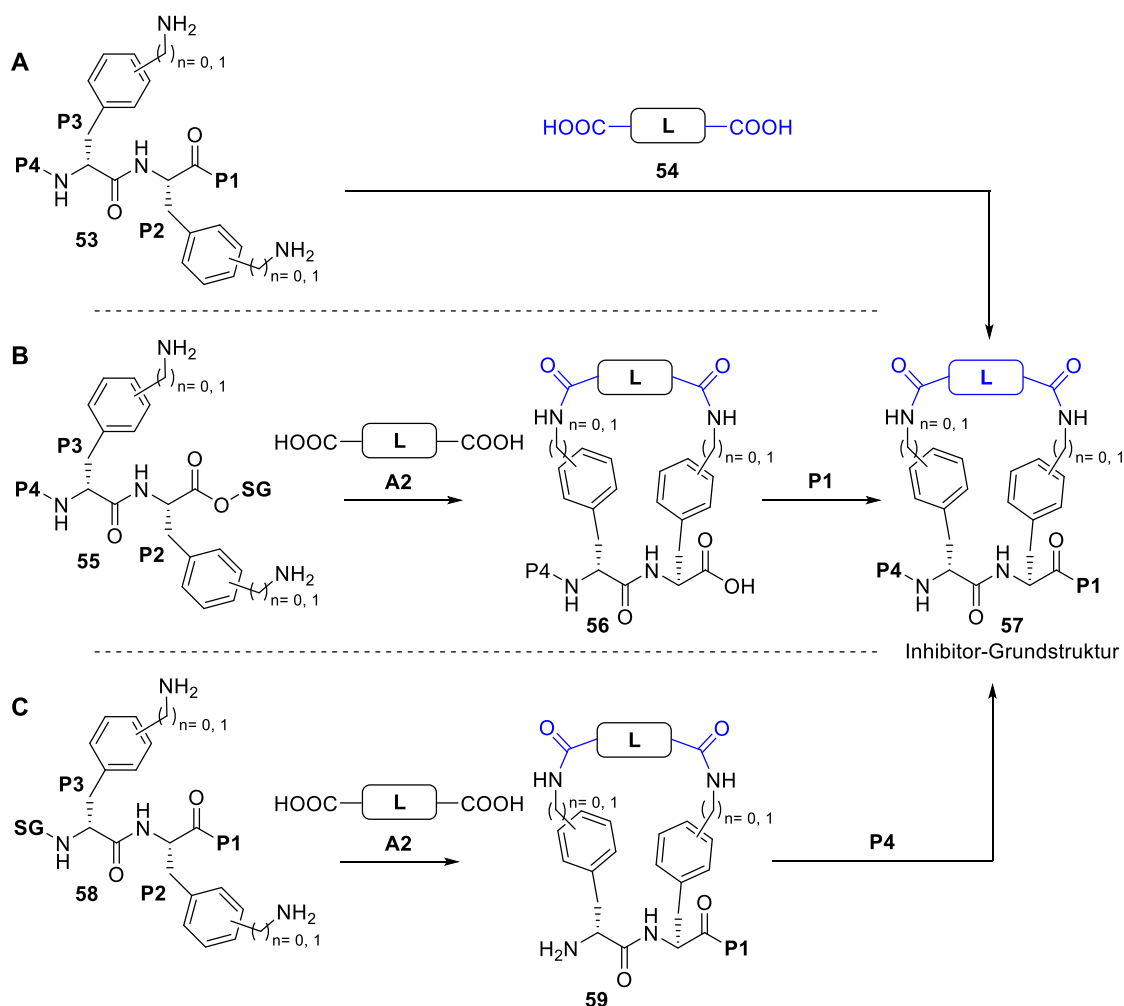
Abbildung 17: Grundstruktur der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren. Ausgehend von der Struktur des Referenzinhibitors **11**¹⁵⁵ sollten neuartige makrozyklische Plm-Hemmstoffe zur Adressierung der gestrichelten Seite des aktiven Zentrums entwickelt werden. Aufgrund der sterisch anspruchsvollen Makrozyklen sollte der neue Inhibitortyp idealerweise eine hohe Plm-Selektivität besitzen. Die Struktur sollte einen konstanten Txa-Rest in P1-Position, *p*-substituierte Phe-Derivate in P1'-Position, sowie variable P2'-Reste und Linkersegmente (L) enthalten.

3. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)

In diesem Kapitel werden die Entwicklung, Synthese und Charakterisierung makrozyklischer substratanaloger Plm-Inhibitoren zur Adressierung der S4-S1-Region des aktiven Zentrums beschrieben. Die hergestellten Hemmstoffe wurden von der Struktur der Referenzverbindung **40** abgeleitet und in drei Serien unterteilt (Serie 1: Verbindungen **I1** und **I2**, ergänzt durch die bereits zuvor synthetisierten Derivate **40 - 44**; Serie 2: Verbindungen **I3 - I6**; Serie 3: Verbindungen **I7** und **I8**). Im Folgenden wird zunächst die Synthese der Inhibitoren vorgestellt. Die Entwicklung und Charakterisierung der Verbindungen werden im Abschnitt 3.4. beschrieben.

3.1. Synthesestrategien A - D

Die Synthese der makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren wurde bisher im Wesentlichen nach drei unterschiedlichen Strategien durchgeführt (**Schema 1**).¹⁸²⁻¹⁸⁴



Schema 1: Bisher verwendete Synthesestrategien. Bei der Herstellung makrozyklischer substratanaloger Plm-Inhibitoren wurden bisher die Synthesestrategien A - C angewendet; SG: Schutzgruppe, L: Linker.¹⁸²⁻¹⁸⁴

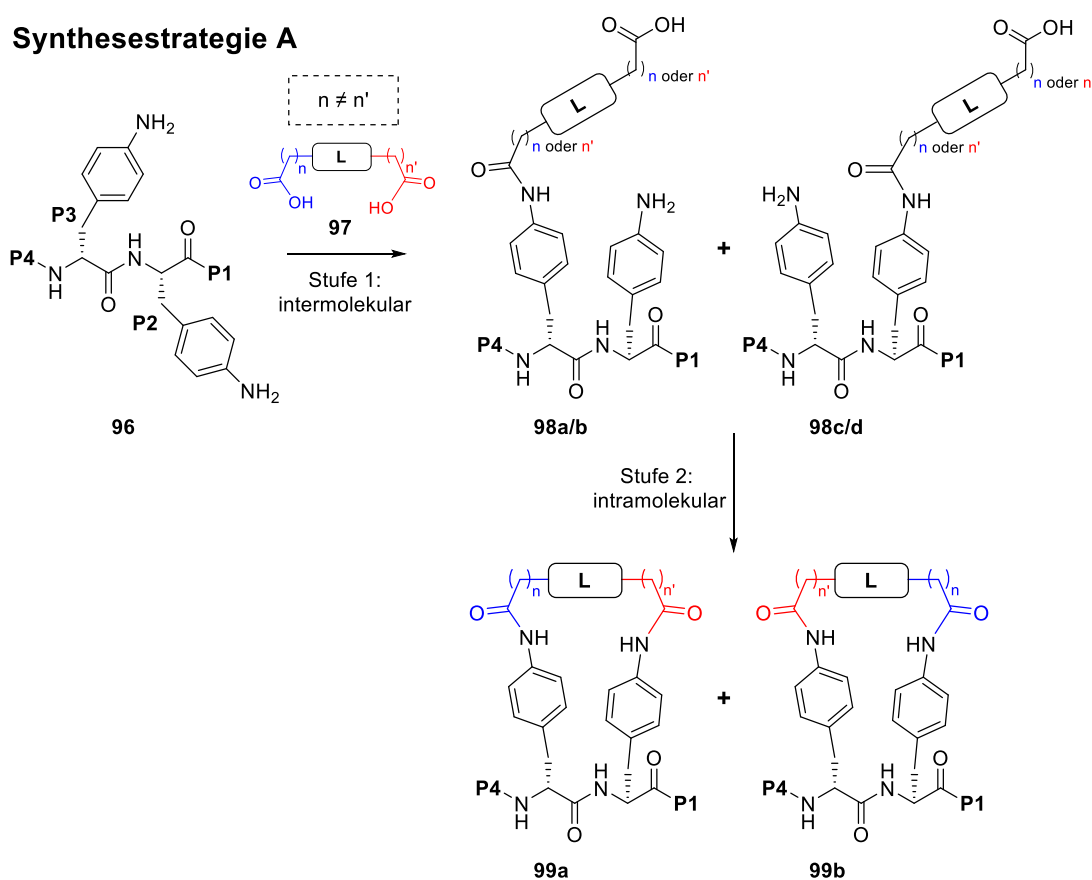
3.1. Synthesestrategien A - D

Dabei wurden azyklische Vorläuferpeptide (Verbindungen **53**, **55** und **59**) in zweistufigen Zyklisierungsreaktionen mit symmetrischen *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäure-Linkersegmenten (**54**) umgesetzt. Da die Synthesen in der Literatur bereits detailliert beschrieben wurden, wird im Folgenden lediglich ein kurzer Überblick über die generelle Vorgehensweise gegeben. Bei der Strategie A werden Vorläuferpeptide verwendet, die bereits die vollständige Sequenz des Inhibitorrückgrats enthalten (Struktur **53**, Reste P4-P3-P2-P1, im Folgenden als P4-P1-Segmente bezeichnet).¹⁸³ Durch Kupplung des Linkersegments **54** wird daraus die Grundstruktur der makrozyklischen Inhibitoren erhalten. Diese Vorgehensweise eignet sich besonders gut zur effizienten Variation des Linkersegments. Im Gegensatz dazu ist die Strategie B besonders für die Einführung unterschiedlicher P1-Bausteine geeignet. Hier werden C-terminal geschützte P4-P3-P2-Segmente (Struktur **55**) durch Umsetzung mit dem Linker **54** zyklisiert. Nach Entfernung der Schutzgruppe am P2-Rest wird der jeweilige P1-Baustein angekuppelt. Die Strategie C eignet sich besonders zur Variation der P4-Gruppe. Hier werden N-terminal geschützte P3-P2-P1-Segmente (**58**) mit dem Linkerbaustein (**54**) zyklisiert, bevor die finale Kupplung des P4-Bausteins erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inhibitoren **I1** - **I3** gemäß der Strategie A synthetisiert.

3.1. Synthesestrategien A - D

Vor dem Beginn dieser Arbeit wurde in der AG STEINMETZER bereits eine Vielzahl makrozyklischer Inhibitoren mit peptidisch gekuppelten Linkersegmenten hergestellt. Dabei wurden bislang ausschließlich symmetrische *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäure-Linker genutzt, sodass die Größe der Makrozyklen bei gleichen P4-P1-Segmenten lediglich in Schritten von mindestens zwei Methylengruppen variiert werden konnte. Für eine ungeradzahlige Änderung der Ringgröße sind dagegen asymmetrische Linkerbausteine erforderlich. Die zuvor beschriebenen Methoden mit sequenzieller Kupplung einer ungeschützten Dicarbonsäure an die P3- und P2-Seitenketten sind für den Einbau asymmetrischer Linkerbausteine jedoch ungeeignet, weil dabei zwei unterschiedliche Produkte entstehen würden (**Schema 2**).

Ausgehend vom Dianilin **96** würde in einer zweistufigen Reaktionsfolge zunächst ein intermolekularer Kupplungsschritt zwischen einer der beiden Carboxylgruppen des asymmetrischen Linkers **97** und der Seitenkette des P2- oder des P3-Restes erfolgen, wobei die Intermediate **98a-d** entstünden. Im darauffolgenden intramolekularen Zyklisierungsschritt würden *in situ* die Konformationsisomere **99a** und **99b** entstehen.

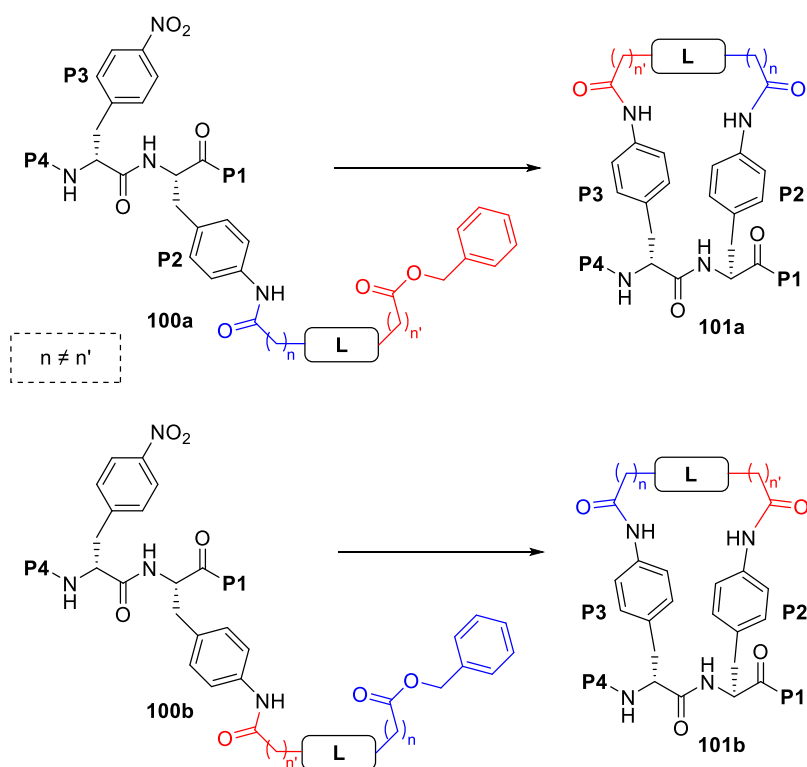


Schema 2: Synthesestrategie A: Unselektiver Einbau asymmetrischer Linkersegmente. Die Zyklisierungsreaktion besteht aus zwei Stufen und enthält einen inter- und einen intramolekularen Reaktionsschritt. Der selektive Einbau eines asymmetrischen Linkersegments ist mit dieser Synthesestrategie nicht möglich.

3.1. Synthesestrategien A - D

Der selektive Einbau eines asymmetrischen Linkersegments erfordert die Inaktivierung einer der beiden Carboxylgruppen des Linkersegments mit einer geeigneten Schutzgruppe. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit die neue Synthesestrategie D entwickelt (**Schema 3**), bei der ein einfach benzylgeschützter, asymmetrischer Linkerbaustein bereits vor der Zyklisierung an die P2-Seitenkette eines geeigneten P2-P1-Segments gekuppelt wird (Intermediate **100a** bzw. **100b**). Durch katalytische Hydrierung kann simultan die Nitrogruppe reduziert und die Benzylschutzgruppe abgespalten werden. Danach können die Inhibitoren **101a** bzw. **101b** durch einstufige intramolekulare Zyklisierungsreaktionen selektiv erhalten werden, wodurch sich die Strategie D von den bisher verwendeten Strategien A - C unterscheidet. Ein Nachteil dieser Methode ist die größere Anzahl erforderlicher Reaktionsschritte.

Synthesestrategie D



Schema 3: Synthesestrategie D: Selektiver Einbau asymmetrischer Linkersegmente.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.1. P3-P2-Makrozyklen mit symmetrischen Linkersegmenten

3.2.1.1. Überblick und allgemeine Erläuterungen (Inhibitoren I1 - I3)

Gemäß **Schema 4** wurden basierend auf der Referenzverbindung **40** die 3-Methoxy- und 3-Chlorderivate **I1** und **I2** zur Ergänzung der bereits vor Beginn dieser Promotion hergestellten Verbindungen **41 - 44** synthetisiert, die zusammen die Inhibitorserie 1 bilden. Diese Hemmstoffe besitzen symmetrische *N,N'*-Piperazinyldipropansäureamid-Linker und unterscheiden sich lediglich in der Substitution des P4-Restes. Darüber hinaus wurde der Inhibitor **I3** hergestellt, der einen verlängerten *N,N'*-Piperazinyldibutansäureamid-Linker enthält. Dieses Linkersegment wurde bislang noch nicht zur Synthese makrozyklischer substratanaloger Inhibitoren verwendet. Aufgrund seines erweiterten Makrozyklus ist der Hemmstoff **I3** der Inhibitorserie 2 zuzuordnen, innerhalb derer ausgehend von der Referenzsubstanz **40** die Länge des Linkersegments variiert wurde.

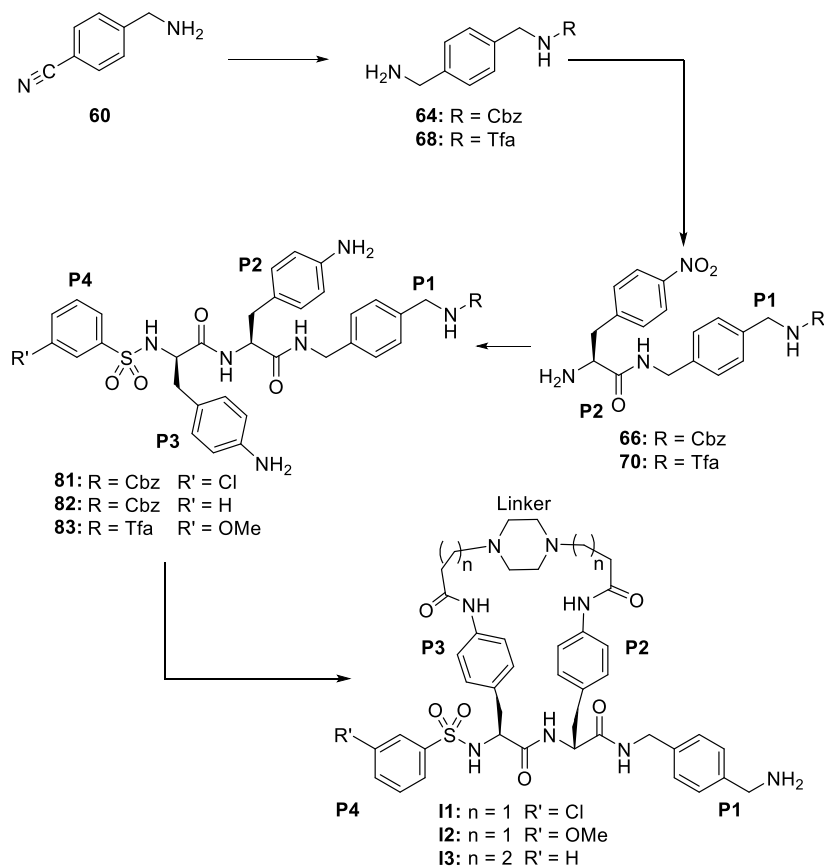
Die Synthesen erfolgten gemäß der Strategie A. Am P1-Baustein wurden zwei unterschiedliche Schutzgruppen für die terminale Aminogruppe verwendet. Zur Herstellung der Verbindungen **I1** und **I3** wurde eine Cbz-Gruppe genutzt, wobei die Aufreinigung der besonders hydrophoben Zwischenstufen oft durch eine geringe Löslichkeit erschwert wurde. Daher wurde zur Herstellung der Verbindung **I2** auf, die bereits in früheren Arbeiten verwendete, stärker polare Trifluoracetyl (Tfa)-Schutzgruppe zurückgegriffen.^{183,185}

Zunächst wurde 4-Cyanobenzylamin (Verbindung **60**) in jeweils mehreren Schritten zu den Cbz- bzw. Tfa-geschützten P1-Bausteinen **64** bzw. **68** umgesetzt. An diese Intermediate wurde dann der P2-Rest 4-Nitrophenylalanin gekuppelt (Verbindungen **66** bzw. **70**). Die Kupplung entsprechender P4-P3-Bausteine und die darauffolgende Reduktion der Nitrogruppen ergaben die P4-P1-Segmente **81 - 83**, die in zweistufigen Zyklisierungsreaktionen mit einem symmetrischen *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäure-Linker umgesetzt wurden. Die Abspaltung der P1-Schutzgruppe lieferte die finalen Inhibitoren **I1 - I3**.

Zum Schutz der terminalen Aminogruppe des *p*-Xda-Restes wurde bisher ausschließlich die Tfa-Schutzgruppe verwendet.^{183,185,186} Ihre Abspaltung erfolgt üblicherweise durch Verseifung im stark alkalischen Milieu, z. B. in einer Mischung aus aq. NaOH-Lösung und 1,4-Dioxan. Aufgrund der guten Löslichkeit der Tfa-geschützten Inhibitor-Vorstufen in Lösungsmittelgemischen mit Wasseranteil war die finale Abspaltung der Schutzgruppe durch einfaches Rühren bei RT möglich.^{183,185,186} Die stark basischen Bedingungen begünstigen jedoch bei längeren Reaktionszeiten prinzipiell die Razemisierung der Stereozentren. Daher

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

wurde versucht bei möglichst kurzen Reaktionszeiten nur geringe Überschüsse an NaOH-Lsg. zu nutzen. Unter diesen Bedingungen wurde bislang keine Razemisierung beobachtet.



Schema 4: Überblick zur Synthese der Inhibitoren I1 - I3 mit symmetrischen Linkern.

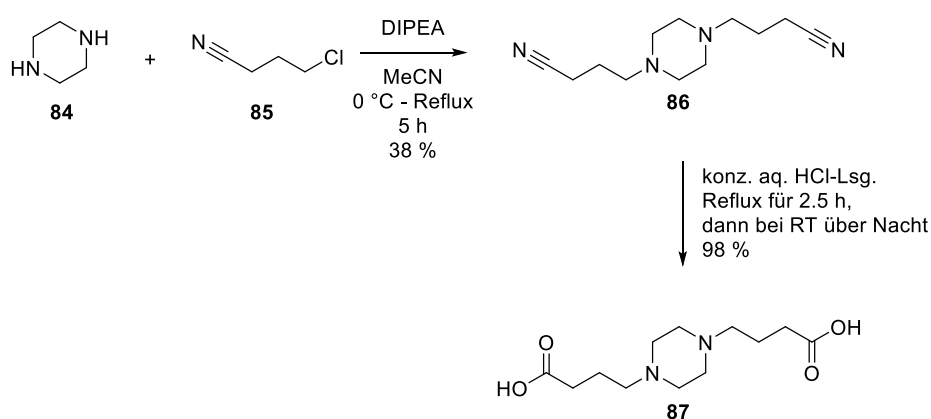
Im Rahmen dieser Arbeit sollte dennoch überprüft werden, ob die potenzielle Razemisierungsgefahr durch eine Änderung der Schutzgruppenstrategie ausgeschlossen werden könnte. Daher sollte die Synthese der Inhibitoren **I1** und **I3** unter Cbz-Schutz am P1-Rest erfolgen. Die Cbz-Schutzgruppe kann sowohl unter milden Bedingungen durch heterogene katalytische Hydrierung, z. B. in 90 % (v/v) aq. Essigsäure, als auch im stark sauren Milieu mittels 32 % (w/v) HBr in Eisessig abgespalten werden. Unter beiden Bedingungen ist eine Razemisierung unwahrscheinlich. Jedoch wiesen die relativ hydrophoben Cbz-geschützten Intermediate im Vergleich zu den hydrophileren Tfa-Analoga sowohl in organischen Lösungsmitteln wie DCM oder EA, als auch in Lösungsmittelgemischen mit Wasseranteil eine deutlich geringere Löslichkeit auf. Dies erschwerte die Reinigung der Cbz-geschützten Intermediate. So mussten bei deren wässrigen Aufarbeitungen häufig sehr große Volumina der organischen Phase von teils mehreren Litern zur Reinigung vergleichsweise kleiner Produktmengen verwendet werden. Die Isolierung der Intermediate mittels präparativer HPLC wurde insbesondere beim Injektionsschritt durch den Wasseranteil im Laufmittelgemisch erschwert. Zudem wurde die Entfernung von Lösungsmitteln *in vacuo* oft durch eine starke Schaumbildung beeinträchtigt, die bei den Tfa-Analoga nicht oder nur in sehr geringem Maße auftrat.

3.2.1.2. Beschreibung und Diskussion der Reaktionsschritte

Im Folgenden werden die bereits übersichtshalber beschriebenen Inhibitorsynthesen genauer betrachtet.

3.2.1.2.1. Symmetrische Linker (Verbindungen 87 und 88)

Das **Schema 5** zeigt die Herstellung des Linker-Bausteins **87**. Zunächst wurde Piperazin (Verbindung **84**) in einer S_N-Reaktion mit γ -Butyronitril (Verbindung **85**) zum symmetrisch-dialkylierten Baustein **86** umgesetzt.¹⁹³ Dieser wurde im zweiten Schritt zur *N,N'*-Piperazinyldibutansäure **87** hydrolysiert.



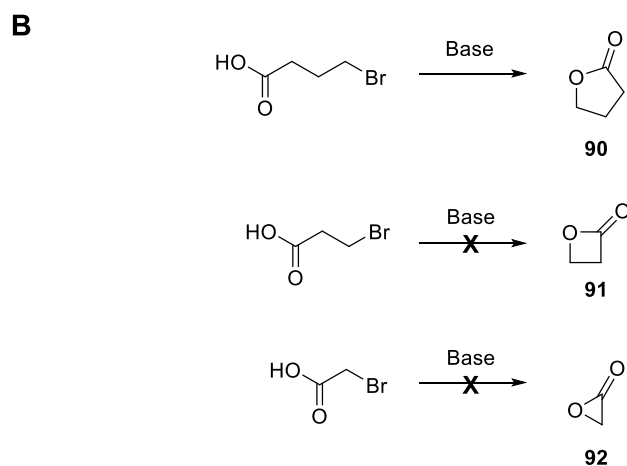
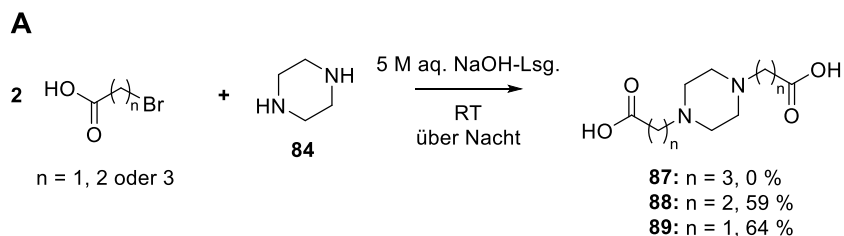
Schema 5: Synthese des symmetrisch dialkylierten Piperazin-Derivats 87.¹⁹³

Die bisher in der AG STEINMETZER genutzten Piperazinyldiessigsäure- und Piperazinyldipropansäure-Linker (Verbindungen **88** und **89**) wurden anders als die Verbindung **87** gemäß **Schema 6A** hergestellt.¹⁸³ Dabei wurde Piperazin in S_N-Reaktionen mit halogenierten Carbonsäuren umgesetzt (**Schema 6A**). Analoge Versuche zur Synthese der Verbindung **87** waren im Rahmen dieser Arbeit jedoch erfolglos, da in mehreren Wiederholungen kein Produkt mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte.

Unter den basischen Reaktionsbedingungen ist die in **Schema 6B** gezeigte Lactonisierung von 4-Brombutansäure denkbar, infolge derer das Edukt nicht mehr für eine Umsetzung mit Piperazin zur Verfügung stünde. Das erhaltene 5-Ring-Lacton **90** sollte im Vergleich zu den kleineren Analoga **91** und **92** eine hohe thermodynamische Stabilität besitzen und daher bevorzugt gebildet werden. Im Gegensatz dazu sind die kleineren, thermodynamisch weniger günstigen Lactone unter den verwendeten Reaktionsbedingungen vermutlich nicht oder nur in unbedeutendem Ausmaß gebildet worden, sodass die azyklischen halogenierten Carbonsäuren für eine Umsetzung mit Piperazin zur Verfügung standen. Dies würde erklären, warum die in der Literatur beschriebenen Synthesen der Derivate **88** und **89** erfolgreich waren, während die Herstellung der Verbindung **87** ausschließlich nach **Schema 5** gelang. Das

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

Piperazinyldipropansäure-Derivat **88** wurde bereits vor dem Beginn dieser Promotion im Rahmen einer Masterarbeit hergestellt und war in ausreichender Menge verfügbar.¹⁸⁵ Die Verbindung **89** wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet und wird hier lediglich vergleichend gezeigt.



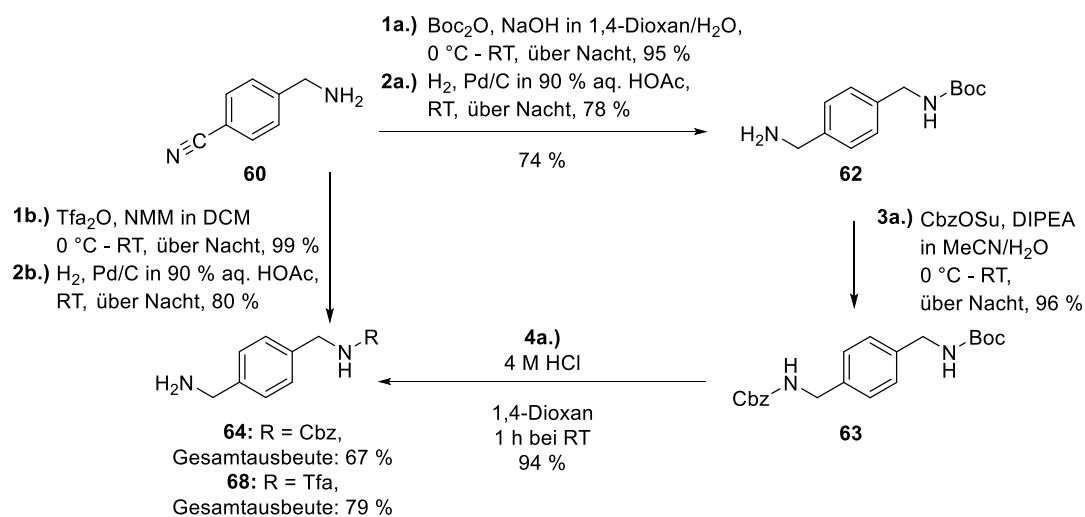
Schema 6: Die symmetrisch dialkylierten Piperazin-Derivate 87 - 89. A) Synthese der Verbindungen **88** und **89**^{182,183} und Syntheserversuche zur Verbindung **87**. B) Lactonisierung aliphatischer Bromcarbonsäuren.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.1.2.2. P1-Bausteine (Verbindungen 64 und 68)

Die Cbz- bzw. Tfa-geschützten P1-Bausteine wurden gemäß **Schema 7** hergestellt. Zur Synthese des Cbz-Derivates wurde das Edukt **60** zunächst unter Verwendung des Einführungsreagenzes Di-*tert*-Butyl-dicarbonat (Boc_2O) geschützt und dann mittels katalytischer Hydrierung in das Zwischenprodukt **62** überführt. Durch die Umsetzung mit Cbz-*N*-Hydroxysuccinimidester (CbzOSu) wurde das doppelt geschützte Intermediat **63** erhalten; die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe lieferte das Produkt **64**.

Im Gegensatz dazu wurde die Tfa-Schutzgruppe durch Umsetzung des Eduktes **60** mit Trifluoressigsäureanhydrid (Tfa_2O) eingeführt.¹⁸³ Nach einer katalytischen Hydrierung wurde der fertige *p*-Xda-Baustein **68** erhalten.



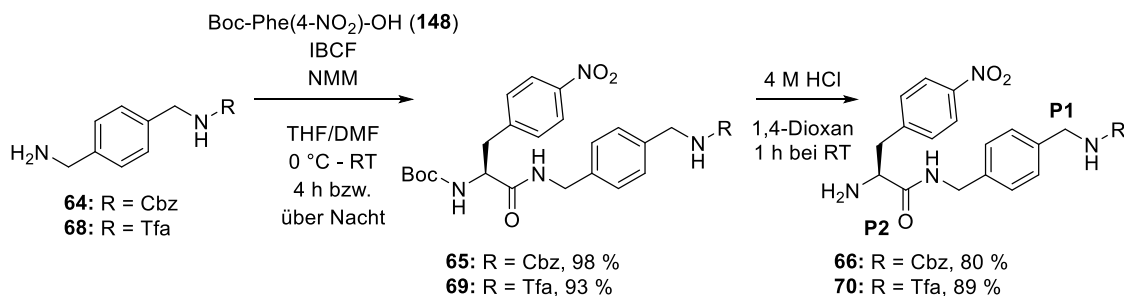
Schema 7: Synthese der geschützten P1-Bausteine 64 und 66.

Die Synthese des doppelt geschützten Intermediats **63** (Schritt 3a) wurde in Suspension durchgeführt. Dabei musste mehrmals Lösungsmittel nachdosiert werden, um eine ausreichende Durchmischung des Ansatzes zu ermöglichen. Nach vollständigem Umsatz erschwerte eine sehr starke Schaumbildung die Entfernung des wasserhaltigen Lösungsmittelgemisches *in vacuo*. Im Zuge der wässrigen Aufarbeitung erforderte die geringe Löslichkeit der Verbindung trotz einer Ansatzgröße von lediglich 5 g der Verbindung **62** den Einsatz von mehr als 2.5 L Ethylacetat. Aufgrund der hohen Ausbeute in diesem Schritt wurden die Reaktionsbedingungen bisher nicht optimiert. Im Gegensatz dazu traten bei der Synthese des Tfa-Analogons **68** weder eine Schaumbildung noch nennenswerte Löslichkeitsprobleme auf.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.1.2.3. P2-P1-Segmente (Verbindungen 66 und 70)

Die Synthese der P2-P1-Segmente wurde gemäß **Schema 8** durchgeführt. Zur Kupplung der P2-Aminosäure **148** (Boc-Phe(4-NO₂)-OH) an den P1-Baustein **64** bzw. **68** wurde das Mischanhydridverfahren nach SHIEH¹⁹⁴ unter Verwendung von Isobutylchloroformiat (IBCF) genutzt.



Schema 8: Synthese der P2-P1-Segmente 66 und 70.

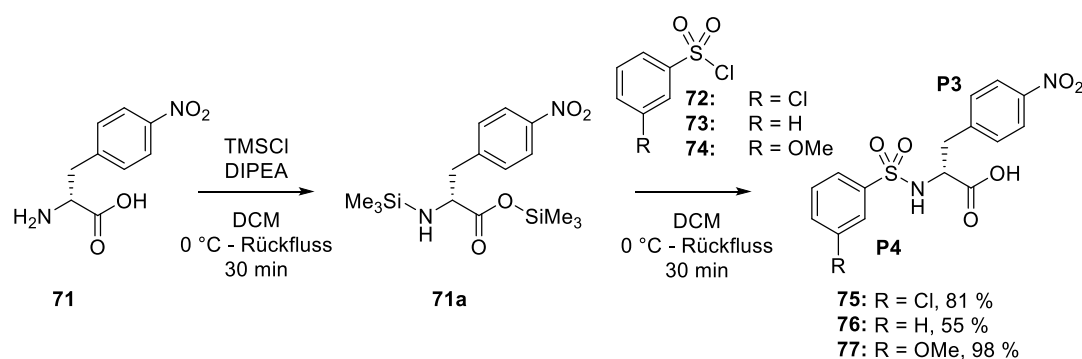
Wie bereits bei der Synthese des Intermediats **63** beobachtet wurde, erschwerte die geringe Löslichkeit des Cbz-Intermediats **65** wiederum dessen wässrige Aufarbeitung. Bei einer Ansatzgröße von lediglich 700 mg des Eduktes **64** wurden erneut mehr als 2.5 L Ethylacetat zur Reinigung des Rohproduktes **65** benötigt. Nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurde das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Trotz ihrer protonierbaren, primären Amino-Gruppe war die Verbindung in einer für die Injektion geeigneten Mischung aus Wasser und MeCN (jeweils versetzt mit 0.1 % (v/v) TFA) relativ schlecht löslich, weshalb die Reinigung in mehreren kleinen Portionen erfolgen musste. Dennoch wurde der Cbz-geschützte Baustein **66** mit einer Gesamtausbeute von 78 % über zwei Stufen erhalten.

Im Gegensatz dazu löste sich das Tfa-Analogon **69** deutlich besser in Ethylacetat, was dessen wässrige Aufarbeitung erleichterte. Nach Abspaltung der Boc-Gruppe wurde der problemlos lösliche P2-P1-Baustein **70** mittels präparativer HPLC gereinigt und mit einer Gesamtausbeute von 83 % über zwei Stufen erhalten.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.1.2.4. P4-P3-Segmente (75 -77)

Die P4-P3-Bausteine wurden gemäß **Schema 9** mittels einer von SCHWARZ beschriebenen Methode hergestellt.¹⁹⁵ Die freie Aminosäure **71** wurde durch Umsetzung mit Trimethylsilylchlorid (TMSCl) transient geschützt (Verbindung **71a**) und dadurch löslich in DCM. Anschließend wurde das Intermediat *in situ* mit dem jeweiligen substituierten Phenylsulfonsäurechlorid **72 - 74** umgesetzt, wodurch die Produkte **75 - 77** erhalten wurden.



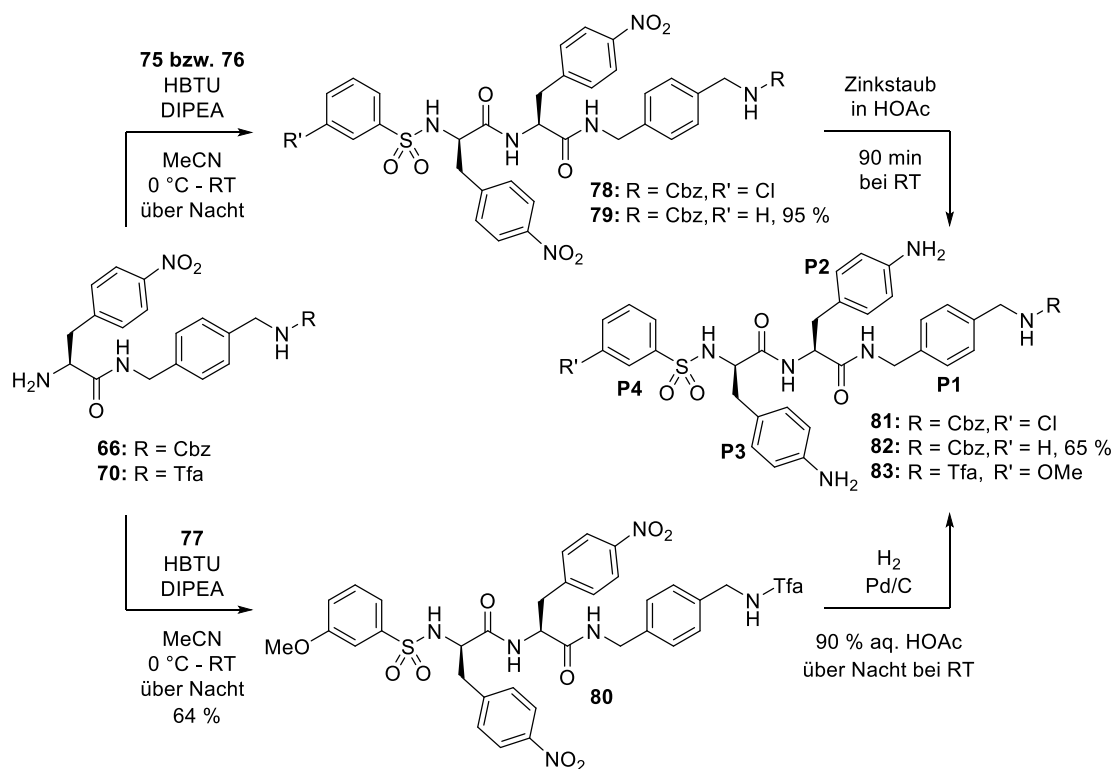
Schema 9: Synthese der P4-P3-Bausteine 75 - 77.

Das Verfahren nach SCHWARZ eignet sich zur selektiven Einführung von N-terminalen Schutzgruppen an freien Aminosäuren oder reaktionsträgen aromatischen Aminen (z. B. durch Umsetzung mit CbzOSu oder FmocCl). Im Gegensatz zu den unter SCHOTTEN-BAUMANN-Bedingungen üblicherweise eingesetzten wässrigen Lösungsmittelgemischen können in trockenem DCM auch relativ instabile (Sulfon-)Säurechloride zur Acylierung der Aminogruppen eingesetzt werden. Das Edukt wird zunächst in das silylierte Intermediat überführt (hier **71a**). Werden freie Aminosäuren verwendet, so wird in diesem Schritt sowohl der N- als auch der C-Terminus silyliert. Die N-terminale TMS-Gruppe wirkt als Aktivator und übt einen +I Effekt aus, wodurch die Nucleophilie des N-Terminus erhöht wird; dies erleichtert die Umsetzung schwach nucleophiler aromatischer Amine. Der C-Terminus wird durch die Silylierung dagegen inaktiviert, sodass die Bildung unerwünschter Nebenprodukte durch den TMS-Schutz weitestgehend vermieden werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren in zahlreichen, unterschiedlichen Synthesen genutzt. Die erhaltenen Produkte wiesen meist eine hohe Reinheit auf und konnten nach wässriger Aufarbeitung ohne zusätzliche Reinigungsschritte weiterverwendet werden.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.1.2.5. P4-P1-Segmente (Verbindungen 81 - 83)

Die P4-P1-Segmente wurden gemäß **Schema 10** synthetisiert. Dafür wurden die Edukte **66** bzw. **70** mit den jeweiligen P4-P3-Bausteinen **75 - 77** zu den Dinitro-Derivaten **78 - 80** umgesetzt. Durch Reduktion mit Zink in Essigsäure oder katalytische Hydrierung wurden dann die Segmente **81 - 83** erhalten.



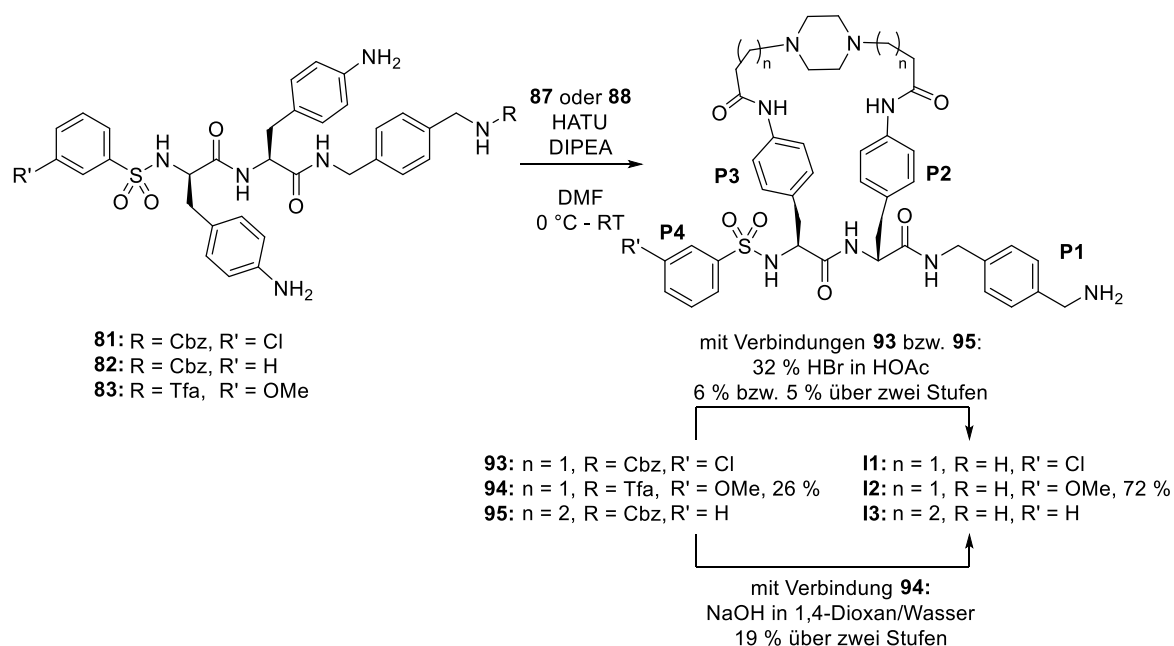
Schema 10: Synthese der azyklischen P4-P1-Segmente 81 - 83. Aufgrund geringer Reinheiten der Verbindungen **78**, **81** und **83** wurde auf die Angabe der Ausbeuten verzichtet.

Wiederum erschwerte die Gegenwart der Cbz-Schutzgruppe die Reinigung sowohl der Nitro- als auch der Anilin-Derivate mittels wässriger Aufarbeitung bzw. präparativer HPLC. Insbesondere bei der Reduktion der Nitrogruppen der Verbindung **78** mit Zink wurden viele Nebenprodukte erhalten, die nur unzureichend entfernt werden konnten. Ein Reinigungsversuch mittels Säulenchromatographie war nicht erfolgreich. Auch bei den Tfa-Verbindungen erschwerte deren ebenfalls relativ geringe Löslichkeit die Reinigung, jedoch in geringerem Ausmaß als bei den Cbz-Intermediaten.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.1.2.6. Finale Inhibitoren (Verbindungen I1 - I3)

Die makrozyklischen Inhibitoren wurden gemäß **Schema 11** durch zweistufige inter- und intramolekulare Zyklisierungsreaktionen hergestellt. Unter Verwendung des Kupplungsreagenzes HATU wurden die azyklischen Peptide **81 - 83** in hoher Verdünnung (1 mL DMF je 1 mg des azyklischen Vorläuferpeptids, ca. 1.4 mmol/L)¹⁹⁶ mit den *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäuren **87** bzw. **88** umgesetzt. Im letzten Schritt wurden die Inhibitoren **I1 - I3** durch Abspaltung der P1-Schutzgruppen erhalten.



Schema 11: Finale Schritte zur Synthese der makrozyklischen Inhibitoren I1 - I3.

Bei der Zyklisierung des Cbz-Derivats **81** wurde neben vier Hauptprodukten eine Vielzahl an nicht identifizierten Nebenprodukten erhalten, die vermutlich aufgrund der unzureichenden Reinheit des Eduktes von lediglich 80 % entstanden waren. Das Intermediat **93** wurde mittels präparativer HPLC isoliert (Reinheit ca. 79 %) und die Cbz-Gruppe unter stark sauren Bedingungen mit 32 % (w/v) HBr in Eisessig abgespalten. Dabei entstanden nur wenige Nebenprodukte. Der finale Inhibitor **I1** wurde mit einer kombinierten Ausbeute von 6 % über zwei Stufen erhalten.

Trotz der höheren Reinheit des Cbz-geschützten Eduktes **82** (> 95 %) entstanden bei der Zyklisierung erneut zahlreiche Nebenprodukte. Der erhaltene Makrozyklus **95** wurde mittels präparativer HPLC mit einer Reinheit von lediglich 57 % isoliert und die Schutzgruppe wie oben beschrieben abgespalten. Nach der erneuten Reinigung durch präparative HPLC wurde der finale Inhibitor **I3** mit einer kombinierten Ausbeute von 5 % über die letzten beiden Stufen erhalten.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

Bei der Zyklisierung der Tfa-geschützten Verbindung **82** (Reinheit > 99%) entstanden vergleichsweise wenige Nebenprodukte. Das Zyklisierungsprodukt **94** wurde nach Reinigung mittels präparativer HPLC mit einer Ausbeute von 26 % und einer Reinheit von 95 % isoliert. Nach Abspaltung der Schutzgruppe und erneuter Reinigung durch präparative HPLC wurde der finale Inhibitor **12** mit einer deutlich höheren kombinierten Ausbeute von 19 % über die letzten beiden Stufen erhalten.

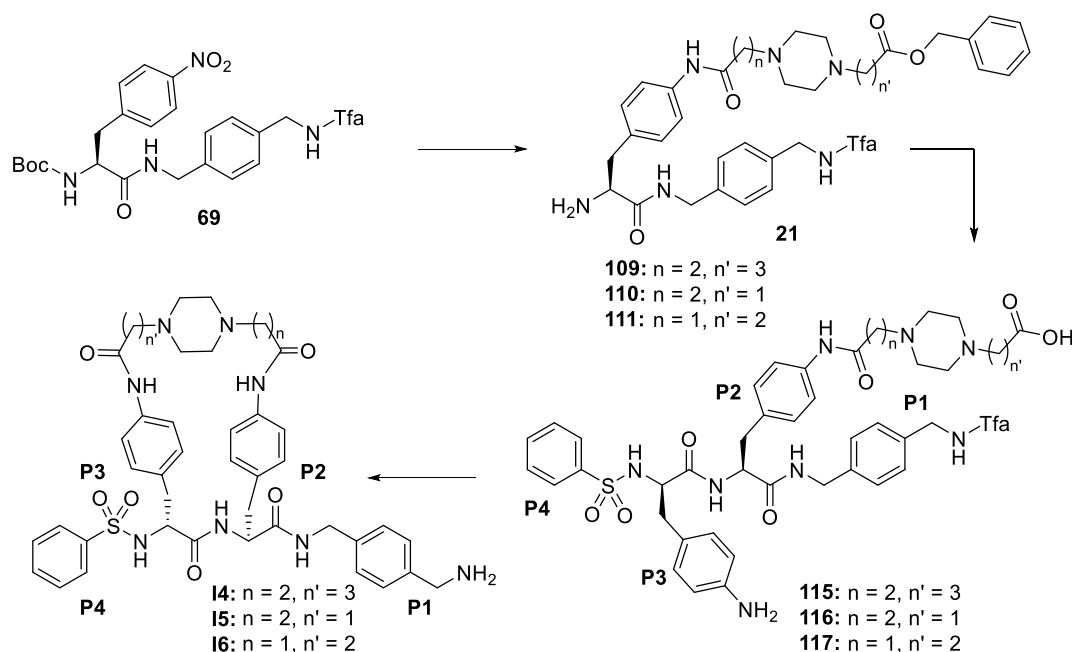
3.2.1.2.7. Anmerkungen zu den Synthesen

Die Inhibitoren **11** - **13** besitzen symmetrische *N,N'*-Piperazinyldipropansäureamid-Linkersegmente und wurden gemäß der Synthesestrategie A mit zwei unterschiedlichen Schutzgruppen am *p*-Xda-Baustein durchgeführt. Die Tfa-Schutzgruppe wurde in der AG STEINMETZER bereits vor Beginn des praktischen Teils dieser Promotion zur Synthese makrozyklischer Inhibitoren verwendet.¹⁸⁵ Aufgrund der erforderlichen stark basischen Bedingungen zur Abspaltung dieser Gruppe besteht, wie bereits beschrieben, grundsätzlich eine Razemisierungsgefahr. Ein Indiz für die Gegenwart verschiedener Diastereomere wäre zum Beispiel das Auftreten nahe beieinanderliegender Signale in der analytischen HPLC oder doppelter Datensätze in den NMR-Spektren. Bei den bisherigen Synthesen konnten jedoch keine Hinweise auf eine Razemisierung im Zuge der Tfa-Abspaltungen gefunden werden. Dennoch sollte anhand der Synthese der makrozyklischen Inhibitoren **11** und **13** die prinzipielle Eignung der Cbz-Gruppe zum Schutz der terminalen Aminogruppe am *p*-Xda-Rest untersucht werden, bei deren Abspaltung keinerlei Razemisierungsgefahr bestehen sollte. Vergleichend wurde die Verbindung **12** unter Verwendung der Tfa-Schutzgruppe nach einer analogen Synthesestrategie hergestellt. Die Reinigung der Cbz-Derivate wurde durch deren vergleichsweise geringe Löslichkeit in organischen Solvenzien und LM-Gemischen mit Wasseranteil erschwert. Infolgedessen waren die Ausbeuten und Reinheiten der Cbz-Intermediate in der Regel geringer als bei den Synthesen ihrer Tfa-Analoga. Solche Schwierigkeiten traten bei der Verwendung des Tfa-Schutzes kaum auf, bei der sich lediglich die Reinigung des hydrophoben Intermediats **83** als schwierig erwies. Bei den Zyklisierungsreaktionen wurden in Gegenwart der Cbz-Gruppe zahlreiche Nebenprodukte erhalten, weshalb die kombinierten Ausbeuten der beiden finalen Reaktionsschritte deutlich niedriger waren als im Falle des Tfa-Schutzes (5 % bzw. 6 % im Vergleich zu 26 %). Folglich scheint die bereits zuvor verwendete Tfa-Gruppe besser zur Synthese der makrozyklischen Inhibitoren geeignet zu sein. Alle weiteren substratanalogen makrozyklischen Inhibitoren wurden daher unter Verwendung eines Tfa-geschützten *p*-Xda-Bausteins hergestellt.

3.2.2. P3-P2-Makrozyklen mit asymmetrischen Linkersegmenten

3.2.2.1. Überblick und allgemeine Erläuterungen (Inhibitoren **I4** - **I6**)

Die makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren **I4** - **I6** besitzen asymmetrische Linkersegmente und wurden gemäß der Synthesestrategie D hergestellt (**Schema 12**). Zusammen mit der Verbindung **I3**, die einen symmetrischen *N,N'*-Piperazinyldibutansäureamid-Linker enthält, bilden sie die Inhibitorserie 2, innerhalb derer ausgehend von der Referenzverbindung **40** die Linkerlänge variiert wurde. Zu Beginn der Synthese wurde die bereits oben beschriebene Verbindung **69** synthetisiert und nach Reduktion der Nitrogruppe ein entsprechender monogeschützter *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäure-Linker an die P2-Seitenkette gekuppelt; die Abspaltung der Boc-Gruppe ergab die Verbindungen **109** - **111**. Nach Kupplung des P4-P3-Bausteins Phs-DPhe(4-NO₂)-OH wurden durch erneute Hydrierung die P3-Nitrogruppe reduziert und simultan die Benzyl-Schutzgruppe des Linkers entfernt (Intermediate **115** - **117**). Durch eine intramolekulare Zyklisierung wurden die makrozyklischen Kernsegmente erhalten, die durch Abspaltung der Tfa-Schutzgruppe zu den finalen Inhibitoren **I4** - **I6** umgesetzt wurden.

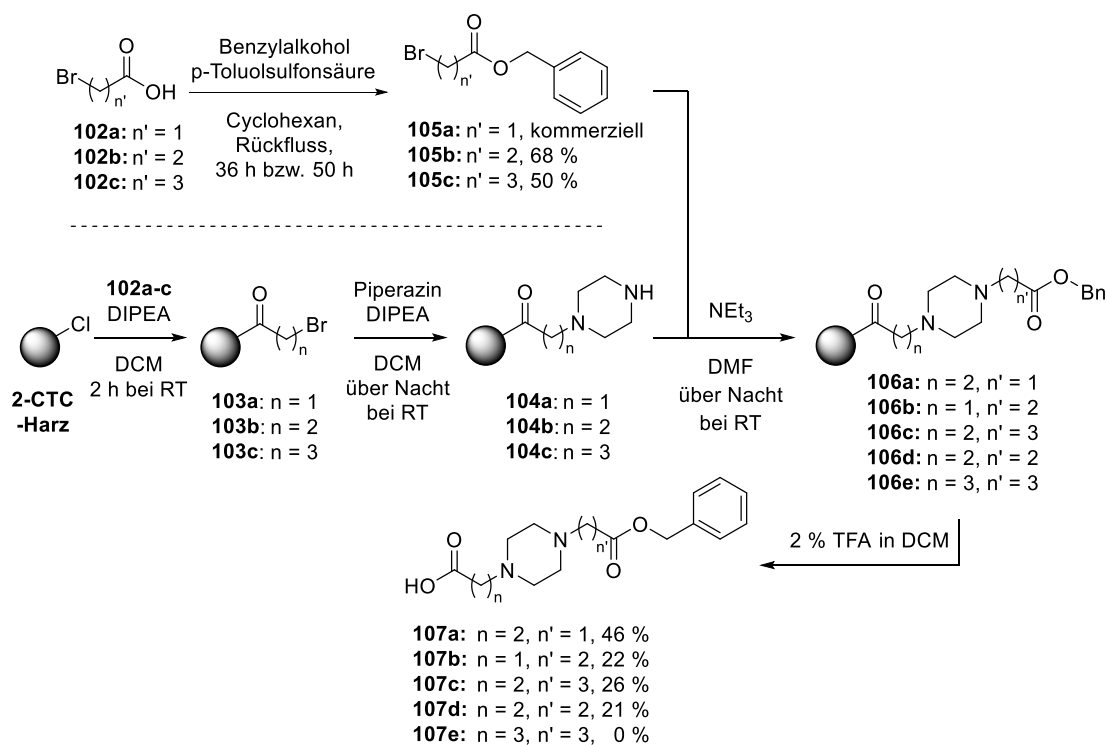


Schema 12: Überblick zur Synthese der Inhibitoren **I4** - **I6** mit asymmetrischen Linkern.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.2.2. Asymmetrische Linker (Verbindungen 107a-e)

Die Herstellung der monogeschützten *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäuren **107a-e** erfolgte unter Adaptierung einer bereits beschriebenen Strategie an einem Festphasensynthese-Harz (**Schema 13**).¹⁹⁷ Vor Beginn der Synthesen wurden aus den Edukten **102a-c** mittels FISCHER-Veresterung die Bromcarbonsäurebenzylester **105a-c** hergestellt. Nach der Beladung eines 2-CTC-Harzes mit der jeweiligen halogenierten Carbonsäure (Intermediate **103a-c**) und der darauffolgenden nucleophilen Substitution des Halogenatoms mit Piperazin (Intermediate **104a-c**) wurde die verbleibende sekundäre Aminogruppe mit dem entsprechenden Bromcarbonsäurebenzylester zu den Intermediaten **106a-e** umgesetzt. Nach deren Abspaltung vom Harz wurden die Bausteine **107a-d** mit Ausbeuten zwischen 21 % und 46 % (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge) erhalten. Im Gegensatz dazu ist die Herstellung des Butansäure-Analogons **107e** nicht gelungen.



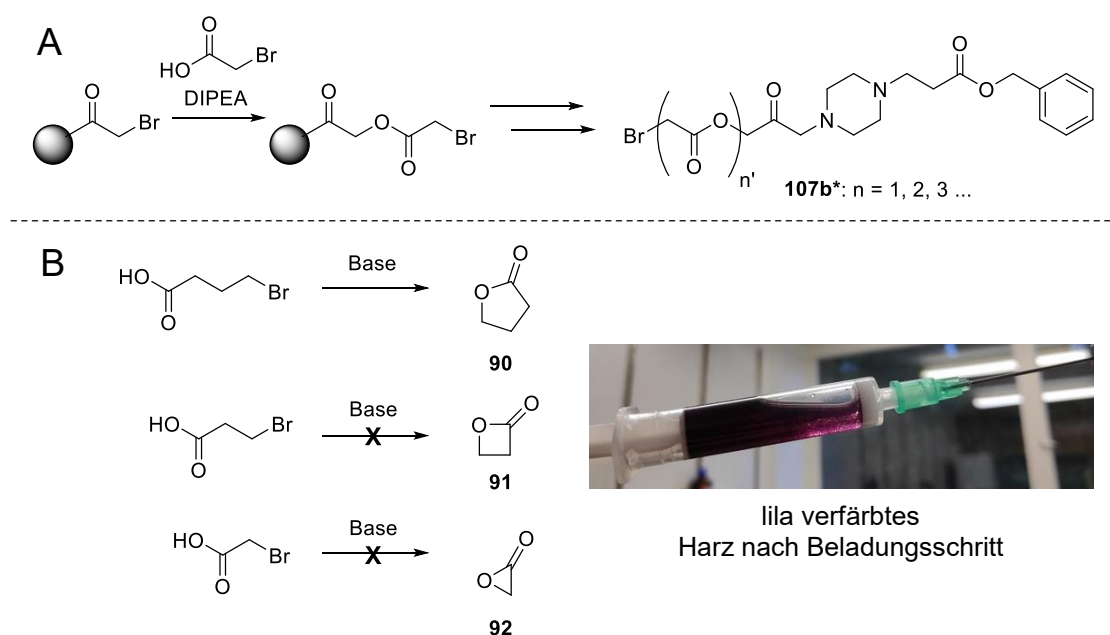
Schema 13: Synthese der monogeschützten Linkerbausteine 107a-e.

Der Baustein Bromessigsäurebenzylester (Verbindung **105a**) war kommerziell erhältlich. Dagegen wurden die Benzylester **105b** und **105c** selbst hergestellt. Ihre Synthesen wurden nach mehreren Tagen trotz unvollständigen Umsatzes vorzeitig abgebrochen, da die gewählten Ansatzgrößen eine ausreichende Produktmenge erwarten ließen.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

Während der Festphasensynthesen zu den Verbindungen **107a-d** wurde eine Oligomerisierung der Edukte Bromessigsäure und 3-Brompropansäure am Harz beobachtet. Das zugrundeliegende Prinzip wird am Beispiel der Verbindung **107b** im **Schema 14** illustriert. In einer S_N -Reaktion kann der am Harz gebundene Bromcarbonsäureester durch den nucleophilen Angriff eines weiteren Äquivalents der Bromcarbonsäure dimerisiert bzw. oligomerisiert werden. Im Rahmen der o. g. Synthesen wurden nach finaler Abspaltung der Reaktionsprodukte vom Harz entsprechende Oligomere (z. B. Verbindungen **107b***) mittels Massenspektrometrie nachgewiesen und teilweise durch präparative HPLC isoliert.

Das Dipropansäure-Derivat **107d** wurde ausschließlich bei der später beschriebenen Herstellung der P4-P2-Makrozyklen verwendet. Die Synthese des Butansäure-Analogons **107e** gemäß **Schema 13** ist trotz mehrfacher Wiederholung nicht gelungen. Während des Beladungsschrittes verfärbte sich das Harz intensiv lila (**Schema 14B**) und nach der vollständigen Durchführung der Festphasensynthese wurde kein Produkt nachgewiesen. Möglicherweise ist die Synthese bereits während des initialen Beladungsschrittes gescheitert. Es ist denkbar, dass unter den basischen Reaktionsbedingungen die bereits vorgeschlagene Lactonisierung der 4-Brombutansäure erfolgte, die bei den kürzeren Analoga nicht möglich war. Dies wurde jedoch nicht näher untersucht.

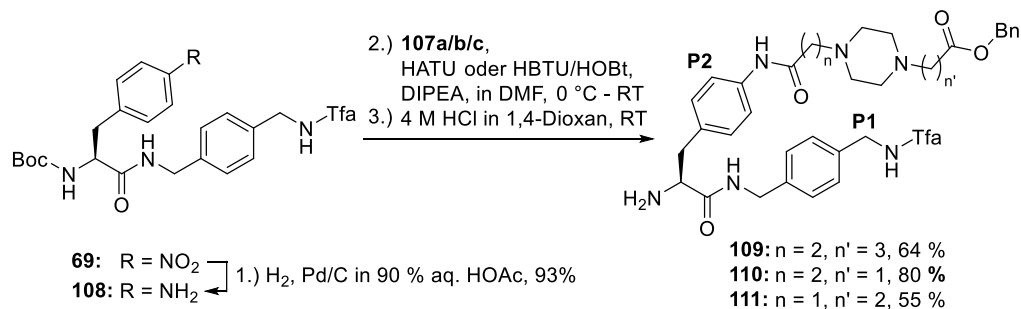


Schema 14: Besonderheiten bei der Synthese asymmetrischer Linkersegmente. A) Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsreaktionen während der Synthese der Verbindung **107b**. B) Lactonisierung aliphatischer Bromcarbonsäuren und verfärbtes 2-CTC-Harz nach dem Beladungsschritt mit 4-Brombutansäure im Rahmen der Syntheseversuche zur Verbindung **107e**. Eine lila-Färbung wird während der Harzbeladung üblicherweise nicht beobachtet. Lediglich während der Abspaltung des fertigen Produktes verfärbt sich das Harz normalerweise tiefrot bis schwarz.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.2.3. P2-P1-Segmente (Verbindungen 109 - 111)

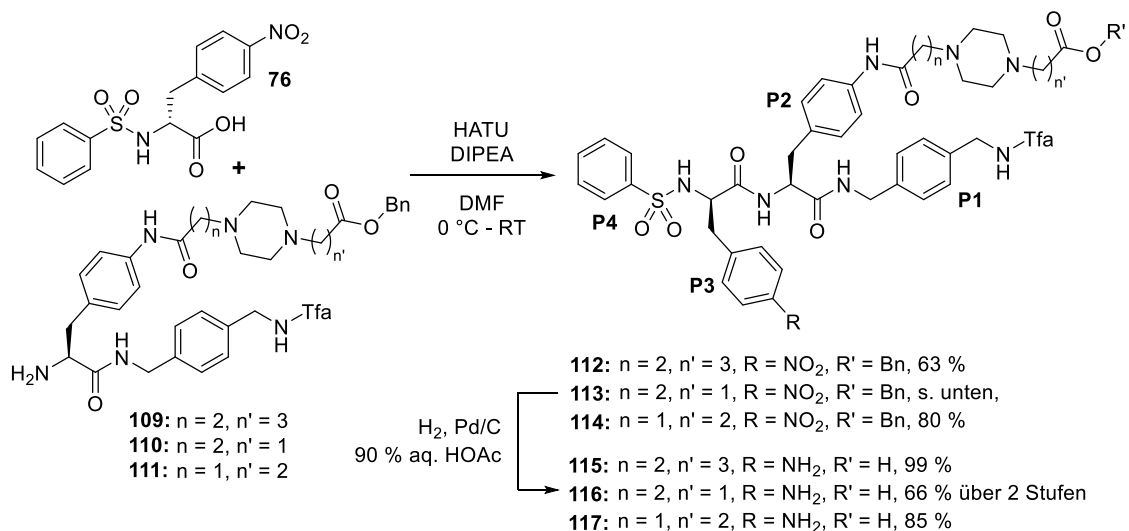
Gemäß **Schema 15** wurde die bereits oben beschriebene Verbindung **69** durch katalytische Hydrierung in das Amino-Derivat **108** überführt. Nach der Kupplung des jeweiligen monogeschützten Linkersegments **107a-c** und der Abspaltung der Boc-Gruppen wurden die substituierten P2-P1-Segmente **109 - 111** mit Ausbeuten zwischen 55 - 80 % erhalten.



Schema 15: Synthese der P2-P1-Segmente 109 - 111.

3.2.2.4. P4-P1-Segmente (Verbindungen 115-117)

Die P2-P1-Segmente **109 - 111** wurden gemäß **Schema 16** mit dem bereits oben beschriebenen P4-P3-Sulfonamidbaustein **76** zu den azyklischen Vorläufermolekülen **112 - 114** umgesetzt. Durch katalytische Hydrierung wurde simultan die Benzyl-Schutzgruppe abgespalten und die Nitrogruppe reduziert; nach der Reinigung mittels präparativer HPLC wurden die Derivate **115 - 117** erhalten.

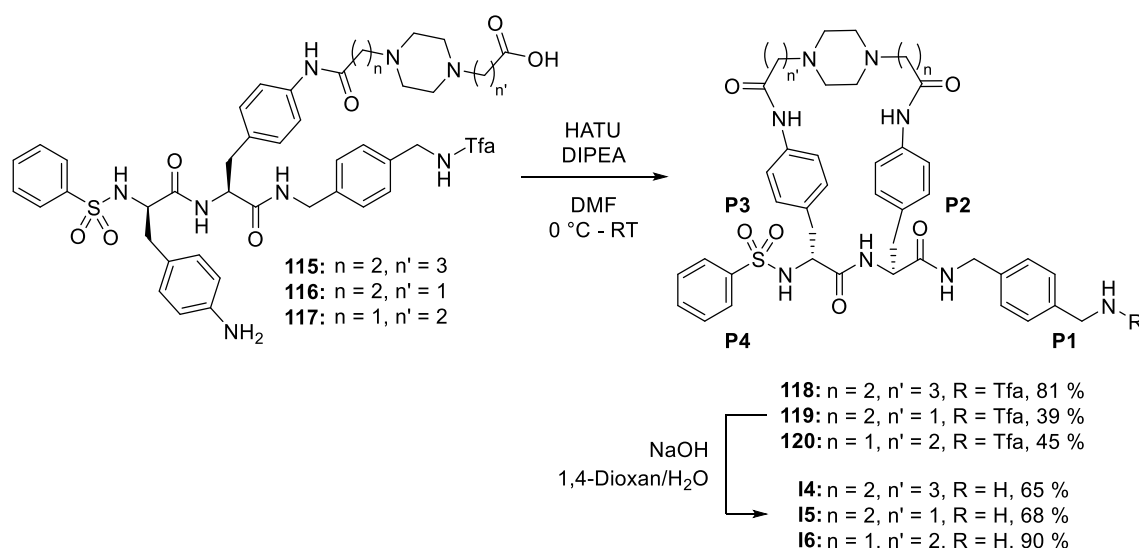


Schema 16: Synthese der P4-P1-Segmente 115 - 117.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.2.5. Finale Inhibitoren (Verbindungen I4 - I6)

Die Intermediate **112** - **114** wurden in einstufigen Reaktionen intramolekular zyklisiert (**Schema 17**). Nach Abspaltung der Tfa-Schutzgruppe wurden die finalen Inhibitoren **I4** - **I6** erhalten.



Schema 17: Synthese der Inhibitoren I4 - I6.

Die intramolekularen Zyklisierungen erfolgten analog zu den Reaktionen mit symmetrischen Linkersegmenten in starker Verdünnung (1 mL DMF je 1 mg Edukt). Bei der Synthese des Inhibitors **I4** entstanden nur wenige Nebenprodukte. Die finale Abspaltung der P1-Schutzgruppe ergab das Endprodukt mit einer kombinierten Ausbeute von 53 % über die letzten beiden Stufen.

Nach der Zyklisierung der Verbindung **116** wurden drei Produkte mittels präparativer HPLC isoliert und massenspektrometrisch untersucht. Die größte Fraktion enthielt das gewünschte Zyklisierungsprodukt **119**, das mit einer Ausbeute von 39 % erhalten wurde. In den beiden kleineren Fraktionen wurden die Massen des peptidisch gekuppelten, azyklischen Dimers bzw. Trimers des Eduktes gefunden. Zur Vermeidung der dafür verantwortlichen Nebenreaktionen könnten künftige Zyklisierungen mit stärker verdünnten Lösungen durchgeführt werden. Während der Verseifung der Tfa-Schutzgruppe entstanden nur wenige Nebenprodukte und der finale Inhibitor **I5** wurde mit einer kombinierten Ausbeute von 27 % über die beiden letzten Stufen erhalten.

Nach der Zyklisierung der Verbindung **117** wurde der Inhibitor **I6** durch Abspaltung der Tfa-Gruppe mit einer kombinierten Ausbeute von 41 % über die letzten beiden Schritte erhalten.

3.2.2.6. Anmerkungen zu den Synthesen

Die Synthesen der makrozyklischen Inhibitoren **14 - 16** erfolgten gemäß der Strategie D, die den selektiven Einbau asymmetrischer Linkerbausteine erlaubt. Dadurch wird die gezielte Variation der Linkerlänge neben der Seitenkette des P3- bzw. P2-Restes um jeweils eine einzelne Methylengruppe ermöglicht.

Anders als bei den zuvor verwendeten Strategien A - C wurde das Linkersegment bereits an den P2-P1-Baustein gekuppelt. Aufgrund der beiden tertiären Aminogruppen des Piperazinyl-Restes im Linker waren alle weiteren Intermediate in Lösungsmittelgemischen mit Wasseranteil gut löslich, sodass deren Aufreinigung mittels präparativer HPLC problemlos möglich war. Dies erwies sich als großer Vorteil im Vergleich zur Syntheseführung nach Strategie A, in deren Verlauf einige sehr hydrophobe und daher schwerer zu reinigende Zwischenprodukte erhalten wurden. Im Vergleich mit den zweistufigen Zyklisierungen der Strategie A entstanden bei den einstufigen intramolekularen Reaktionen weniger Nebenprodukte. Nach der Zyklisierung konnten die Tfa-geschützten Zyklen gut mittels präparativer HPLC gereinigt werden, weshalb auch die finale Abspaltung der Tfa-Gruppe aufgrund der hohen Reinheit der Edukte nur wenige Nebenprodukte produzierte. Entsprechend wurden in den beiden finalen Reaktionsschritten hohe kombinierte Ausbeuten erhalten. Obwohl die Synthesestrategie D für den selektiven Einbau asymmetrischer Linkersegmente entwickelt wurde, kann sie aufgrund der o. g. Vorteile künftig auch zur Synthese von makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren mit symmetrischen Linkern eingesetzt werden.

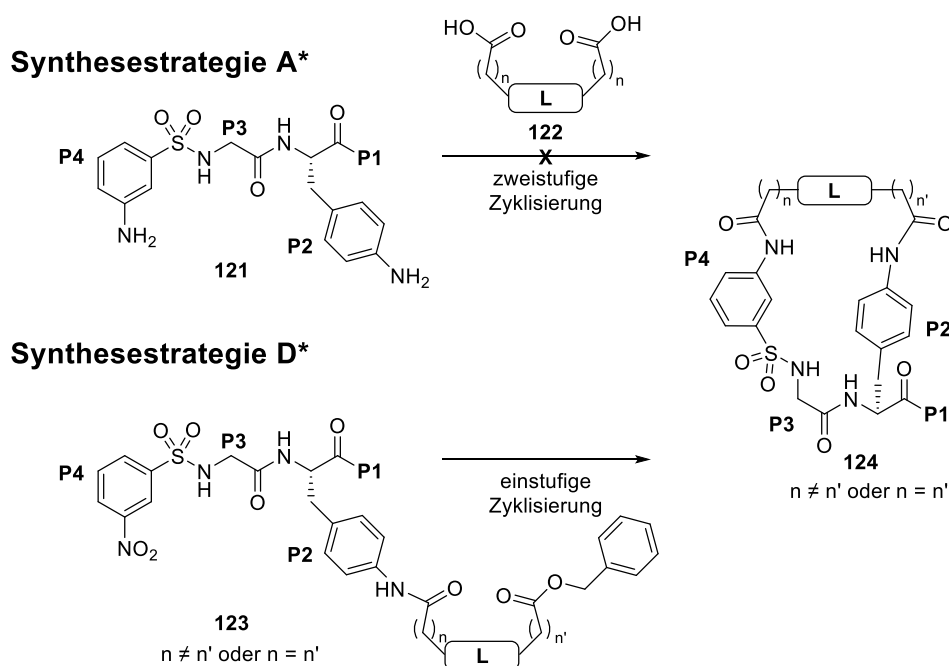
3.2.3. P4-P2-Makrozyklen

3.2.3.1. Modifizierte Synthesestrategien A* und D*

Bislang wurden ausschließlich makrozyklische substratanaloge Inhibitoren vorgestellt, deren P3-Seitenkette über einen symmetrischen oder asymmetrischen Linker an die Seitenkette des P2-Restes gekuppelt wurde.^{182–184} Vor Beginn dieser Promotion wurde im Rahmen einer Masterarbeit jedoch auch versucht, P4-P2-Zyklen gemäß der modifizierten Synthesestrategie A* herzustellen (**Schema 18**).¹⁸⁶ Ausgehend von der azyklischen Verbindung **121** sollte der P4-Rest über das symmetrische Linkersegment **122** in einer zweistufigen Zyklisierungsreaktion mit der Seitenkette des P2-Restes verknüpft werden. Das gewünschte Produkt **24** wurde dabei jedoch nicht erhalten.

Um die gewünschten Produkte dennoch herzustellen, wurde im Rahmen dieser Promotion die bereits vorgestellte Synthesestrategie D modifiziert. Das in der abgewandelten Strategie D* verwendete Vorläufermolekül **123** enthält bereits ein monogeschütztes Linkersegment an der Seitenkette des P2-Restes. Durch katalytische Hydrierung werden simultan die Benzyl-Schutzgruppe des Linkers abgespalten und die Nitrogruppe des P4-Bausteins reduziert. Danach wird die zyklische Verbindung **124** durch eine intramolekulare einstufige Zyklisierungsreaktion erhalten.

Mit dieser Methode wurden erstmals P4-P2-Makrozyklen erhalten, die einen symmetrischen oder asymmetrischen *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linker enthalten.

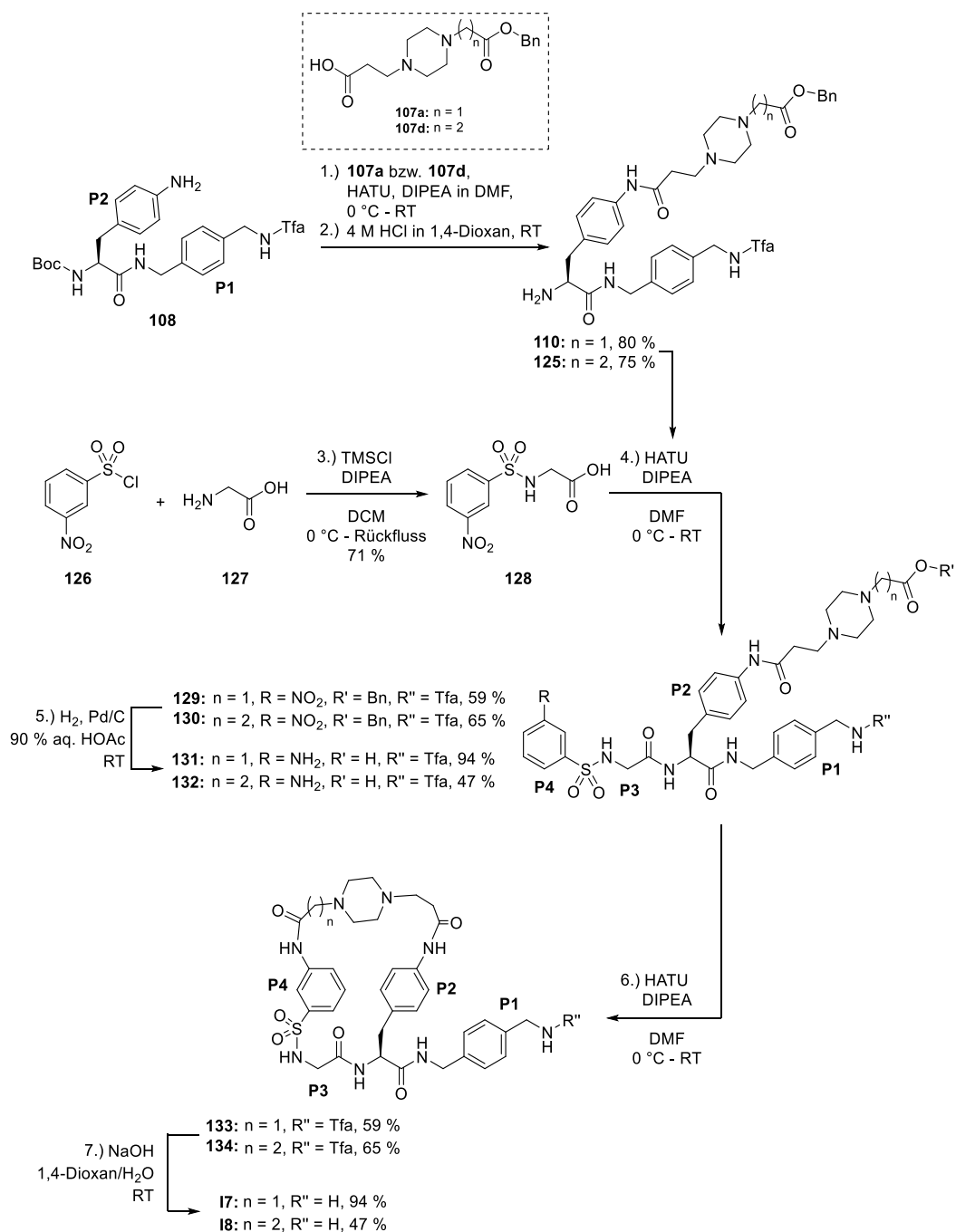


Schema 18: Modifizierte Synthesestrategien zur Herstellung von P4-P2-Makrozyklen.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

3.2.3.2. Herstellung der Inhibitoren I7 und I8

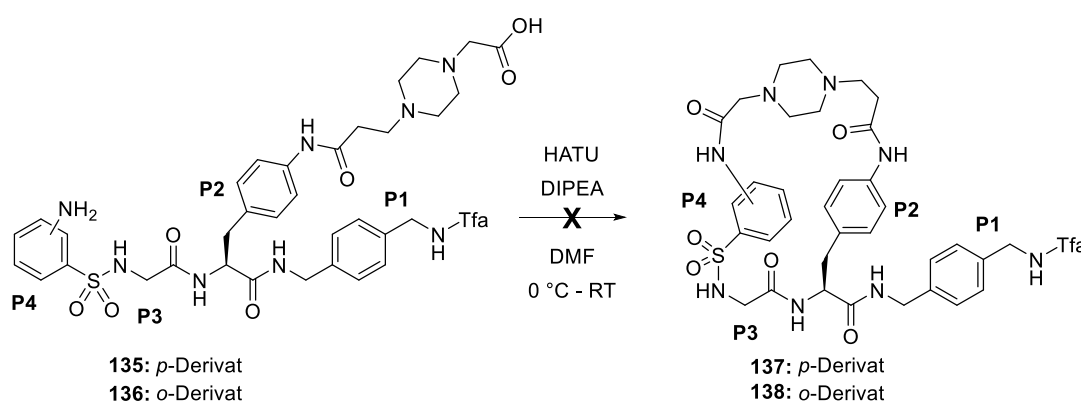
Die Herstellung der Inhibitoren **I7** und **I8** erfolgte gemäß **Schema 19**. Im ersten Schritt wurden die partiell geschützten Linkerbausteine **107a** bzw. **107d** (s. Abschnitt 3.2.2.2.) an die P2-Seitenkette des Eduktes **108** gekuppelt. Durch Abspaltung der Boc-Gruppe wurden die P2-P1-Bausteine **110** und **125** erhalten. Parallel wurde der P4-P3-Baustein **128** unter Anwendung der Methode nach SCHWARZ¹⁹⁵ hergestellt und an die Intermediate **110** bzw. **125** gekuppelt. Die resultierenden P4-P1-Segmente **129** und **130** wurden zu den Verbindungen **131** und **132** hydriert. Durch eine einstufige intramolekulare Zyklisierungsreaktion wurden die Intermediate **133** und **134** erhalten und im letzten Schritt zu den finalen Inhibitoren **I7** bzw. **I8** umgesetzt.



Schema 19: Synthese der P4-P2-Makrozyklen I7 und I8.

3.2. Synthese der Intermediate und Inhibitoren

Nach der Synthese der in P4-Position *m*-substituierten Verbindungen **17** und **18** sollten zusätzlich die *p*- bzw. *o*-Analoga **137** und **138** hergestellt werden (**Schema 20**). Trotz einer hohen Reinheit der Vorstufen **135** und **136** (> 98 %) verliefen mehrere Zyklisierungsversuche erfolglos; dies kann z. B. durch den elektronenziehenden Effekt der Sulfonamidgruppe auf den Phenylring des P4-Bausteins erklärt werden, infolgedessen die ohnehin eher schwach nucleophilen aromatischen Aminogruppen in *o*- und *p*-Stellung stärker desaktiviert werden als in der *m*-Position. Die zusätzlich verringerte Nucleophilie der *o*- bzw. *p*-Aminogruppen könnte die Zyklisierungsreaktionen erschwert haben. Darüber hinaus ist die *o*-Position des P4-Restes aufgrund der benachbarten Sulfonamidgruppe sterisch gehindert, was sich ebenfalls nachteilig auf die Zyklisierung ausgewirkt haben dürfte.



Schema 20: Syntheseversuche zu den Verbindungen 137 und 138.

Dennoch konnten gemäß der Synthesestrategie D* unter Anwendung einer einstufigen Zyklisierungsreaktion erstmals makrozyklische Inhibitoren hergestellt werden, deren P4- und P2-Reste mit *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linkern verknüpft sind. Wie bereits für die P3-P2-verknüpften makrozyklischen Inhibitoren **14** - **16** beschrieben erwies sich die frühzeitige Kupplung des Linkersegments an den P2-P1-Baustein erneut als vorteilhaft. Ab dieser Stufe wiesen alle folgenden Intermediate eine gute Löslichkeit in Lösungsmittelgemischen mit Wasseranteil auf und konnten problemlos mittels präparativer HPLC gereinigt werden. Die einstufigen Zyklisierungsreaktionen wurden entsprechend mit sehr reinen Edukten durchgeführt, was die Entstehung von Nebenprodukten vermied. Daher wurden in den beiden finalen Syntheseschritten der Inhibitoren **17** und **18** hohe kombinierte Ausbeuten erzielt.

3.3. Enzymkinetische Auswertung

Im Rahmen der enzymkinetischen Charakterisierung wurde die Plm-Hemmwirkung aller Inhibitoren ermittelt. Für besonders wirksame Hemmstoffe wurde zusätzlich deren Selektivität gegenüber einigen verwandten trypsinartigen Serinproteasen untersucht. Dafür wurden *in vitro*-Experimente mit isolierten Enzymen in 96-*well* Platten durchgeführt, bei denen fluorogene Substrate unter Freisetzung des Fluorophors 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) gespalten werden. Die zeitabhängige Zunahme des AMC-Fluoreszenz-Signals ist dabei ein Maß für die Proteaseaktivität.

Aus den in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen bestimmten Enzymaktivitäten wurden inhibitorspezifische Hemmkonstanten (K_i -Werte) ermittelt. Detaillierte Informationen zu den verwendeten Proteasen und Substraten sowie den Testbedingungen werden im Methodenteil angegeben. In diesem Kapitel wird lediglich die Auswertung der Messungen erläutert.

3.3.1. Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten

Um Schwankungen der Enzymaktivität zu berücksichtigen wurden bei jeder Inhibitormessung die kinetischen Konstanten V_{\max} und K_M unter *steady state*-Bedingungen bestimmt und zur Ermittlung der K_i -Werte herangezogen.¹⁹⁸ Dies wird hier am Beispiel der Plm-katalysierten Spaltung des fluorogenen Substrats Mes-DArg-Phe-Arg-AMC erläutert, bei der das Fluorophor AMC freigesetzt wird. Für acht unterschiedliche Substratkonzentrationen wurden die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten v (Steigung der Progresskurve) der ungehemmten Enzymreaktion durch lineare Regression ermittelt. Die Werte wurden als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen und zur Bestimmung der Konstanten K_M - und V_{\max} an die Gleichung 1 angepasst (**Abbildung 18**).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Gleichung 1: MICHAELIS-MENTEN Gleichung¹⁹⁸ zur Bestimmung der kinetischen Konstanten V_{\max} und K_M (v : Reaktionsgeschwindigkeit, V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit, K_M : MICHAELIS-MENTEN-Konstante, $[S]$: Substratkonzentration).

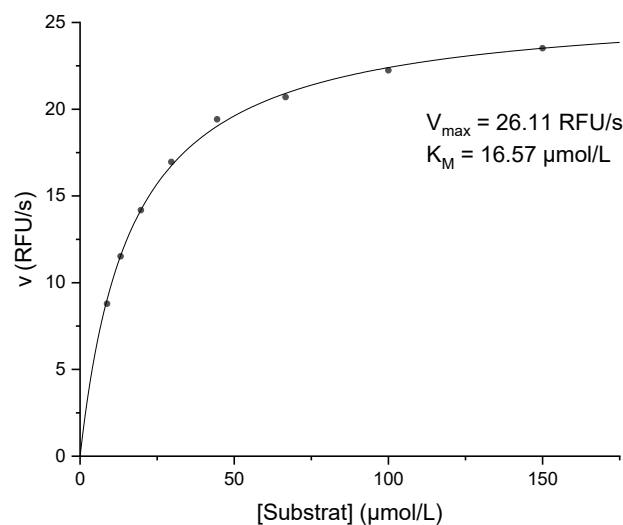


Abbildung 18: Bestimmung der kinetischen Konstanten V_{\max} und K_M . Die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Plm-katalysierten Spaltung des Substrats Mes-DArg-Phe-Arg-AMC wurden als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen. Durch Anpassung der Werte an die Gleichung 1 (schwarze Kurve) wurden die enzymkinetischen Konstanten ermittelt.

3.3.2. Bestimmung der Hemmkonstanten

Zur Bestimmung der K_i -Werte wurden die *steady state*-Geschwindigkeiten gehemmter Enzymreaktionen bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen ermittelt. Dabei wurden entweder lineare oder hyperbolisch verlaufende Progresskurven erhalten. Alle Inhibitormessungen wurden wie unten beschrieben klassisch ausgewertet. Bei gekrümmten Zeit-Umsatz-Kurven wurde zusätzlich eine *slow binding*-Auswertung durchgeführt.

3.3.2.1. Klassische Auswertung

Bei linearen verlaufenden Progresskurven wurden die *steady state*-Geschwindigkeiten (v_s , Anstieg der Geraden) durch lineare Regression bestimmt. Für einige besonders aktive Plm-Inhibitoren wurden jedoch Zeit-Umsatz-Kurven mit initialer Krümmung erhalten, die erst mit fortschreitendem Reaktionsverlauf annähernd lineare Anstiege zeigten (**Abbildung 19**). Dieses Hemmverhalten wurde in der Literatur als *slow binding*-Hemmung beschrieben^{199,200} und bereits zuvor bei mehreren Plm-Inhibitoren aus unserer Arbeitsgruppe beobachtet.¹⁸³ Die *steady state*-Geschwindigkeiten für hyperbolisch verlaufende Progresskurven können durch eine *slow binding*-Auswertung bestimmt werden (s. Abschnitt 3.2.2.2.). Näherungsweise kann die Ermittlung der v_s -Werte jedoch auch im Rahmen einer klassischen Auswertung durch lineare Regression im terminalen Bereich der Progresskurven erfolgen. Eine gegebenenfalls noch vorhandene marginale Krümmung wird dabei vernachlässigt. Diese Vorgehensweise wird hier am Beispiel der Plm-katalysierten Spaltung des Substrats Mes-DArg-Phe-Arg-AMC in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors **43** gezeigt.

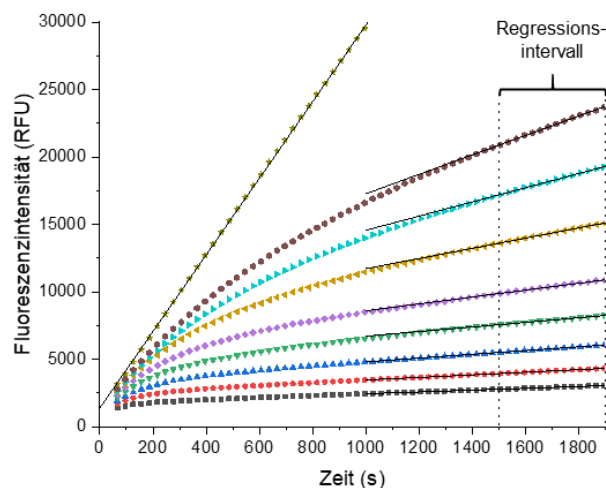


Abbildung 19: Progresskurven mit initialer Krümmung: klassische Auswertung. Bestimmung der *steady state*-Geschwindigkeiten (v_s) der Plm-katalysierten (0.27 nM) Spaltung des Substrats Mes-DArg-Phe-Arg-AMC (100 μ M) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors **43**: 0.200 μ M (schwarze Quadrate), 0.133 μ M (rote Punkte), 0.089 μ M (blaue Dreiecke), 0.059 μ M (grüne Dreiecke) 0.040 μ M (violette Rauten), 0.026 μ M (ockerfarbene Dreiecke), 0.018 μ M (türkise Dreiecke), 0.012 μ M (braune Punkte) und in Abwesenheit des Inhibitors (Kontrolle, olivgrüne Sterne). Zur näherungsweisen Bestimmung der v_s -Werte wurden die Anstiege der Progresskurven im Zeitintervall zwischen 1500 s und 1900 s durch lineare Regression berechnet (schwarze Linien).

3.3. Enzymkinetische Auswertung

Zur Bestimmung der Hemmkonstanten werden die durch lineare Regression ermittelten *steady state*-Geschwindigkeiten als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen (**Abbildung 20**). Der K_i -Wert des Inhibitors wird dann durch Anpassung der Werte an die Gleichung 2 unter Konstanthaltung der Substratkonzentration (S) sowie der zuvor bestimmten enzymkinetischen Konstanten V_{\max} - und K_M berechnet.

Im Gegensatz zur *slow binding*-Auswertung kann mit dem vereinfachten klassischen Verfahren lediglich die Hemmkonstante des Inhibitors ermittelt werden; eine Bestimmung weiterer Parameter wie z. B. der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildung bzw. den Zerfall des Enzym-Inhibitor (EI)-Komplexes ist mit dieser Vorgehensweise nicht möglich.

$$v_s = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2)$$

Gleichung 2: Gleichung zur Bestimmung der Hemmkonstante eines kompetitiv-reversiblen Inhibitors (v_s : *steady state*-Geschwindigkeit, K_M : MICHAELIS-MENTEN Konstante, V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, [S]: Substratkonzentration, [I]: Inhibitorkonzentration, K_i : Hemmkonstante).²⁰¹

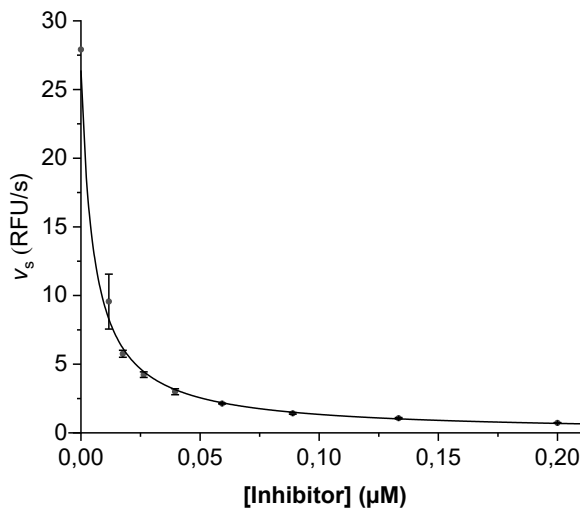


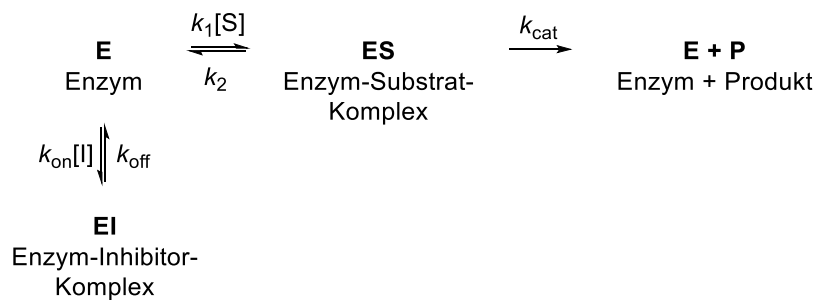
Abbildung 20: Bestimmung der Hemmkonstanten. Die *steady state*-Geschwindigkeiten der Plm-katalysierten (0.27 nM) Spaltung des Substrats Mes-DArg-Phe-Arg-AMC (100 μM) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors **43** wurden als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen und zur K_i -Wert-Bestimmung an die Gleichung 2 angepasst (schwarze Linie). Die K_i -Werte wurden als Triplikate aus drei unabhängigen Einwaagen ermittelt. Dabei wurden die Substratkonzentration und die zuvor bestimmten enzymkinetischen Konstanten V_{\max} und K_M konstant gesetzt.

3.3. Enzymkinetische Auswertung

3.3.2.2. Slow binding-Auswertung

Bei der *slow binding*-Hemmung ist das Ausmaß der Enzyminhibierung zeitabhängig und steigt mit fortschreitendem Reaktionsverlauf.^{199,200} Dies verursacht in einem Intervall von einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten eine initiale Krümmung der Progresskurve (vgl. **Abbildung 19**). Mit zunehmender Inhibierung nimmt die Geschwindigkeit der Enzymreaktion solange ab, bis ein Zustand konstanter Aktivität erreicht ist und die Progresskurve einen (annähernd) linearen Anstieg aufweist (*steady state*-Geschwindigkeit, v_s). Das *slow binding*-Verhalten kann in einem klassischen Photometer beobachtet werden, ohne dass *stopped flow*-Messungen erforderlich sind.

Im Folgenden werden die beiden wichtigsten Mechanismen vorgestellt, die zu einem *slow binding*-Verhalten führen können.²⁰⁰ Bei dem in **Schema 21** gezeigten Mechanismus A wird von einer klassischen, kompetitiven Hemmung ausgegangen, bei der ein Inhibitor ohne vorgelagertes Gleichgewicht an das aktive Zentrum des Enzyms bindet. Die Inhibitorbindung verläuft dabei deutlich langsamer als die Bindung des Substrates; entsprechend ist die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Inhibitorbindung (k_{on}) deutlich kleiner als die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Substratbindung (k_1) und die Geschwindigkeitskonstante des Substratumsatzes (k_{cat}). Unmittelbar nach dem Reaktionsbeginn liegt folglich nur ein geringer Anteil des verfügbaren Enzyms inhibiert vor; die initiale Reaktionsgeschwindigkeit (v_0) entspricht daher in etwa der Geschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion und ist nahezu unabhängig von der Inhibitor-Konzentration. Im Reaktionsverlauf nimmt die Konzentration des EI-Komplexes solange zu bis ein stabiles Gleichgewicht erreicht ist; in diesem *steady state* verläuft die Progresskurve annähernd linear.

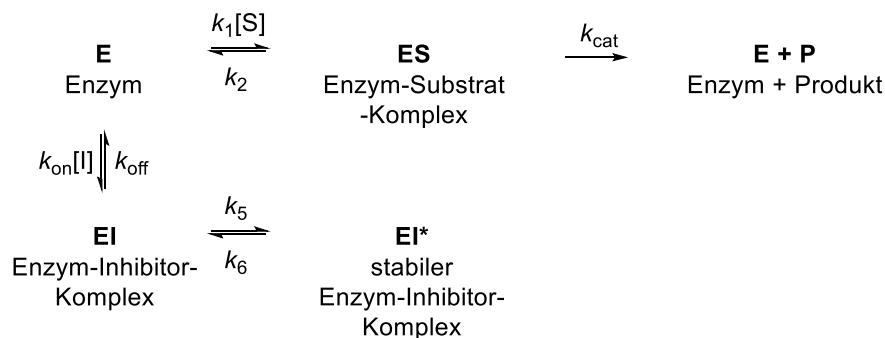


Schema 21: *Slow binding*-Hemmung nach Mechanismus A k_1 : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Substratbindung an das freie Enzym, k_2 Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes, k_{cat} : Wechselzahl bzw. Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung, k_{on} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Ausbildung des EI-Komplexes, k_{off} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des EI-Komplexes, [S]: Substratkonzentration, [I]: Inhibitor-konzentration.²⁰⁰

3.3. Enzymkinetische Auswertung

Der in **Schema 22** gezeigte *slow binding*-Mechanismus B geht von der Annahme eines *induced fit*-Prinzips aus, wobei der Inhibitor zunächst in einem schnellen vorgelagerten Gleichgewicht an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet, seine volle Hemmwirkung jedoch erst nach einem zweiten vergleichsweise langsam verlaufenden Schritt wie z. B. einer nachgelagerten Konformationsänderung entfaltet.²⁰⁰

Die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der initialen EI-Komplexbildung (k_{on} und k_{off}) sind beide groß, sodass sich das vorgelagerte Gleichgewicht innerhalb kurzer Zeit ausbilden kann. Anders als bei der Hemmung nach Mechanismus A sinken dadurch die Initialgeschwindigkeiten v_0 mit zunehmender Inhibitorkonzentration. Folglich können die Mechanismen A und B anhand von v_0 unterschieden werden. Durch den zweiten, langsam verlaufenden Schritt erfolgt die Ausbildung eines stabilen EI*-Komplexes. Die dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k_5 und k_6 sind in der Regel deutlich kleiner als die Konstanten k_1 , k_2 , k_{on} , k_{off} und k_{cat} , sodass der EI*-Komplex zwar relativ langsam gebildet wird, dann jedoch über längere Zeit stabil bleibt. Die langsame EI*-Komplexbildung verursacht im Mechanismus B die initiale Krümmung der Progresskurven. Erst im Reaktionsverlauf erreichen die o. g. Prozesse ein Gleichgewicht, wodurch annähernd linear ansteigende Zeit-Umsatz-Kurven erhalten werden.



Schema 22: Slow binding-Hemmung nach Mechanismus B. k_1 : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes, k_2 Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes, k_{cat} : Wechselzahl bzw. Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung, k_{on} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des EI-Komplexes, k_{off} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des EI-Komplexes, k_5 und k_6 : Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktionen für die Isomerisierung des EI-Komplexes, [S]: Substratkonzentration, [I]: Inhibitorkonzentration.²⁰⁰

3.3. Enzymkinetische Auswertung

Tabelle 1: Gleichungen: *slow binding*-Auswertung. v_s : *steady state*-Geschwindigkeit, v_0 : Initialgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, t : Reaktionszeit, k_{obs} : scheinbare Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Ausbildung des EI-Komplexes, d : y-Achsenabschnitt der Progresskurven beim Start der Reaktion, K_M : MICHAELIS-MENTEN-Konstante, V_{max} : Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, $[S]$: Substratkonzentration, $[I]$: Inhibitor-konzentration, K_i : Hemmkonstante des Inhibitors, k_{on}^* : scheinbare Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des EI-Komplexes, k_{on} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des EI-Komplexes, k_{off} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des EI-Komplexes.²⁰⁰

$$RFU = v_s \cdot t + (v_0 - v_s) \cdot \frac{1 - e^{-k_{obs} \cdot t}}{k_{obs}} + d \quad (3)$$

$$k_{obs} = k_{on}^* \cdot [I] + k_{off} \quad (4)$$

$$k_{on} = k_{on}^* \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \quad (5)$$

$$K_i = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (6)$$

Bei gekrümmten Progresskurven können die v_s - und v_0 -Werte durch Anpassung an die Gleichung 3 berechnet werden; dies ist sogar dann möglich, wenn der lineare Bereich im beobachteten Messintervall noch gar nicht erreicht worden ist. Zur Abschätzung des vorliegenden Hemm-Mechanismus kann eine Betrachtung der Initialgeschwindigkeiten v_0 herangezogen werden. Bei der *slow binding*-Hemmung nach Mechanismus A ist v_0 wie oben beschrieben nahezu unabhängig von der Inhibitor-konzentration, während der Wert bei einer Hemmung nach Mechanismus B mit steigender Inhibitor-konzentration abnimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen *slow binding*-Inhibitoren wurden sowohl klassisch als auch gemäß dem Mechanismus A ausgewertet. Die mittels der beiden Verfahren erhaltenen K_i -Werte unterschieden sich lediglich marginal voneinander. Im Zuge der *slow binding*-Auswertungen konnten jedoch zusätzlich die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bestimmt werden, was im Folgenden erläutert wird.²⁰⁰

In der **Abbildung 21** wird exemplarisch die *slow binding*-Auswertung der Plm-katalysierten Spaltung des Substrats Mes-DArg-Phe-Arg-AMC in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors **43** vorgestellt. Die bereits oben in der **Abbildung 19** gezeigten Progresskurven weisen in Abhängigkeit der Inhibitor-konzentration unterschiedlich starke Krümmungen auf. Durch Anpassung der Messkurven an die Gleichung 3 konnte für jede untersuchte Inhibitor-konzentration die scheinbare Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung (k_{obs}) sowie die *steady state*-Geschwindigkeit v_s ermittelt werden, obwohl bei den niedrigen Inhibitor-konzentrationen im terminalen Bereich der Kurven noch kein lineares Verhalten beobachtet wurde (**Abbildung 21A**). Anhand der so erhaltenen *steady state*-Geschwindigkeiten erfolgte die Bestimmung des K_i -Wertes gemäß der Gleichung 2 analog zur bereits in der **Abbildung 20** gezeigten klassischen Auswertung. Zusätzlich wurden die

3.3. Enzymkinetische Auswertung

erhaltenen k_{obs} -Werte als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen und die scheinbare Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on}^* durch Anpassung der Werte an die Geradengleichung 4 berechnet (**Abbildung 21B**); k_{on}^* entspricht dabei der Steigung der resultierenden Geraden. Mittels der Gleichungen 5 und 6 konnten unter Verwendung von k_{on}^* sowie den bereits bestimmten K_{i} - und K_{M} -Werten die tatsächliche Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} sowie die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} berechnet werden.

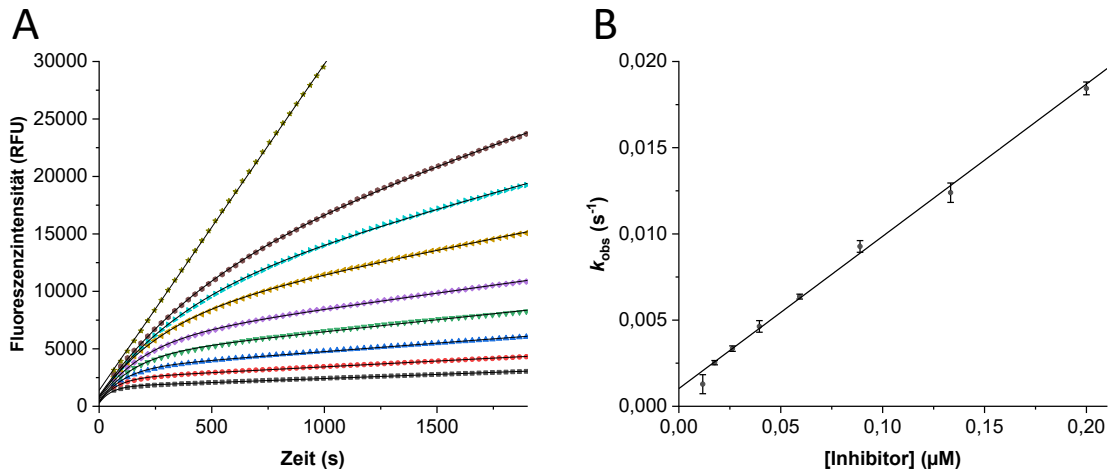


Abbildung 21: Progresskurven mit initialer Krümmung: *slow binding*-Auswertung. A) Bestimmung der *steady state*-Geschwindigkeiten der Plm-katalysierten (0,27 nM) Spaltung des Substrats Mes-DArg-Phe-Arg-AMC (100 µM) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors **43**: 0,200 µM (schwarze Quadrate), 0,133 µM (rote Punkte), 0,089 µM (blaue Dreiecke), 0,059 µM (grüne Dreiecke), 0,040 µM (violette Rauten), 0,026 µM (ockerfarbene Dreiecke), 0,018 µM (türkise Dreiecke), 0,012 µM (braune Punkte) und in Abwesenheit des Inhibitors (Kontrolle, olivgrüne Sterne). Anhand der Kontrolle wird die Initialgeschwindigkeit v_0 durch lineare Regression erhalten. Die Anpassung der Progresskurven der gehemmten Plm-Reaktionen an die Gleichung 3 ergibt unter Konstanzhaltung des v_0 -Wertes für jede untersuchte Inhibitorkonzentration die scheinbare Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_{obs} sowie die *steady state* Geschwindigkeit v_s . B) Auftragung der erhaltenen k_{obs} -Werte als Funktion der Inhibitorkonzentration: die Anpassung der Werte an die Gleichung 4 ergibt die scheinbare Geschwindigkeitskonstante k_{on}^* , die zur Berechnung der k_{on} und k_{off} -Werte verwendet wurde.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Wie oben beschrieben wurden die K_i -Werte der makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren für Plm bestimmt. Zusätzlich wurde die Selektivität gegenüber den verwandten Serinproteasen Trypsin, aktiviertes Protein C (aPC), Plasmakallikrein (PK), Gerinnungsfaktor Xa (FXa), Gerinnungsfaktor XIa (FXIa) sowie Thrombin (FIIa) untersucht. In Zusammenarbeit mit DR. JASON WU (AG LAW, MONASH UNIVERSITY, Melbourne, AU) wurden erstmals Kristallstrukturen dieser Inhibitoren im Komplex mit einer stabilisierten μ Plm-Mutante bestimmt, deren katalytisch aktiver Serin-Rest durch Alanin ersetzt wurde.

3.4.1. Inhibitorserie 1: K_i -Werte und Selektivität

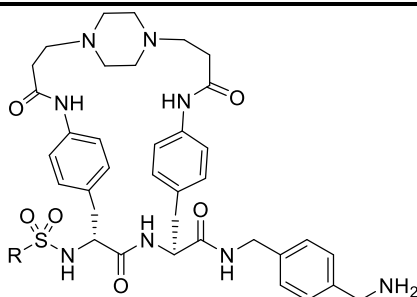
Basierend auf der Struktur der Referenzverbindung **40** wurden die P4-substituierten Derivate **I1** und **I2** hergestellt. Diese bilden zusammen mit den bereits zuvor in unserem Arbeitskreis synthetisierten Verbindungen **41 - 44** die Inhibitorserie 1. Sie enthalten symmetrische *N,N'*-Piperazinyldipropansäureamid-Linker und unterscheiden sich ausschließlich in der Substitution des P4-Restes voneinander. Alle Verbindungen der Serie wurden im Rahmen dieser Promotion enzymkinetisch charakterisiert (**Tabelle 2**). Eine detaillierte Beschreibung der Messbedingungen wird im Methodenteil gegeben.

Die Inhibitoren der ersten Serie zeigten ein ausgeprägtes *slow binding*-Verhalten für Plm und wurden wie oben beschrieben sowohl klassisch als auch nach Mechanismus A der *slow binding*-Hemmung ausgewertet, wobei lediglich marginale Unterschiede in den Hemmkonstanten erhalten wurden. Die *slow binding*-Auswertung erlaubte jedoch die Bestimmung der k_{on} - und k_{off} -Werte der EI-Komplex-Bildung. Bei allen anderen Enzymen wurde aufgrund linearer Progresskurven lediglich eine klassische Auswertung vorgenommen.

Für Plm liegen alle K_i -Werte im unteren nanomolaren bis subnanomolaren Bereich. Im Vergleich zur Referenzverbindung **40** wurden nur geringfügige Unterschiede in den Werten für K_i , k_{on} und k_{off} festgestellt, wobei die Hemmwirkung gegenüber Plm jedoch nicht verbessert werden konnte.¹⁸³ Die *p*-substituierten Derivate **41** und **43** zeigen mit K_i -Werten um 0.9 nM eine höhere Aktivität gegenüber Plm als ihre *m*- und *o*-Analoga und hemmen die Protease nur geringfügig schwächer als der Referenzinhibitor **40** ($K_i = 0.56$ nM).¹⁸⁵ Wie erwartet besitzen alle Verbindungen ein exzellentes Selektivitätsprofil mit K_i -Werten > 15 μ M für fast alle untersuchten Proteasen. Lediglich die K_i -Werte für Trypsin liegen in einem niedrigeren Bereich ($K_i = 1.3 - 8.8$ μ M), wobei dennoch hohe Selektivitätsindizes (SI) zwischen 726 und 3819 erhalten werden. Dabei zeigen die *p*-substituierten Verbindungen **41** und **43** und das Naphthyl-Derivat **44** im Vergleich zu der Referenzverbindung **40** sogar eine leicht verbesserte Selektivität, wobei das *p*-Methoxy-Derivat den höchsten SI aufweist. Alle Verbindungen der Serie 1 sind somit hochaktive und sehr selektive Plm-Inhibitoren.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Tabelle 2: Hemmung trypsinartiger Serinproteasen: Inhibitoren der Serie 1. Die Verbindungen enthalten ein konstantes makrozyklisches Kernsegment und unterscheiden sich lediglich in ihren P4-Bausteinen. Der für Trypsin angegebene Selektivitätsindex [SI] entspricht dem Quotienten $K_{i(\text{Trypsin})} / K_{i(\text{Plm})}$.



#	R	Plm klassisch	Plm <i>slow bind.</i>	Trypsin [SI]	^a FIIa	aPC	PK	FXa	FXIa
		K_i (nM)	K_i (nM) k_{on} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) k_{off} (s^{-1})	K_i (μM)					
40		0.56 ^b	0.54 ^b $6.00 \cdot 10^5$ ^b $3.22 \cdot 10^{-4}$ ^b	1.5 ^b [2679]	37 ^b	> 100 ^b	49 ^b	> 100 ^b	> 55
41		0.932 ± 0.031	0.862 ± 0.079 $4.00 \cdot 10^5$ $3.47 \cdot 10^{-4}$	2.8 ± 0.7 [3004]	> 100	58	17	60	> 100
I1		1.72 ± 0.10	1.61 ± 0.03 $2.68 \cdot 10^5$ $4.30 \cdot 10^{-4}$	2.3 ± 0.3 [1337]	78	> 100	> 100	> 100	91
42		1.79 ± 0.11	1.69 ± 0.06 $2.72 \cdot 10^5$ $4.60 \cdot 10^{-4}$	1.3 ± 0.2 [726]	> 100	78	61	79	> 100
43		0.863 ± 0.142	0.851 ± 0.104 $5.39 \cdot 10^5$ $4.58 \cdot 10^{-4}$	3.3 ± 0.4 [3819]	> 100	30	28	70	58
I2		1.25 ± 0.12	1.31 ± 0.10 $5.35 \cdot 10^5$ $7.02 \cdot 10^{-4}$	2.8 ± 0.2 [2240]	87	> 100	89	> 100	> 100
44		4.42 ± 0.78	2.91 ± 0.31 $6.93 \cdot 10^4$ $2.01 \cdot 10^{-4}$	8.8 ± 0.6 [1990]	> 100	39	> 50	76	> 100

^aFIIa: Thrombin. ^bDie Werte wurden der Literatur entnommen.¹⁸³

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} liegen im Bereich der Referenzwerte des Inhibitors **40**, der mit einem k_{on} -Wert von $6.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ die größte Assoziationsgeschwindigkeit zeigt. Die Plm-Bindung der beiden Methoxy-Derivate **43** und **12** erfolgt mit k_{on} -Werten von je etwa $5.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ nur geringfügig langsamer und ist etwas schneller als die der drei Chlor-Derivate **41**, **42** und **11** ($k_{\text{on}} = 4.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $2.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $2.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Aufgrund seines sterisch anspruchsvollen Naphthylsulfonylrestes besitzt der Inhibitor **44** die kleinste Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ($k_{\text{on}} = 6.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Die k_{off} -Werte liegen zwischen $2.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bis $4.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und somit wiederum im Bereich der Referenzverbindung **40** ($k_{\text{off}} = 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Mit einem k_{off} -Wert von $7.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ zerfällt der Komplex des Plm mit dem *m*-Chlor-Derivat **12** am schnellsten, während das Naphthyl-Derivat **44** mit einem k_{off} -Wert von $2.01 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ besonders lange im EI-Komplex verbleibt. Trotz dessen reduzierter Plm-Hemmwirkung und geringerer Assoziationsgeschwindigkeit scheint dieses folglich den stabilsten EI-Komplex mit Plm auszubilden, was zu einer verlängerten *residence time* führen könnte.^{201–203}

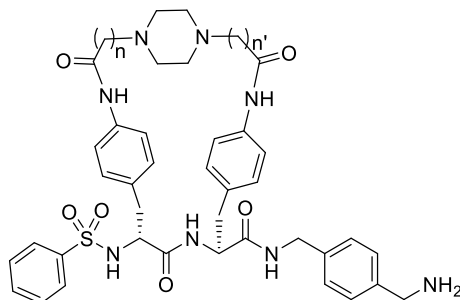
3.4.2. Inhibitorserie 2: K_i -Werte und Selektivität

Bislang wurden in unserer Arbeitsgruppe ausschließlich makrozyklische substratanaloge Inhibitoren mit symmetrischen *N,N'*-Piperazinyldiessigsäureamid- bzw. *N,N'*-Piperazinyldipropansäureamid-Linkern hergestellt.^{182–186} Basierend auf der Referenzverbindung **40** wurde in der Inhibitorserie 2 bei konstantem Inhibitorrückgrat die Größe des makrozyklischen Kernsegments variiert (**Tabelle 3**). Dabei wurden ein symmetrisches und drei asymmetrische Linkersegmente verwendet.

Bei der Verbindung **13** wurde erstmals ein symmetrischer *N,N'*-Piperazinyldibutansäureamid-Linker eingebaut. Im Vergleich zum Referenzinhibitor wurde der Makrozyklus damit um zwei Methylengruppen vergrößert, was eine ca. 300-fache Verringerung der Plm-Hemmwirkung verursachte. Für diesen deutlich schwächer bindenden Inhibitor wurde anders als bei der Ausgangsverbindung kein *slow binding*-Verhalten beobachtet. Bei den Inhibitoren **14 - 16** wurden erstmals asymmetrische *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linker verwendet, wodurch die Größe des makrozyklischen Kernsegments um eine ungerade Anzahl an Methylengruppen variiert werden konnte. Bei den Verbindungen **15** und **16** wurde das Linkersegment an der P3- bzw. P2-Seitenkette um eine Methylengruppe verkürzt; im Gegensatz dazu wurde der Linker der Verbindung **14** an der P3-Seitenkette um eine Methylengruppe verlängert. In enzymkinetischen Messungen mit Plm zeigten alle drei Derivate ein *slow binding*-Verhalten, das bei der Verbindung **15** jedoch nur schwach ausgeprägt war. Dennoch konnten die Inhibitoren zusätzlich zur klassischen Auswertung gemäß des *slow binding*-Mechanismus A ausgewertet werden.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Tabelle 3: Hemmung trypsinartiger Serinproteasen: Inhibitoren der Serie 2. Die Verbindungen enthalten ein konstantes Rückgrat und unterscheiden sich lediglich in der Länge der Linkersegmente. Der für Trypsin angegebene Selektivitätsindex [SI] entspricht dem Quotienten $K_{i(\text{Trypsin})} / K_{i(\text{Plm})}$.



#	n	n'	Plm klassisch	Plm slow bind.	Trypsin [SI]	^a FIIa	aPC	PK	FXa	FXIa
			K_i (nM)	K_i (nM) k_{on} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) k_{off} (s^{-1})						
								K_i (μM)		
40	2	2	0.56 ^b	0.54 ^b $6.00 \cdot 10^5$ ^{5b} $3.22 \cdot 10^{-4b}$	1.5 ^b [2679]	37 ^b	> 100 ^b	49 ^b	> 100 ^b	> 55
13	3	3	170 ± 10	-	4.2 ± 0.04 [25]	97	> 100	33	> 100	> 100
14	3	2	1.87 ± 0.02	1.95 ± 0.02 $6.64 \cdot 10^5$ $1.29 \cdot 10^{-3}$	1.7 ± 0.4 [909]	> 100	> 100	> 40	100	90
15	1	2	15.4 ± 1.3	16.8 ± 1.1 $2.25 \cdot 10^5$ $3.77 \cdot 10^{-3}$	4.3 ± 0.9 [279]	61	29	46	> 100	> 100
16	2	1	1.84 ± 0.06	1.83 ± 0.15 $6.58 \cdot 10^5$ $1.21 \cdot 10^{-3}$	5.0 ± 0.2 [2717]	> 100	> 100	37	97	77

^aFIIa: Thrombin. ^bDie Werte wurden der Literatur entnommen.¹⁸³

Analog zu den Verbindungen der Serie 1 wurden mit den beiden Auswertungsmethoden erneut nur marginale Unterschiede in den K_i -Werten erhalten. Keine der neuen Verbindungen zeigte eine verbesserte Plm-Hemmwirkung im Vergleich zum Referenzinhibitor **40**. Dennoch sind die Derivate **14** und **16** mit K_i -Werten um 2 nM hochwirksame Plm-Hemmstoffe, während die Verbindung **15** eine etwa zehnfach verringerte Hemmwirkung aufweist ($K_i = 15.4$ nM).

Auch die Inhibitoren der zweiten Serie sind selektive Plm-Hemmstoffe; die Hemmkonstanten für Trypsin liegen oberhalb von 1.5 μM , wobei die Selektivitätsindizes jedoch kleiner waren als bei der Inhibitorserie 1. Für die anderen untersuchten Serinproteasen wurden K_i -Werte > 25 μM ermittelt.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten liegen erneut im Bereich der Referenzverbindung **40**, wobei die Werte der Verbindungen **I4** und **I6** (jeweils $k_{\text{on}} = 6.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) nahezu identisch mit dem Referenzwert sind ($k_{\text{on}} = 6.00 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Die vergleichsweise geringe inhibitorische Aktivität der Verbindung **I5** beruht auf einem etwa dreifach reduzierten k_{on} -Wert von $2.25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und einer etwa dreifach erhöhten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ($k_{\text{off}} = 3.77 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Die Geschwindigkeiten des EI-Komplex-Zerfalls sind mit k_{off} -Werten zwischen $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $3.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ somit deutlich größer als bei den Derivaten der Serie 1 ($k_{\text{off}} = 2.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} - 7.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

3.4.3. Kristallstrukturen

Von DR. JASON WU (AG LAW, MONASH UNIVERSITY, Melbourne, AU) wurden erstmals vier Kristallstrukturen substratanaloger makrozyklischer Inhibitoren im Komplex mit einer stabilisierten Ser195(741)Ala Mutante des humanen μPlm bestimmt (Nummerierung: Chymotrypsinogensequenz, in Klammern: Volllängen-P1g-Sequenz). Aus der Serie 1 wurden die Referenzsubstanz **40** sowie deren *m*-Chlor-substituiertes Analogon **I1** ausgewählt, die beide symmetrische *N,N'*-Piperazinyldipropansäureamid-Linker besitzen. Zusätzlich wurden die Derivate **I4** und **I5** der Serie 2 kristallisiert, deren Makrozyklen aufgrund ihrer asymmetrischen Linkerbausteine jeweils um eine Methylengruppe vergrößert bzw. verkleinert wurden. In allen Strukturen wurden zwei Protein-Ligand-Komplexe je kristallographischer Einheit gefunden, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden (**Abbildung 22**).

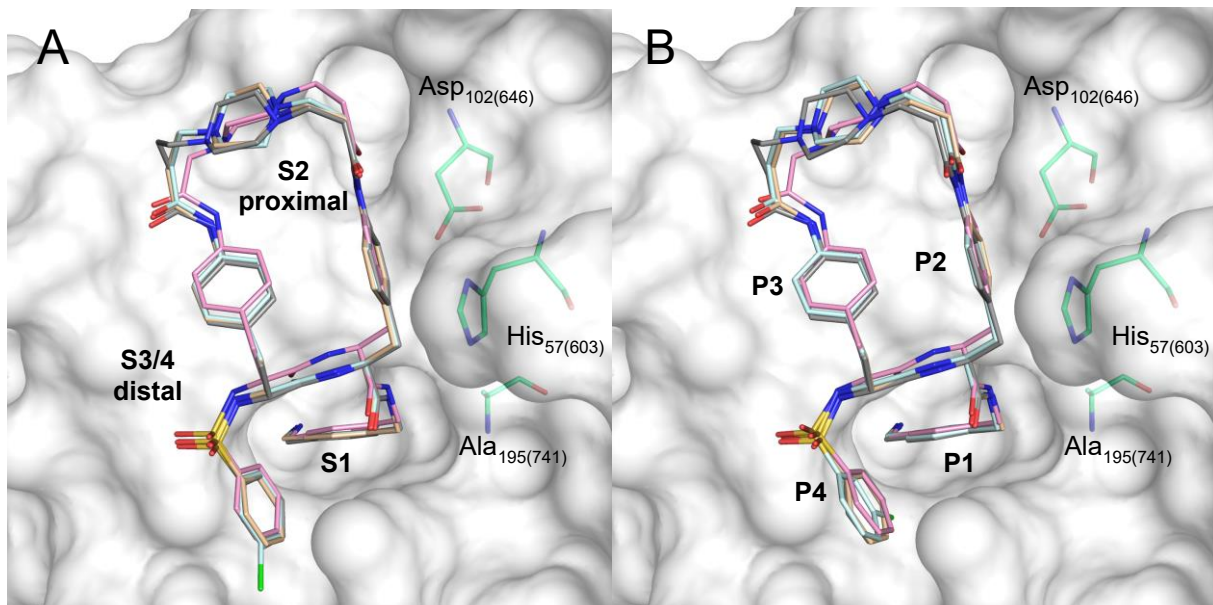


Abbildung 22: Kristallstrukturen: Inhibitoren 40, I1, I4 und I5 im Komplex mit μPlm . Es werden die überlagerten Bindungsmodi der Inhibitoren **40** (beige C-Atome), **I1** (türkise C-Atome), **I4** (dunkelgraue C-Atome) und **I5** (pinke C-Atome) im Komplex mit der stabilisierten Ser195(741)Ala μPlm -Mutante (weiße Oberfläche und weiße C-Atome) gezeigt. Die Reste der mutierten katalytischen Triade werden mit grünen C-Atomen abgebildet. A) Kristallographische Einheit A. B) Kristallographische Einheit B.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Obwohl das Derivat **I5** ein deutlich schwächerer Plm-Inhibitor ist, zeigt dessen Bindungsmodus im Vergleich mit den drei wirksameren Inhibitoren **40**, **I1** und **I4** nur geringfügige Unterschiede. Für die Verbindung **I1** (hellblaue C-Atome) wurden zwei unterschiedliche Orientierungen des *m*-Chlor-Substituenten am P4-Rest gefunden, der entweder ins Lösungsmittel oder in Richtung der Proteinoberfläche zeigt (Komplexe A bzw. B). Die beobachteten Bindungsmodi sind sehr ähnlich zu dem im Jahr 2013 mittels Docking vorgeschlagenen Computermodell eines verwandten makrozyklischen Plm-Inhibitors.¹⁸²

3.4.3.1. Inhibitor 40

Der Bindungsmodus des Inhibitors **40** ist in den Komplexen A und B nahezu identisch und vollständig durch Elektronendichte definiert. Analog zur Kristallstruktur eines strukturell ähnlichen Benzamidin-Derivats im Komplex mit Trypsin (PDB: 5EG4)¹⁸³ bindet der P1-*p*-Xda-Rest über mehrere polare Wechselwirkungen in der für trypsinartige Serinproteasen charakteristischen S1-Tasche (**Abbildung 23A**). Dabei wird eine doppelte Salzbrücke zwischen der freien Aminogruppe des Inhibitors und den beiden Carboxyl-O-Atomen der Seitenkette von Asp189(735) ausgebildet; zusätzlich interagiert das primäre Amin mit den Carbonyl- und Hydroxyl-Gruppen von Ser190(736). Über ein oberhalb des Tyr228(774) fixiertes Wassermolekül, das in zahlreichen Komplexen substratanaloger Inhibitoren mit trypsinartigen Serinproteasen gefunden wird, werden zusätzliche Wechselwirkungen zu den Carbonyl-O-Atomen von Trp215(761) und Val227(773), sowie zur NH-Gruppe des Val227(773) ausgebildet. Darüber hinaus ist das P1-Amid-NH an die Carbonylgruppe des Ser214(760) gebunden. Gemeinsam mit den beiden polaren Wechselwirkungen zwischen dem P3-Rückgrat und Gly216(762) wird eine kurze antiparallele β -Faltblattstruktur ausgebildet. Der P4-Rest bindet in einer flachen Tasche oberhalb der Disulfidbrücke zwischen Cys191(737) und Cys220(765) und interagiert über eines der Sulfonamid-O-Atome mit dem Amid-NH des Gly219(764). Die P2- und P3-Phenylringe befinden sich in einer *edge to face*-Orientierung zueinander. Zusätzlich sind die beiden Ringe jeweils *face to face* zum Imidazolring des His57(603) bzw. zum Indol-Rest des Trp215(761) ausgerichtet, was auf die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen hindeutet. Zur Kristallisation wurde die Ser195(741)Ala Mutante des Plm genutzt, deren katalytisch aktiver Serin-Rest zur Stabilisierung durch Ala ersetzt worden ist. Aufgrund dieser Mutation ist der Imidazol-Ring des in der katalytischen Triade enthaltenen His57(603) nicht durch die typische Wasserstoffbrücke mit Ser195(741) in seiner nativen Position stabilisiert und liegt im Vergleich zu anderen Plm-Strukturen (z. B. PDB: 5UGG)¹⁵⁵ stattdessen in einer um ca. 90 Grad rotierten Konformation vor. Daher ist zu vermuten, dass die *face to face*-Orientierung zwischen dem P2-Phenylring und His57(603) im nativen Plm nicht in gleicher Weise möglich ist.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Das Linkersegment ist von einem komplexen Netzwerk aus sechs Wassermolekülen umgeben und wird durch mehrere wasservermittelte intra- und intermolekulare Wechselwirkungen stabilisiert (**Abbildung 23B**). Über zwei verbrückende Wassermoleküle werden intramolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Piperazinring und den Seitenketten-Amiden der P3- und P2-Reste ausgebildet. Vier verbrückende Wassermoleküle ermöglichen Wechselwirkungen mit den Carbonyl-O-Atomen des Arg175(719) und den beiden Carboxyl-O-Atomen des Glu180(724), sowie zur Hydroxylgruppe des Ser214(760) und zum Amid-NH des Asp102(646). Aufgrund der zahlreichen wasserverbrückten Wechselwirkungen wird der Makrozyklus des Inhibitors **40** im Komplex mit μ Plm stark stabilisiert, obgleich keine direkten polaren Kontakte zwischen dem Linkersegment und den Resten des Plm gefunden werden.

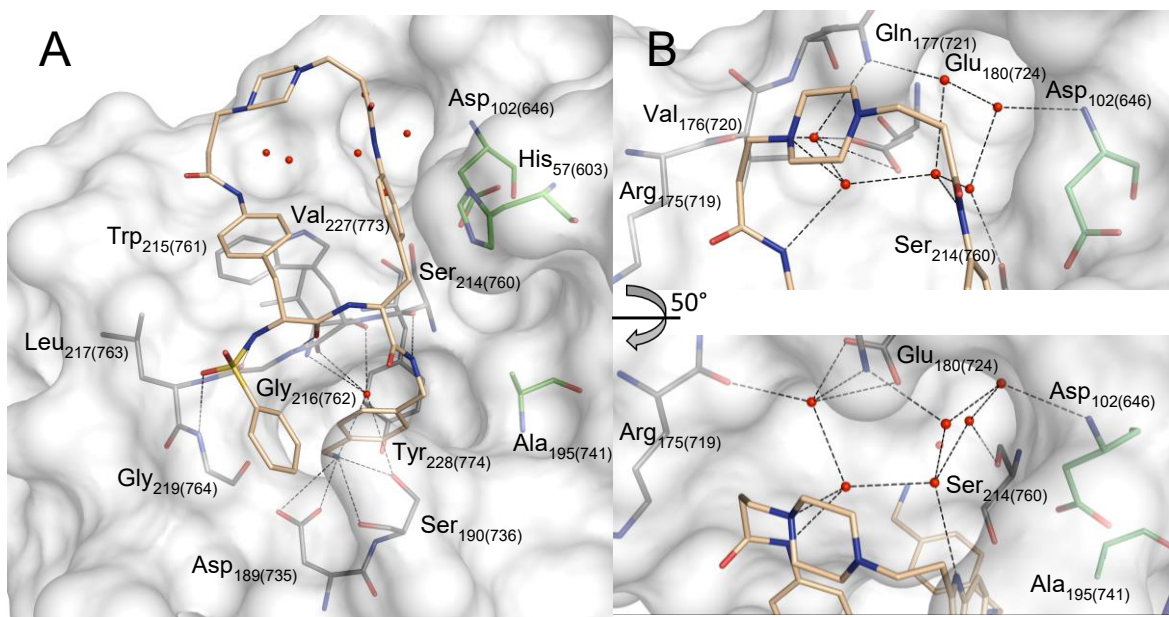


Abbildung 23: Kristallstruktur: Verbindung 40 im Komplex mit μ Plm. Es wird der Bindungsmodus des Inhibitors (beige C-Atome) im Komplex mit der stabilisierten μ Plm-Mutante gezeigt (weiße Oberfläche und graue C-Atome, Komplex A). Die Reste der mutierten katalytischen Triade sind in grün abgebildet. A) Polare Wechselwirkungen des P1-Restes und des Inhibitorrückgrats mit μ Plm. B) Wasservermittelte polare Interaktionen zwischen dem Linkersegment und μ Plm.

3.4.3.2. Inhibitor I1

Der Bindungsmodus des Inhibitors **I1** ist in beiden Komplexen der kristallographischen Einheit vollständig durch Elektronendichte definiert. Gemäß **Abbildung 24A** unterscheiden sich die Inhibitorstrukturen jedoch in der Orientierung des P4-Phenylrings, wobei der *m*-Chlor-Substituent entweder ins Lösungsmittel (Komplex A, hellblaue C-Atome) oder auf die μ Plm-Oberfläche (Komplex B, orange C-Atome) gerichtet ist.

Die für die Kristallstruktur der Referenzverbindung **40** beschriebenen Interaktionen des Inhibitorrückgrats sowie die vermuteten π - π -Wechselwirkungen mit Trp215(761) und His57(603) werden durch den Inhibitor **I1** auf identische Weise ausgebildet (**Abbildung 24B**). Auch die Konformation des Linkersegments wird auf eine mit der Referenzstruktur vergleichbare Weise durch das vorhandene Netzwerk aus sechs Wassermolekülen stabilisiert

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

(Abbildung 24C), wobei wasservermittelte intermolekulare Wechselwirkungen zu den Resten Asp102(646), Arg175(719), Gln177(721), Glu180(724), Ser214(760) sowie intramolekulare Interaktionen zwischen dem Piperazinring und den Seitenketten-Amiden des Inhibitors ausgebildet werden. Da sich der Inhibitor **I1** ($K_i = 1.72 \text{ nM}$) nur durch seinen *m*-Chlor-Substituenten von der Referenzverbindung **40** ($K_i = 0.56 \text{ nM}$)¹⁸³ unterscheidet, muss dieser für die etwa dreifache Verringerung der Plm-Hemmwirkung verantwortlich sein. Jedoch ist unklar, welche der beiden Orientierungen die Bindungsaffinität verringert.

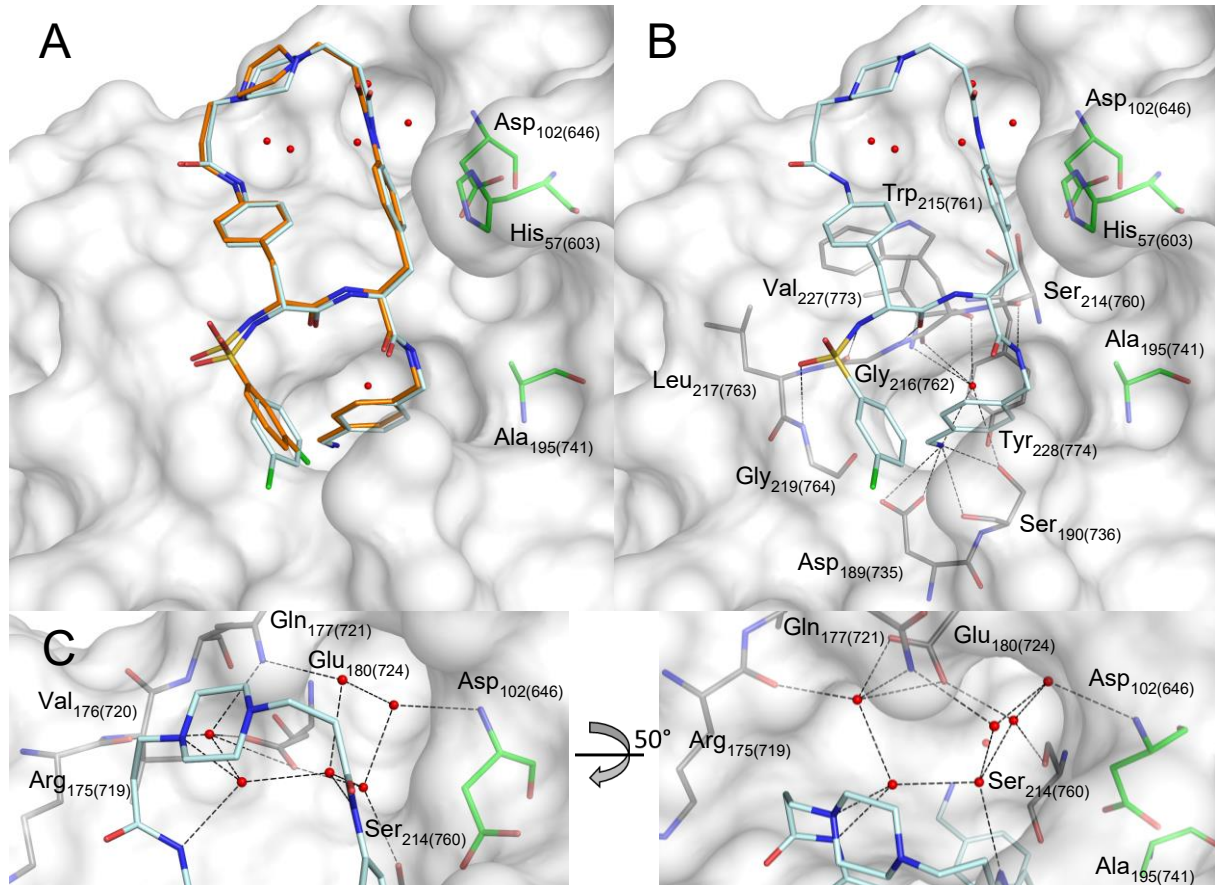


Abbildung 24: Kristallstruktur: Verbindung I1 im Komplex mit μ Plm. Es wird der Bindungsmodus des Inhibitors (hellblaue C-Atome: Komplex A, orange C-Atome: Komplex B) im Komplex mit der stabilisierten μ Plm-Mutante gezeigt (weiße Oberfläche und graue C-Atome). Die Reste der mutierten katalytischen Triade sind in grün abgebildet. A) Überlagerte Konformationen des Inhibitors in den Komplexen A und B der kristallographischen Einheit (Oberfläche: Komplex A). B) Polare Wechselwirkungen des P1-Restes und des Inhibitorrückgrats mit μ Plm. C) Wasservermittelte polare Interaktionen zwischen dem Linkersegment und μ Plm.

3.4.3.3. Inhibitor I4

Im Vergleich zur Referenzsubstanz **40** und dem Inhibitor **I1** ist das asymmetrische Linkersegment des Derivats **I4** auf der Seite des P3-Restes um eine Methylengruppe verlängert worden. Der Bindungsmodus ist in beiden Komplexen der kristallographischen Einheit vollständig durch Elektronendichte definiert.

Sowohl die bereits für die Kristallstrukturen der Analoga **40** und **I1** beschriebenen polaren Interaktionen des Inhibitorrückgrats mit μ Plm, als auch die vermuteten π - π -Wechselwirkungen mit Trp215(761) und His57(603) sind vollständig vorhanden (Abbildung 25A). Das

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

Linkersegment wird wiederum durch ein Netzwerk verbrückender Wassermoleküle stabilisiert (**Abbildung 25B**), wobei intramolekulare Wechselwirkungen mit den Resten Asp102(646), Arg175(719), Ser214(760), Gln177(721) und Glu180(724) ausgebildet werden, während die P3- und die P2-Seitenketten intramolekular mit dem Piperazinring verbunden sind. Im Vergleich mit den oben beschriebenen Komplexen zeigt das Wassernetzwerk um das vergrößerte Linkersegment jedoch geringfügige Unterschiede. Eine zusätzliche wasservermittelte Wechselwirkung wird zwischen dem P3-Amid-O-Atom des Linkers und der Seitenkette des Arg175(719) ausgebildet. Die Seitenkette des Gln177(721) liegt anders als bei den Komplexen der Inhibitoren **40** und **I1** in einer rotierten Konformation vor und interagiert daher lediglich mit einem Wassermolekül des Netzwerks. Insgesamt bildet das asymmetrische Linkersegment weniger stabilisierende Wechselwirkungen aus als die symmetrischen Linker der zuvor gezeigten Komplexe, was die im Vergleich zur Referenzverbindung **140** ($K_i = 0.56 \text{ nM}$)¹⁸³ etwa dreifach reduzierte Plm-Hemmwirkung des Inhibitors **I4** ($K_i = 1.87 \text{ nM}$) erklären könnte.

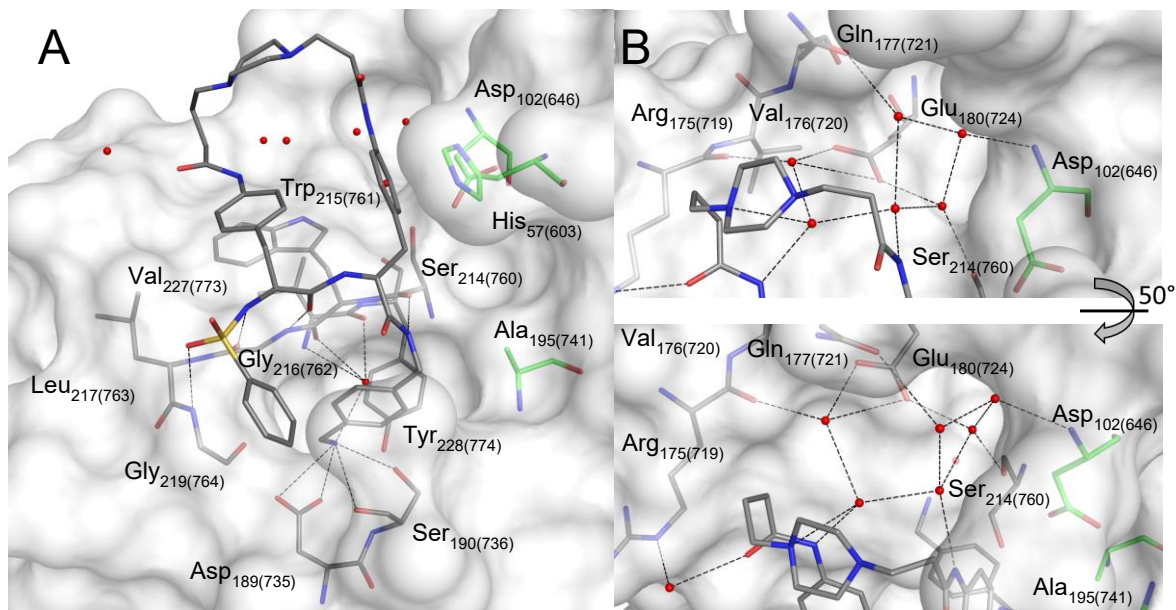


Abbildung 25: Kristallstruktur: Verbindung I4 im Komplex mit µPlm. Es wird der Bindungsmodus des Inhibitors (dunkelgraue C-Atome) im Komplex A der stabilisierten µPlm-Mutante gezeigt (weiße Oberfläche und weiße C-Atome). Die Reste der mutierten katalytischen Triade sind in grün abgebildet. A) Polare Wechselwirkungen des P1-Restes und des Inhibitorrückgrats mit µPlm. B) Wasservermittelte polare Interaktionen zwischen dem Linkersegment und µPlm.

3.4.3.4. Inhibitor I5

Das Linkersegment des Inhibitors **I5** ist im Vergleich zur Referenzsubstanz **40** auf der Seite des P3-Restes um eine Methylengruppe verkürzt worden. Erneut ist die Inhibitorstruktur in beiden Komplexen der kristallographischen Einheit vollständig durch Elektronendichte definiert.

Die bereits beschriebenen polaren Interaktionen des Inhibitorrückgrats und des P1-Restes mit μPlm werden vollständig ausgebildet (**Abbildung 26A**); auch die vermutete π - π -Wechselwirkung des P3-Phenylrings mit Trp215(761) wird reproduziert. Aufgrund des verkleinerten Linkersegments ist die Position des P2-Phenylrings jedoch verschoben (vgl. **Abbildung 22**), sodass keine π - π -Wechselwirkung mit dem Imidazolring des His57(603) ausgebildet wird; dieser liegt daher in einer um ca. 90 Grad rotierten Konformation vor (**Abbildung 26B**), die der Orientierung in Enzym-Inhibitor-Komplexen ohne die Ser195(741)Ala-Mutation ähnelt.¹⁵⁵ Die Amidgruppe der P2-Seitenkette zeigt eine inverse Orientierung, in der das Carbonyl-O-Atom nicht wie bei den anderen Komplexen ins Lösungsmittel sondern in Richtung der Enzymoberfläche zeigt, was abstoßende Wechselwirkungen verursachen könnte.

Das verkürzte Linkersegment ist im Vergleich mit den oben beschriebenen Derivaten an deutlich weniger wasservermittelten polaren Interaktionen beteiligt. Es wird durch Wechselwirkungen mit den Resten Asp102(646), Arg175(719), Gln177(721) und Ser214(760) lediglich rudimentär stabilisiert (**Abbildung 26C**). Die typische Verbrückung der P3- und P2-Seitenketten mit dem Piperazinring durch zwei Wassermoleküle ist in dieser Struktur nicht enthalten. Vermutlich ist die starke Veränderung des Wassernetzwerkes auf die inverse Orientierung der Amidbindung in der P2-Seitenkette zurückzuführen. Insgesamt wird das Linkersegment deutlich schwächer an die Enzymoberfläche gebunden, was als Erklärung für die fast 30-fach verringerte Hemmwirkung des Inhibitors **I5** ($K_i = 15.4 \text{ nM}$) im Vergleich zur Referenzsubstanz **40** ($K_i = 0.56 \text{ nM}$)¹⁸⁵ dienen könnte.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

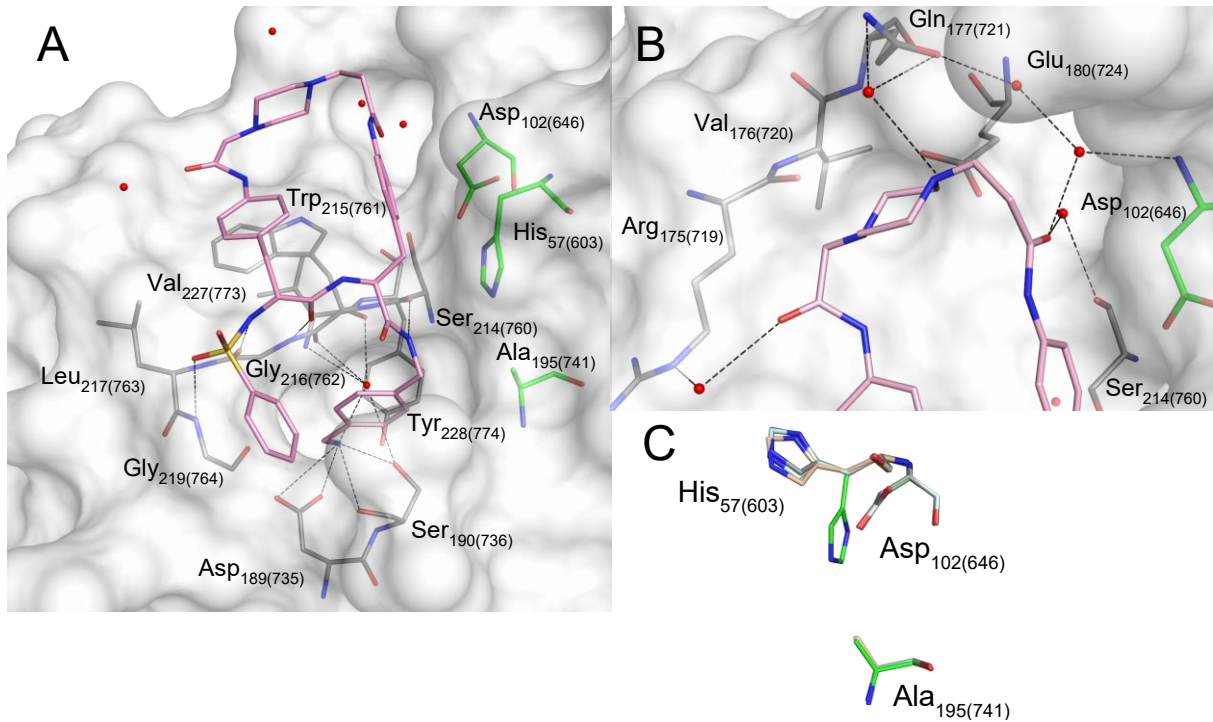


Abbildung 26: Kristallstruktur: Verbindung 15 im Komplex mit µPlm. Es wird der Bindungsmodus des Inhibitors (rosa C-Atome) im Komplex A der stabilisierten µPlm-Mutante gezeigt (weiße Oberfläche und graue C-Atome). Die Reste der mutierten katalytischen Triade sind in grün abgebildet. A) Polare Wechselwirkungen des P1-Restes und des Inhibitorrückgrats mit µPlm. B) Wasservermittelte polare Interaktionen zwischen dem Linkersegment und µPlm. C) Überlagerung der katalytischen Triaden der µPlm-Komplexe mit den Inhibitoren **40** (beige C-Atome), **11** (hellblaue C-Atome), **14** (graue C-Atome) und **15** (grüne C-Atome) im Komplex mit der µPlm-Mutante. Der Imidazolring des Inhibitors **11** liegt in einer um ca. 90 ° rotierten Konformation vor und bildet keine Wechselwirkung mit dem Phenylring in der P2-Seitenkette aus.

3.4.4. Inhibitorserie 3: Entwicklung der Strukturen und K_i -Werte

3.4.4.1. Entwicklung der P4-P2-Makrozyklen

Anders als die oben beschriebenen P3-P2-Makrozyklen wurden die Inhibitoren der Serie 3 zwischen dem P4-Rest und der Seitenkette der P2-Aminosäure zyklisiert. Die Idee wurde von den Strukturen der hochwirksamen Inhibitoren **139** und **140** im Komplex mit Thrombin abgeleitet (**Abbildung 27**, Thrombin: $K_i = 0.06 \text{ nM}^{204}$ bzw. $K_i = 3.7 \text{ nM}^{205}$).

Beide Thrombininhibitoren adressieren die S3/4-S1-Region des katalytischen Zentrums, wobei die P1-Benzamidin- und P2-Prolin-Segmente auf typische Weise in den S1- und S2-Taschen binden (**Abbildung 27B**). Der obere Bereich der S3/4-Bindungsregion wird durch die aromatischen P4-Sulfonamide besetzt, während die Seitenkette des substituierten P3-LAsn-Restes der Verbindung **139** nach unten in Richtung des Lösungsmittels orientiert ist. Dieser Bereich bleibt im Thrombinkomplex des P3-Gly-Derivats **140** unbesetzt. Die Phenylringe der P4-Reste befinden sich in relativer Nähe zur Seitenkette des P2-Prolin-Bausteins, woraus die Idee einer Zyklisierung zwischen dem P4-Baustein und der Seitenkette eines geeigneten P2-Restes entstand. Es wurde vermutet, dass auch solche Verbindungen in geeigneter Weise an die relativ offene S4-S2-Region des Plm binden können. Im Gegensatz dazu sollten die analogen Taschen verwandter Proteasen aufgrund der sterisch anspruchsvollen 99-Schleife nur unzureichend mit diesen Verbindungen adressierbar sein. Da diese bei Plm nicht vorhanden ist, wurde für die neuartigen P4-P2-Makrozyklen eine hohe Plm-Selektivität vermutet. In der **Abbildung 27C** wird eine Überlagerung der Verbindungen **139** im Komplex mit Thrombin und **40** im Komplex mit der μ Plm-Mutante gezeigt, in der die P4-P3-Segmente beider Strukturen eine inverse Orientierung zeigen. Der D-konfigurierte P3-Rest des Inhibitors **40** zeigt auf die Enzymoberfläche und adressiert die obere S3/4-Bindungsregion, während der P4-Rest in der unteren S3/4-Region bindet. In umgekehrter Weise befindet sich die Seitenkette des substituierten P3-LAsn-Restes der Verbindung **139** wie bereits beschrieben in der unteren S3/4-Region, während der P4-Baustein im oberen Bereich der Tasche bindet.

Durch eine P4-P2-Zyklisierung könnte demnach analog zum Bindungsmodus des Hemmstoffs **139** ein neuer Inhibitor-Typ erhalten werden, der im Vergleich zu den bisher beschriebenen Makrozyklen einen veränderten Bindungsmodus besitzt (**Abbildung 28A-C**). Im Rahmen einer Masterarbeit wurde bereits vor dem Beginn dieser Promotion die Struktur des Inhibitors **18** entwickelt, jedoch nicht erfolgreich hergestellt.¹⁸⁶ Sie enthält analog zum Inhibitor **40** einen *p*-Xda-Rest in P1-Position und einen 4-Aminophenylalanin-Rest in P2-Position. Die P2-Seitenkette ist über einen *N,N'*-Piperazinylidipropansäureamid-Linker mit dem P4-Sulfonamidbaustein verknüpft, wobei das doppelt protonierbare Linkersegment wie zuvor bei den P3-P2-Makrozyklen beobachtet, zu einer guten Wasserlöslichkeit der Verbindung beitragen soll.

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

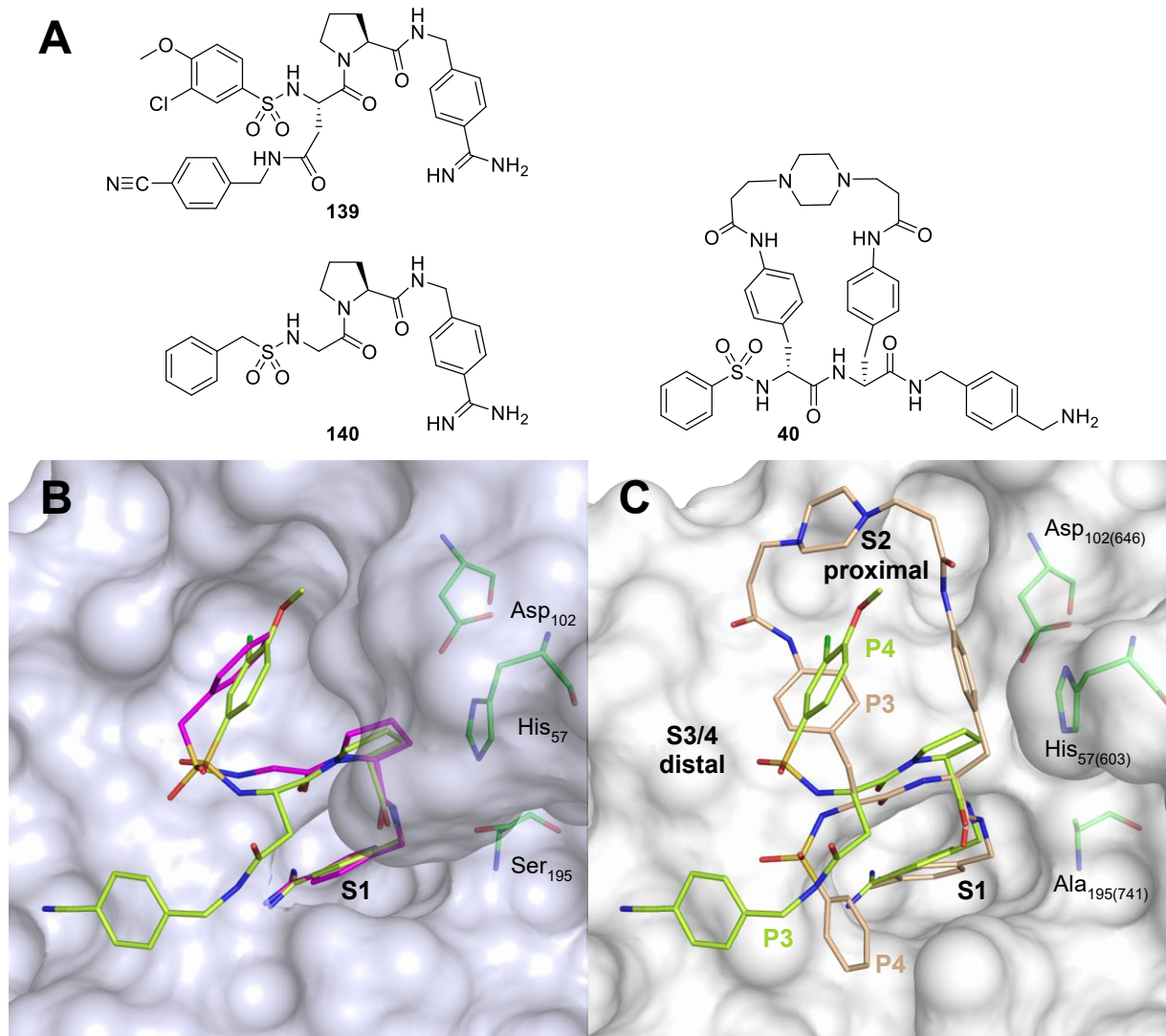


Abbildung 27: Thrombin- bzw. Plm-Inhibitoren: Verbindungen 139, 140 bzw. 40. A) Strukturformeln. B) Überlagerte Bindungsmodi der Substanzen **139** (hellblaue C-Atome, PDB: 3UTU)²⁰⁴ und **140** (hellgrüne C-Atome, PDB: 3RLW)²⁰⁵ im Komplex mit Thrombin (blaugraue Oberfläche, grüne C-Atome: katalytische Triade). C) Überlagerter Bindungsmodus des Inhibitors **139** im Komplex mit Thrombin (Oberfläche nicht gezeigt) mit der Kristallstruktur der Referenzverbindung **40** (beige C-Atome)¹⁸⁵ im Komplex mit der μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche, grüne C-Atome: katalytische Triade).

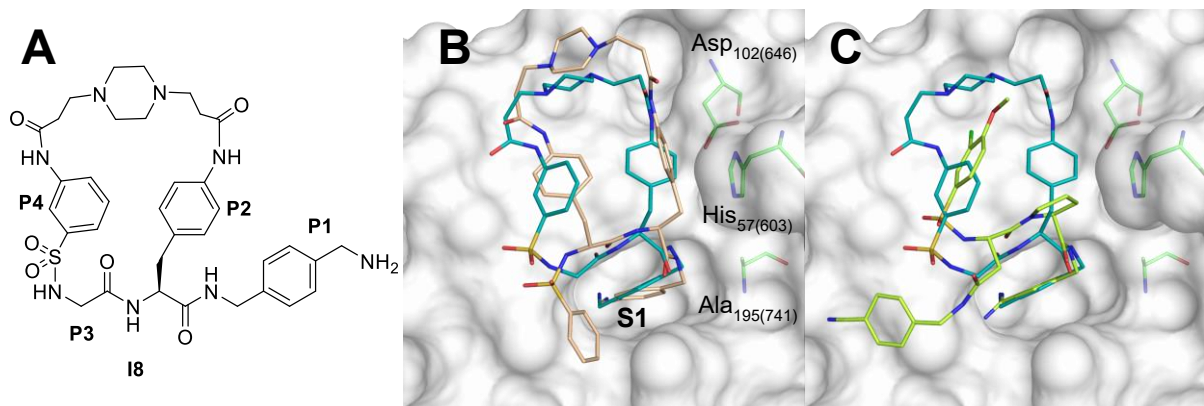


Abbildung 28: Computermodell: Inhibitor 18 in μ Plm. A) Strukturformel. B) Überlagerte energieminierte Pose der Verbindung **18** (blaugrüne C-Atome) mit der Kristallstruktur der Referenzsubstanz **40** (beige C-Atome)¹⁸⁵ in der μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche). C) Überlagerte Struktur der Verbindung **139** (hellgrüne C-Atome, PDB: 3UTU)²⁰⁴ aus dem Thrombin-Komplex (Oberfläche nicht gezeigt) mit der Pose der Verbindung **18** (blaugrüne C-Atome) in der μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche).

3.4. Charakterisierung der Inhibitoren

In P3-Position wurde analog zum Hemmstoff **140** zunächst ein Gly-Rest gewählt, damit der N-terminale P4-Phenylsulfonylrest ohne sterische Hinderung die S3-S2-Bindungsregion besetzen kann.

Die in Computersimulationen erstellte Pose des Inhibitors **18** zeigt Ähnlichkeiten mit den überlagerten Bindungsmodi der Referenzverbindungen **40** in μ Plm (**Abbildung 28B**) und **139** in Thrombin (**Abbildung 28C**).^{185,204} In der S1-Tasche sind die Orientierungen nahezu identisch; jedoch gibt es deutliche Unterschiede in der Lage der P4-P2-Segmente, die vor allem im Bereich der Sulfonamidgruppen auffällig sind. Dennoch wurde basierend auf den oben genannten Beobachtungen eine effektive Bindung des Inhibitors **18** an Plm erwartet, wobei das Linkersegment die offene S3/4-S2-Region des aktiven Zentrums besetzen sollte.

3.4.4.2. K_i -Werte der P4-P2-Makrozyklen

Mit den Verbindungen **17** und **18** wurden im Rahmen dieser Promotion erstmals Makrozyklen synthetisiert, die zwischen dem P4-Rest und der Seitenkette des P2-Restes mit einem *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linker verknüpft sind (**Abbildung 29**). Entgegen der Erwartungen wurde für Plm jedoch nur eine geringe Hemmwirkung ermittelt. Mit K_i -Werten im einstellig-mikromolaren Bereich sind die Verbindungen über 2000-fach schwächere Plm-Hemmstoffe als die Referenzsubstanz **40**, was ohne eine Kristallstruktur nicht zu erklären ist. Aufgrund der geringen Hemmwirkung wurden keine Selektivitäten gegenüber anderen trypsinartigen Serinproteasen bestimmt und das Konzept der makrozyklischen P4-P2-Inhibitoren bislang nicht weiterverfolgt. Dennoch ist es denkbar, dass durch eine Strukturoptimierung auch für diesen Inhibitortyp deutliche Verbesserungen erzielt werden könnten. Entsprechende Vorschläge werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

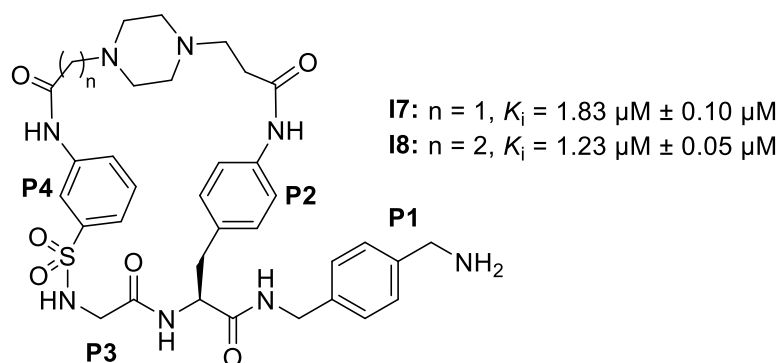


Abbildung 29: Strukturen und K_i -Werte: Inhibitoren **17** und **18** (Serie 3).

3.5. Diskussion (Teil A)

Im ersten Teil dieser Promotion wurden substratanaloge makrozyklische Plm-Inhibitoren zur Adressierung der S4-S1-Region des aktiven Zentrums untersucht. Dafür wurde zunächst eine Serie bereits verfügbarer P4-substituierter Derivate der Referenzverbindung **40** mit den Inhibitoren **I1** und **I2** vervollständigt und enzymkinetisch charakterisiert (Inhibitorserie 1).¹⁸⁶ Der Austausch der üblicherweise verwendeten Tfa-Schutzgruppe am P1-Rest gegen eine Cbz-Gruppe bot bei der Synthese der neuen Verbindungen keine Vorteile, weshalb alle folgenden Derivate wieder unter Tfa-Schutz hergestellt wurden. Alle Verbindungen der Inhibitorserie 1 sind potente und hochselektive Plm-Inhibitoren; allerdings weist keines der Derivate eine stärkere Plm-Hemmwirkung als der Referenzinhibitor **40** auf ($K_i = 0.6 \text{ nM}$).¹⁸³ Innerhalb der Inhibitorserie 1 sind die *m*- und *o*-Derivate **42**, **I1** und **I2** mit Hemmkonstanten im Bereich von 1.3 nM - 1.8 nM etwas weniger wirksam als die *p*-Analoge **41** und **43** (jeweils $K_i = 0.9 \text{ nM}$). Trotz der geringfügigen Affinitätsverringerungen könnte die Substitution des P4-Phenylrings mit Halogen-Atomen vorteilhaft sein, um dessen potenzielle Biotransformation zu reduzieren.²⁰⁶ Dies wurde für die P1-*p*-Xda-Verbindungen bislang jedoch noch nicht experimentell untersucht. Darüber hinaus ist eine Metabolisierung an der primären Aminogruppe des *p*-Xda-Bausteins sehr wahrscheinlich. In Metabolismus-Studien mit dem FXa-Inhibitor *DPC-423*, der ebenfalls eine P1-Benzylamin-Gruppe enthält, wurden zahlreiche Metabolite und Konjugate dieser Aminogruppe nachgewiesen.²⁰⁷⁻²⁰⁹ Allerdings wurde der strukturell eng mit dieser Verbindung verwandte Plasmakallikrein-Inhibitor *Bertralstat* kürzlich zur Behandlung hereditärer Angioödeme zugelassen, obwohl er eine analoge Benzylamin-Gruppe enthält.²¹⁰ Daher könnte die *p*-Xda-Gruppe auch für Plm-Hemmstoffe ein geeigneter P1-Rest sein, zumal diese Wirkstoffe im klinischen Rahmen üblicherweise nur vorübergehend zur Behandlung oder Vermeidung akuter Blutungskomplikationen verabreicht werden. In früheren Metabolismus-Studien zeigten strukturell ähnliche P1-Benzamidin-Derivate der Referenzverbindung **40** eine sehr hohe Stabilität gegenüber der Inkubation mit humanen Leber-Mikrosomen.¹⁸² Darüber hinaus wurde lediglich eine vernachlässigbare Hemmwirkung gegenüber fünf untersuchten CYP-450 Enzymen festgestellt ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$). Daher kann vermutet werden, dass die in dieser Arbeit beschriebenen *p*-Xda-Derivate abgesehen von deren P1-Aminogruppe ebenfalls eine hohe metabolische Stabilität aufweisen dürften.

In der Inhibitorserie 2 wurde unter Verwendung einer neuen Synthesestrategie die Ringgröße des Makrozyklus der Referenzverbindung **40** variiert. Auch die Inhibitoren der zweiten Serie zeigen eine hohe Plm-Selektivität, besitzen jedoch keine stärkere Hemmwirkung als der Referenzinhibitor. Die Verbindung **I3** enthält einen um zwei Methylengruppen vergrößerten, symmetrischen *N,N'*-Piperazinyldibutansäureamid-Linker und zeigt mit einem K_i -Wert von 170 nM eine relativ schwache Plm-Hemmwirkung. Durch den erstmaligen Einbau

3.5. Diskussion (Teil A)

asymmetrischer Linkerbausteine wurde die Ringgröße des Makrozyklus der Referenz um jeweils eine Methylengruppe vergrößert bzw. verkleinert (Verbindungen **14** - **16**). Dabei wurde beobachtet, dass nicht nur die Größe des Makrozyklus, sondern auch die Orientierung des verwendeten asymmetrischen Linkers Einfluss auf die Plm-Hemmwirkung nehmen. Zwei der neuen Inhibitoren hemmen Plm mit K_i -Werten um 2 nM, während der Dritte eine fast zehnfach geringere Wirksamkeit aufweist. Dieser deutliche Hemmwirkungsverlust kann zumindest teilweise durch Unterschiede in den Kristallstrukturen erklärt werden.

Aufgrund ihres *slow binding*-Verhaltens konnten für fast alle Inhibitoren sowohl die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{on}) als auch die zugehörigen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{off}) der EI-Komplexbildung bestimmt werden. Die k_{on} -Werte vieler Inhibitoren liegen im Bereich um $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und sind damit etwas kleiner als bei der Referenzverbindung **40** ($k_{on} = 6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).¹⁸³ Dabei zeigen die Inhibitoren der ersten Inhibitorserie deutlich kleinere k_{off} -Werte als jene der zweiten Serie, was vermuten lässt, dass die Verbindungen mit symmetrischen Piperazinyldipropansäure-Linkern tendenziell fester an Plm binden als ihre Analoga mit asymmetrischen Linkerbausteinen.

Die pharmakologische Effizienz eines Wirkstoffs wird in hohem Maße durch die Stabilität des EI-Komplexes beeinflusst. Neben dem K_i -Wert, der das Dissoziationsgleichgewicht des binären EI-Komplexes beschreibt, ist vor allem die sogenannte *residence time* des Inhibitors an seinem *target* von großer Bedeutung;^{202,203} diese beschreibt die Aufenthaltsdauer des Inhibitors im EI-Komplex und hängt maßgeblich von der Größe des k_{off} -Wertes ab. Näherungsweise entspricht sie dem reziproken Wert der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ($t_{residence} \approx 1/k_{off}$). Für die aktiveren Inhibitoren der Serie 1 wird anhand ihrer k_{off} -Werte von ca. $4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eine Halbwertszeit von etwa 40 min erhalten, die im Bereich der Referenzverbindung **40** liegt ($k_{off} = 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $t_{residence} \approx 50 \text{ min}$).¹⁸³ Die Inhibitoren der zweiten Serie zeigen aufgrund ihrer deutlich größeren k_{off} -Werte eine geringere *residence time* (z. B. Verbindung **16**: $k_{off} = 1.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $t_{residence} \approx 15 \text{ min}$ oder Verbindung **15**: $k_{off} = 3.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $t_{residence} \approx 4 \text{ min}$). Demzufolge sind die EI-Komplexe dieser Inhibitoren weniger stabil, weshalb die symmetrischen Linker der ersten Inhibitorserie gegenüber den asymmetrischen Analoga der zweiten Serie zu bevorzugen sind. Anhand der erhaltenen K_i -Werte und der näherungsweise bestimmten *residence time* kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das Linkersegment der Referenzsubstanz **40** bereits eine optimale Länge aufweist und eine weitere Variation der Größe des Makrozyklus nicht mehr sinnvoll erscheint.

Obwohl die Plm-Hemmwirkung im Vergleich zur Referenzverbindung **40** nicht verbessert werden konnte, wurden innerhalb der Inhibitorserien 1 und 2 mehrere hochwirksame und selektive Plm-Hemmstoffe identifiziert. Basierend auf den enzymkinetischen Daten besitzen diese Verbindungen im Vergleich zu dem strukturell verwandten, azyklischen Plm-Inhibitor

3.5. Diskussion (Teil A)

CU-2010 (Verbindung **25**, $K_i = 2.2$ nM, Abschnitt 1.4.3.3.) ein günstigeres Hemmprofil;¹⁷⁴ trotz seiner geringeren Plm-Selektivität hat dieser die klinische Entwicklungsphase II erreicht. Bei einer durchschnittlichen Plg-Konzentration von 1 - 2 μM im Blut erwies sich in diesen Studien bereits eine CU-2010-Konzentration von 0.5 μM als ausreichend, um die angestrebte antifibrinolytische Wirkung *in vivo* zu erzielen.¹⁸⁰ Die benötigte Wirkstoffkonzentration liegt damit zwar mindestens um den Faktor 250 über den *in vitro* bestimmten K_i -Werten der besseren makrozyklischen Plm-Inhibitoren ($K_i = 0.9 - 2$ nM), ist jedoch deutlich kleiner als die zwischen 1 μM und > 100 μM liegenden K_i -Werte, die in den Selektivitätsstudien für die sechs verwandten Serinproteasen ermittelt wurden. Daher sollte für fast alle im ersten Teil dieser Dissertation untersuchten Verbindungen *in vivo* eine effiziente und selektive Plm-Hemmung und damit eine starke antifibrinolytische Wirkung zu erwarten sein.

In Zusammenarbeit mit der AG LAW (MONASH UNIVERSITY, Melbourne, AU) wurden erstmals Kristallstrukturen von vier makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren im Komplex mit einer stabilisierten μPlm -Mutante erhalten (Verbindungen **40**, **I1**, **I4** und **I5**); diese bestätigen den Bindungsmodus der Inhibitor-Klasse, der bereits im Jahr 2013 im Computermodell eines strukturell eng verwandten P1-Benzamidin-Derivats im Komplex mit μPlm vorgeschlagen wurde.¹⁸² Analog zu zahlreichen anderen Kristallstrukturen azyklischer substratanaloger Hemmstoffe im Komplex mit trypsinartigen Serinproteasen sind alle charakteristischen *backbone*-Interaktionen vollständig konserviert. Im Bereich des Linkersegments unterscheiden sich die Strukturen der potenteren Inhibitoren **40**, **I1** und **I4** jedoch deutlich vom Bindungsmodus des schwächer wirksamen Hemmstoffs **I5**. Die makrozyklischen Kernsegmente der drei wirksameren Inhibitoren werden durch komplexe Netzwerke wasservermittelter, intra- und intermolekularer Wechselwirkungen im aktiven Zentrum des Plm stabilisiert. Im Gegensatz dazu wird in der Kristallstruktur des Inhibitors **I5** nur ein rudimentäres Wassernetzwerk ausgebildet, was dessen geringere Hemmwirkung erklären könnte. Ferner liegt die Amidfunktion seiner P2-Seitenkette in einer inversen Konformation vor und zeigt in Richtung der Enzymoberfläche, woraus abstoßende Wechselwirkungen resultieren könnten. Der bereits vor dieser Promotion verwendete *N,N'*-Piperazinyldipropansäure-Linker wird durch das Wassernetzwerk am besten stabilisiert und besitzt folglich auch unter Berücksichtigung der Kristallstrukturen eine optimale Länge.

Ein Vergleich der Kristallstruktur der Verbindung **40** im Komplex mit μPlm mit dem Bindungsmodus des strukturell sehr ähnlichen Inhibitors **32** im Komplex mit Trypsin (PDB: 5EG4) offenbart deutliche Konformationsunterschiede in den makrozyklischen Kernsegmenten (**Abbildung 30**).¹⁸³ Während die P1- und P4-Reste beider Inhibitoren auf ähnliche Weise die S1- und S4-Taschen besetzen und identische Rückgrat-Interaktionen mit den eng verwandten Enzymen ausgebildet werden, existieren drastische Unterschiede in der Positionierung der P2- und P3-Seitenketten sowie des verknüpfenden Linkersegments.

3.5. Diskussion (Teil A)

Entsprechend den bisherigen Annahmen wird die Ursache der hohen Plm-Selektivität der makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren offensichtlich,¹⁸³ ihre geringe Bindungsaffinität gegenüber Trypsin und verwandten trypsinartigen Serinproteasen wird durch abstoßende Wechselwirkungen mit den 99-Schleifen der Enzyme verursacht. Dieser Effekt tritt bei Plm nicht auf, da es aufgrund des 94-*shunt* keinen 99-loop besitzt, sodass sterisch anspruchsvolle Inhibitoren problemlos in der offenen S3/4-S2-Region des aktiven Zentrums binden können.

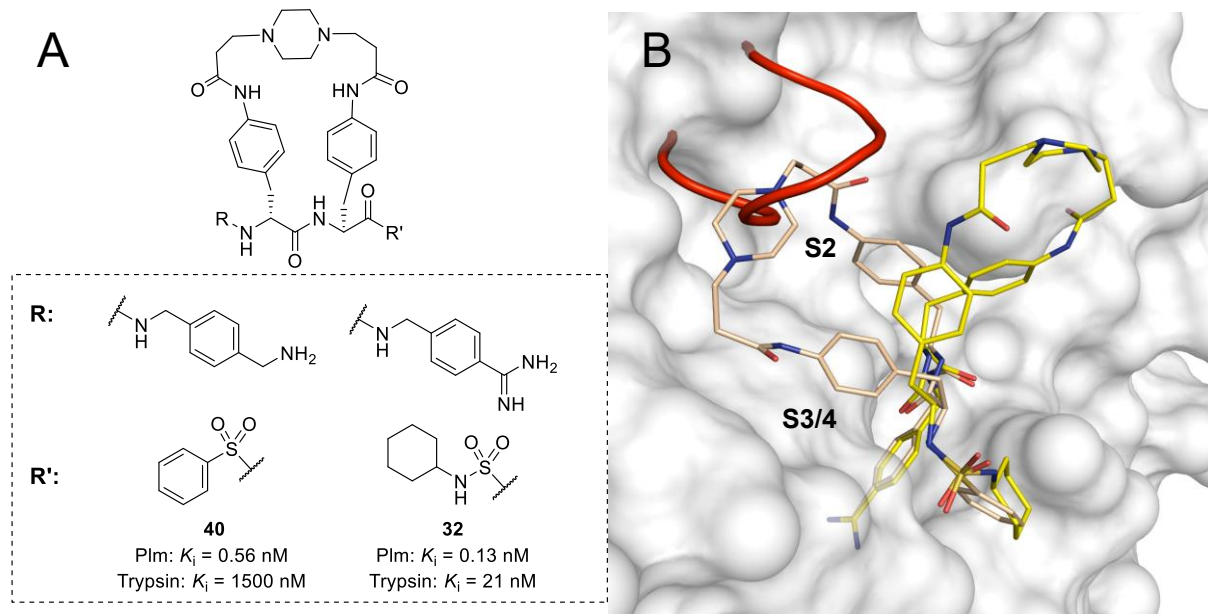


Abbildung 30: Bindungsmodi: Makrozyklische Inhibitoren in μ Plm und Trypsin. A) Strukturen und Hemmwirkungen der Plm-Inhibitoren **40** und **32**.¹⁸³ B) Überlagerte Strukturen des Inhibitors **40** (beige C-Atome) im Komplex mit der μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche) und des Hemmstoffs **32** (gelbe C-Atome, PDB: 5EG4) im Komplex mit Trypsin.¹⁸³ Von Trypsin ist lediglich die 99-Schleife (Reste 94-101) in Rot gezeigt. Diese bewirkt eine Konformationsänderung im makrozyklischen Kernsegment des Inhibitors **32**, der die proximalen und distalen Bindetaschen des Trypsins nicht besetzen kann, woraus ein deutlicher Hemmwirkungsverlust im Vergleich zu Plm resultiert.

Basierend auf den vorhandenen Daten könnte prinzipiell eine Weiterentwicklung P3-P2-Makrozyklen erfolgen. Zunächst sollte dafür deren antifibrinolytische Wirkung in Plasma und in Vollblut, sowie deren Toxizität und pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht werden. Anschließend müsste eine pharmakologische Überprüfung der Wirkstoffe in einem geeigneten Tiermodell erfolgen; im Falle des azyklischen Plm-Inhibitors CU-2010 wurden dafür Hunde verwendet.^{177,178}

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Inhibitoren wurden im Rahmen dieser Promotion erstmalig die zwischen den P4- und P2-Seitenketten zyklisierten Verbindungen **17** und **18** hergestellt. Trotz vielversprechender Computermodelle sind beide Substanzen lediglich schwache Plm-Hemmstoffe mit K_i -Werten im einstellig-mikromolaren Bereich. Jedoch sind auch hier weitere Strukturoptimierungen denkbar. Bisher wurde ausschließlich Gly als P3-Rest eingebaut und die Linkerlänge nur um eine Methylengruppe variiert. Ein erster Verbesserungsansatz könnte beispielsweise die Variation des P4-P3-Segments sein. Zur Veranschaulichung sind in **Abbildung 31A** die Struktur und das Computermodell des

3.5. Diskussion (Teil A)

möglichen Derivats **142** in μ Plm gezeigt, bei dem der P3-Gly-Rest der Verbindung **18** durch hPhe ersetzt wurde, um die S4-Tasche des Plm zu adressieren. Die überlagerte Pose der Verbindung **139** in Thrombin zeigt einen sehr ähnlichen Bindungsmodus, bei dem die S4-Tasche auf analoge Weise durch den P3-Rest besetzt wird.²⁰⁴ Durch die Einführung geeigneter P3-Reste könnte die Hemmwirkung der P4-P2-Makrozyklen gegenüber Plm daher vermutlich gesteigert werden.

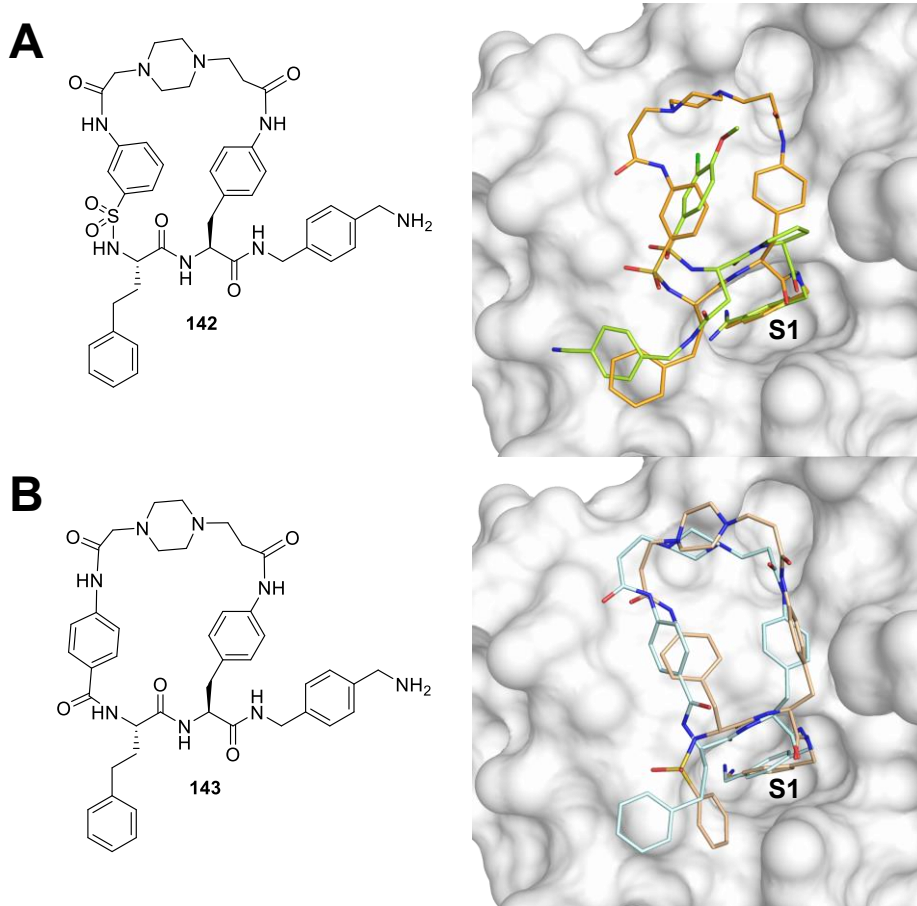


Abbildung 31: P4-P2-Makrozyklen: Möglichkeiten zur Strukturoptimierung. A) Struktur und Computermodell der Verbindung **142** (orange C-Atome) im Komplex mit der μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche) in Überlagerung mit der Pose der Referenzsubstanz **139** (hellgrüne C-Atome, PDB: 3UTU)²⁰⁴ aus dem Komplex mit Thrombin (Thrombinoberfläche nicht gezeigt). B) Struktur und überlagertes Computermodell der Verbindung **143** (hellblaue C-Atome) mit der Kristallstruktur der Verbindung **40** (beige C-Atome) im Komplex mit der μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche).

Im modellierten Bindungsmodus des möglichen Derivats **143** wurde die Sulfonamidgruppe des P4-Restes der Verbindung **142** durch ein Carbonsäureamid ersetzt. Zusätzlich wurde die P4-Aminogruppe in *p*- statt in *m*-Position des Phenylrings angebracht. Infolgedessen ähnelt der simulierte Bindungsmodus der Kristallstruktur des Inhibitors **40** in der μ Plm-Mutante. Durch die fehlende Sulfonamidgruppe kann die wichtige Interaktion zwischen dem Sulfonamid-O-Atom und dem NH-des Gly219 jedoch nicht mehr ausgebildet werden, was sich nachteilig auf die Bindungsaffinität der Substanz auswirken dürfte. Dennoch bietet die Substanzklasse einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Optimierungen.

4. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)

In diesem Kapitel werden die Entwicklung, Synthese und Charakterisierung makrozyklischer Txa-konjugierter Plm-Inhibitoren zur Adressierung der S1-S3'-Region des aktiven Zentrums beschrieben. Die von den Referenzverbindungen **11** und **15** abgeleiteten Hemmstoffe wurden in zwei Serien unterteilt (Serie 4: Verbindungen **I9** - **I27**, Serie 5: Verbindungen **I28** - **I57**). Im Folgenden wird zunächst die Synthese der Inhibitoren vorgestellt. Die Entwicklung und Charakterisierung der Verbindungen wird im Abschnitt 4.6. beschrieben.

4.1. Inhibitorgrundstrukturen

In der **Abbildung 32** sind die Grundstrukturen der Inhibitorserien 4 und 5 gezeigt. Erstere besitzen neben einem konstanten P1-Txa-Baustein einen 4-Amino- bzw. 4-(Aminomethyl)phenylalanin-Rest in P1'-Position, sowie variable P2'-Gruppen und Linkersegmente. Die Seitenkette des P1'-Bausteins ist über das Linkersegment mit dem C-Terminus des P2'-Restes verknüpft, wodurch ein makrozyklisches Kernsegment entsteht. Da sich die Plm-Hemmwirkung dieser Inhibitoren in enzymkinetischen Messungen als relativ schwach erwiesen hat, wurde der P1'-Rest bei der Inhibitorserie 5 durch Biphenylalanin (Bpa)-Bausteine mit unterschiedlichen Substituenten ersetzt.

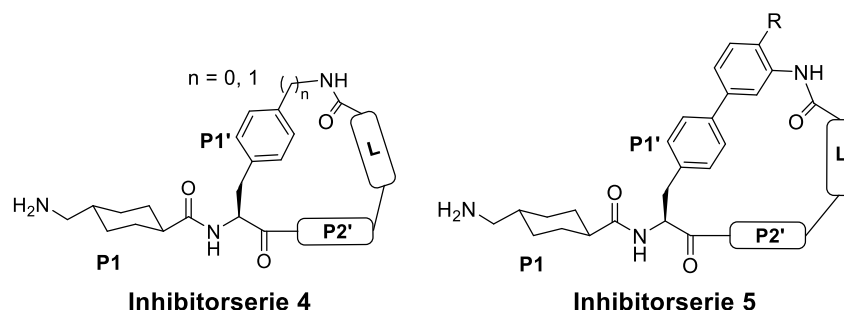


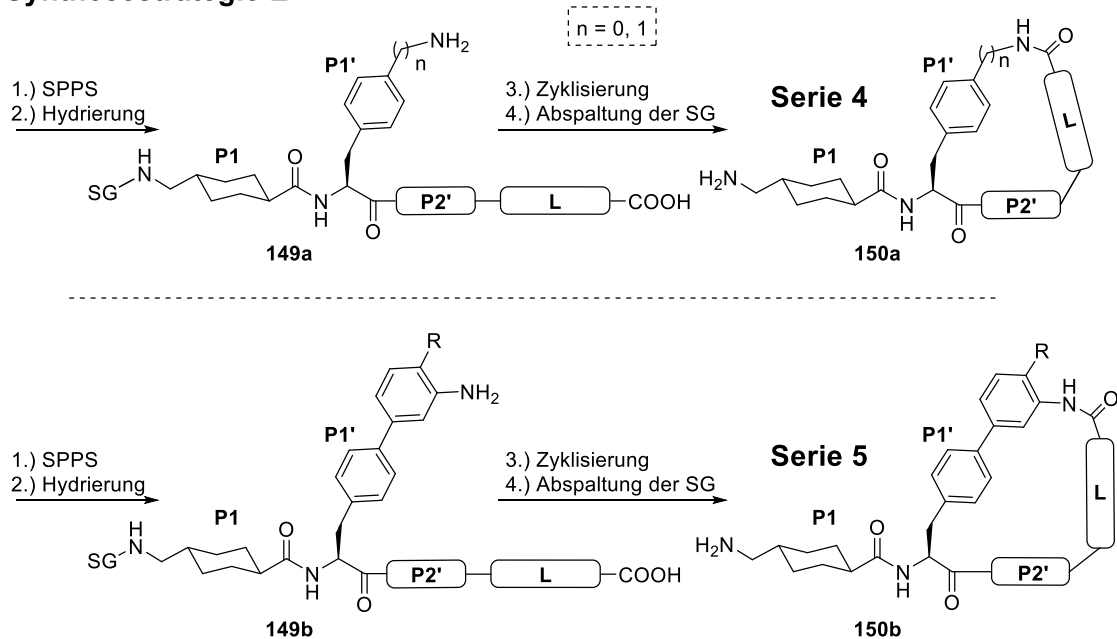
Abbildung 32: Grundstrukturen der Inhibitorserien 4 und 5. (P2': variabler Aminosäurebaustein, L: Linker, R: Substituent des Bpa-Restes).

4.2. Synthesestrategie E

Das **Schema 23** zeigt die Synthesestrategie E zur Herstellung makrozyklischer Txa-konjugierter Inhibitoren. Mittels Fmoc-SPPS werden zunächst die azyklischen Intermediate **149a** bzw. **149b** hergestellt (Schritte 1 und 2), deren Strukturen bereits alle Segmente des finalen zyklischen Inhibitors enthalten. Durch eine einstufige intramolekulare Zyklisierung wird die Aminogruppe der P1'-Seitenkette über eine Amidbindung an den freien C-Terminus des Linkersegments gekuppelt (Schritt 3). Die Abspaltung der P1-Schutzgruppe liefert im vierten Schritt die finalen Inhibitoren **150a** bzw. **150b** der Serien 4 bzw. 5.

4.2. Synthesestrategie E

Synthesestrategie E

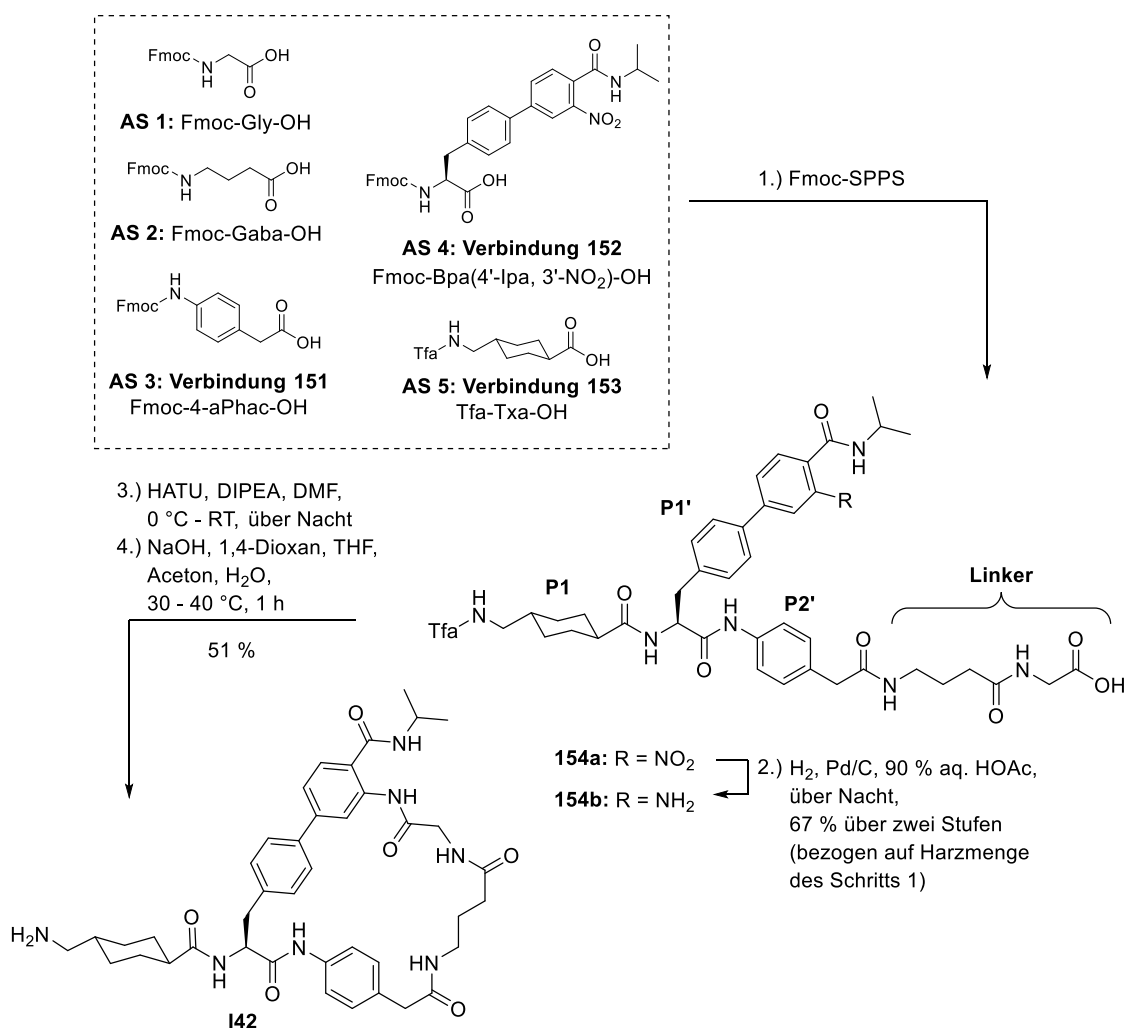


Schema 23: Synthesestrategie E: Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren. SG: Schutzgruppe, R: variabler Substituent, L: variables Linkersegment.

4.3. Inhibitorsynthesen

Im **Schema 24** ist exemplarisch die Synthese der Verbindung **I42** aus der Inhibitorserie 5 gezeigt, die gemäß der Strategie E hergestellt wurde. Die Fmoc-geschützten nicht-proteinogenen Aminosäuren (AS) Fmoc-Gly-OH und Fmoc-Gaba-OH waren kommerziell erhältlich, wohingegen die Bausteine **151** – **153** aus einfachen Grundbausteinen selbst synthetisiert wurden (s. Material und Methoden: Kapitel 6.15.).

Nach einer fünfstufigen Fmoc-SPPS wurde das azyklische Intermediat **154a** erhalten, das aus einem Tfa-geschützten P1-Tranexamoyl (Txa)-Rest, einem Seitenketten-substituierten P1'-Bpa-Baustein, einer 4-Aminophenylacetyl (4-aPhac)-Gruppe in P2'-Position sowie einem aus γ -Aminobutansäure (Gaba) und Glycin (Gly) zusammengesetzten Linkersegment besteht. Anschließend wurde die Nitro-Gruppe hydriert und das erhaltene Amino-Intermediat **154b** mittels HATU-Kupplung intramolekular zyklisiert. Im letzten Schritt wurde durch Abspaltung der Tfa-Schutzgruppe der finale Inhibitor erhalten.



Schema 24: Synthese des Inhibitors **I42** gemäß der Strategie E.

4.4. Alternative Synthesestrategien

Bis auf wenige Ausnahmen erfolgten die Synthesen der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren analog zur Herstellung der Verbindung **I42**. Eine detaillierte Beschreibung der Synthese aller Inhibitoren und ihrer Vorstufen erfolgt im Material- und Methoden-Teil (Kapitel 6.15.).

Nach erfolgter SPPS und Harzabspaltung (Schritt 1) wurden die erhaltenen Nitro-Zwischenstufen meist ohne weitere Reinigung hydriert (Schritt 2). Die resultierenden Amino-Derivate waren aufgrund ihrer zusätzlichen protonierbaren Gruppe in der Regel MeCN/Wasser-Gemischen löslich und konnten daher mittels präparativer HPLC gereinigt werden. Bei einigen besonders hydrophoben Derivaten traten jedoch Löslichkeitsprobleme auf. In diesen Fällen mussten mehrere Trennungen mit relativ kleinen Rohprodukt-Mengen durchgeführt werden. In den einstufigen Zyklisierungsreaktionen (Schritt 3) entstanden aufgrund der hohen Reinheit der Edukte oft nur geringe Mengen an Nebenprodukten, weshalb die P1-Schutzgruppen der erhaltenen Makrozyklen meist ohne vorherige Reinigung der Zyklisierungsprodukte abgespalten wurden (Schritt 4).

Bei den meisten Inhibitorsynthesen wurde der P1-Txa-Rest mit einer N-terminalen Tfa-Gruppe geschützt. Anders als die säurelabile Boc-Gruppe ist diese unter den sauren Bedingungen der präparativen HPLC stabil. Ferner trägt sie im Gegensatz zur besonders hydrophoben Cbz-Gruppe zur Löslichkeit der Intermediate in Lösungsmittelgemischen mit Wasseranteil bei, was deren Reinigung mittels präparativer HPLC erleichtert. Zur Abspaltung der Tfa-Gruppe wurde die makrozyklische Vorstufe im finalen Schritt 4 in 1,4-Dioxan suspendiert, mit wässriger Natronlauge versetzt und für etwa eine Stunde bei RT gerührt. Der Erhalt einer klaren Lösung zeigte meist einen fast vollständigen Umsatz an. Bei besonders hydrophoben Derivaten wurde die Abspaltung der Tfa-Gruppe bisweilen durch eine geringe Löslichkeit erschwert. In diesen Fällen wurden stark getrübbte Suspensionen erhalten, die bis zur deutlichen Aufklärung des Gemisches in kleinen Portionen von je 1 mL mit THF, DMSO und/oder Aceton versetzt wurden. Danach wurde der Ansatz bis zum Erhalt einer annähernd klaren Lösung im Ultraschallbad für etwa eine Stunde bei 30 - 40 °C behandelt. Um die Abspaltung der P1-Schutzgruppe zu erleichtern, wurden bei einigen Synthesen Boc- oder Cbz-Gruppen am Txa-Rest verwendet.

4.4. Alternative Synthesestrategien

Bei der Herstellung der Verbindungen **I24**, **I31**, **I45**, **I39** und **I40** wurden abgewandelte Strategien angewendet, die im Material- und Methoden-Teil detailliert beschrieben werden (Kapitel 6.15.).

4.5. Hergestellte Inhibitoren

Im Rahmen dieser Promotion wurden basierend auf den oben vorgestellten Grundstrukturen die Inhibitoren der Serien 4 und 5 synthetisiert (Tabellen 4 und 5).

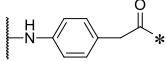
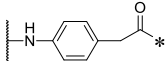
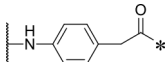
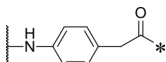
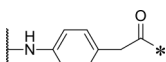
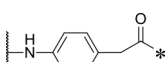
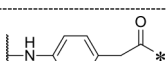
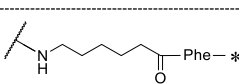
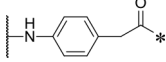
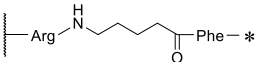
4.5.1. Strukturen der Inhibitorserie 4 (Verbindungen I9 - I27)

Die in der **Tabelle 4** gezeigten makrozyklischen Inhibitoren **I9 - I26** enthalten einen P1-Txa-Rest, ein *p*-substituiertes Phenylalanin-Derivat in P1'-Position sowie variable P2'- und Linkersegmente. Die kombinierten Ausbeuten zur Herstellung der azyklischen Vorstufen (A: Schritte a1 und a2) lagen meist zwischen etwa 30 - 60 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge in der SPPS. Bei der anschließenden Zyklisierung und Abspaltung der P1-Schutzgruppen wurden sehr unterschiedliche kombinierte Ausbeuten (B: Schritte b1 und b2) von bis zu 46 % erhalten.

Tabelle 4: Strukturen und Ausbeuten: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 4. Die Spalte A / B gibt die kombinierten prozentualen Ausbeuten über jeweils zwei Stufen an (A: Fmoc-SPPS und katalytische Hydrierung bezogen auf die eingesetzte Harzmenge), B: Zyklisierung und Abspaltung der P1-Schutzgruppe bezogen auf die eingesetzte Menge der azyklischen Vorstufe). Die Spalte # beschreibt die Anzahl der Hauptkettenatome des jeweiligen Linkers L.

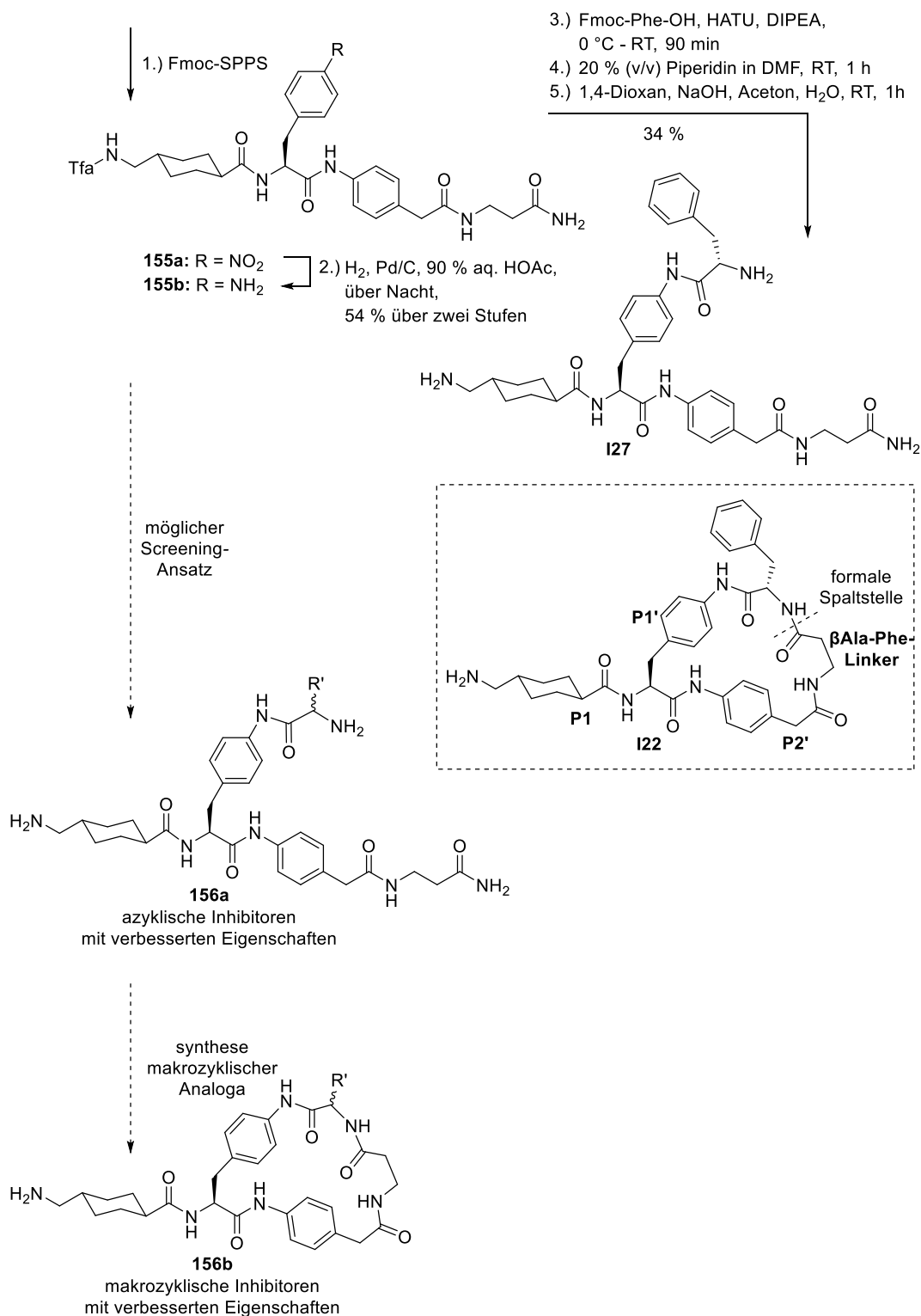
		komb. Ausbeute (A) a1) Fmoc-SPPS a2) kat. Hydrierung		komb. Ausbeute (B) b1) Zyklisierung b2) Entschützung	
Nr.	n	P2'	Linker	#	A / B [%]
I9	0			4	55 / 18
I10	0			4	63 / 20
I11	0			11	65 / 3
I12	0			11	57 / 10
I13	0			11	65 / 44
I14	0			7	86 / 16
I15	0			7	30 / 10
I16	0			6	78 / 16
I17	0			6	34 / 39
I18	0			7	52 / 25

4.5. Hergestellte Inhibitoren

I19	0		β Ala-Gly-*	7	38 / 16
I20	0		β Ala-Leu-*	7	53 / 24
I21	0		β Ala-D-Leu-*	7	52 / 30
I22	0		β Ala-Phe-*	7	18 / 18
I23	0		β Ala-D-Phe-*	7	48 / 5
I24^a	0		β Ala-hPhe-*	7	- / 46
I25	1			10	29 / 33
I26	0			12	26 / 23

^aDa die Verbindung **I24** nicht gemäß der Synthesestrategie E hergestellt wurde, ist sie ohne Angabe der kombinierten Ausbeute A gelistet.

4.5. Hergestellte Inhibitoren



Schema 25: Synthese des azyklischen Inhibitors 127. Die Verbindung ist ein Derivat des makrozyklischen Inhibitors **122**, der formal zwischen dem Phe- und dem β Ala-Rest des Linkersegments gespalten ist. Zur Optimierung der Plm-Hemmwirkung kann ausgehend vom Intermediat **155b** ein einfaches Screening nach geeigneten Aminosäuren durchgeführt werden, deren Kupplung an die P1'-Seitenkette die Plm-Hemmwirkung verbessert. Diese Reste könnten anschließend in die makrozyklischen Strukturen **156b** eingebaut werden.

In **Schema 25** ist die Herstellung der azyklischen Verbindung **127** gezeigt, deren Struktur vom makrozyklischen Inhibitor **122** abgeleitet wurde. Mittels Fmoc-SPPS wurde das Vorläufermolekül **155a** an einem Rink-Amid-Harz synthetisiert (Schritt 1). Nach der Abspaltung vom Harz enthielt es bereits die C-terminale Amidgruppe. Durch Hydrierung (Schritt 2) wurde

4.5. Hergestellte Inhibitoren

das Intermediat **155b** hergestellt, an dessen Aminogruppe anschließend der Baustein Fmoc-Phe-OH in Lösung gekuppelt wurde (Schritt 3). Durch die Abspaltung der Schutzgruppen (Schritte 4 und 5) wurde der finale azyklische Inhibitor erhalten.

Die hier gezeigte Vorgehensweise bietet die Möglichkeit zum effizienten Screening nach geeigneten Linkersegmenten. Unter Verwendung von präparativ gut zugänglichen azyklischen Analoga der makrozyklischen Inhibitoren könnte der Effekt unterschiedlicher Aminosäuren neben der Seitenkette des P1'-Restes auf die Plm-Hemmwirkung und -Selektivität untersucht werden. Nach der Herstellung einer größeren Menge der Vorstufe **155b** könnte diese in parallelen Reaktionen an eine Vielzahl unterschiedlicher Aminosäuren gekuppelt werden (Strukturen **156a**). Die am besten geeigneten Reste der azyklischen Derivate könnten anschließend in die synthetisch aufwändigeren makrozyklischen Strukturen eingebaut werden (Strukturen **156b**). Da die Bpa-Derivate der Inhibitorserie 5 eine deutlich stärkere Wirksamkeit besitzen, wurde auf ein Screening mit den 4-Aminophenylalanin-Derivaten verzichtet. Prinzipiell kann der Screening-Ansatz analog auch auf die Inhibitoren der Serie 5 übertragen werden, was jedoch ebenfalls noch nicht erfolgt ist.

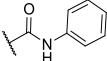
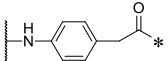
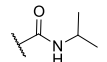
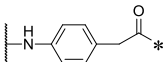
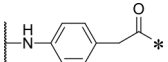
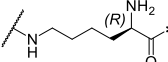
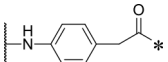
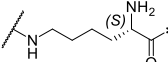
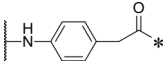
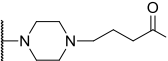
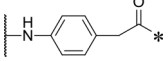
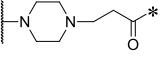
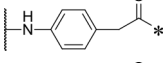
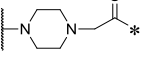
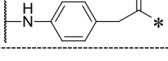
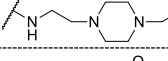
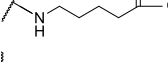
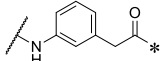
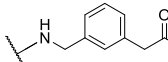
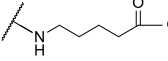
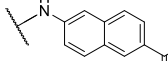
4.5.2. Strukturen der Inhibitorserie 5 (Verbindungen I28 – I57)

Die in der **Tabelle 5** gezeigten Strukturen der Inhibitorserie 5 enthalten einen P1-Txa-Rest, ein substituiertes Bpa-Derivat in P1'-Position sowie variable P2'- und Linkersegmente. Die kombinierten Ausbeuten für die Herstellung der Vorstufen (A: Schritte a1 und a2) lagen analog zur Inhibitorserie 4 meist zwischen etwa 30 - 60 % bezogen auf die eingesetzte Harzmengenge. Bei der Fertigstellung der Inhibitoren wurden oft kombinierte Ausbeuten oberhalb von 20 % erzielt (B: Schritte b1 und b2). Da die Synthesen in der Regel nicht wiederholt wurden, können die in einigen Fällen deutlich geringeren Ausbeuten (z. B. 7 % bei Inhibitor **I38**) zurzeit nicht begründet werden.

Tabelle 5: Strukturen und Ausbeuten: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 5. Die Angabe der Ausbeuten (Spalten A / B) und die Anzahl der Hauptketten-Atome des Linkers (Spalte #) sind analog zur **Tabelle 4** angegeben.

Nr.	R	P2'	Linker	#	A / B [%]
I28	Me			7	16 / 31
I29	Me			7	46 / 38
I30	Me			7	58 / 20
I31 ^b	Me			7	- / 13
I32	Me		β Ala-Gly - *	7	30 / 25
I33	Me		Gly- β Ala - *	7	19 / 60
I34	Me		Gly-Gaba - *	8	38 / 63
I35	Me		Gaba-Gly - *	8	60 / 31
I36	Me			9	41 / 12
I37	Me		Gaba-Phe - *	8	36 / 33
I38	Me		Gaba-hPhe - *	8	61 / 7
I39 ^{a,b}	Me		Gaba-Lys - *	8	- / 37
I40 ^{a,b}	Me		Gaba-Lys - *	8	- / 33

4.5. Hergestellte Inhibitoren

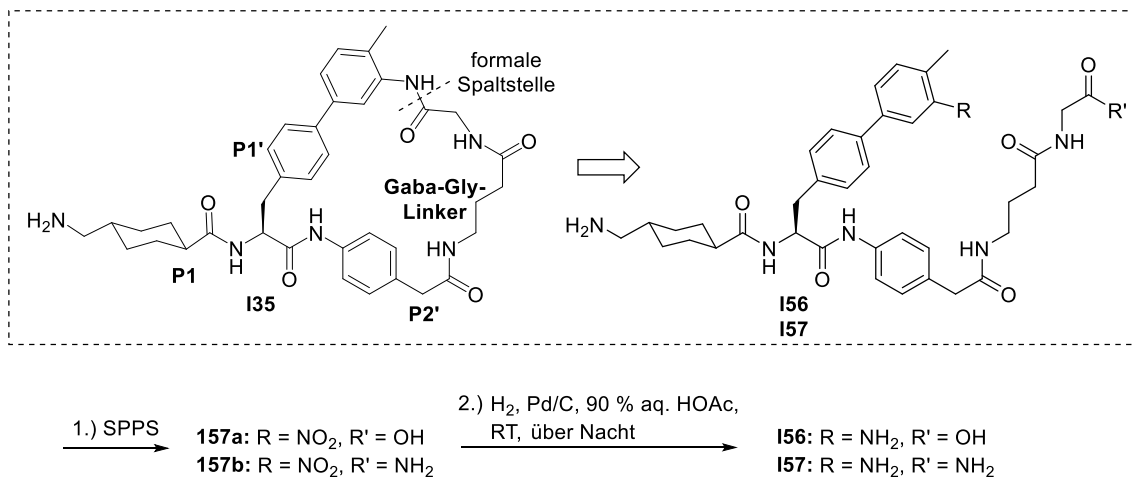
I41			Gaba-Gly - *	8	51 / 10
I42			Gaba-Gly - *	8	67 / 51
I43	Me			7	51 / 24
I44	Me			7	54 / 50
I45^b	Me			8	- / 36
I46	Me			7	65 / 58
I47	Me			6	52 / 45
I48	Me			9	21 / 12
I49	Me			9	51 / 36
I50	Me		Gaba-Gly - *	8	43 / 27
I51	Me		β Ala-Gly - *	7	59 / 36
I52	Me		Gaba-Gly - *	8	53 / 24
I53	Me			9	30 / 22
I54	Me		Gaba-Gly - *	8	23 / 15
I55	Me		β Ala-Gly - *	7	51 / 30

^aDie Verbindungen **I39** und **I40** liegen vermutlich racemisch vor. Nach der finalen Tfa-Abspaltung wurde in Reaktionskontrollen ein Doppelsignal in der analytischen HPLC erhalten, dessen Maxima etwa gleiche Intensitäten aufwiesen. Mittels präparativer HPLC konnten die korrespondierenden Verbindungen isoliert werden, deren Massen beide dem finalen Inhibitor entsprechen. Dies deutet auf eine Racemisierung hin, was durch die später bestimmten, deutlich unterschiedlichen Hemmkonstanten gestützt wird.

^bDie Verbindungen **I31**, **I39**, **I40** und **I45** wurden nicht gemäß der Synthesestrategie E hergestellt und sind daher ohne Angabe der Ausbeute A gelistet.

4.5. Hergestellte Inhibitoren

Die azyklischen Strukturen der Inhibitoren **156** und **157** wurden von der Verbindung **135** abgeleitet, deren Makrozyklus formal zwischen der Seitenkette der P1'-Aminosäure und dem C-Terminus des Linkersegments gespalten ist (**Schema 26**). Die Intermediate **157a** und **157b** wurden mittels SPPS parallel an einem 2-CTC- bzw. Rink-Amid-Harz hergestellt und besitzen daher nach der Harzabspaltung eine C-terminale Carboxyl- bzw. Amid-Gruppe. Als P1-Baustein wurde Boc-Tranexamsäure verwendet, deren Schutzgruppe bereits während der Abspaltung des Peptids vom Harz unter den sauren Reaktionsbedingungen entfernt wurde. Durch Hydrierung wurden die finalen Inhibitoren **156** und **157** erhalten.



Schema 26: Synthese der azyklischen Inhibitoren 156 und 157. Die Strukturen sind Derivate des makrozyklischen Analogons **135**. Mittels SPPS wurden die Vorläuferpeptide **157a** am 2-CTC-Harz und **157b** am Rink-Amid-Harz hergestellt. Die finalen Inhibitoren wurden durch katalytische Hydrierung erhalten.

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

4.6.1. Entwicklung der makrozyklischen Startstruktur I9

Vor wenigen Jahren wurden erste Kristallstrukturen des Plm im Komplex mit Inhibitoren beschrieben, die in der S1-S3'-Region der Protease binden.^{155,191} Zusätzlich wurden von der Firma BAYER zahlreiche Patente mit Txa-konjugierten Verbindungen veröffentlicht, die aufgrund ihrer ähnlichen Grundstruktur einen vergleichbaren Bindungsmodus besitzen sollten.^{161–167} Als Beispiele sind in der **Abbildung 33A** die relativ unselektiven Referenzstrukturen **11** (YO-2) und **12** (PSI-112) gezeigt.¹⁵⁵ Neben einem P1-Txa-Rest besitzen sie alkylierte Tyr-Bausteine in P1'-Position, die in den Patenten der Firma BAYER durch substituierte Bpa-Bausteine ersetzt wurden (z. B. Referenzverbindung **15**).¹⁶¹

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer initialen makrozyklischen Inhibitorstruktur zur Adressierung der S1-S3'-Region wurden die Referenzverbindungen **11** und **12** ausgewählt, die eine Y-förmige Konformation im aktiven Zentrum des Plm einnehmen (**Abbildung 33B**).¹⁵⁵ Ihre P1- und P1'-Reste sind an charakteristischen polaren Wechselwirkungen beteiligt, die in der **Abbildung 33C** am Beispiel des Inhibitors **11** vorgestellt werden. Die primäre Amino-Gruppe des P1-Txa-Restes bindet in der S1-Tasche und wird dort über eine Salzbrücke mit dem konservierten Asp189(735) sowie über zwei Wasserstoffbrücken zu den Carbonyl- und Hydroxyl-Gruppen des Ser190(736) verankert. Ein oberhalb des Tyr228(774) fixiertes, konserviertes Wassermolekül, das in zahlreichen Komplexen substratanaloger Inhibitoren mit trypsinartigen Serinproteasen gefunden wird, verbrückt die P1-Aminogruppe zusätzlich mit dem Carbonyl-O-Atom des Trp215(761) sowie beiden Amid-Gruppen des Val227(773). Vergleichbare Wechselwirkungen werden auch vom *p*-Xda-Rest der im Teil A beschriebenen makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren in der S1-Tasche ausgebildet.

Das Carbonyl-O-Atom des P1-Restes interagiert mit den Amid-NH-Gruppen von Gly193(739) und Ser195(741), während die S1'-Tasche und die darüber liegende Nebentasche (S3'-*subsite*) durch den verlängerten P1'-Tyr-Baustein besetzt werden. Sehr wahrscheinlich kommt es dabei zur Ausbildung einer π - π -Interaktion zwischen dem Pyridylsubstituenten und dem Phenylring der Seitenkette von Phe41(587). Die NH-Gruppe des P1'-Tyr interagiert über ein verbrückendes Wassermolekül mit dem Carbonyl-O-Atom des Ser214(760), während das P2'-Octylamid-Segment oberhalb der S2'-Tasche ins Lösungsmittel zeigt. Sein Amid-NH bindet über ein Wassermolekül an die Hydroxyl-Gruppe und das Amid-NH des Ser195(741) sowie zusätzlich an die Carboxylgruppe des Phe41(587).

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

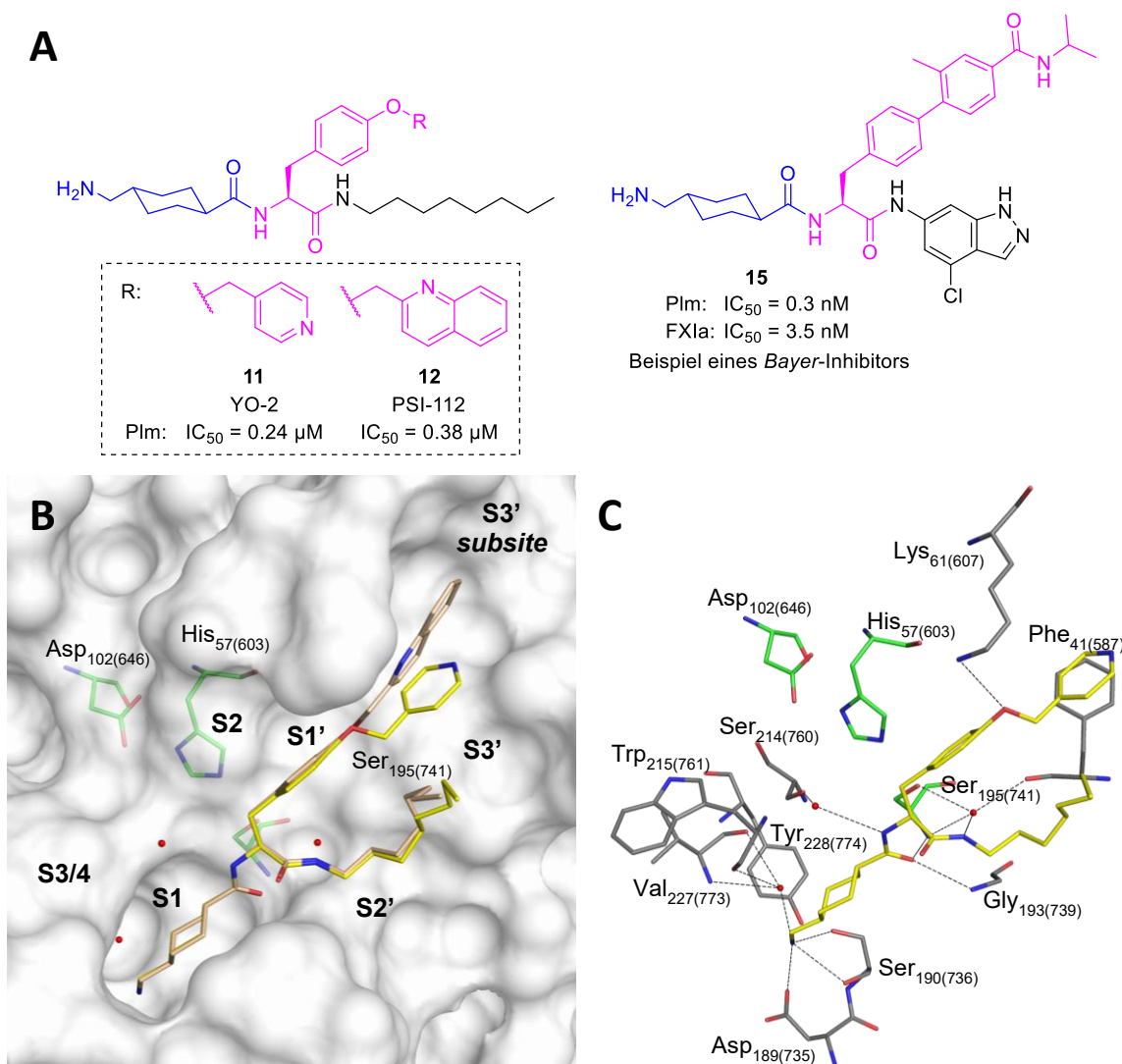


Abbildung 33: Txa-konjugierte Referenzinhibitoren: Verbindungen 11, 12 und 15. ^{155,162} A) Strukturen und Hemmwirkungen. B) Überlagerte Kristallstrukturen der Inhibitoren **11** (gelbe C-Atome, PDB: 5UGD) und **12** (beige C-Atome, PDB: 5UGG) im Komplex mit μ Plm (PDB: 5UGD, weiße Oberfläche). ¹⁵⁵ Die Reste der katalytischen Triade sind mit grünen C-Atomen gezeigt. B) Polare Interaktionen des Inhibitors **11** im Komplex mit μ Plm (graue bzw. grüne C-Atome).

Aus der Analyse der soeben gezeigten Kristallstruktur entstand die Idee den Octylamid-Rest der Referenzverbindung durch geeignete P2'- und Linkersegmente zu ersetzen, um eine Zyklisierung zwischen der Seitenkette des P1'-Bausteins und dem C-Terminus des Linkers zu ermöglichen. Idealerweise sollten die so erhaltenen makrozyklischen Inhibitoren eine starke Plm-Affinität und -Selektivität besitzen, speziell auch gegenüber dem Gerinnungsfaktor XIa (FXIa), der von den meisten azyklischen Verbindungen der Firma BAYER stark gehemmt wird. Obgleich für die Verbindungen **11** und **12** keine Kristallstrukturen oder K_i -Werte für FXIa verfügbar sind, scheinen deren Strukturen geeignet zu sein, um auch an die verwandte Protease in einer mit Plm vergleichbaren Weise zu binden. Jedoch ist die S1'-S2'-Bindungsregion des FXIa etwas enger als bei Plm, sodass sterisch anspruchsvolle makrozyklische Inhibitorstrukturen vermutlich eine reduzierte FXIa-Affinität und idealerweise eine hohe Plm-Selektivität zeigen sollten.

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

Basierend auf dem Referenzinhibitor **11** wurde die initiale Startstruktur **19** hergestellt (**Abbildung 34**), auf deren Grundlage die Inhibitoren der Serie 4 entwickelt wurden.¹⁵⁵ Dafür wurde der P1'-Tyr-Rest durch 4-Amino-Phe ersetzt, das bereits bei den makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren des Teils A verwendet wurde. In P2'-Position wurde statt des Octylamid-Restes der Referenzverbindung ein Gly-Baustein eingebaut, der über einen β Alanin (β Ala)-Linker mit der Seitenkette der P1'-Aminosäure verknüpft wurde. Auf den Einbau des synthetisch aufwändigen Bpa-Bausteins der Referenzverbindung **15** wurde bei den Inhibitoren der Serie 4 verzichtet.

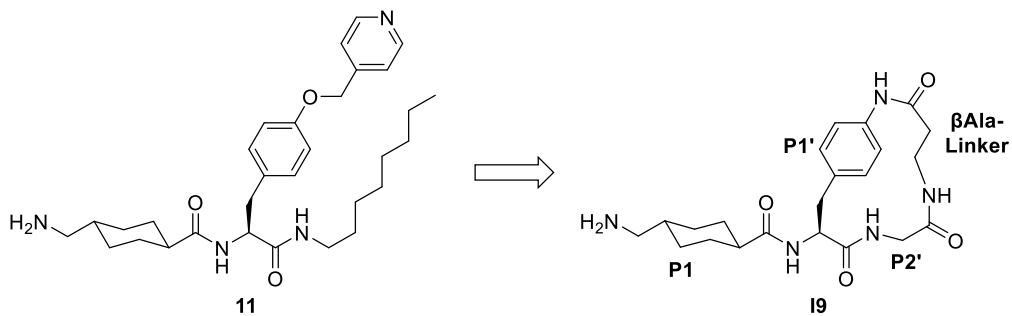


Abbildung 34: Entwicklung des Inhibitors 19 als Startstruktur der Serie 4.¹⁵⁵ Die Inhibitorstruktur wurde von der azyklischen Referenzverbindung **11** abgeleitet.

4.6.2. K_i -Werte und Weiterentwicklung der Startstruktur

(Inhibitorserien 4 und 5)

Alle makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren wurden enzymkinetisch charakterisiert. Neben der Bestimmung der K_i -Werte für Plm wurde bei einigen besonders aktiven Derivaten der Inhibitorserie 5 zusätzlich deren Selektivität gegenüber Trypsin, Thrombin (FIIa), aktiviertes Protein C (aPC), Plasmakallikrein (PK), FXa und FXIa ermittelt.

4.6.2.1. Inhibitorserie 4

Die makrozyklischen Plm-Inhibitoren der Serie 4 wurden ausgehend von der Startstruktur **I9** hergestellt (**Tabelle 6**). Die Ausgangsverbindung erwies sich trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der Referenzsubstanz **11** ($IC_{50} = 0.24 \mu\text{M}$)¹⁵⁵ als nahezu inaktiv. Der Austausch des P2'-Gly-Restes durch Arg (Verbindung **I10**), das bei einigen peptidischen Plm-Hemmstoffen⁹⁵ in dieser Position eine Steigerung der Wirksamkeit ermöglichte, erbrachte hier keine Verbesserung.¹⁹¹ Eine marginal erhöhte Hemmwirkung konnte durch die Verlängerung des Linkers mit einem 4-Aminophenylacetyl (4-aPhac)-Rest erreicht werden (Verbindungen **I11** und **I12**).

Ausgehend von den aromatischen P2'-Bausteinen der BAYER-Inhibitoren¹⁶¹⁻¹⁶⁷ wurden als Nächstes aPhac-Reste in P2'-Position eingebaut. Die erhaltenen Inhibitoren **I13** - **I16** besitzen mit K_i -Werten zwischen $5.81 \mu\text{M}$ und $1.38 \mu\text{M}$ eine verbesserte Plm-Hemmwirkung; daher wurde der 4-aPhac-Baustein in P2'-Position in den nachfolgenden Inhibitoren beibehalten und stattdessen das aliphatische Linkersegment variiert (Verbindungen **I17** - **I24**). Durch die Einführung einer zusätzlichen Amidbindung sollte der flexible Linker stabilisiert werden. Das Gly-Gly-Derivat **I17** ist geringfügig wirksamer als das 5-Aminovaleriansäure (Ava)-Analogon **I16**. Im Gegensatz dazu besitzen die um eine Methylengruppe erweiterten Gly- β Ala bzw. β Ala-Gly-Derivate **I18** und **I19** eine geringere Hemmwirkung als die analoge Verbindung **I15**, deren Linker aus einem ϵ -Aminocaprinsäure (Aca)-Baustein besteht. Das β Ala-Gly-Derivat **I19** ($K_i = 2.82 \mu\text{M}$) wurde dennoch für weitere Linker-Variationen ausgewählt, obwohl dessen K_i -Wert etwa 1.8-mal größer als der des Gly-Gly-Analogons **I17** ist ($K_i = 1.60 \mu\text{M}$); für dieses wurde zuerst eine deutlich größere Hemmkonstante erhalten, die erst nach Kontrollmessungen zum gelisteten Wert korrigiert werden konnte.

Zur Adressierung der S3'-*subsite* wurde der Gly-Baustein der Verbindung **I19** durch α -Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten ersetzt (Verbindungen **I20** - **I24**). Die Hemmwirkung der beiden Leu-Derivate **I20** und **I21** ist geringfügig schwächer, während die Phe- bzw. hPhe-Analoga **I22** - **I24** eine deutlich stärkere Wirksamkeit aufweisen (Faktor 4 - 7).

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

Tabelle 6: P1m-Hemmung: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 4. Alle Verbindungen besitzen einen konstanten P1-Txa-Rest zur Adressierung der S1-Tasche, einen *p*-substituierten Phenylalanin-Rest in P1'-Position sowie variable P2'-Bausteine und Linkersegmente (L). Die Spalte # gibt die Anzahl der Hauptkettenatome des jeweiligen Linkersegments an.

$n = 0, 1$

Nr.	n	P2'	Linker	#	K _i (μM)
I9	0	Gly-*	βAla-*	4	150 ± 31
I10	0	Arg-*	βAla-*	4	110 ± 56
I11	0	Gly-*	βAla-NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	11	30.2 ± 4.3
I12	0	Arg-*	βAla-NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	11	22.3 ± 0.5
I13	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	βAla-NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	11	1.40 ± 0.04
I14	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	NH-(CH ₂) ₆ -C(=O)-*	7	5.81 ± 1.09
I15	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	NH-(CH ₂) ₆ -C(=O)-*	7	1.38 ± 0.15
I16	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	NH-(CH ₂) ₆ -C(=O)-*	6	2.45 ± 0.02
I17	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	Gly-Gly-*	6	1.60 ± 0.09
I18	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	Gly-βAla-*	7	5.53 ± 0.42
I19	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	βAla-Gly-*	7	2.82 ± 0.20
I20	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	βAla-Leu-*	7	3.33 ± 0.41
I21	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	βAla-D-Leu-*	7	3.85 ± 0.28
I22	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	βAla-Phe-*	7	0.714 ± 0.032
I23	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	βAla-D-Phe-*	7	0.551 ± 0.033
I24	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	βAla-hPhe-*	7	0.384 ± 0.051
I25	1	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	NH-(CH ₂) ₆ -C(=O)-Phe-*	10	0.483 ± 0.032
I26	0	NH-C ₆ H ₄ -CH ₂ -C(=O)-*	Arg-NH-(CH ₂) ₆ -C(=O)-Phe-*	12	0.231 ± 0.013

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

Zuletzt wurden basierend auf der Kristallstruktur der Referenzverbindung **11** größere makrozyklische Strukturen im aktiven Zentrum des Plm *in silico* modelliert und energieminiert. Aufgrund ihrer akzeptablen simulierten Bindungsmodi wurden die Inhibitoren **I25** und **I26** hergestellt. Die Verbindung **I25** ist das einzige Derivat der Serie 4, das eine Aminomethyl-Gruppe in *p*-Position des Phenylrings der P1'-Seitenkette enthält; durch den Einbau eines Aca-Bausteins wurde außerdem das Linkersegment erweitert. Mit einem K_i -Wert von 0.483 μM besitzt die Verbindung eine relativ starke Plm-Hemmwirkung.

Die Struktur des Inhibitors **I26** enthält ein erweitertes Arg-Ava-Phe-Linkersegment und ist der stärkste Plm-Hemmstoff der Serie 4 ($K_i = 0.231 \mu\text{M}$). Im Computermodell zeigen die P1- und P1'-Reste eine ähnliche Orientierung wie die analogen Bausteine in der überlagerten Kristallstruktur des Referenzinhibitors **11** (**Abbildung 35**).¹⁵⁵ Die Seitenkette des Phe-Bausteins adressiert die S3'-*subsite*, während die Guanidinogruppe des Arg-Restes mit Glu73(623) interagiert. Letztere verbessert zudem die Löslichkeit des Inhibitors in wässrig-organischen Lösungsmittelgemischen. In den S1- und S1'-Taschen sowie in der S3'-*subsite* wird für die Verbindungen **I20** - **I24** ein ähnlicher Bindungsmodus angenommen.

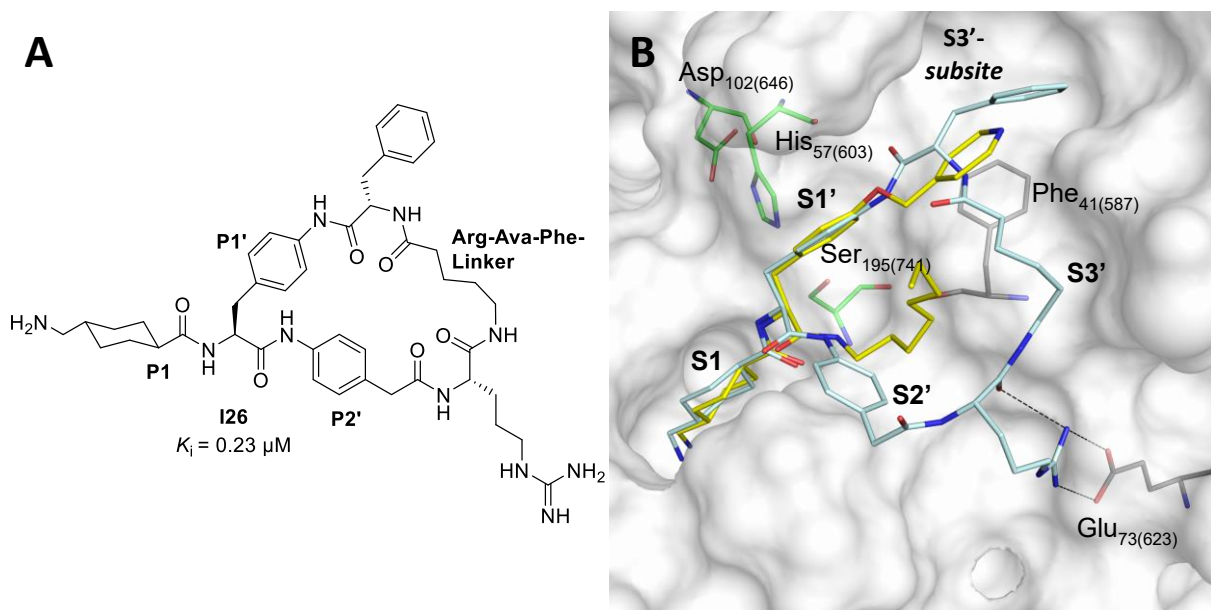


Abbildung 35: Modellierter Bindungsmodus: Inhibitor I26. Struktur und Plm-Hemmwirkung des Inhibitors. B) Überlagerte Kristallstruktur der Referenzverbindung **11** (gelbe C-Atome, PDB: 5UGD)¹⁵⁵ im Komplex mit μPlm mit dem energieminierten Modell des Inhibitors **I26** (hellblaue C-Atome). Beide Strukturen besetzen auf ähnliche Weise die S1- und die S1'-Taschen und adressieren darüber hinaus die S3'-*subsite*. Das Linkersegment des makrozyklischen Inhibitors bindet in der S3'-Tasche und bildet ferner eine ionische Wechselwirkung mit der Seitenkette von Glu73(623) aus.

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

Um den Einfluss der Zyklisierung auf die Plm-Hemmwirkung zu untersuchen, wurde das azyklische Derivat **127** des makrozyklischen Analogons **122** synthetisiert. Für die lineare Verbindung wurde eine etwa dreifach reduzierte Wirksamkeit ermittelt, sodass die Zyklisierung in diesem Beispiel eine geringfügige Steigerung der Plm-Hemmung verursacht. Der Einfluss der zusätzlichen Amino- und Amidgruppen wurde nicht näher untersucht. Da bereits die ersten Inhibitoren der Serie 5 eine deutlich verbesserte Hemmwirkung besitzen, wurde auf eine weitere Optimierung der 4-Aminophenylalanin-Derivate verzichtet.

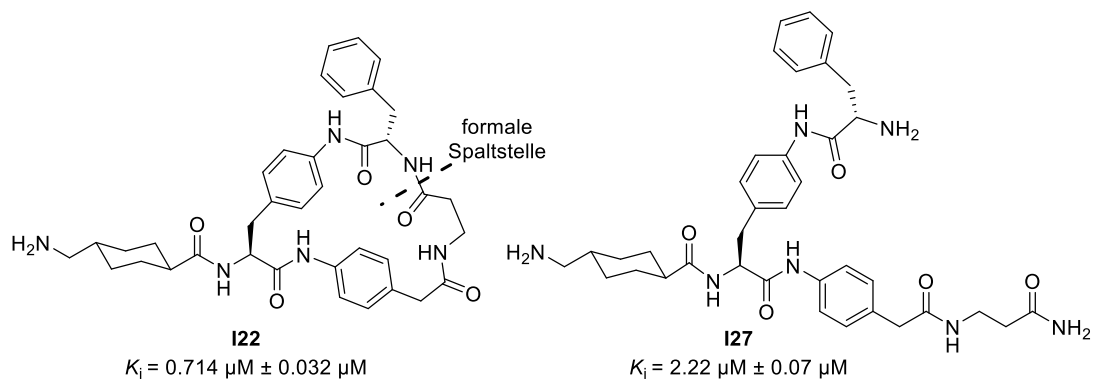


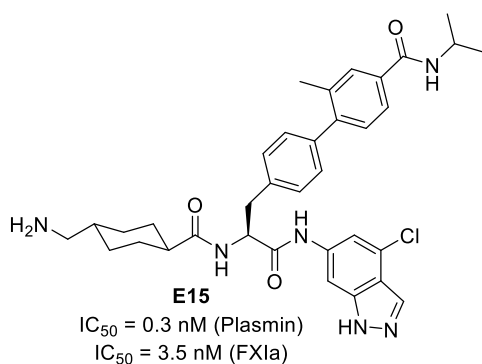
Abbildung 36: Strukturen und Plm-Hemmwirkungen: Verbindungen **122** und **127**.

4.6.2.2. Startstruktur der Inhibitorserie 5 (Verbindung I28)

Im Jahr 2015 patentierte die BAYER AG zahlreiche hochwirksame FXIa-Inhibitoren, die zusätzlich eine starke Hemmwirkung gegenüber Plm im unteren nanomolaren bis subnanomolaren Bereich aufweisen (BAYER-Inhibitoren, Abschnitt 1.4.3.2.).¹⁶¹⁻¹⁶⁷ Diese dualen Hemmstoffe besitzen alle einen P1-Txa-Rest, einen substituierten Bpa-Baustein oder ein substituiertes Analogon in P1'-Position, sowie einen amidisch gekuppelten aromatischen oder heteroaromatischen P2'-Rest.

Vor Beginn der ersten Inhibitorsynthesen zur Serie 5 wurde ein Computermodell der Referenzverbindung **15** im Komplex mit μ Plm erstellt (**Abbildung 37**).¹⁶¹ Der erhaltene Bindungsmodus ähnelt der Struktur des Referenzinhibitors **11** im Komplex mit μ Plm. Die Txa-Reste beider Verbindungen besetzten auf analoge Weise die S1-Tasche, während die verlängerten P1'-Reste die S1'-Tasche sowie die darüberliegende S3'-Nebentasche adressieren. Analog zum oben beschriebenen Computermodell der Verbindung **I26** (**Abbildung 35**) ist der aromatische P2'-Rest parallel zur Oberfläche der S2'-Tasche orientiert, wohingegen die aliphatische Octylamid-Gruppe der Verbindung **11** oberhalb der S2'-Tasche ins Lösungsmittel gerichtet ist.

A



B

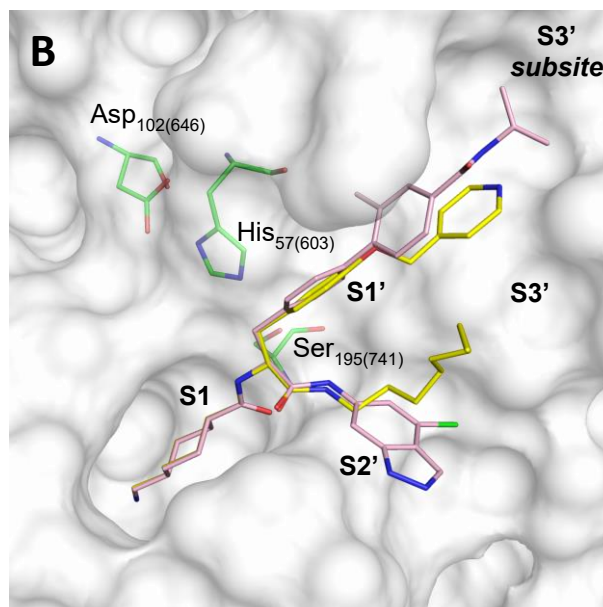


Abbildung 37: Modellierter Bindungsmodus: Referenzinhibitor 15. A) Struktur und Hemmwirkungen.¹⁶¹ B) Überlagerung der Kristallstruktur des Referenzinhibitors **11** im Komplex mit μ Plm (gelbe C-Atome, PDB: 5UGD)¹⁵⁵ mit einem Computermodell der Verbindung **15** (rosa C-Atome). Letztere wurde durch Modifizierung der Struktur **11** im aktiven Zentrum des μ Plm modelliert und energieminiert.

Mithilfe von Linkersegmenten sollten durch Verknüpfung der Seitenketten geeigneter Bpa-Reste in P1'-Position mit Carboxylgruppen der P2'-Bausteine makrozyklische Inhibitoren erhalten werden, der idealerweise eine hohe Plm-Affinität und -Selektivität besitzen. Unter Verwendung möglichst einfacher Bausteine wurde aufbauend auf dem soeben gezeigten Computermodell die makrozyklische Verbindung **I28** hergestellt (**Abbildung 38**). Der

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

komplexe P1'-Bpa-Baustein der Referenz wurde durch einen vereinfachten Rest ersetzt, dessen aromatische Aminogruppe analog zur Inhibitorserie 4 eine peptidische Zyklisierung mit dem C-Terminus des Linkersegments ermöglichte. Die Methylgruppe sollte ähnlich wie der größere Isopropylamid-Substituent die S3'-*subsite* adressieren, ist jedoch zu klein um diese in relevantem Maße auszufüllen. In P2'-Position wurde wiederum der bereits zuvor verwendete 4-aPhac-Rest eingebaut, der den aromatischen Indazol-Rest des Referenzinhibitors imitieren soll. Als Linkersegment wurde analog zur Verbindung **I15** der Inhibitorserie 4 erneut ein Aca-Baustein ausgewählt.

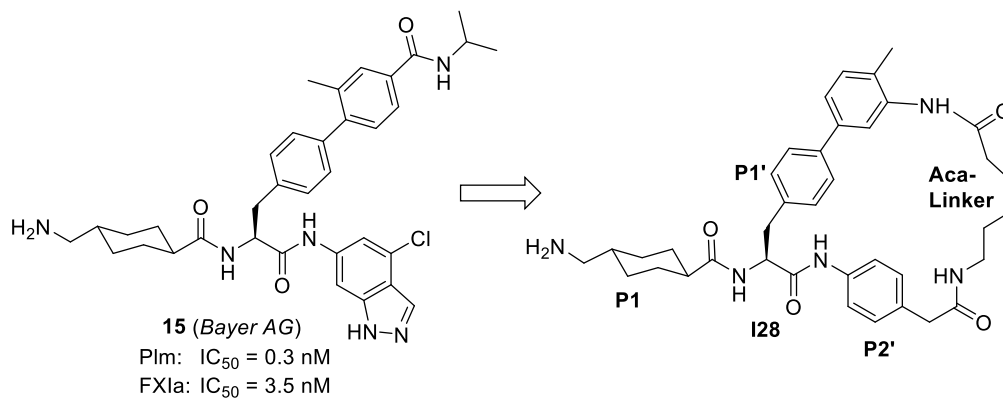


Abbildung 38: Entwicklung des Inhibitors I28 als Startstruktur der Serie 5.¹⁶¹ Die Struktur wurde von der azyklischen Referenzverbindung **15** abgeleitet.

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

4.6.2.3. Inhibitorserie 5

Wie bereits im Teil A beschrieben wurden alle Progresskurven zur K_i -Wert-Bestimmung nach der klassischen Methode ausgewertet (**Tabelle 7**). Einige besonders wirksame Inhibitoren lieferten gekrümmte Progress-Kurven. In diesen Fällen wurde zusätzlich eine *slow binding*-Auswertung unter Annahme des Hemmmechanismus A durchgeführt. Die mittels der beiden unterschiedlichen Verfahren erhaltenen Hemmkonstanten unterscheiden sich erneut nur marginal voneinander (z. B. $K_i = 9.87$ bzw. 10.5 für Inhibitor **I30**). Im Rahmen der *slow binding*-Auswertungen konnten jedoch zusätzlich die k_{on} - und k_{off} -Werte für die Bildung und den Zerfall des EI-Komplexes bestimmt werden.

Tabelle 7: P1m-Hemmung: Makrozyklische Inhibitoren der Serie 5. Alle Verbindungen besitzen einen konstanten P1-Txa-Rest, ein substituiertes Bpa-Derivat in P1'-Position sowie variable P2'-Bausteine und Linkersegmente (L). Die Spalte # gibt die Anzahl der Hauptkettenatome des jeweiligen Linkersegments an.

R: Me

Pha

lpa

Nr.	R	P2'	Linker	#	K_i (nM) klassisch	K_i (nM) <i>slow binding</i>	k_{on} ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
I28	Me			7	42.1 ± 4.4	-	-	-
I29	Me			7	109 ± 4	-	-	-
I30	Me			7	9.87 ± 0.66	10.5 ± 1.4	$1.12 \cdot 10^5$ \pm $1.06 \cdot 10^4$	$1.17 \cdot 10^{-3}$ \pm $1.26 \cdot 10^{-4}$
I31	Me			7	11.6 ± 0.6	-	-	-
I32	Me		β Ala-Gly - *	7	33.8 ± 1.4	-	-	-
I33	Me		Gly- β Ala - *	7	33.1 ± 3.2	-	-	-
I34	Me		Gly-Gaba - *	8	17.0 ± 0.6	-	-	-
I35	Me		Gaba-Gly - *	8	0.821 ± 0.043	0.832 ± 0.044	$2.79 \cdot 10^6$ \pm $1.47 \cdot 10^4$	$2.28 \cdot 10^{-3}$ \pm $1.22 \cdot 10^{-4}$
I36	Me			9	62.6 ± 2.3	-	-	-
I37	Me		Gaba-Phe - *	8	2.01 ± 0.11	2.08 ± 0.05	$9.60 \cdot 10^5$ \pm $3.75 \cdot 10^4$	$1.99 \cdot 10^{-3}$ \pm $9.94 \cdot 10^{-5}$
I38	Me		Gaba-hPhe - *	8	0.753 ± 0.141	0.831 ± 0.154	$1.07 \cdot 10^6$ \pm $7.84 \cdot 10^4$	$8.90 \cdot 10^{-4}$ \pm $1.64 \cdot 10^{-4}$
I39 ^a	Me		Gaba-Lys - *	8	158 ± 5	-	-	-
I40 ^a	Me		Gaba-Lys - *	8	20.2 ± 0.2	-	-	-

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

I41	Pha		Gaba-Gly - *	8	1.39 ± 0.07	1.46 ± 0.07	1.79 · 10 ⁶ ±	2.60 · 10 ⁻³ ±
I42	lpa		Gaba-Gly - *	8	0.452 ± 0.023	0.524 ± 0.011	4.56 · 10 ⁴ ±	1.23 · 10 ⁻⁴ ±
I43	Me		Gaba-Gly - *	8	0.452 ± 0.023	0.524 ± 0.011	2.76 · 10 ⁶ ±	1.44 · 10 ⁻³ ±
I43	Me		Gaba-Gly - *	8	0.452 ± 0.023	0.524 ± 0.011	3.66 · 10 ⁴ ±	8.55 · 10 ⁻⁶ ±
I43	Me		Gaba-Gly - *	8	0.452 ± 0.023	0.524 ± 0.011	-	-
I44	Me		Gaba-Gly - *	8	0.452 ± 0.023	0.524 ± 0.011	-	-
I45	Me		Gaba-Gly - *	8	0.452 ± 0.023	0.524 ± 0.011	-	-
I46	Me		Gaba-Gly - *	7	13.0 ± 0.2	-	-	-
I47	Me		Gaba-Gly - *	6	35.7 ± 1.1	-	-	-
I48	Me		Gaba-Gly - *	9	69.0 ± 4.8	-	-	-
I49	Me		Gly - *	9	26.9 ± 0.5	-	-	-
I50	Me		Gaba-Gly - *	8	8.32 ± 0.83	9.47 ± 0.75	2.53 · 10 ⁵ ±	2.39 · 10 ⁻³ ±
I51	Me		βAla-Gly - *	7	20.6 ± 0.5	-	2.22 · 10 ⁴ ±	9.91 · 10 ⁻⁵ ±
I52	Me		Gaba-Gly - *	8	284 ± 24	-	-	-
I53	Me		Gly - *	9	4.93 ± 0.29	5.14 ± 0.27	3.81 · 10 ⁵ ±	1.96 · 10 ⁻³ ±
I54	Me		Gaba-Gly - *	8	10.3 ± 0.2	-	4.04 · 10 ⁴ ±	1.86 · 10 ⁻⁴ ±
I55	Me		βAla-Gly - *	7	2.33 ± 0.24	2.53 ± 0.23	1.57 · 10 ⁶ ±	3.98 · 10 ⁻³ ±
							1.00 · 10 ⁴ ±	3.56 · 10 ⁴ ±

^aDie Verbindungen **I39** und **I40** liegen vermutlich racemisch vor. Nach der finalen Tfa-Abspaltung wurde in Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC ein Doppelsignal erhalten, dessen Maxima etwa gleiche Intensitäten aufwiesen. Durch präparative HPLC konnten zwei Verbindungen isoliert werden, deren Massen beide mit dem finalen Inhibitor korrespondieren. Dies deutet auf eine Racemisierung hin, was durch die deutlich unterschiedlichen Hemmkonstanten gestützt wird.

Im Folgenden werden zugunsten der Vergleichbarkeit ausschließlich die mittels klassischer Auswertung bestimmten Hemmkonstanten genannt. Die initiale Verbindung **I28** ist mit einem K_i -Wert von 42.1 nM bereits ein fast sechsfach stärkerer Plm-Inhibitor als das wirksamste Derivat der Serie 4 (Verbindung **I26**, $K_i = 0.231 \mu\text{M}$). Darauf aufbauend wurde zunächst das Linkersegment unter Erhalt der Linkerlänge variiert. Der Einbau eines zweiten Txa-Bausteins in die Verbindung **I29** ($K_i = 109 \text{ nM}$) verringerte die Hemmwirkung um den Faktor 2.6, während 4-aPhac- bzw. Piperazinylmalonyl-Reste in dieser Position eine etwa vierfache Affinitätssteigerung bewirkten (Inhibitoren **I30** und **I31**, $K_i = 9.87 \text{ nM}$ bzw. 11.6 nM). Ähnlich wie bei der vierten Serie wurden als Nächstes Linkersegmente verwendet, die aus zwei aliphatischen AS bestehen. Die $\beta\text{Ala-Gly-}$ bzw. $\text{Gly-}\beta\text{Ala-}$ Linker der Verbindungen **I32** und **I33** ermöglichten eine leichte Wirksamkeitssteigerung ($K_i = 33.8 \text{ nM}$ bzw. 33.1 nM) im Vergleich zur Ausgangsverbindung **I28**. Durch Verlängerung des Linkers um lediglich eine einzelne Methylengruppe konnte die Hemmwirkung jedoch drastisch verbessert werden; in

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

Abhängigkeit von der Position der zusätzlichen Peptidbindung sind die Gly-Gaba- bzw. Gaba-Gly-Derivate **I34** und **I35** mit K_i -Werten von 17.0 nM und 0.821 nM um die Faktoren 2.5 bzw. 51 wirksamer als der Hemmstoff **I28**. Die Verlängerung des Linkersegments um eine weitere Methylengruppe verringerte die Hemmwirkung im Falle des Ava-Gly-Derivats **I36** dagegen deutlich ($K_i = 62.6$ nM). Folglich besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Länge des Linkersegments und der Plm-Hemmwirkung, die darüber hinaus von der Position der Peptidbindung im Linker beeinflusst wird. Das Gaba-Gly-Linkersegment des Inhibitors **I35** scheint für eine effiziente Plm-Hemmung besonders gut geeignet zu sein.

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde der Gly-Baustein der Verbindung **I35** durch andere α -Aminosäuren ersetzt (Inhibitoren **I37** - **I40**). Die Phe bzw. hPhe Derivate **I37** und **I38** ($K_i = 2.01$ nM bzw. 0.753 nM) besitzen eine ähnliche starke Plm-Hemmwirkung wie das Analogon **I35**. Die hydrophoben Seitenketten der Phe- und hPhe-Bausteine haben demnach nur einen geringen Einfluss auf die Plm-Hemmwirkung, reduzieren jedoch die Wasserlöslichkeit der Inhibitoren. Durch deren Austausch gegen Lys sollte daher ein besser lösliches Derivat hergestellt werden (Verbindungen **I39** und **I40**). Im letzten Schritt der Inhibitorsynthese wurde in Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC jedoch ein Doppelsignal mit Maxima etwa gleicher Intensität erhalten; beide Verbindungen konnten isoliert werden und zeigten trotz marginal unterschiedlicher Retentionszeiten identische Massen, die mit der Inhibitorstruktur korrelierten. Daher wurde eine Razemisierung vermutet, was durch die deutlich unterschiedlichen K_i -Werte der Verbindungen gestützt wird. Dies wurde jedoch nicht näher untersucht. Im Vergleich zur Ausgangssubstanz **I35** besitzen beide Verbindungen eine stark verringerte Hemmwirkung ($K_i = 158$ nM bzw. 20.2 nM).

Da die Plm-Hemmwirkung durch Variation des Gly-Bausteins nicht verbessert werden konnte, wurde als Nächstes der Methyl-Substituent des P1'-Restes der Verbindung **I35** durch sterisch anspruchsvollere Gruppen ersetzt, die eine möglichst vollständige Besetzung der S3'-*subpocket* ermöglichen sollten. Der Anilinamid-Substituent der Verbindung **I41** ($K_i = 1.39$ nM) reduzierte die Bindungsaffinität geringfügig, während der Einbau eines sterisch weniger anspruchsvollen Isopropylamid-Restes den wirksamsten Inhibitor der Serie 5 lieferte (Verbindung **I42**, $K_i = 0.452$ nM), dessen Hemmwirkung fast doppelt so stark ist wie die der Verbindung **I35**.

Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden zusätzliche protonierbare Gruppen in die Grundstruktur eingeführt. Um die Synthese zu vereinfachen, wurde dabei erneut der leichter zugängliche methylsubstituierte Bpa-Baustein in P1'-Position verwendet. Bei den Derivaten **I43** und **I44** ($K_i = 36.5$ nM bzw. 29.8 nM) wurden die Seitenketten unterschiedlich konfigurierter Lys-Reste als Linkersegmente genutzt. Dadurch wurde die Linkerlänge im Vergleich zur Verbindung **I35** um eine Methylengruppe verringert, wobei die protonierbare freie

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

α -Aminogruppe des Rückgrats zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit beitragen sollte. Die Modifikation wird gut toleriert und verbessert die Hemmwirkung im Vergleich zur analogen Verbindung **I28** ($K_i = 42.1 \text{ nM}$) sogar geringfügig. Dennoch wurden bislang weder verkürzte Ornithin- oder 1,4-Diaminobutansäure-Reste noch verlängerte homo-Lysin-Bausteine in dieser Position untersucht. Stattdessen wurden die Lys-Reste durch protonierbare Piperazinylcarbonsäure-Linker ersetzt, die in ähnlicher Weise bereits bei den makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren des Teils A genutzt wurden, um Inhibitoren mit hoher Wasserlöslichkeit herzustellen.^{182,184} Die sterisch anspruchsvolleren Piperazinringe sollten idealerweise auch zur Selektivität der Plm-Inhibitoren beitragen. Jedoch sind die erhaltenen Verbindungen **I45 - I48** mit K_i -Werten zwischen 112 nM - 13 nM deutlich weniger wirksam als die Ausgangsverbindung **I35**. Die Wasserlöslichkeit der Verbindungen wurde bisher nicht quantifiziert. Bei der Aufreinigung der Vorstufen und der finalen Inhibitoren wurde jedoch eine gute Löslichkeit in MeCN-Wasser-Gemischen beobachtet.

Unter Variation des P2'-Bausteins wurden die Verbindungen **I49 - I55** hergestellt. Die 3-aPhac-Derivate **I49 - I51** bieten mit K_i -Werten zwischen 8 nM und 27 nM keinen Vorteil gegenüber den 4-aPhac-Analoga. Jedoch erwies sich der Gaba-Gly-Linker erneut als besonders geeignet, da bereits eine Verkürzung oder Verlängerung des Gaba-Restes um lediglich eine einzelne Methylengruppe einen etwa dreifachen Affinitätsverlust bewirkt. Im Gegensatz dazu führte die Nutzung eines 3-Aminomethylphenylacetyl (3-aMePhac)-Restes zu einem drastischen Hemmwirkungsverlust (Verbindung **I52**, $K_i = 284 \text{ nM}$). Der Einbau von 6-Amino-2-naphtoyl (6-aNap)-Bausteinen wird dagegen gut toleriert und ergab die Inhibitoren **I53 - I55** mit K_i -Werten im unteren nanomolaren Bereich ($K_i = 10.3 \text{ nM} - 2.33 \text{ nM}$), die jedoch schwächer wirksam sind als das 4-aPhac-Analogon **I35**. Aufgrund der hydrophoben P2'-Reste waren die Naphtoyl-Verbindungen während der chromatographischen Reinigung besonders schlecht in MeCN/Wasser-Gemischen löslich, was ein zusätzlicher Nachteil gegenüber dem 4-aPhac-Rest ist.

Für die besonders wirksamen Inhibitoren wurden gekrümmte Progresskurven erhalten. Mittels *slow binding*-Auswertung wurden für diese Hemmstoffe die Geschwindigkeitskonstanten der EI-Komplexbildung k_{on} und k_{off} bestimmt. Die Assoziationsgeschwindigkeiten des EI-Komplexes liegen mit k_{on} -Werten zwischen $1.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $2.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ im Bereich der substratanalogen makrozyklischen Inhibitoren aus Teil A, deren wirksamstes Derivat **40** einen k_{on} -Wert von $6.00 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ besitzt.¹⁸³ Mit k_{off} -Werten zwischen $8.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $4.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ wurden jedoch geringfügig größere Dissoziationsgeschwindigkeiten erhalten (Verbindung **40**: $k_{off} = 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$),¹⁸³ sodass eine etwas geringere EI-Komplexstabilität vermutet werden kann. In Übereinstimmung mit ihren besonders kleinen Hemmkonstanten besitzen die Verbindungen **I35** und **I42** die größten Assoziationsgeschwindigkeiten (jeweils $k_{on} = 2.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ihre k_{off} -Werte unterschieden sich nur geringfügig voneinander ($k_{off} = 2.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. $1.4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

Im Gegensatz dazu gibt es deutliche Abweichungen in den Assoziationsgeschwindigkeiten der Verbindungen **I35**, **I42**, **I50** und **I55**, die sich in ihren P2'-Bausteinen unterscheiden. Im Vergleich zu den 4-aPhac-Derivaten **I35** und **I42** besitzen die 3-aPhac bzw. 6-aNap-Derivate **I50** bzw. **I55** geringere k_{on} -Werte ($k_{on} = 2.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $1.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), sodass sich der 4-aPhac-Rest in Übereinstimmung mit den K_i -Werten erneut als vorteilhaft erweist. Der niedrigste k_{off} -Wert wurde für den Inhibitor **I38** ermittelt ($k_{off} = 8.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), der demnach besonders fest an das aktive Zentrum des Plm bindet. Die flexible Seitenkette seines hPhe-Restes scheint eine energetisch besonders günstige Konformation im aktiven Zentrum des Plm einzunehmen, wodurch der EI-Komplex vermutlich stabilisiert wird.

Um den Einfluss der Zyklisierung auf die Hemmwirkung der makrozyklischen Inhibitoren zu untersuchen, wurden basierend auf der Verbindung **I35** die azyklischen Analoga **I56** und **I57** synthetisiert (**Abbildung 39**). Die beiden offenkettigen Derivate sind ca. hundert- bzw. achtzigfach weniger wirksam als die Ausgangsverbindung, sodass die Zyklisierung in diesem Beispiel einen vergleichsweise starken Einfluss auf die Plm-Hemmung hat. Im Falle der Inhibitorserie 4 waren die Unterschiede zwischen der zyklischen Verbindung **I22** ($K_i = 0.71 \mu\text{M}$) und dem azyklischen Analogon **I27** ($K_i = 2.22 \mu\text{M}$) deutlich geringer (Faktor 3, s. **Abbildung 36**). Bislang wurden keine weiteren azyklischen Derivate der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren hergestellt und der Beitrag der zusätzlichen funktionalen Gruppen zu dem beobachteten Hemmwirkungsverlust noch nicht näher untersucht. Dafür könnten z. B. die Aminogruppe acyliert und der Carboxyl-Terminus verestert werden.

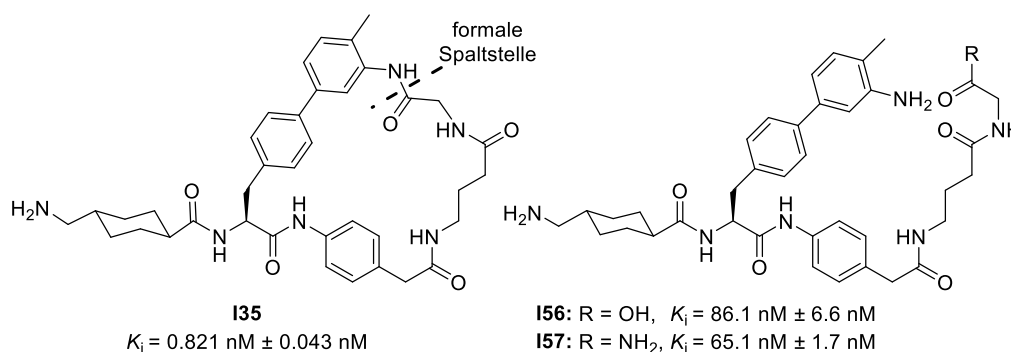


Abbildung 39: Strukturen und K_i -Werte: Verbindungen I35, I56 und I57.

4.6.3. Selektivität ausgewählter Inhibitoren der Serie 5

Zur Selektivitätsbestimmung wurden strukturell unterschiedliche Derivate der fünften Inhibitorserie ausgewählt und K_i -Werte für mehrere trypsinartige Serinproteasen bestimmt (**Tabellen 8 und 9**).

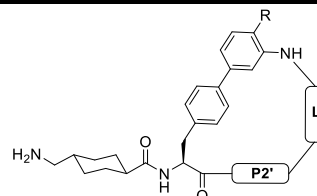
Gegenüber Thrombin, aPC und FXa besitzen alle untersuchten Inhibitoren eine exzellente Selektivität (alle K_i -Werte $> 4 \mu\text{M}$). Im Gegensatz dazu werden die Enzyme Trypsin, PK und FXIa mit K_i -Werten zwischen 5 nM und 798 nM deutlich stärker gehemmt.

Die Selektivitätsindizes (SI) für Trypsin umspannen einen Bereich von 3 - 730, wobei die Verbindungen **I37** und **I38** besonders selektiv sind. Sie enthalten im Linkersegment einen sterisch anspruchsvollen Phe- bzw. hPhe-Rest, der im Vergleich mit dem Gly-Analogon **I35** zwar nicht zur Plm-Affinität beiträgt, jedoch die Trypsinselektivität verbessert (SI = 398 bzw. 730 bzw. 41). Ein ebenfalls hoher SI-Wert von 288 wurde für den aktivsten Plm-Inhibitor **I42** der Serie 5 ermittelt. Dieser enthält im Vergleich mit dem Analogon **I35** einen sterisch anspruchsvolleren Isopropylamid-Substituenten am P1'-Rest, der die Trypsinaffinität verringert.

Die Verwendung sterisch anspruchsvoller Piperazinylocarbonylcarbonsäureamid-Linker verringert im Falle der Verbindungen **I31**, **I46** und **I48** sowohl die inhibitorische Aktivität als auch die Plm-Selektivität. Dagegen hat die Variation des P2'-Restes nur einen geringen Einfluss auf das Selektivitätsprofil (Verbindungen **I50**, **I53** und **I55**).

Gegenüber PK und FXIa ist die Selektivität der untersuchten Derivate mit SI-Werten zwischen 0.4 und 138 eher schwach ausgeprägt. Der Inhibitor **I42** ist trotz seiner besonders starken Plm-Hemmwirkung vergleichsweise unselektiv. Das hydrophobere und geringfügig schwächer wirksame hPhe-Derivat **I38** besitzt dagegen das günstigste Gesamtprofil (PK: SI = 89, FXIa: SI = 117) und ist trotz seiner etwas geringeren Wasserlöslichkeit die vielversprechendste Verbindung der fünften Inhibitorserie.

Tabelle 8: Selektivitätsbestimmung: Ausgewählte makrozyklische Inhibitoren der Serie 5. Die angegebenen Selektivitätsindizes [SI] entsprechen den Quotienten $K_{i(\text{untersuchte Protease})} / K_{i(\text{Plm})}$. FIIa: Thrombin.



Nr.	R	P2'	Linker	Plm K_i (nM)	Trypsin	[SI]	FIIa	aPC	PK	[SI]	FXa	FXIa	[SI]
131	Me			11.6	0.079	[7]	> 50	> 15	0.026 ± 0.001	[2]	> 25	0.075 ± 0.009	[6]
135	Me		Gaba-Gly - *	0.821	0.033 ± 0.001	[40]	> 60	> 35	0.031 ± 0.014	[38]	> 8	0.041 ± 0.300	[50]
137	Me		Gaba-Phe - *	2.01	0.80 ± 0.08	[398]	> 30	> 5	0.060 ± 0.012	[30]	> 80	0.047 ± 0.002	[23]
138	Me		Gaba-hPhe - *	0.753	0.55 ± 0.03	[730]	> 75	> 10	0.067 ± 0.004	[89]	> 80	0.088 ± 0.023	[117]
141			Gaba-Gly - *	1.39	0.14 ± 0.01	[101]	> 25	> 20	0.015 ± 0.001	[11]	> 5	0.0053 ± 0.0014	[4]
142			Gaba-Gly - *	0.452	0.13 ± 0.02	[288]	> 45	> 35	0.0094 ± 0.0021	[21]	> 10	0.0081 ± 0.0016	[18]
146	Me			13.0	0.073 ± 0.012	[5]	> 60	> 35	0.0053 ± 0.0001	[0.4]	> 30	0.026 ± 0.002	[2]
148	Me			69.0	0.18 ± 0.02	[3]	> 75	> 65	0.086 ± 0.003	[1]	> 115	0.15 ± 0.01	[2]
150	Me		Gaba-Gly - *	8.32	0.10 ± 0.01	[12]	> 80	> 40	0.12 ± 0.01	[14]	> 9	0.11 ± 0.01	[13]
153	Me			4.93	0.026 ± 0.004	[5]	> 40	> 5	0.016 ± 0.004	[3]	> 20	0.057 ± 0.014	[12]
155	Me		β Ala-Gly - *	2.33	0.12 ± 0.02	[56]	> 40	> 4	0.016 ± 0.044	[7]	> 40	0.32 ± 0.05	[137]

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

In der **Tabelle 9** werden die Selektivitäten der azyklischen Analoga **I56** und **I57** gezeigt, die Thrombin, aPC und FXa nur sehr schwach hemmen. Allerdings wurden für Trypsin, PK und FXIa besonders niedrige SI-Werte zwischen 1 und 6 bestimmt, die somit deutlich kleiner sind als bei dem zyklischen Analogon **I35** (SI zwischen 38 und 50). Die Zyklisierung der peptidischen Grundstruktur wirkt sich hier folglich nicht nur vorteilhaft auf die Plm-Hemmwirkung aus, sondern verursacht auch eine Verbesserung der Selektivität. Dies sollte anhand weiterer azyklischer Derivate makrozyklischer Txa-konjugierter Inhibitoren bestätigt werden. Zur Inaktivierung der funktionellen Gruppen könnte dabei das aromatische Amin des P1'-Restes acyliert bzw. die Carboxyl-Gruppe methoxyliert werden.

Tabelle 9: Selektivitätsbestimmung: Azyklische Inhibitoren der Serie 5. Die angegebenen Selektivitätsindizes [SI] entsprechen den jeweiligen Quotienten $K_i(\text{untersuchte Protease}) / K_i(\text{Plm})$.

Nr.	R	Plm	Trypsin [SI]	Thrombin	aPC	PK [SI]	FXa	FXIa [SI]
K_i (μM)								
I56	OH	0.0861	0.417 ± 0.024 [5]	> 65	> 50	0.0881 ± 0.0062 [1]	> 40	0.0693 ± 0.0021 [1]
I57	NH ₂	0.0651	0.360 ± 0.133 [6]	> 70	> 55	0.180 ± 0.007 [3]	> 35	0.175 ± 0.055 [3]

4.6.4. Kristallstruktur des Inhibitors I35

Durch DR. JASON WU (AG LAW, MONASH UNIVERSITY, Melbourne, AU) wurde die Kristallstruktur des makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitors **I35** im Komplex mit der stabilisierten Ser195(741)Ala Mutante des μ Plm bestimmt. Der Hemmstoff adressiert erwartungsgemäß die S1-S3'-Region des aktiven Zentrums (**Abbildung 40A**). In einer Überlagerung mit der Kristallstruktur des Referenzinhibitors **11** im Komplex mit μ Plm nehmen die P1- und P1'-Reste beider Inhibitoren analoge Orientierungen in den S1- und S1'-Taschen ein. Die verlängerte P1'-Seitenkette des Inhibitors **I35** bindet ähnlich zum Pyridinring der Referenz in der S3'-Nebentasche, die von der sterisch weniger anspruchsvollen Methylgruppe jedoch kaum ausgefüllt wird.¹⁵⁵ Der 4-aPhac-Baustein bindet vergleichbar mit dem Octylamid-Segment in der S2'-Region, während der Gaba-Gly-Linker in S3'-Tasche positioniert ist.

Die charakteristischen Wechselwirkungen der Referenzsubstanz **11** mit μ Plm sind in der Kristallstruktur des makrozyklischen Inhibitors nahezu identisch vorhanden (**Abbildung 40B**). Durch den Austausch des Tyr-Restes der Referenz gegen Bpa kann lediglich die Interaktion mit Lys61(607) nicht ausgebildet werden. Die primäre Aminogruppe des Txa-Restes interagiert über eine Ionenbindung mit Asp189(735) sowie über zusätzliche polare Wechselwirkungen mit den Hydroxyl- und Carbonyl-Gruppen des Ser190(736). Über das konservierte Wassermolekül oberhalb von Tyr228(774) werden Wechselwirkungen mit beiden Amidgruppen des Rückgrats von Val227(773) sowie dem Carbonyl-O-Atom von Trp215(761) ausgebildet. Die Carbonyl-Gruppe des P1-Bausteins wechselwirkt mit dem Amid-NH des Gly193(739) sowie über ein verbrückendes Wassermolekül mit beiden Amid-Gruppen des Ala195(741) und dem Carbonyl-O-Atom des Phe41(587). Darüber hinaus befindet sich die Seitenkette des Phe41(587) in der Nähe des Phenyl-Substituenten am P1'-Rest, sodass ähnlich wie mit dem Pyridinring des Inhibitors **11** eine π - π -Wechselwirkung ausgebildet wird.

Das makrozyklische Kernsegment wird durch zwei intramolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Carbonyl-O-Atom des 4-aPhac-Bausteins und den Amid-NH-Gruppen des Gly-Restes im Linker und der Seitenkette P1'-Restes stabilisiert. Ferner interagiert der N-Terminus des Gaba-Restes mit der Carbonylgruppe des His40(586). Diese Wechselwirkungen werden durch die Länge und Zusammensetzung des Gaba-Gly-Linkers ermöglicht und könnten entscheidend zur hohen Plm-Affinität der Verbindung beitragen. Die anderen im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Linkersegmente werden vermutlich weniger effizient stabilisiert, sodass die starke Abhängigkeit der K_i -Werte anhand der Kristallstruktur erklärt werden könnte. Zur Bestätigung dieser Annahme sind jedoch entsprechende Kristallstrukturen erforderlich.

4.6. Entwicklung der Inhibitorstrukturen und Charakterisierung

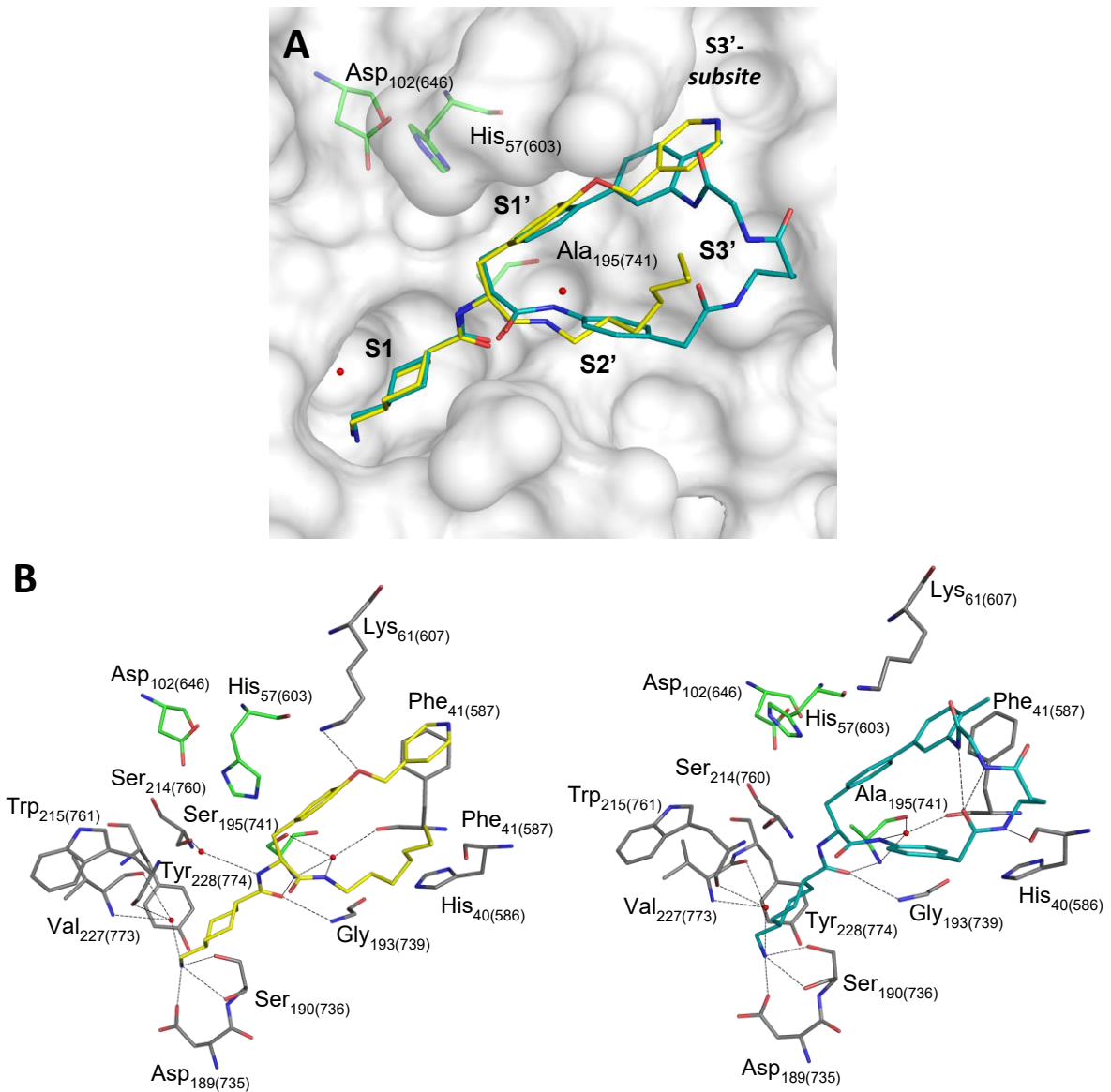


Abbildung 40: Kristallstruktur: Inhibitor I35 im Komplex mit μ Plm. A) Überlagerung der Kristallstruktur des Inhibitors **I35** (blaugrüne C-Atome) im Komplex mit der stabilisierten μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche und grüne C-Atome) mit dem bekannten Referenzinhibitor **11** (gelbe C-Atome, PDB: 5UGD) im Komplex mit μ Plm.¹⁵⁵ B) Vergleichende Darstellungen der polaren Interaktionen des Referenzinhibitors **11** (gelbe C-Atome) im Komplex mit μ Plm (graue bzw. grüne C-Atome, PDB: 5UGD) und der Verbindung **I35** (blaugrüne C-Atome) im Komplex mit der stabilisierten μ Plm-Mutante (graue bzw. grüne C-Atome). Fast alle Wechselwirkungen der azyklischen Verbindung **11** werden analog auch durch den Inhibitor **I35** ausgebildet, der ferner durch drei polare Interaktionen im Bereich des makrozyklischen Kernsegments stabilisiert wird.

4.7. Diskussion (Teil B)

Im Teil B dieser Dissertation wird die Entwicklung makrozyklischer Txa-konjugierter Plm-Inhibitoren beschrieben, die in der S1-S3'-Region des katalytischen Zentrums binden. Ähnlich zu den im Teil A beschriebenen substratanalogen makrozyklischen Inhibitoren wurden sterisch anspruchsvolle Verbindungen erhalten, die teilweise eine starke Plm-Hemmwirkung und ein akzeptables Selektivitätsprofil zeigen.

Ausgehend von der Referenzsubstanz **11** wurden die Inhibitorserien 4 und 5 synthetisiert, deren Plm-Hemmkonstanten zwischen 150 μM und 0.5 nM liegen.¹⁵⁵ Mithilfe der SPPS-basierten Synthesestrategie E konnten die meisten linearen Vorstufen der zyklischen Inhibitoren mit guten Ausbeuten und in hoher Reinheit hergestellt werden; im Gegensatz dazu wäre deren Synthese in Lösung deutlich aufwändiger gewesen. Die benötigten SPPS-Bausteine waren entweder kommerziell erhältlich oder konnten aus einfachen Grundbausteinen in ausreichenden Mengen hergestellt werden. Nach der SPPS wurden die Nitrogruppen der Vorläuferpeptide ohne vorherige Reinigung hydriert, wobei die erhaltenen Amine in MeCN/Wasser-Gemischen in der Regel ausreichend löslich waren, um eine Reinigung mittels präparativer HPLC durchzuführen. Aufgrund der hohen Reinheit der Edukte entstanden in den darauffolgenden Zyklisierungen meist nur wenige Nebenprodukte.

Die K_i -Werte der schwächer wirksamen Verbindungen aus der vierten Inhibitorserie liegen im Bereich zwischen 150 μM und 0.2 μM . Die initiale Verbindung **19** hat große strukturelle Ähnlichkeiten mit der Referenzsubstanz **11** (**Abbildung 41**),¹⁵⁵ zeigt jedoch überraschenderweise nahezu keine Plm-Hemmwirkung. Die Verwendung eines 4-aPhac-Restes in P2'-Position verbessert die inhibitorische Aktivität (Verbindung **119**), weshalb dieser für die weiteren Synthesen beibehalten wurde. Die Hemmkonstanten zeigen eine starke Abhängigkeit von der verwendeten α -Aminosäure im Linkersegment, was darauf hindeutet, dass die neben der S1-Tasche gelegene S3'-Nebentasche von deren Seitenketten adressiert werden könnte. Der $\beta\text{Ala-hPhe}$ -Linker des Inhibitors **124** erwies sich als besonders vorteilhaft für eine effiziente Plm-Hemmung. Vermutlich bindet die flexible hPhe-Seitenkette in der S3'-*subsite*, wodurch die Konformation des Inhibitors stabilisiert werden könnte. Aufgrund seiner hydrophoben Struktur ist die Wasserlöslichkeit des Hemmstoffs jedoch geringer als bei vielen anderen Inhibitoren, was insbesondere bei der Reinigung mittels präparativer HPLC auffiel. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde der vergrößerte Inhibitor **126** entwickelt, der innerhalb der Serie 4 die größte Plm-Hemmwirkung besitzt und aufgrund seines basischen Arg-Restes eine gute Wasserlöslichkeit besitzt.

4.7. Diskussion (Teil B)

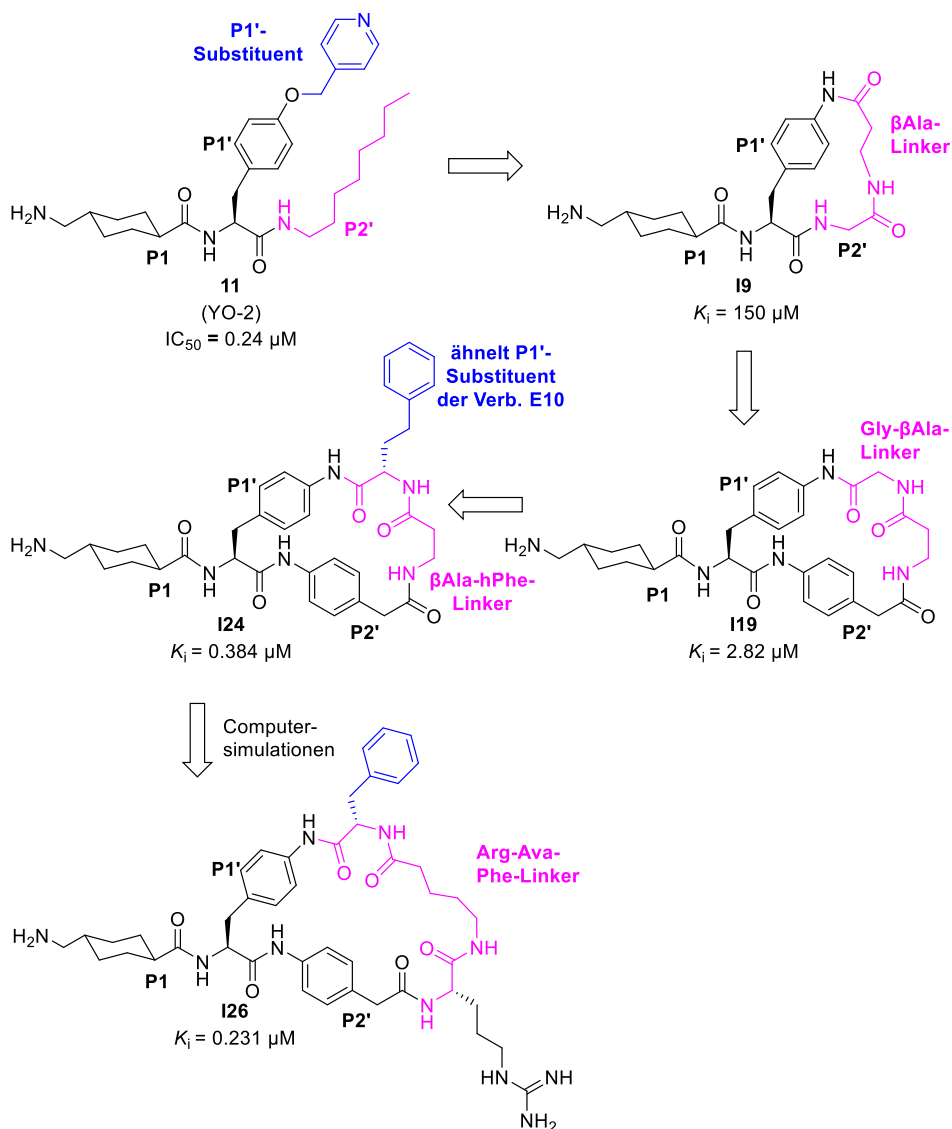


Abbildung 41: Entwicklung des Inhibitors I26. Strukturen und Plm-Hemmwirkungen der Verbindungen **11**¹⁵⁵, **I9**, **I19**, **I24** und **I26** aus der Inhibitorserie 4.

Zusammenfassend wurden innerhalb der Inhibitorserie 4 mehrere Struktur-Wirkungsbeziehungen beobachtet: die Verwendung aromatischer 4-aPhac-Bausteine in P2'-Position verbessert die inhibitorische Aktivität im Vergleich zu aliphatischen Aminosäuren; die Linkerlänge sowie die Einführung einer zusätzlichen Peptidbindung im Linkersegment haben einen großen Einfluss auf die Plm-Hemmwirkung; der Einbau von α -Aminosäuren neben der Seitenkette des P1'-Restes beeinflusst die Plm-Inhibierung ebenfalls stark, was vermutlich durch eine Adressierung der zur S1'-Tasche benachbarten S3'-Nebentasche verursacht wird.

4.7. Diskussion (Teil B)

Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurde die Inhibitorserie 5 entwickelt, deren Verbindungen für Plm deutlich verbesserte K_i -Werte im Bereich zwischen etwa 284 nM bis 0.5 nM besitzen. Die Grundstruktur des initialen Inhibitors **128** wurde von der Referenzsubstanz **15** abgeleitet (**Abbildung 42**).¹⁶¹ Unter Beibehaltung des P1-Restes wurde das Substitutionsmuster des Bpa-Bausteins abgewandelt, um die Synthese zu erleichtern und eine peptidische Zyklisierung zu ermöglichen. Der heteroaromatische P2'-Rest wurde zur Vereinfachung durch den bereits zuvor verwendeten 4-aPhac-Rest ersetzt, dessen C-Terminus über ein aliphatisches Linkersegment mit der Seitenkette des P1'-Bausteins verknüpft ist.

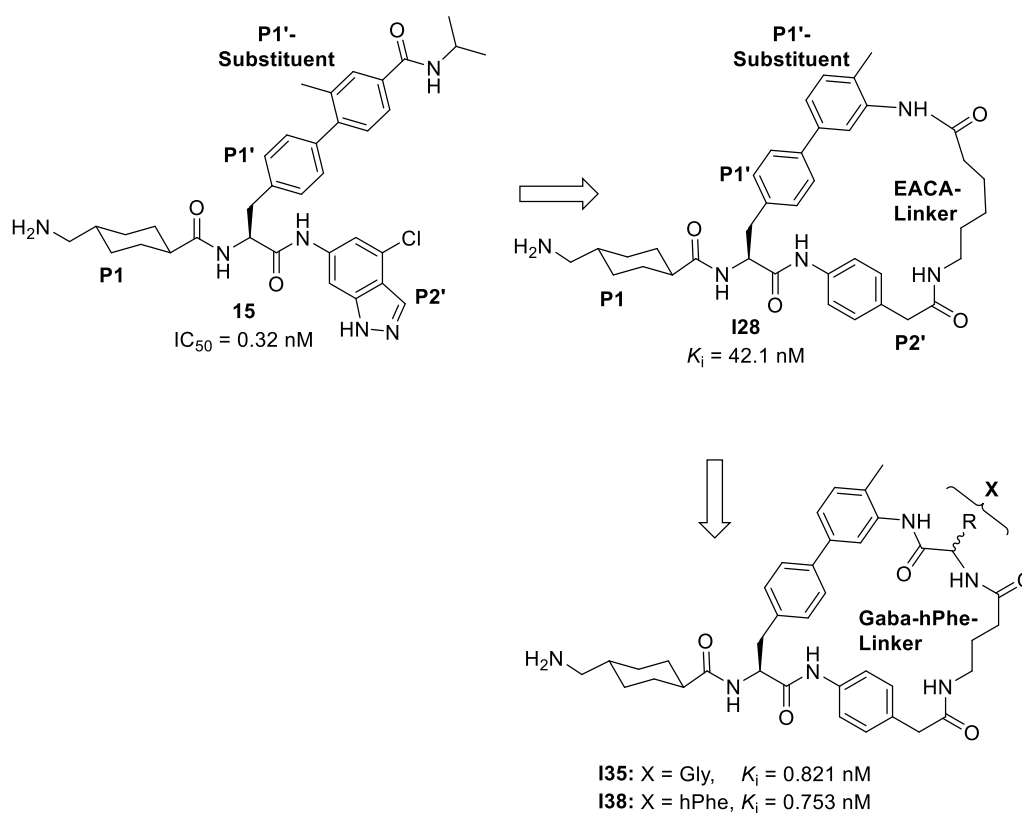


Abbildung 42: Entwicklung des Inhibitors 138. Ausgehend von der azyklischen Referenzverbindung **15**¹⁶¹ wurden die makrozyklischen Derivate **128**, **135** und **138** entwickelt (X: variable α -Aminosäure mit der Seitenkette R).

Bereits die initiale Verbindung **128** ($K_i = 42.1 \mu\text{M}$) zeigt eine deutlich stärkere Plm-Hemmung als der wirksamste Inhibitor der Serie 4 (Verbindung **126**, $K_i = 0.231 \mu\text{M}$). Basierend auf dieser Startstruktur konnte die inhibitorische Aktivität durch Variationen des Linkersegments um den Faktor 50 verbessert werden. Dabei wurde erneut eine deutliche Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Länge und Zusammensetzung des Linkersegments beobachtet. Eine besonders starke Plm-Hemmwirkung wurde mit Linkern erreicht, die aus Gaba und einer geeigneten α -Aminosäure zusammengesetzt sind (z. B. Verbindungen **135** und **138**).

4.7. Diskussion (Teil B)

Die Abhängigkeit der inhibitorischen Aktivität von der Linker-Zusammensetzung konnte anhand der Kristallstruktur der Verbindung **I35** zumindest teilweise erklärt werden (vgl. **Abbildung 40**). Fast alle Wechselwirkungen zwischen μ Plm und der hochwirksamen Referenzsubstanz **11** werden analog auch durch den Inhibitor **I35** ausgebildet.¹⁵⁵ Der Gaba-Gly-Linker des Makrozyklus ermöglicht darüber hinaus jedoch die Ausbildung einer intermolekularen sowie zweier intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen, die das makrozyklische Kernsegment stabilisieren. Es ist wahrscheinlich, dass diese polaren Wechselwirkungen entscheidend zur Plm-Affinität der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren beitragen und mit anderen Linkersegmenten nicht in gleichem Maße ausgebildet werden. Letzteres dürfte mit deutlichen Hemmwirkungsverlusten einhergehen. Die Vermutung wird durch die K_i -Werte der azyklischen Verbindungen **I56** und **I57** gestützt ($K_i = 86.1$ nM bzw. 65.1 nM), die im Vergleich mit dem zyklischen Derivat **I35** ($K_i = 0.821$ nM) eine etwa 105- bzw. 80-fach verringerte Plm-Hemmwirkung besitzen und daher weniger effizient stabilisiert werden. In künftigen Kristallstrukturanalysen sollten neben azyklischen Derivaten insbesondere die Verbindungen **I38** und **I42** untersucht werden, die ein sterisch besonders anspruchsvolles Linkersegment bzw. einen verlängerten P1'-Rest enthalten.

Im Vergleich zu den makrozyklischen substratanalogen Plm-Inhibitoren besitzen die Hemmstoffe der neu entwickelten Verbindungsklasse einen grundlegend anderen Bindungsmodus (**Abbildung 43**). Die makrozyklischen Kernsegmente zeigen in entgegengesetzte Regionen des aktiven Zentrums, während lediglich die P1-Reste auf ähnliche Weise in der S1-Tasche binden.

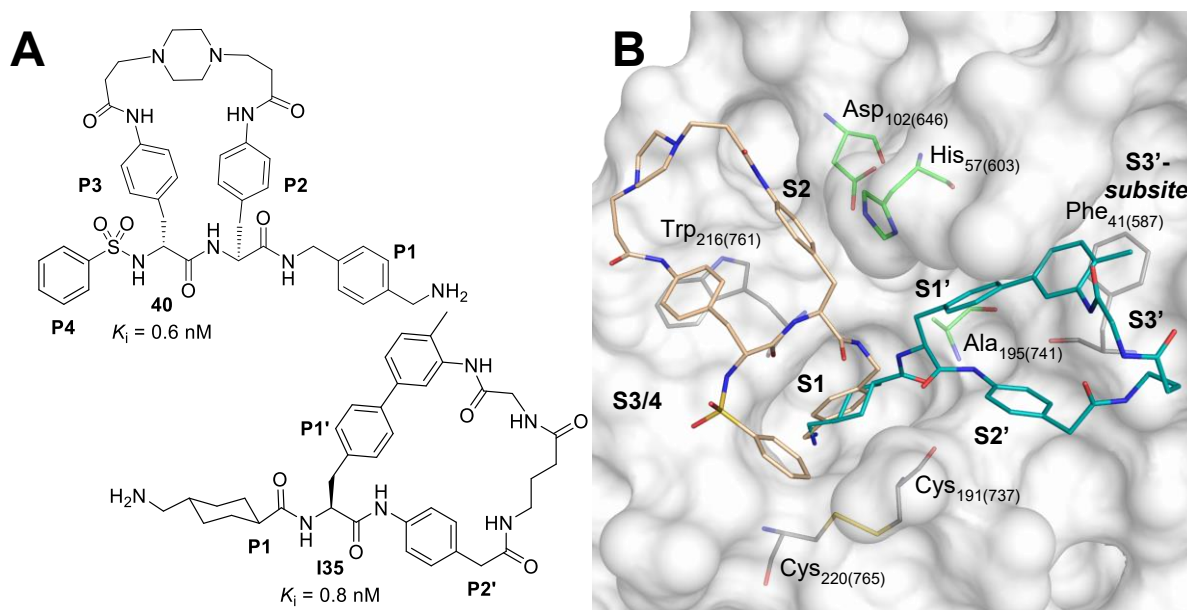


Abbildung 43: Kristallstrukturen: Inhibitoren I35 und 40 im Komplex mit μ Plm. A) Strukturen und Plm-Hemmwirkungen. B) Überlagerte Kristallstrukturen der Inhibitoren **I35** (blaugrüne C-Atome) und **40** (beige C-Atome) im Komplex mit der μ Plm-Mutante (graue C-Atome und weiße Oberfläche, grüne C-Atome: katalytische Triade). Die Makrozyklen binden an unterschiedliche Regionen des aktiven Zentrums.

4.7. Diskussion (Teil B)

Zur besseren Adressierung der S3'-Nebentasche wurde der Methylsubstituent an der P1'-Seitenkette der Verbindung **I35** durch sterisch anspruchsvollere Gruppen ersetzt, die von der Struktur des Referenzinhibitors **15** abgeleitet sind (**Abbildung 44A**).¹⁶¹ In den computergenerierten Posen besetzen die Phenylamid- und Isopropylamid-Reste der Verbindungen **I41** und **I42** die S3'-Nebentasche (**Abbildung 44B**). Während die Verbindung **41** einen etwa zweifachen Hemmwirkungsverlust zeigt, wurde für das Derivat **I42** annähernd eine Verdoppelung der Wirksamkeit festgestellt. Möglicherweise verhindert der größere Phenylamid-Substituent eine optimale Bindung in der S3'-*subsite*.

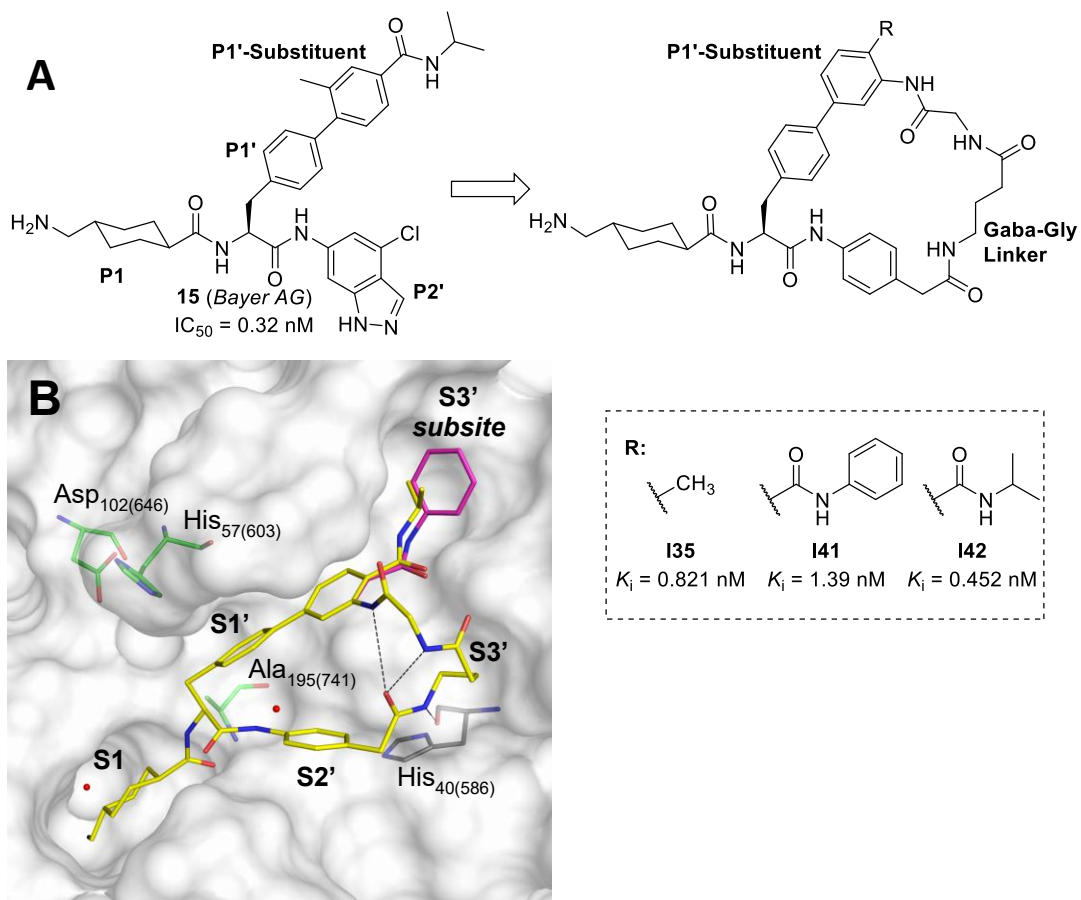


Abbildung 44: Adressierung der S3'-subsite. A) Strukturen und Plm-Hemmwirkungen der Verbindungen **15**,¹⁶¹ **I35**, **I41** und **I42**. B) Computergenerierte Bindungsmodi der Inhibitoren **I41** (violette C-Atome) und **I42** (gelbe C-Atome) im Komplex mit der stabilisierten μ Plm-Mutante (weiße Oberfläche und graue bzw. grüne C-Atome). Die Strukturen wurden ausgehend von der Kristallstruktur der Verbindung **I35** im aktiven Zentrum modelliert und energieminiert.

Viele der besonders wirksamen Verbindungen der Inhibitorserie 5 enthalten relativ hydrophobe Makrozyklen, was ein Nachteil für deren mögliche intravenöse Verabreichung als Fibrinolysehemmstoff ist. Daher wurden zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit protonierbare Reste in das Linkersegment eingebaut (**Abbildung 45**). Da die Kristallstruktur der Verbindung **I35** zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbar war, konnten die zuvor beschriebenen stabilisierenden Wechselwirkungen des makrozyklischen Kernsegments bei der Entwicklung der Inhibitoren **I43** - **I48** dabei nicht berücksichtigt werden. Keines der mehrfach protonierbaren Derivate zeigte eine verbesserte Plm-Hemmwirkung oder -Selektivität. Jedoch

4.7. Diskussion (Teil B)

wurde bei den Piperazinyldicarbonsäure-Derivaten **I45 - I48** erneut eine deutliche Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Linkerlänge festgestellt. Das Piperazinylpropansäure-Derivat **I46** besitzt eine vergleichsweise starke inhibitorische Aktivität, während bereits eine Änderung der Linkerlänge um lediglich eine Methylengruppe einen deutlichen Wirksamkeitsverlust verursacht (Verbindungen **I47** und **I45**). Eine zusätzliche Erweiterung des Makrozyklus erbrachte im Falle des dreifach protonierbaren Inhibitors **I48** keinen Vorteil. Die verringerte Bindungsaffinität wird vermutlich durch eine weniger effiziente Stabilisierung des Makrozyklus verursacht. Ob dabei ähnlich wie in der Kristallstruktur der Verbindung **I35** stabilisierende Wechselwirkungen oder stattdessen destabilisierende Abstoßungseffekte mit den geladenen Linkersegmenten relevant sind, bleibt zu untersuchen.

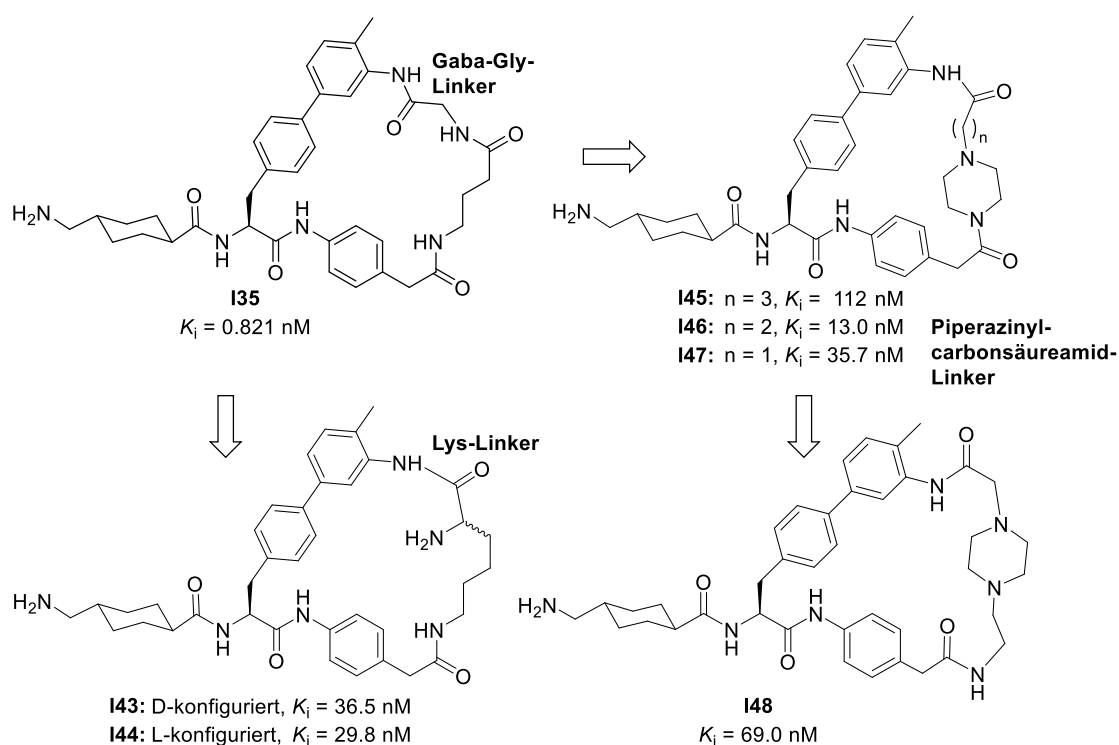


Abbildung 45: Inhibitoren mit verbesserter Löslichkeit. Strukturen und Plm-Hemmwirkungen der mehrfach protonierbaren Inhibitoren **I43 - I48**, die von der Ausgangsverbindung **I35** abgeleitet wurden.

Die Variation des P2'-Restes in Kombination mit mehreren unterschiedlichen Linkersegmenten verbesserte die Plm-Hemmwirkung ebenfalls nicht und wirkte sich nur geringfügig auf die Selektivität der Verbindungen aus. Keiner der untersuchten P2'-Bausteine bot einen Vorteil gegenüber dem zuvor verwendeten 4-aPhac-Rest. Jedoch erwies sich der Gaba-Gly-Linker der Verbindung **I50** ($K_i = 8.32 \text{ nM}$) gegenüber den β Ala-Gly und Ava-Gly-Linkern der Verbindungen **I49** und **I51** ($K_i = 26.9 \text{ nM}$ bzw. 20.6 nM) als vorteilhaft, was wiederum anhand einer unterschiedlich starken Stabilisierung des Makrozyklus durch intramolekulare Wechselwirkungen erklärt werden könnte. Bei den 6-aNap-Derivaten **I53 - I55** wurde dieser Zusammenhang nicht beobachtet. Ob die generell etwas stärkere Hemmwirkung

4.7. Diskussion (Teil B)

dieser Inhibitoren ebenfalls durch eine Stabilisierung des Makrozyklus oder eher durch vorteilhafte Interaktionen des vergrößerten P2'-Bausteins mit Plm verursacht wird, könnte mittels Röntgenkristallstrukturanalyse geklärt werden. Einen besonders drastischen Hemmwirkungsverlust bewirkte der 3-aMePhac-Rest der Verbindung **I52**, der über eine Aminomethylgruppe an den P1'-Rest gekuppelt ist. In Übereinstimmung mit den Strukturen der durch die Firma BAYER patentierten Inhibitoren deutet dies darauf hin, dass aromatische Amid-Gruppen in P2'-Position einen wichtigen Beitrag zur hohen Plm-Affinität der Txa-konjugierten Inhibitoren leisten.¹⁶¹⁻¹⁶⁷ Hier könnten weitere Derivate zur Bestätigung der Hypothese synthetisiert werden. Zur weiteren Strukturoptimierung könnten ferner zusätzliche P2'-Bausteine mit aromatischen Aminogruppen untersucht werden, die sich z. B. über Carboxylgruppen an geeignete Linker kuppeln lassen. Das in den Patenten der Firma BAYER beschriebene breite Spektrum aromatischer P2'-Reste deutet darauf hin, dass hier noch ein erhebliches Potenzial zur Verbesserung der Hemmwirkung besteht.¹⁶¹⁻¹⁶⁷

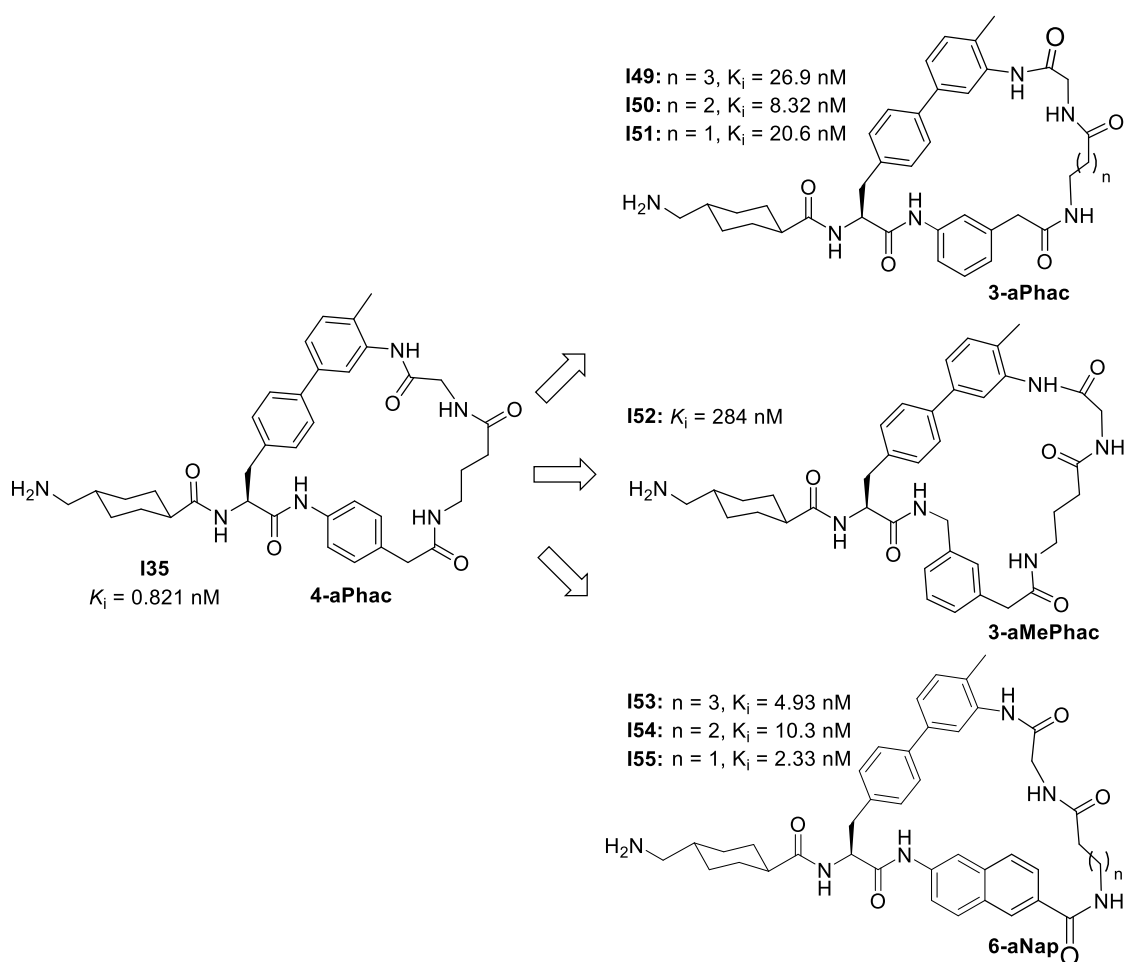


Abbildung 46: Variation des P2'-Restes. Strukturen und Plm-Hemmwirkungen der Verbindungen **I49** und **I49 - I55**, die von dem Analog **I35** abgeleitet wurden.

4.7. Diskussion (Teil B)

Für die besonders potenten Inhibitoren konnten im Rahmen der *slow binding*-Auswertungen die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der EI-Komplexbildung (k_{on} bzw. k_{off}) bestimmt werden. Die k_{on} -Werte umspannen einen Bereich von ca. $1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bis $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und liegen damit in einigen Fällen oberhalb der Werte der makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren des Teils A ($k_{\text{on}} = 7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} - 7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Die k_{off} -Werte liegen zwischen etwa $9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und sind damit größer als die Werte der Inhibitoren aus Teil A ($k_{\text{off}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} - 4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Trotz ihrer teils hohen Assoziationsgeschwindigkeiten dürften die Txa-konjugierten Inhibitoren daher eine kürzere *residence time* im katalytischen Zentrum des Plm aufweisen ($t_{\text{residence}} \approx 1/k_{\text{off}}$). Für den besten Inhibitor **I38** ($k_{\text{off}} = 8.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) beträgt diese etwa 19 Minuten und ist damit weniger als halb so lang wie die des besten substratanalogen Inhibitors **40** ($k_{\text{off}} = 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $t_{\text{residence}} \approx 50 \text{ min}$).¹⁸³ Wie bereits im Teil A bereits diskutiert wurde, ist ein wichtiger Anwendungsbereich von Plm-Inhibitoren die Fibrinolysehemmung zur Blutungsverringering bei operativen Eingriffen oder nach schweren Traumata. Diese Indikation ist lediglich mit einer einmaligen oder kurzzeitigen Verabreichung der Wirkstoffe unter kontrollierten Bedingungen verbunden. Daher muss die vergleichsweise kurze *residence time* der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren nicht grundsätzlich als Ausschlusskriterium für eine Verwendung als Antifibrinolytikum angesehen werden, zumal wie oben diskutiert noch großes Potenzial für weitere Strukturoptimierungen besteht.

Basierend auf strukturellen Unterschieden wurde die Selektivität ausgewählter Inhibitoren untersucht. Die Plm-Selektivität der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren ist insgesamt schwächer ausgeprägt als bei den makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren des Teils A. Gegenüber Thrombin, aPC und FXa wurde mit K_{i} -Werten $> 4 \mu\text{M}$ bzw. $> 115 \mu\text{M}$ eine hohe Selektivität erreicht. Daher wird im Folgenden nur die Hemmwirkung auf die Proteasen Trypsin, PK und FXIa diskutiert.

Bei der Variation des Linkersegments fällt auf, dass insbesondere der Austausch des Gly-Restes der Verbindung **I35** durch Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten einen starken Einfluss auf die Plm-Selektivität hat (**Abbildung 47A**). Der Einbau von Phe in die Verbindung **I37** führt sowohl gegenüber Plm als auch gegenüber Trypsin und PK zu einer schwächeren Hemmwirkung. Dabei wird die Trypsin-Selektivität verbessert, während für PK und FXIa geringfügige Selektivitätsverluste beobachtet werden. Im Gegensatz dazu bewirkt der Einbau des flexibleren hPhe-Restes in die Verbindung **I38** einen Selektivitätszuwachs gegenüber den drei Proteasen, wobei die Plm-Hemmung nicht beeinträchtigt wird. Das aktive Zentrum des Plm scheint im Gegensatz zu den anderen untersuchten Proteasen ausreichend Platz zur Stabilisierung des sterisch anspruchsvollen hPhe-Rest zu bieten, für den in Computermodellen verschiedene energetisch günstige Orientierungen erhalten wurden (**Abbildung 47B**). Dieser trägt folglich entscheidend zur Plm-Selektivität der Verbindung **I38** bei, die insgesamt die beste Kombination aus Plm-Hemmung und Selektivität zeigt und

4.7. Diskussion (Teil B)

daher zu den besonders vielversprechenden Txa-konjugierten Inhibitoren dieser Promotion gehört. Aufgrund der hydrophoben hPhe-Seitenkette ist dessen Wasserlöslichkeit jedoch vergleichsweise gering. Durch den Einbau von Heteroatomen oder geeigneten Substituenten in die hPhe-Seitenkette sollte jedoch eine Verbesserung der Löslichkeit möglich sein. Ferner wäre ein Austausch der P1'-Methylgruppe gegen den größeren Isopropylamid-Rest des Inhibitors **142** interessant, da dieser trotz seiner geringeren Selektivität eine besonders hohe Plm-Hemmwirkung zeigt.

Im Vergleich mit dem besten substratanalogen makrozyklischen Inhibitor **40**¹⁸³ ist die Plm-Selektivität Verbindung **138** schwächer ausgeprägt (**Abbildung 48**). Dennoch besitzt er eine vergleichbare Plm-Hemmwirkung und ist ein relativ selektiver Plm-Inhibitor.

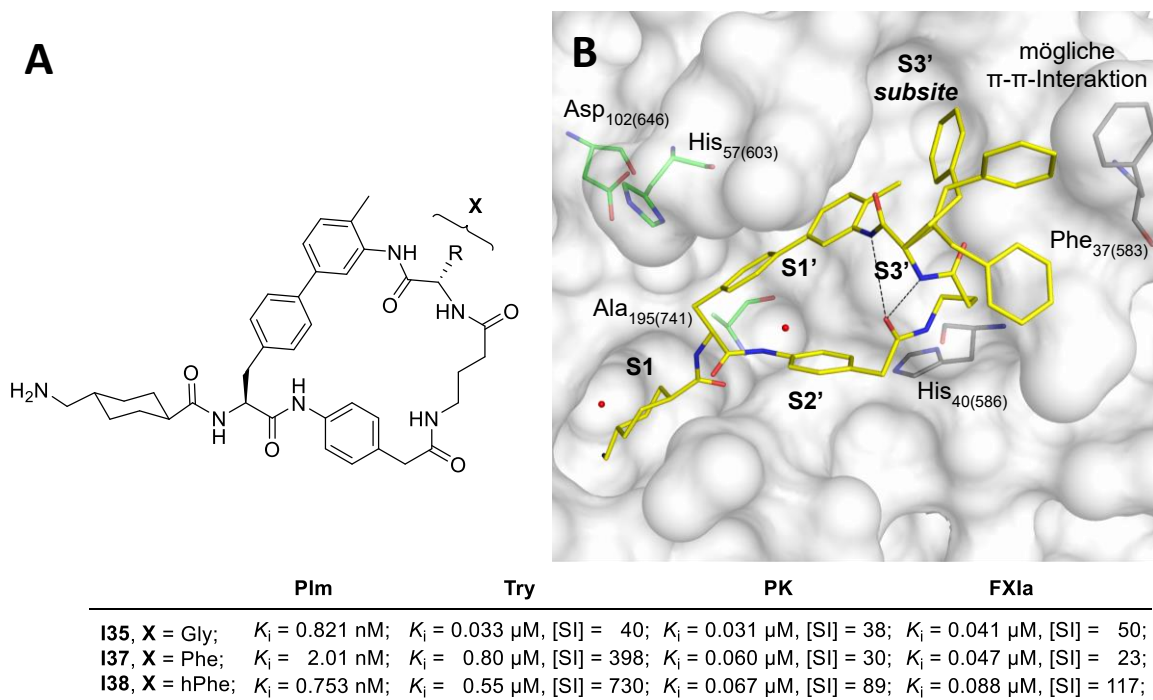


Abbildung 47: Selektivitätsvergleich: ausgewählte Inhibitoren der Serie 5. A) Selektivitätsvergleich der Inhibitoren **135**, **137** und **138**. Die Selektivitätsindizes [SI] entsprechen den jeweiligen Quotienten $K_i(\text{untersuchte Protease}) / K_i(\text{Plm})$. X: variable Aminosäure mit der Seitenkette R. B) Computermodelle des Inhibitors **138** (gelbe C-Atome) im Komplex mit der stabilisierten μ Plm-Mutante (graue bzw. grüne C-Atome und Oberfläche). Die Verbindung wurde ausgehend von der Kristallstruktur des Inhibitors **135** im aktiven Zentrum modelliert und energieminiert. Dabei wurden unterschiedliche energetisch günstige Orientierungen für die hPhe-Seitenkette erhalten. Über eine π - π -Interaktion könnte der Phenylring der hPhe-Seitenkette möglicherweise mit der Seitenkette des Phe37(583) interagieren.

4.7. Diskussion (Teil B)

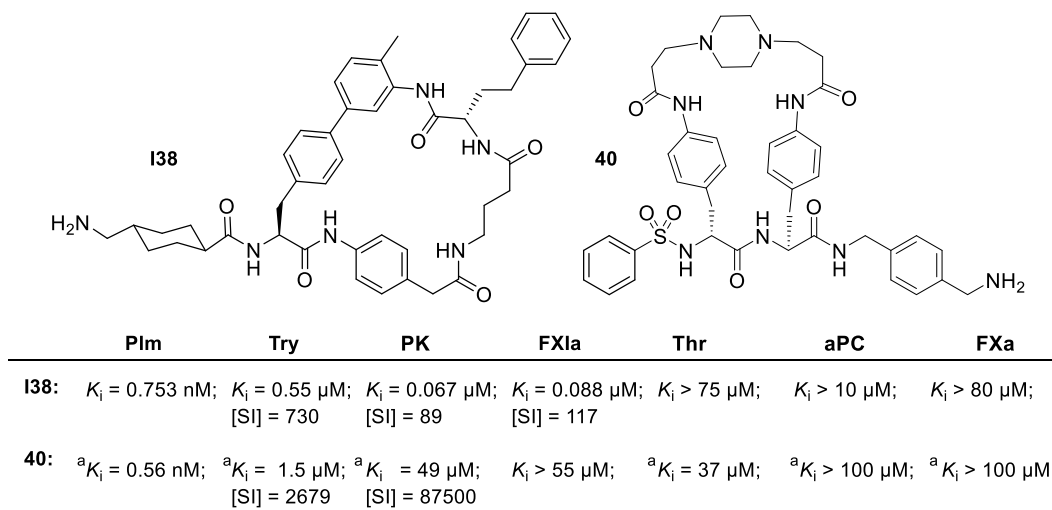


Abbildung 48: Selektivitätsvergleich: Inhibitoren 40 und 138. Strukturen und Selektivität der Verbindungen **40**¹⁸³ (Teil A) und **138** (Teil B). Die angegebenen Selektivitätsindizes [SI] entsprechen den jeweiligen Quotienten $K_i(\text{untersuchte Protease}) / K_i(\text{Plm})$. ^aDie Werte wurden der Literatur entnommen.¹⁸⁵

Es ist bekannt, dass *active site*-Inhibitoren des Plm zur Vermeidung von Blutungen bei chirurgischen Eingriffen eine Hemmstoffkonzentration von etwa $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ im Plasma erfordern.¹⁸⁰ Daher könnte das derzeitige Selektivitätsprofil des Inhibitors **138** möglicherweise bereits ausreichend sein. Die beobachtete relativ starke Trypsin-Hemmung kann vernachlässigt werden, da dieses unter physiologischen Bedingungen ausschließlich im Gastrointestinaltrakt vorhanden ist. Eine moderate FXIa-Hemmung sollte ebenfalls tolerierbar sein, da bei chirurgischen Eingriffen wie Herz-Operationen mit cardiopulmonarem Bypass (CPB) neben Antifibrinolytika in der Regel zusätzlich Antikoagulanzen wie niedermolekulares Heparin verabreicht werden, um eine Thrombusbildung zu vermeiden.^{211,212} Die Entwicklung von FXIa-Hemmstoffen als Antikoagulanzen steht derzeit im Fokus vieler Pharmaunternehmen, da deren Verwendung im Vergleich zu Thrombin- oder FXIa-Inhibitoren zu deutlich weniger Blutungskomplikationen führen soll.^{213–215} Jedoch erlaubt die separate Gabe von Antikoagulanzen und Fibrinolysehemmstoffen eine bessere pharmakologische Kontrolle als die Verabreichung nur eines Wirkstoffs, der gleichzeitig beide Prozesse unterschiedlich stark beeinflusst. Daher ist es sinnvoll, die FXIa-Affinität der neuen Inhibitoren durch weitere Strukturmodifikationen zu senken. Auch die moderate PK-Hemmung könnte in Analogie zum Aprotinin (PK: $K_i = 30 \text{ nM}$) sogar von Vorteil sein.^{139,140} Einerseits sollte diese die Aktivierung des im Blutkreislauf zirkulierenden Plg-Aktivators pro-uPA zu reifem uPA direkt verlangsamen (**Abbildung 49**); andererseits sollte sie zu einer verringerten Bradykinin (BK)-Freisetzung führen. Dies könnte die BK-B2-rezeptorvermittelte tPA-Sekretion aus Endothelzellen in den Blutkreislauf und damit auch die Plg-Aktivierung verlangsamen, was schließlich zu einer verringerten Fibrinolyse rate führen würde.^{149,216,217} Auch einige der durch die BAYER AG patentierten Verbindungen besitzen zusätzlich zu ihrer dualen Plm- und FXIa-Inhibierung eine starke Hemmwirkung auf PK.^{166,167} Ob die hier diskutierten pharmakologischen Effekte *in vivo* tatsächlich relevant sind, bleibt zu überprüfen.

4.7. Diskussion (Teil B)

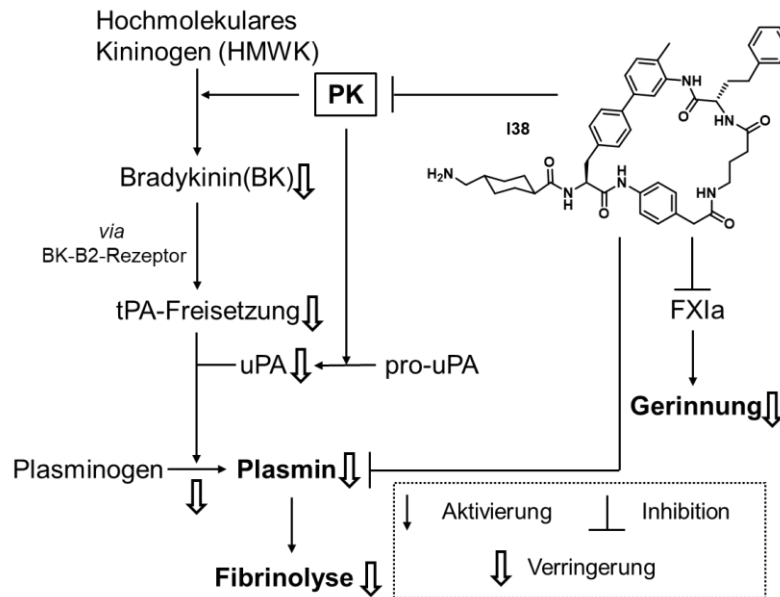


Abbildung 49: Mögliche Wirkungen des Inhibitors I38. ^{149,216,217}

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ausgehend von den Strukturen der Verbindungen **11**¹⁵⁵ und **15**¹⁶¹ hochaktive makrozyklische P1m-Inhibitoren erhalten wurden, die in der S1-S3'-Region des aktiven Zentrums binden und somit einen grundlegend anderen Bindungsmodus besitzen als die makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren des Teils A. Trotz ihres schwächer ausgeprägten Selektivitätsprofils sind auch die neuen P1m-Inhibitoren sehr selektiv. Besonders die Verbindung **I38** könnte als vielversprechende Ausgangssubstanz für weiterführende Strukturentwicklungen dienen. Für die angestrebte intravaskuläre Anwendung sollte künftig eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit angestrebt werden. Zusätzlich muss ihre antifibrinolytische Aktivität in Plasma oder Vollblut bestimmt werden, letzteres z. B. mittels Thrombelastographie.²¹¹ Für besonders geeignete Verbindungen muss zusätzlich deren metabolische Stabilität und Toxizität überprüft werden, bevor die antifibrinolytische Wirkung anhand von Tiermodellen *in vivo* untersucht werden kann. Prinzipiell sollte es möglich sein, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren zu wirksamen Antifibrinolytika weiterzuentwickeln.

5. Zusammenfassung

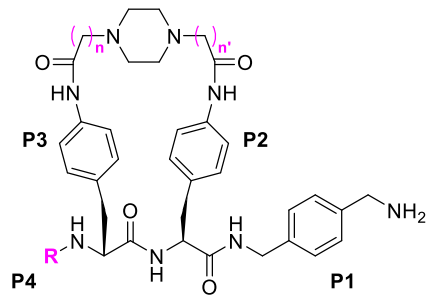
Diese Dissertation ist in zwei Teile untergliedert. Im Teil A wurden Strukturvariationen der bereits bekannten Referenzverbindung **40** vorgestellt (**Abbildung 50**), während der Teil B die Entwicklung einer neuen Inhibitor-Klasse beschreibt.

Teil A (Kapitel 3)

Vor dem Beginn dieser Promotion wurde in unserer Gruppe bereits eine Vielzahl makrozyklischer substratanaloger Plm-Inhibitoren hergestellt, die eine hohe Wirksamkeit und ein hervorragendes Selektivitätsprofil gegenüber verwandten trypsinartigen Serinproteasen besitzen. Die beste Kombination aus Plm-Hemmwirkung und -Selektivität wurde für den makrozyklischen Inhibitor **40** bestimmt. Das Rückgrat dieser Referenzverbindung enthält einen N-terminalen Phenylsulfonyl-Rest, seitenkettensubstituierte Phenylalanin-Bausteine unterschiedlicher Konfiguration in P3- bzw. P2-Position sowie einen C-terminalen *p*-Xda-Rest. Die P3- und P2-Seitenketten sind über einen *N,N'*-Piperazinyldipropansäureamid-Linker miteinander verbunden, wodurch eine zentrale makrozyklische Struktur erhalten wird. Die bereits in einer Masterarbeit basierend auf der Referenz **40** synthetisierten Inhibitoren **41 - 44** wurden im Rahmen dieser Promotion durch die Derivate **11 - 18** ergänzt. Die Verbindungen **11** und **12** bildeten zusammen mit den Verbindungen **41 - 44** die Serie 1, deren Strukturen sich lediglich im Substitutionsmuster des P4-Restes unterscheiden. In der Serie 2 wurde unter Beibehaltung des P4-Phenylsulfonyl-Restes die Linkerlänge variiert (Verbindungen **13 - 16**). Dafür wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt, die den selektiven Einbau asymmetrischer Linkersegmente erlaubt. Darüber hinaus wurde bei den Verbindungen **17** und **18** erstmals eine Zyklisierung zwischen den P4- und P2-Bausteinen vorgenommen (Serie 3).

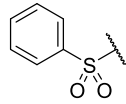
Mit den Verbindungen **41 - 44** und **11 - 16** wurden Hemmkonstanten für Plasmin sowie verwandte trypsinartige Serinproteasen bestimmt. Da die P4-P2-Makrozyklen **17** und **18** nur sehr schwache Plm-Inhibitoren sind, wurde bei diesen auf eine Selektivitätsbestimmung verzichtet. Obwohl einige der untersuchten Verbindungen Plm mit K_i -Werten im subnanomolaren Bereich hemmen, zeigt keines der neuen Derivate ein verbessertes Gesamtprofil im Vergleich mit dem Referenzinhibitor **40**. In Zusammenarbeit mit einer australischen Gruppe (AG LAW, MONASH UNIVERSITY, Melbourne, AU) wurde erstmals der Bindungsmodus der makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt. Dieser entspricht weitestgehend der bereits im Jahr 2013 mittels Docking in unserer Gruppe vorgeschlagenen Konformation eines strukturell sehr ähnlichen Derivats.

5. Zusammenfassung



Serie 1

R:
n = 2
n' = 2



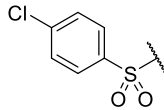
40

MI-2011

Plasmin: $K_i = 0.56$ nM

Trypsin: $K_i = 1.5$ μ M

^aAndere: $K_i > 30$ μ M



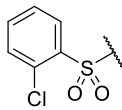
41

MI-1610

Plasmin: $K_i = 0.93$ nM

Trypsin: $K_i = 2.8$ μ M

^aAndere: $K_i > 15$ μ M



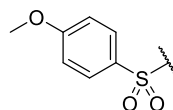
42

MI-1611

Plasmin: $K_i = 1.8$ nM

Trypsin: $K_i = 1.3$ μ M

^aAndere: $K_i > 60$ μ M



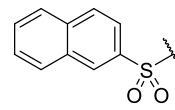
43

MI-1612

Plasmin: $K_i = 0.86$ nM

Trypsin: $K_i = 3.3$ μ M

^aAndere: $K_i > 25$ μ M



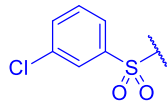
44

MI-1614

Plasmin: $K_i = 4.4$ nM

Trypsin: $K_i = 8.8$ μ M

^aAndere: $K_i > 35$ μ M



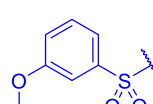
I1

MI-2301

Plasmin: $K_i = 1.7$ nM

Trypsin: $K_i = 2.3$ μ M

^aAndere: $K_i > 75$ μ M



I2

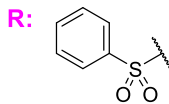
MI-2303

Plasmin: $K_i = 1.3$ nM

Trypsin: $K_i = 2.8$ μ M

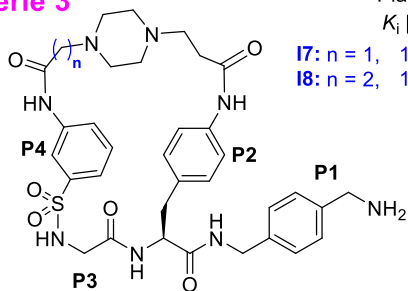
^aAndere: $K_i > 85$ μ M

Serie 2



	n = n'		Plasmin K_i [nM]	Trypsin K_i [μ M]	Andere K_i [μ M]
I3	3	3	170	4.2	> 30
I4	3	2	1.9	1.7	> 40
I5	1	2	15	4.3	> 25
I6	2	1	1.8	5.0	> 35

Serie 3



Plasmin

K_i [μ M]

I7: n = 1, 1.8

I8: n = 2, 1.2

Abbildung 50: Strukturen und Hemmkonstanten: Inhibitoren 40 - 44 und I1 - I8. Die im Rahmen dieser Promotion erhaltenen Strukturen und K_i -Werte sind blau hervorgehoben. ^aThrombin, aPC, PK, FXa und FXIa.

Teil B (Kapitel 4)

Im zweiten Teil dieser Promotion wurde basierend auf der Kristallstruktur des bekannten azyklischen Inhibitors **11** im Komplex mit μ Plm ein neuer Strukturtyp entwickelt (**Abbildung 51**). Das Konzept der makrozyklischen Inhibitoren wurde adaptiert, um sterisch anspruchsvolle Derivate der Referenzstruktur herzustellen, die in der S1-S3'-Region des aktiven Zentrums binden und eine ausgeprägte Plm-Selektivität besitzen (Serien 4 und 5). Alle neuen Verbindungen enthalten einen Txa-Baustein in P1-Position und werden im Rahmen dieser Arbeit als makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren bezeichnet.

Die Derivate der Serie 4 enthalten in P1'-Position einen *p*-substituierten Phenylalanin-Baustein, der über ein Linkersegment mit dem C-Terminus des P2-Restes verbunden ist. Gegenüber Plm wurde mit K_i -Werten zwischen 150 μ M und 0.28 μ M nur eine moderate Hemmwirkung bestimmt. Durch den Austausch des P1'-Bausteins gegen substituierte Bpa-Derivate wurde in der Inhibitorserie 5 eine deutliche Verbesserung der Plm-Hemmung erreicht ($K_i = 42$ nM - 0.45 nM). Mit ausgewählten Derivaten wurden zusätzlich Hemmkonstanten für verwandte Serinproteasen bestimmt und eine deutliche Plm-Selektivität festgestellt, die jedoch schwächer ausgeprägt ist als bei den makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren des Teils A. Das beste Gesamtprofil besitzt der Inhibitor **I38**, dessen sterisch anspruchsvoller hPhe-Rest die Bindungsaffinität zu den anderen untersuchten Proteasen verringert. Im Gegensatz dazu besitzt der wirksamste Plm-Inhibitor **I42** ein schwächer ausgeprägtes Selektivitätsprofil. In Zusammenarbeit mit der AG LAW wurde mittels Röntgenkristallstrukturanalyse der Bindungsmodus des neuen Inhibitorstyps in μ Plm bestimmt. Dieser zeigt große Ähnlichkeiten mit der Konformation der Referenzsubstanz **11**, wobei erwartungsgemäß die S1-S3'-Region adressiert wird.

Obwohl die makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren im Vergleich mit den makrozyklischen substratanalogen Inhibitoren (Teil A) eine geringere Plm-Selektivität besitzen, könnten prinzipiell beide Hemmstoffklassen zu potenten und selektiven Antifibrinolytika weiterentwickelt werden.

5. Zusammenfassung

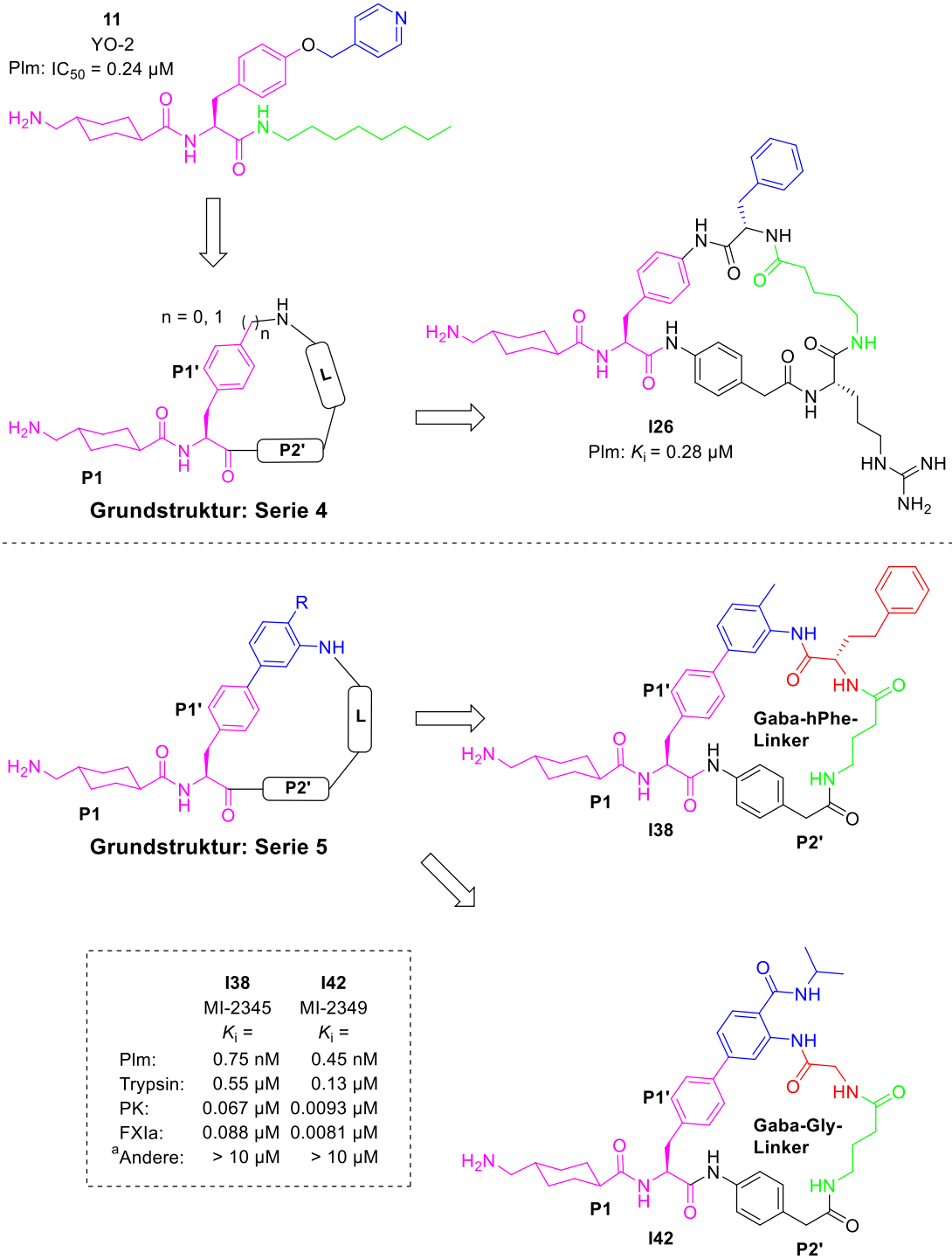


Abbildung 51: Grundstrukturen und beste Inhibitoren der Serien 4 und 5. Die Verbindung **I38** besitzt das günstigste Gesamtprofil, während die Verbindung **I42** der wirksamste Txa-konjugierte Plm-Inhibitor beider Serien ist. Strukturelle Ähnlichkeiten wurden farblich hervorgehoben. ^aThrombin, aPC und FXa.

6. Material und Methoden

6.1 Allgemeines

Verwendete Lösungsmittel und kommerziell erhältliche Reagenzien wurden von folgenden Herstellern und Händlern bezogen: ACROS ORGANICS (Dreieich, DE), ALFA AESAR (Kandel, DE), BACHEM DISTRIBUTION SERVICES GMBH (Weil am Rhein, DE), BLDPHARM GMBH (Kaiserslautern, DE), CARBOLUTION CHEMICALS GMBH (St. Ingbert, DE), CHEMPUR FEINCHEMIKALIEN UND FORSCHUNGSBEDARF GMBH (Karlsruhe, DE), THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH (Dreieich, DE), IRIS BIOTECH GMBH (Marktrechwitz, DE), MERCK KGAA (Darmstadt, DE), CARL ROTH GMBH & CO. KG (Karlsruhe, DE) und VWR INTERNATIONAL GMBH (Darmstadt, DE). Die Reagenzien wiesen i. d. R. eine Reinheit von mindestens 95 % auf und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Die Lösungsmittel wurden mit dem Reinheitsgrad *HPLC-grade*, *pro analysi* oder vergleichbarer Kennzeichnung erworben und ebenfalls ohne zusätzliche Reinigung verwendet. Das als Laufmittel in der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) verwendete Reinstwasser wurde durch Reinigung von demineralisiertem Wasser mit einem NOWAPURE SELECT-System (KSN WASSERTECHNIK; Nistertal, DE) erhalten. Als weiteres Laufmittel wurde Acetonitril (MeCN) (HIPERSOLV CHROMANORM, VWR) oder ein gleichwertiges Produkt der Firma TH. GEYER GMBH & CO. KG, Renningen, DE) verwendet. Alle wässrigen Lösungen wurden unter Verwendung von demineralisiertem Wasser angesetzt. Für Reaktionskontrollen mittels Dünnschichtchromatographie wurden Platten der Firma MERCK (s. oben, Kieselgel 60 F254, Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm) genutzt. Zwischenprodukte der Synthesen wurden mittels präparativer HPLC, präparativer MPLC oder mittels Säulenchromatographie (Silicagel 60 (MERCK KGAA (Darmstadt, DE): 0.015 - 0.040 mm) gereinigt. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte durch analytische HPLC. Alle finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und nach Lyophilisierung als TFA-Salze erhalten. Während der Durchführung von Reaktionen wurden die Ansätze stets gerührt bzw. geschüttelt, auch wenn dies nicht explizit genannt wird. Die Benennung von Verbindungen erfolgt auf zwei Arten. In der Überschrift wird die Verbindung gemäß einer im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kurzschreibweise benannt. Darunter wird zusätzlich der mithilfe des Programms CHEMDRAW 19.1 (PERKINELMER, Waltham, MA, US) generierte englische Name der Verbindung angegeben.

6.2. Analytische HPLC

Reaktionskontrollen und die Abschätzung der Reinheit von Inhibitoren und Zwischenprodukten wurden mittels analytischer HPLC durchgeführt (HITACHI PRIMAIDE, HITACHI EUROPE GMBH, Düsseldorf, DE: Pumpenmodul PRIMAIDE 1110, Autoinjektor 1210, Diodenarray-Detektor 1430,

6.3. Präparative HPLC

Säulenofen 1310, Vorsäule (EC 4/3 NUCLEODUR 100-5 C18 ec), Trennsäule (EC 250/4.6 NUCLEODUR C₁₈ ec, 5 µM, 100 Å, MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany), Software: EZCHROM ELITE (AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, CA, USA).

Als mobile Phasen wurden Reinstwasser (A) und MeCN (B), jeweils versetzt mit 0.1 % (v/v) TFA, verwendet. Bei einer Flussrate von 1 mL pro min wurden zwei unterschiedliche Methoden mit linearen Wasser-MeCN-Gradienten genutzt: Methode A: + 2 % (v/v) B pro min ausgehend von einer Startkonzentration von 10 % (v/v) B; Methode B: + 1 % (v/v) B pro min ausgehend von der für die jeweilige Verbindung genannten Startkonzentration. Zur Detektion wurde die Absorption bei 220 nm gemessen. Die Abschätzung der prozentualen Reinheit erfolgte durch Bestimmung der Flächenintegrale der Signale.

6.3. Präparative HPLC

Zur Reinigung von Inhibitoren und Zwischenprodukten mittels präparativer HPLC wurden Methoden mit linearen Gradienten aus Reinstwasser (A) und MeCN (B), jeweils versetzt mit 0.1 % TFA verwendet. Zum Auftragen der Probe wurde bei einer Flussrate von 5 mL pro min eine auf die jeweilige Verbindung angepasste Startkonzentration der Komponente B zunächst für 3 min konstant gehalten; dann wurde bei einer Flussrate von 20 mL pro min ein linearer Gradient mit einem Anstieg von 0.5 % (v/v) pro min gestartet. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 220 nm. Isolierte Produktfraktionen wurden mittels analytischer HPLC analysiert, vereint und lyophilisiert. Falls die gereinigten Verbindungen protonierbare Gruppen enthielten, wurden diese als TFA-Salze erhalten. Für die Trennungen wurden zwei unterschiedliche HPLC-Anlagen verwendet:

1.) Anlage der Firma VARIAN (jetzt Teil der Firma AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, CA, USA), bestehend aus zwei Pumpen (PREP STAR MODELL 218), einem Detektor mit Xenon-Blitzlampe (PRO STAR MODELL 320) sowie einem Fraktionskollektor (MODELL 701).

2.) Anlage der Firma KNAUER (Berlin, DE.), AZURA bestehend aus einem Pumpenmodul *P 2.1L* mit Pumpenkopf *E4099AB*, (VP 15/32 NUCLEODUR 100-5 C18 ec), einem Detektor *UVD 2.1L* mit Deuteriumlampe, sowie einem *FOXY R1* Fraktions-Sammler (TELEDYNE ISCO, Thousand Oaks, CA, USA).

Für beide Anlagen wurden identische Säulen benutzt (Vorsäule: VP 15/32 NUCLEODUR 100-5 C18 ec, Trennsäule: VP 250/32 NUCLEODUR C₁₈ ec, 5 µM, 100 Å, MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany).

6.4. Präparative MPLC

Die Reinigung von Zwischenstufen mittels präparativer MPLC erfolgte mit einer Anlage der Firma TELEDYNE ISCO (Thousand Oaks, CA, USA, COMBIFLASH SG 100C, UA-6 UV/Vis-Detektor mit optischer Einheit Typ 11, Absorption bei $\lambda = 254$ nm, FOXY JR. Fraktionskollektor). Dafür wurden FLASHPURE SILICA-Kartuschen (Silicagel, irreguläre Körnung, 35 - 34 μm) der Firma BÜCHI LABORTECHNIK AG (Flawil, CH) verwendet. In Abhängigkeit von der genutzten Silicagel-Kartusche wurden unterschiedliche Flussraten eingestellt: 12 g Silicagel, 30 mL pro min oder 40 g Silicagel, 40 mL pro min. Es wurden Gradienten-Methoden mit einer apolaren (A) und eine polaren (B) mobilen Phase benutzt. Zu Beginn der Trennung wurden die Startbedingungen für 3 min konstant gehalten, bevor ein linearer Gradient mit einem Anstieg von +1 % (v/v) B pro min gestartet wurde. Die genauen Bedingungen sind in den Versuchsvorschriften angegeben.

6.5. Lyophilisierung

Falls vorhanden wurden organische Lösungsmittel wie MeCN *in vacuo* weitestgehend entfernt. Dann wurden die zurückbleibenden Lösungen oder Suspensionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter Verwendung einer ALPHA 2-4 LDPLUS Gefriertrocknungsanlage (MARTIN CHRIST GEFRIERTROCKNUNGSANLAGEN GMBH; Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert.

6.6. Massenspektrometrie

Die Massen der Zwischenstufen und Inhibitoren wurden mit einem QTRAP 2000 ESI Massenspektrometer der Firma LIFE TECHNOLOGIES GMBH (Darmstadt, Germany) entweder im ESI-positiv- oder im ESI-negativ-Modus in MeOH bestimmt.

6.7. NMR-Spektroskopie

^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO-*d*6) auf einem von zwei unterschiedlichen Systemen der Firma JEOL GERMANY GMBH (Freising, DE) gemessen: 1.) ECX400, Frequenzen: ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 101 MHz; 2.) ECA500, Frequenzen: ^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz. Die Spektren wurden auf das Lösungsmittel DMSO normiert (stärkstes Signal des Multipletts: ^1H -NMR 2.50 ppm, ^{13}C -NMR: 39.52 ppm). In den Spektren sind die chemischen Verschiebungen δ in der Einheit ppm und die Kopplungskonstanten J in der Einheit Hertz (Hz) angegeben.

6.7. NMR-Spektroskopie

Die Multiplizitäten der gemessenen Signale werden wie folgt abgekürzt:

s	Singulett
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
t	Triplett
td	Triplett vom Dublett
q	Quartett
qd	Quartett vom Dublett
quin	Quintett
m	Multipllett.
br	breites, oft überlappendes Signal; Angabe ohne Multiplizität

In einigen ^{13}C -Spektren sind nicht alle Maxima der durch Trifluoracetylreste oder Trifluoracetat verursachten Quartetts eindeutig vom Untergrund unterscheidbar. In diesen Fällen wurden nur klar erkennbare Signale angegeben und mit dem Präfix p (pseudo) gekennzeichnet (z. B. pd = Pseudo-Dublett statt dem erwarteten Quartett). In ^1H -Spektren kennzeichnet der Präfix b besonders breite Signale (z. B. bs = breites Singulett). Insbesondere bei den in Teil A beschriebenen makrozyklischen Verbindungen konnten in einigen Spektren nicht alle erwarteten Signale vollständig mit Multiplizität, genauer chemischer Verschiebung und Integral angegeben werden. Dies hat mehrere Ursachen: die Signale des Lösungsmittels sowie des darin enthaltenen Wassergehalts überlappen oft mit jenen der untersuchten Verbindungen; enthaltene Piperazinyl-Gruppen verursachen meist zwei besonders breite Singulett (bs), die mit anderen Signalen überlappen; bei makrozyklischen Verbindungen verursachen viele Protonen breite und unscharfe Signale, die mit anderen Signalen überlappen (vor Allem im Bereich zwischen ca. 4.5 ppm und 2 ppm). Innerhalb von größeren Multipletts identifizierte Signale werden zusätzlich zur Nennung des Multipletts separat und ohne die Angabe eines Integrals gelistet.

6.8. Enzymkinetik

Alle Messungen wurden in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (*Nunc GmbH & Co. Kg*, Langensfeld, DE, Teil der *Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die verwendeten Enzyme und Substrate sind in **Tabelle 10** gelistet.

Tabelle 10: Verwendete Enzyme und Substrate.

Enzym, MW, Konz. im Ansatz	Hersteller	Substrat, Konz. im Ansatz, K_M
aPC (human) , 61 kDa, 233 pM	KORDIA LABORATORY SUPPLIES, Leiden, NL	Mes-DArg-Pro-Arg-AMC, 100 μ M, $K_M = 26 \mu$ M
FXa (human) , 46 kDa, 97 pM	ENZYME RESEARCH LABORATORIES INC., South Bend, IN, USA	Mes-DArg-Pro-Arg-AMC, 50 μ M, $K_M = 28 \mu$ M
FXIa (human) , 160 kDa, 897 pM	MOLECULAR INNOVATIONS INC., Novi, MI, USA	Mes-DArg-Pro-Arg-AMC, 143 μ M, $K_M = 81 \mu$ M
PK (human) , 85 kDa, 112 pM	ENZYME RESEARCH LABORATORIES INC., South Bend, IN, USA	Mes-DArg-Pro-Arg-AMC, 100 μ M, $K_M = 39 \mu$ M
Plasmin (human) , 78 kDa, 270 pM	CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM CORP., San Diego, CA, USA	Mes-DArg-Phe-Arg-AMC, 100 μ M, $K_M = 16.1 \mu$ M
Thrombin (bovin) , 33.6 kDa, 31 pM	hergestellt nach WALSMANN ²¹⁸	Tos-Gly-Pro-Arg-AMC, 10 μ M, $K_M = 5.4 \mu$ M
Trypsin (porcin) , 23.2 kDa, 30 pM	MERCK KGaA, Darmstadt, DE	Mes-DArg-Gly-Arg-AMC, 20 μ M, $K_M = 8.3 \mu$ M

Plm-Messungen wurden mit einem TECAN SPARK[®] Spektrophotometer (TECAN GROUP AG, Männedorf, CH) bei $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ sowie $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ mit einer Messdauer von 30 min durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einem TRIS-HCl Puffer (50 mM TRIS, 154 mM NaCl, pH = 8.0). Für jeden Inhibitor wurden in Triplikaten aus drei unabhängigen Einwaagen jeweils acht unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Inhibitor untersucht. Der Messansatz bestand aus 100 μ L des o. g. Puffers, 40 μ L des fluorogenen Substrates gelöst in Wasser, 2 μ L des jeweiligen Inhibitors gelöst in DMSO (bzw. 2 μ L DMSO im Falle der Kontrolle) sowie 40 μ L Plm-Lösung in 0.9 % (m/v) aq. NaCl-Lsg. versetzt mit 0.1 % (m/v) BSA. Nach der Enzymzugabe wurde die Platte für 10 s geschüttelt und für 5 s ohne Schütteln inkubiert, bevor die zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzaktivität gemessen wurde. Messungen mit den Enzymen Trypsin, Thrombin, aPC, PK, FXa und FXIa wurden mit einem Fluoroscan Ascent Spektrophotometer (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., Waltham, MA, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ und einer Messdauer von 10 min durchgeführt. Die Inhibitoren wurden als Triplikate aus drei unabhängigen Einwaagen im Vergleich zu einer

6.8. Enzymkinetik

Kontrolle ohne Inhibitor untersucht. Bei K_i -Werten $< 1 \mu\text{M}$ erfolgte die Messung unter Verwendung von sechs unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen, während bei K_i -Werten $> 1 \mu\text{M}$ zwei unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen untersucht wurden. Ein Ansatz bestand aus je $100 \mu\text{L}$ Inhibitor-Lösung im o. g. Puffer, $20 \mu\text{L}$ Substrat-Lösung in Wasser sowie $20 \mu\text{L}$ des jeweiligen Enzyms gelöst in 0.9% (m/v) NaCl-Lsg. mit 0.1% (m/v) BSA (Ausnahme: FXIa wurde in dem o. g. TRIS-NaCl Puffer gelöst). Für Thrombin-Messungen wurde der Puffer zusätzlich mit 0.01% (w/v) Triton-X100 und für FXIa-Messungen mit 0.03% (w/v) Tween-20 versetzt. Nach der Enzymzugabe wurde die Platte für 20 s geschüttelt, bevor die zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzaktivität gemessen wurde.

Bei jeder Messung wurden die enzymkinetischen Konstanten K_M und V_{Max} anhand von acht bzw. sechs Substrat-Konzentrationen bei Plm bzw. anderen Enzymen gemäß der Gleichung 1 ermittelt. Dann wurden die v_s -Werte der Progress-Kurven für die gehemmten Enzymreaktionen sowie die Kontrollen bestimmt. Alle Kurven wurden gemäß den Erläuterungen im Abschnitt 3.3. klassisch ausgewertet. Im Falle hyperbolisch verlaufender Zeit-Umsatz-Kurven erfolgte zusätzlich eine *slow binding*-Auswertung unter Annahme des Hemm-Mechanismus A. Zugunsten der Übersichtlichkeit werden die Teil A vorgestellten Gleichungen in der **Tabelle 11** erneut gelistet.

Tabelle 11: Gleichungen: Enzymkinetische Charakterisierung der Inhibitoren. v_s : steady state-Geschwindigkeit, v_0 : Initialgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, t : Reaktionszeit in Sekunden, k_{obs} : scheinbare Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Ausbildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes, d : y-Achsenabschnitt der Progresskurven beim Start der Reaktion, K_M : MICHAELIS-MENTEN Konstante, V_{max} : Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, $[S]$: Substratkonzentration, $[I]$: Inhibitor-konzentration, K_i : Hemmkonstante, k_{on}^* : scheinbare Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, k_{on} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, k_{off} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes.²⁰⁰

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

$$v_s = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2)$$

$$\text{RFU} = v_s \cdot t + (v_0 - v_s) \cdot \frac{1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}}{k_{\text{obs}}} + d \quad (3)$$

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}^* \cdot [I] + k_{\text{off}} \quad (4)$$

$$k_{\text{on}} = k_{\text{on}}^* \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \quad (5)$$

$$K_i = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (6)$$

6.11. Mikrowellensynthesen

Bei linearen Verläufen wurden die v_s -Werte aus der Steigung der Geraden bestimmt. Bei der *slow binding*-Auswertung wurde v_s durch Anpassen der Progress-Kurven an die Gleichung 3 über einen Zeitraum von 0 - 1900 s (Teil A) bzw. 0 - 1200 s (Teil B) erhalten. Anschließend wurden die v_s -Werte als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Durch Anpassung der Werte an die Gleichung 6 wurde die Hemmkonstante K_i als Mittelwert dreier Messungen mit unabhängigen Einwaagen bestimmt. Dabei wurden die Werte für die Substratkonzentration S sowie die zuvor ermittelten Werte für K_M und V_{Max} konstant gesetzt und nur der K_i -Wert als variabler Parameter bestimmt. Bei *slow binding*-Auswertungen wurden die aus Gleichung 3 erhaltenen k_{obs} -Werte jeder Einzelmessung als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen und linearisiert. Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurden mit den Gleichungen 4 - 6 die k_{on} - und k_{off} -Werte berechnet.

6.9. Röntgenkristallstrukturanalyse

Die Röntgenkristallstrukturanalyse der vorgestellten μ Plm-Komplexe wurde von DR. JASON WU (AG LAW, MONASH UNIVERSITY, Melbourne, AU) durchgeführt. Zur Kristallisation wurde die stabilisierte Ser195(741)Ala-Mutante des μ Plm verwendet. Die im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Kristallstrukturen wurden bislang nicht veröffentlicht und werden daher ohne PDB-Codes angegeben.

6.10. Computermodelle

Die Erstellung von Computermodellen erfolgte mit der Software MOLECULAR OPERATING ENVIRONMENT (MOE 2019.01.01, CHEMICAL COMPUTING GROUP, Montreal, CA). Die Inhibitoren wurden basierend auf bekannten Kristallstrukturen strukturell ähnlicher Hemmstoffe im aktiven Zentrum des μ Plm modelliert und anschließend energieminiert. Das Protein und vorhandene Wassermoleküle wurden fixiert. Die Minimierung erfolgte mit den voreingestellten Parametern des *Amber10:EHT*-Kraftfelds.

6.11. Mikrowellensynthesen

Die Synthesen wurden in Druckgefäßen in einer Labormikrowelle (Discover SP, CEM GMBH, Kamp-Lintfort, DE) durchgeführt. Dabei wurden die Ansätze bei konstanter Temperatur unter erhöhtem Druck gerührt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in den Versuchsvorschriften angegeben.

6.12. Anmerkungen zur Berechnung von Ansätzen und Ausbeuten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Verbindungen synthetisiert, die ungeschützte aromatische Aminogruppen enthalten. Entgegen der Erwartungen wurde nach deren Reinigung durch präparative HPLC und Trocknung mittels Lyophilisierung in ^{13}C -NMR-Spektren i. d. R. kein Hinweis auf die Gegenwart des Trifluoracetat-Anions gefunden. Möglicherweise wurde ein Großteil der an die relativ schwach basischen, aromatischen Amine gebundenen flüchtigen Trifluoressigsäure während der Lyophilisierung entfernt, sodass die Aminogruppen nur partiell oder gar nicht protoniert vorgelegen haben könnten. Auf Verbrennungsanalysen zur Bestimmung des Protonierungsgrades wurde verzichtet. Bei der Berechnung von Ansätzen und Ausbeuten wurde einheitlich von unprotonierten aromatischen Aminogruppen ausgegangen und das möglicherweise enthaltene Trifluoracetat-Anion nicht berücksichtigt.

6.13. Allgemeine Arbeitsvorschriften

6.13.1. Wässrige Aufarbeitung

Der aufzureinigende Rückstand wurde in einer Mischung eines organischen LM und einer wässrigen Phase gelöst. In einem Scheidetrichter wurde die organische Phase separiert und mit sauren und/oder basischen wässrigen Phasen ausgeschüttelt. Sofern keine anderen Waschlösungen genannt wurden, stehen die Formulierungen „wässrig-sauer“ bzw. „wässrig-basisch“ bzw. „wässrig-neutral“ für jeweils dreimaliges Ausschütteln mit 5 % (m/v) aq. KHSO_4 -Lösung bzw. gesättigter aq. NaHCO_3 -Lösung bzw. gesättigter aq. NaCl -Lösung. Nach dem Ausschütteln wurde stets über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet und filtriert. Wenn nicht anders beschrieben wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

6.13.2. Vorschrift A: Abspaltung von Boc-Gruppen

Die Boc-Verbindung wurde mit 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan versetzt (Volumen s. Versuchsvorschrift) und bei RT für 1 h schwach gerührt. Danach wurde das Rohprodukt mit kaltem DEE gefällt und entweder chromatographisch gereinigt oder dreimal mit DEE gewaschen.

6.13.3. Vorschrift B: Hydrierung

In einem Rundkolben wurde die zu hydrierende Verbindung in 90 % (v/v) aq. HOAc gelöst (150 mL bei Ansätzen < 500 mg, 300 mL bei Ansätzen > 500 mg und 600 mL bei Ansätzen > 1000 mg). Die Lösung wurde mit zehn Prozent (m/m) Pd/C (10 % (m/m)) versetzt und das Gefäß mithilfe einer Membranpumpe je dreimal evakuiert und mit H_2 -Gas geflutet. Wenn nicht anders beschrieben wurde über Nacht bei RT unter H_2 -Atmosphäre gerührt. Anschließend

wurde filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Die Rohprodukte wurden in der Regel mittels präparativer HPLC gereinigt.

6.13.4. Vorschrift C: Kupplung aktivierter Säurederivate

Abgewandelte Reaktionsführung nach SCHWARZ:¹⁹⁵ eine Suspension der Aminosäure (1 eq.) in DCM wurde im Eisbad gekühlt und unter Rühren binnen 3 - 5 min mit TMSCI (2.2 eq.) versetzt. Unter Eiskühlung wurden binnen 5 min (bei Ansätzen > 200 mg binnen 10 - 15 min) 2.2 eq. DIPEA zugetropft und die Mischung für weitere 5 min bei 0 °C gerührt. Nach Überführung in ein Ölbad wurde der Ansatz für 30 min unter Rückfluss gekocht. Falls danach noch Feststoff enthalten war, wurden bezogen auf die eingesetzte Aminosäure-Menge weitere 0.1 eq. TMSCI und 0.1 eq. DIPEA zugegeben und für 5 min unter Rückfluss gekocht. Der Vorgang wurde gegebenenfalls bis zum Erhalt einer klaren Lösung wiederholt. Dann wurde unter Eiskühlung eine Lösung des aktivierten Säurederivats (1 eq.) in DCM binnen 5 min (bei Ansätzen > 200 mg binnen 20-30 min) hinzugegeben. Danach wurde erneut für 5 min bei 0 °C gerührt und für 30-45 min unter Rückfluss gekocht.

Zur wässrigen Aufarbeitung wurde eine 10 % (m/v) aq. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung verwendet (angesäuert auf PH = 1: 0.25 mL 96 % (m/m) H_2SO_4 je 100 mL Waschlösung). Zunächst wurde das überschüssige TMSCI durch Zugabe von 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung je 100 mL Reaktionslösung inaktiviert und das LM *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in EA aufgenommen, und wässrig-sauer ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung) sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Meist war die Reinheit ausreichend hoch, um die Verbindung ohne zusätzliche Reinigung weiterzuverwenden.

6.13.5. Vorschrift D: Fmoc-SPPS

Viele der in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen wurden mittels Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (Fmoc-SPPS) hergestellt. Dabei wurde ein 2-Chlortritylchlorid Harz (2-CTC, Kapazität 1.6 mmol/g, 200-4000 mesh) oder ein Rink-Amid-Harz (Kapazität 0.74 mmol/g, 100-200 mesh, 1% quervernetzt) verwendet. Bei Ansätzen mit weniger als 500 mg Harz wurde die Synthese in Polypropylen-Spritzen mit eingesetzten PTFE-Filterfritten durchgeführt. Bei Ansätzen mit mehr als 500 mg Harz wurde ein verschließbares, Peptidsynthese-Glasgefäß ausgestattet mit Hahn und Glasfilterfritte verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden während allen Schritten bei RT geschüttelt (VIBRAX VXR BASIC (Ika-Werke GmbH & Co. Kg, Staufen, DE)). Alle Waschschritte wurden mit ca. 1.5 mL DMF oder DCM je 100 mg Harz für etwa 1 min durchgeführt. Die im Folgenden angegebenen Äquivalente beziehen sich auf die Kapazität der eingesetzten Harzmenge.

6.13. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Das Harz wurde im Reaktionsgefäß vorgelegt. Bei 2-CTC-Harzen wurde zur Beladung einer Lösung der Fmoc-Aminosäure (Fmoc-AS, 1.3 eq.) und 4.9 eq. DIPEA in DCM (1 mL je 100 mg Harz) zugegeben und der Ansatz und für 2 h geschüttelt. Dann wurde die Lösung entfernt und das Harz dreimal mit einer *capping*-Lösung (17 : 2 : 1 (v/v/v) DCM, MeOH, DIPEA) für je 2 min inkubiert und vor Beginn des u. g. Synthesesyklus dreimal mit DCM gewaschen.

Synthesesyklus:

- 1.) Fmoc-Abspaltung:** 3 × Waschen mit DMF, 2 × Inkubation mit 20 % (v/v) Piperidin in DMF für 5 min bzw. 15 min, 9 × Waschen mit DMF,
- 2.) Kupplung der nächsten Fmoc-AS:** Inkubation mit einer Lösung der jeweiligen Fmoc-AS, HATU und DIPEA für mindestens 2 h. Bei kommerziell erworbenen Bausteinen wurden je 3 eq. Fmoc-AS, HATU und 6 eq. DIPEA verwendet. Bei selbst synthetisierten Bausteinen wurden die Menge aller Reagenzien halbiert und die Kupplungszeiten verdoppelt.

Wenn Fmoc-Rink-Amid Harze verwendet wurden, erfolgte die Beladung nach initialer Fmoc-Abspaltung analog zum Schritt 2 mithilfe des Kupplungsreagenzes HATU. Danach wurde der soeben beschriebene Synthese-Zyklus beginnend ab Schritt 1 analog zur Synthese mittels 2-CTC Harz durchgeführt.

Nach Kupplung der letzten Fmoc-AS wurde neunmal mit DMF und dreimal mit DCM gewaschen. Danach wurde bei 2-CTC-Harzen mindestens dreimal für je 30 min mit einer 5 % (v/v) TFA-Lösung in DCM (bei Peptiden mit säurelabilen Schutzgruppen nur mit 1 % (v/v) TFA in DCM) abgespalten, bis das Harz eine tiefrote bzw. schwarze Farbe angenommen hatte. In Gegenwart säurelabiler Schutzgruppen wurde die im Eluat enthaltene TFA nach jedem Abspaltungsschritt mit DIPEA neutralisiert. Zuletzt wurde DCM LM *in vacuo* entfernt. Bei Rink-Amid Harzen erfolgte die Abspaltung bei gleicher Vorgehensweise mit einer Lösung aus 95 : 2.5 : 2.5 (v/v/v) TFA, Wasser und Triisopropylsilan. Bei in DCM schwerlöslichen Produkten sowie bei ungewöhnlich geringen Ausbeuten wurde das Harz nach der Abspaltung zusätzlich dreimal mit DMF gewaschen und die vereinigten Eluate *in vacuo* getrocknet. Die Rückstände wurden gemäß der jeweiligen Versuchsvorschrift weiterbearbeitet.

Kupplungen an aromatische Amine erfolgten immer mit doppelter Reaktionszeit. Bei Peptiden mit terminaler Fmoc-Schutzgruppe wurde diese vor der Harzabspaltung gemäß Schritt 1 des Synthesesyklus entfernt.

6.13.6. Vorschrift E: Zyklisierung

Das lineare Intermediat (1 eq.) wurde in DMF (1 mL pro mg Substanz) gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Wenn nicht anders angegeben, wurden bei einstufigen Zyklisierungen eine Lösung aus DIPEA in 5 mL DMF (2.6 eq. je 1 eq. Edukt plus 1 eq. für jede protonierte tertiäre Aminogruppe) sowie eine Lösung aus 1.3 eq. HATU in 5 mL DMF in zwei separaten Gefäßen vorbereitet. Bei zweistufigen Zyklisierungen wurde die DIPEA-Lösung zusätzlich mit der als Linker verwendeten *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäure versetzt. Mit einer Mikro-Pipette wurden beide Lösungen unter Eiskühlung binnen 30 min in je zehn gleichgroßen Portionen zum Hauptansatz gegeben. Dann wurde für 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer HPLC kontrolliert. Bei unvollständigem Umsatz wurden je 0.1 eq HATU und 0.2 eq. DIPEA nachdosiert und der Ansatz erneut für 2 h bei RT gerührt. Der Vorgang wurde wiederholt, bis in der HPLC kein Edukt mehr nachweisbar war. Dann wurde das LM *in vacuo* entfernt.

6.13.7. Vorschrift F: Abspaltung von Tfa-Gruppen

Die Tfa-geschützte Verbindung wurde in 1,4-Dioxan suspendiert und mit einer 1 M aq. NaOH-Lsg. versetzt (je. 2 mL pro mmol Edukt; Verhältnis NaOH-Lsg. zu organischem LM: 1 : 4, d. h. ca. 0.25 M NaOH). Bei guter Löslichkeit wurde die erhaltene klare Lösung für 1 h bei RT gerührt. Bei schwerlöslichen Verbindungen wurden in 1 mL-Portionen zusätzliche LM (THF, Aceton und/oder DMSO, siehe Versuchsvorschrift) sowie NaOH-Lösung zugegeben und das Mischungsverhältnis unter Behandlung mit Ultraschall bei 30 °C solange variiert, bis der suspendierte Feststoff weitestgehend gelöst war. Dann wurde unter Ultraschall-Einwirkung bei 30 °C bis zum Erhalt einer klaren Lösung inkubiert (i. d. R. 60 min). Zur Entfernung des NaOH-Überschusses wurde der Ansatz mit einer 10 % (v/v) aq. TFA-Lsg. angesäuert und das LM *in vacuo* entfernt.

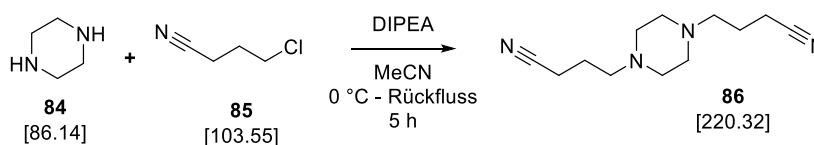
6.14. Makrozyklische substrat analoge Inhibitoren (Teil A)

6.14.1. Linker-Segmente

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Linkersegmente und Vorstufen wurden zur Synthese der makrozyklischen substrat analogen Inhibitoren verwendet.

4,4'-(Piperazin-1,4-diyl)dibutyronitril (**86**)¹⁹³

4,4'-(piperazine-1,4-diyl)dibutanenitrile



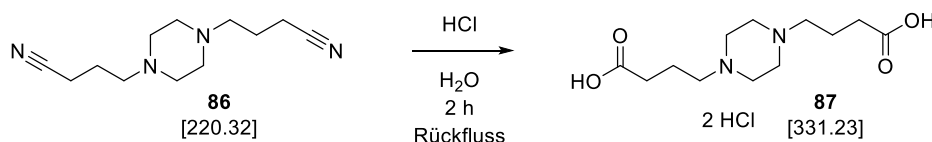
Piperazin (**84**, 10 g, 116 mmol, 1 eq.) wurde in 30 mL MeCN suspendiert und mit DIPEA (20 mL, 116 mmol, 2 eq.) versetzt. Die Mischung wurde in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus 4-Chlorbutyronitril (**85**, 26.4 g, 255 mmol, 2.2 eq.) in weiteren 20 mL MeCN binnen 30 min zugetropft. Danach wurde für 10 min bei 0 °C gerührt, bevor die Mischung in einem Ölbad langsam zum Sieden gebracht und für 4.5 h unter Rückfluss gekocht wurde. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in einer Mischung aus Chloroform und Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Chloroform extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet. Nach der Filtration wurde das LM *in vacuo* entfernt und der Rückstand aus EA umkristallisiert. Das Produkt wurde als beige-rosa Feststoff (FS) erhalten. **Ausbeute:** 9.81 g, 44.5 mmol 38 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 220.17, m/z: 221.13 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 2.46 (t, ³J = 7.1 Hz, 4H), 2.36 (bs, 8H), 2.32 (t, ³J = 6.9 Hz, 4H), 1.70 (p, ³J = 7.0 Hz, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 120.61, 55.98, 52.58, 22.12, 14.10.

HO-But-Piz-But-OH × 2 HCl (**87**)¹⁹³

4,4'-(piperazine-1,4-diyl)dibutyric acid



Das Dinitril-Derivat **86** (7 g, 31.8 mmol, 1 eq.) wurde in 32 mL 32 % (w/v) aq. HCl-Lsg. suspendiert und unter Rühren für 2.5 h unter Rückfluss gekocht. Danach wurde die erhaltene gelbe Lösung über Nacht bei RT zur Kristallisation stehen gelassen. Nach Filtration wurde der Rückstand (RS) mit 32 % (w/v) aq. HCl-Lsg. gewaschen, in Wasser gelöst und lyophilisiert.

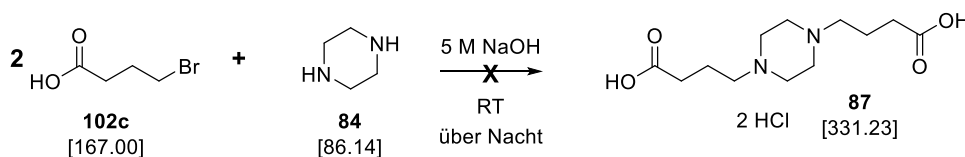
6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.1. Linker-Segmente

Ausbeute: 10.3 g als bräunlicher FS, 31.1 mmol, 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 258.16, m/z: 259.15 [M+H]⁺

Dünnschichtchromatographie: EA, Wasser, Essigsäure, Butan-1-ol 1:1:1:1 (v/v/v/v):
R_f = 0.26.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.13 (bs, 2H), 3.70 (bs, 4H), 3.47 (bs, 4H), 3.13 (bs, 4H), 2.35 (t, ³J = 7.3 Hz, 4H), 1.92 (p, ³J = 7.4 Hz, 4H).

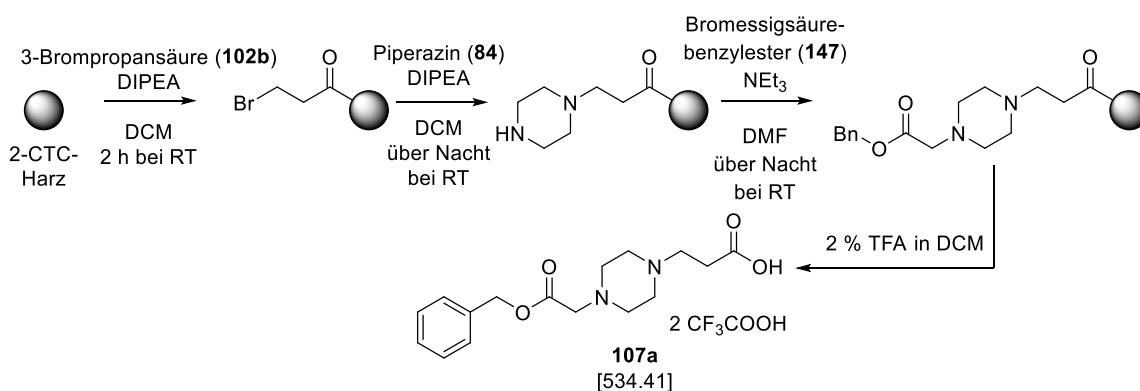
Erfolgreiche Syntheseveruche:



Piperazin (**84**, 500 mg, 5.8 mmol, 1 eq.) wurde in 5 mL einer 5 M aq. NaOH-Lsg. suspendiert und in mehreren Portionen binnen 20 min mit 4-Brombutansäure (**102c**, 1937 mg, 11.6 mmol, 2 eq.) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde mittels konz. aq. HCl-Lösung ein pH-Wert von 2 eingestellt. Der angesäuerte Ansatz wurde zur Kristallisation über Nacht bei –18 °C stehen gelassen. Dabei fiel kein Feststoff aus. Mittels Massenspektrometrie konnte in der Reaktionslösung kein Produkt nachgewiesen werden, weshalb der Ansatz verworfen wurde. Die Reaktion wurde zweimal erfolglos wiederholt.

BnO-Ac-Piz-Prop-OH × 2 TFA (107a)

3-(4-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)propanoic acid



In dem folgenden Protokoll sind die angegebenen Äquivalente und die Ausbeute auf die eingesetzte Harzmenge bezogen. Bei allen Schritten wurde geschüttelt. Waschschrte wurden für jeweils 1 min durchgeführt. In einem 100 mL Reaktionsgefäß mit Glasfilterfritte wurden 5 g 2-CTC-Harz (Kapazität 1.6 mmol/g, absolut 8 mmol) vorgelegt, mit einer Lösung aus 3-Brompropansäure (**102b**, 12.2 g, 80 mmol, 10 eq.) sowie DIPEA (27.9 mL, 160 mmol, 20 eq.) in 60 mL DCM versetzt und für 2 h bei RT geschüttelt. Dann wurde je dreimal für 2 min mit *capping*-Lösung (DCM, MeOH, DIPEA 17:2:1 (v/v/v)) behandelt. Nach dreimaligem

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.1. Linker-Segmente

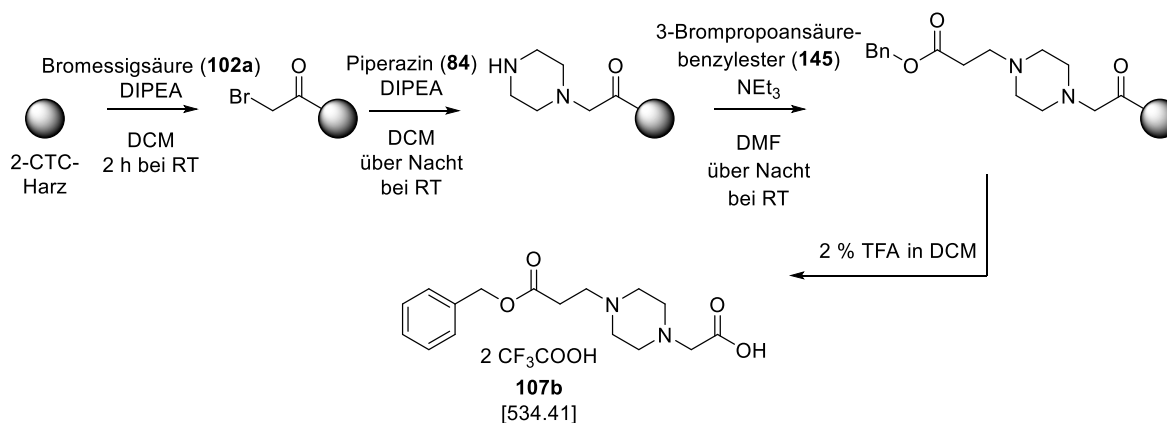
Waschen mit DCM wurde eine Lösung aus Piperazin (**84**, 6.9 g, 80 mmol, 10 eq.) und DIPEA (27.9 mL, 160 mmol, 20 eq.) in 60 mL DCM zugegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Erneut wurde je dreimal mit DCM und DMF gewaschen, bevor eine Lösung aus 2-Bromessigsäurebenzylester (**147**, 4.58 g, 20 mmol, 2.5 eq., kommerziell erworben) und Triethylamin (NEt₃, 5.6 mL, 40 mmol, 5 eq.) in 60 mL DMF hinzugegeben wurde. Nach Schütteln über Nacht wurde je dreimal mit DMF und DCM gewaschen. Das Produkt wurde durch dreimalige Inkubation mit 2 % (v/v) TFA in DCM für je 30 min vom Harz abgespalten. Um das möglicherweise schwerlösliche Produkt vollständig zu lösen, wurde das Harz noch dreimal mit DMF gewaschen. Nach Trocknung aller Eluate *in vacuo* wurde das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 1.971 g als farbloses Lyophilisat, 3.7 mmol, 46 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 17.1 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 306.16, m/z: 307.14 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.42 - 7.31 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 3.53 (s, 2H), 3.30 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, überlappt mit bs bei 3.26 (4H)), 2.89 (bs, 4H), 2.73 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.45, 169.30, 158.29 (q, ²J_{C-F} = 35.7 Hz), 135.83, 128.45, 128.14, 128.05, 115.86 (pd, J = 292.7 Hz), 65.67, 56.60, 51.28, 51.04, 48.43, 28.63.

BnO-Prop-Piz-Ac-OH × 2 TFA (107b)

2-(4-(3-(benzyloxy)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetic acid



Die Verbindung wurde analog zur Verbindung **107a** unter Verwendung von 5 g 2-CTC- Harz (Kapazität 1.6 mmol/g, 8 mmol absolut) mit 2-Bromessigsäure (**102a**, 11.1 g, 80 mmol, 10 eq.) und DIPEA (27.9 mL, 160 mmol, 20 eq.) in 60 mL DCM (für Teilschritt 1), Piperazin (**84**, 6.9 g, 80 mmol, 10 eq.) und DIPEA (27.9 mL, 160 mmol, 20 eq.) in 60 mL DCM (für Teilschritt 2) sowie 3-Brompropionsäurebenzylester (**145**, 4.9 g, 20 mmol, 2.5 eq.) und NEt₃ (5.6 mL, 40 mmol, 5 eq.) in 60 mL DMF (für Teilschritt 3) hergestellt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 935 mg, 1.75 mmol, 22 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 14.2 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 306.16, m/z: 307.18 [M+H]⁺.

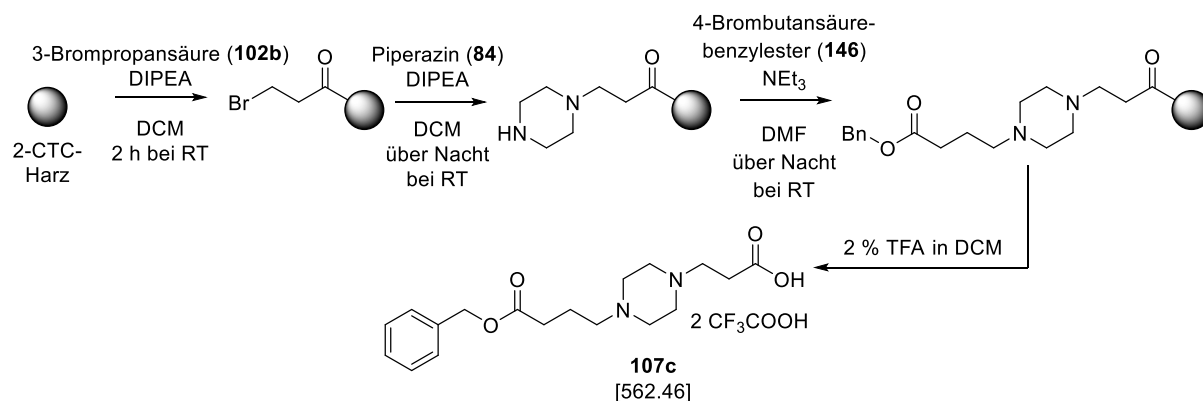
6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.1. Linker-Segmente

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.42 - 7.32 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.36 - 3.16 (m, 6H), 3.05 (bs, 4H), 2.86 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.06, 169.84, 158.34 (q, ²J_{C-F} = 35.4 Hz), 135.76, 128.44, 128.16, 128.0, 115.92 (pd, ¹J_{C-F} = 292.9 Hz), 66.05, 56.13, 51.05, 50.25, 48.84, 28.99.

BnO-But-Piz-Prop-OH × 2 TFA (107c)

3-(4-(4-(benzyloxy)-4-oxobutyl)piperazin-1-yl)propanoic acid



Die Verbindung wurde analog zur Verbindung **107a** unter Verwendung von 3 g 2-CTC- Harz (Kapazität 1.6 mmol/g, 4.8 mmol absolut) mit 3-Brompropansäure (**102b**, 7.3 g, 48 mmol, 10 eq.) und DIPEA (16.7 mL, 96 mmol, 20 eq.) in 40 mL DCM (für Teilschritt 1), Piperazin (**84**, 4.1 g, 48 mmol, 10 eq.) und DIPEA (16.7 mL, 96 mmol, 20 eq.) in 40 mL DCM (für Teilschritt 2) sowie 4-Brombutansäurebenzyloxyester (**146**, 6.2 g, 24 mmol, 5 eq.) und NEt₃ (6.7 mL, 48 mmol, 10 eq.) in 40 mL DMF (für Teilschritt 3) hergestellt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 689 mg, 1.23 mmol, 26 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 15.5 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 334.19, m/z: 335.32 [M+H]⁺.

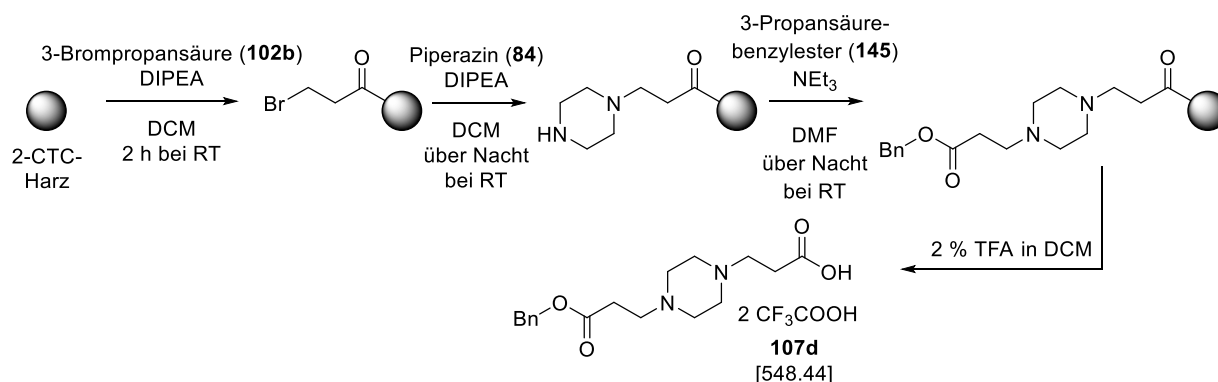
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.46 - 7.26 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.06 (bm, 12H), 2.61 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 2.46 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H), 1.87 (p, ³J = 7.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 159.08, 158.74, 136.61, 129.00, 128.63, 128.55, 79.48, 66.17, 49.77, 44.36, 43.41, 31.01, 22.00.

6.14. Makrozyklische substrat analoge Inhibitoren (Teil A)
6.14.1. Linker-Segmente

BnO-Prop-Piz-Prop-OH × 2 TFA (107d)

3-(4-(3-(benzyloxy)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)propanoic acid

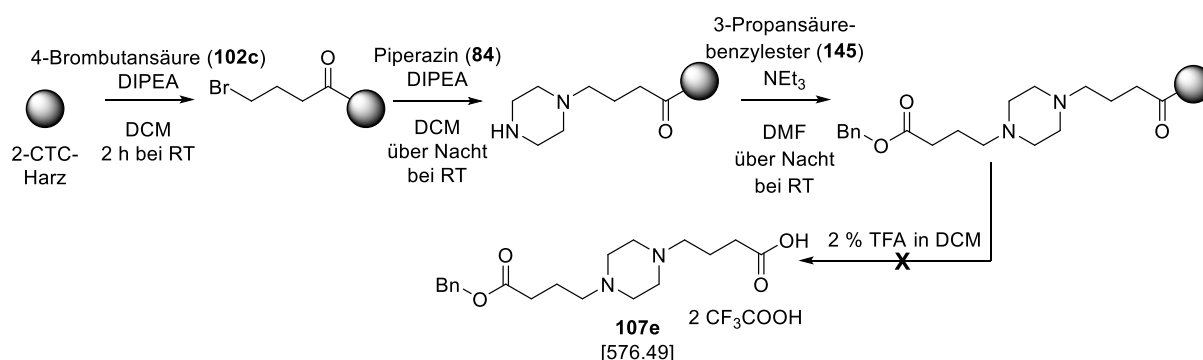


Die Verbindung wurde analog zur Verbindung **107a** unter Verwendung von 3 g 2-CTC-Harz (Kapazität 1.6 mmol/g, 4.8 mmol absolut), 3-Brompropansäure (7.3 g, 48 mmol, 10 eq.) und DIPEA (16.7 mL, 96 mmol, 20 eq.) in 40 mL DCM (für Teilschritt 1), Piperazin (**84**, 4.1 g, 48 mmol, 10 eq.) und DIPEA (16.7 mL, 96 mmol, 20 eq.) in 40 mL DCM (für Teilschritt 2) sowie 3-Propansäurebenzylester (**145**, 5.8 g, 24 mmol, 5 eq.) und NEt₃ (6.7 mL, 48 mmol, 10 eq.) in 40 mL DMF (für Teilschritt 3) hergestellt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 563 mg, 1.01 mmol, 21 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 14.68 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 320.17, m/z: 321.26 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 7.41 - 7.32 (m, 5H), 5.13 (s, 2H), 3.22 - 3.01 (m, 12H), 2.76 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 2.66 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H).

BnO-But-Piz-But-OH × 2 TFA (107e)

4-(4-(4-(benzyloxy)-4-oxobutyl)piperazin-1-yl)butanoic acid



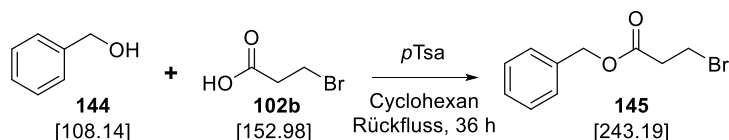
Die Synthese wurde analog zur Verbindung **107a** unter Verwendung von 3 g 2-CTC-Harz (Kapazität 1.6 mmol/g 4.8 mmol absolut) mit 4-Brombutansäure (8.0 g, 48 mmol, 10 eq.) und DIPEA (16.7 mL, 96 mmol, 20 eq.) in 40 mL DCM (für Teilschritt 1), Piperazin (**84**, 4.1 g, 48 mmol, 10 eq.) und DIPEA (16.7 mL, 96 mmol, 20 eq.) in 40 mL DCM (für Teilschritt 2) sowie 4-Brombutansäurebenzylester (**146**, 6.2 g, 24 mmol, 5 eq.) und NEt₃ (6.7 mL, 48 mmol,

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.1. Linker-Segmente

10 eq.) in 40 mL DMF (für Teilschritt 3) durchgeführt. Nach der Abspaltung vom Harz konnte mittels Massenspektrometrie kein Produkt nachgewiesen werden und der Ansatz wurde verworfen. Die Synthese wurde mehrmals erfolglos wiederholt.

3-Brompropansäurebenzylester (145)

benzyl 3-bromopropanoate

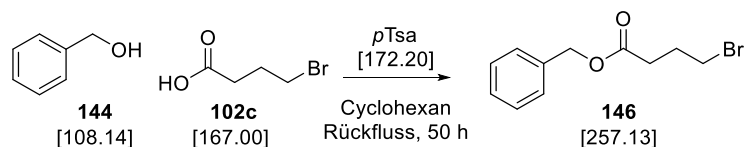


Benzylalkohol, (**144**, 5.9 g, 54.3 mmol, 1 eq.), 3-Brompropansäure (**102b**, 8.300 g, 54.3 mmol, 1 eq.) und p-Toluolsulfonsäure (pTSA, 9 mg, 0.053 mmol, 0.001 eq.) wurden in 250 mL Cy gelöst und 36 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und sowohl wässrig-sauer, wässrig-basisch und wässrig-neutral aufgearbeitet. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt als farblose, stark süßlich riechende Flüssigkeit erhalten. **Ausbeute:** 8.935 g, 36.75 mmol, 68 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 24.3 min, Reinheit: > 93 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 241.99, m/z: 242.89 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.61 - 7.04 (m, 5H), 5.15 (s, 2H), 3.67 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H), 3.03 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H).

4-Brombutansäurebenzylester (146)

benzyl 4-bromobutanoate



Benzylalkohol, (**144**, 5.9 g, 54.3 mmol, 1 eq.), 4-Brombutansäure (**102c**, 9.0 g, 54.3 mmol, 1 eq.) und p-Toluolsulfonsäure (pTSA, 100 mg, 0.54 mmol, 0.1 eq.) wurden in 250 mL Cy gelöst und 50 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Die Lösung wurde *in vacuo* konzentriert und mittels präparativer MPLC gereinigt (40 g Silicagel, Cy/EA, Start bei 0 % EA). Das Produkt wurde als farblose, stark süßlich riechende Flüssigkeit erhalten. **Ausbeute:** 6.870 g, 26.7 mmol, 49 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 24.3 min, Reinheit: > 93 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 256.01, m/z: 257.07 [M+H]⁺.

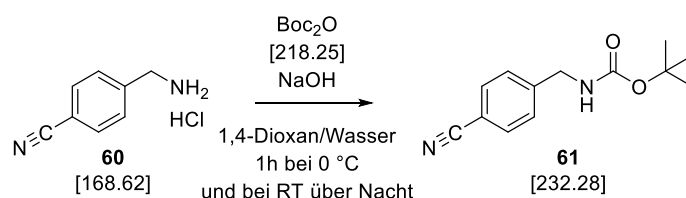
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.42 - 7.27 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 3.54 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H), 2.51 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 2.07 (p, ³J = 6.7 Hz, 2H)

6.14.2. Inhibitoren I1-I3

In diesem Abschnitt werden die Synthesen der Inhibitoren **I1** - **I3** gezeigt, die symmetrische *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linkersegmente enthalten.

Boc-4-cyanobenzylamin (**61**)

tert-butyl (4-cyanobenzyl)carbamate



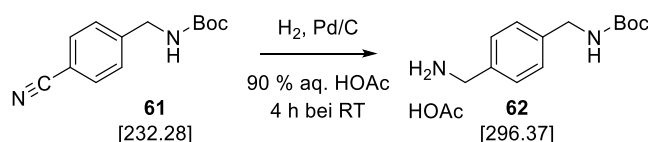
4-Cyanobenzylamin \times HCl (**60**, 10.0 g, 59.3 mmol, 1 eq.) wurde in einer Mischung aus 118 mL 1,4-Dioxan und 59 mL 2 M aq. NaOH-Lsg. (4.7 g NaOH, 118 mmol, 2 eq.) gelöst. Unter Eiskühlung wurde Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O , 14.2 g, 65.2 mmol, 1.1 eq.) in zwei Portionen binnen 10 min zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der erhaltene Rückstand in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO_4 -Lsg. gelöst und wässrig-sauer sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach der Entfernung des LM wurde das Produkt **61** als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 13.08 g, 56.3 mmol, 95 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 28.8 min, Reinheit > 98 %. **MS (ESI, positiv):** *ber.:* 232.12; *m/z:* 233.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.79 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.49 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H), 7.42 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 4.20 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 2H), 1.39 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 155.78, 146.07, 132.18, 127.67, 118.85, 109.41, 78.05, 43.13, 28.16.

Boc-p-Xda \times HOAc (**62**)

tert-butyl (4-(aminomethyl)benzyl)carbamate



Boc-4-cyanobenzylamin (**61**, 13.0 g, 56.3 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Nach der Entfernung des LM wurde das Rohprodukt in wenig MeOH gelöst, mit DEE gefällt, dreimal mit DEE gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Das Produkt **62** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 12.97 g, 43.8 mmol, 78 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 17.7 min, Reinheit > 96 %. **MS (ESI, positiv):** *ber.:* 236.15; *m/z:* 237.01 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)

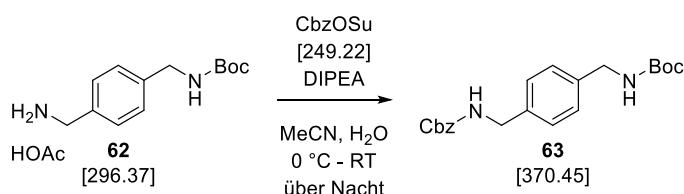
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.33 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.28 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 7.18 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 5.76 (bs, 3H), 4.09 (d, ³J = 6.1 Hz, 2H), 3.74 (s, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.39 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 179.94, 155.78, 139.82, 138.69, 127.43 (2C), 126.81 (2C), 77.74, 44.32, 43.14, 28.27(3C), 22.34 ppm.

Boc-p-Xda-Cbz (63)

tert-butyl (4-(aminomethyl)benzyl)carbamate



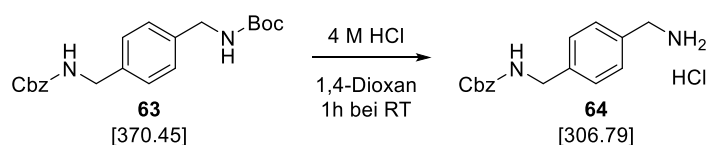
Boc-*p*-Xda × HOAc (**62**, 5.0 g, 16.8 mmol, 1 eq.) wurde in 170 mL einer 7 : 3 (v/v) Mischung aus MeCN und Wasser suspendiert, mit DIPEA (5.9 mL, 33.6 mmol, 2 eq.) versetzt und im Eisbad gekühlt. In 6 gleichen Portionen wurde binnen 25 min eine Lösung aus CbzOSu (4.0 g, 15.96 mmol, 0.95 eq.) in 6 mL MeCN hinzugegeben. Dabei wurde eine hochviskose Suspension erhalten und es musste mehrmals Lösungsmittel nachdosiert werden, um eine ausreichende Durchmischung des Ansatzes zu ermöglichen. Die Mischung wurde über Nacht bei 0 °C - RT gerührt und der pH-Wert innerhalb der ersten 5 h durch Zugabe von insgesamt 1 mL DIPEA zwischen 8 und 9 gehalten. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der RS in einer Mischung aus ca. 2.5 L EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach der Entfernung des LM wurde das Produkt als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 5.72 g, 15.4 mmol, 96 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 31.7 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** *ber.:* 370.19; m/z: 371.24 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.77 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 7.37 - 7.30 (m, 6H), 7.21 - 7.14 (m, 4H), 5.04 (s, 2H), 4.17 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H), 4.09 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 156.36, 155.78, 138.75, 138.10, 137.20, 128.38, 127.81, 127.78, 126.97, 126.89, 77.76, 65.37, 43.59, 43.12, 28.27.

Cbz-p-Xda × HCl (64)

benzyl (4-(aminomethyl)benzyl)carbamate



Die Boc-Gruppe der Verbindung **63** (5.7 g, 15.4 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A unter Verwendung von 45 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan abgespalten. Nach der Fällung mit DEE wurde das Präzipitat dreimal mit DEE gewaschen und nach Trocknung *in*

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

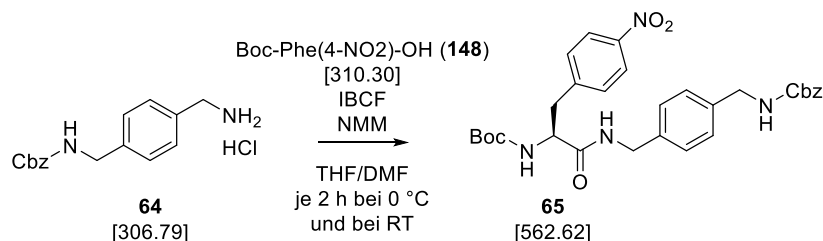
vacuo als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 4.52 g, 14.7 mmol, 95 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 22.3 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** *ber.:* 270.33; *m/z:* 271.22 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.45 (s, 3H), 7.86 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 7.43 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.40 - 7.28 (m, 5H), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.20 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H), 3.97 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 156.32, 140.07, 137.13, 132.50, 128.90, 128.32, 127.77, 127.70, 127.10, 65.36, 43.48, 41.86.

Boc-Phe(4-NO₂)-*p*-Xda-Cbz (65)

benzyl (S)-4-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-nitrophenyl)propanamido)methyl)benzyl)carbamate



Cbz-*p*-Xda × HCl (**64**, 2.0 g, 6.5 mmol, 1 eq.), Boc-Phe(4-NO₂)-OH (**148**, 2.0 g, 6.5 mmol, 1 eq.) und *N*-Methylmorpholin (NMM, 1.95 mL, 17.6 mmol, 2.7 eq.) wurden in 27 mL einer 4 : 1 (v/v) Mischung aus THF und DMF suspendiert und in einem Eisbad gekühlt. Unter starkem Rühren wurde Chlorameisensäureisobutylester (IBCF, 0.8 g, 6.7 mmol, 1 eq.) in zehn gleichen Portionen binnen 90 min zugegeben. Die Mischung wurde für 30 min bei 0 °C und für 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der RS in einer Mischung aus ca. 2.5 L EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach der Entfernung des LM wurde das Produkt als blassoranger FS erhalten. Zur Charakterisierung wurde eine kleine Probe mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 3.40 g, 6.0 mmol, 93 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 55.5 min, Reinheit: > 78 %. **MS (ESI, positiv):** *ber.:* 562.24; *m/z:* 563.39 [M+H]⁺.

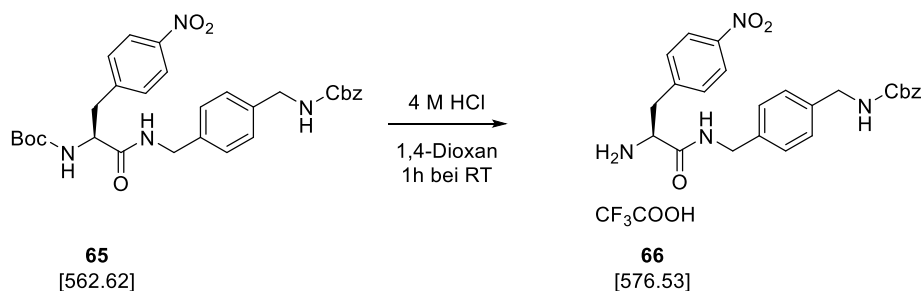
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.42 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.14 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H), 7.53 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.43 - 7.27 (m, 5H), 7.21 - 7.12 (m, 4H), 7.06 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.30 - 4.22 (m, 3H), 4.17 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H), 3.10 (dd, ²J = 13.2 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H), 2.92 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 10.5 Hz, 1H), 1.29 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.08, 156.35, 155.29, 146.73, 146.17, 138.28, 137.75, 137.20, 130.60, 128.36, 127.80, 127.76, 127.11, 126.94, 123.14, 78.13, 65.36, 55.45, 43.57, 41.87, 37.34, 28.08.

6.14. Makrozyklische substratanalogue Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

H-Phe(4-NO₂)-p-Xda-Cbz × Tfa (66)

benzyl (S)-4-((2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanamido)methyl)benzyl)carbamate



Die Boc-Gruppe der Verbindung **65** (3.650 g, 6.5 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A unter Verwendung von 33 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan abgespalten und das Produkt nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten.

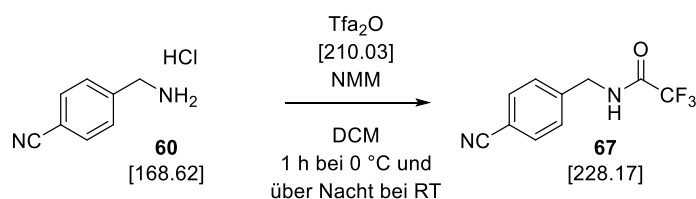
Ausbeute: 3.003 g, 5.2 mmol, 80 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 13.7 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 462.51; m/z: 463.16 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.84 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.31 (s, 3H), 8.17 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.79 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 7.48 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.41 - 7.22 (m, 5H), 7.16 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 7.09 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.33 - 4.19 (m, 2H), 4.17 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H), 4.08 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H), 3.25 - 3.08 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 167.37, 156.35, 146.81, 143.08, 138.75, 137.18, 136.60, 130.95, 128.38, 127.83, 127.77, 127.54, 126.97, 123.59, 65.38, 53.21, 43.52, 42.13, 36.76.

Tfa-4-cyanobenzylamin (67)¹⁸³

N-(4-cyanobenzyl)-2,2,2-trifluoroacetamide



4-Cyanobenzylamin × HCl (**60**, 5.06 g, 30 mmol, 1 eq.) und NMM (3.7 mL, 33 mmol, 1.1 eq.) wurden in 50 mL DCM gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Dann wurde unter Rühren binnen 20 min eine Lösung aus Trifluoressigsäureanhydrid (Tfa₂O, 6.3 g, 30 mmol, 1 eq.) in 50 mL DCM zugetropft. Nach den ersten 30 min wurde eine weitere Dosis NMM (3.3 mL, 30 mmol, 1 eq.) langsam zugetropft, um den pH-Wert zwischen 8 und 9 zu halten. Die Lösung wurde über Nacht bei 0 °C - RT gerührt und das LM *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach der Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Produkt als bräunlicher FS erhalten. **Ausbeute:** 6.81 g, 29.9 mmol, 99 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 31.24 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 228.05, m/z: 229.02 [M+H]⁺.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)

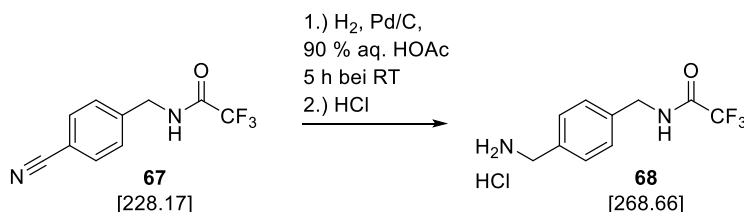
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.07 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H), 7.83 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.47 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 4.48 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 143.12, 132.45, 128.14, 118.66, 117.33, 114.47, 110.13, 42.27.

Tfa-p-Xda × HCl (**68**)¹⁸³

N-(4-(aminomethyl)benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamide



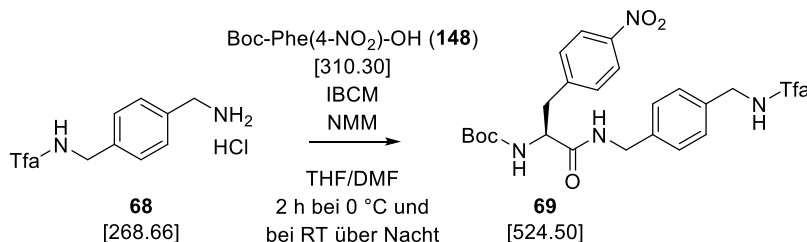
N-Tfa-4-cyanobenzylamin (**67**, 6.8 g, 30 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B für 5 h hydriert. Nach der Entfernung des LM wurde das Rohprodukt in wenig MeOH gelöst und mit DEE gefällt. Das Präzipitat wurde in 20 mL aq. 1 M HCl-Lsg. gelöst und *in vacuo* getrocknet. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt und das Produkt nach Lyophilisierung mit Wasser als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 6.51 g, 24.3 mmol, 80 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 11.81 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 232.08, m/z: 233.05 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.45 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.30 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.94 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 156.49 (q, ²J_{C-F} = 36.3 Hz), 137.96, 133.20, 129.30, 127.67, 116.11 (pd, ¹J_{C-F} = 288.4 Hz), 42.36, 41.96.

Boc-Phe(4-NO₂)-p-Xda-Tfa (**69**)¹⁸³

tert-butyl (S)-(3-(4-nitrophenyl)-1-oxo-1-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propan-2-yl)carbamate



Eine Suspension aus Tfa-p-Xda × HCl (**68**, 3.0 g, 11.2 mmol, 1 eq.), Boc-Phe(4-NO₂)-OH (**148**, 3.48 g, 11.2 mmol, 1 eq.) und NMM (2.9 mL, 25.7 mmol, 2.3 eq.) in 70 mL einer 6 : 1 (v/v) Mischung aus DCM und THF wurde in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus IBCF (1.3 g, 10.6 mmol, 0.95 eq.) in 5 mL DCM binnen 90 min in 10 gleichen Portionen zugegeben. Es wurde für weitere 30 min bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt und das LM *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus EA und ges. aq. NaHCO₃-Lsg.

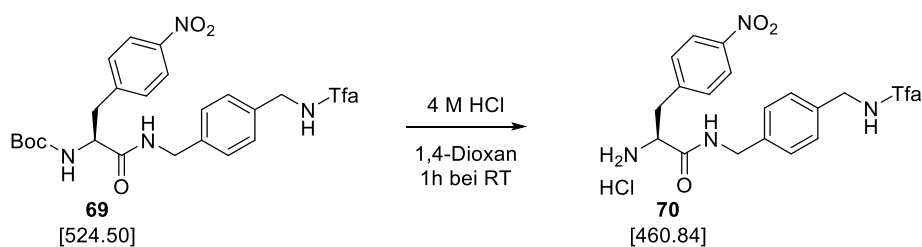
6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)

6.14.2. Inhibitoren I1-I3

gelöst und wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach der Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Produkt als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 5.34 g, 10.2 mmol, 96 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 40 % B, 17.7 min, Reinheit > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 524.19, m/z: 525.26 [M+H]⁺.

H-Phe(4-NO₂)-p-Xda-Tfa × HCl (70)¹⁸³

(S)-2-amino-3-(4-nitrophenyl)-N-(4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)propanamide



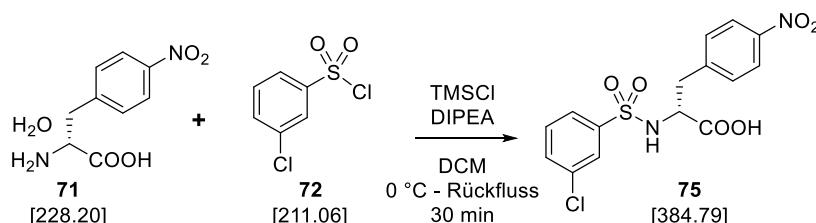
Die Boc-Gruppe der Verbindung **69** (5.25 g, 10.0 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A unter Verwendung von 10 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan abgespalten. Nach dem Fällen mit DEE wurde das Präzipitat dreimal mit DEE gewaschen und das Produkt als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 4.14 g, 9.0 mmol, 90 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 15.4 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 424.14, m/z: 425.08 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.01 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 9.06 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.44 (s, 3H), 8.15 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.52 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.18 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.12 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 4.34 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.28 (dd, ²J = 15.0, ³J = 6.0 Hz, 1H), 4.21 (dd, ²J = 15.0, ³J = 5.5 Hz, 1H), 4.13 (t, ³J = 7.0 Hz, 1H), 3.22 (d, ³J = 7.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 167.33, 156.29 (pd, ²J_{C-F} = 36.1 Hz), 146.75, 143.13, 137.25, 136.35, 130.95, 127.63, 127.29, 123.45, 53.12, 42.28, 41.98, 36.58.

3-Cl-Phs-DPhe(4-NO₂)-OH (75)

(R)-2-((3-chlorophenyl)sulfonamido)-3-(4-nitrophenyl)propanoic acid



Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C wurde D-4-Nitrophenylalanin × H₂O (H-DPhe(4-NO₂)-OH × H₂O, **71**, 400 mg, 1.75 mmol, 1 eq.) unter Verwendung von TMSCl (665 mg, 6.1 mmol, 3.5 eq.), DIPEA (1070 µL, 6.1 mmol, 3.5 eq.) und 3 mL DCM mit 3-Chlorphenylsulfonsäurechlorid (3-Cl-PhsCl, **72**, 369 mg, 1.75 mmol, 1 eq., gelöst in weiteren

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

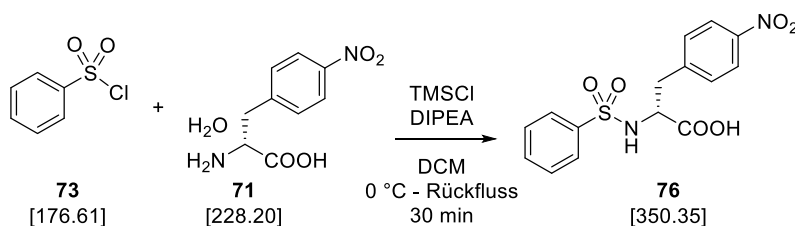
2 mL DCM) umgesetzt. Nach wässriger-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silicagel, DCM/MeOH/Ameisensäure, 100 : 5 : 1 (v/v/v) gereinigt. Das Produkt wurde als beiger FS erhalten. Zur Charakterisierung wurde eine kleine Probe zusätzlich mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 545 mg, 1.4 mmol, 81 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 21.1 min, Reinheit: > 89 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 384.02, m/z: 385.01 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.55 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H), 7.96 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.54 - 7.46 (m, 2H), 7.44 - 7.37 (m, 3H), 7.35 (t, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 4.17 - 3.89 (m, 1H), 3.15 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 4.2 Hz, 1H), 2.82 (dd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 10.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.98, 146.24, 145.08, 143.01, 133.43, 131.80, 130.75, 130.53, 125.55, 124.73, 122.99, 57.00, 37.15.

Phs-DPhe(4-NO₂)-OH (76)

(R)-3-(4-nitrophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanoic acid



Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C wurde D-4-Nitrophenylalanin × H₂O (H-DPhe(4-NO₂)-OH × H₂O, **71**, 1.0 g, 4.4 mmol, 1 eq.) unter Verwendung von TMSCl (1.5 g, 14 mmol, 3.2 eq.) DIPEA (2.45 mL, 14 mmol, 3.2 eq.) und 11 mL DCM mit Phenylsulfonsäurechlorid (PhsCl, **73**, 777 mg, 4.4 mmol, 1 eq., gelöst in weiteren 4 mL DCM) umgesetzt. Nach wässriger-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Produkt wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 848 mg, 2.4 mmol, 55 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 15.4 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 350.06, m/z: 351.24 [M+H]⁺.

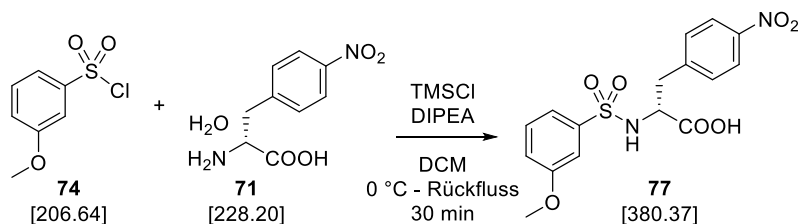
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.91 (s, 1H), 8.34 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H), 7.97 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 7.53 - 7.33 (m, 7H), 3.98 (td, ³J = 9.7, 4.7 Hz, 1H), 3.12 (dd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H), 2.83 (dd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 10.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.93, 146.25, 145.10, 141.06, 131.81, 130.50, 128.66, 126.02, 123.05, 56.89, 37.27.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

3-MeO-Phs-DPhe(4-NO₂)-OH (77)

(R)-2-((3-methoxyphenyl)sulfonamido)-3-(4-nitrophenyl)propanoic acid



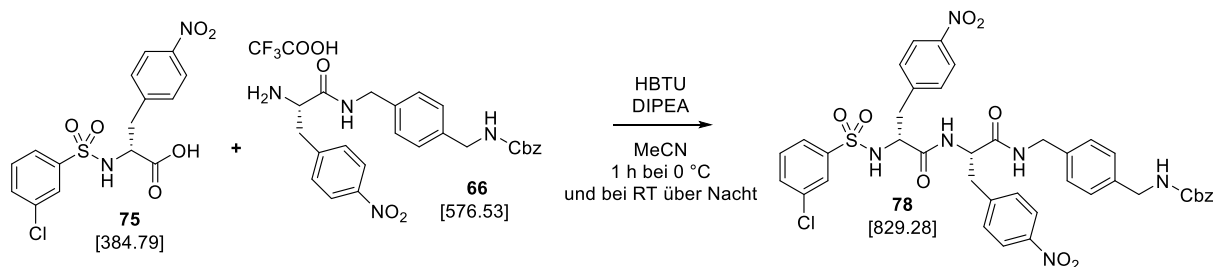
Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C wurde D-4-Nitrophenylalanin \times H₂O (H-DPhe(4-NO₂)-OH \times H₂O, **71**, 593 mg, 2.6 mmol, 1 eq.) unter Verwendung von TMSCl (903 mg, 8.3 mmol, 3.2 eq.) DIPEA (1.45 mL, 8.3 mmol, 3.2 eq.) und 6.5 mL DCM mit 3-Methoxy-phenylsulfonsäurechlorid (3-MeO-PhsCl, **74**, 593 mg, 2.6 mmol, 1 eq., gelöst in weiteren 2 mL DCM) umgesetzt. Nach wässriger-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silicagel, DCM/MeOH/Ameisensäure, 100 : 3 : 1 (v/v/v)) gereinigt. Das Produkt wurde als bräunlicher FS erhalten. **Ausbeute**: 965 mg, 2.5 mmol, 98 %. **HPLC**: Methode B, Start bei 30 % B, 18.10 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv)**: ber.: 380.07, m/z: 381.13 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.86 (s, 1H), 8.34 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H), 7.95 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 7.36 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H), 7.28 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.15 - 7.06 (m, 1H), 6.99 (ddd, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 0.9 Hz, 1H), 6.87 (dd, ⁴J = 2.5 Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.12 - 3.90 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.12 (dd, ²J = 13.5 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1H), 2.81 (dd, ²J = 13.5 Hz, ³J = 10.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 172.19, 163.11, 158.98, 146.13, 145.17, 142.30, 130.52, 129.87, 122.98, 118.23, 117.70, 57.03, 55.30, 37.23.

3-Cl-Phs-DPhe(4-NO₂)-Phe(4-NO₂)-p-Xda-Cbz (78)

benzyl (4-(((S)-2-((R)-2-((3-chlorophenyl)sulfonamido)-3-(4-nitrophenyl)propanamido)-3-(4-nitrophenyl)propanamido)methyl)benzyl)carbamate



Die Carbonsäure **75** (500 mg, 1.1 mmol, 1 eq.) und das Amin **66** (749 mg, 1.3 mmol, 1 eq.) wurden in 27 mL MeCN gelöst, mit DIPEA (700 μ L, 4 mmol, 3.1 eq.) versetzt und im Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HBTU (542 mg, 1.43 mmol, 1.1 eq.) in drei Portionen binnen 10 min zugegeben und die Mischung wurde bei 0 °C für 1 h und dann über Nacht bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der RS in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq.

6.14. Makrozyklische substratanalogue Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

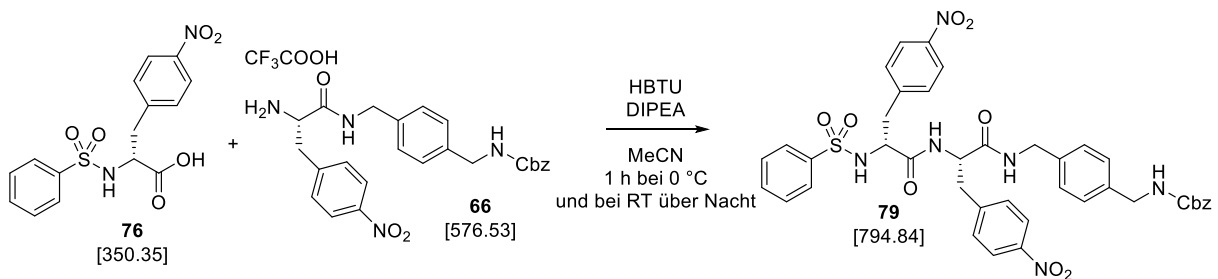
KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silicagel, EA/Cy, 1 : 1 (v/v)) gereinigt und das Produkt als blaugelber FS erhalten. Eine kleine Probe wurde zur Charakterisierung mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** zwei Fraktionen unterschiedlicher Reinheit: 389 mg, 0.47 mmol, 36 %, Reinheit > 99 % und 625 mg, Reinheit 75 % (daher wurde auf die Angabe der Ausbeute verzichtet). **HPLC:** Methode B, Start bei 40 % B, 25.62 min. **MS (ESI, positiv):** ber.: 828.20, m/z: 828.98 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 8.72 - 8.54 (m, 2H), 8.38 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.09 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H), 7.94 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.78 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H), 7.46 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H), 7.44 - 7.37 (m, 2H), 7.37 - 7.25 (m, 8H), 7.20 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.66 (td, ³J = 8.9, 5.3 Hz, 1H), 4.35 (dd, ²J = 15.0 Hz, ³J = 6.0 Hz, 1H), 4.25 (dd, ²J = 15.0 Hz, ³J = 5.5 Hz, 1H), 4.18 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H), 4.16 - 4.10 (m, 1H), 3.11 (dd, ²J = 13.5 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H), 2.89 (dd, ²J = 13.3 Hz, ³J = 9.3 Hz, 1H), 2.67 - 2.64 (m, 1H), 2.48 - 2.40 (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 169.89, 169.70, 163.10, 156.37, 146.27, 146.12, 145.81, 145.46, 142.88, 138.49, 137.38, 137.19, 133.35, 131.65, 130.76, 130.49, 128.38, 127.83, 127.79, 127.35, 127.06, 125.51, 125.51, 124.64, 123.12, 122.88, 65.40, 57.29, 53.00, 43.60, 42.91, 38.27, 37.93.

Phs-dPhe(4-NO₂)-Phe(4-NO₂)-p-Xda-Cbz (79)

benzyl 4-(((S)-3-(4-nitrophenyl)-2-((R)-3-(4-nitrophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanamido)propanamido)methyl)benzyl)carbamate



Die Carbonsäure **76** (473 mg, 1.35 mmol, 1 eq.) und das Amin **66** (778 mg, 1.35 mmol, 1 eq.) wurden in 25 mL MeCN gelöst, mit DIPEA (611 µL, 3.50 mmol, 2.6 eq.) versetzt und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HBTU (666 mg, 1.76 mmol, 1.3 eq.) in drei Portionen binnen 10 min zugegeben und die Mischung über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der RS in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Das Produkt wurde als beiger FS erhalten. **Ausbeute:** 1.019 g, 1.3 mmol, 95 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 36.61 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 794.24, m/z: 795.4 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 8.62 - 8.50 (m, 2H), 8.09 (m, 3H), 7.94 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.79 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 7.48 - 7.41 (m, 5H), 7.41 - 7.29 (m, 6H), 7.28 - 7.12 (m, 7H), 5.03 (s, 2H), 4.64 - 4.57 (m, 1H), 4.34 (dd, ²J = 15.1 Hz, ³J = 5.8 Hz, 1H), 4.27 (dd, ²J = 15.2 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H), 4.22 -

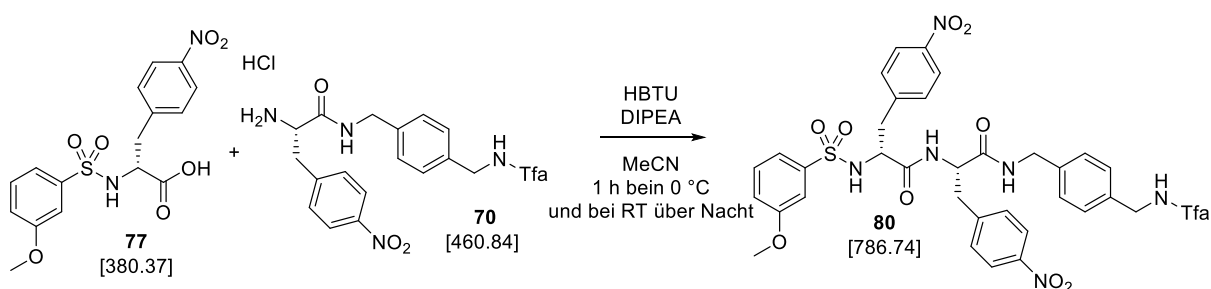
6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

4.09 (m, 3H), 3.08 (dd, $^2J = 13.5$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $^2J = 13.5$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1H), 2.75 - 2.62 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 169.88, 169.68, 160.51, 156.36, 146.23, 146.15, 145.81, 145.54, 140.99, 138.47, 137.38, 137.17, 130.70, 130.54, 128.53, 128.36, 127.80, 127.77, 127.34, 127.03, 125.99, 123.08, 122.93, 114.47, 65.38, 57.19, 52.94, 43.57, 41.93, 38.25.

3-MeO-Phs-DPhe(4-NO₂)-Phe(4-NO₂)-p-Xda-Tfa (80)

(R)-2-((3-methoxyphenyl)sulfonamido)-3-(4-nitrophenyl)-N-((S)-3-(4-nitrophenyl)-1-oxo-1-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propan-2-yl)propanamide



Die Carbonsäure **77** (380 mg, 1.0 mmol, 1 eq.) und das Amin **70** (460 mg, 1.0 mmol, 1 eq.) wurden in 7 mL MeCN gelöst, mit DIPEA (557 μL , 3.2 mmol, 3.2 eq.) versetzt und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HBTU (417 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq.) in drei Portionen binnen 10 min zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der RS in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Das Produkt wurde als brauner FS erhalten. Eine kleine Probe wurde zur Charakterisierung mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 602 mg, 0.76 mmol, 76 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 40 % B, 21.00 min, Reinheit: > 96 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 786.19, m/z: 787.08 [M+H]⁺.

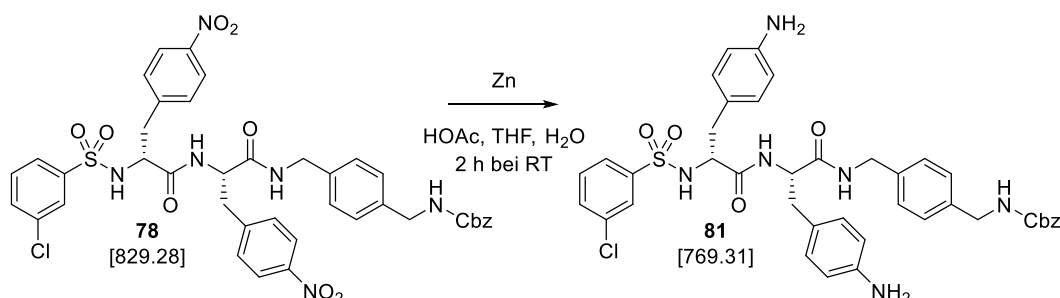
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 9.96 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H), 8.58 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H), 8.53 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H), 8.08 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 7.90 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.45 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H), 7.40 - 7.32 (m, 1H), 7.29 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1H), 7.22 - 7.19 (m, 5H), 7.15 - 7.00 (m, 2H), 6.96 - 6.88 (m, 1 H), 6.86 - 6.75 (m, 1 H), 4.70 - 4.61 (m, 1H), 4.36 (d, $^3J = 5.9$ Hz, 1H), 4.34 - 4.20 (m, 3H), 4.14 - 4.06 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.10 (dd, $^2J = 13.5$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, 1H), 2.89 (dd, $^2J = 13.2$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $^2J = 13.5$ Hz, $^3J = 3.2$ Hz, 1H), 2.44 (dd, $^2J = 14.5$, $^3J = 3.7$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 169.87, 169.84, 158.84, 146.22, 145.96, 145.72, 145.41, 142.17, 137.92, 136.10, 130.65, 130.38, 129.63, 127.44, 127.36, 123.02, 122.68, 118.14, 117.45, 110.97, 57.25, 55.18, 52.99, 42.32, 41.87, 38.33, 37.86.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

3-Cl-Phs-dPhe(4-NH₂)-Phe(4-NH₂)-p-Xda-Cbz (81)

benzyl (4-(((S)-3-(4-aminophenyl)-2-((R)-3-(4-aminophenyl)-2-((3-chlorophenyl)sulfonamido)propanamido)propanamido)methyl)benzyl)carbamate



Das Dinitro-Derivat **78** (374 mg, 0.45 mmol, 1 eq.) wurde in 20 mL einer 3 : 1 (v/v) Mischung aus 90 % (v/v) aq. HOAc und THF gelöst und mit Zinkstaub (884 mg, 13.5 mmol, 30 eq.) versetzt. Die Suspension wurde für 2 h bei RT gerührt. Dann wurde mit EA verdünnt und filtriert. Der Filtrerrückstand wurde sorgfältig mit EA gewaschen und verworfen. Die vereinten Filtrate wurden *in vacuo* getrocknet und der Rückstand in einer Mischung aus EA und ges. aq. NaCl-Lsg. aufgenommen. Dann wurde wässrig-basisch und wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach der Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt als gelbliches Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 268 mg, Berechnung der Ausbeute aufgrund geringer Reinheit nicht sinnvoll. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 19.4 min, Reinheit: ca. 80 %. **MS (ESI, positiv):** ber. 768.25, m/z: 769.22 [M+H]⁺.

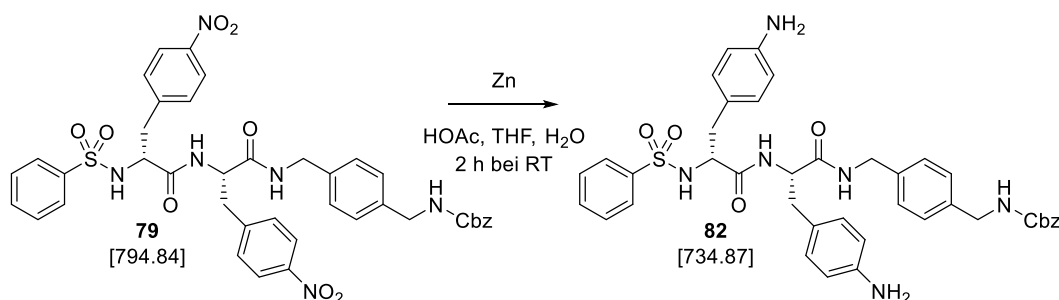
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.22 (t, ³J = 6.4 Hz, 1H), 8.17 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H), 7.79 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.52 - 7.42 (m, 3H), 7.38 - 7.29 (m, 7H), 7.20 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H), 7.12 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 6.81 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 6.74 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 6.41 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 6.38 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.82 (s, 4H), 4.37 - 4.18 (m, 3H), 4.18 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H), 3.91 (td, ²J = 9.2 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H), 2.68 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 4.9 Hz, 1H), 2.29 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 9.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.72, 170.22, 156.32, 146.89, 146.82, 141.17, 138.16, 137.54, 137.14, 131.69, 129.74, 129.66, 128.56, 128.31, 127.75, 127.70, 127.13, 126.93, 126.14, 124.36, 124.24, 113.66, 65.34, 58.30, 54.09, 43.59, 41.77, 37.67, 37.45.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

Phs-dPhe(4-NH₂)-Phe(4-NH₂)-p-Xda-Cbz (82)

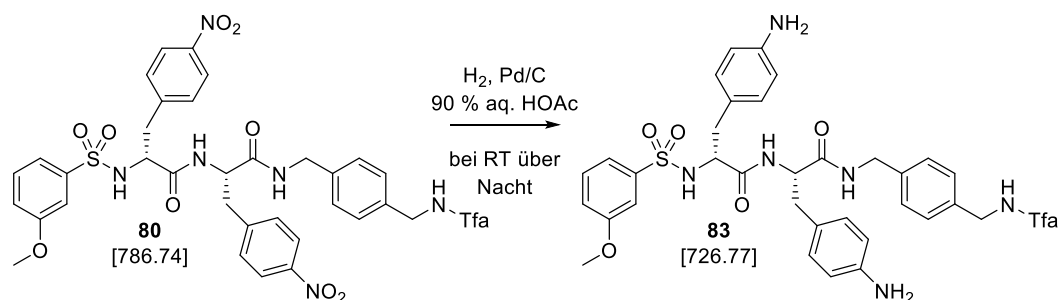
Benzyl 4-(((S)-3-(4-aminophenyl)-2-((R)-3-(4-aminophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanamido)propanamido)methyl)benzyl)carbamate



Das Dinitro-Derivat **79** (575 mg, 0.72 mmol, 1 eq.) wurde analog zur Verbindung **81** reduziert. Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde die Verbindung als farbloser FS erhalten und ohne weitere Reinigung verwendet. **Ausbeute:** 225 mg, 0.31 mmol, 43 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 42.1 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 734.29, m/z: 735.44.4 [M+H]⁺.

3-MeO-Phs-dPhe(4-NH₂)-Phe(4-NH₂)-p-Xda-Tfa (83)

(R)-3-(4-aminophenyl)-N-((S)-3-(4-aminophenyl)-1-oxo-1-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propan-2-yl)-2-((3-methoxyphenyl)sulfonamido)propanamide



Das Dinitro-Derivat **80** (578 mg, 0.73 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B über Nacht hydriert. Nach der Entfernung des LM wurde das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 512 mg, Berechnung der Ausbeute aufgrund unzureichender Reinheit nicht sinnvoll. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 15.56 min, Reinheit: > 85 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 726.24, m/z: 727.29 [M+H]⁺.

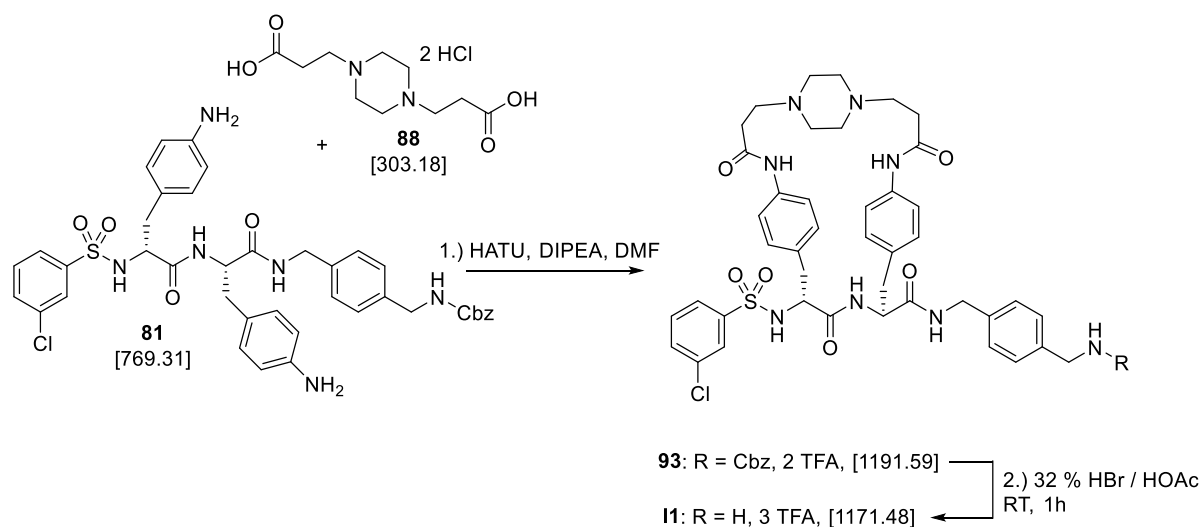
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.99 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.39 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.33 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H), 7.91 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H), 7.25 - 7.15 (m, 5H), 7.11 - 7.00 (m, 7H), 6.95 - 6.77 (m, 4H), 4.51 - 4.38 (m, 1H), 4.37 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 4.34 - 4.17 (m, 2H), 4.06 - 3.96 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.85 (dd, ²J = 13.6, ³J = 5.1 Hz, 1H), 2.65 - 2.57 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.35 (dd, ²J = 13.7, ²J = 10.6 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.41, 169.89, 158.99, 142.25, 138.08, 136.01, 130.29, 130.24, 129.81, 127.37, 127.36, 119.47, 118.98, 118.24, 117.98, 117.43, 111.03, 57.72, 55.36, 53.56, 42.35, 41.80, 37.80, 37.60.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

3-Cl-Phs-dPhe(c[4-NH-Prop-Piz-Prop]-Phe(4-NH))-p-Xda × 3 TFA (**I1**)

(13S,16R)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-16-((3-chlorophenyl)sulfonamido)-3,9,15-trioxo-2,10,14-triaza-6(1,4)-piperazina-1,11(1,4)-dibenzenacycloheptadecaphane-13-carboxamide



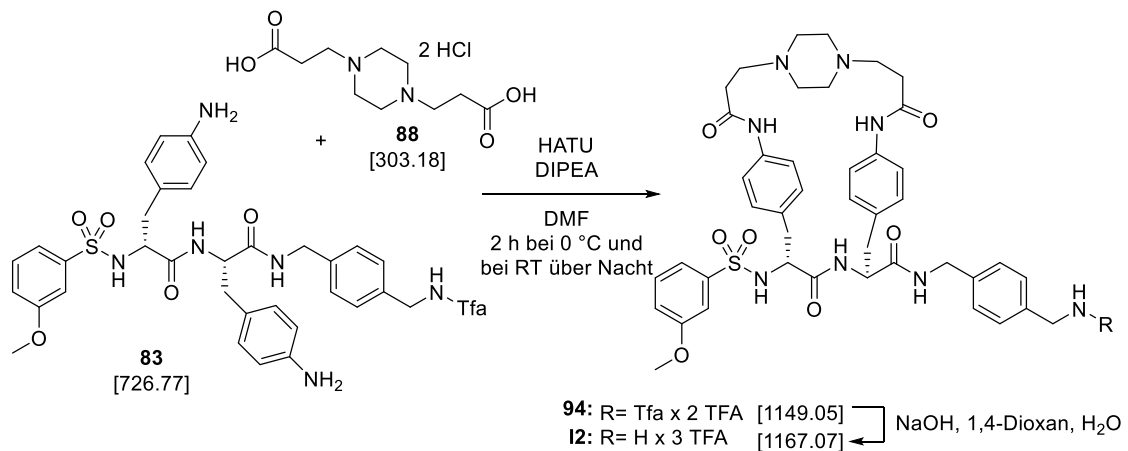
Das Dianilin-Derivat **81** (210 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) wurde unter Verwendung der Dicarbonsäure **88** (82 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E unter Verwendung von HATU (113 mg, 0.3 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (235 μ L, 1.35 mmol, 5 eq.) zyklisiert. Nach Entfernung des LM wurde das erhaltene braune Öl mittels präparativer HPLC gereinigt und das Intermediat **93** als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 37 mg, Angabe der prozentualen Ausbeute wegen geringer Reinheit nicht sinnvoll. HPLC: Methode A, 17.56 min, Reinheit 79 %, MS (ESI, positiv): ber.: 962.36, m/z: 963.36 [M+H]⁺.

Nach der Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Cbz-geschützte Intermediat **93** mit 1 mL 32 % (w/v) HBr versetzt und für 1 h bei RT schwach gerührt. Danach wurde mit DEE gefällt. Der finale Inhibitor **I1** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 20 mg, 0.017 mmol, 6 % über zwei Stufen. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 21.74 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 828.32, m/z: 829.12 [M+H]⁺.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

3-MeO-Phs-dPhe(c[4-NH-Prop-Piz-Prop)-Phe(4-NH)]-p-Xda × 3 TFA (I2)

(13S,16R)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-16-((3-methoxyphenyl)sulfonamido)-3,9,15-trioxo-2,10,14-triaza-6(1,4)-piperazina-1,11(1,4)-dibenzenacycloheptadecaphane-13-carboxamide



Das Dianilin-Derivat **83** (254 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) wurde unter Verwendung der Dicarbonsäure **88** (106 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Tfa-geschützte Intermediat **94** nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 106 mg, 0.09 mmol, 26 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 12.72 min, Reinheit > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 920.35, m/z: 921.37 [M+H]⁺.

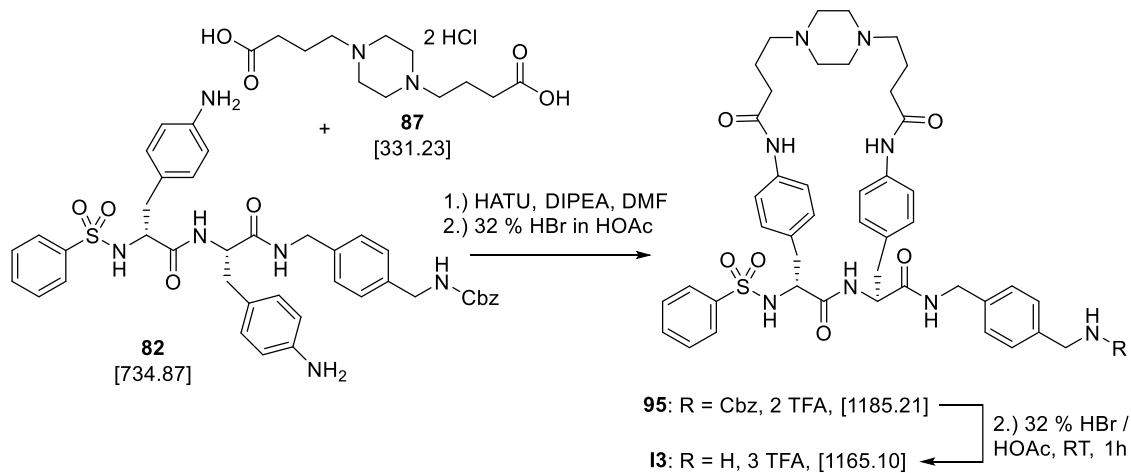
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.98 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 9.92 (bs, 1H), 9.87 (bs, 1H), 8.47 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 8.37 (d, ³J = 6.4 Hz, 1H), 7.44 - 7.28 (m, 5H), 7.29 - 7.17 (m, 5H), 7.16 - 6.96 (m, 5H), 6.26 (d, ³J = 4.8 Hz, 2H), 4.37 (d, J = 6.3 Hz), 4.33 (s), 4.16 - 4.09 (m), 3.77 (s), 3.32 (bs), 3.05 (bs), 2.90 - 2.57 (m).

Die Tfa-Gruppe des Intermediats **94** (94 mg, 0.08 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH abgespalten. Der finale Inhibitor wurde nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 67 mg, 0.06 mmol, 72 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 20.1 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 824.37, m/z: 825.22 [M+H]⁺.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.2. Inhibitoren I1-I3

Phs-DPhe(c[4-NH-But-Piz-But]-Phe-(4-NH))-p-Xda (I3)

(15S,18R)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-3,11,17-trioxo-18-(phenylsulfonamido)-2,12,16-triaza-7(1,4)-piperazina-1,13(1,4)-dibenzenacyclonadecaphane-15-carboxamide



Das Dianilin-Derivat **82** (421 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) wurde mit der Dicarbonsäure **87** (190 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E cyclisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und das erhaltene Öl mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Intermediat **95** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 125 mg, HPLC: Methode B, Start bei 30 % B, 15.56 min, Reinheit > 57 %, MS (ESI, positiv): ber.: 956.43, m/z: 957.37 [M+H]⁺.

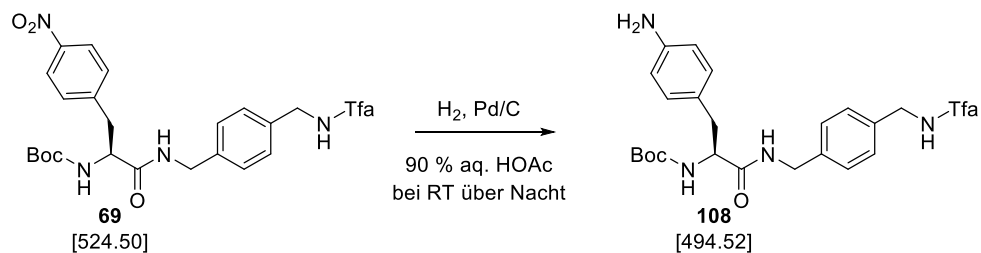
Nach der Entfernung des LM wurde die Verbindung **95** mit 3 mL 32 % (w/v) HBr versetzt und für 1 h bei RT schwach gerührt. Danach wurde das Rohprodukt mit DEE gefällt und mittels präparativer HPLC gereinigt. Der Inhibitor **I3** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 31 mg, 0.027 mmol, 5 % über zwei Stufen. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 18.72 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 822.39, m/z: 823.42 [M+H]⁺.

6.14.3. Inhibitoren I4-I6

In diesem Abschnitt werden die Synthesen der Inhibitoren **I4 - I6** beschrieben, die asymmetrische *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linkersegmente enthalten.

Boc-Phe(4-NH₂)-p-Xda-Tfa (108)

tert-butyl (S)-3-(4-aminophenyl)-1-oxo-1-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propan-2-yl)carbamate



Boc-Phe(4-NO₂)-OH (**69**, 3.71 g, 7.1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Nach Entfernung des LM wurde das Rohprodukt in einer Mischung aus EA und ges. aq. NaHCO₃-Lsg. aufgenommen. Die organische Phase wurde wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet und das LM *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silicagel, DCM/MeOH, 94 : 6 (v/v)) gereinigt und das Produkt als bräunlicher FS erhalten. **Ausbeute:** 2.99 g, 6 mmol, 86 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 17.7 min, Reinheit > 96 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 494.21, m/z: 495.12 [M+H]⁺.

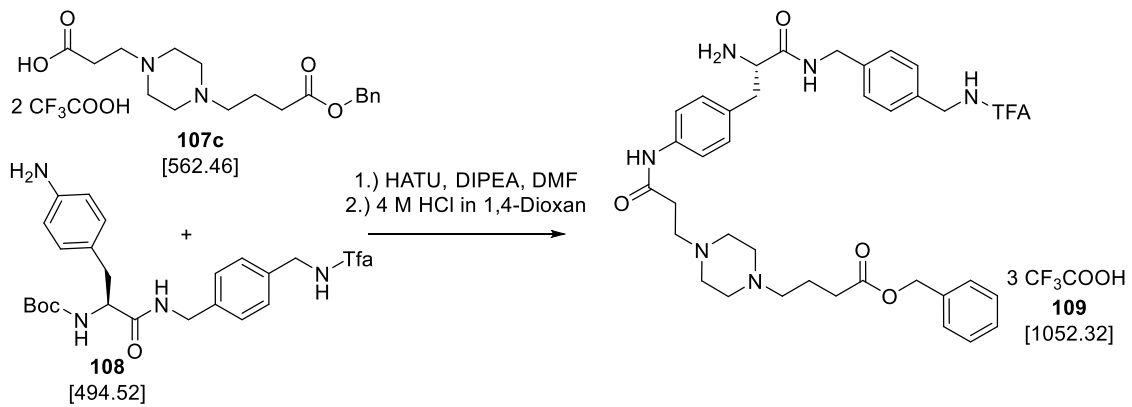
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.97 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.38 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H), 7.24 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.20 (s, 4H), 7.05 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 6.94 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 4.36 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 4.31 - 4.21 (m, 2H), 4.19 - 4.07 (m, 1H), 2.94 (dd, ²J = 13.5, ³J = 4.7 Hz, 1H), 2.75 (dd, ²J = 13.2 Hz, ³J = 10.2 Hz, 1H), 1.32 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 208.63, 171.65, 156.51, 156.15, 155.35, 138.51, 135.96, 130.35, 127.34, 127.22, 120.73, 78.08, 56.01, 42.35, 41.79, 36.84, 28.16.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

H-Phe(4-NH-Prop-Piz-But-OBn)-p-Xda-Tfa × 3 TFA (109)

benzyl (S)-4-(4-(3-((4-(2-amino-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)butanoate



Die Carboxylkomponente **107c** (341 mg, 0.61 mmol, 1 eq, HBTU (278 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq.), HOBt (100 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq.) und DIPEA (329 μ L, 1.9 mmol, 3.1 eq.) wurden unter Eiskühlung in 6 mL DMF gelöst und für 10 min gerührt. Dann wurde das Boc-geschützte Anilin-Derivat **108** (300 mg, 0.61 mmol, 1 eq.) in einer Portion hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Kupplungsprodukt (HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 23.96 min) mit 5 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan versetzt und für 1 h bei RT schwach gerührt. Das Produkt wurde mit DEE gefällt und mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 413 mg als farbloses Lyophilisat, 0.39 mmol, 64 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 14.15 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 710.34, m/z: 711.31 [M+H]⁺.

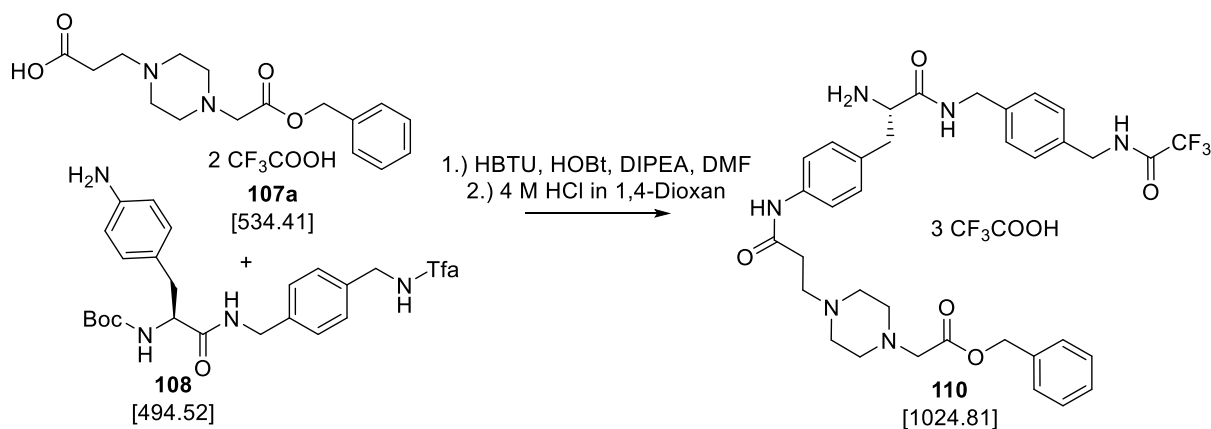
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.11 (s, 1H), 9.95 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.76 (t, ³*J* = 5.7 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H), 7.49 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.38 - 7.28 (m, 5H), 7.16 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H), 7.11 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.07 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.32 (d, ³*J* = 5.9 Hz, 2H), 4.22 (d, ³*J* = 5.4 Hz, 2H), 4.02 - 3.89 (m, 1H), 2.97 (bm, 14H), 2.70 (t, ³*J* = 6.4 Hz, 2H), 2.44 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 2H), 1.85 (p, ³*J* = 7.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 172.55, 169.00, 168.30, 159.26, 158.99, 158.72, 158.45, 157.30, 157.01, 156.72, 156.43, 138.58, 137.81, 136.86, 136.64, 130.30, 130.16, 128.98, 128.60, 128.51, 128.09, 127.94, 119.83, 118.18, 117.69, 115.85, 115.40, 66.16, 55.50, 54.19, 52.48, 50.03, 42.89, 42.60, 37.04, 32.42, 31.10, 20.08.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

H-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OBn)-p-Xda-Tfa, × 3 TFA (110)

benzyl (S)-2-(4-(3-((4-(2-amino-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetate



Die Carboxylkomponente **107a** (486 mg, 0.91 mmol, 1 eq. und DIPEA (713 µl, 4.1 mmol, 4.5 eq.) wurden in 3 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. HBTU (448 mg, 1.2 mmol, 1.3 eq.) und HOBT (160 mg, 1.2 mmol, 1.3 eq.) wurden in je einer Portion zugegeben und die Lösung bei 0 °C für 10 min gerührt. Dann wurde das Boc-geschützte Anilin-Derivat **108** (450 mg, 0.9 mmol, 1 eq.) zugegeben und die Mischung über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Kupplungsprodukt (HPLC: Methode B: Start bei 10 % B, 38.16 min) mit 6 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan versetzt und für 1 h bei RT schwach gerührt. Das Rohprodukt wurde mit DEE gefällt und *in vacuo* getrocknet. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde es als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 741 mg, 0.7 mmol, 80 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 16.47 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 682.31, m/z: 683.26 [M+H]⁺.

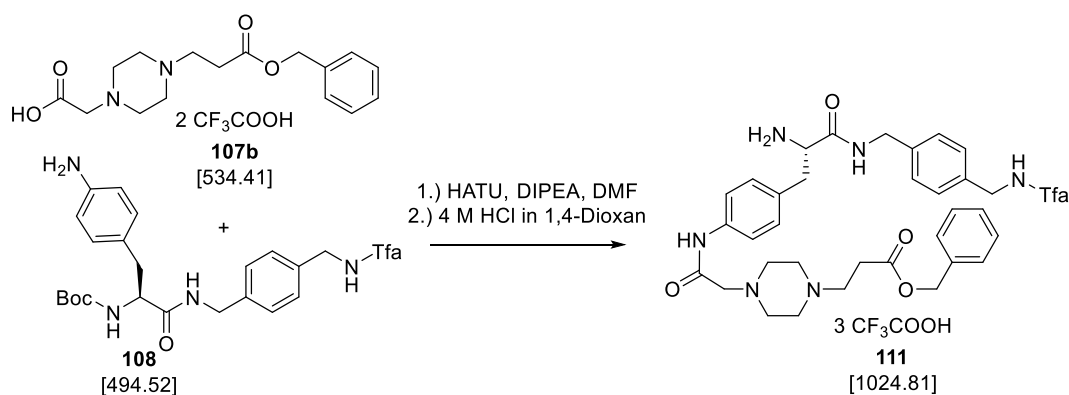
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.24 (s, 1H), 10.01 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.82 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.24 (s, 3H), 7.52 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.44 - 7.26 (m, 5H), 7.20 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.15 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.10 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.35 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.25 (d, ³J = 5.3 Hz, 2H), 3.50 (s, 2H), 3.40 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H), 3.22 - 2.93 (bm, 7H), 2.91 - 2.60 (bm, 5H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 167.75, 167.65, 158.16 (pd, ²J_{C-F} = 33.6 Hz), 137.87, 137.25, 136.30, 135.86, 129.77, 129.75, 128.44, 128.12, 128.03, 127.52, 127.38, 119.32, 65.60, 56.73, 53.61, 51.20, 48.44, 42.32, 42.03, 36.47.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

H-Phe(4-NH-Ac-Piz-Prop-OBn)-p-Xda-Tfa, × 3 TFA (111)

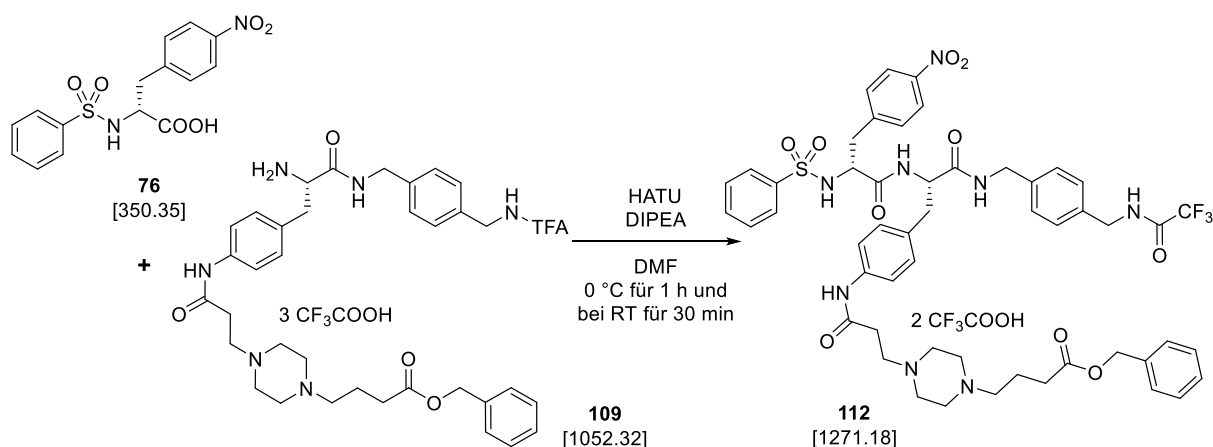
(S)-3-(4-(2-((4-(2-amino-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)propanoate



Die Carboxylkomponente **107b** (497 mg, 0.93 mmol), 1 eq, das Boc-geschützte Anilin-Derivat **108** (460 mg, 0.93 mmol, 1 eq.) und DIPEA (810 μ L, 4.65 mmol, 5 eq.) wurden in 6 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HATU (354 mg, 0.93 mmol, 1 eq.) in einer Portion hinzugegeben und die Lösung für 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Kupplungsprodukt (HPLC: Methode B, Start bei 10 % B, 38.04 min) mit 5 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan versetzt und für 1 h bei RT schwach gerührt. Das Produkt wurde mit DEE gefällt, *in vacuo* getrocknet und nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 521 mg, 0.51 mmol, 55 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 15.17 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 682.31, m/z: 683.33 [M+H]⁺.

Phs-DPhe(4-NO₂)-Phe(4-NH-Prop-Piz-But-OBn)-p-Xda-Tfa, × 2 Tfa (112)

benzyl 4-(4-(3-((4-((S)-2-((R)-3-(4-nitrophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)butanoate



Die Carboxylkomponente **76** (67 mg, 0.19 mmol, 1.2 eq.), die Aminokomponente **109** (200 mg, 0.16 mmol, 1 eq.) und DIEPA (165 μ L, 0.95 mmol, 5 eq.) wurden in 1 mL DMF gelöst und im Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HATU (87 mg, 0.23 mmol, 1.2 eq.) in einer Portion

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0 °C und für 30 min bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 150 mg, 0.12 mmol, 63 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 29.42 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 1042.39, m/z: 1043.40 [M+H]⁺.

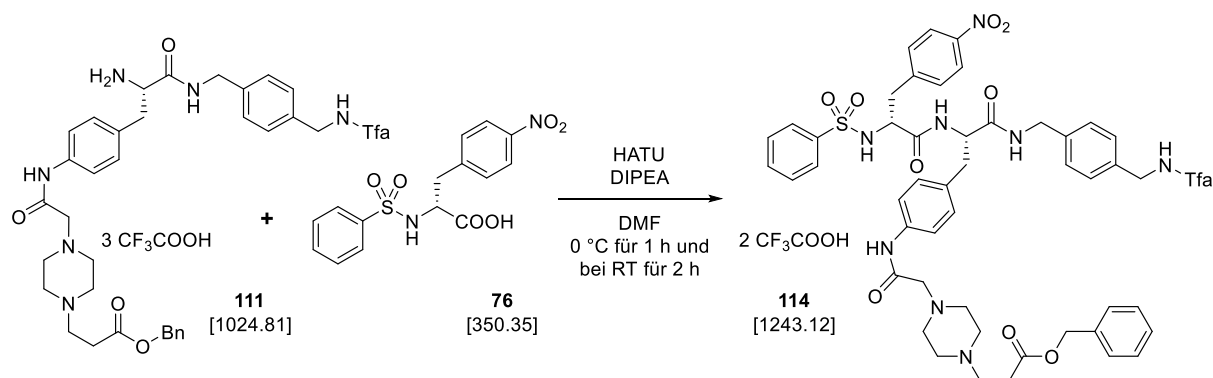
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.04 - 9.89 (m, 2H), 8.55 - 8.42 (m, 2H), 8.05 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H), 7.94 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 7.47 - 7.41 (m, 4H), 7.39 - 7.34 (m, 5H), 7.31 - 7.17 (m, 9H), 7.14 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.55 - 4.45 (m, 1H), 4.37 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.34 - 4.24 (m, 2H), 4.13 (td, ²J = 9.9, ³J = 4.0 Hz, 1H), 3.42 - 2.56 (bm, 18H), 2.45 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 1.89 - 1.78 (m, 2H).

Phs-dPhe(4-NO₂)-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OBn)-p-Xda-Tfa, × 2 TFA (113)

Die Synthese wird zusammen mit der Herstellung der Verbindung **116** beschrieben.

Phs-dPhe(4-NO₂)-Phe(4-NH-Ac-Piz-Prop-OBn)-p-Xda-Tfa, × 2 TFA (114)

benzyl 3-(4-(2-((4-((S)-2-((R)-3-(4-nitrophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)propanoate



Die Carboxylkomponente **76** (85 mg, 0.24 mmol, 1 eq.), die Aminokomponente **111** (246 mg, 0.24 mmol, 1 eq.) und DIEPA (210 µL, 1.22 mmol, 5 eq.) wurden in 3 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HATU (91 mg, 0.24 mmol, 1 eq.) in einer Portion zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0 °C und 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in einer Mischung aus EA und ges. aq. NaHCO₃-Lsg. gelöst. Die organische Phase wurde wässrig-basisch und wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Produkt als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 241 mg, 0.19 mmol, 80 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 40 % B, 12.2 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 1014.36, m/z: 1015.38 [M+H]⁺.

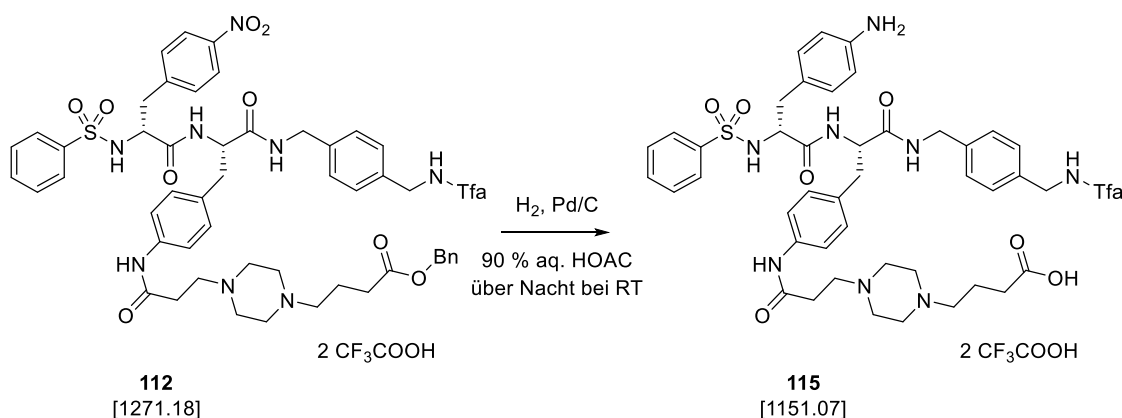
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.96 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.54 - 8.42 (m, 2H), 8.03 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H), 7.93 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 7.47 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.44 - 7.40 (m, 2H), 7.42 - 7.26 (m, 6H), 7.29 - 7.17 (m, 8H), 7.13 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.51 (td, ²J = 9.0, ³J = 4.9 Hz, 1H), 4.37 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 4.36 - 4.25 (m, 2H), 4.13 (td, ²J = 9.8, ³J = 3.8 Hz, 1H), 3.04 (s, 2H), 2.91 (dd, ²J = 14.9, ³J = 6.4 Hz, 1H), 2.77 - 2.56 (m, 6H), 2.42 (br, 9H).

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 170.21, 167.84, 158.32 (pd, $^2J_{\text{C-F}} = 33.6$ Hz), 143.81, 137.53, 137.33, 136.36, 135.82, 130.07, 129.85, 128.52, 128.24, 128.17, 127.58, 127.44, 119.59, 118.04, 66.11, 53.66, 51.13, 50.57, 49.52, 42.37, 42.05, 36.54.

Phs-DPhe(4-NH₂)-Phe(4-NH-Prop-Piz-But-OH)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (115)

4-(4-(3-((4-((S)-2-((R)-3-(4-aminophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)butanoic acid



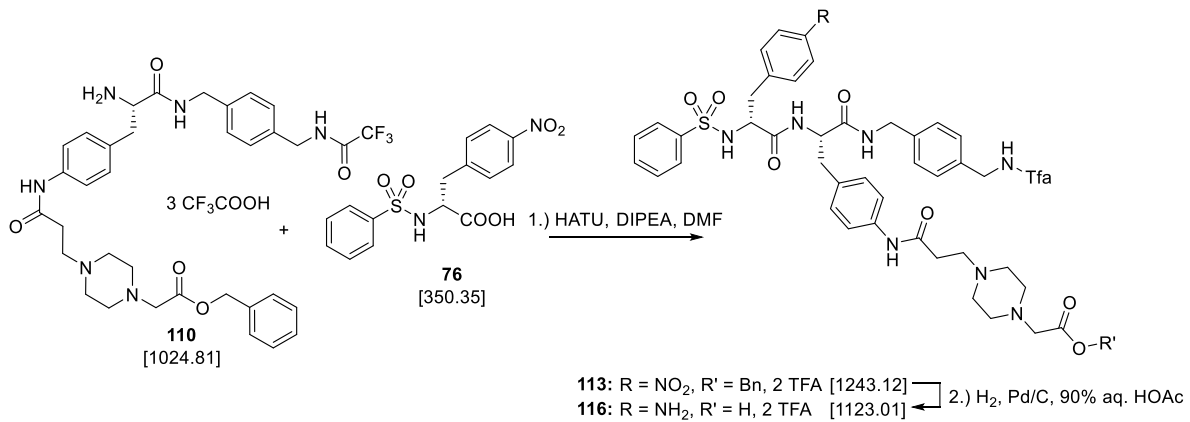
Das benzylgesch\u00fctzte Nitroderivat **112** (135 mg, 0.106 mmol) wurde gem\u00e4\u00df der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Produkt wurde mittels pr\u00e4parativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 118 mg, 0.105 mmol, 97 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 11.91 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 922.37, m/z: 923.22 [M+H]⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 10.03 (s, 1H), 10.00 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 1H), 8.46 - 8.40 (m, 2H), 7.94 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H), 7.47 - 7.39 (m, 5H), 7.33 - 7.27 (m, 2H), 7.23 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H), 7.17 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.13 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 4H), 7.01 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 4.47 - 4.40 (m, 1H), 4.37 (d, $^3J = 6.0$, 2H), 4.35 - 4.23 (m, 2H), 4.09 - 3.97 (m, 1H), 3.34 - 3.02 (bm, 10H), 3.02 - 2.92 (m, 2H), 2.87 (dd, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1H), 2.71 - 2.63 (m, 3H), 2.56 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, 1H), 2.37 (dd, $^2J = 13.5$ Hz, $^3J = 10.6$ Hz, 1H), 2.31 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H), 1.82 (p, $^3J = 7.4$ Hz, 2H).

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

Phs-DPhe(4-NH₂)-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OH)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (116)

2-(4-(3-((4-((S)-2-((R)-3-(4-aminophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetic acid



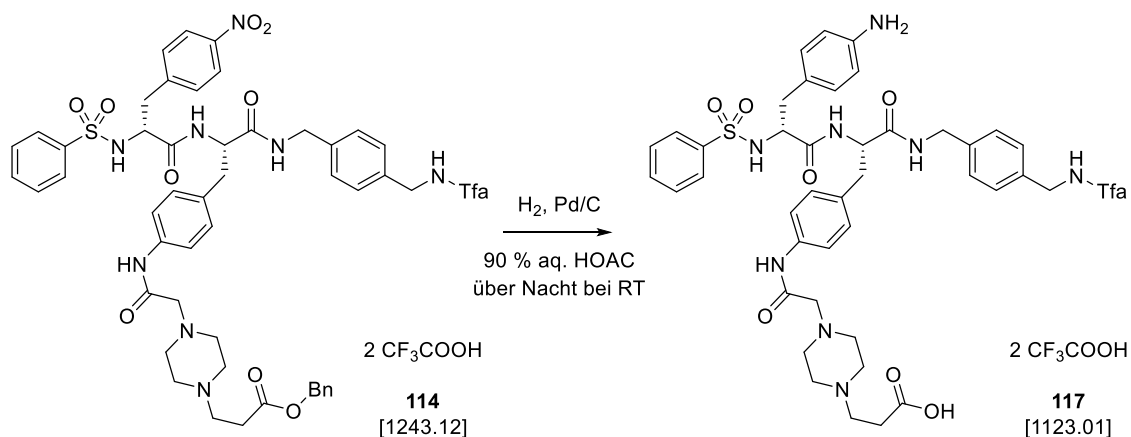
Die Carboxylkomponente **76** (81 mg, 0.23 mmol, 1 eq.), die Aminokomponente **110** (236 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) und DIEPA (200 µL, 1.15 mmol, 5 eq.) wurden in 3 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HATU (96 mg, 0.25 mmol, 1.1 eq.) in einer Portion zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0 °C sowie für 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das Kupplungsprodukt **113** (HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 32.75 min) gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Produkt **116** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 171 mg, 0.15 mmol, 66 % über zwei Stufen. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 12.43 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 894.33, m/z: 895.29 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.04 (s, 1H), 9.98 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.46 - 8.30 (m, 2H), 7.91 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H), 7.46 - 7.40 (m, 5H), 7.34 - 7.26 (m, 2H), 7.22 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.17 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.13 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.08 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 6.93 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H), 4.43 (td, ²J = 8.9, ³J = 5.7 Hz, 1H), 4.36 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 4.35 - 4.17 (m, 2H), 4.06 - 3.96 (m, 1H), 3.40 (s, 2H), 3.31 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H), 3.24-2.89 (bm, 4H), 2.97 - 2.82 (bm, 5H), 2.75 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H), 2.64 (dd, ²J = 13.5, ³J = 9.3 Hz, 1H), 2.58 - 2.51 (m, 1H), 2.35 (dd, ²J = 13.4, ³J = 10.5 Hz, 1H).

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

Phs-dPhe(4-NH₂)-Phe(4-NH-Ac-Piz-Prop-OH)-p-Xda-Tfa, × 2 TFA (**117**)

3-(4-(2-((4-(S)-2-((R)-3-(4-aminophenyl)-2-(phenylsulfonamido)propanamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)propanoic acid



Das benzylgeschützte Nitroderivat **114** (228 mg, 0.18 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert und das Produkt **117** nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 176 mg, 0.16 mmol, 85 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 12.93 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 894.33, m/z: 895.30 [M+H]⁺.

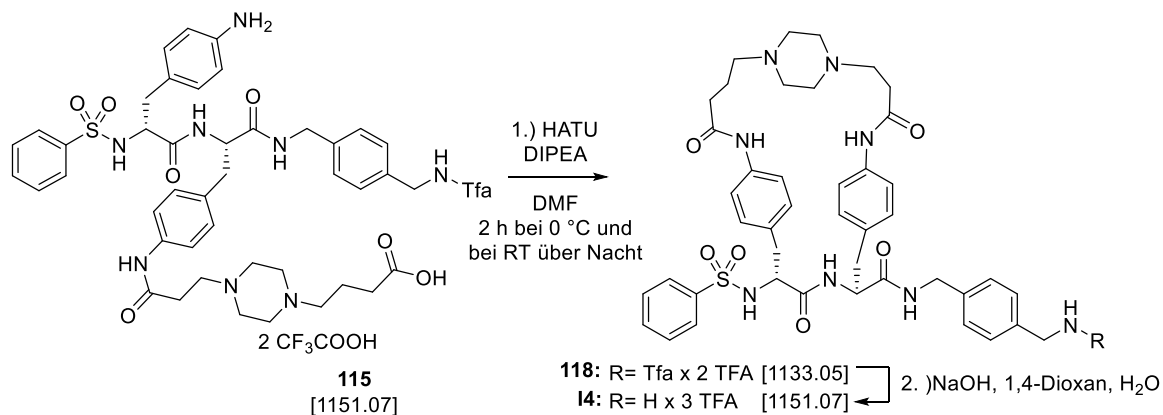
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.98 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.47 - 8.34 (m, 2H), 7.92 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H), 7.49 - 7.39 (m, 5H), 7.34 - 7.27 (m, 2H), 7.23 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.17 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.14 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 6.98 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 4.44 (td, ³J = 8.9, 5.6 Hz, 1H), 4.36 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.35 - 4.20 (m, 2H), 4.03 (td, ³J = 9.9, 4.0 Hz, 1H), 3.40 (s, 2H), 3.24 (bm, 6H), 2.89 (bm, 5H), 2.70 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H), 2.65 (dd, ²J = 13.7, ³J = 9.1 Hz, 1H), 2.56 (dd, ²J = 13.8, ³J = 3.7 Hz, 1H), 2.38 (dd, ²J = 13.7, ³J = 10.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 171.60, 170.42, 169.89, 158.18 (q, ²J_{C-F} = 33.6 Hz), 157.52, 156.29 (q, ²J_{C-F} = 36.3 Hz), 140.96, 138.08, 136.71, 135.99, 132.72, 131.79, 130.41, 129.52, 128.57, 127.37, 127.34, 126.02, 120.50, 119.43, 119.07, 117.60, 117.13, 115.25, 114.84, 59.22, 57.73, 53.53, 51.36, 50.73, 49.34, 42.35, 41.78, 37.83, 37.73, 28.93. Von dem zwischen ca. 121 und 113 ppm erwarteten, durch TFA verursachten Quartett konnten nur zwei der vier Signale klar identifiziert werden. Diese wurden als individuelle Signale angegeben.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

Phs-dPhe(c[4-NH-But-Piz-Prop)-Phe(4-NH)]-p-Xda × 3 TFA (I4)

(14R,17S)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-3,10,15-trioxa-14-(phenylsulfonamido)-2,11,16-triaza-6(1,4)-piperazina-1,12(1,4)-dibenzencyclooctadecaphane-17-carboxamide



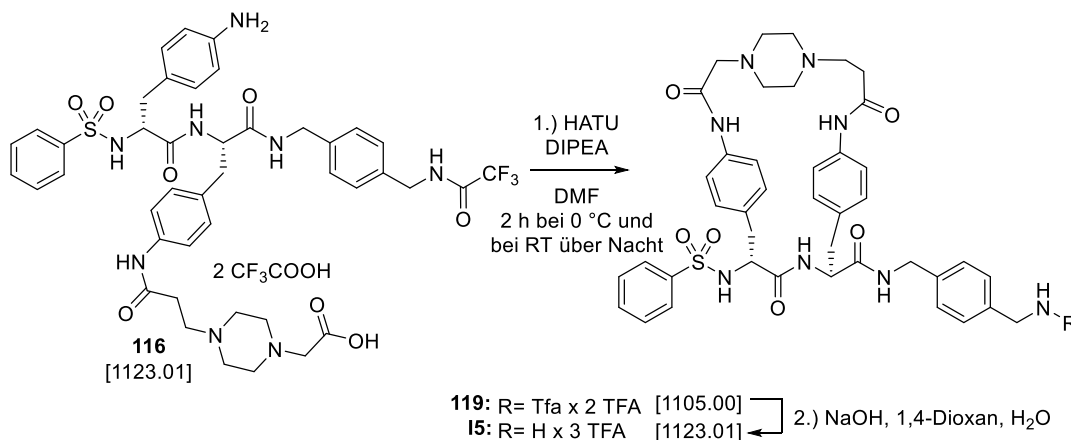
Das offenkettige Intermediat **115** (104 mg, 0.09 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E unter Verwendung von HATU (38 mg, 0.1 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (78 µL, 0.45 mmol, 5 eq.) in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und der erhaltene RS mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Tfa-geschützte Zwischenprodukt **118** (HPLC: Methode B, Start bei 20 %, 18.68 min) wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 83 mg, 0.07 mmol, 81 %. HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 18.82 min, Reinheit > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 904.36, m/z: 905.37 [M+H]⁺.

Die Tfa-Gruppe des Intermediats **118** (67 mg, 0.06 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten und der finale Inhibitor **I4** nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 44 mg, 0.04 mmol, 65 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 17.82 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 808.37, m/z: 809.20 [M+H]⁺.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

Phs-dPhe(c[4-NH-Ac-Piz-Prop]-Phe(4-NH))-p-Xda × 3 TFA (I5)

(12S,15R)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-3,8,14-trioxa-15-(phenylsulfonamido)-2,9,13-triaza-5(1,4)-piperazina-1,10(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-12-carboxamide



Das offenkettige Edukt **116** (111 mg, 0.1 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E unter Verwendung von HATU (41 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (87 µL, 0.5 mmol, 5 eq.) in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und der erhaltene RS mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Tfa-geschützte Zwischenprodukt **119** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute**: 43 mg, 0.04 mmol, 39 %. **HPLC**: Methode B, Start bei 30 % B, 11.72 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv)**: ber.: 876.32, m/z: 877.36 [M+H]⁺.

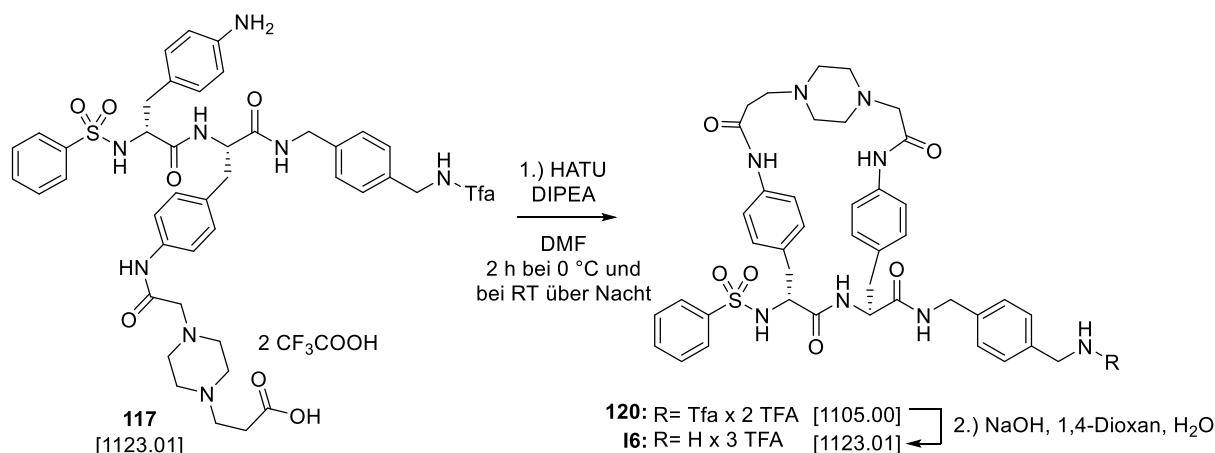
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.16 (s, 1H), 9.98 (t, ³J = 5.9 Hz, 1 H), 9.39 (s, 1H), 8.40 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H), 7.82 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.65 - 7.56 (m, 2H), 7.55 - 7.41 (m, 5H), 7.34 - 7.13 (m, 7H), 7.08 (bs, 2H), 6.66 (br, 2H), 4.46 (t, ³J = 8.8 Hz, 1H), 4.37 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.29 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 4.10 - 3.98 (m, 1H), 3.31 - 3.14 (bm), 2.97 - 2.88 (m), 2.80 (dd, ²J = 14.8 Hz, ³J = 10.9 Hz), 2.67 (bs), 2.65 (bs).

Die Tfa-Gruppe des Intermediats **119** (43 mg, 0.04 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg abgespalten und der finale Inhibitor **I5** nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute**: 31 mg, 0.027 mmol, 68 %. **HPLC**: Methode B, Start bei 10 % B, 18.9 min, Reinheit > 96 %. **MS (ESI, positiv)**: ber.: 780.34, m/z: 781.32 [M+H]⁺.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.3. Inhibitoren I4-I6

Phs-dPhe(c[4-NH-Prop-Piz-Ac)-Phe(4-NH)]-p-Xda × 3 TFA (I6)

(12R,15S)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-3,8,13-trioxa-12-(phenylsulfonamido)-2,9,14-triaza-5(1,4)-piperazina-1,10(1,4)-dibenzenacyclohexadecaphane-15-carboxamide



Das offenkettige Intermediat **117** (162 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E unter Verwendung von HATU (60 mg, 0.16 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (126 µL, 0.7 mmol, 5 eq.) in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und der erhaltene RS mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Tfa-geschützte Zwischenprodukt **120** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 72 mg, 0.065 mmol, 45 %. HPLC: Methode B, Start bei 30 % B, 11.47 min, Reinheit > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 876.32, m/z: 877.36 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.10 (s, 1H), 9.96 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 9.82 (br, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.42 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H), 8.01 (br, 2H), 7.82 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H), 7.58 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H), 7.51 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H), 7.39 (bd, ³J = 6.0 Hz, 2H), 7.35 - 7.20 (m, 7H), 6.84 (bd, ³J = 7.2 Hz, 2H), 6.76 (bd, ³J = 6.2 Hz, 2H), 4.38 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.32 - 4.28 (m, 2H), 4.22 (br, 1H), 4.11 - 3.92 (m, 1H), 3.56 (br), 3.22 - 3.04 (m), 2.97 (d, ³J = 11.9 Hz), 2.93 - 2.78 (m), 2.65 (br).

Die Tfa-Gruppe des Intermediats **120** (61 mg, 0.06 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten und der finale Inhibitor **I6** nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 56 mg, 0.05 mmol, 90 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 18.9 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 780.34, m/z: 781.42 [M+H]⁺.

6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138

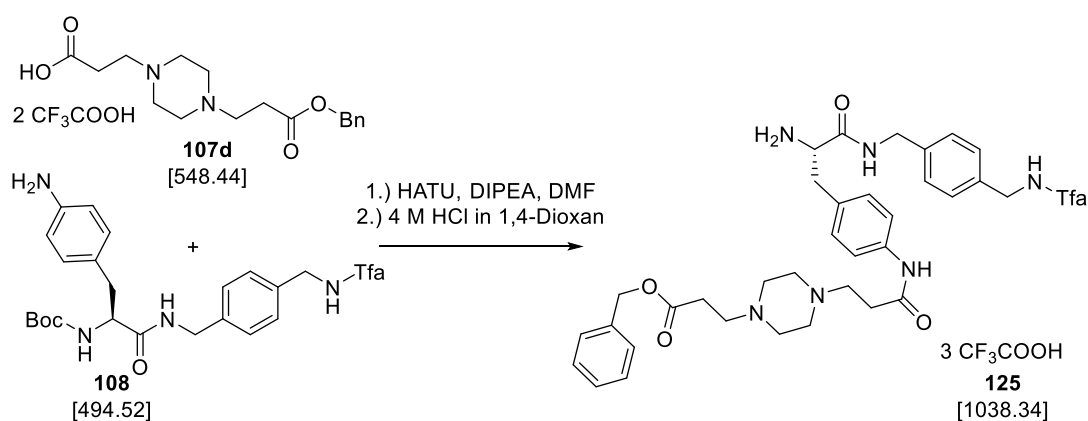
In diesem Abschnitt werden die Synthesen der Inhibitoren **I7** und **I8** beschrieben, die mittels eines *N,N'*-Piperazinyldicarbonsäureamid-Linkers zwischen den P4- und P2-Resten zyklisiert sind. Zusätzlich werden die erfolglosen Syntheseveruche zu den Analoga **137** und **138** gezeigt.

H-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OBn)-p-Xda-Tfa, × 3 TFA (**110**)

s. Abschnitt 6.14.3.

H-Phe(4-NH-Prop-Piz-Prop-OBn)-p-Xda-Tfa × 3 TFA (**125**)

Benzyl (S)-3-(4-(3-((4-(2-amino-3-oxo-3-((4-(2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)propanoate



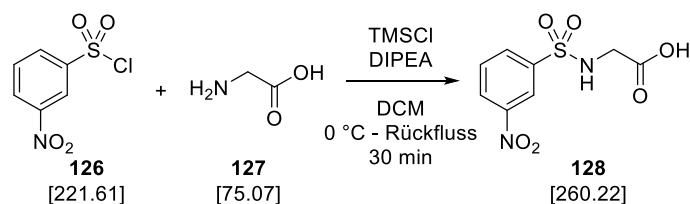
Die Carboxylkomponente **107d** (350 mg, 0.64 mmol, 1 eq), das Boc-geschützte Anilin-Derivat **108** (312 mg, 0.64 mmol, 1 eq.) und DIPEA (560 μ L, 3.15 mmol, 5 eq.) wurden unter Eiskühlung in 5 mL DMF gelöst, in einer Portion mit HATU (268 mg, 0.7 mmol, 1.1 eq.) versetzt und über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Kupplungsprodukt (HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 24.93 min) mit 5 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan versetzt und für 1 h bei RT schwach gerührt. Das Produkt wurde mit DEE gefällt, *in vacuo* getrocknet und mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 500 mg als farbloses Lyophilisat, 0.48 mmol, 75 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 14.74 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 696.32, m/z: 697.30 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.24 (s, 1H), 10.01 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.82 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.24 (s, 3H), 7.52 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.44 - 7.26 (m, 5H), 7.20 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.15 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.10 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.35 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.23 (d, ³J = 5.3 Hz, 2H), 3.43 (m, 5H), 3.3 - 2.6 (bm, 12H, enthält: 3.05 (bs), 2.99 (t, ³J = 7.1 Hz), 2.85 (bs, ³J = 7.3 Hz), 2.76 (bs).

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren 17 und 18 / Verbindungen 137 und 138

3-NO₂-Phs-Gly-OH (128)

((3-nitrophenyl)sulfonyl)glycine



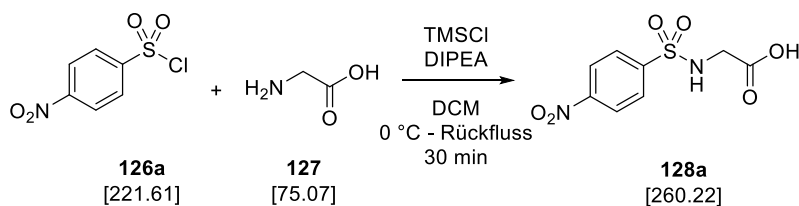
Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C hergestellt. Dabei wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Glycin (**127**, 339 mg, 4.52 mmol, 1 eq.), TMSCl (1078 mg, 9.94 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (1.73 mL, 9.94 mmol, 2.2 eq.) und 11 mL DCM sowie 3-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (**126**, 1000 mg, 4.51 mmol, 1 eq., gelöst in 11 mL DCM). Nach wässrig-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 836 mg, 3.21 mmol, 71 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 11.73 min, Reinheit > 98 %. **MS (ESI, negativ):** ber.: 260.01, m/z: 259.06 [M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.71 (s, 1H), 8.57 - 8.53 (m, 1H), 8.51 - 8.42 (m, 2H), 8.26 - 8.16 (m, 1H), 7.88 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H), 3.70 (d, ³J = 4.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.10, 147.73, 142.53, 132.60, 131.04, 126.92, 121.45, 43.74.

4-NO₂-Phs-Gly-OH (128a)

((4-nitrophenyl)sulfonyl)glycine



Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C hergestellt. Dabei wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Glycin (**127**, 339 mg, 4.52 mmol, 1 eq.), TMSCl (1078 mg, 9.94 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (1.73 mL, 9.94 mmol, 2.2 eq.) und 11 mL DCM sowie 4-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (**126a**, 1000 mg, 4.52 mmol, 1 eq., gelöst in 11 mL DCM). Nach wässrig-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde der Rückstand mittels präparativer MPLC gereinigt (40 g Silicagel, DCM/MeOH (jeweils versetzt mit 1 % Ameisensäure), Start bei 0 % MeOH) und das Produkt als beiger FS erhalten. **Ausbeute:** 742 mg, 2.85 mmol, 63 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 12.50 min, Reinheit > 98 %. **MS (ESI, negativ):** ber.: 260.01, m/z: 259.04 [M-H]⁻.

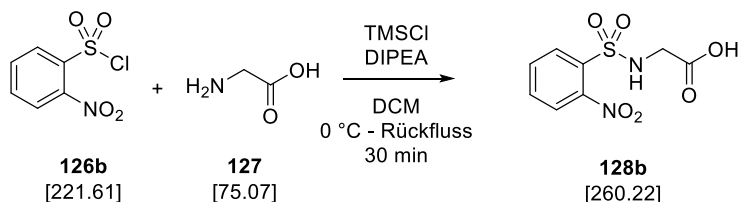
6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren 17 und 18 / Verbindungen 137 und 138

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.73 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.42 - 8.35 (m, 2H), 8.08 - 7.95 (m, 2H), 3.70 (s, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.04, 149.46, 146.48, 128.07, 124.31, 43.72.

2-NO₂-Phs-Gly-OH (128b)

((2-nitrophenyl)sulfonyl)glycine



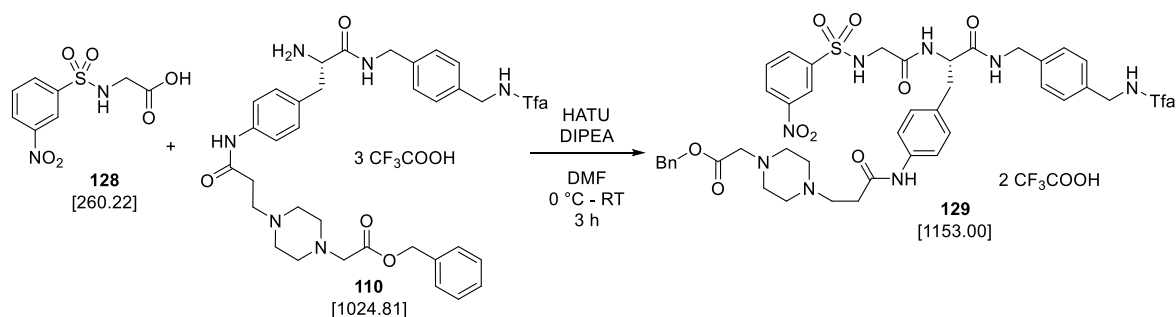
Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C hergestellt. Dabei wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Glycin (**127**, 339 mg, 4.52 mmol, 1 eq.), TMSCl (1078 mg, 9.94 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (1.73 mL, 9.94 mmol, 2.2 eq.) und 11 mL DCM sowie 2-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (**126b**, 1000 mg, 4.52 mmol, 1 eq., gelöst in 11 mL DCM). Nach wässrig-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde das Produkt nicht weiter gereinigt und als beiger FS erhalten. **Ausbeute:** 1011 mg, 3.88 mmol, 86 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 12.50 min, Reinheit > 98 %. **MS (ESI, negativ):** ber.: 260.01, m/z: 259.04 [M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.73 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.42 - 8.35 (m, 2H), 8.08 - 7.95 (m, 2H), 3.70 (s, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.04, 149.46, 146.48, 128.07, 124.31, 43.72.

3-NO₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OBn)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (129)

Benzyl (S)-2-(4-(3-((4-(2-(2-((3-nitrophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetate



Die Carboxylkomponente **128** (55 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), die Aminokomponente **110** (218 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) und DIEPA (183 µL, 1.05 mmol, 5 eq.) wurden in 15 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HATU (80 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) in einer Portion zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0 °C und für 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Produkt wurde

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren 17 und 18 / Verbindungen 137 und 138

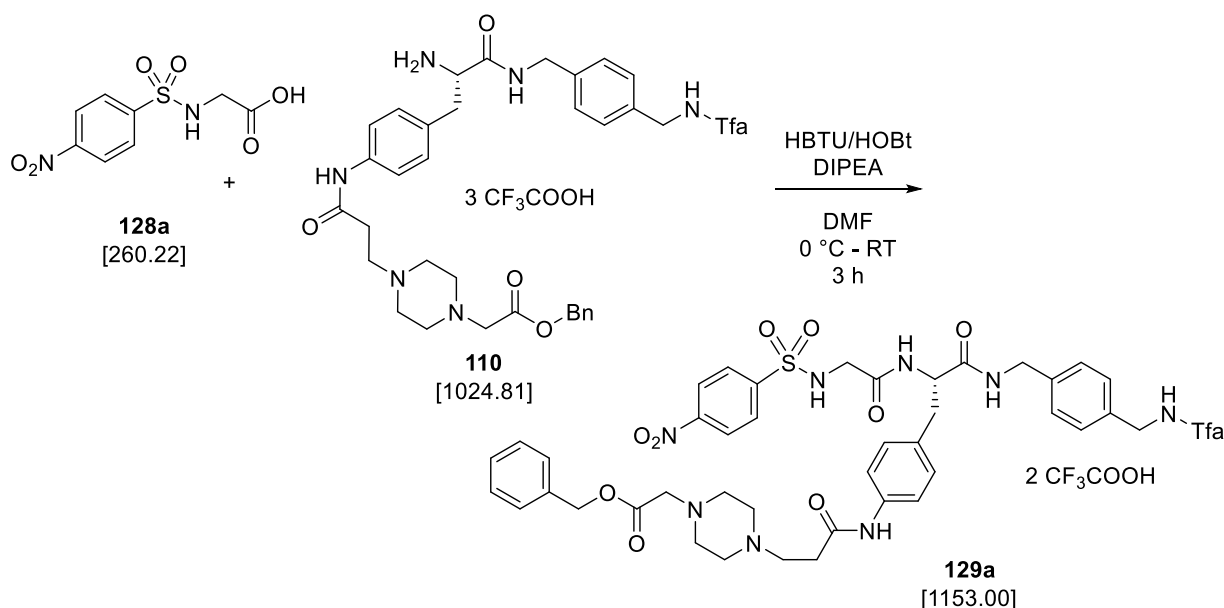
als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 197 mg, 0.17 mmol, 81 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 40 % B, 12.2 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 924.31, m/z: 925.29 [M+H]⁺. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 28.41 min, Reinheit > 99 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.07 (s, 1H), 9.95 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.53 (t, ⁴J = 1.9 Hz, 1H), 8.45 - 8.41 (m, 2H), 8.30 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 8.15 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 8.12 (ddd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.7, 1.0 Hz, 1H), 7.81 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.45 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.38 (m, 5H), 7.19 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.13 - 7.08 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.35 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.21 (m, 2H), 3.65 - 3.45 (bm, enthält bs von Piperazin, 3.60, dd, ²J = 16.6 Hz, ³J = 6 Hz; 3.50, dd, ²J = 16.6 Hz, ³J = 6.3 Hz sowie protoniertes Wasser), 3.17 - 2.99 (m, 4H), 2.88 (m, 1H), 2.81 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 2.76 - 2.62 (m, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.42, 156.26 (pd, ²J_{C-F} = 36.6 Hz), 147.69, 142.11, 138.14, 137.05, 135.91, 135.83, 132.57, 130.91, 129.38, 128.242, 128.10, 128.00, 127.33, 127.21, 126.88, 121.49, 119.41, 118.93, 115.97 (pd, ¹J_{C-F} = 288.4 Hz), 65.57, 56.69, 53.96, 51.62, 51.33, 48.29, 44.79, 42.33, 41.71, 40.11, 37.32.

4-NO₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OBn)-p-Xda-Tfa × 2 Tfa (129a)

(S)-3-(4-(3-((4-(2-(2-((3-aminophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)propanoic acid



Die Carboxylkomponente **128a** (76 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) und DIEPA (253 µL, 1.44 mmol, 5 eq.) wurden in 10 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurden HBTU (122 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) und HOBt (44 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) in jeweils einer Portion zugegeben und die Mischung für 10 min bei 0 °C gerührt. Dann wurde die Aminokomponente **110** (300 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) hinzugegeben und die erhaltene Lösung für 50 min bei 0 °C sowie für 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 87 mg als farbloses Lyophilisat, 0.075 mmol, 26 %.

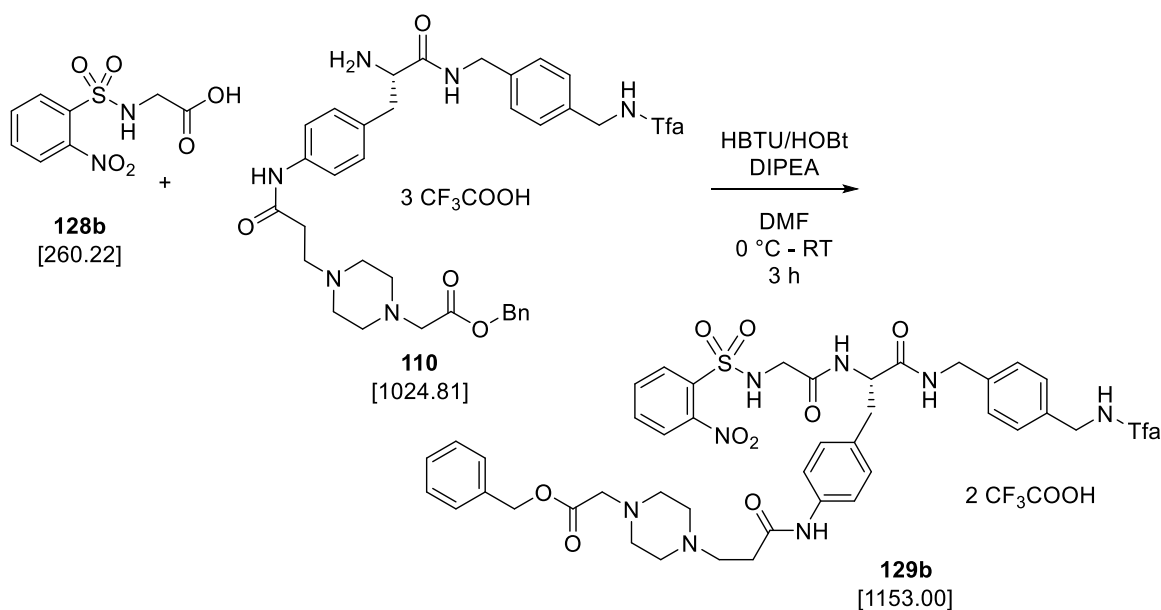
6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren 17 und 18 / Verbindungen 137 und 138

HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 28.20 min, Reinheit: > 96 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 924.31, m/z: 925.34 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.13 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 8.45 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.37 - 8.28 (m, 3H), 8.18 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H), 7.96 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H), 7.46 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.42 - 7.31 (m, 5H), 7.19 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.11 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 4.41 - 4.30 (m, 3H), 4.29 - 4.14 (m, 2H), 3.62 (dd, ²J = 16.7 Hz, ³J = 5.9 Hz, 1H), 3.53 - 3.34 (m, 9 H), 3.04 (br, 4H), 2.90 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H), 2.82 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H), 2.69 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.0 Hz, 1H).

2-NO₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OBn)-p-Xda-Tfa × 2 Tfa (129b)

Benzyl (S)-2-(4-(3-((4-(2-(2-((2-nitrophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetate

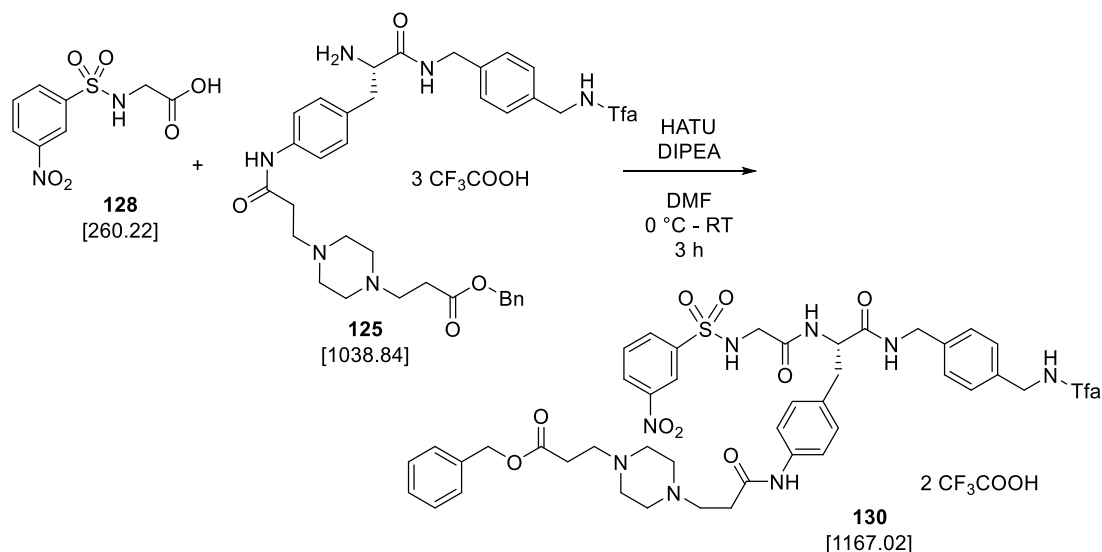


Die Carboxylkomponente **128b** (76 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) und DIEPA (253 μ L, 1.44 mmol, 5 eq.) wurden in 10 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurden HBTU (122 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) und HOBt (44 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) in jeweils einer Portion zugegeben und die Mischung für 10 min bei 0 °C gerührt. Dann wurde die Aminokomponente **110** (300 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) hinzugegeben und die erhaltene Lösung 50 min bei 0 °C und 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 206 mg als farbloses Lyophilisat, 0.18 mmol, 61 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 28.20 min, Reinheit: > 96 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 924.31, m/z: 925.64 [M+H]⁺.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
 6.14.4. Inhibitoren 17 und 18 / Verbindungen 137 und 138

3-NO₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Prop-OBn)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (130)

Benzyl (S)-3-(4-(3-((4-(2-(2-((3-nitrophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)propanoate



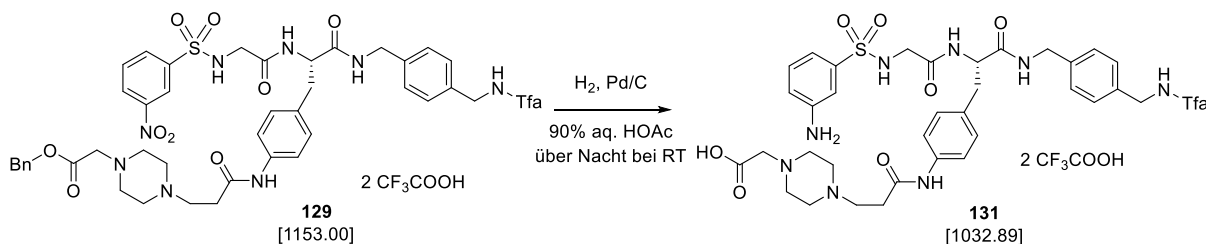
Die Carboxylkomponente **128** (75 mg, 0.29 mmol, 1 eq.), die Aminokomponente **125** (300 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) und DIEPA (252 μ L, 1.44 mmol, 5 eq.) wurden in 10 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) in einer Portion zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0 °C und für 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 218 mg als farbloses Lyophilisat, 0.19 mmol, 65 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 25.54 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 938.32, m/z: 939.34 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.05 (s, 1H), 9.95 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.53 (t, ³J = 1.9 Hz, 1H), 8.45 - 8.41 (m, 2H), 8.30 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 8.15 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 8.13 (ddd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.81 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.45 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.41 - 7.31 (m, 5H), 7.19 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.11 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 4.39 (td, ³J = 8.5 Hz, 5.5 Hz, 1H), 4.35 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.21 (m, 2H), 3.60 (dd, ²J = 16.6 Hz, ³J = 6.0 Hz, 1H), 3.50 (dd, ²J = 16.6 Hz, ³J = 6.2 Hz, 1H), 3.29 (bs, 4H), 3.11 (bs, 4H), 2.92 - 2.85 (m, 1H), 2.82 - 2.72 (m, 5H), 2.72 - 2.64 (m, 1H).

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren 17 und 18 / Verbindungen 137 und 138

3-NH₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OH)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (131)

(S)-2-(4-(3-((4-(2-(2-((3-aminophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetic acid



Das benzylgeschützte Nitroderivat **129** (197 mg, 0.17 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 165 mg, 0.16 mmol, 94 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 10.69 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 804.29, m/z: 805.17 [M+H]⁺.

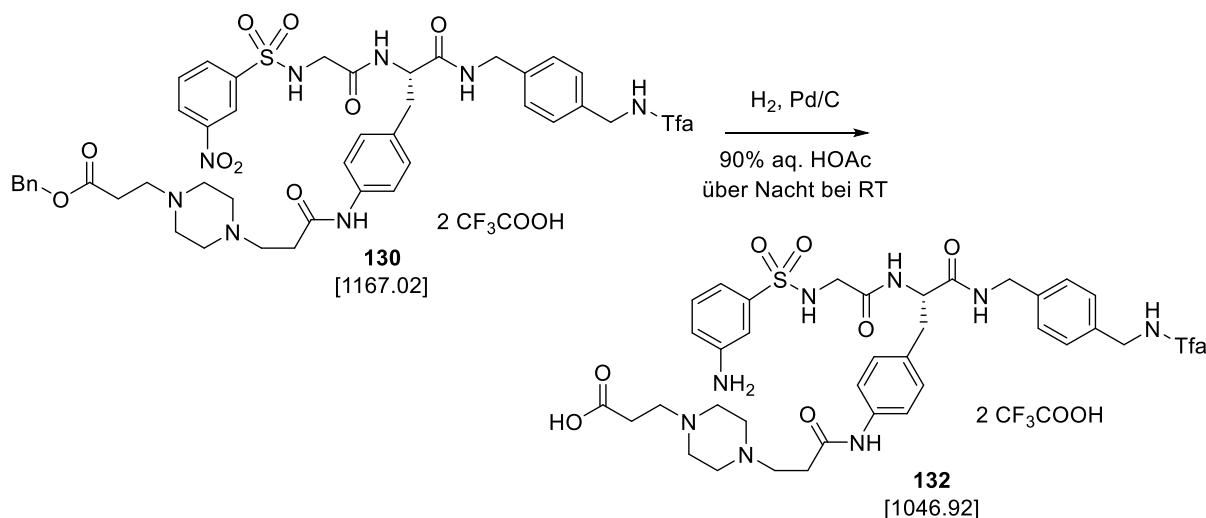
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.07 (s, 1H), 9.93 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.43 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 7.99 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.65 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 7.43 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.18 - 7.14 (m, 3H), 7.10 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.09 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.99 (t, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 6.88 (ddd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.7, 0.9 Hz, 1H), 6.77 (ddd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 2.3, 0.9 Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.32 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.20 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 3.53 (s, 2H), 3.43 - 3.25 (m, 4H), 3.30 (br, 4H), 3.02 (br, 4H), 2.90 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H), 2.77 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H), 2.72 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 8.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 170.50, 169.99, 167.65, 167.29, 158.26 (q, ²J_{C-F} = 36.2 Hz), 156.30 (q, ²J_{C-F} = 36.1 Hz), 148.33, 140.47, 138.17, 137.13, 135.94, 132.57, 129.57, 129.45, 127.37, 127.27, 119.44, 119.18, 118.97, 117.93, 117.14, 116.86, 114.85, 114.54, 113.98, 112.56, 112.22, 111.70, 56.24, 53.99, 51.69, 50.42, 48.57, 45.20, 42.35, 41.80, 37.31, 30.65. Die beiden durch den Trifluoroacetyl-Rest und TFA verursachten Quartetts im Bereich zw. ca. 120 und ca. 110 ppm konnten nicht eindeutig identifiziert werden. In diesem Bereich wurden die Einzelsignale ohne Angabe von Multiplizitäten gelistet.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138

3-NH₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Prop-OH)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (132)

(S)-3-(4-(3-(4-(2-(2-((3-aminophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)propanoic acid



Das benzylgeschützte Nitroderivat **130** (218 mg, 0.19 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 92 mg, 0.09 mmol, 47 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 10.84 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 818.87, m/z: 819.26 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.08 (s, 1H), 9.96 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.47 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.02 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H), 7.47 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.22 - 7.18 (m, 3H), 7.16 - 7.11 (m, 4H), 7.01 (t, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 6.92 - 6.89 (m, 1H), 6.79 (ddd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 0.9 Hz, 1H), 4.49 (td, ³J = 8.5 Hz, 5.4 Hz, 1H), 4.35 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.23 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 3.40 (dd, ²J = 16.4 Hz, ³J = 5.9 Hz, 1H), 3.50 - 3.10 (bm, 13 H, enthält: 3.32 (dd, ²J = 16.4 Hz, ³J = 6.2 Hz), 3.28 (bs), 3.23 - 3.15 (m), 3.19 (bs)), 2.94 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H), 2.80 - 2.72 (m, 3H), 2.66 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H).

c[3-(NH-Ac-Piz-Prop)-Phs-Gly-Phe(4-NH)]-p-Xda-Tfa (133)

Die Synthese wird zusammen mit der Verbindung **I7** beschrieben.

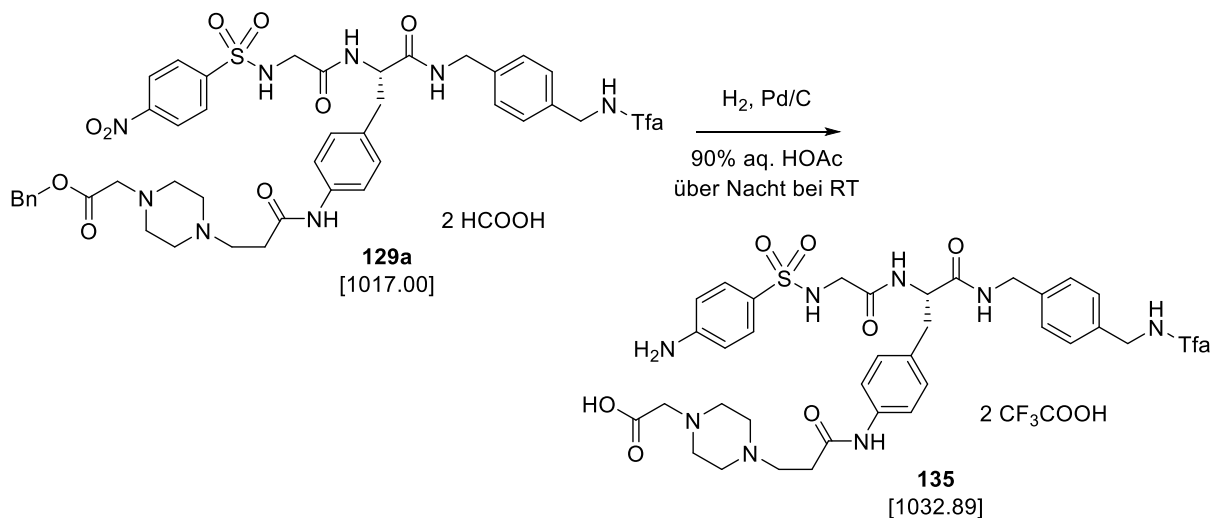
c[3-(NH-Prop-Piz-Prop)-Phs-Gly-Phe(4-NH)]-p-Xda-Tfa (134)

Die Synthese wird zusammen mit der Verbindung **I8** beschrieben.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138

4-NH₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OH)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (135)

(S)-2-(4-(3-((4-(2-(2-((4-aminophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetic acid



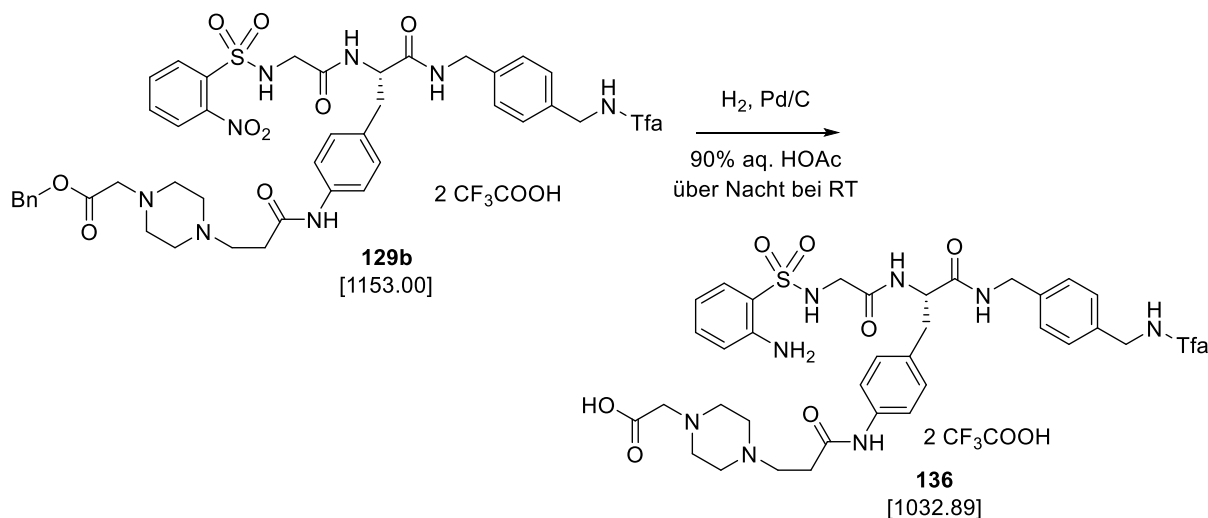
Das benzylgeschützte Nitroderivat **129a** (115 mg, 0.11 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 59 mg, 0.057 mmol, 51 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 12.17 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 804.29, m/z: 805.34 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.10 (s, 1H), 9.96 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.45 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 7.97 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.46 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.43 - 7.31 (m, 3H), 7.20 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.15 - 7.09 (m, 4H), 6.60 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 4.48 (dt, ³J = 8.5, 4.2 Hz, 1H), 4.35 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.23 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 3.60 - 2.70 (m, 15H, enthält u.a.: 3.56 (s), 3.38 (t, ³J = 6.9 Hz), 3.05 (br), 2.94 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 5.2 Hz), 2.80 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H), 2.76 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 8.7 Hz, 1H).

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138

2-NH₂-Phs-Gly-Phe(4-NH-Prop-Piz-Ac-OH)-p-Xda-Tfa × 2 TFA (136)

(S)-2-(4-(3-((4-(2-(2-((2-aminophenyl)sulfonamido)acetamido)-3-oxo-3-((4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)amino)propyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)piperazin-1-yl)acetic acid



Das benzylgeschützte Nitroderivat **129b** (126 mg, 0.11 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 72 mg, 0.070 mmol, 63 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 15.32 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 804.29, m/z: 805.32 [M+H]⁺.

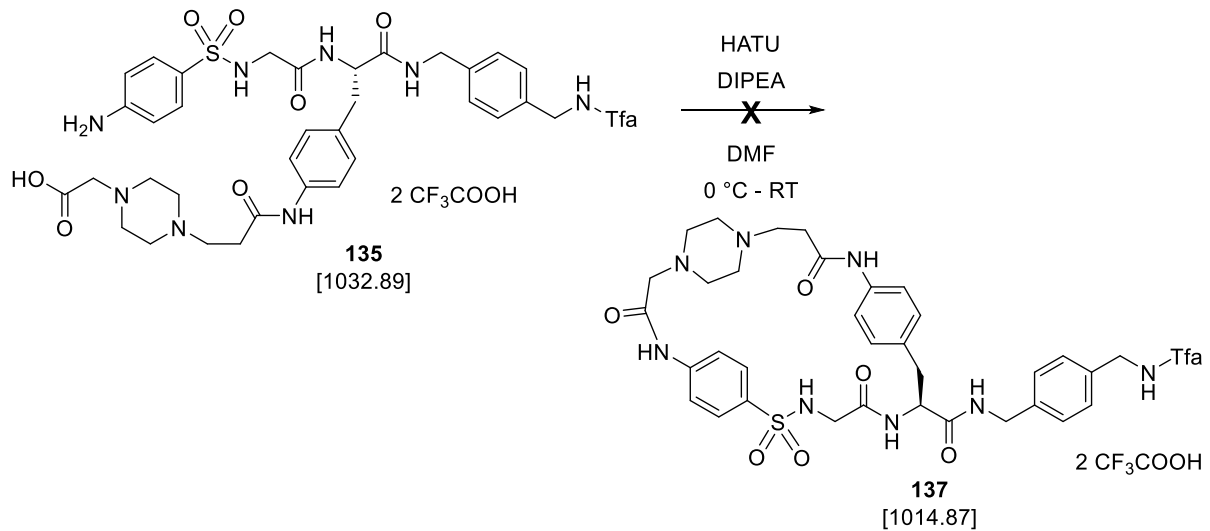
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.06 (s, 1H), 9.93 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.41 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.02 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.68 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 7.45 - 7.40 (m, 3H, enthält: 7.42 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.22 (ddd, ³J = 8.6 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H), 7.16 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.11 - 7.03 (m, 4H), 6.77 (dd, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 1H), 6.56 (ddd, ³J = 8.1 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1H), 4.44 (td, ³J = 8.6 Hz, 5.5 Hz, 1H), 4.32 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.19 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 3.50 - 2.50 (bm, 18H, enthält: 3.44 (s), 3.30 (m), 2.95 (br), 2.90 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 5.2 Hz), 2.76 (t, ³J = 7.0 Hz, 4H), 2.69 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 8.9 Hz)).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.04, 158.73 (pd, ²J_{C-F} = 34.6 Hz), 158.32, 156.86 (pd, ²J_{C-F} = 36.1 Hz), 146.87, 138.75, 137.69, 136.49, 134.18, 133.13, 129.98, 129.65, 127.81, 119.70, 119.53, 117.54, 115.56, 70.26, 66.61, 57.05, 54.61, 51.35, 49.21, 45.13, 42.91, 42.34. Nicht alle erwarteten Signale konnten klar vom Untergrund unterschieden werden.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren 17 und 18 / Verbindungen 137 und 138

c[4-(NH-Ac-Piz-Prop)-Phs-Gly-Phe(4-NH)]-p-Xda-Tfa (137)

(S)-3,8,14-trioxo-N-(4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)-17-thia-2,9,13,16-tetraaza-5(1,4)-piperazina-1,10(1,4)-dibenzenacycloheptadecaphane-12-carboxamide 17,17-dioxide

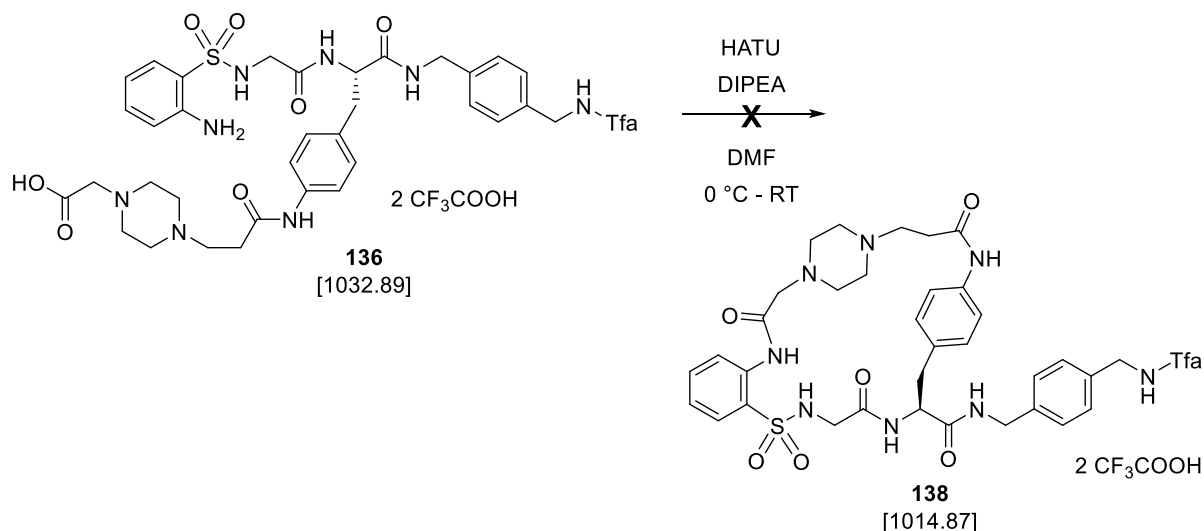


Die Zyklisierung der Verbindung **135** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E verlief nicht erfolgreich. Nach der ersten HATU-Zugabe wurde insgesamt viermal je 1 eq. HATU und DIPEA nachdosiert, bis in der HPLC kein Edukt mehr nachweisbar war. Es wurde eine Vielzahl an Nebenprodukten erhalten. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurden die Hauptprodukte mittels präparativer HPLC isoliert. Bei der massenspektrometrischen Analyse der erhaltenen Fraktionen konnte das Zyklisierungsprodukt **137** nicht nachgewiesen werden. Der Ansatz wurde verworfen.

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138

c[2-(NH-Ac-Piz-Prop)-Phs-Gly-Phe(4-NH)]-p-Xda-Tfa (138)

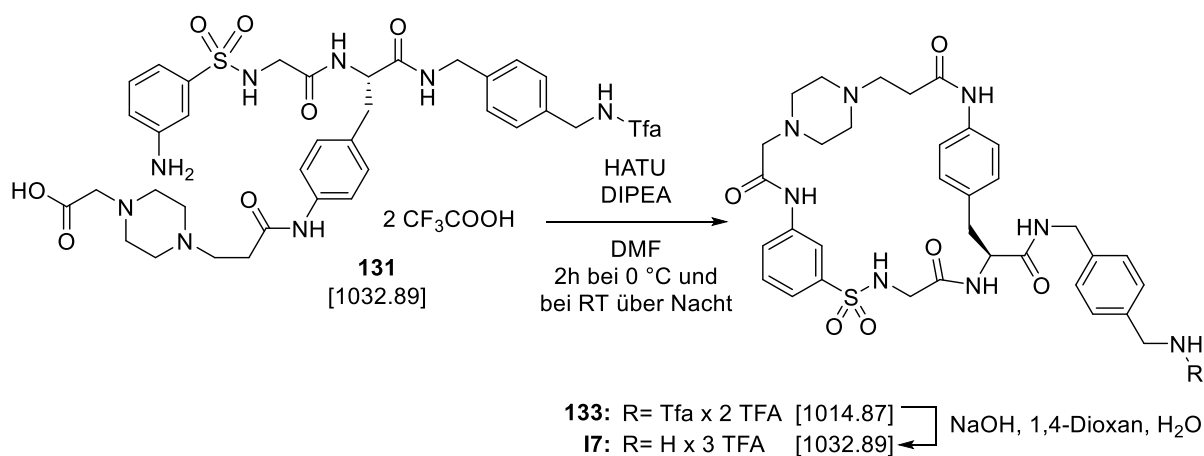
(S)-3,8,14-trioxo-N-(4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)benzyl)-17-thia-2,9,13,16-tetraaza-5(1,4)-piperazina-1(1,2),10(1,4)-dibenzencycloheptadecaphane-12-carboxamide 17,17-dioxide



Die Zyklisierung der Verbindung **136** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E verlief nicht erfolgreich. Nach der ersten HATU-Zugabe wurde insgesamt dreimal je 1 eq. HATU und DIPEA nachdosiert, bis in der HPLC kein Edukt mehr nachweisbar war. Es wurde eine Vielzahl an Nebenprodukten erhalten. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde der Rückstand massenspektrometrisch untersucht. Das Zyklisierungsprodukt konnte nicht nachgewiesen werden.

c[3-(NH-Ac-Piz-Prop)-Phs-Gly-Phe(4-NH)]-p-Xda × 3 TFA (I7)

(S)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-3,8,14-trioxo-17-thia-2,9,13,16-tetraaza-5(1,4)-piperazina-1(1,3),10(1,4)-dibenzencycloheptadecaphane-12-carboxamide 17,17-dioxide



Das offenkettige Intermediat **131** (151 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E unter Verwendung von HATU (63 mg, 0,17 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (131 µL, 0.75 mmol, 5 eq.) in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo*

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138

entfernt und der erhaltene RS mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Tfa-geschützte Zwischenprodukt **133** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 74 mg, 0.07 mmol, 50 %. HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 16.85 min, Reinheit > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 786.28, m/z: 787.18 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.17 (m, 2H), 9.98 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.60 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.06 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 7.99 (bs, 1H), 7.96 - 7.80 (m, 2H), 7.55 (t, ³J = 7.9 Hz, 1H), 7.51 - 7.48 (m, 1H), 7.46 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.29 - 7.22 (m, 4H), 7.16 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 4.47 (ddd, ²J = 11.8 Hz, ³J = 8.6 Hz, 3.2 Hz, 1H), 4.37 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 4.31 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H), 3.6 - 2.9 (bm, 14H, enthält: 3.45 (dd, ²J = 16.1 Hz, ³J = 6.7 Hz), 3.37 (bs), 3.08 (bs), 3.05 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 2.9 Hz), 2.99 (dd, ²J = 16.1 Hz, ³J = 5.2 Hz)), 2.81 - 2.62 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.03, 168.44, 167.04, 158.19 (q, ²J_{C-F} = 34.7 Hz), 156.28 (q, ²J_{C-F} = 36.1 Hz), 140.47, 138.66, 138.33, 136.93, 136.03, 132.93, 129.81, 129.43, 127.41, 127.31, 123.55, 121.65, 119.34, 118.31, 117.31, 117.13, 114.97, 114.84, 112.54, 54.20, 51.40, 49.07, 44.58, 41.84, 36.97, 31.15. Die beiden zwischen ca. 130 und ca. 110 ppm erwarteten Quartetts, die durch den Trifluoracetyl-Rest und Tfa verursacht werden, konnten nicht klar identifiziert werden. Daher wurden die einzelnen Signale ohne Angabe von Multiplizitäten gelistet.

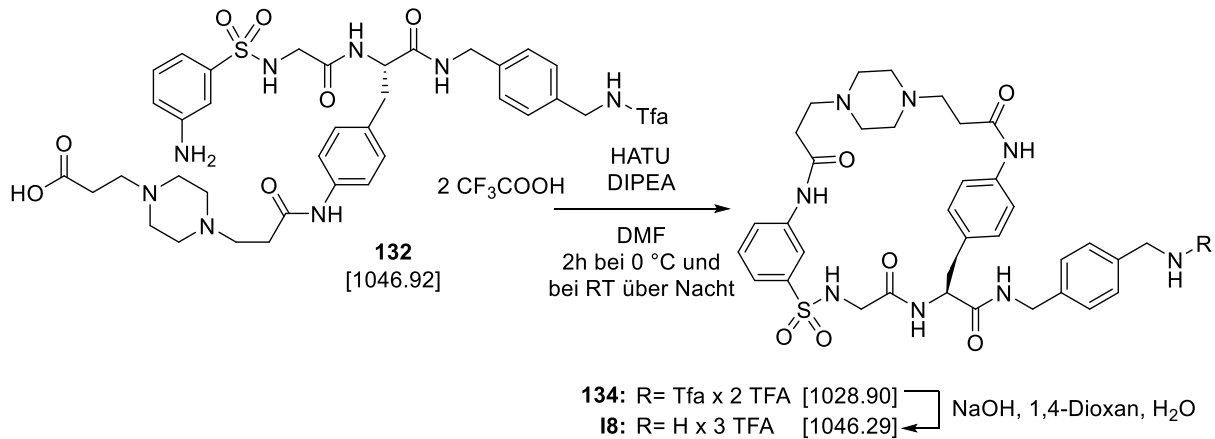
Die Tfa-Gruppe des zyklisierten Intermediats **133** (61 mg, 0.06 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten und der finale Inhibitor **I7** nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 53 mg, 0.05 mmol, 85 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 14.51 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 690.29, m/z: 691.36 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.30 - 10.21 (m, 2H), 8.68 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 8.19 (s, 3H), 8.08 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.55 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.53 - 7.45 (m, 1H), 7.47 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.41 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.32 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.16 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 4.48 (ddd, ²J = 11.7 Hz, ³J = 8.5, 3.3 Hz, 1H), 4.33 (m, 2H), 4.09 - 3.95 (m, 2H), 3.55 - 2.9 (bm, 14H, enthält: 3.45 (dd, ²J = 16.1 Hz, ³J = 7.1 Hz), 3.38 (bs), 3.11 - 2.92 (m), 3.02 (bs)), 2.75 (bs, 2 H), 2.67 (m, 2H).

6.14. Makrozyklische substratanaloge Inhibitoren (Teil A)
6.14.4. Inhibitoren I7 und I8 / Verbindungen 137 und 138

c[3-(NH-Prop-Piz-Prop)-Phs-Gly-Phe(4-NH)]-p-Xda × 3 TFA (I8)

(S)-N-(4-(aminomethyl)benzyl)-3,9,15-trioxo-12-thia-2,10,13,16-tetraaza-6(1,4)-piperazina-1(1,4),11(1,3)-dibenzenacyclooctadecaphane-17-carboxamide 12,12-dioxide



Das offenkettige Intermediat **132** (105 mg, 0.10 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E unter Verwendung von HATU (42 mg, 0.011 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (87µL, 0.50 mmol, 5 eq.) in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und der erhaltene RS mittels präparativer HPLC gereinigt (**134**, 53 mg, wegen geringer Reinheit keine Angabe der Ausbeute, HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 15.00 min, Reinheit > 84 %). Die Tfa-Gruppe des geschützten Intermediats wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten und der finale Inhibitor **I8** nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute**: 11 mg, 0.011 mmol, 10 % über zwei Stufen. **HPLC**: Methode B, Start bei 10 % B, 13.93 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv)**: ber.: 705.20, m/z: 727.14 [M+Na]⁺

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)

In diesem Kapitel wird die Herstellung der makrozyklischen Txa-konjugierten Inhibitoren und ihrer Vorstufen beschrieben.

6.15.1. Nomenklatur und häufig verwendete Abkürzungen

Zur Erläuterung der Nomenklatur wird in **Abbildung 52** exemplarisch eine Auswahl an Verbindungen gezeigt, die gemäß der im folgenden Kapitel verwendeten Kurzschreibweise benannt sind.

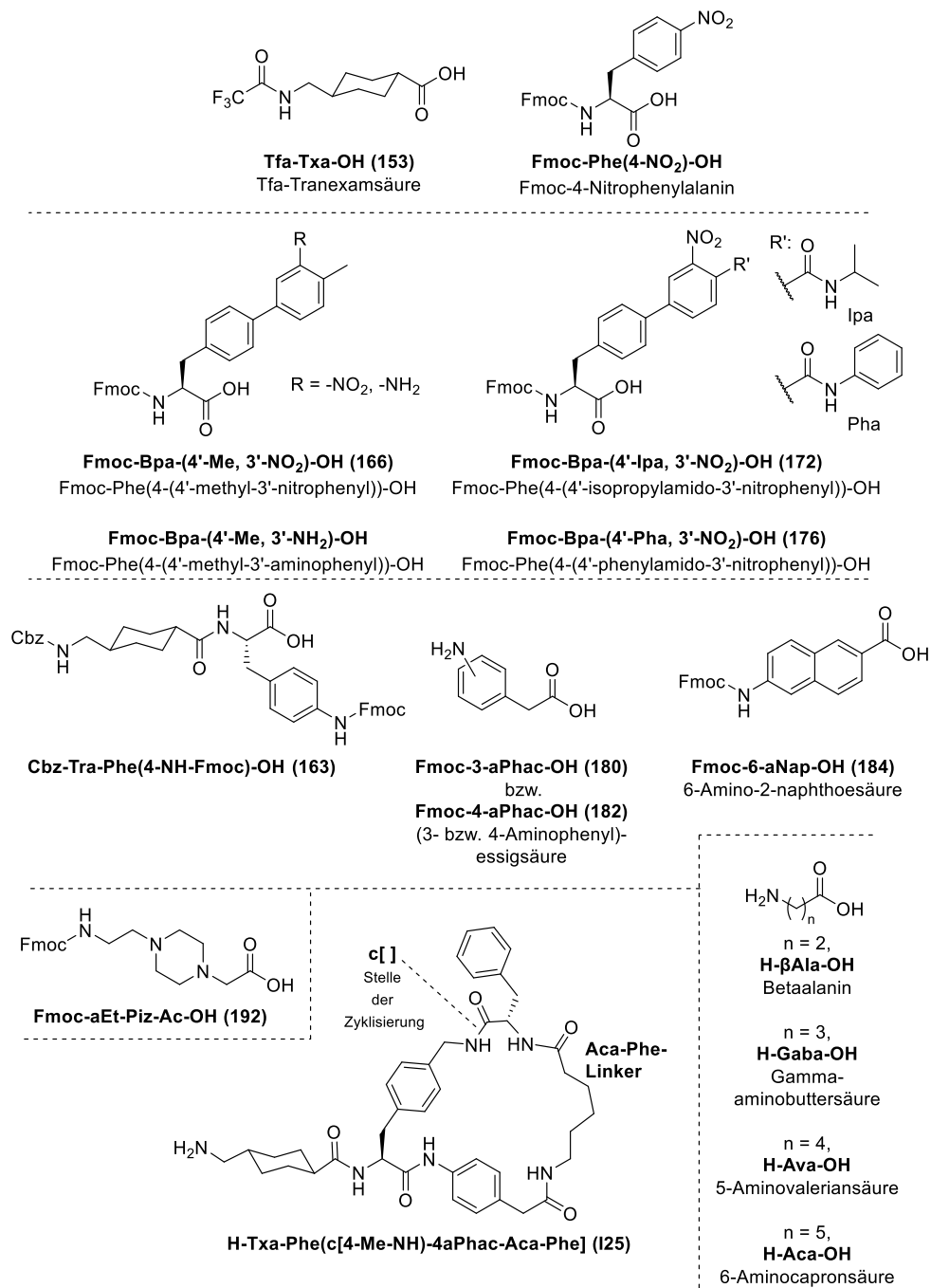


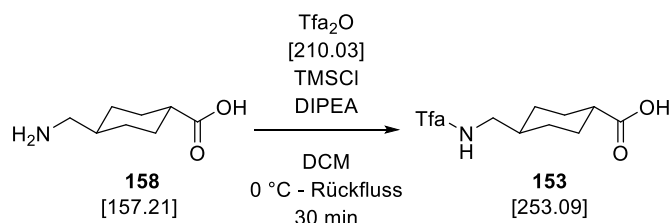
Abbildung 52: Strukturen und Benennung ausgewählter Verbindungen des Teils B.

6.15.2. Geschützte Txa-Derivate

Die in diesem Abschnitt beschriebenen geschützten Txa-Bausteine wurden sowohl zum Einbau in P1-Position als auch im Linkersegment des Inhibitors **I29** verwendet.

Tfa-Tranexamsäure (Tfa-Txa-OH, **153**)

(1r,4r)-4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid



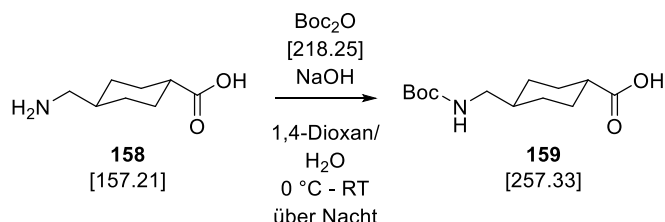
Die Verbindung **153** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C hergestellt. Dabei wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Tranexamsäure (**158**, 2.00 g 12.72 mmol, 1 eq.), TMSCl (3.04 g, 28 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (4.9 mL, 13.8 mmol, 2.2 eq.) und 30 mL DCM sowie Trifluoacetanhydrid (2.94 g, 14 mmol, 1.1 eq., gelöst in 8 mL DCM). Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. **Ausbeute:** 2.95 g, 11.68 mmol, 92 %. **MS (ESI, negativ):** ber.: 253.09, m/z: 252.14 [M-H]⁻.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 11.96 (s, 1H), 9.36 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 3.03 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 2.12 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.1 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.6 Hz, 1H), 1.89 (pdd, ³J_{ax-ax} = 13.8 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.3 Hz, 2H), 1.70 (dd, ³J_{ax-ax} = 13.7 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.2 Hz, 2H), 1.55 - 1.39 (m, 1H), 1.25 (qd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 3.4 Hz, 2H), 0.93 (qd, ²J = 13.2 Hz, ³J = 3.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 176.51, 156.29 (q, ²J_{C-F} = 35.9 Hz), 44.99, 42.28, 36.30, 29.14, 28.06.

Boc-Tranexamsäure (Boc-Txa-OH, **159**)

(1r,4r)-4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid



Tranexamsäure (**158**, 500 mg, 3.18 mmol, 1 eq.) wurde in 10 mL 1,4-Dioxan gelöst und mit 6.4 mL 1 M aq. Natronlauge versetzt (256 mg NaOH, 6.4 mmol, 2 eq.). Die Mischung wurde in einem Eisbad gekühlt. Dann wurde Boc₂O (764 mg, 3.5 mmol, 1.1 eq.) in einer Portion zugegeben und der Ansatz unter Eiskühlung für 90 min gerührt. Der pH-Wert wurde mehrfach

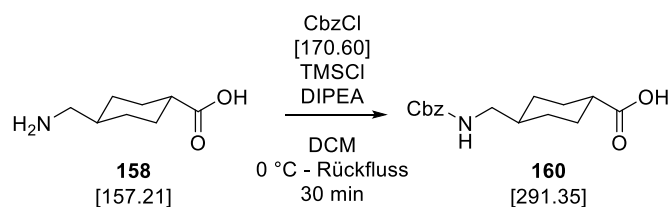
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.2. Geschützte Txa-Derivate

kontrolliert und durch Zugabe mehrerer Dosierungen von insgesamt 1.5 mL Natronlauge (60 mg NaOH, 1.5 mmol, ca. 0.5 eq.) zwischen 9 und 10 gehalten. Es wurde über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Dann wurde mit 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. angesäuert und das LM *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst und wässrig-sauer sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten und ohne weitere Reinigung verwendet. **Ausbeute:** 781 mg, 3.04 mmol, 96 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 257.16, m/z: 258.18 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 11.93 (s, 1H), 6.75 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 2.76 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 2.09 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.1 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.6 Hz, 1H), 1.92 - 1.82 (m, 2H), 1.72 - 1.62 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.33-1.17 (m, 3H), 0.86 (qd, ^{2,3}J = 13.1 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.3 Hz, 2H).

Cbz-Tranexamsäure (Cbz-Txa-OH, 160)

(1r,4r)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid



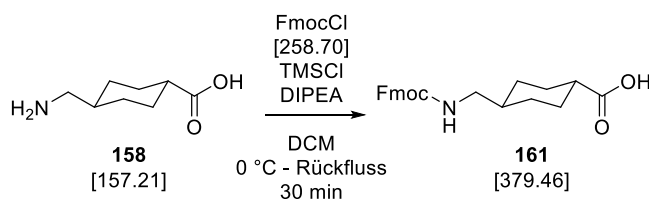
Die Verbindung **160** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C hergestellt. Dabei wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Tranexamsäure (**158**, 1.00 g, 6.36 mmol, 1 eq.), TMSCl (1.52 g, 14 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (2.8 mL, 16 mmol, 2.5 eq.) und 25 mL DCM sowie CbzCl (1.09 mg, 6.36 mmol, 1 eq., gelöst in 5 mL DCM). Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. **Ausbeute:** 1.59 g, 5.46 mmol, 86 %. **HPLC:** Methode A, 22.47 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 291.15, m/z: 292.14 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 11.95 (s, 1H), 7.40 - 7.28 (m, 5H), 7.23 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 2.85 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H), 2.10 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.2 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.5 Hz, 1H), 1.93 - 1.84 (m, 2H), 1.77 - 1.66 (m, 2H), 1.40 - 1.18 (m, 3H), 0.95 - 0.81 (m, 2H).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

Fmoc-Tranexamsäure (Fmoc-Txa-OH, 161)

(1r,4r)-4-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid



Die Verbindung **161** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C hergestellt. Dabei wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Tranexamsäure (**158**, 350 mg 2.22 mmol, 1 eq.), TMSCl (556 mg, 5.11 mmol, 2.3 eq.), DIPEA (1.24 mL, 7.10 mmol, 3.2 eq.) und 10 mL DCM sowie FmocCl (547, 2.12 mmol, 0.95 eq., gelöst in 5 mL DCM). Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. **Ausbeute:** 715 mg, 1.88 mmol, 85 %. **HPLC:** Methode A, 28.92 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 379.18, m/z: 380.22 [M+H]⁺.

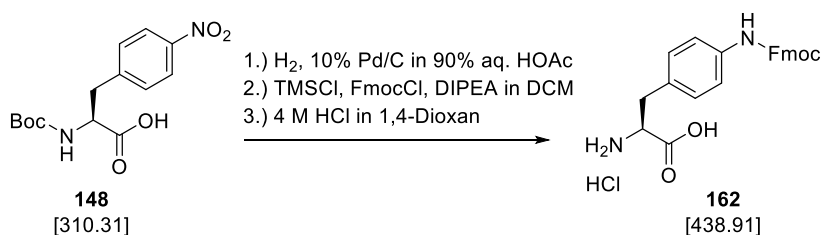
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

In diesem Abschnitt wird die Herstellung der P1'-Bausteine beschrieben.

6.15.3.1. Herstellung des *p*-substituierten Fmoc-Phe-Derivats 163

H-Phe(4-NH-Fmoc)-OH × HCl (162)

(S)-3-(4-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)phenyl)-2-aminopropanoic acid



Boc-Phe(4-NO₂)-OH (**148**, 1.26 g, 4.06 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Nach der Entfernung des LM wurde der erhaltene Rückstand in Wasser (versetzt mit 0.1 % (v/v)) TFA suspendiert und lyophilisiert. Das so erhaltene Anilin-Derivat (1.21 g, HPLC: Methode B, Start bei 10 % B, 12.75 min, MS (ESI, positiv): ber.: 280.14, m/z: 281.19 [M+H]⁺) wurde in 10 mL DCM suspendiert und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung von TMSCl (1.02 g, 9.34 mmol, 2.3 eq.), DIPEA (1.91 mL, 10.96 mmol, 2.7 eq.) und FmocCl (1.00 g, 3.86 mmol, 0.95 eq., gelöst in 10 mL DCM) umgesetzt. Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde das LM *in vacuo* entfernt. Die Boc-Schutzgruppe des doppelt geschützten Intermediats (HPLC: Methode B, Start bei 10 % B, 53.11 min) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten und die

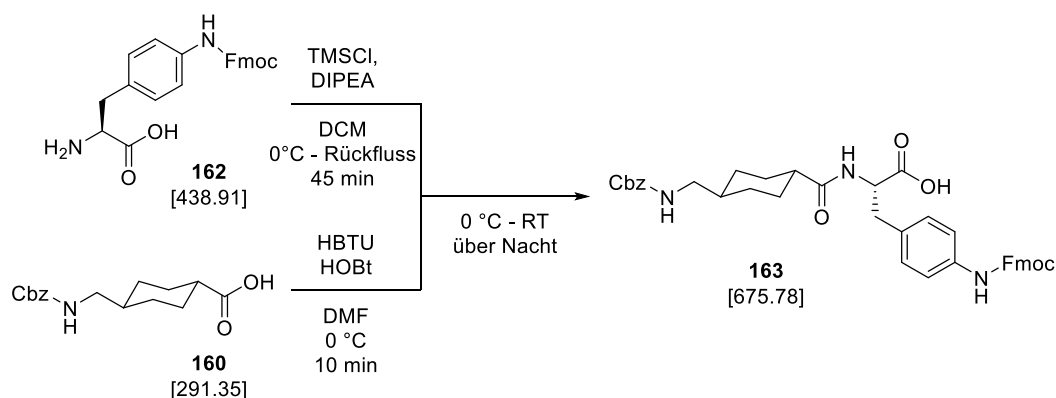
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

Seitenketten-geschützte Aminosäure **162** wurde als blassbrauner FS erhalten. **Ausbeute:** 1.13 g, 2.57 mmol, 77 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 30 % B, 14.97 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 402.16, m/z: 403.14 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 13.79 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.38 (s, 3H), 7.91 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.75 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.46 - 7.29 (m, 7H), 7.17 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 4.48 (d, ³J = 6.7 Hz, 2H), 4.30 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H), 4.09 (bs, 1H), 3.07 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H).

Cbz-Txa-Phe(4-NH-Fmoc)-OH (**163**)

(S)-3-(4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)phenyl)-2-((1*r*,4*S*)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)propanoic acid



Das Intermediat **162** (75 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) wurde in 2 mL DCM suspendiert, mit TMSCl (41 mg, 0.38 mmol, 2.2 eq.) versetzt und in einem Eisbad gekühlt. Daraufhin wurde langsam DIPEA (65 µL 0.37 mmol, 2.2 eq.) zugetropft, für 5 min bei 0 °C gerührt und für 45 min unter Rückfluss gekocht, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Parallel wurde in einem zweiten Reaktionsgefäß Cbz-Tranexamsäure (**160**, 50 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) in 2 mL DCM gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Nacheinander wurde DIPEA (59 µL, 0.34 mmol, 2 eq.), HOBT (23 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) und HBTU (65 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) zugegeben und für 10 min bei 0 °C gerührt. Zu der der aktivierten Carbonsäure **160** wurde dann die Lösung der silylierten Verbindung **162** in DCM binnen 5 min zugetropft. Es wurde über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Dann wurde das LM *in vacuo* entfernt und der Rückstand in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. aufgenommen. Die organische Phase wurde wässrig-sauer sowie wässrig-neutral aufgearbeitet und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer MPLC gereinigt (12g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 1 % Ameisensäure, Start bei 0 % MeOH) und das Produkt **163** als blassgelber FS erhalten. **Ausbeute:** 81 mg, 0.12 mmol, 71 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 54.70 min, Reinheit: > 96 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 675.29, m/z: 676.30 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.59 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 7.99 - 7.83 (m, 3H), 7.74 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.47 - 7.37 (m, 2H), 7.38 - 7.27 (m, 9H), 7.21 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 7.10 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 4.46 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H), 4.37 - 4.32 (m, 1H), 4.30 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H), 2.97 (dd, ²J = 14.0 Hz,

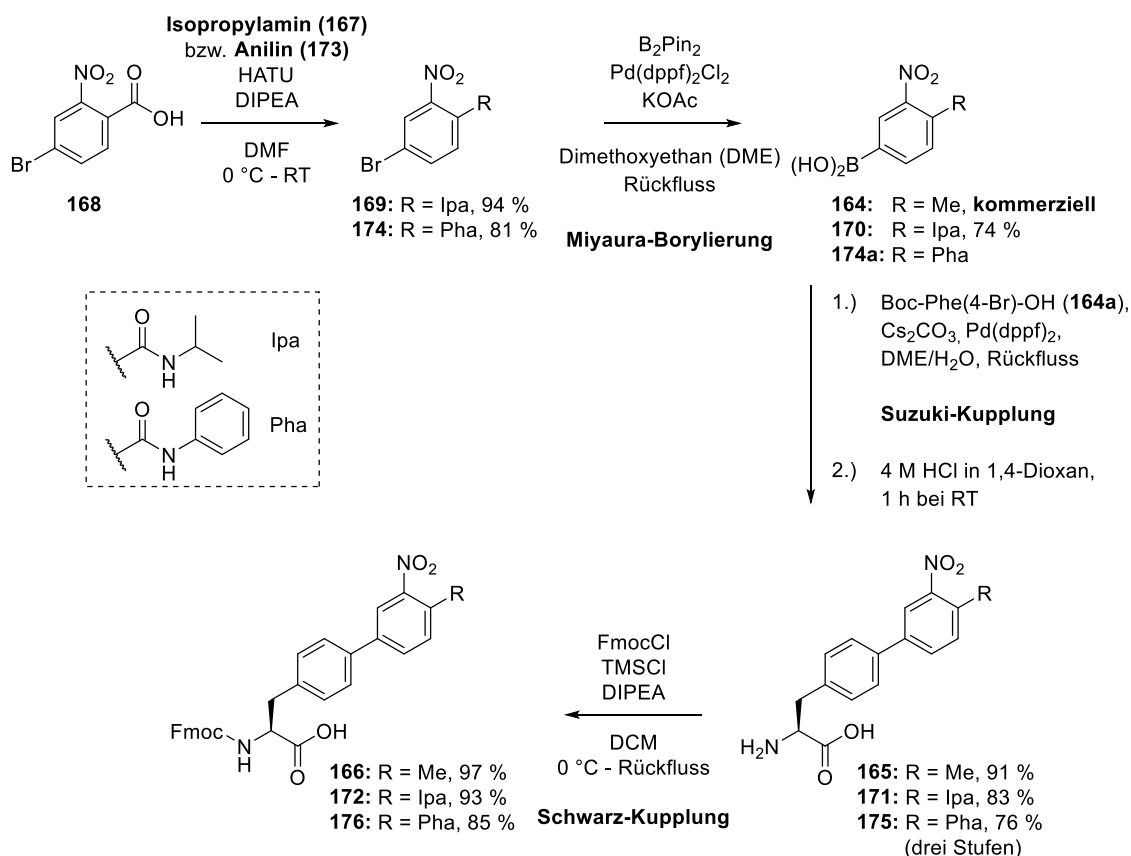
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

$^3J = 4.7$ Hz, 1H), 2.83 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H), 2.78 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 9.7$ Hz, 1H), 2.05 (tt, $^3J_{ax-ax} = 12.0$ Hz, $^3J_{ax-eq} = 3.2$ Hz, 1H), 1.75 - 1.53 (m, 4H), 1.36 - 1.11 (m, 3H), 0.91 - 0.77 (m, 2H).

6.15.3.2. Substituierte Biphenylalaninderivate

Bei der Inhibitorserie 5 wurden substituierte Biphenylalanin (Bpa)-Derivate in P1'-Position verwendet. Dafür wurden die zur SPPS benötigten Fmoc-geschützten Bausteine **166**, **172** und **176** gemäß **Schema 27** hergestellt.

Die Boronsäure **164** ist kommerziell erhältlich. Im Gegensatz dazu wurden die Boronsäuren **170** und **174a** ausgehend vom Edukt 4-Brom-2-nitrobenzoesäure (**168**) hergestellt. Zunächst wurde Isopropylamin (**167**) bzw. Anilin (**173**) an das Edukt gekuppelt (Verbindungen **169** bzw. **174**). Im nächsten Schritt wurde der Brom-Substituent mittels MIYAURO-Borylierung durch eine Boronsäure-Funktion ersetzt (**170** und **174a**). Durch SUZUKI-Kupplungen mit Boc-Phe-(4-Br)-OH (**164a**) und Abspaltung der Boc-Schutzgruppen wurden die ungeschützten Biphenylalanin-Derivate **165**, **171** und **175** erhalten. Im letzten Schritt wurden die Fmoc-Gruppen gemäß der Methode nach SCHWARZ eingeführt.¹⁹⁵ Alle drei Verbindungen konnten mit akzeptablen Gesamtausbeuten hergestellt werden.



Schema 27: Synthese der Fmoc-geschützten Biphenylalanin-Derivate 166, 172 und 176.

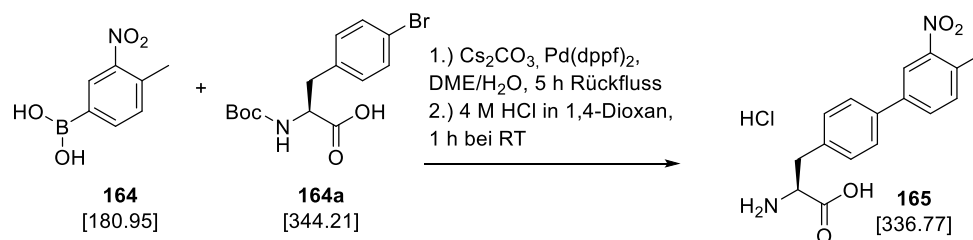
Das Anilin-Derivat **174** wurde in drei Stufen ohne Reinigung der Zwischenprodukte zur freien Aminosäure **175** umgesetzt. Nach Durchführung der MIYAURO-Borylierung wurde das Reaktionsgemisch lediglich filtriert; das im Filtrat enthaltene Rohprodukt **174a** wurde daraufhin

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

unter SUZUKI-Bedingungen mit Boc-Phe(4-Br)-OH (**164a**) umgesetzt und die Boc-Gruppe entfernt. Das erhaltene Produkt **175** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und mit einer Ausbeute von etwa 76 % über drei Stufen erhalten. Die Reinigung mittels präparativer HPLC erwies sich jedoch aufgrund der Hydrophobie des Produktes als schwierig, sodass lediglich eine Reinheit von 82 % erreicht wurde. Dennoch konnte daraus das Fmoc-geschützte Derivat **176** hergestellt werden.

4-(4-Methyl-3-nitrophenyl)-phenylalanin × HCl (**165**)

(S)-2-amino-3-(4'-methyl-3'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoic acid



SUZUKI-Kupplung

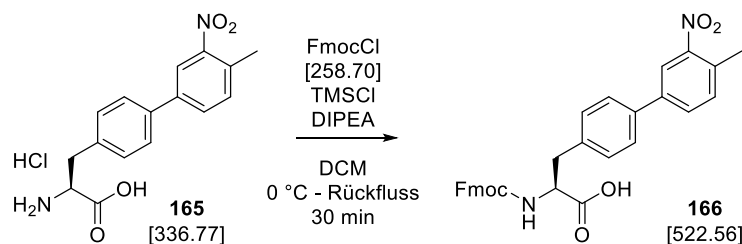
In einem SCHLENK-Kolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 4-Methyl-3-nitrophenylboronsäure (**164**, 1.735 g, 9.59 mmol, 1.1 eq.), Boc-Phe(4-Br)-OH (**164a**, 3.000 g, 9.59 mmol, 1 eq.), Pd(dppf)₂Cl₂ (48 mg, 0.065 mmol, 0.006 eq.) und 12 mL einer 2 M aq. Cs₂CO₃-Lsg. (7.81 g Cs₂CO₃, 24 mmol, 2.5 eq.) in 150 mL DME suspendiert. Unter starkem Rühren wurde mithilfe einer Membranpumpe durch zehnmaliges Evakuieren und Fluten der Apparatur mit Argon eine Schutzgas-Atmosphäre hergestellt. Die Mischung wurde für 5 h unter Rückfluss gekocht und der Umsatz mittels HPLC kontrolliert (Methode A: 30.67 min). Dann wurde filtriert und das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A, 30.02 min). Der erhaltene Rückstand wurde in einer Mischung aus EA und 20 % (m/v) aq. Zitronensäure gelöst und unter Verwendung der genannten Zitronensäurelösung wässrig-sauer und danach wässrig-neutral aufgearbeitet. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A unter Verwendung von 15 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan abgespalten. Das Produkt wurde als blassbrauner FS erhalten. **Ausbeute:** 2.938 g, 7.95 mmol, 91 %. **HPLC:** Methode A, 18.92 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 300.31, m/z: 301.13 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.21 (d, ³J = 2.0 Hz, 1H), 7.95 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 7.75 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.59 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 4.19 (t, ³J = 6.5 Hz, 1H), 3.18 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 6.1 Hz, 1H), 3.12 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 6.8 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (166)

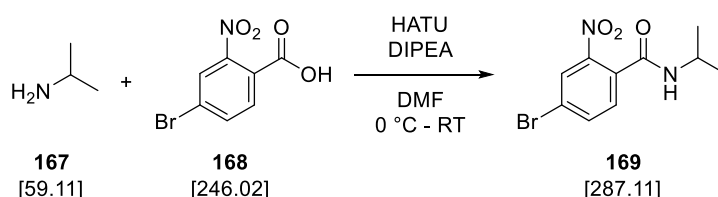
(S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4'-methyl-3'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoic acid



Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung der freien Aminosäure **165** (2.69 g, 7.98 mmol, 1 eq.), TMSCl (2.00 g, 18.35 mmol, 2.3 eq.), DIPEA (4.6 mL, 26.33 mmol, 3.3 eq.) und 20 mL DCM sowie FmocCl (1.96 g, 7.58 mmol, 0.95 eq., gelöst in 20 mL DCM) synthetisiert. Nach wässrig-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde das Produkt als blassbrauner FS erhalten und ohne weitere Reinigung in der Fmoc-SPPS verwendet. **Ausbeute:** 3.84 g, 7.35 mmol, 97 %. **HPLC:** Methode A: 35.14 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, negativ):** ber.: 522.56, m/z: 521.40 [M-H]⁻.

4-Brom-2-nitrobenzoesäureisopropylamid (169)

4-bromo-N-isopropyl-2-nitrobenzamide



Isopropylamin (**167**, 241 mg, 4.08 mmol, 1 eq.), 4-Brom-2-nitrobenzoesäure (**168**, 1.00 g, 4.08 mmol, 1 eq.) und DIPEA (1.78 mL, 10.2 mmol, 2.5 eq.) wurden in 13 mL DMF gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Unter starkem Rühren wurde HATU (2.02 g, 5.30 mmol, 1.3 eq.) in zehn Portionen binnen 10 min zugegeben. Die Lösung wurde und über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in einer Mischung aus EA und 5 % (m/v) aq. KHSO₄-Lsg. gelöst. Die organische Phase wurde wässrig-sauer, wässrig-basisch und wässrig-neutral gewaschen und das LM danach *in vacuo* entfernt. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 1.10 g, 3.82 mmol, 94 %. **HPLC:** Methode A, 21.44 min, Reinheit: > 98 %.

MS (ESI, positiv): ber.: 286.00, m/z: 286.98 [M+H]⁺.

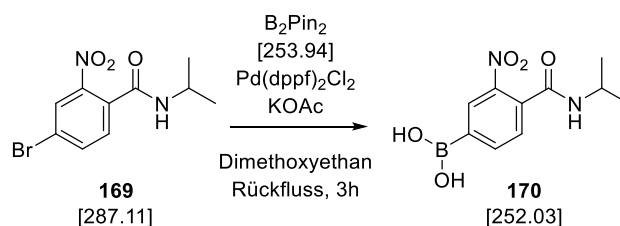
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.52 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H), 8.25 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 7.99 (dd, ³J = 8.2, ⁴J = 1.9 Hz, 1H), 7.53 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 4.07 - 3.84 (m, 1H), 1.14 (d, ³J = 6.6 Hz, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 163.48, 147.71, 136.08, 131.68, 130.76, 126.57, 122.41, 41.13, 21.84.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

4-(Isopropylcarbamoyl)-3-nitrophenylboronsäure (**170**)

(4-(isopropylcarbamoyl)-3-nitrophenyl)boronic acid



MIYAUURA-Borylierung

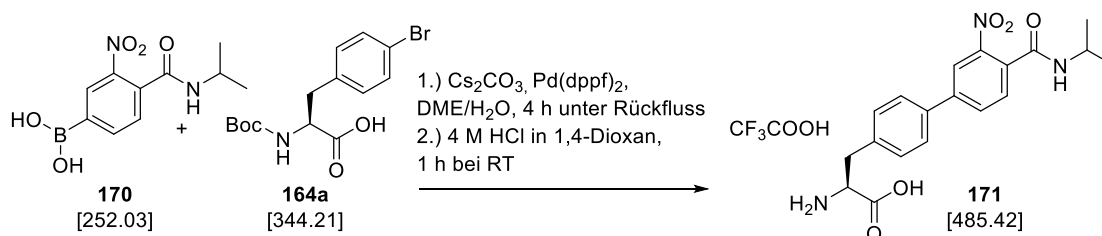
Das Brom-Derivat **169** (1.05 g, 3.65 mmol, 1 eq.), Bis(pinakolato)diboron (B_2Pin_2 , 1.02 g, 4.02 mmol, 1.1 eq.), $Pd(dppf)_2Cl_2$ (89 mg, 0.11 mmol, 0.03 eq.) und Kaliumacetat (1.08 g, 11 mmol, 3 eq.) wurden in 105 mL DME suspendiert. Unter starkem Rühren wurde mithilfe einer Membranpumpe durch zehnmalsiges Evakuieren und Fluten der Apparatur mit Argon eine Schutzgas-Atmosphäre hergestellt. Die Mischung wurde unter der Argon Atmosphäre für 3 h gekocht und der Umsatz mittels HPLC kontrolliert. Nach Filtration des Ansatzes wurde das LM *in vacuo* entfernt und der Rückstand in einer 9:1-Mischung aus Wasser und Acetonitril (jeweils versetzt mit 0.1 % TFA) für 1 h bei RT inkubiert, um die Pinakol-Gruppe abzuspalten. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten.
Ausbeute: 685 mg, 2.7 mmol, 74 %. **HPLC:** Methode A, 12.88 min, Reinheit: > 98 %.
MS (ESI, positiv): ber.: 252.09 m/z: 253.12 $[M+H]^+$.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 8.46 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H), 8.36 (d, $^4J = 0.9$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1H), 7.53 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H), 4.07 - 3.94 (m, 1H), 1.15 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 164.64, 146.39, 138.90, 134.30, 128.75, 128.24, 40.99, 21.90.

H-Bpa(4'-Ipa, 3'-NO₂)-OH × HCl (**171**)

(S)-2-amino-3-(4'-(isopropylcarbamoyl)-3'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoic acid



Die Verbindung wurde analog zum Derivat **162** unter Verwendung der Boronsäure **170** (636 mg, 2.53 mmol, 1.3 eq.), sowie Boc-Phe(4-Br)-OH (**164a**, 668 mg, 1.94 mmol, 1 eq.), $Pd(dppf)_2Cl_2$ (82 mg, 0.10 mmol, 0.04 eq.), 3.16 mL einer 2 M aq. Cs_2CO_3 -Lsg. (2.07 g Cs_2CO_3 , 6.33 mmol, 2.5 eq.) und 35 mL DME hergestellt. Dabei wurde 4 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abspaltung der Boc-Gruppe wurde das erhaltene Präzipitat mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

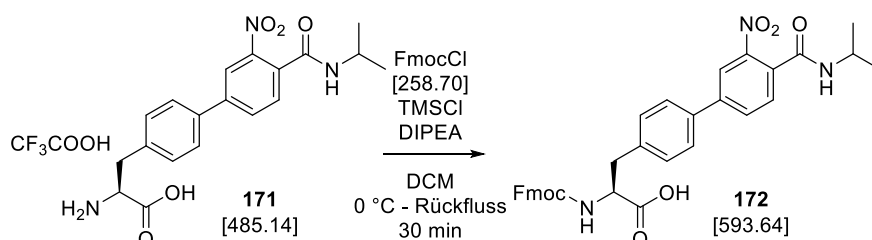
Ausbeute: 786 mg, 1.62 mmol, 83 %. **HPLC:** Boc-Derivat: Methode A, 25.14 min; freie Aminosäure: Methode A, 14.55 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 371.15, m/z: 372.14 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.24 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H), 8.06 (dd, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H), 7.77 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 2H), 7.65 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 1H), 7.43 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 2H), 4.11 - 3.95 (m, 2H), 3.19 (dd, ²*J* = 14.3 Hz, ³*J* = 5.8 Hz, 1H), 3.10 (dd, ²*J* = 14.3 Hz, ³*J* = 7.0 Hz, 1H), 1.16 (d, ³*J* = 6.6 Hz, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.16, 164.15, 147.87, 141.75, 136.63, 135.74, 131.27, 130.74, 130.34, 129.71, 127.00, 121.39, 53.72, 41.07, 35.79, 21.91.

Fmoc-Bpa(4'-Ipa, 3'-NO₂)-OH (152)

(S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4'-(isopropylcarbamoyl)-3'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoic acid



Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung der Aminosäure **171** (786 mg, 1.62 mmol, 1 eq.), TMSCl (387 mg, 3.56 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (931 µL mL, 5.34 mmol, 3.3 eq.) und 10 mL DCM sowie FmocCl (406 mg, 1.57 mmol, 0.97 eq., gelöst in 5 mL DCM) synthetisiert. Nach wässrig-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde das Produkt als blassbrauner FS erhalten und ohne weitere Reinigung in der Fmoc-SPPS verwendet. **Ausbeute:** 869 mg, 1.51 mmol, 93 %. **HPLC:** Methode A: 29.92 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 593.22, m/z: 594.30 [M+H]⁺.

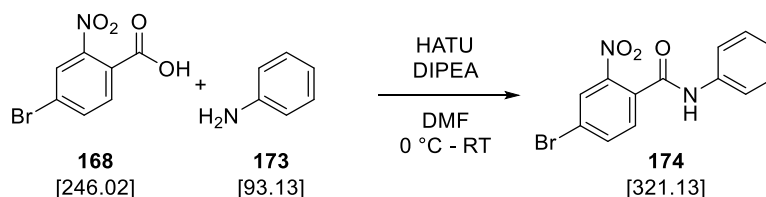
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.78 (bs, 1H), 8.52 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H), 8.20 (d, ⁴*J* = 1.7 Hz, 1H), 8.02 (dd, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 1.7 Hz, 1H), 7.87 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 2H), 7.76 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H), 7.70 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H), 7.66 - 7.61 (m, 3H), 7.45 - 7.36 (m, 4H), 7.35 - 7.22 (m, 2H), 4.28 - 4.19 (m, 2H), 4.18 - 4.13 (m, 2H), 4.06 - 3.93 (m, 1H), 3.16 (dd, ²*J* = 13.9 Hz, ³*J* = 4.2 Hz, 1H), 2.95 (dd, ²*J* = 13.8 Hz, ³*J* = 10.8 Hz, 1H), 1.16 (d, ³*J* = 6.6 Hz, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 173.13, 164.17, 155.92, 147.83, 143.69, 141.91, 140.62, 138.92, 135.18, 131.15, 130.72, 129.98, 129.63, 127.55, 126.98, 126.74, 125.19, 121.37, 120.03, 65.56, 55.26, 46.53, 41.05, 39.85, 36.03, 21.92.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

4-Brom-2-nitrobenzoesäurephenylamid (174)

4-bromo-2-nitro-N-phenylbenzamide



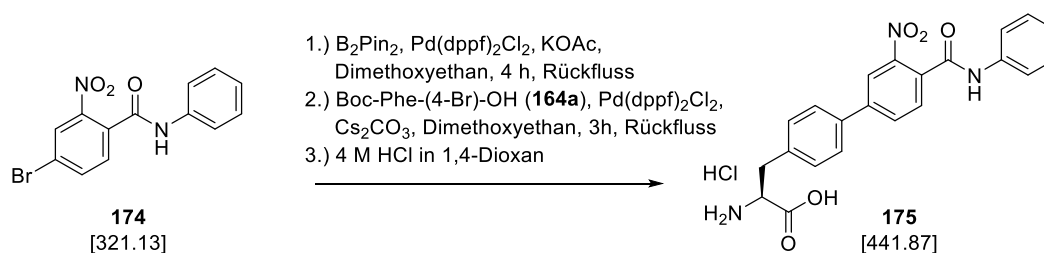
Die Verbindung wurde analog zur Verbindung **169** unter Verwendung von 4-Brom-2-nitrobenzoesäure (**168**, 2.010 g, 8.17 mmol, 1 eq.), Anilin (**173**, 761 mg, 8.17 mmol, 1 eq.), HATU (4.038 g, 10.62 mmol, 1.3 eq.), DIPEA (3.56 mL, 20.43 mmol, 2.5 eq.) und 26 mL DMF hergestellt. Dabei wurde auf eine wässrige Aufarbeitung verzichtet und das Rohprodukt direkt mittels präparativer MPLC gereinigt (40 g Silicagel, Cy/EA, 4 : 1, Start bei 0 % EA). Eine kleine Probe des erhaltenen blassbraunen FS wurde zur Charakterisierung mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 2.135 g, 6.65 mmol, 81 %. **HPLC:** Methode A: 26.6 min, Reinheit > 95 % bzw. > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 319.98, m/z: 321.04 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.66 (s, 1H), 8.37 (d, ⁴J = 1.9 Hz, 1H), 8.10 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1H), 7.75 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.64 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 2H), 7.37 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 7.5 Hz, 2H), 7.13 (tt, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = f1.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 163.03, 147.33, 138.56, 136.56, 131.38, 130.96, 128.79, 126.86, 124.06, 123.02, 119.68.

H-Bpa(4'-Pha, 3'-NO₂)-OH × HCl (175)

(S)-2-amino-3-(3'-nitro-4'-(phenylcarbamoyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoic acid



Das Brom-Derivat **174** (2.135 g, 6.65 mmol, 1 eq.) wurde mittels MIYAUURA-Borylierung wie für Verbindung **170** beschrieben in die freie Boronsäure überführt. Dafür wurden Bis(pinakolato)diboron (B₂Pin₂, 1.857 g, 7.32 mmol, 1.1 eq.), Pd(dppf)₂Cl₂ (163 mg, 0.20 mmol, 0.03 eq.) und Kaliumacetat (1.958 g, 20 mmol, 3 eq.) sowie 200 mL DME verwendet. Anschließend wurde für 4 h unter Rückfluss gekocht und die Reaktionslösung filtriert. Die im Filtrat gelöste Boronsäure (HPLC: Methode A: 19.54 min) wurde ohne weitere Reinigung in einer SUZUKI-Kupplung weiter umgesetzt. Dafür wurden Boc-Phe(4-Br)-OH (**164a**, 2.518 g, 7.32 mmol, 1.1 eq.), Pd(dppf)₂Cl₂ (271 mg, 0.33 mmol, 0.05 eq.) sowie

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

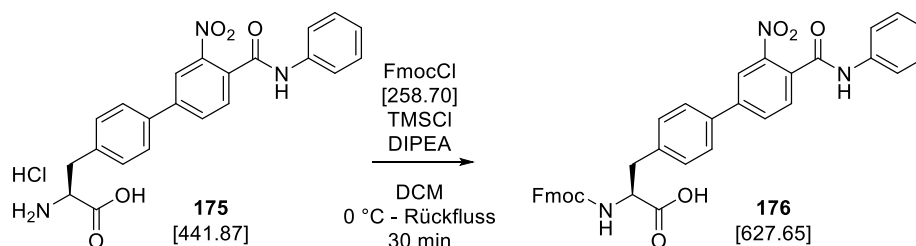
9.15 mL einer 2 M aq. Cs₂CO₃-Lsg. (5.962 g Cs₂CO₃, 18.3 mmol, 2.5 eq.) verwendet. Nach Kochen unter Rückfluss für 3 h wurde filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Die so erhaltene Boc-Aminosäure (HPLC: Methode A, 28.25 min) wurde mittels präparativer MPLC gereinigt (40 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 0.1 % TFA, Start bei 100 % DCM). Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde die Boc-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten und das Produkt als blassbrauner FS erhalten. Zur Charakterisierung wurde eine kleine Probe mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 2.244 g, 5.07 mmol, 76 %. **HPLC:** Methode A: 18.6 min, Reinheit: > 82 % bzw. > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 405.13, m/z: 406.30 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.70 (s, 1H), 8.36 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 8.18 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 7.87 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.84 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.71 - 7.65 (m, 2H), 7.45 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.42 - 7.29 (m, 2H), 7.14 (tt, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H), 4.22 (t, ³J = 6.5 Hz, 1H), 3.20 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 6.2 Hz, 1H), 3.15 (dd, ²J = 14.4 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 170.27, 163.71, 147.53, 142.17, 138.77, 136.12, 135.85, 131.20, 131.02, 130.40, 129.95, 128.78, 127.16, 123.96, 121.70, 119.67, 53.15, 35.53.

Fmoc-Bpa(4'-Pha, 3'-NO₂)-OH (176)

(S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(3'-nitro-4'-(phenylcarbamoyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoic acid

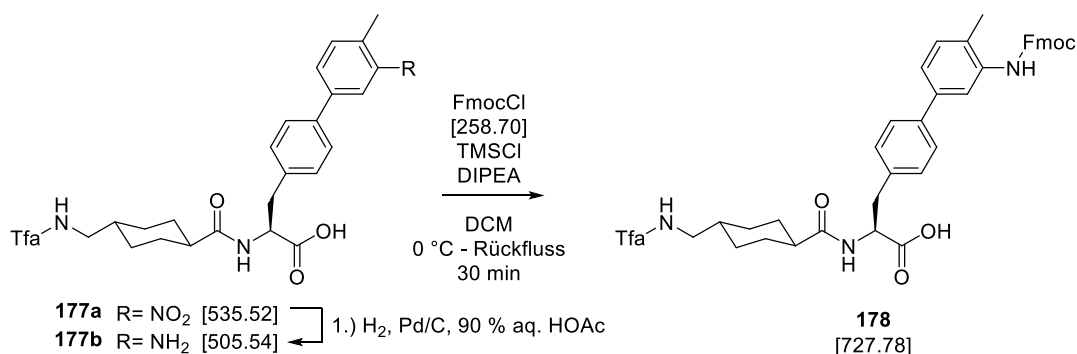


Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung der Aminosäure **175** (4.06 g, 9.19 mmol, 1 eq.), TMSCl (2.20 g, 20.23 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (5.12 mL, 29.41 mmol, 3.2 eq.) und 40 mL DCM sowie FmocCl (2.30 g, 8.91 mmol, 0.97 eq., gelöst in 20 mL DCM) synthetisiert. Nach wässrig-saurer und wässrig-neutraler Aufarbeitung wurde das Produkt mittels präparativer MPLC (40 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 0.1 % TFA, Start bei 100 % DCM) gereinigt und als blassbrauner FS erhalten. **Ausbeute:** 3.346 g, 7.57 mmol, 85 %. **HPLC:** Methode A: 32.36 min, Reinheit: > 96 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 627.20, m/z: 628.14 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.3. Substituierte Phe- und Bpa-Derivate

Tfa-Xda-Bpa(4'-Me, 3'-NH-Fmoc)-OH (178)

(S)-3-(3'-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-((1r,4S)-4-((2,2,2-trifluoroacetamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)propanoic acid



In der Fmoc-SPPS verwendete Aminosäurederivate:

1.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 2.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 600 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.96 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das Dipeptid **177a** (HPLC: Methode A, 28.68 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurde das Harz über drei Nächte beladen und der zweite Baustein über Nacht gekuppelt. Nach der Harzabspaltung wurde das Peptid ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **177b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 112 mg, 0.22 mmol, 23 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 17.96 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 505.22, m/z: 506.20 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.34 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.01 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.49 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.25 - 7.13 (m, 3H), 4.46 - 4.37 (m, 1H), 3.08 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 4.8 Hz, 1H), 3.02 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 2.89 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.08 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.2 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.4 Hz, 1H), 1.74 - 1.55 (m, 4H), 1.49 - 1.39 (m, 1H), 1.31 - 1.13 (m, 2H), 0.94 - 0.82 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.48, 173.68, 158.62 (pd, ²J_{C-F} = 34.5 Hz), 156.88 (pd, ²J_{C-F} = 35.7 Hz), 139.11, 138.41, 137.55, 131.71, 130.22, 126.51, 120.61, 117.90, 117.72 (pt, ¹J_{C-F} = 288.4 Hz), 116.92, 115.56, 53.58, 45.64, 44.02, 36.91, 36.89, 29.89, 29.83, 28.99, 28.90, 17.31.

Das anilinische Zwischenprodukt **177b** (86 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung von TMSCl (43 mg, 0.39 mmol, 2.3 eq.), DIPEA (74 µL, 0.425 mmol, 2.5 eq.) und FmocCl (43 mg, 0.165 mmol, 0.97 eq.) Fmoc-geschützt und mittels präparativer MPLC (12 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 0.1 % TFA, Start bei 0 % B) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser FS erhalten.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.4. Fmoc-geschützte P2'-Bausteine

Ausbeute: 75 mg, 0.103 mmol, 61 %. **HPLC:** Methode A: 33.83 min, Reinheit: > 975 %.

MS (ESI, positiv): ber.: 727.29, m/z: 728.14 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.55 (bs, 1H), 9.32 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.00 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.89 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.72 (s, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.51 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.45 - 7.21 (m, 8H), 4.43 (m, 3H), 4.30 (m, 1H), 3.08 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 4.8 Hz, 1H), 3.01 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 2.90 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.09 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.1 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.4 Hz, 1H), 1.64 (m, 4H), 1.49 - 1.36 (m, 1H), 1.22 (m, 2H), 0.87 (m, 2H).

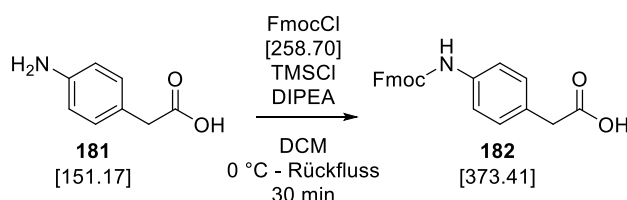
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 174.91, 173.08, 156.28 (pd, ³J_{C-F} = 35.69 Hz) 154.36, 143.74, 140.74, 137.88, 137.72, 136.90, 136.68, 130.81, 129.65, 127.61, 127.00, 126.01, 125.19, 123.06, 120.09, 115.98 (pd, ¹J_{C-F} = 288.1 Hz), 111.69, 65.70, 61.96, 53.02, 46.72, 45.05, 43.41, 36.31, 29.24, 28.31, 25.43, 17.37.

6.15.4. Fmoc-geschützte P2'-Bausteine

Bei den Inhibitorserien 4 und 5 wurden in P2'-Position aromatische nicht-proteinogene Aminosäuren verwendet. Dafür wurden die Fmoc-geschützten SPPS-Bausteine **180**, **182** und **184** benötigt, die gemäß der Methode nach SCHWARZ¹⁹⁵ hergestellt wurden. Die Produkte wurden wässrig aufgearbeitet und ohne weitere Reinigung in der Fmoc-SPPS verwendet.

Fmoc-4-aPhac-OH (**151**)

2-(4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)phenyl)acetic acid



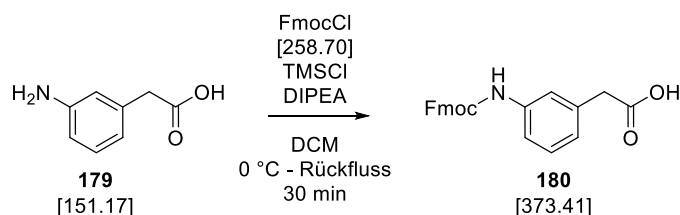
Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung von 4-Aminophenyllessigsäure (**181**, 1.84 g, 12.2 mmol, 1.0 eq.), TMSCl (3.31 g, 30.5 mmol, 2.5 eq.), DIPEA (5.31 mL, 30.5 mmol, 2.5 eq.) und 33 mL DCM sowie FmocCl (3.06 g, 11.83 mmol, 97 eq., gelöst in 20 mL DCM) hergestellt und ohne weitere Aufarbeitung in der Fmoc-SPPS verwendet. Das Produkt wurde als blassgelber FS erhalten. **Ausbeute:** 4.29 g, 11.5 mmol, 97 %. **HPLC:** Methode A, 29.10 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 373.13, m/z: 374.18 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.24 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 7.91 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.75 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H), 7.49 - 7.27 (m, 6H), 7.15 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 4.48 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H), 4.31 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.4. Fmoc-geschützte P2'-Bausteine

Fmoc-3-aPhac-OH (180)

2-(3-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)phenyl)acetic acid

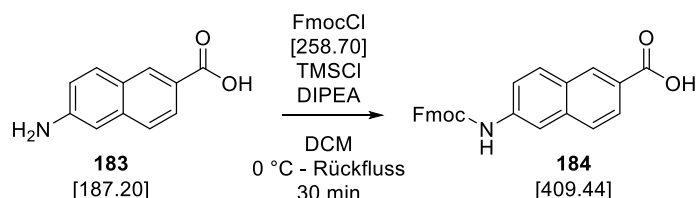


Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung von 3-Aminophenylacetic acid (**179**, 2.00 g, 13.2 mmol, 1.0 eq.), TMSCl (3.15 g, 29.0 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (5.05 mL, 29.0 mmol, 2.2 eq.) und 33 mL DCM sowie FmocCl (3.25 g, 12.5 mmol, 0.95 eq., gelöst in 8 mL DCM) hergestellt und ohne weitere Aufarbeitung in der Fmoc-SPPS verwendet. Das Produkt wurde als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 4.541 g, 12.2 mmol, 97 %. **HPLC:** Methode A, 29.53 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 373.13, m/z: 374.14 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.28 (bs, 1H), 9.69 (s, 1H), 7.91 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.76 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.50 - 7.29 (m, 6H), 7.20 (t, ³J = 7.9 Hz, 1H), 6.89 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 4.46 (d, ³J = 6.8 Hz, 2H), 4.31 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H), 3.50 (s, 2H). Fmoc-4-aPhac-OH (**182**)

Fmoc-6-aNap-OH (184)

6-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-2-naphthoic acid



Die Verbindung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift C unter Verwendung von 6-Amino-2-naphthoic acid (**183**, 500 mg, 2.67 mmol, 1.0 eq.), TMSCl (639 mg, 5.88 mmol, 2.2 eq.), DIPEA (1.00 mL, 5.88 mmol, 2.2 eq.) und 12 mL DCM sowie FmocCl (663 mg, 2.56 mmol, 0.96 eq., gelöst in 3 mL DCM) hergestellt und ohne weitere Aufarbeitung in der Fmoc-SPPS verwendet. Das Produkt wurde als blassbrauner FS erhalten.

Ausbeute: 994 mg, 0.243 mmol, 95 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 32.85 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 409.44, m/z: 410.13 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.87 (bs, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.01 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H), 7.96 - 7.89 (m, 3H), 7.83 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H), 7.78 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.61 (pd, ³J = 7.7 Hz, 1H), 7.44 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H), 7.39 - 7.31 (m, 2H), 4.56 (d, ³J = 6.3 Hz, 2H), 4.35 (t, ³J = 6.4 Hz, 1H).

6.15.5. Linkersegmente

Bei den Inhibitorsynthesen nach Strategie E wurden die meisten Linkersegmente im Rahmen der SPPS unter Verwendung kommerziell erhältlicher Fmoc-Aminosäuren am Harz zusammengesetzt. Einige Linker wurden jedoch separat synthetisiert (**Abbildung 53**).

Zur Inhibitorsynthese wurden die bereits zusammengefügt **187**, **188** und **192** gemäß der Strategie E mittels SPPS in azyklische Vorläufermoleküle eingebaut, die dann zu den makrozyklischen Inhibitoren **I46** - **I48** umgesetzt. Aufgrund der bereits in Teil A beschriebenen, vermuteten Lactonisierung von 4-Brombutansäure unter basischen Bedingungen wurde auf die Herstellung des Butanoyl-Analogons der Verbindungen **187** und **188** verzichtet. Der Inhibitor **I45** wurde daher unter Verwendung des Bausteins **189** nach einer alternativen Strategie hergestellt.

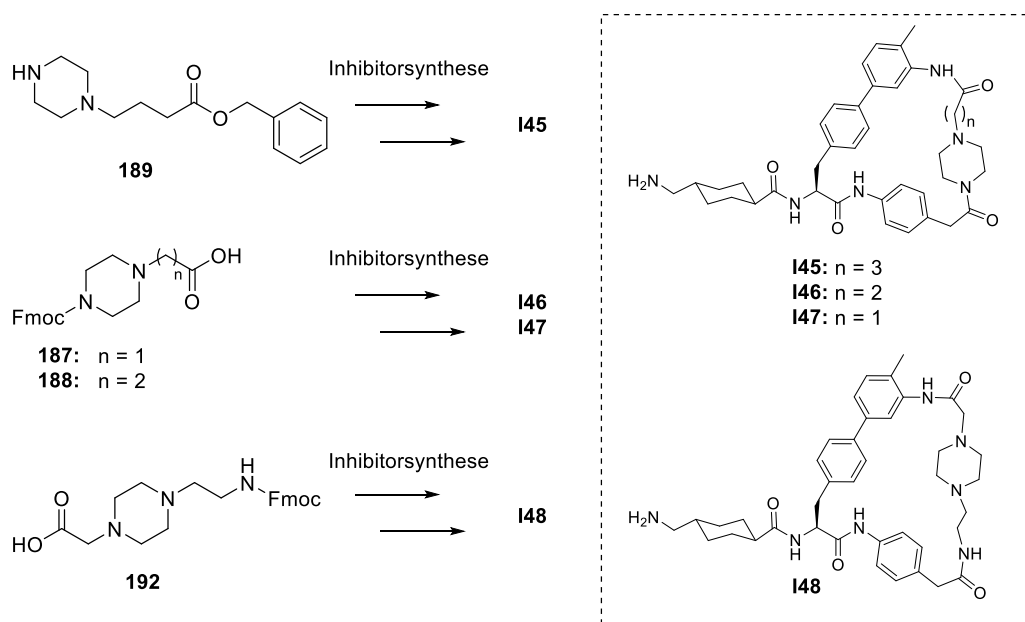
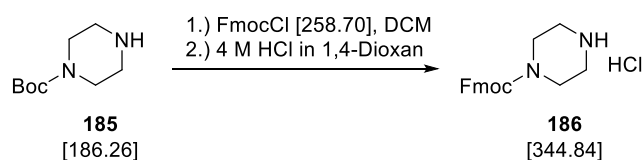


Abbildung 53: Separat synthetisierte Linkersegmente: Verbindungen **187** - **189**.

Fmoc-Piz-OH × HCl (**186**)

(9H-fluoren-9-yl)methyl piperazine-1-carboxylate



Unter Eiskühlung wurden FmocCl (695 mg, 2.68 mmol, 1.00 eq.) und Boc-Piperazin (**185**, 1000 mg, 5.37 mmol, 2 eq.) in DCM gelöst, welches zuvor auf 0 °C gekühlt wurde. Die Mischung wurde über Nacht bei 0 °C - RT gerührt und wässrig-sauer, wässrig-basisch sowie wässrig-neutral aufgearbeitet. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde die Boc-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten und das Produkt ohne weitere

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.5. Linkersegmente

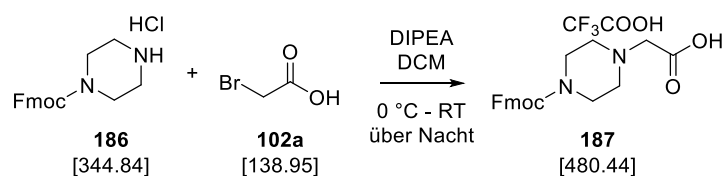
Reinigung verwendet. **Ausbeute:** 722 mg als farbloser FS, 2.09 mmol, 78 %. **HPLC:** Methode A, 18.34 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 308.15, m/z: 309.21 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.91 - 7.89 (m, 2H), 7.64 (dd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 2H), 7.45 - 7.39 (m, 2H), 7.35 (td, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H), 4.40 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H), 4.29 (t, ³J = 6.5 Hz, 1H), 3.55 (t, ³J = 5.5 Hz, 4H), 3.01 (t, ³J = 5.1, 4.0 Hz, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 154.07, 143.66, 140.70, 127.66, 127.11, 124.99, 120.09, 66.93, 46.65, 42.11, 40.21.

Fmoc-Piz-Ac-OH × TFA (187)

2-(4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)piperazin-1-yl)acetic acid



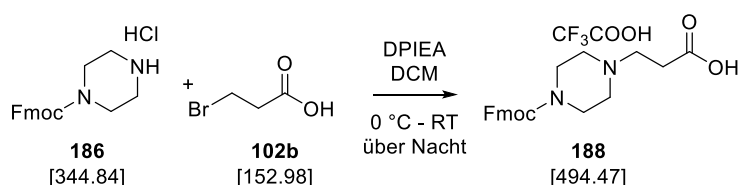
Eine Mischung aus Fmoc-Piperazin × HCl (**186**, 350 mg, 1.02 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (1066 µL, 6.12 mmol, 6 eq.) und 5 mL DCM wurde in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde Bromessigsäure (**102a**, 425 mg, 3.06 mmol, 3 eq.) in einer Portion hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Danach wurde mit TFA angesäuert und das LM *in vacuo* entfernt. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 239 mg, 0.50 mmol, 49 %. **HPLC:** Methode A, 19.14 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 366.42, m/z: 367.16 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.90 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.64 (dd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 2H), 7.46 - 7.41 (m, 2H), 7.35 (td, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H), 4.38 (d, ³J = 6.7 Hz, 2H), 4.29 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.58 (bs, 4H), 3.13 (bs, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 157.74, 154.03, 143.63, 140.71, 127.68, 127.13, 125.00, 120.12, 67.04, 55.66, 51.24, 51.24, 46.61. Vermutlich aufgrund der hohen Flexibilität des Piperazinrings fehlt ein Signal im aliphatischen Bereich.

Fmoc-Piz-Prop-OH × TFA (188)

3-(4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)piperazin-1-yl)propanoic acid



Eine Mischung aus Fmoc-Piperazin × HCl (**186**, 350 mg, 1.02 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (1066 µL, 6.12 mmol, 6 eq.) und 5 mL DCM wurde in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde 3-Brompropansäure (**102b**, 468 mg, 3.065 mmol, 3 eq.) in einer Portion hinzugegeben und der

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.5. Linkersegmente

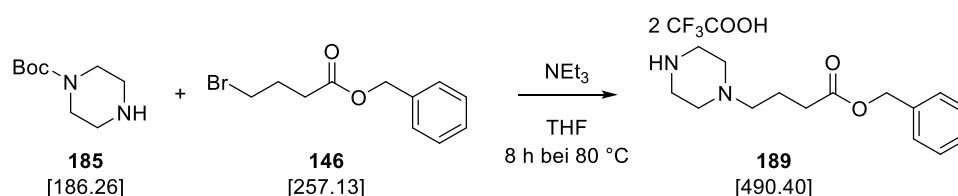
Ansatz über Nacht gerührt (0 °C - RT). Danach wurde mit TFA angesäuert und das LM *in vacuo* entfernt. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 305 mg, 0.62 mmol, 60 %. **HPLC:** Methode A, 20.74 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 380.17, m/z: 381.11 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.44 (bs, 1H), 9.95 (bs, 1H), 7.91 (dt, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 2H), 7.69 - 7.59 (m, 2H), 7.48 - 7.40 (m, 2H), 7.35 (td, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H), 4.41 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H), 4.29 (t, ³J = 6.4 Hz, 1H), 3.77 (br), 3.30 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H), 3.17 (bs, 4H), 2.74 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.44, 153.97, 143.63, 140.72, 127.68, 127.12, 124.99, 120.12, 67.02, 51.47, 50.66, 46.63, 28.55. Vermutlich aufgrund der hohen Flexibilität des Piperazinrings fehlt ein Signal im aliphatischen Bereich.

BnO-But-Piz × 2 TFA (189)

benzyl 4-(piperazin-1-yl)butanoate



Boc-Piperazin (**185**, 188 mg, 1.01 mmol, 1.3 eq.) und NEt₃ (158 µL, 1.56 mmol, 2 eq.) wurden in einem Mikrowellen-Druckgefäß in 2 mL abs. THF vorgelegt. Dazu wurde eine Lösung aus 4-Brombutansäurebenzylester (**146**, 200 mg, 0.78 mmol, 1.0 eq.) in 1 mL abs. THF hinzugegeben und das Gefäß gasdicht verschlossen. Der Ansatz wurde in einer Labormikrowelle für 8 h bei 80 °C und auf einem Magnetrührer über Nacht bei RT gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und die Boc-Schutzgruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 275 mg, 0.56 mmol, 72 %. **HPLC:** Methode A, 11.99 min, Reinheit >98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 262.17, m/z: 263.13 [M+H]⁺.

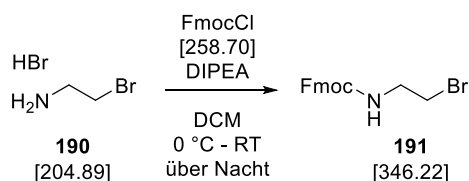
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.17 (s, 2H), 7.41 - 7.31 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.31 (bs, 4H), 3.20 (s, 4H), 2.96 (bs, 2H), 2.46 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H), 1.87 (p, ³J = 7.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 171.96, 136.05, 128.39, 128.01, 127.92, 65.57, 55.29, 48.35, 40.90, 30.46. Vermutlich konnten aufgrund der hohen Flexibilität des Piperazinrings nicht alle im aliphatischen Bereich erwarteten Signale identifiziert werden.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.5. Linkersegmente

Fmoc-2-Bromethylamin (Fmoc-aEt-Br, 191)

(9H-fluoren-9-yl)methyl (2-bromoethyl)carbamate



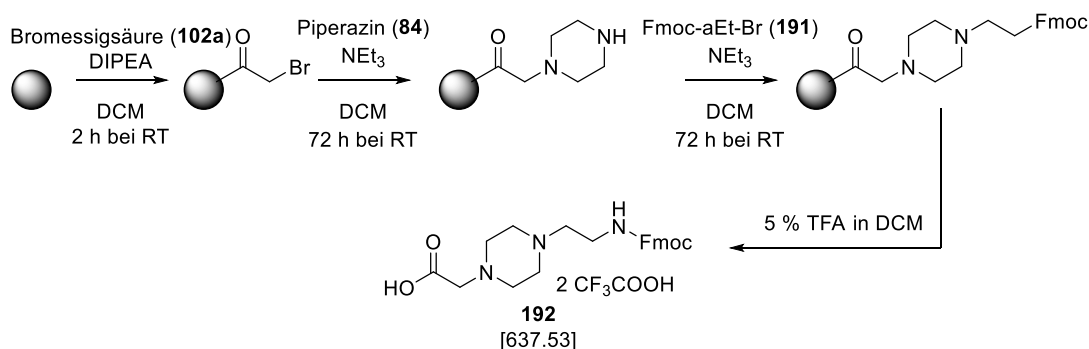
Eine Mischung aus DIPEA (6.72 mL, 38.7 mmol, 2 eq.) und 75 mL DCM wurde in einem Eisbad gekühlt und dann unter starkem Rühren zu einem Gemenge aus festem FmocCl (5.00 g, 19.3 mmol, 1 eq.) und 2-Bromethylamin Hydrobromid (**190**, 7.91 g, 38.7 mmol, 2 eq.) gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 0 °C - RT gerührt. Dann wurde wässrig-sauer sowie wässrig-neutral aufgearbeitet und das Produkt nach Entfernung des LM *in vacuo* als farbloser FS erhalten. **Ausbeute:** 5.89 g, 17.0 mmol, 88 %. **HPLC:** Methode A, 31.42 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 346.22, m/z: 347.19 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.58 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.46 - 7.39 (m, 2H), 7.35 - 7.30 (m, 2H), 4.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.23 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.46 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.37 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 156.00, 143.79, 140.70, 127.56, 127.00, 125.08, 120.06, 65.40, 46.66, 42.27, 32.29.

Fmoc-aEt-Piz-Ac-OH (192)

2-(4-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)piperazin-1-yl)acetic acid



Im folgenden Protokoll sind alle angegebenen Äquivalente auf die Harzmenge bezogen, alle Waschschritte wurden für jeweils 1 min durchgeführt und das Reaktionsgefäß wurde außer bei der Entfernung des LM permanent geschüttelt. In einem 100 mL Reaktionsgefäß mit Glasfilterfritte wurden 3 g 2-CTC Harz (Kapazität: 1.6 mmol/g, 4.8 mmol absolut) vorgelegt, mit einer Lösung aus Bromessigsäure (**102a**, 0.53 g, 3.8 mmol, 0.8 eq.)^a sowie DIPEA (3.13 mL, 18.0 mmol, 3.75 eq.) in 50 mL DCM versetzt und für 2 h bei RT geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit DCM wurde eine Lösung aus Piperazin (**84**, 4.96 g, 57.6 mmol, 12 eq.) und NEt₃ (16.1 mL, 115 mmol, 24 eq.) in 50 mL DCM zugegeben und der Ansatz für 72 h bei RT

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.5. Linkersegmente

geschüttelt.^b Erneut wurde dreimal mit DCM gewaschen und dann eine Lösung aus Fmoc-2-Bromethylamin (**191**, 2.98 g, 14.4 mmol, 3.0 eq.) und NEt₃ (4.0 mL, 28.8 mmol, 6.0 eq.) in 50 mL DCM hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 72 h bei RT geschüttelt, dreimal mit DCM gewaschen und das Produkt durch dreimaliges Schütteln mit 5 % (v/v) TFA in DCM für je 30 min vom Harz abgespalten. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das Harz nochmals dreimal mit DMF gewaschen, um das möglicherweise noch im Reaktionsgefäß befindliche restliche Produkt herauszuspülen. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 1.316 g, 2.06 mmol, 43 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 18.77 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 409.20, m/z: 410.23 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.62 (bs, 1H), 9.31 (bs, 1H), 7.89 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.67 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.44 - 7.40 (m, 2H), 7.39 - 7.26 (m, 2H), 4.39 (d, ³J = 6.5 Hz, 2H), 4.23 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H), 3.59 - 2.65 (m, 14H). Durch die beiden breiten Singulets, die durch den Piperazin Ring verursacht wurden konnte aliphatischen Bereich nur ein sehr breites Multipllett aus überlappenden Signalen zwischen etwa 3.2 und 2.5 ppm beobachtet werden. Die einzelnen Signale dieses Bereiches konnten nicht klar differenziert werden.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 157.90 (pd, ²J_{C-F} = 32.9 Hz), 143.75, 140.75, 127.59, 127.01, 124.95, 120.10, 65.40, 56.55, 55.01, 53.38, 50.89, 46.68, 40.11, 40.02, 39.95, 39.85, 39.78, 39.69, 39.61, 39.52, 39.44, 39.35, 39.19, 39.02.

^aUm eine Oligomerisierung der Bromessigsäure am Harz zu vermeiden, wurde das Edukt bei der Harzbeladung im Unterschuss eingesetzt (vgl. **Schema 14**). Zudem wurde auf die Inkubation mit *capping*-Reagenz verzichtet, um eine Methoxylierung der am Harz fixierten Bromessigsäure auszuschließen.

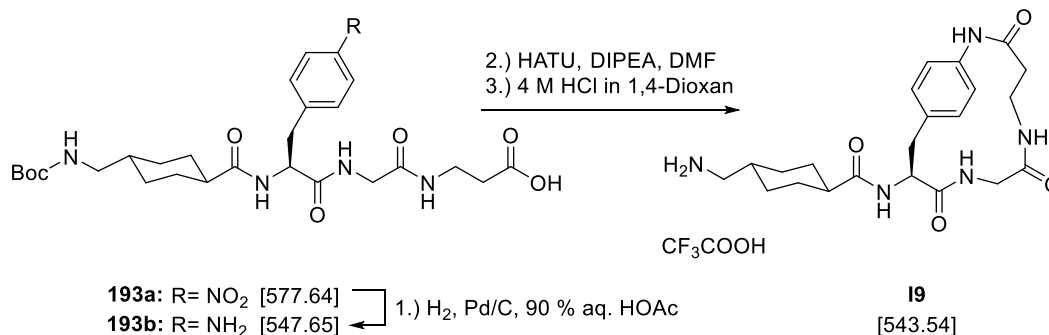
^bIm Vergleich zu den unter Abschnitt 6.14.1. beschriebenen Festphasensynthesen der Verbindungen **107a-d** wurde die eingesetzte Piperazin-Menge erhöht und die Reaktionszeit verlängert.

6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

In diesem Abschnitt wird die Synthese der Inhibitoren der Serie 4 und deren Vorstufen beschrieben.

H-Txa-Phe(c[4-NH]-Gly-βAla) × TFA (I9)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((*S*)-3,7,10-trioxo-2,6,9-triaza-1(1,4)-benzenacyclododecaphane-11-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

1.) Fmoc-βAla-OH, 2.) Fmoc-Gly-OH, 3.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **193a** (HPLC: Methode A, 21.67 min, MS (ESI, positiv): ber.: 577.27, m/z: 578.33 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **193b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 121 mg, 0.22 mmol, 55 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 13.81 min, Reinheit > 85 %. MS (ESI, positiv): ber.: 547.30, m/z: 548.06 [M+H]⁺.

Die Verbindung **193b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Boc-geschützte Intermediat mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC: Methode A, 17.52 min, MS (ESI, positiv): ber.: 529.29, m/z: 530.23 [M+H]⁺). Die Verbindung wurde mit 5 mL einer 20 % (v/v) Lösung aus TFA in DCM versetzt und bei RT für 1 h schwach gerührt. Danach wurde das Produkt mit DEE gefällt. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I9** als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 21 mg, 0.04 mmol, 18 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 1 % B, 16.28 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 429.24, m/z: 430.20 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.34 (s, 1H), 8.11 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H), 7.73 (s, 3H), 7.42 - 7.34 (m, 1H), 7.32 (dd, ³J = 8.2, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 7.20 (dd, ³J = 8.1, ⁴J = 2.2 Hz, 1H), 7.07 (dd, ³J = 8.1, ⁴J = 2.2 Hz, 1H), 6.98 (dd, ³J = 8.1, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 6.06 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 4.48 - 4.37 (m, 1H), 3.59

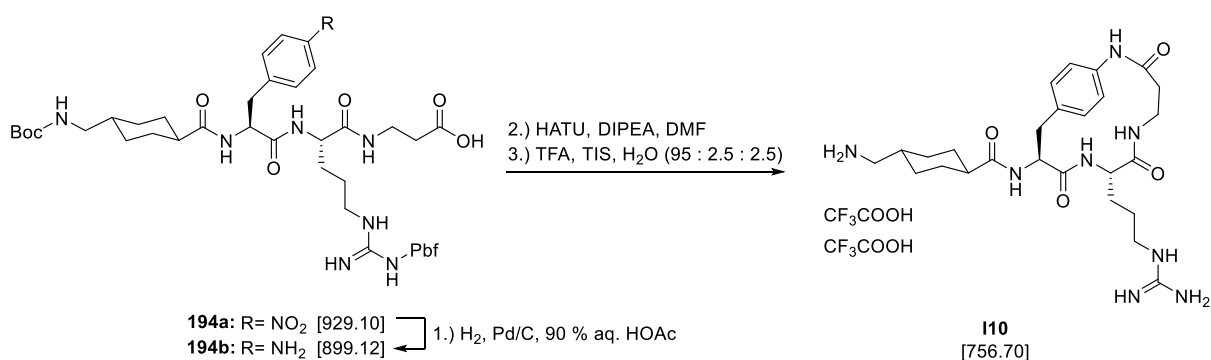
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

(dd, $^2J = 16.0$, $^3J = 7.9$ Hz, 1H), 3.25 - 3.17 (m, 1H), 3.08 - 2.97 (m, 3H), 2.73 - 2.62 (m, 3H), 2.64 - 2.57 (m, 1H), 2.34 - 2.28 (m, 1H), 2.19 (tt, $^3J_{ax-ax} = 11.9$ Hz, $^3J_{ax-eq} = 3.3$ Hz, 1H), 1.84 - 1.69 (m, 4H), 1.57 - 1.44 (m, 1H), 1.40 - 1.23 (m, 2H), 1.01 - 0.87 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 174.68, 173.68, 170.30, 167.71, 136.64, 134.99, 130.33, 129.83, 54.89, 44.33, 42.93, 42.05, 37.63, 35.67, 35.04, 34.26, 28.85, 28.28.

H-Txa-Phe(c[4-NH]-Arg- β Ala) \times 2 TFA (I10)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((8S,11S)-8-(3-guanidinopropyl)-3,7,10-trioxo-2,6,9-triaza-1(1,4)-benzenacyclododecaphane-11-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

1.) Fmoc- β Ala-OH, 2.) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 3.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **194a** (HPLC: Methode A, 28.87 min, MS (ESI, positiv): ber.: 928.44, m/z: 929.43 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **194b** wurde mittels präparativer MPLC gereinigt (12 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 1 % (v/v) Ameisensäure, Start bei 0 % MeOH) und als brauner FS erhalten. Ausbeute: 225 mg, 0.25 mmol, 63 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 21.81 min, Reinheit > 80 %. MS (ESI, positiv): ber.: 898.46, m/z: 899.35 [M+H]⁺.

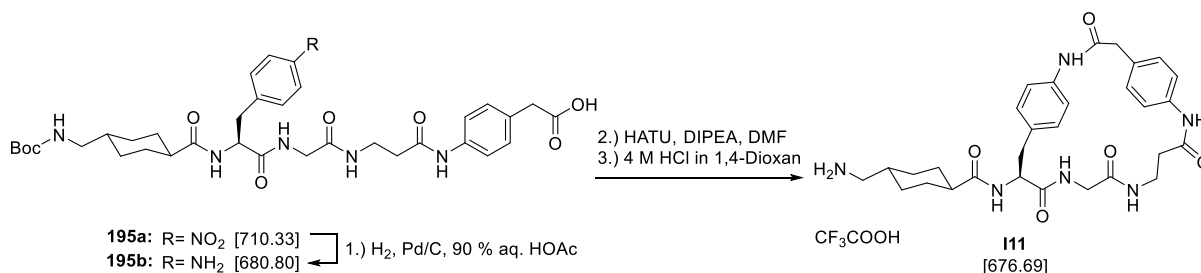
Die Verbindung **194b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Boc-geschützte Intermediat mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC: Methode A, 25.70 min). Nach der Trocknung *in vacuo* wurde der RS mit einer Mischung aus 95:2.5:2.5 (v/v/v) TFA, Wasser und Triisopropylsilan (TIS) versetzt und unter schwachem Rühren 1h bei RT behandelt. Danach wurde das Produkt mit DEE gefällt. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I10** als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 37 mg, 0.05 mmol, 20 %.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

HPLC: Methode B, Start bei 1 % B, 16.00 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 528.32, m/z: 529.28 [M+H]⁺.

H-Txa-Phe(c[4-NH]-Gly-βAla-4-aPhac] × TFA (I11)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,7,11,14-tetraoxo-2,6,10,13-tetraaza-1,5(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-15-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-Gly-OH,
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **195a** (HPLC: Methode A, 22.96 min, MS (ESI, negativ): ber.: 710.33, m/z: 709.38 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **195b** wurde mittels präparativer MPLC gereinigt (12 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 1 % (v/v) Ameisensäure, Start bei 0 % MeOH) und als farbloser FS erhalten. Ausbeute: 177 mg, 0.26 mmol, 65 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 15.9 min, Reinheit > 80 %. MS (ESI, positiv): ber.: 680.35, m/z: 681.26 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.90 (s, 1H), 8.12 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.82 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.73 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.39 (ddd, *J* = 9.9, 8.2, 4.7 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 16.6, 5.9 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 16.6, 5.6 Hz, 1H), 3.49 (s, 2H), 3.35 (ddd, *J* = 12.8, 7.0, 3.4 Hz, 2H), 2.96 (dd, *J* = 13.8, 4.5 Hz, 1H), 2.74 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.69 (dd, *J* = 13.9, 10.0 Hz, 1H), 2.49 (pd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (tt, *J* = 12.2, 3.3 Hz, 1H), 1.74 - 1.49 (m, 4H), 1.36 (s, 9H), 1.30 - 1.06 (m, 4H), 0.88 - 0.68 (m, 2H).

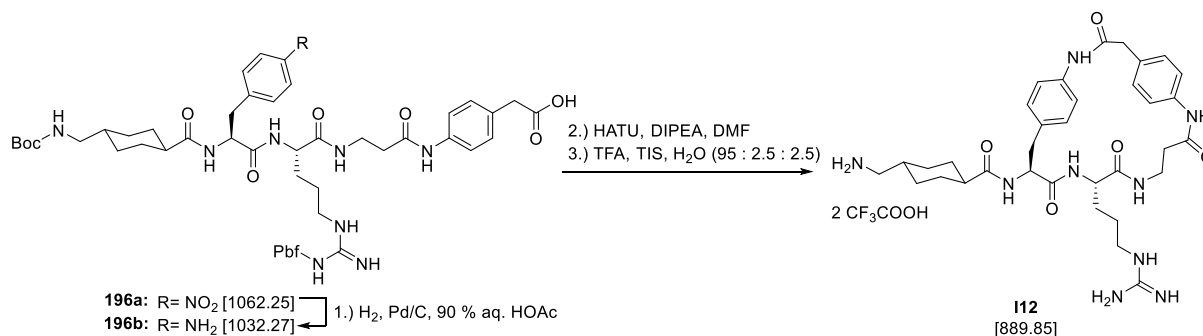
Die Verbindung **195b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 19.8 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I11** als farbloses Lyophilisat erhalten.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

Ausbeute: 6 mg, 0.012 mmol, 3 %. **HPLC:** Methode A, 10.46 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 562.29, m/z: 563.31 [M+H]⁺.

H-Txa-Phe(c[4-NH]-Arg-βAla-4-aPhac) × 2 TFA (I12)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((12S,15S)-12-(3-guanidinopropyl)-3,7,11,14-tetraoxo-2,6,10,13-tetraaza-1,5(1,4)-dibenzenacyclohexadecaphane-15-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-Arg(Pbf)-OH,
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

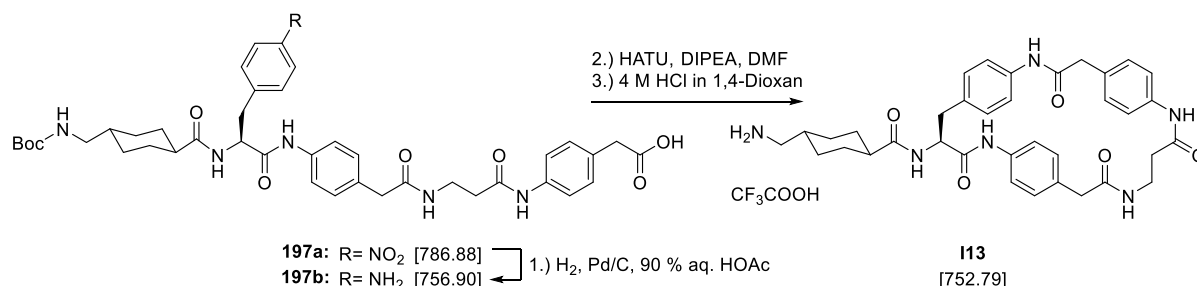
Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **196a** (HPLC: Methode A, 28.81 min, MS (ESI, positiv): ber.: 1061.49, m/z: 1062.49 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **196b** wurde mittels präparativer MPLC gereinigt (12 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 1 % (v/v) Ameisensäure, Start bei 0 % MeOH) und als blassbrauner FS erhalten. Ausbeute: 237 mg, 0.23 mmol, 57 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 22.58 min, Reinheit > 80 %. MS (ESI, positiv): ber.: 1031.52, m/z: 1032.40 [M+H]⁺.

Die Verbindung **196b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 26.05 min, MS (ESI, positiv): ber.: 1013.50, 1014.42 [M+H]⁺). Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde der Rückstand zur Abspaltung der Boc- und Pbf-Gruppen mit einer Mischung aus 95 : 2.5 : 2.5 (v/v/v) TFA, Wasser und Triisopropylsilan (TIS) versetzt und 1h bei RT schwach gerührt. Danach wurde das Produkt mit DEE gefällt. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I12** als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 20 mg, 0.23 mmol, 10 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 1 % B, 21.99 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 661.37, m/z: 662.42 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-βAla-4-aPhac) × TFA (I13)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,8,12,16-tetraoxo-4,9,13,17-tetraaza-1,5,10(1,4)-tribenzenacycloheptadecaphane-7-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **197a** (HPLC: Methode A, 25.42 min, MS (ESI, negativ): ber.: 786.36, m/z: 785.37 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **197b** wurde mittels präparativer MPLC (12 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 1 % (v/v) Ameisensäure, Start bei 0 % MeOH) gereinigt und als farbloser FS erhalten. Ausbeute: 196 mg, 0.26 mmol, 65 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 17.69 min, Reinheit: > 94 %. MS (ESI, positiv): ber.: 756.90, m/z: 757.45 [M+H]⁺.

Die Verbindung **197b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 22.17 min, MS (ESI, positiv): ber.: 738.37, m/z: 739.33 [M+H]⁺) und die Boc-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I13** als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 86 mg, 0.11 mmol, 44 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 17.43 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 638.32, m/z: 639.47 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.77 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.06 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H), 7.85 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H), 7.73 (s, 3H), 7.44 (s, 2H), 7.39 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.23 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.01 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 6.93 (bs, 2H), 6.84 (d, ³J = 7.0 Hz, 2H), 4.48 (br, 1H), 3.52 - 3.41 (m, 4H), 3.36 - 3.20 (m, 2H), 2.93 - 2.82 (m, 1H), 2.76 - 2.60 (m, 3H), 2.43 (bs, 2H), 2.22 (tt, ³J_{ax-ax}} = 12.5 Hz, ³J_{ax-eq}} 2.6 Hz, 1H), 1.86 - 1.70 (m, 4H), 1.58 - 1.45 (m, 1H), 1.43 - 1.21 (m, 2H), 1.04 - 0.88 (m, 2H).

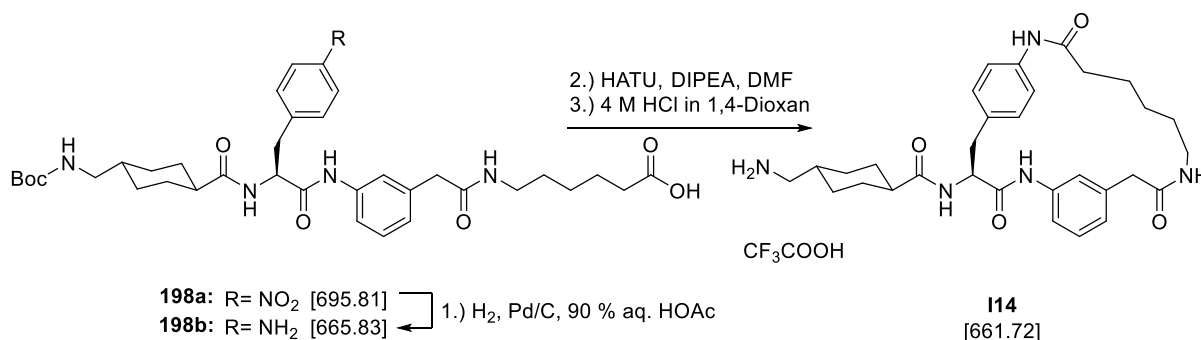
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 174.50, 170.01, 169.08, 157.96 (pd, ²J_{C-F}} = 31.8 Hz), 140.27, 137.93, 136.14, 131.30, 131.03, 129.31, 128.72, 128.45, 120.06, 119.34, 118.29, 44.34, 43.96, 42.95,

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

41.38, 38.19, 35.06, 28.87, 28.83, 28.34, 28.26. Nicht alle erwarteten Signale konnten eindeutig identifiziert werden.

H-Txa-Phe(c[4-NH]-3-aPhac-Aca) × TFA (I14)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,8,15-trioxo-2,7,14-triaza-1(1,3),6(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Aca-OH, 2.) Fmoc-3-aPhac-OH (**180**), 3.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH,
- 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **198a** (HPLC: Methode A, 26.14 min, MS (ESI, positiv): ber.: 695.35, m/z: 696.41 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **198b** wurde mittels präparativer MPLC gereinigt (12 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 1 % (v/v) Ameisensäure, Start bei 0 % MeOH) und als blassbrauner FS erhalten. Ausbeute: 229 mg, 0.34 mmol, 86 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 18.19 min, Reinheit > 88 %. MS (ESI, positiv): ber.: 665.38, m/z: 666.41 [M+H]⁺.

Die Verbindung **198b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert und das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 23.77 min, MS (ESI, positiv): ber.: 647.37, m/z: 648.15 [M+H]⁺). Zur Abspaltung der Boc-Gruppe wurde der RS mit 5 mL einer 20 % (v/v) Lösung aus TFA in DCM versetzt und 1 h bei RT gerührt. Danach wurde das Produkt mit DEE gefällt. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I14** als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 37 mg, 0.056 mmol, 16 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 1 % B, 16.28 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 547.32, m/z: 548.38 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.70 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.06 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.72 (bs, 3H), 7.70 - 7.64 (m, 2H), 7.43 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.13 (t, ³J = 7.9 Hz, 1H), 7.04 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 6.96 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 4.55 (ddd, ³J = 12.4 Hz, 7.2, 5.2 Hz, 1H), 3.22 (d, ³J = 3.9 Hz,

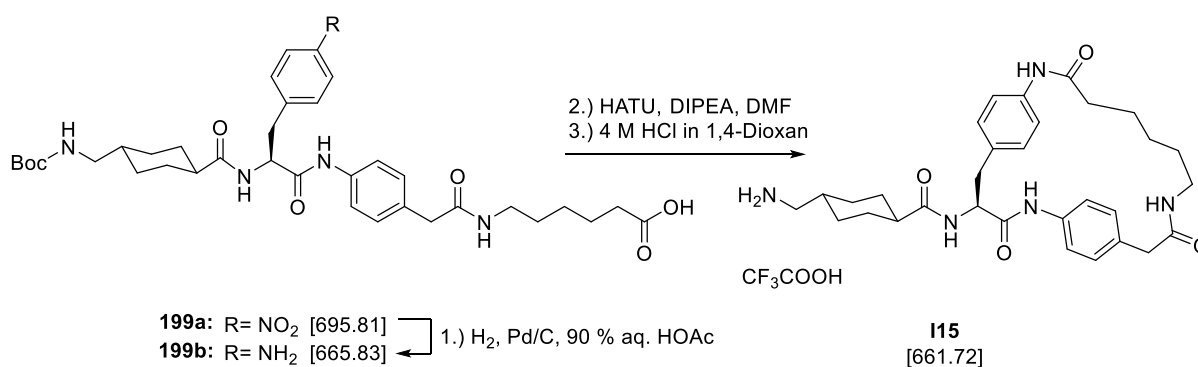
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

2H), 3.13 - 3.04 (m, 1H), 2.98 - 2.85 (m, 2H), 2.79 - 2.67 (m, 1H), 2.68 (p, $^3J = 5.9$ Hz, 2H), 2.29 - 2.17 (m, 3H), 1.87 - 1.71 (m, 4H), 1.67 - 1.56 (m, 2H), 1.55 - 1.46 (m, 1H), 1.42 - 1.26 (m, 4H), 1.25 - 1.11 (m, 2H), 0.96 1.02 - 0.90 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 175.15, 171.73, 170.11, 167.10, 158.57, 138.59, 138.16, 136.85, 129.85, 129.84, 128.58, 125.73, 119.20, 118.36, 55.60, 44.94, 43.54, 38.88, 37.15, 35.65, 29.46, 29.43, 29.30, 28.92, 28.87, 26.61, 25.67.

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-Aca) \times TFA (I15)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,8,15-trioxo-2,7,14-triaza-1,6(1,4)-dibenzenacyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Aca-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 3.) Fmoc-Phe(4- NO_2)-OH,
- 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **199a** (HPLC: Methode A, 26.44 min, MS (ESI, positiv): ber.: 695.35, m/z: 696.56 $[\text{M}+\text{H}]^+$) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **199b** wurde mittels präparativer MPLC gereinigt (12 g Silicagel, DCM/MeOH, jeweils versetzt mit 1 % (v/v) Ameisensäure, Start bei 0 % MeOH) und als blassbrauner FS erhalten. Ausbeute: 80 mg, 0.12 mmol, 30 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 17.88 min, Reinheit > 88 %. MS (ESI, positiv): ber.: 665.38, m/z: 666.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Die Verbindung **199b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Boc-geschützte Intermediat (HPLC: Methode A: 23.77 min, MS (ESI, positiv: ber.: 647.37, m/z: 648.15 $[\text{M}+\text{H}]^+$) mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC: Methode A, 22.71 min, MS (ESI, positiv: ber.: 647.37, m/z: 648.34 $[\text{M}+\text{H}]^+$). Zur Entfernung der Boc-Gruppe wurde das lyophilisierte Zwischenprodukt wurde mit 5 mL einer 20 % (v/v) Lösung aus TFA in DCM versetzt und 1 h bei RT gerührt. Danach wurde das Produkt mit DEE gefällt. Durch Reinigung mittels

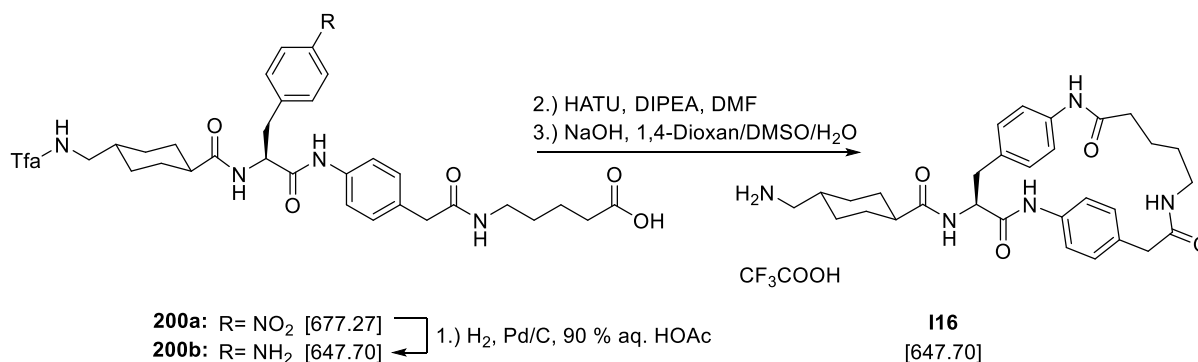
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I15** als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 8 mg, 0.012 mmol, 10 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 15.87 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 547.32, m/z: 548.38 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.61 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.11 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 7.73 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H), 7.67 (s, 3H), 7.36 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.96 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 6.82 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 4.61 - 4.54 (m, 1H), 3.21 (s, 2H), 3.19 - 3.09 (m, 1H), 3.07 - 2.94 (m, 2H), 2.74 - 2.57 (m, 3H), 2.30 - 2.17 (m, 3H), 1.87 - 1.72 (m, 4H), 1.67 - 1.40 (m, 3H), 1.42 - 1.20 (m, 4H), 1.17 - 1.05 (m, 2H), 1.04 - 0.90 (m, 2H).

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-Ava) × TFA (I16)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,8,14-trioxo-2,7,13-triaza-1,6(1,4)-dibenzencyclopentadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Ava-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 3.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH,
- 4.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **200a** (HPLC: Methode A, 23.24 min, MS (ESI, negativ): ber.: 677.27, m/z: 676.49 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **200b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 201 mg, 0.31 mmol, 78 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 14.84 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 647.29, m/z: 648.29 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 11.94 (br, 1H), 9.98 (s, 1H), 9.35 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.00 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.47 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.24 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.16 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.02 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 4.61 (td, ^{2,3}J = 8.7 Hz, 5.4 Hz, 1H), 3.33 (s, 2H), 3.08 - 2.93 (m, 5H), 2.82 (dd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 9.4 Hz, 1H), 2.20 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H), 2.11 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.0 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.3 Hz, 1H), 1.73 - 1.54 (m, 4H), 1.53 - 1.36 (m, 5H), 1.30 - 1.11 (m, 2H), 0.99 - 0.80 (m, 2H).}}

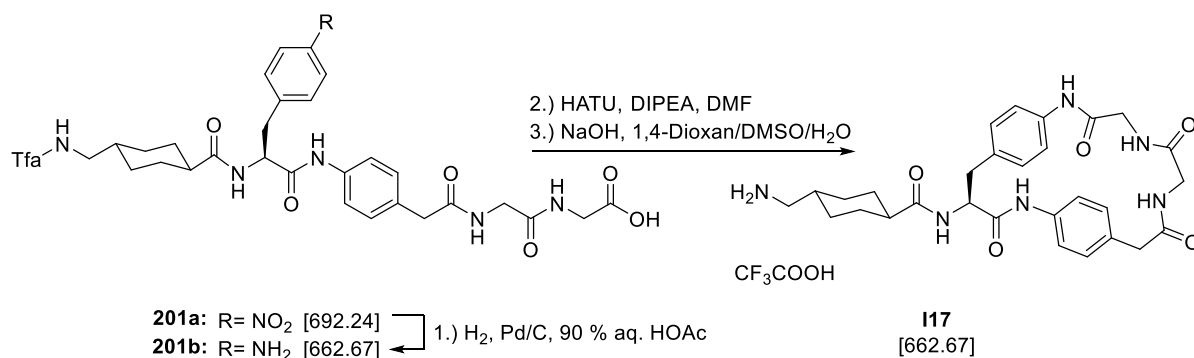
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

Die Verbindung **200b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 18.53 min) und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/DMSO/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I16** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 32 mg, 0.05 mmol, 16 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 13.13 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 533.30, m/z: 534.35 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.54 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.12 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.84 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H), 7.68 (bs, 3H), 7.26 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H), 7.05 - 6.97 (m, 4H), 6.92 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.57 (dt, ²J = 11.3 Hz, ³J = 7.0 Hz, 1H), 3.20 (d, ³J = 12.4 Hz, 1H), 3.17 - 2.99 (m, 2H), 2.90 - 2.77 (m, 1H), 2.68 (p, ³J = 5.8 Hz, 2H), 2.65 - 2.58 (m, 1H), 2.23 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.0 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.3 Hz, 1H), 2.20 - 2.13 (m, 1H), 2.12 - 2.05 (m, 2H), 1.84 - 1.74 (m, 4H), 1.58 - 1.48 (m, 1H), 1.48 - 1.39 (m, 2H), 1.39 - 1.31 (m, 2H), 1.30 - 1.14 (m, 2H), 1.14 - 1.02 (m, 1H), 0.97 (qd, ²J und ³J_{ax-ax} = 13.0 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.5 Hz, 2H).

H-Txa-Phe(c[4-NH])-4-aPhac-Gly-Gly × TFA (I17)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,8,11,14-tetraoxo-2,7,10,13-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzencyclopentadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gly-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **201a** (HPLC: Methode A, 20.89 min, MS (ESI, negativ ber.: 692.24, m/z: 691.25 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **201b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 90 mg, 0.14 mmol, 34 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 12.73 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 662.27, m/z: 663.24 [M+H]⁺.

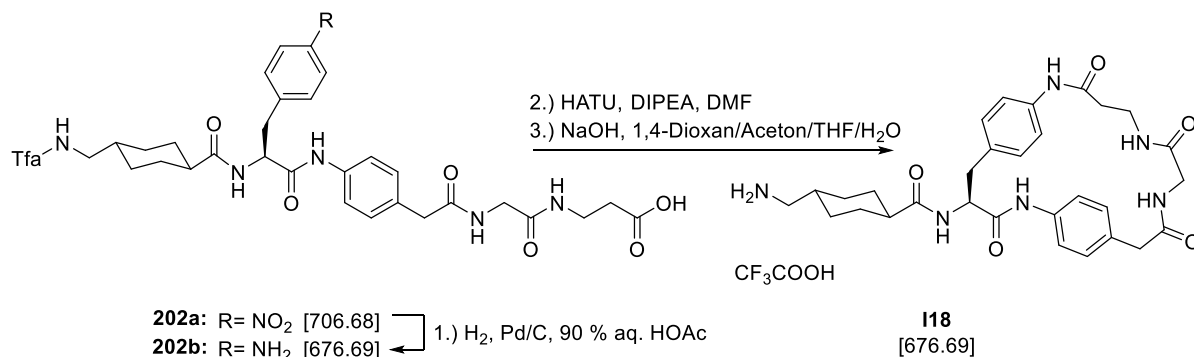
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

Die Verbindung **201b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 17.08 min) und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/DMSO/NaOH-Lsg. abgespalten. Das Produkt **I17** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 35 mg, 0.05 mmol, 39 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 1 % B, 19.15 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 548.27, m/z: 549.11 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 8.92 (s, 1H), 8.70 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.39 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 8.13 (d, ³J = 7.1 Hz, 1H), 7.69 (s, 3H), 7.05 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H), 6.95 (s, 4H), 6.83 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 4.46 (dt, ^{2,3}J = 11.5 Hz, 6.8 Hz, 1H), 3.84 - 3.73 (m), 3.68 (dd, J = 16.3, 5.6 Hz), 3.61 - 3.55 (m), 3.53 (d, J = 14.6 Hz), 3.27 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 2.98 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 6.1 Hz, 1H), 2.72 - 2.66 (m, 2H), 2.63 - 2.56 (m, 1H), 2.24 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.0 Hz, ³J_{ax-eq} 3.2 Hz, 1H), 1.81 (d, ³J = 10.3 Hz, 4H), 1.60 - 1.45 (m, 1H), 1.43 - 1.28 (m, 2H), 0.98 (m, J = 12.8, 3.6 Hz, 2H). Aufgrund eines breiten, durch protoniertes Wasser verursachten Signals wurden die Signale zw. etwa 3.9 und 3.4 ppm ohne Integrale gelistet.

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-Gly-βAla) × TFA (I18)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,8,12,15-tetraoxo-2,7,11,14-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-βAla-OH, 2.) Fmoc-Gly-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **202a** (HPLC: Methode A, 21.04 min, MS (ESI, negativ): ber.: 706.26, m/z: 705.33 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **202b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 140 mg,

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

0.21 mmol, 52 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 12.86 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 676.28, m/z: 677.27 [M+H]⁺.

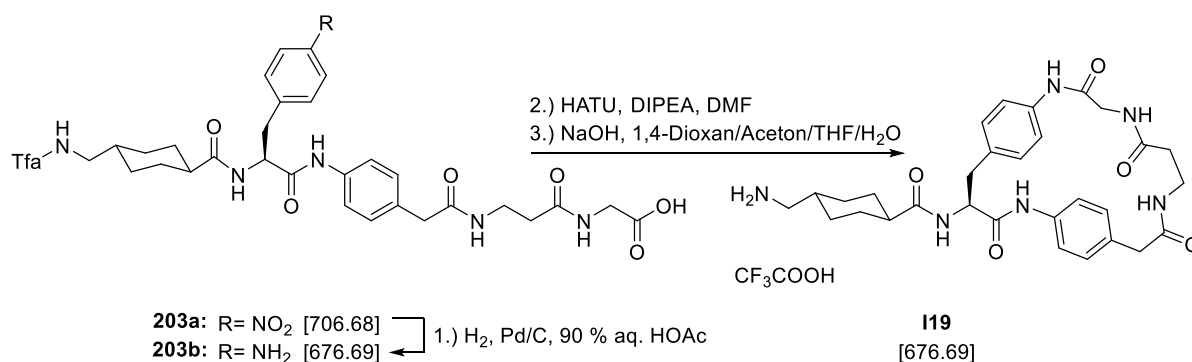
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 12.21 (br, 1H), 9.99 (s, 1H), 9.36 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.15 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.02 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.47 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.26 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.19 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.05 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 4.62 (td, ^{2,3}J = 8.6, 5.5 Hz, 1H), 3.65 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 3.42 (s, 2H), 3.26 (pq, J = 6.9 Hz, 2H), 3.06 - 2.96 (m, 3H), 2.83 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.4 Hz, 1H), 2.38 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H), 2.12 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.0 Hz, ³J_{ax-eq} 3.2 Hz, 1H), 1.75 - 1.56 (m, 4H), 1.52 - 1.38 (m, 1H), 1.30 - 1.11 (m, 2H), 0.98 - 0.82 (m, 2H).

Die Verbindung **202b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 17.19 min) und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I18** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 35 mg, 0.05 mmol, 25 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 1 % B, 19.76 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 562.29, m/z: 563.18 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.63 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.08 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H), 7.65 (bs, 3H), 7.28 (t, ³J = 4.8 Hz, 1H), 7.22 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 6.99 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 6.96 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 6.85 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 4.51 (dt, ²J = 11.3 Hz, ³J = 7.0 Hz, 1H), 3.63 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H), 3.31 (d, J = 14.1 Hz, 2H), 3.26 (d, J = 14.0 Hz, 1H), 3.00 (dd, ²J = 12.9 Hz, ³J = 6.5 Hz, 1H), 2.70 - 2.55 (m, 3H), 2.39 - 2.30 (m, 2H), 2.21 (tt, ³J_{ax-ax} = 11.1 Hz, ³J_{ax-eq} 2.7 Hz, 1H), 1.83 - 1.71 (m, 4H), 1.55 - 1.42 (m, 1H), 1.40 - 1.23 (m, 2H), 0.94 (qd, J = ³J_{ax-ax} = 12.9 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.2 Hz, 2H).

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-βAla-Gly) × TFA (I19)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-3,8,11,15-tetraoxo-2,7,10,14-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **203a** (HPLC: Methode A, 20.85 min, MS (ESI, negativ): ber.: 706.26, m/z: 705.42 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **203b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 102 mg, 0.15 mmol, 38 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 12.99 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 676.28, m/z: 677.31 [M+H]⁺.

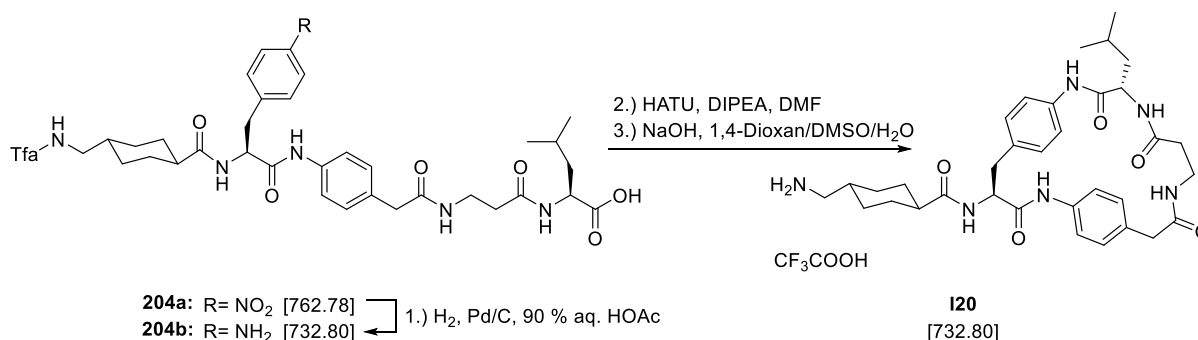
Die Verbindung **203b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 16.90 min) und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I19** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 16 mg, 0.02 mmol, 16 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 1 % B, 19.93 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 562.29, m/z: 563.47 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.54 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.17 (bs, 1H), 8.12 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.69 (bs, 3H), 7.37 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.27 (bs, 2H), 7.01 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H), 6.92 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 6.80 (bs, 1H), 4.59 - 4.40 (m, 1H), 3.93 - 3.80 (m, 1H), 3.71 - 3.59 (m, 1H), 3.34 - 3.17 (m, 4H), 3.03 (dd, ²J = 12.5 Hz, ²J = 6.0 Hz, 1H), 2.74 - 2.60 (m, 3H), 2.41 - 2.28 (m, 2H), 2.24 (tt, ³J_{ax-ax} = 11.8 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.3 Hz, 1H), 1.85 - 1.71 (m, 4H), 1.60 - 1.46 (m, 1H), 1.42 - 1.29 (m, 2H), 0.97 (qd, ³J_{ax-ax} = 13.9 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.7 Hz, 2H).

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-βAla-Leu) × TFA (I20)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((4S,9S)-9-isobutyl-3,8,11,15-tetraoxo-2,7,10,14-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Leu-OH, 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

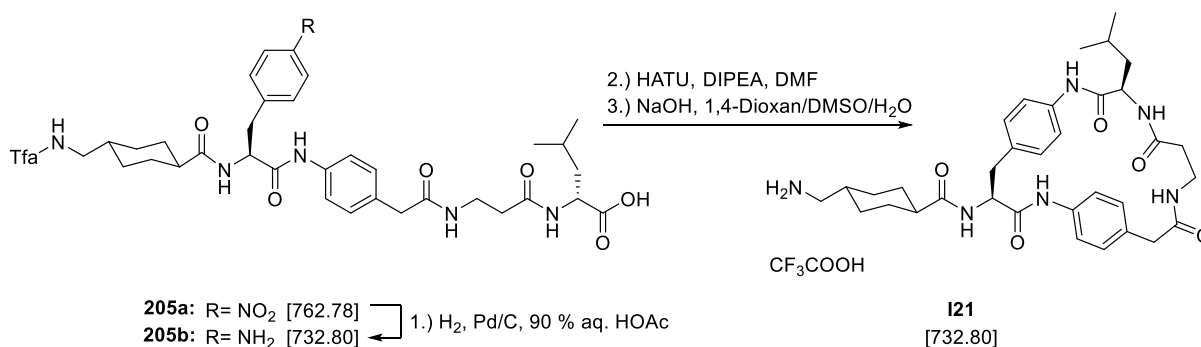
Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **204a** (HPLC: Methode A, 24.23 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **204b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 93 mg, 0.13 mmol, 53 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 16.66 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 732.35, m/z: 733.27 [M+H]⁺.

Die Verbindung **204b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 21.96 min, MS (ESI, positiv): ber.: 714.34, m/z: 715.37 [M+H]⁺) und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/DMSO/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I20** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 22 mg, 0.03 mmol, 24 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 23.05 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 618.35, m/z: 619.34 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.78 (s, 0.3H), 9.66 (s, 0.7H), 8.95 (s, 0.7H), 8.89 (s, 0.3H), 8.13 (d, ³J = 7.6 Hz, 0.3H), 8.08 (d, ³J = 7.4 Hz, 0.7H), 8.01 (d, ³J = 8.3 Hz, 0.7H), 7.98 (d, ³J = 7.8 Hz, 0.3H), 7.78 - 7.55 (m, 4H), 7.40 (d, ³J = 8.6 Hz, 0.5H), 7.27 (d, ³J = 8.0 Hz, 1.5H), 7.06 (d, ³J = 8.5 Hz, 1.5H), 7.00 (d, ³J = 8.7 Hz, 0.5H), 6.93 (d, ³J = 8.5 Hz, 0.5H), 6.84 (d, ³J = 8.5 Hz, 1.5H), 6.81 - 6.69 (m, 2H), 4.59 (dt, ²J = 11.0 Hz, ³J = 7.0 Hz, 0.7H), 4.51 - 4.41 (m, 1H), 4.39 - 4.32 (m, 0.3H), 3.34 - 3.27 (m, 3H), 3.25 - 3.14 (m, 2H), 3.08 (dd, ²J = 12.7 Hz, ³J = 6.3 Hz, 0.7H), 3.02 (dd, ²J = 12.7 Hz, ³J = 6.2 Hz, 0.3H), 2.71 - 2.65 (m, 2H), 2.63 - 2.55 (m, 1H), 2.28 - 2.19 (m, 2H), 1.88 - 1.72 (m, 4H), 1.68 - 1.45 (m, 4H), 1.40 - 1.29 (m, 2H), 1.03 - 0.95 (m, 2H), 0.94 - 0.86 (m, 6H).

H-Txa-Phe(c[4-NH])-4-aPhac-βAla-DLeu] × TFA (I21)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((4*S*,9*R*)-9-isobutyl-3,8,11,15-tetraoxo-2,7,10,14-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-DLeu-OH, 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

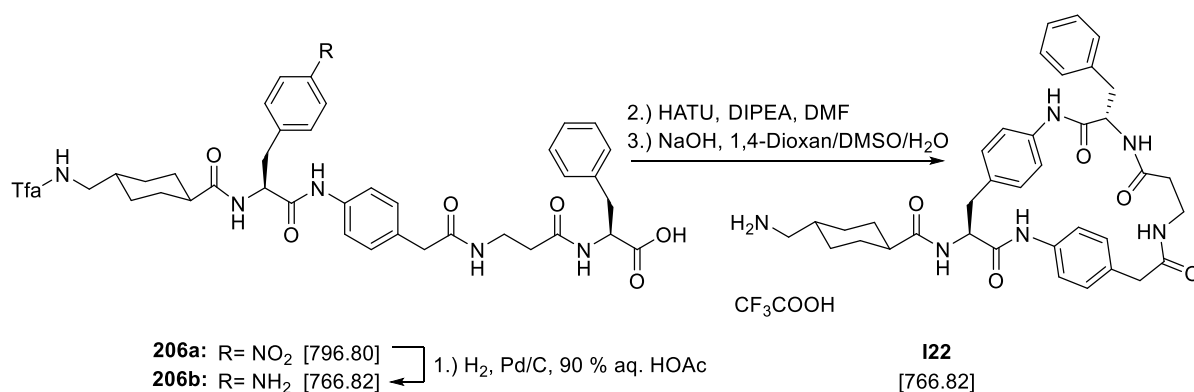
Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **205a** (HPLC: Methode A, 24.24 min, MS (ESI, negativ): ber.: 762.32, m/z: 761.45 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **205b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 91 mg, 0.12 mmol, 52 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 16.68 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 732.35, m/z: 733.32 [M+H]⁺.

Die Verbindung **205b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt (HPLC: Methode A: 21.98 min, MS (ESI, positiv): ber.: 714.34, m/z: 715.20 [M+H]⁺) und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/DMSO/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I21** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 27 mg, 0.037 mmol, 30 %. **HPLC:** Methode A, 14.46 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 618.35, m/z: 619.50 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.78 (s, 0.4H), 9.66 (s, 0.6H), 8.96 (s, 0.6H), 8.89 (s, 0.4H), 8.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 0.4H), 8.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.6H), 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 0.6H), 7.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.4H), 7.78 - 7.65 (m, 4H), 7.40 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 0.6H), 7.27 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1.4H), 7.06 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1.2H), 7.00 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 0.8H), 6.93 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 0.8H), 6.84 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1.2H), 6.78 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 0.8H), 6.76 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1.2H), 4.59 (dt, ²*J* = 11.1 Hz, ³*J* = 7.1 Hz, 0.6H), 4.51 - 4.40 (m, 1H), 4.40 - 4.32 (m, 0.4H), 3.41 - 3.27 (m, 3H), 3.25 - 3.12 (m, 2H), 3.08 (dd, ²*J* = 12.5 Hz, ³*J* = 6.5 Hz, 0.6H), 3.02 (dd, ²*J* = 12.5 Hz, ³*J* = 6.1 Hz, 0.4H), 2.72 - 2.64 (m, 2H), 2.64 - 2.57 (m, 1H), 2.28 - 2.18 (m, 2H), 1.84 - 1.74 (m, 4H), 1.66 - 1.43 (m, 4H), 1.40 - 1.31 (m, 2H), 1.03 - 0.94 (m, 2H), 0.94 - 0.86 (m, 6H).

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-βAla-Phe) × TFA (I22)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((4*S*,9*S*)-9-benzyl-3,8,11,15-tetraoxo-2,7,10,14-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzenacyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Phe-OH, 2.) Fmoc- β Ala-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **206a** (HPLC: Methode A, 24.73 min, MS (ESI, negativ): ber.: 796.30, m/z: 795.70 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **206b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 33 mg, 0.04 mmol, 18 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 17.10 min, Reinheit: > 98 %. MS (ESI, positiv): ber.: 766.33, m/z: 767.47 [M+H]⁺.

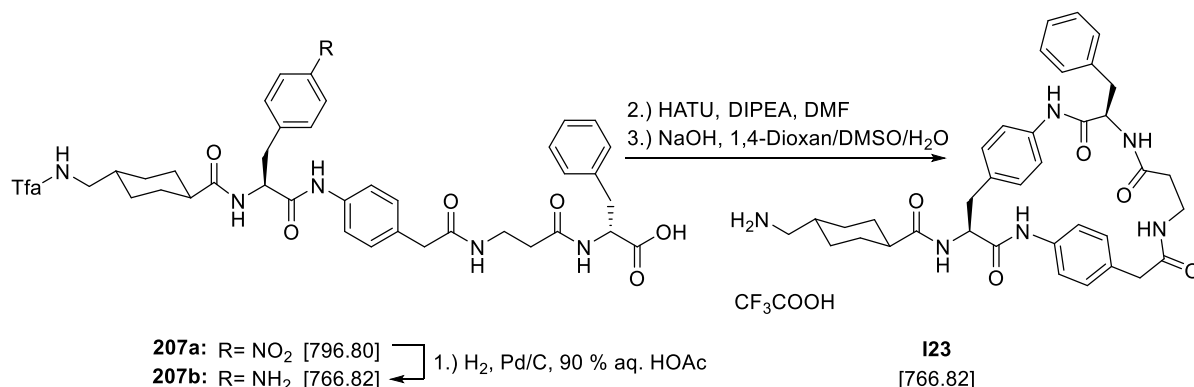
Die Verbindung **206b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 22.29 min, MS (ESI, positiv): ber.: 748.32, m/z: 749.50 [M+H]⁺). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/DMSO/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I22** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 6 mg, 0.008 mmol, 18 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 15 % B, 14.90 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.34, m/z: 653.37 [M+H]⁺. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.34, m/z: 653.37 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9.85 (s, 0.5H), 9.62 (s, 0.5H), 8.90 (s, 0.5H), 8.85 (s, 0.5H), 8.21 (d, ³J = 8.5 Hz, 0.5H), 8.13 (d, ³J = 8.1 Hz, 0.5H), 8.10 (d, ³J = 7.4 Hz, 0.5H), 8.04 (d, ³J = 7.3 Hz, 0.5H), 7.72 - 7.60 (m, 3H), 7.35 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H), 7.28 - 7.12 (m, 7H), 7.02 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 6.97 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 6.89 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 6.80 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 6.73 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 4.62 - 4.52 (m, 1.5H), 4.45 (dt, ²J = 11.4 Hz, ³J = 6.8 Hz, 0.5H), 3.19 - 3.09 (m, 3H), 3.07 - 2.90 (m, 2H), 2.84 - 2.75 (td, ²J = 13.6 Hz, ³J = 9.1 Hz, 1H), 2.65 (p, ³J = 5.7 Hz, 2H), 2.61 - 2.51 (m, 1H), 2.42 - 2.34 (m, 2H), 2.24 - 2.16 (m, 1H), 2.13 - 2.05 (m, 1H), 1.81 - 1.68 (m, 4H), 1.53 - 1.42 (m, 1H), 1.38 - 1.26 (m, 2H), 0.94 (qd, ²J = 12.6 Hz, ³J = 3.0 Hz, 2H).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-βAla-DPhe) × TFA (I23)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((4S,9R)-9-benzyl-3,8,11,15-tetraoxo-2,7,10,14-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzenacyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Phe-OH, 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-DPhe(4-NO₂)-OH, 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **207a** (HPLC: Methode A, 24.60 min, MS (ESI, positiv): ber.: 796.30, m/z: 797.30 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **207b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 89 mg, 0.12 mmol, 48 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 17.17 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 766.33, m/z: 767.35 [M+H]⁺.

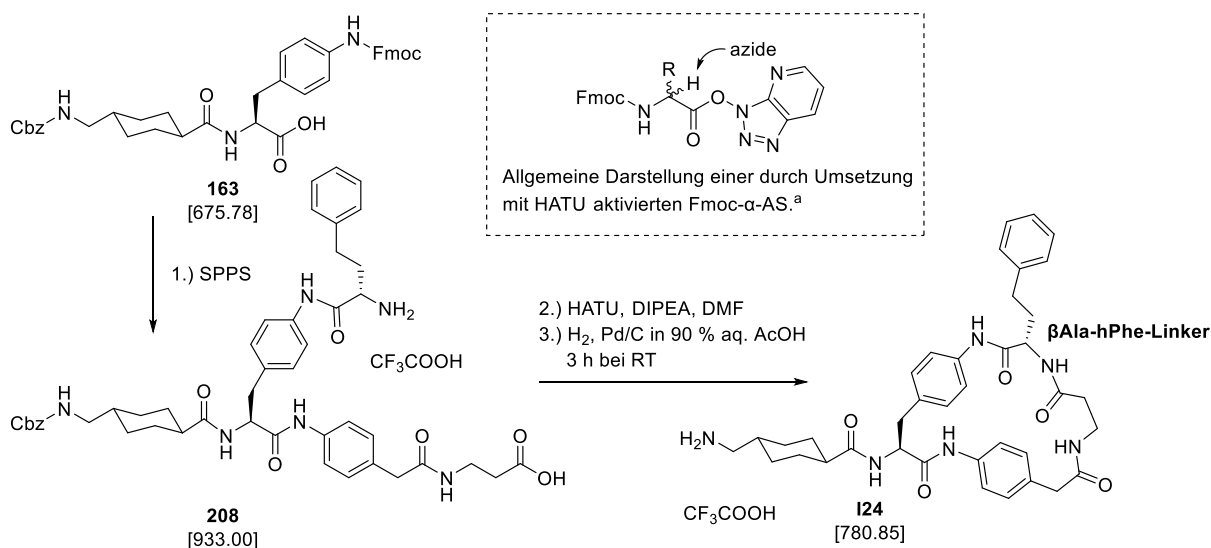
Die Verbindung **207b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 22.30 min, MS (ESI, positiv): ber.: 748.32, m/z: 749.58 [M+H]⁺). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/DMSO/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I23** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 4.5 mg, 0.005 mmol, 5 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 15 % B, 14.98 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.34, m/z: 653.35 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-βAla-hPhe) × TFA (I24)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((4*S*,9*S*)-3,8,11,15-tetraoxo-9-phenethyl-2,7,10,14-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzencyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide

Zur Herstellung des Inhibitors **I24** wurde eine alternative Synthesestrategie ausprobiert, die eine mögliche Razemisierung der beiden Stereozentren vermeiden soll (**Schema 28**). Die Kupplung der relativ schwach reaktiven anilinischen P1'-Aminogruppe an das sterisch anspruchsvolle Fmoc-hPhe erfolgt anders als bei der Synthese nach Strategie E bereits während der SPPS. Der im Überschuss vorhandene, durch HATU aktivierte Fmoc-hPhe-Baustein reagiert dabei relativ schnell mit dem schwach nucleophilen aromatischen Amin des P1'-Restes, wodurch dessen prinzipiell mögliche Razemisierung vermieden wird. Während der Zyklisierung (Schritt 2) enthält der durch HATU aktivierte C-Terminus des βAla-Restes kein Stereozentrum, sodass keine Razemisierung möglich ist. Die finale Abspaltung der Cbz-Gruppe erfolgt durch Hydrierung (Schritt 3). Die zur Abspaltung der zuvor häufig verwendeten Tfa-Gruppe erforderlichen stark basischen Bedingungen, die eine Razemisierung prinzipiell begünstigen, werden vermieden. Die Strategie wurde bislang ausschließlich zur hier beschriebenen Synthese des Inhibitors **I24** genutzt.



Schema 28: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung des Inhibitors I24.

^aDas α-H-Atom ist azide und könnte durch DIPEA vorübergehend abgespalten werden, wenn die AS lange im aktivierten Zustand vorliegt. Bei der darauffolgenden Reprotonierung wäre eine Razemisierung zu erwarten.

Herstellung des Inhibitors:

In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-βAla-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Cbz-Txa-Phe(4-NH-Fmoc)-OH (**163**), 4.) Boc-hPhe-OH

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **208** unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt. Abweichend vom allgemeinen Protokoll wurde das Peptid mit einer 20 % (v/v) Tfa-Lsg. in DCM vom Harz abgespalten, um die N-terminale Boc-Schutzgruppe zu entfernen. Die Verbindung wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 31 mg, 0.03 mmol, 14 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode B, Start bei 20 % B, 26.28 min, Reinheit: > 98 %. MS (ESI, positiv): ber.: 818.40, m/z: 819.43 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 10.39 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 8.31 (bs, 3H), 8.03 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 8.00 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H), 7.49 - 7.43 (m, 3H), 7.38 - 7.13 (m, 16H), 5.00 (s, 2H), 4.62 (td, ³J = 8.5 Hz, 5.6 Hz, 1H), 3.99 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 3.33 (s, 2H), 3.23 (q, ³J = 6.8 Hz, 2H), 2.99 (dd, ²J = 13.5 Hz, ³J = 5.0 Hz, 1H), 2.89 - 2.74 (m, 3H), 2.73 - 2.61 (m, 2H), 2.37 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H), 2.19 - 1.99 (m, 3H), 1.72 - 1.52 (m, 4H), 1.34 - 1.11 (m, 3H), 0.91 - 0.76 (m, 2H).

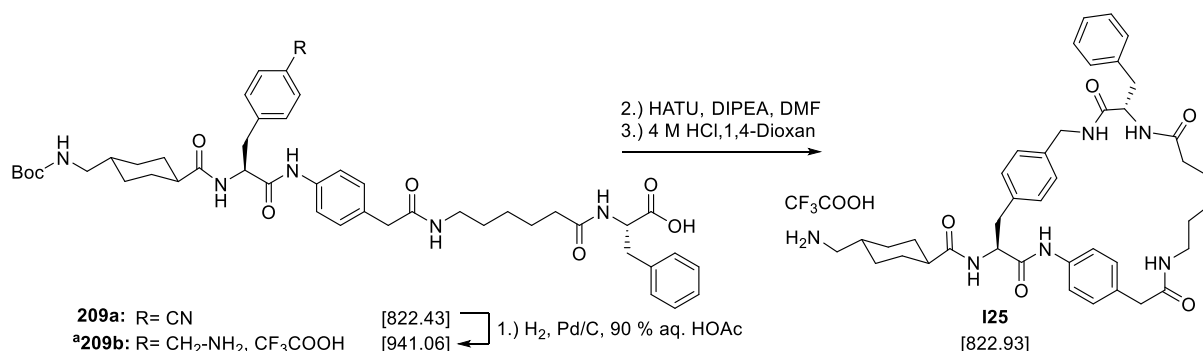
Die Verbindung **208** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 28.40 min, MS (ESI, positiv): 800.39, m/z: 801.18 [M+H]⁺). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Cbz-Gruppe durch katalytische Hydrierung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B abgespalten. Der finale Inhibitor **I24** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 12 mg, 0.015 mmol, 46 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 26.94 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 666.35, m/z: 667.32 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.75 (s, 0.5H), 9.63 (s, 0.5H), 8.96 (s, 0.5H), 8.89 (s, 0.5H), 8.17 - 8.05 (m, 2H), 7.77 - 7.63 (m, 4H), 7.44 - 7.35 (m, 1.3H), 7.35 - 7.14 (m, 6.7H), 7.06 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 7.00 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H), 6.94 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 6.85 (d, ³J = 8.5 Hz, 0.7H), 6.78 (d, ³J = 8.4 Hz, 1.3H), 4.59 (dt, ²J = 11.1 Hz, ³J = 7.2 Hz, 0.5H), 4.48 (dt, ²J = 11.6 Hz, ³J = 7.3 Hz, 0.5H), 4.42 - 4.35 (m, 0.5H), 4.33 - 4.26 (m, 0.5H), 3.43 - 3.34 (m, 1H), 3.22 - 3.16 (m, 2H), 3.08 (dd, ²J = 12.7 Hz, ³J = 6.5 Hz, 0.5H), 3.07 - 2.96 (m, 0.5H), 2.76 - 2.55 (m, 6H), 2.31 - 2.19 (m, 2H), 2.03 - 1.84 (m, 3H), 1.84 - 1.72 (m, 4H), 1.58 - 1.45 (m, 1H), 1.43 - 1.27 (m, 2H), 1.08 - 0.84 (m, 2H). Im aliphatischen Bereich überlappen einige Signale mit dem des LM sowie dem durch den Wassergehalt des LM verursachten Signal. Daher konnten in diesem Bereich nicht alle Signale deutlich vom Untergrund unterschieden werden.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

H-Txa-Phe(c[4-Me-NH]-4-aPhac-Aca-Phe) × TFA (I25)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((4S,10S)-10-benzyl-3,9,12,19-tetraoxo-2,8,11,18-tetraaza-1,6(1,4)-dibenzenacycloicosaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



^aDa das Intermediat **209b** eine aliphatische Aminomethylgruppe statt der üblichen anilinschen Aminogruppen enthält, wurde bei der Berechnung der molaren Masse 1 eq. TFA berücksichtigt (vgl. auch Anmerkung im Abschnitt 6.12.)

In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Phe-OH, 2.) Fmoc-Aca-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Phe(4-CN)-OH, 5.) Boc-Txa-OH (**66**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **209a** (HPLC: Methode A, 26.76 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **209b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 66 mg, 0.07 mmol, 29 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 21.52 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 826.46, m/z: 827.44 [M+H]⁺.

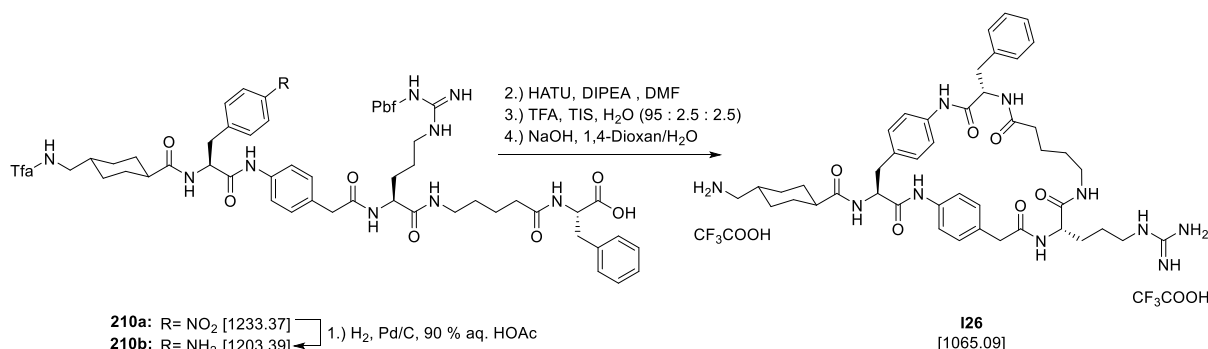
Die Verbindung **209b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 25.89 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der finale Inhibitor **I25** als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 19 mg, 0.023 mmol, 33 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 25.73 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 708.40, m/z: 709.42 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

H-Txa-Phe(c[4-NH]-4-aPhac-Arg-Ava-Phe) × TFA (I26)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((4S,9S,18S)-9-benzyl-18-(3-guanidinopropyl)-3,8,11,17,20-pentaaxo-2,7,10,16,19-pentaaza-1,6(1,4)-dibenzencyclohenicosaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Phe-OH, 2.) Fmoc-Ava-OH, 3.) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 4.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 5.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 6.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **210a** (HPLC: Methode A, 29.49 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **210b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 75 mg, 0.06 mmol, 26 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 23.01 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 1202.54, m/z: 1203.81 [M+H]⁺.

Die Verbindung **210b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 28.60 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt, der RS zur Abspaltung der Pbf-Gruppe mit einer Mischung aus 95 : 2.5 : 2.5 (v/v/v) TFA, Wasser und Triisopropylsilan (TIS) versetzt und bei RT für 1h schwach gerührt. Danach wurde das Produkt mit DEE gefällt. Die Tfa-Gruppe wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg abgespalten und der finale Inhibitor **I26** mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 15 mg als farbloses Lyophilisat, 0.014 mmol, 23 %. **HPLC:** Methode A, 14.07 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 836.47, m/z: 837.47 [M+H]⁺.

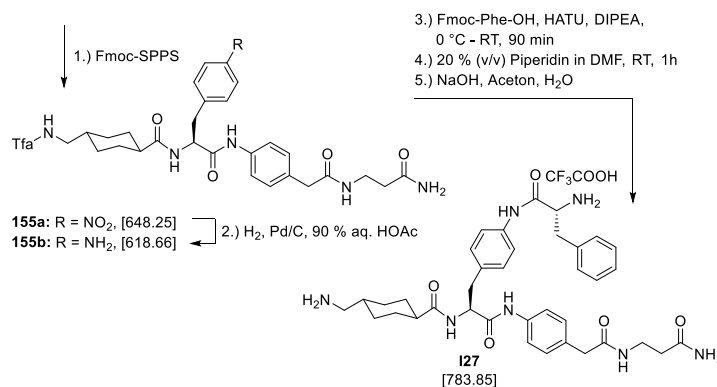
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.92 (s, 0.5H), 9.88 (s, 0.5H), 9.60 (pd, 1H), 8.16 - 8.06 (m, 2.45H), 7.96 (d, ³J = 7.9 Hz, 0.5H), 7.88 - 7.81 (m, 1H), 7.70 (s, 3H), 7.56 - 7.47 (m, 1H), 7.45 - 7.37 (m, 2H), 7.34 - 7.21 (m, 7H), 7.88 - 7.81 (m, 2H), 7.12 - 7.04 (m, 5H), 4.64 - 4.46 (m, 2H), 4.27 - 4.13 (m, 1H), 3.54 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 7.3 Hz, 1H), 3.25 - 3.13 (m, 2H), 3.13 - 3.02 (m, 2H), 3.01 - 2.89 (m,

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.6. Inhibitoren I9 - I27 (Serie 4)

2H), 2.88 - 2.76 (m, 2H), 2.76 - 2.61 (m, 2H), 2.28 - 2.10 (m, 2H), 2.01 - 1.90 (m, 1H), 1.85 - 1.71 (m, 4H), 1.65 - 1.23 (m, 12H), 1.03 - 0.86 (m, 2H).

H-Txa-Phe(4-NH-Phe-NH₂)-4-aPhac-βAla-OH × TFA (I27)

(1*r*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-((4-(2-((3-amino-3-oxopropyl)amino)-2-oxoethyl)phenyl)amino)-3-(4-((*R*)-2-amino-3-phenylpropanamido)phenyl)-1-oxopropan-2-yl)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-βAla-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 2.) Fmoc-Phe(4-NO₂)-OH, 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 450 mg Rink-Amid (Kapazität: 0.74 mmol/g, 0.333 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde die Nitro-Verbindung **211a** (HPLC: Methode A, 20.92 min, MS (ESI, positiv): ber.: 648.25, m/z: 649.30 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt. Die Verbindung wurde ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert und das Zwischenprodukt **211b** mittels präparativer HPLC gereinigt. Ausbeute: 112 mg als farbloses Lyophilisat, 0.181 mmol, 54 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 13.00 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 618.26, m/z: 619.26 [M+H]⁺.

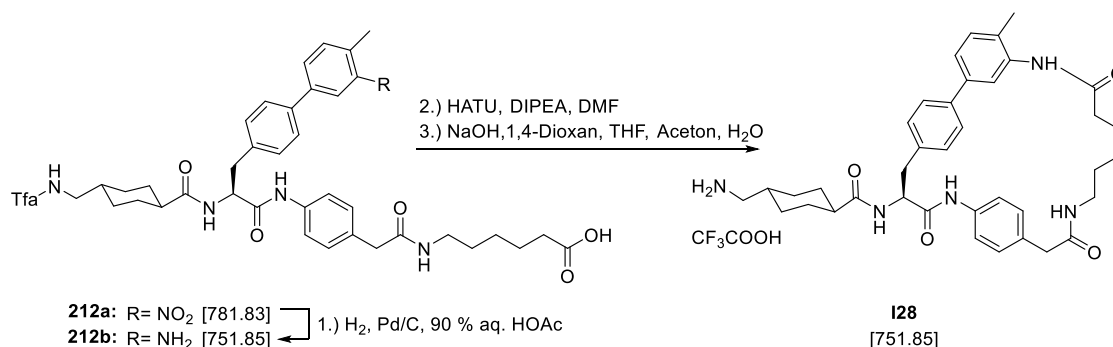
Die Verbindung **211b** (28 mg, 0.045 mmol, 1 eq.) und Fmoc-Phe-OH (15.5 mg, 0.050 mmol, 1.1 eq.) wurden in 3 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit DIPEA (21 µL, 0.121 mmol, 2.7 eq.) versetzt. Nach der Zugabe von HATU (22 mg, 0.058 mmol, 1.3 eq.) wurde die Mischung für 45 min bei 0 °C und für 1 h bei RT gerührt. Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde das LM *in vacuo* entfernt, das erhaltene Öl in 3 mL einer 20 % (v/v) Lösung aus Piperidin in DMF gelöst und für 35 min bei RT gerührt (Rohprodukt: HPLC: Methode A, 15.52 min, MS (ESI, positiv): ber.: 765.35, m/z: 766.39 [M+H]⁺). Erneut wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F in 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I27** wurde nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 12 mg, 0.015 mmol, 34 %. **HPLC:** Methode A, 11.53 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 669.36, m/z: 670.36 [M+H]⁺.

6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

In diesem Abschnitt wird die Synthese der Inhibitoren der Serie 5 und deren Vorstufen beschrieben.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Aca] × TFA (I28)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,16-trioxo-6,10,17-triaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacycloheptadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Aca-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**),
- 4.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **212a** (HPLC: Methode A, 28.53 min, MS (ESI, negativ): ber.: 781.33, m/z: 780.7 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **212b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 29 mg, 0.038 mmol, 16 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 19.35 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 751.36, m/z: 752.32 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.02 (s, 1H), 9.34 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.05 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H), 7.93 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.52 - 7.47 (m, 4H), 7.35 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.23 - 7.15 (m, 4H), 4.67 (td, ³J = 8.7 Hz, 5.1 Hz, 1H), 3.09 - 2.95 (m, 5H), 2.89 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.5 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.18 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H), 2.15 - 2.08 (m, 1H), 1.78 - 1.56 (m, 4H), 1.54 - 1.33 (m, 5H), 1.33 - 1.10 (m, 6H), 0.99 - 0.67 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆): δ[ppm] = 175.00, 174.34, 170.12, 169.92, 156.45, 156.16, 138.57, 137.64, 137.08, 137.02, 131.54, 131.18, 129.77, 129.11, 125.84, 119.27, 116.87, 115.32, 114.85, 54.36, 45.07, 43.45, 41.80, 38.43, 36.33, 33.57, 29.36, 29.25, 28.76, 28.50, 28.31, 25.91, 24.15, 16.69. Nicht alle erwarteten Signale konnten eindeutig identifiziert werden.

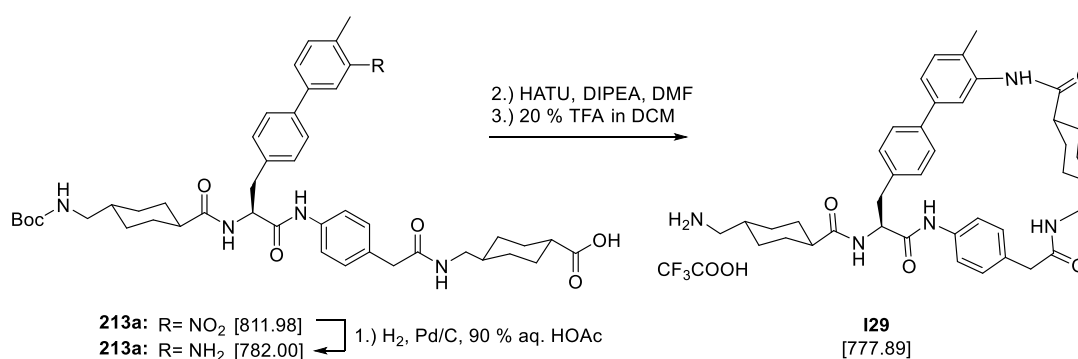
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

Die Verbindung **212b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 24.96 min, MS (ESI, positiv): ber.: 733.35, m/z: 734.60 [M+H]⁺). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I28** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 9 mg, 0.012 mmol, 31 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 27.81 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 637.36, m/z: 638.45 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.35 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.11 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 7.90 - 7.83 (m, 1H), 7.68 (s, 3H), 7.64 - 7.57 (m, 1H), 7.44 - 7.32 (m, 2H), 7.31 - 7.13 (m, 4H), 7.11 - 6.96 (m, 4H), 4.63 - 4.52 (m, 1H), 3.33 - 3.23 (m, 2H), 3.09 - 2.97 (m, 3H), 2.91 - 2.78 (m, 1H), 2.72 - 2.66 (m, 2H), 2.45 - 2.35 (m, 2H), 2.31 - 2.18 (m, 4H), 1.88 - 1.77 (m, 4H), 1.65 - 1.58 (m, 2H), 1.56 - 1.46 (m, 1H), 1.46 - 1.27 (m, 6H), 1.05 - 0.86 (m, 2H).

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Txa) × TFA (I29)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((51S,54S,13S)-24-methyl-4,8,12-trioxo-3,7,11-triaza-1,10(1,4),2(1,3)-tribenzena-5(1,4)-cyclohexanacyclotetradecaphane-13-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Txa-OH (**161**), 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.208 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **213a** (HPLC: Methode A, 31.24 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **213b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 75 mg, 0.10 mmol, 46 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 22.26 min, Reinheit: > 99 %.

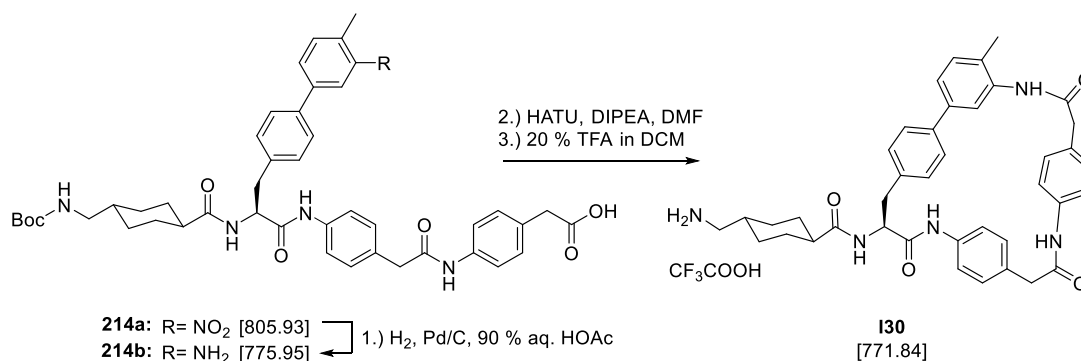
Die Verbindung **213b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 27.14 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppe durch einstündiges Rühren in 4 mL einer 20 % (v/v) TFA Lösung in DCM bei

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

RT abgespalten. Der finale Inhibitor **I29** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 28 mg, 0.036 mmol, 38 %. **HPLC:** Methode A, 17.50 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 663.83, m/z: 664.54 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-4-aPhac) × TFA (I30)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-24-methyl-4,8,12-trioxo-3,7,11-triaza-1,6,10(1,4),2(1,3)-tetrabenzencyclotetradecaphane-13-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.208 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **214a** (HPLC: Methode A, 31.73 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **214b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 94 mg, 0.12 mmol, 58 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 22.62 min, Reinheit: > 99 %.

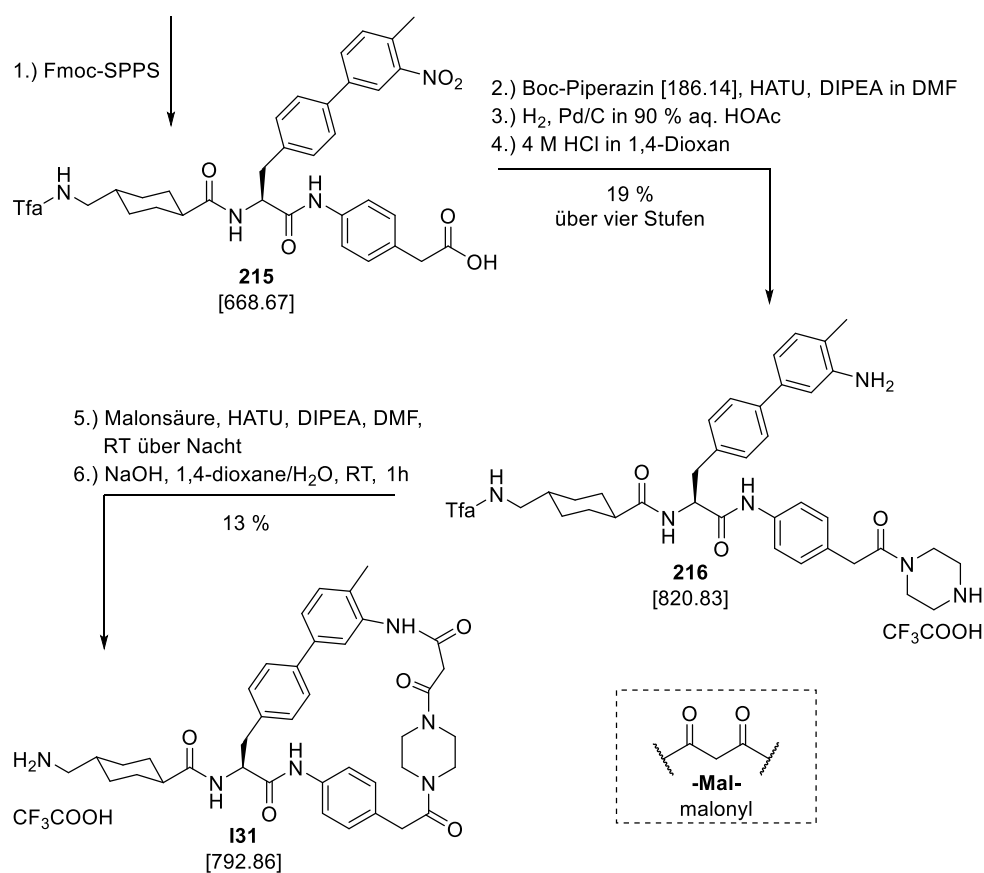
Die Verbindung **214b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 28.85 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppe durch einstündiges Rühren in 4 mL einer 20 % (v/v) TFA Lösung in DCM bei RT abgespalten. Der finale Inhibitor **I30** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 19 mg, 0.025 mmol, 20 %. **HPLC:** Methode A, 18.93 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 657.33, m/z: 658.40 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Piz-Mal) × TFA (I31)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-24-methyl-4,6,8,12-tetraoxo-3,11-diaza-7(1,4)-piperazina-1,10(1,4),2(1,3)-tribenzenacyclotetradecaphane-13-yl)cyclohexane-1-carboxamide

Die Synthese der Verbindung **I31** erfolgte gemäß **Schema 29**. Das lineare Intermediat **215** wurde mittels Fmoc-SPPS hergestellt und ohne Reinigung in den Schritten 2 - 4 zur Verbindung **216** umgesetzt, welche mittels präparativer HPLC gereinigt und mit einer Ausbeute von 19 % bezogen auf die eingesetzte Harzmengende erhalten wurde. Abweichend zur Synthesestrategie E erfolgte die Zyklisierung des Vorläufermoleküls **216** mit Malonsäure zweistufig, d. h. intermolekular im 1. Schritt und intramolekular im 2. Schritt. Nach Abspaltung der P1-Schutzgruppe wurde der Inhibitor **I31** mit einer Ausbeute von 13 % erhalten.



Schema 29: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung des Inhibitors I31.

In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

1.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 2.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 3.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 500 mg 2-CTC (Kapazität 1.6 mmol/g. 0.8 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F wurde das Intermediat **215** unter Verwendung der o. g. AS und Harzmengende hergestellt (HPLC: Methode A, 23.75 min, Reinheit: > 93 %, MS (ESI, negativ): ber.: 668.25, m/z: 667.31 [M-H]⁻, m = 420 mg). Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde der RS ohne weitere Reinigung in 5 mL DMF gelöst, unter Eiskühlung mit DIPEA

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

(108 μ L, 1.56 mmol, 2.5 eq.), Boc-Piperazin (117 mg, 0.63 mmol, 1 eq.) und HATU (240 mg, 0.63 mmol, 1 eq.) versetzt und für 1 h bei 0 °C sowie für 30 min bei RT gerührt. Das LM wurde entfernt und das Rohprodukt (HPLC: Methode A, 33.54 min) gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Boc-geschützte Intermediat mittels präparativer MPLC (40 g Silicagel, DCM, MeOH, Start bei 0 % MeOH) gereinigt und als brauner FS erhalten (450 mg, HPLC: Methode A, 23.75 min, Reinheit 85 %, MS (ESI, positiv): ber.: 806.40, m/z: 807.48 [M+H]⁺). Dann wurde die Boc-Gruppe entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift A abgespalten und das Intermediat **216** mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 125 mg, 0.15 mmol, 19 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 16.44 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 706.35, m/z: 707.37 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.07 (s, 1H), 9.35 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.83 (bs, 2H), 8.07 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.53 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.49 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.35 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.23 - 7.05 (m, 5H), 4.69 - 4.63 (m, 1H), 3.69 - 3.59 (m), 3.13 - 2.97 (m, 7H), 2.89 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.16 - 2.09 (m, 1H), 1.74 - 1.54 (m, 4H), 1.48 - 1.38 (m, 1H), 1.33 - 1.12 (m, 2H), 0.94 - 0.83 (m, 2H). Das von Wasser verursachte breite Singulett überlappte mit einem der beiden durch Piperazin verursachten Singuletts (nicht gelistet) sowie der N-terminalen Methylengruppe des Tranexamsäurebausteins (ohne Integral gelistet). Dabei wurde ein breites Signal im Bereich von 4.5 - 3.25 ppm erhalten.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 175.64, 170.85, 169.83, 157.03, 156.75, 139.05, 138.52, 137.87, 137.44, 131.58, 130.79, 130.28, 129.86, 126.40, 119.93, 55.03, 45.65, 44.02, 43.38, 43.22, 42.87, 40.60, 39.19, 38.66, 37.87, 36.92, 29.93, 29.83, 29.07, 28.90, 17.34. Nicht alle erwarteten Signale konnten klar identifiziert werden.

Das Diamin **216** (40 mg, 0.049 mmol, 1 eq.), Malonsäure (5 mg, 0.049 mmol, 1 eq.) und HATU (43 μ L, 0.11 mmol, 5 eq.) wurden unter Eiskühlung in 40 mL DMF gelöst. Unter Rühren wurde eine Lösung aus DIPEA (43 μ L, 0.246 mmol, 2.3 eq.) in 1 mL DMF wurde unter Rühren in 10 gleichen Portionen binnen 30 min hinzugegeben. Dann wurde für 1 h bei 0 °C und für 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Tfa-geschützte Zyklisierungsprodukt mittels präparativer HPLC isoliert (HPLC: Methode A, 21.52 min, MS (ESI, positiv): ber.: 774.34, m/z: 797.60 [M+Na]⁺). Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von NaOH-Lsg. in 1,4-Dioxan ohne Zusatz weiterer Lösungsmittel abgespalten. Der finale Inhibitor **I30** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 5 mg, 0.006 mmol, 13 %. **HPLC:** Methode A, 16.15 min, Reinheit > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 678.35, m/z: 679.63 [M+H]⁺.

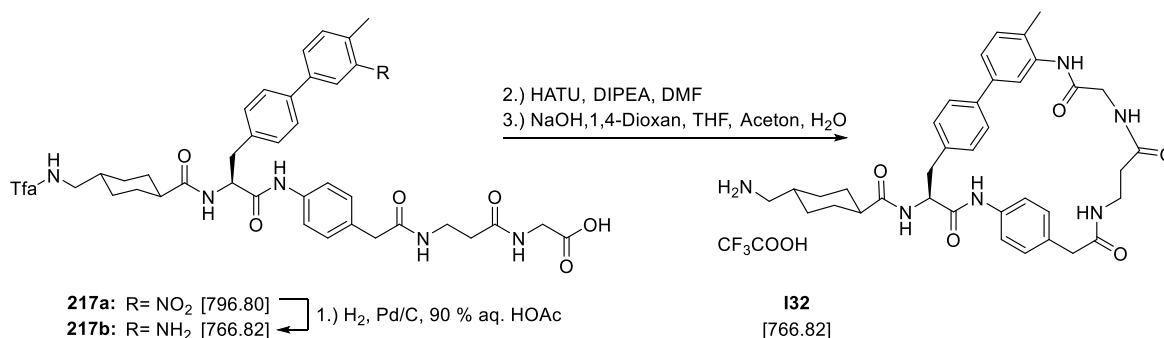
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9.59 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.10 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H), 7.61 (bs, 3H), 7.56 (s, 1H), 7.33 - 7.27 (m, 4H), 7.26 - 7.17 (m, 4H), 7.03 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 4.54 - 4.44 (m, 1H),

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

33.71 - 3.65 (m, 1H), 3.64 - 3.58 (m, 1H), 2.96 (dd, $^2J = 12.7$ Hz, $^2J = 4.7$ Hz, 1H), 2.92 - 2.83 (m, 1H), 2.68 - 2.61 (m, 2H), 2.26 - 2.17 (m, 4H), 1.82 - 1.71 (m, 4H), 1.53 - 1.44 (m, 1H), 1.40 - 1.19 (m, 4H), 0.99 - 0.87 (m, 2H). Das durch protoniertes Wasser verursachte Signal überlappte mit einem der beiden breiten Singulets des Piperazins, das daher nicht gelistet ist (entspräche weiteren 4 H).

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-βAla-Gly) × TFA (I32)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,13,16-tetraoxo-6,10,14,17-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacycloheptadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-βAla-OH, 2.) Fmoc-Gly-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **217a** (HPLC: Methode A, 27.45 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **217b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 55 mg, 0.07 mmol, 30 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 18.34 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 766.33, m/z: 767.23 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.02 (s, 1H), 9.34 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H), 8.19 (t, $^3J = 5.8$ Hz, 1H), 8.05 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H), 7.96 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H), 7.55 - 7.44 (m, 4H), 7.35 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.24 - 7.12 (m, 4H), 4.67 (td, $^3J = 8.6$ Hz, 5.2 Hz, 1H), 3.74 (d, $^3J = 5.9$ Hz, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.24 (q, $^3J = 6.9$ Hz, 2H), 3.11 - 2.98 (m, 3H), 2.89 (dd, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 9.6$ Hz, 1H), 2.30 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (tt, $^3J_{ax-ax} = 11.9$ Hz, $^3J_{ax-eq} = 2.7$ Hz, 1H), 1.75 - 1.56 (m, 4H), 1.49 - 1.37 (m, 1H), 1.25 (qd, $J = ^3J_{ax-ax} = 13.2$ Hz, $^3J_{ax-eq} = 3.1$ Hz, 1H), 1.21 - 1.14 (m, 1H), 0.98 - 0.78 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆): δ[ppm] = 175.59, 171.86, 171.30, 170.72, 170.70, 157.03, 139.13, 138.28, 137.67, 137.55, 131.96, 131.73, 130.34, 129.75, 126.41, 120.00, 119.85, 54.95, 45.65, 44.03, 42.28, 41.09, 37.96, 36.91, 35.86, 35.58, 29.93, 29.83, 29.08, 28.89, 17.28. Nicht alle erwarteten Signale konnten eindeutig identifiziert werden.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

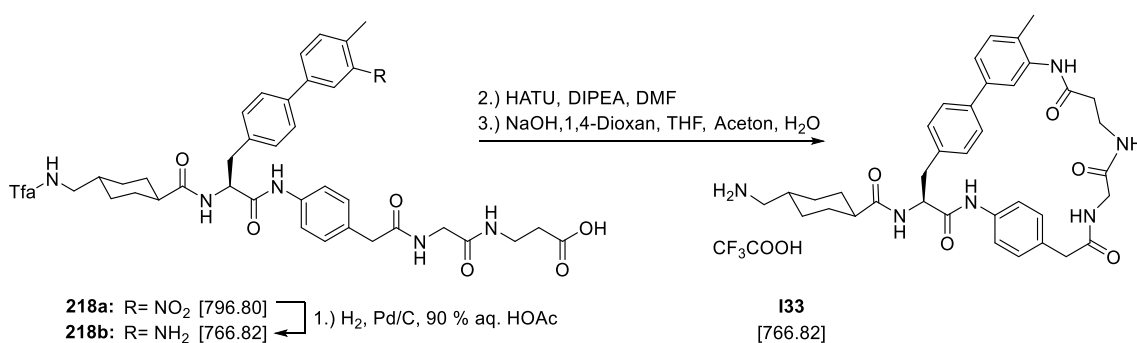
Die Verbindung **217b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 23.39 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I32** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 14 mg, 0.018 mmol, 25 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 24.29 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.34, m/z: 653.50 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.33 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.20 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H), 8.13 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 7.95 - 7.81 (m, 1H), 7.74 (bs, 4H), 7.35 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 7.27 (s, 2H), 7.17 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.09 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 6.84 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 4.79 - 4.45 (m, 1H), 4.10 (dd, ²J = 15.9 Hz, ³J = 4.8 Hz, 1H), 3.91 (dd, ²J = 16.4 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H), 3.38 - 3.33 (m, 2H), 3.32 - 3.27 (m, 1H), 3.05 (dd, ²J = 12.6 Hz, ³J = 5.0 Hz, 1H), 2.88 - 2.72 (m, 1H), 2.68 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H), 2.43 - 2.21 (m, 7H), 1.91 - 1.74 (m, 4H), 1.53 (tt, ³J_{ax-ax} = 10.3 Hz, ³J = 6.6 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.4 Hz, 1H), 1.44 - 1.31 (m, 2H), 1.06 - 0.86 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆): δ[ppm] = 174.63, 171.48, 170.17, 169.32, 138.53, 136.54, 135.79, 135.53, 131.80, 130.70, 129.85, 128.89, 128.66, 126.55, 122.65, 121.18, 54.94, 44.36, 43.03, 42.20, 40.02, 38.65, 35.51, 35.18, 35.07, 28.90, 28.87, 28.36, 28.31, 17.37. Nicht alle erwarteten Signale konnten eindeutig identifiziert werden.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Gly-βAla) × TFA (I33)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((*S*)-14-methyl-5,9,12,16-tetraoxo-6,10,13,17-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacycloheptadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **218a** (HPLC: Methode A, 26.04 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **218b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

erhalten. Ausbeute: 35 mg, 0.05 mmol, 19 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 17.29 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 766.33, m/z: 767.39 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.03 (s, 1H), 9.34 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.15 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.05 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H), 7.90 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.59 - 7.47 (m, 3H), 7.42- 7.33 (m, 3H), 7.28 (s, 1H), 7.24 - 7.18 (m, 4H), 4.71 - 4.62 (m, 1H), 3.65 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.32 - 3.20 (m, 2H), 3.13 - 2.97 (m, 3H), 2.90 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.5 Hz, 1H), 2.38 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.14 (tt, ³J_{ax-ax} = 12.1 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.4 Hz, 1H), 1.75 - 1.53 (m, 4H), 1.49 - 1.33 (m, 1H), 1.33 - 1.08 (m, 2H), 0.97 - 0.74 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.00, 172.75, 170.46, 170.12, 168.76, 158.28, 158.01, 157.73, 156.45, 156.16, 138.58, 137.61, 137.15, 137.03, 131.20, 129.78, 129.30, 125.84, 119.25, 54.36, 45.08, 43.46, 42.00, 41.47, 37.38, 36.34, 34.71, 33.79, 29.36, 29.25, 28.51, 28.32, 16.68.

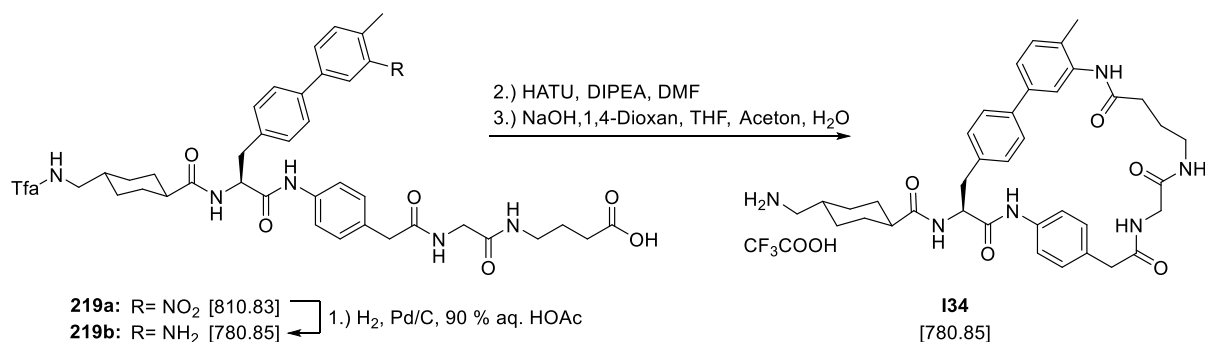
Die Verbindung **218b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 22.30 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I33** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 21 mg, 0.027 mmol, 60 %. **HPLC:** Methode A, 16.12 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.34, m/z: 653.52 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.28 (pd, 2H), 8.13 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 8.10 - 8.00 (m, 1H), 7.79 - 7.59 (m, 5H), 7.37 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H), 7.31 - 7.23 (m, 2H), 7.20 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.11 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.97 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 4.67 - 4.51 (m, 1H), 3.74 - 3.62 (m, 2H), 3.44 - 3.36 (m, 4H), 3.05 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 5.4 Hz, 1H), 2.87 - 2.77 (m, 1H), 2.73 - 2.65 (m, 2H), 2.57 (bs, 2H), 2.30 - 2.19 (m, 4H), 1.89 - 1.77 (m, 4H), 1.59 - 1.46 (m, 1H), 1.37 1.45 - 1.30 (m, 2H), 1.03 - 0.92 (m, 2H).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Gly-Gaba) × TFA (I34)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,12,17-tetraoxo-6,10,13,18-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gaba-OH, 2.) Fmoc-Gly-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **219a** (HPLC: Methode A, 27.90 min, MS (ESI, negativ): ber.: 810.32, m/z: 809.58 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **219b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 70 mg, 0.09 mmol, 38 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 18.81 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 780.35, m/z: 781.31 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.02 (s, 1H), 9.34 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.14 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.05 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 7.57 - 7.43 (m, 4H), 7.34 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.29 - 7.08 (m, 5H), 4.67 (td, ³J = 8.7 Hz, 5.2 Hz, 1H), 3.65 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.17 - 2.97 (m, 5H), 2.94 - 2.79 (m, 1H), 2.26 - 2.09 (m, 6H), 1.77 - 1.54 (m, 6H), 1.50 - 1.37 (m, 1H), 1.31 - 1.13 (m, 2H), 0.94 - 0.81 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.01, 174.12, 170.47, 170.12, 168.66, 138.54, 137.77, 137.14, 136.94, 131.24, 131.21, 131.11, 129.76, 129.30, 125.83, 119.25, 54.37, 45.07, 43.46, 42.09, 41.51, 37.88, 37.37, 36.34, 30.97, 29.36, 29.25, 28.51, 28.31, 24.51, 16.72.

Die Verbindung **219b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 23.96 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Das Produkt **I34** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

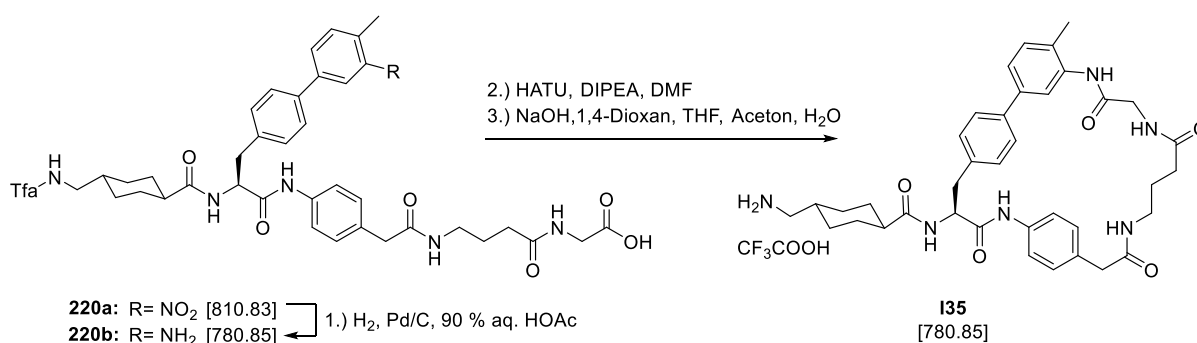
Ausbeute: 44 mg, 0.058 mmol, 63 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 23.26 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 666.35, m/z: 667.47 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.74 (bs, 1H), 9.39 (s, 1H), 8.06 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H), 7.99 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H), 7.90 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.76 (s, 3H), 7.43 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.39 - 7.30 (m, 4H), 7.26 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 7.25 - 7.16 (m, 4H), 4.77 - 4.45 (m, 1H), 3.67 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H), 3.65 - 3.56 (m, 1H), 3.43 - 3.31 (m, 2H), 3.18 - 3.05 (m, 2H), 3.04 - 2.96 (m, 2H), 2.73 - 2.62 (m, 2H), 2.38 - 2.23 (m, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.92 - 1.76 (m, 4H), 1.75 - 1.65 (m, 2H), 1.61 - 1.47 (m, 1H), 1.46 - 1.30 (m, 2H), 1.03 - 0.87 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 174.57, 170.90, 170.44, 169.10, 168.47, 138.08, 137.80, 136.74, 135.76, 131.28, 131.17, 130.72, 129.83, 129.30, 129.29, 126.23, 124.22, 123.17, 119.67, 54.81, 44.36, 42.99, 41.96, 41.66, 38.30, 37.82, 35.08, 32.73, 28.91, 28.84, 28.41, 28.26, 25.62, 17.41.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Gaba-Gly) × TFA (I35)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((*S*)-14-methyl-5,9,14,17-tetraoxo-6,10,15,18-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **220a** (HPLC: Methode A, 25.92 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **220b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 112 mg, 0.14 mmol, 60 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 16.88 min, Reinheit: > 93 %. MS (ESI, positiv): ber.: 780.35, m/z: 781.45 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 9.98 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.08 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.01 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.93 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.49 - 7.44 (m, 4H), 7.31 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.18 (bs, 1H), 7.16 - 7.12 (m, 3H), 7.15 - 7.06 (m, 1H), 4.64 (td, ³J = 8.6 Hz, 5.1 Hz, 1H), 3.69 (d, ³J = 5.9 Hz,

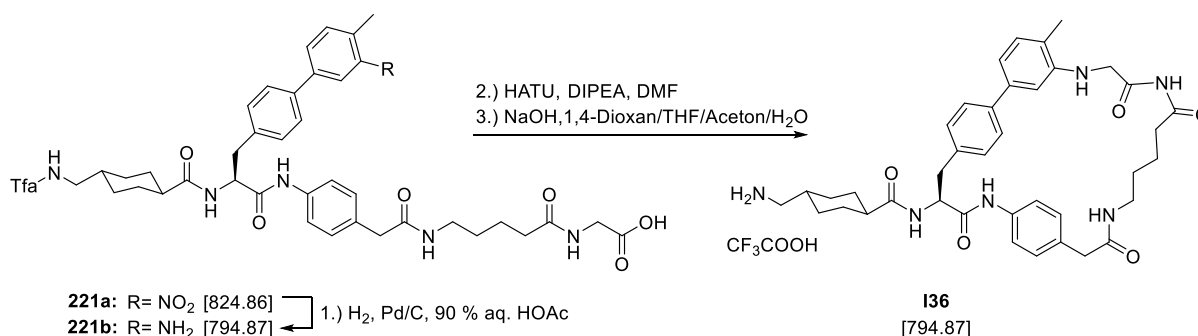
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

2H), 3.09 - 3.05 (m, 4H), 3.04 - 2.94 (m, 1H), 2.86 (dd, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.13 - 2.05 (m, 3H), 1.75 - 1.47 (m, 6H), 1.46 - 1.34 (m, 1H), 1.28 - 1.17 (m, 2H), 0.92 - 0.78 (m, 2H).

Die Verbindung **220b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 22.97 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Das Produkt **I35** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 35 mg, 0.045 mmol, 31 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 22.02 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 666.35, m/z: 667.38 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Ava-Gly) × TFA (I36)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,15,17-tetraoxo-6,10,16,19-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzencyclonadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Ava-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **221a** (HPLC: Methode A, 27.90 min, MS (ESI, negativ): ber.: 824.34, m/z: 823.54 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **221b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 76 mg, 0.10 mmol, 41 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 18.93 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 794.36, m/z: 795.28 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.02 (s, 1H), 9.34 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H), 8.17 - 8.01 (m, 2H), 7.94 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 1H), 7.56 - 7.46 (m, 4H), 7.35 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.22 - 7.11 (m, 4H), 4.67 (td, $^3J = 8.8$ Hz, 5.1 Hz, 1H), 3.72 (d, $^3J = 5.9$ Hz, 2H), 3.33 (s, 2H), 3.10 - 2.95 (m, 5H), 2.89 (dd, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.14 - 2.04 (m, 3H), 1.77 - 1.55 (m, 4H), 1.56 - 1.33 (m, 5H), 1.31 - 1.12 (m, 2H), 0.96 - 0.77 (m, 2H).

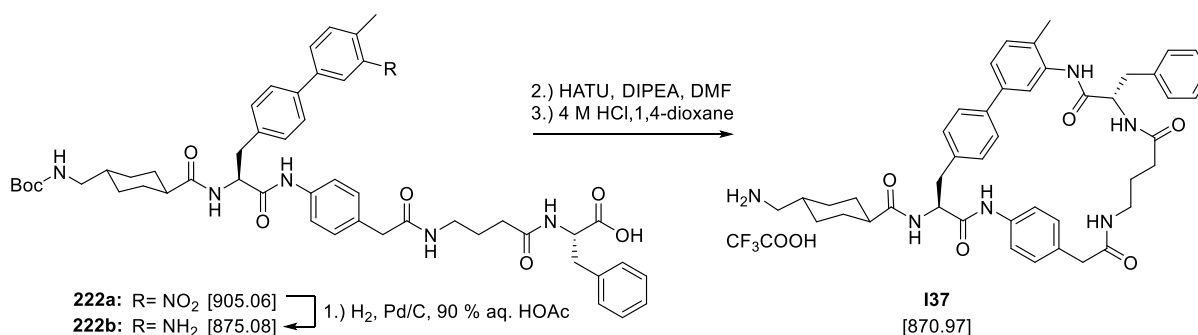
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 175.01, 172.36, 170.12, 169.94, 156.31 (pd, ²J_{C-F} = 35.7 Hz), 150.94, 138.55, 137.74, 137.07, 136.96, 131.54, 131.13, 129.76, 129.13, 125.84, 119.28, 115.99 (pd, ¹J_{C-F} = 288.4 Hz), 54.36, 45.07, 43.46, 41.78, 40.50, 38.36, 37.38, 36.34, 34.64, 29.36, 29.25, 28.64, 28.51, 28.32, 22.61, 16.71.

Die Verbindung **221b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 18.72 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I36** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 9 mg, 0.011 mmol, 12 %. **HPLC:** Methode A, 16.07 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 680.37, m/z: 681.43 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH])-4-aPhac-Gaba-Phe] × TFA (I37)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((4S,16S)-16-benzyl-14-methyl-5,9,14,17-tetraoxo-6,10,15,18-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Phe-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 200 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.32 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **222a** (HPLC: Methode A, 30.79 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **222b** wurde in 2 mL MeOH gelöst, aus Diethylether gefällt und dreimal mit Diethylether gewaschen. **Ausbeute:** 75 mg, 0.09 mmol, 27 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 21.80 min, Reinheit: > 95 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 874.46, m/z: 875.29 [M+H]⁺.

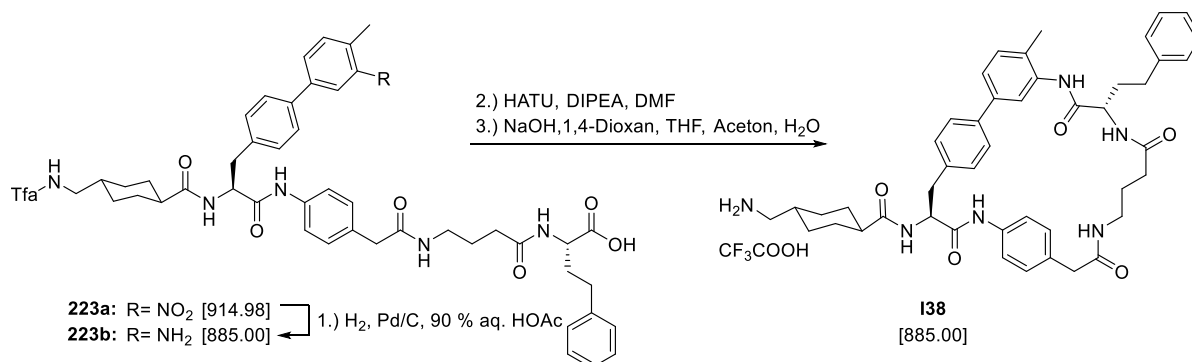
Ohne zusätzliche Reinigung wurde die Verbindung **222b** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 29.19 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppe entsprechend der allgemeinen

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

Arbeitsvorschrift A abgespalten. Das Produkt **I37** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 25 mg, 0.029 mmol, 33 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 22.52 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 756.40, m/z: 757.56 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Gaba-hPhe) × TFA (I38)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((4S,16S)-14-methyl-5,9,14,17-tetraoxo-16-phenethyl-6,10,15,18-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-hPhe-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **223a** (HPLC: Methode A, 31.85 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Nach Entfernung des LM *in vacuo* wurde das Rohprodukt **223b** in MeOH gelöst, mit Wasser (jeweils versetzt mit 0.1 % TFA) gefällt, zentrifugiert und abdekantiert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurde dreimal mit Wasser (versetzt mit 0.1 % Tfa) gewaschen, der RS in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Ausbeute: 130 mg als farbloses Lyophilisat, 0.15 mmol, 61 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 22.31 min, Reinheit: > 94 %. MS (ESI, positiv): ber.: 884.41, m/z: 885.50 [M+H]⁺.

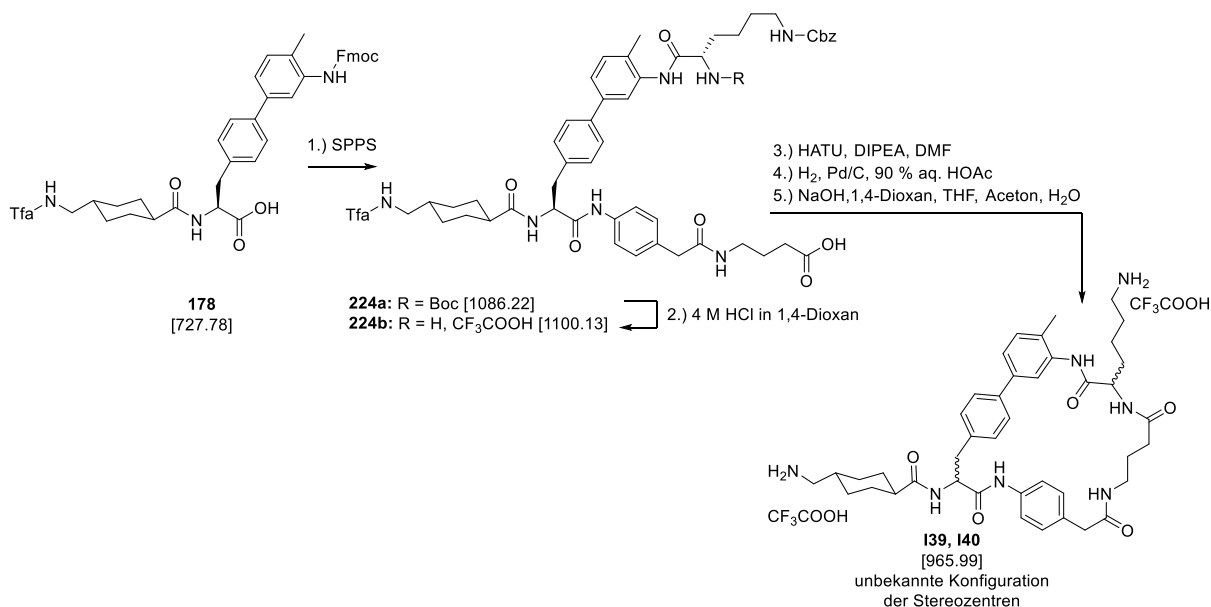
Die Verbindung **223b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 46.61 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Das Produkt **I38** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 9 mg, 0.010 mmol, 7 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 32.60 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 770.42, m/z: 771.77 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Gaba-Lys] × 2 TFA (I39 und I40)

(1r,4r)-N-(16-(4-aminobutyl)-14-methyl-5,9,14,17-tetraoxo-6,10,15,18-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-4-yl)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamide

Initiale Versuche, den hPhe-Rest im Linker der Verbindung **I38** gemäß der Synthesestrategie E gegen L- oder D-Lys zu ersetzen schlugen fehl, da in den Zyklisierungsreaktionen trotz guter Reinheit der Edukte kein Produkt erhalten wurde. Zur Herstellung der Verbindungen **I39** und **I40** wurde deshalb eine abgeänderte Synthesestrategie verwendet (**Schema 30**). Ausgehend von der Verbindung **178** wurde der sterisch anspruchsvolle, doppelt geschützte L-Lys-Rest bereits im Zuge einer SPPS als Überschusskomponente an die Seitenkette des P1'-Restes gekuppelt (Verbindung **224a**). Nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurde das azyklische Intermediat **224b** in drei Schritten weiter umgesetzt. Bei der finalen Tfa-Abspaltung (Schritt 5) wurde in Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC ein Doppelsignal mit nahe beieinanderliegenden Maxima etwa gleicher Intensität erhalten. Die Verbindungen konnten durch präparative HPLC isoliert werden. Beide Massen korrespondierten mit dem gewünschten Produkt, sodass von einer Razemisierung ausgegangen wurde, was durch die sehr unterschiedlichen K_i -Werte der Inhibitoren **I39** ($K_i = 158$ nM) und **I40** ($K_i = 20$ nM) gestützt wird. Die Konformationen der Stereozentren wurden nicht bestimmt.



Schema 30: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung der Inhibitoren I39 und I40.

In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gaba-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Tfa-Txa-Bpa(4'-Me, 3'-NH-Fmoc)-OH (**178**), 4.) Boc-Lys(Cbz)-OH.

Harz: 75 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.12 mmol absolut).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **224a** (HPLC: Methode A, 30.22 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt. Nach der Entfernung des LM wurde der erhaltene RS zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit einer Lösung aus 20 % (v/v) TFA in DCM versetzt und 2.5 h bei RT schwach gerührt. Das Zwischenprodukt **224b** wurde aus Diethylether gefällt und nach Reinigung mittels präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 28 mg, 0.03 mmol, 21 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 23.25 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, positiv): ber.: 985.46, m/z: 986.57 [M+H]⁺.

Die Verbindung **224b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 28.39 min, MS (ESI, positiv): ber.: 967.45, m/z: 969.00 [M+H]⁺). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Cbz-Schutzgruppe durch Hydrierung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B abgespalten (HPLC: Methode A, 19.38 min, MS (ESI, positiv): ber.: 833.41, m/z: 834.35 [M+H]⁺). Nach Entfernung des LM wurde die Tfa-Gruppe entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. entfernt. Während der Reaktionskontrolle mittels analytischer HPLC wurde bei diesem Schritt erstmals ein Doppelsignal beobachtet. Durch präparative HPLC wurden zwei Produkte (Verbindungen **I39** und **I40**) mit nur leicht unterschiedlicher Retentionszeit und identischer Masse isoliert. Die Konfiguration der Stereozentren konnte nicht bestimmt werden.

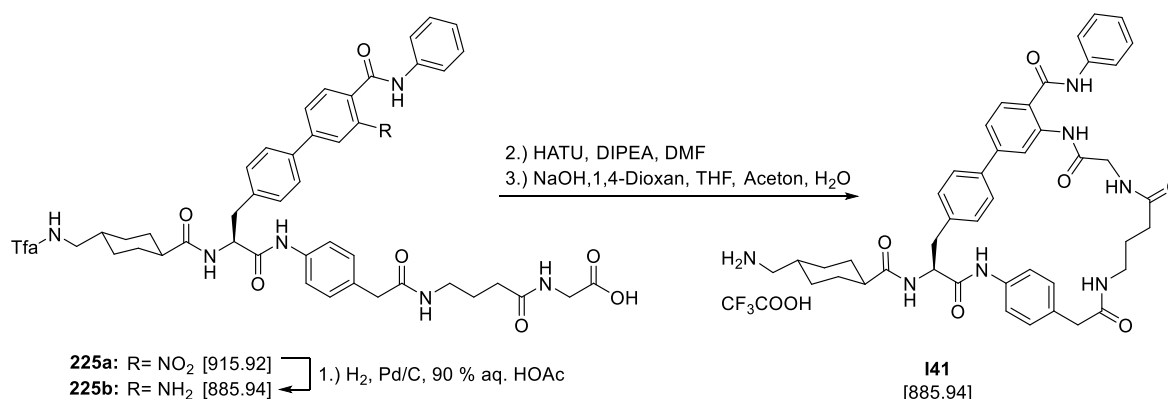
Ausbeute:

- Verbindung **I39**, 9 mg, 0.009 mmol, 37 %. **HPLC:** Methode A, 13.66 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 737.43, m/z: 738.30 [M+H]⁺.
- Verbindung **I40**, 8 mg, 0.008 mmol, 33 % **HPLC:** Methode A, 13.41 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 737.43, m/z: 738.32 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Pha, c[3'-NH]-4-aPhac-Gaba-Gly] × TFA (I41)

(S)-4-((1r,4S)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamido)-5,9,14,17-tetraoxo-N-phenyl-6,10,15,18-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-14-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Pha, 3'-NO₂)-OH (**176**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **225a** (HPLC: Methode A, 25.15 min, MS (ESI, negativ): ber.: 915.34, m/z: 914.50 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **225b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 108 mg, 0.12 mmol, 51 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 23.96 min, Reinheit: > 98 %. MS (ESI, positiv): ber.: 885.37, m/z: 886.50 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 12.44 (bs, 1H), 10.23 - 9.80 (m, 2H), 9.34 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.12 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.06 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.96 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.75 - 7.70 (m, 3H), 7.55 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.50 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.37 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.36 - 7.31 (m, 2H), 7.18 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H), 7.08 (tt, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1H), 7.05 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 6.90 (dd, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 4.69 (td, ³J = 8.7 Hz, 5.1 Hz, 1H), 3.73 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.14 - 2.98 (m, 5H), 2.91 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H), 2.19 - 2.07 (m, 3H), 1.77 - 1.56 (m, 6H), 1.49 - 1.39 (m, 1H), 1.32 - 1.12 (m, 2H), 0.94 - 0.81 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.60, 172.72, 171.91, 170.68, 170.63, 168.05, 156.89 (pd, ²J_{C-F} = 35.9 Hz), 143.95, 139.79, 138.23, 138.14, 137.67, 132.07, 130.33, 129.93, 129.73, 129.02, 126.69, 123.92, 121.10, 117.72, 115.43, 114.90, 114.71, 114.03, 54.91, 45.66, 44.04, 42.37, 41.10, 41.02, 40.61, 38.87, 36.92, 33.15, 29.95, 29.84, 29.08, 28.91, 25.87.

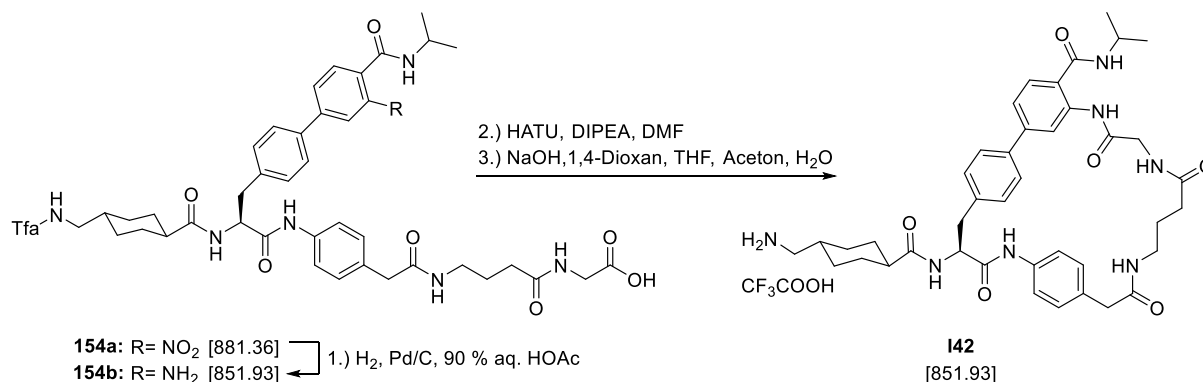
Die Verbindung **225b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 25.76 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Das Produkt **I41** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 11 mg, 0.012 mmol, 10 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 20 % B, 18.93 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 771.39, m/z: 772.48 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Ipa, c[3'-NH]-4-aPhac-Gaba-Gly) × TFA (I42)

(S)-4-((1r,4S)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamido)-N-isopropyl-5,9,14,17-tetraoxo-6,10,15,18-tetraaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-14-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Ipa, 3'-NO₂)-OH (**152**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **154a** (HPLC: Methode A, 22.50 min, MS (ESI, negativ): ber.: 881.36, m/z: 880.50 [M-H]⁻) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **154b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 136 mg, 0.19 mmol, 67 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 20.27 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 851.38, m/z: 852.51 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 12.38 (bs, 1H), 10.02 (s, 1H), 9.33 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.11 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.04 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.99 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H), 7.96 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.58 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.53 - 7.47 (m, 4H), 7.35 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.18 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.00 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 6.84 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H), 4.68 (td, ³J = 8.8 Hz, 5.1 Hz, 1H), 4.13 - 4.03 (m, 1H), 3.73 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.12 - 2.97 (m, 5H), 2.90 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.5 Hz, 1H), 2.20 - 2.04 (m, 3H), 1.77 - 1.54 (m, 6H), 1.48 - 1.37 (m, 1H), 1.30 - 1.20 (m, 2H), 1.16 (d, ³J = 6.6 Hz, 6H), 1.01 - 0.68 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 175.01, 172.14, 171.33, 170.09, 170.05, 167.58, 156.30 (pd, ²J_{C-F} = 35.9 Hz), 142.73, 137.61, 137.48, 137.09, 131.48, 129.70, 129.14, 128.85, 126.05, 119.28,

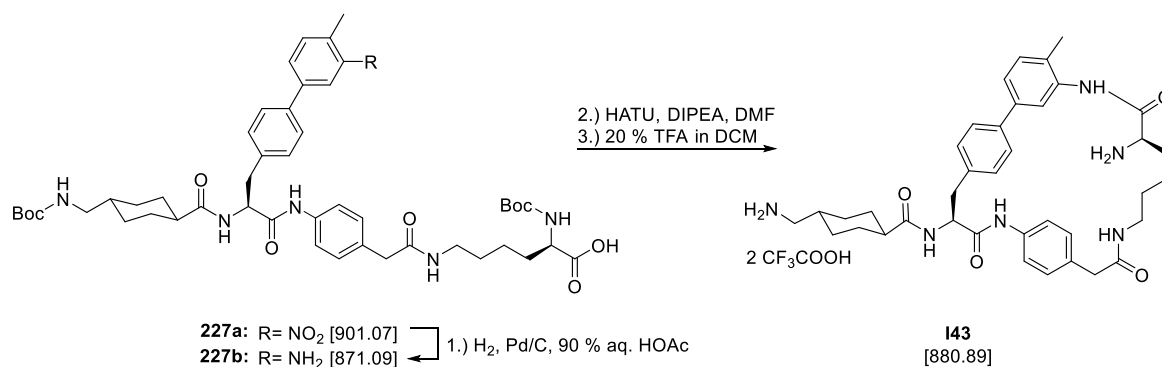
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

117.13, 114.29, 113.66, 54.32, 45.07, 43.44, 41.78, 40.52, 40.44, 38.29, 37.40, 36.33, 32.56, 29.35, 29.25, 28.49, 28.32, 25.28, 22.29.

Die Verbindung **226b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 23.57 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Das Produkt **I42** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 69 mg, 0.081 mmol, 51 %. **HPLC:** Methode A, 16.12 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 737.39, m/z: 738.51 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-(NH₂)-DLys]-NH₂ × 2 TFA (I43)

(1r,4S)-N-((4S,15R)-15-amino-14-methyl-5,9,16-trioxo-6,10,17-triaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzencycloheptadecaphane-4-yl)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Boc-DLys(Fmoc)-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 120 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.19 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **227a** (HPLC: Methode A, 32.54 min, MS (ESI, positiv): ber.: 900.46, m/z: 901.43 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **227b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 72 mg, 0.084 mmol, 43 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 23.51 min, Reinheit: > 99 %. MS (ESI, negativ): ber.: 870.49, m/z: 869.71 [M-H]⁻.

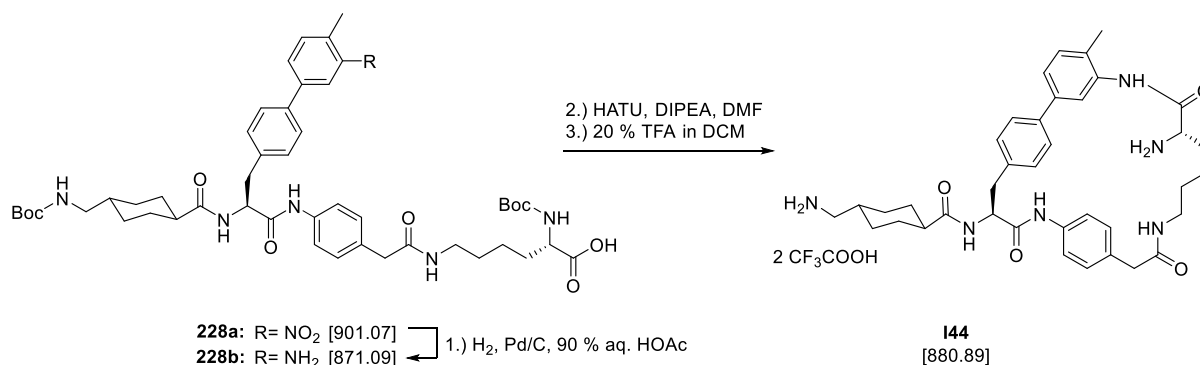
Die Verbindung **227b** (53 mg, 0.06 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 30.66 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppen durch einstündiges Rühren in 4 mL einer 20 % (v/v) TFA Lösung in DCM bei RT abgespalten. Der finale Inhibitor **I43** wurde mittels präparativer

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 13 mg, 0.015 mmol, 24 %. **HPLC:** Methode A, 14.12 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.37, m/z: 653.47 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-(NH₂)-Lys]-NH₂ × 2 TFA (I44)

(1r,4S)-N-((4S,15S)-15-amino-14-methyl-5,9,16-trioxo-6,10,17-triaza-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacycloheptadecaphane-4-yl)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Boc-Lys(Fmoc)-OH, 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 4.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 120 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.19 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **228a** (HPLC: Methode A, 32.79 min, MS (ESI, positiv): ber.: 900.46, m/z: 901.54 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **228b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 97 mg, 0.11 mmol, 58 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 23.82 min, Reinheit: > 98 %. MS (ESI, positiv): ber.: 870.49, m/z: 871.74 [M+H]⁺.

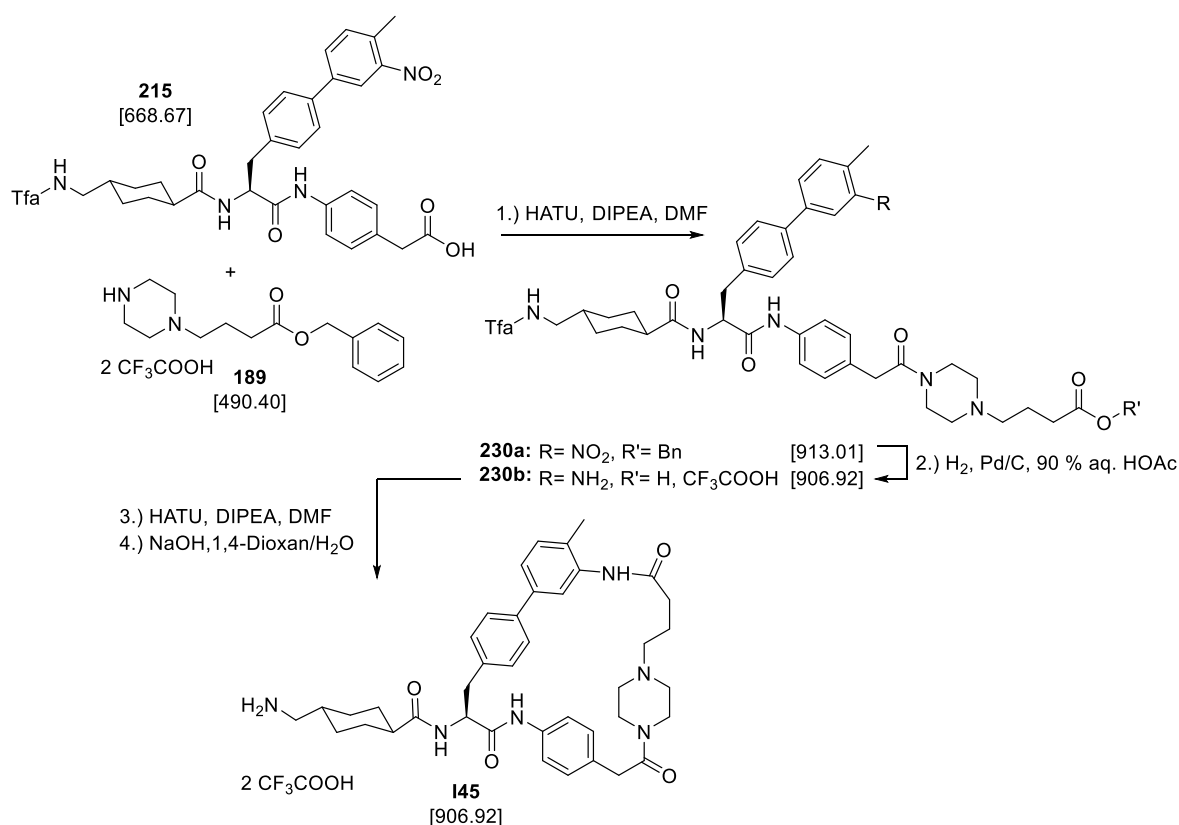
Die Verbindung **228b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 30.71 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Boc-Gruppen durch einstündiges Rühren in 4 mL einer 20 % (v/v) TFA Lösung in DCM bei RT abgespalten. Der finale Inhibitor **I44** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 49 mg, 0.056 mmol, 50 %. **HPLC:** Methode A, 14.08 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.84, m/z: 653.56 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Piz-But] × 2 TFA (I45)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,14-trioxo-6,15-diaza-10(1,4)-piperazina-1(1,3),2,7(1,4)-tribenzenacyclopentadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide

Die Verbindung **I45** wurde abweichend von der Synthesestrategie E gemäß **Schema 31** hergestellt. Im ersten Schritt wurden die bereits beschriebenen Edukte **189** und **215** zur Verbindung **230a** umgesetzt. Durch Hydrierung wurde die C-terminale Benzyl-Schutzgruppe abgespalten und simultan die Nitrogruppe reduziert (Verbindung **230b**). Nach intramolekularer Zyklisierung und Abspaltung der Tfa-Gruppe wurde der Inhibitor **I45** erhalten.



Schema 31: Alternative Synthesestrategie zur Herstellung des Inhibitors I45.

In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

1.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**), 2.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 3.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 150 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.24 mmol absolut).

Das Edukt **215** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt. Nach der Harzabspaltung wurde der erhaltene FS (128 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit dem Piperazin-Derivat **189** (93.2 mg, 0.19 mmol, 1 eq), DIPEA (145 µL, 0.86 mmol, 4.5 eq.) sowie HATU (73 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei 0 °C und für 30 min bei RT gerührt, bevor das LM *in vacuo* entfernt wurde. Das Kupplungsprodukt **230a** (HPLC: Methode A, 29.39 min) wurde ohne Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Vor der

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

Zyklisierung wurde das offenkettige Intermediat **230b** mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 81 mg, 0.089 mmol, 37 %. HPLC: Methode A, 17.42 min, Reinheit > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 792.38, m/z: 793.38 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.07 (s, 1H), 9.35 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.07 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.53 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.49 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.23 - 7.06 (m, 5H), 4.66 (td, ³J = 8.5 Hz, 5.0 Hz), 3.71 (s), 3.14 - 3.08 (m), 3.06 - 3.00 (m), 2.89 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.7 Hz, 2.33 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.17 - 2.09 (m, 1H), 1.92 - 1.82 (m, 2H), 1.76 - 1.56 (m, 4H), 1.49 - 1.38 (m, 1H), 1.30 - 1.12 (m, 2H), 0.94 - 0.80 (m, 2H). Zusammen mit dem durch den Wassergehalt des LM verursachten Signal formten die beiden breiten Singulets des Piperazin-Bausteins ein überlappendes Signal zw. etwa 5.5 ppm und 3 ppm. In diesem Bereich wurden ausschließlich Signale gelistet, die klar zu unterscheiden waren. Auf die Angabe von Integralen wurde dabei verzichtet.

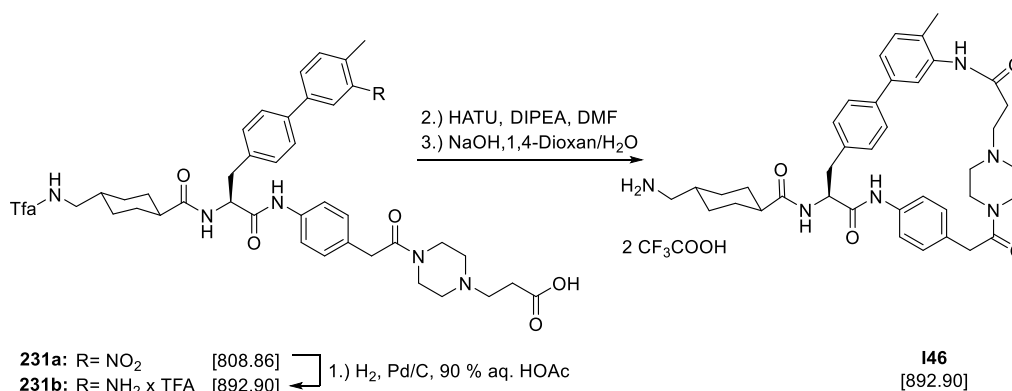
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.07, 173.36, 170.27, 169.24, 156.31 (pd, ²J_{C-F} = 36.0 Hz), 138.48, 137.92, 137.29, 136.87, 131.01, 130.19, 129.71, 129.31, 125.83, 119.36, 117.14, 115.78, 115.35, 114.85, 54.96, 54.46, 50.96, 50.66, 45.07, 43.45, 42.25, 38.46, 38.19, 37.30, 36.34, 30.42, 29.35, 29.25, 28.50, 28.32, 18.85, 16.76.

Die Verbindung **230b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert. Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Tfa-geschützte Intermediat mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC: Methode A: 22.06 min, MS (ESI, positiv): ber.: 774.89, m/z: 775.30 [M+H]⁺). Die Tfa-Gruppe wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH abgespalten und der finale Inhibitor **I45** mittels präparativer HPLC gereinigt. **Ausbeute:** 28 mg als farbloses Lyophilisat, 0.032 mmol, 36 %. **HPLC:** Methode B, Start bei 10 % B, 22.46 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 678.39, m/z: 679.34 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Piz-Prop] × 2 TFA (I46)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((*S*)-24-methyl-4,8,12-trioxo-3,11-diaza-7(1,4)-piperazina-1,10(1,4),2(1,3)-tribenzenacyclotetradecaphane-13-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Piz-Prop-OH (**188**), 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 4.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 180 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.29 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **231a** (HPLC: Methode A, 24.07 min, MS (ESI, positiv): ber.: 808.34, m/z: 809.32 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **231b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 168 mg, 0.19 mmol, 65 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 16.24 min, Reinheit: > 98 %. MS (ESI, positiv): ber.: 778.37, m/z: 779.32 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.07 (s, 1H), 9.35 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.07 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.53 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.48 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.34 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.18 - 7.10 (m, 4H), 7.04 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 4.66 (td, ³J = 8.8 Hz, 5.0 Hz, 1H), 3.71 (bs), 3.33 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H), 3.23 (bs, 4H), 3.15 - 2.98 (m, 3H), 2.89 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H), 2.75 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.16 - 2.06 (m, 1H), 1.76 - 1.55 (m, 4H), 1.48 - 1.37 (m, 1H), 1.31 - 1.12 (m, 2H), 0.96 - 0.81 (m, 2H). Zusammen mit dem durch den Wassergehalt des LM verursachten Signal bildete eines der beiden durch Piperazin Singulett ein breites überlappendes Signal im Bereich zw. ca. 4.5 ppm und 3.25 ppm. Das breite Singulett bei 3.71 ppm wurde daher ohne Integral gelistet.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.05, 171.43, 170.27, 169.24, 156.30 (pd, ²J_{C-F} = 35.9 Hz), 156.30 (pd, ²J_{C-F} = 35.9 Hz), 138.42, 138.07, 137.29, 136.77, 135.04, 130.90, 130.18, 129.68, 129.31, 125.80, 119.35, 117.69, 117.13, 114.84, 54.44, 51.35, 51.13, 50.92, 45.06, 43.44, 42.20, 38.43, 38.19, 37.29, 36.33, 29.34, 29.24, 28.53, 28.49, 28.32, 16.80.

Die Verbindung **231b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 22.16 min, MS (ESI, positiv): ber.: 760.86, m/z: 761.41 [M+H]⁺).

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

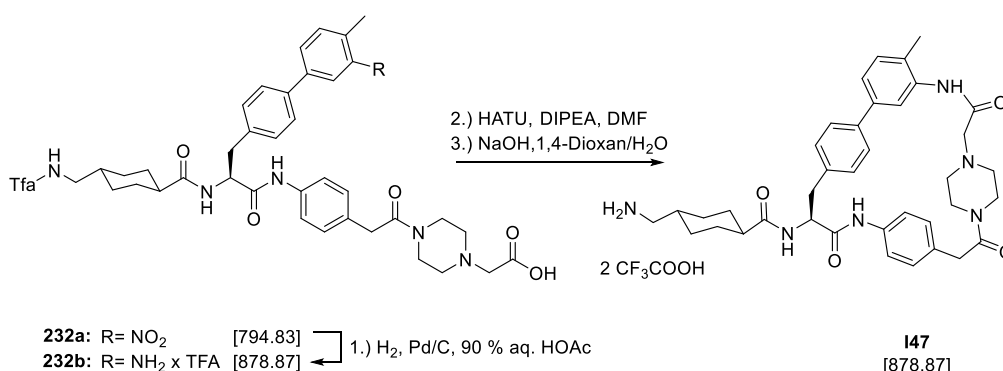
Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I46** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 98 mg, 0.110 mmol, 58 %. **HPLC:** Methode A, 14.86 min, Reinheit: > 98 %.

MS (ESI, positiv): ber.: 664.37, m/z: 665.38 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-Piz-Ac) × 2 TFA (I47)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-24-methyl-4,7,11-trioxo-3,10-diaza-6(1,4)-piperazina-1,9(1,4),2(1,3)-tribenzenacyclotridecaphane-12-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Piz-Ac-OH (**187**), 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 4.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 200 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g 0.32 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **232a** (HPLC: Methode A, 24.12 min, MS (ESI, positiv): ber.: 794.33, m/z: 795.40 [M+H]⁺) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **232b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 148 mg, 0.17 mmol, 52 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 15.89 min, Reinheit: > 98 %. MS (ESI, positiv): ber.: 764.35, m/z: 765.42 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.07 (s, 1H), 9.35 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.07 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.53 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 7.48 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.18 - 7.12 (m, 4H), 7.06 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 4.66 (td, ³J = 8.4 Hz, 5.1 Hz, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.81 - 3.61 (m, 6H), 3.22 (s, 4H), 3.09 - 2.99 (m, 3H), 2.89 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.16 - 2.09 (m, 1H), 1.74 - 1.54 (m, 4H), 1.48 - 1.37 (m, 1H), 1.30 - 1.08 (m, 2H), 0.98 - 0.77 (m, 2H).

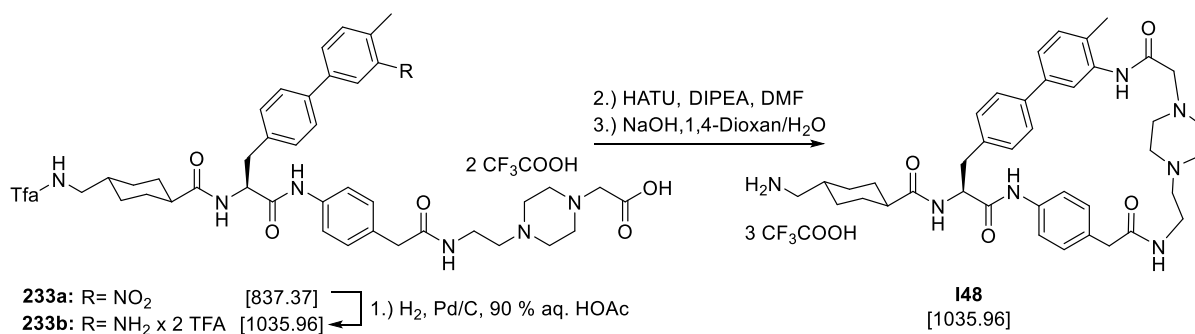
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.05, 170.27, 169.20, 167.44, 158.16, 157.90, 157.90, 157.63, 156.44, 156.16, 138.43, 138.03, 137.30, 136.80, 130.93, 130.17, 129.68, 129.28, 125.81, 119.36, 55.27, 55.27, 54.43, 51.69, 51.47, 45.06, 43.43, 42.09, 38.45, 38.04, 36.33, 29.34, 29.24, 28.49, 28.31, 16.78.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

Die Verbindung **232b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 20.05.16 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I47** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 65 mg, 0.075 mmol, 44 %. **HPLC:** Methode A, 13.91 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 650.36, m/z: 651.37 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-4-aPhac-aEt-Piz-Ac) × 3 TFA (I48)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-24-methyl-4,10,14-trioxo-3,9,13-triaza-6(1,4)-piperazina-1,12(1,4),2(1,3)-tribenzenacyclohexadecaphane-15-yl)cyclohexane-1-carboxamiden



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-aEt-Piz-Ac-OH (**192**), 2.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 3.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 4.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 250 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.4 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **233a** (HPLC: Methode A, 24.36 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **233b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 176 mg, 0.17 mmol, 42 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 16.66 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 807.39, m/z: 808.52 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.02 (s, 1H), 9.32 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.17 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 8.03 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.50 - 7.44 (m, 4H), 7.32 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.16 (d, ³J = 8.7 Hz, 4H), 4.72 - 4.56 (m, 1H), 3.43 (s), 3.38 - 3.26 (m), 3.14 (bs), 3.08 - 2.79 (m), 2.19 (s, 3H), 2.10 (tt, ²J = 12.0 Hz, ³J = 3.4 Hz, 1H), 1.74 - 1.52 (m, 4H), 1.47 - 1.32 (m, 1H), 1.27 - 1.08 (m, 2H), 0.93 - 0.76 (m, 2H). Zusammen mit dem durch den Wassergehalt des LM verursachten Signal formten die beiden breiten Singulets des Piperazin-Bausteins ein überlappendes Signal zw. etwa 5.5 ppm und 3 ppm. Signale in diesem Bereich konnten nicht eindeutig unterschieden werden und wurden nicht gelistet.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.63, 171.55, 170.81, 158.74 (q, ²J_{C-F} = 34.6 Hz), 157.03, 156.75, 139.12, 138.25, 137.87, 137.58, 131.76, 131.42, 130.33, 126.42, 119.91, 117.88, 117.71,

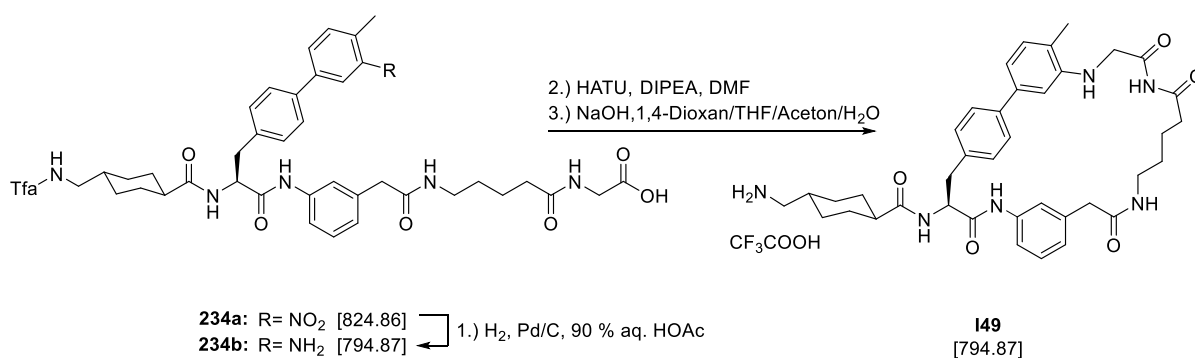
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

115.54, 115.42, 57.02, 55.44, 54.99, 51.32, 49.31, 45.64, 44.03, 42.27, 37.90, 36.92, 34.53, 29.93, 28.89, 17.27.

Die Verbindung **233b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 21.02 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I48** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 21 mg, 0.02 mmol, 12 %. **HPLC:** Methode A, 14.53 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 693.40, m/z: 694.54 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-3-aPhac-Ava-Gly) × TFA (I49)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,15,17-tetraoxo-6,10,16,19-tetraaza-1,7(1,3),2(1,4)-tribenzenacyclonadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Ava-OH, 3.) Fmoc-3-aPhac-OH (**179**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g 0.208 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **234a** (HPLC: Methode A, 26.08 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **234b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 84 mg, 0.11 mmol, 51 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 18.80 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 794.36, m/z: 795.39 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.05 (s, 1H), 9.34 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.08 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.04 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 8.00 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.51 - 7.45 (m, 4H), 7.36 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.24 - 7.12 (m, 4H), 6.94 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H), 4.67 (td, ³J = 8.5 Hz, 4.9 Hz, 1H), 3.72 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.11 - 3.00 (m, 5H), 2.89 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.15 - 2.08 (m, 3H), 1.76 - 1.57 (m, 4H), 1.56 - 1.46 (m, 2H), 1.44 - 1.36 (m, 3H), 1.31 - 1.10 (m, 2H), 0.97 - 0.78 (m, 2H).

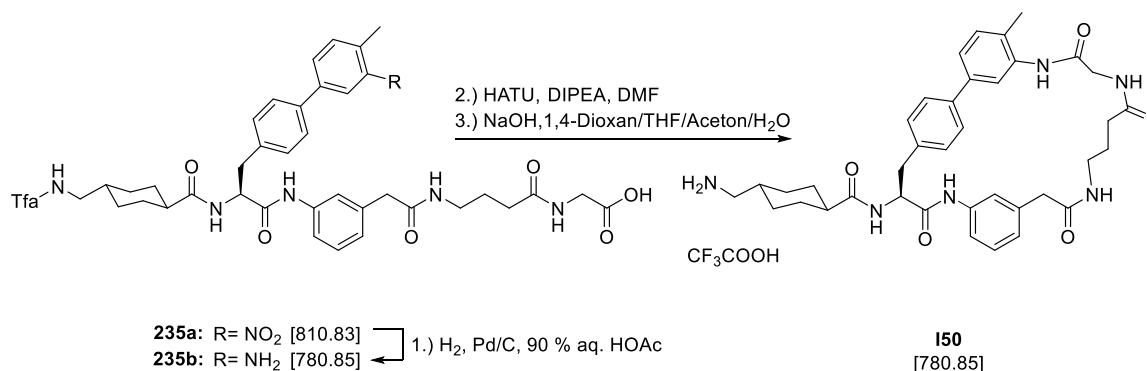
6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 175.01, 172.35, 171.33, 170.25, 169.68, 158.14, 138.67, 138.53, 137.79, 137.76, 137.04, 136.97, 131.08, 129.73, 128.41, 127.09, 125.82, 124.06, 119.90, 117.39, 117.13, 54.41, 45.06, 43.45, 42.37, 40.48, 38.39, 37.30, 36.32, 34.63, 29.35, 29.25, 28.62, 28.49, 28.31, 22.62, 16.73.

Die Verbindung **234b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 24.86 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I49** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 30 mg, 0.038 mmol, 36 %. **HPLC:** Methode A, 16.86 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 680.37, m/z: 681.43 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-3-aPhac-Gaba-Gly) × TFA (I50)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,14,17-tetraoxo-6,10,15,18-tetraaza-1,7(1,3),2(1,4)-tribenzenacyclooctadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-3-aPhac-OH (**179**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g. 0.21 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **235a** (HPLC: Methode A, 26.69 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **235b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 70 mg, 0.09 mmol, 43 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 18.88 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 780.35, m/z: 781.30 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 10.06 (s, 1H), 9.34 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.12 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.09 - 8.00 (m, 2H), 7.52 - 7.45 (m, 4H), 7.36 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.28 - 7.13 (m, 4H), 6.95 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H), 4.67 (td, ³J = 8.9 Hz, 4.9 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.37 (s, 2H), 3.12 - 2.97 (m,

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

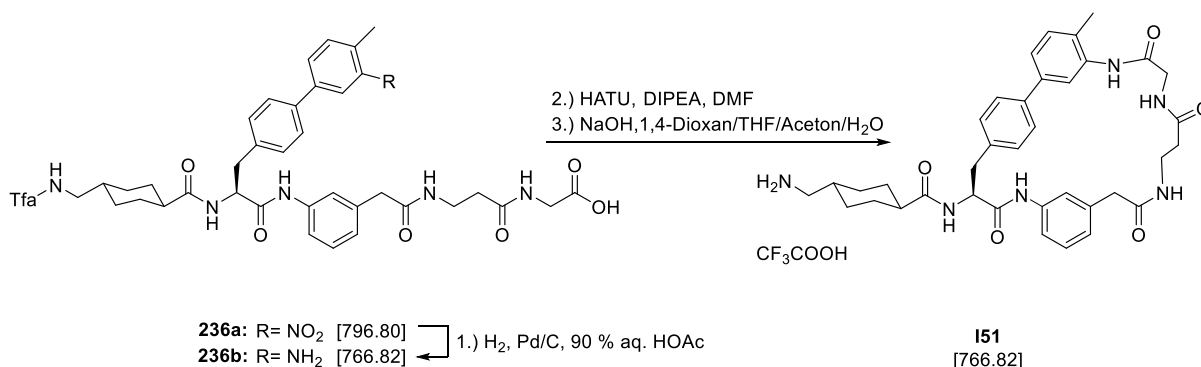
5H), 2.89 (dd, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 9.8$ Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.19 - 2.05 (m, 3H), 1.77 - 1.53 (m, 6H), 1.51 - 1.35 (m, 1H), 1.30 - 1.10 (m, 2H), 0.97 - 0.79 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 175.02, 172.14, 171.33, 170.27, 169.80, 158.05 (pd, $^2J_{\text{C-F}} = 34.3$ Hz), 156.3 (pd, $^2J_{\text{C-F}} = 35.9$ Hz), 138.69, 138.54, 137.74, 136.99, 131.11, 129.74, 128.43, 125.83, 124.07, 120.57, 119.90, 119.41, 117.41, 117.13, 54.42, 45.07, 43.45, 42.39, 40.52, 38.31, 37.29, 36.33, 32.56, 29.35, 29.25, 28.49, 28.31, 25.27, 16.72. Nicht alle erwarteten Signale konnten eindeutig identifiziert werden.

Die Verbindung **235b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 24.35 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I50** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 19 mg, 0.024 mmol, 27 %. **HPLC:** Methode A, 16.65 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 666.35, m/z: 667.37 [M+H] $^+$.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-3-aPhac- β Ala-Gly) \times TFA (I51)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,9,13,16-tetraoxo-6,10,14,17-tetraaza-1,7(1,3),2(1,4)-tribenzenacycloheptadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc- β Ala-OH, 3.) Fmoc-3-aPhac-OH (**179**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g. 0.21 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **236a** (HPLC: Methode A, 26.61 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **236b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 94 mg, 0.12 mmol, 59 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 18.73 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 766.33, m/z: 767.29 [M+H] $^+$.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

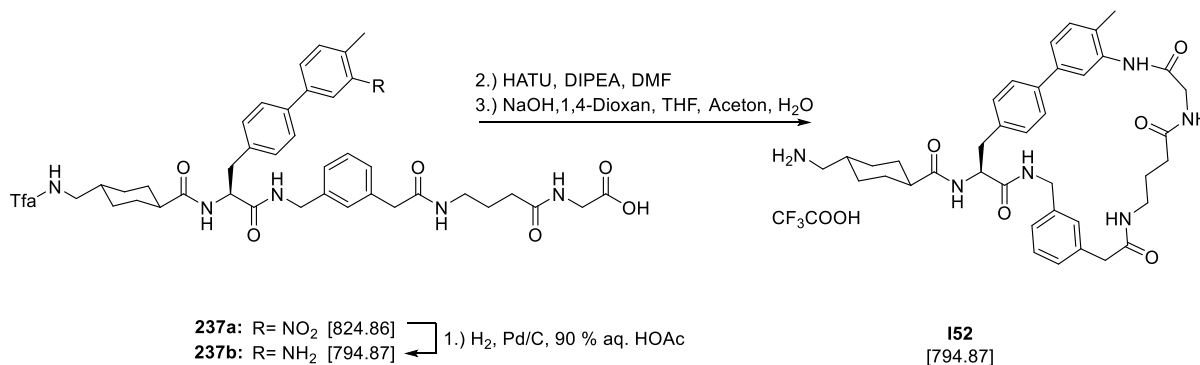
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.05 (s, 1H), 9.34 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.19 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.08 - 8.00 (m, 2H), 7.55 - 7.43 (m, 4H), 7.36 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.25 - 7.11 (m, 4H), 6.94 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 4.67 (td, ³J = 8.9 Hz, 4.9 Hz, 1H), 3.74 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.28 - 3.20 (m, 2H), 3.09 - 2.98 (m, 3H), 2.88 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H), 2.31 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.16 - 2.08 (m, 1H), 1.76 - 1.53 (m, 4H), 1.49 - 1.37 (m, 1H), 1.31 - 1.09 (m, 2H), 0.96 - 0.81 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.03, 171.29, 170.69, 170.28, 169.89, 138.69, 138.52, 137.83, 136.96, 136.89, 131.06, 129.73, 128.43, 125.83, 119.94, 119.42, 117.41, 45.07, 43.45, 42.29, 40.52, 37.29, 36.33, 35.30, 35.02, 29.35, 29.25, 28.50, 28.30, 16.74, 16.42. Nicht alle erwarteten Signale konnten eindeutig identifiziert werden.

Die Verbindung **236b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A: 24.21 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I51** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 34 mg, 0.044 mmol, 36 %. **HPLC:** Methode A, 16.09 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 652.34, m/z: 653.42 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH])-3-aMePhac-Gaba-Gly × TFA (I52)

(1*r*,4*S*)-4-(aminomethyl)-N-((*S*)-14-methyl-5,10,15,18-tetraoxo-6,11,16,19-tetraaza-1,8(1,3),2(1,4)-tribenzenacyclononadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-3-aMePhac-OH,
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g. 0.21 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **237a** (HPLC: Methode A, 26.89 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **237b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

erhalten. Ausbeute: 87 mg, 0.11 mmol, 53 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 18.54 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 794.36, m/z: 795.23 [M+H]⁺.

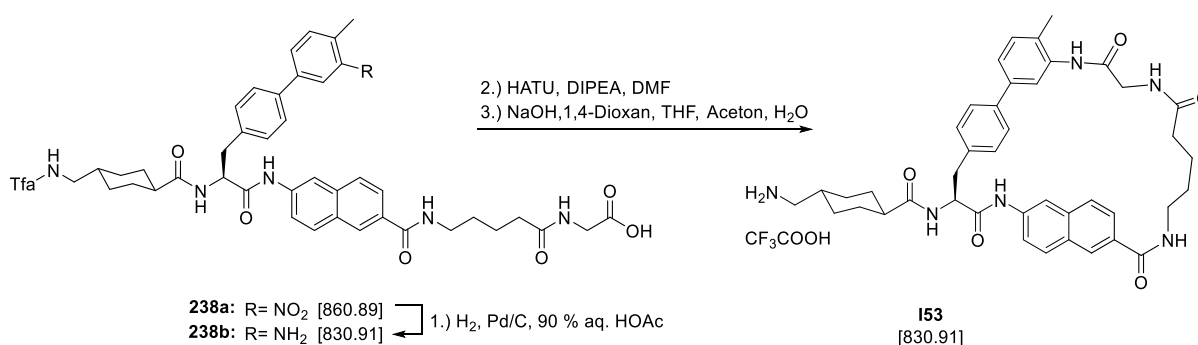
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 9.33 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.42 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.11 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.00 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 7.94 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H), 7.47 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.24 - 7.05 (m, 6H), 7.00 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H), 4.55 (td, ³J = 9.0 Hz, 5.1 Hz, 1H), 4.29 - 4.22 (m, 2H), 3.72 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.09 - 3.00 (m, 5H), 2.83 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.14 - 2.05 (m, 3H), 1.76 - 1.53 (m, 6H), 1.48 - 1.37 (m, 1H), 1.30 - 1.20 (m, 1H), 1.14 (qd, ³J_{ax-ax} = 12.9 Hz, ³J_{ax-eq} = 3.3 Hz, 1H), 0.95 - 0.81 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] = 174.84, 172.14, 171.32, 171.19, 169.83, 157.99 (pd, ²J_{C-F} = 34.4 Hz), 156.29 (pd, ²J_{C-F} = 36.13 Hz), 139.06, 138.56, 137.71, 137.18, 136.36, 131.06, 129.71, 128.03, 127.86, 127.31, 125.79, 124.99, 117.13, 114.83, 53.66, 45.07, 43.51, 42.31, 42.00, 40.51, 38.30, 37.35, 36.33, 32.55, 29.38, 29.23, 28.54, 28.20, 25.26, 16.74.

Die Verbindung **237b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 22.89 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I52** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 21 mg, 0.026 mmol, 24 %. **HPLC:** Methode A, 16.51 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 680.37, m/z: 681.44 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-6-aNap-Ava-Gly) × TFA (I53)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,8,14,17-tetraoxo-6,9,15,18-tetraaza-7(2,6)-naphthalena-1(1,3),2(1,4)-dibenzencyclooctadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Ava-OH, 3.) Fmoc-6-aNap-OH (**184**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g. 0.21 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **238a** (HPLC: Methode A, 29.53 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **238b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 50 mg, 0.06 mmol, 30 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 20.47 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 830.36, m/z: 831.45 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.39 (s, 1H), 9.35 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.54 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 8.37 - 8.32 (m, 2H), 8.15 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 8.11 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 7.96 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H), 7.89 - 7.83 (m, 2H), 7.66 (dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 7.51 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.39 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.19 (s, 2H), 4.75 (td, ³J = 8.7 Hz, 5.2 Hz, 1H), 3.73 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.30 (q, ³J = 6.0 Hz, 2H), 3.12 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 5.0 Hz, 1H), 3.03 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H), 2.95 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.21 - 2.10 (m, 3H), 1.77 - 1.52 (m, 8H), 1.50 - 1.39 (m, 1H), 1.32 - 1.15 (m, 2H), 0.95 - 0.84 (m, 2H).

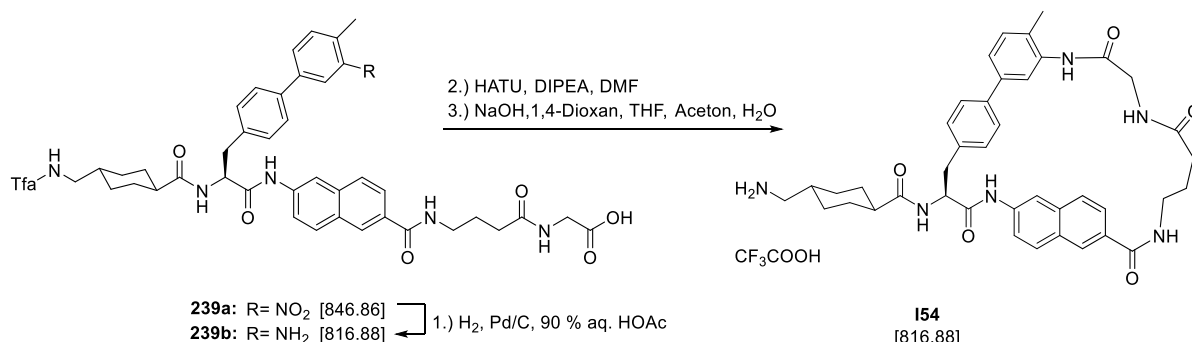
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.15, 172.43, 171.35, 170.82, 166.09, 158.10 (pd, ²J_{C-F} = 34.6 Hz), 156.31 (pd, ²J_{C-F} = 35.8 Hz), 138.54, 137.77, 137.73, 136.96, 134.57, 131.17, 130.74, 129.78, 129.49, 128.80, 127.19, 127.01, 125.88, 124.67, 120.59, 119.43, 119.42, 117.14, 116.63, 115.02, 66.32, 54.60, 45.08, 43.46, 40.51, 37.26, 36.35, 34.75, 29.36, 29.27, 28.77, 28.49, 28.36, 22.73, 16.70.

Die Verbindung **238b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 25.33 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I52** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 11 mg, 0.013 mmol, 22 %. **HPLC:** Methode A, 18.20 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 716.37, m/z: 717.54 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-6-aNap-Gaba-Gly] × TFA (I54)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,8,13,16-tetraoxo-6,9,14,17-tetraaza-7(2,6)-naphthalena-1(1,3),2(1,4)-dibenzenacycloheptadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-6-aNap-OH (**184**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g. 0.21 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **239a** (HPLC: Methode A, 29.38 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **239b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 39 mg, 0.05 mmol, 23 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 20.22 min, Reinheit: > 97 %. MS (ESI, positiv): ber.: 816.35, m/z: 817.38 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.40 (s, 1H), 9.35 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.57 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 8.40 - 8.32 (m, 2H), 8.22 - 8.11 (m, 2H), 7.96 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H), 7.91 - 7.85 (m, 2H), 7.67 (dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 7.50 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.39 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.24 - 7.11 (m, 3H), 4.74 (td, ³J = 8.4 Hz, 5.2 Hz, 1H), 3.75 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.32 (q, ³J = 6.7 Hz, 2H), 3.12 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 4.9 Hz, 1H), 3.03 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H), 2.95 (dd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 9.5 Hz, 1H), 2.27 - 2.12 (m, 6H), 1.85 - 1.59 (m, 6H), 1.50 - 1.40 (m, 1H), 1.33 - 1.15 (m, 2H), 0.96 - 0.83 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.16, 172.30, 171.35, 170.83, 166.21, 158.07 (pd, ²J_{C-F} = 33.8 Hz), 156.32 (pd, ²J_{C-F} = 35.6 Hz), 138.50, 137.88, 137.80, 136.88, 134.59, 131.08, 130.68, 129.76, 129.50, 128.80, 127.21, 127.06, 125.87, 124.68, 120.61, 119.73, 117.15, 116.09, 115.02, 114.85, 54.61, 45.08, 43.46, 40.55, 37.26, 36.35, 32.73, 29.36, 29.27, 28.50, 28.36, 25.32, 16.74.

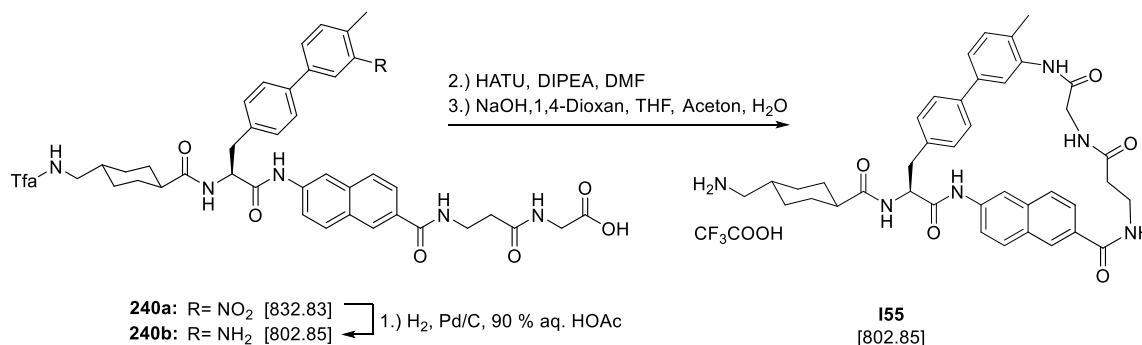
Die Verbindung **239b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 24.44 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I53** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 6 mg,

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

0.007 mmol, 15 %. **HPLC:** Methode A, 17.80 min, Reinheit: > 97 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 702.35, m/z: 703.10 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, c[3'-NH]-6-aNap-βAla-Gly) × TFA (I55)

(1r,4S)-4-(aminomethyl)-N-((S)-14-methyl-5,8,12,15-tetraoxo-6,9,13,16-tetraaza-7(2,6)-naphthalena-1(1,3),2(1,4)-dibenzenacyclohexadecaphane-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-βAla-OH, 3.) Fmoc-6-aNap-OH (**184**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Tfa-Txa-OH (**153**).

Harz: 130 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g. 0.21 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **240a** (HPLC: Methode A, 29.12 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt und ohne weitere Reinigung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert. Das Zwischenprodukt **240b** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. Ausbeute: 86 mg, 0.11 mmol, 51 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. HPLC: Methode A, 19.94 min, Reinheit: > 98 %. MS (ESI, positiv): ber.: 802.33, m/z: 803.31 [M+H]⁺.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 10.39 (s, 1H), 9.34 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 8.55 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.33 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 8.26 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 8.14 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 7.96 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H), 7.92 - 7.84 (m, 2H), 7.66 (dd, ³J = 8.9, ⁴J = 2.1 Hz, 1H), 7.50 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.22 - 7.10 (m, 3H), 4.74 (td, ³J = 8.4 Hz, 5.1 Hz, 1H), 3.77 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.60 - 3.44 (m, 2H), 3.12 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 4.9 Hz, 1H), 3.03 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 2.94 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1H), 2.49 - 2.45 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.18 - 2.08 (m, 1H), 1.77 - 1.57 (m, 4H), 1.49 - 1.39 (m, 1H), 1.34 - 1.12 (m, 2H), 0.95 - 0.81 (m, 2H).

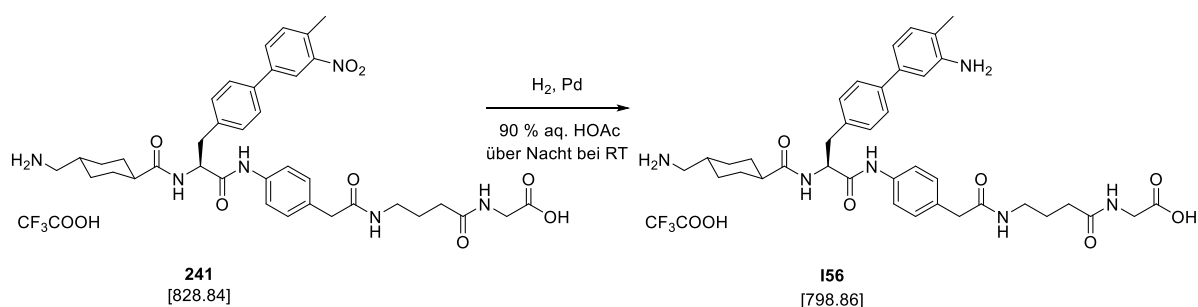
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ[ppm] = 175.13, 171.31, 170.83, 170.82, 166.21, 158.30 (pd, ²J_{C-F} = 35.4 Hz), 156.30 (pd, ²J_{C-F} = 35.9 Hz), 138.48, 137.91, 137.82, 136.84, 134.61, 131.03, 130.52, 129.74, 129.51, 128.77, 127.22, 127.10, 125.85, 124.60, 120.60, 115.99 (pd, ¹J_{C-F} = 288.3 Hz), 115.00, 70.28, 54.59, 45.07, 43.44, 40.56, 37.26, 36.34, 36.07, 35.07, 29.35, 29.26, 28.49, 28.35, 16.74. Nicht alle erwarteten Signale nicht klar vom Untergrund unterschieden werden.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

Die Verbindung **240b** wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift E in einem Schritt zyklisiert (HPLC: Methode A, 25.07 min). Anschließend wurde das LM *in vacuo* entfernt und die Tfa-Gruppe gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift F unter Verwendung von 1,4-Dioxan/THF/Aceton/NaOH-Lsg. abgespalten. Der finale Inhibitor **I55** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 26 mg, 0.032 mmol, 30 %. **HPLC:** Methode A, 16.82 min, Reinheit: > 98 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 688.34, m/z: 689.66 [M+H]⁺.

H-Txa-Bpa(4'-Me, 3'-NH₂)-4-aPhac-Gaba-Gly-OH (I56)

(4-(2-(4-((S)-3-(3'-amino-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-((1r,4S)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamido)propanamido)phenyl)acetamido)butanoyl)glycine



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Boc-Txa-OH (**159**).

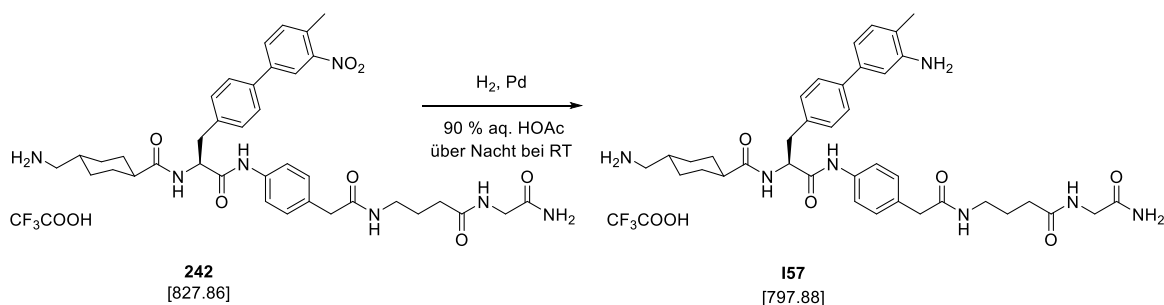
Harz: 100 mg 2-CTC (Kapazität: 1.6 mmol/g, 0.16 mmol absolut).

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde die Nitro-Verbindung **241** (HPLC: Methode A, 19.87 min) unter Verwendung der o.g. AS und Harzmenge hergestellt. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurde bei der Abspaltung zur simultanen Entfernung der Boc-Gruppe eine 95 : 2.5 : 2.5 Mischung aus TFA Wasser und TIS verwendet. Das Intermediat wurde ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Der azyklische Inhibitor **I56** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 69 mg, 0.086 mmol, 54 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge **HPLC:** Methode A, 12.80 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 684.36, m/z: 685.42 [M+H]⁺.

6.15. Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren (Teil B)
6.15.7. Inhibitoren I28 - I57 (Serie 5)

H-Txa-Bpa(4'-Me, 3'-NH₂)-4-aPhac-Gaba-Gly-NH₂ (I57)

(1r,4S)-N-((S)-1-((4-(2-((4-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-4-oxobutyl)amino)-2-oxoethyl)phenyl)amino)-3-(3'-amino-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-oxopropan-2-yl)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamide



In der Fmoc-SPPS verwendete AS:

- 1.) Fmoc-Gly-OH, 2.) Fmoc-Gaba-OH, 3.) Fmoc-4-aPhac-OH (**182**),
- 4.) Fmoc-Bpa(4'-Me, 3'-NO₂)-OH (**166**), 5.) Boc-Txa-OH (**159**).

Harz: 200 mg Rink-Amid (Kapazität: 0.74 mmol/g, 0.148 mmol absolut)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift D wurde das azyklische Intermediat **242** (HPLC: Methode A, 18.53 min) unter Verwendung der o. g. AS und Harzmenge hergestellt. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurde bei der Abspaltung eine 95 : 2.5 : 2.5 Mischung aus TFA Wasser und TIS verwendet. Das Intermediat wurde ohne weitere Reinigung gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift B hydriert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Der finale Inhibitor **I57** wurde als farbloses Lyophilisat erhalten. **Ausbeute:** 59 mg, 0.074 mmol, 50 % bezogen auf die eingesetzte Harzmenge. **HPLC:** Methode A, 12.32 min, Reinheit: > 99 %. **MS (ESI, positiv):** ber.: 683.38, m/z: 684.49 [M+H]⁺.

Referenzen

- (1) Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27* (2), 157–162. DOI: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X.
- (2) Steinmetzer, T.; Pilgram, O.; Wenzel, B. M.; Wiedemeyer, S. J. A. Fibrinolysis Inhibitors: Potential Drugs for the Treatment and Prevention of Bleeding. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (4), 1445–1472. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01060. Published Online: Nov. 13, 2019.
- (3) Collen, D.; Lijnen, H. R. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb. Haemostasis* **1995**, *74* (1), 167–171. DOI: 10.1055/s-0038-1642671
- (4) Chapin, J. C.; Hajjar, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* **2015**, *29* (1), 17–24. DOI: 10.1016/j.blre.2014.09.003. Published Online: Sep. 16, 2014.
- (5) Saes, J. L.; Schols, S. E. M.; van Heerde, W. L.; Nijziel, M. R. Hemorrhagic disorders of fibrinolysis: a clinical review. *J. Thromb. Haemostasis* **2018**. DOI: 10.1111/jth.14160. Published Online: May. 30, 2018.
- (6) Straub, A.; Roehrig, S.; Hillisch, A. Oral, direct thrombin and factor Xa inhibitors: the replacement for warfarin, leeches, and pig intestines? *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50* (20), 4574–4590. DOI: 10.1002/anie.201004575. Published Online: Apr. 29, 2011.
- (7) Pollack, C. V.; Reilly, P. A.; van Ryn, J.; Eikelboom, J. W.; Glund, S.; Bernstein, R. A.; Dubiel, R.; Huisman, M. V.; Hylek, E. M.; Kam, C.-W.; Kamphuisen, P. W.; Kreuzer, J.; Levy, J. H.; Royle, G.; Sellke, F. W.; Stangier, J.; Steiner, T.; Verhamme, P.; Wang, B.; Young, L.; Weitz, J. I. Idarucizumab for Dabigatran Reversal - Full Cohort Analysis. *The N. Engl. J. Med.* **2017**, *377* (5), 431–441. DOI: 10.1056/NEJMoa1707278. Published Online: Jul. 11, 2017.
- (8) Rogers, K. C.; Finks, S. W. A New Option for Reversing the Anticoagulant Effect of Factor Xa Inhibitors: Andexanet Alfa (ANDEXXA). *Am. J. Med.* **2019**, *132* (1), 38–41. DOI: 10.1016/j.amjmed.2018.06.028. Published Online: Jul. 25, 2018.
- (9) Di Cera, E. Serine proteases. *IUBMB Life* **2009**, *61* (5), 510–515. DOI: 10.1002/iub.186.
- (10) Rawlings, N. D.; Morton, F. R.; Kok, C. Y.; Kong, J.; Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (Database issue), D320–5. DOI: 10.1093/nar/gkm954. Published Online: Nov. 8, 2007.
- (11) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Thomas, P. D.; Huang, X.; Bateman, A.; Finn, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (D1), D624–D632. DOI: 10.1093/nar/gkx1134.
- (12) Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (12), 4501–4524. DOI: 10.1021/cr000033x.
- (13) Perona, J. J.; Craik, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Prot. science : a publication of the Protein Society* **1995**, *4* (3), 337–360. DOI: 10.1002/pro.5560040301.
- (14) Page, M. J.; Di Cera, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (7–8), 1220–1236. DOI: 10.1007/s00018-008-7565-9.
- (15) Hartley, B. S.; Brown, J. R.; Kauffman, D. L.; Smillie, L. B. Evolutionary similarities between pancreatic proteolytic enzymes. *Nature* **1965**, *207* (5002), 1157–1159. DOI: 10.1038/2071157a0.
- (16) Blow, D. M.; Birktoft, J. J.; Hartley, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **1969**, *221* (5178), 337–340. DOI: 10.1038/221337a0.
- (17) Hartley, B. S.; Kilby, B. A. The reaction of p-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin. *Biochem. J.* **1954**, *56* (2), 288–297. DOI: 10.1042/bj0560288.
- (18) Schaller, J.; Gerber, S. S. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68* (5), 785–801. DOI: 10.1007/s00018-010-0566-5. Published Online: Dec. 7, 2010.
- (19) Neurath, H.; Dixon, G. H. Structure and activation of trypsinogen and chymotrypsinogen. *Fed. Proc.* **1957**, *16* (3), 791–801.
- (20) Fehllhammer, H.; Bode, W. The refined crystal structure of bovine β -trypsin at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1975**, *98* (4), 683–692. DOI: 10.1016/S0022-2836(75)80004-0.

- (21) Fehlhammer, H.; Bode, W.; Huber, R. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1977**, *111* (4), 415–438. DOI: 10.1016/S0022-2836(77)80062-4.
- (22) Forsgren, M.; Råden, B.; Israelsson, M.; Larsson, K.; Hedén, L.-O. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Lett.* **1987**, *213* (2), 254–260. DOI: 10.1016/0014-5793(87)81501-6.
- (23) Murray, J. C.; Buetow, K. H.; Donovan, M.; Hornung, S.; Motulsky, A. G.; Disteché, C.; Dyer, K.; Swisshelm, K.; Anderson, J.; Giblett, E. Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27. *Am. J. Hum. Genet.* **1987**, *40* (4), 338–350.
- (24) Petersen, T. E.; Martzen, M. R.; Ichinose, A.; Davie, E. W. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (11), 6104–6111.
- (25) Lijnen, H. R.; Hoylaerts, M.; Collen, D. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. Role in the regulation of fibrinolysis and identification as histidine-rich glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255* (21), 10214–10222. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)70451-7
- (26) Jones, A. L.; Hulett, M. D.; Altin, J. G.; Hogg, P.; Parish, C. R. Plasminogen is tethered with high affinity to the cell surface by the plasma protein, histidine-rich glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (37), 38267–38276. DOI: 10.1074/jbc.M406027200. Published Online: Jun. 25, 2004.
- (27) Wu, G.; Quek, A. J.; Caradoc-Davies, T. T.; Ekkel, S. M.; Mazzitelli, B.; Whisstock, J. C.; Law, R. H. P. Structural studies of plasmin inhibition. *Bioch. Soc. Trans.* **2019**, *47* (2), 541–557. DOI: 10.1042/BST20180211. Published Online: Mar. 5, 2019.
- (28) Cederholm-Williams, S. A. Concentration of plasminogen and antiplasmin in plasma and serum. *J. Clin. Pathol.* **1981**, *34* (9), 979–981. DOI: 10.1136/jcp.34.9.979.
- (29) Backes, B. J.; Harris, J. L.; Leonetti, F.; Craik, C. S.; Ellman, J. A. Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18* (2), 187–193. DOI: 10.1038/72642.
- (30) Prydzial, E. L.; Lavigne, N.; Dupuis, N.; Kessler, G. E. Plasmin converts factor X from coagulation zymogen to fibrinolysis cofactor. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (13), 8500–8505. DOI: 10.1074/jbc.274.13.8500.
- (31) Ogiwara, K.; Nogami, K.; Nishiya, K.; Shima, M. Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coag. & Fibrinolysis* **2010**, *21* (6), 568–576. DOI: 10.1097/MBC.0b013e32833c9a9f.
- (32) Brophy, T. M.; Ward, S. E.; McGimsey, T. R.; Schneppenheim, S.; Drakeford, C.; O'Sullivan, J. M.; Chion, A.; Budde, U.; O'Donnell, J. S. Plasmin Cleaves Von Willebrand Factor at K1491-R1492 in the A1-A2 Linker Region in a Shear- and Glycan-Dependent Manner In Vitro. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2017**, *37* (5), 845–855. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308524. Published Online: Mar. 9, 2017.
- (33) Hamilton, K. K.; Fretto, L. J.; Grierson, D. S.; McKee, P. A. Effects of plasmin on von Willebrand factor multimers. Degradation in vitro and stimulation of release in vivo. *The Journal of clinical investigation* **1985**, *76* (1), 261–270. DOI: 10.1172/JCI111956.
- (34) Saksela, O. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **1985**, *823* (1), 35–65. DOI: 10.1016/0304-419X(85)90014-9.
- (35) Rømer, J.; Bugge, T. H.; Pyke, C.; Lund, L. R.; Flick, M. J.; Degen, J. L.; Danø, K. Plasminogen and wound healing. *Nat. Med.* **1996**, *2* (7), 725. DOI: 10.1038/nm0796-725a.
- (36) Sulniute, R.; Shen, Y.; Guo, Y.-Z.; Fallah, M.; Ahlskog, N.; Ny, L.; Rakhimova, O.; Broden, J.; Boija, H.; Moghaddam, A.; Li, J.; Wilczynska, M.; Ny, T. Plasminogen is a critical regulator of cutaneous wound healing. *Thromb. Haemostasis* **2016**, *115* (5), 1001–1009. DOI: 10.1160/TH15-08-0653. Published Online: Jan. 21, 2016.
- (37) Hamilton, J. A. Plasminogen activator/plasmin system in arthritis and inflammation: friend or foe? *Arthritis Rheum.* **2008**, *58* (3), 645–648. DOI: 10.1002/art.23269.
- (38) Kamio, N.; Hashizume, H.; Nakao, S.; Matsushima, K.; Sugiya, H. Plasmin is involved in inflammation via protease-activated receptor-1 activation in human dental pulp. *Bioch. Pharmacol.* **2008**, *75* (10), 1974–1980. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.02.018. Published Online: Feb. 23, 2008.
- (39) Koizumi, M.; Momoeda, M.; Hiroi, H.; Nakazawa, F.; Nakae, H.; Ohno, T.; Yano, T.; Taketani, Y. Inhibition of proteases involved in embryo implantation by cholesterol sulfate. *Hum. Reprod.* **2010**, *25* (1), 192–197. DOI: 10.1093/humrep/dep370. Published Online: Nov. 7, 2009.

- (40) Valinsky, J. E.; Reich, E. Plasminogen in the chick embryo. Transport and biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256* (23), 12470–12475.
- (41) Miles, L. A.; Parmer, R. J. Plasminogen receptors: the first quarter century. *Sem. Thromb. Hemost.* **2013**, *39* (4), 329–337. DOI: 10.1055/s-0033-1334483. Published Online: Mar. 26, 2013.
- (42) Draxler, D. F.; Sashindranath, M.; Medcalf, R. L. Plasmin: A Modulator of Immune Function. *Sem. Thromb. Hemost.* **2017**, *43* (2), 143–153. DOI: 10.1055/s-0036-1586227. Published Online: Sep. 27, 2016.
- (43) Seligsohn, U.; Lubetsky, A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344* (16), 1222–1231. DOI: 10.1056/NEJM200104193441607.
- (44) Cesarman-Maus, G.; Hajjar, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* **2005**, *129* (3), 307–321. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
- (45) Al-Horani, R. A.; Desai, U. R. Recent advances on plasmin inhibitors for the treatment of fibrinolysis-related disorders. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34* (6), 1168–1216. DOI: 10.1002/med.21315. Published Online: Mar. 21, 2014.
- (46) Guo, Y.-H.; Hernandez, I.; Isermann, B.; Kang, T.; Medved, L.; Sood, R.; Kerschen, E. J.; Holyst, T.; Mosesson, M. W.; Weiler, H. Caveolin-1-dependent apoptosis induced by fibrin degradation products. *Blood* **2009**, *113* (18), 4431–4439. DOI: 10.1182/blood-2008-07-169433. Published Online: Dec. 12, 2008.
- (47) Tordai, H.; Bányai, L.; Patthy, L. The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Lett.* **1999**, *461* (1-2), 63–67. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01416-7.
- (48) Jensen S. The Primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one "Mini-" plasminogen (MW,38000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis. *Prog. Chem. Fibrinolysis Thrombolysis* **1987**, *3*, 191–209.
- (49) Wang, X.; Lin, X.; Loy, J. A.; Tang, J.; Zhang, X. C. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* **1998**, *281* (5383), 1662–1665. DOI: 10.1126/science.281.5383.1662.
- (50) Ramesh, V.; Petros, A. M.; Llinás, M.; Tulinsky, A.; Park, C. H. Proton magnetic resonance study of lysine-binding to the kringle 4 domain of human plasminogen. *J. Mol. Biol.* **1987**, *198* (3), 481–498. DOI: 10.1016/0022-2836(87)90295-6.
- (51) Mathews, I. I.; Vanderhoff-Hanaver, P.; Castellino, F. J.; Tulinsky, A. Crystal structures of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen in complexes with the ligands epsilon-aminocaproic acid and trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic Acid. *Biochemistry* **1996**, *35* (8), 2567–2576. DOI: 10.1021/bi9521351.
- (52) Law, R. H. P.; Caradoc-Davies, T.; Cowieson, N.; Horvath, A. J.; Quek, A. J.; Encarnacao, J. A.; Steer, D.; Cowan, A.; Zhang, Q.; Lu, B. G. C.; Pike, R. N.; Smith, A. I.; Coughlin, P. B.; Whisstock, J. C. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep.* **2012**, *1* (3), 185–190. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.012. Published Online: Mar. 8, 2012.
- (53) Suenson, E.; Thorsen, S. Secondary-site binding of Glu-plasmin, Lys-plasmin and miniplasmin to fibrin. *Biochem. J.* **1981**, *197* (3), 619–628. DOI: 10.1042/bj1970619.
- (54) Wiman, B.; Lijnen, H. R.; Collen, D. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in α 2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta, Prot. Struct.* **1979**, *579* (1), 142–154. DOI: 10.1016/0005-2795(79)90094-1.
- (55) Frank, P. S.; Douglas, J. T.; Locher, M.; Llinás, M.; Schaller, J. Structural/functional characterization of the alpha 2-plasmin inhibitor C-terminal peptide. *Biochemistry* **2003**, *42* (4), 1078–1085. DOI: 10.1021/bi026917n.
- (56) Berge, A.; Sjöbring, U. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (34), 25417–25424.
- (57) Wistedt, A. C.; Kotarsky, H.; Marti, D.; Ringdahl, U.; Castellino, F. J.; Schaller, J.; Sjöbring, U. Kringle 2 mediates high affinity binding of plasminogen to an internal sequence in streptococcal surface protein PAM. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (38), 24420–24424. DOI: 10.1074/jbc.273.38.24420.
- (58) Miles, L. A.; Dahlberg, C. M.; Plow, E. F. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (24), 11928–11934.
- (59) Ponting, C. P.; Marshall, J. M.; Cederholm-Williams, S. A. Plasminogen: a structural review. *Blood coagulation & fibrinolysis* **1992**, *3* (5), 605–614.

- (60) Marti, D.; Schaller, J.; Ochensberger, B.; Rickli, E. E. Expression, purification and characterization of the recombinant kringle 2 and kringle 3 domains of human plasminogen and analysis of their binding affinity for omega-aminocarboxylic acids. *Europ. J. Biochem.* **1994**, *219* (1-2), 455–462. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb19959.x.
- (61) Söhndel, S.; Hu, C. K.; Marti, D.; Affolter, M.; Schaller, J.; Llinás, M.; Rickli, E. E. Recombinant gene expression and 1H NMR characteristics of the kringle (2 + 3) supermodule: spectroscopic/functional individuality of plasminogen kringle domains. *Biochemistry* **1996**, *35* (7), 2357–2364. DOI: 10.1021/bi9520949.
- (62) Wang, H.; Prorok, M.; Bretthauer, R. K.; Castellino, F. J. Serine-578 is a major phosphorylation locus in human plasma plasminogen. *Biochemistry* **1997**, *36* (26), 8100–8106. DOI: 10.1021/bi970328d.
- (63) Violand, B. N.; Castellino, F. J. Mechanism of the urokinase-catalyzed activation of human plasminogen. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251* (13), 3906–3912.
- (64) Gong, Y.; Kim, S. O.; Felez, J.; Grella, D. K.; Castellino, F. J.; Miles, L. A. Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (22), 19078–19083. DOI: 10.1074/jbc.M101387200. Published Online: Mar. 22, 2001.
- (65) Parry, M. A.; Fernandez-Catalan, C.; Bergner, A.; Huber, R.; Hopfner, K. P.; Schlott, B.; Gührs, K. H.; Bode, W. The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5* (10), 917–923. DOI: 10.1038/2359.
- (66) Parry, M.; Fernandez-Catalan, C.; Bergner, A.; Huber, R.; Hopfner, K.; Schlott, B.; Guehrs, K.; Bode, W. *Structure of the ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex: a proteinase-cofactor-substrate complex in action*, 1999. DOI: 10.2210/pdb1bui/pdb.
- (67) Mather, T.; Oganessyan, V.; Hof, P.; Huber, R.; Foundling, S.; Esmon, C.; Bode, W. The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *EMBO J.* **1996**, *15* (24), 6822–6831.
- (68) Sichler, K.; Banner, D. W.; D'Arcy, A.; Hopfner, K.-P.; Huber, R.; Bode, W.; Kresse, G.-B.; Kopetzki, E.; Brandstetter, H. Crystal Structures of Uninhibited Factor VIIa Link its Cofactor and Substrate-assisted Activation to Specific Interactions. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322* (3), 591–603. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00747-7.
- (69) van Huis, C. A.; Bigge, C. F.; Casimiro-Garcia, A.; Cody, W. L.; Dudley, D. A.; Filipski, K. J.; Heemstra, R. J.; Kohrt, J. T.; Narasimhan, L. S.; Schaum, R. P.; Zhang, E.; Bryant, J. W.; Haarer, S.; Janiczek, N.; Leadley, R. J.; McClanahan, T.; Thomas Peterson, J.; Welch, K. M.; Edmunds, J. J. Structure-based drug design of pyrrolidine-1, 2-dicarboxamides as a novel series of orally bioavailable factor Xa inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69* (6), 444–450. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2007.00520.x.
- (70) Guo, Z.; Bannister, T.; Noll, R.; Jin, L.; Rynkiewicz, M.; Bibbins, F.; Magee, S.; Gorga, J.; Babine, R. E.; Strickler, J. E.; Meyers, H. V.; Abdel-Meguid, S. S. *Crystal Structure of the Catalytic Domain of Coagulation Factor XI in complex with N-(7-Carbamidoyl-naphthalen-1-yl)-3-hydroxy-2-methyl-benzamide*, 2006. DOI: 10.2210/pdb1zsj/pdb.
- (71) Tang, J.; Yu, C. L.; Williams, S. R.; Springman, E.; Jeffery, D.; Sprengeler, P. A.; Estevez, A.; Sampang, J.; Shrader, W.; Spencer, J.; Young, W.; McGrath, M.; Katz, B. A. Expression, crystallization, and three-dimensional structure of the catalytic domain of human plasma kallikrein. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (49), 41077–41089. DOI: 10.1074/jbc.M506766200. Published Online: Sep. 30, 2005.
- (72) Dullweber, F.; Stubbs, M. T.; Musil, D.; Stürzebecher, J.; Klebe, G. Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313* (3), 593–614. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5062.
- (73) Schweinitz, A.; Steinmetzer, T.; Banke, I. J.; Arlt, M. J. E.; Stürzebecher, A.; Schuster, O.; Geissler, A.; Giersiefen, H.; Zeslowska, E.; Jacob, U.; Krüger, A.; Stürzebecher, J. Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (32), 33613–33622. DOI: 10.1074/jbc.M314151200. Published Online: May. 18, 2004.
- (74) Saito, H.; Goodnough, L. T.; Knowles, B. B.; Aden, D. P. Synthesis and secretion of alpha 2-plasmin inhibitor by established human liver cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79* (18), 5684–5687. DOI: 10.1073/pnas.79.18.5684.
- (75) Sumi, Y.; Ichikawa, Y.; Nakamura, Y.; Miura, O.; Aoki, N. Expression and characterization of pro alpha 2-plasmin inhibitor. *J. Biochem.* **1989**, *106* (4), 703–707. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122920.
- (76) Coughlin, P. B. Antiplasmin: the forgotten serpin? *FEBS J.* **2005**, *272* (19), 4852–4857. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04881.x.

- (77) Favier, R.; Aoki, N.; Moerlose, P. de. Congenital alpha(2)-plasmin inhibitor deficiencies: a review. *Brit. J. Haematol.* **2001**, *114* (1), 4–10. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02845.x.
- (78) Sottrup-Jensen, L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (20), 11539–11542.
- (79) Aoki, N.; Harpel, P. C. Inhibitors of the fibrinolytic enzyme system. *Semin. Thromb. Hemostasis* **1984**, *10* (1), 24–41. DOI: 10.1055/s-2007-1004405.
- (80) Stubbs, M. T.; Renucci, M.; Bode, W. An active zymogen: unravelling the mystery of tissue-type plasminogen activator. *Biological chemistry* **1998**, *379* (2), 95–103. DOI: 10.1515/bchm.1998.379.2.95.
- (81) Renucci, M.; Engh, R. A.; Stubbs, M. T.; Huber, R.; Fischer, S.; Kohnert, U.; Bode, W. Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J.* **1997**, *16* (16), 4797–4805. DOI: 10.1093/emboj/16.16.4797.
- (82) Swedberg, J. E.; Harris, J. M. Natural and engineered plasmin inhibitors: applications and design strategies. *ChemBioChem* **2012**, *13* (3), 336–348. DOI: 10.1002/cbic.201100673. Published Online: Jan. 11, 2012.
- (83) Koster, A.; Faraoni, D.; Levy, J. H. Antifibrinolytic Therapy for Cardiac Surgery: An Update. *Anesthesiology* **2015**, *123* (1), 214–221. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000688.
- (84) Massicotte, L.; Thibeault, L.; Roy, A. Classical Notions of Coagulation Revisited in Relation with Blood Losses, Transfusion Rate for 700 Consecutive Liver Transplantations. *Semin. Thromb. Hemostasis* **2015**, *41* (5), 538–546. DOI: 10.1055/s-0035-1550428. Published Online: Jun. 16, 2015.
- (85) Marasco, S. F.; Pilcher, D.; Oto, T.; Chang, W.; Griffiths, A.; Pellegrino, V.; Chan, J.; Bailey, M. Aprotinin in lung transplantation is associated with an increased incidence of primary graft dysfunction. *European journal of cardio-thoracic surgery* **2010**, *37* (2), 420–425. DOI: 10.1016/j.ejcts.2009.08.007. Published Online: Sep. 19, 2009.
- (86) Patrassi, G. M.; Viero, M.; Sartori, M. T.; Silvestro, G. de; Rossaro, L.; Burra, P.; Nalli, M. L.; Piccinni, P.; Bassi, N. Aprotinin efficacy on intraoperative bleeding and transfusion requirements in orthotopic liver transplantation. *Transfusion* **1994**, *34* (6), 507–511. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1994.34694295066.x.
- (87) Kesten, S.; Hoyas, A. de; Chaparro, C.; Westney, G.; Winton, T.; Maurer, J. R. Aprotinin reduces blood loss in lung transplant recipients. *Annals of thoracic surgery* **1995**, *59* (4), 877–879. DOI: 10.1016/0003-4975(95)00051-L.
- (88) Nishijima, D. K.; Kuppermann, N.; Roberts, I.; VanBuren, J. M.; Tancredi, D. J. The Effect of Tranexamic Acid on Functional Outcomes: An Exploratory Analysis of the CRASH-2 Randomized Controlled Trial. *Annals of emergency medicine* **2019**, *74* (1), 79–87. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2018.11.018. Published Online: Jan. 12, 2019.
- (89) Gall, L. S.; Davenport, R. A. Fibrinolysis and antifibrinolytic treatment in the trauma patient. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **2018**, *31* (2), 227–233. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000561.
- (90) Cannon, J. W. Hemorrhagic Shock. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378* (4), 370–379. DOI: 10.1056/NEJMra1705649.
- (91) Ducloy-Bouthors, A.-S.; Jude, B.; Duhamel, A.; Broisin, F.; Huissoud, C.; Keita-Meyer, H.; Mandelbrot, L.; Tillouche, N.; Fontaine, S.; Le Goueff, F.; Depret-Mosser, S.; Vallet, B.; Susen, S. High-dose tranexamic acid reduces blood loss in postpartum haemorrhage. *Critical care* **2011**, *15* (2), R117. DOI: 10.1186/cc10143. Published Online: Apr. 15, 2011.
- (92) Bryant-Smith, A. C.; Lethaby, A.; Farquhar, C.; Hickey, M. Antifibrinolytics for heavy menstrual bleeding. *Cochrane database of systematic reviews* **2018**, *4*, CD000249. DOI: 10.1002/14651858.CD000249.pub2. Published Online: Apr. 15, 2018.
- (93) Joseph, J.; Martinez-Devesa, P.; Bellorini, J.; Burton, M. J. Tranexamic acid for patients with nasal haemorrhage (epistaxis). *Cochrane database of systematic reviews* **2018**, *12*, CD004328. DOI: 10.1002/14651858.CD004328.pub3. Published Online: Dec. 31, 2018.
- (94) French, K. F.; White, J.; Hoesch, R. E. Treatment of intracerebral hemorrhage with tranexamic acid after thrombolysis with tissue plasminogen activator. *Neurocrit. care* **2012**, *17* (1), 107–111. DOI: 10.1007/s12028-012-9681-5.
- (95) O'Carroll, C. B.; Aguilar, M. I. Management of Postthrombolysis Hemorrhagic and Orolingual Angioedema Complications. *The Neurohospitalist* **2015**, *5* (3), 133–141. DOI: 10.1177/1941874415587680.

- (96) Spahn, D. R.; Goodnough, L. T. Alternatives to blood transfusion. *Lancet* **2013**, *381* (9880), 1855–1865. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60808-9.
- (97) Hofmann, A.; Ozawa, S.; Farrugia, A.; Farmer, S. L.; Shander, A. Economic considerations on transfusion medicine and patient blood management. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2013**, *27* (1), 59–68. DOI: 10.1016/j.bpa.2013.02.001.
- (98) Shander, A.; Hofmann, A.; Ozawa, S.; Theusinger, O. M.; Gombotz, H.; Spahn, D. R. Activity-based costs of blood transfusions in surgical patients at four hospitals. *Transfusion* **2010**, *50* (4), 753–765. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02518.x. Published Online: Dec. 9, 2009.
- (99) Leahy, M. F.; Hofmann, A.; Towler, S.; Trentino, K. M.; Burrows, S. A.; Swain, S. G.; Hamdorf, J.; Gallagher, T.; Koay, A.; Geelhoed, G. C.; Farmer, S. L. Improved outcomes and reduced costs associated with a health-system-wide patient blood management program: a retrospective observational study in four major adult tertiary-care hospitals. *Transfusion* **2017**, *57* (6), 1347–1358. DOI: 10.1111/trf.14006. Published Online: Feb. 2, 2017.
- (100) Okamoto, S. Plasmin and Antiplasmin. *Keio j. med* **1959**, *8* (4), 211–217. DOI: 10.2302/kjm.8.211.
- (101) Abe, T.; Sato, A. Reaction mechanism between ϵ -aminocaproic acid and plasmin, tissue activator and trypsin. *Keio j. med* **1959**, *8* (4), 219–224. DOI: 10.2302/kjm.8.219.
- (102) Okamoto, S.; Okamoto, U. Amino-Methyl-Cyclohexane-Carboxylic Acid: AMCHA. *Keio j. med* **1962**, *11* (3), 105–115. DOI: 10.2302/kjm.11.105.
- (103) Okamoto, S.; Sato, S.; Takada, Y.; Okamoto U. An active stereo-isomer (trans-form) of AMCHA and its Antifibrinolytic (Antiplasminic) action in vitro and in vivo. *Keio j. med* **1964**, *13* (4), 177–185. DOI: 10.2302/kjm.13.177.
- (104) Lecker, I.; Wang, D.-S.; Romaschin, A. D.; Peterson, M.; Mazer, C. D.; Orser, B. A. Tranexamic acid concentrations associated with human seizures inhibit glycine receptors. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (12), 4654–4666. DOI: 10.1172/JCI63375. Published Online: Nov. 26, 2012.
- (105) Marti, D. N.; Hu, C. K.; An, S. S.; Haller, P. von; Schaller, J.; Llinás, M. Ligand preferences of kringle 2 and homologous domains of human plasminogen: canvassing weak, intermediate, and high-affinity binding sites by 1H-NMR. *Biochemistry* **1997**, *36* (39), 11591–11604. DOI: 10.1021/bi971316v.
- (106) Marti, D. N.; Schaller, J.; Llinás, M. Solution structure and dynamics of the plasminogen kringle 2-AMCHA complex: 3(1)-helix in homologous domains. *Biochemistry* **1999**, *38* (48), 15741–15755. DOI: 10.1021/bi9917378.
- (107) Chang, Y.; Mochalkin, I.; McCance, S. G.; Cheng, B.; Tulinsky, A.; Castellino, F. J. Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen. *Biochemistry* **1998**, *37* (10), 3258–3271. DOI: 10.1021/bi972284e.
- (108) Breau, R. H.; Kokolo, M. B.; Punjani, N.; Cagiannos, I.; Beck, A.; Niznick, N.; Buenaventura, C.; Cowan, J.; Knoll, G.; Momoli, F.; Morash, C.; Ruzicka, M.; Schachkina, S.; Tinmouth, A.; Xie, H. Y.; Fergusson, D. A. The effects of lysine analogs during pelvic surgery: a systematic review and meta-analysis. *Transfusion medicine reviews* **2014**, *28* (3), 145–155. DOI: 10.1016/j.tmr.2014.05.002. Published Online: May. 18, 2014.
- (109) Montroy, J.; Fergusson, N. A.; Hutton, B.; Lavallée, L. T.; Morash, C.; Cagiannos, I.; Crossen, S.; Fergusson, D. A.; Breau, R. H. The Safety and Efficacy of Lysine Analogues in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion medicine reviews* **2017**, *31* (3), 141–148. DOI: 10.1016/j.tmr.2017.03.002. Published Online: Mar. 22, 2017.
- (110) Levy, J. H. Pharmacologic methods to reduce perioperative bleeding. *Transfusion* **2008**, *48* (1 Suppl), 31S–38S. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01574.x.
- (111) Trudell, J. Current Antifibrinolytic Therapy for Coronary Artery Revascularization. *AANA J.* 2008 Apr;76(2)121-4.
- (112) Fergusson; Dean A.; M.H.A.; Ph.D. Hébert; Paul C.; M.D.; M.H.Sc. Mazer; C. David; M.D. Fremes; Stephen; M.D. MacAdams; Charles; M.D. Murkin; John M.; M.D. Teoh; Kevin; M.Sc. Duke; Peter C.; M.D. Arellano; Ramiro; M.Sc. Blajchman; Morris A.; M.D. Bussièrès; Jean S.; M.D. Côté; Dany; M.D. Karski; Jacek; M.D. Martineau; Raymond; M.D. Robblee; James A.; M.B.A. Rodger; Marc; M.Sc. Wells; George; Ph.D. Clinch; Jennifer; M.A. Pretorius; Roanda; M.Sc. A Comparison of Aprotinin and Lysine Analogues in High-Risk Cardiac Surgery. *N. Engl. J. Med* **2010**, *363*(13):1290.

- (113) Ker, K.; Prieto-Merino, D.; Roberts, I. Systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of tranexamic acid on surgical blood loss. *Br. J. Surg.* **2013**, *100* (10), 1271–1279. DOI: 10.1002/bjs.9193. Published Online: Jul. 9, 2013.
- (114) Longo, M. A.; Cavalheiro, B. T.; Oliveira Filho, G. R. de. Systematic review and meta-analyses of tranexamic acid use for bleeding reduction in prostate surgery. *J. Clin. Anesth.* **2018**, *48*, 32–38. DOI: 10.1016/j.jclinane.2018.04.014. Published Online: May. 1, 2018.
- (115) Amer, K. M.; Rehman, S.; Amer, K.; Haydel, C. Efficacy and Safety of Tranexamic Acid in Orthopaedic Fracture Surgery: A Meta-Analysis and Systematic Literature Review. *Journal of orthopaedic trauma* **2017**, *31* (10), 520–525. DOI: 10.1097/BOT.0000000000000919.
- (116) Gausden, E. B.; Qudsi, R.; Boone, M. D.; O’Gara, B.; Ruzbarsky, J. J.; Lorich, D. G. Tranexamic Acid in Orthopaedic Trauma Surgery: A Meta-Analysis. *Journal of orthopaedic trauma* **2017**, *31* (10), 513–519. DOI: 10.1097/BOT.0000000000000913.
- (117) Faraoni, D.; Willems, A.; Melot, C.; Hert, S. de; van der Linden, P. Efficacy of tranexamic acid in paediatric cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *European journal of cardio-thoracic surgery* **2012**, *42* (5), 781–786. DOI: 10.1093/ejcts/ezs127. Published Online: Apr. 24, 2012.
- (118) Napolitano, L. M.; Cohen, M. J.; Cotton, B. A.; Schreiber, M. A.; Moore, E. E. Tranexamic acid in trauma: how should we use it? *J. trauma acute care surg.* **2013**, *74* (6), 1575–1586. DOI: 10.1097/TA.0b013e318292cc54.
- (119) Bailey, A. M.; Baker, S. N.; Weant, K. A. Tranexamic acid for trauma-related hemorrhage. *Advanced emergency nursing journal* **2014**, *36* (2), 123-31; quiz 132-3. DOI: 10.1097/TME.000000000000018.
- (120) Roberts, I. Tranexamic acid in trauma: how should we use it? *J. Thromb. Haemostasis* **2015**, *13 Suppl 1*, S195-9. DOI: 10.1111/jth.12878.
- (121) Roberts, I.; Prieto-Merino, D. Applying results from clinical trials: tranexamic acid in trauma patients. *Journal of intensive care* **2014**, *2* (1), 56. DOI: 10.1186/s40560-014-0056-1. Published Online: Oct. 5, 2014.
- (122) Roberts, I.; Prieto-Merino, D.; Manno, D. Mechanism of action of tranexamic acid in bleeding trauma patients: an exploratory analysis of data from the CRASH-2 trial. *Critical care (London, England)* **2014**, *18* (6), 685. DOI: 10.1186/s13054-014-0685-8. Published Online: Dec. 13, 2014.
- (123) Hibbs, S. P.; Roberts, I.; Shakur-Still, H.; Hunt, B. J. Post-partum haemorrhage and tranexamic acid: a global issue. *Br. J. Haematol.* **2018**, *180* (6), 799–807. DOI: 10.1111/bjh.15073. Published Online: Jan. 9, 2018.
- (124) Nilsson, I. M. Clinical pharmacology of aminocaproic and tranexamic acids. *J. Clin. Pathol.* **1980**, *s3-14* (1), 41–47. DOI: 10.1136/jcp.s3-14.1.41.
- (125) Zhou, Z.-F.; Zhang, F.-J.; Huo, Y.-F.; Yu, Y.-X.; Yu, L.-N.; Sun, K.; Sun, L.-H.; Xing, X.-F.; Yan, M. Intraoperative tranexamic acid is associated with postoperative stroke in patients undergoing cardiac surgery. *PLoS One* **2017**, *12* (5), e0177011. DOI: 10.1371/journal.pone.0177011. Published Online: May. 26, 2017.
- (126) Furtmüller, R.; Schlag, M. G.; Berger, M.; Hopf, R.; Huck, S.; Sieghart, W.; Redl, H. Tranexamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulsions by a gamma-aminobutyric acid(A) receptor antagonistic effect. *The J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301* (1), 168–173. DOI: 10.1124/jpet.301.1.168.
- (127) Murkin, J. M.; Falter, F.; Granton, J.; Young, B.; Burt, C.; Chu, M. High-dose tranexamic Acid is associated with nonischemic clinical seizures in cardiac surgical patients. *Anesth. Analg.* **2010**, *110* (2), 350–353. DOI: 10.1213/ANE.0b013e3181c92b23. Published Online: Dec. 8, 2009.
- (128) Sander, M.; Spies, C. D.; Martiny, V.; Rosenthal, C.; Wernecke, K.-D.; Heymann, C. von. Mortality associated with administration of high-dose tranexamic acid and aprotinin in primary open-heart procedures: a retrospective analysis. *Critical care* **2010**, *14* (4), R148. DOI: 10.1186/cc9216. Published Online: Aug. 3, 2010.
- (129) Markwardt, F.; RICHTER, M. UBER DIE ANTIFIBRINOLYTISCHE WIRKUNG VON DERIVATEN DER P-AMINOMETHYLBENZOESAEURE (PAMBA). *Acta Biol. Med. Ger.* **1964**, *13*, 719–724.
- (130) Westlund, L. E.; Lundén, R.; Wallén, P. Effect of EACA, PAMBA, AMCA and AMBOCA on fibrinolysis induced by streptokinase, urokinase and tissue activator. *Haemostasis* **1982**, *11* (4), 235–241. DOI: 10.1159/000214669.
- (131) Boström, J.; Grant, J. A.; Fjellström, O.; Thelin, A.; Gustafsson, D. Potent fibrinolysis inhibitor discovered by shape and electrostatic complementarity to the drug tranexamic acid. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (8), 3273–3280. DOI: 10.1021/jm301818g. Published Online: Apr. 10, 2013.

- (132) Cheng, L.; Pettersen, D.; Ohlsson, B.; Schell, P.; Karle, M.; Evertsson, E.; Pahlén, S.; Jonforsen, M.; Plowright, A. T.; Boström, J.; Fex, T.; Thelin, A.; Hilgendorf, C.; Xue, Y.; Wahlund, G.; Lindberg, W.; Larsson, L.-O.; Gustafsson, D. Discovery of the Fibrinolysis Inhibitor AZD6564, Acting via Interference of a Protein-Protein Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (5), 538–543. DOI: 10.1021/ml400526d. Published Online: Feb. 18, 2014.
- (133) Hassfeld, J.; Kinzel, T.; Köbberling, J.; Cancho, G. Y.; Beyer, K.; Röhrig, S.; Köllnberger, M.; Sperzel, M.; Burkhardt, N.; Schlemmer, K. H.; Stegmann, C.; Schuhmacher, J.; Werner, M.; Ellermann, M.; Haßfeld, J. (Aza)pyridopyrazolopyrimidinones and indazolopyrimidinones and their use, US2015126449 (A1), 2015.
- (134) Ellermann, M.; Valot, G.; Cancho, G. Y.; Hassfeld, J.; Kinzel, T.; Köbberling, J.; Beyer, K.; Röhrig, S.; Sperzel, M.; Stampfuss, J.; Meyer, I.; Köllnberger, M.; Burkhardt, N.; Schlemmer, K. H.; Stegmann, C.; Schuhmacher, J.; Werner, M.; Heiermann, J.; Hengeveld, W. J. PIPERIDINYLPYRAZOLOPYRIMIDINONES AND THEIR USE, WO2016071216 (A1), 2016.
- (135) Ellermann, M.; Valot, G.; Cancho, G. Y.; Hassfeld, J.; Kinzel, T.; Köbberling, J.; Beyer, K.; Röhrig, S.; Sperzel, M.; Stampfuss, J.; Meyer, I.; Köllnberger, M.; Burkhardt, N.; Schlemmer, K. H.; Stegmann, C.; Schuhmacher, J.; Werner, M. INDAZOLOPYRIMIDINONES AS FIBRINOLYSIS INHIBITORS, WO2016173948 (A1), 2016.
- (136) Laskowski, M.; Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 593–626. DOI: 10.1146/annurev.bi.49.070180.003113.
- (137) Zakharova, E.; Horvath, M. P.; Goldenberg, D. P. Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (27), 11034–11039. DOI: 10.1073/pnas.0902463106. Published Online: Jun. 19, 2009.
- (138) Bode, W.; Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204* (2), 433–451. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16654.x.
- (139) Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Bolognesi, M.; Spallarossa, A.; Coletta, M.; Cristofaro, R. de; Menegatti, E. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr. Protein Pept. Sci* **2003**, *4* (3), 231–251. DOI: 10.2174/1389203033487180.
- (140) Fritz, H.; Wunderer, G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneim. Forsch.* **1983**, *33* (4), 479–494.
- (141) Royston, D.; Aprotinin therapy. *Br. J. Anaesth.* **1994**, *73* (6), 734–7. DOI: 10.1093/bja/73.6.734.
- (142) Dhir, A. Antifibrinolytics in cardiac surgery. *Annals of cardiac anaesthesia* **2013**, *16* (2), 117–125. DOI: 10.4103/0971-9784.109749.
- (143) Ortmann, E.; Besser, M. W.; Klein, A. A. Antifibrinolytic agents in current anaesthetic practice. *Br. J. Anaesth.* **2013**, *111* (4), 549–563. DOI: 10.1093/bja/aet154. Published Online: May. 9, 2013.
- (144) Royston, D. Blood-sparing drugs: aprotinin, tranexamic acid, and epsilon-aminocaproic acid. *Int. Anesthesiol. Clin.* **1995**, *33* (1), 155–179.
- (145) Karkouti, K.; Beattie, W. S.; Dattilo, K. M.; McCluskey, S. A.; Ghannam, M.; Hamdy, A.; Wijeyesundera, D. N.; Fedorko, L.; Yau, T. M. A propensity score case-control comparison of aprotinin and tranexamic acid in high-transfusion-risk cardiac surgery. *Transfusion* **2006**, *46* (3), 327–338. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00724.x.
- (146) Mangano, D. T.; Tudor, I. C.; Dietzel, C. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354* (4), 353–365. DOI: 10.1056/NEJMoa051379.
- (147) Schneeweiss Sebastian; Seeger John D.; Landon Joan; Walker Alexander M. Aprotinin during Coronary-Artery Bypass Grafting and Risk of Death. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358* (8), 771–83. DOI: 10.1056/NEJMoa0707571.
- (148) Apeler, H.; Peters, J.; Schröder, W.; Schneider, K.-H.; Lemm, G.; Hinz, V.; Rossouw, G. J.; Dembowski, K. Expression, purification, biochemical and pharmacological characterization of a recombinant aprotinin variant. *Arzneim. Forsch.* **2004**, *54* (8), 483–497. DOI: 10.1055/s-0031-1297003.
- (149) Schmaier, A. H. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109* (8), 1007–1009. DOI: 10.1172/JCI15490.
- (150) Sun, Z.; Lu, W.; Jiang, A.; Chen, J.; Tang, F.; Liu, J.-N. Expression, purification and characterization of aprotinin and a human analogue of aprotinin. *Protein Expression Purif.* **2009**, *65* (2), 238–243. DOI: 10.1016/j.pep.2008.12.010. Published Online: Dec. 27, 2008.

- (151) Mattler, L. E.; Bang, N. U. Serine protease specificity for peptide chromogenic substrates. *Thromb. Haemostasis* **1977**, *38* (4), 776–792.
- (152) Okada, Y.; Tsuda, Y.; Teno, N.; Wanaka, K.; Bohgaki, M.; Hijikata-Okunomiya, A.; Naito, T.; OKAMOTO, S. Synthesis of active center-directed peptide inhibitors of plasmin. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36* (4), 1289–1297. DOI: 10.1248/cpb.36.1289.
- (153) Okada, Y.; Tsuda, Y.; Teno, N.; Wanaka, K.; Sasaki, K.; Hijikata, A.; Naito, T.; OKAMOTO, S. Synthesis of plasmin substrates and relationship between their structure and plasmin activity. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27* (1), 79–85. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1986.tb02768.x.
- (154) Hidaka, K.; Gohda, K.; Teno, N.; Wanaka, K.; Tsuda, Y. Active site-directed plasmin inhibitors: Extension on the P2 residue. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (4), 545–553. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.12.009. Published Online: Dec. 8, 2015.
- (155) Law, R. H. P.; Wu, G.; Leung, E. W. W.; Hidaka, K.; Quek, A. J.; Caradoc-Davies, T. T.; Jeevarajah, D.; Conroy, P. J.; Kirby, N. M.; Norton, R. S.; Tsuda, Y.; Whisstock, J. C. X-ray crystal structure of plasmin with tranexamic acid-derived active site inhibitors. *Blood Adv.* **2017**, *1* (12), 766–771. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016004150. Published Online: May. 9, 2017.
- (156) Teno, N.; Wanaka, K.; Okada, Y.; Tsuda, Y.; OKAMOTO, U.; Hijikata-Okunomiya, A.; Naito, T.; OKAMOTO, S. Development of active center-directed inhibitors against plasmin. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39* (9), 2340–2346. DOI: 10.1248/cpb.39.2340.
- (157) Wanaka, K.; Okada, Y.; Tsuda, Y.; OKAMOTO, U.; Hijikata-Okunomiya, A.; OKAMOTO, S. Synthesis of trans-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L- and -D-phenylalanine-4-carboxymethylanilide and examination of their inhibitory activity against plasma kallikrein. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40* (7), 1814–1817. DOI: 10.1248/cpb.40.1814.
- (158) Okada, Y.; Tsuda, Y.; Tada, M.; Wanaka, K.; OKAMOTO, U.; Hijikata-Okunomiya, A.; OKAMOTO, S. Development of potent and selective plasmin and plasma kallikrein inhibitors and studies on the structure-activity relationship. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48* (12), 1964–1972. DOI: 10.1248/cpb.48.1964.
- (159) Okada, Y.; Tsuda, Y.; Wanaka, K.; Tada, M.; OKAMOTO, U.; OKAMOTO, S.; Hijikata-Okunomiya, A.; Bokonyi, G.; Szende, B.; Keri, G. Development of plasmin and plasma kallikrein selective inhibitors and their effect on M1 (melanoma) and ht29 cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (19), 2217–2221. DOI: 10.1016/S0960-894X(00)00431-5.
- (160) Teno, N.; Wanaka, K.; Okada, Y.; Taguchi, H.; OKAMOTO, U.; Hijikata-Okunomiya, A.; OKAMOTO, S. Development of active center-directed plasmin and plasma kallikrein inhibitors and studies on the structure-inhibitory activity relationship. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41* (6), 1079–1090. DOI: 10.1248/cpb.41.1079.
- (161) Röhn, U.; Ellermann, M.; Strassburger, J.; Wendt, A.; Röhrig, S.; Webster, R. A.; Schmidt, M. V.; Tersteegen, A.; Beyer, K.; Schäfer, M.; Buchmüller, A.; Gerdes, C.; Sperzel, M.; Sandmann, S.; Heitmeier, S.; Hillisch, A.; Ackerstaff, J.; Terjung, C. SUBSTITUTED PHENYLALANINE DERIVATIVES, WO2015044163 (A1), 2015.
- (162) Röhn, U.; Ellermann, M.; Strassburger, J.; Wendt, A.; Röhrig, S.; Webster, R. A.; Schmidt, M. V.; Tersteegen, A.; Beyer, K.; Schäfer, M.; Buchmüller, A.; Gerdes, C.; Sperzel, M.; Sandmann, S.; Heitmeier, S.; Hillisch, A.; Ackerstaff, J.; Terjung, C. SUBSTITUTED PHENYLALANINE DERIVATIVES, WO2015044165 (A1), 2015.
- (163) Röhn, U.; Ellermann, M.; Strassburger, J.; Wendt, A.; Röhrig, S.; Webster, R. A.; Schmidt, M. V.; Tersteegen, A.; Beyer, K.; Schäfer, M.; Buchmüller, A.; Gerdes, C.; Sperzel, M.; Sandmann, S.; Heitmeier, S.; Hillisch, A.; Ackerstaff, J.; Terjung, C. SUBSTITUTED PHENYLALANINE DERIVATIVES AND USE THEREOF TO TREAT THROMBOTIC/THROMBOEMBOLIC DISEASES, WO2015044170 (A1), 2015.
- (164) Röhn, U.; Ellermann, M.; Strassburger, J.; Wendt, A.; Röhrig, S.; Webster, R. A.; Schmidt, M. V.; Tersteegen, A.; Beyer, K.; Schäfer, M.; Buchmüller, A.; Gerdes, C.; Sperzel, M.; Sandmann, S.; Heitmeier, S.; Hillisch, A.; Ackerstaff, J.; Terjung, C. SUBSTITUTED PHENYLALANINE DERIVATIVES, WO2015044172 (A1), 2015.
- (165) Röhn, U.; Ellermann, M.; Strassburger, J.; Wendt, A.; Röhrig, S.; Webster, R. A.; Schmidt, M. V.; Tersteegen, A.; Beyer, K.; Schäfer, M.; Buchmüller, A.; Gerdes, C.; Sperzel, M.; Sandmann, S.; Heitmeier, S.; Hillisch, A.; Ackerstaff, J.; Terjung, C. SUBSTITUTED PHENYLALANINE DERIVATIVES AS MODULATORS OF FACTOR XIA, WO2015044174 (A1), 2015.

- (166) Röhn, U.; Ellermann, M.; Röhrig, S.; Webster, R. A.; Schmidt, M. V.; Tersteegen, A.; Beyer, K.; Schäfer, M.; Buchmüller, A.; Gerdes, C.; Sperzel, M.; Stampfuss, J.; Hillisch, A.; Ackerstaff, J.; Terjung, C. 7-{4-[(2S)-2-({[TRANS-4-(AMINOMETHYL)CYCLOHEXYL]CARBONYL}AMINO)-3-(PHENYLAMINO)-3-OXOPROPYL]PHENYL}-6-METHYL-4-OXO-1,4-DIHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES AS FACTOR XIA INHIBITORS FOR TREATING FIBRINOLYTIC DISEASES, WO2016146604 (A1), 2016.
- (167) Röhn, U.; Ellermann, M.; Röhrig, S.; Webster, R. A.; Schmidt, M. V.; Tersteegen, A.; Beyer, K.; Schäfer, M.; Buchmüller, A.; Gerdes, C.; Sperzel, M.; Stampfuss, J.; Hillisch, A.; Ackerstaff, J.; Terjung, C.; Wendt, A. SUBSTITUTED PHENYLALANINE DERIVATIVES, WO2016146605 (A1), 2016.
- (168) Kolte, D.; Bryant, J.; Holsworth, D.; Wang, J.; Akbari, P.; Gibson, G.; Shariat-Madar, Z. Biochemical characterization of a novel high-affinity and specific plasma kallikrein inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162* (7), 1639–1649. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01170.x.
- (169) Corte, J. R.; Fang, T.; Hangeland, J. J.; Friends, T. J.; Rendina, A. R.; Luettgen, J. M.; Bozarth, J. M.; Barbera, F. A.; Rossi, K. A.; Wei, A.; Ramamurthy, V.; Morin, P. E.; Seiffert, D. A.; Wexler, R. R.; Quan, M. L. Pyridine and pyridinone-based factor Xla inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (4), 925–930. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.050. Published Online: Dec. 31, 2014.
- (170) Gustafsson, D.; Antonsson, T.; Bylund, R.; Eriksson, U.; Gyzander, E.; Nilsson, I.; Elg, M.; Mattsson, C.; Deinum, J.; Pehrsson, S.; Karlsson, O.; Nilsson, A.; Sörensen, H. Effects of melagatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, on thrombin and fibrinolytic enzymes. *Thromb. Haemostasis* **1998**, *79* (1), 110–118.
- (171) Stürzebecher, A.; Dönnecke, D.; Schweinitz, A.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Stürzebecher, U.; Kotthaus, J.; Clement, B.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T. Highly potent and selective substrate analogue factor Xa inhibitors containing D-homophenylalanine analogues as P3 residue: part 2. *ChemMedChem* **2007**, *2* (7), 1043–1053. DOI: 10.1002/cmdc.200700031.
- (172) Wiley, M. R.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Craft, T. J.; Gifford-Moore, D. S.; Jones, N. D.; Olkowski, J. L.; Weir, L. C.; Smith, G. F. D-Phe-Pro-p-Amidinobenzylamine: A potent and highly selective thrombin inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (20), 2387–2392. DOI: 10.1016/0960-894X(96)00442-8.
- (173) Steinmetzer, T.; Schweinitz, A.; Steinmetzer, P.; van Locht, A. de; Nicklisch, S.; Reichelt, C.; Ludwig, F. A.; Schulze, A.; Daghish, M.; Heinicke, J. New glycyglycine derivatives with a benzylsulfonylamido group and an amidino-organylamido group at the opposite chain ends, used in drugs for reducing loss of blood, e.g. in operations, DE102006050672 (A1), 2008.
- (174) Dietrich, W.; Nicklisch, S.; Koster, A.; Spannagl, M.; Giersiefen, H.; van de Locht, A. CU-2010—a novel small molecule protease inhibitor with antifibrinolytic and anticoagulant properties. *Anesthesiology* **2009**, *110* (1), 123–130. DOI: 10.1097/ALN.0b013e318191408c.
- (175) Herold, P.; Daghish, M.; Jelakovic, S.; Ludwig, A.; Reichelt, C.; Schulze, A.; Schweinitz, A.; Ludwig, F. A. TRYPSIN-LIKE SERINE PROTEASE INHIBITORS, AND THEIR PREPARATION AND USE, WO2011094496 (A2), 2011.
- (176) Voegeli, R.; Wikstroem, P.; Campiche, R.; Steinmetzer, T.; Jackson, E.; Gempeler, M.; Imfeld, D.; Rawlings, A. V. The effects of benzylsulfonyl-D-Ser-homoPhe-(4-amidino-benzylamide), a dual plasmin and urokinase inhibitor, on facial skin barrier function in subjects with sensitive skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2017**, *39* (2), 109–120. DOI: 10.1111/ics.12354. Published Online: Aug. 26, 2016.
- (177) Szabó, G.; Veres, G.; Radovits, T.; Haider, H.; Krieger, N.; Bährle, S.; Miesel-Gröschel, C.; Niklisch, S.; Karck, M.; van de Locht, A. Effects of novel synthetic serine protease inhibitors on postoperative blood loss, coagulation parameters, and vascular relaxation after cardiac surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2010**, *139* (1), 181-8; discussion 188. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.09.019.
- (178) Szabó, G.; Veres, G.; Radovits, T.; Haider, H.; Krieger, N.; Bährle, S.; Niklisch, S.; Miesel-Gröschel, C.; van de Locht, A.; Karck, M. The novel synthetic serine protease inhibitor CU-2010 dose-dependently reduces postoperative blood loss and improves postischemic recovery after cardiac surgery in a canine model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2010**, *139* (3), 732–740. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.10.059.
- (179) Kim, H.; Szlam, F.; Tanaka, K. A.; van de Locht, A.; Ogawa, S.; Levy, J. H. The effects of MDCO-2010, a serine protease inhibitor, on activated clotting time in blood obtained from volunteers and cardiac surgical patients. *Anesth. Analg.* **2012**, *115* (2), 244–252. DOI: 10.1213/ANE.0b013e3182576a5a. Published Online: May. 14, 2012.
- (180) Englberger, L.; Dietrich, W.; Eberle, B.; Erdoes, G.; Keller, D.; Carrel, T. A novel blood-sparing agent in cardiac surgery? First in-patient experience with the synthetic serine protease inhibitor MDCO-2010: a phase II,

- randomized, double-blind, placebo-controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.* **2014**, *119* (1), 16–25. DOI: 10.1213/ANE.0000000000000218.
- (181) The Medicines Company. *A Phase II, Double-blind, Parallel Group, Dose-selection Study to Compare Antifibrinolytic MDCO-2010 vs. Placebo and Tranexamic Acid in Reducing Blood Loss in Patients Undergoing Primary Cardiac Surgery:NCT01530399, TMC-MDC-11-01.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01530399> (accessed 2022-06-16).
- (182) Saupe, S. M.; Leubner, S.; Betz, M.; Klebe, G.; Steinmetzer, T. Development of new cyclic plasmin inhibitors with excellent potency and selectivity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (3), 820–831. DOI: 10.1021/jm3012917. Published Online: Jan. 23, 2013.
- (183) Hinkes, S.; Wuttke, A.; Saupe, S. M.; Ivanova, T.; Wagner, S.; Knörlein, A.; Heine, A.; Klebe, G.; Steinmetzer, T. Optimization of Cyclic Plasmin Inhibitors: From Benzamidines to Benzylamines. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (13), 6370–6386. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00606. Published Online: Jun. 17, 2016.
- (184) Saupe, S. M.; Steinmetzer, T. A new strategy for the development of highly potent and selective plasmin inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (3), 1171–1180. DOI: 10.1021/jm2011996. Published Online: Jan. 25, 2012.
- (185) Hinkes, S. Synthese und Charakterisierung zyklischer Inhibitoren des Plasmins. Masterarbeit, unter Betreuung von Prof. T. Steinmetzer, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, 2016.
- (186) Pham, T. L. P. Synthese und Charakterisierung neuer zyklischer Plasmininhibitoren. Masterarbeit, unter Betreuung von Prof. T. Steinmetzer, Philipps-Universität Marburg, Marburg, 2017.
- (187) Xue, F.; Seto, C. T. Structure-activity studies of cyclic ketone inhibitors of the serine protease plasmin: design, synthesis, and biological activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (24), 8467–8487. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.08.040. Published Online: Sep. 12, 2006.
- (188) Teno, N.; Gohda, K.; Wanaka, K.; Tsuda, Y.; Akagawa, M.; Akiduki, E.; Araki, M.; Masuda, A.; Otsubo, T.; Yamashita, Y. Novel type of plasmin inhibitors: providing insight into P4 moiety and alternative scaffold to pyrrolopyrimidine. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 3696–3704. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.013. Published Online: Apr. 10, 2015.
- (189) Swedberg, J. E.; Harris, J. M. Plasmin substrate binding site cooperativity guides the design of potent peptide aldehyde inhibitors. *Biochemistry* **2011**, *50* (39), 8454–8462. DOI: 10.1021/bi201203y. Published Online: Sep. 9, 2011.
- (190) Tsuda, Y.; Teno, N.; Okada, Y.; Wanaka, K.; Bohgaki, M.; Hijikata-Okunomiya, A.; OKAMOTO, U.; Naito, T.; OKAMOTO, S. Synthesis of tripeptide chloromethyl ketones and examination of their inhibitory effects on plasmin and plasma kallikrein. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37* (11), 3108–3111. DOI: 10.1248/cpb.37.3108.
- (191) Swedberg, J. E.; Wu, G.; Mahatmanto, T.; Durek, T.; Caradoc-Davies, T. T.; Whisstock, J. C.; Law, R. H. P.; Craik, D. J. Highly Potent and Selective Plasmin Inhibitors Based on the Sunflower Trypsin Inhibitor-1 Scaffold Attenuate Fibrinolysis in Plasma. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (2), 552–560. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01139. Published Online: Dec. 26, 2018.
- (192) Bajaj, M. S.; Ogueli, G. I.; Kumar, Y.; Vadivel, K.; Lawson, G.; Shanker, S.; Schmidt, A. E.; Bajaj, S. P. Engineering kunitz domain 1 (KD1) of human tissue factor pathway inhibitor-2 to selectively inhibit fibrinolysis: properties of KD1-L17R variant. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (6), 4329–4340. DOI: 10.1074/jbc.M110.191163. Published Online: Nov. 29, 2010.
- (193) Ivanov, A. A.; Koval, V. S.; Susova, O. Y.; Salyanov, V. I.; Oleinikov, V. A.; Stomakhin, A. A.; Shalginskikh, N. A.; Kvasha, M. A.; Kirsanova, O. V.; Gromova, E. S.; Zhuze, A. L. DNA specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP(n): the synthesis, spectral properties, and biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* **2015**, *25* (13), 2634–2638. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.04.087. Published Online: May. 5, 2015.
- (194) Shieh, W.-C.; Carlson, J. A.; Shore, M. E. A novel kinetically-controlled peptide synthesis—Dramatic increase of chemical yield with retention of chiral integrity. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (40), 7167–7170. DOI: 10.1016/S0040-4039(99)01493-8.
- (195) Schwarz, G.; Alberts, H.; Kricheldorf, H. R. Syntheses and reactions of (trimethylsiloxy)benzoyl chlorides. *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, *1981* (7), 1257–1270. DOI: 10.1002/jlac.198119810713.
- (196) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha(V)\beta(3)$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (16), 3033–3040. DOI: 10.1021/jm970832g.

- (197) Oliver, M.; Jorgensen, M. R.; Miller, A. D. Solid-Phase Assisted N-1 Functionalization of Azamacrocycles. *Synlett* **2004**, *2004* (3), 453–456. DOI: 10.1055/s-2004-815404.
- (198) Michaelis, L.; Menten, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **1913** *49*, 333–369.
- (199) Goličnik, M.; Stojan, J. Slow-binding inhibition: A theoretical and practical course for students. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2004**, *32* (4), 228–235. DOI: 10.1002/bmb.2004.494032040358.
- (200) Morrison, J. F.; Walsh, C. T. The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1988**, *61*, 201–301. DOI: 10.1002/9780470123072.ch5.
- (201) Copeland, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists*, 2nd ed.; Wiley, 2013. DOI: 10.1002/9781118540398.
- (202) Copeland, R. A. The drug-target residence time model: a 10-year retrospective. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2016**, *15* (2), 87–95. DOI: 10.1038/nrd.2015.18. Published Online: Dec. 18, 2015.
- (203) Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5* (9), 730–739. DOI: 10.1038/nrd2082. Published Online: Aug. 4, 2006.
- (204) Steinmetzer, T.; Baum, B.; Biela, A.; Klebe, G.; Nowak, G.; Bucha, E. Beyond heparinization: design of highly potent thrombin inhibitors suitable for surface coupling. *ChemMedChem* **2012**, *7* (11), 1965–1973. DOI: 10.1002/cmdc.201200292. Published Online: Aug. 20, 2012.
- (205) Biela, A.; Sielaff, F.; Terwesten, F.; Heine, A.; Steinmetzer, T.; Klebe, G. Ligand binding stepwise disrupts water network in thrombin: enthalpic and entropic changes reveal classical hydrophobic effect. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (13), 6094–6110. DOI: 10.1021/jm300337q. Published Online: Jun. 25, 2012.
- (206) Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (21), 8315–8359. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00258. Published Online: Jul. 22, 2015.
- (207) Mutlib, A. E.; Chen, S.-Y.; Espina, R. J.; Shockcor, J.; Prakash, S. R.; Gan, L.-S. P450-mediated metabolism of 1-3-(aminomethyl)phenyl-N-3-fluoro-2'-(methylsulfonyl)-1,1'-biphenyl-4-yl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (DPC 423) and its analogues to aldoximes. Characterization of glutathione conjugates of postulated intermediates derived from aldoximes. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (1), 63–75. DOI: 10.1021/tx0101189.
- (208) Mutlib, A. E.; Dickenson, P.; Chen, S.-Y.; Espina, R. J.; Daniels, J. S.; Gan, L.-S. Bioactivation of benzylamine to reactive intermediates in rodents: formation of glutathione, glutamate, and peptide conjugates. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (9), 1190–1207. DOI: 10.1021/tx020063q.
- (209) Mutlib, A. E.; Shockcor, J.; Chen, S.-Y.; Espina, R. J.; Pinto, D. J.; Orwat, M. J.; Prakash, S. R.; Gan, L.-S. Disposition of 1-3-(aminomethyl)phenyl-N-3-fluoro-2'-(methylsulfonyl)-1,1'-biphenyl-4-yl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (DPC 423) by novel metabolic pathways. Characterization of unusual metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (1), 48–62. DOI: 10.1021/tx0101191.
- (210) Manning, M. E.; Kashkin, J. M. Berotralstat (BCX7353) is a novel oral prophylactic treatment for hereditary angioedema: Review of phase II and III studies. *Allergy Asthma Proc.* **2021**, *42* (4), 274–282. DOI: 10.2500/aap.2021.42.210034. Published Online: Jun. 14, 2021.
- (211) O'Carroll-Kuehn, B. U.; Meeran, H. Management of coagulation during cardiopulmonary bypass. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **2007**, *7* (6), 195–198. DOI: 10.1093/bjaceaccp/mkm036.
- (212) Bartoszko, J.; Karkouti, K. Managing the coagulopathy associated with cardiopulmonary bypass. *J. Thromb. Haemostasis* **2021**, *19* (3), 617–632. DOI: 10.1111/jth.15195. Published Online: Dec. 17, 2020.
- (213) Gailani, D.; Gruber, A. Factor XI as a Therapeutic Target. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2016**, *36* (7), 1316–1322. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.306925. Published Online: May. 12, 2016.
- (214) Mackman, N.; Bergmeier, W.; Stouffer, G. A.; Weitz, J. I. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2020**, *19* (5), 333–352. DOI: 10.1038/s41573-020-0061-0. Published Online: Mar. 4, 2020.
- (215) Chen, R.; Guan, X.; Hu, P.; Dong, Y.; Zhu, Y.; Zhang, T.; Zou, J.; Zhang, S. First-In-Human Study to Assess the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of SHR2285, a Small-Molecule Factor XIa Inhibitor in Healthy Subjects. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 821363. DOI: 10.3389/fphar.2022.821363. Published Online: Feb. 10, 2022.

(216) Brown, N. J.; Gainer, J. V.; Murphey, L. J.; Vaughan, D. E. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway. *Circulation* **2000**, *102* (18), 2190–2196. DOI: 10.1161/01.cir.102.18.2190.

(217) Minai, K.; Matsumoto, T.; Horie, H.; Ohira, N.; Takashima, H.; Yokohama, H.; Kinoshita, M. Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *37* (6), 1565–1570. DOI: 10.1016/S0735-1097(01)01202-5.

(218) Walsmann, P. Über die Reinigung von Thrombinpräparaten. *Die Pharmazie* **1968**, *23* (7), 401–402.

(219) Markus, G.; Priore, R. L.; Wissler, F. C.; The binding of tranexamic acid to native (Glu) and modified (Lys) human plasminogen and its effect on conformation. *J. Biol. Chem.* **1979** *254* (4) 1211-6.

Summary in English

Development, Synthesis and Characterization of macrocyclic Plasmin Inhibitors

Entwicklung, Synthese und Charakterisierung makrozyklischer Plasmininhibitoren

Antifibrinolytics are important drugs for the reduction of bleeding after severe traumata and in major surgical interventions. Currently, only few antifibrinolytic drugs are approved for clinical use, which possess limited efficacies and can cause severe side effects. The most important antifibrinolytic drug *tranexamic acid* has been developed at the beginning of the 1960's and reduces the plasmin formation from its zymogen plasminogen, but lacks an inhibitory efficacy against already activated plasmin. This limits its therapeutic usability. The current work is focused on the development of new potent and selective active site inhibitors of plasmin as potential antifibrinolytics.

Hemostasis includes the formation of fibrin clots in the injured vessel, which facilitates the accumulation of platelets and erythrocytes. During wound healing, the clot removal is mediated by plasmin, which degrades insoluble fibrin polymers into soluble fragments during the process of fibrinolysis. In hyperfibrinolytic states, an increased plasmin activity impedes hemostasis and can thereby cause severe bleeding complications. An antifibrinolytic effect can be achieved either *via* a direct plasmin inhibition or by reducing the plasmin formation from its zymogen plasminogen.

In our group, a multitude of highly active and selective macrocyclic plasmin inhibitors has been developed before, which address the S4-S1-region of the catalytic center. The high plasmin selectivity could be achieved by their sterically demanding macrocycle, which causes a steric clash with the characteristic 99-loop that is missing in Plasmin, but is present in all other trypsin like serine proteases. Among these inhibitors, compound **40** exhibits the best combination of plasmin inhibition and selectivity. Its macrocyclic core segment consists of two *p*-substituted phenylalanine-residues in P3- and P2-position, respectively, whose sidechains are connected with a symmetric piperazinyldicarboxylic acid amide linker. In this thesis, such structures and their derivatives are named macrocyclic substrate analogue inhibitors.

Within the scope of this work, several derivatives of compound **40** have been synthesized varying both the P4-position (series 1) and the length of the linker segment (series 2). For the inhibitor series 2, a new synthesis strategy has been established that allows the selective incorporation of asymmetric linkers. Furthermore, a new type of macrocycle has been synthesized, in which the P4-residue is connected to the P2-amino acid via the aforementioned linker segments (series 3). Inhibitory constants were determined for plasmin and six related trypsin-like serine proteases. Although some derivatives inhibit plasmin with subnanomolar K_i -

values, none of the new inhibitors showed an improved overall profile in comparison to the reference compound **40**. In cooperation with an Australian group, the binding mode of these inhibitors has been determined by X-ray crystallography for the first time.

In a second project, a new inhibitor type was developed based on the known crystal structure of the acyclic compound **11 (YO-2)** in μ Plasmin. This reference inhibitor addresses the S1-S2'-region of the catalytic center and possesses a relatively weak plasmin selectivity. The concept of macrocyclization was adapted to synthesize sterically demanding **YO-2**-derivatives, which should reveal a similar binding mode and would ideally show an improved selectivity profile over related trypsin-like serine proteases. For this thesis, A large number of new macrocyclic inhibitors has been synthesized, which share a common Tranexamoyl- (Txa) residue in P1-position and are therefore called macrocyclic Txa-conjugated inhibitors (series 4 and 5). The best derivatives possess subnanomolar inhibition constants for plasmin. Several of these compounds also show a significant selectivity against a panel of related trypsin-like serine proteases. However, in comparison to the reference inhibitor **40**, their selectivity profile is less pronounced. Together with the Australian group, the binding mode of the new macrocyclic Txa-conjugated inhibitors in μ Plasmin was determined, which resembles the conformation of the reference inhibitor **YO-2** in the S1-S2'-region.

Both the macrocyclic substrate analogue inhibitors and the macrocyclic Txa-conjugated inhibitors could potentially be further developed as potent and selective antifibrinolytic drugs for the reduction of bleeding.

Verbindungen

Teil A: Makrozyklische substratanaloge

Inhibitoren

Referenzverbindung

40 MI-2011

P3-P2-Makrozyklen mit symmetrischen

Linkersegmenten (Inhibitorserie 1)

Inhibitornummer

MI-

41 1610

42 1611

43 1612

44 1614

11 2301

12 2302

P3-P2-Makrozyklen mit asymmetrischen

Linkersegmenten (Inhibitorserie 2)

Inhibitornummer

MI-

13 2300

14 2306

15 2303

16 2304

P4-P2-Makrozyklen (Inhibitorserie 3)

Inhibitornummer

MI-

17 2305

18 2309

Teil B: Makrozyklische Txa-konjugierte Inhibitoren

Referenzverbindungen

11 YO-2

15 BAYER-Inh.

Verbindungen mit substituierten

Phenylalanin-Resten in P1'-Position

Inhibitorserie 4

MI-

19 2312

110 2315

111 2318

112 2316

113 2317

114 2313

115 2314

116 2325

117 2326

118 2324

119 2323

120 2330

121 2329

122 2328

123 2331

124 2338

125 2341

126 2332

127 2337

**Verbindungen mit substituierten
Biphenylalanin-Resten in P1'-Position**

Inhibitorserie 5	MI-		
128	2339	151	2364
129	2374	152	2367
130	2375	153	2363
131	2355	154	2362
132	2346	155	2361
133	2340	156	2368
134	2348		
135	2343		
136	2347		
137	2344		
138	2345		
139	2370		
140	2371		
141	2350		
142	2349		
143	2372		
144	2373		
145	2353		
146	2352		
147	2351		
148	2351		
149	2366		
150	2365		

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

*„Entwicklung, Synthese und Charakterisierung makrozyklischer
Plasmininhibitoren.“*

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Lebenslauf

Die Seiten VI und VII enthalten persönliche Daten und sind deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

