

Entwicklung und Untersuchung von aktivierten und aktivierbaren Phosphotyrosinmimetika

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

STEFAN WAGNER

aus Berlin

Berlin 2016

Die Promotionsarbeit wurde im Zeitraum von April 2010 bis September 2013 am Institut für Pharmazie der Universität Leipzig und von Oktober 2013 bis März 2015 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Rademann durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

Disputation am 03.06.2016

Erklärung

Hiermit versichere ich, Stefan Wagner, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine weiteren, als die hier aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Stefan Wagner

Das Kapitel 4.1 der vorliegenden Arbeit enthält Ergebnisse der Masterarbeit, die als solche gekennzeichnet wurden.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

A. Horatscheck, S. Wagner, J. Ortwein, B. G. Kim, M. Lisurek, S. Belyny, A. Schütz, J. Rademann, *Angewandte Chemie International Edition*, **2012**, 51(37), 9441-9447

S. Wagner, A. Schütz, J. Rademann, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, 23(12), 2839-2847

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Jörg Rademann für die Bereitstellung der interessanten Projekte, für die stete Gesprächsbereitschaft und die angeregten Diskussionen, sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Ferner danke ich Frau Prof. Beck-Sickinger und ihrer Arbeitsgruppe an der Universität Leipzig für die Möglichkeit der Nutzung ihrer Ausstattung und die angenehme Arbeitsatmosphäre an dieser Arbeitsstätte, sowie deren Bereitschaft, diverse biochemische Fragestellungen zu diskutieren.

Weiter erwähnen möchte ich meine ehemaligen Kollegen an dem Institut für Pharmazie der Universität Leipzig, insbesondere Frau Jutta Ortwein und Frau Dr. Edyta Burda, die mir in meinem Verbleib in Leipzig eine große Hilfe jedweder Art waren.

Ich danke Herrn Dr. Johannes Preidl, der mir immer ein wertvoller Ansprechpartner in Fragestellungen der Analytischen Chemie war.

Ich danke Frau Franziska Gottschalk, mit der ich die wichtigsten Phasen unserer gemeinsamen Ausbildung geteilt habe.

Großer Dank gilt Herrn Dr. André Horatscheck für die Zusammenarbeit im Projekt der Benzoylphosphonsäuren.

Ferner danke ich den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Rademann, die mir in der Zeit meiner Promotionsarbeit eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre ermöglicht haben. Insbesondere danke ich dabei Herrn Daniel Becker, mit dem ich hochwertige Ergebnisse teilen und hervorragende Diskussionen halten konnte.

Großer Dank gilt meinen Freunden, die mir immer einen außergewöhnlichen Rückhalt in allen Aspekten meines Lebens geboten haben.

Meinen größten Dank möchte ich meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder aussprechen, ohne die ich nicht die Person wäre, die ich heute bin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Proteinphosphorylierung	3
2.2	Phosphotyrosinerkennung	4
2.2.1	STAT Proteine	6
2.2.2	Proteintyrosinphosphatasen	8
2.3	Proteintyrosinphosphatase PTP1B	12
2.3.1	Inhibition von PTP1B	16
2.3.2	Irreversible Inhibition von PTP1B	23
2.4	Aktivitätsbasierte Proteinmodifikation	25
2.4.1	Photoaffinitätsmarkierung	29
3	Zielstellung	35
4	Ergebnisse und Diskussion	37
4.1	Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbare pTyr-Mimetika	37
4.1.1	Eigenschaften von Benzoylphosphonsäuren	38
4.1.1.1	Photochemische Eigenschaften von Benzoylphosphonsäuren	40
4.1.1.2	Säurestärke der Benzoylphosphonsäuren	46
4.1.2	Synthese von Benzoylphosphonsäuren	47
4.1.2.1	Synthese der fluoreszenzmarkierten Benzoylphosphonsäure	48
4.1.2.2	Synthese der nicht-natürlichen Aminosäure pcPhe	50
4.1.2.3	Synthese pcPhe-haltiger Peptide	54

4.1.3	Untersuchung der Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbares pTyr-Mimetikum	59
4.1.3.1	Benzoylphosphonsäuren und PTP1B	60
4.1.3.2	Benzoylphosphonsäuren und STAT5B	71
4.1.4	Phosphonocarbonylphenylalanin in der Proteinbiosynthese	79
4.1.4.1	Synthese von Phosphonocarbonylphenylalanin	79
4.1.4.2	Stabilitätsuntersuchung von Phosphonocarbonylphenylalanin	82
4.1.4.3	Phosphonocarbonylphenylalanin als nicht-natürliche Aminosäure in der Proteinbiosynthese	83
4.1.5	Zusammenfassung der Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbare Phosphotyrosinmimetika	84
4.2	Monofluorphosphonsäuren als neue pTyr-Mimetika	86
4.2.1	Monofluorphosphonsäuren und PTP1B	87
4.2.1.1	Wie verhalten sich Monofluorphosphonsäuren gegenüber PTP1B?	89
4.2.2	Synthese und Stabilität von Monofluorphosphonsäuren	91
4.2.2.1	Reaktivität von Monofluorphosphonsäuren	93
4.2.2.2	Synthese von Monofluorphosphonsäurederivaten	97
4.2.3	Untersuchung des Verhaltens gegenüber PTP1B	101
4.2.3.1	Monofluorphosphonsäuren als irreversible Inhibitoren	101
4.2.3.2	Monofluorphosphonsäuren als PTP1B-Substrate	119
4.2.3.3	Monofluorphosphonsäuren als stabile PTP1B-Inhibitoren	121
4.2.4	Zusammenfassung der Monofluorphosphonsäuren als neue pTyr-Mimetika	129
4.3	Phosphonsäuren als kovalent bindende pTyr-Mimetika	130
4.3.1	Einfluss von Redoxsystemen auf eine Proteinvernetzung	132
4.3.2	Massenspektrometrische Untersuchung	136
4.3.3	Selektivität der Proteinvernetzungsreaktion	140
4.3.4	Diskussion möglicher Mechanismen der Markierungsreaktion	146
4.3.5	Zusammenfassung der Phosphonsäuren als kovalent bindende Phosphotyrosinmimetika	154

5	Experimenteller Teil	155
5.1	Materialien und Methoden	155
5.2	Verwendete Geräte und Methoden	155
5.3	Synthesevorschriften	160
5.3.1	Allgemeines Protokoll zur Festphasenpeptidsynthese	244
5.4	Biochemische Methoden	250
5.4.1	Materialien und Methoden	250
5.4.2	Messung der Aktivität von PTP1B	251
5.4.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE	254
5.4.4	Westernblot	255

Abkürzungsverzeichnis

ABPP	<i>activity-based protein profiling</i>
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AMCA	7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Äq.	Äquivalent
arom.	aromatisch
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	<i>boiling point</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
br	breites Signal
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition
d	Dublett
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEE	Diethylether
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppf	1,1'-Bis-(diphenylphosphin)-ferrocen
dppp	3-Bis-(diphenylphosphin)-propan
DSP	Dual-spezifische Phosphatase
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethylacetat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisierung
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Heptett
Hexan	<i>n</i> -Hexan
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	hochaufgelöst
JAK	Januskinase
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
m	Multiplett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure

MKP	<i>MAP kinase phosphatase</i>
MOMCI	Methoxymethylchlorid
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NFBS	<i>N</i> -Fluorbis(phenylsulfonyl)amin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
ObR	<i>obesity receptor</i> , Leptinrezeptor
p	Pentett
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PTP1B	Proteintyrosinphosphatase 1B
pTyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	Quartett
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Singulett
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH2	Src Homologie 2 (Domäne)
SHP2	Proteintyrosinphosphatase SHP2
SILAC	<i>stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>

SUMO	<i>small ubiquitin related modifier</i>
t	Triplett
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Tetrafluorborat
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TCPTP	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TEMPO	Tetramethylpiperidiny- <i>N</i> -oxid
Tf	Triflylgruppe
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSBr	Trimethylsilylbromid
TOF	<i>time of flight</i>
UV	Ultraviolett

Zusammenfassung

Störungen in dem Prozess der reversiblen Phosphorylierung von Biopolymeren stehen im Zusammenhang mit Erkrankungen, die in der modernen Gesellschaft eine große Bedrohung darstellen. So wird die Entwicklung und der Verlauf von Krebserkrankungen, Diabetes und Adipositas nachweislich über eine Fehlregulation der Phosphorylierung mitbestimmt. Demnach stellt die selektive Adressierung jener Proteine, die an der Fehlregulation beteiligt sind und / oder diese einleiten, einen wichtigen Bereich der aktuellen Forschung dar.

Der Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung und Untersuchung von Verbindungen, die gegenüber dem natürlichen Erkennungsmotiv Phosphotyrosin ein chemisch reaktives Isooster darstellen. Der erste Teil der Arbeit behandelt die Substanzklasse der Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbare Phosphotyrosinmimetika. Diese wurden auf ihre photochemischen Eigenschaften hin untersucht und verschiedene Derivate dargestellt. Mit der Synthese und Verwendung einer fluoreszenzmarkierten Benzoylphosphonsäure konnte die bestrahlungsinduzierte kovalente Vernetzung mit der Proteintyrosinphosphatase PTP1B erreicht werden. Durch den Einbau der photoreaktiven Gruppe in Peptide wurden Peptidomimetika erhalten, die eine drastisch erhöhte Affinität aufwiesen. Vernetzungsexperimente gegenüber PTP1B zeigten, dass die Bestrahlung der photoreaktiven Peptide eine oxidative Desaktivierung der Phosphatase bewirkt. Ferner wurden hochaffine Liganden für den Transkriptionsfaktor STAT5B dargestellt, die in früheren Arbeiten als selektive kovalent vernetzende Substanzen identifiziert werden konnten. Folgend wurde Anwendbarkeit des Systems der Benzoylphosphonsäuren innerhalb von Zelllysaten untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Substanzklasse der monofluorierten Phosphonsäuren als neue pTyr-Mimetika untersucht und erstmals gegenüber der Proteintyrosinphosphatase PTP1B getestet. Mit den fluorierten Phosphonsäuren liegt eine Substanzklasse vor, die nur wenig beschrieben ist, sodass diese zunächst auf seine chemischen Eigenschaften hin untersucht wurde. In Analogie zu den bekannten chemisch reaktiven fluorierten Phosphonaten wurde dem neuen Mimetikum ein hohes Potential in aktivitätsbasierten

Proteinvernetzungsreaktionen zugeschrieben. Folgende Untersuchungen zeigten, dass die Monofluorphosphonsäuren gegenüber PTP1B als stabile Inhibitoren agieren. Im Zuge der näheren Betrachtung des Verhaltens der fluorierten Phosphonsäuren wies eine andere Substanzklasse kovalent bindende Eigenschaften auf.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Klasse der Phosphonsäuren untersucht, die unter bestimmten Bedingungen eine kovalente Markierung von PTP1B bewirkten. Diese ist abhängig von dem Vorliegen der oxidierten Proteinspezies. Innerhalb von Selektivitätsuntersuchungen konnte eine kovalente Reaktion gegenüber anderen pTyr-erkennenden Proteinen beobachtet werden. Im Zuge dessen wurde die Hypothese einer Reaktion der Phosphonsäuren gegenüber der oxidierten Form von Cystein, der Sulfensäure, aufgestellt.

Abstract

The reversible phosphorylation constitutes one of the most important molecular switches of cellular activity. With its predominantly participation in signal transduction, dysregulation of this process leads to numerous diseases like diabetes, cancer and obesity.

The subject of this work was the development of chemically reactive isosters of the natural recognition site, phosphotyrosine. The first part of this thesis covers the class of benzoylphosphonic acids, which we recently identified as the first photoreactive phosphotyrosine mimetic. The photochemical properties of this compound class were further investigated and numerous photoreactive inhibitors were synthesized. The covalent photo-induced modification of the protein tyrosine phosphatase PTP1B was accomplished through the irradiation of a fluorescently labelled benzoylphosphonic acid. The incorporation of the photoreactive moiety into substrate analogues furnished peptidomimetics with a drastic increase of affinity. Irradiation of these compounds in the presence of PTP1B led to an oxidative deactivation of the phosphatase. Synthesized ligands of the transcription factor STAT5B were previously identified as highly selective and covalent reactive probes. In this work, the applicability of the photoreactive peptides in cell lysate was investigated.

The second part covers the synthesis and evaluation of a new class of phosphotyrosine mimetics, the monofluorinated phosphonic acids. The analysis of the chemical stability was followed by the investigation of its biochemical behavior against PTP1B, which is, to our knowledge, the first application of these substances relating protein tyrosine phosphatases. Since monofluorinated phosphonic esters are highly reactive and biochemically active compounds, a comparable reactivity was postulated. Subsequent experiments identified the monofluorinated phosphonic acids as hydrolytically and biochemically stable compounds. In the course of these investigations, an other class of compounds led to a covalent modification of the protein.

In the third part of this work, the covalent reactivity of phosphonic acids was investigated. Labelled phosphonic acids covalently modified PTP1B, depending on oxidative conditions.

During selectivity experiments a covalent reaction with other proteins was observed. Hence, the reaction with the oxidized form of cysteine, the sulfenic acid, was hypothesized.

1 Einleitung

Nahezu alle lebenswichtigen Vorgänge innerhalb einer Zelle werden über die posttranslationale Modifikation von Proteinen reguliert. Unter diesen Prozessen stellt die reversible Phosphorylierung einen der wichtigsten biologisch wirksamen Regulationsmechanismen dar.

Im Jahre 1955 erkannten E. Fischer und E. Krebs, dass die inaktive Form der Glycogenphosphorylase *b* in seine aktive Form *a* umgewandelt werden kann, aber nur unter bestimmten Voraussetzungen: der Anwesenheit einer bestimmten Proteinfraction und Adenosintriphosphat.^[1,2] Dies war die erste Beschreibung der reversiblen Phosphorylierung (Nobelpreis, 1992). Die Beobachtung der Umwandlung der inaktiven in die aktive Form entspricht der Phosphorylierung. So wie die Modifikation im historischen Beispiel die Aktivierung des Proteins bedingte, folgt mit der Dephosphorylierung die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes. Damit stellt dieser Vorgang einen Schalter zwischen zwei grundverschiedenen Proteinformen mit unterschiedlichen Funktionen dar.

Ein Prozess, der über schaltbare Mechanismen gesteuert wird, ist die Signalübertragung. Eben an dieser ist die Phospho- und Dephosphorylierung maßgeblich beteiligt. Die Weiterleitung von Signalen ist ein Vorgang über den Prozesse wie Zellproliferation, Genexpression, Immunantwort und Apoptose gesteuert werden.^[3] So werden Störungen in dem System der reversiblen Phosphorylierung mit schwerwiegenden Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, Morbus Parkinson, der Alzheimer-Krankheit und Adipositas in Verbindung gebracht.^{[4][5][6][7][8]}

Viele Zusammenhänge sind jedoch nicht vollends verstanden, so ist die nähere Untersuchung von Phosphorylierungs-abhängigen Signalwegen ein wichtiger Bestandteil der aktuellen Forschung. Wichtige Werkzeuge in diesem Zusammenhang sind Substanzen, die kovalent mit Proteinen reagieren. So können diese das Zielprotein "ausschalten" und ferner zur Charakterisierung von kovalent vernetzten Bindungspartnern genutzt werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Proteinphosphorylierung

Die Proteinphosphorylierung wurde nach ihrer erstmaligen Beschreibung durch Fischer und Krebs lange Zeit als individuelle Eigenart des Glycogenmetabolismus verstanden. Mit der Isolierung der cAMP abhängigen Proteinkinase A durch Walsh et al. erkannte man, dass dieses Phänomen weitreichender ist.^[3,9] Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung findet an 30 % aller in einem Organismus vorkommenden Proteinen statt, wobei die Bildung und Spaltung des Phosphorsäureesters an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin erfolgt.^[10] Innerhalb dieser Aminosäuren findet sich ein großes Ungleichgewicht in der Häufigkeit ihrer Phosphorylierung. So beträgt der Anteil von Serin an der Gesamtphosphorylierung ~ 86 %.^[11] Das zweithäufigste Motiv ist Threonin mit einem Anteil von 12 %.^[11] Die Beteiligung von Tyrosin an einer Phosphorylierungsreaktion wurde hingegen erst spät erkannt. Der Gruppe um T. Hunter gelang 1979 die Identifikation einer Tyrosin-spezifischen Kinaseaktivität aus einem Immunpräzipitat des Polyoma T Antigens.^[12] Obwohl der Anteil von Tyrosin mit 2 % vergleichsweise gering ist,^[11] wird dieser Aminosäuremodifikation eine große Bedeutung im Zusammenhang mit Krebs, Diabetes und Fettleibigkeit beigemessen.^[5,13]

Jene Enzyme, die für die Reaktion der Phosphorylierung verantwortlich sind, sind die sog. Proteinkinasen (PK). Proteinkinasen übertragen eine Phosphatgruppe auf die Oberfläche von Proteinen unter dem Verbrauch eines Äquivalentes ATP. Die Gegenspieler der Proteinkinasen sind die sog. Proteinphosphatasen (PP), welche die Modifikation unter Hydrolyse rückgängig machen (Abb. 2.1).

Die Modifikation mit einem Phosphatrest hat signifikante Konsequenzen auf die strukturellen Eigenschaften des Proteinsubstrates. Durch den pK_{S2} -Wert von ~ 6.7 liegt der Phosphatrest unter physiologischen Bedingungen in einer dianionischen Form vor. Diese Eigenschaft besitzt keine Aminosäure, sodass sich veränderte elektrostatische Wechselwir-

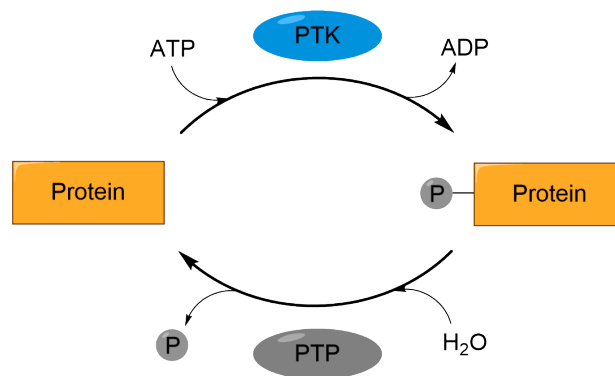


Abb. 2.1 Phosphorylierung und Dephosphorylierung am Beispiel der Modifikation von Tyrosin.
PTK: Proteintyrosinkinase, PTP: Proteintyrosinphosphatase

kungen ausbilden können.^[3] Durch die doppelt negative Ladung und den vier Sauerstoffatomen, die Netzwerke von H-Brückenbindungen ausbilden können, kann der Phosphatrest mit dem Peptidrückgrad sowie mit den polaren Aminosäureresten von Arginin, Lysin, Histidin, Tyrosin, Serin und Threonin interagieren. Die Guanidgruppe des Arginins stellt dabei einen bevorzugten Interaktionspartner dar, da mit diesem eine bidentate Bindung ausgebildet werden kann.^[14] So führen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen zu starken konformationellen Veränderungen und somit zu einer veränderten Funktion des Zielproteins. So führt die Phosphorylierung z.B. zu der Aktivierung der Glycogenphosphorylase, zu der Desaktivierung der Isocitrat-Dehydrogenase, als auch zur Assoziation von z.B. STAT-Proteinen.^[14]

2.2 Phosphotyrosinerkennung

Signalwege, die an eine Phosphorylierung des Aminosäurerestes von Tyrosin gebunden sind, werden im Wesentlichen von drei Enzymklassen bestimmt. Der pTyr-Signalweg wird durch die erste Klasse, den phosphorylierenden Proteinkinasen PTKs, eingeleitet und durch die Proteintyrosinphosphatasen PTPs, der zweiten Klasse, unterbrochen. Die dritte Gruppe "liest" die von den PTKs "geschriebene" Information, ohne diese zu verändern. Solche Proteine müssen über eine effektive Erkennung der Tyrosinphosphorylierung verfügen, um den Signalweg verlässlich auf weitere Moleküle übertragen zu können. Neben der SH2- und der Phosphotyrosin-bindenden-Domäne (PTB) existiert eine Anzahl von weiteren sog. atypischen pTyr-erkennenden Domänen, jedoch nimmt die SH2-Domäne mit ihrer

Häufigkeit und Selektivität die wichtigste Rolle ein.^[15]

Die SH2 Domäne

Die Src Homologie 2 (SH2) Domäne ist ein aus ~ 100 Aminosäuren bestehendes Proteinmotiv, das erstmals 1986 beschrieben wurde. Sadowski et al. identifizierten eine nicht katalytisch aktive *N*-terminale pTyr-Bindungsdomäne in Tyrosin-Kinasen des *Fujinami sarcoma virus*.^[16] Das humane Genom codiert 111 Proteine mit 121 SH2-Domänen in Funktionen als Kinasen, Phosphatasen, Ligasen und Transkriptionsfaktoren.^[15] Die erste Kristallstruktur dieses Strukturmotivs wurde 1992 erhalten. Walksman et al. kristallisierten die SH2-Domäne zusammen mit zwei Phosphotyrosin-haltigen Peptiden (Abb. 2.2).^[17]

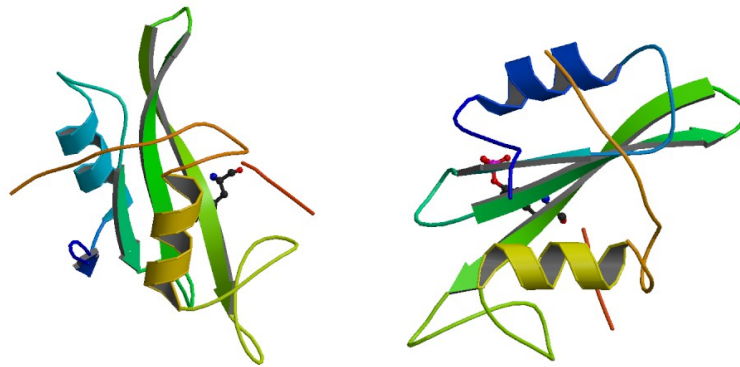


Abb. 2.2 Kristallstrukturen der SH2-Domäne;
Die Peptidkette ist in *N*→*C*-Richtung als spektraler Farbgradient dargestellt.
Originale Elektronendichten aus Waksman et al. (PDB Darstellung).

Strukturell bildet die SH2-Domäne zwei α -Helices, die ein 7-strängiges β -Faltblatt umschließen. In der *protein data bank* (PDB) finden sich über 70 Einträge individueller Strukturen. Im Gegensatz zum *C*-Terminus, der höhere strukturelle Unterschiede aufweist, besitzen die pTyr-bindenden *N*-terminalen Bereiche eine hohe strukturelle Ähnlichkeit.^[15] Die Erkennung der Tyrosinphosphorylierung erfolgt über Aminosäurereste innerhalb der Strukturen β -A, α -A, β -B, β -C und β -D.^[15] Innerhalb dieser wird eine positiv geladene Bindungstasche ausgebildet, deren maßgeblich bindungsbestimmende Wechselwirkung über eine Guanidingruppe erfolgt (Arg175 in der *v-src* SH2 Domäne). Während die *N*-terminale pTyr-Bindung mit etwa der Hälfte der freien Bindungsenergie einen großen Anteil an der grundlegenden Affinität stellt, wird die Spezifität in der Ligandenbindung

durch den C-terminalen Rest bestimmt.^[15,18] So besitzen Src-Kinase SH2 Domänen eine Präferenz gegenüber der Sequenz pTyr-Glu-Glu-Ile, während die Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) SH2 Domänen das Motiv pTyr-Val-Asn-Val bevorzugen.^[19]

2.2.1 STAT Proteine

Die SH2-Domäne findet sich in einer Vielzahl biologisch relevanter Proteine wieder. Eine wichtige Gruppe sind die STAT-Proteine (*signal transducer and activator of transcription*). STAT-Proteine kommen in allen Säugetierzellen vor und bestimmen als Wachstumsfaktoren Prozesse wie Zellwachstum und -proliferation. Bis heute sind 7 verschiedene Mitglieder dieser Familie bekannt, STAT1 bis STAT4, STAT5A und STAT5B sowie STAT6, wobei sich die molekulare Masse dieser Proteine über einen Bereich von 80 bis 110 kDa erstreckt.^[20] Alle Proteine sind an individuellen Signalwegen beteiligt, wobei der JAK/STAT-Signalweg den wohl bekanntesten darstellt (Abb. 2.3).

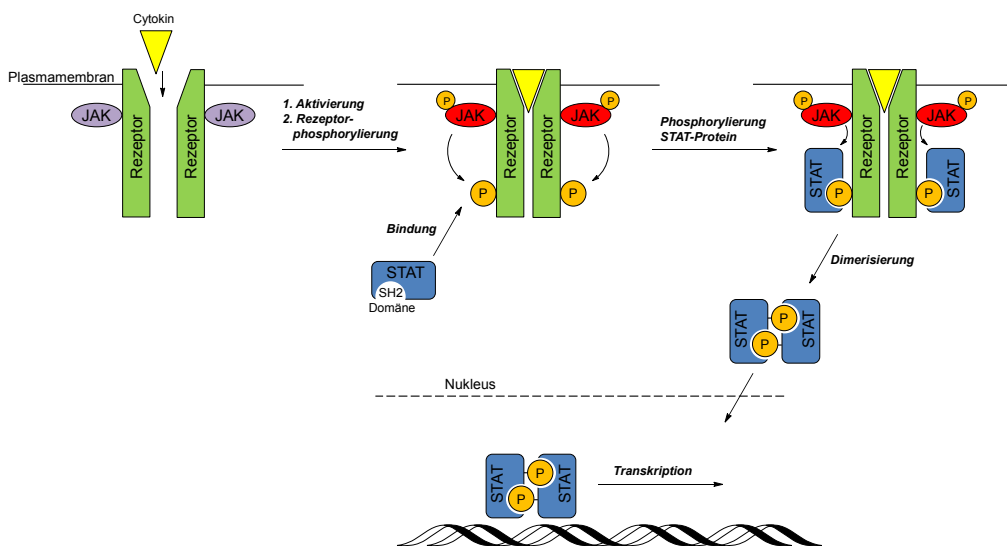


Abb. 2.3 Schema des JAK/STAT-Signalweges.

Der JAK/STAT-Weg ist ein intrazellulärer Prozess, der über ein Zusammenspiel von Dimerisierungsreaktionen über eine reversible Phosphorylierung eingeleitet wird. So aktiviert dieser Vorgang vor allem den Transkriptionsprozess im Zellkern. Durch die Bindung von Cytokinen an den transmembranen Rezeptor wird dessen Dimerisierung eingeleitet, was die Aktivierung der Januskinase (JAK) über eine gegenseitige Phosphorylierung

bewirkt.^[21] Im phosphorylierten Zustand besitzen Januskinasen eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität und phosphorylieren die cytosolische Seite des Membranrezeptors. Mit ihrer (C-terminalen) pTyr-erkennenden SH2-Domäne binden die STAT-Proteine an den Rezeptor und werden ihrerseits über die Januskinase C-terminal phosphoryliert. Nach der Dissoziation vom Rezeptor können sich die pTyr-haltigen STAT-Proteine reziprok assoziieren, sodass Homo- und Heterodimere gebildet werden.^[22] Die aktivierten Dimere werden im Zellkern akkumuliert, woraufhin sie an die DNA binden und die Transkription einleiten.

Eine Negativregulation des JAK/STAT-Signalweges kann seinerseits durch die STAT-Protein initiierte Expression von SOCS-Proteinen (*suppressor of cytokine signalling*) oder durch die Dephosphorylierung durch Proteintyrosinphosphatasen, wie TCPTP, SHP1 und SHP2 erfolgen.^[23]

Ein bekannter JAK/STAT-Weg wird über die Januskinase 2 und STAT3 ausgeführt. Ein veränderter JAK2/STAT3-Signalweg wird mit Krebserkrankungen im Brustgewebe und den Eierstöcken in Verbindung gebracht.^[24] Ferner wird dieser Signalweg durch den Leptinrezeptor über die Bindung des Hormons Leptin initiiert. Leptin, auch als "Sättigungshormon" bezeichnet, wird verstärkt in Adipozyten exprimiert und liegt bei fettleibigen Menschen in einem erhöhten Spiegel vor. Leptin interagiert mit dem Rezeptor ObR und leitet den Signalweg über die Januskinase 2 und STAT3 ein. Das aktivierte STAT3-Dimer führt dann zu der Expression von hungervermindernden Endocannabinoiden.^[25] Die Störung eben dieses Prozesses wird für die Entwicklung von Adipositas verantwortlich gemacht. Ein Negativregulator des JAK2/STAT3-Signalweges ist PTP1B (Abb. 2.4).

Eine aktive Proteintyrosinphosphatase PTP1B kann die Januskinase 2 sowie den Rezeptor ObR (und das pTyr-STAT3) dephosphorylieren und somit den Signalweg aufheben.

So finden sich im System der JAK/STAT-Signalweiterleitung alle Proteine, die im Zusammenhang mit der reversiblen Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin stehen: die phosphorylierenden Proteinkinasen, pTyr-erkennende Proteine wie Mitglieder der STAT-Familie, sowie die dephosphorylierenden Proteintyrosinphosphatasen.

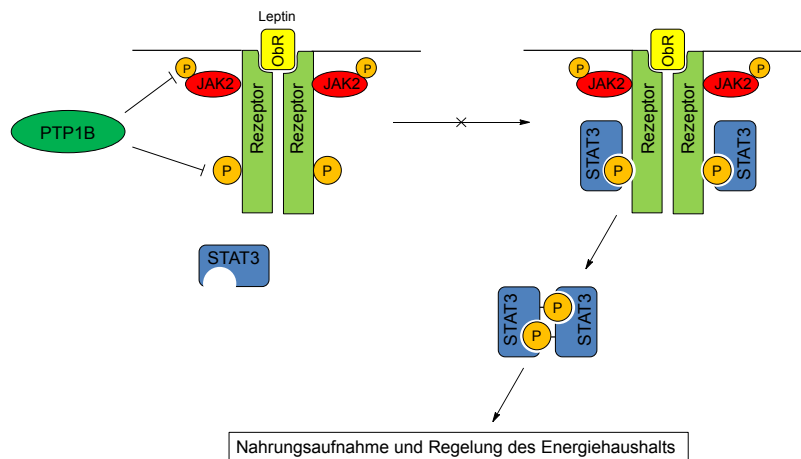


Abb. 2.4 Negativregulation des JAK2/STAT3-Signalweges.

2.2.2 Proteintyrosinphosphatasen

Der Familie der Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) wurde neben seiner, im Verhältnis zu den Serin/Threoninphosphatasen, geringeren Beteiligung an der Gesamtphosphorylierung zunächst wenig Beachtung zuteil, da der bestimmende Anteil der Regulation der Tyrosinphosphorylierung den Proteintyrosinkinasen zugesprochen wurde.^[26,27] Die ursprüngliche Auffassung der PTPs in ihrer sog. *housekeeping*-Rolle hat sich in den vergangenen beiden Jahrzehnten gewandelt, da diese Enzymklasse nachweisbar an einer Vielzahl von fundamentalen Signalübertragungswegen beteiligt ist. Im Jahre 2004 beschrieben Alonso et al. Gene des menschlichen Genoms, die für die Kodierung von Proteintyrosinphosphatasen verantwortlich sind. Die 107 beschriebenen Gene werden dabei Enzymen zugeordnet, deren Klassifizierung in 4 Familien erfolgt:^[28]

- **Klasse I Cys-basierte PTPs (99 Gene)**
 - *klassisch* (38)
 - * transmembrane Rezeptor-Proteintyrosinphosphatasen (21)
 - * Nicht-Rezeptor-Proteintyrosinphosphatasen (17)
 - *dual-spezifische Phosphatasen* (61)
 - * MKPs (11)
 - * atypische DSPs (19)
 - * Myotubularine (16)

* andere (15)

- **Klasse II Cys-basierte PTPs** (1 Gen)
- **Klasse III Cys-basierte PTPs** (3 Gene)
- **Asp-basierte PTPs** (4 Gene)

Innerhalb dieser Unterteilung stellt die Klasse I die größte Familie dar. Die weitere Differenzierung erfolgt in dual-spezifische und klassische Phosphatasen, welche eine selektive Gruppe bilden, da diese exklusiv die Aminosäure Tyrosin dephosphorylieren. Die Gene der sog. klassischen PTPs (37) wurden bereits 2001 von Anderson et al. beschrieben und 2004 um PTP-OST auf 38 erweitert¹.^[31,32] Eine weitere Unterteilung der klassischen PTPs erfolgt dabei in Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Proteinphosphatasen. Zu den klassischen Nicht-Rezeptor-Phosphatasen zählen dabei populäre Proteintyrosinphosphatasen wie PTP1B, TCPTP, SHP1 und SHP2 (Abb. 2.5).^[27]

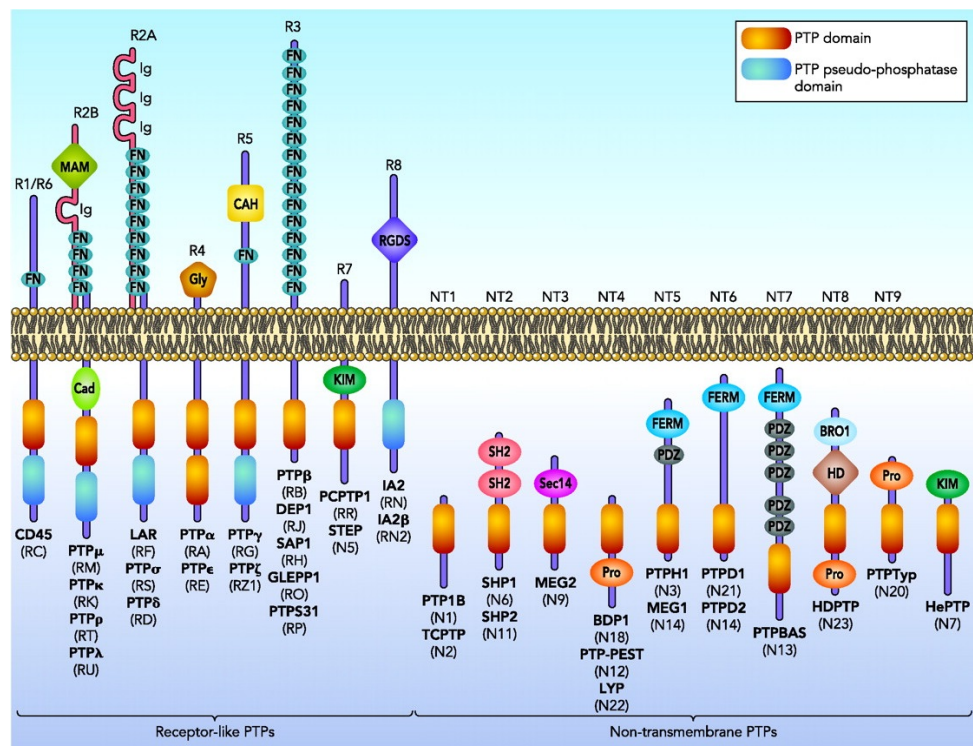


Abb. 2.5 Die Familie der klassischen Proteintyrosinphosphatasen (ohne PTP-OST).

Obwohl die PTPs und Protein-Serin/Threoninphosphatasen (PSP) die gleiche Reaktion, die

¹Die Beschreibung und Anerkennung der Anzahl variiert zwischen 37 und 38.^[29,30]

Dephosphorylierung von Proteinen bewirken, verfügen diese über grundverschiedene Katalysemechanismen. Während PSPs sich eines Metall-katalysierten Reaktionsmechanismus (via der Koordination von Mn^{2+} und Fe^{2+} -Ionen) bedienen, verfügen die Proteintyrosinphosphatasen über einen metallfreien zweistufigen Katalysemechanismus, dessen zentrales Objekt ein aktives Cystein darstellt.^[33]

Katalysereaktion der Proteintyrosinphosphatasen

Die Phosphotyrosin-erkennende PTP-Domäne aller klassischen PTPs besteht aus ~ 280 Aminosäuren mit einer hohen strukturellen Ähnlichkeit, jedoch geringer Sequenzhomologie. Bestimmend für die Bindung und die folgende Hydrolysereaktion des Substrates sind dabei Sequenzmotive, die eine definierte Interaktion ermöglichen. Alle Cystein-basierten Phosphatasen besitzen die Konsensussequenz (H/V)CX₅R(S/T),² den sog. *P-Loop*, sowie den sog. *WPD-Loop* (Trp-Pro-Asp), welcher als Schließmechanismus der Tasche agiert.^[31,34] Die vorliegende Tasche des aktiven Zentrums entspricht in seiner Tiefe der Struktur des Phosphotyrosins, sodass kürzere Substrate wie Phosphoserin und Phosphothreonin nicht in räumliche Nähe des katalytisch aktiven Cysteins gelangen können.³ Das sich in der Konsensussequenz befindliche Cystein weist aufgrund seiner chemischen Umgebung stark veränderte Säureeigenschaften auf. Die Säurekonstante des Cystein-Thiols ist mit einem $pK_S < 6$ zwei Größenordnungen niedriger als die Säurekonstante anderer Thiole mit pK_S -Werten um 8,^[36] was jedoch auch dessen Oxidationsempfindlichkeit erhöht. Mit dieser Eigenschaft liegt das Cysteinthiol unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor und kann gegenüber elektrophilen Zentren als Nukleophil agieren. So folgt die Reaktion der Substrathydrolyse in seinem ersten Schritt dem Angriff des Thiolates an das Phosphoratom des Phosphotyrosins (Abb. 2.6).

Der nukleophile Angriff der deprotonierten Aminosäure führt zu der Bildung eines Cysteinyl-Phosphat-Intermediates und dem dephosphorylierten Substrat. Innerhalb dieser Reaktion stellt der Asparaginsäurerest des *WPD-Loops* gegenüber dem Tyrosin einen Protonendonator dar und wirkt unterstützend in der Bildung des Cysteinylphosphates. Der zweite Schritt wird durch einen Glutaminrest, auch als *Q-Loop* bezeichnet, eingeleitet.^[37] Über die Koordination eines Wassermoleküls und des als Base agierenden Aspartats folgt die Hydrolyse des gebildeten Intermediates, sodass nach erfolgter Reaktion das unmodifi-

²Aminosäuren im Einbuchstabencode, X bezeichnet eine beliebige Aminosäure.

³ $\sim 9 \text{ \AA}$ für Tyrosin-spezifische PTPs, $\sim 6 \text{ \AA}$ für dualspezifische Phosphatasen.^[35]

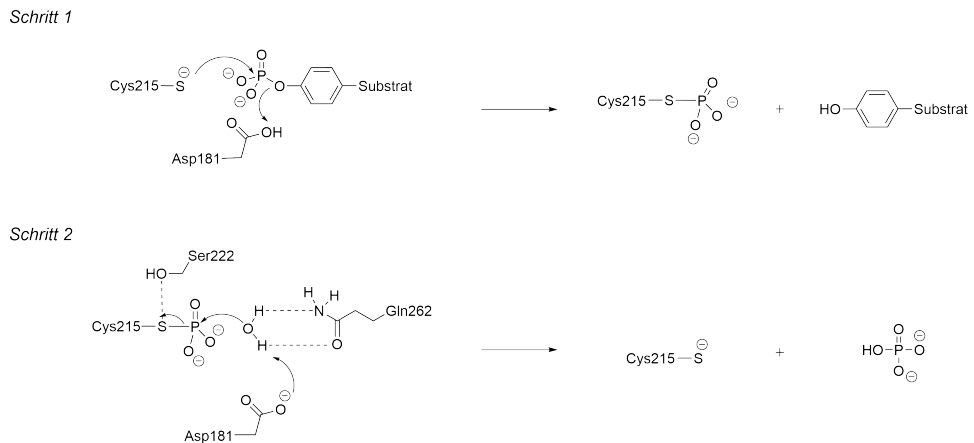


Abb. 2.6 Hydrolyse des Phosphotyrosins durch eine Proteintyrosinphosphatase;
Die Nummerierung der Aminosäuren folgt der humanen Phosphatase PTP1B.

zierte Cystein vorliegt.

Mutationen innerhalb der katalytisch aktiven Domäne verdeutlichen den Einfluss der jeweiligen Aminosäuren auf die Funktion und Aktivität der Proteintyrosinphosphatase. Die Mutation von Aminosäuren, die nicht direkt an der Katalysereaktion beteiligt sind, weisen Desaktivierungsfaktoren der Größen k_{cat} und der Bildungsgeschwindigkeit des Cysteinyl-Intermediates von 10 bis 800 auf. Der Austausch jener Aminosäuren, die einen maßgeblichen Beitrag an der Bindung und anschließender Hydrolysereaktion besitzen, führt hingegen zu drastischeren Effekten. So konnte nach der Mutation der Reste Asp181 und Arg221 (Bestandteil des Konsensusmotivs) eine Verringerung der Enzymaktivität und Cysteinyl-Intermediatbildung in der Größenordnung von 10^3 bis 10^4 beobachtet werden. Die Reste Ser222 und Gln262 zeigten im Zuge ihrer Mutation ihren verstärkten Einfluss auf die Hydrolyse des Cysteinylphosphat-Intermediates, da deren Austausch eine verringerte Hydrolysegeschwindigkeit des Intermediates bis zu einem Faktor 10^2 bedingte. Die Substitution des aktiven Cysteins215 durch Serin führte zu einem Erhalt der Substratbindungseigenschaften, jedoch zu einer vollständig ausbleibenden Dephosphorylierungsreaktion.^[35]

2.3 Proteintyrosinphosphatase PTP1B

Die Proteintyrosinphosphatase PTP1B (codiert von dem Gen *PTPNI*) ist das Enzym, welches innerhalb seiner Familie der PTPs als erstes rein erhalten werden konnte. Mit seiner prototypischen Rolle ist PTP1B bis heute das meistgenutzte Modell für Proteintyrosinphosphatasen. Tonks et al. isolierten das Protein 1988 aus der menschlichen Plazenta und erhielten damit die erste isolierte humane Proteintyrosinphosphatase, die nach der aktiven Fraktion 1B der chromatographischen Aufreinigung benannt wurde.^[38,39] PTP1B wurde zunächst als seine katalytische Domäne von ~ 37 kDa erhalten.

Struktur von PTP1B

Die Aufklärung der Kristallstruktur von PTP1B erfolgte im Jahre 1994 durch Barford et al., welche die katalytische Domäne als Komplex mit dem Phosphatanalog Wolframat erhielten (Abb. 2.7).^[40]



Abb. 2.7 Kristallstruktur der katalytischen Domäne von PTP1B;
Die Peptidkette ist in $N \rightarrow C$ -Richtung als spektraler Farbgradient dargestellt.
Originale Elektronendichte aus Barford et al. (PDB Darstellung).

Die Struktur wurde in einer Auflösung von 2.85 \AA mit einer asymmetrischen Einheitszelle erhalten, wobei PTP1B in seiner Tertiärstruktur eine einzelne Domäne bildet, deren Polypeptidkette in 8 α -Helices und 12 β -Stränge organisiert ist. Mit der Ausbildung eines 10-strängigen β -Faltblattes ergibt sich eine stark verdrehte Konformation, die die räumliche Ausrichtung des Proteins bewirkt. Die pTyr-erkennende Konsensussequenz befindet sich

(ROS). Über eine *in vivo* Oxidation des aktiven Cysteins wird dieses zunächst in eine instabile Sulfensäure überführt, welche zu einem Sulfenamid cyclisiert. Die Bildung des Sulfenamides ist kristallographisch nachweisbar und stellt mit seiner konformationellen Änderung der Proteinstruktur einen Schutzmechanismus gegenüber weiteren irreversiblen Oxidationen dar.^[43,44] Die Oxidation zum Sulfenamid ist ein reversibler Prozess, sodass PTP1B durch eine intrazelluläre Reduktion durch z.B. Thioredoxin und Glutaredoxin reaktiviert werden kann.^[45]

Als Phosphatase ist PTP1B naturgemäß beteiligt an der reversiblen Phosphorylierung von Proteinen, kann jedoch auch selbst phosphoryliert werden. Innerhalb der Peptidsequenz sind 11 Positionen bekannt an denen die Aminosäuren Serin und Tyrosin phosphoryliert wird. Im Gegensatz zu der Oxidation des aktiven Cysteins besitzen diese Modifikationen einen geringeren Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Die individuellen Phosphorylierungen wirken unterschiedlich auf die Aktivität von PTP1B. So wird die Modifikation von Y152 und Y153 als entweder aktivitätssteigernd oder verringernd beschrieben.^[42,46] Daher wird der Phosphorylierung weniger ein Einfluss auf die Aktivität sondern eher eine Rolle in der Proteininteraktion zugeschrieben.

Die Sumoylierung ist ein posttranslationaler Prozess, der zelluläre Vorgänge wie Apoptose als auch Stabilität, Interaktionen und Aktivität beeinflusst. Das SUMO-Protein (*small ubiquitin-related modifier*) besteht aus etwa 100 Aminosäuren und wird enzymatisch auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysins übertragen. 2007 beschrieben Dadke et al. die Sumoylierung an den Aminosäureresten Lys335 und Lys347.^[47] Die Modifikation dieser C-terminalen Aminosäuren verringerte die Aktivität von PTP1B gegenüber Substraten wie dem Insulinrezeptor (IR).

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die proteolytische Spaltung durch Calpain. 1993 beschrieben Frangioni et al. im System der Thrombozyten die C-terminale Abspaltung der ER-orientierten Domäne durch die Cysteinprotease Calpain.^[48] Im Zuge dessen konnte eine erhöhte PTP1B Aktivität und eine verringerte Tyrosinphosphorylierung innerhalb der untersuchten Thrombozyten festgestellt werden. So bewirkt die Proteolyse durch Calpain zum einen die Aktivierung, jedoch auch die Spaltung zu inaktiven Fragmenten der reversibel oxidierten Phosphatase.^[49]

PTP1B in humanen Erkrankungen

"Imagine a pill that could keep you thin, free from diabetes, and protected from breastcancer."^[42]

Diese Eigenschaften könnten einem Therapeutikum zugesprochen werden, welches die Fehlregulation von PTP1B adressiert. Diabetes Typ II und Adipositas sind jene Erkrankungen, die am häufigsten im Zusammenhang mit PTP1B genannt werden, da diese Phosphatase nachweislich den Signalweg der Insulin- und Leptinrezeptoren negativ beeinflusst.^[50–52] Tonks et al. zeigten 1990 den antagonistischen Effekt von PTP1B gegenüber dem Insulin-abhängigen Reifeprozess von Krallenfroscheizellen.^[50] Die Mikroinjektion der isolierten Phosphatase PTP1B in *Xenopus* Oocyten führte zu einer Verlangsamung der Embryonalentwicklung von bis zu 5 h, die auch bei einer Zugabe von Insulin-unabhängigen Wachstumsfaktoren beobachtet werden konnte. Eine Meilensteinveröffentlichung bezüglich des Zusammenhangs von PTP1B und Diabetes / Adipositas folgte mit PTP1B-*Knockout* Mäusen. Elchebly et al. veröffentlichten 1999 die physiologischen Effekte nach Ausschalten des PTP1B codierenden Gens (Mäusehomolog zu *PTPNI*).^[52] Mäuse mit homozygotischer Zerstörung des PTP1B-Gens zeigten eine erhöhte Insulinsensitivität mit vergleichbaren Vitalparametern gegenüber der Wildtypvariante. Nach Nahrungsaufnahme konnten bei PTP1B^{-/-} Mäusen im Vergleich niedrigere Werte von Blutzucker und Insulin festgestellt werden. Dieser Zusammenhang findet sich in einer erhöhten Phosphorylierung des Insulinrezeptors in Muskel- und Lebergewebe wieder. Ferner konnte im Zuge einer fettreichen Diät beobachtet werden, dass die *Knockout* Mäuse eine verringerte Gewichtszunahme und gleichbleibende Insulinsensitivität aufwiesen, während die Wildtypvariante einer Gewichtszunahme von ca. 50 % und der Entwicklung einer Insulinresistenz unterlag. Neben seinem Einfluss auf metabolische Signalwege wird PTP1B häufig mit Tumorerkrankungen wie Brust- und Eierstockkrebs in Verbindung gebracht.^{[53][54]} Inwieweit PTP1B als Tumorsuppressor oder -promoter agiert, ist diskutabel, sodass es heutzutage als *two-faced* oder als *double agent* bezeichnet wird.^[42,55] Wiener et al. beschrieben 1994 die Überexpression von PTP1B im Gewebe von Brust- und Eierstockkarzinomen.^[56,57] In beiden Fällen steht das erhöhte Proteinlevel im Zusammenhang mit einer Überexpression der Rezeptortyrosinkinase ErbB2 (auch als HER2, Neu bekannt). Das codierende Gen *ERBB2* ist ein Proto-Onkogen, sodass die Überexpression des Rezeptors ErbB2 in über 20 % aller Brustkarzinome zu finden ist. Der Annahme einer Überexpression von PTP1B als

zellulären Abwehrmechanismus gegenüber der erhöhten Wirkung der Proteintyrosinkinase ErbB2 stehen Ergebnisse einer positiven Regulation der Tumorentwicklung gegenüber. So konnte in Mausstudien bei einem PTP1B Defizit mit gleichzeitiger Überexpression von ErbB2 die Tumorentwicklung unterdrückt und bei einem höheren Level von PTP1B gegenüber ErbB2 die Bildung von Tumoren induziert werden.^[54]

Ein Beispiel eines suppressiven Effektes von PTP1B auf schwerwiegende Erkrankungen findet sich in der Hemmung des Signalweges, welcher zu der Entwicklung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) führt. PTP1B ist in Zellen, die das Onkoprotein Bcr-Abl überexprimieren, selbst überexprimiert. Bcr-Abl ist eine Tyrosinkinase, die maßgeblich die Entwicklung der CML bestimmt. Das *BCR-ABL* Gen wird im Zuge eines Chromosomenbruchs und -neufusion gebildet (Philadelphia-Chromosom) und führt nach dessen Codierung zu der Bildung der dauerhaft aktivierten Form von Bcr-Abl. LaMontagne et al. beschrieben die Inhibition des Wachstums, der Koloniebildung und Tumorentwicklung von Bcr-Abl-exprimierenden Zellen nach der Expression von PTP1B in Fibroblasten.^[58] Ein regulatives Verhalten von PTP1B konnte auch in der Entstehung von Lymphdrüsenkrebs und Speiseröhrenkrebs nachgewiesen werden.^[59,60] In der Entwicklung von Ösophaguskarzinomen konnte bei PTP1B ein suppressiver, bei der Proteintyrosinphosphatase PTPH1 hingegen ein fördernder Effekt beobachtet werden.

Innerhalb der letzten Jahre folgten weitere Nachweise der physiologischen Relevanz der Proteintyrosinphosphatase PTP1B in humanen Erkrankungen wie Lungenkrebs, Lebererkrankungen, Immunantwort und Entzündungsprozessen.^[61–64]

Mit all diesen Zusammenhängen stellt PTP1B, nach seiner Entdeckung vor über 25 Jahren, heute ein wichtiges therapeutisches Target dar, sodass die Entwicklung von selektiven PTP1B-Inhibitoren eine wichtige Rolle in der aktuellen Forschung einnimmt.

2.3.1 Inhibition von PTP1B

Der Nachweis der Beteiligung an den Krankheiten Diabetes und Fettleibigkeit führte zu einem großen Interesse innerhalb der akademischen Forschung und pharmazeutischen Unternehmen, da diese Erkrankungen ein ernst zu nehmendes Problem in der modernen Gesellschaft darstellen. Es folgte eine Vielzahl an Veröffentlichungen, in denen die Entwicklung von PTP1B Inhibitoren im Fokus stand.^[65,66] In der *protein data bank* (PDB)

finden sich heute nahezu 100 Einträge, in denen PTP1B mit einem Inhibitor oder Substrat komplexiert ist. Anhand dessen lassen sich die Bemühungen und auch Erfolge der selektiven Aktivitätshemmung der Phosphatase PTP1B bemessen. Aus der Natur der katalytischen Domäne mit seiner hohen Ladung und der Affinität gegenüber dem negativ geladenen Substrat Phosphotyrosin ergibt sich jedoch ein schwer zu überwindendes Hindernis. So sind nahezu alle entwickelten pTyr-Mimetika selbst negativ geladen, was die Zellpermeabilität in starkem Maße unterdrückt, sodass die Bioverfügbarkeit stark eingeschränkt bis nicht gegeben ist. Obwohl Strukturen entwickelt werden konnten, die eine sehr hohe inhibitorische Aktivität *in vitro* aufwiesen, erreichten diese nicht die klinischen Phasen.

Phosphonsäuren als pTyr-Mimetikum

Die ersten Arbeiten in der Entwicklung von nicht-hydrolysierbaren pTyr-Mimetika führten zu der nicht-proteinogenen Aminosäure Phosphonomethylphenylalanin (pmP). Marseigne et al. substituierten die Phosphatstruktur des Substrats durch eine $\text{CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$ Gruppe und beschrieben das erhaltene Phosphonomethylphenylalanin als hydrolysestabiles pTyr-Mimetikum.^[67,68] Da die Bindung des Substrates in großem Maße durch den ionischen Charakter bedingt ist und pmP veränderte Säureeigenschaften aufweist, folgte 1992 die Beschreibung von α, α -Difluorbenzylphosphonsäure als optimiertes Mimetikum und 1993 die Aminosäure Phosphonodifluormethylphenylalanin (F_2pmP) (Abb. 2.9).^[69,70]

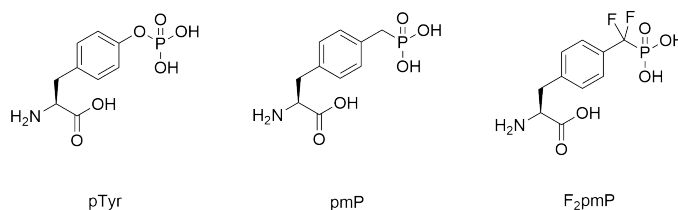


Abb. 2.9 Strukturen der Aminosäuren Phosphotyrosin, Phosphonomethylphenylalanin und Phosphonodifluormethylphenylalanin.

Die Säurekonstante und der sich daraus ergebene Deprotonierungsgrad bestimmt, inwieweit ein Mimetikum Interaktionen ausbilden kann, die denen des Substrates entsprechen. Die $\text{p}K_{\text{S}2}$ -Werte der korrespondierenden Phosphonsäure bzw. des Phenylphosphates sind in Tabelle 2.1 dargestellt.^[69]

Tabelle 2.1 pK_{S2} -Werte der simplifizierten Säuren

α -Pos	Substanz	pK_{S2}
O	Phenylphosphat	6.22
CH ₂	Benzylphosphonsäure	7.72
CF ₂	α, α -Difluorbenzylphosphonsäure	5.71

Der Vergleich der angegebenen pK_{S2} -Werte zeigt, dass die Säurekonstanten der zweiten Deprotonierung stark verschieden sind. Deshalb sollten α -fluorierte Phosphonsäuren im Gegensatz zu den Benzylphosphonsäuren unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vorliegen und dem anionischen Charakter von pTyr entsprechen. Die Annahme, dass das Mimetikum F₂pmP ein besser bindendes Isooster von pTyr darstellt, wurde durch den Erhalt von höher affinen Inhibitoren unterstützt. Hingegen konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungskonstanten bei der Erhöhung des pH-Wertes nicht verändern.^[71] Daher können die verbesserten Bindungseigenschaften nicht ausschließlich auf einen optimierten pK_{S2} zurückgeführt werden, sondern auch auf die zusätzliche Ausbildung polarer Wechselwirkungen der CF₂-Gruppe.

1994 bestimmten Zhang et al. mittels einer Verkürzung der Substratsequenz des EGF-Rezeptors (EGFR_{988–998}) die Sequenz DADEpYL als das potenteste Phosphopeptid.^[72] Diese Sequenz ist die bis heute wohl bekannteste PTP-affine Aminosäureabfolge und wird häufig als Grundgerüst für neue Peptidomimetika verwendet. So besitzt der peptidische Inhibitor Ac-DADEF₂pmPL-NH₂ gegenüber PTP1, dem Rattenhomolog zu PTP1B, eine Inhibitionskonstante von 180 nM. Das identische Peptid unter Verwendung von pmP, Ac-DADEpmPL-NH₂, bindet hingegen mit einem K_I -Wert von 181 μ M drei Größenordnungen schlechter. Damit haben sich bis heute zwei Systeme in der Entwicklung neuer PTP1B-Inhibitoren etabliert, die Verwendung des pTyr-Mimetikums F₂pmP und der Sequenz DADEXL.

Ein weiterer Durchbruch in der Entwicklung von Phosphataseinhibitoren folgte 1997 mit der Entdeckung einer "zweiten pTyr Bindungstasche".^[73] 1997 erreichte die Gruppe von Z.-Y. Zhang mit der Darstellung und Untersuchung eines bidentaten PTP1B-Inhibitors eine Erhöhung der Bindungskonstante auf 2.4 nM, eine der bis heute am stärksten bindenden Verbindungen. Die aus der Kristallstruktur einer inaktiven C215S-Variante identifizierte benachbarte Bindungstasche wird seitdem als *B-site* bezeichnet. Folgende Arbeiten iden-

tifizierten dieses Motiv als Bindungsstruktur gegenüber den phosphorylierten Tyrosinen Y1162 und Y1163 der Insulin Rezeptor Kinase (IRK).^[74] Die drastisch erhöhte Affinität wurde als kooperativer Effekt durch die Bindung an das katalytisch aktive Zentrum und die *B-site* interpretiert. Spätere Arbeiten konnten die Bindung der Zhang-Verbindung innerhalb der *B-site* widerlegen, da diese stattdessen mit einer weiteren Dömane der *C-site* interagiert^[75] (Abb. 2.10).^[76]

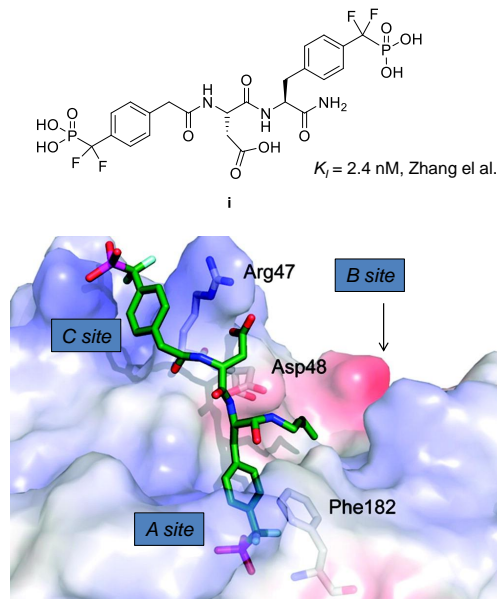


Abb. 2.10 oben: Struktur des bidentaten PTP1B Inhibitors **i**;
 unten: Bindung gegenüber der katalytischen Domäne und der *C-site*.

Neben einer deutlichen Erhöhung der Affinität gegenüber PTP1B konnte auch eine weitere wesentliche Eigenschaft optimiert werden, die Selektivität gegenüber TCPTP. Die T-Zellen Phosphatase TCPTP ist eine ubiquitäre Nicht-Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase und besitzt in seiner PTP-Domäne eine Sequenzübereinstimmung von 71 % gegenüber PTP1B.^[32] Mit der Adressierung einer weiteren PTP1B-spezifischen Bindungstasche konnte erstmals eine signifikante Selektivität gegenüber TCPTP um den Faktor 10 erreicht werden. Diese Selektivität muss in der Entwicklung eines effektiven PTP1B-Inhibitors gegeben sein, da TCPTP und PTP1B grundverschiedene Signalwege bestimmen. Während PTP1B-*Knockout* Mäuse positive Eigenschaften bezüglich der Insulinresistenz und Gewichtszunahme aufwiesen, sterben TCPTP^{-/-} Mäuse innerhalb von 5 Wochen an hämatologischen Erkrankungen.^[77] TCPTP wird eine entscheidende Rolle in der Blutent-

wicklung und Immunfunktion zugesprochen, sodass dessen simultane Inhibition negative Effekte hervorrufen würde.

Auch wenn sich die inhibitorischen Eigenschaften wie Affinität und Selektivität gegenüber der Phosphatase PTP1B stark verbessern ließen, sind die klassischen hoch-polaren PTP1B-Inhibitoren nicht zellgängig und besitzen folglich keine *in vivo* Aktivität. Daher stand in der Entwicklung selektiver Inhibitoren verstärkt der Erhalt zellgängiger Verbindungen im Fokus.

Alternative pTyr-Mimetika

Die Substitution der $\text{CF}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ -Gruppe ist ein entscheidender Schritt für den Erhalt weniger polarer Verbindungen. Jedoch muss ein neues pTyr-Mimetikum eine ausreichende Affinität gegenüber der katalytischen Domäne besitzen, um als Inhibitor und potenzielles Therapeutikum Anwendung finden zu können. So konnten in der Vergangenheit alternative pTyr-Mimetika bestimmt werden, die zu potenten PTP1B-Inhibitoren führten. Eine Auswahl derer soll im Folgenden vorgestellt werden.^[76]

Ein früher Ansatz des Erhalts einer erhöhten Zellpermeabilität war die Verwendung von Carbonsäuren/Carboxylaten als pTyr-Mimetikum. Die ersten Verbindungen dieser Art waren **ii** (1994) und **iii** (1998).^[78,79] In jüngerer Vergangenheit folgten verschiedene hochpotente Carboxylat-basierte Strukturen, die Bindungskonstanten im nM-Bereich aufweisen (Abb. 2.11).

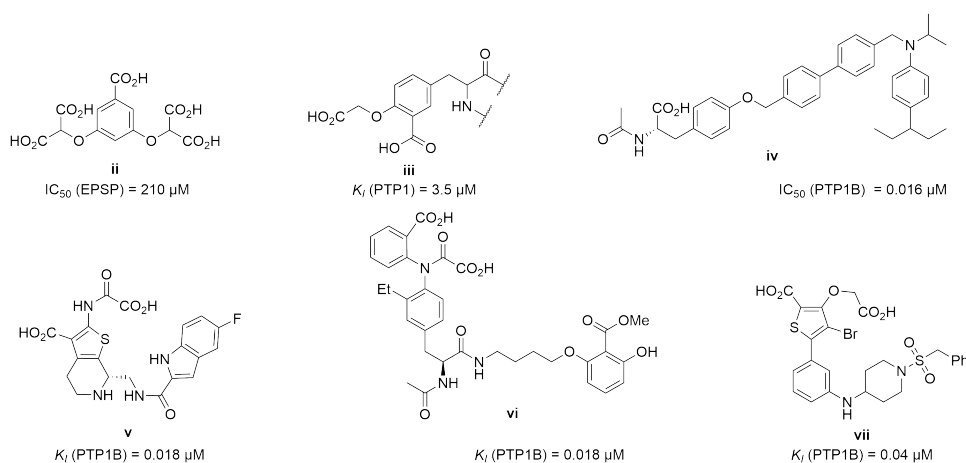


Abb. 2.11 Strukturen ausgewählter Carboxylat-basierter PTP Inhibitoren.

Nahezu alle beschriebenen hochaffinen Inhibitoren besitzen jedoch zwei Säurefunktionen

und damit keine signifikante Zellgängigkeit. Strukturoptimierungen mit dem Fokus auf einer erhöhten oralen Bioverfügbarkeit, durch die Verwendung von nur einer Carbonsäurefunktion, führten in den meisten Fällen zu dem Verlust der PTP1B-Affinität.

Die Wahl einer Basisstruktur, die dem elektronischen Zustand des Phosphates nahe kommt, ist ein rationaler Schritt und führte zu der ersten Kristallstruktur von PTP1B, in der diese mit Wolframat komplexiert erhalten werden konnte. Die Sulfonsäure besitzt hingegen nur eine negative Ladung und stellte ein potenziell zellpermeables pTyr-Mimetikum dar (Abb. 2.12).

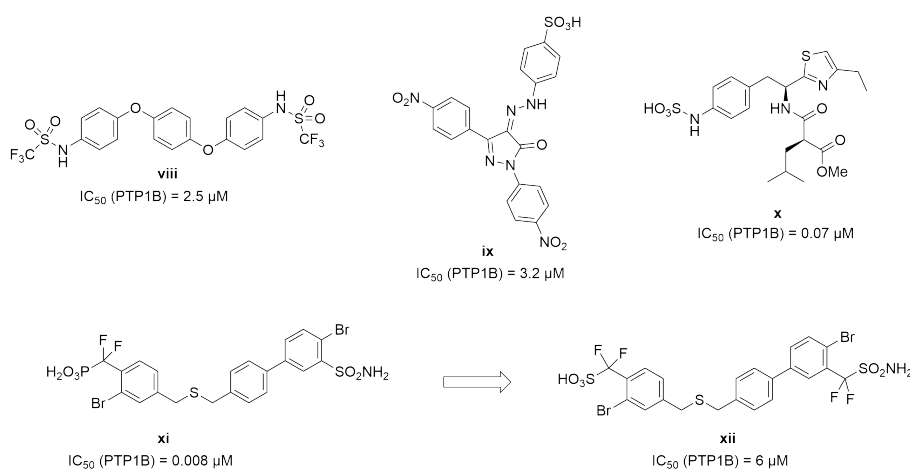


Abb. 2.12 Strukturen ausgewählter Sulfonsäure-basierter PTP Inhibitoren.

Die Sulfonsäuregruppe kann in verschiedenen Varianten verwendet werden, so sind Inhibitoren als freie Sulfonsäure, Amidosulfonsäure und Triflat beschrieben. In Kombination verschiedener Grundgerüste konnten Bindungskonstanten im niedrigen μ M- bis nM-Bereich erhalten werden. Das Pyrazolon **ix** konnte innerhalb des Arbeitskreises Rademann als nM-bindender Inhibitor gegenüber der Phosphatase SHP2 erhalten werden und inhibiert PTP1B im einstelligen μ M-Bereich.^[80,81] Dass die Sulfonsäure ein potentes, wenn auch gegenüber der $CF_2PO_3H_2$ -Gruppe ein weitaus geringer affines pTyr-Mimetikum ist, zeigten Hussain et al.^[82] Durch die Substitution der Phosphonsäuregruppe von **xi** durch eine analoge α, α -Difluormethylsulfonsäure (DFMS) verringerte sich die Affinität signifikant, sodass der IC_{50} -Wert des Sulfonsäurederivates um den Faktor 750 erhöht war (Abb. 2.12; unten).

Die Substitution von geladenen Strukturen durch Heterozyklen ist ein probates Mittel in der Medizinischen Chemie. So folgte auch das Design von PTP1B-Inhibitoren dieser

Strategie, was zum Erhalt hochaffiner Strukturen führte (Abb. 2.13).

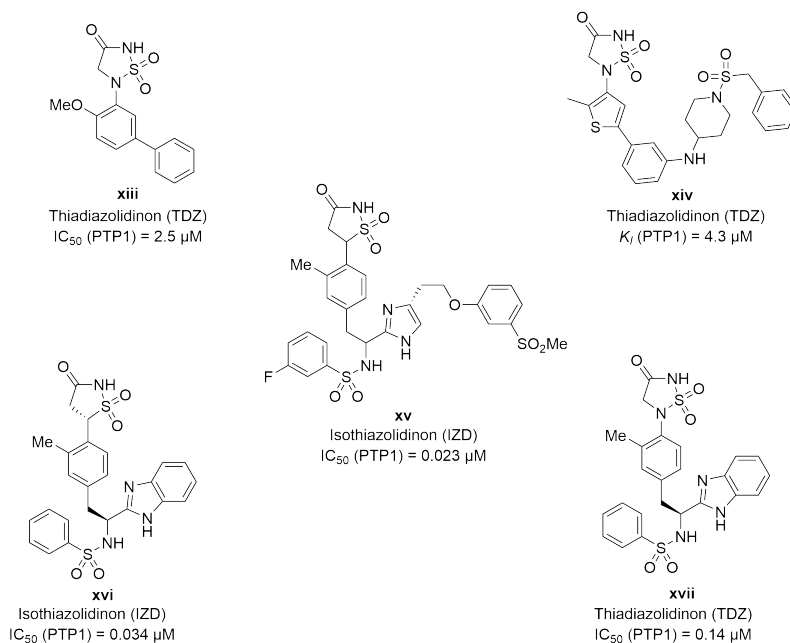


Abb. 2.13 Strukturen ausgewählter Heterozyklen-basierter PTP Inhibitoren.

Substanzen, die die Strukturelemente Thiadiazolidinone (TDZ) und Isothiazolidinon (IZD) enthalten, wurden zwischen 2003 und 2005 unabhängig voneinander von den 4 pharmazeutischen Unternehmen Novartis, AstraZeneca, Vertex und Incyte zum Patent angemeldet. Allen beschriebenen Derivaten wird eine gegebene zelluläre Aktivität zugesprochen, was einen signifikanten Fortschritt darstellt.^[33] Das Bindungsverhalten der IZD-Gruppe gegenüber dem katalytischen Zentrum folgt dabei Interaktionen, die zu der Verdrängung von drei Wassermolekülen führen. Folglich wurde dieses Mimetikum als potenter im Vergleich zu anderen pTyr-Mimetika beschrieben.^[76,83] Nachteilig ist hingegen die nicht ausreichend gegebene Selektivität. So besitzen Isothiazolidinonverbindungen identische Bindungskonstanten gegenüber PTP1B und TCPTP.^[84]

Neben den vorgestellten Substanzklassen ist eine Vielzahl weiterer Systeme beschrieben. Innerhalb dieser finden sich neutrale Inhibitoren,^[85] naturstoffbasierte Substanzen wie Stereoiden,^[86] allosterisch-bindende^[87,88] sowie anorganische Verbindungen.^[89]

Innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte konnte im Bereich der Entwicklung von PTP1B-Inhibitoren ein großer Fortschritt verzeichnet werden. Nach den ersten Verbindungen, deren

Basis eine nicht-hydrolysierbare Phosphonsäuregruppe darstellte, wurden verschiedenste Substanzklassen als potente pTyr-Mimetika identifiziert. Im Laufe der Optimierungsbe-mühungen konnten Verbindungen erhalten werden, die den individuellen Ansprüchen an das Inhibitor-design im Weitesten entsprechen. Dennoch sind die Anforderungen an ein potenzielles Präparat hoch, da dieses Eigenschaften wie hohe Affinität, Selektivität, Zell-gängigkeit und Bioverfügbarkeit besitzen muss. Viele Substanzen entsprechen daher nicht den Restriktionen der klinischen Phasen, sodass die Entwicklung eines Therapeutikums gegen die Erkrankungen Diabetes Typ II und Adipositas bei weitem nicht als abgeschlossen angesehen werden kann.

2.3.2 Irreversible Inhibition von PTP1B

Der klassische Ansatz einer Protein-hemmung ist die Verwendung reversibler Inhibitoren, die kompetitiv gegenüber der natürlichen Erkennungsstruktur agieren. Eine weitere Option der Unterdrückung einer Proteinaktivität bietet die Verwendung von reaktiven Strukturen, die mit dem Proteintarget eine chemische Reaktion eingehen. In der Regel werden dabei Verbindungen gewählt, die eine Affinität gegenüber dem katalytisch aktiven Zentrum besitzen und dieses im Zuge der Bindung chemisch modifizieren.

Das wohl einfachste System in Anwendung auf die Proteintyrosinphosphatase PTP1B ist die Verwendung von Oxidationsmitteln, die das katalytisch aktive Cystein oxidieren und somit die Inaktivierung des Proteins bewirken. 1997 beschrieben Huyer et al. den möglichen Bindungsmechanismus von Vanadat und Pervanadat gegenüber PTP1B. Pervanadat, der Komplex aus Vanadat und H_2O_2 , oxidierte *in vitro* das Cys215 irreversibel zur Sulfonsäure (Cys-SO₃H), während äquimolare Mengen von H_2O_2 zu keiner vollständigen Oxidation führten. Zu einem möglichen System eines *in vivo* selektiven PTP1B Oxidationsmittels kam es nicht.

Weitere Beispiele irreversibel kovalenter Modifikation von Proteintyrosinphosphatasen sind in Abb. 2.14 dargestellt.^[90–94]

Der Reaktionsweg der dargestellten Verbindungen folgt zwei unterschiedlichen Modi, der Reaktion des aktiven Cysteins und der Reaktion eines proteinständigen Nukleophils nach Phosphatabspaltung. Taylor et al. beschrieben 1996 die Reaktionen von α -halogenierten Benzylphosphonsäuren gegenüber der *Yersinia* PTPase und konnten zeigen, dass die α -

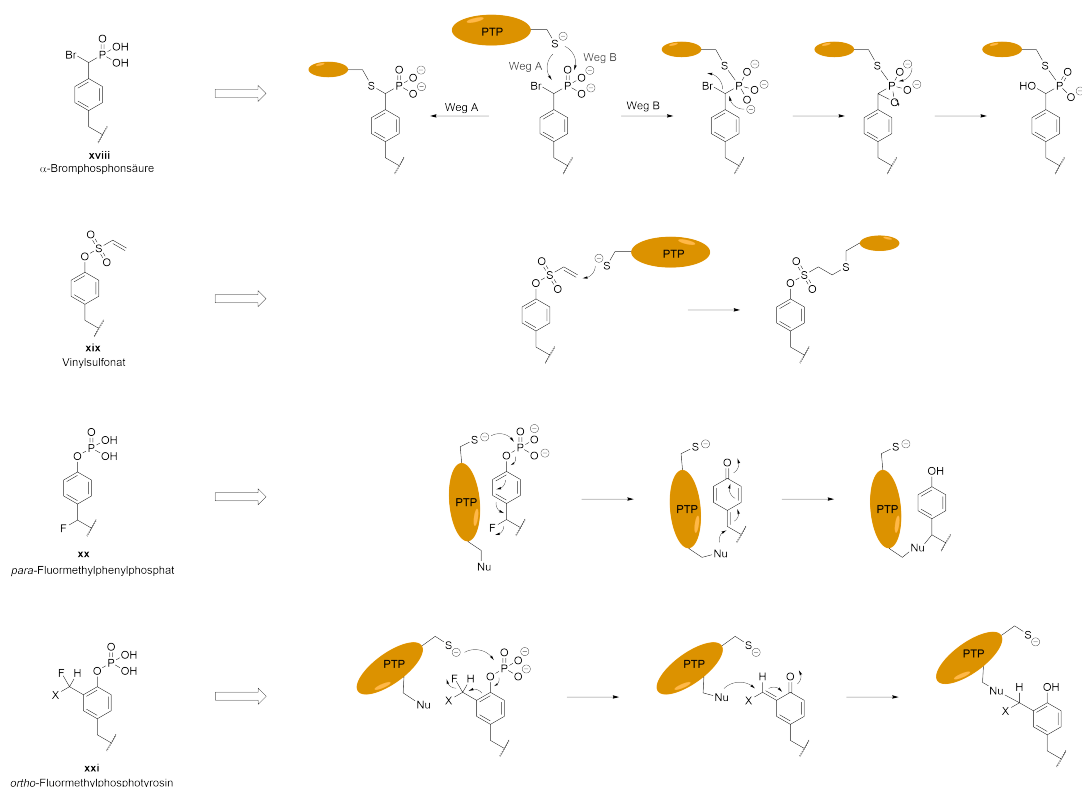


Abb. 2.14 Strukturen kovalent reagierender Verbindungen gegenüber PTPs und deren postulierter Reaktionsmechanismus (abgewandelt aus Originalpublikation).

Brombenzylphosphonsäure **xviii** eine zeit- und konzentrationsabhängige Inaktivierung der Phosphatase bewirkt.^[95] Es folgten Veröffentlichungen, in denen dieses Strukturelement aufgenommen wurde,^[90] bis hin zur Verwendung in einer Peptidstruktur.^[96] Allen Verbindungen wird der Charakter von kovalent irreversiblen Inhibitoren zugeschrieben. Ein weiteres Beispiel der Modifikation des aktiven Zentrums ist die Reaktion mit einem Michael-Akzeptor. Lui et al. beschrieben die Reaktion von Phenylvinylsulfonat (Ph-O-SO₂C₂H₃) und Phenylvinylsulfon (Ph-SO₂C₂H₃) mit der *Yersinia* Proteintyrosinphosphatase YopH.^[91] Der irreversible Bindungsmechanismus konnte innerhalb der beschriebenen Arbeiten enzymkinetisch, massenspektrometrisch und über den Erhalt einer Proteinkristallstruktur bestätigt werden.

Ein weiteres System einer kovalenten Modifikation von Proteintyrosinphosphatasen ist die Bildung einer reaktiven Spezies nach der Abspaltung eines Phosphatrestes (*suicide substrates*). Diesem Mechanismus folgen die Verbindungen *para*-Fluormethylphenylphosphat **xx**

und *ortho*-Fluormethylphosphotyrosin **xxi**. Nach der Dephosphorylierung ist die Bildung eines Chinon-Methides eine mögliche Folgereaktion, welches dann von einem Nukleophil angegriffen werden kann. Die Verbindungen wurden erstmal von der Gruppe um L.-C. Lo (*para*-Fluormethylphenylphosphat, 2002) und S.Q. Yoa (*ortho*-Fluormethylphosphotyrosin, 2003) beschrieben, wobei deren irreversibel kovalentes Verhalten mittels Westernblot nachgewiesen werden konnte.^{[97][98]}

Jüngere Arbeiten beschreiben Dimedon (5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion) als Struktur, die selektiv gegenüber der oxidierten Form des aktiven Cysteins von Proteintyrosinphosphatasen, der Sulfensäure, reagiert. So kann dieses System als Hilfsmittel in der näheren Untersuchung einer Redox-Regulation von PTPs dienen.^[45,99]

Alle beschriebenen Verbindungen reagieren nachweisbar kovalent gegenüber dem Target der PTPs und werden im Bereich der Proteomforschung im *activity-based protein profiling* (ABPP) verwendet.

2.4 Aktivitätsbasierte Proteinmodifikation

"Activity-based protein profiling (ABPP) has emerged as a powerful strategy to study the activity of enzymes in complex proteomes."^[100]

Diese Formulierung findet sich in nahezu jeder Veröffentlichung, die die selektive kovalente Modifikation von Protein zum Gegenstand hat. Der Begriff des *activity-based protein profiling* wurde maßgeblich von Benjamin Cravatt geprägt, der diesen erstmals 1999 verwendete.^[101] Das Prinzip dieser Methodik ist so einfach wie effektiv.

Die Basis bildet eine chemisch reaktive Verbindung (Sonde), die aus zwei wesentlichen Elementen besteht: einer reaktiven Struktur, auch als *warhead* bezeichnet, und einer Markierung *tag* (Abb. 2.15).

Bei einer ausreichend gegebenen Selektivität der verwendeten Sonde wird eine kovalente Bindung gegenüber dem Zielprotein ausgebildet, wobei andere Biopolymere nicht modifiziert werden. Dabei folgt die kovalente Modifikation der Reaktion des aktiven Zentrums mit dem *warhead*, sodass die verwendeten Substanzen als aktivitätsbasierte Sonden (*activity-based probes*) bezeichnet werden. Nach einer erfolgten Markierung des

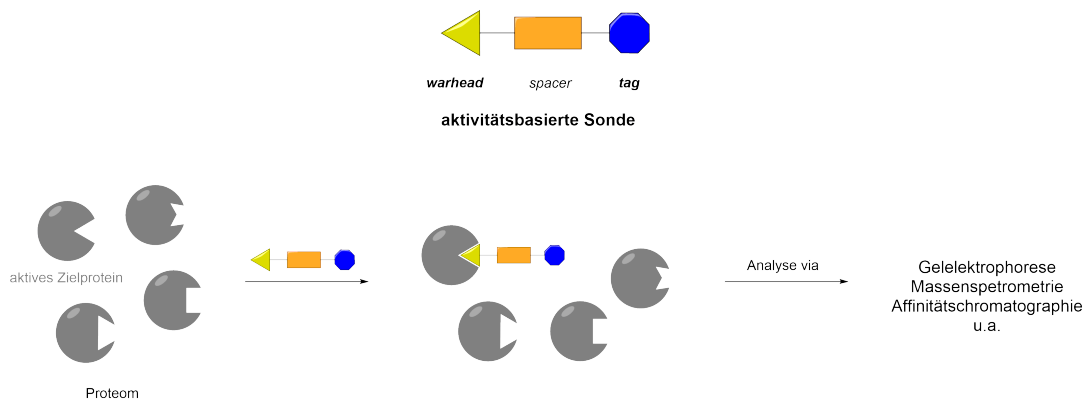


Abb. 2.15 Prinzip des ABPP.

Proteins kann dieses dann, je nach Wahl der Markierung, analytisch nachgewiesen werden. Beispiele populärer *warheads* und *tags* sind in Abb. 2.16 dargestellt.

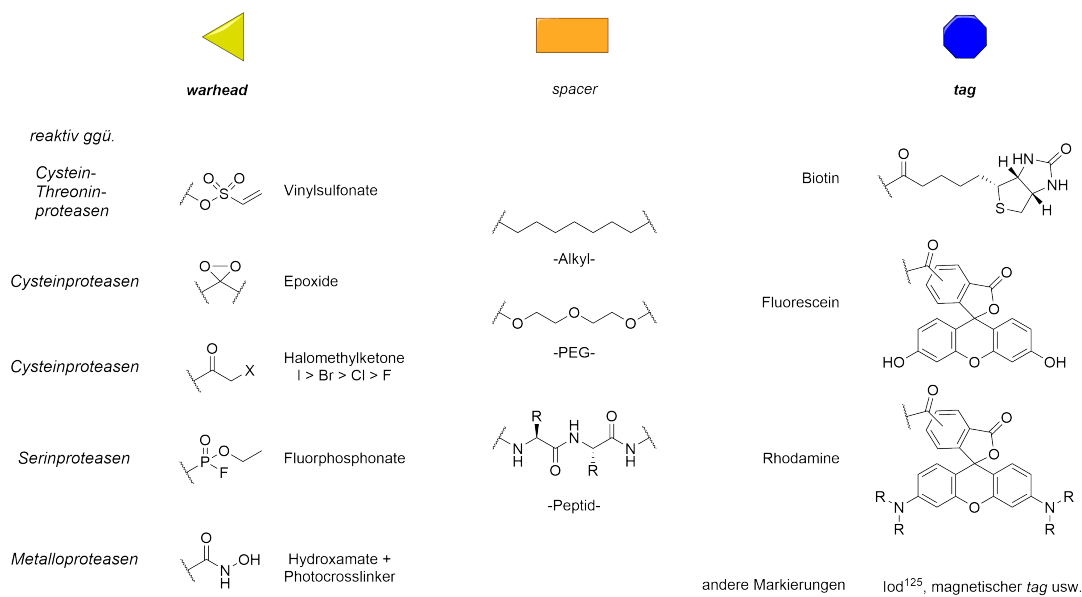


Abb. 2.16 Beispiele des Aufbaus einer aktivitätsbasierten Sonde.

Die Kombinationsmöglichkeiten sind vielfältig, sodass im Zuge des Sondendesigns verschiedene Optimierungsoptionen zur Verfügung stehen. Eine der wichtigsten Eigenschaften der Sonde ist deren Reaktivität gegenüber der aktiven Form des Zielproteins. Maßgeblich bestimmend dafür ist der Einsatz einer geeigneten reaktiven Gruppe. Diese muss Bestandteil jener Struktur sein, die selektiv von dem zu adressierenden Protein erkannt

wird, sodass dieses innerhalb des aktiven Zentrums modifiziert werden kann. Dabei muss der *warhead* eine gegebene Reaktivität besitzen, darf jedoch nicht unselektiv gegenüber anderen Proteinen reagieren. Verwendet werden dabei häufig elektrophile Gruppen wie Michael-Akzeptoren, Sulfon- und Phosphonsäurehalogenide, Epoxide und andere Strukturelemente.^[102]

Der *spacer* bzw. *linker* ist ein weiteres Element, das die Effektivität der Sonde bestimmt. Um eine erfolgreiche Reaktion zwischen der reaktiven Gruppe und dem Protein zu gewährleisten, darf der Rest der Sondenstruktur die Reaktivität des *warheads* nicht beeinflussen. Neben einer räumlichen Trennung von *warhead* und *tag* ist die Löslichkeit der verwendeten Sonden ein wichtiger Aspekt, sodass häufig polare Strukturen wie Glykolketten verwendet werden. Der Einsatz eines peptidischen Rückgrades bietet über die Ausbildung favorisierter Interaktionen die Erhöhung einer Sondenaffinität.^[103]

Die Wahl einer geeigneten Markierung ist entscheidend für einen Nachweis der Proteinreaktion. Der wohl einfachste Weg ist der Einsatz von Fluorophoren, sodass kovalent markierte Proteine direkt nach einer gelelektrophoretischen Trennung nachgewiesen werden können. Ein weiteres populäres System ist die Verwendung von Biotin als Affinitätsstruktur. So können markierte Proteinspezies über eine Affinitätschromatographie bzw. einen Biotin-Avidin-*pull down* aus dem Reaktionsgemisch isoliert und analysiert werden.

Folgende analytische Verfahren können dann zu der Identifizierung der isolierten Proteinspezies genutzt werden, sodass sich Aussagen über das Level der Aktivität des Biopolymers im Proteom treffen lassen können. Das am häufigsten genutzte analytische Verfahren stellt dabei die Massenspektrometrie nach tryptischen Verdau dar.

Eine weitere Möglichkeit des Designs aktivitätsbasierter Sonden ist das Konzept eines zweistufigen Systems durch eine der Proteinreaktion folgenden Verknüpfung der Sonden-elemente. Dazu werden sog. bioorthogonale Reaktionen verwendet (Abb. 2.17).^[104]

Die Strategie einer zweistufigen Reaktion zur Verknüpfung des modifizierten Proteins mit einer Markierung bietet verschiedenste Vorteile. So kann zum einen ein störender Einfluss von Strukturen ausgeschlossen werden, ferner ergibt sich innerhalb dieser Anwendung eine "freie" Wahl des *tags* sowie die Möglichkeit einer Zellgängigkeit.

Die Anforderungen an die Verknüpfungsreaktion sind hoch, da diese grundlegende Eigenschaften besitzen muss. Die verwendeten Einzelstrukturen müssen kinetisch, thermodynamisch und metabolisch stabil sein und eine chemoselektive Reaktion miteinander eingehen. Ferner sollten die Elemente nicht toxisch sein, um *in vitro* anwendbar zu sein.

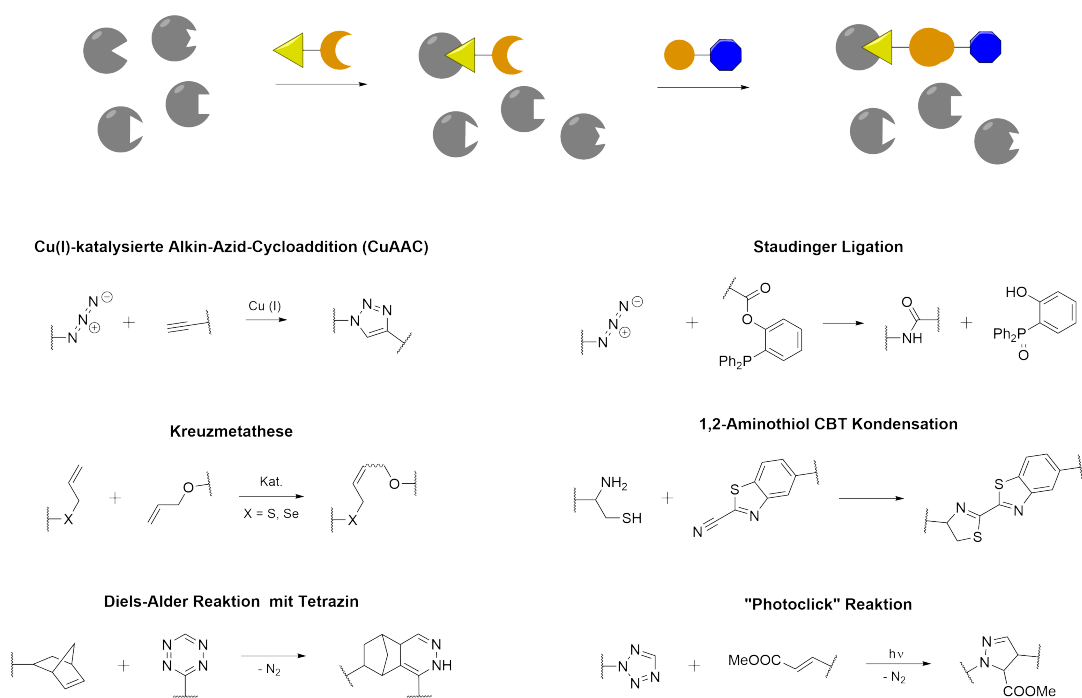


Abb. 2.17 oben: zweistufiger Prinzip des ABPP;
 unten: Auswahl bioorthogonaler Reaktionen.

Die Ligationen selbst müssen unter physiologischen Bedingungen (Temperatur, Druck, pH-Wert usw.) ablaufen können und sollten eine hohe Geschwindigkeitskonstante aufweisen. In der Vergangenheit konnten verschiedene Systeme identifiziert werden, die diesen Ansprüchen entsprechen und damit ein fester Bestandteil der aktivitätsbasierten Proteomforschung sind. Innerhalb dieser Reihe finden sich nicht nur Reaktionen, die verschiedene individuelle Vorteile aufweisen, sondern auch zueinander orthogonale Reaktionen, sodass diese im selben Reaktionsansatz durchgeführt werden können. Willems et al. beschrieben 2012 die selektive Markierung unterschiedlicher Proteine durch die konsequente Verwendung der Verknüpfungsmethoden Tetrazin-Diels-Alder Reaktion, Staudinger Ligation und der Cu(I)-katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC).^[105]

Das Prinzip des ABPP bietet ein breites Anwendungsspektrum in der Identifizierung, Quantifizierung und Aktivitätsbestimmung von Biopolymeren. Mit der Verwendung von Strukturen, die eine kovalente Reaktion mit dem katalytisch aktiven Zentrum eingehen, folgt jedoch eine unsteuerbare Modifikation des Proteins. Ein weiterer Teilbereich des

ABPP ist die steuerbare Aktivierung der Sonde durch Bestrahlung.

2.4.1 Photoaffinitätsmarkierung

Das Grundprinzip der Photoaffinitätsmarkierung ergibt sich aus der zunächst reversiblen Bindung eines Strukturelementes an das Zielprotein, gefolgt von einer photoinduzierten kovalenten Vernetzung. Ein bekanntes Beispiel dieses Systems findet sich in der Entwicklung und Anwendung der photoreaktiven Sonde HxBP-Rh gegenüber Matrixmetalloproteasen.^[106] Metalloproteasen sind neben den Cystein- und Serinhydrolasen die dritte Hauptklasse der peptidspaltenden Proteasen. Aufgrund ihrer individuellen Eigenschaft, der Hydrolyse durch die Koordination eines Wassermoleküls über ein Metallzentrum, besitzen diese kein direkt adressierbares aktives Zentrum wie einen Serin- oder Cysteinrest (Abb. 2.18; *unten, links*). Um dennoch eine selektive Markierung dieser Proteine zu ermöglichen, wurde Benzophenon verwendet (Abb. 2.18).

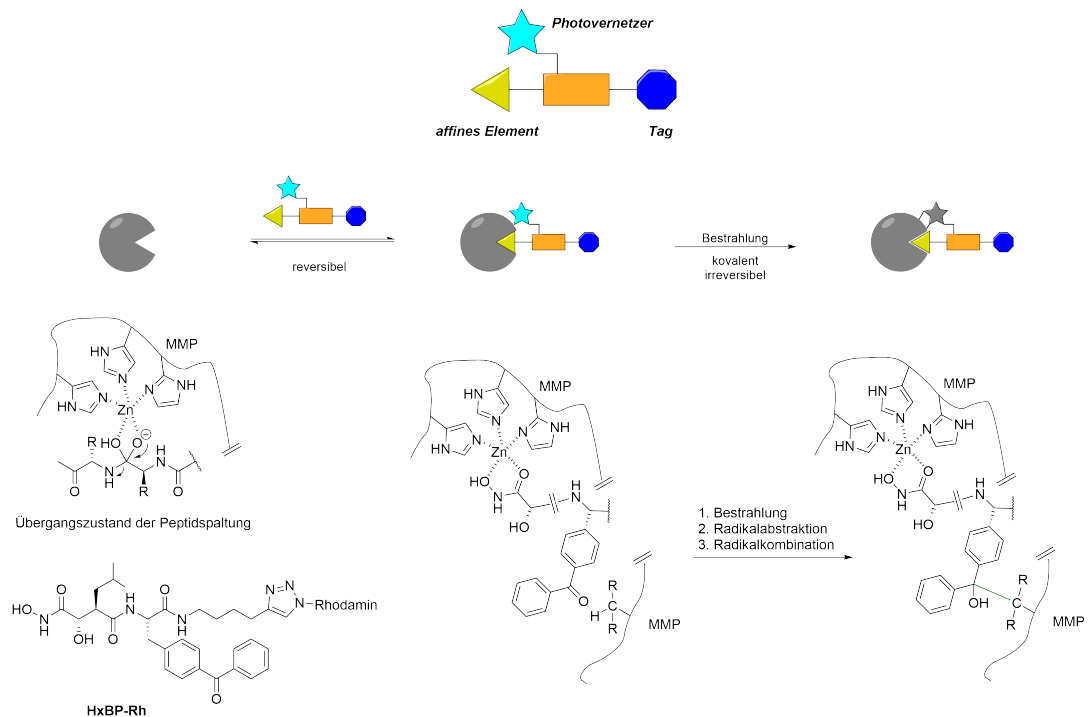


Abb. 2.18 oben: Prinzip des ABPP unter Verwendung eines Photovernetzers; unten: Anwendung von HxBP-Rh auf Matrixmetalloproteasen.

In dieser Anwendung stellt der Begriff einer affinitätsbasierten Sonde (*affinity-based probe*) eine treffendere Beschreibung dar, da die Modifikation des Proteins auf der Basis einer reversiblen Protein-Sonden-Interaktion erfolgt. Die kovalente Vernetzung ist eine Folgereaktion der photochemischen Anregung des Benzophenons zu einer Biradikalspezies. Benzophenon agiert im vorgestellten Falle als hydrophober Bindungspartner gegenüber der S_2' -Tasche der Metalloprotease und kann im Zuge einer Bestrahlung eine Radikalabstraktions- und Radikalrekombinationsreaktion mit dieser eingehen.^[106]

Die erste Beschreibung einer photoreaktiven Gruppe, die in Anwendung auf eine Proteinreaktion zum Einsatz kam, erfolgte 1962. Westheimer et al. untersuchten die Photolyse der Diazoacetylgruppe sowie das Inaktivierungspotenzial gegenüber der Serinprotease Chymotrypsin.^[102,107] Darauf folgten über die Jahre weitere Publikationen, die die Entwicklung und Untersuchung von photoreaktiven Verbindungen zum Gegenstand hatten.^[108] Damit eine photoaktivierbare Verbindung erfolgreich in einer Proteinvernetzungsreaktion eingesetzt werden kann, müssen jedoch bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Die Verbindungen müssen unter Bedingungen einer biologischen Anwendung stabil sein und dürfen nur eine Reaktivität entwickeln, wenn sie einer Bestrahlung unterzogen werden. Diese sollte in einem Wellenlängenbereich von $\lambda_{ex} > 300$ nm erfolgen, um Schäden an dem zu untersuchenden System zu vermeiden. Ferner muss die Halbwertszeit der reaktiven Spezies deutlich kürzer sein als die des Inhibitor-Protein-Komplexes, sodass während der Aktivierung keine bzw. weniger unspezifische Reaktionen erfolgen können. Weiter muss der Photovernetzer in einer Struktur vorliegen, die die Bindung der Affinitätssonde nicht beeinträchtigt. So haben sich in der Vergangenheit drei Strukturen etabliert, die heutzutage erfolgreich innerhalb von Photoaffinitätssonden verwendet werden: Arylazide, Diazirine und Benzophenon (Abb. 2.19).

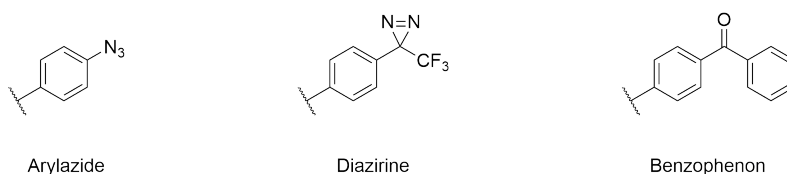


Abb. 2.19 Die Photovernetzer Arylazide, Diazirine und Benzophenon.

Arylazide

Die Substanzklasse der Arylazide ist innerhalb dieser Gruppe das älteste beschriebene System (1969).^[109] Der reaktionsbestimmende Schritt der Aktivierung ist die Eliminierung eines Äquivalentes N_2 . Arylazide besitzen ein vergleichsweise breites Spektrum der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} < 300$ nm bis > 400 nm und können nach ihrer Aktivierung verschiedene Folgereaktionen eingehen (Abb. 2.20).

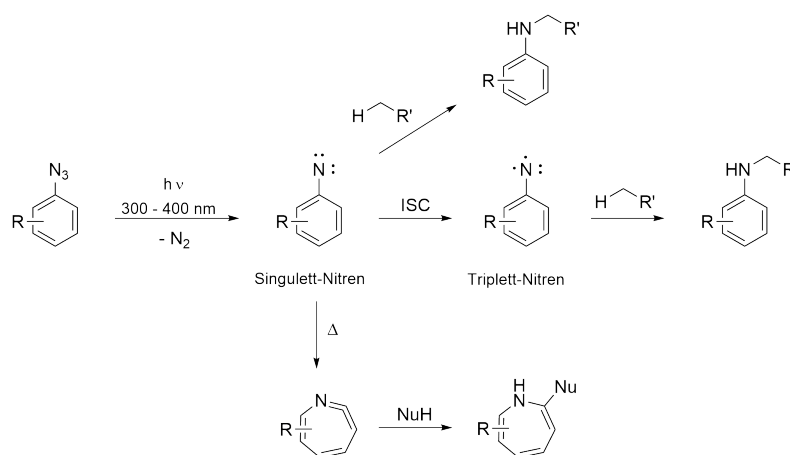


Abb. 2.20 Postulierte Folgereaktionen der aktivierten Arylazide.
ISC: *Intersystem crossing*

Im ersten Schritt erfolgt die Bildung eines Nitrens, einer hochreaktiven Spezies mit einer Halbwertszeit von ~ 0.1 ms, welches zügig in andere reaktive Zwischenstufen übergeht: einem Triplett-Biradikal nach *intersystem crossing* oder einem Ketenimin im Zuge einer Insertionsreaktion. Der Triplettzustand ist energetisch tiefer liegend und reagiert bevorzugt mit aliphatischen CH-Gruppen in einer Radikalabstraktions- und Rekombinationsreaktion. Das Ketenimin wird in Abwesenheit eines Reaktionspartners gebildet (~ 1 ns für Phenylazid im organischen System) und stellt ein langlebiges Elektrophil dar, welches Reaktionen mit Nucleophilen eingehen kann.^[110]

Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil der ersten Arylazide war die benötigte hochenergetische Anregungswellenlänge unter 300 nm, sodass die Arylazide durch die Verwendung bestimmter Substitutionsmuster in ihren photochemischen Eigenschaften optimiert wurden. So bewirken elektronenziehende Substituenten wie Hydroxyl-, Nitro- und Acylgruppen die

Rotverschiebung des Absorptionsmaximums.^[111] Ferner unterdrückt die Perfluorierung des Ringes die Cyclisierung zum Ketenimin.^[102,112]

Diazirine

Diazirine bilden die zweite Klasse populärer Photocrosslinker, die in der Medizinischen Chemie verwendet werden und wurden erstmals 1973 beschrieben.^[113] Der Anregungsmechanismus ist dem der Arylazide verwandt, sodass die Bildung der reaktiven Spezies der Abspaltung eines Äquivalentes Stickstoff folgt. Diazirine besitzen hingegen höherwellige Absorptionsmaxima um $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ und bilden im Zuge ihrer Bestrahlung Carbene (Abb. 2.21).

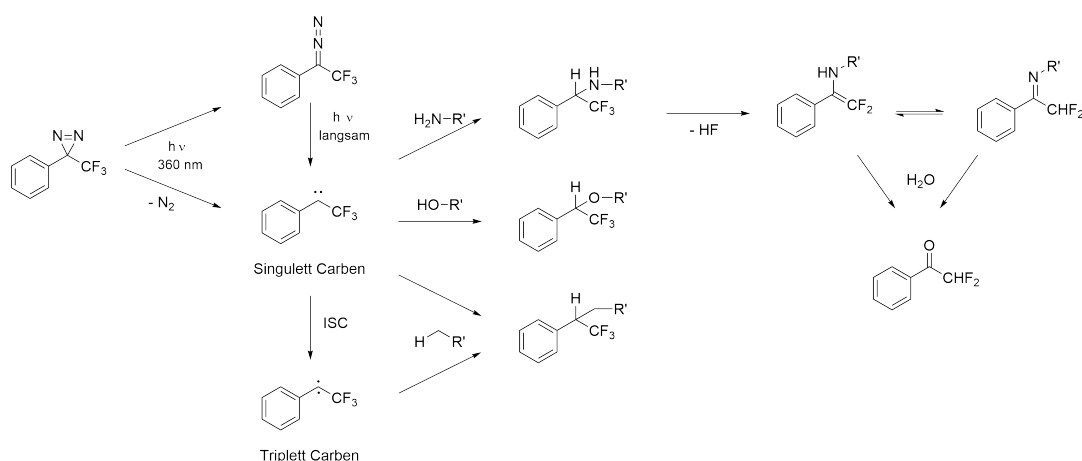


Abb. 2.21 Postulierte Folgereaktionen der aktivierten Diazirine.
ISC: Intersystem crossing

Wenn Diazirine mit einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt werden, folgt maßgeblich die Bildung eines Singulettcarbens. Eine Nebenreaktion der Anregung, die auch unter erhöhten Temperaturen auftreten kann, ist die Ausbildung des α -Diazoisomers. Dies kann bis zu einer relativen Menge von 35 % auftreten und stellt eine ungewollte Nebenreaktion dar. Diazoverbindungen können als Elektrophil reagieren und führen somit zu unspezifischen Reaktionen. Eine bestrahlungsinduzierte Rücküberführung kann zwar erreicht werden, jedoch ist diese Reaktion stark verlangsamt. Mit der Einführung der geminalen CF_3 -Gruppe konnten Brunner et al. eine Herabsetzung der Reaktivität der Diazoverbindungen erreichen, sodass sich heute die Gruppe der Trifluormethylphenyldiazirinen etabliert hat.^[114] Singulett-

Lettcarbene besitzen hingegen eine sehr kurze Halbwertszeit von $t_{1/2} \sim 1$ ns. Analog zu den Nitrenen kann es unter strahlungsloser Spinumkehr zu der Bildung des Triplettzustandes kommen, sodass die identische Folgereaktion der C-H Insertion eintritt. Das Singulettcarben kann auch als Elektrophil reagieren, sodass Reaktionen mit Hydroxylgruppen und Aminen beschrieben sind.^[115] Letztere können aufgrund des Gleichgewichts mit den korrespondierenden Iminen zum Verlust der Markierung führen. Trotz der Nebenreaktion zu Diazoverbindungen und der Anfälligkeit gegenüber Hydrolysereaktionen stellt die Gruppe der Diazirine eines der wichtigsten Systeme der Photovernetzer dar.

Benzophenon

Die erste Beschreibung von Benzophenon als Photovernetzer in einer biologischen Anwendung erfolgte 1973.^[116] Neben den Arylaziden und Diazirinen, die unter einem irreversiblen Stickstoffaustritt aktiviert werden, stellt das Benzophenon ein reversibel aktivierbares System dar. Unter Bestrahlung im Wellenlängenbereich von 350 bis 360 nm kann die Ketofunktion zum Biradikal angeregt werden (Abb. 2.22).

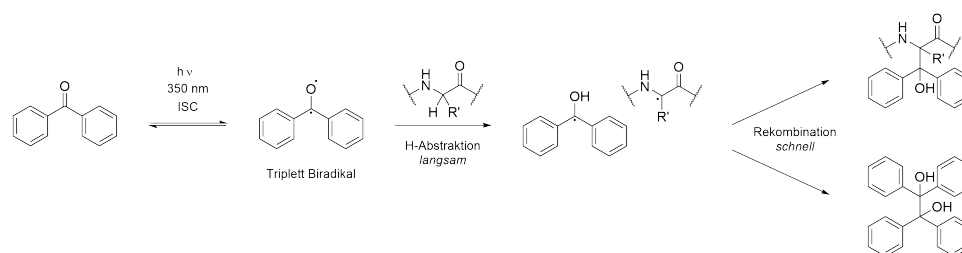


Abb. 2.22 Postulierte Folgereaktionen des angeregten Benzophenons.
 ISC: *Intersystem crossing*

Das gebildete Biradikal ist ein vergleichsweise langlebiger Zustand und geht nach ~ 120 μ s in den Grundzustand über. In Anwesenheit einer CH-Gruppe kann dieses in einer H-Abstraktion reagieren und folgend eine Radikalrekombination eingehen. Das Biradikal reagiert dabei bevorzugt gegenüber C-H-Bindungen und weniger mit OH-Funktionen. Strukturen, die nach H-Abstraktion ein stabiles Monoradikal ausbilden können, neigen am ehesten dazu eine Reaktion mit dem angeregten Benzophenon einzugehen. Die α -Position von Aminosäuren stellt als tertiäres Zentrum eine solche Position dar (Ausnahme Glycin), sodass die Reaktion mit jeder Aminosäure möglich ist. Die folgende Radikalrekombination

führt dann zu der kovalenten Vernetzung mit der Zielstruktur. Eine mögliche Nebenreaktion ist die Homodimerisierung des Monoradikals unter der Bildung eines Benzopinacols. Diese Nebenreaktion kann bei der Bestrahlung von Benzophenon zwar beobachtet werden, jedoch findet diese nur in geringem Maße statt. Ein großer Vorteil dieses Systems ist seine Reversibilität. So kann der angeregte Zustand des Benzophenons nach einem geeigneten Reaktionspartner "suchen" und ist nicht wie ein Nitren oder Carben an eine schnelle Folgereaktion gebunden. Daher wird dem Benzophenon eine höhere Vernetzungseffizienz zugesprochen. Nachteilig ist der hohe sterische Anspruch, sodass Interaktionen mit Proteinen beeinträchtigt werden können.

Die Stellung der Photoaffinitätsmarkierung in der aktuellen Forschung lässt sich mit der steigenden Anzahl von Publikationen und dem kommerziellen Vertrieb von photoaktivierbaren Aminosäuren bemessen. So hat sich die bestrahlungsabhängige Proteinmodifikation innerhalb der Medizinischen Chemie als wertvolles Werkzeug etabliert, mit dem Proteine kovalent markiert werden können, die unter dem Einsatz konventioneller aktivitätsbasierter Sonde nicht adressierbar sind. Ferner können biologische Prozesse zeitabhängig untersucht werden, da die Reaktion durch den äußeren Einfluss der Bestrahlung initiiert werden kann. Mit der kovalenten Modifikation der Zielproteine ergeben sich verschiedenste Möglichkeiten der darauf folgenden Analytik, sodass Informationen über Mechanismen in Rezeptor-Ligand- und Protein-Proteininteraktionen erhalten werden können.

3 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von chemisch-reaktiven Mimetika der phosphorylierten Aminosäure Tyrosin. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte ein pTyr-Mimetikum untersucht werden, das über eine photochemische Anregung in einen reaktiven Zustand überführt werden kann. Durch die Kombination des photoreaktiven Motivs mit dem pTyr-Isoster sollte das, nach unserer Kenntnis, erste photoaktivierbare pTyr-Mimetikum erhalten werden und zunächst auf seine photochemischen Eigenschaften hin untersucht werden. Folgend sollte das Desaktivierungspotenzial gegenüber Proteintyrosinphosphatasen sowie das Verhalten in kovalent-irreversiblen Proteinreaktionen untersucht werden. Dazu sollte das photoreaktive Strukturmotiv mit einer fluoreszenten Struktur versehen werden, um dessen photochemisch-induzierten kovalenten Eigenschaften auf die Proteintyrosinphosphatase PTP1B zu untersuchen. In darauffolgenden Arbeiten sollte eine neue, nicht-proteinogene Aminosäure dargestellt werden, die im Standardverfahren der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden kann, um den Zugang zu höher affinen Peptidomimetika zu ermöglichen.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit hat die Untersuchung einer neuen Klasse von pTyr-Mimetika zum Gegenstand. Die zentrale Substanzklasse dieser Arbeiten waren dabei fluorierte Phosphonsäuren. Fluorierte Phosphonsäureester sind etablierte aktivitätsbasiert kovalent reagierende Verbindungen. Diese Substanzklasse sollte auf ihre Anwendung auf Proteintyrosinphosphatasen hin modifiziert und untersucht werden. Über das Einbringen einer negativen Ladung sollte eine Affinität gegenüber Phosphatasen erreicht und die individuellen Eigenschaften der neuen pTyr-Mimetika untersucht werden. Abschließend sollten Stabilitätsuntersuchungen sowie die Darstellung affiner Inhibitoren die Substanzklasse der monofluorierten Phosphonsäuren als neue pTyr-Mimetika etablieren und deren Verhalten in Proteinvernetzungsreaktionen näher untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbare Phosphotyrosinmimetika

Die individuelle Adressierung von Biopolymeren und deren selektive Inhibition ist das Grundprinzip der Wirkstoffentwicklung innerhalb der Medizinischen Chemie. Klassisch erfolgt die Inhibition über die Verwendung von affinen Strukturen, die aufgrund ihrer hohen Bindungskonstante zu bestimmten Proteinbereichen, die biologische Wirkung dieses Proteins stark einschränken bis vollständig aufheben können. Diese reversible Bindung kann dabei gegenüber aktiven Zentren oder Bindungsdomänen erfolgen, wobei sich das Maß der Inhibition aus der Dissoziationskonstante K_I des Enzym-Inhibitor-Komplexes ergibt.

Neben einer reversiblen Inhibition durch den Einsatz kompetitiver Inhibitoren kann das selektive Ausschalten einer proteinabhängigen Wirkung über kovalent reagierende Substanzen erfolgen. Zum Einsatz kommen dabei irreversible Inhibitoren, die mit dem Protein eine chemische Reaktion eingehen und dieses kovalent modifizieren. Ein bekanntes Beispiel dieses Wirkmechanismus findet sich in dem Präparat Acetylsalicylsäure, welches die Acetylierung der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 bewirkt und somit die Bildung der schmerzfördernden Prostaglandine unterdrückt. Ein Nachteil bei der Verwendung von irreversiblen Inhibitoren stellt eben ihre Reaktivität dar. So können zum einen unselektive Reaktionen gegenüber anderen Strukturen oder Proteinen erfolgen, ferner kann die Wirksamkeit durch eine kurze Halbwertszeit stark eingeschränkt sein.^[117]

Mit einer schaltbaren Reaktivität ist es hingegen möglich, solch ungewollte Effekte zu vermindern. Wenn ein Bioisoster innerhalb einer Bindungsdomäne in eine reaktive Spezies überführt wird, kann erreicht werden, dass eine Reaktion vermehrt mit dem Zielprotein eingegangen wird. Dies bietet die Verwendung von photoreaktiven Molekülstrukturen.

Die Entwicklung von photoschaltbaren Inhibitoren stellt in der Medizinischen Chemie in jüngerer Vergangenheit einen sehr populären Forschungsbereich dar.^[118] Photoreaktive Verbindungen finden sich in Anwendungen auf verschiedenste biologische Funktionen wie Zelladhäsion,^[118] Ionentransport,^[119,120] Biokatalyse,^[121,122] Proteinfaltung^[123–125] und vielen mehr.

Mit der Synthese, Untersuchung und Validierung der Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbare Phosphotyrosinmimetika konnte eine Substanzklasse erhalten werden, die ein großes Potenzial für die biochemische Anwendung auf Phosphotyrosin-erkennende Biopolymere besitzt.^{1[126,127]}

4.1.1 Eigenschaften von Benzoylphosphonsäuren

Photoreaktive Strukturen lassen sich im Wesentlichen in irreversibel aktivierbar, z.B. unter dem Austritt von N₂ und reversibel aktivierbar, unter der Rückbildung der unreaktiven Spezies, unterteilen (siehe Seite 31 ff.). Benzophenon stellt dabei das bekannteste reversibel aktivierbare System dar. Neben dem direkten Einbau in Inhibitorstrukturen hat sich die Verwendung dieser Verbindung soweit etabliert, dass es kommerziell als nicht natürliche Aminosäure Benzoylphenylalanin erhältlich ist.^{[128–130][131]} Da Benzophenon selbst in der Regel keine Affinität gegenüber den zu untersuchenden Zielproteinen besitzt, wird es meist in Kombination mit einem affinen Strukturmerkmal eingesetzt.

Mit der Klasse der Benzoylphosphonsäuren liegt hingegen ein photoaktivierbares Bioisoster vor, in dem sich das Proteinerkennungsmerkmal und eine photoreaktive Gruppe in einer Struktur vereinbaren. Die Weiterentwicklung dieses Systems führte zu dem Erhalt der nicht-proteinogenen Aminosäure Phosphoncarbonylphenylalanin (pcPhe) (Abb. 4.1).

Der postulierte Bindungsmodus gegenüber der Erkennungsdomäne einer Proteintyrosinphosphatase entspricht dem des natürlichen Substrates Phosphotyrosin. Während die dargestellten Interaktionen gegenüber pTyr zu dessen Hydrolyse im Zuge der Substratspaltung führen, liegt mit den Benzoylphosphonsäuren ein nicht hydrolysierbares Isoster vor. *In silico* Bindungsstudien ergaben für die Struktur der Benzoylphosphonsäuren einen favorisierten Bindungsmodus gegenüber der pTyr-Bindungsstelle von MptpA (PTP aus

¹Wagner, S.; Masterarbeit, 2009, AG Rademann;
Horatscheck, A.; Dissertation, 2011, AG Rademann.

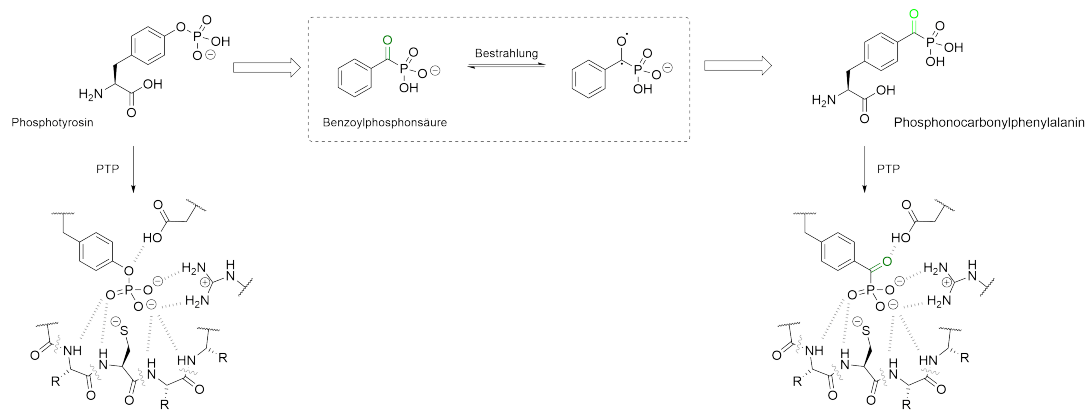


Abb. 4.1 *oben*: Benzoylphosphonsäuren mit der Weiterentwicklung zu dem Bioisoster Phosphonocarboxyphenylalanin;
unten: Bindungsmodus von Phosphotyrosin und Phosphonocarboxyphenylalanin gegenüber einer PTP-Domäne.

Mycobacterium tuberculosis) sowie gegenüber der SH2-Domäne des Transkriptionsfaktors STAT5B (Abb. 4.2).²

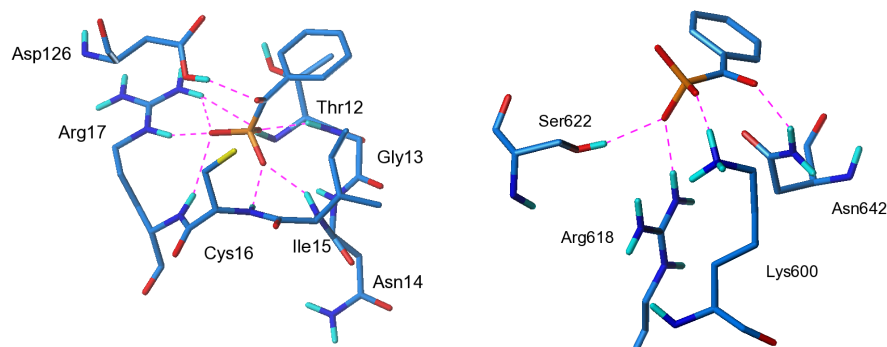


Abb. 4.2 *links*: Berechnete Wechselwirkungen der Benzoylphosphonsäure mit dem katalytischen Zentrum von MptpA;
rechts: Berechnete Wechselwirkungen der Benzoylphosphonsäure mit der SH2-Domäne von STAT5B (basierend auf der Kristallstruktur von STAT5A)
 Darstellung aus Horatscheck und Wagner et al.^[126]

Der Darstellung lässt sich für beide Phosphotyrosin-erkennende Strukturen ein Bindungsmodus entnehmen, der aus der Interaktion mit mehreren Aminosäureresten folgt. Über die Veränderung der Substratstruktur durch eine Substitution zu einer Carbonylfunktion,

²durchgeführt von Dr. Michael Lisurek, AG Kühne, FMP

ergeben sich in beiden Fällen Wechselwirkungen mit dieser Gruppe. Der Bindungsstudie folgend weist die Phosphonsäure gegenüber MtpA eine Interaktion der Keto-Funktion mit Asp126 auf, wie sie auch für die Bindung des natürlichen Substrates angenommen wird (Abb. 4.2; *links*). Im Falle der Bindung gegenüber der SH2-Domäne von STAT5B erfolgt diese Wechselwirkung mit einem Asparaginrest innerhalb der Bindungsdomäne (Abb. 4.2; *rechts*), sodass für die Substanzklasse der Benzoylphosphonsäuren eine ausreichend hohe Affinität für den Einsatz als photoreaktives Bioisoster gegeben ist.

4.1.1.1 Photochemische Eigenschaften von Benzoylphosphonsäuren

Die photochemische Anregung einer Ketofunktion zu einem Biradikal stellt einen reversiblen Prozess dar, der einem Elektronenübergang innerhalb der C=O-Bindung folgt. Dabei erfolgt ein Einelektronenübergang des gemäß Molekülorbitaltheorie vorliegenden nichtbindenden sp^2 -ähnlichen n -Orbitals, in ein energetisch höher gelegenes antibindendes Orbital (π^*). Diese Anregung bedarf zwar einer geringeren Energie, jedoch stellt diese laut den Auswahlregeln einen verbotenen Übergang dar und besitzt eine deutlich geringere Häufigkeit als der $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang. Der vorliegende Singulettzustand $S_{n\pi^*}$ kann durch einen strahlungsfreien Energietransfer dem *intersystem crossing* in den kurzlebigen Triplettzustand $T_{n\pi^*}$ übergehen, welcher dem Biradikal entspricht (Abb. 4.3).

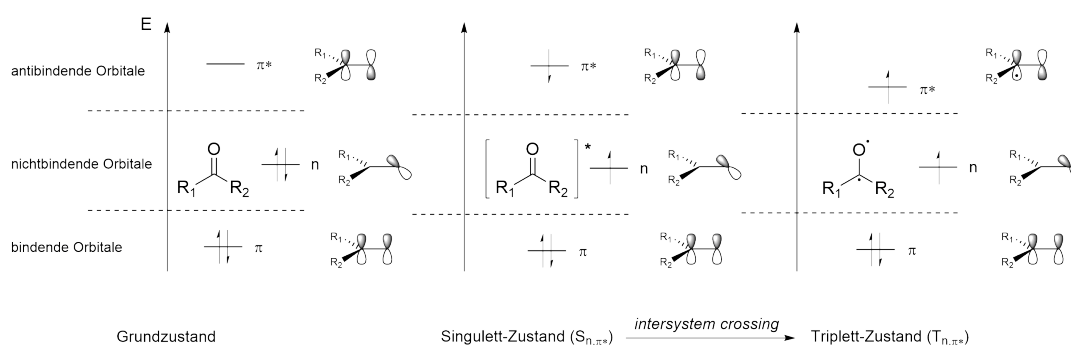


Abb. 4.3 Ausschnitt des Energieniveauschemas der photochemisch relevanten Molekülorbitale.

Für Benzophenon (Anregungswellenlänge ~ 350 nm) wird für den $n \rightarrow \pi^*$ Triplettzustand, je nach seiner chemischen Umgebung, eine Lebensdauer von 80 bis 120 μ s angegeben.^[130] Der elektronisch angeregte Zustand einer Gruppe kann über verschiedene Relaxationspro-

zesse in einen energetisch tiefer liegenden Zustand übergehen. Neben den strahlungslosen Übergängen *intersystem crossing* und *internal conversion*, dem Übergang in einen höheren Schwingungszustand eines tiefer gelegenen Elektronenzustandes, kann es zu einer Emission von Licht kommen. Dabei wird je nach vorliegender Spinmultiplizität zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden (Abb. 4.4).

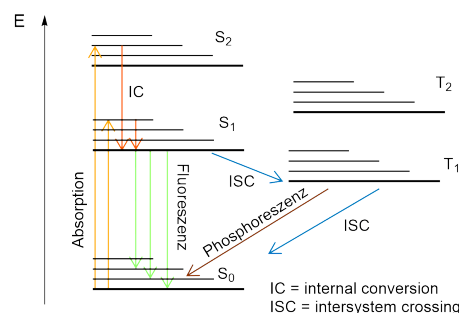


Abb. 4.4 Modifiziertes Jablonski-Termschema.

Der reversible Anregungsmechanismus zu einem Biradikal konnte in vorherigen Arbeiten innerhalb des Arbeitskreises AG Rademann validiert werden. So unterliegt Benzoylphosphonsäure **1** in Anwesenheit von *iso*-Propanol unter Bestrahlung³ bei einer Wellenlänge von 365 nm einer Dimerisierungsreaktion zu drei Stereoisomeren (*meso*-Verbindung **2** sowie die Enantiomere **3**, *R,R* und *S,S*) (Abb. 4.5). *iso*-Propanol stellt in diesem Zusammenhang einen H-Radikaldonator dar und diente auch in Untersuchungen des photochemischen Verhaltens von Benzophenon.^[130,132]

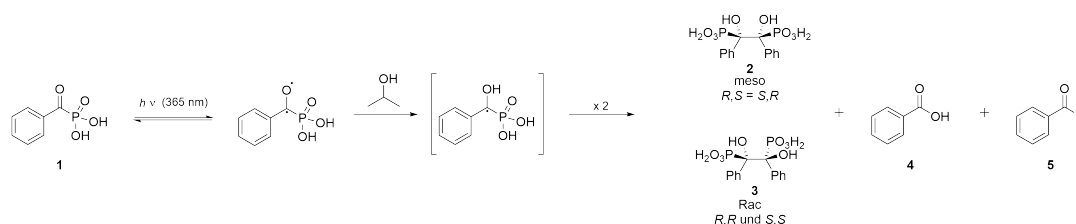


Abb. 4.5 Bestrahlungsinduzierte Dimerisierung von Benzoylphosphonsäure und die gebildeten Nebenprodukte.

³Benzoylphosphonsäure: $\epsilon_{365} = 96 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ in H₂O
 Benzophenon: $\epsilon_{344} = 100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ in Hexan.

Neben den Dimerierungsprodukten können weitere Verbindungen beobachtet werden, die im Zuge anderer photochemischer Prozesse gebildet werden. Die Hauptnebenprodukte stellen dabei die Benzoesäure **4** sowie der Benzaldehyd **5** dar.

Quantifizierung der Produkte der Photoreaktion

Um die Effizienz des photochemischen Potenzials beurteilen zu können, sollte eine Möglichkeit gefunden werden die Bildung der Dimerisierungsprodukte zu quantifizieren. Die Stereoisomere konnten zwar isoliert und charakterisiert werden, jedoch kann die Isolation dieser Verbindungen ausschließlich mittels HPLC erfolgen. Ferner besitzen die Stereoisomere aufgrund ihres hohen polaren Charakters eine stark verkürzte Retentionszeit und ein Absorptionsspektrum, das mit dem des Laufmittels Acetonitril überlappt. Diese Eigenschaften führen im Zuge einer HPLC-chromatographischen Isolierung zu keinen repräsentativen Ausbeuten. Mit einer Modifikation der Benzoylphosphonsäure sollten die individuellen Eigenschaften soweit optimiert werden, dass die gebildeten Dimere eine höhere Reaktionszeit und ein verändertes Absorptionsspektrum aufweisen. Das nach der H-Radikalaufnahme gebildete Monoradikal (vgl. Abb. 4.5) besitzt einen nahezu planaren Charakter.^[130] Um eine vergleichbare Radikalkombination ermöglichen zu können, sollte die Modifikation einen vergleichsweise geringen sterischen Effekt ausüben, sodass als Zielverbindung die *para*-methyl-substituierte α -Ketophosphonsäure **8** gewählt wurde (Abb. 4.6).

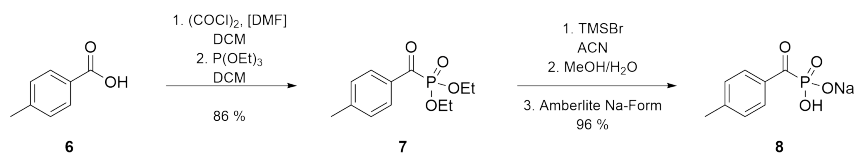


Abb. 4.6 Synthese von (4-Methyl-benzoyl)phosphonsäure.

Als Startsubstanz diente 4-Methylbenzoesäure **6**, welche zunächst mittels Oxalylchlorid aktiviert und anschließend in einer Michaelis-Arbusow-Reaktion zum diethylgeschützten Phosphonat **7** umgesetzt wurde. Die Hydrolyse der Esterfunktionen erfolgte mikrowellenunterstützt durch den Einsatz von TMSBr. Die anschließende Hydrolyse des Silylesters erfolgte in einem Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1). Im letzten Schritt wurde die

erhaltene Phosphonsäure mittels Amberlite® Ionentauscherharz (IR120 Natriumform) in die Natriumsalzform **8** überführt.

Die Überführung der Benzoylphosphonsäuren in ihre Salzform stellt einen entscheidenden Schritt dar. Benzoylphosphonsäuren besitzen eine Instabilität in ihrer vollständig protonierten Form und unterliegen Hydrolyse- und anderen Zersetzungsreaktionen, sodass die protonierten Säuren bedingt lagerfähig sind. Zudem werden die Benzoylphosphonsäuren nach dem Natriumaustausch in einer festen Form erhalten, was ihre Handhabbarkeit erleichtert.

Nach dem Erhalt der *para*-methylierten Phosphonsäure **8** wurde diese in Anwesenheit von *iso*-Propanol bei einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt. Während der Photoreaktion wurden nach definierten Zeiten Aliquots entnommen und diese mittels analytischer HPLC untersucht. Nach der vollständigen Umsetzung zu den Photoprodukten wurden die stereoisomeren Dimere **9a** und **9b** isoliert und deren Peakfläche bei einer Wellenlänge von 220 nm bei bekannten Konzentrationen bestimmt. Die Linearitätsbestimmung zwischen Substanzmenge und der Peakfläche erfolgte für die Nebenprodukte 4-Methylbenzoesäure **10** und 4-Methylbenzaldehyd **11** bei der Wellenlänge von 250 nm. Für das Edukt 4-(Methylbenzoyl)phosphonsäure **8** erfolgte dies bei den Wellenlängen 220 nm und 250 nm. Ein Gemisch aller Substanzen identischer Konzentration diente als Referenz, aus der die Korrekturfaktoren für die Photoprodukte erhoben wurden. Die Referenzierung auf eine Phosphonsäurelösung einer Konzentration von $0.5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ ermöglichte die Quantifizierung der im Zuge einer Bestrahlung gebildeten Produkte (Abb. 4.7).

In dem zeitabhängigen Umsatz von 4-(Methylbenzoyl)phosphonsäure in Gegenwart von *iso*-Propanol zeigte sich dessen hohe Photoreaktivität. Während in Abwesenheit eines Protonendonatorsystems nur ein langsamer Zersetzungsprozess zu beobachten war, betrug die Halbwertszeit in *i*PrOH bei einer Bestrahlung etwa 15 min, sodass nach 60 min nur noch 4 % der ursprünglichen Stoffmenge von **8** nachweisbar war (Abb. 4.7; unten, links). Bei der Betrachtung des Produktbildungsverhältnisses zeigt sich, dass verstärkt die Photodimere *Meso* und *Rac* gebildet wurden (Abb. 4.7; unten, rechts). Das Verhältnis der Dimere betrug $\approx 2 : 1$ zugunsten des kinetisch und thermodynamisch begünstigten *Meso*-Produktes. Die Umsetzung zu den Nebenprodukten **10** und **11** folgte einem nahezu linearen Verlauf und betrug einen geringen Anteil an der Gesamtstoffmenge. Die Addition aller Mengenteile ergab innerhalb der ersten 60 min ca. 80 % der eingesetzten Stoffmenge, sodass die Dime-

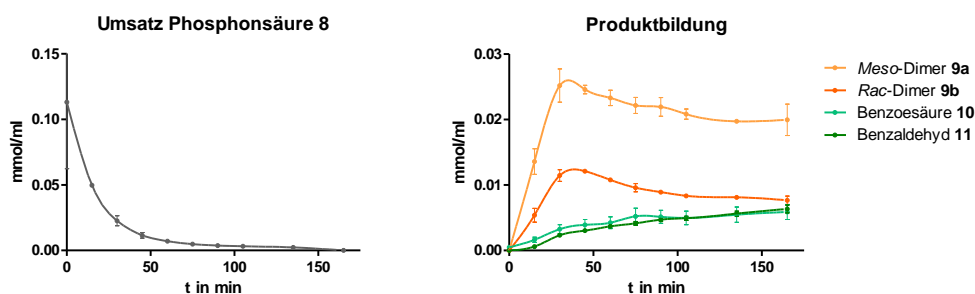
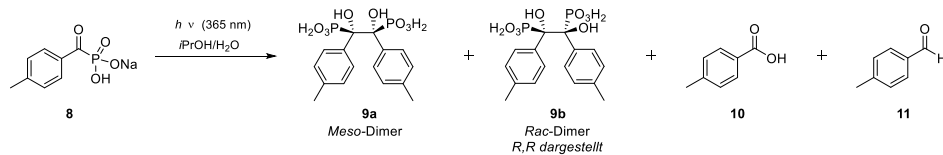


Abb. 4.7 oben: Photoreaktion von 4-(Methyl-benzoyl)phosphonsäure; unten, links: Zeitabhängiger Umsatz der Phosphonsäure; unten, rechts: Zeitabhängige Bildung der Photoprodukte.

risierungsreaktion als die bevorzugte Umsetzung anzusehen ist.

Einflüsse auf die Photoreaktion

Obleich anhand der vorliegenden Ergebnisse ein Anregungsmechanismus auf Basis einer Biradikalbildung postuliert werden kann, wurden weitere Experimente hinsichtlich der Eigenschaften der Photoreaktion durchgeführt.

Durch die Zugabe des stabilen Radikals TEMPO (**T**etramethylpiperidiny **N**-oxid) sollte untersucht werden, ob dieses als Radikalfänger agiert und somit eine Photoreaktion unterdrückt. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf eine photochemische Radikalbildung. Mercaptane wie Glutathion und Dithiothreitol (DTT) sind bekannt dafür die photochemisch induzierte Zwischenstufe von Benzophenon zu reduzieren und somit die Folgereaktionen der gebildeten Radikale zu vermindern.^[133] Der Einfluss dieser Additive auf die Photoreaktion der Benzoylphosphonsäure **8** ist in Abb. 4.8 dargestellt⁴.

Dem HPLC-Chromatogramm der Bestrahlung ohne den Zusatz der zu untersuchenden

⁴Bestrahlung bei 365 nm für 30 min in *i*PrOH / H₂O

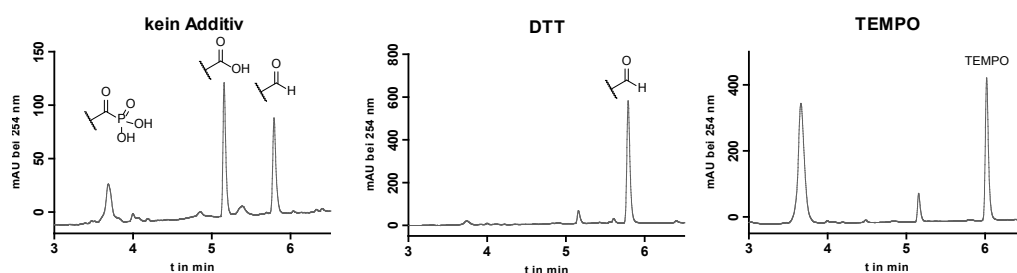


Abb. 4.8 HPLC-Chromatogramme der Photoreaktion von 4-(Methyl-benzoyl)phosphonsäure in An- und Abwesenheit von DTT und TEMPO

Additive lässt sich die Reaktion zu den bekannten Nebenprodukten der Benzoesäure und des Benzaldehydes entnehmen (Abb. 4.8; *links*). Die Darstellung der Produktbildung folgt hier anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm, um einen qualitativen Einfluss besser beurteilen zu können. Die Dimere können dieser Darstellung nicht entnommen werden, da diese keine Absorption im aromatischen Wellenlängenbereich besitzen. In Anwesenheit von DTT kann beobachtet werden, dass nahezu ausschließlich die Bildung des Benzaldehyds erfolgt (Abb. 4.8; *mitte*). Ferner wurde die Phosphonsäure in diesem Reaktionsansatz nahezu vollständig umgesetzt, was die hohe Reaktivität der photochemisch angeregten Zwischenstufe mit DTT aufzeigt. Die beobachtete Reaktivität ist dabei ausschließlich bestrahlungsinduziert, da in Reaktionsansätzen ohne Bestrahlung auch nach stark verlängerter Reaktionszeit kein Umsatz beobachtet werden konnte.

Das stabile Radikal TEMPO sollte als Abfangreagenz den postulierten Radikalmechanismus unterstützen. Im Zuge der Bestrahlung in Anwesenheit von TEMPO konnte beobachtet werden, dass die Photoreaktion der Benzoylphosphonsäure stark unterdrückt wurde, sodass nach einer 30 minütigen Bestrahlung bei 365 nm kaum Umsatz beobachtet werden konnte (Abb. 4.8; *rechts*). Ferner konnte die zeitabhängige Bildung eines stark unpolaren Nebenproduktes bei erhöhter Retentionszeit (*nicht dargestellt*) sowie einer Verbindung ohne Absorptionseigenschaften beobachtet werden. Die Molekülmassen dieser Verbindungen entsprechen denen einer Radikalkombination zwischen TEMPO und den Produkten nach einer P-C-Spaltungsreaktion (Abb. 4.9).

Die dargestellte Umsetzung würde entsprechend der Norrish Typ I Reaktion folgen, die ein bekannter Mechanismus nach einer photochemischen $n \rightarrow \pi^*$ Anregung einer Carbonylgruppe ist.^[133,134] Die Molekülmassen der Nebenprodukte **12** und **13** finden sich zwar in

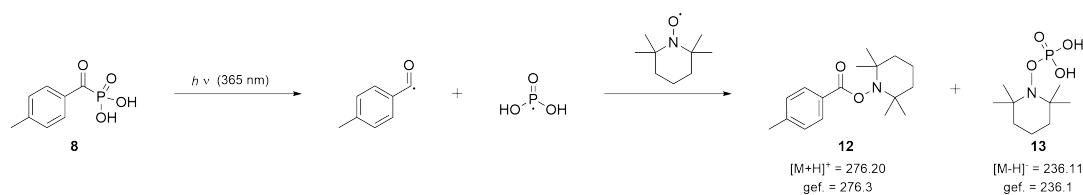


Abb. 4.9 Mögliche Reaktion zu den Produkten der beobachteten Molekülmassen.

beiden Ionisierungsmodi mit einer signifikanten Häufigkeit, jedoch konnte keine Isolierung und Charakterisierung der Substanzen erfolgen, sodass kein weiterer Nachweis dieses Reaktionsweges möglich war. Aufgrund der unterdrückten Reaktivität der Benzoylphosphonsäure konnte diese auch nach einer Bestrahlungszeit von 120 min nachgewiesen werden. Ein vollständiger Umsatz war erst nach 240 min zu beobachten.

Anhand dieser Beobachtungen ist die photochemische Anregung der α -ständigen Carbonylgruppe zu einem Biradikal als der wahrscheinlichste Reaktionsmechanismus anzusehen. Die Reaktivität gegenüber DTT bzw. die Unterdrückung einer Radikalkombination durch dieses stellt hingegen einen relevanten Umstand bzgl. der Verwendung von Benzoylphosphonsäuren in biochemischen Systemen dar.

4.1.1.2 Säurestärke der Benzoylphosphonsäuren

Die Bindung eines Phosphotyrosinmimetikums gegenüber einer Erkennungsdomäne wird in großem Maße von dessen Säurestärke mitbestimmt. Der unter physiologischen Bedingungen vorliegende Protonierungszustand sollte dabei dem des natürlichen Substrates p-Tyr nahe kommen, um vergleichbare polare Wechselwirkungen ausbilden zu können. So wird die Affinitätssteigerung mit der Verwendung einer α, α -Difluormethylengruppe innerhalb von PTP-Inhibitoren unter anderem mit einem erhöhten Deprotonierungsgrad begründet.^[71] Es konnte beobachtet werden, dass dargestellte Benzoylphosphonsäuren nach der Überführung in ihre stabilere Salzform eine saure Reaktion im wässrigen Milieu zeigten. Um den tatsächlichen Deprotonierungszustand der Benzoylphosphonsäuren und deren pK_{S2} -Wert beurteilen zu können, wurden zwei unterschiedliche Proben des Natriumsalzes der Benzoylphosphonsäure **8** mit einer 0.1 M NaOH Lösung titriert (Abb. 4.10). Mit dem Erhalt der Titrationskurven zeigte sich, dass die Phosphonsäure nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscherharz nicht, wie häufig angenommen, vollständig deprotoniert

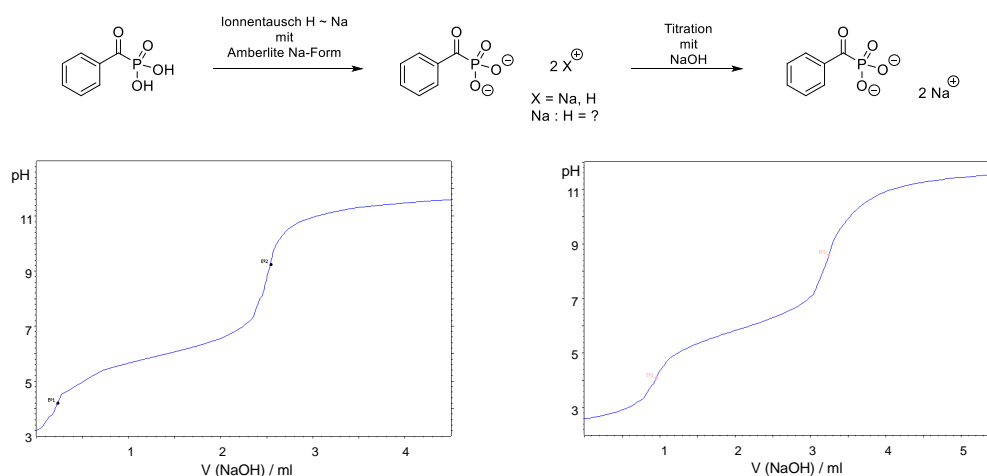


Abb. 4.10 oben: Schema der Titration von Natriumbenzoylphosphonsäure; unten: Darstellung der erhaltenen Titrationskurven.

vorliegt. Aus der Berechnung des Verbrauchs der NaOH-Lösung ergab sich für die beiden Proben ein Deprotonierungsgrad von 0.9 bzw. 0.6. Somit liegt die Benzoylphosphonsäure nach dem Kationentausch trotz der erhöhten Stabilität weniger als 1-fach deprotoniert vor. Daher erfolgt die graphische Darstellung von Benzoylphosphonsäuren, die mit dem Ionentauscherharz (Amberlite® IR120 Natriumform) deprotoniert wurden in ihrer Mononatriumform. Den Titrationskurven ließ sich ferner graphisch der pK_{S2} -Wert entnehmen, der mit ca. 6.0 in der Größenordnung des natürlichen Substrates pTyr ($pK_{S2} = 6.22$) liegt.^[135] Mit diesen Eigenschaften sollten die Benzoylphosphonsäuren unter physiologischen Pufferbedingungen dem anionischen Zustand von pTyr entsprechen und vergleichbare polare Wechselwirkungen mit einem pTyr-erkennenden Protein ausbilden.

4.1.2 Synthese von Benzoylphosphonsäuren

Die bekannteste Reaktion zu Acylphosphonsäuren ist die Umsetzung des Säurehalogenides mit einem Trialkylphosphit. Die Michaelis-Arbusow-Reaktion liefert dabei zunächst die labilen α -Ketophosphonsäureester, welche dann mittels TMSBr zu den Acylphosphonsäuren hydrolysiert werden (Abb. 4.11).

Die Darstellung der Ketophosphonate erfolgt üblicherweise ausgehend von zuvor zum

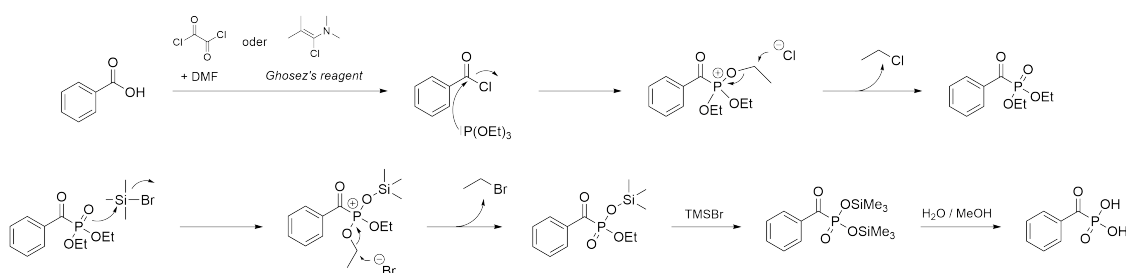


Abb. 4.11 oben: Schema der Michaelis-Arbusow-Reaktion am Beispiel von Benzoylchlorid und Triethylphosphit;

unten: Hydrolyse des Phosphonsäureesters durch TMSBr.

Säurechlorid aktivierten Phosphonsäuren. Als Reagenz dient dabei vor allem Oxalylchlorid in Anwesenheit einer katalytischen Menge Dimethylformamid über die *in situ* Generierung des Vilsmeier-Haack Komplexes. Diese Reaktivität ist im sog. *Ghosez's reagent* bereits enthalten, sodass diese Verbindung eine elegante, wenn auch kostenintensivere Alternative darstellt. Mechanistisch erfolgt die Michaelis-Arbusow-Reaktion unter dem nukleophilen Angriff des Phosphits und anschließendem rückseitigen Angriff des eliminierten Halogenides. Ein vergleichbarer Reaktionsmechanismus liegt bei der Hydrolysereaktion unter der Verwendung von TMSBr vor (Abb. 4.11; unten). Bei beiden Reaktionen werden gasförmige Alkylhalogenide gebildet, die bei höherer Konzentration ein gesundheitliches Gefahrenpotenzial besitzen.

4.1.2.1 Synthese der fluoreszenzmarkierten Benzoylphosphonsäure

Um eine kovalente Reaktion zwischen den Benzoylphosphonsäuren und den zu untersuchenden Proteinen beurteilen zu können, sollte die Darstellung einer fluorophorhaltigen Sonde erfolgen. Mit der Verwendung eines fluoreszenten Strukturelements bietet sich die Möglichkeit der Validierung einer kovalenten vernetzenden Reaktion über die Fluoreszenzmarkierung des Proteins nach gelelektrophoretischer Trennung.

Die α -Ketofunktion von Benzoylphosphonaten besitzt eine hohe Reaktivität gegenüber dem Angriff von Nucleophilen. So reagieren Benzoylphosphonsäureester quantitativ mit primären und sekundären Aminen unter Eliminierung der Phosphonatgruppe. Mit dieser Eigenschaft erwies sich die direkte Synthese einer Sonde, die Fluorophor und Benzoylphosphonsäure in einer Struktur vereinbart, trotz der Wahl verschiedenster Schutzgruppensysteme.

me, als wenig zielführend. Die gewählten Zielstrukturen konnten zwar erhalten werden, jedoch nur in geringen Ausbeuten, sodass ein alternativer Darstellungsweg gewählt wurde. Durch die Verknüpfung beider Strukturelemente als finale Stufe sollte die Reaktivität der Ketofunktion umgangen und die Zielverbindung erhalten werden. Zunächst wurden dazu die beiden Synthons **17** und **22** dargestellt (Abb. 4.12 und 4.13).

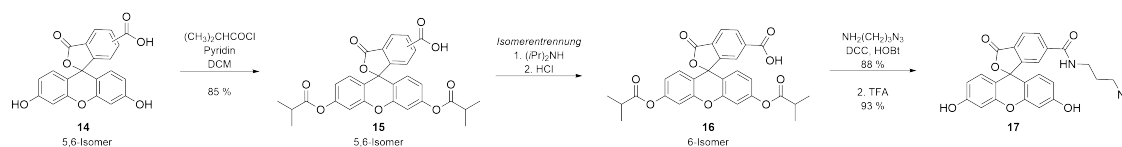


Abb. 4.12 Darstellung des Fluorescein-haltigen Fragments.

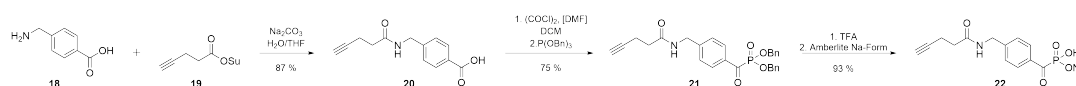


Abb. 4.13 Darstellung des Benzoylphosphonsäurefragments.

Die Darstellung des Fluoresceinfragments erfolgte ausgehend von einem 5,6-Isomeregemisch von Carboxyfluorescein⁵. Als Schutzgruppe der phenolischen Hydroxyfunktionen wurde die Isobutyrylgruppe gewählt, die eine geringere Stabilität gegenüber sauren Bedingungen besitzt, als die häufig verwendete Pivaloylgruppe. Die Isomerentrennung erfolgte durch die Zugabe der Aminbase Diisopropylamin, wobei 6-Carboxyfluorescein als Diisopropylammoniumsalz präzipitiert. Nach der Überführung in die korrespondierende Säureform wurde das 6-er Isomer **16** mit 3-Azidopropylamin unter Peptidkuppelungsbedingungen umgesetzt und anschließend mittels Trifluoressigsäure entschützt (Abb. 4.12).

Der Darstellung des Phosphonsäurefragments **22** diente 4-Aminomethylbenzoesäure als Startsubstanz. Die Alkinfunktion wurde im wässrigen Milieu über die Umsetzung mit Pentinsäuresuccinimidylester **19** eingeführt, da die Verwendung von Aktivierungsreagenzien wie DIC oder DCC zu ungewollten Nebenreaktionen führen würde. Die Umsetzung zum Benzoylphosphonsäureester **21** erfolgte über die Michaelis-Arbusow-Reaktion mit Tribenzylphosphit. Der Phosphonsäureester wurde als Benzylvariante dargestellt, da die

⁵Die Darstellung von 5,6-Carboxyfluorescein ist im Kapitel *Experimenteller Teil* beschrieben.

Alkingruppe während der Behandlung mit TMSBr einer Hydrobromierungsreaktion unterliegt, die Benzylgruppe hingegen mit TFA entfernt werden kann (Abb. 4.13).

Im finalen Schritt wurden die beiden Fragmente in einer Cu(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition umgesetzt (Abb. 4.14).

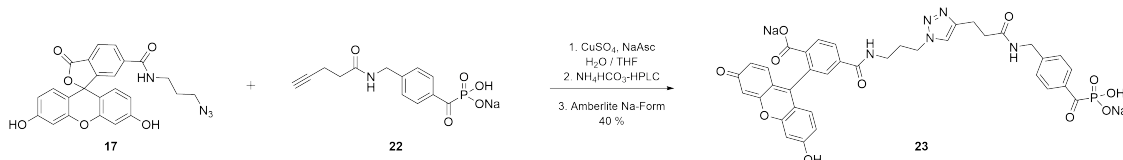


Abb. 4.14 Darstellung der fluoreszenten Benzoylphosphonsäure.

Die Reaktion der beiden Fragmente wurde in einem Gemisch aus Wasser und THF (4 : 1) durchgeführt. Nach der erfolgreichen Umsetzung zu der Zielverbindung wurde der Reaktionsansatz mittels basisch gepufferter HPLC aufgereinigt. Die Verwendung eines basischen Milieus erfolgte aufgrund der Instabilität der α -Ketophosphonsäuren unter wässrig-sauren Bedingungen. Substanzen, die unter über ein 0.1 % TFA gepuffertes System isoliert wurden, unterlagen während ihrer Lyophilisation signifikanten Zersetzungsreaktionen und konnten darauffolgend nicht rein erhalten werden. NH₄HCO₃ wird als flüchtige Puffer-substanz verwendet und besitzt bei einer Konzentration von 50 mM einen pH Wert von 8. Nach der Lyophilisation der isolierten Endstufe wurde die Fluorescein-markierte Benzoylphosphonsäure zunächst als NH₄-Salz erhalten und anschließend in ihre Natriumform 23 überführt.

Mit der erfolgreichen Darstellung eines fluorophor-markierten photoreaktiven Phosphotyrosinmimetikums, sollte dieses in der Untersuchung von Proteinvernetzungsreaktionen eingesetzt werden.

4.1.2.2 Synthese der nicht-natürlichen Aminosäure pcPhe

Der bedeutendste Aspekt bei der Entwicklung von Inhibitoren ist der Erhalt einer hohen Affinität gegenüber dem Zielprotein. Wenn das natürliche Erkennungsmotiv ein Substrat oder einen Liganden mit einem peptidischen Grundgerüst darstellt, erfolgt dessen Bindung in der Regel über multiple Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der vorliegenden Aminosäuresequenz des Bindungspartners. Somit ist die Verwendung der natürlichen Sequenz in Form von peptidischen Inhibitoren häufig ein zielführender Weg. Die Darstellung

von Peptidomimetika erfolgt in der Regel Festphasen-unterstützt unter der Verwendung der Fmoc-Strategie (Abb. 4.15).

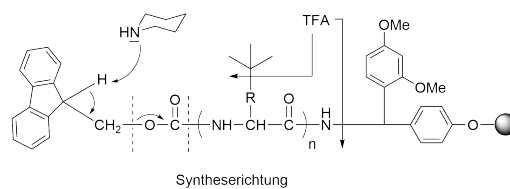


Abb. 4.15 Schematische Darstellung der Fmoc-Strategie unter Verwendung eines Rinkamidlinkers.

Die Festphasen-unterstützte Peptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) wurde von R. B. Merrifield im Jahre 1963 beschrieben und ermöglicht die Synthese von Polypeptiden in C→N Richtung.^[136] Genutzt wird dabei ein orthogonales Schutzgruppensystem des N-Terminus gegenüber dem C-Terminus und reaktiven Seitenketten der Aminosäuren. In der Fmoc-Strategie wird dabei N-terminal die basenlabile N-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) verwendet. Diese temporäre Schutzgruppe kann mittels Aminbasen wie Piperidin selektiv entfernt werden, sodass die NH₂-Funktion der Aminosäure zur Kettenverlängerung zur Verfügung steht. Die finale TFA-saure Entfernung der Seitenschutzgruppen sowie die C-terminale Abspaltung vom Linker liefert das ungeschützte Peptid in hoher Reinheit.

Für die Anwendung in der Festphasenpeptidsynthese sollte die Synthese eines geschützten Aminosäurebausteins erfolgen, sodass Peptide erhalten werden können, die eine Benzoylphosphonsäure als pTyr-Mimetikum enthalten. Die Darstellung der Festphasengeeigneten nicht-proteinogenen Aminosäure Phosphonocarbonylphenylalanin konnte bereits in vorherigen Arbeiten erfolgreich umgesetzt werden.⁶ Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden die Reaktionswege und chemischen Ausbeuten optimiert (Abb. 4.16).

Als Startsubstanz der Synthese diente die kommerziell erhältliche Aminosäure Boc-Tyr-OMe **24**, welche zunächst mit N-Phenyl-bis-(trifluormethansulfonyl)-imid umgesetzt wurde. Mit der Einführung der Trifluormethylsulfonyl-Abgangsgruppe sollte eine C-C-Knüpfungsreaktion über eine palladiumkatalysierte Hydroxycarbonylierung unter Verwendung von gasförmigem Kohlenmonoxid erfolgen.^[137] Während dieser Reaktion wurde statt des Liganden dppf (*1,1'*-Bis-(**d**iphenyl**p**hosphin)-ferrocen) der ebenfalls zweizäh-

⁶Wagner, S.; Masterarbeit; 2009; AG Rademann.

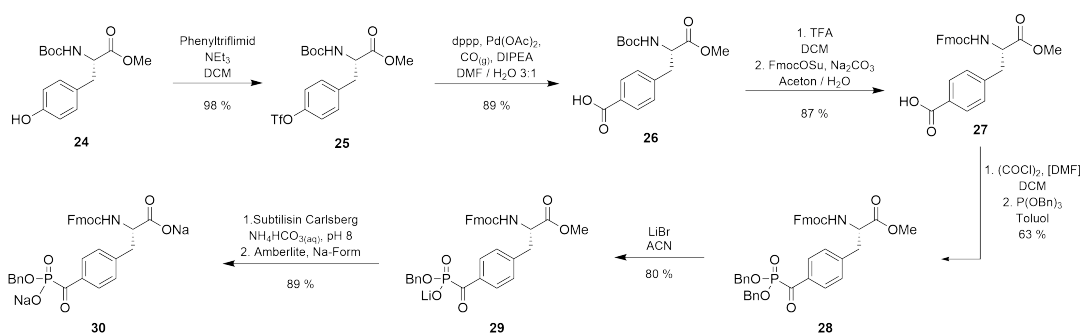


Abb. 4.16 Synthese des Festphasen-geeigneten Bausteins der Aminosäure Phosphonocarboxylphenylalanin.

nige Ligand dppp (3-Bis-(**d**iphenyl**p**hosphin)-**p**ropan) verwendet, wodurch die Ausbeute von 75 % auf 89 % gesteigert werden konnte.^[138] Die Verwendung des Atemgiftes Kohlenmonoxid stellt ein hohes Gefahrenpotenzial dar, weshalb diese Reaktion unter besonderer Vorsicht durchgeführt wurde.⁷ Während der Hydroxycarbonylierungsreaktion kann es abhängig von den Reaktionsbedingungen zur Racemisierung des Stereozentrums der vorliegenden Aminosäure kommen. Die Bestimmung der optischen Drehung von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-carboxy-phenylalaninmethylester **26** lieferte einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +9.9^\circ$ (Lit.:^[137] $[\alpha]_D^{20} = +4.0^\circ$). Die chromatographische Trennung mittels chiraler HPLC-Materialien lieferte keinen Hinweis auf einen teilweisen Verlust der stereochemischen Information.

Für eine spätere Anwendung in der Festphasensynthese musste der Wechsel der *N*-terminalen Schutzgruppe von Boc hin zu Fmoc erfolgen. Die initiale Verwendung der säurelabilen *N*-*tert*-Butyloxycarbonylgruppe erfolgte aufgrund der Instabilität der Fmoc-Gruppe unter den Bedingungen der Hydroxycarbonylierung. Der Schutzgruppenwechsel wurde unter üblichen Bedingungen, der TFA-sauren Entschützung und der wässrig basischen Einführung der Fmoc-Gruppe mittels Fmoc-OSu umgesetzt.

Nach dem Erhalt des *N*-Fmoc geschützten 4-Carboxyl-phenylalaninmethylesters **27** folgte die Einführung der Phosphonatstruktur mittels der Michalis-Arbuzow Reaktion unter Verwendung von Tribenzylphosphit. Das erhaltene Ketophosphonat **28** besitzt, wie bereits beschrieben, eine hohe Reaktivität gegenüber Nucleophilen und kann nur unter dem Zusatz von Säure (AcOH) chromatographisch isoliert werden.

Da während der Festphasenpeptidsynthese Aminbasen wie Piperidin verwendet werden

⁷Kohlenmonoxid wurde als Gaskartusche über Fa. Linde bezogen; Alternativ kann dieses über eine Gasapparatur mittels konz. H₂SO₄ in Ameisensäure entwickelt werden.

und Benzoylphosphonsäuren eine nachgewiesene Reaktion mit diesen eingehen,^[139] musste die Reaktivität der Ketofunktion vermindert werden. Aufgrund der erhöhten negativen Ladung, würde die vollständige Entschützung zur Phosphonsäure den Angriff nukleophiler Substanzen unterdrücken. Jedoch können diprotonige Phosphonsäuren mit Aktivierungsreagenzien wie Carbodiimiden aktiviert werden, was zu ungewollten Nebenreaktionen führen würde. Mit einer 1-fachen Entschützung des Phosphonsäureesters konnte sowohl die Stabilität der Ketofunktion als auch stark verminderte Reaktivität gegenüber Aktivierungsreagenzien erreicht werden. Alkalimetallhalogenide wie NaI und LiBr können für die Monodealkylierung von Alkanoyl-, Alkenoyl- und Aroylphosphonaten verwendet werden.^[140,141] Während der Behandlung der Dibenzyl-geschützten Verbindung **28** präzipitierte das Phosphonat als stabiles Monolithiumsalz **29** und konnte nach Filtration und Waschen rein erhalten werden.

Im finalen Schritt zum Erhalt der Zielverbindung **30** musste eine Verseifung des Methyl-esters erfolgen. Klassische Methoden wie der Umsatz mit Alkalihydroxiden führten im Falle der vorliegenden Verbindung zu einem gleichzeitigen Verlust der Fmoc-Gruppe sowie, trotz deren erhöhter Stabilität, der α -Ketophosphonatstruktur. Die Verwendung von bioaktiven Proteinen wie Oxidasen, Esterasen, Acylasen, Hydrolasen und vielen mehr gewinnt in der organischen Synthese immer mehr an Bedeutung.^[142,143] So findet sich in den letzten Jahren eine steigende Anzahl an Veröffentlichungen, die Begriffe wie *biocatalysis* und *enzymatic* enthalten. Chen et al. beschrieben die kinetische Racematspaltung von Aminosäuren durch die Verseifung mittels des Enzymgemisches Alcalase®⁸ (Abb. 4.17).^[144,145]

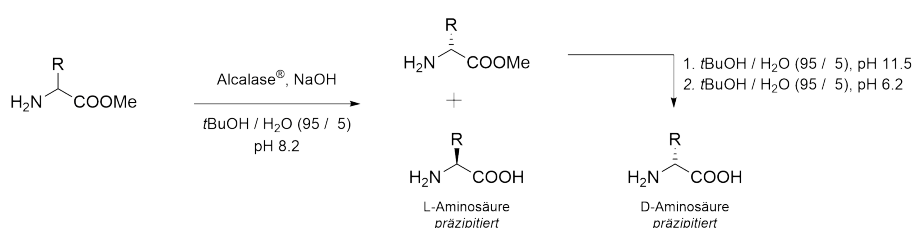


Abb. 4.17 Kinetische Racematspaltung mittels Alcalase® nach Chen et al.

Ogleich dieses System optimale Eigenschaften für die Verseifung des vorliegenden Methyl-esters aufweist, konnte diese Reaktion unter den beschriebenen Bedingungen nicht

⁸Hauptkomponente ist die Serinprotease Subtilisin Carlsberg.

reproduziert werden. Der limitierende Faktor war dabei das Löslichkeitsverhalten des Proteingemisches, welches in keinem Verhältnis von *tert*-Butanol und Wasser in Lösung gebracht werden konnte. Mit der Modifikation des Systems hin zu der Verwendung des basischen Puffers NH_4HCO_3 konnte eine Reaktivität der Alcalase® erhalten werden, sodass die enzymatische Verseifung innerhalb weniger Stunden vollständig war. Nach der Lyophilisation des Reaktionsansatzes wurde die geschützte Aminosäure zunächst als Ammoniumsalz erhalten und musste mittels Ionentauscherharz in ihre Natriumform überführt werden, da die Behandlung mit Aktivierungsreagenzien zu einer Amidierung des Carbonsäurerestes führte. Mit der finalen Umsetzung wurde die Zielverbindung **30** als Feststoff mit einem optischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +25.0^\circ$ erhalten, die über einen Lagerzeitraum von mehreren Monaten keinen Zersetzungsprozess zeigte.

4.1.2.3 Synthese pcPhe-haltiger Peptide

Mit dem Erhalt des Festphasen-geeigneten Aminosäurebausteins **30**, der nach saurer Entschützung die photoaktivierbare Aminosäure Phosphonocarbonylphenylalanin liefert, sollte diese in verschiedene Peptidomimetika eingebaut werden.

Die Beladung des verwendeten Harzes mit dem dargestellten Aminosäurebaustein sowie dessen Stabilität unter Entschützungsbedingungen bestimmen die Ausbeute der photoreaktiven Peptide. Bei der Untersuchung des Verhaltens während der Festphasenpeptidsynthese konnten folgende, zu beachtende Faktoren ermittelt werden:

- Die Verwendung des üblichen Carbonsäureaktivierungssystems DIC / HOBt erwies sich für die Kupplung der dargestellten Aminosäure als ungenügend reaktiv, sodass unter diesen Bedingungen keine vollständige Umsetzung zu beobachten war. Mit dem Einsatz des reaktiveren Reagenzes TBTU konnten hingegen vollständige Kupplungen an das Harz erreicht werden. Der Einsatz zusätzlicher Basenäquivalente sollte aufgrund der vorliegenden Deprotonierung der Na-Salzform grundsätzlich nicht notwendig sein konnte aber die Reaktionszeit verringern.
- Die Kupplung der auf pcPhe-folgenden Aminosäure zeigte unter DIC / HOBt Bedingungen verlängerte Reaktionszeiten von bis zu 6 h, sodass deren Harzbeladung auch mit dem reaktiveren System TBTU / HOBt / DIPEA realisiert wurde.

- Die Entfernung der Fmoc-Gruppe erfolgt standardmäßig mit einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF. Bei der Darstellung pcPhe-haltiger Peptide konnte mit voranschreitender Peptidkettenlänge die stetige Bildung eines Nebenproduktes beobachtet werden, dessen molare Masse dem korrespondierenden Piperidinamid nach Abspaltung der Phosphonsäuregruppe entsprach. Nach der Durchführung von 3 Abspaltungszyklen betrug das Piperidinamid etwa 20 % der Gesamtausbeute. Mit der Verwendung der nicht-nukleophilen Aminbase DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en) konnte die nukleophile Substitutionsreaktion der Phosphonsäuregruppe verhindert werden. Folglich wurde nach der Einführung von pcPhe eine 2 %ige DBU Lösung in DMF zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe verwendet.^[146]
- Die finale TFA-saure Entschützung wird in der Regel unter der Verwendung verschiedener Additive wie z.B. Silanen und Thiolen durchgeführt. Diese Abspaltungscocktails dienen dem Abfang reaktiver Abspaltungsprodukte wie z.B. dem *tert*-Butylkation und sollen Modifikationen und Umlagerungsreaktionen verhindern. Die Anwesenheit von Triisopropylsilan und Thiophenol führte jedoch im Zuge der sauren Abspaltung zu der nahezu quantitativen Bildung unbekannter Nebenprodukte. Da der Zusatz von H₂O zu keiner signifikanten Verbesserung führte, erfolgte die Abspaltungsreaktion der Einfachheit halber unter Verwendung von 100 % TFA.
- Die Aufreinigung von abgespaltenen vollentschützten Peptiden mittels HPLC ist ein notwendiger Schritt. Obgleich die Festphasenpeptidsynthese für hohe Ausbeuten und den Erhalt des Zielpeptides in hoher Reinheit bekannt ist, können mit zunehmender Kettenlänge Fehl- und Mehrfachkupplungen auftreten, welche zusammen mit anderen nicht-flüchtigen Nebenprodukten abgetrennt werden müssen. Es konnte beobachtet werden, dass pcPhe-haltige Peptide unter den Bedingungen des HPLC-Standardpuffers (0.1 % TFA) nach deren Trennung instabil waren. Die Zielpeptide konnten zwar isoliert werden, unterlagen jedoch, wie Verbindung **23**, im Zuge ihrer Lyophilisation einer Zersetzungsreaktion. Mit der Verwendung des basischen Puffers NH₄HCO₃ und der anschließenden Überführung in die Natriumsalzform konnten die Peptide rein und stabil erhalten werden.

Mit der Bestimmung der Parameter für eine größtmögliche Ausbeute und dem Erhalt von pcPhe-haltigen Peptiden in stabiler Form wurden verschiedene potenziell photoreaktive Peptidomimetika synthetisiert.

pcPhe-Peptide als Liganden für STAT5B

Der Transkriptionsfaktor STAT5B ist wichtiger Bestandteil von Signaltransduktionswegen, wie dem JAK/STAT Signalweg^[22] und besitzt C-terminal eine Phosphotyrosin-erkennende SH2-Domäne. Innerhalb des Arbeitskreises Rademann konnte eine pTyr-haltige Peptidsequenz identifiziert werden, die eine Bindungskonstante im nanomolaren Bereich gegenüber STAT5B-MBP⁹ besitzt. Die Sequenz entspricht einem abgewandelten Bestandteil der β -Untereinheit des GM-CSF Rezeptors (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) mit der Aminosäureabfolge pTyr-Leu-Ser-Leu-Pro-Pro-Trp. Diese Abfolge sollte genutzt werden, um hochaffine photoreaktive Liganden für STAT5B-MBP zu erhalten (Abb. 4.18).

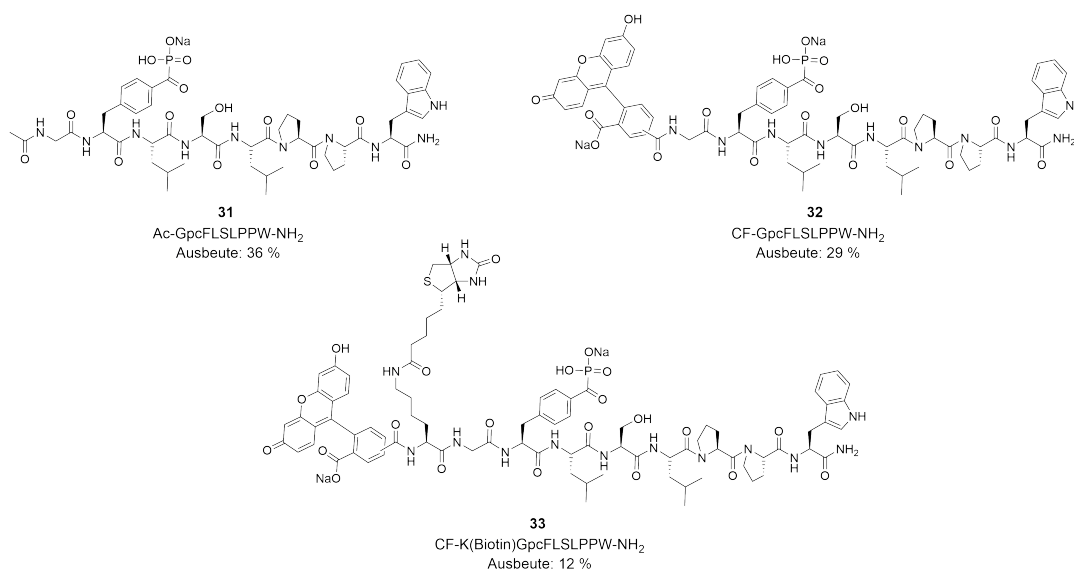


Abb. 4.18 Dargestellte pcPhe-haltige Peptide als Ligand für STAT5B-MBP.

Die Synthese der Peptide erfolgte entsprechend ihrer geplanten biochemischen Anwendung. Peptid **31** wurde als *N*-acetyliertes Derivat für die Verwendung in Verdrängungsexperimenten synthetisiert. Für die Untersuchung des photochemischen Verhaltens in Proteinvernetzungsreaktionen wurden die Peptide **32** und **33** *N*-terminal mit 5,6-Carboxyfluorescein acyliert. Neben dem Fluorophor erfolgte die Verwendung einer weiteren Markierung. Um die Anwendung innerhalb einer Affinitätschromatographie zu ermöglichen wurde **33** als

⁹Das verwendete rekombinat dargestellte STAT5B Konstrukt enthält das Proteinexpressionsauxiliar MBP (*maltose binding protein*)

dualmarkierte Verbindung synthetisiert. Dazu wurde die Sequenz um ein biotinyliertes Lysin verlängert, sodass das Peptid in Biotin-Avidin-*pulldown* Experimenten eingesetzt werden kann.

pcPhe-Peptide als Substratanaloga für PTP1B

Die Proteintyrosinphosphatase PTP1B stellt innerhalb der Familie der PTPs die wohl am meisten untersuchte Phosphatase dar und steht im Zusammenhang mit fundamentalen physiologischen Funktionen wie Zellwachstum, -teilung, -differenzierung, Metabolismus und vielen mehr.^[42] PTP1B besitzt eine erhöhte Substratspezifität, wenn sich saure Aminosäuren wie Asp und Glu *N*-terminal und hydrophobe Aminosäuren *C*-terminal zum phosphorylierten Tyrosin befinden.^[72,147] Für Untersuchungen gegenüber PTP1B wurden bekannte affine Substratsequenzen gewählt und das phosphorylierte Tyrosin durch die nicht-natürliche Aminosäure pcPhe substituiert (Abb. 4.19).^[71]

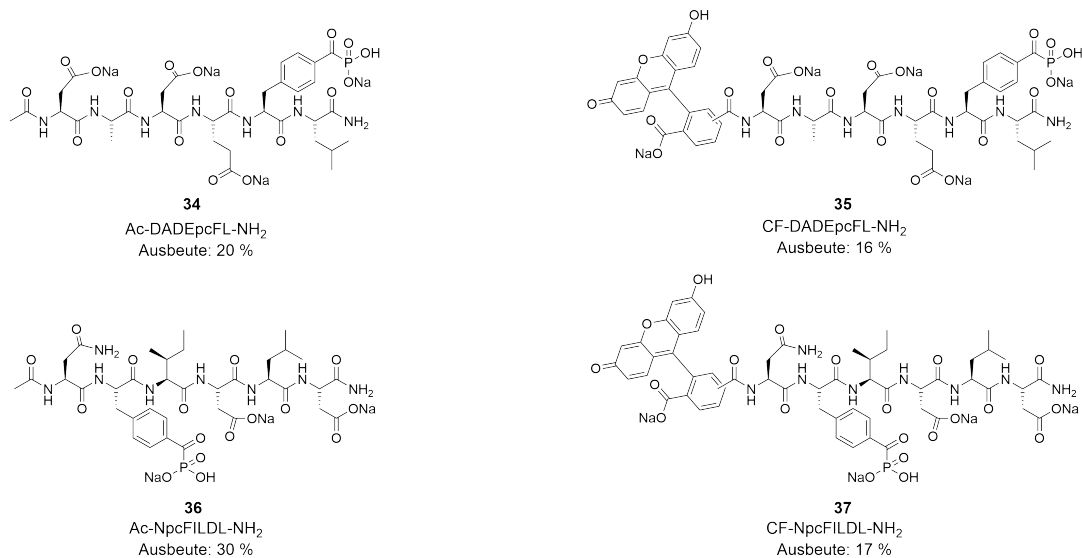


Abb. 4.19 Dargestellte pcPhe-haltige Peptide als Substratanalogen für PTP1B.

Die beiden Sequenzen wurden analog zu den STAT5B Liganden, jeweils *N*-acetyliert sowie mit 5,6-Carboxyfluorescein acyliert, dargestellt.

Da mit PTP1B im Gegensatz zum pTyr bindenden STAT5B ein substratspaltendes Enzym vorliegt, musste eine geeignete hydrolysestabile Kontrollverbindung dargestellt werden. Die

nicht-natürliche Aminosäure Phosphonodifluormethylphenylalanin (F_2pmP) stellt heutzutage das Bioisoster dar, welches in seinen Wechselwirkungen am ehesten denen des natürlichen Substrates pTyr entspricht.^[71,135,148] Obgleich unter Verwendung dieser Inhibitorstruktur hochaffine Peptide erhalten werden und der synthetische Zugang als etabliert und optimiert beschrieben ist,^[149,150] sollte als Kontrollverbindung die nicht-fluorierte Aminosäure Phosphonomethylphenylalanin (pmP) verwendet werden. Diese Wahl erfolgte aufgrund der einfacheren Synthese über weniger Stufen ohne instabile Zwischenprodukte. Dargestellt wurde Phosphonomethylphenylalanin als *N*-Fmoc- und Phosphono-diethylgeschützte Verbindung (Abb. 4.20).

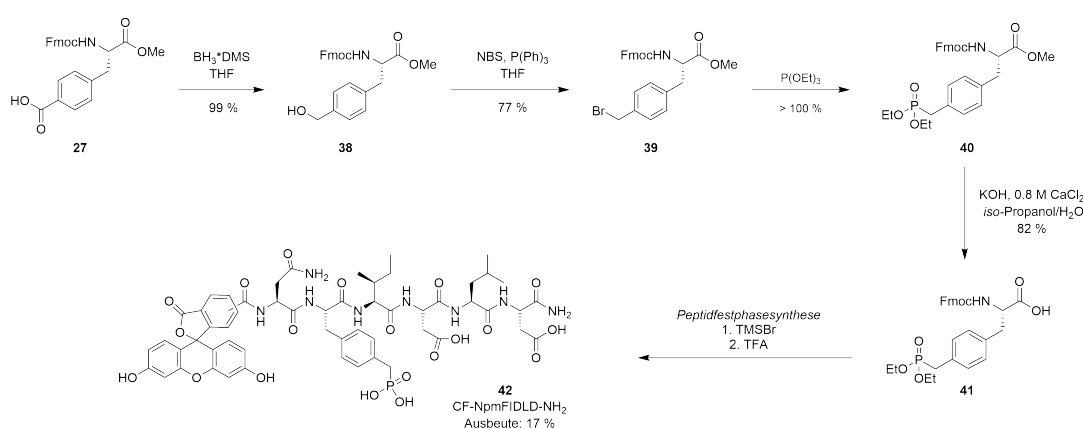


Abb. 4.20 Synthese des Fmoc-Aminosäurebausteins **41** sowie des Kontrollpeptides **42**.

Als Startsubstanz der Darstellung des festphasengeeigneten Aminosäurebausteins diente die Carbonsäure **27**, welche bereits als Zwischenprodukt der pcPhe-Synthese erhalten wurde. Im ersten Schritt erfolgte die Reduktion der Säurefunktion durch den Komplex $BH_3 \bullet DMS$ in THF. Der erhaltene Alkohol **38** wurde mit Triphenylphosphin und *N*-Bromsuccinimid in einer abgewandelten Appel-Reaktion zum Bromid **39** umgesetzt. Eine Michaelis-Arbusow-Reaktion lieferte das Diethylbenzylphosphonat **40**, welches im Folgenden verseift werden sollte. Da die enzymatische Verseifung des Methylesters mittels Alcalase® zu ungenügenden Ausbeuten führte, erfolgte die Spaltung des Esters unter basischen Bedingungen in Anwesenheit von $CaCl_2$.^[151] Der dargestellte Aminosäurebaustein **41** wurde analog zu pcPhe in eine Substratsequenz eingebaut und *N*-terminal mit 5,6-Carboxylfluorescein acyliert. Als Abspaltungsreagenzien dienen TMSBr im Überschuss sowie Trifluoressigsäure.

Mit dem Erhalt von Peptiden, die eine potenzielle Photoreaktivität sowie Affinität gegenüber dem Transkriptionsfaktor STAT5B und der Proteintyrosinphosphatase PTP1B aufweisen, sollten diese auf ihr Bindungsverhalten vor und nach einer Bestrahlung hin untersucht werden.

4.1.3 Untersuchung der Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbares pTyr-Mimetikum

Die wesentliche Frage, die sich im Zusammenhang mit der Entwicklung der Benzoylphosphonsäuren als photoreaktives pTyr-Mimetikum stellt, ist die nach der Reaktivität gegenüber Proteinen. Im Zuge der Untersuchung des photochemischen Verhaltens der Modellverbindungen Benzoylphosphonsäure und 4-Methylbenzoylphosphonsäure konnte beobachtet werden, dass diese in Anwesenheit eines Protonendonorsystems einer Radikalrekombination unterliegen. Unter der Annahme einer Bindung der Benzoylphosphonsäure an die pTyr-erkennende Domäne und der damit ausgebildeten räumlichen Nähe, sollte das Protein selbst das H-Donorsystem darstellen. In Folge einer photochemischen Anregung sind verschiedene Reaktionswege denkbar (Abb. 4.21).

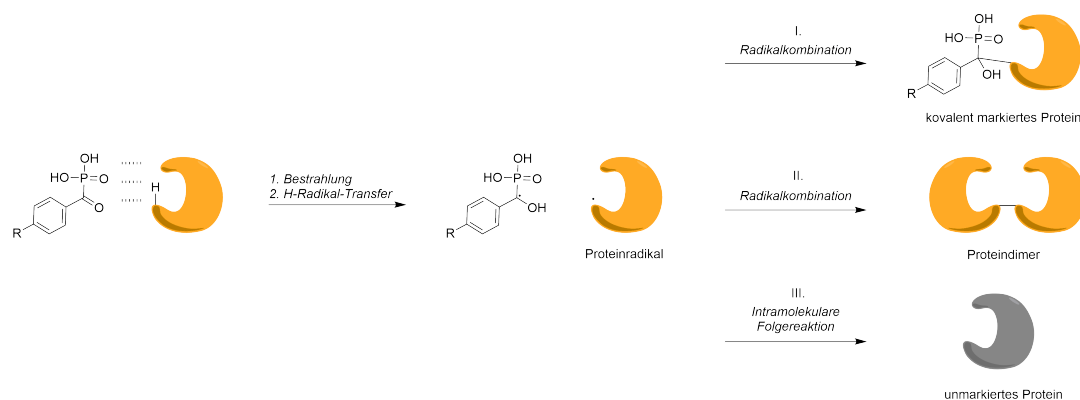


Abb. 4.21 Dargestellte mögliche Reaktionen nach der photochemischen Anregung der Benzoylphosphonsäuren.

Der Darstellung lassen sich jene Folgereaktionen entnehmen, die im Zuge der H-Radikalabstraktion erfolgen könnten. Im ersten Fall würde nach der Bestrahlung das kovalent modifizierte Protein vorliegen, was der Entwicklung der Benzoylphosphonsäuren als photovernetzendes pTyr-Mimetikum entspricht. Eine schaltbar kovalent-reagierende Sonde bietet

dessen Einsatz im Bereich des *activity-based protein profiling*, sodass pTyr-erkennende Proteine selektiv adressiert werden könnten.

Die Rekombination der Monoradikale stellte innerhalb der Photoaktivierung der Modellverbindungen die bevorzugte Reaktion dar, sodass eine Rekombination der gebildeten Proteinradikale eine mögliche, wenn auch weniger wahrscheinliche Folgereaktion ist.

Ein weiterer Reaktionsweg ergibt sich in einer intramolekularen Abreaktion des gebildeten Radikals. Aufgrund des Vorliegens von Proteinen in ihrer natürlichen Tertiärstruktur ergibt sich eine hohe räumliche Dichte, sodass eine intramolekulare Folgereaktion nicht ausgeschlossen werden kann.

Alle dargestellten Reaktionswege resultieren in Modifikationen des Proteins, die sich innerhalb der pTyr-erkennenden Domäne befinden. Mit den beschriebenen chemischen Veränderungen sollte diese nicht mehr ihrem natürlichen Verhalten, wie Ligandenbindung oder Substratspaltung folgen können, woraufhin das zu untersuchende Protein in einer inaktivierten Form vorliegt.

4.1.3.1 Benzoylphosphonsäuren und PTP1B

Enzymkinetische Untersuchung der Fluorescein-haltigen Benzoylphosphonsäure

In den ersten Untersuchungen wurde der Einfluss einer Bestrahlung auf die Proteintyrosinphosphatase PTP1B in Anwesenheit von α -Ketophosphonsäuren untersucht. Experimentell wurde dazu die Enzymaktivität von PTP1B vor und nach einer Bestrahlung bestimmt. Als Dokumentationssystem diente der *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Assay (Abb. 4.22).

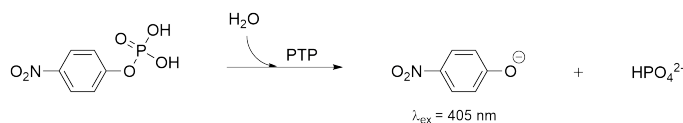


Abb. 4.22 Hydrolyse von pNPP durch eine Phosphatase.

Die Bestimmung der enzymespezifischen Aktivität erfolgt während dieses Assays über die zeitabhängige Bildung des Nitrophenolates, welches mit $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ein Absorptionsmaximum im sichtbaren Wellenlängenbereich besitzt. Der pNPP-Assay stellt ein etabliertes System für viele Phosphatasen dar und kann auch für die Bestimmung von

Bindungskonstanten fluoreszenter Inhibitoren genutzt werden. Hingegen besitzt *para*-Nitrophenolat einen pK_S -Wert von 7.1, was die Anwendbarkeit des pNPP-Assays im sauren pH-Wertbereich einschränkt.

Für die erste Beurteilung des photochemischen Desaktivierungspotenzials wurde das dargestellte Fluoresceinderivat **23** in Anwesenheit von PTP1B mit einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt und die Aktivität der Phosphatase bestimmt¹⁰ (Abb. 4.23). Während dieses und folgenden Experimenten wurde auf die Verwendung des Reduktionsmittels DTT verzichtet, da dieses die photochemischen Eigenschaften der Benzoylphosphonsäuren in großem Maße beeinflusst.

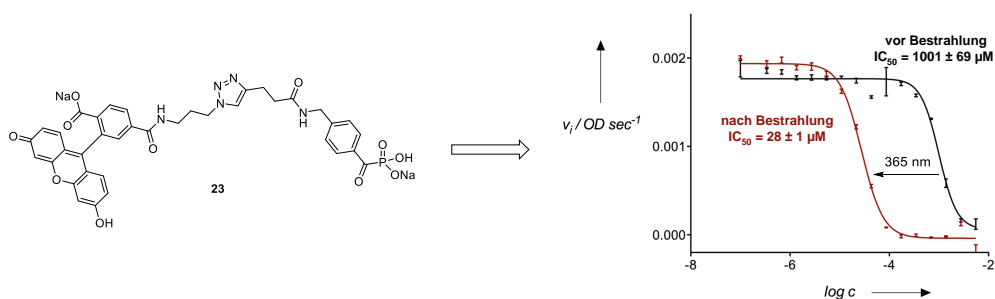


Abb. 4.23 Einfluss der Bestrahlung der Benzoylphosphonsäuren auf die Aktivität von PTP1B am Beispiel von Verbindung **23**.

Darstellung aus Horatscheck und Wagner *et al.*^[126]

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte¹¹ vor und nach Bestrahlung zeigte eindeutig die photochemische Reaktivität des Inhibitors und dessen Einfluss auf die Enzymaktivität von PTP1B. Während die Phosphatase in Abwesenheit der Benzoylphosphonsäure unter Bestrahlung keiner Desaktivierung unterlag, liegt zwischen den beiden Werten ein Faktor $IC_{50}/IC_{50(UV)}$ von ≈ 36 , sodass sich nach Bestrahlung ein IC_{50} -Wert von $28 \mu\text{M}$ ergab. Diese Beobachtung findet sich auch in der Anwendung der Modellverbindung Benzoylphosphonsäure **1** auf PTP1B und MptpA, dessen Faktoren sich im Bereich von 100 bis 400 ermitteln ließen.^[126]

Mit dem Erhalt einer Inhibitionssteigerung im Zuge einer Bestrahlung sollte untersucht

¹⁰Durchgeführt von André Horatscheck

¹¹Die Verwendung des Begriffes IC_{50} ist für einen irreversiblen Inhibitionsmodus nicht zulässig und dient hier der vereinfachten Darstellung.

werden, ob Verbindungen der vorliegenden Substanzklasse als kovalent reagierende Inhibitoren agieren.

Vernetzungsexperimente unter Verwendung der Fluorescein-haltigen Benzoylphosphonsäure

Um eine kovalente Reaktion zwischen einem Protein und einer reaktiven Inhibitorstruktur nachweisen zu können, muss ein geeignetes System der Probenaufbereitung und -reinigung vorliegen.

Durch die Verwendung von gelelektrophoretischen Trennungen können Substanzen, die sich in ihren ionischen Eigenschaften signifikant voneinander unterscheiden, innerhalb einer Gelmatrix getrennt werden. Dieses analytische Verfahren wird vor allem bei der Untersuchung von Proteingemischen genutzt, wobei je nach Verwendung des Polymers Makromoleküle zwischen 5 und 20.000 kDa voneinander getrennt werden können. Bei der Durchführung von SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wird als Matrix ein Acrylamidpolymer genutzt, welches die negativ geladenen Analyten unterschiedlich stark retendiert und somit deren Auftrennung bewirkt. Dabei werden je nach Anwendung Proteinmengen im nano- bis µg-Bereich eingesetzt, die nach erfolgter Trennung durch Bestrahlung im UV-Bereich und / oder der Zugabe von Färbereagenzien sichtbar gemacht werden können.

Im folgenden Vernetzungsexperiment wurde die Fluoreszenzsonde **23** in verschiedenen Konzentrationen in Anwesenheit einer nachweisbaren Menge PTP1B für 45 min bei 4 °C mit der Wellenlänge 365 nm bestrahlt. Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Reaktionsansätze mit Laemmli-Puffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.24).¹² Nach Durchführung der SDS-PAGE wurde das erhaltene Gel zunächst auf einem *Imaging-system* unter Bestrahlung von 312 und 365 nm dokumentiert und anschließend mit dem Proteinfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 angefärbt (Abb. 4.24; *unten; links und rechts*). Beim Vergleich der beiden Dokumentationen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Markierung des Phosphatase PTP1B. Die mitgeführte Negativkontrolle (Pos. 1) wies erwartungsgemäß keine Fluoreszenzmarkierung auf, wobei hingegen beim Vorliegen der höchsten Sondenkonzentrationen (Pos. 2 bis 6) eine fluoreszente Proteinbande erkennbar war. Neben der erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung war eine Abbaureaktion

¹²Reaktionspuffer: 25 mM TRIS HCl pH 7.0, 10 % Glycerin, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.01 % Brij 35; Die aufgetragene Proteinmenge je Tasche betrug 900 ng.

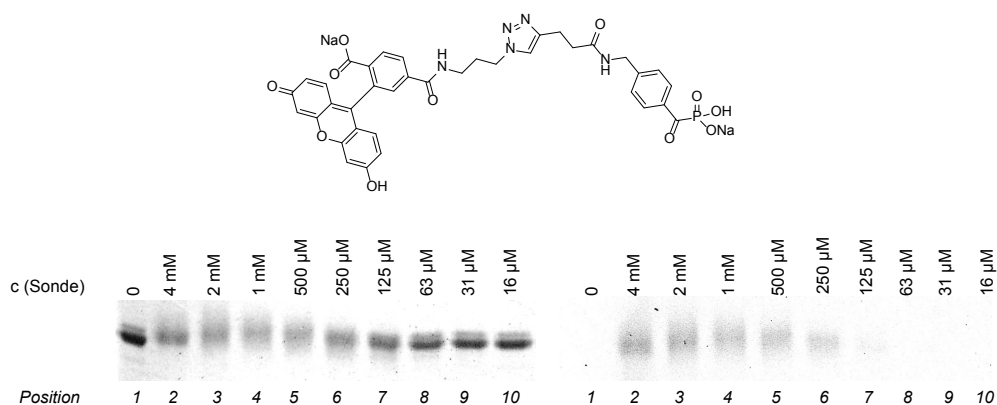


Abb. 4.24 *oben*: Struktur der verwendeten Sonde;
unten, links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
unten, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

zu beobachten. In Konzentrationen im mM-Bereich war keine definierte Proteinbande zu erkennen, was auf eine sehr hohe Photoreaktivität der verwendeten Benzoylphosphonsäure gegenüber dem Protein schließen lässt. Die Nachweisbarkeitsgrenze der fluoreszenten Proteinmarkierung lag zwischen 100 und 200 μM, was sich mit dem Vorliegen einer mM-bindenden Sonde vereinbaren lässt.

Mit der erfolgreichen Proteinmarkierung und dem damit verbundenen Nachweis einer kovalenten Proteinvernetzungsreaktion sollte nach der Konzentrationsabhängigkeit die Zeitabhängigkeit der Photovernetzungsreaktion untersucht werden. Dazu wurde PTP1B in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der photoreaktiven Sonde **23** für unterschiedliche Zeiträume bestrahlt (Abb. 4.25).

Dem Vergleich der Coomassiefärbung und dem Fluoreszenzbild ließ sich der Einfluss der Bestrahlungsdauer entnehmen. Während nach einer Bestrahlung von 20 min eine höhere Bandenschärfe und eine geringere Fluoreszenz zu beobachten war (Pos. 1, 2 und 3), zeigte sich zwischen den Reaktionsansätzen 40 min (Pos. 4 bis 6) und 60 min (Pos. 7 bis 9) kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzmarkierung. Den Geldokumentationen ließ sich analog der Untersuchung einer Konzentrationsabhängigkeit ein höherer Zersetzungsgrad bei einer mM-Konzentration entnehmen. Der destruktive Einfluss der photoreaktiven Sonde fiel bei der höchsten Bestrahlungsdauer am deutlichsten aus, sodass aus einer verlängerten Bestrahlungszeit keine gesteigerte Proteinmarkierung, sondern ein höherer Zersetzungsgrad folgte.

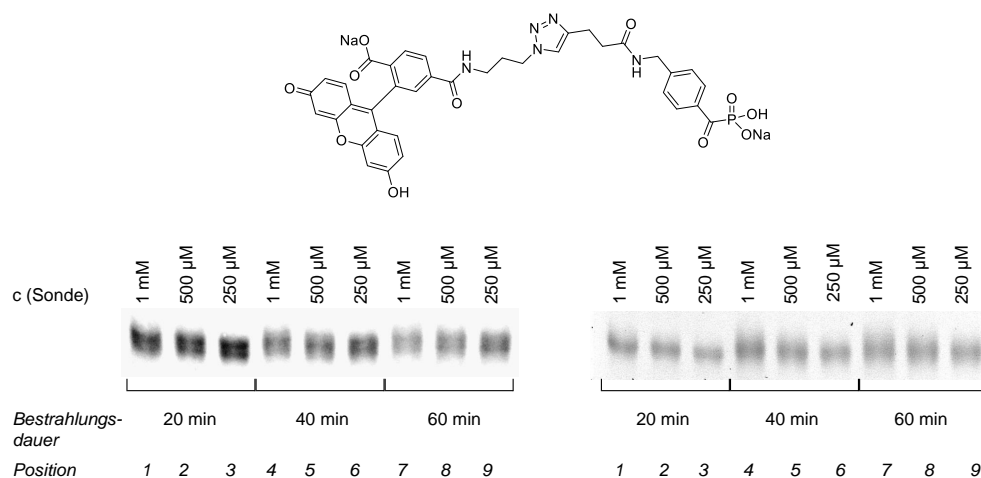


Abb. 4.25 oben: Struktur der verwendeten Sonde;
 unten, links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
 unten, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine kovalente Proteinvernetzungsreaktion auf, die konzentrations- und bedingt zeitabhängig war. Unter Verwendung der fluoreszenten Benzoesäure als Negativkontrolle konnte keine Fluoreszenzmarkierung der Phosphatase PTP1B beobachtet werden. Dieser Zusammenhang zeigte die Abhängigkeit einer kovalenten Proteinmodifikation vom Vorliegen des α -Ketophosphonsäurestrukturelements. Es konnte enzymkinetisch eine Proteindeaktivierung sowie die kovalent-reagierenden Eigenschaften der fluoreszenten Benzoylphosphonsäure **23** nachgewiesen werden, jedoch ließ dies keine Aussage über eine Reaktivität innerhalb des aktiven Zentrums von PTP1B zu. Über die Verdrängung der fluoreszenten Sonde durch eine höher affine Struktur sollte im Falle einer Selektivität eine Fluoreszenzmarkierung unterdrückt werden. Als Verdrängungsstruktur wurde Suramin gewählt, welcher einen bekannten PTP-Inhibitor darstellt und eine Bindungskonstante von $K_I = 5.5 \mu\text{M}$ gegenüber PTP1B besitzt.^[152] Experimentell erfolgte eine Verdünnungsreihe von Suramin gegenüber einer festen Konzentration der Sonde **23** in Anwesenheit von PTP1B. Nach der Bestrahlung¹³ wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenz sowie die Coomassiefärbung dokumentiert (Abb. 4.26).

Der Darstellung der Fluoreszenz bei 312 nm und 365 nm (Abb. 4.26; unten, rechts) ließ sich kein signifikanter Unterschied in der erfolgten Proteinmarkierung entnehmen. In

¹³Bestrahlungszeit: 1 h bei 4 °C

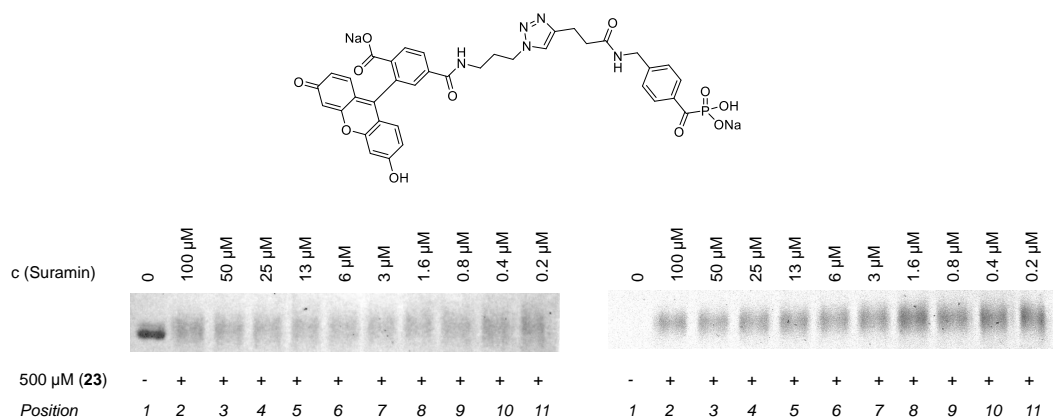


Abb. 4.26 oben: Struktur der verwendeten Sonde;
 unten, links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
 unten, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

Anbetracht der Inhibitionskonstante von Suramin, sollte bei den höchsten Konzentrationen dieser Verbindung (Pos. 2 und 3) keine Bindung der mM-inhibierenden Sonde **23** innerhalb des katalytisch aktiven Zentrums erfolgen. Mit der Beobachtung einer eingetretenen Proteinmarkierung in jedem Reaktionsansatz kann die vorliegende fluoreszenzmarkierte Benzoylsäure nicht als selektiv reagierendes SONDENSYSTEM beurteilt werden, sodass von einer unspezifischen Reaktion mit dem Protein auszugehen ist.

Enzymkinetische Untersuchung der pcPhe-haltigen Peptide

Mit den dargestellten Benzoylphosphonsäurepeptiden liegen nicht-hydrolysierbare Substratanaloga vor, die eine deutlich erhöhte Affinität gegenüber PTP1B aufweisen sollten. Die Peptidomimetika wurden zunächst auf ihre inhibitorischen Eigenschaften vor einer Bestrahlung untersucht. Folgend wurde die Desaktivierung im Zuge der Bestrahlung mit der Wellenlänge 365 nm bestimmt. Die erhaltenen IC₅₀-Werte der Einzelmessungen wurden für eine Vergleichbarkeit in die Inhibitionskonstante K_I überführt (Cheng-Prusoff Gleichung).^[153]

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (4.1)$$

Untersucht wurden die Substratanaloga **34**, **35**, **36** und **37**, das als Negativkontrolle synthetisierte Phosphonomethylphenylalaninpeptid **42** sowie das dual-markierte Peptid **33**, welches als STAT5B Ligand dargestellt wurde (Abb. 4.27). Ferner wurde der bekannte Phosphataseinhibitor PHPS1^[80] als weitere Negativkontrolle hinsichtlich einer Photoreaktivität verwendet.

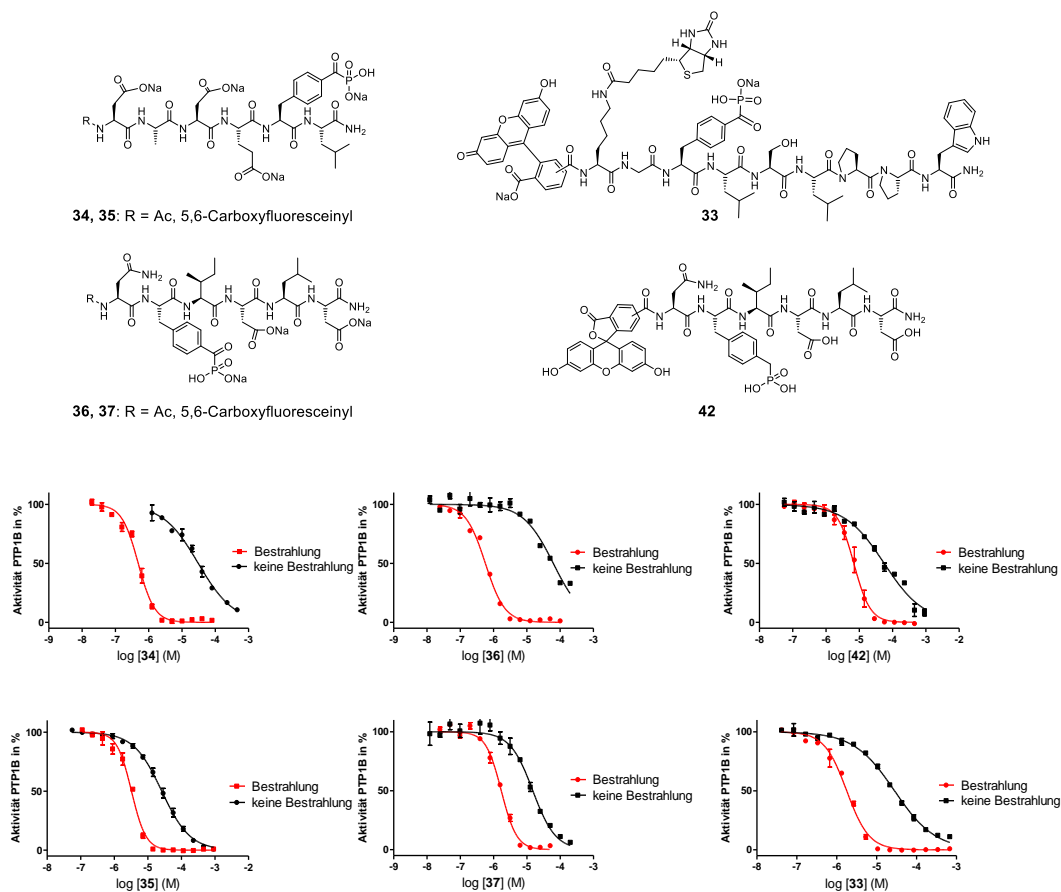


Abb. 4.27 oben: Strukturen der verwendeten Peptide;
unten: Normalisierte Desaktivierungskurven.

Die Inhibitionsdaten vor (K_I) und nach erfolgter Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 365 nm ($K_I(UV)$) sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Das bestrahlungsinduzierte Desaktivierungspotenzial ergibt sich über den Quotienten $K_I/K_{I(UV)}$.

Beim direkten Vergleich der vorliegenden inhibitorischen Daten zeigte sich, dass alle

Tabelle 4.1 Inhibitorische Daten der Peptide

#	Sequenz	K_I	K_I (UV) ^a	K_I/K_I (UV)
34	Ac-DADEpcFL-NH ₂	30.04 ± 4.70 μM	0.39 ± 0.03 μM	76
36	Ac-NpcFIDLD-NH ₂	48.8 ± 7.9 μM	0.41 ± 0.05 μM	120
35	CF-DADEpcFL-NH ₂	19.1 ± 1.5 μM	1.62 ± 0.20 μM	12
37	CF-NpcFIDLD-NH ₂	10.75 ± 1.44 μM	1.16 ± 0.09 μM	9
33	CF-K(Biotin)GpcFLSLPPW-NH ₂	21.35 ± 1.75 μM	1.87 ± 0.06 μM	11
42	CF-NpmFIDLD-NH ₂	58.12 ± 6.50 μM	5.14 ± 0.23 μM	11
PHPS1		6.29 ± 1.23 μM	2.57 ± 0.69 μM	2.5
34^b	Ac-DADEpcFL-NH ₂	17.25 ± 4.52 μM	12.88 ± 1.80 μM	1.4
35^b	CF-DADEpcFL-NH ₂	10.57 ± 1.14 μM	14.82 ± 1.40 μM	0.7

^aDie Bestrahlung erfolgte für 45 min bei 4 °C ohne den Zusatz des Reduktionsmittels DTT

^bDie Bestrahlung erfolgte für 45 min bei 4 °C in Anwesenheit von 1 mM DTT

untersuchten Peptide vor einer Bestrahlung moderate PTP1B Inhibitoren darstellen, deren Bindungskonstanten im niedrigen μM-Bereich liegen. Die Substratanaloga **34** und **36** unter Verwendung des Bioisoters F₂pmP besitzen gegenüber PTP1¹⁴ Inhibitionskonstanten im nM-Bereich mit Ac-DADEF₂pmPL-NH₂, $K_I = 0.18 \pm 0.02 \mu\text{M}$ und Ac-NF₂pmPIDLD-NH₂, $K_I = 0.48 \pm 0.02 \mu\text{M}$.^[71] Demnach stellt die nicht-natürliche Aminosäure Phosphonomethylphenylalanin (pcPhe) ein weniger potentes Isooster im Vergleich zu F₂pmP dar. Die Verwendung des Fluoresceinylrestes in *N*-terminaler Position erhöhte die Affinität gegenüber PTP1B um Faktoren von 1.5 und 4.5. Der inhibitionssteigernde Effekt bei der Verwendung von Fluoresceinmarkierungen konnte innerhalb verschiedener Arbeiten des Arbeitskreises bei der Entwicklung von pTyr-Mimetika beobachtet werden. Der STAT5B Ligand **33** besitzt keine beschriebene Affinität gegenüber PTP1B und sollte der Untersuchung einer Sequenzspezifität dienen. Mit einer Inhibitionskonstante von 21 μM lag diese in derselben Größenordnung der substratanalogen Peptide, sodass eine Spezifität zwischen den gewählten Sequenzen nicht vorliegt. Die als Negativkontrolle dargestellte Verbindung **42** besaß die geringste Affinität innerhalb der untersuchten Peptide. Demnach kann pcPhe als ein affineres pTyr-Bioisoster als pmP beurteilt werden.

Nach erfolgter Bestrahlung konnte für jedes Peptid eine deutlich erhöhte Inhibition ermittelt werden. Die Inhibitionskonstanten lagen im hohen nM bis einstelligen μM-Bereich, sodass sich ein Faktor der photochemischen Desaktivierung zwischen 10 und 120 ergab.

¹⁴PTP1: Homolog (Ratte) der humanen Phosphatase PTP1B, mit 97 % identischer Aminosäureabfolge in der Position 1-322.

Das höchste Desaktivierungspotenzial besaßen die acetylierten Peptide **34** und **36** deren K_I -Werte nach Bestrahlung bei ca. 400 nM lagen. Die Fluorescein-haltigen Peptide **33**, **35** und **37** zeigten eine deutlich verringerte Desaktivierung um den Faktor ≈ 10 . Fluorescein besitzt ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 490$ nm, jedoch ein breites Anregungsspektrum, sodass bei der Durchführung der Bestrahlungsexperimente eine Fluoreszenz der Reaktionslösung beobachtet werden konnte. Die verringerte Desaktivierung von PTP1B kann demnach aufgrund einer verringerten Biradikalbildung im Zuge einer in Konkurrenz stehenden Bestrahlungsenergieaufnahme durch das Fluorophor erfolgt sein. Für die Verbindung **42** konnte ein Faktor $K_I/K_{I(UV)}$ von 11 bestimmt werden. Das pmP-Peptid sollte innerhalb dieser Betrachtung als Negativkontrolle dienen, sodass ein solches Verhalten nicht zu erwarten war. Es existieren wenige Veröffentlichungen die eine photochemische Reaktivität von Benzylphosphonsäuren beschreiben. Die beschriebenen Reaktionswege beinhalten dabei eine photo-oxidative Spaltung der P-C Bindung unter der Ausbildung von Radikalen,^[154,155] jedoch bedarf es während dieser Reaktionen des Zusatzes von Additiven oder individueller Substitutionsmuster, die im untersuchten System nicht vorliegen. Die Bestrahlung der Phosphatase selbst hatte keinen Einfluss auf die zu ermittelnden Daten, sodass sich in Abhängigkeit der Bestrahlungsintensität zwar eine Verringerung der Gesamtaktivität ergeben kann, sich jedoch vor und nach Bestrahlung identische Inhibitionswerte bestimmen ließen. Ferner besaß die mitgeführte Negativkontrolle PHPS1 kein signifikantes photochemisch-induziertes Desaktivierungspotenzial. Der Erhalt von identischen Inhibitionskonstanten ließ sich auch innerhalb von Bestrahlungsexperimenten beobachten, die in Anwesenheit von DTT durchgeführt wurden (siehe Tabelle 4.1; unten). Dabei wurde der Parameter der Fluoresceinacylierung untersucht und die inhibitorischen Konstanten K_I und $K_{I(UV)}$ bestimmt. So zeigte die Bestrahlung des Peptides **34**, welches ohne den Zusatz von DTT einen Faktor der Inhibitionserhöhung von 76 aufweist, in Anwesenheit des Reduktionsmittels keine Desaktivierung von PTP1B (Faktor 1.4). Dieser Effekt ließ sich auch bei dem Fluoresceinylpeptid **35** beobachten, welches unter DTT Zusatz nach Bestrahlung ebenfalls keine gesteigerte Inhibition mehr zeigte.

In den Dimerisierungsexperimenten der Modellverbindungen konnte beobachtet werden, dass die Bildung der Dimere durch die Anwesenheit des Reduktionsmittels vollständig unterdrückt wurde. Im Folgenden sollte der Einfluss von Dithiothreitol auf die photoaktivierbaren pcPhe-Peptide untersucht werden. Experimentell erfolgte dabei eine Verdün-

nungsreihe von DTT gegenüber einer festen Konzentration von 35 μM der Peptide **34** und **35**. Diese Konzentration führte unter bestrahlungslosen Reaktionsbedingungen für beide Verbindungen höchstens zur halbmaximalen Inhibition von PTP1B und sollte eine nahezu vollständige Inhibition nach Bestrahlung bewirken. Innerhalb eines weiteren Experiments sollte der Einfluss von DTT auf die desaktivierte Phosphatase untersucht werden. Dazu wurde PTP1B in Anwesenheit einer festen Konzentration von Peptid **34** ($c \approx 10 \mu\text{M}$) bestrahlt¹⁵ und die relative Aktivität bei unterschiedlichen reduktiven Reaktionsbedingungen bestimmt. Die graphische Darstellung beider Experimente folgt in Abb. 4.28.

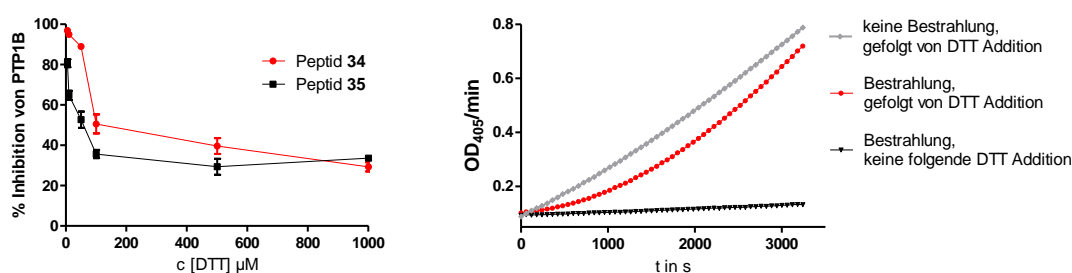


Abb. 4.28 links: Inhibition nach Bestrahlung in Abhängigkeit der DTT Konzentration, c (**34**, **35**) = 35 μM ; rechts: PTP1B Aktivität bei $\approx 10 \mu\text{M}$ Peptid **34** mit / ohne Bestrahlung gefolgt von der Addition von 1 mM DTT.

Die DTT-Konzentration hatte einen starken Einfluss auf die relative Aktivität von PTP1B (Abb. 4.28; links). Zwischen der in Puffern üblichen Konzentration von 1 mM bis zu einer Konzentration von 100 μM war nahezu keine inhibitionssteigernde Wirkung nach Bestrahlung zu erkennen. Bei Konzentrationen, die der äquimolaren Menge des eingesetzten Peptides entsprachen, konnte hingegen ein desaktivierender Effekt beobachtet werden. Dieser Umstand deutete auf die quantitative Reaktion des unter Bestrahlung gebildeten Biradikals mit DTT hin, sodass dieses keine Wirkung mehr auf die Phosphatase ausüben konnte.

Die Bestrahlung in Anwesenheit einer festen Peptidkonzentration von 10 μM bewirkte in Abwesenheit von DTT eine vollständige Desaktivierung (Abb. 4.28; rechts, schwarzer Graph). Wenn dem identischen Reaktionsansatz nach Bestrahlung 1 mM DTT zugesetzt wurde, ergab sich hingegen ein neues Bild der Inhibition. In Anwesenheit von DTT unterlag die desaktivierte Phosphatase einer zeitabhängigen Reaktivierung (roter Graph), die nach ca. 50 min der Aktivität einer nicht bestrahlten Probe entsprach (grauer Graph). Mit

¹⁵Bestrahlungsdauer 45 min bei 4 °C

der Wiederherstellung der Enzymaktivität ergab sich eindeutig der Zusammenhang mit einer oxidativen Desaktivierung von PTP1B. Die Probe, die keiner Bestrahlung unterzogen wurde und anschließend mit DTT versetzt wurde, zeigte eine Enzymaktivität mit linearem Charakter, sodass keine Reaktivierung von PTP1B vorlag. Diese Beobachtung zeigte, dass die Oxidation der Phosphatase ausschließlich durch die photochemisch aktivierte Benzoylphosphonsäure erfolgte. Aus der Reaktivierung durch die reduktiven Eigenschaften von DTT ließ sich auf eine Oxidation innerhalb der katalytisch aktiven Dömane schließen. Mit einer vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Enzymaktivität war eine kovalente Modifikation der Phosphatase PTP1B mit den verwendeten Peptidomimetika als unwahrscheinlich anzusehen.

Vernetzungsexperimente unter Verwendung der pcPhe-haltigen Peptide

Die Untersuchung der synthetisierten fluoresceinmarkierten Benzoylphosphonsäure **23** in Proteinvernetzungsreaktionen zeigte ein Verhalten als unselektiv kovalent-reagierender Inhibitor. Mit den photoaktivierbaren pcPhe-Peptiden konnten Inhibitoren erhalten werden, die im niedrigen μM -Bereich binden und eine photochemisch-induzierte Desaktivierung von PTP1B bis zu einem Faktor 120 bewirken. Weitere Untersuchungen zeigten die Reversibilität der Desaktivierung durch eine nachträgliche Addition des Reduktionsmittels Dithiothreitol.

Im Folgenden wurden Vernetzungsexperimente mit den vorliegenden fluoreszenzmarkierten Peptiden durchgeführt. Experimentell wurden dazu die substratanalogen Peptide **35** und **37** in verschiedenen Konzentrationen mit einer nachweisbaren Menge PTP1B (≈ 600 nM) bestrahlt und die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt. Während dieser Versuche konnte zwar das Protein mittels Coomassie-Färbung visualisiert, jedoch keine fluoreszente Proteinbande erhalten werden. Auch höhere Konzentrationen der Peptide bis zu $500 \mu\text{M}$ bewirkten keine nachweisbare Markierung des Proteins. Diese Beobachtung deckte sich mit der ermittelten Reversibilität der Desaktivierung, sodass von keiner Bildung eines stabilen kovalent vernetzten Sonden-PTP1B-Adduktes ausgegangen werden kann. Aus der beobachteten Interaktion des gebildeten Triplettradikalzustandes mit dem Dithiol DTT und dem damit verbundenen Ausbleiben von Dimerisierungsreaktionen und Protein-desaktivierung folgt eine mögliche Reaktion mit dem Thiol des Cys215. Mit der Bindung

an das aktive Zentrum der Phosphatase ergibt sich eine räumliche Nähe zum Cys215, sodass die Bildung eines Thioradikals im Zuge einer H-Radikalabstraktion, gegenüber anderen weniger stabilen Heteroatomradikalen, eine mögliche Reaktion darstellt (Abb. 4.29).

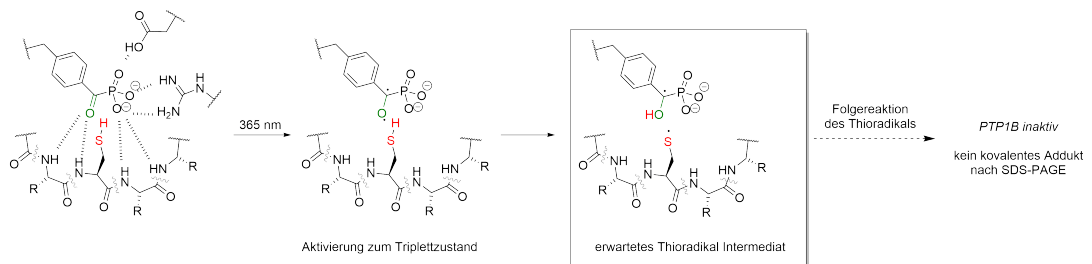


Abb. 4.29 Möglicher Mechanismus der Photodeaktivierung von PTP1B über die Bildung eines Thioradikalintermediates.

Die Oxidation des Cys215 zu einem Thioradikal würde zu einer reaktiven Spezies führen, die über Folgereaktionen die Inaktivierung von PTP1B bewirkt. Die Bildung eines Hemithioacetals zwischen der Phosphatase und dem peptidischen Monoradikal wäre ein mögliches Rekombinationsprodukt, welches aufgrund seiner Hydrolyseempfindlichkeit nicht nachweisbar sein sollte. Ferner sind andere Reaktionswege möglich, die eine oxidativ inaktivierte Form von PTP1B ohne eine Modifikation zur Folge haben.

4.1.3.2 Benzoylphosphonsäuren und STAT5B

Die Untersuchung der photoreaktiven Benzoylphosphonsäuren und deren Verhalten gegenüber dem Transkriptionsfaktor STAT5B (*signal transducer and activator of transcription 5B*) war Gegenstand der Dissertation von Dr. André Horatscheck, für dessen Arbeiten die pcPhe-haltigen Peptide synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurden. Im Folgenden wird eine Auswahl der erhaltenen Ergebnisse kurz zusammengefasst.

Im Gegensatz zu den substratspaltenden Phosphatasen, deren Interaktion mit dem Substrat Phosphotyrosin über eine PTP-Domäne ausgebildet wird, liegt mit STAT5B eine Protein-Liganden-Wechselwirkung über eine SH2-Domäne vor. Assaysysteme, die gebildete Spaltprodukte detektieren, können folglich nicht verwendet werden. Die Messung von Fluoreszenzpolarisation stellte innerhalb des vorliegenden Liganden-Protein Systems

eine Möglichkeit der Bestimmung von Bindungskonstanten dar. Fluorophore die mittels polarisierten Lichts angeregt werden, emittieren ihrerseits Licht polarisiert. Mit einer freien Rotation von Fluorophoren folgt ein Verlust dieser Polarisation, sodass Protein-gebundene Fluorophore aufgrund ihrer gehinderten Rotation einen erhöhten Betrag der Polarisation emittieren. Demnach ist die erhöhte Rückgewinnung einer Fluoreszenzpolarisation proportional zu einer erhöhten Bindung an das Protein. Eine detailliertere Behandlung dieses Assays soll an dieser Stelle nicht erfolgen.

Die ermittelten Bindungskonstanten der Benzoylphosphonsäure **1** und der pcPhe-Peptide **31-33** sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2 Inhibitorische Daten gegenüber STAT5B

#	Sequenz	K_D, K_I^a
1	Benzoylphosphonsäure	$326 \pm 49 \mu\text{M}$
31	Ac-GpcFLSLPPW-NH ₂	$11 \pm 1.9 \mu\text{M}$
32	CF-GpcFLSLPPW-NH ₂	$0.869 \pm 0.44 \mu\text{M}$
33	CF-K(Biotin)GpcFLSLPPW-NH ₂	$5.3 \mu\text{M}$

^aohne Bestrahlung

K_I -Werte bestimmt nach Nikolovska-Coleska et al.^[156]

Die Inhibitionskonstanten der dargestellten Peptide **31**, **32** und **33** gegenüber STAT5B-MBP lagen im hohen nM- bis niedrigen μM -Bereich. Die höchste Affinität besaß das Peptid CF-GpcFLSLPPW-NH₂ **32** mit einer Inhibitionskonstante von 869 nM. Die Bestrahlung der Peptide führte zu einer signifikanten Erhöhung der Affinität. So besaß z.B. das Peptid Ac-GpcFLSLPPW-NH₂ **31** nach einer Bestrahlung der Wellenlänge 365 nm eine Inhibitionskonstante von 13 μM , was einer Affinitätssteigerung von über 50 % entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass die pcPhe-Peptide gegenüber STAT5B-MBP als kovalent-vernetzende Strukturen agieren. Unter Verwendung des Fluorescein-haltigen Peptides **32** konnte das Protein bei Bestrahlung einer Fluoreszenzmarkierung unterzogen werden (Abb. 4.30).

Dabei folgte die Vernetzungsreaktion mit STAT5B-MBP einem selektiven und zeitabhängigen Charakter. Die Reaktion mit dem Rinderserumalbumin BSA entsprach einem linearen Verlauf (Abb. 4.30; *rechts*), gleiches galt für denaturiertes STAT5B-MBP. Die hohe Affinität des Peptides bewirkte hingegen konzentrationsabhängig eine schnelle Markierung

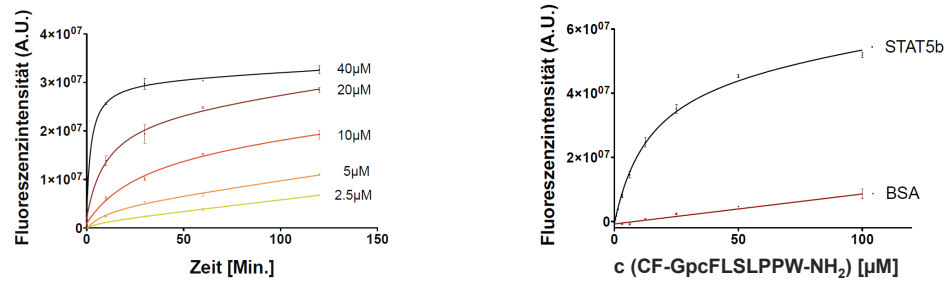


Abb. 4.30 links: Zeitabhängigkeit der Vernetzung;
rechts: Selektivität gegenüber STAT5B-MBP.
Darstellungen aus Dissertation André Horatscheck

innerhalb der Bindungsdomäne, welche schließlich in eine Sättigung überging. Das dual-markierte Peptid **33** wurde für den Einsatz in der Affinitätschromatographie entwickelt. Mit der Einführung eines Biotins in die Peptidsequenz sollte dieses in Biotin-Avidin-*pull-down*-Experimenten zum Einsatz kommen. Die Bestrahlung des Peptides **33** in Anwesenheit von STAT5B-MBP führte zu dessen kovalenter Modifikation und konnte darauffolgend mittels eines Avidin-beladenen Harzes aus dem Reaktionsansatz isoliert werden (Abb. 4.31).

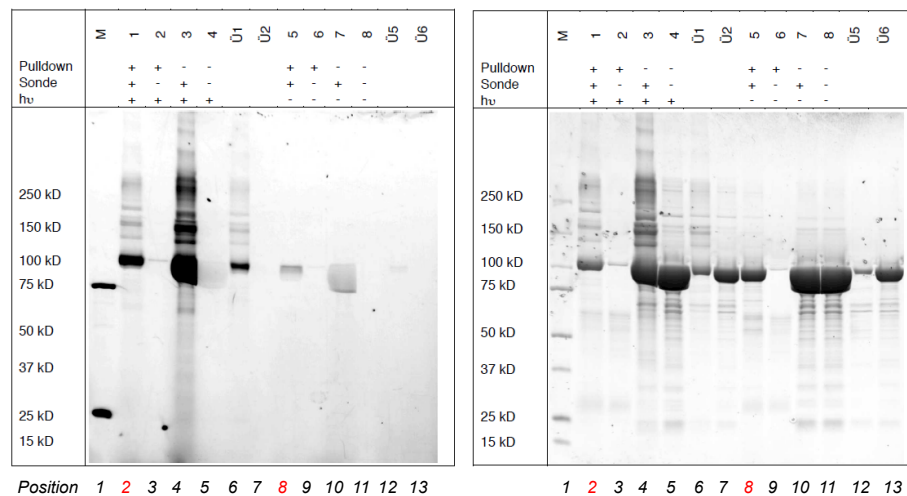


Abb. 4.31 links: Fluoreszenzdarstellung;
rechts: Coomassie-Färbung.
Darstellung aus Dissertation André Horatscheck

Experimentell erfolgte dabei die Variation der Parameter Bestrahlung, Sonde und *pull-down*.

Der Fluoreszenzdarstellung ließ sich die erfolgreiche Extraktion des biotinmarkierten STAT5B-MBP anhand der Positionen 2 und 8 entnehmen, in denen die Elution¹⁶ vom Avidinharz aufgetragen wurde. Position 2 entsprach der Biotin-Extraktion aus dem Reaktionsansatz, Position 8 der Extraktion aus dem Überstand der Probe von Pos. 2. Innerhalb beider Ansätze konnte eine fluoreszente Proteinbande von STAT5B-MBP erhalten werden. Bei der Extraktion aus dem Überstand konnte ebenfalls eine geringe Menge des markierten Proteins erhalten werden, da ein Überschuss an STAT5B-MBP gegenüber der zunächst verwendeten Harzmenge vorlag. Anhand der verwendeten Kontrollen, mit denen sich fehlerbehaftete Ergebnisse des Experimentes ausschließen lassen, und der erfolgreichen Durchführung der Affinitätschromatographie liegt mit dem dual-markierten Peptid **33** eine Verbindung vor, die im *activity-based protein profiling* eingesetzt werden kann.

Mit der Validierung der pcPhe-Peptide als photovernetzende Strukturen sollten innerhalb der vorliegenden Arbeit die Eigenschaften der Vernetzungsreaktion weiter untersucht werden.

Vernetzungsexperimente mit STAT5B-MBP

Die dargestellten Benzoylphosphonsäuren reagierten unter Bestrahlung kovalent sowie selektiv mit dem Protein STAT5B-MBP und konnten bei vorliegender Biotinylierung über einen *pull-down* isoliert werden. Mit diesen Eigenschaften bietet sich deren Verwendung in einer kovalenten Markierung von STAT5- und anderen pTyr-erkennenden Proteinen innerhalb komplexer Systeme wie Zelllysaten an.

Die selektive Markierung und Identifikation von Proteinen, die unter Bedingungen des hochkomplexen Systems innerhalb einer Zelle vorliegen, stellt eine große Herausforderung dar. Um die Möglichkeit der Identifikation von STAT5B beurteilen zu können, sollte dieses zunächst mittels Westernblot nachgewiesen werden. Untersucht wurden dabei Lysate jener Zelllinien, die innerhalb des Arbeitskreises Rademann zur Verfügung standen (Abb. 4.32).

Verwendet wurden Zelllysate der Linien BAF3 und Jurkat. Der Aufschluss der Zellen erfolgte aus zentrifugierten Pellets (ca. 4×10^6 Zellen) durch Ultraschall. Als Antikörperdienten Anti-STAT5B (primär, TransAMTM STAT Family Kit, Fa. Active Motive) und ein

¹⁶Verdrängung der Probe mittels eines Überschusses von Biotin, oder der Denaturierung von Avidin.

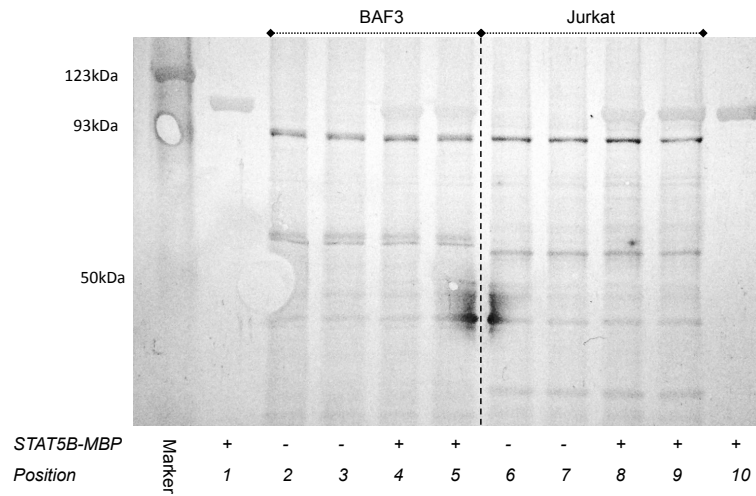


Abb. 4.32 Anti-STAT5B Westernblot der Zelllinien BAF3 und Jurkat.

Antirabbit AP-Konjugat (sekundär, Fa. Sigma). Zur Visualisierung wurde das Farbstoffsystem NBT/BCIP verwendet (siehe Seite 110). Experimentell erfolgte der Nachweis des STAT5B Proteins in An- und Abwesenheit von STAT5B-MPB (siehe Abb. 4.32).

Mit der Entwicklung der Farbreaktion konnte beobachtet werden, dass sich in beiden Zelllysaten die starke Färbung einer Bande im Molekularmassenbereich von 93 kDa ergab. Dies deckte sich mit der theoretischen Masse von STAT5B von 94 kDa.^[157,158] Die Entwicklungszeit wurde im vorliegenden Experiment zu lang gewählt, da eine starke Hintergrundfärbung zu beobachten war. Eine Auffälligkeit war die nicht eingetretene selektive Anfärbung des STAT5B-MBP Proteins (Abb. 4.32; Pos. 1, 4, 5, 8, 9 und 10). Obgleich die Detektion des rekombinat hergestellten STAT5B-MBP nicht das Ziel dieses Experiments war, zeigte sich in dem Ausbleiben der Antikörperreaktion die signifikante Abweichung von der natürlichen Sequenzabfolge, da die Antikörperbindung eine bestimmte Aminosäureabfolge des Antigens voraussetzt. Folglich war der verwendete Antikörper nicht in der Lage STAT5B-MBP zu binden. Das verwendete rekombinant hergestellte Protein besitzt mit 111 kDa ein erhöhtes Molekulargewicht und aufgrund der Fusion mit dem *maltose binding protein* eine zusätzliche Aminosäuresequenz (Abb. 4.33).

Das MBP stellt ca. 35 % der Gesamtsequenz und sollte demnach die Eigenschaften des Proteins signifikant mitbestimmen. Um einen Einfluss des Strukturelements MBP auf die

```

1 MKTEEGKLV I WINGDKGYNG LAEVGKFKFEK DTGIKVTVEH PDKLEEKFPQ
51 VAATGDGDPDI IFWAHDRFEGG YAQSGLLAEI TPDKAFQDKL YPFTWDVAVRY
101 NGKLIAYPIA VE MBP PNPPTKW EEIPALDKEL KAKGKSALMF
151 NLQEPYFTWPL STAT5B YENGGYDIK DVGVDNAGAK AGLTFLVDLI
201 KNKHINADTD STAT5B ETAMTINGP WAWSNDITSK VNYGVYTVLPT
251 FKGQPSKPFV GVL SAGINAA SPNKELAKEF LENYLLTDEG LEAVNKDKPL
301 GAVALKSYYEE ELAKDPRIAA TMENAKQGEI MPNIPQMSAF WYAVRTAVIN
351 AASGRQTVDE ALKDAQTNSN STAT5B FEENLYFQSG TVDAGADAGK PRPGSSENLY
401 FQGGRRPM SOK HLIQNTFEE LRLVTQDTEN ELKQLQQTQE YFIIQYQESL
451 RIAAQFGPLA QLSPOERLSR ETALQKQKQVS LEAWLQREAO TLQOQYRVELA
501 EKHQKTLQLL RKQQTILDD ELIQWKRROQ LAGNGGPPPEG SLDVLSQWCE
551 KLAEIWQNR QQIRRAEHL C QQLPIPGPVE EMLAEVNATI TDIISALVTS
601 TFIKQPPQ VLKTQTKFAA TVRLLVGGKL NVHMNPPQVK ATISEQQA K
651 SLLKNENTRN DYSG STAT5B TLSAHRNMS LKRIKRSDDR
701 GAESVTEEFK TILFE STAT5B TSLPVPVIV HGSQDNNATA
751 TVLWDAFAE PGRV STAT5B A LNMFKAEVQ SNRGLTKENL
801 VFLAQKLFNN SSSHLEDYSG LSVSWSQFNR ENLPGRNYTF WQWFDGVMVEV
851 LKHLKPHWN DGAHLGFVNK QQAHDLLINK PDGTFLLRFS DSEIGGITIA
901 WKFDQSERMF WNLMPFTTRD FSIRSLADRL GDLNLYLYVF PDRPKDEVYS
951 KYTTPVPCES ATAKAVDGYV KPQIKQVVE FVNASADAGG GSATYMDQAP
1001 SPAVCPQAHY NMYPGNPFARR SRSHHHHHH
    
```

Abb. 4.33 Sequenz des verwendeten STAT5B-MPB.

Bindung und kovalente Vernetzungsreaktion der pcPhe-Peptide ausschließen zu können, wurde dieses in Bestrahlungsexperimenten auf seine Reaktivität gegenüber dem fluoreszenten Peptid **33** hin untersucht (Abb. 4.34).

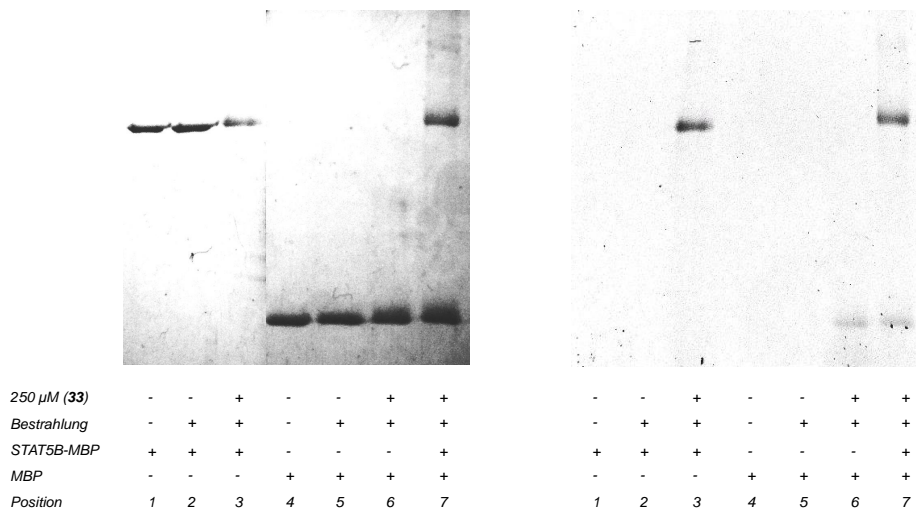


Abb. 4.34 links: Coomassiefärbung der Proteinbanden; rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).
Zuschnitt zur besseren Darstellung

In diesem Experiment sollte die Fluoreszenzmarkierung von STAT5B-MBP und MBP verglichen werden. Auch wenn jeweils beide Proteine nach Bestrahlung eine fluoreszente Bande aufwiesen (Pos. 3 und 6), fiel die Markierung von STAT5B-MBP deutlich stärker aus. Beim Vorliegen beider Proteine konnte eine Selektivität des photoreaktiven Peptides **33** gegenüber STAT5B-MBP beobachtet werden (Pos. 7). Mit diesen Ergebnissen ließ sich

ein Einfluss des Strukturelements MBP auf die eintretende Proteinvernetzungsreaktion ausschließen.

Im Folgenden sollte das dual-markierte pcPhe-Peptid **33** auf Zelllysate angewendet werden. Verwendet wurde die BAF3 Zelllinie, deren Lysat in einer Konzentration verwendet wurde, bei der eine Bandenauflösung gegeben ist. Vernetzungsexperimente mit Lysatproben erhöhter Konzentration führten zu stark verschmierten Banden ohne Aussagekraft. Experimentell wurden verschiedene Parameter variiert (Abb. 4.35).

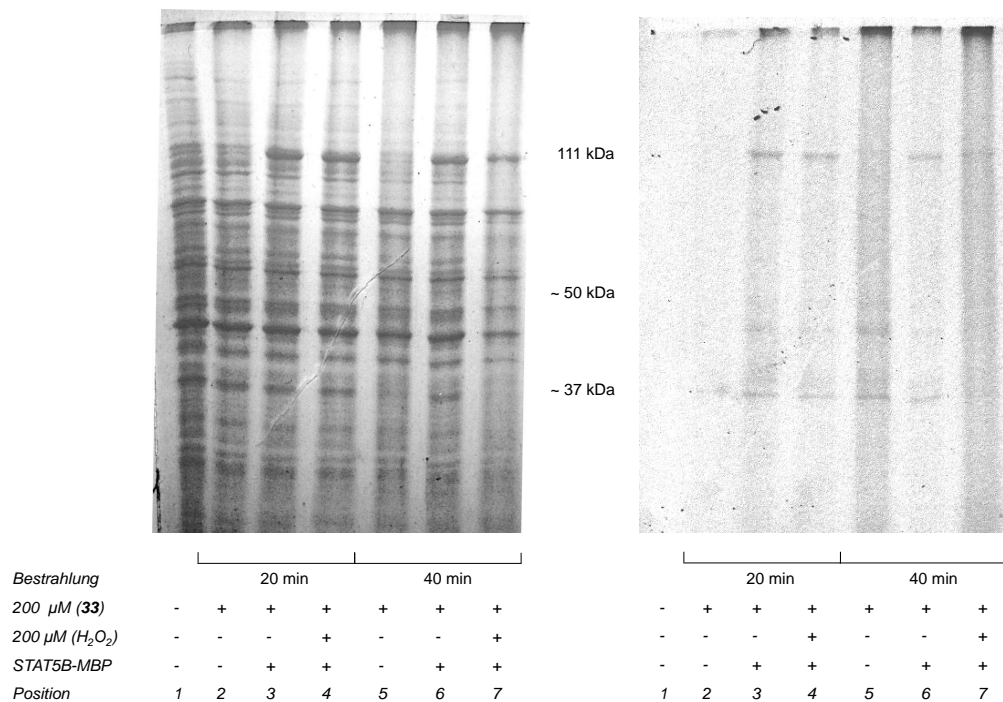


Abb. 4.35 links: Coomassiefärbung der Proteinbanden;
rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

Als Variablen wurden die Bestrahlungsdauer, die Addition von H_2O_2 und die zusätzliche Addition von STAT5B-MBP gewählt. In vorherigen Experimenten führte eine erhöhte Bestrahlungsdauer zu einer unselektiven Markierung aller Proteinspezies sowie zu diffusen Banden ohne Auflösung nach SDS-PAGE. Dieser Effekt kann auch im vorliegenden Experiment beobachtet werden. Der Fluoreszenzdokumentation (Abb. 4.35; rechts) ließ sich eine Markierung auf der gesamten Trennstrecke entnehmen, wobei diese bei einer Bestrahlungszeit von 40 min stärker ausfiel (Pos. 5, 6 und 7). Dennoch konnten definierte

fluoreszente Banden beobachtet werden. Neben den Reaktionsansätzen, in denen eine zusätzliche Menge STAT5B-MBP vorlag und dieses selektiv markiert werden konnte (Pos. 3, 4, 6 und 7), lag eine zusätzliche konzentrierte Fluoreszenzmarkierung anderer Proteine vor. So konnte in einem Massenbereich von 37 kDa eine Bande beobachtet werden, deren erhöhte Fluoreszenz nicht auf eine erhöhte Proteinkonzentration zurückgeführt werden konnte (vgl. Coomassie↔Fluoreszenz).

Da die Anwesenheit des Dithiols nachweislich die Photovernetzungsreaktion beeinflusst, sollte die Addition von H₂O₂ den reduktiven Bedingungen, die naturgemäß innerhalb einer Zelle vorliegen, entgegenwirken. Obwohl in vorherigen Arbeiten¹⁷ ein unterdrückender Effekt des ubiquitären Reduktionsmittels Glutathion auf die Photoreaktion nachgewiesen wurde, konnte in diesem als auch anderen Experimenten eine Proteinmarkierung aus Lysaten erreicht werden.

Im dargestellten Experiment konnte die selektive Markierung von STAT5B-MBP innerhalb eines Zelllysates realisiert werden. Ferner konnten Banden anderer Proteine beobachtet werden, die eine erhöhte Fluoreszenzmarkierung aufwiesen. Mit den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich das große Potenzial der photoreaktiven pcPhe-Peptide in ihrer Anwendung auf die selektive Markierung von Proteinen innerhalb des komplexen Systems von Zelllysaten.

Diese Arbeiten werden durch Ee Lin Wong, Arbeitskreis Prof. Rademann, mit der Verwendung der dargestellten pcPhe-Peptide in SILAC (*stable isotope labelling by/with amino acids in cell culture*) Experimenten weitergeführt.

¹⁷Dissertation André Horatscheck

4.1.4 Phosphonocarbonylphenylalanin in der Proteinbiosynthese

Die Verwendung von nicht-proteinogenen Aminosäuren in der natürlichen Proteinbiosynthese bietet die Möglichkeit die ursprünglichen Eigenschaften von Proteinen zu verändern oder eine gewünschte Funktionalität einzufügen. Über ein orthogonales tRNA / Aminoacyl-tRNA-Synthetase Paar (AARS) kann dies *in vitro* in Bakterienstämmen wie *E. Coli* nach der Umprogrammierung von existenten Codons erfolgen. In der Regel werden dabei sog. Stopcodons in Sinncodons umdefiniert, sodass statt einer Termination der Translation eine nicht-natürliche Aminosäure in das entsprechende Protein eingebaut wird. Ein bekanntes Beispiel für diesen Mechanismus ist die Biosynthese von Selen-haltigen Proteinen über den Einbau von Selenocystein (Sec). Dabei paart die mit Selenocystein beladene tRNA mittels ihres Anticodons UCA mit dem Stopcodon UGA der mRNA, wodurch das Selenocystein auf den C-Terminus des in der Synthese begriffenen Proteins übertragen wird.

Über die Einführung des photoaktiven Phosphonocarbonylphenylalanins in natürlich exprimierte Proteine bietet sich die Möglichkeit zum Zugang von photoaktivierbaren Biopolymeren (Abb. 4.36). Durch die Bestrahlung jener könnten dann Bindungspartner in Protein-Protein-Interaktionen kovalent gebunden und / oder selektiv in ihrer Funktion gehemmt werden.

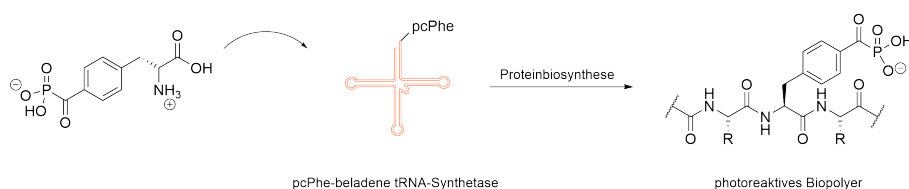


Abb. 4.36 Schema der Proteinbiosynthese mittels pcPhe-beladener tRNA

4.1.4.1 Synthese von Phosphonocarbonylphenylalanin

Die Synthese der vollständig entschützten Aminosäure pcPhe sollte ausgehend von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-geschütztem 4-Carboxyphenylalaninmethylester erfolgen. Nach einer Michaelis-Arbusow-Reaktion mit Tribenzylphosphit würden die Schutzgruppen soweit orthogonal vorliegen, dass die Zielverbindung nach Verseifung des Esters und Behandlung mit konzentrierter Trifluoressigsäure in zwei Stufen zugänglich ist (Abb. 4.37).

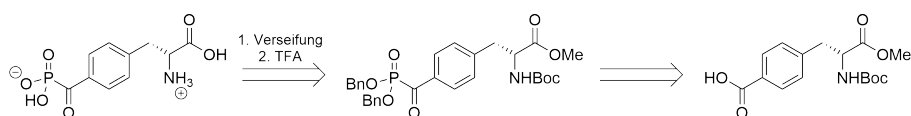


Abb. 4.37 Retrosynthese von Phosphonocarbonylphenylalanin I.

Bei der Durchführung dieser Syntheseroute zeigte sich, dass der *N*-Boc-geschützte Phosphonsäureester keine ausreichende Stabilität unter den Bedingungen säulenchromatographischer Trennungen aufwies und quantitativ zur Carbonsäure hydrolysierte. Der Zusatz von Essigsäure, um einem nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe entgegenzuwirken sowie die Veränderung der Estergruppen am Phosphonat, zeigte keinen Effekt. Der Wechsel der Schutzgruppe zu *N*-Fmoc führte zwar zu einer Hydrolysestabilität, jedoch ließ sich die Einführung der Fmoc-Gruppe nicht mit einer zielführenden Schutzgruppenstrategie vereinbaren.

Die Verwendung von ausschließlich säurelabilen Schutzgruppen bietet die Möglichkeit einer Einstufenentschützung. Dies sollte durch den Wechsel der Esterfunktion von Methyl zu *tert*-Butyl erreicht werden (Abb. 4.38).

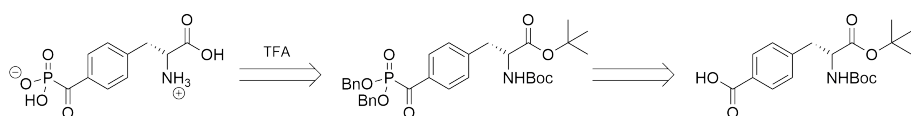


Abb. 4.38 Retrosynthese von Phosphonocarbonylphenylalanin II.

N-*tert*-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosin wurde unter Verwendung von Boc_2O unter DMAP-Katalyse in *tert*-Butanol zum gewünschten säurelabilen Ester **44** umgesetzt. Dies erfolgte über die Bildung eines gemischten Kohlesäureesters zwischen der Aminosäure und *tert*-Butyloxycarbonyl, welcher nach Angriff eines Äquivalents *tert*-BuOH zum *tert*-Butylester abreagierte. Die anschließende Entfernung der *O*-Benzylgruppe des Tyrosins erfolgte unter Standardhydrierungsbedingungen mit $\text{H}_2/\text{Pd/C}$. Die aromatische Hydroxyfunktion wurde mit Phenyltriflimid in das korrespondierende Triflat **45** überführt und anschließend mit gasförmigem Kohlenmonoxid hydroxycarbonyliert. Der erhaltene *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-4-carboxy-phenylalanin-*tert*-butylester **46** wurde unter der Verwendung des *Ghosez's reagent* zum Säurechlorid aktiviert und mit Tribenzylphosphit zum Phosphonat **47** umgesetzt (Abb. 4.39).

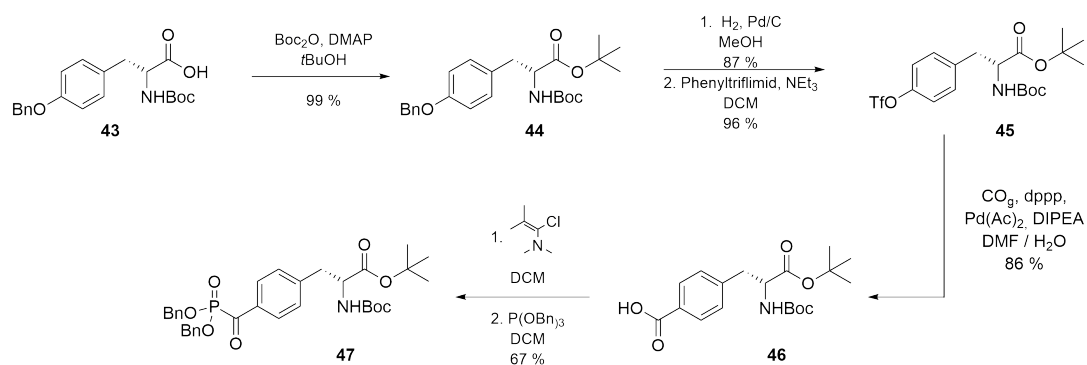


Abb. 4.39 Synthese des Phosphonates **47**.

Der finale Schritt zum Erhalt der nicht-natürlichen Aminosäure Phosphocarbonylphenylalanin sollte unter TFA-sauren Bedingungen erfolgen. In ersten Versuchen unter Verwendung von 100 %iger Trifluoressigsäure konnte neben der Bildung des gewünschten Produkts eine Vielzahl von Nebenprodukten beobachtet werden. Da einige Nebenprodukte trotz verschiedener HPLC-Retentionszeiten eine identische Molekularmasse besaßen, lag der Schluss einer Transalkylierung im Zuge der Schutzgruppenabspaltung nahe. Durch den Zusatz von Wasser konnte die Bildung der Nebenprodukte reduziert werden. Eine anschließende Behandlung mit H₂/Pd/C führte zur vollständigen Abspaltung vorhandener Benzylgruppen und zum Erhalt der reinen Zielsubstanz Phosphocarbonylphenylalanin **48** (Abb. 4.40).

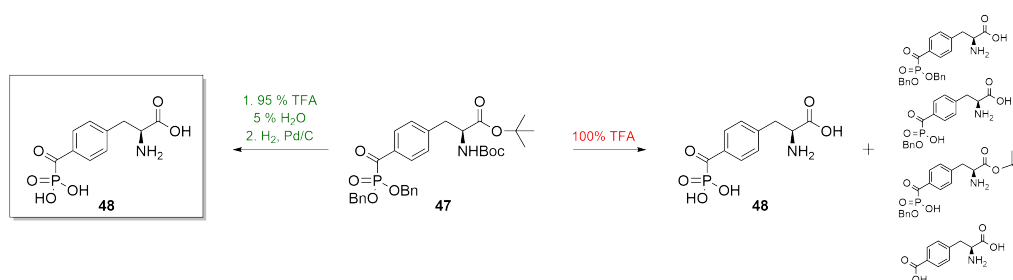


Abb. 4.40 Saure Entschützung von Phosphocarbonylphenylalanin.

4.1.4.2 Stabilitätsuntersuchung von Phosphonocarbonylphenylalanin

Für den folgenden Einsatz in biochemischen tRNA-Beladungsexperimenten musste gewährleistet sein, dass die Aminosäure pcPhe über einen hinreichend langen Zeitraum stabil ist. Vorangegangene Untersuchungen zeigten eine deutlich erhöhte Stabilität, wenn Benzoylphosphonsäuren in ihrer Salzform vorlagen. Obwohl pcPhe als amphotere Aminosäure in ihrer Phosphonsäuregruppe einfach deprotoniert vorliegen sollte und demnach eine gewisse Stabilität angenommen werden könnte, wurden NMR-Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Dazu wurde eine Probe von pcPhe, welches aus Ether gefällt wurde, mit einer Probe, die mit Amberlite® Ionenaustauscherharz (IR120 Natriumform) behandelt wurde, verglichen. Im direkten Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Spektren zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Auflösung der diastereotopen Protonen der CH_2 -Gruppe. Die pcPhe-Probe, die durch das basische Ionenaustauscherharz stärker deprotoniert vorlag, zeigte einen scharfen Signalsatz für die Doppeldoublets der jeweiligen CH_2 -Protonen. Dasselbe Strukturelement der protonierten Aminosäure zeigte hingegen ein breites Singulett (Abb. 4.41).

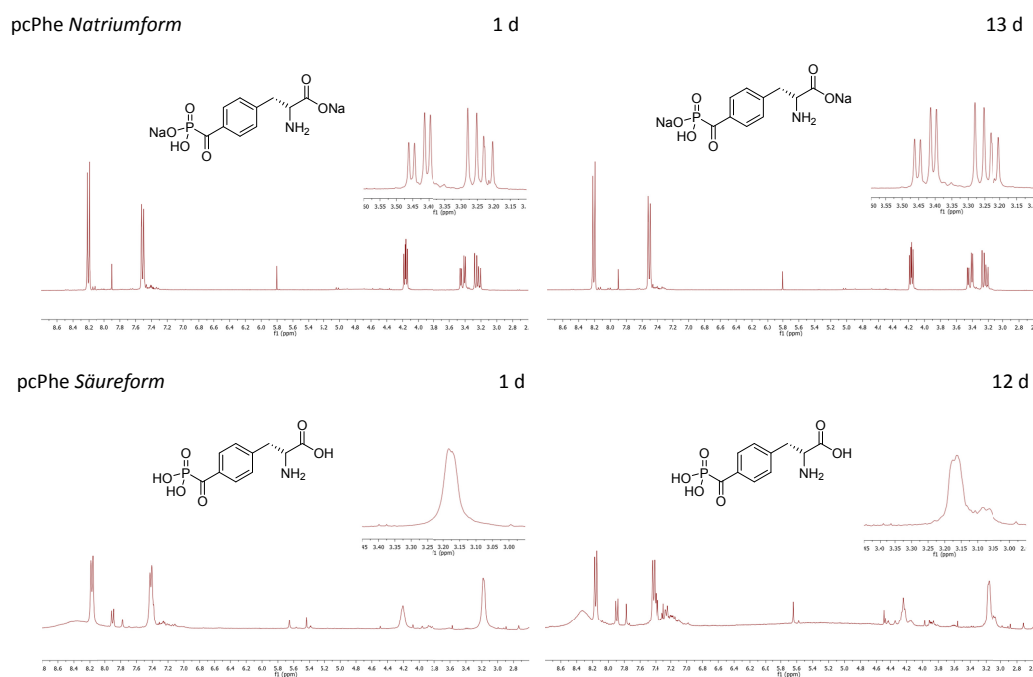


Abb. 4.41 $^1\text{H-NMR}$ Spektren von pcPhe nach 12 bzw. 13 Tagen bei RT;
Die Lösungsmittelsignale wurde der Übersicht halber unterdrückt.

Beim Vergleich der beiden Spektren nach 12 bzw. 13 Tagen zeigte sich deutlich, dass Phosphonocarbonylphenylalanin in seiner protonierten Form deutlich instabiler ist als in seiner korrespondierenden Natriumsalzform. Im ^{31}P -NMR Spektrum aller Verbindungen (*nicht dargestellt*) war ein weiterer Signalsatz zu beobachten, der mit einer ^1H - ^{31}P -Kopplung von etwa 635 Hz dem protonenkoppelten Signal von Phosphonsäure zugeordnet werden konnte. Aufgrund von zuvor nicht abtrennbarer Dibenzylphosphonsäure, lag diese nach den Bedingungen der sauren Entschützung als freie Säure vor. Im ^1H -NMR aller Vergleichsproben zeigte sich dieser Signalsatz in einem scharfen Dublett, das sich über eine chemische Verschiebung von $\delta = 7.9$ ppm bis 5.8 ppm erstreckte. Nach 12 Tagen ergab die Integration dieses Signals im ^1H -NMR Spektrum der protonierten Aminosäure eine Verdopplung der Substanzmenge von H-P(O)(OH)_2 , was auf die Abspaltung der Phosphonsäuregruppe zurückzuführen war. Die NMR-Probe der Natriumsalzform wies hingegen keine Veränderung auf.

4.1.4.3 Phosphonocarbonylphenylalanin als nicht-natürliche Aminosäure in der Proteinbiosynthese

Die nicht-natürliche Aminosäure Phosphonocarbonylphenylalanin wurde nach den Ergebnissen der Stabilitätsuntersuchungen in ihrer Natriumsalzform an die Arbeitsgruppe Prof. Stefan Schiller (*Freiburg Institute for Advanced Studies, FRIAS*) übergeben, welche die Substanz auf ihre Eigenschaften in der Beladung einer tRNA-Synthetase und deren Einbau in Proteine hin untersuchen sollte.

Letztlich konnte im Zuge dieser Kooperation kein pcPhe-haltiges Protein über eine Proteinbiosynthese erhalten werden, da eine optimierte Mutante der Tyrosin-tRNA-Synthetase nicht dargestellt werden konnte.

4.1.5 Zusammenfassung der Benzoylphosphonsäuren als photoaktivierbare Phosphotyrosinmimetika

Die Substanzklasse der Benzoylphosphonsäuren stellt, nach unserer Kenntnis, das erste photoaktivierbare Phosphotyrosinmimetikum dar.

In dieser und vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die α -Ketogruppe der Benzoylphosphonsäuren photochemisch in einen $n \rightarrow \pi^*$ Triplettzustand anregen lässt. Das gebildete Biradikal besitzt eine hohe Reaktivität und führte in Anwesenheit geeigneter Reaktionspartner zu der Bildung unterschiedlicher Produkte. So reagierten die Modellverbindung Benzoylphosphonsäure **1** und 4-(Methyl-benzoyl)phosphonsäure **8** in Anwesenheit des H-Radikaldonorsystems *iso*-Propanol bevorzugt in einer Radikalkombination zu stereoisomeren Dimeren. Andere Additive wie das stabile Radikal TEMPO und das Reduktionsmittel DTT führten hingegen zu einer Unterdrückung der Dimerbildung. Alle dargestellten α -Ketophosphonsäuren führten unter Bestrahlung zur Desaktivierung der untersuchten Phosphatase PTP1B und zu einer erhöhten Bindung gegenüber dem Transkriptionsfaktor STAT5B-MBP. Es wurde eine fluoreszente Benzoylphosphonsäure dargestellt, deren Bestrahlung die Erhöhung der Inhibition von PTP1B um den Faktor 36 und eine kovalente Modifikation des Proteins bewirkte. Die photochemische Anregung des Inhibitors führte aufgrund seiner hohen Reaktivität zu einer Zersetzung des Proteins sowie zu einer unselektiven Markierung der Phosphatase.

Die Verwendung der nicht-natürlichen Aminosäure Phosphonocarbonylphenylalanin (pcPhe) in der Festphasenpeptidsynthese ermöglichte den Zugang zu hochaffinen Peptidomimetika. Es wurden nicht-hydrolysierbare Substratanaloga für die Proteintyrosinphosphatase PTP1B und photoreaktive Liganden für STAT5B-MBP dargestellt.

Die Bestrahlung der substratanalogen pcPhe-Peptide führte zu einer Erhöhung der Inhibition von PTP1B bis zu einem Faktor $K_I/K_I(UV)$ von 120. Bei Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT führten die identischen Versuchsbedingungen zu keiner gesteigerten Inhibition. Ferner konnte das photodesaktivierte Protein durch eine anschließende Zugabe von DTT vollständig reaktiviert werden. Proteinvernetzungsexperimente fluoreszenter pcPhe-Peptide mit PTP1B führten zu keiner Markierung des Proteins. Unter Bestrahlung reagierten die pcPhe-Peptide oxidativ und nicht kovalent mit der Proteintyrosinphosphatase PTP1B.

André Horatscheck konnte innerhalb seiner Arbeiten die kovalent-irreversiblen Eigenschaften photoreaktiver pcPhe-Peptide gegenüber dem Transkriptionsfaktor STAT5B nachwei-

sen. Die Vernetzungsreaktion folgte dabei einer hohen Selektivität gegenüber der aktiven Form von STAT5B-MBP.

Die Selektivität der kovalenten Markierung konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit weiter unterstützt werden. So bestimmte allein die STAT5B Struktur des verwendeten MBP-Konstruktes die eintretende erhöhte Markierung. Es wurde ein Biotin-Fluorescein-markiertes pcPhe-Peptid synthetisiert, welches bereits erfolgreich in Biotin-Avidin-*pull-down* Experimenten eingesetzt wurde. Diese Verbindung wurde in Vernetzungsexperimenten in Zellysaten verwendet, in denen STAT5B-MBP selektiv gegenüber anderen im Lysat vorliegenden Proteinen markiert werden konnte. Ferner wurden weitere fluoreszente Proteinbanden erhalten, die eine erhöhte Markierung aufwiesen. Somit liegt mit dem dual-markierten pcPhe-Peptid ein Molekül vor, welches für die selektive Markierung von pTyr-erkennenden Proteinen aus komplexen Systemen wie Zellysaten geeignet ist. Diese Arbeiten werden in der MS-Anwendung SILAC innerhalb des Arbeitskreises Prof. Jörg Rademanns weitergeführt.

4.2 Monofluorphosphonsäuren als neue Phosphotyrosinmimetika

Die Entwicklung von Wirkstoffen, die mit einem Protein eine kovalente Bindung eingehen und dieses im Zuge dieser Reaktion in seinen Eigenschaften gehemmt wird, stellt einen bedeutenden Teilbereich der Medizinischen Chemie dar.

Durch die Verwendung einer chemisch reaktiven Gruppe in einer Inhibitorstruktur, die eine hinreichend hohe Affinität zu einem Protein besitzt, kann erreicht werden, dass eine kovalente Bindung zum aktiven Zentrum des Proteins z.B. einer Protease ausgebildet wird. Dies führt in der Regel zu einer irreversiblen Inhibition des Proteins und somit zum Erliegen der enzymespezifischen Aktivität. Wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, können dazu verschiedenste Strukturelemente genutzt werden.

Die biologische Wirksamkeit von monofluorierten oder anders substituierten Phosphonsäureestern ist seit den 1930er Jahren hinlänglich bekannt. Ursprünglich für den Einsatz als Pflanzenschutzmittel entwickelt, führte die Erkenntnis ihrer toxischen Wirkung auf Säugetiere zur Weiterentwicklung zu chemischen Kampfstoffen wie zum Beispiel Sarin, Tabun, Soman oder VX (Abb. 4.42).

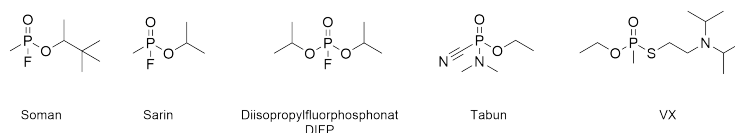


Abb. 4.42 Auswahl stark toxischer Verbindungen basierend auf substituierten Phosphonsäureestern

Die Wirkung dieser Substanzen beruht auf der Reaktion zwischen dem Serin des aktiven Zentrums der Serinprotease Acetylcholinesterase (AChE) und dem elektrophilen Phosphorzentrum des entsprechenden Wirkstoffes. Durch die im Zuge der Substitution des Fluorides oder einer anderen Abgangsgruppe ausgebildete kovalente Bindung kommt es zum Ausbleiben des Umsatzes des natürlichen Substrates Acetylcholin (ACh). Dabei führt die unnatürliche Konzentrationssteigerung von ACh im synaptischen Raum zu überhöhter Muskelkontraktion, bis hin zum Tod durch Atemlähmung.

Die Reaktivität von fluorierten Phosphonaten wird seit wenigen Jahrzehnten in der Medizinischen Chemie genutzt, um zum Beispiel selektiv Serinhydrolasen zu adressieren

und diese irreversibel zu hemmen (Abb. 4.43). Zu den populärsten Arbeiten, die dem Bereich des *activity-based protein profiling* (ABPP) zugeordnet werden, zählen dabei die Veröffentlichungen der Gruppe um Benjamin Cravatt.^[101,159,160]

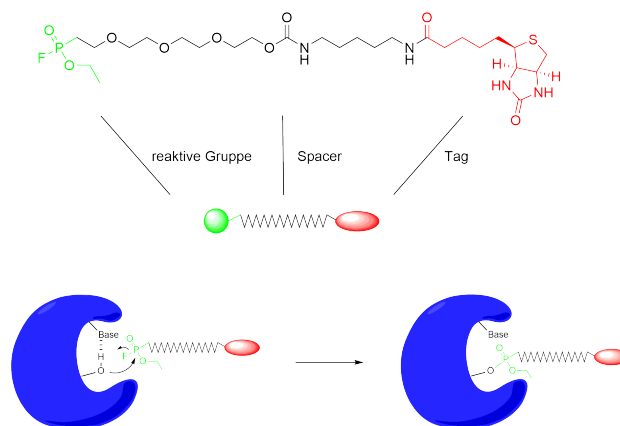


Abb. 4.43 Aufbau einer Fluorophosphonatsonde und die schematische Darstellung der Reaktion mit einer Serinhydrolase.

Wie dargestellt reagieren die Fluorophosphonate unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem aktiven Serin des aktiven Zentrums des Proteins.^[161] Verwendet werden in diesen sogenannten Sonden geeignete Markierungen wie z.B. Fluorophore oder Molekülstrukturen die für eine anschließende Affinitätschromatographie geeignet sind, insbesondere Biotin für Biotin-Streptavidin-Systeme.

4.2.1 Monofluorophosphonsäuren und PTP1B

Da die Phosphatstruktur das natürliche Erkennungsmotiv von Proteintyrosinphosphatasen ist und die verwandten Phosphonsäuren bekannte Liganden darstellen, stellte sich die Frage, ob fluoridierte Phosphonsäuren als Inhibitoren gegenüber Phosphatasen agieren könnten. Da, nach unserer Kenntnis, keine Affinität zwischen den bereits bekannten ungeladenen Fluor-substituierten Phosphonsäureestern und Proteintyrosinphosphatasen besteht, galt es bei der Entwicklung neuer Inhibitoren dem natürlichen negativen Ladungszustand des Substrates hinreichend nahe zu kommen, um eine notwendige Affinität zum aktiven Zentrum zu erreichen. Eine potenzielle Zielstruktur ergab sich in monofluorierten Phosphonsäuren, welche zwar eine bekannte Substanzklasse ist, jedoch nicht auf ihren Einsatz als Phosphotyrosinmimetika hin beschrieben ist (Abb. 4.44).

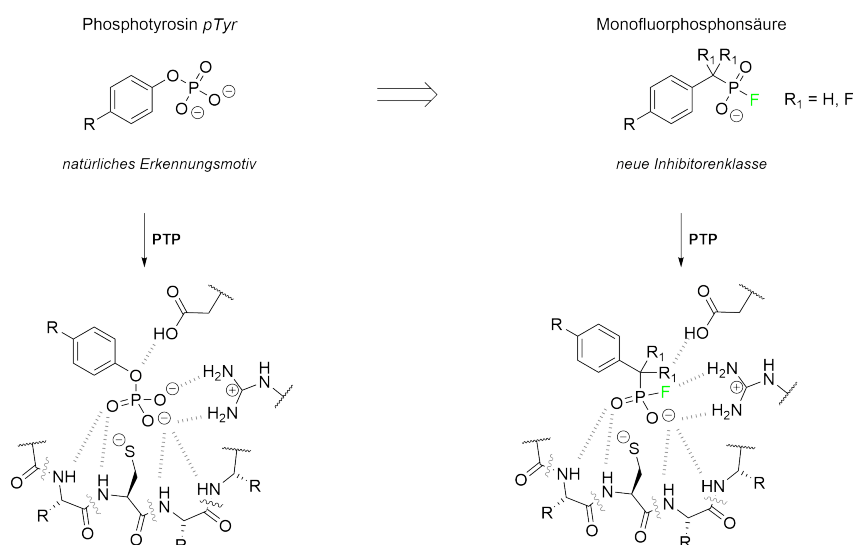


Abb. 4.44 links: Phosphotyrosin und die Bindung gegenüber einer Phosphatase; rechts: Monofluorophosphonsäuren und die mögliche Bindung gegenüber einer Phosphatase.

Der Bindungsmodus von Phosphotyrosin innerhalb des katalytisch aktiven Zentrums von Proteintyrosinphosphatasen ergibt sich aus einem Zusammenspiel mehrerer H-Brückenbindungen des Peptidrückgrades sowie der Koordination über verschiedene polare Aminosäureseitenketten.^[162,163] Eine Hauptinteraktion erfolgt dabei über die Guanidin-Gruppe des Arginins. Entsprechend dieses Koordinationsverhaltens ergibt sich für die Klasse der monofluorierten Phosphonsäuren ein vergleichbarer Bindungsmodus (Abb. 4.44; rechts). Anhand dessen könnten Interaktionen erfolgen, die eine ausreichende Bindung der Monofluorophosphonsäuren gegenüber der Proteintyrosinphosphatase PTP1B ermöglichen.

Die Substitution eines Atoms oder Strukturelementes durch das elektronegative Element Fluor stellt innerhalb der Medizinischen Chemie eine Modifikation dar, die die biologisch-chemischen Eigenschaften in großem Maße beeinflusst. Obwohl nahezu alle natürlichen biologisch wirksamen Substanzen keine Fluorsubstituenten aufweisen, beträgt der Anteil fluorhaltiger Wirkstoffneuentwicklungen (insbesondere der *small molecules*) heutzutage 20 bis 25 %.^[164] Mit der Entwicklung des Zytostatikums 5-Fluoruracil im Jahre 1957^[165] folgten bis heute Schlüsselpräparate in verschiedensten Anwendungen wie Fluoxetin, bekannt als Prozac[®] (antidepressiv), Faslodex (antiproliferativ), Flurithromycin (antibakteriell) and Efavirenz (antiviral), um nur einige zu nennen. Mit der Verwendung von Fluor innerhalb von Wirkstoffen können chemische Eigenschaften soweit verändern

werden, dass biologisch wirksame Wechselwirkungen optimiert werden können. Dazu gehören veränderte pK_S -Werte, konformationelle Veränderungen, erhöhte Lipophilie und metabolische Stabilität sowie verbesserte Protein-Liganden-Interaktionen.^[164,166]

Mit der Einführung eines direkt an das Phosphorzentrum gebundenen Fluoratoms ergibt sich neben veränderten Bindungseigenschaften eine potenzielle Reaktivität, die im Folgenden diskutiert werden soll.

4.2.1.1 Wie verhalten sich Monofluorphosphonsäuren gegenüber PTP1B?

Innerhalb der Reihe der toxischen Nervenkampfstoffe und der reaktiven Serinproteasensonden agiert das Fluorid als Abgangsgruppe und führt im Zuge seiner Substitution zu der Ausbildung einer kovalenten Modifikation des Proteins. Die Dissoziationsenergie der P-F Bindung wird je nach vorliegender Struktur in einer Größenordnung von $D_{298}^0 \leq 405$ kJ/mol angegeben, dem gegenüber steht z.B. die P-Cl Bindung mit ≤ 376 kJ/mol (im Vergleich dazu P-O = 589 kJ/mol).^{18[167]} Somit führt die Fluorierung innerhalb von halogenierten Phosphor- und Phosphonsäuren zum stabilsten Säurehalogenid (P-X, X = F > Cl > Br > I).^[168,169] Fluorierte Phosphorsäuren besitzen substituentenabhängig eine Hydrolysestabilität und werden mit antiviralen Eigenschaften in Verbindung gebracht.^[170] Mit Erhalt von hydrolysestabilen monofluorierten Phosphonsäuren könnte eine Inhibitor-klasse vorliegen, die gegenüber dem nukleophilen Zentrum der Proteintyrosinphosphatasen als affine, kovalent reagierende Struktur agiert und somit ein neues Sondensystem für Anwendungen des *activity-based protein profiling* darstellen würde (Abb. 4.45; Fall 1). Der postulierte Reaktionsmechanismus würde im Falle der Reaktion mit einer Proteintyrosinphosphatase äquivalent dem der Serinhydrolasen verlaufen. Abweichend ist dabei die Reaktion des nukleophilen Cysteinrestes des aktiven Zentrums, was folglich zur Bildung eines Thiophosphonsäureesters führen würde. Obgleich die Ausbildung eines Monothio-phosphonsäureesters ein weniger hydrolysestabiles PTP-Sondenaddukt zur Folge haben würde, sind diese stabiler als Phosphorsäurethioester, wie sie bei der natürlichen Substratspaltung gebildet werden.

Abhängig von eben dieser Stabilität des gebildeten Adduktes, entspricht der Bindungsmodus einer kovalent irreversiblen Hemmung oder, im Falle einer darauf folgenden Hydrolyse,

¹⁸Bindungsenergien eines diatomischen Moleküls A-B; D_{298}^0 entspricht der Enthalpie der Spaltung von A-B \rightarrow A + B.

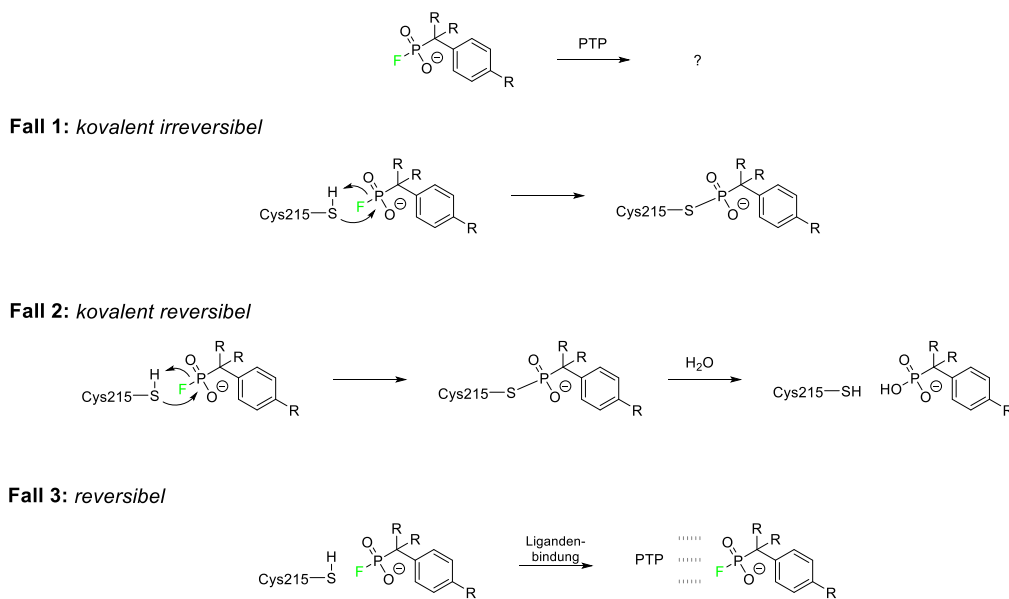


Abb. 4.45 Zielstruktur der negativ geladenen Monofluorphosphonsäuren und die schematische Darstellung der möglichen Interaktionen mit einer Proteintyrosinphosphatase

einer kovalent reversiblen Interaktion. Mit der Bildung eines Thiophosphonsäureintermediates, gefolgt von einer Hydrolysereaktion, würden Monofluorphosphonsäuren in ihrem Verhalten dem eines Substrates entsprechen, sodass nach der erfolgten Reaktionskaskade ein reaktiviertes Protein zurückgebildet werden würde (Abb. 4.45; Fall 2).

Neben einer kovalenten Reaktion zwischen Inhibitor und Phosphatase ergibt sich bei einer erhöhten Stabilität die Möglichkeit des Vorliegens eines unreaktiven Systems. Somit würden monofluorierte Phosphonsäuren reversible Inhibitoren darstellen (Abb. 4.45; Fall 3).

Fluorierte Sulfonsäuren sind eine verwandte Substanzklasse der fluorierten Phosphonsäuren. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) reagiert irreversibel mit vielen Serinproteasen und findet in sogenannten Inhibitorcocktails Verwendung. Innerhalb der Klasse der S-Fluoride sind Substanzen bekannt, die mit verschiedenen biologisch relevanten Proteinen eine kovalente Bindung eingehen. Beschrieben sind irreversible Inhibitoren der Dihydrofolatreduktase (DHFR),^[171] Guanin-Desaminase (GAH),^[172] Xanthinoxidase (XO),^[173] α -Chymotrypsin,^[174] Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH)^[175] und viele mehr.^[176] Bekannt ist jedoch ferner, dass S-Fluoride, die als kovalent irreversibel reagierende Inhibitoren

entwickelt wurden, keine Reaktion mit dem Zielprotein eingehen und somit als klassisch reversible Inhibitoren anzusehen sind.^[177,178]

4.2.2 Synthese und Stabilität von Monofluorosphonsäuren

Die Synthese von Di- und Monofluorosphonsäuren, die einen Benzylsubstituenten aufweisen, ist nur in einer bekannten Veröffentlichung beschrieben. Bender et al. veröffentlichten 1974 die Verteilungsreaktionen von Fluoratomen zwischen Difluorosphonsäuren und Phosphonsäuren. Diese Umsetzungen wurden unter Stickstoffatmosphäre bei erhöhter Temperatur durchgeführt. (Abb. 4.46).^[179]

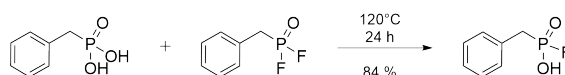


Abb. 4.46 Synthese von Monofluorbenzylphosphonsäure nach Bender et al.

Monofluorbenzylphosphonsäure wurde in einer Ausbeute von 84 % erhalten und konnte NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Jedoch liegen keine Informationen über die Stabilität der dargestellten Substanzen vor. Um die Eigenschaften von Monofluorosphonsäuren als neue pTyr-Mimetika beurteilen zu können, musste im Folgenden die Stabilität dieser Substanzklasse untersucht werden.

Zunächst wurde dazu Difluorbenzylphosphonsäure hergestellt (Abb. 4.47). Benzylbromid wurde mit Trimethylphosphit umgesetzt, wobei Dimethylbenzylphosphonat **50** erhalten wurde. Die anschließende Silylierung gefolgt von einer Hochvakuumdestillation und der Hydrolyse des Silylesters lieferte die Phosphonsäure **51**. Den Literaturbedingungen von Bender et al. abweichend wurde **51** zunächst vollständig chloriert und mittels ZnF_2 difluoriert, wobei Difluorbenzylphosphonsäure **53** nach Hochvakuumdestillation erhalten wurde (Abb. 4.47).

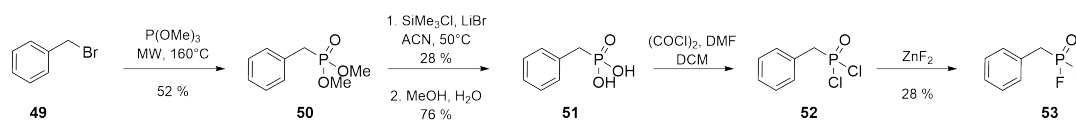


Abb. 4.47 Synthese von Difluorbenzylphosphonsäure.

Nach der erfolgreichen Darstellung von **53** sollten nun Bedingungen ausgemacht werden,

die eine selektive Umsetzung zur Monofluorphosphonsäure ermöglichen. Fluorierte Carbonsäuren besitzen im Vergleich zu ihren Säurechloriden eine erhöhte Hydrolysestabilität und können sogar wässrig aufgearbeitet werden.^[180] Folglich sollte versucht werden die Difluorphosphonsäure mittels einfacher Hydrolyse zur Monofluorphosphonsäure umzusetzen.

Aufgrund der NMR-aktiven Kerne ^1H , ^{19}F und ^{31}P ist die spektroskopische NMR-Analytik sehr aussagekräftig gegenüber der Hydrolysereaktion hin zur mono- bzw. desfluorierten Phosphonsäure (Abb. 4.48).

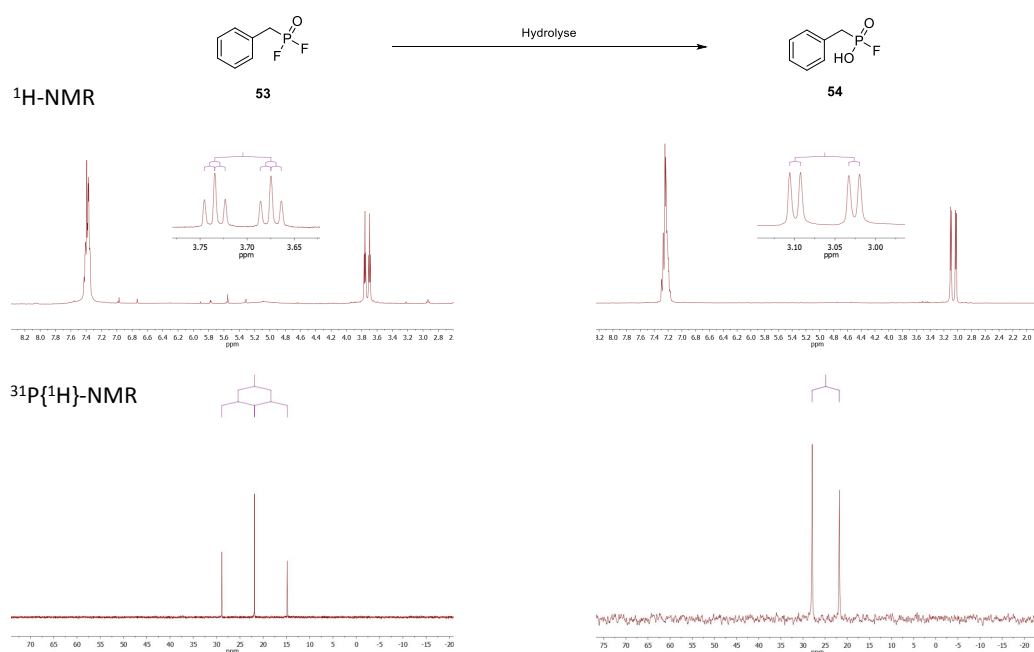


Abb. 4.48 ^1H - und ^{31}P -NMR Spektren der Hydrolyse von Difluorbenzylphosphonsäure; Die Lösungsmittelsignale CD_3CN und D_2O wurden der Übersicht halber unterdrückt.

Im $^1\text{H-NMR}$ bildet die CH_2 -Gruppe von Difluorbenzylphosphonsäure **53** durch die 2J -Kopplung (23 Hz) zum Phosphorkern und den zwei Fluoratomen ($^3J = 4.4$ Hz) ein Dublett-Triplett-Signal (Abb. 4.48; oben, links). Nach der Hydrolyse konnte für diese Strukturgruppe ein veränderter Signalsatz beobachtet werden. Das Kopplungsmuster des Dublett-Dublett-Signals ($J = 22$ Hz und 4 Hz) zeigte die Gegenwart von zwei unterschiedlichen NMR-aktiven Kernen (Abb. 4.48; oben, rechts). Im Protonen-entkoppelten $^{31}\text{P-NMR}$ zeigte sich die erfolgreiche Hydrolyse zur Monofluorphosphonsäure **54** in der Veränderung

des Triplettsignals ($^1J = 1138$ Hz) hin zu einem Dublett mit $^1J = 990$ Hz (Abb. 4.48; unten).

Weiter war zu beobachten, dass ein Signalsatz der desfluorierten Phosphonsäure **51** nicht gefunden werden konnte. Demnach besitzt die Monofluorbenzylphosphonsäure **54** eine signifikante Hydrolysestabilität in "wässrigen" Systemen (D₂O).¹⁹ Die wiederholte Aufnahme von ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren der hydrolysierten Probe nach 7 Tagen, zeigte die Weiterreaktion zur desfluorierten Phosphonsäure **51** mit einem Verhältnis von 7 : 3 (Phosphonsäure : Monofluorid).

Die relative Stabilität der Monofluorbenzylphosphonsäure ist auch im wässrigen Medium von HPLC-Trennungen vorhanden, sodass einheitliche HPLC-Chromatogramme und Massenspektren erhalten werden konnten. Die fluorierte Phosphonsäure weist eine stärkere Interaktion zu C18-HPLC-Materialien auf, sodass Säure und Monofluorid chromatographisch voneinander getrennt werden können. In Abb. 4.49 ist ein Vergleich der Retentionszeiten der Verbindungen **51** und **54** dargestellt.²⁰

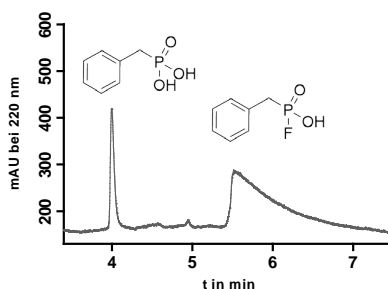


Abb. 4.49 Ausschnitt eines HPLC-Chromatogramms eines Gemisches aus Benzylphosphonsäure **51** und Monofluorbenzylphosphonsäure **54** bei einer Absorptionswellenlänge von 220 nm.

4.2.2.1 Reaktivität von Monofluorphosphonsäuren

Thiolgruppen

Um eine mögliche Reaktivität gegenüber dem aktivierten Cystein einer Proteintyrosinphosphatase beurteilen zu können, sollte zunächst der synthetische Zugang zu Thiophosphonsäureestern evaluiert werden. Da auf keine bekannten Veröffentlichungen zur Synthese

¹⁹ Aufgrund der Bildung eines Äquivalents HF liegt ein saurer pH-Wert vor.

²⁰ Analytische HPLC; Gradiententrennung H₂O / ACN, 5-99 % Acetonitril unter dem Zusatz von 0.1 % TFA.

von Monothio- und Dithiophosphonsäureestern auf Basis einer Benzyl-substituierten Phosphonsäure zurückgegriffen werden konnte, musste eine Syntheseroute zum Erhalt dieser entwickelt werden. Dazu sollte die Benzylphosphonsäure **51** als Säurehalogenid aktiviert und mit *N*-Acetylcysteinmethylester zum entsprechenden Thioester umgesetzt werden. Dies erfolgte über das reaktivere Säurechlorid und die anschließende Umsetzung mit AcCysOMe in Gegenwart von DBU, um der Deponierung des aktiven Cysteins einer Phosphatase nahe zu kommen. Der erfolgreiche Umsatz zum Mono- und Dithioester konnte zwar durch die geeignete Wahl der Edukt- und Basenäquivalente erreicht werden, jedoch war diese Umsetzung aufgrund ihrer oxidationsempfindlichen Edukte und Reaktionsprodukte sowie der Bildung anderer unbekannter Nebenprodukte mit einer geringen Ausbeute verbunden (Abb. 4.50).

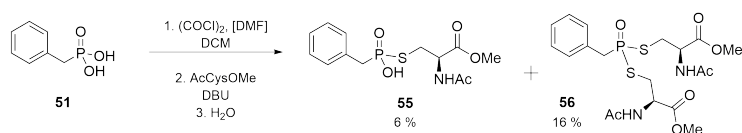


Abb. 4.50 Synthese des Mono- und Dithiophosphonsäurebenzylesters.

Die beiden Produkte wurden nach ihrer erfolgreichen Darstellung mittels präparativer HPLC aufgereinigt und voneinander getrennt. Die isolierten Thiophosphonsäureester wurden im Anschluss NMR-spektroskopisch charakterisiert und auf ihre Stabilität hin untersucht. Im direkten Vergleich der beiden Substanzen zeigte sich eine erhöhte Stabilität des Dithiophosphonsäurebenzylesters **56** gegenüber dem Monothioester **55**. Nach 12 Tagen bei Raumtemperatur in $\text{DMSO-}d_6$ wies letzterer eine Hydrolyse hin zur Benzylphosphonsäure und *N*-Acetylcysteinmethylester von ca. 25 % auf. Der Dithioester hingegen zeigte selbst nach 32 Tagen keine Anzeichen einer Hydrolyse.

Obleich eine signifikante Hydrolyse von Verbindung **55** beobachtet werden konnte, besitzt der Monothioester eine relative Hydrolysestabilität, sodass bei einer erfolgreichen Protein-Inhibitor-Reaktion von einem hinreichend stabilen kovalent vernetzten Addukt ausgegangen werden kann.

Bei der Entwicklung von irreversibel reagierenden Inhibitoren stellt die Anwesenheit von Thiolen eine nicht zu vernachlässigende Herausforderung dar. Thiole wie z.B. Dithiothreitol (DTT) sind ein wichtiger Bestandteil von Puffern in biochemischen Untersuchungen und dienen dem Schutz oxidationsempfindlicher Proteine. Da die meisten kovalent reagierenden Inhibitoren reaktive elektrophile Gruppen besitzen, ist eine Reaktion mit DTT ein

häufiger ungewollter Nebeneffekt.

Mit dem vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass das Thioesterprodukt der hypothetischen Reaktion zwischen Monofluorosphonsäuren und einer Proteintyrosinphosphatase ausreichend stabil sein sollte. Folgend wurde die Reaktivität gegenüber Dithiothreitol untersucht. Dazu wurde eine Säuremonofluoridprobe gewählt, die zu einem Teil zur Phosphonsäure hydrolysiert war, um Substanzen im Bereich der chemischen Verschiebung von CH₂-Gruppen besser differenzieren zu können. Es wurden ¹H- und ¹⁹F-NMR Spektren vor und nach der Inkubation mit einem Äquivalent DTT aufgenommen und die relevanten Signale in ihrer Integration verglichen (Abb. 4.51).

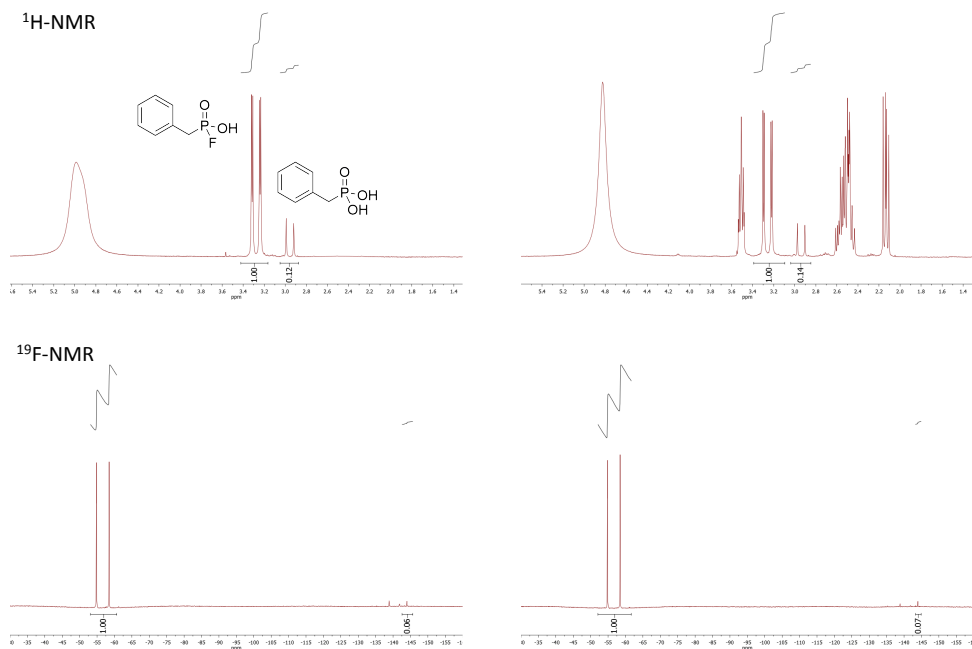


Abb. 4.51 ¹H- und ¹⁹F-NMR Spektren vor (*links*) und nach (*rechts*) Inkubation mit 1 Äq. DTT für 1h in D₂O.

Im ¹H-NMR konnte beobachtet werden, dass sich das Verhältnis der Signalsätze zueinander weder veränderte noch sich ein weiteres Dublett bildete, was auf die Bildung eines Thioesters schließen lassen würde (Abb. 4.51; *oben*). Der Signalsatz im ¹⁹F-NMR-Spektrum zeigte für das Phosphor-gebundene Fluoratom eine Aufspaltung zu einem Dublett bei $\delta = -56$ ppm mit einer Kopplungskonstante von $J = 990$ Hz (Abb. 4.51; *unten*). Neben dem Dublett des Fluoratoms des Säuremonofluorids war ein weiteres Signal bei einer

chemischen Verschiebung von $\delta = -145$ ppm zu beobachten. Dieses konnte dem freien Fluorid nach erfolgter Hydrolyse der Monofluorbenzylphosphonsäure zugeordnet werden. Das Fluorid würde im Zuge einer Umsetzung mit DTT gebildet werden, sodass sich das Verhältnis zwischen Dublettsignal und Fluoridsingulett verändern würde. Nach der Inkubation mit DTT für 1 h zeigte sich im ^{19}F -Spektrum keine solche Veränderung, was den Beobachtungen aus den ^1H -NMR Spektren entsprach. Das erneute Vermessen der NMR-Proben nach 28 Tagen zeigte nur eine vorangeschrittene einfache Hydrolyse, die der Veränderung der Signalverhältnisse in beiden Kernen (^1H und ^{19}F) entnommen werden konnte.

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass keine Reaktivität von Monofluorbenzylphosphonsäure gegenüber DTT besteht.

Andere Nukleophile

Da sich die Monofluorphosphonsäure **54** als ausreichend hydrolysestabil und resistent gegenüber einer unselektiven Reaktion mit freien Thiolen erwiesen hat, sollte die Reaktivität gegenüber anderen Nukleophilen untersucht werden. Dazu wurde eine Versuchsreihe durchgeführt in der Monofluorbenzylphosphonsäure im basisch wässrigen Milieu (NaHCO_3 , $\text{pH} > 8$) mit verschiedenen Modellverbindungen inkubiert wurde. Als potenziell reaktive Nukleophile wurden dabei *n*-Propanol, Essigsäure, Benzylamin und Alanin-*tert*-butylester gewählt. Die Reaktionsansätze wurden mittels LCMS verfolgt und auf mögliche Reaktionsprodukte hin analysiert. Auch nach mehreren Tagen konnte keine Produktbildung im Zuge einer Reaktion mit *n*-Propanol, Essigsäure und AlaOtBu beobachtet werden. Hingegen konnte eine mögliche Reaktivität gegenüber Aminen festgestellt werden. Die mutmaßliche Bildung eines Phosphonsäureamides konnte nach verlängerter Reaktionszeit von 4 Tagen im Auftreten einer weiteren UV-aktiven Substanz mit der korrespondierenden Molekülmasse beobachtet werden.

Anhand dieser Ergebnisse kann von einer geringen Reaktivität gegenüber Aminosäureresten wie Serin, Glutamat / Aspartat und Lysin und daraus resultierenden unselektiven Reaktionen ausgegangen werden.

4.2.2.2 Synthese von Monofluorophosphonsäurederivaten

Im Folgenden sollten verschiedene Derivate monofluorierter Phosphonsäuren dargestellt werden, mit denen eine kovalente Modifikation von PTP1B nachgewiesen werden kann. Die Einführung eines fluoreszenten Strukturelements ist ein komfortablerer Ansatz, da im Gegensatz zu Biotin auf die Verwendung weiterer Reagenzien wie Antikörper und bildgebender Substrate verzichtet werden kann. Zum Einsatz kommen dabei häufig Xanthenfarbstoffe wie Fluorescein oder Rhodamin. Carboxyfluorescein ist gegenüber Carboxyrhodamin synthetisch leichter zugänglich und besitzt nach der Einführung von Schutzgruppen in den phenolischen Positionen bessere Eigenschaften in organischen Synthesen. Demnach kam bei der Entwicklung einer fluoreszenzmarkierten Monofluorophosphonsäuresonde geschütztes Carboxyfluorescein zum Einsatz. Retrosynthetisch sollte die Zielstruktur über die Fluorierung der Phosphonsäure, gefolgt von einer sauren Entschützung der phenolischen OH-Gruppen des Fluoresceins, erhalten werden. Als Startsubstanz wurde kommerziell erhältliche 4-Aminomethylbenzoesäure gewählt (Abb. 4.52).

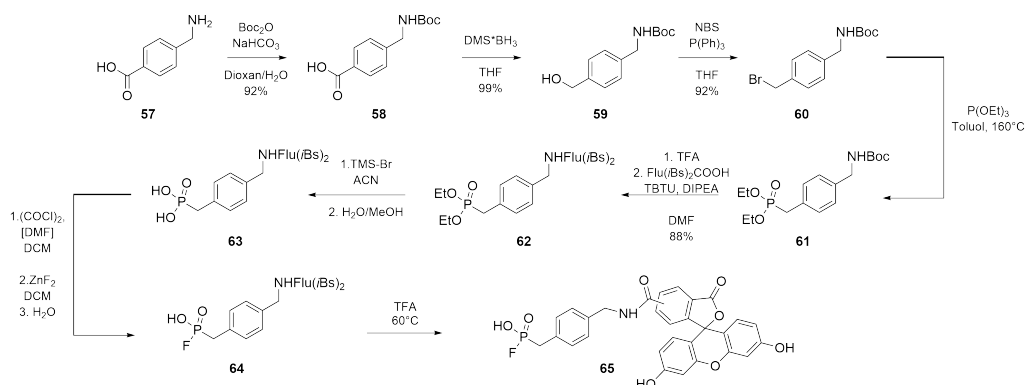


Abb. 4.52 Synthese der fluoreszenzmarkierten Monofluorophosphonsäure **65**.

Die Aminofunktion der 4-Aminomethylbenzoesäure wurde zunächst als säurelabiles Carbat geschützt und anschließend mittels $\text{BH}_3 \bullet \text{DMS}$ in THF zum Alkohol **59** reduziert. Eine abgewandelte Appel-Reaktion führte zur Einführung der Bromidabgangsgruppe, welche im Zuge einer Michalis-Arbuzow Reaktion durch einen Diethylphosphonatrest substituiert wurde. Das Isobutyryl-geschützte 5,6-Carboxyfluorescein wurde unter Standardpeptidkuppelungsbedingungen nach TFA-saurer Entschützung der Aminfunktion eingeführt. Die Hydrolyse des Phosphonats **62** lieferte die Phosphonsäure **63** ohne eine partielle Abspaltung der Fluorescein-ständigen Schutzgruppen. Die letzten Schritte der Synthese,

zum Erhalt der Zielverbindung **65**, waren die Fluorierung der Phosphonsäure und die anschließende Abspaltung der Isobutyryl-Schutzgruppen. Dazu wurde die Phosphonsäure **63** zunächst mittels Oxalylchlorid vollständig chloriert und anschließend über ZnF_2 erhitzt. Nach der Hydrolyse zur Monofluorphosphonsäure **64**, wurde das Rohprodukt organisch extrahiert und die Isobutyrylgruppen mit TFA entfernt. Obwohl die Zielsubstanz **65** zunächst nur in einer Reinheit von 65 % erhalten werden konnte, wurde diese in Vorversuchen einer Proteinvernetzungsreaktion verwendet.

Der Umstand, dass Eigenschaften der Proteininteraktion einer funktionellen Gruppe durch die räumliche Nähe von Fluorescein aufgehoben werden können, ist literaturbekannt.^[181] Dies kann bis hin zu einem grundverschiedenen Bindungsmodus gegenüber dem Zielprotein führen, sodass ein irreversibler Mechanismus aufgehoben wird. Durch die Einführung eines Linkers, zwischen zu erkennender Strukturgruppe und dem Fluoresceinrest, ist es hingegen möglich, diesen wieder herzustellen.

Analog zu diesem Ansatz sollte eine alternative fluoreszente Monofluorphosphonsäuresonde dargestellt werden. Als Linkerstruktur wurde 6-Aminohexansäure gewählt. (Abb. 4.53).

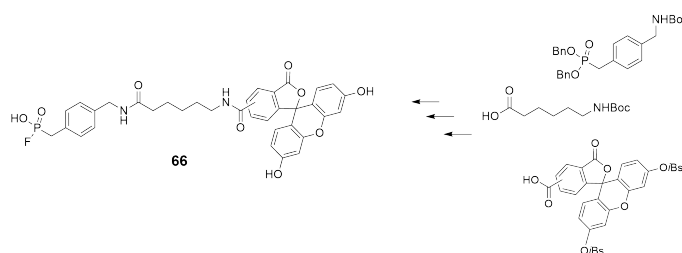


Abb. 4.53 Schema der Darstellung der linkerverlängerten Sonde **66**.

Die Synthese der linkerverlängerten Sonde erfolgte ebenfalls im Mikromaßstab. Abweichend der Synthese von **65** wurde eine andere Schutzgruppenstrategie gewählt. Ferner erfolgte die Fluorierung der Phosphonsäure statt des Halogenidaustausches mittels ZnF_2 über das Reagenz Diethylschwefeltrifluorid (DAST).

Mit der Einführung des Fluorophors wurde ein Strukturelement aufgenommen, welches selbst eine Affinität gegenüber PTP1B besitzt.²¹ Eine vergleichbare inhibitorische Wirkung ist von Fluorescein bekannt.^[182] Um eine potenzielle Proteinmarkierungsreaktion

²¹ IC_{50} (5,6-Carboxyfluorescein) \approx 660 μM

beurteilen zu können, sollte ein Weg gefunden werden, um einer Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens der Monofluorphosphonsäuregruppe entgegenzuwirken. Durch die Einführung des Fluorophors nach erfolgter Proteinbindung, kann ein Einfluss des Fluoresceinrestes ausgeschlossen werden.

Eine Möglichkeit der späteren Verknüpfung einer reaktiven Sonde mit einem anderen Molekül stellt die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Alkin und einem Azid dar. Die 1,3-dipolare Cycloaddition, bei der 1,3-Dipole mit Dipolarophilen zu fünfgliedrigen Heterocyclen umgesetzt werden, wurde bereits in den 1960er Jahren von Rolf Huisgen beschrieben.^[183–185] Dabei bildet sich bei der Verwendung von substituierten Aziden (Dipol) und Alkinen (Dipolarophil) ein Isomerengemisch aus 1,4- und 1,5-Triazolen. Diese Reaktion findet in der Regel erst bei hohen Temperaturen statt. Mit der Entdeckung der Katalyse der Cycloaddition durch Cu(I)-Salze, war es möglich diese Reaktion unter milden Bedingungen hin zu einem regioselektiv gebildeten 1,4-Triazol durchzuführen.^[186,187] Die kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) wird heutzutage oft als "Klick-Reaktion" bezeichnet und zählt zu den häufigsten Reaktionen, die in der bioorthogonalen Chemie zum Einsatz kommen.^[188]

Folglich musste ein Sondensystem entwickelt werden, bei dem die Klick-Reaktion nach erfolgter Proteininkubation erfolgen kann (Abb. 4.54).

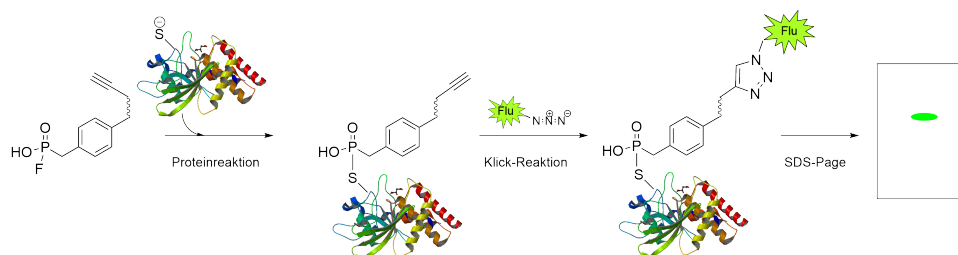


Abb. 4.54 Schema der bioorthogonalen Klick-Reaktion mit der postulierten kovalent irreversiblen Reaktion der Monofluorphosphonsäuren.

Zur Einführung des Alkins wurde das entschützte Phosphonat **61** mit Pentinsäuresuccinimidylester umgesetzt. Anschließend wurde die Phosphonsäure **67** mit DAST fluoriert und nach der Hydrolyse zur Monofluorphosphonsäure mittels HPLC aufgereinigt (Abb. 4.55).

Die Biotinylierung zu untersuchender Proteine stellt neben der Markierung mit Fluorophoren eine weitere häufig genutzte Option in der Proteinanalytik dar. Biotin, auch als

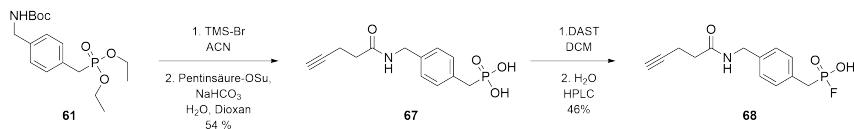


Abb. 4.55 Synthese der Alkinsonde.

Vitamin B₇ bzw. Vitamin H bekannt, besitzt neben seiner physiologischen Relevanz in Stoffwechselprozessen eine außergewöhnlich hohe Bindungsaffinität zu dem Protein Avidin ($K_d \approx 10^{-15}$) und wird aufgrund dieser Eigenschaft in der Affinitätschromatographie verwendet.^[189,190] Ferner ist es möglich die Bildung des Biotin-Avidin-Komplexes in der Visualisierung von Westernblots zu nutzen.

Daher sollte eine biotinylierte Monofluorphosphonsäure dargestellt werden, mit der eine Reaktivität gegenüber PTP1B mittels Westernblot untersucht werden kann. Synthetisch wurde dies durch die Cycloaddition der Alkinsonde **68** mit einem Biotinazid umgesetzt (Abb. 4.56).

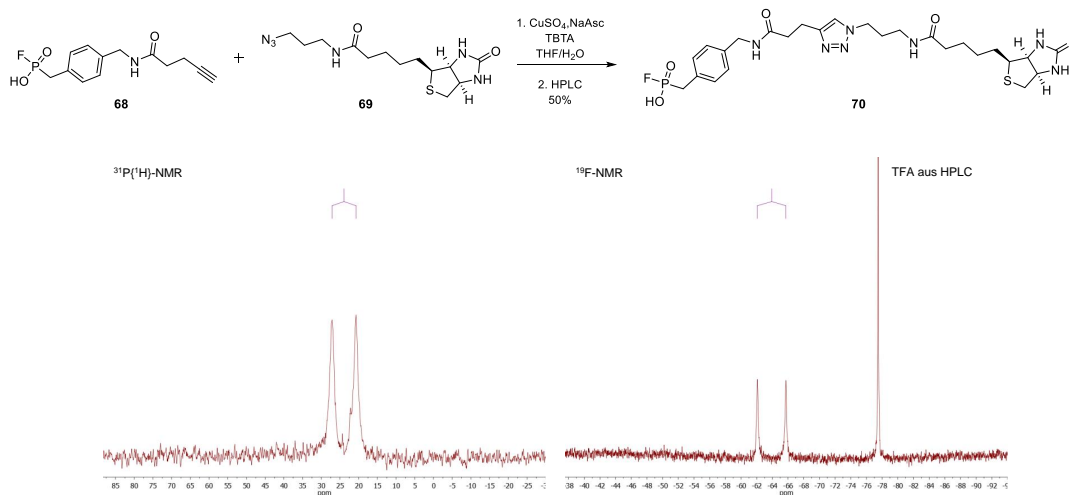


Abb. 4.56 oben: Synthese der Biotinsonde **70**;
unten: ³¹P- und ¹⁹F-NMR Spektren von **70**.

Im Folgenden sollten die dargestellten Verbindungen auf ihr Verhalten gegenüber der Proteintyrosinphosphatase PTP1B hin untersucht werden.

4.2.3 Untersuchung des Verhaltens gegenüber PTP1B

4.2.3.1 Monofluorophosphonsäuren als irreversible Inhibitoren

Enzymkinetische Betrachtung

Der Umsatz eines Substrates durch ein Enzym wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit v_s bestimmt. Bei gleichbleibender Aktivität des Enzyms ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Substrathydrolyse konstant, sodass die Bildung der zu detektierenden Produkte einem linearen Verlauf folgt. Diese Linearität des Substratumsatzes wird bei der Durchführung von Positivkontrollen beobachtet. Wenn ein Protein mit einem Inhibitor eine Reaktion eingeht und dies in einer irreversiblen Hemmung resultiert, kann folglich kein Substrat mehr umgesetzt werden. Dies führt bei einer Überkonzentration des irreversiblen Inhibitors gegenüber dem Enzym zu einer zeitabhängigen Aktivitätsabnahme, was in einer Reaktionsgeschwindigkeit von $v_s = 0$ resultieren kann (Abb. 4.57).²²

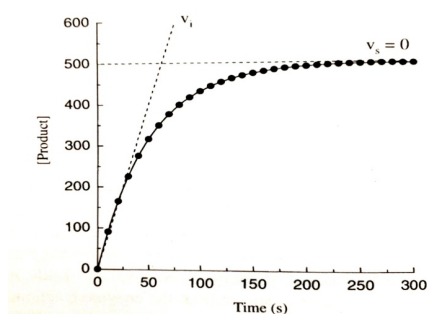


Abb. 4.57 Darstellung des Substratumsatzes bei einer irreversiblen Hemmung.

Zunächst wurde die Enzymaktivität von PTP1B, in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Monofluorbenzylphosphonsäure **54**, mittels des pNPP-Assays über einen Zeitraum von 25 min und 60 min bestimmt (Abb. 4.58).²³

Der Kurvenschar der Messungen von Monofluorbenzylphosphonsäure gegenüber PTP1B ließ sich eine Abweichung gegenüber dem linearen Substratumsatz entnehmen. In einem Konzentrationsbereich von 2 mM verringerte sich die Geschwindigkeit des Substratumsatzes bereits nach 10 Minuten, was in einer vollständigen Desaktivierung nach etwa 20

²²aus *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, Robert A. Copeland, John Wiley and Sons, 2005^[191]

²³durchgeführt von Dr. Christoph Arkona, AG Rademann

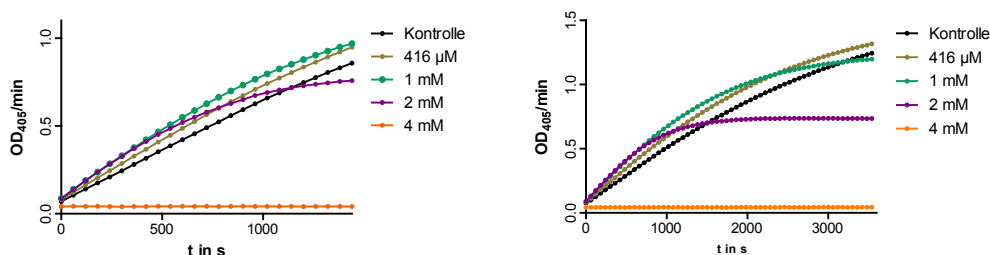


Abb. 4.58 links: Substratumsatz durch PTP1B in Anwesenheit von **54** (30 min);
rechts: Substratumsatz durch PTP1B in Anwesenheit von **54** (60 min).

Minuten endete. Der Effekt einer Desaktivierung ließ sich noch bei einer Konzentration von 1 mM beobachten, wobei höhere Verdünnungen keinen Effekt mehr zeigten.

Mit dem Vorliegen der kinetischen Daten von PTP1B in Anwesenheit der Monofluorphosphonsäure **54** wurde auf einen irreversiblen Mechanismus geschlossen. Die dargestellten Ergebnisse erwiesen sich als reproduzierbar und konnten auch bei der enzymkinetischen Untersuchung der synthetisierten Fluoreszenz- und Biotinsonden beobachtet werden.²⁴ Unter der Verwendung anderer Verbindungen als Negativkontrollen ließ sich jedoch feststellen, dass diese mitunter ein vergleichbares Verhalten aufwiesen.

Daher wurden zunächst die enzymkinetischen Eigenschaften verschiedener Substanzen und Inhibitoren untersucht, die bekannte irreversible Eigenschaften besitzen. Als Positivkontrollen einer irreversiblen Enzymkinetik wurden NaF und H₂O₂ gewählt. NaF wirkt als nicht-kompetitiver irreversibler Inhibitor auf Serin- und Threonin- sowie saure Phosphatasen^[192,193] und zeigte während eigener Untersuchungen irreversible Eigenschaften hinsichtlich PTP1B. H₂O₂ bewirkt vor allem die Oxidation von schwefelhaltigen Aminosäuren, wie z.B. des aktiven Cysteins (Cys215) und entspricht in seiner Wirkung Pervanadaten, welche wie NaF ein häufiger Bestandteil von Inhibitorcocktails sind. Als Vergleich wurden die Monofluorphosphonsäure **70** sowie die Phosphonsäuren **71** und **72** unter identischen Versuchsbedingungen gewählt.²⁵ (Abb. 4.59)

Dem Kurvenverlauf des Substratumsatzes bei der Verwendung von NaF und H₂O₂ ließ sich eindeutig eine zeitabhängige Abnahme der Aktivität entnehmen. Das Desaktivierungspotenzial der beiden Verbindungen war hingegen sehr verschieden. NaF wies erst bei

²⁴durchgeführt von Dr. Christoph Arkona, AG Rademann

²⁵verwendeter Puffer: 25 mM TRIS HCl pH 7.0, 10 % Glycerin, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.01 % Brij 35, 1 mM DTT (Ausnahme H₂O₂)

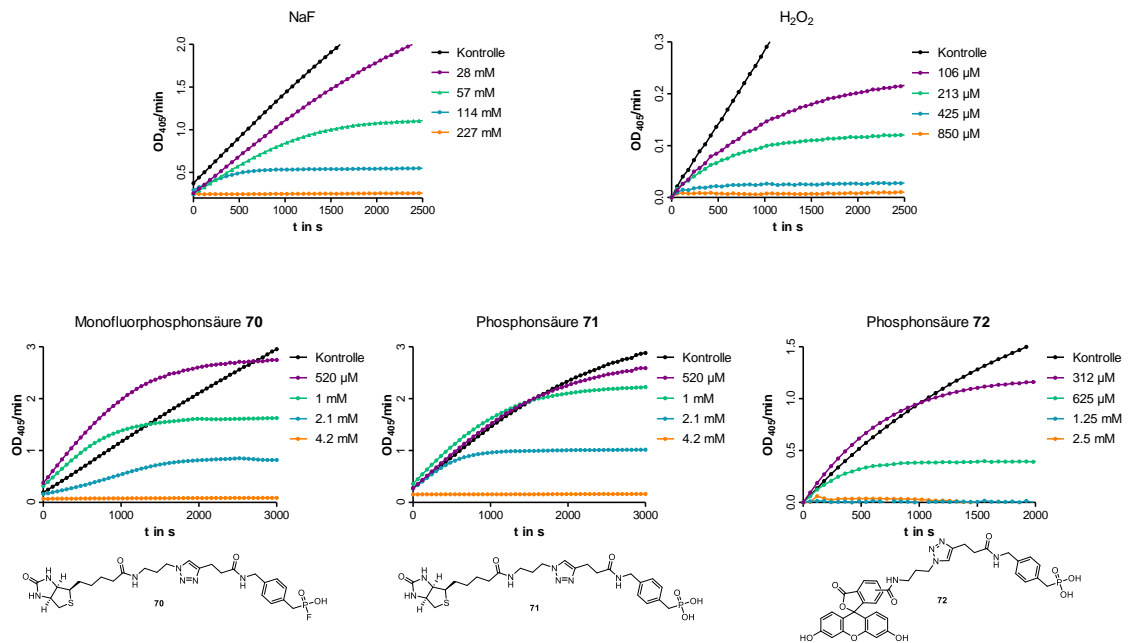


Abb. 4.59 oben: Irreversibler Kurvenverlauf der Kontrollen NaF und H₂O₂ bei verschiedenen Konzentrationen;
 unten: Kurvenverlauf der verwendeten Inhibitoren bei verschiedenen Konzentrationen.

Konzentrationen von etwa 50 mM eine signifikante Desaktivierung auf (grüner Graph), H₂O₂ war schon im μM-Bereich wirksam (Abb. 4.59; oben).

Bei der Betrachtung des zeitabhängigen Substratumsatzes konnte für die Monofluorophosphonsäure **70** ein vergleichbares irreversibles Verhalten festgestellt werden. Zu beobachten war dabei eine erhöhte Enzymaktivität im Konzentrationsbereich zwischen 500 μM und 1 mM, die nach etwa 25 min in eine relative Reaktionsgeschwindigkeit von $v_s = 0$ überging. Die bedeutendste Beobachtung im Zuge dieses Experimentes war der Umstand, dass die verwendeten Phosphonsäuren **71** und **72** ebenfalls ein Verhalten zeigten, welches dem Charakter eines irreversiblen Inhibitors entspricht. Eine zeitabhängige Desaktivierung konnte in Konzentrationen von 300 μM bis 1 mM beobachtet werden (Abb. 4.59; unten; mitte und rechts). Das Auftreten einer erhöhten Enzymaktivität im Vergleich zu der Kontrolle konnte ebenfalls beobachtet werden. Diese Enzymkinetik konnte in verschiedenen Folgeexperimenten reproduziert werden und entspricht nicht dem literaturbekannten Verhalten der Phosphonsäuren gegenüber PTP1B.

Da Phosphonsäuren die am häufigsten verwendete Klasse von kompetitiven und reversi-

blen PTP1B-Inhibitoren darstellen, musste mit dem Erhalt der dargestellten Ergebnisse das verwendete Dokumentationssystem untersucht werden. Bei der Durchführung von enzymkinetischen Messungen werden üblicherweise Puffer in einer Konzentration von 25 bis 100 mM eingesetzt. Bei der Entwicklung eines geeigneten Puffersystems müssen, neben der Abdeckung eines optimalen pH-Bereiches, Faktoren wie Ionenstärke der eingesetzten Verbindungen, Einflüsse durch Additive sowie Komplexbildner, Detergenzien und Reduktionsmittel berücksichtigt werden.^[194] Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Pufferzusammensetzung verwendet, die bei der Durchführung von pNPP-Assays ein etabliertes System im Arbeitskreis Rademann sowie der Screening Unit, FMP darstellt.

Um einen direkten Einfluss der Pufferkonzentration auf die Aktivität von PTP1B in Anwesenheit der eingesetzten Inhibitoren feststellen zu können, wurden diese in identischen Konzentrationen in einfach- und doppelt konzentriertem TRIS HCl Puffer vermessen (Abb. 4.60).

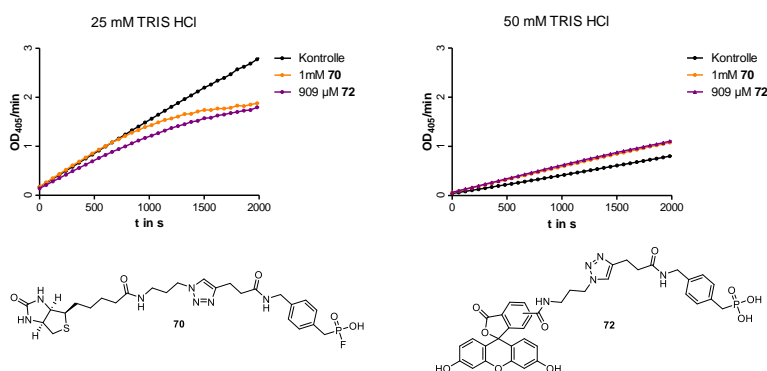


Abb. 4.60 oben: Substratumsatz in Anwesenheit der Substanzen bei Verwendung von einer Pufferkonzentration von 25 mM und 50 mM;
unten: Strukturen der verwendeten Inhibitoren **70** und **72**.

Bei dem Vergleich der Kurvenverläufe des Substratumsatzes in 25 mM und 50 mM TRIS HCl gepuffertem System zeigte sich eindeutig, welchen signifikanten Einfluss die Pufferzusammensetzung auf die Aktivität des Proteins ausübte. Die Aktivität von PTP1B betrug in doppelt konzentriertem Puffer lediglich 30 % im Vergleich zu der im ursprünglich verwendeten Einfachpuffer gemessenen. Den dargestellten Ergebnissen (Abb. 4.60; oben, links) ließ sich für beide Substanzen (Monofluorophosphonsäure **70** und Phosphonsäure **72**) ein irreversibler Effekt bei Verwendung von 25 mM TRIS HCl entnehmen. Dieser war vollständig aufgehoben, sobald die identische Konzentration der Substanzen in der

doppelten Konzentration des Puffersalzes vorlag. Diese Ergebnisse wiesen auf eine ungenügende Pufferkapazität hin, da der einzig gemeinsame Puffer-relevante Charakter beider Substanzen die Säurefunktion ist.

Dieser Umstand legte die Vermutung nahe, dass die zeitabhängige Aktivitätsabnahme von PTP1B durch eine pH-Wertänderung im Zuge des Einsatzes stark saurer Inhibitoren bedingt war.

Untersuchung der pH-Wert-Aktivitätsbeziehung von PTP1B

PTP1B kann aufgrund seiner hinreichenden Toleranz gegenüber dem pH-Wert in einem Bereich von 6.5 bis 7.5 verwendet werden. Am häufigsten erfolgt dabei der Einsatz von neutralen Bedingungen. Unter üblichen Pufferbedingungen konnte bei Enzymlösungen von PTP1B selbst nach einer Lagerung von über 12 h bei Raumtemperatur eine Restaktivität festgestellt werden.

Im Folgenden sollte die Stabilität von PTP1B bei verschiedenen pH-Werten untersucht werden. Dazu wurde als Puffersystem das Salz MES (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure) gewählt, welches bei sauren pH-Werten eine höhere Pufferkapazität als TRIS aufweist. Experimentell wurde dazu eine konzentrierte TRIS gepufferte PTP1B-Enzymlösung in MES-Puffer verschiedener pH-Werte verdünnt und deren Aktivität durch die Hydrolyse von pNPP zu pNP bestimmt (Abb. 4.61).

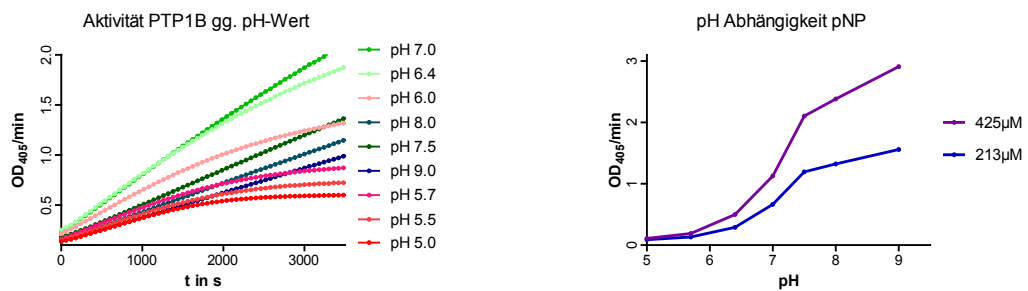


Abb. 4.61 links: Substratumsatz durch PTP1B bei verschiedenen pH-Werten; rechts: pH-Abhängigkeit der Absorption von *para*-Nitrophenolat.

Der Kurvenschar des Substratumsatzes ließ sich ein signifikanter Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von PTP1B entnehmen (Abb.4.61; links). Dies entsprach der Erwartung, da PTP1B als natürliches Biopolymer nativ unter physiologischen Bedingungen vorliegt. Auffällig war, dass die Änderung des pH-Wertes hin zu stärker alkalischen bzw. sauren

Bedingungen einen anderen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte. Auch wenn sich die relative Aktivität unter basischen Bedingungen mit höheren pH-Werten verringerte, folgte der Verlauf des Substratumsatzes einem linearen Charakter. Wenn PTP1B hingegen unter sauren Bedingungen vorlag, zeigte sich ein zeitabhängiger Aktivitätsverlust.

Bei der Quantifizierung der Aktivität über die Absorption des, durch die Phosphatase gebildeten, *para*-Nitrophenolates muss beachtet werden, dass die Veränderung des pH-Wertes auch das Dokumentationssystem beeinflusst. *Para*-Nitrophenol besitzt einen pK_S -Wert von 7.1 und wird über sein Absorptionsmaximum bei 405 nm nach Deprotonierung quantifiziert. Beim Vorliegen eines sauren pH-Wertes wird das Gleichgewicht der Bildung des Nitrophenolates hin zum Nitrophenol verschoben (vgl. Abb. 4.61; *rechts*), sodass die erhaltenen Aktivitätskurven von PTP1B nicht in ein Verhältnis zueinander gesetzt werden dürfen. So wurde zum Beispiel bei der Verwendung des fluoreszenzbasierten Substrates DiFMUP ($pK_S = 4.9$) eine andere pH-Wert-Aktivitätsbeziehung erhalten. Der Effekt der zeitabhängigen Aktivitätsabnahme unter sauren Bedingungen ist hingegen auch mit diesem Substratsystem reproduzierbar.

Bei einer durchgeführten Verdünnungsreihe der Monofluorbenzylphosphonsäure **54** in 25 mM TRIS HCl konnte eine Verschiebung des pH-Wertes nachgewiesen werden (*nicht dargestellt*). Bei den zuvor als wirksam erachteten Konzentrationen von 1 mM bis 5 mM wurde dabei ein pH-Bereich erreicht, der dem erhaltenen Desaktivierungsbereich von PTP1B entsprach. Ferner zeigte die Monofluorbenzylphosphonsäure **54** nach der Überführung in die korrespondierende Natriumsalzform keine signifikanten inhibitorischen Eigenschaften.

Der Einsatz von Puffern einer Konzentration von 25 mM stellt ein etabliertes System dar und wird auch in der Literatur verwendet.^[90,195–199] Mit den erhaltenen Ergebnissen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konzentration des verwendeten Assaypuffers für die Untersuchung der Substanzklasse der monofluorierten Phosphonsäuren nicht angemessen war. Dies führte zu Ergebnissen, die auf ein irreversibles Verhalten der eingesetzten Inhibitoren hindeuteten, jedoch durch den sekundären Effekt einer pH-Verschiebung bedingt waren.

Ogleich während der enzymkinetischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die untersuchten Verbindungen nicht dem Verhalten irreversibler Inhibitoren entsprechen, stellt die Klasse fluorierter Phosphonsäuren ein vielversprechendes System dar. Demnach sollte die Untersuchung von Proteinvernetzungsreaktionen erfolgen.

Vernetzungsexperimente mit PTP1B

Verwendung der Fluoreszenzsonden

Für die ersten Versuche der Beurteilung einer Reaktivität monofluorierter Phosphonsäuren in einer Proteinvernetzungsreaktion sollten die dargestellten fluoreszenten Inhibitoren zum Einsatz kommen (Abb. 4.62).

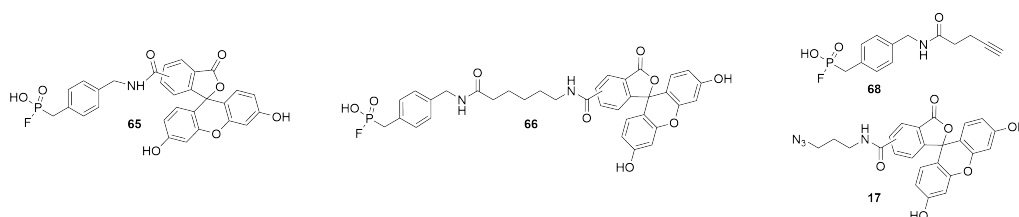


Abb. 4.62 Übersicht der dargestellten Fluoreszenzsonden **65**, **66** sowie des Klicksystems.

Für die Untersuchung der Reaktion der Fluoreszenzsonde **65** mit PTP1B wurde eine Konzentration gewählt, in der die Sonde in einem Bereich von 4 mM bis 31 μ M gegenüber einer Proteinkonzentration von 660 nM vorlag.²⁶ Als Negativkontrollen wurde PTP1B ohne Anwesenheit von **65** sowie eine mittels 8 M Harnstoff denaturierte Proteinprobe in Anwesenheit von 4 mM Sonde gewählt. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei Raumtemperatur wurden die Reaktionslösungen auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das entwickelte Gel wurde zunächst auf einem Gel-Imagingsystem unter Bestrahlung von 312 und 365 nm dokumentiert und anschließend mit dem Proteinfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 angefärbt (Abb. 4.63).

Der Fluoreszenzdokumentation ließ sich die Präsenz von fluoreszenten Banden entnehmen (Abb. 4.63; *rechts*), wobei die Intensität der Fluoreszenz mit dem Grad der Verdünnung der Sonde **65** abnahm. Zu beobachten war ferner das Auftreten diffuser Fluoreszenzbanden beim Einsatz hoher Inhibitorkonzentrationen (Abb. 4.63; Pos. 2, 3 und 10). Diese Hintergrundfluoreszenz trat im Zuge der gelelektrophoretischen Trennung auf, wenn sehr hohe Konzentrationen einer Fluoreszenzsonde verwendet wurden und konnte durch längere Gelwaschphasen reduziert werden.

Mit diesen Ergebnissen wurde zunächst ein Hinweis auf die Fluoreszenzmarkierung der

²⁶Puffer: 25 mM TRIS HCl pH 7.0, 10 % Glycerin, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.01 % Brij 35, 1 mM DTT; Die aufgetragene Proteinmenge je Tasche betrug 250 ng.

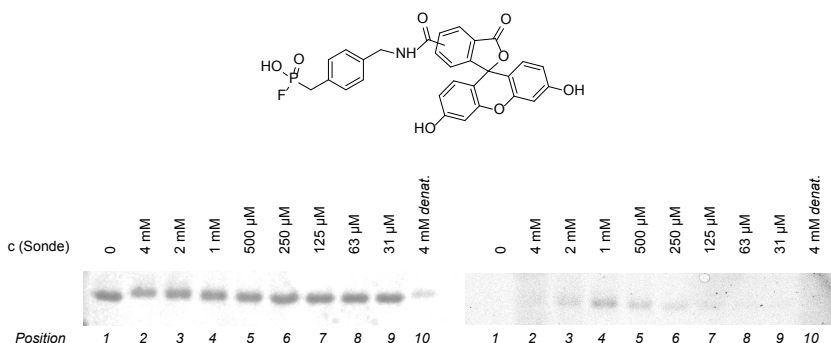


Abb. 4.63 oben: Struktur der verwendeten Sonde **65**;
links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

Proteintyrosinphosphatase PTP1B durch die Monofluorosphonsäure **65** erhalten. Hingegen konnte beobachtet werden, dass die Fluoreszenzmarkierung von PTP1B mit einer verkürzten Inkubationsszeit zu 1 bis 2 Stunden schwer reproduzierbar war. Fluoreszente Proteinbanden konnten in diesen Experimenten zwar erhalten werden, jedoch entsprach die Intensität der Fluoreszenz keiner hinreichenden Signifikanz.

Bei der Verwendung der linkerverlängerten Sonde **66** in Proteinvernetzungsexperimenten konnte kein Effekt einer Markierung beobachtet werden.

Vor der Verwendung der Alkinsonde **68** in Vernetzungsexperimenten wurde diese zunächst auf ihre Reaktivität in der 1,3-dipolaren Cycloaddition hin untersucht. Dazu sollte die Sonde unter den Assaybedingungen mit dem Fluoresceinylazid **17** umgesetzt werden. Der Reaktionsverlauf wurde mittels LCMS verfolgt, wobei zunächst keine erfolgreiche Reaktion zu einem Cycloadditionsprodukt beobachtet werden konnte. Der Vergleich mit organisch / wässrigen Systemen zeigte hingegen einen erfolgreichen Reaktionsumsatz. Um den störenden Effekt eines oder mehrerer Pufferbestandteile zu bestimmen, wurden entsprechende Versuchsreihen durchgeführt. Nach der Variation der Pufferingredienzen zeigte sich, neben dem literaturbekannten Einfluss von TRIS ein supressiver Effekt bei dem Einsatz von DTT.^[153] Durch die Substitution des Puffers TRIS durch HEPES konnten die Reaktionsbedingungen der Cycloaddition optimiert werden (Abb. 4.64).

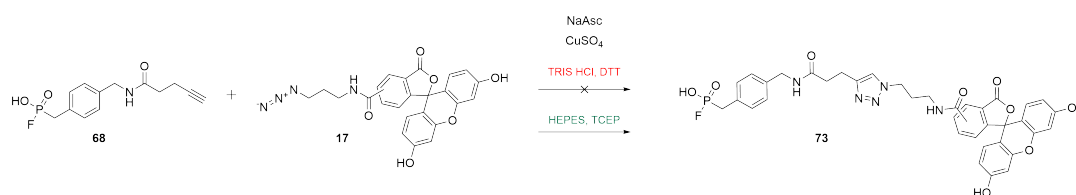


Abb. 4.64 1,3-dipolare Cycloaddition der Alkinsonde unter Pufferbedingungen.

Ogleich die Verwendung eines Reduktionsmittels wie DTT für Anwendungen mit PTP1B nicht obligatorisch ist, die Enzymaktivität jedoch in großem Maße beeinflusst, sollte das zu untersuchende System nicht zu weit verändert werden, sodass eine Alternative ermittelt wurde. Ein weiteres bekanntes Reduktionsmittel stellt das Phosphin TCEP [Tris(2-carboxyethyl)phosphin] dar. TCEP wird im Zusammenhang mit der Phosphatase PTP1B weniger als Pufferzusatz verwendet, sondern eher zu der Wiederherstellung des aktiven Zustands nach der Oxidation zu PTP1B-OX.^{[200][201]} Zunächst wurde daher die Enzymaktivität gegenüber verschiedenen Konzentrationen des Reduktionsmittels untersucht. Nach der Bestimmung einer geeigneten TCEP-Konzentration von 30 μ M wurde ein alternativer PTP1B-Puffer auf Basis von HEPES hergestellt, wobei auf die Verwendung von EDTA und Glycerin verzichtet wurde, da bei diesen kein signifikanter Einfluss auf die Enzymaktivität festgestellt werden konnte.

Folgend sollte die Alkinsonde in Vernetzungsexperimenten zum Einsatz kommen. Als Variablen wurden verschiedene Sondenkonzentrationen, die An- bzw. Abwesenheit des Reduktionsmittels TCEP sowie des Substrates pNPP gewählt. Das Enzym wurde mit der Monofluorphosphonsäure **68** für 140 min inkubiert und anschließend durch die Zugabe von SDS denaturiert. Nach der Zugabe der Reagenzien TBTA,²⁷ CuSO₄ und weiterer Äquivalente TCEP erfolgte die Zugabe des Fluoresceinazids **17**, wobei der Reaktionsverlauf mittels LCMS verfolgt wurde. Nach vollständiger Umsetzung wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.65).

Dem Fluoreszenzbild war zu entnehmen, dass es bei der höchsten Konzentration zur Markierung des Proteins kam (Pos. 4, 7, 10). Auffällig war, dass bei diesen Reaktionsansätzen nur eine sehr schwache (Pos. 4, 7, 10) bzw. keine Proteinbandenfärbung (Pos. 1) durch Coomassieblau eingetreten ist. Während der Durchführung der gelelektrophoretischen

²⁷TBTA: stabilisierender Komplexbildner des Cu(I)-Kations, nach Reduktion von Cu(II) durch TCEP.^[202]

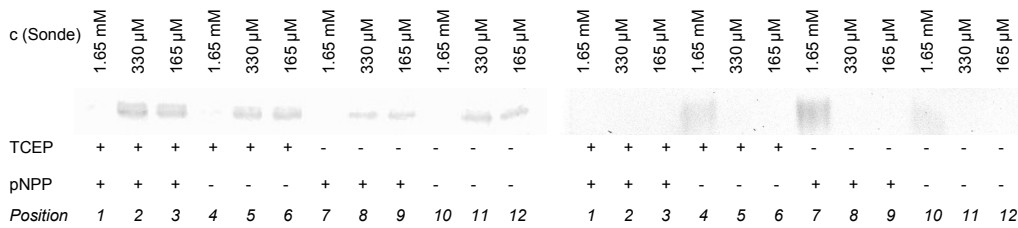


Abb. 4.65 links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
rechts: Fluoreszenz bei 312/365 nm (invertiert).

Trennung konnte bei diesen Proben ein Niederschlag auf dem Sammelgel beobachtet werden, sodass es während des Versuchsverlaufs vermutlich zu einer teilweisen Enzympräzipitation kam. Bei der Betrachtung der beiden Variablen Substrat und Reduktionsmittel konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Abschließend konnte der Ansatz, die Ausbildung einer fluoreszenten Struktur auf der Proteinoberfläche, nicht zu einer Reaktionsvalidierung von potenziell kovalent reagierenden Monofluorophosphonsäuren beitragen, sodass das System der Fluoreszenzmarkierung des Proteins PTP1B verworfen wurde.

Verwendung der Biotinsonden

Die biotinylierte Sonde **70** wurde unter vergleichbaren Bedingungen wie die fluoreszenten Inhibitoren eingesetzt.²⁸ Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde der Reaktionsansatz zunächst mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Antikörper diente ein Avidin-alkalische Phosphatase-Konjugat, welches das Phosphat BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) hydrolysiert wobei in Anwesenheit von NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) im Zuge einer Redoxreaktion, ein Indigofarbstoff sowie ein Formazanfarbstoff gebildet wird (Abb. 4.66).

Als Kontrollen wurden DMSO und biotinyliertes BSA als Negativ- respektive Positivwert gewählt.²⁹ Bei der Entwicklung des Westernblots mit anschließender Farbstoffreaktion

²⁸durchgeführt von Dr. Christoph Arkona, AG Rademann

²⁹verwendeter Puffer: 25 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 50 mM NaCl, 0,01% Brij 35, 0.6 mM DTT

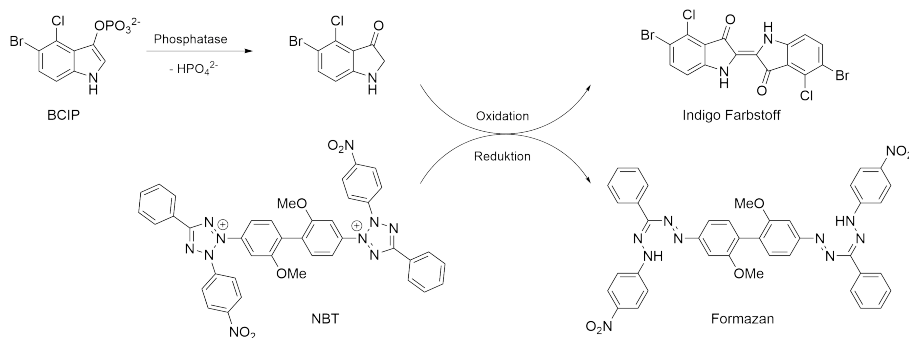


Abb. 4.66 Farbstoffreaktion des BCIP/NBT Systems.

konnte eine Färbung der Proteinbanden von PTP1B und Biotin-BSA beobachtet werden.³⁰ Die Negativkontrolle wies hingegen keine Färbung einer Proteinbande auf (Abb. 4.67; *links, links*). In einer Erweiterung des Experiments sollten zusätzliche Kontrollen zum Einsatz kommen: zum einen Biotin, zum anderen die biotinylierten Phosphonsäuren **71** und **74**, die keine Fluorierung aufweisen (Abb. 4.67; *links, rechts*). Alle Verbindungen wurden bei einer identischen Konzentration von 4.3 mM eingesetzt.

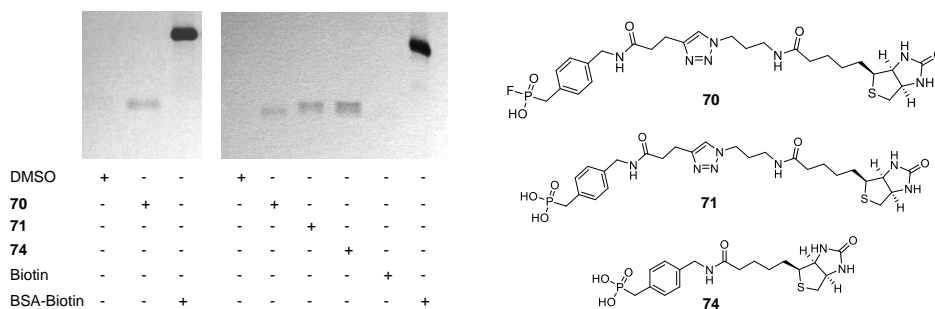


Abb. 4.67 *links*: Anti-Biotin-Westernblot mit identischen Konzentrationen der Sonden und Kontrollen von 4.3 mM; *rechts*: Strukturen der Sonden.

Bei der Wiederholung des Vernetzungsexperiments mit einer Inkubationszeit von 18 h und anschließender Westernblotanalytik ließen sich die Ergebnisse der kovalenten Markierung von PTP1B durch die fluoridierte Phosphonsäure **70** reproduzieren. Bei der Betrachtung der neu mitgeführten Kontrollen wurde allerdings deutlich, dass es bei dem Einsatz der nicht fluoridierten Phosphonsäuren **71** und **74** ebenfalls zu einem positiven Biotinnachweis kam,

³⁰Die Proteinmenge der Positivkontrolle Biotin-BSA betrug versuchsbedingt ein vielfaches der Konzentration von PTP1B.

der im Vergleich zu der Monofluorphosphonsäure viel stärker ausfiel. Andere Negativkontrollen wiesen hingegen keine positive Reaktion auf. Durch den Einsatz von Biotin und dessen ausbleibender Farbreaktion, was auf eine fehlerhafte Versuchsdurchführung hinweisen könnte, war eine "Reaktivität" der Biotinstruktur selbst auszuschließen. Ferner wurde die Phosphonsäure **74** über eine Kupplungsreaktion der Säurefunktion des Biotins mit einer Aminomethylgruppe dargestellt. Demnach konnte eine vermeintliche Reaktion der als inert bekannten Triazolstruktur ebenfalls ausgeschlossen werden. Das einzig gemeinsame Strukturmerkmal der eingesetzten Verbindungen, die in der Antikörperreaktion einen positiven Biotinnachweis zeigten, ist die Phosphonsäuregruppe. Auffällig ist dabei die höhere Markierungsrate der Phosphonsäuren **71** und **74** gegenüber der Monofluorphosphonsäure **70**.

Dies entsprach nicht der Erwartung gegenüber der Substanzklasse der Monofluorphosphonsäuren, deren kovalent-irreversibles Verhalten eine Option des Bindungsmodus gegenüber PTP1B darstellte. Derivate der Benzylphosphonsäuren hingegen sind klassische nicht-hydrolysierbare Phosphotyrosinmimetika, deren Grundstruktur z.B. die Basis der Entwicklung der F₂pmP-Inhibitoren ist.^[67] Es existiert eine Vielzahl an Veröffentlichungen die Phosphonsäureinhibitoren beschreiben, wobei, nach unserer Kenntnis, kein derartiges Verhalten in einer Proteinvernetzungsreaktion bekannt ist.

Die Untersuchung des Verhaltens der Phosphonsäuren in Proteinmarkierungsreaktionen erfolgt in Kapitel 4.3.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse der Vernetzungsexperimente sowie der kinetischen Untersuchung können die monofluorierten Phosphonsäuren nicht als kovalent irreversibel reagierende Inhibitoren angesehen werden.

Strukturoptimierung der Monofluorphosphonsäuren

Mit der Entwicklung und Einführung der nicht-natürlichen Aminosäure Phosphonodifluormethylphenylalanin (F₂pmP) als Ersatz für Phosphonomethylphenylalanin (pmP) erfolgte eine deutliche Affinitätssteigerung gegenüber Proteintyrosinphosphatasen. Die wohl be-

kannteste substratbasierte Peptidsequenz DADEXL weist dabei eine Erhöhung der inhibitorischen Wirkung mit einem Faktor von 10^3 auf (Abb. 4.68).^[71]

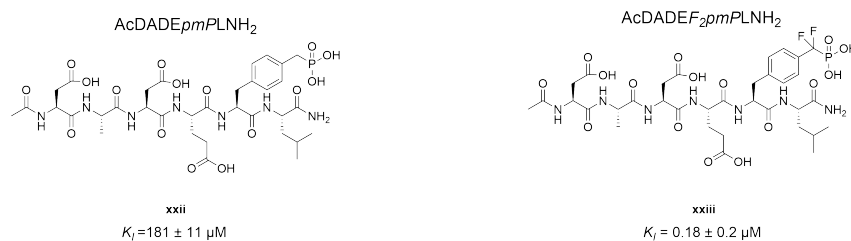


Abb. 4.68 pmP und F₂pmP-haltige Inhibitoren nach Chen et al.

Literaturbekannt ist ferner, dass irreversible Inhibitoren nur wirksam sind, wenn eine ausreichende Affinität gegenüber dem Zielprotein vorliegt. Diesem Umstand folgt zum Beispiel die Substanzklasse der S-Fluoride, so heisst es:

"[the] SO₂F group reacts slowly, if at all, with proteins that are not reversibly complexed with the moiety bearing the SO₂F group. In contrast, when an SO₂F-bearing compound is complexed to a macromolecule such as an enzyme or cellulose, rapid covalent bond formation can occur."^[203]

Mit der Verwendung einer F₂pmP-analogen CF₂-Gruppe sollten demnach höher affine Monofluorophosphonsäuren erhalten werden. Im Zuge einer α -Fluorierung würde desweiteren ein stark elektronegativer Einfluss in die Inhibitorstruktur eingeführt werden, was zu einer Destabilisierung der P-F-Bindung und weiter zu einer daraus resultierenden Reaktivität gegenüber Proteintyrosinphosphatasen führen könnte.

Monofluorophosphonsäuren die eine α -Fluorierung aufweisen wurden bereits im Arbeitskreis Rademann dargestellt und charakterisiert.³¹ Durch die erhöhte Reaktivität des Phosphor-gebundenen Fluoratoms konnten diese Verbindungen jedoch nicht rein erhalten werden. Während Difluorbenzylphosphonsäure **53** über eine Hochvakuumdestillation erhalten werden konnte und anschließend durch eine Hydrolyse zur Monofluorophosphonsäure **54** umgesetzt wurde, war die Isolierung von Difluor(- α , α -difluormethyl)-phenylphosphonsäure **75** über diesen Weg nicht möglich. Folglich wurden die monofluorierte Phosphonsäure **77** mittels HPLC aufgereinigt und in maximal 80 % Reinheit erhalten. Um eindeutige Aussagen bzgl. des inhibitorischen Effektes und einer möglichen Reaktivität

³¹Diplomarbeit Michael Köner

treffen zu können, sollte ein Syntheseweg entwickelt werden, über den die Zielverbindungen in möglichst hoher Reinheit erhalten werden können (Abb. 4.69).

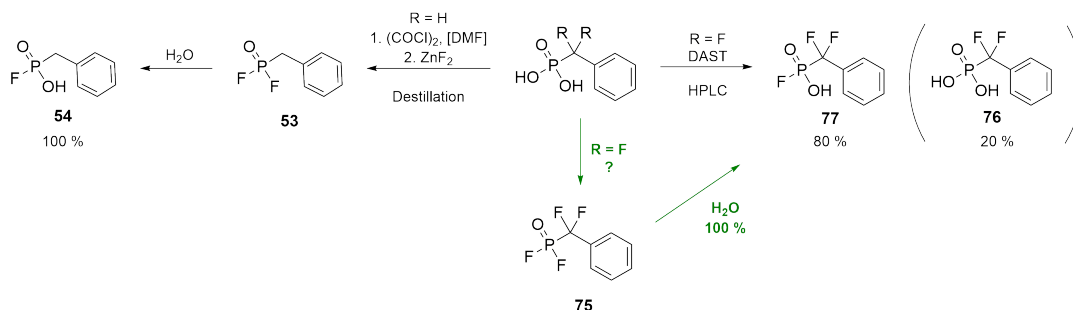


Abb. 4.69 Fluorierung von Phosphonsäuren und deren Hydrolyse zu Monofluorphosphonsäuren.

Eine Isolierung der difluorierten Säure **75** bietet den Vorteil einer direkten Hydrolyse zur entsprechenden Monofluorphosphonsäure **77** ohne die Notwendigkeit folgender Aufreinigungsschritte. Die verminderte Hydrolysestabilität schließt jedoch verschiedene Aufreinungsverfahren wie z.B. Säulenchromatographie aus. Da inerte Hochvakuumdestillationen nicht zielführend sind und die bekannten und bisher verwendeten Fluorierungsmethoden (Transhalogenierung mittels ZnF_2 oder direkte Fluorierung mittels DAST) nicht-flüchtige Nebenprodukte liefern, musste ein Weg gefunden werden, der die Zielverbindung rein und ohne Nebenprodukte liefert. Eine Möglichkeit dessen bietet eine Fluorierung bei der ausschließlich gasförmige bzw. leicht flüchtige Nebenprodukte gebildet werden. Diese Eigenschaft konnten in dem Reagenz Oxalylfluorid gefunden werden. Oxalylfluorid sollte während seiner Reaktion, vergleichbar zu Oxalylchlorid, in die Produkte HF, CO_2 , CO und das gebildete Säurefluorid übergehen (Abb. 4.70).



Abb. 4.70 Darstellung und Reaktion von Oxalylfluorid.

Synthetisch ist $(\text{COF})_2$ über eine Transhalogenierung von Oxalylchlorid mittels NaF zugänglich.^[204] Das Fluorierungsmittel wurde in einer Niederdruckdestillation bei -78 °C kondensiert und anschließend in Acetonitril gelöst. Aufgrund des niedrigen Siedepunktes und der hohen Reaktivität unter der Bildung toxischer Nebenprodukte wurden diese Synthese und die folgenden Reaktionen unter besonderer Vorsicht durchgeführt.

Die nebenproduktfreie Fluorierung wurde durch die quantitative Überführung von Benzylphosphonsäure in Difluorbenzylphosphonsäure evaluiert (*Experimenteller Teil*; Seite 216).

Ferner ist anzumerken, dass manche Phosphonsäuren und deren Monofluoride auf den verwendeten HPLC-Materialien keine Elution bzw. eine stark erhöhte Retentionzeit aufwiesen. Dies konnte bei verschiedenen Substanzen beobachtet werden, sodass eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC nicht möglich war. Dieses Problem konnte mit der Entwicklung einer nebenproduktfreien Darstellung der Phosphonsäuredifluoride ebenfalls umgangen werden. Mit dieser Methode konnten nun Monofluorphosphonsäuren direkt aus den korrespondierenden Phosphonsäuren erhalten werden. Nach der Fluorierungsreaktion wurde zunächst der Überschuss an Oxalylfluorid unter inerten Bedingungen im Stickstoffstrom entfernt. Die Hydrolyse sollte die Monofluorphosphonsäuren in ihrer stabileren weniger sauren Natriumform liefern. Dazu erfolgte diese in Anwesenheit von Natrium-beladenem Ionentauscherharz. Als Modellverbindungen wurden zunächst α, α -Difluormethylphenylphosphonsäure **76** und α, α -Difluormethylphenylphosphonsäuremonofluorid **77** synthetisiert und auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber PTP1B hin untersucht (Abb. 4.71).

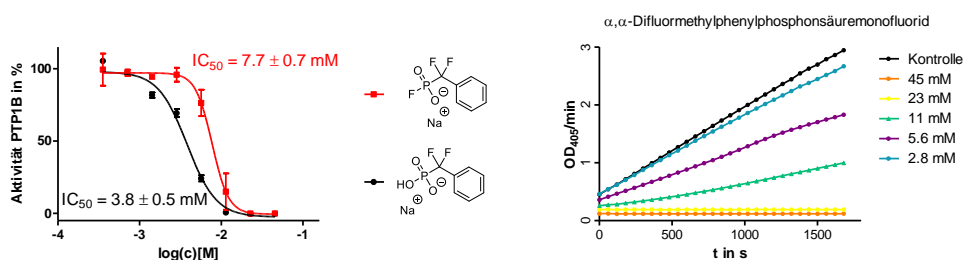


Abb. 4.71 links: Inhibition von PTP1B durch **76** und **77**;
rechts: Substratumsatz bei verschiedenen Konzentrationen von **76**.

Der Vergleich beider Substanzen zeigte, dass die Einführung des Fluoratoms eine Verringerung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 2 bewirkte. Der erhaltene IC_{50} -Wert der Phosphonsäure **76** entsprach mit 3.8 mM dem der Literatur.^[205] Die Monofluorphosphonsäure **77** hingegen besaß mit einem IC_{50} -Wert von 7.7 mM eine geringere Affinität ggü. PTP1B (Abb. 4.71; links). Die zeitabhängige Substrathydrolyse wies eine gleichbleibende Linearität auf, was auf einen reversiblen Bindungsmodus schließen ließ (Abb. 4.71; rechts).

Stabilität der optimierten Monofluorphosphonsäuren

Die zuvor dargestellten Benzyl-substituierten Monofluorphosphonsäuren konnten analytisch rein erhalten werden und besaßen eine ausreichende Hydrolysestabilität für folgende Untersuchungen. Die α -difluorierten Monofluorphosphonsäuren wiesen im Vergleich eine stark erhöhte Instabilität auf, wurden folgend in ihre stabilere Natriumsalzform überführt und konnten daraufhin ebenfalls analytisch rein erhalten werden. Die Überführung in die Natriumsalzform erhöhte auch die Stabilität der benzyl-substituierten Verbindungen. Während die Monofluorbenzylphosphonsäure **54** als freie Säure eine Halbwertszeit von $t_{1/2} < 7$ Tage besaß, konnte bei der Natriumsalzform keine Hydrolyse mehr beobachtet werden.

Mit der Einführung einer α, α -Fluorierung musste eine Neubetrachtung der Stabilität der Phosphonsäuremonofluoride erfolgen. Dazu wurde die Hydrolysestabilität von Natrium- α, α -Difluormethylphenylphosphonsäuremonofluorid **77** in einem MES-gepufferten System bei verschiedenen pH-Werten NMR-spektroskopisch untersucht. Als Kontrolle diente eine ungepufferte D_2O Lösung (Abb. 4.72).

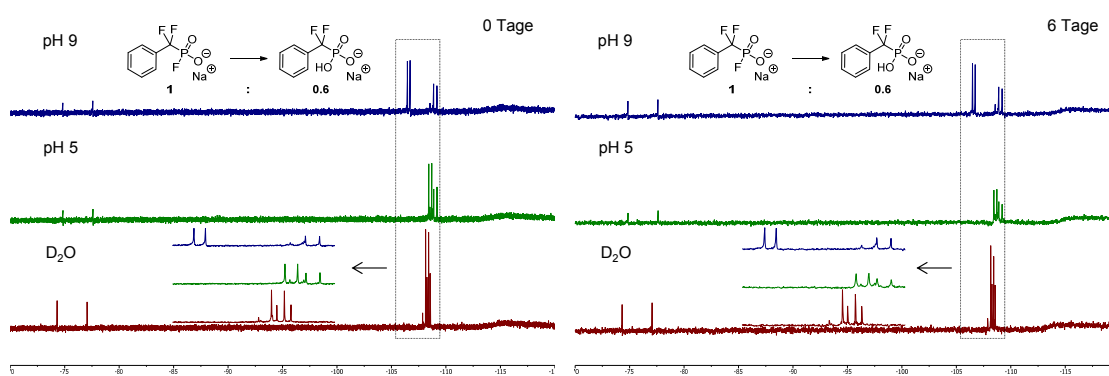


Abb. 4.72 links: ^{19}F -NMR Spektren bei verschiedenen pH-Werten nach 0 Tagen;
rechts: ^{19}F -NMR Spektren bei verschiedenen pH-Werten nach 6 Tagen.

In diesem Experiment wurde ein Gemisch aus Phosphonsäure **76** und Monofluorphosphonsäure **77** verwendet um eine Differenzierung zwischen diesen zu ermöglichen. Gewählt wurden zwei pH-Bereiche mit einem pH-Wert von 9 und 5. Die Aufnahme von ^{19}F -NMR-Spektren sollte die vorangeschrittene Hydrolyse der Monofluorphosphonsäure **77** hin zur

Phosphonsäure **76** dokumentieren. Über die Dublettsignale bei einer chemischen Verschiebung von ca. $\delta = -107$ ppm ist eine Unterscheidung zwischen Phosphonsäure und Säuremonofluorid möglich. Für die Beurteilung der Hydrolysestabilität wurden die Proben nach 6 Tagen erneut vermessen und die Integration der Signale verglichen. Weder unter leicht sauren (pH 5) noch leicht basischen Bedingungen (pH 9) konnte eine fortschreitende Hydrolyse hin zur korrespondierenden Phosphonsäure beobachtet werden. Allein eine Verschiebung der Signalsätze bei der Verwendung verschiedener pH-Werte war zu beobachten.

Reaktivität der optimierten Derivate in Proteinvernetzungsreaktionen

Mit der Synthese von α, α -Difluormethylphenylphosphonsäuremonofluorid **77** wurde eine Verbindung dargestellt, die eine, im Vergleich zu **76** verringerte, Affinität ggü. PTP1B besitzt. Obgleich während der enzymkinetischen Messung keine Hinweise auf ein irreversibles Verhalten erhalten werden konnten, sollte mit der Entwicklung einer Fluoreszenzsonde eine mögliche Reaktivität in einer Proteinvernetzungsreaktion final untersucht werden. Dazu wurden zwei Inhibitoren synthetisiert, die als Kontrolle sowie potenziell reaktive Sonde dienen sollten. Synthetisch sollte dabei eine 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen zwei Sondenfragmenten verwendet werden, sodass folgende Reaktionschritte vermieden werden konnten. Dazu wurde das Dipolarophil (Alkin) mit einer neuen Syntheseroute dargestellt (Abb. 4.73).

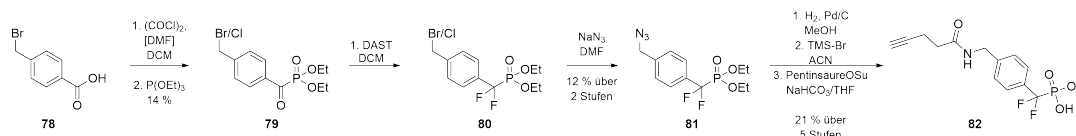


Abb. 4.73 Synthese des Alkinfragments **82**.

Die Darstellung des Alkinfragments erfolgte mit 4-(Brommethyl)benzoesäure als Ausgangssubstanz. Nach Aktivierung zum Säurechlorid und anschließender Umsetzung mit Triethylphosphit wurde das Benzoylphosphonat **79** erhalten. Bei dieser Reaktion kam es zu einem Halogenaustausch an der *para*-Methylengruppe, sodass ein Produktgemisch vorlag. Diese Reaktion erwies sich anspruchsvoller als erwartet, da es während der Umsetzungen zu einer Polymerisationsreaktion kam, was die Aufreinigung erschwerte und zu geringen Ausbeuten führte.^[206] Im folgenden Schritt wurde die α -Ketofunktion mittels

DAST fluoriert und anschließend die Abgangsgruppe Chlorid/Bromid mit NaN_3 in eine Azidfunktion überführt. Nach Reduktion des Azids zur NH_2 -Gruppe wurden die Ethylschutzgruppen des Phosphonats durch TMSBr entfernt. Die gewünschte Endstufe, das α, α -Difluor-phosphonsäurealkin **82**, wurde nach der Umsetzung mit Pentinsäuresuccinimidylester erhalten.

Nach Erhalt der Alkinsonde **82** sollte diese mit dem Fluoresceinylazid **17** umgesetzt werden. Für die Darstellung des Säuremonofluorids **83** wurde die Phosphonsäure **82** mittels DAST fluoriert und anschließend der Cycloaddition unterzogen (Abb. 4.74).

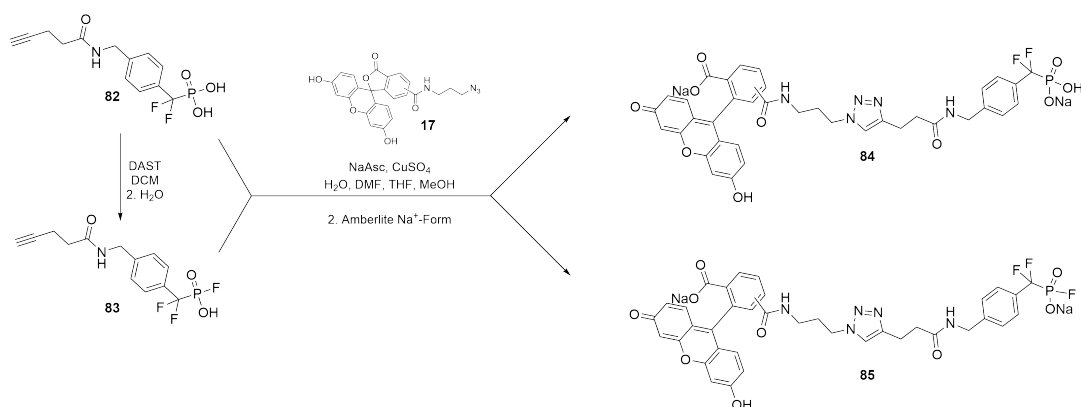


Abb. 4.74 Synthese der α, α -difluorierten Verbindungen **84** und **85**.

Beide Substanzen wurden mittels HPLC isoliert und in ihre Natriumform überführt. Für die Fluorierung erwies sich DAST als hinreichend, da sich das Produkt **85** während der HPLC-Aufreinigung als stabil erwies, sodass der Einsatz des toxischen Oxalylfluorids nicht notwendig war. Die dargestellten Verbindungen **84** und **85** wurden zunächst auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber PTP1B hin untersucht (Abb. 4.75).

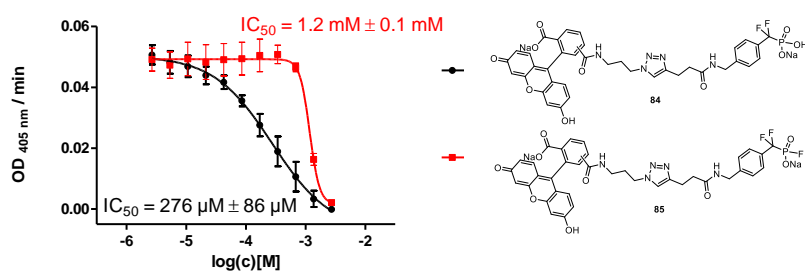


Abb. 4.75 PTP1B-Inhibition der Sonden Phosphonsäure **84** und Phosphonsäuremonofluorid **85**.

Die inhibitorischen Daten zeigten den bereits zuvor beobachteten Effekt einer reduzierten Affinität der Monofluorphosphonsäure gegenüber der Phosphonsäure. Die als Kontrolle in Proteinvernetzungsreaktion synthetisierte α, α -Difluor-Phosphonsäure **84** besitzt gegenüber PTP1B einen IC₅₀-Wert von 276 μ M. Die Monofluorphosphonsäure **85** wies mit einem IC₅₀-Wert 1.2 mM eine um den Faktor 4 verringerte Affinität auf. Bei der Aufnahme der kinetischen Daten des Substratumsatzes wurde wiederum kein irreversibles Verhalten des Säuremonofluorides **85** in dem Eintreten einer zeitabhängigen Aktivitätsverringerng von PTP1B beobachtet.

Mit dem Einsatz der, im Vergleich zu den Benzylmonofluorphosphonsäuren, höher affinen α, α -Difluor-Monofluorphosphonsäuren in PTP1B-Vernetzungsreaktionen sollte abschließend geprüft werden, ob diese irreversibel kovalent reagieren. Dazu wurde das Säuremonofluorid **85** als Natriumsalz und in Säureform mit PTP1B inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Vergleich wurden die korrespondierende α, α -difluorierte Phosphonsäure **84** und die Benzylphosphonsäure **72** verwendet. In keinem Reaktionsansatz der Monofluorphosphonsäure **85** konnte, unabhängig vom Einsatz der Säure- respektive Natriumform, eine Fluoreszenzmarkierung beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuteten erneut nicht auf das Vorliegen einer angenommenen irreversibel kovalenten Reaktivität der Phosphonsäuremonofluoride gegenüber der Proteintyrosinphosphatase PTP1B hin, sodass die Untersuchung dieser Substanzen dahingehend als abgeschlossen erachtet werden konnte.

4.2.3.2 Monofluorphosphonsäuren als PTP1B-Substrate

Monofluorierte Phosphonsäuren sind keine kovalent-irreversiblen Inhibitoren von PTP1B. Hingegen konnte eine Hydrolyse sowie die mutmaßliche Bildung eines Phosphonsäureamides (siehe Seite 96), beobachtet werden. Demnach entspricht die Klasse der Monofluorphosphonsäuren ihrer ursprünglich angenommenen Charakteristik, der Reaktivität gegenüber Nukleophilen. Das Cystein des aktiven Zentrums von PTP1B besitzt einen pK_S-Wert von 5.4, liegt unter physiologischen Pufferbedingungen als Thiolat vor und reagiert nukleophil mit dem Phosphoratom seiner Substrate.^[36,207] Obgleich die relative Stabilität

eines Monothiophosphonsäurebenzylesters (siehe Seite 94) nachgewiesen werden konnte, liegt mit den Bedingungen innerhalb der Bindungstasche ein anderes System vor. Daher ist eine Reaktion zwischen dem aktiven Zentrum und dem Säuremonofluorid mit einer anschließenden Hydrolyse des Thioesters nicht auszuschließen (Abb. 4.76).

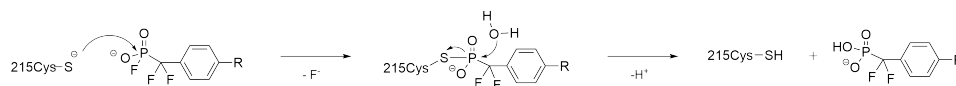


Abb. 4.76 Schema einer möglichen Hydrolyse des gebildeten Thiophosphonsäureesters.

In diesem Fall würde ein kovalent reversibler Reaktionsmechanismus zu Grunde liegen, der die Wiederherstellung einer aktiven Phosphatase zur Folge hätte. Dabei könnte kein zeitabhängiger Aktivitätsverlust zu beobachten sein und die fluorierten Phosphonsäuren würden in ihrer Reaktivität der eines Substrates entsprechen.

Die enzyminduzierte Hydrolyse zur korrespondierenden Phosphonsäure und freiem Fluorid, wurde folgend NMR-spektroskopisch untersucht. Der ^{19}F -Kern besitzt mit seiner natürlichen Häufigkeit von 100 % und seinem gyromagnetischen Verhältnis von $\gamma = 2.518 \cdot 10^8 \text{ HzT}^{-1}$ eine Messempfindlichkeit die der von ^1H -Kernen entspricht ($\gamma = 2.675 \cdot 10^8 \text{ HzT}^{-1}$). Mit dieser analytischen Nachweisbarkeit ist es möglich auch solch geringe Konzentrationen zu detektieren, wie sie in biochemischen Assays verwendet werden. Experimentell wurde die potenzielle Hydrolyse von α, α -Difluormethylphenylphosphonsäuremonofluorid **77** zur korrespondierenden Phosphonsäure **76** untersucht. Gewählt wurde ein Gemisch beider Substanzen, die Phosphatasen PTP1B, SHP2 sowie die An- und Abwesenheit von DTT (Abb. 4.77).

Eine 100 mM Stammlösung des Stoffgemisches der beiden Säuren wurde mit einer TRIS HCl pH 7 gepufferten Enzymlösung auf eine finale Konzentration von 2 mM verdünnt. Um einen etwaigen Einfluss auf die substratanaloge Reaktion zu untersuchen, erfolgte das Experiment sowohl mit als auch ohne Zusatz des Reduktionsmittels DTT. Als weitere Variable wurde die humane Proteintyrosinphosphatase SHP2 gewählt. Als Kontrolle diente eine TRIS HCl gepufferte Lösung ohne Zusatz einer Phosphatase.

Bei dem Vergleich der ^{19}F -NMR Spektren ließ sich bei keinem Reaktionsansatz ein Unterschied gegenüber der vorliegenden Kontrolle beobachten. Weder die Anwesenheit eines Proteins noch die von DTT hatte einen Einfluss auf eine voranschreitende Hydrolysereaktion.

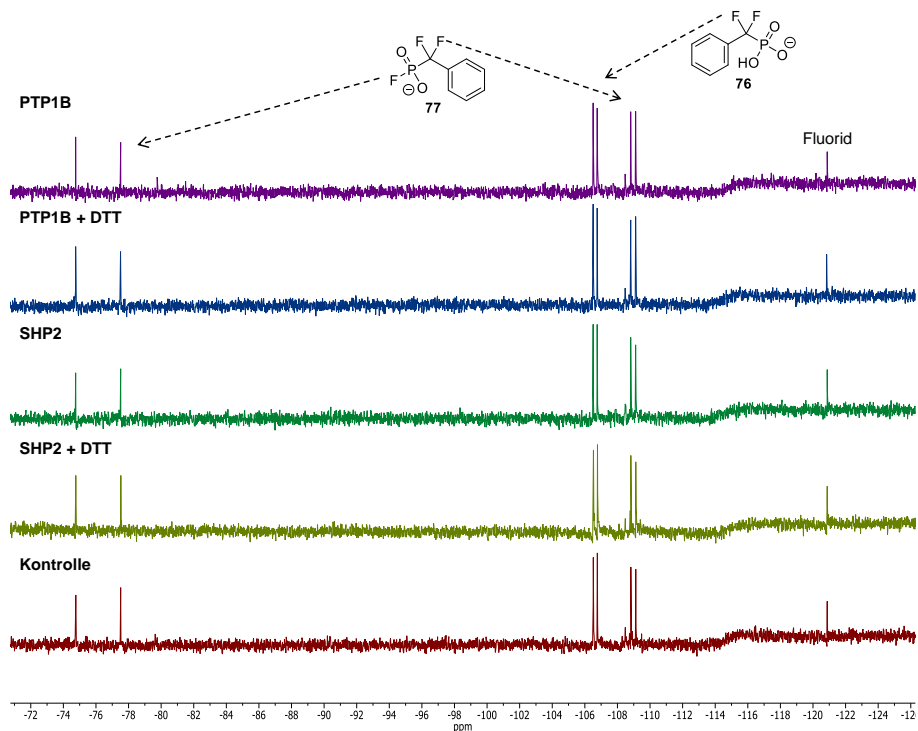


Abb. 4.77 ^{19}F -NMR Spektren des 2 mM Gemisches von **77** und **76** in Anwesenheit der Phosphatasen PTP1B und SHP2 \pm DTT.

Diese Ergebnisse wiesen auf keine Substrathydrolyse hin, sodass Phosphonsäuremonofluoride als stabile PTP-Inhibitoren zu beurteilen sind.

4.2.3.3 Monofluorophosphonsäuren als stabile PTP1B-Inhibitoren

Mit dem Abschluss der Untersuchung der fluorierten Phosphonsäuren als reaktive Inhibitoren der Proteintyrosinphosphatase PTP1B, konnte konstatiert werden, dass diese Substanzklasse eindeutig die Eigenschaften klassischer stabiler Phosphotyrosinmimetika besitzt. Im Zuge der vorherigen Untersuchungen wurden zwei stabile Monofluorophosphonsäuren dargestellt, die einen IC_{50} -Wert im mM-Bereich aufwiesen. Im Folgenden sollten nun Inhibitoren entwickelt werden, die eine höhere Affinität gegenüber PTP1B besitzen. Unter Berücksichtigung literaturbekannter Phosphataseinhibitoren können strukturelle Grundgerüste ausgemacht werden, die ein erhöhtes inhibitorisches Potenzial aufweisen. Diese sollten genutzt werden, um einen direkten Vergleich zwischen den Phosphonsäure-

und Monofluorphosphonsäureinhibitoren zu ermöglichen. Gewählt wurden dabei Verbindungen, die sich in ihrer Affinität in ein- bis zweifacher Größenordnung voneinander unterscheiden (Abb. 4.78).

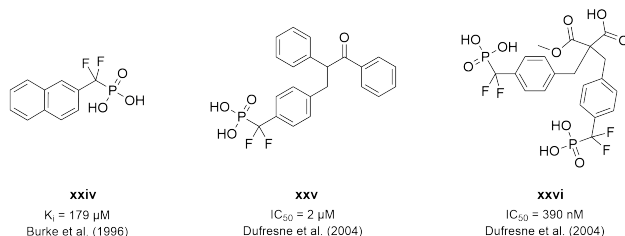


Abb. 4.78 Bekannte PTP1B-Inhibitoren mit verschiedenen Grundgerüsten.

Burke et al. konnten zeigen, dass die Substitution des Phenylrings von α, α -Difluormethylphenylphosphonsäure gegen einen Naphthylrest eine um dem Faktor 14 erhöhte Affinität bewirkt. Dieser Effekt beruht auf der Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Bindungstasche und konnte mittels Kristallstrukturanalyse bewiesen werden.^[208] Obwohl DAST das bevorzugte Reagenz zum Erhalt der nicht-natürlichen Aminosäure F₂pmP darstellt bzw. darstellte,^[69,70,150] bedarf es bei dessen Verwendung des Einsatzes mehrerer Äquivalente sowie des Vorliegens der reaktiven α -Ketophosphonate. Zu einem alternativen Erhalt der CF₂-Gruppe führt der Einsatz von elektrophilem Fluor nach Deprotonierung der benzyllischen Methylenfunktion.^[208,209] Demnach erfolgte die Synthese der Naphthyl-substituierten Monofluorphosphonsäure über den Einsatz des Reagenzes NFBS (*N*-Fluorbis(phenylsulfonyl)amin) (Abb. 4.79).

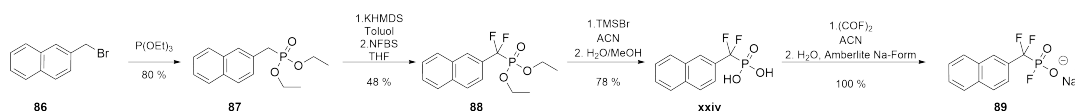


Abb. 4.79 Synthese von α, α -Difluor(2-naphthyl)methylphosphonsäuremonofluorid **89**.

Als Ausgangssubstanz diente 2-(Brommethyl)naphthalin, welches mit Triethylphosphit zum Phosphonat **87** umgesetzt wurde. Nach Deprotonierung der α -Position wurde diese mittels NFBS difluoriert. Die Hydrolyse des Phosphonsäureesters **88** erfolgte über die Silylierung mit TMSBr und anschließender Behandlung mit H₂O / Methanol. Die erhaltene Phosphonsäure **xxiv** wurde mit Oxalylfluorid fluoriert und anschließend in Anwesenheit von Natrium-beladenem Ionenaustauscherharz in das Phosphonsäuremonofluorid **89** über-

führt.³²

Die inhibitorischen Daten wurden im Vergleich zu der korrespondierenden Phosphonsäure erhoben (Abb. 4.80).

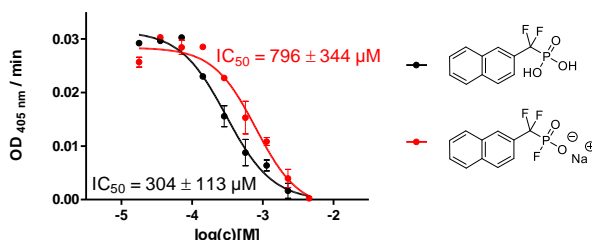


Abb. 4.80 PTP1B-Inhibition der Phosphonsäure **xxiv** und Phosphonsäuremonofluorid **89**.

Im Vergleich der beiden Inhibitoren zeigte sich erneut eine verringerte Affinität durch die Einführung des Fluoratoms. Mit einem IC₅₀-Wert der α, α -difluorierten Phosphonsäure von 304 μM ($K_I = 152 \mu\text{M}$) entspricht dieser der Literatur.^[208] Zwischen den beiden Substanzen liegt ein Faktor von $\frac{\text{IC}_{50}(\text{Fluorid})}{\text{IC}_{50}(\text{Säure})} = 2.6$ im Bezug auf ihre inhibitorische Wirkung. Gegenüber α, α -Difluormethylphenylphosphonsäuremonofluorid **77** konnte durch die Verwendung des Naphthylsubstituenten eine Affinitätssteigerung um den Faktor 10 erreicht werden.

Ein weiteres Inhibitorgrundgerüst wurde von Dufresne et al. beschrieben.^[210] Auf der Basis einer Phenylacetophenongrundstruktur konnten Inhibitoren erhalten werden, die PTP1B substituentenabhängig im hohen nM-Bereich inhibieren und mit der Phosphatase kristallisiert werden konnten.^[211] Als Zielstruktur wurde ein Substitutionsmuster gewählt, welches synthetisch gut zugänglich ist. Dabei wurde eine von der Literatur abweichende Syntheseroute beschrrieben (Abb. 4.81).

Als Ausgangsreagenzien dienten 4-(Brommethyl)benzoesäure und Phenylacetophenon. Zunächst wurde Phenylacetophenon mittels Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit zuvor dargestelltem 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester zu **92** alkyliert. Nach Verseifung des Esters wurde über die Aktivierung zum Säurechlorid und Behandlung mit Triethylphosphit das α -Ketophosphonat **93** erhalten. Einen kritischen Punkt stellte die folgende Umsetzung dar. Diethylaminoschwefeltrifluorid fluoriert neben Alkoholen

³²Das dargestellte Phosphonsäuremonofluorid **89** wies eine stark erhöhte Retentionszeit ggü. den verwendeten analytischen HPLC-Materialien auf und eluierte erst in darauffolgenden chromatographischen Trennungen.

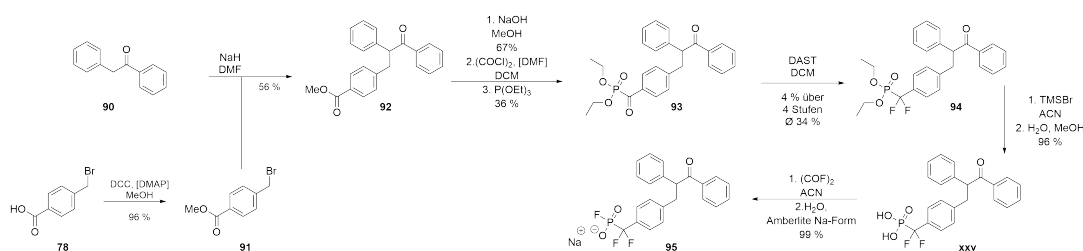


Abb. 4.81 Synthese des Phosphonsäuremonofluorids **95** mit Phenylacetophenongrundgerüst.

und Säuren wie bereits beschrieben Ketofunktionen. Mit dem Einsatz von DAST bestand mit der Fluorierung der Ketogruppe des Phenylacetophenons eine Konkurrenzreaktion. Experimentell konnte beobachtet werden, dass sich die α -Ketofunktion des Phosphonates **93** als reaktiver erwies und dieses selektiv zu **94** fluoriert werden konnte. In den nächsten Schritten zum Erhalt der Zielsubstanz erfolgte die Hydrolyse des Phosphonsäureesters sowie die Fluorierung von **xxv** mittels Oxalylfluorid mit anschließender Hydrolyse. Diese erfolgte in Anwesenheit von Natrium-beladenem Ionenaustauscherharz um das Phosphonsäuremonofluorid **95** als stabilere Salzform zu erhalten.³³

Die Daten der enzymkinetischen Hemmung wurden in Analogie zu denen der Naphtylderivate erhoben (Abb. 4.82).

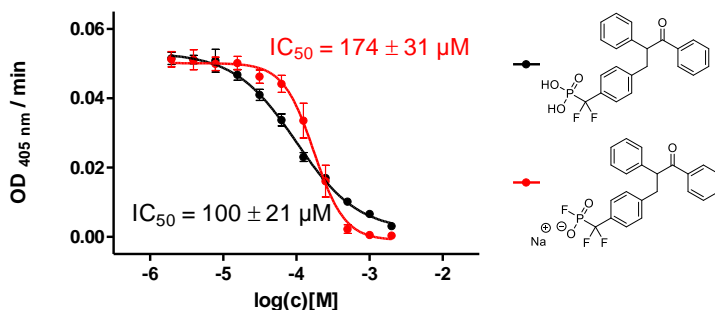


Abb. 4.82 PTP1B-Inhibition der Phosphonsäure **xxv** und des Phosphonsäuremonofluorids **94**.

Der erhaltene IC_{50} -Wert der Phosphonsäure **xxv** entspricht mit $100 \mu\text{M}$ nicht dem in der

³³Die dargestellte Verbindung **95** wies eine stark erhöhte Retention ggü. den verwendeten analytischen HPLC-Materialien auf und eluierte erst in darauffolgenden chromatographischen Trennungen. Ein alternativer Syntheseweg zum Erhalt des α, α -difluorierten Phosphonates ist im Kapitel *Experimenteller Teil* beschrieben.

Literatur beschriebenen von 2 μM .^[210] Dieser Wert erwies sich jedoch als reproduzierbar und deckt sich in seinem Verhältnis zu dem Inhibitionswert des Säuremonofluorids **95** (Faktor $\frac{\text{IC}_{50}(\text{Fluorid})}{\text{IC}_{50}(\text{Säure})} = 1.7$) mit den vorherigen Ergebnissen. Mit der Darstellung des Phosphonsäuremonofluorids **95** auf Basis eines Phenylacetophenongrundgerüsts konnte ein Inhibitor erhalten werden, der im niedrigen μM -Bereich wirksam ist. Dies stellte eine erneute Verbesserung der inhibitorischen Wirkung dar und sollte durch die Verwendung einer affineren Struktur weiter verbessert werden.

Mit der Entdeckung einer benachbarten Bindungstasche von PTP1B, die eine Affinität zu α, α -Difluormethylphosphonsäuregruppen besitzt, folgte in den vergangenen Jahren die Entwicklung einer neuen Inhibitorenklasse die zwei $\text{CF}_2\text{PO}(\text{OH})_2$ -Gruppen aufweist.^[73] Diese zweizählig bindenden Liganden besitzen eine erhöhte inhibitorische Aktivität, die im Bereich von 1 μM bis 1.8 nM liegt.^[75,210] Als Basis eines zweizählig-bindenden Phosphonsäuremonofluorides wurde Malonsäuredimethylester gewählt. Ein vergleichbarer Inhibitor **xxvi** mit diesem Grundgerüst ist mit einem IC_{50} -Wert von 390 nM beschrieben.^[210] Als Syntheseweg wird dabei die Alkylierung von Dimethylmalonat mit einem α, α -Difluormethylphosphonatbaustein beschrieben (Abb. 4.83).

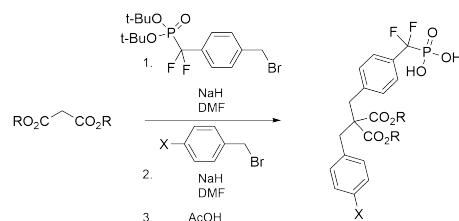


Abb. 4.83 Beschriebene Synthese zum Erhalt zweizähliger PTP1B-Inhibitoren nach Dufresne et al.

Dieser Weg bietet zwar den Vorteil der Einführung verschiedener Substituenten durch eine stufenweise Alkylierung, setzt aber das *para*-Brommethyl-substituierte Phosphonat voraus. Die Synthese dessen stellt aufgrund der auftretenden Nebenreaktionen eine Herausforderung dar, die durch die Wahl einer alternativen Syntheseroute umgangen werden konnte. Da keine stufenweise Alkylierung erfolgen sollte, bildete retrosynthetisch eine Dibenzoessäure die Basis zum Erhalt der Zielstruktur (Abb. 4.84).

Als Startsubstanz diente erneut 4-(Brommethyl)benzoessäure, welche zunächst zum Benzylester **96** umgesetzt wurde. Diese Verbindung erwies sich als instabil und nicht lagerfähig, sodass sie nach Erhalt direkt verwendet wurde. Im nächsten Schritt wurde Dimethylmalonat zunächst mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit dem Benzylester

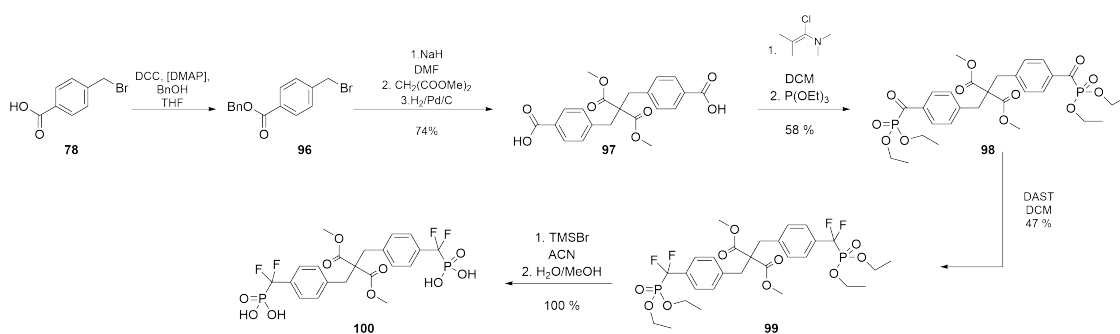


Abb. 4.84 Synthese der bidentaten Phosphonsäure **100**.

alkyliert. Die Dibenzoessäure **97** wurde nach der hydrogenolytischen Umsetzung mit H_2 / Pd / C erhalten. Zur Aktivierung der Carbonsäure erwies sich das *Ghosez's reagent* als zielführend, da unter der Verwendung von Oxalylchlorid kein Umsatz beobachtet werden konnte. Das Ketophosphonat **98** wurde nach der Michaelis-Arbusow-Reaktion mit Triethylphosphit erhalten. Die Fluorierung der α -Ketofunktion erfolgte mittels DAST.³⁴ Der finale Schritt zum Erhalt der Phosphonsäure **100** war die Entschützung des Phosphonats **99**. Das Reagenz TMSBr dient nicht nur zur Entschützung von Phosphonaten, sondern weist eine Reaktivität gegenüber Estern auf und wird zu deren Silylierung mit anschließender Hydrolyse verwendet. Daher stellte die Hydrolyse der Methylestergruppen eine potenzielle Nebenreaktion dar, deren Nebenprodukte in der darauffolgenden Fluorierung zur Bildung von Carbonsäurefluoriden führen würde. Durch den Einsatz eines hohen Überschusses an TMSBr und einer nur leichten Erwärmung bei einer verkürzten Reaktionszeit konnten die Ethylgruppen des Phosphonates selektiv entfernt werden, ohne dass es zu einer Reaktion der Methylesterfunktionalität kam. Während der Umsetzung mit TMSBr konnte erneut beobachtet werden, dass die Phosphonsäure **100** ein ungewöhnliches Verhalten gegenüber C8 und C18 HPLC-Materialien aufwies. Es konnte zwar eine zeitabhängige Abnahme der Peakfläche des Eduktes **99** beobachtet werden, hingegen keine Bildung eines weiteren, dem Produkt entsprechenden, Signals. Während einige Phosphonsäuren und deren Monofluoride sehr stark retentiert werden und erst in darauffolgenden HPLC-Läufen eluierten, konnte die bidentate Phosphonsäure nie in chromatographischen Trennungen nachgewiesen werden. Analytisch wurde die Verbindung **100** durch eine MSD-Direktinjektion und die Aufnahme von NMR-Spektren nachgewiesen (Abb. 4.85).

³⁴Das erhaltene α, α -Difluorophosphonat **99** besitzt keine Absorption im aromatischen Wellenlängenbereich.

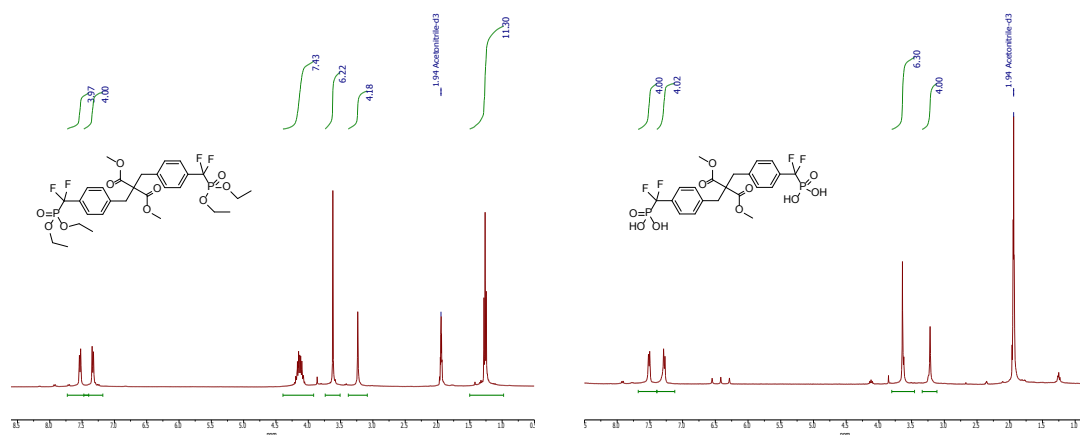


Abb. 4.85 ¹H-NMR Spektren des Phosphonats **99** (links) und der Phosphonsäure **100** (rechts).

Bei der Interpretation der ¹H-NMR Spektren des Phosphonats **99** und der gebildeten Phosphonsäure **100** zeigte sich, dass aufgrund der Symmetrie der Moleküle kein komplexer Signalsatz vorliegt. Die beobachtenden Signale sind dem Phenylring, der benzylichen CH₂-Gruppe ($\delta = 3.2$ ppm) und dem Methylester ($\delta = 3.6$ ppm) zuzuordnen. Während der Signalsatz der Ethylgruppe des Phosphonsäureesters (Abb. 4.85; links: $\delta = 4.1$ ppm und 1.3 ppm) nicht mehr beobachtet werden konnte, zeigte sich nach Behandlung mit TMSBr (Abb. 4.85; rechts) bei der Integration des Methylestersignals keine Veränderung.

Im finalen Schritt sollte die erhaltene Phosphonsäure **100** unter der Verwendung von (COF)₂ fluoriert werden, was aufgrund der substanzspezifischen Eigenschaften nicht möglich war. Neben der starken Hygroskopie, was in folgenden Fluorierungsversuchen zur Hydrolyse des Fluorierungsreagenzes führte, konnte auch unter verstärkt inerten Bedingungen kein Umsatz beobachtet werden. Hinderlich war dabei die Löslichkeit der Diphosphonsäure, welche nur mit dem Zusatz von Wasser in Acetonitril in Lösung gebracht werden konnte. Acetonitril stellt neben Toluol das einzige Lösungsmittel dar, welches sich in Anwendungen mit Oxalylfluorid als tauglich erwies. Das Überführen in die korrespondierende Natriumform konnte zwar die hygroskopischen Eigenschaften verringern, führte jedoch folglich zu einem stärker polaren Charakter und zu keiner verbesserten Löslichkeit in Acetonitril. Alternative Fluorierungsmethoden kamen in Anbetracht einer darauffolgend notwendigen HPLC-Aufreinigung nicht in Betracht.

Letztlich konnte eine bidentate Phosphonsäure dargestellt werden, welche, nach unserer Kenntnis, nicht in der Literatur beschrieben ist. Diese Verbindung konnte jedoch aufgrund

ihrer spezifischen Eigenschaften nicht fluoriert werden. Folglich konnte bei der Datenerhebung der enzymkinetischen Hemmung kein Vergleich mit dem Säuremonofluorid erfolgen (Abb. 4.86).

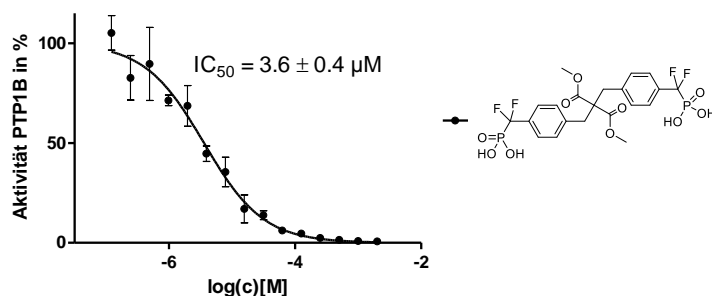


Abb. 4.86 PTP1B-Inhibition der bidentaten Phosphonsäure **100**.

Die dargestellte bidentate Phosphonsäure **100** besaß mit einem IC_{50} -Wert von $3.6 \mu M$ das höchste inhibitorische Potenzial gegenüber der Proteintyrosinphosphatase PTP1B, die innerhalb dieses Projektes erreicht werden konnte. Im Vergleich zu der Literaturverbindung, die eine freie Säurefunktion am Malonsäuregrundgerüst besitzt, erwies sich die neu dargestellte Verbindung um den Faktor 10 weniger affin. In Anbetracht der zuvor erhaltenen Verhältnisse $\frac{IC_{50}(\text{Fluorid})}{IC_{50}(\text{Säure})}$ zwischen den beiden Substanzklassen, könnte im Falle einer erfolgreichen Fluorierung eine bidentate Monofluorphosphonsäure mit einem IC_{50} -Wert im zweistelligen μM -Bereich vorliegen.

4.2.4 Zusammenfassung der Monofluorphosphonsäuren als neue pTyr-Mimetika

Mit den monofluorierten Phosphonsäuren wurde eine Substanzklasse untersucht, die nur sehr vereinzelt in Veröffentlichungen beschrieben ist. Es wurden Derivate mit einer Monofluorphosphonsäuregruppe dargestellt und diese auf ihre reaktiven Eigenschaften und Stabilität hin untersucht. Im Zuge dessen konnte festgestellt werden, dass die vorliegende Substanzklasse eine hohe Hydrolysestabilität sowie eine geringe Reaktivität gegenüber Nukleophilen besitzt. Mit der Überführung in die anionische Natriumsalzform wurden Substanzen erhalten, deren Reaktivität in einer Hydrolysereaktion stark vermindert war. Die in diesem Kapitel vorgestellten biochemischen Arbeiten stellen, nach unserer Kenntnis, die erste Anwendung von Monofluorphosphonsäuren auf die Proteintyrosinphosphatase PTP1B dar. Aufgrund der Erstbetrachtung dieser Verbindungen als PTP1B Inhibitoren wurden verschiedene Interaktionen der fluorierten Phosphonsäuren gegenüber PTP1B postuliert. Mit der Einführung einer reaktiven Abgangsgruppe am Proteinerkennungsmotiv ergab sich die Hypothese einer potenziellen Reaktivität gegenüber dem aktiven Zentrum der Phosphatase. Im Zuge der Untersuchung des Verhaltens gegenüber PTP1B konnte nachgewiesen werden, dass Monofluorphosphonsäuren weder kovalent irreversible noch kovalent reversible Eigenschaften aufweisen und daher als stabile Inhibitoren gegenüber PTP1B zu beurteilen sind. Innerhalb einer Strukturoptimierung konnten Substanzen erhalten werden, deren Bindungskonstanten im mittleren bis niedrigen μM -Bereich lagen. Im Vergleich mit den korrespondierenden Phosphonsäuren sind die monofluorierten Phosphonsäuren zwar weniger affin, hingegen weist diese neue Substanzklasse eine verringerte negative Ladung auf und sollte eine erhöhte Zellgängigkeit besitzen. Mit dieser Eigenschaft ergibt sich ein potenzieller Einsatz in *in vivo* Anwendungen, sodass die Verwendung der neuen pTyr-Mimetika zu neuen Erkenntnissen innerhalb von Proteintyrosinphosphatase-abhängigen Vorgängen führen könnte.

4.3 Phosphonsäuren als kovalent bindende Phosphotyrosinmimetika

Im Zuge der Untersuchungen der Reaktivität von fluorierten Phosphonsäuren gegenüber der Phosphatase PTP1B wurde beobachtet, dass jene Verbindungen eine Proteinmarkierung bewirkten, die ursprünglich als Negativkontrollen dargestellt wurden. Die Inkubation mit den unfluorierten biotinylierten Phosphonsäuren **71** und **74** führte zu einem positiven Nachweis einer Proteinbiotinylierung nach Westernblot (siehe Seite 111). Die enzymkinetische Betrachtung der Benzylphosphonsäuren wies auf kein irreversibles Verhalten hin, sodass diese reversible Inhibitoren darstellen. Mit den Phosphonsäuren liegt eine literaturbekannte Substanzklasse vor, wobei ein derartiges Verhalten in einer Proteinvernetzungsreaktion weder beschrieben noch zu erwarten war.

Bei der Durchführung der Vernetzungsexperimente der biotinylierten Inhibitoren wurde eine geringere Konzentration des Reduktionsmittels DTT gewählt. Ferner betrug die Inkubationszeit 18 h, was eine stark verlängerte Reaktionszeit darstellt. Die Beobachtung einer erfolgreichen Proteinvernetzung deckte sich mit den Ergebnissen der ersten Experimente mit Sonde **65**, die mit verkürzter Reaktionszeit nicht reproduziert werden konnten (siehe Seite 108). Der Zusammenhang einer verlängerten Reaktionszeit mit der Verwendung einer geringeren Konzentration des Reduktionsmittels wurde als eine potenziell oxidationsabhängige Reaktivität interpretiert. Diesem Umstand folgend sollte die Vernetzungsreaktivität der Phosphonsäuren mit der Phosphatase PTP1B in Abhängigkeit von DTT untersucht werden. Als Sonde wurde die Phosphonsäure **72** gewählt. Die Versuchsreihe wurde mit abnehmender Sondenkonzentration in An- und Abwesenheit von 1 mM DTT durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenz sowie eine Coomassiefärbung dokumentiert (Abb. 4.87).

Der Fluoreszenzdarstellung (Abb. 4.87; *rechts*) ließ sich eine starke Fluoreszenzmarkierung der Phosphatase PTP1B entnehmen. Ferner ließ sich ein signifikanter Einfluss des Reduktionsmittels DTT feststellen. Nach einer Reaktionszeit von 1 h war eine starke Fluoreszenz bei allen Proben zu beobachten, die ohne DTT vorlagen (Pos. 2 bis 6). Reaktionsansätze, die in Anwesenheit von DTT mit PTP1B inkubiert wurden zeigten, bis auf die höchste Konzentration von 2 mM (Pos. 7), keine Fluoreszenz, obwohl versuchsbedingt eine höhere Proteinkonzentration vorlag (vgl. Coomassiefärbung).

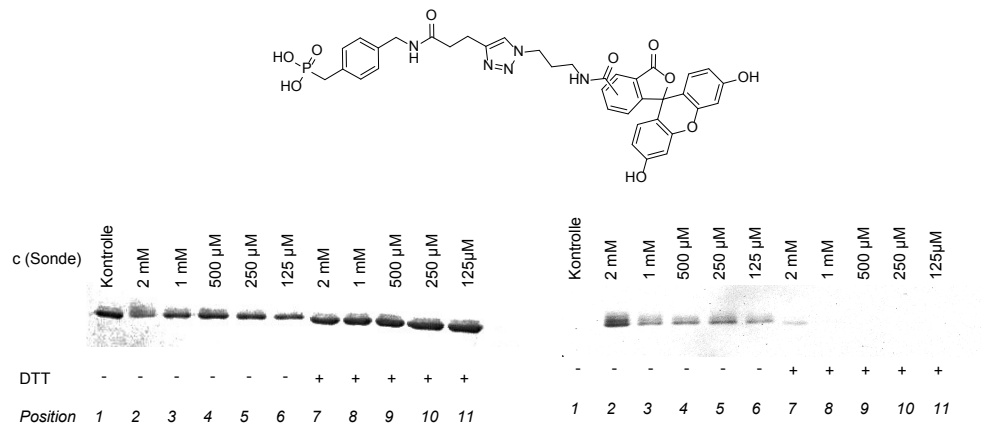


Abb. 4.87 oben: Struktur der verwendeten Sonde **72**;
links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

Mit dem ausschließlichen Erhalt der Proteinmarkierung bei verlängerter Reaktionszeit und bei Verwendung einer geringeren Konzentration des Reduktionsmittels, sind folgende Faktoren relevant:

- Obgleich die Monofluorophosphonsäuren eine signifikante Hydrolysestabilität aufweisen, konnte ein Vorliegen der Phosphonsäure nie ausgeschlossen werden.
- Der Einfluss eines Reduktionsmittels konnte mit dem vorangegangenen Experiment gezeigt werden. DTT besitzt eine Reaktivität gegenüber allen Oxidationsmitteln, ist in Lösung bedingt stabil, und sollte bei Verwendung jeweils frisch gelöst werden. Die Stabilität einer DTT-Lösung ist abhängig von dem vorliegenden pH-Wert sowie Metallionen und Komplexbildnern. Bei einem pH-Wert von 7.5 besitzt eine 0.5 bis 1 mM DTT-Lösung eine Halbwertszeit von 10 h.^[212]

Aufgrund dieser Umstände kann die zuvor beobachtete Fluoreszenz- bzw. Biotinmarkierung bei Verwendung der Monofluorophosphonsäuren durch die Anwesenheit der korrespondierenden Phosphonsäure eingetreten sein.

4.3.1 Einfluss von Redoxsystemen auf eine Proteinvernetzung

Reduktionsmittel

Nach der ermittelten Relevanz von DTT in der Proteinmarkierungsreaktion sollte ein Einfluss des Phosphins TCEP untersucht werden. Experimentell erfolgte dies im direkten Vergleich mit DTT in einer identischen Konzentration von 1 mM gegenüber verschiedenen Konzentrationen der Phosphonsäure **72**. Zusätzlich erfolgte eine Verdünnungsreihe der Reduktionsmittel gegenüber einer festen Sondenkonzentration von 500 μM . Nach einer Inkubationszeit von 1.5 h wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.88).

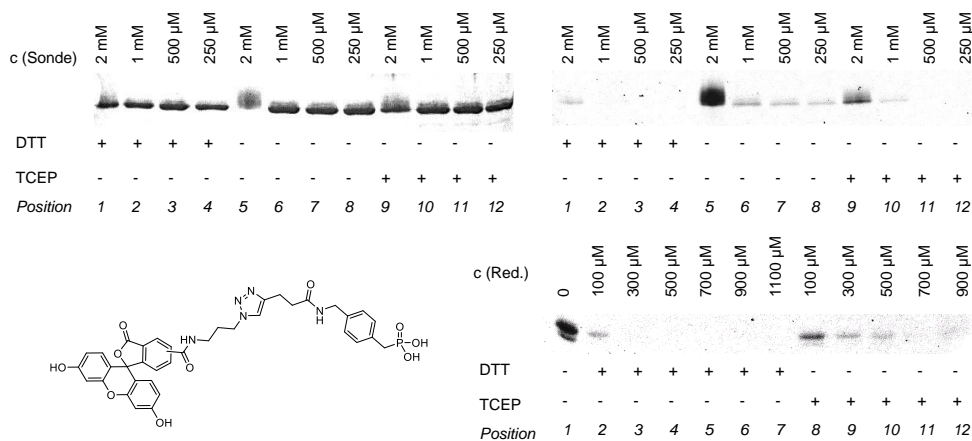


Abb. 4.88 oben, links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B; oben, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert); unten, links: Struktur der eingesetzten Benzylphosphonsäure **72**; unten, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

In Abwesenheit eines Reduktionsmittels konnte erneut eine Markierung beobachtet werden (Abb. 4.88; oben, rechts, Pos. 5 bis 8). Während durch DTT eine Proteinmarkierung nahezu vollständig unterdrückt wurde (Abb. 4.88; oben, rechts, Pos. 1 bis 4), konnte bei der Verwendung von TCEP in höheren Konzentrationen der Sonde noch eine Fluoreszenz festgestellt werden (Abb. 4.88; oben, rechts, Pos. 9 und 10). Bei Betrachtung der Verdünnungsreihen der Reduktionsmittel (Abb. 4.88; unten, rechts) zeigt sich ein identisches Bild. Diese Ergebnisse lassen auf einen stärkeren Effekt von DTT hinsichtlich der Unter-

drückung der Proteinvernetzungsreaktion im Vergleich zu TCEP schließen.

Oxidationsmittel

Mit einer unterdrückten Proteinmarkierung durch die Verwendung von Reduktionmitteln wurde anschließend der Einfluss von Oxidationsmitteln auf die Vernetzungsreaktion untersucht.

Die Proteinphosphatase PTP1B besitzt mit seiner katalytisch aktiven Aminosäure Cys215 ein oxidationsempfindliches Zentrum. Im Falle einer erfolgten Oxidation führt diese zu der Inaktivierung des Enzyms und somit zu dem Ausbleiben einer Dephosphorylierung von Substraten. Salmeen et al. sowie Montfort et al. beschrieben 2003 jeweils die Oxidation des Cys215 zu einer Sulfensäure mit anschließender Cyclisierung zum Sulfenamid.^[43,44] Die Bildung des 5-gliedrigen Isothiazolidinons erfolgt über die NH-Gruppe der benachbarten Aminosäure Ser216 und konnte kristallographisch nachgewiesen werden (Abb. 4.89).^[43,44]

Durch die Verwendung von H₂O₂ erfolgt zunächst die Oxidation des aktiven Cysteins zu einer Sulfensäure der Oxidationsstufe ± 0 . Diese steht, über die Reaktion mit der NH-Gruppe des Peptidrückgrades, im Gleichgewicht mit dem Sulfenamid. Die Oxidation des Cysteins zur Sulfensäure ist reversibel, sodass in Anwesenheit von Reduktionsmitteln wie DTT die natürliche reduzierte Form des katalytisch aktiven Zentrums erhalten werden kann. Dieser Redoxmechanismus wird als ein Schutz der Phosphatase gegenüber weiteren irreversiblen Oxidationen zur Sulfin- bzw. Sulfonsäure interpretiert. Die Bildung dieses Sulfenamids konnte auch innerhalb dieser Arbeit beobachtet werden. So wurde im Zuge von Kristallisationsversuchen mit dargestellten Inhibitoren die Elektronendichte der oxidierten Phosphatase PTP1B erhalten.³⁵

Die Wirkung von H₂O₂ auf PTP1B wurde in dieser Arbeit bereits enzymkinetisch untersucht (siehe Seite 103). Bei der Anwendung einer nichtlinearen Regression ergibt sich für H₂O₂ ein formaler IC₅₀-Wert von 71 μ M.³⁶ Während der Betrachtung der zeitabhängigen Aktivitätsabnahme ließ sich bei einer Konzentration von 200 μ M bereits nach 10 min

³⁵durchgeführt von Dr. Anja Schütz, AG Heinemann, FMP Berlin

³⁶Inkubationszeit von 40 min; Die Verwendung des IC₅₀-Wert für irreversible Inhibitoren ist grundsätzlich nicht zulässig und diente in diesem Zusammenhang der Bestimmung eines wirksamen Konzentrationsbereichs.

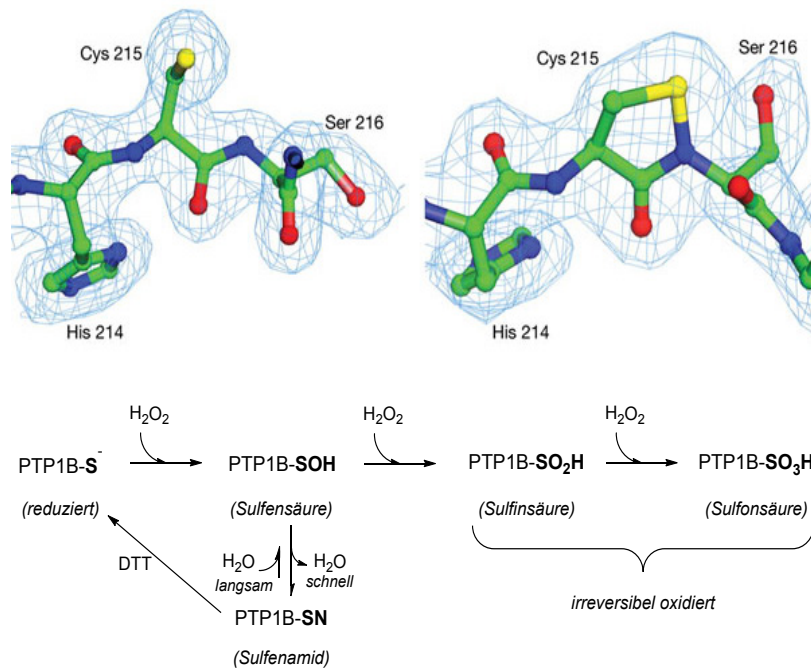


Abb. 4.89 oben, links: Elektronendichte der katalytischen Domäne von PTP1B;
oben, rechts: Elektronendichte nach der Oxidation zum Sulfenamid;
unten: Oxidation des Cys215 mittels H₂O₂ zu unterschiedlichen Oxidationszuständen.

keine signifikante Enzymaktivität mehr feststellen (35 min bei 100 µM). Dies bedeutet, dass selbst bei längeren Inkubationzeiten geringer Konzentrationen H₂O₂ kein aktives Protein mehr vorliegt, sondern dessen oxidierte Spezies. Experimentell erfolgte die Untersuchung mittels einer Verdünnungsreihe von H₂O₂ gegenüber einer festen Konzentration der fluoreszenten Benzylphosphonsäure **72** von 375 µM (Abb. 4.90).

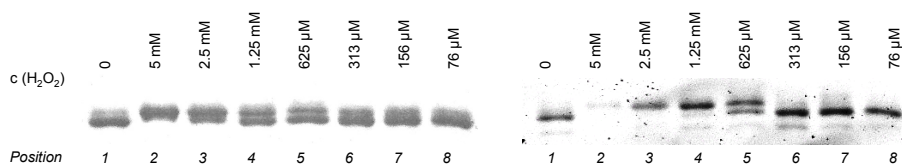


Abb. 4.90 links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

Die Phosphatase wurde 3 h mit verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ vorinkubiert

und anschließend die Phosphonsäure **72** hinzugegeben. Nach weiteren 1.5 h wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit der Betrachtung der Fluoreszenzmarkierung ergab sich ein signifikanter Einfluss des Oxidationsmittels auf die Proteinvernetzungsreaktion. Mit einer Gesamtzeit von 4.5 h unter oxidativen Bedingungen war das Vorliegen einer aktiven Phosphatase auszuschließen. Folglich reagierte die Fluoreszenzsonde mit dem inaktivierten Protein. Die beobachtete Reaktion der Kontrolle bzw. der Probe, die keiner vorsätzlichen Oxidation unterzogen wurde (Pos. 1), deckt sich mit den Ergebnissen anderer Versuche. Es konnte beobachtet werden, dass Proteinstammlösungen, die häufiger Auftau/Frierzyklen unterlagen, eine stärkere Proteinmarkierung aufwiesen als frische Aliquots. Dies wurde als eine Teiloxidation durch Luftsauerstoff interpretiert. Den fluoreszenten Banden (insbesondere Pos. 5) ließ sich eine Trennung von zwei Spezies unterschiedlicher Retention auf dem SDS-Gel entnehmen. Diese Trennung konnte auch auf Seiten der Coomassiefärbung beobachtet werden. Die Erhöhung des Molekulargewichts erfolgte mit der Modifikation von oxidationsempfindlichen Aminosäureresten wie Cystein und Methionin und ist literaturbekannt.^[44,213] Die Intensität der Markierung war abhängig von der Konzentration des Oxidationsmittels und wies im Bereich von 156 μM (Pos. 7) ein Maximum auf. Ferner zeigte sich, dass die Fluoreszenzmarkierung hin zu höher oxidierten Zuständen abnahm und bei einer H_2O_2 -Konzentration von 5 mM nicht mehr zu beobachten war. Die Auftrennung der Banden bzw. der Proteinspezies wurde mit der maximalen Laufstrecke der SDS-Gel-Elektrophorese und Wahl der geringsten Geldichte erreicht. Obwohl die Superposition der beiden Dokumentationen (Fluoreszenz und Coomassie) auf die Markierung einer bestimmten Bande hinwies, konnte aufgrund der unmittelbaren Nähe keine eindeutige Aussage dahingehend getroffen werden, welche Proteinspezies eine Fluoreszenzmarkierung aufwies. Selbst manuelle Markierungen von fluoreszenten Proteinbanden ließen dies nicht zu.

Ein weiteres Oxidationsmittel, das im Zusammenhang mit der Oxidation von PTP1B steht, ist Glutathiondisulfid (GSSG). Barrett et al. zeigten im Zuge einer Untersuchung der reversiblen Regulation von PTP1B, dass die Phosphatase in Anwesenheit von GSSG einer zeitabhängigen Desaktivierung unterliegt. Der Verlust der enzymespezifischen Aktivität ist reversibel, sodass diese durch einen Überschuss an DTT oder der Glutathion-spezifischen Thioltransferase Glutaredoxin wiederhergestellt werden konnte. Mit der Reversibilität der Desaktivierung und einer massenspektrometrischen Validierung einer einfachen und/oder

mehrfachen Glutathionylierung, liegen die Cysteinreste von PTP1B als gemischte Disulfide vor.^[214]

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Desaktivierung mit Bestimmung der enzymkinetischen Daten nachgewiesen werden. In Anwesenheit von 1 mM GSSG konnte bereits nach 10 min keine Enzymaktivität mehr beobachtet werden. Durch die Vorinkubation von PTP1B mit 1 mM GSSG sollten die Cysteinreste zum gemischten Disulfid oxidiert werden und anschließend hinsichtlich einer Reaktion gegenüber der fluoreszenten Benzylphosphonsäure **74** untersucht werden.

Während dieses Experiments konnte beobachtet werden, dass jene Proben, die mit GSSG oxidiert wurden, keine verstärkte Fluoreszenz aufwiesen (*nicht dargestellt*). Dies deutete darauf hin, dass die Markierung des Proteins durch die Benzylphosphonsäure nicht auf deren Reaktivität gegenüber einem zum Disulfid oxidierten Cysteinrest beruht.

4.3.2 Massenspektrometrische Untersuchung

Analyse des Vollproteins

In vorangegangenen Experimenten konnte eine Proteinmarkierung durch Benzylphosphonsäuren mittels positivem Nachweis im Anti-Biotin-Westernblot und der Fluoreszenz von Proteinbanden nach Inkubation mit fluoreszenten Sonden nachgewiesen werden.

Eine weitere Methodik der Proteinanalytik bietet die Aufnahme von MALDI-TOF-MS Spektren. Mit dieser Ionisierungsmethode können Molekülmassen in einem Bereich zw. 1-300 kDa detektiert werden, was die Analytik von Vollproteinen einschließt.^[215] Die in dieser Arbeit verwendete, rekombinant dargestellte, katalytische Domäne von PTP1B besitzt eine Molekülmasse von 37456 Da.

Um eine kovalente Modifikation der oxidierten Phosphatase PTP1B bestätigen zu können, wurden MALDI-TOF-MS Spektren vor und nach der Inkubation mit der fluoreszenten Sonde ($m/z = 739$ Da), aufgenommen (Abb. 4.91).³⁷

Das erhaltene Massenspektrum der Kontrolle von PTP1B (Abb. 4.91; *oben, links*) deckte sich mit der berechneten theoretischen Molekülmasse. Jene Proteinproben, die auf eine Modifikation hin untersucht werden sollten, wurden für 1.5 h unter oxidativen Bedingungen mit 500 μ M der Benzylphosphonsäure inkubiert und anschließend mittels MALDI-TOF-

³⁷Die Aufnahme der MALDI-TOF-MS Spektren erfolgte durch Frau Regina Reppich-Sacher, AG Beck-Sickingher, Universität Leipzig.

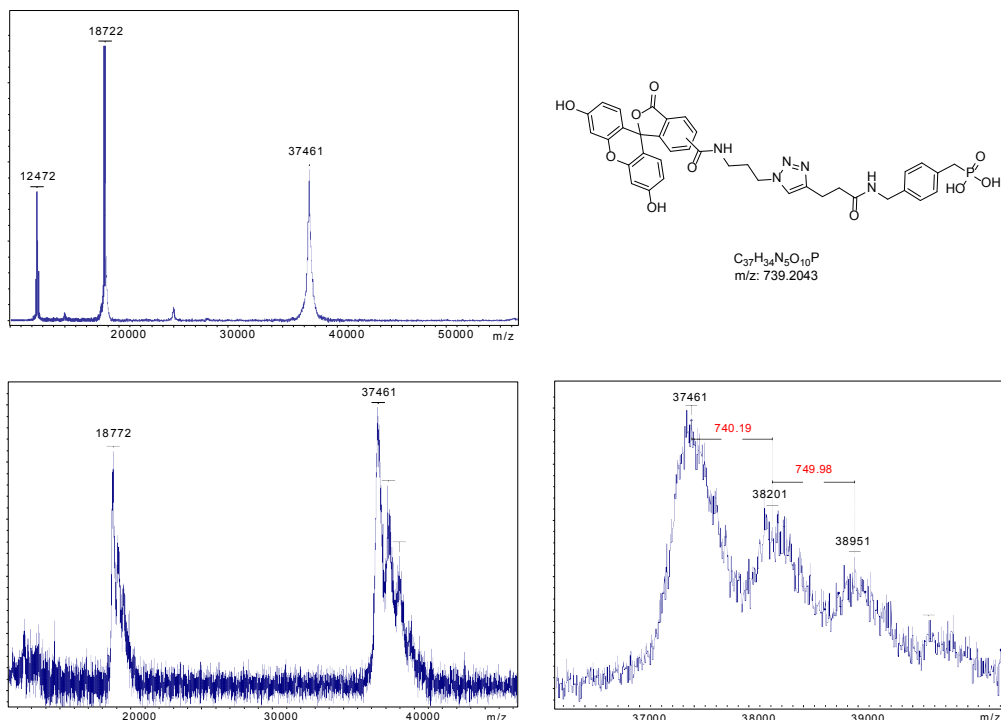


Abb. 4.91 oben, links: MALDI-TOF-MS Spektrum von PTP1B;
 oben, rechts: Struktur der verwendeten Phosphonsäure **72**;
 unten, links: MALDI-TOF-MS Spektrum von PTP1B nach Inkubation mit **72**;
 unten, rechts: Vergrößerter Ausschnitt des MALDI-TOF-MS Spektrums.

Spektrometer analysiert. Bei Betrachtung der erhaltenen MS Spektren (Abb. 4.91; unten, links und rechts) zeigte sich eine Modifikation des Proteins. Dem Ausschnitt des Spektrums ließ sich im Bereich des $M+H^+$ Signals eine Modifikation entnehmen, die im Weitesten der Molekülmasse der verwendeten Benzylphosphonsäure **72** entsprach. Manchen MALDI-TOF-MS Spektren ließen sich weitere Modifikationen entnehmen, die auf eine Reaktion mehrerer Sondenäquivalente hindeuteten. Die Wiederholung der massenspektrometrischen Analyse wies reproduzierbar die Modifikation mit mindestens einem Äquivalent der Sonde auf, jedoch nie eine vollständige Markierung.³⁸

³⁸Ferner erfolgte die Aufnahme von ESI-MS Massenspektren, welche zu keinem Ergebnis führten.

Analyse nach tryptischem Verdau

Mit der Aufnahme von MALDI-TOF-MS Massenspektren konnte eine Reaktion der Phosphonsäure und PT1PB zu einem kovalent verknüpften Vernetzungsprodukt validiert werden. Nachteilig bei der MALDI-MS-Analytik von Vollproteinen ist der Erhalt von stark verbreiterten Signalen. Dies erfolgt aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung und nicht anwendbarer mathematischer Operationen wie z.B. Dekonvolution. Daher ist es nicht möglich, die Modifikation anhand einer Differenz eindeutig zu bestimmen. Durch eine detailliertere Analytik sollte die kovalente Verknüpfung weiter untersucht werden.

Die Fragmentierung eines Proteins hin zu kleineren Molekülmassen bietet die Möglichkeit der Identifikation modifizierter Peptidsequenzen. Innerhalb der Proteinanalytik werden dazu Peptidasen genutzt, die andere Proteine selektiv nach bestimmten Aminosäuren spalten. Die wohl am häufigsten verwendete Peptidase stellt die Serinprotease Trypsin dar. Folgend sollte die modifizierte Phosphatase PTP1B einem tryptischen Verdau unterzogen werden, um Rückschlüsse über Art und Position der Proteinmodifikation ziehen zu können. Um einen größtmöglichen Informationsgehalt zu erhalten, wurde das dargestellte Verfahren angewendet (Abb. 4.92).

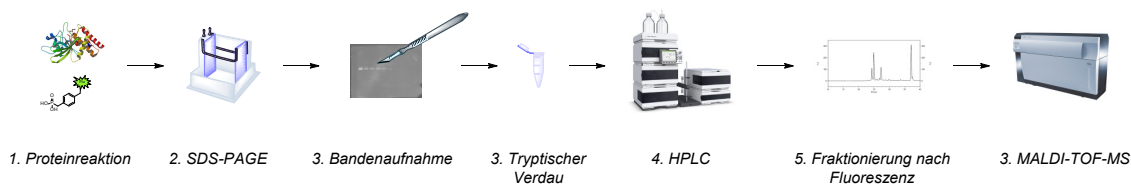


Abb. 4.92 Schema der Probenaufbereitung und folgende Analytik.

Die MS-Analyse eines Proteinverdaus erfolgt üblicherweise im direkten Vergleich zw. der zu untersuchenden Probe und der nicht modifizierten Kontrolle. Da bei dieser Durchführung keine Ergebnisse erhalten werden konnten, sollte die Kopplung mit einer HPLC-Trennung und anschließender MS-Analytik folgen. Ferner bietet eine zuvor durchgeführte gelelektrophoretische Trennung den Vorteil der Abtrennung des Überschusses der eingesetzten Sonde. Die erhaltenen fluoreszenten Proteinbanden wurden aus dem Trenngel entfernt und in einem in-Gel-Verdau mit Trypsin inkubiert. Nach der Elution der Peptide aus dem Reaktionsansatz wurden diese mittels HPLC getrennt. Die Fraktionierung der Peptide, die eine Modifikation mit der verwendeten Sonde aufwiesen, erfolgte manuell anhand der

Signale des Fluoreszenzdetektors bei der Absorptions- und Emissionswellenlänge von $\lambda_{ex} = 492 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$ (Abb. 4.93).

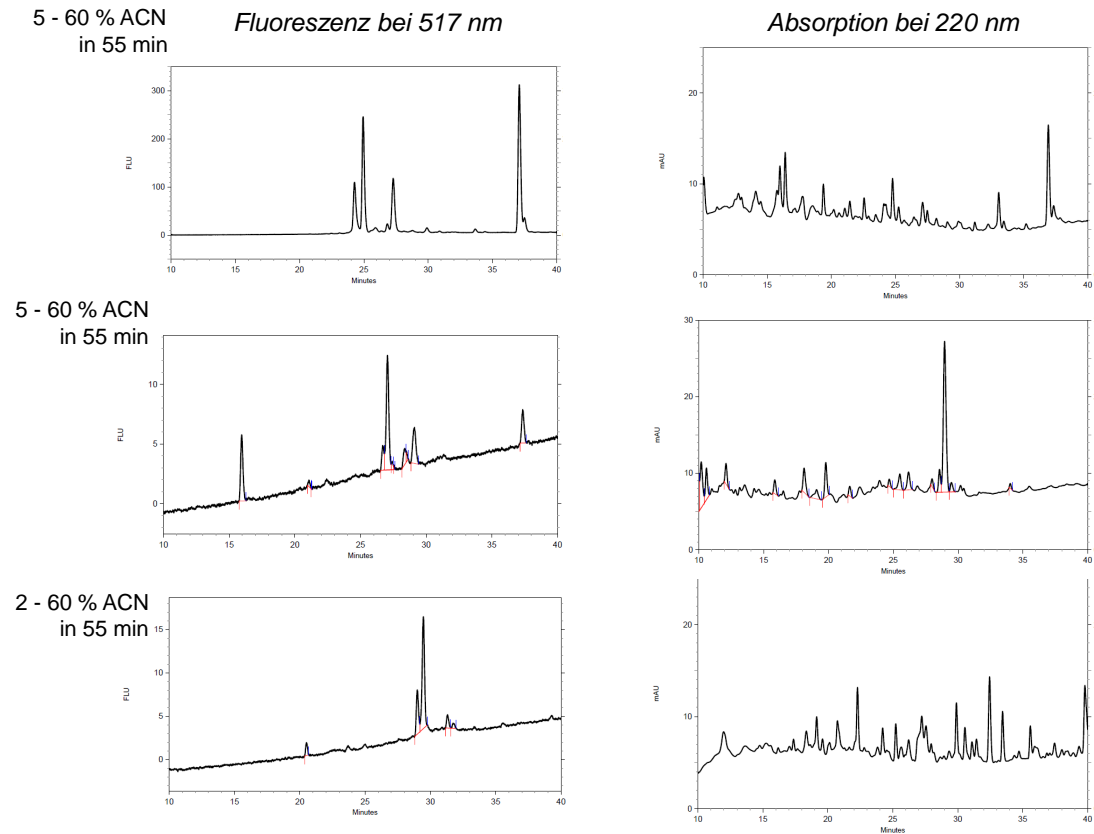


Abb. 4.93 Spalte, links: HPLC-Chromatogramme der Fluoreszenz bei 517 nm; Spalte, rechts: HPLC-Chromatogramme der Absorption bei 220 nm.

Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme bestätigten erneut das Vorliegen einer kovalenten Proteinmodifikation, da in der Kontrolle des Verdaus des reinen Proteins PTP1B keine fluoreszenten Signale beobachtet werden konnten (*nicht dargestellt*). Es wurden verschiedene Gradiententrennungen durchgeführt, wobei in jedem Chromatogramm jeweils mehr als ein Signal eines fluoreszenten Peptides zu beobachten war. Ferner zeigte sich, dass die Chromatogramme der Fluoreszenzspur bei Verwendung eines identischen Gradienten (Abb. 4.93; Spalte, links: oben und mitte) nicht deckungsgleich waren, was auf einen unterschiedlichen Verlauf des Verdaus und/oder auf das Vorliegen unterschiedlicher Proteinspezies schließen ließ. Den HPLC-Chromatogrammen bei der Absorptionswellenlänge von 220 nm ließ sich entnehmen, dass im Retentionsbereich der fluoreszenten Peptide

weitere, nicht fluoreszente Peptide vorlagen.

Dies konnte auch bei der Aufnahme der MADLI-MS Spektren der eingeeengten Fraktionen beobachtet werden. Die erhaltenen Spektren (*nicht dargestellt*) wiesen zwar Molekülmassen auf, die nicht mit einem theoretischen Verdau des unmodifizierten Proteins erhalten werden sollten, eine Zuordnung dieser war jedoch nicht möglich.

4.3.3 Selektivität der Proteinvernetzungsreaktion

Anhand der vorangegangenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die verwendete fluoreszente Benzylphosphonsäure **72** unter bestimmten Reaktionsbedingungen eine kovalente Bindung mit der Proteintyrosinphosphatase PTP1B einging. Mit der unterdrückten Markierung unter reduktiven Bedingungen und der verstärkten Reaktivität unter oxidativen Bedingungen, liegt die Reaktion mit einer oxidierten Proteinspezies nahe. Im Weiteren sollte die Selektivität untersucht werden.

Einfluss der Puffersysteme

Da bei der Untersuchung der monofluorierten Phosphonsäuren die pH-Wertveränderung die Enzymkinetik von PTP1B beeinflusste, wurde die Reaktivität der Benzylphosphonsäuren in verschiedenen Puffersystemen betrachtet. Bekannt ist, dass die Verwendung verschiedener Puffersubstanzen zu einer Aktivitätsveränderung von Enzymen oder zu der Bildung von Addukten zwischen Inhibitoren und den Pufferbestandteilen führen kann.^[216,217] Daher folgte eine Variation der Puffer sowie eine Verdünnungsreihe gegenüber H₂O₂, um einen oxidierten Zustand zu erreichen (Abb. 4.94).³⁹

Mit den Puffern TRIS, HEPES und MES wurden Verbindungen gewählt, die sich strukturell unterscheiden. TRIS besitzt mit einer primären Aminogruppe und drei primären Alkoholen reaktive Eigenschaften.^[216] HEPES weist wie TRIS eine primäre OH-Funktion auf, während MES einen vergleichsweise inerten Morpholinrest besitzt. Beim Vergleich der Fluoreszenzbanden (Abb. 4.94; *rechts*) zeigte sich kein Unterschied in der Fluores-

³⁹Inkubationszeit (H₂O₂): 1 h, Inkubationszeit (Sonde **72**): 1.5 h; Die Konzentration der Sonde betrug 330 µM.

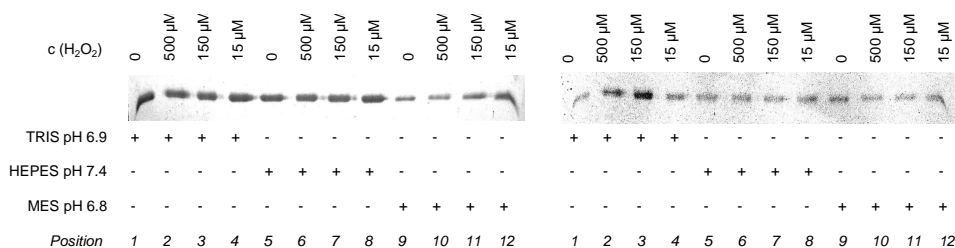


Abb. 4.94 links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

zenzintensität oder in dem Fehlen eben dieser Banden. Folglich war die Proteinmarkierung unabhängig von dem verwendeten Puffer. Der Verdünnungsreihe von H₂O₂ ließ sich erneut eine fluoreszente Proteinbande den Proben entnehmen, die nicht vorsätzlich oxidiert wurden (Pos. 1, 5 und 9). Dies deckt sich mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen, bei der eine weitere Oxidation des Proteins nicht notwendig war.

Die Konzentration des verwendeten Puffers ist entscheidend für einen konstanten pH-Wert. Um Effekte im Zuge einer pH-Wertveränderung ausschließen zu können, wurde die Fluoreszenzmarkierung des oxidierten Proteins bei verschiedenen Pufferkonzentrationen untersucht. Zusätzlich erfolgte die Verwendung der alternativen fluoreszenten Benzylphosphonsäure **101** (Abb. 4.95).⁴⁰

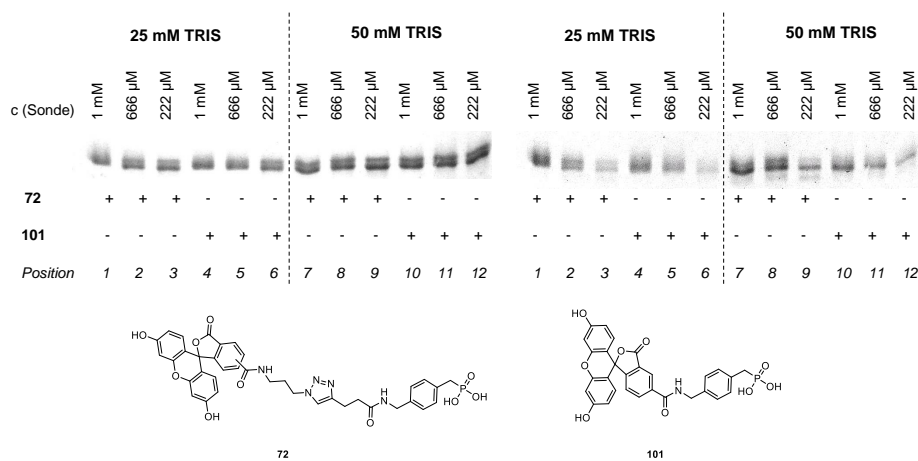


Abb. 4.95 oben, links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von PTP1B;
oben, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert);
unten: Strukturen der verwendeten Sonden.

⁴⁰Inkubationszeit (H₂O₂): 1.25 h, Inkubationszeit (Sonden **72** und **101**): 1.5 h; Die Konzentration von H₂O₂ betrug 150 μ M.

Aus dem Erhalt der fluoreszenten Proteinmarkierung konnte geschlossen werden, dass die Pufferkonzentration keinen Einfluss auf die Proteinvernetzungsreaktion hatte, da in beiden TRIS Konzentrationen eine Reaktion zu beobachten war. Bei der Superposition der Coomassiefärbung und der Fluoreszenzdokumentation zeigte sich erneut das Vorliegen von zwei Proteinbanden. Die Verwendung der alternativen Phosphonsäure **101** lieferte ebenfalls Fluoreszenz-markierte Proteinbanden, was die alleinige Reaktivität der zuvor verwendeten Sonde **72** ausschließt.

Ferner wurde eine weitere Versuchsreihe mit der Verwendung einer Pufferkonzentration (TRIS) von 100 mM und verschiedenen pH-Werten von 6.5, 7, 7.5 und 8 durchgeführt (*nicht dargestellt*). Auch innerhalb dieses Experiments konnte keine Veränderung bei der erfolgten Markierung von PTP1B festgestellt werden. Demnach kann die Veränderung der Pufferbedingungen nicht als reaktionsbestimmende Variable angesehen werden.

Synthese und Untersuchung von Phosphonsäurederivaten

Biotinylierte Phosphonsäuren zeigten im Anti-Biotin-Westernblot eine Proteinmarkierung (siehe Seite 111). Die fluoreszente Phosphonsäure **72** wurde mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition dargestellt und die Proteinmodifikation mittels MALDI-TOF-MS Experimenten nachgewiesen. Ferner konnte unter Verwendung der Phosphonsäure **101** eine Proteinmarkierung beobachtet werden.

Im Folgenden sollten weitere Derivate von benzylsubstituierten Phosphonsäuren synthetisiert und untersucht werden. Dazu wurden alternative fluoreszente Strukturen, wie Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) sowie Aminomethylcumarinacetat (AMCA), gewählt (Abb. 4.96).

Die bereits in Experimenten der Erhöhung der Pufferkonzentration verwendete Phosphonsäure **101** wurde ausgehend von *N*-Fmoc-geschützter 4-Aminomethylbenzoesäure dargestellt. Die Reduktion der Säurefunktion, gefolgt von der Transformation des benzyli-schen Alkohols zum Benzylbromid, lieferte Verbindung **103**. Eine Michaelis-Arbusow-Reaktion mit Triethylphosphit, gefolgt von der Kupplung mit Pivaloyl-geschütztem 5-Carboxyfluorescein führte zum Erhalt des Phosphonates **104**. Die vollständige Entschützung mit TFA und TMSBr lieferte Verbindung **101**, welche mittels HPLC aufgereinigt

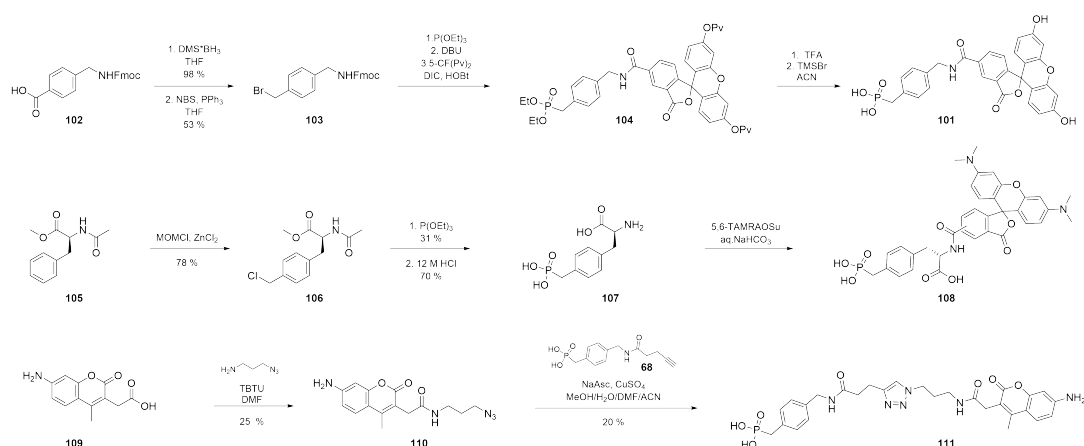


Abb. 4.96 Synthese der fluoreszenten Phosphonsäuren **101**, **108** und **111**.

wurde.

Durch Modifikation des Grundgerüsts sollte eine Phosphonsäure auf Basis der Aminosäure pmP erhalten werden. Dazu wurde zunächst Phenylalaninmethylester acetyliert und anschließend eine 4-Chlormethylgruppe eingeführt. Dies erfolgte über den Einsatz von Methoxymethylchlorid (MOMCl) und der Lewisäure ZnCl₂. Das Reagenz MOMCl dient vor allem der Einführung einer Methoxymethylschutzgruppe in alkoholischer Position, kann jedoch auch als Chlormethylierungsreagenz verwendet werden.^[218–220] Nach Erhalt des 4-chlormethylierten Phenylalanins **106** folgte die Einführung der Phosphonatgruppe und die anschließende vollständige Entschützung mittels konzentrierter Salzsäure. Das Fluorophor 5,6-TAMRA wurde zunächst in seinen Succinimidylester überführt und unter basischen Bedingungen mit der entschützten Aminosäure **107** umgesetzt. Diese Reaktion war mit einem sehr geringen Umsatz und einer anspruchsvollen HPLC-Trennung verbunden. Daher wurde Verbindung **108** leicht verunreinigt und in sehr geringer Ausbeute erhalten.

Ein weiteres Benzylphosphonsäurederivat sollte das Fluorophor 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) enthalten. AMC besitzt mit ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) eine kürzere Anregungswellenlänge als Fluorescein- (λ_{ex} um 492 nm) und Rhodaminderivate (λ_{ex} um 546 nm) und stellt in der Medizinischen Chemie einen alternativen, analytisch genutzten Fluoreszenzfarbstoff dar. Aufgrund der freien Aminogruppe sollten Reaktionen vermieden werden, die die Möglichkeit einer Nebenreaktion beinhalten. Folglich sollte die Zielverbindung über eine 1,3-dipolare Cycloaddition erhalten werden. Dazu wurde das Cumarin

AMCA zunächst in einer Kupplungsreaktion mit 3-Azidopropylamin umgesetzt. Diese stellte zwar selbst eine potenzielle Nebenreaktion über eine intermolekulare Polymerisation des aktivierten Cumarins dar, jedoch war die aromatische NH₂-Gruppe ausreichend unreaktiv, sodass das fluoreszente Azid **110** erhalten werden konnte. In einer Cycloaddition wurde dieses mit der Alkin-Phosphonsäure **68** zur gewünschten Zielverbindung **111** umgesetzt. Die erhaltenen Derivate sowie das bereits zuvor synthetisierte pmP-haltige Substratanalogon **42** wurden auf ihr Verhalten in der Proteinvernetzungsreaktion gegenüber PTP1B hin untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Einsatz der zusätzlich dargestellten Substanzen zu keiner fluoreszenten Proteinmarkierung führte (*nicht dargestellt*). So konnte bei den beiden Phosphonomethylphenylalanin-haltigen Verbindungen **42** und **108** sowie der AMC-Phosphonsäure **111** keine Reaktivität festgestellt werden (Abb. 4.97).

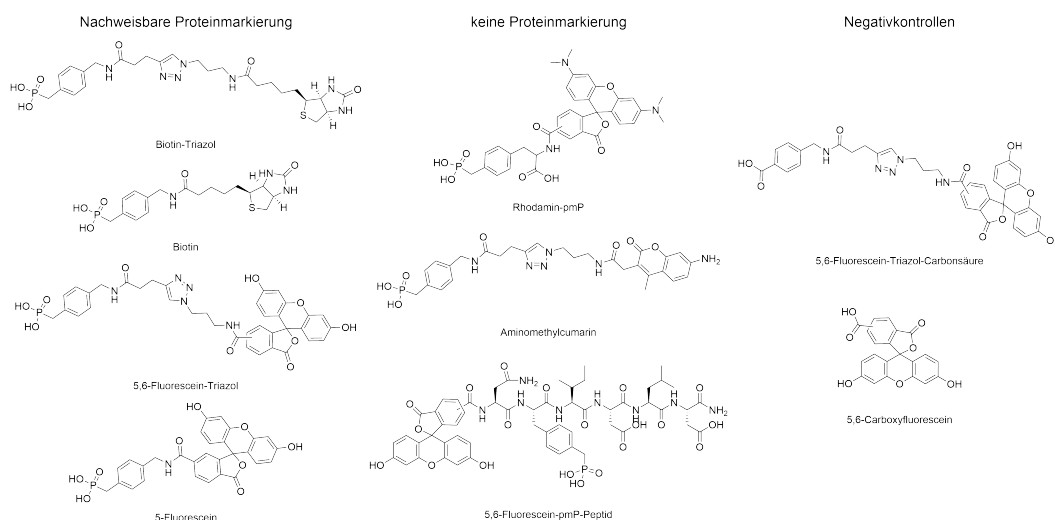


Abb. 4.97 Übersicht der Phosphonsäuren und ihre Reaktivität in einer Proteinmarkierungsreaktion mit PTP1B.

Um eine mögliche Reaktion über den Fluoresceinylrest ausschließen zu können, wurden eine Fluorescein-Triazol-Carbonsäure sowie 5,6-Carboxyfluorescein als Negativkontrollen verwendet. Diese zeigten auch in einer Konzentration von bis zu 2 mM keine Anzeichen einer Proteinmarkierung. Welche Umstände zu dem Ausbleiben der Vernetzung der pmP-Derivate und der AMC-haltigen Phosphonsäure mit der Phosphatase PTP1B führten, die Proteinmarkierung der Fluorescein- und Biotin-Phosphonsäuren hingegen reproduzierbar

war, konnte in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden.

Reaktivität gegenüber anderen Proteinen

Eine veränderte Reaktivität der Benzylphosphonsäuren konnte durch die Verwendung unterschiedlicher Puffer und Pufferkonzentrationen nicht beobachtet werden. Ferner zeigten verschiedene Phosphonsäurederivate eine unterschiedliche Reaktivität. Im Folgenden sollte eine Selektivität gegenüber anderen Proteinen untersucht werden.

Das globuläre Protein BSA wird innerhalb von biochemischen Arbeiten vielfältig verwendet. Als Bestandteil von Puffern soll es das adhäsive Verhalten anderer im System zu untersuchender Proteine verringern. Als Referenzprotein dient es ferner der Bestimmung von Proteinmengen in z.B. Zellysaten. Aufgrund seiner niedrigen biochemischen Reaktivität wird BSA als Negativwert bzw. als Kontrolle für unselektive Proteinvernetzungsreaktionen verwendet.^[126]

Folglich sollte die Reaktivität gegenüber BSA sowie weiteren Biopolymeren untersucht werden. Gewählt wurden dazu jene Proteine, die innerhalb des Arbeitskreises Rademann untersucht werden. Dazu zählen die humane Proteintyrosinphosphatase SHP2, der pTyr-bindende Transkriptionsfaktor STAT5B sowie die virale 3C Cysteinprotease des Coxsackie Virus B3 (COX)(Abb. 4.98).⁴¹

Bei dem Vergleich der Coomassiefärbung und der Fluoreszenzdokumentation zeigte sich, dass das Serumalbumin BSA während der Inkubation mit der Phosphonsäure **72** keiner Proteinmarkierung unterlag (Abb. 4.98; *links*, Pos. 1, 2). PTP1B hingegen wies selbst in Anwesenheit von BSA eine fluoreszente Proteinbande auf (Abb. 4.98; *links*, Pos. 3). Ferner konnte eine Markierung von STAT5-MBP beobachtet werden (Abb. 4.98; *links*, Pos. 4 bis 6).

Mit der Selektivität gegenüber PTP1B und STAT5B-MBP sollten weitere aktive Biopolymere untersucht werden. Dies folgte mit der Proteintyrosinphosphatase SHP2, welche naturgemäß eine Affinität gegenüber Phosphotyrosinmimetika besitzt und der Cysteinprotease COX, die keine bekannte Affinität gegenüber diesen aufweist. Experimentell erfolgte die Inkubation der einzelnen Proteine mit der fluoreszenten Phosphonsäure **72** sowie im

⁴¹Inkubationszeit (H₂O₂): 1 h, Inkubationszeit (Sonde **72**): 1.5 h; Die Konzentration der Sonde betrug 400 µM; Dichte der Polyacrylamidgele *links*: 12 %, *rechts*: 15 %.

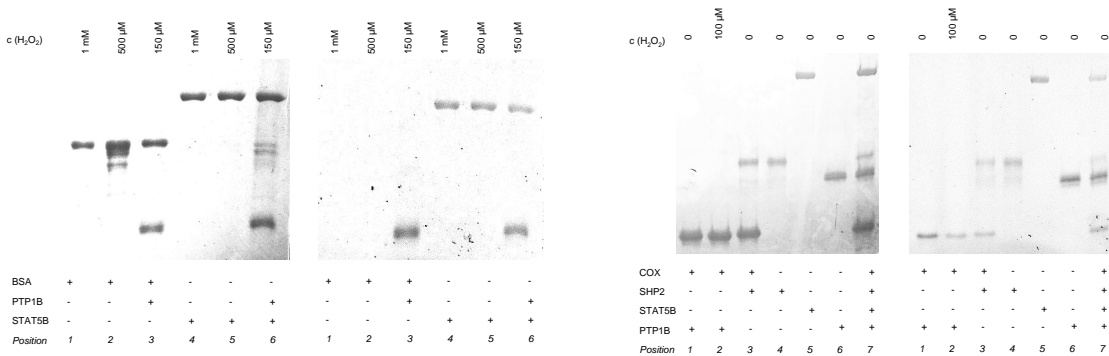


Abb. 4.98 *links, links*: Coomassiefärbung der Proteinbanden von BSA, PTP1B und STAT5B-MBP;
links, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert);
rechts, links: Coomassiefärbung der Proteinbanden von COX, SHP2, PTP1B und STAT5B-MBP;
rechts, rechts: Fluoreszenz bei 312 und 365 nm (invertiert).

Gemisch.⁴² Aufgrund der stark verschiedenen Molekulargewichte zw. 21 kDa (COX) und 111 kDa (STAT5B-MBP) wurde eine höhere Polymerdichte des Trenngels verwendet. Im Vergleich der Fluoreszenz mit der Proteinfärbung zeigte sich, dass alle verwendeten Proteine eine Reaktion mit der fluoreszenten Sonde **72** eingegangen sind (Abb. 4.98; *rechts*). Die Intensität der Markierung der COX Proben fiel im Gegensatz zu den anderen Proteinen deutlich schwächer aus, obwohl experimentell bedingt eine höhere Proteinmenge vorlag (Abb. 4.98; *rechts, links*, Pos. 1 bis 3). In einem Reaktionsansatz erfolgte der Zusatz von H_2O_2 , welcher keinen Einfluss auf den Grad der Proteinvernetzungsreaktion hatte (Abb. 4.98; *rechts*, Pos. 2). In Reaktionsansätzen, in denen ein Gemisch aus allen Proteinen vorlag, konnte die Markierung jeder Spezies beobachtet werden (Abb. 4.98; *rechts*, Pos. 7). Demnach erfolgte eine Reaktion mit den verwendeten Proteinen PTP1B, SHP2 und STAT5B-MBP, hingegen weniger mit der Protease COX und nicht mit BSA.⁴³

4.3.4 Diskussion möglicher Mechanismen der Markierungsreaktion

Die chemische Modifikation von Proteinen stellt einen bedeutenden und überaus vielfältigen Bereich in der Medizinischen Chemie dar. So kann eine Proteinmodifikation über eine Vielzahl reaktiver Strukturmerkmale an unterschiedlichen Zielstrukturen erfolgen.

⁴²Inkubationszeit (H_2O_2): 1 h, Inkubationszeit (Sonde **72**): 1.5 h; Die Konzentration von **72** betrug 500 μM .

⁴³Ferner erfolgte die Untersuchung der Proteinmarkierung innerhalb von BAF3-Zelllysaten, welche zu keinem Ergebnis führte.

Dabei werden in der Regel Seitenketten von Aminosäuren adressiert, die selbst über eine Reaktivität verfügen (Auszug in Tabelle 4.3).^[221]

Tabelle 4.3 Beispiele der Reaktivität von Aminosäureseitenketten

Seitenkettenrest (Aminosäure)	reaktive Substanz
Amin (Lys)	NHS-Ester Imido-Ester
Thiol (Cys)	Maleimide Haloacetylgruppen
Carbonsäure (Asp, Glu)	Carbodiimide
Hydroxy (Ser)	Isocyanate

Mit dem Vorliegen einer Phosphonsäure als mutmaßlich reaktives Strukturmerkmal konnte nicht auf bekannte Literatur zurückgegriffen werden, da eine solches Verhalten, nach unserer Kenntnis, nicht beschrieben ist. Anhand der Ergebnisse der vorangegangenen Experimente konnten folgende Zusammenhänge erhalten werden:

- Die dargestellten Phosphonsäuren zeigten während enzymkinetischer Untersuchungen gegenüber der Phosphatase PTP1B kein irreversibles Verhalten.
- Es konnte keine Proteinmarkierung beobachtet werden, wenn das Protein unter reduktiven Bedingungen (DTT und TCEP) vorlag.
- Eine Oxidation der Phosphatase durch H₂O₂ führte zu einer verstärkten Proteinmarkierung. Die Oxidation zu gemischten Disulfiden durch GSSG hatte keinen Effekt auf die Proteinmarkierung.
- Die Veränderung des Puffersystems durch die Verwendung verschiedener Puffer und höherer Pufferkonzentrationen hatte keinen Effekt auf die eintretende Markierung.
- Die Reaktivität der Phosphonsäuren war abhängig von der vorliegenden Struktur, sodass einige dargestellte Derivate keine Proteinvernetzungsreaktion, in Form einer fluoreszenten Proteinbande, mit PTP1B eingingen.
- α -Difluorierte Phosphonsäuren wurden ebenfalls auf eine Proteinreaktion hin untersucht. Diese zeigten eine Reaktivität in der Markierung von PTP1B, die jedoch im

Vergleich zu den Benzylphosphonsäuren schwächer ausfiel. Substanzen deren Reaktivität nachweisbar war (α , α -Difluor- und Benzylphosphonsäuren), zeigten nach der Überführung in ihre Natriumsalzform eine stark verringerte bis ausbleibende Reaktivität (*nicht dargestellt*).⁴⁴

- Es konnten fluoreszente Proteinbanden bei der Verwendung anderer Biopolymere beobachtet werden. So zeigten die Phosphatase SHP2 sowie der Transkriptionsfaktor STAT5B-MBP eine deutliche Proteinmarkierung. Die Cysteinprotease COX wies eine verringerte Reaktivität auf, während keine Reaktion mit BSA beobachtet werden konnte.

Im Folgenden sollen mögliche Reaktionsmechanismen vorgestellt und diskutiert werden.

Benzylphosphonsäuren als Redoxsonden

Die Proteinmarkierung durch Phosphonsäuren wurde unter oxidativen Bedingungen verstärkt.

Die Untersuchung von oxidierten Proteinen sowie deren Regulation stellt in den vergangenen Jahren einen etablierten Forschungsbereich dar.^[222] Der Einfluss sog. ROS (*reactive oxygen species*) auf zelluläre Prozesse ist hinlänglich bekannt und wird mit Vorgängen wie Signaltransduktion, Zellwachstum, -differenzierung, -alterungsprozessen, bis hin zum geplanten Zelltod in Verbindung gebracht.^[223–225] Ein Haupttarget der ROS ist die oxidationsempfindliche Seitenkette der Aminosäure Cystein, dessen Schwefelatom in Oxidationsstufen von -II bis +IV vorliegen kann. Dies schließt neben der irreversiblen Oxidation zu Sulfin- und Sulfonsäuren (Cys-SO₂H und Cys-SO₃H) die reversible Oxidation zur Sulfensäure (Cys-SOH) ein, welche aufgrund ihrer biologischen Relevanz der Schwerpunkt vieler Veröffentlichungen ist.^[226,227]

Allison beschrieb die Reaktion der Cys149-Sulfensäure der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GAPDH mit Dimedon (5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion).^[228] Eine zunächst nicht vorhandene Affinität und eingeschränkte Detektionsmöglichkeit wurde durch die Einführung affiner Grundgerüste und entsprechender Markierungen wie Fluorophore und Biotin umgangen, sodass potente selektive Redox-Sonden erhalten werden konnten (Abb. 4.99).^[45,227,229]

⁴⁴Durch die Verwendung eines Puffers mit ausreichender Kapazität, sollten identische Protonierungszustände vorliegen. Dennoch war die verringerte Reaktivität reproduzierbar.

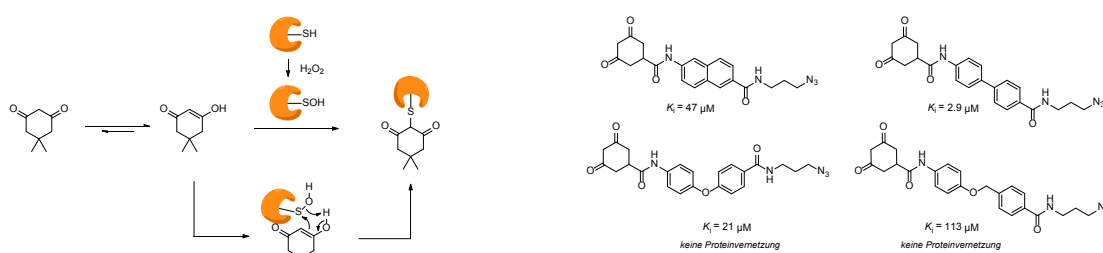


Abb. 4.99 links: Mechanismus der Reaktion einer Cysteinsulfensäure mit Dimedon
 aus Gupta et al.;
rechts: Auswahl von Sonden mit ihrer Inhibitionskonstante gegenüber Yersinia
 Proteintyrosinphosphatase (YopH)
 aus Leonard et al.

Dargestellt ist zum einem der postulierte Mechanismus der Reaktion von Dimedon mit einer Sulfensäure (Abb. 4.99; links). Obgleich der Reaktionsmechanismus nicht als bewiesen angesehen werden kann, hat sich die Annahme einer als Elektrophil reagierenden Sulfensäure durchgesetzt. Die Reaktivität der Sulfensäuren ist sowohl von der chemischen Umgebung als auch von den Reaktionsbedingungen abhängig, sodass Sulfensäuren als Elektrophil oder Nukleophil reagieren können.^[222,227] Da sich die p*K*_S-Wert-Bestimmung von Sulfensäuren aufgrund ihrer Reaktivität als schwierig erweist, sind nur für wenige stabile Sulfensäuren p*K*_S-Werte bekannt. Diese sind zwei- bis dreifachen Größenordnungen höher, als die p*K*_S-Werte der korrespondierenden Thiole.^[230,231]

Der Darstellung lässt sich ferner eine Auswahl von μM-bindenden Dimedonderivaten entnehmen, die zunächst auf ihre Affinität gegenüber der reduzierten Form der Yersinia Phosphatase (YopH) untersucht wurden und als reversible Inhibitoren agieren (Abb. 4.99; rechts).^[45] Die Verbindungen wurden mit der oxidierten Phosphatase inkubiert⁴⁵ und anschließend einer Staudinger Reaktion mit einem Phosphin-Biotin unterzogen. Der darauffolgenden Analyse mittels Anti-Biotin-Western Blot konnte bei verschiedenen Derivaten eine erfolgte Proteinmarkierung über die Reaktion mit dem Dimedonrest entnommen werden. Neben den erfolgreich eingesetzten Verbindungen konnte beobachtet werden, dass einige Derivate, trotz einer Bindungskonstante im μM-Bereich, keine Reaktion mit der Phosphatase eingegangen sind (Abb. 4.99; rechts, unten). Das Ausbleiben einer Reaktion wurde mit der Bildung von promiskuen Aggregaten begründet. Eine vollständige

⁴⁵Die Konzentration der Sonden betrug 500 μM.

Unterdrückung der Proteinvernetzungsreaktion konnte bei Vorinkubation der Phosphatase mit 0.9 mM TCEP beobachtet werden. Ferner konnte das oxidierte Protein nach erfolgter Inkubation mit Dimedon durch darauffolgende Zugabe von DTT nicht reaktiviert werden. Die beschriebenen Ergebnisse einer validierten Reaktion der Dimedonderivate, mit der zur Sulfensäure oxidierten Phosphatase YopH, konnten auch in Anwendung auf die Proteintyrosinphosphatase PTP1B reproduziert werden.

Neben den zur Sulfensäure oxidierten Cysteinresten der Phosphatasen PTP1B, YopH und der Oxidoreduktase GAPDH sind eine Vielzahl weiterer Proteine beschrieben, die eine solche Cysteinoxidation aufweisen können. Innerhalb dieser finden sich Peroxidasen, Kinasen, Transkriptionsfaktoren, Cysteinproteasen sowie andere biologisch relevante Proteine.^[99,232]

Die beschriebene Reaktivität gegenüber Dimedon unter oxidativen Bedingungen sowie die Unterdrückung der Vernetzungsreaktion durch Reduktionsmittel deckt sich mit den erhaltenen Ergebnissen der Untersuchung der Phosphonsäuren. Ferner ist die Reaktivität gegenüber anderen Proteinen beschrieben, wie sie auch bei den hier vorgestellten Selektivitätsuntersuchungen der Proteinmarkierung von SHP2, STAT5B-MBP und der Cysteinprotease COX beobachtet werden konnte. Aus diesem Zusammenhang ergab sich die Hypothese einer Reaktion der Phosphonsäuren mit einer Sulfensäure (Abb. 4.100).

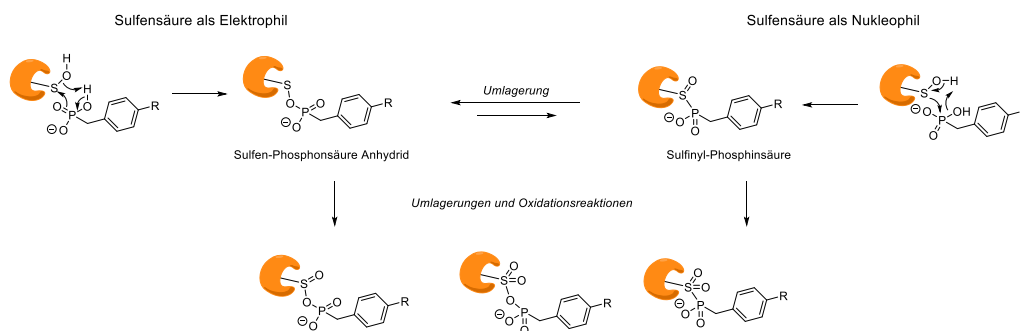


Abb. 4.100 Mögliche Mechanismen der Reaktion von Phosphonsäuren mit einer Cysteinsulfensäure und mögliche Produkte nach Folgereaktionen.

Dargestellt sind zwei Reaktionswege, in denen die Sulfensäure entweder als Elektrophil oder als Nukleophil reagiert. Obleich die Reaktivität der Sulfensäuren eher der eines Elektrophils entspricht, sind beide Reaktionswege literaturbekannt. In beiden Fällen er-

folgt die Reaktion über die Eliminierung von H₂O. Dies deckt sich mit der beobachteten Modifikation von PTP1B im Zuge der MALDI-TOF-MS Untersuchungen, in denen eine Erhöhung des Molekulargewichts detektiert werden konnte, die im Weitesten der Masse der verwendeten Sonde entsprach.⁴⁶ Im Falle einer Reaktion der Sulfensäure als Elektrophil würde, entsprechend des postulierten Reaktionsmechanismus, ein gemischtes Anhydrid gebildet werden, welches unter physiologischen Bedingungen nicht als hydrolysestabil angesehen werden kann. Es ist keine Verbindung in der Literatur beschrieben, die der Reaktion einer Phosphonsäure mit einer Sulfensäure zu einem gemischten Anhydrid folgt. Jedoch beschreiben wenige Veröffentlichungen Reaktionen zu bzw. über vergleichbare Phosphorschwefelverbindungen (Abb. 4.101).^[233–235]

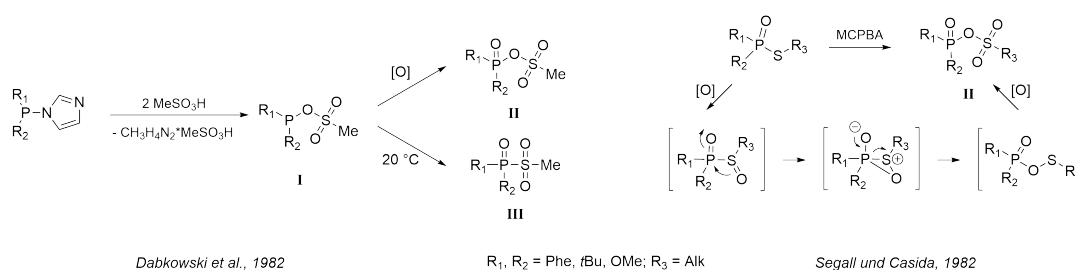


Abb. 4.101 Beschriebene Reaktionen zu vergleichbaren Phosphorschwefelverbindungen.

Charakterisierbar sind Anhydride des Types **I**, Sulfonate des Types **II** sowie Sulfinat des Types **III**. Alle Verbindungen besitzen jedoch lt. Veröffentlichungen keine Stabilität gegenüber Folgereaktionen wie Hydrolyse, Methanolyse und Reaktionen gegenüber anderen Nucleophilen. Sulfonate werden hingegen auch als stabile Endstufe beschrieben.^[236]

Der Reaktionsweg über den Charakter als Nucleophil würde zu der Bildung einer Sulfinyl-Phosphinsäure führen, die nicht isolierbar ist. Laut Segall und Casida folgen diese Verbindungen einer -P(O)S(O)R → -P(O)OSR Umlagerung und unterliegen bei oxidativen Bedingungen der Umsetzung zu höher oxidierten Derivaten (Abb. 4.101; *rechts*).

Weitere Oxidationen und Umlagerungen könnten im Falle der hypothetischen Sulfinyl-Phosphonsäurereaktion zu stabileren Verbindungen führen, sodass der Vernetzungsnachweis nach SDS-PAGE und in MALDI-MS Messungen erfolgte. Der Umstand, dass die Proteinmodifikation in der milden Ionisierung der MALDI-MS, jedoch nicht in ESI-MS Messungen beobachtet wurde, spricht hingegen für ein labiles Proteinaddukt.

⁴⁶MS-Spektren von Cys-SOH-Proteinen können nicht erhalten werden.

Die beobachtete Markierung anderer verwendeter Proteine könnte über eine Reaktion mit einer oder mehrerer vorliegender Sulfensäuren erfolgen. Die Proteintyrosinphosphatase SHP2 besitzt in ihrer PTP-Domäne eine Sequenzübereinstimmung von 37 % gegenüber PTP1B^[31,80] und konnte in verschiedenen Experimenten reproduzierbar als fluoreszenzmarkierte Proteinbande erhalten werden. Bekannt ist eine hohe Sensitivität gegenüber den oxidativen Bedingungen von H₂O₂ sowie ein alternativer Inaktivierungsmechanismus von SHP2, der über die Bildung einer Sulfensäure erfolgen soll.^[237] Die virale Protease COX besitzt mit einem katalytisch aktiven Cystein ein oxidationsempfindliches Zentrum, wobei das Vorliegen der Oxidation zu einer Sulfensäure nicht beschrieben ist.

Nicht vollständig vereinbar mit der aufgestellten Hypothese ist die Modifikation von STAT5B-MBP sowie die nicht eingetretene Reaktion gegenüber dem Serumalbumin BSA. Obgleich BSA für seinen hohen Gehalt der Aminosäure Cystein von ~ 6 % der Gesamtsequenz bekannt ist, besitzt das Protein nur eine freie SH-Gruppe in der Position Cys34.^[238] Das Vorliegen einer Sulfensäure wurde zwar postuliert, aber im Gegensatz zu dem humanen Serumalbumin (HSA) nicht nachgewiesen.^[239,240] Von STAT5B⁴⁷ hingegen sind keine Daten bekannt, die im Zusammenhang mit dem Vorliegen eines oxidierten Cysteins stehen. Gleichwohl konnten Sulfensäuren in Proteinen nachgewiesen werden, von denen keine Eigenschaften dahingehend bekannt waren.^[99,232]

Neben den vorliegenden Phosphonsäuren, die eine nachweisbare Reaktivität in einer Proteinvernetzungsreaktion zeigten, wurden Verbindungen dargestellt, die keine Proteinmarkierung zeigten. Obgleich sich die vorliegenden Verbindungen in ihren strukturellen Eigenschaften wenig unterscheiden, ist bekannt, dass individuelle Unterschiede zu einem alternativen Bindungsmodus bzw. einer veränderten Reaktivität führen können.^[45,181]

Andere Mechanismen

Neben einer möglichen Reaktivität gegenüber eines zur Sulfensäure oxidierten Cysteins sind weitere Mechanismen denkbar, die zu einer kovalenten Bindung zwischen Protein und Sonde führen könnten.

Eine Option stellt die Reaktion mit dem Sulfenamid dar, welches im Gleichgewicht mit der Sulfensäure steht. Sulfenamide besitzen eine vielfältige Reaktivität, werden jedoch bevorzugt von Nukleophilen angegriffen (Abb. 4.102).^[241]

⁴⁷Das verwendete STAT5B-MBP enthält in seiner Aminosäuresequenz 7 Cysteine.

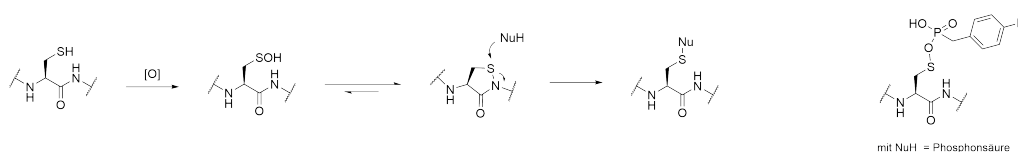


Abb. 4.102 Reaktion eines cyclischen Sulfenamids mit einem Nukleophil sowie das mögliche Produkt nach der Reaktion mit einer Phosphonsäure.

Beschrieben sind Reaktionen mit Thiolen, unter der Bildung von Disulfiden, sowie mit Aminen im Zuge einer Transamidierung. Die Reaktion mit einer Phosphonsäure würde, entsprechend der postulierten Umsetzung mit einer elektrophilen Sulfensäure, zu einem Sulfen-Phosphonsäure-Anhydrid führen.

Das Vorliegen eines Sulfenamids ist im Falle der Phosphatase PTP1B kristallographisch nachweisbar. Im Gegensatz dazu steht die beobachtete Reaktivität der Phosphonsäuren mit den Proteinen SHP2, STAT5B-MBP und COX, welche nicht im Zusammenhang mit diesem Strukturmerkmal in der Literatur beschrieben sind.

Neben der Säuregruppe als mutmaßlich reaktives Element, besitzen alle verwendeten Verbindungen eine α -CH₂-Gruppe deren Reaktivität literaturbekannt ist.^[154,155,242] Die beschriebene Reaktivität basiert dabei auf der Bildung einer Radikalspezies und bedarf, je nach Veröffentlichung, Reaktionsbedingungen wie Bestrahlung und / oder der Anwesenheit bestimmter Additive wie z.B. TiO₂. Eine Reaktion über die Bildung eines α -Phosphonsäureradikals kann unter den gegebenen Umständen nicht als wahrscheinlich angesehen werden.

Weitere Reaktionswege könnten an dieser Stelle zwar in Betracht gezogen werden, jedoch lassen sich diese mit den vorliegenden Ergebnissen nicht vereinbaren, sodass von einer weiteren Diskussion Abstand genommen wird.

4.3.5 Zusammenfassung der Phosphonsäuren als kovalent bindende Phosphotyrosinmimetika

Mit den Phosphonsäuren liegt eine Substanzklasse vor, die unter bestimmten Bedingungen eine kovalente Proteinmarkierung bewirkte. Im Zuge der Untersuchung dieser Proteinvernetzungsreaktion konnte beobachtet werden, dass verschiedene dargestellte Verbindungen einen positiven Nachweis in einer Markierung der Phosphatase PTP1B zeigten. Es konnten eine Proteinbiotinylierung nach Inkubation mit Biotin-haltigen Phosphonsäuren über einen Anti-Biotin-Westernblot und Fluorescein-haltige Derivate über eine Fluoreszenz der Proteinbande nachgewiesen werden. Mit der Oxidation der Phosphatase PTP1B mittels H_2O_2 konnte eine Verstärkung der Proteinmarkierung erreicht werden, sodass die Reaktion mit einer oxidativ inaktivierten Spezies nahe liegt. Unter reduktiven Bedingungen konnte die Proteinvernetzung vollständig unterdrückt werden. Die kovalente Modifikation konnte mittels MALDI-TOF-MS verifiziert werden, jedoch nicht über die Aufnahme von ESI-MS Spektren. Im Zuge einer Untersuchung der Selektivität konnten verschiedene Zusammenhänge erhalten werden. So besitzt das verwendete Puffersystem keinen Einfluss auf die Reaktion der Phosphonsäuren mit PTP1B. Es wurden weitere benzylsubstituierte Phosphonsäuren dargestellt und auf ihre Reaktivität hin untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass einige Substanzen keine Proteinreaktion eingingen. Ferner konnte eine Markierung weiterer Proteine nachgewiesen werden. So zeigten nach Gelelektrophorese die Proteintyrosinphosphatase SHP2 sowie der Transkriptionsfaktor STAT5B-MBP eine Proteinmodifikation in dem Vorliegen einer fluoreszenten Proteinbande. Eine verringerte Reaktivität konnte gegenüber der viralen Cysteinprotease COX, sowie keine gegenüber dem Serumalbumin BSA, beobachtet werden. Literaturbekannt sind Systeme, die in ihrem Verhalten Gemeinsamkeiten mit der untersuchten Proteinmarkierungsreaktion aufweisen und selektiv mit einem zur Sulfensäure oxidierten Cystein reagieren. Im Zuge dessen wurde die Hypothese der Reaktion von Phosphonsäuren mit der oxidierten Aminosäure Cystein-SOH aufgestellt. Im Falle einer Validierung dieser würden Phosphonsäurederivate ein neues Redoxsondensystem darstellen, welches innerhalb der Medizinischen Chemie zu neuen Erkenntnissen der Redox-Regulation von Proteinfunktionen führen könnte.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Methoden

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von üblichen Lieferanten wie ABCR, Carl Roth, Fisher Scientific, Fluka, Merck, Novabiochem, Sigma-Aldrich und VWR bezogen und wurden, falls nicht anders beschrieben, ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Alle Reaktionen, die unter trockenen Bedingungen beschrieben und durchgeführt wurden, folgten den üblichen Bedingungen der Schlenk-Technologie. Die verwendeten Lösungsmittel wurden aus einer Lösungsmitteltrocknungsanlage der Fa. MBraun Modell MB-SPS-800 bezogen oder über geeigneten Trocknungsmitteln getrocknet, destilliert und über Molekularsieb gelagert. Als Inertgasatmosphäre diente, falls nicht anders beschrieben, Stickstoff, welcher über eine CaSO₄-Kartusche (DrieriteTM) vorgetrocknet wurde. Das Entfernen von Lösungsmitteln unter vermindertem Druck erfolgte entweder unter der Verwendung handelsüblicher Rotationsverdampfer oder durch das Anlegen von Hochvakuum und der Verwendung einer zusätzlichen Kühlfalle. Die Lyophilisation von Substanzen erfolgte durch das Einfrieren in einem geeigneten Lösungsmittel (Dioxan, *tert*-Butanol, Acetonitril / Wasser -Gemische) und der Verwendung einer Gefriertrocknungsanlage der Fa. Christ.

5.2 Verwendete Geräte und Methoden

Dünnschichtchromatographie

Für die Durchführung von Dünnschichtchromatographien wurden mit Silikagel 60 F₂₅₄-beschichtete Aluminiumplatten der Fa. Merck verwendet. Visualisierung erfolgte mittels UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm.

Kernspinresonanzspektroskopie NMR

Die Aufnahme von Kernspinresonanzspektren erfolgte an folgenden Geräten:

- Bruker AV 300
- Varian *Mercury* 300 MHz
- Varian *Mercury* 400 MHz
- JEOL ECX 400
- JEOL ECP 500

Die aufgenommenen Spektren wurden auf das Signal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels referenziert. Die Aufnahme von ^{13}C -Spektren wurde standardmäßig unter der Verwendung von Breitband ^1H -Entkopplung durchgeführt. Die Aufnahme von ^{31}P -Spektren erfolgte, falls nicht anders gekennzeichnet, ^1H -gekoppelt und wurde extern auf das Signal von Phosphorsäure referenziert (δ ; ppm = 0). Spektren der Resonanz von ^{19}F -Kernen wurden extern auf das Signal von Trifluoressigsäure referenziert (δ ; ppm = - 77.5). Die Multiplizität der Signale wurde wie folgt gekennzeichnet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, p = Pentett, h = Heptett, m = Multiplett.

Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte durch die Software *MestReNova 7* der Fa. Mestrelab Research.

Geldokumentationssysteme

Die Dokumentation von fluoreszenten Polyacrylamidgelen erfolgte entweder durch eine Anlage der Fa. Biostep Modell *Felix*, welches mit einer Digitalkamera und Zweiwellenlängentransilluminator (365 nm und 312 nm) ausgestattet war, oder durch ein Gerät der Fa. Syngene Modell *PXi 4*, welches mit Digitalkamera und Epi UV LEDs ausgestattet war.

Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Die Aufnahme von hochaufgelösten Massenspektren erfolgte entweder an einem 6210 ESI-TOF Spektrometer der Fa. Agilent Technologies, gekoppelt mit einer HPLC-Anlage der Serie 1100, oder einem ESI-Q-TOF *iFunnel* Spektrometer des Modells 6550, gekoppelt mit einer HPLC-Anlage der Serie *Infinity II* 1290. Die Aufnahme von Proteinmassenspektren

erfolgte mit einem MALDI-TOF/TOF-Spektrometer der Fa. Bruker Modell *Ultraflex III*, der Arbeitsgruppe Prof. Anette Beck-Sickinger (Universität Leipzig).

Mikrowellen-unterstützte Synthesen

Synthesen, die unter der Verwendung eines Mikrowellenreaktors erfolgten, wurden entweder mit einem Gerät der Fa. Biotage Modell *SmithSynthesizer* oder *Initiator+* durchgeführt. Verwendet wurden dabei druckstabile Reaktionsgefäße mit verschiedenen Volumina zwischen 0.2 und 5 mL.

Photoreaktionen

Synthesen, die unter der Verwendung von ultraviolettem Licht erfolgten, wurden durch Bestrahlung mittels eines Transilluminators der Fa. UVP (4 x 25 W) oder der Fa. Biostep UXDT-20ML-15 K bei einer Wellenlänge von 365 nm durchgeführt.

Festphasenpeptidsynthese SPPS

Die Harz-gebundene Synthese von Peptiden erfolgte in Polypropylenspritzen, die mit einer Polyethylenfritte ausgestattet wurden. Verwendet wurde ein Polystyrolharz mit Rink-Amid-Linker (100 - 200 *mesh*) und einer Beladung von 0.74 mmol / g. Die verwendeten Fmoc-Aminosäuren wurden von der Fa. GLS bezogen.

Kaisertest

Zur Bestimmung des Reaktionsverlaufs von Kupplungsreaktionen wurde eine geringe Menge an Harz (» 1 mg) mit einem gleichen Volumen einer ethanolschen Ninhydrinlösung (500 mg in 10 ml Ethanol) und einer basischen KCN-Lösung (1 mM KCN in 20 ml Pyridin) versetzt. Das Gemisch wurde kurzzeitig auf > 100 °C erhitzt, wobei ein unvollständiger Reaktionsverlauf eine blau-violette Färbung des Harzes zeigte.

UV-photometrische Bestimmung der Harzbeladung

Eine getrocknete Harzmenge bekannter Masse wurde mit einer Piperidin / DMF Lösung (10 mL, 1 : 4) versetzt, mit der Abspaltungslösung verdünnt (1 : 10) und anschließend die

Absorption bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt. Die Bestimmung der Harzbeladung erfolgte anhand folgender zugrunde liegenden Reaktion (Abb. 5.1).

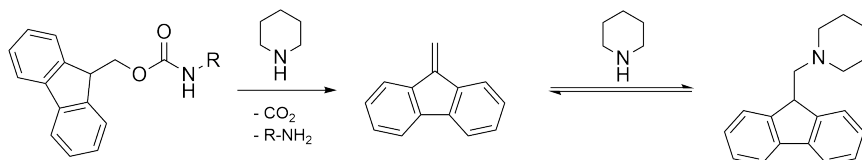


Abb. 5.1 Fmoc-Abspaltung unter der Bildung von Dibenzofulven.

Das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt wurde anhand seiner Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{267} = 17500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{289} = 5800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{301} = 7800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes quantifiziert. Zum direkten Erhalt der Harzbeladung wurde folgende Gleichung verwendet:

$$x = \frac{10^5 \cdot E_\lambda}{\epsilon_\lambda \cdot m_{\text{Harz}}} \quad (5.1)$$

x = Harzbeladung [mmol / g]

E_λ = Extinktion

ϵ_λ = molarer Extinktionskoeffizient

m_{Harz} = Masse Harz [mg]

Schmelzpunktbestimmung

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden mit einem Gerät der Fa. Büchi Modell B-545 bestimmt.

Säulenchromatographische Normalphasentrennung

Säulenchromatographische Trennungen wurden entweder über mit Kieselgel-gepackten Glassäulen oder unter der Verwendung von MPLC-Anlagen mit automatisierten Fraktionssammlern durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen der individuellen Absorptionsmaxima. Verwendet wurden Anlagen der Fa. Agilent Technologies Modell 971-FP *Flash Purification System* oder der Fa. Biotage Modell *IsoleraTM Spektra*.

Säulenchromatographische Umkehrphasentrennung

Analytische HPLC/MS

HPLC-basierte Quantifizierungsexperimente wurden an einer Anlage der Fa. Dionex Modell P680, ausgestattet mit einem *Diode Array Detector* (DAD), durchgeführt.

Die Kontrolle von Reaktionsverläufen wurde an einer analytischen HPLC-Anlage der Fa. Agilent Technologies Modell 1100 durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch einen *Diode Array Detector* (DAD) bei verschiedenen Wellenlängen und die Kopplung mit einem Elektrospray (ESI) Single Quadrupole Mass Spektrometer. Verwendet wurden folgende analytische Trennsäulen:

- Phenomenex, *Luna* 3 μm C18(2) 100 Å, 100 x 4.6 mm
- Agilent Technologies, *Zorbax* 3.5 μm 300SB-C8 300 Å, 50 x 4.6 mm
- Phenomenex, *Kromasil* 3.5 μm C18 100 Å, 50 x 4.6 mm
- Macherey-Nagel, *Nucleodur* 5 μm 100-5 C18ec 100 Å, 100 x 4.6 mm
- Phenomenex *Jupiter* 5 μm C18 300 Å, 250 x 4.6 mm

Als Eluenten dienten Gemische von Acetonitril (*LC/MS grade*) und Wasser (*Millipore-Reinstwasser*) mit 0.1 % Ameisensäure als Zusatz. Als übliche Gradienten wurden 5 - 50 % und 5 - 99 % Acetonitril verwendet. Die Flussrate betrug 1 mL / min, mit Ausnahme der Proteintrennsäule Jupiter mit 0.5 mL / min.

Präparative HPLC

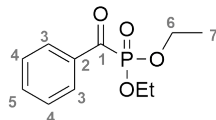
Die Trennung von Substanzgemischen im präparativen Maßstab erfolgte an Anlagen der Fa. Varian Pumpenmodell *ProStar* oder Fa. Agilent Technologies Modell 1260 *Infinity*. Verwendet wurden folgende Trennsäulen:

- Macherey-Nagel, *Nucleodur* 5 μm C18 100 Å, 150 x 32 mm
- Agilent, *Zorbax ODS* 5 μm C18 70 Å, 250 x 9.8 mm

Als Eluenten dienten Gemische von Acetonitril (*HPLC grade*) und Wasser (*Millipore-Reinstwasser*) mit einem Zusatz von 0.1 % Trifluoressigsäure. Als Gradienten wurden 5 - 70 % und 5 - 99 % Acetonitril über einem Zeitraum von 20 bis 25 min bei einer Flussrate von 40 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ verwendet.

5.3 Synthesevorschriften

Synthese von Diethylbenzoylphosphonat^[243]



Benzoylchlorid (1.64 mL, 14.3 mmol, 1.0 Äq.) und Triethylphosphit (2.68 mL, 15.7 mmol, 1.1 Äq.) wurden gemischt und die Reaktionslösung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂, Hexane / Ethylacetat, 10-50 % Ethylacetat) wurde Diethylbenzoylphosphonat als leicht gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 2.21 g, 64 %

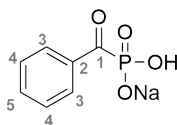
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 8.17 (m, 2H, H-3), 7.77 (m, 1H, H-5), 7.63 (m, 2H, H-4), 4.20 (m, 4H, H-6), 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, H-7)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 199.2 (d, *J* = 174 Hz, C-1), 135.2 (C-5), 129.3 (d, *J* = 1.6 Hz, C-2), 129.2 (d, *J* = 0.8 Hz, C-3), 128.6 (C-4), 63.7 (d, *J* = 7.1 Hz, C-6), 16.2 (d, *J* = 5.5 Hz, C-7)

³¹P-NMR (122 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = - 0.3 (p, *J* = 8.0 Hz)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₆H₁₆O₄P⁺: 243.08 Da; gefunden: 243.0 Da

Synthese von Natrium-Benzoylphosphonsäure 1¹



Diethylbenzoylphosphonat (0.43 mL, 2.06 mmol) wurde in ACN (2 mL) gelöst und langsam Trimethylsilylbromid (0.68 mL, 5.16 mmol, 2.5 Äq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 2 h im Mikrowellenreaktor bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurde der

¹Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt.

gebildete Silylester mit einem Gemisch aus MeOH und Wasser (9 : 1, 10 mL) hydrolysiert. Die Lösung wurde 1 h über Amberlite® Ionentauscherharz (IR120 Natriumform) gerührt, filtriert und lyophilisiert, wobei Natrium-Benzoylphosphonsäure **1** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 380 mg, 76 %

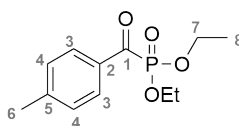
¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ; ppm = 8.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-3), 7.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-5), 7.56 (dd, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-4)

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ; ppm = 208.4 (d, *J* = 169.4 Hz, C-1), 135.5 (d, *J* = 52.8 Hz, C-2), 134.5 (C-5), 129.2 (d, *J* = 1.6 Hz, C-3), 128.7 (d, *J* ≈ 1 Hz, C-4)

³¹P{¹H}-NMR (122 MHz, D₂O): δ; ppm = - 0.5

ESI-MS (*m/z*): [M-H]⁻ berechnet für C₇H₆O₄P⁻: 185.0 Da; gefunden: 184.9 Da

Synthese von Diethyl-(4-methyl-benzoyl)phosphonat **7**



4-Methylbenzoesäure (3.0 g, 22 mmol) wurde in trockenem DCM (30 mL) suspendiert und mit einer katalytischen Menge DMF (≈ 2 Mol-%) versetzt. Es wurde Oxalylchlorid (3.78 mL, 44 mmol, 2 Äq.) bei einer Temperatur von 0 °C zugetropft. Die Lösung wurde 30 min bei 0 °C gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 1.5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die klare gelbe Lösung im Stickstoffstrom eingeeengt und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Der ölige Rückstand wurde in trockenem Toluol (10 mL) gelöst und Triethylphosphit (4.54 mL, 26.4 mmol, 1.2 Äq.) zugetropft, während die Lösung auf 70 °C erwärmt wurde. Die Lösung wurde 3 h bei 70 °C gerührt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum destilliert. Nach Destillation (bp. 125 °C / < 1.0 x 10⁻³ mbar) wurde Diethyl-(4-methyl-benzoyl)phosphonat **7** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 4.82 g, 86 %

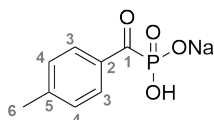
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 8.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3), 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H 4, zusammen mit Solventsignal), 4.21 (p, *J* = 7.3 Hz, 4H, H-7), 2.38 (s, 3H, H-6) 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H-8)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 198.30 (d, *J* = 173.9 Hz, C-1), 146.1 (C-5), 133.3 (d, *J* = 64.0 Hz, C-2), 130.0 (d, *J* = 1.7 Hz, C-3), 129.6 (d, *J* = 1.0 Hz, C-4), 63.9 (d, *J* = 7.3 Hz, C-7), 21.9 (C-6), 16.4 (d, *J* = 5.8 Hz, C-8)

³¹P{¹H}-NMR (122 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 0.06

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₂H₁₈O₄P⁺: 257.09 Da; gefunden: 257.0 Da

Synthese von Natrium-(4-methyl-benzoyl)phosphonsäure **8**



Einer Lösung von Diethyl-(4-methyl-benzoyl)phosphonat **7** (200 mg, 0.78 mmol) in 1.5 mL trockenem ACN wurde unter Stickstoffatmosphäre TMSBr (227 µL, 1.72 mmol, 2.2 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h im Mikrowellenreaktor auf 70 °C erhitzt. Der gebildete Silylester wurde mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser (95 : 5) hydrolysiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und dem öligem Rückstand Wasser (8 mL) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1 h über Amberlite® Ionentauscherharz (IR120 Natriumform) gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert, wobei Natrium-(4-methyl-benzoyl)phosphonsäure **8** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 166 mg, 96 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 8.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3), 7.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-4), 2.38 (s, 3H, H-6)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 204.0 (d, *J* = 175.3 Hz, C-1), 144.4 (C-5),

134.1 (d, $J = 57.9$ Hz, C-2), 129.4 (br d, C-3), 129.2 (C-4), 21.3 (C-6)

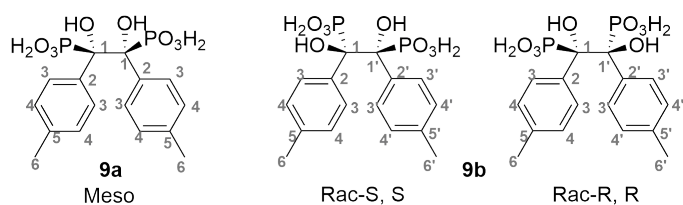
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (122 MHz, DMSO- d_6): δ ; ppm = - 1.8

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4\text{P}^-$: 199.0166 Da;

gefunden: 199.0162 Da

Zersetzungspunkt: ≥ 355 °C

Photodimerisierung von Natrium-(4-methyl-benzoyl)phosphonsäure zu **9a** und **9b**



Natrium-(4-methyl-benzoyl)phosphonsäure (88 mg, 0.36 mmol) wurde in einem Gemisch aus Isopropanol und Wasser (7 : 3, 1.8 mL) gelöst und in einer UV-Küvette bei einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt. Die Küvetten wurden verschlossen auf einem Transilluminator platziert, wobei nach bestimmten Zeiten Aliquots entnommen und mittels HPLC analysiert wurden. Nach 165 min wurde das Produktgemisch mittels präparativer HPLC aufgereinigt ($\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA / ACN + 0.1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 0.1 % TFA). Lyophilisation der Produktfraktionen ergab die getrennten Dimere als eine weiße Feststoffe.

Ausbeute Meso **9a**: 6 mg, 8 %

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ; ppm = 7.16 (br d, $J = 7.8$ Hz, 4H, H-3), 6.87 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, H-4), 2.24 (s, 6H, H-6)

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ ; ppm = 135.0 (d, $J = 1.7$ Hz), 134.5 (d, $J = 5.0$ Hz.), 128.6 (d, $J = 3.9$ Hz), 126.4, 80.0 (dd, $J = 147.4$, $J = 12.8$ Hz, C-1), 20.6 (C-6)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ ; ppm = 22.0 (s)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_8\text{P}_2^+$: 403.0706 Da;

gefunden: 403.0711 Da

Ausbeute Rac **9b**: 2 mg, 3 %

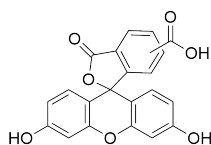
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 7.25 (vbr d, 4H, H-3), 6.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, H-4), 2.09 (s, 6H, H-6)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 136.8 (br d), 136.7 (br d), 134.2 (vbr d), 126.8 (m), 79.17 (dd, *J* = 146.3, *J* = 6.1 Hz, C-1), 20.6 (C-6)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 24.6 (s)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₆H₂₁O₈P₂⁺: 403.0706 Da;
gefunden: 402.0707 Da

Synthese von 5,6-Carboxyfluorescein **14**^[244]



Trimellitsäureanhydrid (2 g, 10.4 mmol) und Resorcin (2.46 g, 22.4 mmol, 2.2 Äq) wurden mit Toluol (3 mL) in einem Mikrowellengefäß suspendiert. Nach der Zugabe einer katalytischen Menge konzentrierter Schwefelsäure wurde das Gemisch für 2 h bei 180 °C im Mikrowellenreaktor erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und der rote Feststoff in Methanol unter Verwendung von Ultraschall gelöst. Die tiefbraune Lösung wurde über Celite filtriert und langsam unter vermindertem Druck eingeeengt. Die Filtration des sich gebildeten Niederschlags lieferte 1.58 g 5,6-Carboxyfluorescein. Das Filtrat wurde weiter eingeeengt und der Rückstand in 10 %igem Ammoniak gelöst. Die grüne Lösung wurde über eine Fritte filtriert und mit konzentrierter Salzsäure versetzt. Der rot-gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und bei 90 °C getrocknet. 5,6-Carboxylfluorescein **14** wurde als gelb-roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.76 g, 96 %

IR (ATR): cm⁻¹ = 1584 (s), 1458 (m), 1363 (w), 1303 (s), 1236 (m), 1210 (s), 1172

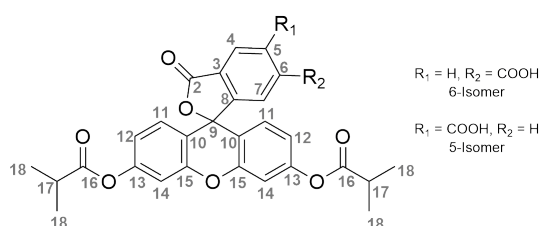
(m), 1118 (s), 876 (m), 851 (s), 759 (m), 672 (s), 565 (s)

ESI-HRMS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{21}H_{11}O_7^-$: 375.0510 Da;

gefunden: 375.0506 Da

Zersetzungspunkt: $\geq 345^\circ\text{C}$

Synthese von 3',6'-Bis(isobutyryloxy)-5,6-carboxyfluorescein **15**^[244]



5,6-Carboxyfluorescein **14** (570 mg, 1.5 mmol) wurde in trockenem DCM (15 mL) gelöst und mit trockenem Pyridin (2.4 mL, 30.2 mol, 20 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und anschließend Isobutyrylchlorid (635 μL , 6.1 mmol, 4 Äq.) über eine Spritze zugegeben. Die Mischung rührte für 18 h während sie sich langsam auf Raumtemperatur erwärmte. 1 M HCl (20 mL) wurde zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit DCM gewaschen, die organischen Phasen vereinigt, mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , DCM + 1% AcOH / Methanol, 100-98 % DCM + 1% AcOH).

Obwohl die Trennung der Isomere auch teilweise chromatographisch erfolgen kann, wurden die Produktfraktionen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Lyophilisation aus Dioxan ergab 3',6'-Bis(isobutyryloxy)-5,6-carboxyfluorescein **15** als gelben Feststoff.

Ausbeute: 667 mg, 85 %

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_9H_{24}O_9^+$: 516.1416 Da;

gefunden: 516.1420 Da

Isomerentrennung

Das 5,6-Isomerengemisch (667 mg) wurde in 5 mL Ethylacetat gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Diisopropylamin (5 mL) wurde zugegeben, wobei das 6-Isomer als Diisopropylammonium-Salz ausgefällt wurde. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und dreimal mit kaltem Ethylacetat gewaschen. Die Lösungen der getrennten Isomere wurden mit 1 M HCl versetzt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Die jeweiligen organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Produkte wurden nach Lyophilisation aus Dioxan als blass-gelbe Feststoffe erhalten.

5-Isomer

Ausbeute: 322 mg, 48 %

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 8.46 (dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 0.7 Hz, 1H, H-4), 8.33 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-6), 7.52 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 0.6 Hz, 1H, H-7), 7.28 (dd, *J* = 2.0 Hz, *J* = 0.5 Hz, 2H, H-14), 6.98 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 0.5 Hz, 2H, H-11), 6.93 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.1 Hz, 2H, H-12), 2.83 (hept, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-17), 1.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 12H, H-18)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 174.6 (C-16), 167.6 (C-2), 165.9 (COOH), 155.6 (C-8), 152.3 (C-15), 150.8 (C-13), 136.5 (C-6), 133.3 (C-5), 129.3 (C-11), 126.3 (C-3), 125.9 (C-4), 124.7 (C-7), 118.6 (C-12), 115.2 (C-10), 110.4 (C-14), 81.3 (C-9), 33.4 (C-17), 18.6 (C-18)

Schmelzpunkt: 170-175 °C

6-Isomer **16**

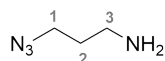
Ausbeute: 270 mg, 41 %

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 8.27 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-5), 8.18 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 0.5$ Hz, 1H, H-4), 7.83 (br d, 1H, H-7), 7.29 (dd, $J = 1.7$ Hz, $J = 0.8$ Hz, 2H, H-14), 6.94 (m, 4H, H-11, H-12), 2.84 (hept, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-17), 1.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 12H, H-18)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 174.6 (C-16), 167.7 (C-2), 166.0 (COOH), 152.3 (C-8), 152.3 (C-15), 150.9 (C-13), 137.8 (C-6), 131.4 (C-5), 129.3 (C-11), 128.9 (C-3), 125.7 (C-4), 124.6 (C-7), 118.5 (C-12), 115.6 (C-10), 110.4 (C-14), 81.4 (C-9), 33.4 (C-17), 18.6 (C-18)

Schmelzpunkt: 185-190 °C

Synthese von 3-Azido-propylamin^[245]



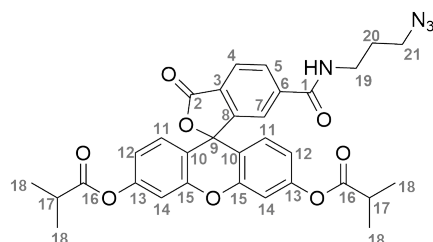
3-Brom-propylamin Hydrobromid (3.2 g, 14.6 mmol) wurde in Wasser (10 mL) suspendiert. Nach der Zugabe von NaN₃ (3.2 g, 49 mmol, 3.4 Äq.) wurde das Gemisch für 7 h unter Rückfluss erhitzt. Die klare gelbe Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und weitere 15 h gerührt. Nach Abkühlen auf 15 °C wurden KOH-Pellets (3.8 g) hinzugeben und das Gemisch mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 3-Azido-propylamin wurde als leicht gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1.03 g, 70 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 3.38 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-1), 2.72 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-3), 1.73 (p, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 50.2 (C-1), 39.8 (C-3), 32.7 (C-2)

Synthese von *N*-(3-Azidopropyl)-(3',6'-bis(isobutyryloxy))-fluorescein-6-carboxamid **17a**



3',6'-Bis(isobutyryloxy)-6-carboxyfluorescein **16** (100 mg, 0.19 mmol) wurde in trockenem THF (10 mL) gelöst. 1-Hydroxybenzotriazol (26 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.) und *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (40 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.) wurden zur Aktivierung hinzugegeben. Nach 20 min erfolgte die Zugabe von 3-Azido-propylamin (21 μ L, 0.21 mmol, 1.1 Äq.) und die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Harnstoff DCU wurde abfiltriert und die klare Lösung unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und erneut filtriert. Die Lösung wurde zweimal mit 5 % NaHCO_3 , 1 M HCl und gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , DCM + 1 % AcOH / Methanol, 100-98 % DCM + 1 % AcOH). Lyophilisation ergab *N*-(3-Azidopropyl)-(3',6' bis(isobutyryloxy))-fluorescein-6-carboxamid **17a** als einen leicht-gelben Feststoff.

Ausbeute: 110 mg, 88 %

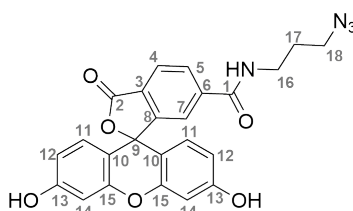
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 8.74 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, -NH-), 8.22 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-5), 8.16 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 0.4$ Hz, 1H, H-4), 7.78 (br s, 1H, H-7), 7.3 (dd, $J = 1.6$ Hz, $J = 1$ Hz, 2H, H-14), 6.95 (m, 4H, H-11, H-12), 3.3 (unter H_2O -Signal, 2H, H-21), 3.27 (dt, $J = 6.7$ Hz, $J = 5.8$ Hz, 2H, H-19), 2.84 (hept, $J = 7$ Hz, 2H, H-17), 1.7 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-20), 1.24 (d, $J = 7$ Hz, 12H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 174.6 (C-16), 167.7 (C-2), 164.5 (C-1), 152.3 (C-8 and C 15), 150.8 (C-13), 141.1 (C-6), 129.9 (C-5), 129.4 (C-11), 127.6 (C-3), 125.4 (C-4), 122.3 (C-7), 118.6 (C-12), 115.7 (C-10), 110.4 (C-14), 81.2 (C-9), 48.5 (C-21), 36.9 (C-19), 33.4 (C-17), 28.2 (C-20), 18.6 (C-18)

ESI-HRMS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{32}H_{29}N_4O_8^-$: 597.1991 Da;
gefunden: 597.2001 Da

Schmelzpunkt: 132 - 136 °C

Synthese von *N*-(3-Azidopropyl)-fluorescein-6-carboxamid **17**



N-(3-Azidopropyl)-(3',6'-bis(isobutyryloxy))-fluorescein-6-carboxamid **17a** (56 mg, 0.094 mmol) wurde in TFA (1 mL) gelöst und auf 60 °C erwärmt. Nach 2 h wurde die TFA im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , EE + 1 % AcOH / Hexan + 1 % AcOH, 50:50). Lyophilisation ergab *N*-(3-Azidopropyl)-fluorescein-6-carboxamid **17** als einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 40 mg, 93 %

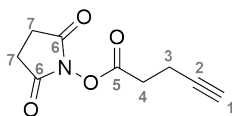
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): δ ; ppm = 8.13 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-5), 8.07 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 0.6$ Hz, 1H, H-4), 7.62 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-7), 6.69 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, H-14), 6.63 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-11), 6.55 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-12), 3.39 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-18), 3.34 (unter Solventsignal, 2H, H-16), 1.8 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-17)

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD): δ ; ppm = 170.7 (C-1), 168.3 (C-2), 162.1, 154.3 (C-13), 142.0 (C-6), 134.6, 130.4, 130.3, 126.4, 124.2, 114.1, 111.2, 106.2, 103.6, 84.5 (C-9), 50.2 (18), 38.6 (C-16), 29.6 (C-17)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{18}N_4O_6^+$: 459.1299 Da;
gefunden: 459.1301 Da

Schmelzpunkt: 225 - 230 °C

Synthese von 4-Pentinsäuresuccinimidylester **19**^[246]



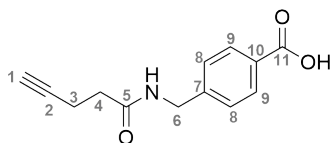
4-Pentinsäure (200 mg, 2.0 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (235 mg, 2.0 mmol, 1 Äq.) wurden in THF gelöst (7 mL) und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (421 mg, 2.0 mmol, 1. Äq) gelöst in trockenem THF (2 mL) wurde tropfenweise hinzugegeben. Das Gemisch rührte für 45 min bei 0 °C und für weitere 2 h, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Der gebildete Harnstoff DCU wurde abfiltriert und die klare Lösung unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, erneut filtriert, zweimal mit gesättigter NaHCO₃ Lösung, 1 M HCl und gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Lyophilisation ergab 4-Pentinsäuresuccinimidylester **19** als einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 393 mg, 99 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 2.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-4), 2.84 (s, 4H, H-7), 2.57 (td, *J* = 7.2 Hz, *J* = 2.6 Hz, 2H, H-3), 2.34 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-1)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 171.7 (C-6), 168.9 (C-5), 82.2 (C-2), 70.9 (C-1), 31.2 (C 4), 26.4 (C-7), 14.7 (C-3)

Synthese von 4-(Pent-4-ynamidomethyl)benzoesäure **20**



4-Aminomethylbenzoesäure (229 mg, 1.5 mmol) und Na₂CO₃ (480 mg, 4.5 mmol, 3 Äq.) wurden in einem Gemisch aus Wasser und THF (3 : 1, 20 mL) gelöst. 4-Pentinsäuresuccinimidylester **19** (295 mg, 1.5 mmol, 1 Äq.) wurde hinzugegeben und das Gemisch für

2 h bei Raumtemperatur gerührt. Ethylacetat (20 mL) und gesättigte NaHCO₃ Lösung (2 mL) wurden hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl angesäuert bis ein Niederschlag ausfiel. Das Gemisch wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Lyophilization ergab 4-(Pent-4-ynamidomethyl)benzoesäure **20** als einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 300 mg, 87 %

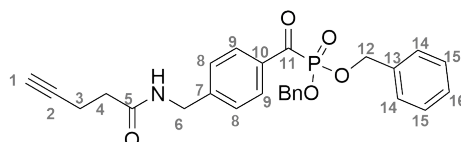
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 7.97 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-9), 7.41 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-8), 4.45 (s, 2H, H-6), 2.49 (m, 4H, H-4 und H-3), 2.29 (t, J = 2.5 Hz, 1H, H-1)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 174.1 (C-5), 169.7 (C-11), 145.4 (C-7), 130.9 (C-9), 130.8 (C-10), 128.4 (C-8), 83.5 (C-2), 70.4 (C-1), 43.7 (C-6), 36.0 (C-4), 15.8 (C-3)

ESI-HRMS (m/z): [M+H]⁺ berechnet für C₁₃H₁₃NO₃⁺: 232.0968 Da;
gefunden: 232.0975 Da

Schmelzpunkt: 203-204 °C

Synthese von Dibenzyl(4-(pent-4-ynamidomethyl)benzoyl)phosphonat **21**



4-(Pent-4-ynamidomethyl)benzoesäure **20** (230 mg, 1.0 mmol) und DMF (20 μ L, 20 Mol-%) wurden in trockenem DCM (20 mL) suspendiert. Oxalylchlorid (138 μ L, 1.6 mmol, 1.6 Äq.) wurde über eine Spritze tropfenweise hinzugegeben. Nach 1 h wurde eine zusätzliche Menge Oxalylchlorid (43 μ L, 0.5 mmol, 0.5 eq) hinzugefügt bis eine klare Lösung entstand. Das Lösungsmittel und der Überschuss an Oxalylchlorid wurden im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Öl wurde in trockenem Toluol gelöst und anschließend mit Tribenzylphosphit^[247] (825 mg,

2.3 mmol, 2.3 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde auf 70 °C erwärmt und für 1 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM + 1 % AcOH / Methanol, 95:5). Dibenzyl(4-(pent-4-ynamidomethyl)benzoyl)phosphonat **21** wurde als leicht gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 353 mg, 75 %

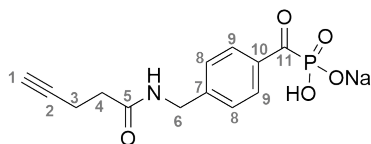
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-9), 7.36 - 7.20 (m, 12 H, H-8 und H-14,15,16), 6.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, -NH-), 5.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H, H-12), 4.47 (d, *J* = 6.0 Hz 2H, H-6), 2.53 (td, *J* = 6.6 Hz, *J* = 2.3 Hz, 2H, H-3), 2.43 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-4), 1.98 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-1)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 197.7 (d, *J* = 174 Hz, C-11), 171.3 (C-5), 146.1 (C-7), 135.4 (d, *J* = 5.9 Hz, C-10), 134.8, 134.1, 130.3 (d, *J* = 1.5 Hz, C-9), 128.8 (C-9), 128.7 (C-15), 128.5, 128.2, 128.0, 127.9, 127.5, 83.0 (C-2), 69.6 (C-1), 69.4 (d, *J* = 7.4 Hz, C-12), 43.2 (C-6), 35.2 (C-4), 15.0 (C-3)

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = - 0.3 (p, *J* = 8.2 Hz)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₂₇H₂₇NO₅P⁺: 476.12 Da; gefunden: 476.0 Da

Synthese von Natrium-(4-(pent-4-ynamidomethyl)benzoyl)phosphonsäure **22**



Dibenzyl(4-(pent-4-ynamidomethyl)benzoyl)phosphonat **21** (340 mg, 0.714 mmol) wurde bei 0 °C in TFA (7 mL) gelöst und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Öl wurde in einem Gemisch aus Wasser und ACN (1 : 1, 10 mL) gelöst und für 1 h über Amberlite® Ionentauscherharz (IR120 Natriumform) gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Natrium-(4-(pent-4-ynamidomethyl)benzoyl)phosphonsäure **22** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 224 mg, 92 %

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-₆): δ; ppm = 8.52 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, -NH-), 8.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H 9), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-8), 4.32 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H-6), 2.80 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-1), 2.38 (m, 4H, H-3 und H-4)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-₆): δ; ppm = 170.5 (C-5), 145.8 (C-7), 129.5 (C-9), 126.6 (C-8), 83.8 (C 2), 71.4 (C-1), 42.0 (C-6), 34.2 (C-4), 14.3 (C-3)

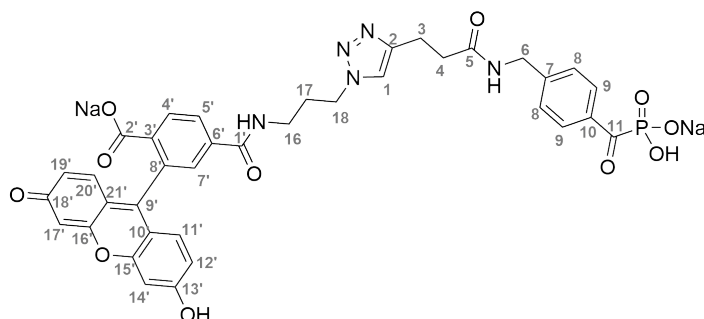
(Phosphor-gekoppelte ¹³C-Kerne konnten nicht vollständig aufgelöst werden)

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-₆): δ; ppm = - 1.8

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₃H₁₅N₄O₅P⁺: 296.0682 Da; gefunden: 296.0683 Da

Zersetzungspunkt: ≥ 340 °C

Synthese von Natrium-(4-((3-(1-(3-(Fluoresceinyl-6-carboxamido)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)benzoyl)phosphonsäure **23**



Natrium-(4-(pent-4-ynamidomethyl)benzoyl)phosphonsäure **22** (20 mg, 0.063 mmol) und 6-Fluorescein-azido-propyl-amid **17** (29 mg, 0.063 mmol, 1 Äq.) wurden in einem Gemisch aus Wasser und THF (4 : 1, 2.5 mL) suspendiert. CuSO₄•5 H₂O (1.6 mg, 0.006 mmol, 10 Mol-%) wurde zugegeben und das Gemisch mit Argon entgast. Natriumascorbat (5 mg, 40 mol-%) gelöst in Wasser (100 µL) wurde unter Argon hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem vollständigen Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in NH₄HCO₃

(50 mM) aufgenommen und durch einen Spritzenfilter filtiert. Die grün-gelbe Lösung wurde über ein basisch gepuffertes HPLC-System aufgereinigt (50 mM NH₄HCO₃ / ACN; 28 min: 5-70 % ACN). Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert, wobei ein oranger Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde in Wasser gelöst und 1 h über Amberlite® Ionentauscherharz (IR120 Natriumform) gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und die Lösung lyophilisiert wobei das Natriumsalz **23** als roter Feststoff erhalten wurde.

Die Verbindung **23** ist empfindlich gegenüber sauren und stark basischen Bedingungen. Längere Lagerung führte zu einer langsamen Zersetzung.

Ausbeute: 19 mg, 40 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 8.30 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-9), 8.07 (m, 2H, H-4' und H-5'), 7.68 (m, 2H, H-7' und H-1), 7.27 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-8), 7.07 (s, 1H, H-14' oder H-17'), 7.04 (s, 1H, H-14' oder H-17'), 6.58 (m, 4H, H-11', H-12', H-19', H-20'), 4.39 (m, 4H, H-6 und H-18) 3.38 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H-16), 2.99 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-3), 2.59 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-4), 2.15 (p, J = 6.7 Hz, 2H, H-17)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 201.8 (d, J = 177 Hz, C-11), 179.6, 174.4, 173.0, 169.0, 159.7, 147.6, 145.2, 144.1, 136.1, 135.2, 132.4, 131.2, 130.2, 129.4, 129.1, 128.1, 128.0, 123.8, 123.0, 114.2, 49.1 unter Solventsignal (C-18), 43.8 (C-6), 38.2 (C-16), 36.4 (C-4), 31.1 (C-17), 22.5 (C-3)

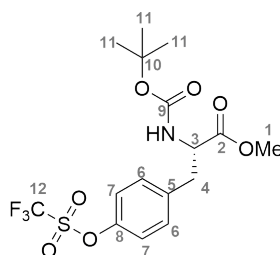
³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-₆): δ ; ppm = - 1.94

ESI-HRMS (m/z): [M+H]⁺ berechnet für C₃₇H₃₂N₅O₁₁P⁺: 754.1909 Da;
gefunden: 754.1910 Da

Zersetzungspunkt: \geq 320 °C

Synthese von *N*-tert-Butoxycarbonyl-4-trifluoromethansulfonyl-oxy-phenylalaninmethylester **25**^[137] ²

²Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt.



N-*tert*-Butoxycarbonyl-tyrosinmethylester (1.08 g, 3.66 mmol) und *N*-Phenyltrifluoromethansulfonimid (1.44 g, 4.02 mmol, 1.1 Äq.) wurden in trockenem DCM (12 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Triethylamin (0.582 mL, 4.02 mmol, 1.1 Äq.) wurde langsam zutropft und die Lösung 1.5 h bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Wasser (20 mL) wurde hinzugegeben und die organische Phase mit 1 M NaOH und gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan / Ethylacetat, 0-25 % Ethylacetat), wobei *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-4-trifluoromethylsulfonyloxy-phenylalaninmethylester **25** als farbloses Öl erhalten wurde, welches bei längerer Lagerung kristallisierte.

Ausbeute: 1.51 g, 98 %

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 7.40 (m, 4H, H-6, H-7), 4.23 (m, 1H, H-3), 3.61 (s, 3H, H-1), 3.08 (dd, *J* = 13.8 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 2.87 (dd, *J* = 13.8 Hz, *J* = 11.0 Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 1.29 (s, 9H, H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 172.2 (C 2), 155.3 (C-9), 147.9 (C-8), 138.8 (C-5), 131.4 (C-6), 121.0 (C-7), 118.2 (q, *J* = 321 Hz, C-12), 78.3 (C 10), 54.6 (C-3), 51.8 (C-1), 35.7 (C-4), 278.0 (C-11)

¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 73.3

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₆H₂₀F₃NNaO₇S⁺: 450.08 Da;
gefunden: 450.0 Da

Synthese von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-carboxy-phenylalaninmethylester **26**^[137] ³

Die Hydroxycarbonylierung wurde entsprechend eines literaturbekannten Protokolls durchgeführt, wobei dppp als alternativer bidentaler Palladium-Ligand verwendet wurde. Das Triflat **25** (2.78 g, 6.51 mmol), 1,3-Bis(diphenylphosphin)propan (161 mg, 0.04 mmol, 0.06 Äq.) und Pd(OAc)₂ (44 mg, 0.02 mmol, 0.03 Äq.) wurden in einem Gemisch aus DMF und Wasser (3: 1, 11 mL) gelöst. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Ballon Kohlenmonoxid versehen, die braune Lösung 10 min mit CO gesättigt und anschließend auf 70 °C erhitzt. DIPEA (1.26 mL, 7.2 mmol, 2.1 Äq.) wurde hinzugefügt und die Lösung unter CO-Atmosphäre gerührt. Während der Reaktion färbte sich die braune Lösung gelblich, wobei sie sich nach 1 h vollständig geklärt hatte. Die Lösung rührte 2 h bei 70 °C, wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Ethylacetat (20 mL) versetzt. Der Lösung wurde gesättigte NaHCO₃ (3 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase der Reaktionslösung wurde zweimal mit gesättigter NaHCO₃ extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurde mit 1 M HCl versetzt bis ein Niederschlag ausfiel. Ethylacetat wurde hinzugegeben und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Lyophilisation aus Dioxan ergab *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-carboxy-phenylalaninmethylester **26** als weißen Feststoff.

Die Hydroxycarbonylierung kann alternativ auch unter der Verwendung des zweizähligen Palladium-Liganden dppf erfolgen,^[248] wobei damit geringere Ausbeuten erzielt wurden. Beide Systeme lieferten ein Produkt mit einer identischen optischen Drehung. Die Analyse mittels chiraler HPLC-Materialien lieferte keinen Hinweis auf eine partielle Racemisierung.

³Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt, wobei Reaktionsbedingungen und Ausbeute optimiert wurden.

Ausbeute: 1.87 g, 89 %

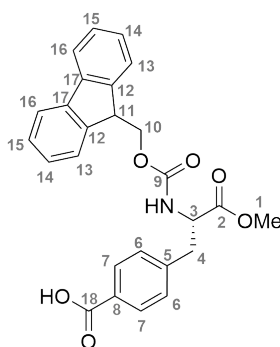
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 8.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-7), 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-6), 5.08 (br d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 4.63 (m, 1H, H-3), 3.20 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 5.5 Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 3.10 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 5.8 Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 1.40 (s, 9H, H-11)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 171.3 und 172.0 (C-2 und C-12), 155.0 (C-9), 142.4 (C-5), 130.4 (C-7), 129.5 (C-6), 128.5 (C-8), 80.2 (C-10), 67.0 (C-3), 52.4 (C-1), 38.6 (C 4), 28.2 (C-11)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₆H₂₁NNaO₆⁺: 346.12611 Da;
gefunden: 346.12614 Da

Drehwert: [α]_D²⁰ = + 9.9°, (c = 1, EtOH); Lit.:^[137] [α]_D²⁰ = + 4.0°, (c = 1, EtOH)

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-carboxyl-phenylalaninmethylester **27**⁴



N-*Tert*-butyloxycarbonyl-4-carboxy-phenylalaninmethylester **26** (409 mg, 1.26 mmol) wurde bei einer Temperatur von 0 °C in TFA (3 mL) gelöst. Nach 1 h wurde die TFA im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand mit Dioxan koevaporiert. Der leicht gelbe Feststoff wurde in einem Gemisch aus Wasser und Aceton (1 : 1, 5 mL) gelöst. Es wurde Na₂CO₃ (402 mg, 3.79 mmol, 3 Äq.) hinzugegeben und die Lösung auf 0 °C abgekühlt.

⁴Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt.

Fmoc-OSu (427 mg, 1.26 mmol, 1 Äq.) gelöst in Dioxan (1 mL) wurde tropfenweise zugegeben und das Gemisch für 15 min gerührt. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 3 h gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt (10 mL) und dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Zitronensäure angesäuert bis ein Niederschlag ausfiel. Ethylacetat wurde zugegeben und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die Lösung unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan + 1 % AcOH / Ethylacetat + 1 % AcOH, 0-60 % Ethylacetat + 1 % AcOH). Lyophilisation ergab *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-carboxyl-phenylalaninmethylester **27** als weißen Feststoff. Analyse mittels chiraler HPLC-Materialien und die Reaktion mit Phenylalaninmethylester lieferte keinen Hinweis auf eine partielle Racemisierung.

Ausbeute: 490 mg, 87 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 7.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-7), 7.76 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-16), 7.57 (m, 2H, H-13), 7.23- 7.39 (m, 6H, H-6, H-14, H-15), 6.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 4.47 (m, 1H, H-3), 4.29 (m, 2H, H-10a oder H-10b, H-11), 4.14 (dd, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-10a oder H-10b), 3.70 (s, 3H, H-1), 3.22 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 2.28 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 171.3 und 172.7 (C-2 und C-18), 157.5 (C-8), 155.6 (C-9), 143.6 (C-12), 141.3 (C-17), 130.4 (C 6), 129.5 (C-7), 128.2 (5), 127.7 (C-15), 127.1 (C-14), 125.0 (C-13), 120.0 (C-16), 66.9 (C-10), 54.5 (C-3), 52.5 (C-1), 47.1 (C-11), 38.3 (C-4)

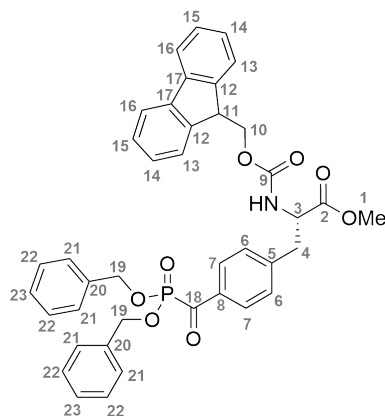
ESI-HRMS (m/z): [M+Na]⁺ berechnet für C₂₆H₂₃NNaO₆⁺: 468.14176 Da;

gefunden: 468.14155 Da

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -7.7^\circ$, (c = 1, EtOH); Lit.:^[249] $[\alpha]_D^{20} = +7.7^\circ$, (c = 1, EtOH)

Schmelzpunkt: 168 °C

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-dibenzyl-phosphono-carbonyl)-phenylalaninmethylester **28**⁵



Entsprechend einer Literaturvorschrift^[149] wurden *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-carboxyl-phenylalaninmethylester **27** (477 mg, 1.08 mmol) und DMF (8.3 μ L, 10 Mol-%) in trockenem DCM (10 mL) suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Über einen Zeitraum von 20 min wurde Oxalylchlorid (276 μ L, 3.21 mmol, 3 Äq.) zutropft und für 45 min gerührt. Das Gemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt, wobei sich eine klare gelbe Lösung bildete. Nach 1.5 h wurde das Lösungsmittel und der Überschuss an Oxalylchlorid unter trockenen Bedingungen durch das Anlegen von Hochvakuum und der Verwendung einer zusätzlichen Kühlfalle entfernt. Der ölige Rückstand wurde 1 h im Hochvakuum getrocknet und anschließend in frisch getrocknetem Toluol (7 mL) gelöst. Tribenzylphosphit (952 mg, 2.70 mmol, 2.5 Äq.) wurde über eine Spritze zugegeben und die Lösung auf 50 °C erwärmt. Das Gemisch wurde für 3 h gerührt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde ohne Einengen säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexane + 1 % AcOH / Ethylacetat + 1 % AcOH, 0-30 % Ethylacetat + 1 % AcOH) wobei *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-dibenzyl-phosphono-carbonyl)-phenylalaninmethylester **28** als blass-gelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 468 mg, 63 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN): δ ; ppm = 8.12 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-7), 7.81 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-16), 7.58 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-13), 7.35 (m, 16H, H-6, H-14, H-15, H-21,

⁵Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt.

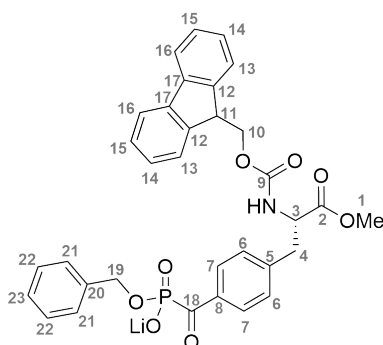
H-22, H-23), 6.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 5.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H-19), 4.50 (m, 1H, H-3), 4.29 (m, 2H, H-10a oder H-10b, H-11), 4.16 (m, 1H, H-10a oder H-10b), 3.24 (dd, $J = 13.9$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 3.69 (s, 3H, H-1), 3.05 (dd, $J = 13.9$ Hz, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3CN): δ ; ppm = 199.0 (d, $J = 174.4$ Hz), 172.8 (C-2), 156.8 (C-9), 146.2 (C-12), 145.0 (C-5), 142.1 (C-17), 135.5, 134.6, 131.0, 130.7 (d, $J = 1.5$ Hz, C-7), 129.6, 129.6, 129.2, 128.7, 128.1, 126.1, 121.0 (C-16), 70.0 (d, $J = 7.2$ Hz), 67.9 (C-10), 55.8 (C-3), 53.0 (C-1), 48.0 (C-11), 38.2 (C-4)

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CD_3CN): δ ; ppm = - 0.3 (tp, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.17$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{NO}_8\text{P}^+$: 690.2251 Da;
gefunden: 690.2254 Da

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-benzyl-lithium-phosphono-carbonyl)-phenylalaninmethylester **29**⁶



Entsprechend einer Literaturvorschrift^[140] wurde *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-dibenzylphosphonocarbonyl)-phenylalaninmethylester **28** (289 mg, 0.42 mmol) in trockenem ACN (2 mL) gelöst. Es wurde LiBr (400 mg, 4.61 mmol, 11 Äq.) gelöst in trockenem ACN (8 mL) zugegeben und die Lösung 2 h gerührt, wobei ein Niederschlag ausfiel. Filtration und trocknen des Niederschlags ergab 102 mg *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-benzyl-lithium-phosphono-carbonyl)-phenylalaninmethylester **29**. Das Filtrat wurde für 2 Tage gerührt, erneut filtriert und der Niederschlag mit Aceton

⁶Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt, wobei Reaktionsbedingungen und Ausbeute optimiert wurden.

gewaschen. Die beiden Produktfraktionen wurden vereinigt und in Dioxan gelöst. Lyophilisation ergab *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-benzyl-lithium-phosphono-carbonyl)-phenylalaninmethylester **29** als einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 201 mg, 80 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 8.24 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-7), 7.76 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-16), 7.57 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-13), 7.21 - 7.29 (m, 11H, H-6, H-14, H-15, H-21, H-22, H-23), 4.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-19), 4.47 (m, 1H, H-3), 4.28 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-10), 4.14 Hz (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-11), 3.69 (s, 3H, H-1), 3.21 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 3.02 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b)

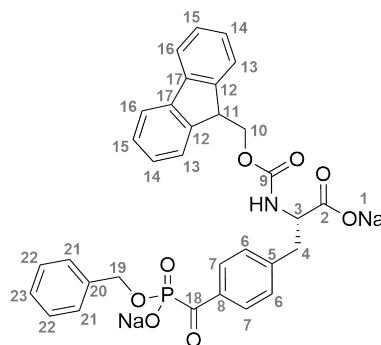
¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 207.9 (d, $J = 171.4$ Hz), 173.6 (C-2), 158.3, 145.2, 145.1, 144.7, 142.5 (C-17), 139.6 (d, $J = 6.6$ Hz, C-20), 136.9 (d, $J = 56.0$ Hz, C-8), 130.9 (br d, C-7), 130.4 (br s, C-6), 129.4, 129.2, 128.2, 128.8, 126.2, 120.9 (C-16), 68.7 (d, $J = 7.2$ Hz), 67.9 (C-10), 56.5 (C-3), 52.8 (C-1), 48.3 (C-11), 38.4 (C-4)

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = -0.3 (br t, $J = 6.7$ Hz)

ESI-MS (m/z): [M-H]⁻ berechnet für C₃₃H₂₉NO₈P⁻: 598.16 Da; gefunden: 597.9 Da

Schmelzpunkt: 254 °C

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-benzyl-natrium-phosphono-carbonyl)-phenylalanin **30**⁷



⁷Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt.

N-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-benzyl-lithium-phosphono-carbonyl)-phenylalanin-methylester **29** (97 mg, 0.16 mmol) und frisch aufbereitetes Subtilisin Carlsberg (2.6 mg) wurden in NH_4HCO_3 Puffer (3.5 mL, 50 mM, pH 8) suspendiert und auf 60 °C erwärmt. Nach 2 h wurde die klare Lösung durch einen Spritzenfilter (Nylon, 45 μm) filtriert. Das Filtrat wurde lyophilisiert wobei **30** als Ammoniumsalz erhalten wurde. Der weiße Feststoff wurde in Wasser gelöst (15 mL) und 1 h über Amberlite® Ionentauscherharz (IR120 Natriumform) gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert, wobei *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(*O*-benzyl-natrium-phosphono-carbonyl)-phenylalanin **30** als weißer Feststoff erhalten wurde. Dieser kann ohne weitere Aufarbeitung verwendet werden und ist bei einer Lagerung bei 4 °C über mehrere Monate stabil.

Da literaturbekannte Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich reproduziert werden konnten,^[145] wurde die verwendete Hydrolase entsprechend folgendem Protokoll aufbereitet. Subtilisin Carlsberg (Alcalase®) wurde als wässrige Glycerinlösung (spezifische Aktivität von ≥ 2.4 U/g) von Sigma Aldrich bezogen. Die Lösung wurde mit *tert*-Butanol versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde zentrifugiert und dreimal mit *tert*-Butanol gewaschen. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst und lyophilisiert, wobei ein leicht brauner Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 93 mg, 92%

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ ; ppm = 7.99 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-7), 7.77 (m, 2H, H-16), 7.13 - 7.50 (m, 11H, H-6, H-13, H-14, H-15, H-21, H-22, H-23), 4.45 (m, 1H, H-3), 4.22 (m, 2H, H-10), 4.02 (m, 1H, H-11), 3.20 (dd, $J = 13.7$, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b), 2.84 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4a oder H-4b)

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ ; ppm = 207.5 (d, $J = 167.3$ Hz), 177.9 (C-2), 156.9, 145.0, 143.4, 140.1, 139.4 (d, $J = 6.1$ Hz, C-20), 134.2 (d, $J \approx 52$ Hz, C-8), 129.4 (br s, C-7), 128.5 (br s, C-6), 128.16, 127.9, 127.7, 127.6, 127.6, 124.5, 119.8 (C-16), 67.5 (d, $J = 5.5$ Hz), 65.9 (C-10), 56.7 (C-3), 46.5 (C-11), 37.9 (C-4)

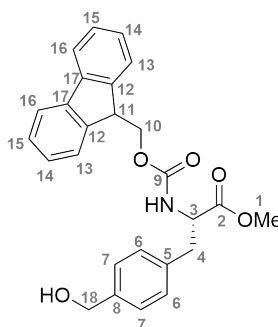
³¹P-NMR (122 MHz, D₂O): δ ; ppm = 0.1 (t, $J = 8.3$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{P}^+$: 586.1625 Da;
gefunden: 586.1629 Da

Zersetzungspunkt: ≥ 150 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = + 25.0^\circ$, (c = 1, H₂O)

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-hydroxymethyl-phenylalaninmethylester **38**



N-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-carboxy-phenylalaninmethylester **27** (253 mg, 0.569 mmol) wurde in trockenem THF (3 mL) gelöst, auf 0 °C abgekühlt und eine Lösung von BH₃•DMS in THF (600 µL, 1.2 mmol, 2.1 Äq.) zugetropft. Die Lösung rührte 16 h, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das Gemisch wurde auf 0 °C abgekühlt und solange vorsichtig gesättigte NaHCO₃ Lösung zugetropft bis keine Wasserstoffentwicklung mehr erfolgte. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und Ethylacetat hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 1 M HCl und gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan / Ethylacetat, 0 – 20 % Ethylacetat), wobei *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-hydroxymethyl-phenylalaninmethylester **38** als farbloses Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 240 mg, 99 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-16), 7.57 (m, 2H, H-13), 7.41 (m, 2H, H-15), 7.31 (m, 4H, H-14, H-7), 7.09 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-6), 5.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.66 (m, 3H, H-18, H-3), 4.40 (m, 2H, H-10), 4.20 (t, *J* = 7.0 Hz,

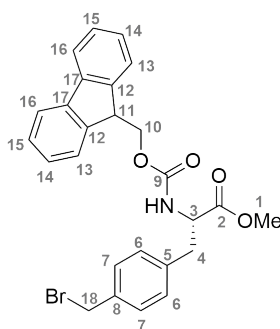
^1H , H-11), 3.74 (3H, H-1), 3.10 (m, 2H, H-4)

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 172.0 (C-2), 155.7, (C-9), 144.0, 143.9, 141.5, 139.9, 135.3, 129.6, 127.9, 127.4, 125.2, 120.1, 67.0 (C-10), 65.2 (C-18), 54.9 (C-3), 52.5 (C-1), 47.3 (C-11), 38.1 (C-4)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NO}_5^+$: 432.18055 Da;
gefunden: 432.18064 Da

Schmelzpunkt: ≤ 132 °C

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-brommethyl-phenylalaninmethylester **39**



N-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-hydroxymethyl-phenylalaninmethylester **38** (240 mg, 0.557 mmol) und Triphenylphosphin (425 mg, 1.62 mmol, 2.9 Äq.) wurden in trockenem THF (10 mL) gelöst. *N*-Bromsuccinimid (287 mg, 1.62 mmol, 2.9 Äq.) gelöst in trockenem THF wurde über eine Spritze tropfenweise hinzugegeben. Die Lösung wurde 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt und Kieselgel 60 hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das auf Kieselgel gebundene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , Hexan + 1 % AcOH / Ethylacetat + 1 % AcOH, 0 - 60 % Ethylacetat). Lyophilisation aus Dioxan ergab *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-brommethyl-phenylalaninmethylester **39** als blass-gelben Feststoff.

Ausbeute: 213 mg, 77 %

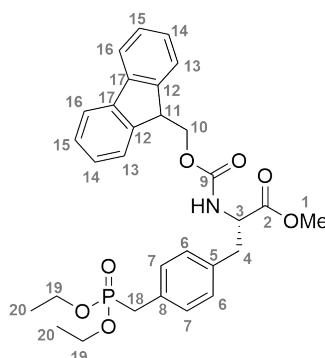
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-16), 7.57 (m, 2H, H-13), 7.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-15), 7.32 (m, 4H, H-14, H-7), 7.07 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-6), 5.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 4.67 (m, 1H, H-3), 4.45 (s, 2H, H-18), 4.41 (m, 2H, H-10), 4.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-11), 3.70 (3H, H-1), 3.12 (m, 2H, H-4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 171.9 (C-2), 155.6, (C-9), 143.9, 141.5, 136.8, 129.9, 129.4, 127.9, 127.2, 125.2, 120.2, 120.1, 67.1 (C-10), 54.8 (C-3), 52.6 (C-1), 47.3 (C-11), 38.1 (C-4), 33.3 (C-18)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{BrNO}_4^+$: 494.09615 Da;
gefunden: 494.09665 Da

Schmelzpunkt: 124 °C

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(diethoxyphosphoryl)-methyl-phenylalaninmethylester **40**



N-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-bromomethyl-phenylalaninmethylester **39** (93 mg, 0.118 mmol) und Triethylphosphit (64 μL , 0.377 mmol, 2 Äq.) wurden in einem Mikrowellenreaktor für 4 h bei 120 °C erhitzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , DCM / MeOH, 0 - 10 % MeOH), wobei *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(diethoxyphosphoryl)-methyl-phenylalaninmethylester **40** als farbloses Öl erhalten wurde. Das Produkt enthielt geringe Mengen an Triethylphosphat und Diethylphosphit, die sich nicht abtrennen ließen.

Ausbeute: 113 mg, ≤ 100 %

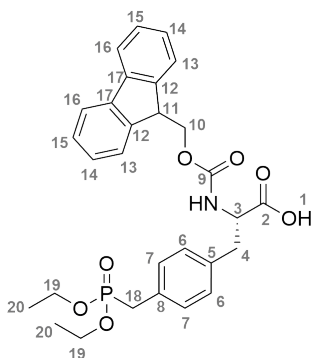
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-16), 7.57 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 3.3 Hz, 2H, H-13), 7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-15), 7.31 (m, 2H, H-14), 7.22 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 2H, H-7), 7.04 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-6), 5.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.65 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-3), 4.39 (m, 2H, H-10), 4.18 (m, 1H, H-11), 4.0 (m, 4H, H-19), 3.72 (3H, H-1), 3.11 (d und m, *J* = 15 Hz, 4H, H-18 und H-4), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H-20)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 172.0 (C-2), 155.7, (C-9), 143.9, 141.4, 130.2 (d, *J* = 6.8 Hz), 129.6 (*J* = 3.4 Hz), 127.9, 127.2, 125.2 (d, *J* = 4.7 Hz), 120.1 (d, *J* = 1.7 Hz), 120.1, 67.1 (C-10), 62.4 (*J* = 8.8 Hz, C-19), 54.9 (C-3), 52.5 (C-1), 47.3 (C-11), 38.1 (C-4), 33.5 (d, *J* = 138.5 Hz, C-18), 16.5 (d, *J* = 6.4 Hz, C-20)

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 27.5 (br m)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₃₀H₃₅NO₇P⁺: 552.21457 Da;
gefunden: 552.21615 Da

Synthese von *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(diethoxyphosphoryl)-methylphenylalanin 41



N-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(diethoxyphosphoryl)-methylphenylalaninmethylester **40** (104 mg, 0.118 mmol) wurde in einem 0.8 M CaCl₂ Isopropanol / Wasser-Gemisch (7 : 3, 5 mL) gelöst. Es wurde 1 M KOH zugegeben und der Umsatz der Verseifung mittels HPLC verfolgt. Nach der Zugabe von insgesamt 440 µL (0.44 mmol, 3.7 Äq.) war der Methylester vollständig umgesetzt. Ethylacetat und gesättigte NaHCO₃ Lösung wurden

zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat gewaschen und mit 1 M HCl angesäuert bis ein Niederschlag ausfiel. Es wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Die Lösung wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Lyophilisation aus Dioxan ergab *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-4-(diethoxyphosphoryl)-methyl-phenylalanin **41** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 83 mg, 82 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-16), 7.59 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-13), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-15), 7.31 (m, 2H, H-14), 7.22 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 2.6 Hz, 2H, H-7), 7.14 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-6), 5.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.71 (m, 1H, H-3), 4.42 (m, 2H, H-10), 4.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-11), 4.00 (m, 4H, H-19), 3.11 (m, 4H, H-18 und H-4), 1.22 (2 t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H-20)

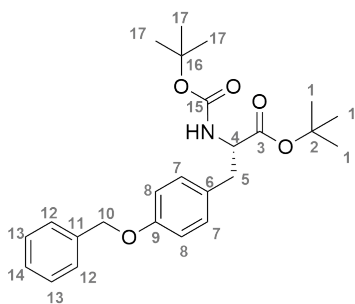
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 173.0 (C-2), 155.7 (C-9), 144.0, 144.0, 141.5, 135.0, 130.1 (d, *J* = 6.5 Hz), 129.7 (d, *J* = 9.2 Hz), 127.9, 127.2, 125.3 (d, *J* = 8.1 Hz), 120.1 (d, *J* = 1.9 Hz), 67.0 (C-10), 63.2 (2 d, *J* = 6.9 Hz, C-19), 54.5 (C-3), 47.4 (C-11), 37.3 (C-4), 33.1 (d, *J* = 137.1 Hz, C-18), 16.4, (2 d, *J* = 6.9 Hz, C-20)

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 28.8 (m)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₂₉H₃₃NO₇P⁺: 538.19892 Da; gefunden: 538.20082 Da

Schmelzpunkt: ≤ 100 °C

Synthese von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosin-*tert*-butylester **44**



N-*tert*-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosin (1 g, 2.695 mmol) und eine katalytische Menge DMAP wurden in *tert*-Butanol (10 mL) gelöst. Di-*tert*-butyldicarbonat (773 μ L, 3.370 mmol, 1.25 Äq.) gelöst in *tert*-Butanol (1 mL) wurde hinzugegeben und das Gemisch für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Kieselgel 60 hinzugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das auf Kieselgel gebundene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch augereinigt (SiO₂, DCM + 1 % AcOH). Lyophilisation aus Dioxan ergab *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosin-*tert*-butylester **44** als weißen Feststoff.

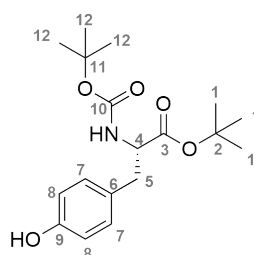
Ausbeute: 1.18 g, \geq 100 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = 7.38 (m, 5H, H-12, H-13, H-14), 7.08 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-7), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-6), 5.04 (s, 2H, H-10), 4.98 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.40 (dd, J = 6.6 Hz, J = 6.6 Hz, 1H, H-4), 2.99 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-5), 1.42 (s, 9H, H-1 oder H-15), 1.40 (s, 9H, H-1 oder H-17)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = 171.2 (C-3), 157.9 (C-14, oder C-9), 155.2 (C-14, oder C-9), 137.2 (11), 130.7 (C-7), 128.8 (C-6), 128.7 (C-13), 128.1 (C-14), 127.6 (C-12), 114.9 (C-8), 82.1 (C-2), 79.7 (C-16), 70.1 (C-10), 55.1 (C-4), 37.8 (C-5), 28.4 (C-1 oder C-17), 28.1 (C-1 oder C-17)

ESI-HRMS (m/z): [M+Na]⁺ berechnet für C₂₅H₃₃NNaO₅⁺: 450.22509 Da;
gefunden: 450.22681 Da

Synthese von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-tyrosin-*tert*-butylester **45a**



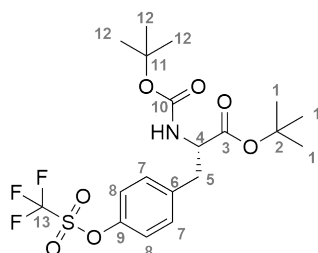
N-*tert*-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosin-*tert*-butylester **44** (1.18 g, 2.76 mmol) wurde in Methanol (10 mL) gelöst und Pd/C (10 mg, 10 wt. %) zugegeben. Die Lösung wurde im Ultraschallbad entgast, anschließend mit einem H₂-Ballon versehen und für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Kieselgel 60 zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das auf Kieselgel gebundene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM + 1 % AcOH). Lyophilisation aus Dioxan ergab *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-tyrosin-*tert*-butylester **45a** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 806 mg, 87%

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-7), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-8), 5.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.40 (dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-4), 2.97 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-5), 1.42 (s, 9H, H-1 oder H-12), 1.41 (s, 9H, H-1 oder H-12)
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 170.7 (C-3), 154.7 (C-10), 154.3 (C-9), 130.1 (C-7), 127.6 (C-6), 114.8 (C-8), 81.2 (C-2), 79.4 (C-11), 54.5 (C-4), 37.2 (C-5), 27.8 (C-1 oder C-12), 27.5 (C-1 oder C-12)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₈H₂₇NNaO₅⁺: 360.17814 Da;
 gefunden: 360.1776 Da

Synthese von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*O*-trifluormethansulfonyl-tyrosin-*tert*-butylester
45



N-*tert*-Butyloxycarbonyl-tyrosin-*tert*-butylester **45a** (760 mg, 2.25 mmol) und Triethylamin (366 μ L, 2.66 mmol, 1.2 Äq.) wurden in trockenem DCM (8 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es wurde Phenyltriflimid (942 mg, 2.66 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und für 5 h gerührt, wobei sich das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde Wasser (10 mL) hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde dreimal mit 1 M NaOH, und mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan / Ethylacetat, 0 - 25 % Ethylacetat), wobei *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*O*-trifluormethansulfonyl-tyrosin-*tert*-butylester **45** als farbloses Öl erhalten wurde.

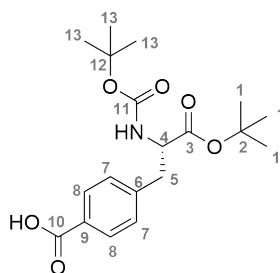
Ausbeute: 1.018 g, 96 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = 7.27 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-8), 7.19 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-6), 5.06 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.45 (dd, J = 6.9 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-4), 2.97 (m, 2H, H-5), 1.42 (s, 9H, H-1 oder H-12), 1.38 (s, 9H, H-1 oder H-12)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = 170.7 (C-3), 155.2 (C-10), 148.7 (C-9), 137.6 (C-6), 131.51 (C-7), 121.3 (C-8), 119.3 (q, J = 321 Hz, C-13), 82.8 (C-2), 80.2 (C-11), 54.9 (C-4), 38.4 (C-5), 28.5 (C-1 oder C-12), 28.1 (C-1 oder C-12)

ESI-HRMS (m/z): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₉H₂₆F₃NNaO₇S⁺: 492.12743 Da;
gefunden: 492.12931 Da

Synthese von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-4-carboxy-phenylalanin-*tert*-butylester **46**



N-*tert*-Butoxycarbonyl-*O*-trifluormethansulfonyl-tyrosin-*tert*-butylester **45** (235 mg, 0.501 mmol), dppp (12 mg, 0.030 mmol, 0.06 Äq.) und Pd(Ac)₂ (3.4 mg, 0.015 mmol, 0.03 Äq.) wurden in einem Gemisch aus DMF und Wasser (7 : 3, 7 mL) gelöst und die Lösung auf 70 °C erwärmt. Das Gemisch wurde mit CO gesättigt und DIPEA (255 µL, 1.501 mmol) über eine Spritze zugetropft. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Ballon mit CO versehen und für 1.5 h bei 70 °C gerührt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurde halbgesättigte NaHCO₃ Lösung (10 mL) zugegeben und dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl angesäuert bis ein Niederschlag ausfiel. Es wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Lyophilisation aus Dioxan ergab *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-4-carboxyphenylalanin-*tert*-butylester **46** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 156 mg, 86 %

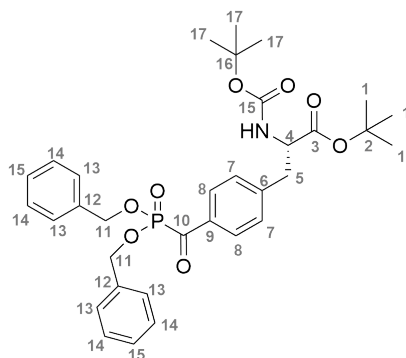
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 8.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-8), 7.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-7), 5.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.49 (dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-4), 3.13 (m, 2H, H-5), 1.42 (s, 9H, H-1 oder H-13), 1.40 (s, 9H, H-1 oder H-13)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 171.1 (C-10), 170.8 (C-3), 155.2 (C-11), 142.9 (C-6), 130.3 (C-8), 129.8 (C-7), 128.3 (C-9), 82.6 (C-2), 80.1 (C-12), 54.8 (C-4), 38.8 (C-5), 28.4 (C-1 oder C-13), 28.1 (C-1 oder C-13)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₉H₂₇NNaO₆⁺: 388.17306 Da;
gefunden: 388.17412 Da

Schmelzpunkt: 139 °C

Synthese von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-4-(*O*-dibenzyl-phosphono-carbonyl)-phenylalanin-*tert*-butylester **47**



N-*tert*-Butoxycarbonyl-4-carboxy-phenylalanin-*tert*-butylester **46** (137 mg, 0.375 mmol) wurde in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Es wurde langsam 1-Chlor-*N,N*,2-trimethyl-1-propenylamin (54 μ L, 0.413 mmol, 1.1 Äq.) über eine Spritze zugetropft und Lösung 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Tribenzylphosphit (380 mg, 1.08 mmol, 2.9 Äq.) wurde hinzugegeben und die Lösung auf 60 °C erwärmt. Nach 2.5 h wurde das Reaktionsgemisch säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM + 1 % AcOH). Die Produktfraktionen wurden unter vermindertem Druck eingeeengt und der ölige Rückstand im Stickstoffstrom getrocknet. *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-4-(*O*-dibenzyl-phosphono-carbonyl)-phenylalanin-*tert*-butylester **47** wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 150 mg, 65 %

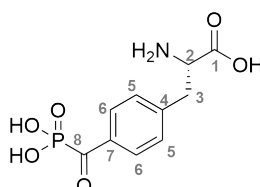
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = 8.16 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-8), 7.37 (m, 12H, H-7, H-13, H-14, H-15), 5.19 (2d, J = 8.1 Hz, 4H, H-11), 4.48 (dd, J = 6.6 Hz, J = 6.6 Hz, 1H, H-4), 3.13 (m, 2H, H-5), 1.42 (s, 9H, H-1 oder H-17), 1.40 (s, 9H, H-1 oder H-17)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = 197.7 (d, J = 174.4 Hz, C-10), 176.0 (C-3), 170.5 (C-15), 155.2 (C-6), 144.6 (C-8), 135.7 (m, C-9), 130.2, 130.1, 129.8, 128.7, 128.7, 128.3, 128.2, 128.1, 127.7, 127.1, 82.7 (C-2), 80.11 (C-16), 68.9 (2d, J = 7.4 Hz, C-11), 54.6 (C-4), 38.8 (C-5), 28.4 (C-1 oder C-17), 28.1 (C-1 oder C-17)

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = - 0.2 (p, J = 8.1 Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $C_{33}H_{42}NNaO_7P^+$: 618.25911 Da;
gefunden: 618.26129 Da

Synthese von 4-Phosphonocarbonylphenylalanin **48**



N-*tert*-Butoxycarbonyl-4-(*O*-dibenzyl-phosphono-carbonyl)-phenylalanin-*tert*-butylester **47** (150 mg, 0.243 mmol) wurde bei einer Temperatur von 0 °C in DCM (1 mL) gelöst und mit einem Gemisch aus TFA und Wasser (9 : 1, 1 mL) versetzt. Das Gemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und Pd/C (50 mg, 10 wt. %) zugegeben. Die Lösung wurde mit Stickstoff gesättigt, mit einem Ballon mit H₂ versehen und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der ölige Rückstand wurde in THF aufgenommen und **48** in kaltem Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und der Ether abdekantiert, wobei es zu einem signifikanten Produktverlust kam. Der Niederschlag wurde im Hochvakuum getrocknet, wobei 4-Phosphono-carbonyl-phenylalanin **48** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 10 mg, 15 %

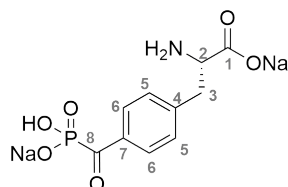
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 8.16 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-6), 7.41 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H-5), 4.20 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H-2), 3.17 (br d, J = 5.1 Hz, 2H, H-3)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 205.4 (d, J = 173.9 Hz, C-8), 170.3 (C-1), 141.2 (br s, C-4), 135.3 (d, J = 56.1 Hz, C-7), 129.7 (m, C-5 und C-6), 52.9 (C-2), 35.9 (C-3)

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = - 2.5

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{10}H_{13}NO_6P^+$: 274.04750 Da;
gefunden: 274.04783 Da

Synthese von Dinatrium-4-phosphono-carbonyl-phenylalanin 48-Na



N-*tert*-Butoxycarbonyl-*O*-trifluormethansulfonyl-tyrosin-*tert*-butylester **47** (171 mg, 0.281 mmol) wurde bei einer Temperatur von 0 °C in DCM (0.5 mL) gelöst und mit einem Gemisch aus TFA und Wasser (9 : 1, 1 mL) versetzt. Das Gemisch wurde 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt und Pd/C (40 mg, 10 wt. %) zugegeben. Die Lösung wurde mit Stickstoff gesättigt, das Reaktionsgefäß mit einem Ballon mit H₂ versehen und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft. Der ölige Rückstand wurde in THF aufgenommen und das Produkt in kaltem Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und der Ether abdekantiert. Der Niederschlag wurde im Stickstoffstrom getrocknet und in Wasser gelöst. Es wurde 0.5 h über Amberlite® Ionenaustauscherharz (IR120 Natriumform, 2.5 g) gerührt, das Harz abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Dinatrium-phosphono-carbonyl-phenylalanin **48-Na** wurde als weißer Feststoff erhalten.

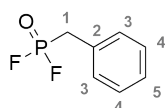
Ausbeute: 75 mg, 98 %

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ; ppm = 8.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-6), 7.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-5), 4.16 (dd, *J* = 8.2, 5.3 Hz, 1H, H-2), 3.43 (dd, *J* = 14.5, 5.2 Hz, 1H, H-3a oder H3-b), 3.24 (dd, *J* = 14.5, 8.2 Hz, 1H, H-3a oder H3-b)

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ; ppm = 207.66 (d, *J* = 169.4 Hz, C-8), 172.0 (C-1), 140.87 (C-4), 134.09 (d, *J* = 52.4 Hz, C-7), 129.0 (m, C-5 und C-6), 54.15 (C-2), 35.29 (C-3)

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ; ppm = - 0.5

Synthese von Difluorbenzylphosphonsäure 53



Benzylphosphonsäure (1.02 g, 5.92 mmol) und eine katalytische Menge DMF wurden in trockenem DCM (7 mL) suspendiert. Oxalylchlorid (1.52 mL, 17.74 mmol, 3 Äq.) wurde zutropft und das Gemisch für 2 h gerührt, wobei sich eine klare gelbe Lösung bildete. Das Lösungsmittel und der Überschuss an $(\text{COCl})_2$ wurde unter verminderten Druck in einer Kühlfalle kondensiert. Der feste Rückstand wurde auf 55 °C erwärmt, wobei sich ein Öl bildete. Trockenes Zinkfluorid (732 mg, 7.089 mmol, 1.2 Äq.) wurde zugegeben und das Gemisch für 1.5 h bei 70 °C gerührt. Nach Hochvakuumdestillation ($< 1.0 \times 10^{-3}$ mbar) wurde Difluorbenzylphosphonsäure **53** als farbloses Öl erhalten, welches bei längerer Lagerung in einen festen Zustand überging.

Ausbeute: 267 mg, 26 %

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 7.36 (m, 5H, H-3, H-4, H-5), 3.52 (dt, $J = 23$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 2H, H-1)

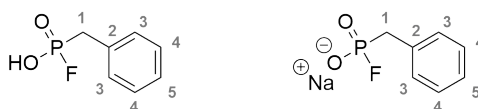
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 129.7 (d, $J = 7.7$ Hz, C-2), 129.5 (d, $J = 3.3$ Hz, C-4), 128.5 (d, $J = 4.4$ Hz, C-3), 126.9 (C-5), 30.7 (dt, $J = 140$ Hz, $J = 19.2$ Hz, C-1)

$^{19}\text{F-NMR}$ (282 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = - 66.4 (dt, $J = 1141$ Hz, $J = 4.2$ Hz)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 20.1 (t, $J = 1136$ Hz)

Schmelzpunkt: ≤ 25 °C

Synthese von Monofluorbenzylphosphonsäure und Natrium-Monofluorbenzylphosphonsäure **54**



Difluorbenzylphosphonsäure wurde bei 0 °C in vollentsalztem Wasser gelöst und für 3 min gerührt. Die Lösung wurde lyophilisiert wobei Monofluorbenzylphosphonsäure **54** als

farbloser Feststoff erhalten wurde.

Zum Erhalt der stabileren Natriumsalzform wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und anschließend der Rückstand erneut in Wasser aufgenommen und 10 min über Amberlite® Ionentauscherharz (Sulfon- oder Acetatbasis, natriumbeladen) gerührt. Nach Filtration und Lyophilisation wurde Natrium-Monofluorbenzylphosphonsäure **54** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 100%

NMR-Daten der Säureform

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ ; ppm = 7.39 (m, 5H, H-3, H-4, H-5), 3.21 (dd, $J = 21.8$ Hz, $J = 3.9$ Hz, 2H, H-1)

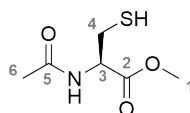
¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ ; ppm = 133.6 (m, C-2), 129.7 (d, $J = 7.7$ Hz, C-3), 128.9 (d, $J = 3.2$ Hz, C-4), 126.7 (d, $J = 4.4$ Hz, C-5), 33.4 (dd, $J = 136$ Hz, $J = 29.9$ Hz, C-1)

¹⁹F-NMR (282 MHz, D₂O): δ ; ppm = - 63.5 (dt, $J = 989$ Hz, $J = 3.9$ Hz)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ ; ppm = 24.9 (d, $J = 990$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): [M+H]⁺ berechnet für C₇H₉FO₂P⁺: 175.03187 Da;
gefunden: 175.03259 Da

Synthese von Acetylcysteinmethylester



Acetylcystein (2 g, 12.27 mmol) wurde in Methanol (20 mL) gelöst und auf - 20 °C abgekühlt. Thionylchlorid (1 mL, 13.87 mmol, 1.1 Äq.) wurde langsam zugetropft und die Lösung 3 h bei - 20 °C gerührt wobei sich die Lösung auf Raumtemperatur erwärmte. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Es wurde zweimal mit Wasser und mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Lyophilisation aus Dioxan ergab Acetylcysteinmethylester als weißen Feststoff.

Bei dieser Reaktion wurde die Bildung des Disulfid-verknüpften Oxidationproduktes beobachtet. Die anschließende Reduktion der Disulfidbindung, mittels elementarem Zink, führte zu einem starken Produktverlust. Daher wurde der erhaltene Acetylcysteinmethylester ohne weitere Aufreinigung verwendet.

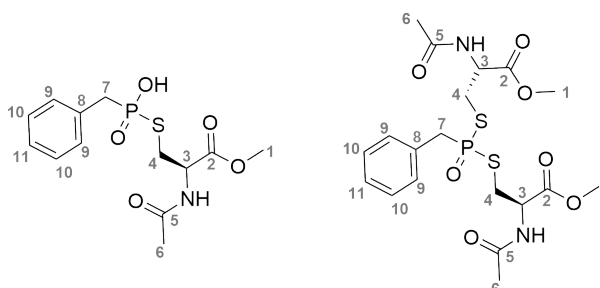
Ausbeute: 1.16 g, 54 %

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 8.21 (d, $J = 4.87$ Hz, 1H, NH), (m, 1H, H-3), 3.79 (s, 3H, H-1), 3.00 (m, 2H, H-4), 2.07 (s, 3H, H-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 170.8 (C-5), 170.0 (C-2), 53.67 (C-3), 52.94 (C-1), 27.00 (C-4), 23.27 (C-6)

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{S}^+$: 178.05 Da; gefunden: 178.3 Da

Synthese der Benzylphosphonsäure-*S*-(*N*-Acetyl-*O*-Me-Cysteinyl)-thioester **55** und **56**



Benzylphosphonsäure (50 mg, 0.290 mmol) wurde in trockenem DCM (6 mL) gelöst und mit einer katalytischen Menge DMF versetzt. Das Gemisch wurde auf 0 °C abgekühlt und Oxalylchlorid (68 μL , 0.792 mmol, 2.7 Äq.) zugetropft. Die Lösung rührte für 1 h, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Acetylcysteinmethylester (114 mg, 0.644 mmol, 2.2 Äq.) und DBU (43 μL , 0.290 mmol, 1 Äq.) wurden hinzugegeben. Die Menge der Base DBU wurde in zwei Portionen über einen Zeitraum von 1 h hinzugegeben, wobei sich die Lösung tiefrot färbte. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN und Wasser aufgenommen und mittels HPLC aufgereinigt ($\text{H}_2\text{O} + 1\%$ TFA

/ ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA). Die getrennten Thioester wurden nach Lyophilisation der Produktfraktionen als weißer Feststoff erhalten.

Monothioester 55

Ausbeute: 16.0 mg, 17 %

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 8.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.30 (m, 5-H, H-9, H-10, H-11), 4.40 (m, 1H, H-3), 3.62 (s, 3H, H-1), 3.31 (d, *J* = 18.5 Hz, 2H, H-7), 2.97 (m, 2H, H-4), 1.85 (s, 3H, H-6)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 170.7 (C-5), 169.4 (C-2), 132.8 (d, *J* = 9.3 Hz, C-8), 130.1 (d, *J* = 6.5 Hz, C-9), 128.1 (d, *J* = 3.3 Hz, C-10), 126.4 (d, *J* = 3.9 Hz, C-11), 53.1 (d, *J* = 3.0 Hz, C-3), 52.10 (C-1), 41.20 (d, *J* = 100.6 Hz, C-7), 30.64 (d, *J* = 2.6 Hz, C-4), 22.30 (C-6)

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 44.5 (vbr)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₃H₁₉NO₅PS⁺: 332.07 Da; gefunden: 332.0 Da

Dithioester 56

Ausbeute: 13.2 mg, 9 %

Mit dem Vorliegen einer weiteren Phosphor-gebundenen Aminosäure ergab sich für die Resonanz der Kerne jeweils ein doppelter Signalsatz.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 8.46 (2d, *J* = 7.8 Hz, 2H, NH), 7.31 (m, 5H, H-9, H-10, H-11), 4.49 (m, 2H, H-3), 3.82 (d, *J* = 15.1 Hz, 2H, H-7), 3.64 (2s, 6H, H-1), 3.12 (m, 4H, H-4), 1.85 (2s, 6H, H-6)

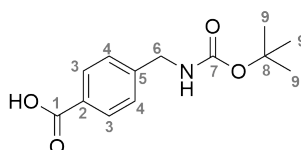
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 170.4 (2s, C-5), 169.5 (2s, C-2), 130.61 (d, *J* = 9.9 Hz, C-8), 130.5 (d, *J* = 6.7 Hz, C-9), 129.7 (d, *J* = 6.2 Hz, C-9), 128.4 (d, *J* = 3.9 Hz, C-10), 128.0 (d, *J* = 2.9 Hz, C-10), 127.3 (d, *J* = 4.5 Hz, C-11), 125.9 (d, *J* = 3.4 Hz, C-11), 52.5 (m, C-3), 52.3 (2s, C-1), 44.5 (br d, *J* = 66.2 Hz, C-7), 31.0 (d, *J* = 2.1 Hz,

C-4), 30.8 (d, $J = 2.1$ Hz, C-4), 22.3 (2s, C-6)

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 66.8 (hept, $J = 13.8$, $J = 12.5$ Hz)

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{PS}_2^+$: 491.11 Da; gefunden: 490.9 Da

Synthese von 4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzoesäure **58**



4-Aminomethylbenzoesäure (1 g, 6.6 mmol) wurde in einem Gemisch aus Dioxan und Wasser (1 : 1, 50 mL) suspendiert und NaHCO_3 (1.109 g, 13.2 mmol, 2 Äq.) zugegeben. Di-*tert*-butyldicarbonat (1.73 mL, 7.94 mmol, 1.2 Äq.) gelöst in 1 mL Dioxan wurde zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich nach 1 h eine klare Lösung bildete. Nach 16 h wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und Ethylacetat hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat gewaschen und mit 1 M HCl angesäuert bis ein Niederschlag ausfiel. Es wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet, wobei 4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzoesäure **58** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 1.537 g, 92%

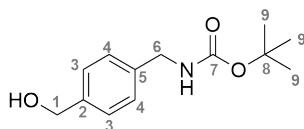
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; 12.86 (s, 1H, OH), 7.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3), 7.47 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, NH), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-4), 4.19 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-6), 1.39 (s, 9H, H-9)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 167.3 (C-1), 155.9 (C-7), 145.4 (C-5), 129.4 (C-3), 129.2 (C-2), 126.9 (C-4), 78.0 (C-8), 43.3 (C-6), 28.23 (C-9)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NNaO}_4^+$: 274.10498 Da; gefunden: 274.10522 Da

Schmelzpunkt: 167 °C

Synthese von 4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzylalkohol **59**



4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzoesäure **48** (331 mg, 1.313 mmol) wurde in THF (10 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. $\text{BH}_3 \bullet \text{DMS}$ in THF (1.25 mL, 2.5 mmol, 1.9 Äq.) wurde langsam zugetropft und die Lösung 20 min bei 0 °C gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 5 h wurde die Lösung erneut auf 0 °C abgekühlt und solange gesättigte NaHCO_3 Lösung zugetropft bis keine Wasserstoffentwicklung mehr erfolgte. Ethylacetat wurde hinzugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, wobei 4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzylalkohol **59** als öli-ger Rückstand erhalten wurde, der über längere Lagerung in einen festen Zustand überging.

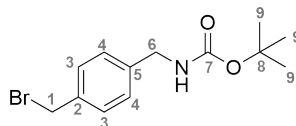
Ausbeute: 308 mg, 99%

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 7.36 (t, J = 6.6 Hz, 1H NH), 7.24 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-4), 7.17 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H-3), 5.12 (t, J = 5.7 Hz, 1H, OH), 4.45 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H-1), 4.09 (d, J = 6.2 Hz, 2H, H-6), 1.39 (s, 9H, H-9)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 155.8 (C-8), 140.8 (C-5), 126.7 (C-3), 126.7 (C-2), 126.4 (C-4), 77.7 (C-8), 62.7 (C-1), 43.2 (C-6), 28.3 (C-9)

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NNaO}_3^+$: 260.13 Da;
gefunden: 260.3 Da

Schmelzpunkt: ≤ 90 °C

Synthese von 4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzylbromid **60**

4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzylalkohol **59** (293 mg, 1.236 mmol) und Triphenylphosphin (896 mg, 3.42 mmol, 2.7 Äq.) wurden in trockenem THF (10 mL) gelöst und für 5 min bei 0 °C gerührt. *N*-Bromsuccinimid (605 mg, 3.42 mmol, 2.9 Äq.) wurde zugegeben, wobei sich ein brauner Niederschlag bildete. Die Lösung rührte für 20 min bei 0 °C und wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 2 h wurde zu der klaren braunen Lösung Kieselgel **60** hinzugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das auf Kieselgel gebundene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM + 1 % AcOH). Die Produktfraktionen wurden unter vermindertem Druck eingengt, wobei 4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzylbromid **60** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 169 mg, 49 %

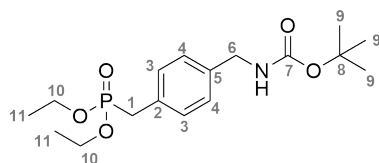
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 7.48 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH), 7.38 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3), 7.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-4), 4.69 (s, 2H, H-1), 4.11 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-6), 1.39 (s, 9H, H-9)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 156.0 (C-7), 139.5 (C-2), 136.9 (C-5), 129.4 (C-3), 127.9 (C-4), 79.7 (C-8), 44.4 (C-6), 33.3 (C-1), 28.50 (C-9)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₃H₁₈BrNNaO₂⁺: 322.04131 Da;
gefunden: 322.04124 Da

Schmelzpunkt: 90 °C

Synthese von Diethyl((4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl)methyl)phosphonat **61**



4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzylbromid **60** (319 mg, 1.063 mmol) und Triethylphosphit (1.820 g, 10.6 mmol, 10 Äq.) wurden in einem Mikrowellengefäß für 16 h bei 60 °C gerührt. Der sich gebildete Überdruck wurde mittels einer Kanüle entfernt und das Gemisch weitere 16 h bei 70 °C gerührt. Der Überschuss an Triethylphosphit wurde im Hochvakuum entfernt wobei Diethyl((4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl)methyl)phosphonat **61** als farbloses Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 370 mg, 97 %

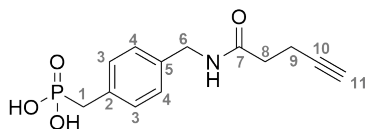
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.23 (m, 4H, H-3, H-4), 4.27 (s, 2H, H-6), 4.00 (m, 4H, H-10), 3.11 (d, *J* = 21.6 Hz, 2H, H-1), 1.44 (s, 9H, H-9), 1.23 (td, *J* = 7.0 Hz, *J* = 0.5 Hz, 6H, H-11)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 156.0 (C-7), 137.7 (d, *J* = 3.3 Hz, C-5), 130.8 (d, *J* = 9.2 Hz, C-2), 130.1 (d, *J* = 6.6 Hz, C-3), 127.9 (d, *J* = 2.6 Hz, C-4), 79.67 (C-8), 62.22 (d, *J* = 6.7 Hz, C-10), 44.48 (C-6), 33.52 (d, *J* = 138.3 Hz, C-1), 28.52 (C-9), 16.49 (d, *J* = 6.1 Hz, C-11)

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 27.4

ESI-MS (*m/z*): [M-*t*Bu+H]⁺ berechnet für C₁₃H₂₁NO₅P⁺: 302.12 Da;
gefunden: 302.0 Da

Synthese von Methyl((4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **67**



Diethyl((4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl)methyl)phosphonat **61** (101 mg, 0.282 mmol) wurde in einem Mikrowellengefäß in trockenem ACN (1 mL) gelöst und

TMSBr (187 μ l, 1.415 mmol, 5 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde 2 h bei 70 °C im Mikrowellenreaktor erhitzt und ein Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1) hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Der erhaltene braune Feststoff wurde in einem Gemisch aus Dioxan und Wasser (1 : 1, 5 mL) suspendiert und Na₂CO₃ (74 mg, 0.696 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben. Pentinsäuresuccinimidylester (41 mg, 0.209 mmol, 0.7 Äq.) wurde zugegeben und das Gemisch für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und lyophilisiert. Der erhaltene Feststoff **67** wurde in einem Gemisch aus ACN und Wasser gelöst und mittels HPLC aufgereinigt (H₂O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA).

Ausbeute: 45 mg, 77 %

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 7.27 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 2H, H-3), 7.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-4), 4.35 (s, 2H, H-6), 3.08 (d, $J = 21.6$ Hz, 2H, H-1), 2.48 (m, 2H, H-8), 2.43 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 2H, H-9), 2.27 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-11)

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 173.9 (C-7), 138.10 (d, $J = 3.7$ Hz, C-5), 133.50 (d, $J = 9.1$ Hz, C-2), 130.99 (d, $J = 6.4$ Hz, C-3), 128.60 (d, $J = 3.0$ Hz, C-4), 83.5 (C-10), 70.4 (C-11), 43.8 (C-6), 36.0 (C-8), 35.6 (d, $J = 134.8$ Hz, C-1), 15.7 (C-9)

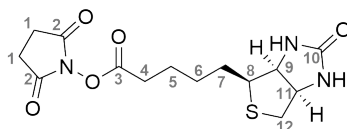
³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 21.4 (vb s)

ESI-HRMS (m/z): [M+H]⁺ berechnet für C₁₃H₁₇NO₄P⁺: 282.08897 Da;

gefunden: 282.08984 Da

Schmelzpunkt: 195 °C

Synthese von Biotinsuccinimidylester



Biotin (300 mg, 1.228 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (170 mg, 1.474 mmol, 1.2 Äq.) wurden in DMF (7 mL) gelöst und EDC•HCl (283 mg, 1.474 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Ethanol / Wasser / AcOH (95 : 4 : 1, 40 mL) umkristallisiert und der Niederschlag mit einer kalten Ethanol / Wasser / AcOH (95 : 4 : 1) Lösung gewaschen. Biotinsuccinimidylester wurde nach dem Trocknen als weißer Feststoff erhalten.

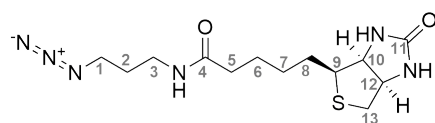
Ausbeute: 340 mg, 81 %

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 6.41 (s, 1H, NH), 6.35 (s, 1H, NH), 4.31 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-11), 4.15 (ddd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 4.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-9), 3.10 (m, 1H, H-8), 2.85 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H-12a oder H-12b), 2.81 (s, 4H, H-1), 2.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-4), 2.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-12a oder H-12b), 1.65 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-5), 1.46 (m, 4H, H-6 und H-7)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 170.3 (C-10), 168.9 (C-3), 162.7 (C-2), 61.0 (C-9), 59.2 (C-11), 55.2 (C-8), 39.9 (unter Solventsignal, C-12), 30.0 (C-4), 27.8 (C-7), 27.6 (C-6), 25.5 (C-1), 24.31 (C-5)

Schmelzpunkt: 219 °C

Synthese von *N*-(3-Azidopropyl)-biotinylcarboxamid **69**



Biotinsuccinimidylester (280 mg, 0.821 mmol), 3-Azido-propan-1-amin (90 µL, 0.9 mmol, 1.1 Äq.) und Triethylamin (227 µL, 1.642 mmol, 2 Äq.) wurden in einem Gemisch aus DMF und peroxidfreiem THF (4 : 1, 10 mL) gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mit peroxidfreiem Diethylether gefällt und der Niederschlag aus *iso*-Propanol / Hexan / Ethylacetat umkristallisiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Feststoff aus *tert*-Butanol und Wasser lyophilisiert. *N*-(3-Azidopropyl)-biotinylcarboxamid

69 wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 100 mg, 37 %

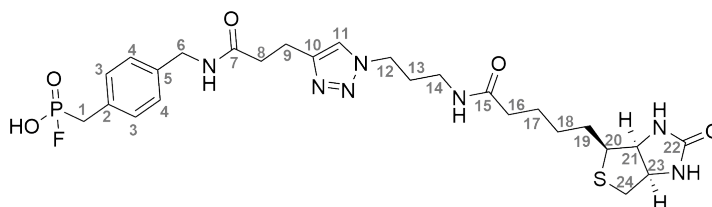
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 4.50 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-12), 4.31 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-10), 3.36 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-1), 3.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-3), 3.20 (m, 1H, H-9), 2.93 (dd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-13a oder H-13b), 2.71 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, H-13a oder H-13b), 2.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-5), 1.76 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-2), 1.62 (m, 4H, H-6, H-8), 1.45 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-7)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 176.1 (C-4), 166.1 (C-11), 63.4 (C-10), 61.6 (C-12), 57.0 (C-9), 50.1 (C-1), 41.0 (C-13), 37.7 (C-5), 36.8 (C-3), 29.8, 29.7, 29.5, 26.8 (C-6)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₃H₂₂N₆NaO₂S⁺: 349.14172 Da; gefunden: 349.14424 Da

Schmelzpunkt: 160 °C

Synthese von 4-(Methyl((3-(1-(3-(biotinyl-carboxamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-propanamido)methyl)(phenyl)methyl)monofluorosphonsäure **70**



Methyl((4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **67** (10 mg, 0.036 mmol) wurde in trockenem DCM (1 mL) suspendiert und auf 10 °C abgekühlt. Diethylaminoschwefeltrifluorid (14 µL, 0.107 mmol, 3 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre zuge tropft und das Gemisch 1 h gerührt, wobei sich eine klare Lösung bildete. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und Wasser (1 mL) hinzugegeben und 3 min bei Raumtemperatur gerührt. *N*-(3-Azidopropyl)-biotinylcarboxamid **69** (14 mg, 0.043 mmol, 1.2 Äq.), gelöst in einem Gemisch aus THF und Wasser (1 : 1, 3 mL), wurde

hinzugegeben. Natriumascorbat (3 mg, 0.014 mmol, 0.4 Äq.) und $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (1 mg, 0.004 mmol, 0.1 Äq.) wurden in Wasser gelöst (0.8 mL) und dem Reaktionsgemisch unter Stickstoffatmosphäre hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und TBTA (10 μl einer 10 mM Lösung in Wasser) zugegeben. Nach 30 min wurde die Lösung filtriert und mittels HPLC aufgereinigt (H_2O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA). Lyophilisation der Produktfraktionen ergab 4-(Methyl((3-(1-(3-(biotinyl-caboxamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-propanamido)methyl)(phenyl)methyl)monofluorphosphonsäure **70** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 7 mg, 32 %

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 8.37 (m, 1H, NH), 7.88 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, H-11), 7.21 (vb d, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-3), 7.12 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-4), 6.42 (vbr s, 2H, $\text{NH}_{\text{Biotin}}$), 4.27 (m, 3H, H-6, H-12, H-21 oder H-23), 4.12 (m, unter H_2O , 1H, H-21 oder H-23), 3.25 (d, $J = 22.0$ Hz, 2H, H-1), 3.10 (m, 1H, H-20), 3.03 (dt, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-14), 2.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-8), 2.82 (dd, $J = 12.5$ Hz, 5.1 Hz, 1H, H-24a oder H-24b), 2.57 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, H-24a oder H-24b), 2.48 (unter Solventsignal, 2H, H-9), 2.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-16), 1.90 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-13), 1.54 (m, 4H, H-17, H-19), 1.31 (m, 2H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 172.2 (C-15), 170.3 (C-7), 162.7 (C-22), 148.4 (C-10), 137.8 (d, $J = 11.1$ Hz, C-2), 130.4 (d, $J = 7.7$ Hz, C-5), 129.5 (m, C-3), 127.2 (d, $J = 3.6$ Hz, C-4), 61.1 (C-21), 59.2 (C-23), 55.4 (C-20), 47.1 (C-12), 41.8 (C-6 und C-24), 35.7 (C-14), 35.2 (C-16), 34.2 (C-8), 34.07 (d, $J = 120.9$ Hz, C-1), 30.0 (C-13), 28.2, 28.0, 25.3 (C-17), 21.33 (C-9)

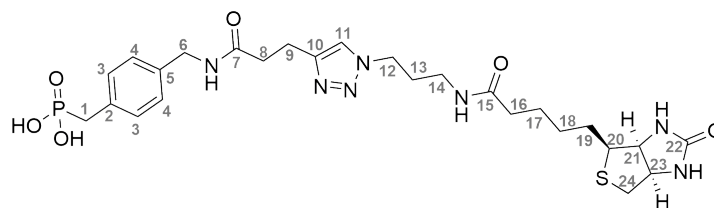
$^{19}\text{F-NMR}$ (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = - 64.0 (d, $J = 1026.0$ Hz)

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 23.9 (vb d, $J = 1033.7$ Hz)

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{FN}_7\text{O}_5\text{PS}^+$: 610.24 Da;
gefunden: 610.0 Da

Schmelzpunkt: 143 - 150 °C

Synthese von 4-(Methyl((3-(1-(3-(biotinyl-carboxamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-propanamido)methyl)(phenyl)methyl)phosphonsäure **71**



Methyl((4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **67** (20 mg, 0.072 mmol) und *N*-(3-Azidopropyl)-biotinylcarboxamid **69** (26 mg, 0.078 mmol, 1.1 Äq.) wurden in einem Gemisch aus Wasser / THF / DMSO / *tert*-Butanol und AcOH (7 : 7 : 5 : 4 : 0.5, 4 mL) gelöst. Natriumascorbat (7 mg, 0.036 mmol, 0.5 Äq.), CuSO₄•5 H₂O (3.6 mg, 0.015 mmol, 0.2 Äq.) und TBTA (10 µL einer 10 mM Lösung in Wasser) wurden in Wasser (100 µL) gelöst und zu dem Substanzgemisch gegeben. Das Lösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und mittels HPLC aufgereinigt (H₂O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA). Lyophilisation der Produktfraktionen ergab 4-(Methyl((3-(1-(3-(biotinyl-carboxamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)(phenyl)methyl)phosphonsäure **71** als weißen Feststoff.

Aubeute: 24.4 mg, 56 %

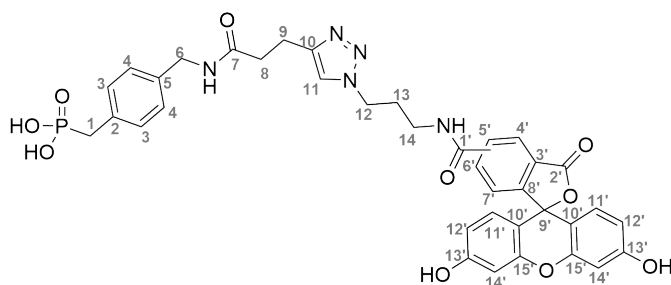
¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN): δ; ppm = 7.90 (s, 1H, H-11), 7.19 (dd, *J* = 6.3 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, H-3), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4), 4.44 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-23), 4.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-12), 4.26 (m, 1H, H-21), 4.23 (s, 2H, H-6), 3.16 (m, 1H, H-20), 3.08 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-14), 3.00 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-9) 3.07 (d, *J* = 21.6 Hz, 2H, H-1), 2.85 (dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-24a oder H-24b), 2.64 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-24a oder H-24b), 2.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-8), 2.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-16), 2.01 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-13), 1.55 (m, 4H, H-17, H-19), 1.33 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-18)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃CN): δ; ppm = 176.5 (C-15), 173.8 (C-7), 165.5 (C-22), 145.5 (C-10), 137.7 (d, *J* = 4.2 Hz, C-5), 132.7 (d, *J* = 9.5 Hz, C-2), 130.8 (d, *J* = 6.8 Hz, C-3), 128.4 (d, *J* = 3.5 Hz, C-4), 126.0 (C-11), 62.8 (C-21), 61.1 (C-23), 56.3 (C-20), 50.3 (C-12), 43.5 (C-6), 40.8 (C-24), 36.8 (C-14), 36.4 (C-16), 35.2 (C-8), 34.86 (d, *J* = 133.2 Hz, C-1), 29.9 (C-13), 29.1, 28.8, 26.2, 21.0 (C-9)

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃CN): δ; ppm = 28.5 (t, *J* = 21.5 Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{39}N_7O_6PS^+$: 608.24147 Da;
 gefunden: 608.24122 Da

Synthese von (4-((3-(1-(3-(Fluoresceinyl-5,6-caboxamido)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)(phenyl)methyl)phosphonsäure 72



Methyl((4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **67** (14 mg, 0.046 mmol) und *N*-(3-Azidopropyl)-fluorescein-5,6-carboxamid **17** (22 mg, 0.048 mmol, 1.1 Äq.) wurden in einem Gemisch aus Methanol / THF und H_2O (1 : 1 : 1, 4 mL) gelöst und unter Argonatmosphäre entgast. Natriumascorbat (9 mg, 0.045 mmol, 1.0 Äq.) und $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (3.4 mg, 0.014 mmol, 0.3 Äq.) wurden in Wasser gelöst (0.4 mL) und dem Reaktionsgemisch unter Stickstoffatmosphäre hinzugegeben. Die Lösung wurde im Ultraschallbad unter Stickstoffatmosphäre entgast und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde filtriert und mittels HPLC aufgereinigt (H_2O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA). Lyophilisation der Produktfraktionen ergab (4-((3-(1-(3-(Fluoresceinyl-5,6-caboxamido)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)(phenyl)methyl)phosphonsäure **72** als einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 25 mg, 73 %

Da bei dieser Reaktion ein Isomerengemisch aus 5- und 6-substituiertem Fluorescein eingesetzt wurde, ergibt sich für die Resonanz der Kerne ein doppelter Signalsatz.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ ; ppm = 8.92 und 8.77 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, -NH-Flu), 8.47 (m, 1H, H-5' $_{Fl-5er}$), 8.36 und 8.33 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH, -Phe- CH_2 -NH-), 8.25 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-6' $_{Fl-5er}$), 8.17 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-5' $_{Fl-6er}$),

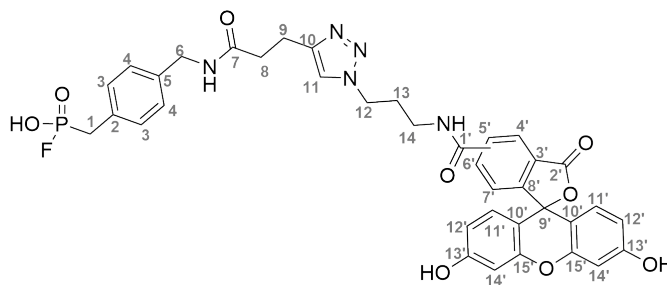
8.08 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 0.6$ Hz, 1H, H-4'_{Fl-6er}), 7.85 und 7.79 (s, 1H, H-11), 7.67 (m, 1H, H-6'_{Fl-6er}), 7.38 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J \approx 0.5$ Hz, 1H, H-7'_{Fl-5er}), 7.16 (2 dd, $J \approx 8.0$ Hz, $J \approx 2.2$ Hz, 2H, H-3), 7.09 und 7.07 (d, $J \approx 8.1$ Hz, 2H, H-4), 6.69 (t, $J = 2.6$ Hz, 2H, H-14'_{Fl-5er} und H-14'_{Fl-6er}), 6.60 und 6.58 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, H-11'_{Fl-5er} und _{Fl-6er}), 6.56 und 6.54 (dd, $J = 4.4$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 2H, H-12'_{Fl-5er} und H-12'_{Fl-6er}), 4.39 und 4.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-12), 4.21 (2 d, $J \approx 6.6$ Hz, 2H, H-6), 3.33 und 3.21 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-14), 2.92 und 2.91 (d, $J = 21.4$ Hz, 2H, H-1), 2.87 und 2.83 (t, $J \approx 7.8$ Hz, 2H, H-9), unter Solventsignal und 2.45 (t, $J \approx 7.8$ Hz, 2H, H-8), 2.08 und 1.99 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-13)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 171.0 (C-7), 168.2 und 168.1 (C-2'), 164.8 und 164.7 (C-1'), 159.6 (C-13'), 154.7, 152.7, 151.9, 140.6, 137.2 (m, C-2), 136.18, 134.7 (C-6'_{Fl-5er}), 132.6 (m, C-5), 129.6 (d, $J = 6.1$ Hz, C-3), 129.4 (C-6'_{Fl-6er}), 129.3 und 129.2 (C-11'), 129.2, 128.2, 126.9 (d, $J = 2.3$ Hz, C-4), 126.5, 124.9 (C-4'_{Fl-6er}), 124.3 (C-7'_{Fl-5er}), 123.3 (C-4'_{Fl-5er}), 122.3 und 122.2 (C-11, C-7'_{Fl-6er}), 112.8 und 112.7 (C-12'), 109.2, 102.3 (C-14'), 83.5 (C-9'), 47.2 (C-12), 41.8 (C-6), 36.8 (C-14), 35.0 (d, $J = 133.1$ Hz, C-1), 34.9 (C-8), 29.8 und 29.7 (C-13), 21.4 (C-14)

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 21.87

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₃₇H₃₅N₅O₁₀P⁺: 740.21161 Da;
gefunden: 740.21118 Da

Synthese von (4-((3-(1-(3-(Fluoresceinyl-5,6-carboxamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)(phenyl)methyl)monofluorosphonsäure 73



Methyl((4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **67** (7 mg, 0.023 mmol) wurde in trockenem DCM (1 mL) suspendiert. Diethylaminoschwefeltrifluorid (9 μ L, 0.069

mmol, 3 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre zugetropft, wobei sich eine klare Lösung bildete. Das Gemisch wurde für 50 min gerührt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Es wurde Wasser (1.25 mL) hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Der Lösung wurde mit THF (1.25 mL) versetzt und *N*-(3-Azidopropyl)-fluorescein-5,6-carboxamid **17** (11 mg, 0.023 mmol) hinzugegeben. Natriumascorbat (2 mg, 0.009 mmol, 0.4 Äq.) und CuSO₄•5 H₂O (1.5 mg, 0.006 mmol, 0.3 Äq.) wurden in Wasser gelöst (0.8 mL) und dem Reaktionsgemisch unter Stickstoffatmosphäre hinzugegeben. Die Lösung wurde im Ultraschallbad unter Stickstoffatmosphäre entgast und 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde filtriert und mittels HPLC aufgereinigt (H₂O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA). Lyophilisation der Produktfraktionen ergab 4-((3-(1-(3-(Fluoresceinyl-5,6-carboxamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)(phenyl)methyl)monofluorphosphonsäure **73** als einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 11 mg, 63 %

*Da bei dieser Reaktion ein Isomerengemisch aus 5- und 6-substituiertem Fluorescein eingesetzt wurde, ergibt sich für die Resonanz der Kerne ein doppelter Signalsatz. Die Substanz wurde in einem Gemisch aus CD₃CN, DMSO-*d*₆ und D₂O gelöst und die Spektren auf das Solventsignal von DMSO-*d*₆ referenziert.*

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN / DMSO-*d*₆ / D₂O): δ; ppm = 8.31 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-4' *Fl-5er*), 8.05 (m, 2H, H-4' *Fl-6er*, H-6' *Fl-5er*), 7.97 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-5' *Fl-6er*), 7.69 (s, 1H, H-11), 7.60 (s, 1H, H-11), 7.48 (br s, 1H, H-7' *Fl-6er*), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7' *Fl-5er*), 7.07 (2dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.4 Hz, 2H, H-3), 6.94 (2d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-4), 6.80 (2d, *J* = 2.6 Hz, 2H, H-14'), 6.74 (2d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-11'), 6.62 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.6 Hz, 2H, H-12'), 4.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-12), 4.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-12), 4.25 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-14), 4.00 (s, unter H₂O, 2H, H-6), 4.10 (s, 2H, H-6), 3.28 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-14), 3.15 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-14), 2.89 (m, 4H, H-1, H-9), 2.46 (m, 2H, H-8), 2.09 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-13), 1.97 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-13)

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃CN / DMSO-*d*₆ / D₂O): δ; ppm = 174.9, 173.1, 168.4, 165.3, 156.0, 135.3 (m, C-5), 131.5 (m, C-2), 131.0 (m, C-3), 128.6 (m, C-4), 115.7, 115.6, 115.6, 104.0, 103.90, 49.76, 43.72, 43.65, 36.21, 36.17, 31.62, 31.0 (2d, *J* ≈ 133 Hz, C-1), 30.3, 25.9, 25.5, 23.1, 22.2

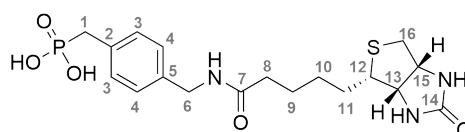
Die Signale der ^{13}C -Kerne konnten nicht vollständig aufgelöst werden.

^{19}F -NMR (376 MHz, CD_3CN / $\text{DMSO}-d_6$ / D_2O): δ ; ppm: - 64.3 (2d, $J = 987$ Hz)

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD / CD_3CN): δ ; ppm = 25.29 (d, $J = 984$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{33}\text{FN}_5\text{NaO}_9\text{P}^+$: 764.18921 Da;
gefunden: 764.19083 Da

Synthese von 4-(((Biotinyl)carboxamido)methyl)benzylphosphonsäure **74**



Diethyl((4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl)methyl)phosphonat **61** (101 mg, 0.282 mmol) wurde in einem Mikrowellengefäß in trockenem ACN (2 mL) gelöst und TMSBr (148 μl , 1.122 mmol, 4 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und ein Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1) hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einem Gemisch aus Dioxan und Wasser (1 : 3, 4 mL) suspendiert. Na_2CO_3 (41 mg, 0.392 mmol, 1.4 Äq.) und Biotinsuccinimidylester (67 mg, 0.196 mmol, 0.7 Äq.) wurden zugegeben und das Gemisch für 2 Tage gerührt. Die Lösung wurde filtriert und lyophilisiert. Der erhaltene Feststoff **74** wurde in einem Gemisch aus ACN und Wasser gelöst und mittels HPLC aufgereinigt ($\text{H}_2\text{O} + 1\%$ TFA / $\text{ACN} + 1\%$ TFA, 20 min, 5-70 % $\text{ACN} + 1\%$ TFA), wobei 4-(((Biotinyl)carboxamido)methyl)benzylphosphonsäure **74** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 19.5 mg, 23 %

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ; ppm = 7.15 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-3), 7.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-4), 4.34 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-15), 4.19 (s, 2H, H-6), 4.14 (dd(d), $J = 7.9$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-13, unter H_2O), 3.08 (dt, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-12), 2.94 (d, $J = 21.4$ Hz, 1H, H-1), 2.80 (dd, $J = 12.7$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H, H-16a oder H-16b), 2.58 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, H-16a oder H-16b), 2.12 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H,

H-8), 1.65 - 1.25 (m, 6H, H-9, H-10, H-11)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 174.3 (C-7), 164.2 (C-14), 137.9 (d, $J = 3.5$ Hz, C-5), 132.9 (d, $J = 9.1$ Hz, C-2), 130.5 (d, $J = 6.2$ Hz, C-3), 127.9 (d, $J = 2.8$ Hz, C-4), 62.1 (C-13), 60.2 (C-15), 56.2 (C-12), 42.6 (C-6), 40.6 (C-16), 36.0 (C-8), 35.23 (d, $J = 131.3$ Hz, C-1), 29.1 (C-11), 28.7 (C-10), 26.1 (C-9)

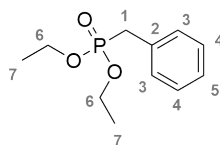
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 22.6

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{PS}^+$: 428.14035 Da;

gefunden: 428.14019 Da

Schmelzpunkt: 265-275 °C

Synthese von Diethylbenzylphosphonat



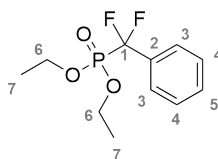
Benzylbromid (500 μL , 4.21 mmol) und Triethylphosphit (793 μL , 4.632 mmol, 1.1 Äq.) wurden für 16 h in einem Mikrowellengefäß bei 130 °C im Ölbad erhitzt. Der Überschuss an Triethylphosphit wurde im Hochvakuum entfernt, wobei Diethylbenzylphosphonat als leicht gelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 960 mg, 100 %

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{P}^+$: 229.09881 Da;

gefunden: 229.09902 Da

Synthese von Diethyl(difluor(phenyl)methyl)phosphonat



Diethylbenzylphosphonat (835 mg, 3.662 mmol) wurde in trockenem THF (7 mL) gelöst und auf -78 °C abgekühlt. NaHMDS (1.675 g, 9.156 mmol, 2.5 Äq.) wurde hinzugeben und das Gemisch für 2.5 h gerührt. NFBS (3.112 g, 9.880 mmol, 2.7 Äq.) wurde hinzugegeben, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Das Gemisch rührte für 16 h, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Ethylacetat und gesättigte NaHCO₃ Lösung wurden zugegeben und die Phasen getrennt. Es wurde viermal mit gesättigter NaHCO₃ Lösung und dreimal mit 1 M HCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan / Ethylacetat, 0 - 25 % Ethylacetat), wobei Diethyl(difluor(phenyl)methyl)phosphonat als leicht gelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 566 mg, 58 %

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.61 (m, 2H), 7.46 (m, 3H), 4.17 (br m, 4H, H-6), 1.30 (dt, *J* = 7.1 Hz, *J* = 0.6 Hz, 6H, H-7)

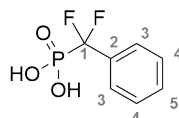
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 130.9 (m), 128.5 (d, *J* = 1.5 Hz), 126.3 (dt, *J* = 6.8 Hz, *J* = 2.3 Hz, C-1), 64.91 (d, *J* = 6.7 Hz, C-6), 16.44 (d, *J* = 5.6 Hz, C-7)

¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃): δ; ppm = -108.4 (d, *J* = 114.7 Hz)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.5 (d, *J* = 116.5 Hz)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₁H₁₆F₂O₃P⁺: 265.08 Da;
gefunden: 265.1 Da

Synthese von (Difluor(phenyl)methyl)phosphonsäure 76



Diethyl(difluor(phenyl)methyl)phosphonat (0.40 g, 1.51 mmol) wurde in einem Mikrowellengefäß in trockenem Acetonitril (1.5 ml) gelöst. TMSBr (0.60 mL, 4.54 mmol, 3 Äq.) wurde hinzugegeben und das Gemisch für 2 h im Mikrowellenreaktor bei 70 °C erhitzt. Es wurde ein Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1, 10 mL) zugegeben und lyophilisiert. (Difluor(phenyl)methyl)phosphonsäure **76** wurde als leicht brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 280 mg, 88 %

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 7.47 (m, 5H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 130.8 (d, *J* = 2.3 Hz), 129.0 (d, *J* = 14.0 Hz), 126.8 (d, *J* = 2.2 Hz), 126.7 (d, *J* = 1.6 Hz), 126.6 (m)

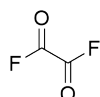
¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = -108.5 (d, *J* = 107.1 Hz)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 4.1 (t, *J* = 107.0 Hz)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₇H₈F₂O₃P⁺: 209.01736 Da;
gefunden: 209.01738 Da

Schmelzpunkt (Natriumsalz): > 300 °C

Synthese von Oxalylfluorid



NaF (2.9 mg, 70.0 mmol) wurde im Hochvakuum getrocknet und Sulfolan (5 mL) zugegeben. Oxalylchlorid (2 mL, 23.307 mmol, 0.3 Äq.) wurde langsam zugetropft und das Gemisch 16 h gerührt. Die Lösung wurde kurz unter Argonatmosphäre auf 40 °C erwärmt und unter vermindertem Druck destilliert (200 mbar, 80 °C, 2 h). Das Destillat wurde in einem Schlenkrohr bei einer Temperatur von - 78 °C kondensiert. Das bei - 78 °C als Feststoff vorliegende Oxalylfluorid wurde unter vermindertem Druck in ein weiteres Schlenkrohr überkondensiert (Vorlage: - 78 °C, erstes Schlenkrohr: Raumtemperatur). Das doppelt destillierte Oxalylfluorid wurde in trockenem ACN-*d*₃ gelöst (1 : 3) und bei - 20 °C gelagert.

Acetonitril erwies sich als einzig dienliches Lösungsmittel, obgleich die Oxalylfluoridlösung nach wenigen Tagen Lagerung eine gelbe Verfärbung bis hin zur Entwicklung einer braunen Lösung zeigte.

Auf spektroskopische Analytik wurde aufgrund des Gefahrenpotenzials dieser Verbindung verzichtet. Die Reaktivität der Lösung wurde in der vollständigen Fluorierung von Benzylphosphonsäure evaluiert (Abb. 5.2).

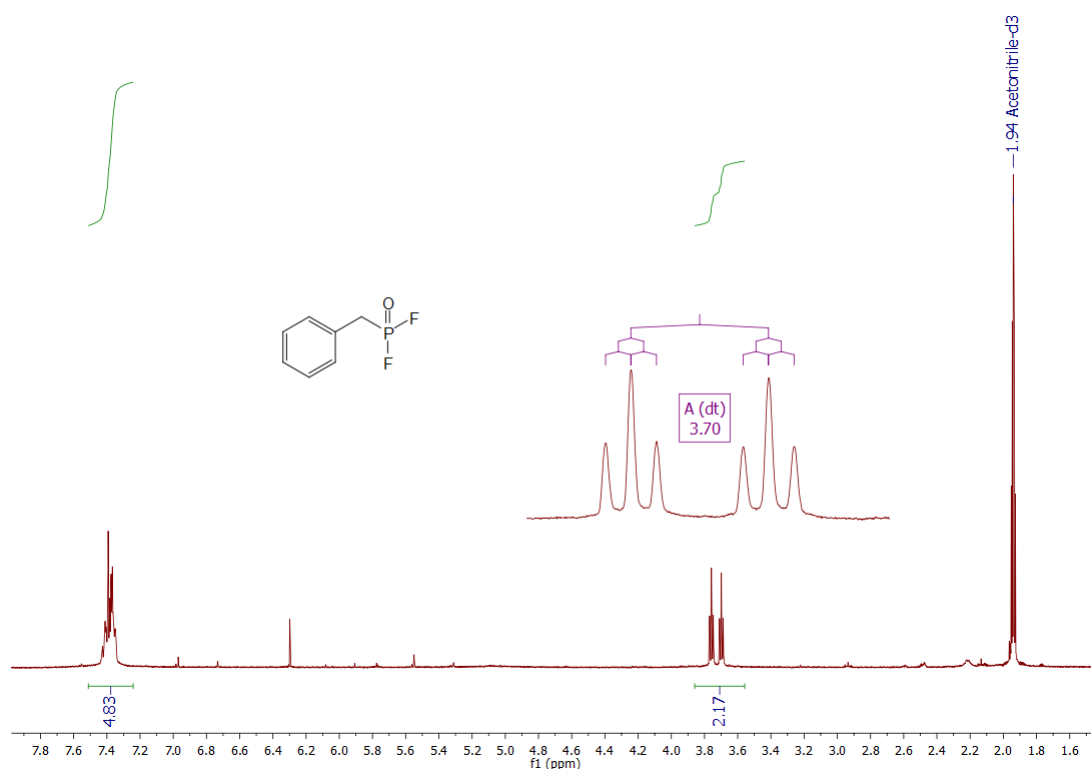
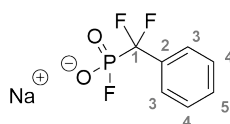


Abb. 5.2 ^1H -Spektrum der vollständigen Fluorierung von Benzylphosphonsäure mittels Oxalylfluorid.

Synthese von Natrium-(Difluor(phenyl)methyl)phosphonsäuremonofluorid **77**



(Difluor(phenyl)methyl)phosphonsäure **76** (20 mg, 0.096 mmol) wurde in einem Schlenkrohr auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Oxalylfluorid (250 μL , ACN Lösung) wurde hinzugegeben und das Gemisch 30 min gerührt. Das Lösungsmittel und der Überschuss an $(\text{COF})_2$ wurden im Stickstoffstrom entfernt und Amberlite® Ionenaustauscherharz (Acetatbasis, natriumbeladen) sowie Wasser (1 mL) zugegeben und für 3 min bei Raumtemperatur gerührt. Natrium-(Difluor(phenyl)methyl)phosphonsäuremonofluorid **76** wurde als leicht brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 16.3 mg, 73 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ ; ppm = 7.55 (m, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ ; ppm = 130.9 (br m), 130.3 (br m), 128.7 (br m), 128.4 (br m), 125.7 (vbr m, C-1)

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, D_2O): δ ; ppm = - 75.6 (d, $J = 1036$ Hz, P-F), - 108.4 (d, $J = 114.8$ Hz, CF_2)

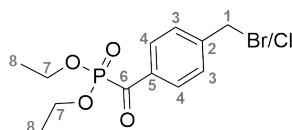
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, D_2O): δ ; ppm = 2.7 (dt, $J = 1036$ Hz, $J = 114.4$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M-H}]^-$ berechnet für $\text{C}_7\text{H}_5\text{F}_3\text{O}_2\text{P}^-$: 208.99847 Da;

gefunden: 208.99873 Da

Schmelzpunkt: > 300 °C

Synthese von Diethyl(4-(brommethyl)benzoyl)phosphonat **79**



4-(Bromomethyl)benzoesäure (1.010 g, 4.73 mmol) wurde in trockenem DCM (15 mL) suspendiert und mit einer katalytischen Menge DMF versetzt. Das Gemisch wurde auf 10 °C abgekühlt und Oxalylchlorid (610 μL , 7.11 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft. Die Lösung rührte für 1.5 h wobei sie sich fast vollständig klärte. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und erneut in trockenem DCM (5 mL) gelöst. Es wurde Triethylphosphit (893 μL , 5.21 mmol, 1.1 Äq.) zugetropft und die Lösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Während dieser Reaktion bildete sich das gewünschte Produkt Diethyl(4-(bromomethyl)benzoyl)phosphonat **79**, sowie das durch Halogenaustausch entstandene Diethyl(4-(chloromethyl)benzoyl)phosphonat in einem Verhältnis von $\approx 1 : 1$. Ferner besteht die Gefahr einer Polymerisationsreaktion, sodass in vielen Ansätzen ein stark viskoses klebriges Öl erhalten wurde, welches nur sehr schwer aufzureinigen war. Die erhaltene Masse ließ sich in gängigen Lösungsmitteln nicht vollständig in Lösung bringen, was in folgenden Aufreinigungsschritten zu einem starken Produktverlust führte.

Ausbeute: 210 mg, 14 % bezogen auf ein 1 : 1 Gemisch der Produkte

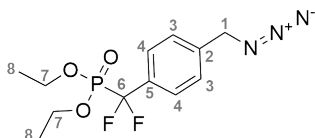
Aufgrund des Vorliegens von zwei verschiedenen Verbindungen, ergab sich für einige Signale ein doppelter Signalsatz

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 8.27 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-4), 8.24 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-4), 7.54 und 7.51 (2m, 2H, H-3), 4.62 (s, 2H, H-1), 4.49 (s, 2H, H-1), 4.28 (dq, *J* = 8.0 Hz, 7.1 Hz, 4H, H-7), 1.38 (td, *J* = 7.1 Hz, *J* = 0.6 Hz, 6H, H-8)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 130.5 (d, *J* = 1.9 Hz, C-2 oder C-4), 130.4 (d, *J* = 1.9 Hz, C-2 oder C-4), 129.6 (d, *J* = 1.3 Hz, C-5), 129.0 (d, *J* = 1.3 Hz, C-2), 64.3 (d, *J* = 7.9 Hz, C-7), 45.3 (C-1), 32.0 (C-1), 16.5 (d, *J* = 5.9 Hz, C-8)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₂H₁₆ClNaO₄P⁺: 313.03669 Da;
gefunden: 313.0366 Da

Synthese von Diethyl((4-(azidomethyl)phenyl)-difluormethyl)phosphonat **81**



Das verwendete Edukt Diethyl(4-((brom/chlor)methyl)-benzoyl)phosphonat **79** wurde als Rohprodukt eingesetzt, da eine vorherige Aufreinigung nicht möglich war, bzw. mit einem zu starken Produktverlust einherging.

Diethyl(4-((brom/chlor)methyl)-benzoyl)phosphonat (1.295 g, 3.76 mmol) wurde in trockenen DCM (40 mL) suspendiert und auf - 20 °C abgekühlt. Diethylaminoschwefeltrifluorid (1.48 mL, 11.3 mmol, 3 Äq.) wurde langsam zugetropft und die Mischung für 16 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde zweimal mit 0.1 M NaOH Lösung, 1 M HCl Lösung und gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, wobei ein klebriges Öl erhalten wurde. Der Rückstand wurde in DMF aufgenommen, NaN₃ (743 mg, 11.42 mmol, 10 Äq., bezogen auf 394 mg Rohprodukt der Fluorierung) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Ethylacetat hinzuge-

geben und die organische Phase zweimal mit 0.1 M NaOH Lösung, einmal mit 1 M HCl und gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan + 1 % AcOH, DCM / MeOH (9 : 1); 0 - 100 % DCM / MeOH (9 : 1)), wobei Diethyl((4-(azidomethyl)phenyl)-difluormethyl)phosphonat **81** als leicht gelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 141 mg, 12 %

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): δ; ppm = 7.60 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-4), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3), 4.45 (s, 2H, H-1), 4.13 (m, 4H, H-7), 1.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, H-8)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃CN): δ; ppm = 140.2 (q, *J* = 2.4 Hz), 129.4 (d, *J* = 1.3 Hz), 127.6 (td, *J* = 7.0, *J* = 2.3 Hz, C-5), 122.92, 120.32, 65.89 (d, *J* = 6.9 Hz, C-7), 54.54 (C-1), 16.67 (d, *J* = 5.4 Hz, C-8)

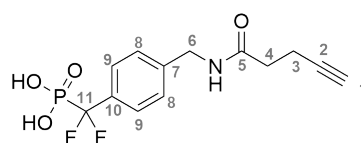
Die Zuordnung der aromatischen ¹³C-Signale konnte nicht eindeutig erfolgen.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CD₃CN): δ; ppm: - 109.01 (d, *J* = 113.6 Hz)

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃CN): δ; ppm = 6.2 (t, *J* = 113.8 Hz)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₂H₁₆F₂N₃NaO₃P⁺: 342.07896 Da;
gefunden: 342.07890 Da

Synthese von (Difluor(4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **82**



Diethyl((4-(brom/chlor-methyl)phenyl)difluormethyl)phosphonat⁸ (128 mg, 0.371 mmol) wurde in DMF (5 mL) gelöst, NaN₃ (241 mg, 3.71 mmol, 10 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Ethylacetat hinzugegeben, zweimal mit 0.1 M NaOH Lösung, 1 M HCl Lösung und gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt

⁸erhalten aus α, α-Fluorierung von **79**

und der Rückstand in Methanol (5 mL) gelöst. Es wurde AcOH (100 µl) und Pd/C (20 mg, 10 wt. %) zugegeben und die Lösung mit Stickstoff gesättigt. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Ballon mit H₂ versehen und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet, in einem Mikrowellengefäß in trockenem ACN (2 mL) gelöst und TMSBr (180 µL, 1.365 mmol, 4 Äq., *bezogen auf 100 mg Rohprodukt der Reduktion*) zugegeben. Die Lösung wurde 3 h im Mikrowellenreaktor bei 70 °C erhitzt, wobei sich ein blass-brauner Niederschlag bildete. Der Silylester wurde mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1) hydrolysiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in THF (5 mL) gelöst und gesättigte NaCO₃ Lösung zugegeben bis sich ein leicht basischer pH-Wert eingestellt hatte. Pentinsäuresuccinimidylester **19** (60 mg, 0.303 mmol, 0.9 Äq., *bezogen auf Diethyl((4-(brom/chlor-methyl)phenyl)difluormethyl)phosphonat*) wurde zugegeben und das Gemisch 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit TFA angesäuert und das Reaktionsgemisch durch einen Spritzenfilter filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in einem Gemisch aus ACN und Wasser gelöst und mittels HPLC aufgereinigt (H₂O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA). Während der chromatographischen Trennung ergab sich ein Gerätedefekt, der zu einen signifikanten Produktverlust führte. Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert, wobei (Difluor(4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **82** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 24.4 mg, 21 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-9), 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-8), 4.43 (s, 2H, H-6), 2.48 (m, 4H, H-3, H-4), 2.28 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-1)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 142.51 (m), 128.30 (m), 127.53 (td, *J* = 7.1 Hz, *J* = 2.0 Hz, C-10), 83.53 (C-2), 70.43 (C-1), 43.72 (C-6), 36.02 (C-4), 15.73 (C-3)

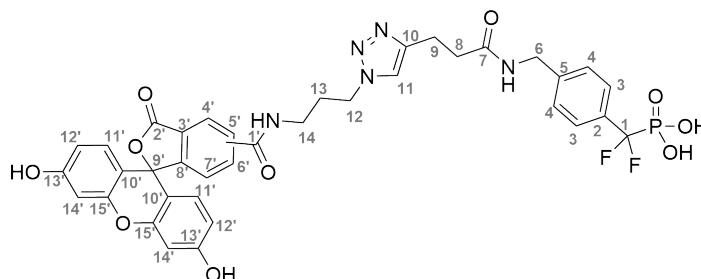
Die aromatischen ³¹P-gekoppelten ¹³C-Signale konnten nicht vollständig aufgelöst werden.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CD₃OD): δ; ppm: - 111.0 (d, *J* = 113.2 Hz)

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 5.9 (t, *J* = 113.3 Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{13}H_{15}F_2NO_4P^+$: 318.07013 Da;
gefunden: 318.07115 Da

Synthese von 4-(Difluor((3-(1-(3-(fluoresceinyl-5,6-caboxamido)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)(phenyl)methyl)phosphonsäure **84**



N-(3-Azidopropyl)-fluorescein-5,6-carboxamid **17** (20 mg, 0.043 mmol) und (Difluor(4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **82** (13 mg, 0.043 mmol, 1 Äq.) wurden in einem Gemisch aus Wasser / THF / DMF und Methanol gelöst und die Lösung mit Stickstoff gesättigt. Natriumascorbat (5 mg, 0.026 mmol, 0.6 Äq.) und $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (3 mg, 0.013 mmol, 0.3 Äq.) wurden in einem gesonderten Reaktionsgefäß in Wasser gelöst und unter Stickstoffatmosphäre der Mischung zugeführt. Das Gemisch wurde für 16 h unter Stickstoffatmosphäre gerührt, über einen Spritzenfilter filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus ACN und Wasser gelöst und mittels HPLC aufgereinigt ($H_2O + 1\%$ TFA / ACN + 1% TFA, 20 min, 5-70% ACN + 1% TFA). Lyophilisation der Produktfraktionen ergab 4-(Difluor((3-(1-(3-(fluoresceinyl-5,6-caboxamido)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)(phenyl)methyl)phosphonsäure **84** als einen gelben Feststoff. Die Natriumform von **84** wurde nach Behandlung mit Amberlite® Ionentauscherharz erhalten.

Ausbeute: 19 mg, 56 %

Da bei dieser Reaktion ein Isomerengemisch aus 5- und 6-substituiertem Fluorescein eingesetzt wurde, ergab sich für die Resonanz der Kerne ein doppelter Signalsatz. Die Substanz wurde in einem Gemisch aus CD_3OD und CD_3CN gelöst und die Spektren auf

das Solventsignal von CD_3OD referenziert.

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD / CD_3CN): δ ; ppm = 8.47 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-4' $_{Fl-5er}$), 8.20 (dd, $J = 8.0, J = 1.7$ Hz, 1H, H-6' $_{Fl-5er}$), 8.15 (m, 2H, H-4' $_{Fl-6er}$, H-5' $_{Fl-6er}$), 7.74 (s, 1H, H-1), 7.67 (s, 1H, H-1), 7.66 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7' $_{Fl-6er}$), 7.55 (2d, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-3), 7.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-7' $_{Fl-5er}$), 7.30 (m, 2H, H-4), 6.83 (m, 2H, H-14' $_{Fl-5,6er}$), 6.78 (2d, $J = 8.7$ Hz, H-11' $_{Fl-5,6er}$) 6.67 (2dd, $J = 8.7, J = 2.4$ Hz, 2H, H-12' $_{Fl-5,6er}$), 4.47 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-12), 4.37 (m, unter H_2O , 4H, H-6, H-12) 3.45 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-14), 3.31 (m unter Solventsignal, 2H, H-14), 3.00 (m, 4H, H-9), 2.61 (m, 4H, H-8), 2.23 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-13), 2.12 (p, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-13)

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD / CD_3CN): δ ; ppm = 174.1 (C-7), 169.8 (C-2), 168.1 (2s, C-1'), 162.9 (C-13'), 154.9 (C-15), 147.4 (C-10), 142.4, 141.7, 137.7, 135.0, 131.0, 130.3, 129.0, 128.7, 128.4, 128.2, 127.4 (m, C-2), 126.4, 125.8, 124.9, 123.9, 114.8, 111.9, 103.5 (2s, C-3), 88.5 (9'), 48.3 (C-12), 43.5 (C-6), 38.2 und 38.1 (C-14), 36.1 (2s, C-8), 30.7 (2s, C-13), 22.3 (2s, C-9)

^{19}F -NMR (376 MHz, CD_3OD / CD_3CN): δ ; ppm: - 110.1 (2d, $J = 110.8$ Hz)

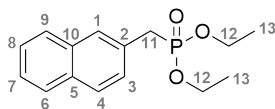
^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD / CD_3CN): δ ; ppm = 5.2 (2t, $J = 110.6$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{37}H_{33}F_2N_5O_{10}P^+$: 776.19276 Da;
gefunden: 776.19203 Da

Das Monofluorid **85** wurde im Mikromaßstab dargestellt, sodass keine NMR-spektroskopischen Daten erhoben wurden.

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{37}H_{32}F_3N_5O_9P^+$: 778.18843 Da; gefunden:
778.19087 Da

Synthese von Diethyl(2-naphthyl-methyl)phosphonat **87**



2-(Brommethyl)naphthalin (1 g, 4.566 mmol) und Triethylphosphit (860 μ l, 5.025 mmol, 1.1 Äq.) wurden in einem Mikrowellengefäß gemischt und für 3 h bei 120 °C im Mikrowel-

lenreaktor erhitzt. Das erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan / Ethylacetat, 0 – 100 % Ethylacetat), wobei Diethyl(2-naphthyl-methyl)phosphonat **87** als farbloses Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 1.018 g, 80 %

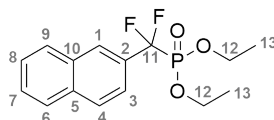
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.80 (m, 3H, H-4, H-6, H-9), 7.75 (m, 1H, H-1), 7.45 (m, 3H, H-3, H-7, H-8), 4.01 (m, 4H, H-12), 3.32 (d, *J* = 21.6 Hz, 2H, H-11), 1.23 (td, *J* = 7.1, *J* = 0.5 Hz, 6H, H-13)

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 133.6 (d, *J* = 3.1 Hz, C-10), 132.4 (d, *J* = 2.7 Hz, C-5), 129.3 (d, *J* = 9.6 Hz, C-2), 128.6 (d, *J* = 8.7 Hz, C-3), 128.3 (d, *J* = 2.7 Hz), 128.03 (d, *J* = 5.0 Hz), 127.76 (d, *J* = 1.9 Hz), 127.7 (d, *J* = 1.5 Hz), 126.3 (d, *J* = 1.3 Hz, C-8), 125.9 (d, *J* = 1.6 Hz, C-7), 62.3 (d, *J* = 6.8 Hz, C-12), 34.1 (d, *J* = 138.1 Hz, C-11), 16.5 (d, *J* = 6.0 Hz, C-13)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 29.9

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₅H₂₀O₃P⁺: 279.11 Da; gefunden: 279.3 Da

Synthese von Diethyl(difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonat **88**



Diethyl(2-naphthyl-methyl)phosphonat **87** (200 mg, 0.719 mmol) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst und auf - 78 °C abgekühlt. Eine Lösung von KHMDS (2.4 mL, 1.799 mmol, 2.5 Äq.) in Toluol (15 wt %) wurde langsam über eine Spritze zugetropft und das Reaktionsgemisch für 2 h bei - 78 °C gerührt. NFBS (612 mg, 1.943 mmol, 2.7 Äq.) gelöst in trockenem THF (3 mL) wurde langsam zugetropft und das Gemisch für 2.5 h gerührt, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde Ethylacetat hinzugegeben und dreimal mit gesättigter NaHCO₃ Lösung, zweimal mit 1 M HCl Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchro-

matographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan / Ethylacetat, 0 – 100 % Ethylacetat), wobei Diethyl(difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonat **88** als leicht gelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 109 mg, 48 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 8.13 (m, 1H, H-1), 7.90 (m, 3H, H-4, H-6, H-9), 7.69 (m, 1H, H-3), 7.56 (m, 2H, H-8, H-7), 4.19 (m, 4H, H-12), 1.31 (td, *J* = 7.1 Hz, *J* = 0.7 Hz, 6H)

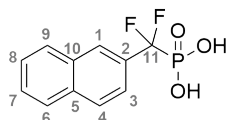
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 134.3 (br s, C-10), 132.5 (d, *J* = 1.5 Hz, C-5), 129.9 (br s, C-5), 128.9 (d, *J* = 1.4 Hz), 128.5 (d, *J* = 0.7 Hz), 127.9 (m), 127.7, 126.6 (td, *J* = 7.9, *J* = 3.3 Hz, C-2), 122.84, 64.9 (d, *J* = 6.7 Hz, C-12), 16.4 (d, *J* = 5.6 Hz, C-13)
Das Phosphor- und Fluor-gekoppelte C-11-Signal konnte aufgrund der multiplen Aufspaltung nicht eindeutig zugeordnet werden.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ; ppm = - 107.7 (d, *J* = 117.3 Hz)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.06 (t, *J* = 116.2 Hz)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₅H₁₈F₂O₃P⁺: 315.10 Da; gefunden: 315.0 Da

Synthese von (Difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonsäure **xxiv**



Diethyl(difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonat **88** (109 mg, 0.347 mmol) wurde in einem Mikrowellengefäß in trockenem ACN (1 mL) gelöst und TMSBr (114 µL, 0.867 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde 3 h in einem Ölbad erhitzt und der gebildete Silylester mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1) hydrolysiert. Die Lösung wurde lyophilisiert, wobei (Difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonsäure **xxiv** als leicht grauer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 70 mg, 78 %

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ ; ppm = 7.93 (s, 1H, H-1), 7.65 (m, 2H, H-4, H-6), 7.55 (m, 1H, H-9), 7.49 (m, 1H, H-3), 7.22 (dd, $J = 6.3$ Hz, $J = 3.3$ Hz, 2H, H-7, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ ; ppm = 133.6 (C-10), 132.2 (C-5), 131.4 (td, $J = 22.1$ Hz, $J = 12.6$ Hz, C-2), 128.5 und 128.3 (C-4 und C-6), 127.7, 127.5 (d, $J = 7.4$ Hz), 126.8 (d, $J = 7.4$ Hz), 126.0 (vbr s, C-1), 122.8 (vbr s, C-3)

Das Phosphor- und Fluor-gekoppelte C-11-Signal konnte aufgrund der multiplen Aufspaltung nicht eindeutig zugeordnet werden.

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, D_2O): δ ; ppm = - 108.1 (d, $J = 106.8$ Hz)

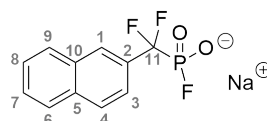
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, D_2O): δ ; ppm = 5.04 (t, $J = 107.6$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_3\text{P}^+$: 259.03301 Da;

gefunden: 259.03253 Da

Schmelzpunkt: 100 °C

Synthese von Natrium(Difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonsäuremonofluorid **89**



(Difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonsäure **xxiv** (5 mg, 0.019 mmol) wurde in einem Schlenkrohr im Hochvakuum getrocknet, in CD_3CN (1.5 mL) gelöst und auf - 20 °C abgekühlt. Es wurde eine Lösung von Oxalylfluorid in CD_3CN ($\approx 1 : 3$, 200 μL) langsam zuge tropft und für 2.5 h bei - 20 °C gerührt. Das Lösungsmittel und der Überschuss an Oxalylfluorid wurde im Stickstoffstrom entfernt und Amberlite® Ionentauscherharz (Acetatbasis, natriumbeladen) zugegeben und mit Wasser (1 mL) versetzt. Das Harz wurde abfiltriert und die Lösung lyophilisiert, wobei Natrium(Difluor(2-naphthyl)methyl)phosphonsäuremonofluorid **89** als grauer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 9 mg, > 100 %

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ ; ppm = 8.21 (br s, 1H, H-1), 8.03 (m, 3H, H-4, H-6, H-9), 7.70 (m, 2H, H-7, H-8)

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): δ ; ppm = 133.6 (C-10), 132.2 (C-5), 131.4 (td, $J = 22.1$ Hz, $J = 12.6$ Hz, C-2), 128.5 und 128.3 (C-4 und C-6), 127.7, 127.5 (d, $J = 7.4$ Hz), 126.8 (d, $J = 7.4$ Hz), 126.0 (vbr s, C-1), 122.8 (vbr s, C-3)

Das Phosphor- und Fluor-gekoppelte C-11-Signal konnte aufgrund der multiplen Aufspaltung nicht eindeutig zugeordnet werden.

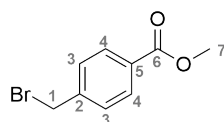
^{19}F -NMR (376 MHz, D_2O): δ ; ppm = -75.2 (d, $J = 1037.2$ Hz), -107.9 (d, $J = 114.7$ Hz)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, D_2O): δ ; ppm = 3.47 (dt, $J = 1036.6$ Hz, $J = 114.3$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{F}_3\text{O}_2\text{P}^-$: 259.01412 Da;

gefunden: 259.01531 Da

Synthese von 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester **91**



4-(Brommethyl)benzoesäure (1.2 g, 5.581 mmol) wurde in DCM (15 mL) gelöst und Methanol (300 μL , 7.425 mmol, 1.3 Äq.) zugegeben. Es wurde DMAP (50 mg, 0.410 mmol, 0.07 Äq.) und DCC (1.15 g, 5.583 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Es wurde zweimal über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde Ethylacetat zugegeben, die Lösung über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, wobei 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester **91** als leicht gelber Feststoff erhalten wurde.

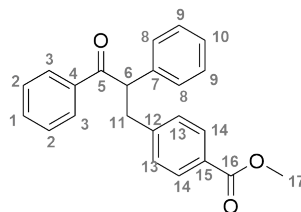
Ausbeute: 1.335 g, 96 %

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ; ppm = 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-4), 7.45 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-3), 4.49 (s, 2H, H-1), 3.84 (s, 3H, H-7)

^{13}C -NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ; ppm = 166.1 (C-6), 144.0 (C-2), 129.2 (C-4), 128.6 (C-3), 127.3 (C-5), 52.1 (C-7), 33.1 (C-1)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_9H_{10}BrO_2^+$: 228.99 Da; gefunden: 229.0 Da

Synthese von 4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)benzoesäuremethylester **92**



Phenylacetophenon (680 mg, 3.48 mmol) wurde in trockenem DMF (12 mL) gelöst und auf 10 °C abgekühlt. NaH (60 %, 140 mg, 3.48 mmol, 1.05 Äq.) wurde zugegeben und das Gemisch 3 h gerührt, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester **91** (760 mg, 3.319 mmol, 0.95 Äq.) wurde in trockenem DMF (3 mL) gelöst und über eine Spritze zugetropft. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und 1 M HCl Lösung zugegeben. Es wurde Ethylacetat zugegeben, die organische Phase mit 1 M NaOH Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , Hexan, Ethylacetat, 0 - 25 % Ethylacetat), wobei 4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)benzoesäuremethylester **92** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 670 mg, 56 %

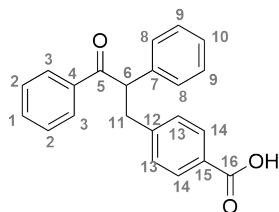
1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ ; ppm = 8.00 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 2H, H-3), 7.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-14), 7.53 (m, 1H, H-1), 7.43 (m, 2H, H-2), 7.34 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-13), 7.30 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 2H, H-8), 7.25 (dd, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-9), 7.16 (m, 1H, H-10), 5.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-6), 3.79 (s, 3H, H-17), 3.49 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 3.09 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b)

^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ ; ppm = 199.2 (C-5), 166.6 (C-16), 146.0 (C-12), 139.2, 136.4, 129.9, 129.9, 129.4, 129.3, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.7, 127.9, 127.5,

53.6 (C-6), 52.49 (C-17), 39.4 (C-11)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{23}H_{21}O_3^+$: 345.15 Da; gefunden: 345.3 Da

Synthese von 4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)benzoesäure **93a**



4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)benzoesäuremethyl ester **92** (621 mg, 1.085 mmol) wurde in Methanol gelöst und mit 5 M NaOH (1 mL) versetzt. Die Lösung wurde 16 h unter Rückfluss erhitzt und 1 M HCl zugegeben bis sich ein saurer pH-Wert eingestellt hatte. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einem Gemisch aus Ethylacetat und THF aufgenommen. Die Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , Hexan + 1 % AcOH, Ethylacetat + 1 % AcOH, 0 - 25 % Ethylacetat + 1 % AcOH). Die Produktfraktionen wurden eingengt, wobei 4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)benzoesäure **93a** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 400 mg, 67 %

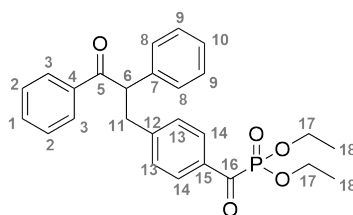
1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ ; ppm = 12.78 (s, 1H, OH), 8.00 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 2H, H-3), 7.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-14), 7.54 (m, 1H, H-1), 7.43 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2), 7.31 (m, 4H, H-13, H-8), 7.25 (m, 2H, H-9), 7.16 (m, 1H, H-10), 5.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-6), 3.49 (dd, $J = 13.8$ Hz, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 3.08 (dd, $J = 13.8$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b)

^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ ; ppm = 198.7 (C-5), 167.2 (C-16), 145.0 (C-12), 138.8, 135.9, 133.2, 129.2, 129.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.2, 127.0, 53.2 (C-6), 39.0 (C-11)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{19}O_3^+$: 331.13287 Da;
gefunden: 331.13315 Da

Schmelzpunkt: 145 °C

Synthese von Diethyl(4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl))benzoylphosphonat **93**



4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)benzoesäure **93a** (71 mg, 0.215 mmol) wurde in trockenem DCM (5 mL) gelöst und eine katalytische Menge DMF zugegeben. Es wurde Oxalylchlorid (100 μ L, 1.166 mmol, 5 Äq.) zugetropft und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in trockenem DCM (3 mL) gelöst. Triethylphosphit (44 μ L, 2.571 mmol, 1.2 Äq.) wurde zugetropft und das Gemisch für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Lösung wurde ein Gemisch aus ACN und Wasser (9 : 1) zugefügt und das Produktgemisch mittels HPLC aufgereinigt (H_2O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-70 % ACN + 1 % TFA). Lyophilisation der Produktfraktionen ergab Diethyl(4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl))benzoylphosphonat **93** als leicht gelbes Öl.

Ausbeute: 35 mg, 36 %

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ ; ppm = 8.09 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3), 7.89 (m, 2H, H-14), 7.44 (m, 1H, H-1), 7.35 (m, 2H), 7.25 (m, 2H), 7.20 (m, 5H), 4.80 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-6), 4.25 (m, 4H, H-17), 3.60 (dd, J = 13.6 Hz, J = 7.3 Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 3.14 (dd, J = 13.6 Hz, J = 7.3 Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 1.34 (m, 6H, H-18)

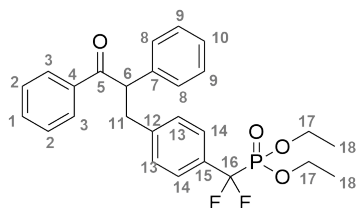
^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ ; ppm = 198.7 (C-5), 198.4 (d, J = 174.5 Hz, C-16), 147.9 (C-12), 138.6, 136.5, 130.3, 130.1 (d, J = 1.7 Hz), 129.9 (d, J = 1.0 Hz), 129.2, 128.9, 128.6, 128.4 (d, J = 4.8 Hz), 127.6, 64.2 (d, J = 7.2 Hz, C-17), 55.6 (C-6), 40.4 (C-11),

16.5 (d, $J = 5.8$ Hz, C-18)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, D_2O): δ ; ppm = - 0.5

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{P}^+$: 451.17 Da; gefunden: 451.0 Da

Synthese von Diethyl((4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl))difluormethyl)phosphonat **94**



Obgleich die direkte Fluorierung der α -Ketofunktion des Phosphonates **93** unter Verwendung von Diethylaminoschwefeltrifluorid erfolgen kann, wurde aufgrund der mäßigen Ausbeuten der Alkylierungs- und Acylierungsreaktion ein anderer Syntheseweg gewählt. Die Synthese von Diethyl(4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl))difluormethylphosphonat **94** erfolgte ausgehend von 4-(Brommethyl)benzoesäure.

4-(Brommethyl)benzoesäure (600 mg, 2.791 mmol) wurde in trockenem DCM (10 mL) suspendiert und mit einer katalytischen Menge DMF versetzt. Das Gemisch wurde auf 0 °C abgekühlt und Oxalylchlorid (370 μL , 4.221 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft. Das Gemisch rührte für 2 h bei Raumtemperatur, wobei sich die Lösung vollständig klärte. Das Lösungsmittel und der Überschuss an Oxalylchlorid wurden im Stickstoffstrom entfernt und Triethylphosphit (574 μL , 3.354 mmol, 1.2 Äq.) gelöst in DCM (7 mL) zugegeben. Das Gemisch wurde für 1 h auf 80 °C erhitzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde auf 0 °C abgekühlt, DAST (700 μL , 5.304 mmol, 1.9 Äq.) zugetropft, 3 h bei Raumtemperatur gerührt und 1 M NaOH Lösung bei einer Temperatur von 0 °C zugegeben. Ethylacetat wurde zugegeben und extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Phenylacetophenon (340 mg, 1.735 mmol, 0.6 Äq.) wurde in einem gesonderten Reaktionsgefäß mit NaH (60 %, 70 mg, 1.735 mmol, 0.6 Äq.) deprotoniert und das in DMF (5 mL) gelöste Rohprodukt zugetropft. Das Gemisch rührte für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und mit einer 1 M HCl Lösung versetzt. Es wurde mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter

vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch vorgereinigt (SiO₂, Hexan, Ethylacetat, 1 : 1). Da die erhaltene Produktfraktion (244 mg) noch signifikant verunreinigt war, wurde das Rohprodukt mittels HPLC weiter aufgereinigt (H₂O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-99 % ACN + 1 % TFA). Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert, wobei Diethyl((4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl))-difluormethyl)phosphonat **94** als leicht gelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 50 mg, 4 % über 3 Stufen (ø 34 % je Stufe)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.91 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.3 Hz, 2H, H-3), 7.47 (m, 3H, H-1, H-14), 7.37 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-2), 7.26 (m, 5H, H-8, H-9, H-10) 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-13), 4.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-6), 4.17 (m, 2H, H-17), 4.08 (m, 2H, H-17), 3.61 (dd, *J* = 13.7 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 3.14 (dd, *J* = 13.7 Hz, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 1.27 (2dt, *J* = 7.0 Hz, *J* = 0.6 Hz, 6H, H-18)

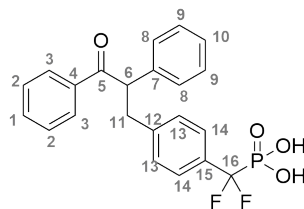
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 198.9 (C-5), 143.0 (C-12), 138.8, 136.7, 133.1, 130.5 (m, C-12), 129.4 (d, *J* = 1.1 Hz), 129.1, 128.8, 128.7, 128.4, 127.5, 126.3 (td, *J* = 6.6 Hz, *J* = 1.8 Hz, C-15), 64.9 (d, *J* = 6.8 Hz, C-17), 55.8 (C-6), 40.0 (C-11), 16.4 (2d, *J* = 2.7 Hz, C-18)

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ; ppm = - 108.1 (d, *J* = 117.7 Hz)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.0 (t, *J* = 117.3 Hz)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₂₆H₂₈F₂O₄P⁺: 473.17 Da; gefunden: 473.0 Da

Synthese von 4-((3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)-difluormethyl)phosphonsäure xxv



Diethyl((4-(3-Oxo-2,3-diphenylpropyl))-difluormethyl)phosphonat (45 mg, 0.095 mmol) wurde in einen Mikrowellengefäß in trockenem ACN (1 mL) gelöst und mit TMSBr (50 µL,

0.380 mmol, 4 Äq.) versetzt. Es wurde für 2 h im Ölbad bei 85 °C gerührt und der Silylester mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1) hydrolysiert. Die Lösung wurde lyophilisiert, wobei 4-((3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)-difluormethyl)phosphonsäure **xxv** als leicht grauer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 36 mg, 91 %

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 7.94 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 2H, H-3), 7.46 (m, 3H, H-1, H-13), 7.37 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2), 7.26 (m, 6H, H-8, H-9, H-13), 7.17 (m, 1H, H-10), 5.06 (d, $J = 7.9$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-6), 3.55 (dd, $J = 13.8$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 3.08 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b)

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 200.9 (C-5), 143.8 (C-12), 140.4, 137.9, 134.2, 130.3 (m, C-12), 130.1, 130.0, 129.8, 129.6, 129.4, 128.3, 127.2 (m, C-15), 56.3 (C-6), 40.6 (C-11)

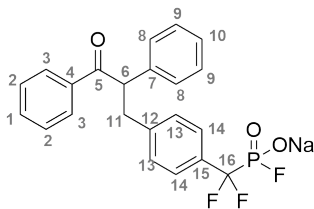
¹⁹F-NMR (376 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = - 110.0 (d, $J = 114.2$ Hz)

³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 5.4 (t, $J = 114.3$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für C₂₂H₂₀F₂O₄P⁺: 417.10618 Da;
gefunden: 417.10600 Da

Schmelzpunkt: 145 °C

Synthese von Natrium-4-((3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)-difluormethyl)phosphonsäuremonofluorid **95**



4-((3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)-difluormethyl)phosphonsäure **xxv** (12 mg, 0.029 mmol) wurde in einem Schlenkrohr im Hochvakuum getrocknet, in CD₃CN gelöst und auf - 20 °C

abgekühlt. Es wurde eine Lösung von Oxalylfluorid in CD_3CN ($\approx 1 : 3$, 300 μL) langsam zugetropft und für 1.5 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ und 10 min bei $10\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Das Lösungsmittel und der Überschuss an Oxalylfluorid wurden im Stickstoffstrom entfernt und Amberlite® Ionenaustauscherharz (Acetat, natriumbeladen) zugegeben und mit Wasser (1 mL) versetzt. Das Harz wurde abfiltriert und die Lösung lyophilisiert, wobei Natrium-4-((3-Oxo-2,3-diphenylpropyl)-difluormethyl)phosphonsäuremonofluorid **95** als leicht brauner Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 12.4 mg, 99 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{CN} / \text{D}_2\text{O}$): δ ; ppm = 7.64 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-3), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-14), 6.99 (m, 8H), 6.85 (m, 2H), 4.79 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-6), 3.27 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b), 2.86 (dd, $J = 13.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-11a oder H-11b)

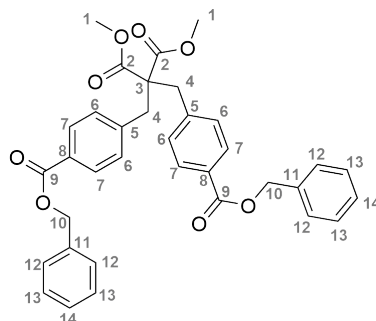
$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CD_3OD): δ ; ppm = - 74.1 (d, $J = 1028.7$ Hz), - 107.01 (d, $J = 114.2$ Hz)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ ; ppm = 2.7 (dt, $J = 1028.1$ Hz, $J = 114.5$ Hz)

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{O}_3\text{P}^+$: 419.10184 Da;
gefunden: 419.10190 Da

Schmelzpunkt: $> 315\text{ }^\circ\text{C}$

Synthese von Dimethyl-2,2-bis(4-(benzyloxy)benzyl)malonat **97a**



Da das Edukt 4-(Bromomethyl)benzoesäurebenzylester **96** nicht stabil und lagerfähig ist, wurde diese Verbindung kurz zuvor dargestellt und direkt umgesetzt. 4-(Bromomethyl)benzoesäure wurde unter Verwendung von DCC / DMAP (1 Äq. / 1 Äq.) in Gegenwart von Benzylalkohol (1.1 Äq.) in THF zum Benzylester **96** umgesetzt.

Dimethylmalonat (85 μ L, 0.741 mmol) gelöst in trockenem DMF (5 mL) wurde auf - 20 °C abgekühlt. NaH (75 mg, 1.851 mmol, 2.5 Äq.) wurde zugegeben und die Lösung 45 min gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Die Lösung wurde auf - 40 °C abgekühlt und 4-(Bromomethyl)benzoesäurebenzylester **96** (549 mg, 1.800 mmol, 2.4 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 16 h gerührt, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde 1 M HCl Lösung zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, wobei Dimethyl-2,2-bis(4-(benzyloxy)benzyl)malonat **97a** als weißer Feststoff erhalten wurde.

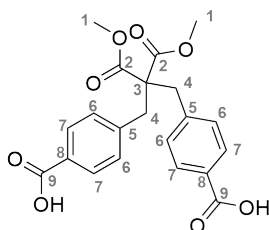
Ausbeute: 310 mg, 74 %

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-6), 7.47 (m, 4H), 7.37 (m, 12H), 5.34 (s, 4H, H-10), 3.59 (s, 6H, H-1), 3.18 (s, 4H, H-4)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ ; ppm = 136.1, 130.5, 129.2, 128.6, 128.2, 128.0, 72.6 (C-10), 59.8 (C-3), 52.5 (C-1), 40.0 (C-4)

¹³C-Signale geringer Intensität konnten nicht vollständig aufgelöst werden.

Synthese von 4,4'-(2,2-bis(methoxycarbonyl)propan-1,3-diyl)dibenzoessäure **97**



Dimethylmalonat (272 μ L, 2.370 mmol) wurde in trockenem DMF (7 mL) gelöst und auf - 20 °C abgekühlt. NaH (100 mg, 4.934 mmol, 2.1 Äq.) wurde zugegeben und die Lösung 45 min gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Die Lösung wurde auf - 40 °C

abgekühlt, 4-(Bromomethyl)benzoesäurebenzylester **96** (549 mg, 1.800 mmol) zugegeben und das Gemisch 16 h gerührt, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde 1 M HCl Lösung zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol (10 mL) aufgenommen und Pd/C (15 mg, 10 wt. %) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Ballon mit H₂ versehen und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan + 1 % AcOH/ Ethylacetat, + 1 % AcOH; 75 % Ethylacetat, + 1 % AcOH), wobei 4,4'-(2,2-bis(methoxycarbonyl)propan-1,3-diyl)dibenzoesäure **97** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 695 mg, 73 %

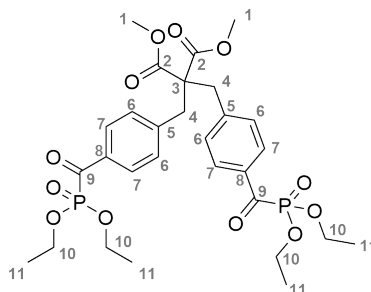
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 12.91 (s, 2H, COOH), 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H-7), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H-6), 3.59 (s, 6H, H-1), 3.18 (s, 4H, H-4)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ; ppm = 170.2 (C-2), 167.2 (C-9), 140.9 (C-5), 130.3 (C-7), 129.6 (C-8), 129.3 (C-6), 67.0 (C-3), 59.8 (C-1), 52.4 (C-4)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₂₁H₂₀NaO₈⁺: 423.10504 Da;
gefunden: 423.10527 Da

Schmelzpunkt: ≤ 225 °C

Synthese von Dimethyl-2,2-bis(4-((diethoxyphosphoryl)carbonyl)benzyl)malonat **98**



4,4'-(2,2-bis(methoxycarbonyl)propan-1,3-diyl)dibenzoessäure **97** (266 mg, 0.665 mmol) wurde in trockenem DCM (10 mL) gelöst und langsam 1-Chlor-*N,N*,2-trimethyl-1-propenylamin (219 μ L, 0,431 mmol, 2.5 Äq.) zugetropft. Die Suspension klärte sich nach 45 min und wurde 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Triethylphosphit (83 μ L, 0.483 mmol, 2.8 Äq.) wurde zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Hexan + 1 % AcOH / Ethylacetat, + 1 % AcOH; 0 - 100 % Ethylacetat, + 1 % AcOH), wobei Dimethyl-2,2-bis(4-((diethoxyphosphoryl)carbonyl)benzyl)malonat **98** als leicht verunreinigtes gelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 246 mg, 58 %

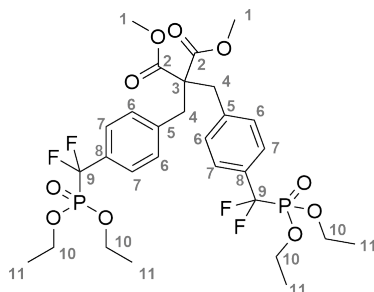
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 8.14 (m, 4H, H-7), 7.41 (m, 4H, H-6), 4.28 (m, 8H, H-10), 3.63 (s, 6H, H-1), 3.31 (mit Solventsignal, 4H, H-4) 1.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 12H, H-11)

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = 199.1 (d, $J = 175.7$ Hz, C-9), 172.1 (C-2) 145.6 (C-5), 135.9 (m, C-8) 132.1 (br s, C-7), 130.6 (br s, C-6), 65.7 (d, $J = 7.4$ Hz, C-10), 65.1 (C-3), 52.9 (C-1), 41.1 (C-4), 16.7 (d, $J = 5.7$ Hz)

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ ; ppm = - 0.8 (p, $J = 8.3$ Hz)

ESI-MS (m/z): [M+H]⁺ berechnet für C₂₉H₃₉O₁₂P₂⁺: 461.19 Da; gefunden: 461.0 Da

Synthese von Dimethyl-2,2-bis(4-((diethoxyphosphoryl)-difluormethyl)benzyl)-malonat **99**



Dimethyl-2,2-bis(4-((diethoxyphosphoryl)carbonyl)benzyl)malonat **98** (246 mg, 0.384 mmol) wurde in trockenem DCM (5 mL) gelöst und auf - 20 °C abgekühlt. DAST (304 µL, 2.307 mmol, 6 Äq.) wurde zugetropft und die Reaktionslösung 16 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde 1 M NaOH Lösung zugegeben, mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM / Methanol, 95 : 5), wobei Dimethyl-2,2-bis(4-((diethoxyphosphoryl)-difluormethyl)benzyl)malonat **99** als leicht gelbes Öl erhalten wurde. Die Mischfraktionen der Normalphasensilikatrennung wurden mittels HPLC weiter aufgereinigt (H₂O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-99 % ACN + 1 % TFA).

Ausbeute: 123 mg, 47 %

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.52 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.6 Hz, 4H), 7.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H, H-6), 4.17 (m, 8H), 3.60 (s, 6H, H-1), 3.23 (s, 4H, H-4), 1.28 (t, *J* = 6.9 Hz, 12H, H-11)

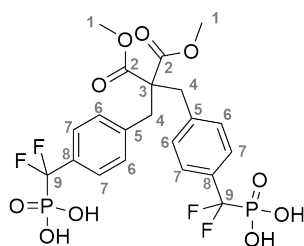
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 170.8 (C-2), 131.5 (td, *J* = 22.3 Hz, *J* = 13.8 Hz), 130.2 (m), 126.3 (td, *J* = 6.4 Hz, *J* = 2.1 Hz), 117.2 (dt, *J* = 218.6 Hz, *J* = 263.3 Hz, C-9), 64.9 (d, *J* = 6.8 Hz, C-12), 60.3 (C-3), 52.4 (C-1), 39.6 (C-4), 16.41 (d, *J* = 5.4 Hz, C-11)

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ; ppm = - 108.4 (d, *J* = 117.8 Hz)

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 6.91 (tp, *J* = 116.7 Hz, *J* ≈ 8.0 Hz)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₂₉H₃₉F₄O₁₀P₂⁺: 685.19491 Da;
gefunden: 685.19716 Da

Synthese von (((2,2-bis(methoxycarbonyl)propan-1,3-diyl)bis(4,1-phenyl))bis(-difluormethyl))bis(phosphonsäure) 100



Dimethyl-2,2-bis(4-((diethoxyphosphoryl)-difluormethyl)benzyl)malonat **99** (57 mg, 0.083 mmol) wurde in einem Mikrowellengefäß in trockenem ACN (1 mL) gelöst und TMSBr (200 µL, 1.516 mmol, 18 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h im Mikrowellenreaktor auf 40 °C erwärmt. Der Silylester und der Überschuss an TMSBr wurde mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser (9 : 1, 4 mL) hydrolysiert. Die Lösung wurde lyophilisiert und der erhaltene graue Feststoff **100** in Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert.

Ausbeute: 49 mg, $\geq 100\%$

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): δ ; ppm = 7.50 (br d, $J = 7.9$ Hz, 4H, H-7), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, H-6), 3.62 (s, 6H, H-1), 3.21 (s, 4H, H-4)

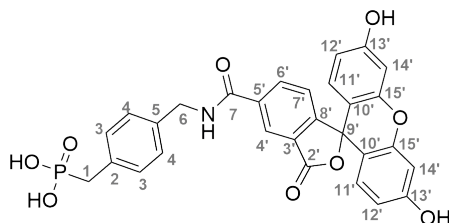
¹³C-NMR (101 MHz, CD₃CN): δ ; ppm = 172.1 (C-2), 139.6 (m), 131.2, 127.1 (m), 61.4 (C-3), 53.3 (C-1), 39.8 (C-4)

¹⁹F-NMR (376 MHz, CD₃CN): δ ; ppm = -109.61 (d, $J = 111.1$ Hz)

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃CN): δ ; ppm = 4.53 (br t, $J = 112.3$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für C₂₁H₂₃F₄O₁₀P₂⁺: 573.06971 Da;
gefunden: 573.07025 Da

Synthese von (4-((Fluoreceinyl-5-carboxamido)methyl)benzyl)phosphonsäure **101**



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 9.41 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 8.51 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-4'), 8.29 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-6'), 7.39 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7'), 7.27 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-4), 7.22 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-3), 6.70 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-14), 6.60 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-11'), 6.55 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 2H, H-12'), 4.50 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, H-6), 2.95 (d, $J = 21.3$ Hz, 2H, H-1)

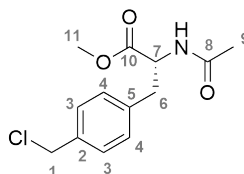
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 168.2 (C-2'), 164.5 (C-7), 159.6 (C-13'), 151.8 (C-15'), 137.0 (d, $J = 3.6$ Hz, C-5), 136.1, 134.8, 132.8 (d, $J = 8.8$ Hz, C-2), 129.7 (d, $J = 6.2$ Hz, C-3), 129.2, 127.1 (d, $J = 3.0$ Hz, C-4), 126.6, 124.3, 123.4, 112.7, 109.1, 102.3 (C-14'), 83.4 (C-9'), 42.6 (C-6), 35.1 (d, $J = 131.8$ Hz, C-1)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ ; ppm = 21.7

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{NO}_9\text{P}^+$: 560.11 Da;
gefunden: 560.0 Da

Schmelzpunkt: > 325 °C

Synthese von *N*-Acetyl-4-chlormethyl-phenylalaninmethylester 106



N-Acetylphenylalaninmethylester (215 mg, 0.972 mmol) und trockenes ZnCl_2 (517 mg, 3.89 mmol, 4 Äq.) wurden auf 0 °C abgekühlt. MOMCl (739 μL , 9.730 mmol, 10 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre langsam zugetropft und das Gemisch für 16 h gerührt, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Der Überschuss an MOMCl wurde im Stickstoffstrom entfernt. *MOMCl ist als besonders gefährlicher krebserzeugender Stoff eingestuft.* Es wurde Ethylacetat und gesättigte NaHCO_3 Lösung hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter NaHCO_3 Lösung, dreimal mit 1 M HCl und mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , Hexan / Ethylacetat, 0 – 100 % Ethylacetat). *N*-Acetyl-4-chlormethyl-

phenylalaninmethylester **106** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

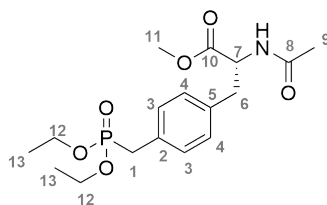
Ausbeute: 205 mg, 78 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3), 7.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-4), 6.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.85 (dt, *J* = 7.9 Hz, *J* = 5.9 Hz, 1H, H-7), 4.53 (s, 2H, H-2), 3.70 (s, 3H, H-11), 3.08 (2 x dd → qd, *J* = 13.9 Hz, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-6), 1.95 (s, 3H, H-9)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 172.0 (C-10), 169.9 (C-8), 136.3 und 136.3 (C-2 und C-5), 129.6 (C-3), 128.8 (C-4), 53.1 (C-7), 52.4 (C-11), 46.0 (C-1), 37.5 (C-6), 23.1 (C-9)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₃H₁₇ClNO₃⁺: 270.09 Da; gefunden: 270.0 Da

Synthese von *N*-Acetyl-4-(diethoxyphosphoryl)-methyl-phenylalaninmethylester **107a**



N-Acetyl-4-chlormethyl-phenylalaninmethylester **106** (482 mg, 1.792 mmol) und Triethylphosphit (1.53 mL, 8.940 mmol, 5 Äq.) wurden in einem Mikrowellengefäß für 2 h bei 140 °C im Mikrowellenreaktor erhitzt. Das Gemisch wurde in Ethylacetat aufgenommen und säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Ethylacetat / THF, 0 – 100 % THF). *N*-Acetyl-4-(diethoxyphosphoryl)-methyl-phenylalaninmethylester **107a** wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 206 mg, 31 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ; ppm = 7.22 (dd, *J* = 8.1 Hz, 2.5 Hz, 2H, H-3), 7.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4), 6.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 4.85 (dt, *J* = 7.8 Hz, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-7), 4.0 (m, 4H, H-12), 3.70 (s, 3H, H-11), 3.11 (d, *J* = 21.6 Hz, 2H, H-1), 3.08 (m, 2H,

H-6) 1.97 (s, 3H, H-9), 1.23 (td, $J = 7.1$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 6H, H-13)

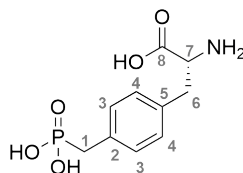
^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 172.1 (C-10), 169.8 (C-8), 134.6 (d, $J = 3.7$ Hz, C-5), 130.6 (d, $J = 9.0$ Hz, C-2), 130.1 (d, $J = 6.6$ Hz, C-3), 129.5 (d, $J = 3.1$ Hz, C-4), 62.3 (d, $J = 7.4$ Hz, C-12), 53.2 (C-7), 52.4 (C-11), 37.6 (C-6), 33.5 (d, $J = 138.4$ Hz, C-1), 23.2 (C-9), 16.5 (d, $J = 6.1$ Hz, C-13)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 27.4

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{P}^+$: 372.15705 Da;

gefunden: 372.15761 Da

Synthese von Phosphonomethylphenylalanin **107**



N-Acetyl-4-(dieethoxyphosphoryl)-methyl-phenylalaninmethylester **107a** (205 mg, 0.552 mmol) wurde in einem Mikrowellengefäß in konzentrierter HCl suspendiert und 1 h bei 100 °C erhitzt. Es wurde erneut HCl zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur für 3 Tage gerührt. Die HCl wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Phosphonomethylphenylalanin **107** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 100 mg, 70 %

^1H -NMR (300 MHz, D_2O): δ ; ppm = 7.33 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 2H, H-3), 7.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-4), 4.33 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-7), 3.35 (dd, $J = 14.5$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-6a oder H-6b), 3.22 (m, 1H, H-6a oder H-6b), 3.19 (d, $J = 21.2$ Hz, 2H, H-1)

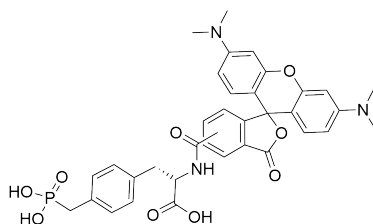
^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 171.6 (C-8), 132.8 (d, $J = 9.7$ Hz, C-2), 132.5 (d, $J = 3.9$ Hz, C-5), 130.5 (d, $J = 6.2$ Hz, C-3), 129.8 (d, $J = 3.2$ Hz, C-4), 54.2 (C-7), 35.3 (C-6), 34.23 (d, $J = 130.7$ Hz, C-1)

^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ ; ppm = 26.00 (t, $J = 21.2$ Hz)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{10}H_{15}NO_5P^+$: 260.06824 Da;
 gefunden: 260.06830 Da

Schmelzpunkt: 280 °C

Synthese von Phosphonomethylphenylalanyl-5,6-carboxamido-*N,N*-tetramethylrhodamin **108**

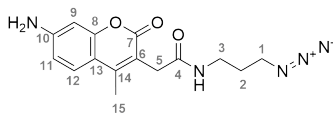


Das dargestellte Phosphonomethylphenylalalin sollte in folgenden Umsetzungen mit zum Succinimidylester aktivierten Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt werden. Während der Umsetzung mit 5,6-Carboxyfluorescein-OSu konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Die Umsetzung mit 5,6-Carboxy-*N,N*-tetramethylrhodamin führte zwar zu einer Produktbildung, jedoch konnte die Verbindung **108** nicht rein und nur in sehr geringer Ausbeute isoliert werden.

Ausbeute: \ll 2 mg, \ll 8 %

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{35}H_{35}N_3O_9P^+$: 672.21 Da;
 gefunden: 671.8 Da

Synthese von *N*-(3-Azidopropyl)-(7-amino-4-methyl-coumarin)-3-acetamid **110**



7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure (44 mg, 0.190 mmol) und TBTU (61 mg, 0.190 mmol, 1 Äq.) wurden in DMF (3 mL) gelöst und 3-Azido-propylamin (19 μ L, 0.190 mmol,

1 Äq.) zugegeben und für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels HPLC aufgereinigt (H₂O + 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-99 % ACN + 1 % TFA). *N*-(3-Azidopropyl)-(7-amino-4-methyl-coumarin)-3-acetamid **110** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

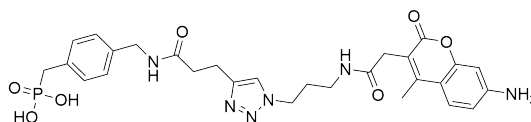
Ausbeute: 15 mg, 25 %

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 6.67 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-11), 6.52 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-9), 3.54 (s, 2H, H-5), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-3), 3.26 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-1), 2.38 (s, 3H, H-15), 1.75 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-2)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ; ppm = 173.1 (C-4), 164.8 (C-7), 155.9 (C-8), 153.5 (C-10), 152.9 (C-14), 127.4 (C-12), 114.6 (C-6), 113.4 (C-11), 112.1 (C-6), 100.8 (C-9), 50.1 (C-1), 38.0 (C-3), 35.1 (C-2), 29.7 (C-5), 15.4 (C-15)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₅H₁₈N₅O₃⁺: 316.14042 Da;
gefunden: 316.14077 Da

Synthese von (4-((3-(1-(3-(7-Amino-4-methyl-2-cumarin-3-acetamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)benzyl)phosphonsäure **111**



N-(3-Azidopropyl)-(7-amino-4-methyl-coumarin)-3-acetamid **110** (5 mg, 0.017 mmol) und Methyl(4-(pent-4-ynamidomethyl)phenyl)methyl)phosphonsäure **67** (5 mg, 0.017 mmol, 1.1 Äq.) wurden in einem Gemisch aus Methanol / H₂O / DMF und ACN (1 / 1 / 0.3 / 1, 2 mL) suspendiert, eine katalytische Menge NaAsc und CuSO₄ zugegeben und das Gemisch für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC aufgereinigt (+ 1 % TFA / ACN + 1 % TFA, 20 min, 5-99 % ACN + 1 % TFA). (4-((3-(1-(3-(7-Amino-4-methyl-2-cumarin-3-acetamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)methyl)benzyl)phosphonsäure **111** wurde als blass-grauer Feststoff

erhalten.

Ausbeute: 1.9 mg, 20 %

Aufgrund der geringen isolierten Stoffmenge konnten keine NMR-spektroskopischen Messungen durchgeführt werden.

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{28}H_{34}N_6O_7P^+$: 597.22211 Da;
gefunden: 597.22394 Da

5.3.1 Allgemeines Protokoll zur Festphasenpeptidsynthese

Kupplung von Fmoc-Aminosäuren

Die Kupplung von Fmoc-Aminosäuren erfolgte in der Regel unter der Verwendung von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid und *N*-Hydroxybenzotriazol. Die Reaktionen erfolgten in einem Minimalvolumen von DMF. Die entsprechende Aminosäure (3 Äq., bezogen auf die Harzbeladung) wurde für 5 min mit DIC / HOBt voraktiviert und zum Harz gegeben. Fmoc-Pro-OH wurde unter der Verwendung von HATU (5 Äq.) and 2,4,6-Collidin (10 Äq.) an das Harz gekuppelt.

Die Reaktionszeiten variierten zwischen 1 h und 3 h, wobei der Reaktionsverlauf mittels Kaisertest verfolgt wurde.

Kupplung von Fmoc-Phosphonocarbonylphenylalanin **30**

Die Kupplung der unnatürlichen Aminosäure Phosphonocarbonylphenylalanin **30** wurde unter der Verwendung von TBTU und DIPEA als Base durchgeführt. Die Aminosäure (4 Äq., bezogen auf die Harzbeladung) wurde in einem Minimalvolumen von DMF gelöst und DIPEA (2 Äq.) zugegeben. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von TBTU (4 Äq.). Nach weiteren 3 min wurde die voraktivierte Aminosäure **30** zu dem Harz gegeben. Die Reaktionszeiten betragen bis zu 4 h, wobei der Reaktionsverlauf mittels Kaisertest verfolgt wurde.

Kupplung der auf pcPhe folgenden Aminosäuren

Die direkt *N*-terminal auf pcPhe folgende Aminosäure wurde unter der Verwendung von TBTU / DIPEA (jeweils 4 Äq.) an das Harz gekuppelt. Die Reaktionszeiten betragen bis zu 3 h, wobei der Reaktionsverlauf mittels Kaisertest verfolgt wurde.

Darauf folgende Aminosäuren wurden mittels DIC / HOBt an das Harz gekuppelt.

Waschen des Harzes

Das Harz wurde nach jedem Reaktionsschritt mit mindestens 5 Spritzenvolumina DMF, THF, DCM und Et₂O gewaschen.

Fmoc-Abspaltung

Die Fmoc-Anspaltung erfolgte mit einer Lösung von Piperidin in DMF (1 : 4). Die Reaktion erfolgte entweder für 45 min oder einmal für 1 min und zweimal für 10 min.

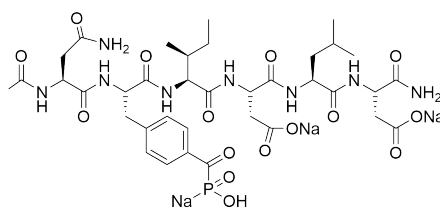
Harz-gebundene Peptide, die die Aminosäure pcPhe enthielten und mit Piperidin behandelt wurden, zeigten nach ihrer Abspaltung eine signifikante Substitution der Phosphonatgruppe durch Piperidin. Unter der Verwendung von DBU als Base konnte keine Nebenreaktion beobachtet werden.

Fmoc-Abspaltungen nach der Einführung von pcPhe wurden folglich unter den Bedingungen von DBU / DMF (1 : 49) durchgeführt, wobei dieselben Reaktionszeiten wie für Piperidin / DMF verwendet wurden.

Acylierung des *N*-Terminus

Sogenanntes *end-capping* der Peptide erfolgte entweder durch die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid / DIPEA (1 : 1) in DCM für eine 1 h oder durch die Reaktion mit 5,6-Carboxyfluorescein.

5,6-Carboxyfluorescein (10 Äq.) wurde mittels DIC / HOBt (10 Äq. / 10 Äq., bezogen auf die Harzbeladung) für 2 min voraktiviert und zum Harz gegeben. Nach 1 h wurde das Harz gewaschen und mit einer Lösung von DBU in DMF (1 : 48) versetzt. Nach 15 min wurde das Harz gewaschen und das Prozedere solange wiederholt, bis die Lösung farblos blieb.

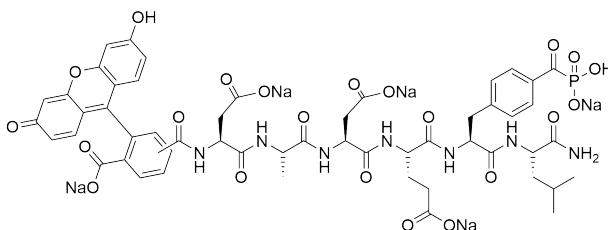


30 mg vorbeladenes Rink-Amid-Harz (0.54 mmol/g) wurden verwendet.

Ausbeute: 4.3 mg, 30 %

ESI-HRMS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{36}H_{52}N_8O_{16}P^-$: 883.3244;
gefunden: 883.3357

Synthese von CF-DADEpcFL-NH₂ 35

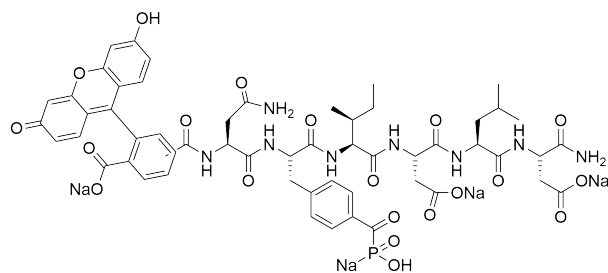


15 mg vorbeladenes Rink-Amid-Harz (0.72 mmol/g) wurden verwendet.

Ausbeute: 2 mg, 16 %

ESI-HRMS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{53}H_{55}N_7O_{22}P^-$: 1172.3143;
gefunden: 1172.3238

Synthese von CF-NpcFIDLD-NH₂ 37

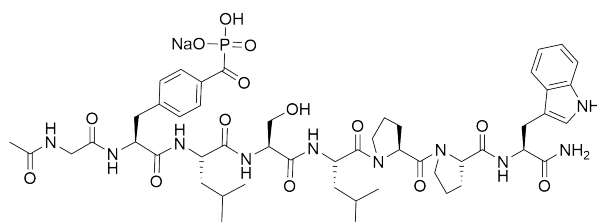


25 mg vorbeladenes Rink-Amid-Harz (0.54 mmol/g) wurden verwendet.

Ausbeute: 3.3 mg, 20 %

ESI-HRMS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{55}H_{60}N_8O_{21}P^-$: 1199.3616;
gefunden: 1199.3753

Synthese von Ac-GpcFLSLPPW-NH₂ 31

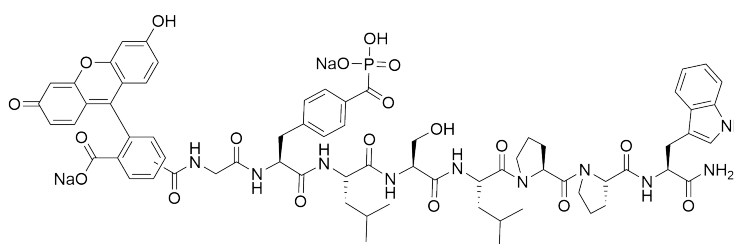


16 mg vorbeladenes Rink-Amid-Harz (0.51 mmol/g) wurden verwendet.

Ausbeute: 5 mg, 29 %

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{50}H_{69}N_{10}O_{14}P^+$: 1065.4805;
gefunden: 1065.4808

Synthese von CF-GpcFLSLPPW-NH₂ 32

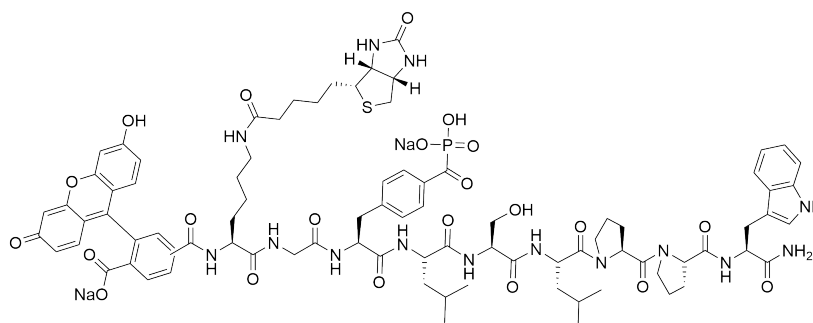


25 mg vorbeladenes Rink-Amid-Harz (0.48 mmol/g) wurden verwendet.

Ausbeute: 5 mg, 29 %

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{69}H_{77}N_{10}O_{19}P^+$: 1381.5177;
gefunden: 1381.5196

Synthese von CF-K(Biotin)GpcFLSLPPW-NH₂ 33

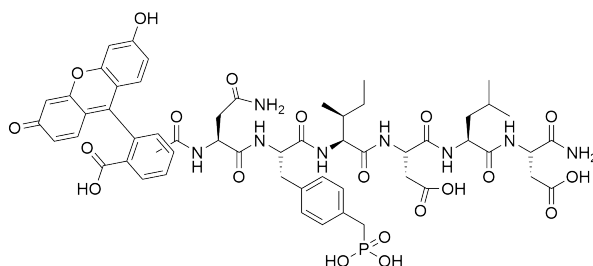


30 mg vorbeladenes Rink-Amid-Harz (0.48 mmol/g) wurden verwendet.

Ausbeute: 3.1 mg, 12 %

ESI-HRMS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{85}H_{102}N_{14}O_{22}P^-$: 1733.6757;
gefunden: 1733.6907

Synthese von CF-NpmFIDLD-NH₂ 42



25 mg vorbeladenes Rink-Amid-Harz (0.54 mmol/g) wurden verwendet.

Ausbeute: 2.7 mg, 17 %

ESI-HRMS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{55}H_{622}N_8O_{20}P^-$: 1185.3823;
gefunden: 1185.3929

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Materialien und Methoden

verwendete Puffer in Enzymaktivitätsmessungen

Die verwendeten Puffer wurden von üblichen Lieferanten wie Carl Roth, Sigma Aldrich und VWR bezogen. Die Substanzen wurden in vollentsalztem Wasser oder in *Millipore*-Reinstwasser gelöst. Die Puffer wurden als Konzentrate hergestellt und der pH-Wert mittels Zugabe von HCl (12 M) oder NaOH (10 M) auf den gewünschten Wert eingestellt.

Verwendet wurde in der Regel ein neutraler TRIS HCl Puffer in einer Molarität von 25 mM (Tabelle 5.1). Messungen, bei denen stark saure Inhibitoren verwendet wurden, fanden in doppelt konzentriertem Puffer (50 mM) statt, um ein überschreiten der Pufferkapazität auszuschließen. Exemplarische Messungen wurden in HEPES NaOH Puffer durchgeführt (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.1 Zusammensetzung des TRIS HCl Puffers im Assay

Substanz	Zusammensetzung
TRIS HCl, pH 7.0	25 mM (50 mM)
NaCl	100 mM (200 mM)
Glycerin	10 % (20 %)
EDTA	2 mM (4 mM)
Brij 25	0.01 % (0.02 %)
DTT	± 1 mM

Tabelle 5.2 Zusammensetzung des HEPES NaOH Puffers im Assay

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
HEPES NaOH, pH 7.4	19 mM
NaCl	38 mM
Brij 25	0.008 %
DTT	± 0.6 mM

5.4.2 Messung der Aktivität von PTP1B

Die Phosphatase PTP1B wurde als katalytische Domäne (Aminosäuren 1 bis 321) verwendet, welche rekombinant in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) exprimiert wurde. Das Protein wurde von Dr. Anja Schütz (AG. Prof. Heinemann, MDC Berlin) bereitgestellt.

Die Aktivität der Phosphatase PTP1B wurde mithilfe eines absorptionsbasierten Substratsystems bestimmt. Verwendet wurde dabei standardmäßig *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP). Die Dokumentation der Absorptionwerte erfolgte mithilfe eines Readers der Fa. Tecan Modell *Safire*² unter folgenden Parametern (Tabelle 5.3).

K_M -Wert Bestimmung

Die Bestimmung der Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit der Substrathydrolyse erfolgte durch die Aufnahme der Enzymaktivität bei verschiedenen Sub-

Tabelle 5.3 Parameter der Absorbtionsmessungen

Parameter	Wert
Absorptionswellenlänge	405 nm
Anzahl der Messungen	10
<i>time between move and read</i>	100 ms
Anzahl der Zyklen	120
Intervall	60 s
Temperatur	37 °C

stratkonzentrationen. Verwendet wurde dabei ein TRIS HCl Puffersystem (Tabelle 5.1) und eine Proteinkonzentration von ca. 50 nM. Die Berechnung des K_M -Wertes erfolgte durch die Software GraphPad Prism 5 unter Verwendung der nichtlinearen Regression "*Michaelis-Menten enzyme kinetics*".

Bestimmt wurde ein K_M -Wert von 2.4 ± 0.1 mM.

pNPP Assay

Die entsprechend in ihrer inhibitorischen Wirkung zu untersuchenden Substanzen wurden in einem 1 : 1 Verdünnungsschema in 384er Mikrotiterplatten (Corning 3544 oder 3711) vorgelegt und anschließend mit Puffer, Enzymlösung und Substratlösung versetzt. Die Parameter der verschiedenen Lösungen sind in Tabelle 5.4 wiedergegeben. Das Pipettierschema war wie folgt:

Die zu untersuchende Substanz wurde (vorliegend, je nach Löslichkeit, in einen DMSO / Puffer Gemisch mit einem minimalen Anteil von DMSO) mit 10 μ L Puffer spaltenweise verdünnt und mit Puffer versetzt. Es folgte die Zugabe der Proteinlösung mit einer anschließenden Inkubationszeit von 30 min. Der Assay wurde durch die Zugabe der pNPP-Lösung gestartet.

Nach jedem Schritt wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte auf einem Schüttler homogenisiert und kurz bei 1000 rpm zentrifugiert.

Tabelle 5.4 Parameter der des pNPP-Assays

Lösung	Volumen
Substanzverdünnung	10 µL
TRIS HCl pH 7.0	4 µL
PTP1B (270 nM) in TRIS HCl pH 7.0	4 µL
pNPP 13 mM in H ₂ O	4 µL

Bestimmung der Inhibitionswerte

Die erhaltenen Absorptionswerte wurden mithilfe des Programms Magellan 7 in die durchschnittliche Steigung mit der Einheit OD₄₀₅ / min überführt, wobei ein Zeitraum der Messung gewählt wurde, in dem der Kurvenverlauf die maximale Linearität aufwies. Nach Subtraktion der Steigung der Negativkontrolle wurde der Datensatz in das Programm GraphPad Prism 5 überführt. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte unter Anwendung der nicht-linearen Regression *”log(inhibitor) vs. response - variable slope”* oder nach Normierung auf Positiv- und Negativkontrolle mittels *”log(inhibitor) vs. normalized response - variable slope”*. Die Transformation in die Größe K_I erfolgte durch die Anwendung der Gleichung nach Cheng-Prusoff (Gleichung 5.2).^[153]

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (5.2)$$

Bestimmung von Enzymkinetiken nach Bestrahlung

Experimente, bei denen die Enzymkinetik nach Bestrahlung bestimmt werden sollte, wurden entsprechend des oben genannten Prozedere experimentell vorbereitet. Mikrotiterplatten, die die zu untersuchende Substanz und die Phosphatase PTP1B enthielten, wurden mit einer lichtundurchlässigen selbstklebenden Aluminiumfolie versiegelt. Die entsprechenden Kontrollen die denselben experimentellen Bedingungen unterliegen sollten, aber nicht bestrahlt werden sollten, wurden identisch vorbereitet. Die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden an der lichtdurchlässigen Unterseite mit selbstklebender Aluminiumfolie verdeckt.

Die Bestrahlungszeit betrug, falls nicht anders gekennzeichnet, 45 min. Die Bestrahlung erfolgte in einem auf 4 °C temperierten Kühlraum auf einem Transilluminator bei der Wellenlänge 365 nm. Um thermische Effekte aufgrund einer zu starken Erwärmung ausschließen zu können, wurde die Mikrotiterplatte auf Küvetten platziert, um eine Luftzirkulation unterhalb der Platte zu ermöglichen. Nach beendeter Bestrahlung wurde die Platte für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert, die Aluminiumfolie ober- und unterhalb der Platte entfernt, die Substratlösung zugegeben und die Messung gestartet.

5.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE

Probenvorbereitung

Proteinproben die über eine Gelelektrophorese getrennt werden sollten, wurden wie folgt vorbereitet.

Die Reaktionsansätze wurden entweder in 384er Mikrotiterplatten oder in Polypropylenreaktionsgefäßen (vorzugsweise Eppendorf *Safe-lock Tubes*) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde so gewählt, dass eine Menge von 300 ng bis zu 1 µg je zu trennender Fraktion vorlag.

Die Probenlösung (16 µL) wurden mit 4 µl Laemmli-Puffer (Tabelle 5.6) versetzt und für 5 min bei ≤ 100 °C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben kurzzeitig bei 9×10^3 rpm zentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert, wobei ein Volumen je Tasche von 20 µL nicht überschritten wurde. Als Massenreferenz diente ein Proteinmarkergemisch der Fa. Roth (*Roti®-Mark STANDARD*).

Durchführung von gelelektrophoretischen Trennungen

Die verwendeten SDS-Gele wurden je nach ihrer Anwendung in verschiedenen Polyacrylamiddichten hergestellt (Tabelle 5.5).

Die Lösungen wurden entsprechend ihrer Zielpolymerdichte vorbereitet und die Reaktion kurz vor dem Gießen der Gele mit einer Lösung von Ammoniumperoxidisulfat gestartet. Die Trenngele wurden mit *iso*-Propanol überschichtet und nach vollständiger Polymerisation das Sammelgel aufgetragen.

Die SDS-Gele wurden feucht bei 4 °C gelagert und bis zu einem Alter von 7 Tagen ver-

Tabelle 5.5 Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele (Volumina für 2 Gele)

Trenngel	Trenngel			Sammelgel
	12 %	15 %	17 %	4 %
Acryl- Bisacrylamid				
37.5 : 1	7.5 mL	7.2 mL	8.25 mL	0.9 mL
H ₂ O _{dest}	9 mL	6 mL	4.8 mL	4.5 mL
1.5 M TRIS pH 8.8	5.7 mL	4.5 mL	4.5 mL	
SDS 10 % (w / v)	0.45 mL	0.36 mL	0.36 mL	0.15 mL
TEMED	23 µL	23 µL	23 µL	23 µL
APS 10 % (w / v)	68 µL	45 µL	45 µL	45 µL
0.5 M TRIS pH 6.8				1.8 mL

wendet.

Die Durchführung der gelelektrophoretischen Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA und wurde solange durchgeführt bis die gesamte Laufstrecke erreicht wurde.

Die entwickelten Gele wurden zunächst mit vollentsalztem Wasser gewaschen und das Sammelgel entfernt. Gele, die fluoreszenzmarkierte Proteine enthielten wurden auf einem Fluoreszenz-Imaging-System dokumentiert und anschließend für 5 min in der Fixierlösung (Tabelle 5.6) gelagert. Die Anfärbung der Biopolymere erfolgte unter der Verwendung einer methanolischen Coomassie-Lösung. Die Gele wurden angefärbt, bis eine gleichmäßige Blaufärbung erreicht wurde. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele mit verdünnter Essigsäure entfärbt, bis die Lösung farblos blieb.

5.4.4 Westernblot

Anti-STAT5B-Westernblot

Zellpellets (4×10^6) der Zelllinien BAF3 und Jurkat wurden in 500 µL 25 mM TRIS HCl pH 7.0 aufsuspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Die Zellsuspension wurde viermal für 30 Sekunden mittels Ultraschall (70 % Leistung) lysiert, wobei das Gemisch nach

Tabelle 5.6 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer in gelelektrophoretischen Trennungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
4 x Laemmli Puffer	240 mM TRIS HCl pH 6.8, 40 % Glycerol, 4 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol, 0.4 % Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS
Fixierlösung	50 % Methanol
Färbelösung	0.15 g Coomassie-Brillant-Blau G-250 in Methanol / AcOH (11 : 1, 120 ml)
Entfärbelösung	10 % AcOH

jedem Zyklus für 30 Sekunden ruhte. Es wurde für 3 min bei 14×10^3 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Jeweils 10 μ L des Lysates wurden auf die Geltaschen aufgetragen. Proben, die einen Überschuss an STAT5B-MBP enthalten sollten, wurden mit 5 μ L einer 0.16 mg / mL STAT5B-Lösung in 25 mM TRIS HCl versetzt. Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurden die getrennten Proteine auf eine PVDF Membran transferiert (1 h, 30 V, I = konstant \sim 250 mA). Die Membran wurde mit Wasser gewaschen, 30 min im Sättigungspuffer (1 % BSA, 0.05 % NaN_3 in PBS) geschwenkt und anschließend dreimal für 10 min mit Waschpuffer (50 mM TRIS HCl 7.2, 0.09 % NaCl, 0.05 % Tween 20) gewaschen. Die Membran wurde für 16 h bei 0 °C mit dem primären STAT5B Antikörper (TransAMTM STAT Family Kit, Fa. Active Motive, 1:5000 Verdünnung) inkubiert. Es wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper AP-Konjugat (Antirabbit, Fa. Sigma) inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und in der AP-Reaktionslösung (100 mM TRIS HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) geschwenkt. Die Entwicklungsreagenzien NBT (33 μ L einer 5 mg / mL Lösung) und BCIP (16 μ L, einer 5 mg / mL Lösung) wurden in 10 mL Reaktionslösung verdünnt und zu der PVDF Mebran gegeben. Der Blot wurde solange entwickelt (\sim 6 min), bis visuell erkennbare Banden zu beobachten waren.

Literaturverzeichnis

- [1] E. H. Fischer, E. G. Krebs, *The Journal of Biological Chemistry* **1955**, 216(1), 121–132.
- [2] E. G. Krebs, E. H. Fischer, *The Journal of Biological Chemistry* **1955**, 216(1), 113–120.
- [3] L. N. Johnson, *Biochemical Society Transactions* **2009**, 37(Pt 4), 627–641.
- [4] J. Reimand, O. Wagih, G. D. Bader, *Scientific Reports* **2013**, 3, 2651.
- [5] A. González-Rodríguez, J. A. Mas Gutierrez, S. Sanz-González, M. Ros, D. J. Burks, A. M. Valverde, *Diabetes* **2010**, 59(3), 588–599.
- [6] I. Martin, J. W. Kim, B. D. Lee, H. C. Kang, J.-C. Xu, H. Jia, J. Stankowski, M.-S. Kim, J. Zhong, M. Kumar, S. A. Andrabi, Y. Xiong, D. W. Dickson, Z. K. Wszolek, A. Pandey, T. M. Dawson, V. L. Dawson, *Cell* **2014**, 157(2), 472–485.
- [7] T. Ma, M. A. Trinh, A. J. Wexler, C. Bourbon, E. Gatti, P. Pierre, D. R. Cavener, E. Klann, *Nature Neuroscience* **2013**, 16(9), 1299–1305.
- [8] X. Li, R. Zeng, Q.-Q. Tang, *Methods in Enzymology* **2014**, 538, 279–295.
- [9] D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs, *Journal of Biological Chemistry* **1968**, 243(13), 3763–3765.
- [10] P. Cohen, *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, 25(12), 596–601.
- [11] J. V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnäd, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, M. Mann, *Cell* **2006**, 127(3), 635–648.
- [12] W. Eckhart, M. A. Hutchinson, T. Hunter, *Cell* **1979**, 18(4), 925–933.

- [13] T. Hunter, *Current Opinion in Cell Biology* **2009**, 21(2), 140–146.
- [14] L. N. Johnson, R. J. Lewis, *Chemical Reviews* **2001**, 101(8), 2209–2242.
- [15] T. Kaneko, R. Joshi, S. M. Feller, S. S. C. Li, *Cell Communication and Signaling* **2012**, 10(1), 32.
- [16] I. Sadowski, J. C. Stone, T. Pawson, *Molecular and Cellular Biology* **1986**, 6(12), 4396–4408.
- [17] G. Waksman, D. Kominos, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R. B. Birge, D. Cowburn, H. Hanafusa, B. J. Mayer, M. Overduin, M. D. Resh, C. B. Rios, L. Silverman, J. Kuriyan, *Nature* **1992**, 358(6388), 646.
- [18] G. Waksman, S. Kumaran, O. Lubman, *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2004**, 6(3), 1–18.
- [19] W. Gan, B. Roux, *Proteins* **2009**, 74(4), 996–1007.
- [20] W. E. Balch, C. J. Der, A. Hall, *Regulators and Effectors of Small GTPases, Part G: Ras Family II: Ras Family II*, Elsevier Science, **2001**.
- [21] A. J. Brooks, W. Dai, M. L. O'Mara, D. Abankwa, Y. Chhabra, R. A. Pelekanos, O. Gardon, K. A. Tunny, K. M. Blucher, C. J. Morton, M. W. Parker, E. Sierecki, Y. Gambin, G. A. Gomez, K. Alexandrov, I. A. Wilson, M. Doxastakis, A. E. Mark, M. J. Waters, *Science* **2014**, 344(6185), 1249783.
- [22] D. S. Aaronson, C. M. Horvath, *Science* **2002**, 296(5573), 1653–1655.
- [23] K. Shuai, B. Liu, *Nature Reviews. Immunology* **2003**, 3(11), 900–911.
- [24] K. Abubaker, R. B. Luwor, H. Zhu, O. McNally, M. A. Quinn, C. J. Burns, E. W. Thompson, J. K. Findlay, N. Ahmed, *BMC Cancer* **2014**, 14(1), 317.
- [25] V. Di Marzo, *Diabetologia* **2008**, 51(8), 1356–1367.
- [26] B. G. Neel, N. K. Tonks, *Current Opinion in Cell Biology* **1997**, 9(2), 193–204.
- [27] M. Soulsby, A. M. Bennett, *Physiology* **2009**, 24, 281–289.

- [28] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, *Cell* **2004**, *117*(6), 699–711.
- [29] J. W. Robinson, *Frontiers in Protein Research*, Nova Biomedical Books, **2005**.
- [30] N. K. Tonks, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, *7*(11), 833.
- [31] J. N. Andersen, O. H. Mortensen, G. H. Peters, P. G. Drake, L. F. Iversen, O. H. Olsen, P. G. Jansen, H. S. Andersen, N. K. Tonks, N. P. Møller, *Molecular & Cellular Proteomics* **2001**, *21*(21), 7117–7136.
- [32] J. N. Andersen, P. G. Jansen, S. M. Echwald, O. H. Mortensen, T. Fukada, R. Del Vecchio, N. K. Tonks, N. P. H. Møller, *FASEB Journal* **2004**, *18*(1), 8–30.
- [33] A. J. Barr, *Future Medicinal Chemistry* **2010**, *2*(10), 1563–1576.
- [34] G. H. Peters, T. M. Frimurer, J. N. Andersen, O. H. Olsen, *Biophysical Journal* **2000**, *78*(5), 2191–2200.
- [35] Z.-Y. Zhang, *Annual review of pharmacology and toxicology* **2002**, *42*, 209–234.
- [36] D. L. Lohse, J. M. Denu, N. Santoro, J. E. Dixon, *Biochemistry* **1997**, *36*(15), 4568–4575.
- [37] N. K. Tonks, *FEBS Letters* **2003**, *546*(1), 140–148.
- [38] N. K. Tonks, C. D. Diltz, E. H. Fischer, *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*(14), 6731–6737.
- [39] N. K. Tonks, C. D. Diltz, E. H. Fischer, *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*(14), 6722–6730.
- [40] D. Barford, A. J. Flint, N. K. Tonks, *Science* **1994**, *263*(5152), 1397–1404.
- [41] F. Liu, D. E. Hill, J. Chernoff, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*(49), 31290–31295.
- [42] S.-C. Yip, S. Saha, J. Chernoff, *Trends in Biochemical Sciences* **2010**, *35*(8), 442–449.

- [43] van Montfort, Rob L M, M. Congreve, D. Tisi, R. Carr, H. Jhoti, *Nature* **2003**, 423(6941), 773–777.
- [44] A. Salmeen, J. N. Andersen, M. P. Myers, T.-C. Meng, J. A. Hinks, N. K. Tonks, D. Barford, *Nature* **2003**, 423(6941), 769–773.
- [45] S. E. Leonard, F. J. Garcia, D. S. Goodsell, K. S. Carroll, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50(19), 4423–4427.
- [46] D. Bandyopadhyay, A. Kusari, K. A. Kenner, F. Liu, J. Chernoff, T. A. Gustafson, J. Kusari, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272(3), 1639–1645.
- [47] S. Dadke, S. Cotteret, S.-C. Yip, Z. M. Jaffer, F. Haj, A. Ivanov, F. Rauscher, K. Shuai, T. Ng, B. G. Neel, J. Chernoff, *Nature Cell Biology* **2007**, 9(1), 80–85.
- [48] J. V. Frangioni, A. Oda, M. Smith, E. W. Salzman, B. G. Neel, *The EMBO Journal* **1993**, 12(12), 4843–4856.
- [49] A. Trümpler, B. Schlott, P. Herrlich, P. A. Greer, F.-D. Böhmer, *The FEBS Journal* **2009**, 276(19), 5622–5633.
- [50] N. K. Tonks, M. F. Cicirelli, C. D. Diltz, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Molecular & Cellular Proteomics* **1990**, 10(2), 458–463.
- [51] A. Cheng, N. Uetani, P. D. Simoncic, V. P. Chaubey, A. Lee-Loy, C. McGlade, B. P. Kennedy, M. L. Tremblay, *Developmental Cell* **2002**, 2(4), 497–503.
- [52] M. Elchebly, *Science* **1999**, 283(5407), 1544–1548.
- [53] N. Dubé, M. L. Tremblay, *Cell Cycle* **2014**, 3(5), 548–551.
- [54] S. G. Julien, N. Dube, M. Read, J. Penney, M. Paquet, Y. Han, B. P. Kennedy, W. J. Muller, M. L. Tremblay, *Nature Genetics* **2007**, 39(3), 338–346.
- [55] L. Lessard, M. Stuiblé, M. L. Tremblay, *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, 1804(3), 613–619.
- [56] J. R. Wiener, J. A. Hurteau, B. J. Kerns, R. S. Whitaker, M. R. Conaway, A. Berchuck, R. C. J. Bast, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **1994**, 170(4), 1177–1183.

- [57] J. R. Wiener, B.-J. M. Kerns, E. L. Harvey, M. R. Conaway, J. D. Iglehart, A. Berchuck, R. C. Bast, *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **1994**, 86(5), 372–378.
- [58] K. R. J. LaMontagne, G. Hannon, N. K. Tonks, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95(24), 14094–14099.
- [59] N. Dubé, A. Bourdeau, K. M. Heinonen, A. Cheng, A. L. Loy, M. L. Tremblay, *Cancer Research* **2005**, 65(21), 10088–10095.
- [60] M. Warabi, T. Nemoto, K. Ohashi, M. Kitagawa, K. Hirokawa, *Experimental and Molecular Pathology* **2000**, 68(3), 187–195.
- [61] H. Liu, Y. Wu, S. Zhu, W. Liang, Z. Wang, Y. Wang, T. Lv, Y. Yao, D. Yuan, Y. Song, *Cancer letters* **2015**, 359(2), 218–225.
- [62] P.-J. Chen, S.-P. Cai, C. Huang, X.-M. Meng, J. Li, *Toxicology* **2015**, 337, 10–20.
- [63] D. Medgyesi, E. Hobeika, R. Biesen, F. Kollert, A. Taddeo, R. E. Voll, F. Hiepe, M. Reth, *The Journal of Experimental Medicine* **2014**, 211(3), 427–440.
- [64] P. G. Través, V. Pardo, M. Pimentel-Santillana, Á. González-Rodríguez, M. Mojena, D. Rico, Y. Montenegro, C. Calés, P. Martín-Sanz, A. M. Valverde, L. Boscá, *Cell Death & Disease* **2014**, 5, e1125.
- [65] S. Lee, Q. Wang, *Medicinal Research Reviews* **2007**, 27(4), 553–573.
- [66] S. Zhang, Z.-Y. Zhang, *Drug discovery today* **2007**, 12(9-10), 373–381.
- [67] I. Marseigne, B. P. Roques, *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, 53(15), 3621–3624.
- [68] Terrence R. Burke Jr, P. Russ, B. Lim, *Synthesis* **1991**, 1991(11), 1019–1020.
- [69] M. S. Smyth, H. Ford, T. R. Burke, *Tetrahedron Letters* **1992**, 33(29), 4137–4140.
- [70] T. R. Burke, M. S. Smyth, M. Nomizu, A. Otaka, P. R. Roller, *The Journal of Organic Chemistry* **1993**, 58(6), 1336–1340.

- [71] L. Chen, L. Wu, A. Otaka, M. S. Smyth, P. P. Roller, T. R. Burke, J. Denhertog, Z. Y. Zhang, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995**, 216(3), 976–984.
- [72] Z. Y. Zhang, D. Maclean, D. J. McNamara, T. K. Sawyer, J. E. Dixon, *Biochemistry* **1994**, 33(8), 2285–2290.
- [73] Y. A. Puius, Y. Zhao, M. Sullivan, D. S. Lawrence, S. C. Almo, Z. Y. Zhang, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94(25), 13420–13425.
- [74] A. Salmeen, J. N. Andersen, M. P. Myers, N. K. Tonks, D. Barford, *Molecular cell* **2000**, 6(6), 1401–1412.
- [75] J.-P. Sun, A. A. Fedorov, S.-Y. Lee, X.-L. Guo, K. Shen, D. S. Lawrence, S. C. Almo, Z.-Y. Zhang, *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278(14), 12406–12414.
- [76] A. P. Combs, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53(6), 2333–2344.
- [77] K. E. You-Ten, E. S. Muise, A. Itié, E. Michaliszyn, J. Wagner, S. Jothy, W. S. Lapp, M. L. Tremblay, *The Journal of Experimental Medicine* **1997**, 186(5), 683–693.
- [78] T. R. Burke, Z.-J. Yao, H. Zhao, G. W. Milne, L. Wu, Z.-Y. Zhang, J. H. Voigt, *Tetrahedron* **1998**, 54(34), 9981–9994.
- [79] M. J. Miller, D. S. Braccolino, D. G. Clearly, J. E. Ream, M. C. Walker, J. A. Sikorski, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, 4(21), 2605–2608.
- [80] K. Hellmuth, S. Grosskopf, C. T. Lum, M. Würtele, N. Röder, J. P. v. Kries, M. Rosario, J. Rademann, W. Birchmeier, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105(20), 7275–7280.
- [81] S. Grosskopf, C. Eckert, C. Arkona, S. Radetzki, K. Böhm, U. Heinemann, G. Wolber, J.-P. v. Kries, W. Birchmeier, J. Rademann, *ChemMedChem* **2015**, 10(5), 815–826.
- [82] M. Hussain, V. Ahmed, B. Hill, Z. Ahmed, S. D. Taylor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, 16(14), 6764–6777.

- [83] E. W. Yue, B. Wayland, B. Douty, M. L. Crawley, E. McLaughlin, A. Takvorian, Z. Wasserman, M. J. Bower, M. Wei, Y. Li, P. J. Ala, L. Gonneville, R. Wynn, T. C. Burn, P. C. C. Liu, A. P. Combs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*(17), 5833–5849.
- [84] B. Douty, B. Wayland, P. J. Ala, M. J. Bower, J. Pruitt, L. Bostrom, M. Wei, R. Klabe, L. Gonneville, R. Wynn, T. C. Burn, P. C. C. Liu, A. P. Combs, E. W. Yue, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*(1), 66–71.
- [85] M. Stuibler, L. Zhao, I. Aubry, D. Schmidt-Arras, F.-D. Böhmer, C.-J. Li, M. L. Tremblay, *ChemBioChem* **2007**, *8*(2), 179–186.
- [86] Z. Lin, Y. Zhang, Y. Zhang, H. Shen, L. Hu, H. Jiang, X. Shen, *Biochemical Pharmacology* **2008**, *76*(10), 1251–1262.
- [87] N. Krishnan, D. Koveal, D. H. Miller, B. Xue, S. D. Akshinthala, J. Kragelj, M. R. Jensen, C.-M. Gauss, R. Page, M. Blackledge, S. K. Muthuswamy, W. Peti, N. K. Tonks, *Nature Chemical Biology* **2014**, *10*(7), 558.
- [88] C. Liljebris, J. Martinsson, L. Tedenborg, M. Williams, E. Barker, J. E. S. Duffy, A. Nygren, S. James, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10*(10), 3197–3212.
- [89] G. Huyer, S. Liu, J. Kelly, J. Moffat, P. Payette, B. Kennedy, G. Tsaprailis, M. J. Gresser, C. Ramachandran, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*(2), 843–851.
- [90] S. Kumar, B. Zhou, F. Liang, W.-Q. Wang, Z. Huang, Z.-Y. Zhang, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*(21), 7943–7948.
- [91] S. Liu, B. Zhou, H. Yang, Y. He, Z.-X. Jiang, S. Kumar, L. Wu, Z.-Y. Zhang, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*(26), 8251–8260.
- [92] L.-C. Lo, Y.-L. Chiang, C.-H. Kuo, H.-K. Liao, Y.-J. Chen, J.-J. Lin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *326*(1), 30–35.
- [93] K. A. Kalesh, L. P. Tan, K. Lu, L. Gao, J. Wang, S. Q. Yao, *Chemical Communications* **2010**, *46*(4), 589–591.

- [94] K. Lee, H. Jin Kang, Y. Xia, S. J. Chung, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*(1), 54–63.
- [95] W. P. Taylor, Z. Y. Zhang, T. S. Widlanski, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*(9), 1515–1520.
- [96] N. S. Tulsi, A. M. Downey, C. W. Cairo, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*(24), 8679–8686.
- [97] L.-C. Lo, T.-L. Pang, C.-H. Kuo, Y.-L. Chiang, H.-Y. Wang, J.-J. Lin, *Journal of Proteome Research* **2002**, *1*(1), 35–40.
- [98] Q. Zhu, X. Huang, G. Y. Chen, S. Q. Yao, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*(13), 2669–2672.
- [99] S. E. Leonard, K. S. Carroll, *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*(1), 88–102.
- [100] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annual review of biochemistry* **2008**, *77*, 383–414.
- [101] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*(26), 14694–14699.
- [102] S. A. Sieber, *Activity-Based Protein Profiling*, Bd. 324, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**.
- [103] D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*(1), 87–95.
- [104] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*(1), 16–20.
- [105] L. I. Willems, N. Li, B. I. Florea, M. Ruben, van der Marel, Gijbert A, H. S. Overkleeft, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*(18), 4431–4434.
- [106] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*(27), 10000–10005.
- [107] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *The Journal of Biological Chemistry* **1962**, *237*, 3006–3008.

- [108] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, 51(46), 12479–12520.
- [109] G. W. J. Fleet, R. R. Porter, J. R. Knowles, *Nature* **1969**, 224(5218), 511–512.
- [110] M. S. Rizk, X. Shi, M. S. Platz, *Biochemistry* **2006**, 45(2), 543–551.
- [111] G. Aranda, J. P. Beaucourt, M. Ponchant, M. F. Isambert, J. P. Henry, *European Journal of Medicinal Chemistry* **1990**, 25(4), 369–374.
- [112] K. G. Pinney, J. A. Katzenellenbogen, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56(9), 3125–3133.
- [113] R. A. G. Smith, J. R. Knowles, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, 95(15), 5072–5073.
- [114] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *Journal of Biological Chemistry* **1980**, 255(8), 3313–3318.
- [115] M. Platz, A. S. Admasu, S. Kwiatkowski, P. J. Crocker, N. Imai, D. S. Watt, *Bioconjugate Chemistry* **1991**, 2(5), 337–341.
- [116] R. E. Galaray, L. C. Craig, M. P. Printz, *Nature: New Biology* **1973**, 242(117), 127–128.
- [117] A. G. McDonald, K. F. Tipton, „Enzymes: Irreversible Inhibition“ in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2001**.
- [118] M. Fullbeck, E. Michalsky, I. S. Jaeger, P. Henklein, H. Kuhn, K. Ruck-Braun, R. Preissner, *Genome informatics* **2006**, 17(1), 141–151.
- [119] P. Osman, S. Martin, D. Milojevic, C. Tansey, F. Separovic, *Langmuir* **1998**, 14(15), 4238–4242.
- [120] V. Borisenko, D. C. Burns, Z. Zhang, G. A. Woolley, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122(27), 6364–6370.
- [121] H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, A. Yamazawa, M. Komiyama, *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39(7), 1316–1318.

- [122] T. Yamaguchi, T. Seki, T. Tamaki, K. Ichimura, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1992**, 65(3), 649–656.
- [123] R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterhelt, L. Moroder, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38(18), 2771–2774.
- [124] R. Behrendt, M. Schenk, H.-J. Musiol, L. Moroder, *Journal of Peptide Science* **1999**, 5(11), 519–529.
- [125] S. Spörlein, H. Carstens, H. Satzger, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99(12), 7998–8002.
- [126] A. Horatscheck, S. Wagner, J. Ortwein, B. G. Kim, M. Lisurek, S. Beligny, A. Schütz, J. Rademann, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51(37), 9441–9447.
- [127] S. Wagner, A. Schütz, J. Rademann, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, 23(12), 2839–2847.
- [128] I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1998**, 37(17), 5779–5784.
- [129] G. DeSantis, C. Paech, J. Jones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, 8(3), 563–570.
- [130] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, 33(19), 5661–5673.
- [131] J. W. Chin, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99(17), 11020–11024.
- [132] X. Cai, Z. Han, S. Yao, N. Lin, *Science in China Series B: Chemistry* **2001**, 44(6), 582–586.
- [133] S. G. Cohen, W. V. Sherman, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85(11), 1642–1647.
- [134] R. G. W. Norrish, F. W. Kirkbride, *Journal of the Chemical Society* **1932**, 1518.
- [135] T. Burke, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2006**, 6(14), 1465–1471.

- [136] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85(14), 2149–2154.
- [137] J. W. Tilley, R. Sarabu, R. Wagner, K. Mulkerins, *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55(3), 906–910.
- [138] J. B. Grimm, K. J. Wilson, D. J. Witter, *Tetrahedron Letters* **2007**, 48(26), 4509–4513.
- [139] M. Sekine, M. Satoh, H. Yamagata, T. Hata, *The Journal of Organic Chemistry* **1980**, 45(21), 4162–4167.
- [140] R. Karaman, A. Goldblum, E. Breuer, H. Leader, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1989**, (4), 765.
- [141] T. A. O'Brien, R. Kluger, D. C. Pike, R. B. Gennis, *Biochimica et Biophysica Acta* **1980**, 613(1), 10–17.
- [142] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53(12), 3070–3095.
- [143] B. G. Davis, V. Boyer, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18(6), 618–640.
- [144] S.-T. Chen, S.-Y. Wu, S.-Y. Chen, K.-T. Wang, *Biotechnology Letters* **1993**, 15(4), 373–376.
- [145] S.-T. Chen, W.-H. Huang, K.-T. Wang, *Chirality* **1994**, 6(7), 572–576.
- [146] J. D. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, G. W. Tregear, *Peptide Research* **1990**, 4(3), 194–199.
- [147] D. Barford, A. K. Das, M.-P. Egloff, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1998**, 27(1), 133–164.
- [148] H. Chen, L. N. Cong, Y. Li, Z. J. Yao, L. Wu, Z. Y. Zhang, T. R. J. Burke, M. J. Quon, *Biochemistry* **1999**, 38(1), 384–389.
- [149] J. Wrobel, A. Dietrich, *Tetrahedron Letters* **1993**, 34(22), 3543–3546.

- [150] C. Meyer, M. Köhn, *Synthesis* **2011**, 2011(20), 3255–3260.
- [151] R. Pascal, R. Sola, *Tetrahedron Letters* **1998**, 39(28), 5031–5034.
- [152] D. F. McCain, L. Wu, P. Nickel, M. U. Kassack, A. Kreimeyer, A. Gagliardi, D. C. Collins, Z.-Y. Zhang, *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279(15), 14713–14725.
- [153] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochemical Pharmacology* **1973**, 22(23), 3099–3108.
- [154] Y. Okamoto, N. Iwamoto, S. Takamuku, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1986**, (20), 1516.
- [155] K. W. Krosley, D. M. Collard, J. Adamson, M. A. Fox, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1993**, 69(3), 357–360.
- [156] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, S. Wang, *Analytical Biochemistry* **2004**, 332(2), 261–273.
- [157] C. Arnould, C. Philippe, V. Bourdon, M. J. Grégoire, R. Berger, P. Jonveaux, *Human Molecular Genetics* **1999**, 8(9), 1741–1749.
- [158] R. L. Rosen, K. D. Winestock, G. Chen, X. Liu, L. Hennighausen, D. S. Finbloom, *Blood* **1996**, 88(4), 1206–1214.
- [159] G. C. Adam, *Molecular & Cellular Proteomics* **2002**, 1(10), 781–790.
- [160] B. Cravatt, *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, 4(6), 663–668.
- [161] S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *Chemical Communications* **2006**, (22), 2311–2319.
- [162] A. K. Pedersen, X.-L. Guo, K. B. Møller, G. H. Peters, H. S. Andersen, J. S. Kastrup, S. B. Mortensen, L. F. Iversen, Z.-Y. Zhang, N. P. H. Møller, *The Biochemical Journal* **2004**, 378(Pt 2), 421–433.
- [163] Z. Y. Zhang, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, 33(1), 1–52.

- [164] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chemical Society Reviews* **2008**, 37(2), 320–330.
- [165] C. Heidelberger, N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Bach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin, J. Scheiner, *Nature* **1957**, 179(4561), 663–666.
- [166] H.-J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, 5(5), 637–643.
- [167] Y.-R. Luo, *Comprehensive handbook of chemical bond energies*, CRC Press, Boca Raton, FL, **c2007**.
- [168] A. H. Neilson, *Organofluorines*, Springer, **2002**.
- [169] T. Murai, Y. Tonomura, T. Takenaka, *Heteroatom Chemistry* **2011**, 22(3-4), 417–425.
- [170] W. Dabkowski, I. Tworowska, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, 3(5), 866–874.
- [171] B. R. Baker, N. M. J. Vermeulen, *Journal of Medicinal Chemistry* **1970**, 13(6), 1154–1160.
- [172] B. R. Baker, W. F. Wood, *Journal of Medicinal Chemistry* **1969**, 12(2), 216–220.
- [173] B. R. Baker, W. F. Wood, *Journal of Medicinal Chemistry* **1969**, 12(2), 214–216.
- [174] B. R. Baker, J. A. Hurlbut, *Journal of Medicinal Chemistry* **1969**, 12(2), 221–224.
- [175] D. A. Karanian, Q. B. Brown, A. Makriyannis, T. A. Kosten, B. A. Bahr, *The Journal of Neuroscience* **2005**, 25(34), 7813–7820.
- [176] J. Dong, L. Krasnova, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53(36), 9430–9448.
- [177] J. L. Kelley, B. R. Baker, *Journal of Medicinal Chemistry* **1982**, 25(5), 600–603.
- [178] B. R. Baker, M. H. Doll, *Journal of Medicinal Chemistry* **1971**, 14(9), 793–799.

- [179] R. Bender, C. Demay, J.-C. Elkaim, Riess, Jean, G., *Phosphorus and the Related Group V Elements* **1974**, (4), 183–186.
- [180] C. Kaduk, H. Wenschuh, M. Beyermann, K. Forner, L. Carpino, M. Bienert, *Letters in Peptide Science* **1996**, 2(5), 285–288.
- [181] T. Liu, J. R. Nedrow-Byers, M. R. Hopkins, C. E. Berkman, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21(23), 7013–7016.
- [182] „Fluorescein (free acid) | CAS 2321-07-5 | Santa Cruz Biotechnology, Inc.“.
- [183] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition* **1963**, 2(10), 565–598.
- [184] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition* **1963**, 2(11), 633–645.
- [185] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chemische Berichte* **1967**, 100(8), 2494–2507.
- [186] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41(14), 2596–2599.
- [187] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67(9), 3057–3064.
- [188] M. D. Best, *Biochemistry* **2009**, 48(28), 6571–6584.
- [189] G. S. Wood, R. Warnke, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1981**, 29(10), 1196–1204.
- [190] E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Clinical Chemistry* **1991**, 37(5), 625–636.
- [191] R. A. Copeland, *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists*, Bd. v. 46 von *Methods of biochemical analysis*, J. Wiley, Hoboken, N.J, **2005**.
- [192] M. Jaumot, J. F. Hancock, *Oncogene* **2001**, 20(30), 3949–3958.
- [193] J. G. Shaw, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1966**, 117(1), 1–9.
- [194] H. Bisswanger, *Perspectives in Science* **2014**, 1(1-6), 41–55.

- [195] C. Seo, J. HanYim, H. Kum Lee, H. Oh, *Mycology* **2011**, 2(1), 18–23.
- [196] K. E. Lukong, D. Larocque, A. L. Tyner, S. Richard, *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280(46), 38639–38647.
- [197] A. Seale, L. d. Jesus, S.-Y. Kim, Y.-H. Choi, H. B. Lim, C.-S. Hwang, Y.-S. Kim, *Biotechnology Letters* **2005**, 27(4), 221–225.
- [198] Y. S. Shim, K. C. Kim, D. Y. Chi, K.-H. Lee, H. Cho, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13(15), 2561–2563.
- [199] N. G. Aher, B. Kafle, H. Cho, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2013**, 34(4), 1275–1277.
- [200] A. Haque, J. N. Andersen, A. Salmeen, D. Barford, N. K. Tonks, *Cell* **2011**, 147(1), 185–198.
- [201] Z. D. Parsons, K. S. Gates, *Biochemistry* **2013**, 52(37), 6412–6423.
- [202] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Organic Letters* **2004**, 6(17), 2853–2855.
- [203] B. R. Baker, *Accounts of Chemical Research* **1969**, 2(5), 129–136.
- [204] K. Takata, M. Takesue, Y. Iseki, T. Sata, *Journal of Fluorine Chemistry* **1995**, 75(2), 163–167.
- [205] Z.-J. Yao, B. Ye, X.-W. Wu, S. Wang, L. Wu, Z.-Y. Zhang, T. R. Burke, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1998**, 6(10), 1799–1810.
- [206] D. Solas, R. L. Hale, D. V. Patel, *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61(4), 1537–1539.
- [207] C. E. Paulsen, K. S. Carroll, *Chemical Reviews* **2013**, 113(7), 4633–4679.
- [208] T. R. Burke, B. Ye, X. Yan, S. Wang, Z. Jia, L. Chen, Z. Y. Zhang, D. Barford, *Biochemistry* **1996**, 35(50), 15989–15996.
- [209] S. D. Taylor, A. Dinaut, A. N. Thadani, Z. Huang, *Tetrahedron Letters* **1996**, 37(45), 8089–8092.

- [210] C. Dufresne, P. Roy, Z. Wang, E. Asante-Appiah, W. Cromlish, Y. Boie, F. Forghani, S. Desmarais, Q. Wang, K. Skorey, D. Waddleton, C. Ramachandran, B. P. Kennedy, L. Xu, R. Gordon, C. C. Chan, Y. Leblanc, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*(4), 1039–1042.
- [211] Y. Han, M. Belley, C. I. Bayly, J. Colucci, C. Dufresne, A. Giroux, C. K. Lau, Y. Leblanc, D. McKay, M. Therien, M.-C. Wilson, K. Skorey, C.-C. Chan, G. Scapin, B. P. Kennedy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*(11), 3200–3205.
- [212] R. Stevens, L. Stevens, N. C. Price, *Biochemical Education* **1983**, *11*(2), 70.
- [213] Y.-W. Lou, Y.-Y. Chen, S.-F. Hsu, R.-K. Chen, C.-L. Lee, K.-H. Khoo, N. K. Tonks, T.-C. Meng, *The FEBS Journal* **2008**, *275*(1), 69–88.
- [214] W. C. Barrett, J. P. DeGnore, S. König, H. M. Fales, Y. F. Keng, Z. Y. Zhang, M. B. Yim, P. B. Chock, *Biochemistry* **1999**, *38*(20), 6699–6705.
- [215] T. Bonk, A. Humeny, *The Neuroscientist* **2001**, *7*(1), 6–12.
- [216] J. Gäb, H. John, M. Melzer, M.-M. Blum, *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2010**, *878*(17-18), 1382–1390.
- [217] J. Gäb, H. John, M.-M. Blum, *Toxicology Letters* **2011**, *200*(1-2), 34–40.
- [218] *Organic Syntheses* **2007**, *84*, 102.
- [219] G. A. Olah, D. A. Beal, J. A. Olah, *The Journal of Organic Chemistry* **1976**, *41*(9), 1627–1631.
- [220] F. C. Whitmore, A. Ginsburg, W. Rueggeberg, I. Tharp, H. Nottorf, M. Cannon, F. Carnahan, D. Cryder, G. Fleming, G. Goldberg, H. Haggard, C. Herr, T. Hoover, H. Lovell, R. Mraz, C. Noll, T. Oakwood, H. Patterson, R. van Strien, R. Walter, H. Zook, R. Wagner, C. Weisgerber, J. Wilkins, *Industrial & Engineering Chemistry* **1946**, *38*(5), 478–485.
- [221] A. Sinz, *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25*(4), 663–682.
- [222] U. Jakob, D. Reichmann (Hrsg.:), *Oxidative Stress and Redox Regulation*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2013**.

- [223] M. Sundaresan, Z.-X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, T. Finkel, *Science* **1995**, 270(5234), 296–299.
- [224] T. Finkel, *Current Opinion in Cell Biology* **2003**, 15(2), 247–254.
- [225] J. D. Lambeth, *Nature Reviews. Immunology* **2004**, 4(3), 181–189.
- [226] M. Lo Conte, K. S. Carroll, *The Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288(37), 26480–26488.
- [227] V. Gupta, K. S. Carroll, *Biochimica et Biophysica Acta* **2014**, 1840(2), 847–875.
- [228] W. S. Allison, *Accounts of Chemical Research* **1976**, 9(8), 293–299.
- [229] L. B. Poole, B.-B. Zeng, S. A. Knaggs, M. Yakubu, S. B. King, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, 16(6), 1624–1628.
- [230] A. Heckel, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Letters* **1983**, 24(46), 5047–5050.
- [231] A. J. McGrath, G. E. Garrett, L. Valgimigli, D. A. Pratt, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132(47), 16759–16761.
- [232] S. E. Leonard, K. G. Reddie, K. S. Carroll, *ACS Chemical Biology* **2009**, 4(9), 783–799.
- [233] W. Dabkowski, J. Michalski, C. Radziejewski, Z. Skrzypczyński, *Chemische Berichte* **1982**, 115(4), 1636–1643.
- [234] W. Dabkowski, J. Michalski, Z. Skrzypczynski, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1982**, (21), 1260.
- [235] Y. Segall, J. E. Casida, *Tetrahedron Letters* **1982**, 23(2), 139–142.
- [236] Y. C. Yang, L. L. Szafraniec, W. T. Beaudry, D. K. Rohrbaugh, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112(18), 6621–6627.
- [237] C.-Y. Chen, D. Willard, J. Rudolph, *Biochemistry* **2009**, 48(6), 1399–1409.
- [238] J. Liu, V. Bulmus, D. L. Herlambang, C. Barner-Kowollik, M. H. Stenzel, T. P. Davis, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46(17), 3099–3103.

- [239] R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman, *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266(7), 4244–4250.
- [240] S. Carballal, B. Alvarez, L. Turell, H. Botti, B. A. Freeman, R. Radi, *Amino Acids* **2007**, 32(4), 543–551.
- [241] L. Craine, M. Raban, *Chemical Reviews* **1989**, 89(4), 689–712.
- [242] T. Mill, C. W. Gould, *Environmental Science & Technology* **1979**, 13(2), 205–208.
- [243] G. D. Kishore Kumar, D. Saenz, G. L. Lokesh, A. Natarajan, *Tetrahedron Letters* **2006**, 47(35), 6281–6284.
- [244] J. Haralambidis, K. Angus, S. Pownall, L. Duncan, M. Chai, G. W. Tregear, *Nucleic Acids Research* **1990**, 18(3), 501–505.
- [245] N. S. Hatzakis, H. Engelkamp, K. Velonia, J. Hofkens, P. C. M. Christianen, A. Svendsen, S. A. Patkar, J. Vind, J. C. Maan, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chemical Communications* **2006**, (19), 2012–2014.
- [246] M. Slater, M. Snauko, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Analytical Chemistry* **2006**, 78(14), 4969–4975.
- [247] U. Wong, R. J. Cox, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46(26), 4926–4929.
- [248] C. Cai, H. J. Breslin, W. He, *Tetrahedron* **2005**, 61(28), 6836–6838.
- [249] L. J. Oates, R. F. W. Jackson, M. H. Block, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1(1), 140–144.