



universität
wien

DIPLOMARBEIT

„Prüfung des Zuganges für Histidin-Derivate als Baustoffe
für die Peptidsynthese“

verfasst von

Philipp Wagner

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreut von:

ao. Univ. Prof. Mag. pharm. Dr. Martin Kratzel

Danksagung:

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung des Studiums und bei der Ausarbeitung der Diplomarbeit unterstützt und begleitet haben.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer ao. Univ. Prof. Mag. pharm. Dr. Martin Kratzel, sowie der Doktorandin Mag.pharm. Elisabeth Wurzer-Priester, die mir beim praktischen Teil dieser Diplomarbeit geholfen haben, aber auch in der Auswertung unterstützt haben und auch genügend Geduld mit mir hatten.

Weiters möchte ich meiner Familie danken, natürlich meinen Eltern Agnes und Franz, die obwohl wir oft Meinungsverschiedenheiten hatten immer meine Ausbildungsziele, sei es Schule, aber auch dann auf der Universität unterstützt haben. Dank gilt hier auch meinen Schwestern.

Ein besonderer Dank gilt meinem Onkel, Dipl.Ing. Josef Wagner, der schon in meiner Kindheit das Interesse zu den Naturwissenschaften erweckte, was sogar, wie man sieht, starken Einfluss auf mein Leben und mein zukünftiges Berufsfeld nimmt.

Weiters möchte ich meinen Freunden danken, mit denen ich viel Zeit verbracht habe, wenn ich im Waldviertel war.

Zum Schluss danke ich noch meiner Freundin, Maria Geisberger, besonders für ihr Durchhaltevermögen mit mir als Student, da ich oft das Lernen für Prüfungen vorzog, als Zeit mit ihr zu verbringen. Aber auch dafür, dass du mich trotz meiner vielen Macken so hinnimmst wie ich bin und dein Organisationstalent auch bei meinen Angelegenheiten anwendest.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Die Haut unter Einfluss von UV-Strahlung	2
1.2.1	Arten der UV-Strahlung	2
1.2.2	Sonnenbrand	3
1.2.3	Maglines Melanom	3
1.3	Erkrankungen mit fehlerhafter Hautpigmentierung	4
1.3.1	Albinismus	4
1.3.2	Morbus Addison	5
1.3.3	Vitiligo	5
1.4	Das Melanocortinsystem	6
1.4.1	Physiologie der natürlichen Hautbräunung	6
1.4.2	Melanozyten	6
1.4.3	POMC	6
1.4.4	Melanozyten-stimulierende Hormone	7
1.4.5	Melanin	8
1.4.6	Melanocortinrezeptoren	8
1.4.7	Afamelanotid	9
1.4.8	Bremelanotid	9
1.5	Sonnenschutz und Hautbräuner	9
1.5.1	Der Hauttyp nach Fitzpatrick	9
1.5.2	UV-Filter	10
1.5.3	Solarien	11
1.5.4	Bräunungstabletten und Bräunungsbeschleuniger	11
1.5.5	Selbstbräuner	12
1.6	Histidin	12
1.6.1	Allgemeines zu Histidin	12
1.6.2	Tautomerie des Histidins	12
1.6.3	Racemisierung des Histidins	13
1.6.4	Chemische Eigenschaften des Histidins	14
1.7	Synthetische Ziele dieser Diplomarbeit	14
2	Eigene Untersuchungen	15
2.1	N(α)-Schutz von Aminosäuren	17
2.1.1	Schutz mittels Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe	18
2.1.2	Phthalylschutz von Aminosäuren	21
2.2	Veresterung von L-Histidin	25
2.2.1	Synthese von L-Histidinmethylester	25
2.2.2	Synthese von L-Histidinbenzylester	26

2.3 Versuche der τ -Acylierung des Imidazol-Stickstoff von N(α)geschützten Histidinbenzylestern.....	28
2.3.1 Syntheseveruche von τ -acylierten Derivaten mittels Anhydriden.....	29
2.3.2 Syntheseveruche mittels Säurechloriden.....	30
2.4 Rigidisierungsversuche von Histidin.....	32
2.3.1 Syntheseveruche von Spinacin	32
2.4.2 Syntheseveruch von Spinacinbenzylester.....	35
2.5 Syntheseveruche von 2-Amino-3-(1H-Imidazol-1-yl)propansäurederivaten....	36
2.5.1 Synthese von Z-L- β -Lacton	36
2.6 Resultate/Diskussion	41
3 Experimenteller Teil:	42
4 Literaturverzeichnis.....	51
5 Anhang.....	57

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und dient zum Schutz, einerseits vor Wasserverlusten von innen, andererseits gegenüber schädlichen Einflüssen von außen, wie Krankheitserreger, Strahlung oder Umweltgiften. Besonders Strahlung betreffend, ist die Hautfarbe, beziehungsweise der Hauttyp, für die Stärke der Barriere verantwortlich. Genauer gesagt ist die Strahlungsbarriere das von den Melanozyten gebildete Melanin. Dieses ist das Hautpigment, welches neben der Hautfarbe auch für die Haar- und Augenfarbe verantwortlich ist. Aufgrund der protektiven Funktion des Melanins gegenüber UV-Strahlung ist also die Hautfarbe ein guter Indikator zur Bestimmung des Sonnenbrand- aber auch des Hautkrebsrisikos.

UV-Strahlung führt zur Schädigung der DNS, der humane Organismus versucht dieser durch verschiedenste Kompensationsmechanismen Herr zu werden, indem die DNS wieder repariert wird, während in aussichtslosen Fällen die Apoptose eingeleitet wird. Ein prophylaktischer Mechanismus, die Ausschüttung von Melanin, dient dazu, die DNS anderer Zellen vor dem schädlichen Einfluss zu schützen. Neben der schädlichen Wirkung darf man aber nicht vergessen, dass UV-Strahlung auch essentiell für die Biosynthese von Vitamin D₃ ist.

Eine hellere Haut erhöht das Risiko an einem kutanen Melanom zu erkranken¹, weshalb eine prophylaktische Bräunung Sinn machen würde. Aktuell existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten einen dunkleren Hautton zu erlangen, jedoch reichen die Möglichkeiten der künstlichen Hautbräunung nicht aus, um einen entsprechenden UV-Schutz zu erzeugen. Dabei gibt es neben der Bräunung durch Strahlung in Solarien auch Möglichkeiten der strahlungsfreien Bräune. Die Idee ist es also, ein Arzneimittel herzustellen, welches agonistisch an den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) bindet und das α -Melanozyten-stimulierende-Hormon (α -MSH) imitiert. Dadurch kommt es zur Produktion und Ausschüttung von Melanin ohne UV-Einwirkung, was zu einer dunkleren Hautfarbe führt und deshalb UV-Schutz bietet. Dies wäre besonders für Menschen mit einem hellen Hauttyp interessant, bzw. für Personen, die krankheitsbedingt einen zu geringen Melaninschutz besitzen und dadurch auch ein erhöhtes Sonnenbrand- oder Melanomrisiko haben.

Afamelanotid ist ein Wirkstoff, der zum aktuellen Zeitpunkt bereits in der Schweiz und in Italien zugelassen ist und eben diese agonistische Wirkung am Melanocortin-1-Rezeptor besitzt. Er wird jedoch durch subkutane Implantat-Injektionen verabreicht, weil der Wirkstoff, kutan verabreicht, nicht bis zu den Melanozyten vorzudringen vermag. Es wurden bereits

tetrapeptidische Analoga des Melanocortins α -Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH) getestet, die wirksamer als das natürliche α -MSH sind. Auch tripeptidische Verbindungen wurden bisher unter anderem von Abdel-Malek et al getestet, die agonistisch an MC1R wirksam sind, jedoch erreichten diese Substanzen nicht denselben Effekt wie α -MSH.² Um nun ein Molekül zu entwickeln, das als Arzneimittel verwendbar ist, wird versucht einzelne Aminosäuren zu modifizieren. Die Modifikation soll so erfolgen, dass eine erhöhte Aktivität am Rezeptor erreicht werden kann, dabei das Molekulargewicht reduziert wird (im Idealfall unter 500 Dalton³) und die hydrophilen und lipophilen Eigenschaften verändert werden, um eine topische oder systemische Anwendung zu ermöglichen.

1.2 Die Haut unter Einfluss von UV-Strahlung^{4, 5, 6}

1.2.1 Arten der UV-Strahlung

Wenn man von UV-Strahlung spricht, dann handelt es sich um nicht sichtbares Licht, welches eine Wellenlänge von 100-400 nm aufweist. Man unterteilt dieses Spektrum wiederum in drei Arten von UV-Strahlung, abhängig von ihrer Wellenlänge. Diese Subtypen unterscheiden sich durch den Einfluss auf die Haut, in ihrer biologischen Aktivität und der Eigenschaft, die Hautbarriere zu durchdringen.

Mit 100-280 nm besitzt UVC die kürzeste Wellenlänge im UV-Bereich. Sie kann zwar durch ihre hohe Energie großen Schaden anrichten, wird aber durch die Ozonschicht vollständig absorbiert und besitzt deshalb keine Relevanz in der Schädigung der Haut. Mittelwellige UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 280-315 nm wird als UVB-Strahlung bezeichnet. Diese wird nur teilweise durch die Ozonschicht absorbiert. Sie penetriert nur die obersten Hautschichten und ist verantwortlich für die verzögert einsetzende Schutzbräunung. Sie ist aber auch verantwortlich für die Hautrötung und die Entstehung von Sonnenbränden. Außerdem fördert sie die Entwicklung von Hautkrebs durch Schädigung der DNS. Es kommt zu Photoadditionsreaktionen und zur Ausbildung von Cyclobutandimeren aus zwei Pyrimidinbasen eines DNS-Stranges.

UVA ist jene Strahlung mit der höchsten Wellenlänge, 320-410 nm und macht 95% der UV-Strahlung aus. Sie penetriert die Haut am tiefsten, und verursacht sowohl zelluläre als auch strukturelle Schäden. Die Bräunung durch UVA kommt sehr schnell zustande, da schon vorhandenes Melanin oxidiert wird. Zusätzlich kommt es zur Bildung von Reaktiven-Sauerstoffspezies (ROS), wodurch Proteine wie Elastin und Kollagen beschädigt werden, was zur Faltenbildung führt. Die ROS können sogar auf zellulärer Ebene zu DNS-Mutationen führen, UVA ist aus diesem Grund ein potenter Promotor für die Entstehung maligner Tumore. Trotz dieses Risikos wird es in Sonnenstudios zur Hautbräunung eingesetzt.

1.2.2 Sonnenbrand

Ein Sonnenbrand ist per Definition⁷ ein akuter Hautschaden, der hauptsächlich durch UVB-Strahlung ausgelöst wird. An Stellen, welche der Sonne ausgesetzt sind bildet sich ein scharf abgegrenztes Erythem. In schweren Fällen kann es sogar bis zur Blasenbildung kommen, was einer Verbrennung 2. Grades gleichkommt. Nur durch die Exposition mit UVB kommt es zu irreversiblen Schäden der DNS in den Keratinozyten, was wiederum zur Einleitung der Apoptose führt. Eine große Gefahr ist allerdings, wenn die Apoptosemechanismen nicht funktionieren, da es in diesem Fall zur Bildung von Krebszellen kommen kann.⁸

1.2.3 Malignes Melanom^{9, 10}

Ein malignes Melanom ist ein maligner Tumor der Melanozyten und wird im Volksmund als „Schwarzer Krebs“ bezeichnet. Er gilt unter den Hautkrebsarten als der aggressivste. Die wissenschaftliche Bezeichnung lautet Melanozytoblastom. Häufig tritt er bei Menschen im Alter von 30-60 Jahren auf, wobei in Österreich Männer häufiger als Frauen betroffen sind¹¹. Risikofaktoren für ein malignes Melanom sind Exposition von UV-Strahlung, besonders in der Kindheit, aber auch, wenn man eine ganze Population betrachtet, der vorherrschende Hauttyp. Dabei sind Personen mit Hauttyp 1 oder 2 am ehesten betroffen, während Menschen mit Hauttyp 5 und 6 sehr selten und wenn, dann nur auf den Handflächen und Fußsohlen, oder im Nagelbett Melanome entwickeln. Auf die Differenzierung der Hauttypen nach Fitzpatrick, wird später eingegangen.

Außerdem zählt eine familiäre Prädisposition, aber auch die Anzahl der Naevi zu den Risikofaktoren, da Melanome oftmals aus diesen entstehen. Eine der Hauptursachen für die Entstehung von Melanomen ist das UV-Licht. Aus diesem Grund sollte man versuchen die Exposition zu verringern. Das bedeutet die Verwendung von UV-schützender Kleidung und Brillen, aber auch die Verwendung von Sonnenschutzmitteln und die Vermeidung der UV-Strahlung zu Spitzenzeiten.

Laut Statistik Austria¹¹ hat sich die Anzahl an Melanomneuerkrankungen bis zum 75. Lebensjahr von 1986 bis 2001 von 0,5% auf 1,2% erhöht, wobei Männer häufiger betroffen waren als Frauen. Die Mortalität ist konstant bei 0,2% geblieben. Eine wichtige Selbstdifferentialdiagnosemethode ist die sogenannte ABCDE-Regel¹², mit der man ein Melanom von einem Naevus unterscheiden kann.

A: Asymmetrie: Ein Muttermal ist nicht asymmetrisch, ein Melanom kann durchaus asymmetrisch sein.

B: Grenze (engl.: Border): Die Grenzen eines Muttermals sind gleichmäßig, bei einem Melanom sind diese ungleichmäßig.

C: Farbe (engl.: Color): Muttermale sind einfärbig, sie können von rot, gelb oder am häufigsten brauner Farbe sein. Ein Melanom kann verschiedene Tönungen aufweisen: schwarz-braun-rot, aber auch weiß und blau.

D: Durchmesser (engl.: Diameter): In vielen Fällen ist der Durchmesser von Melanomen größer als bei Naevi, das muss aber nicht sein, so können Melanome in frühen Phasen auch sehr klein sein.

E: Entwicklung: Muttermale verändern sich im Laufe der Zeit nicht. Eine Veränderung bedeutet, dass sich die Form, die Größe, die Farbe, die Erhebung ändern. Es können auch neue Symptome wie Juckreiz, Blutungen oder Verkrustungen auftreten.

1.3 Erkrankungen mit fehlerhafter Hautpigmentierung

Durch die unterschiedliche genetische Veranlagung, aber auch als Begleitsymptome von Erkrankungen, können Variationen im Pigmentierungsgrad zwischen den Menschen auftreten. Man unterscheidet zwischen Hypo- und Hyperpigmentierung.

1.3.1 Albinismus^{13, 14, 15}

Bei allen Formen des Albinismus handelt es sich um eine zu geringe Pigmentierung von Haut, Haaren aber auch Augen, ausgelöst durch eine zu geringe oder fehlende Melaninbiosynthese. Es gibt dabei mehr als 10 verschiedenen Typen, wobei der okulocutane Typ (OCA) der am häufigsten vorkommende ist. Die Ursachen beim okulocutanen Typ sind genetisch bedingt, es handelt sich dabei um ein autosomal rezessiv vererbtes Gen. Problematisch für die Patienten ist die erhöhte Photosensitivität, die zu einem erhöhten Sonnenbrand- und Hautkrebsrisiko, aber auch zu Sehstörungen führen kann. Wie eben erwähnt, kommt der okulocutane Typ am häufigsten vor. Dieser Typ kann wiederum in 4 Untergruppen unterteilt werden.

Die OCA-Typen des Albinismus:¹⁶

OCA 1-Fälle werden mit weißem Haar geboren, und besitzen keine Möglichkeit Melanin anzuhäufen, falls das betroffene Tyrosinase-Gen defekt ist. Eine mutierte, weniger aktive Tyrosinase, welche einen Subtyp von OCA1 charakterisiert führt maximal zur Ausbildung von gelbem Haar und zur Ausbildung schwach sichtbarer Sommersprossen. Bei einem vollständigen Defekt würde nicht einmal ein Wirkstoff ausreichen, der an den MC1R bindet, um die

Melaninproduktion anzuregen, da die Tyrosinase ein Schlüsselenzym für die Melaninsynthese ist. Hingegen ist bei OCA 2 ein Gen defekt, welches das P-Protein codiert und dadurch verantwortlich für die Pigmentierungsstörung ist. Die genaue Funktion dieses Gens ist noch nicht bekannt, aber es beeinflusst die Struktur der Melanosomen.

Melanosome¹⁷ sind Granula, in welchen die Synthese, Speicherung und Lagerung des Melanins stattfindet. Neugeborene können schwach braune Haare besitzen, im weiteren Verlauf des Lebens kann eine erhöhte, fast normale Pigmentierung erreicht werden. Hier könnte man sich ein Einsatzgebiet für MC1-Rezeptoragonisten vorstellen, um eine normale Pigmentierung zu erreichen oder den Erhalt einer Schutzbräune zu beschleunigen. Der OCA 3-Typ wird durch Mutationen am TYRP1-Gen, welches das Tyrosinase-related-protein 1 codiert, charakterisiert. Dieses Protein ist für die Tyrosinase-stabilisierung mitverantwortlich. OCA 4 kommt durch ein defektes SCL45A2-Gen zustande. Dieses codiert für einen Membran-assoziierten Transporter und wird autosomal rezessiv vererbt. Gerade Albinismus-Patienten sind Extremfälle, da sie durch ihre überaus empfindliche, zu schwach oder gar nicht pigmentierte Haut praktisch schutzlos gegenüber der Sonnenstrahlung sind und deshalb das direkte Sonnenlicht vermeiden müssen. Hier hätte ein MC1R-Agonist einen protektiven Effekt, aber nur dann, wenn die Möglichkeit der Melaninbiosynthese noch vorhanden ist.

1.3.2 Morbus Addison¹⁸

Morbus Addison wird auch als Bronzehautkrankheit bezeichnet und zeigt den Zusammenhang zwischen dem adrenergen und dem melanozytären System. Es handelt sich dabei um eine primäre Nebennierenrindeninsuffizienz, bei der es zum Symptom der Hyperpigmentierung kommt. Der Grund dafür ist die gekoppelte Aktivierung des Melanocortin-Systems und die vermehrte Ausschüttung von ACTH und verwandten Peptiden wie β -Lipotropin oder den Melanozyten-stimulierenden Hormonen. Dabei wird das epidermale Melanin vermehrt gebildet, die Anzahl an dermalen Melanozyten bleibt jedoch gleich. Ein typisches Symptom ist deswegen auch die Hypermelanose.

1.3.3 Vitiligo¹⁹

Vitiligo ist eine erworbene Pigmentierungsstörung der Haut und der Schleimhäute. Es gibt viele verschiedene Ursachen für das Auftreten, so können sowohl genetische, aber auch nicht genetische Ursachen der Grund sein. In den meisten Fällen kommt es zu einer autoimmunen Zerstörung der Melanozyten. Dies führt zu einer gefleckten Haut, was besonders bei dunkelhäutigen Menschen sichtbar ist. Diese Krankheit ist nicht lebensgefährlich, die Patienten leiden aber aufgrund der sichtbaren Flecken psychisch darunter. Eine Therapieoption aktuell sind

Behandlungen, welche zur Depigmentierung, also zur Ausbleichung der nichthellen Areale führen.

Das in klinischen Studien getestete Afamelanotid unterstützt die Repigmentierung, also die Herstellung des natürlichen Hauttons, jedoch erfolgt die Verbreichung in Form von subkutanen Implantaten.

1.4 Das Melanocortinsystem

1.4.1 Physiologie der natürlichen Hautbräunung

Bei der Exposition durch UV-Strahlung kommt es zu zwei Bräunungsmechanismen, abhängig vom Subtyp der UV-Strahlung. Während UVA-Strahlung zu einer Oxidation des vorhandenen Melanins führt und dadurch zu einer sofortigen Bräunung, stimuliert UVB hingegen die Bildung von Proopiomelanocortin (POMC) und der Spaltung und Freisetzung von ACTH und α -MSH in den Melanozyten, aber auch in den Keratinozyten.²⁰ Dieses bindet an die MC1-Rezeptoren der Melanozyten und erhöht die Tyrosinaseaktivität, was im weiteren Verlauf zu einer erhöhten Melaninproduktion führt. Das Melanin wird in Vesikel verpackt und aus den Melanocyten abgegeben, um umliegende Keratinozyten mit Melanin zu versorgen. Das Melanin bildet in diesen Zellen „Supranukleäre Melaninkappen“ aus, um den Zellkern vor weiterer UV-Strahlung zu schützen.²¹

1.4.2 Melanozyten²²

Bei Melanozyten handelt es sich um pigment-produzierende, dendritische Zellen, welche aus der Neuralleiste als Melanoblasten hervorgehen. In der Haut kommt es zur Differenzierung in die Melanozyten, welche sich danach suprabasal an der Basalmembran befinden, wobei ein Melanozyt 36 Keratinozyten mit Melanin versorgt. Man bezeichnet dies auch als epidermale Melanineinheit. Ihre Hauptaufgabe ist die Produktion von Melanin und die anschließende Verpackung in Vesikel, welche danach in die umgebenden Keratinozyten transferiert werden.

1.4.3 POMC²³

Eine wichtige Vorstufe für die Synthese von Melanozyten-stimulierenden Hormonen ist das Prohormon Proopiomelanocortin. Dieses Prohormon besteht aus 267 Aminosäuren²⁴ und wird im Hypophysenvorderlappen, besonders unter Aktivierung durch Corticotropin-Releasing Hormon (CRH), aber auch in Melanozyten und Keratinozyten produziert. Die wichtigsten Spaltprodukte des POMC sind das ACTH, die Melanozytenstimulierenden Hormone, das β -Lipotropin und das

β -Endorphin. Diese Produkte besitzen unterschiedliche Wirkungen. Wird POMC in den Melanozyten gespalten, so erhält man hauptsächlich α -MSH und ACTH, während andere Spaltprodukte abhängig vom Gewebe entstehen.

ACTH bindet bevorzugt an den Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R)²⁵, welcher sich auf der Nebennierenrinde befindet und die Freisetzung von Cortisol induziert. β -Endorphin ist ein natürlicher Ligand an Opioidrezeptoren, während β -Lipotropin einen lipolytischen Effekt besitzt.²⁶

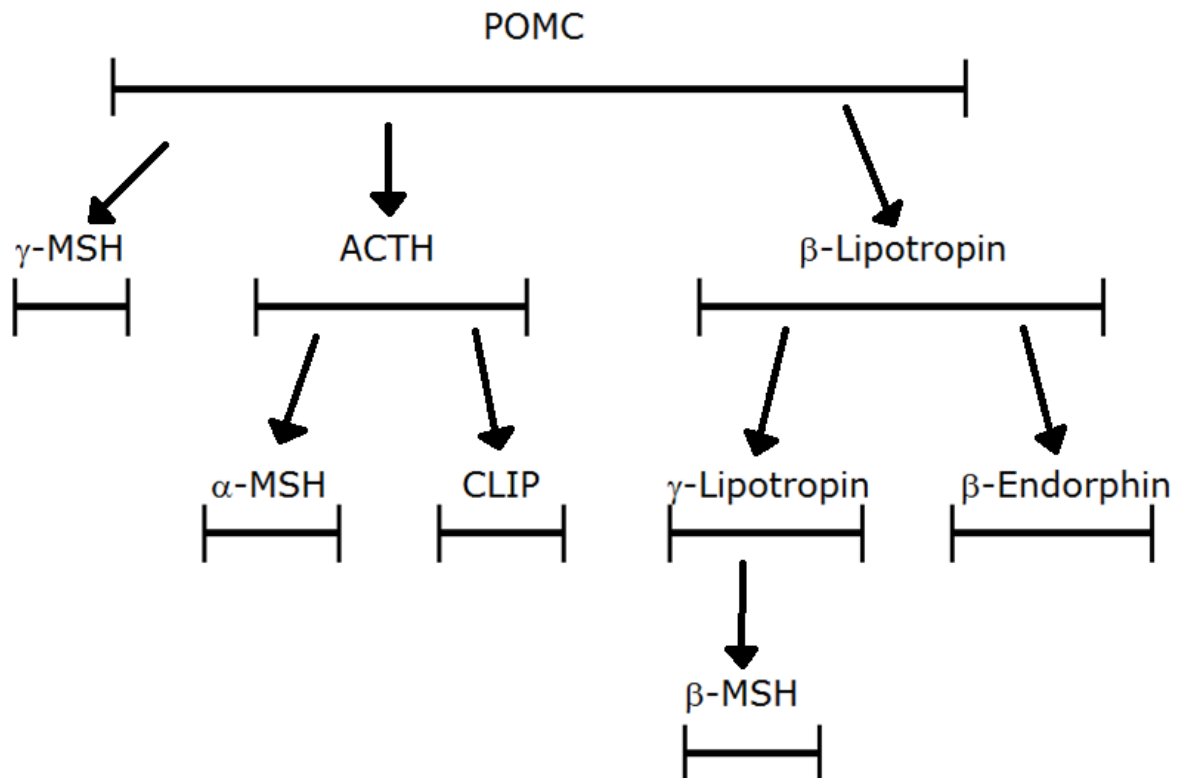


Abb.1: Die Spaltprodukte des POMC

1.4.4 Melanozyten-stimulierende Hormone²⁷

Wie zuvor erwähnt, sind die melanozytenstimulierenden Hormone Spaltprodukte des POMC. Neben der Gemeinsamkeit in ihrem Ursprung besitzen sie eine gemeinsame Sequenz, ein Tetrapeptid, welches die bindende Struktur an vier der fünf Melanocortinrezeptoren darstellt. Dabei handelt es sich um His-Phe-Arg-Trp. α -MSH ist ein Spaltprodukt aus ACTH, und besteht aus 13 Aminosäuren. Es ist verantwortlich für eine schnelle Translokation von Melanosomen und für die normale, aber auch abnormale Melanogenese in Melanozyten. Daneben besitzt α -MSH

einen stark entzündungshemmenden Effekt, wenn es systemisch oder lokal verabreicht wird.²⁸ Es bindet an den MC1-Rezeptor, den MC3-Rezeptor, aber auch an den MC4-Rezeptor und MC5-Rezeptor. β -MSH besteht aus 18 Aminosäuren und bindet bevorzugt an den MC4-Rezeptor. Es ist, unter anderem verantwortlich für die Gewichtsregulierung. γ -MSH ist ein Peptid aus elf Aminosäuren, das direkt aus POMC abgespalten wird. Es bindet an den MC3-Rezeptor. Es reguliert den Natriumhaushalt und den Blutdruck durch Aktivierung des Melanocortinrezeptors. Dabei fördert es die Natriurese, aufgrund der Bindung an den MC3-Rezeptor.²⁹ Zu den Antagonisten der Melanocortinrezeptoren zählen Agouti-signaling-protein und Agouti-related-protein.

1.4.5 Melanin³⁰

Melanin ist das Pigment, welches beim Menschen für die Haut-, Haar- und Augenfarbe verantwortlich ist. Man unterscheidet hierbei zwischen dem schwarz-braunen Pigment, dem Eumelanin und dem rot-gelben Phäomelanin. Ausgangssubstanz für die Melaninbiosynthese ist Tyrosin. Sowohl bei der Synthese von Eumelanin wie auch bei der Synthese von Phäomelanin wird Tyrosin unter Einfluss der Tyrosinase zu L-DOPA und anschließend zu DOPA-Chinon oxidiert. Eumelanin entsteht unter Bildung des Dihydroxyindols und der Dihydroxyindolcarbonsäure und anschließender Polymerisation. Die Phäomelaninsynthese erfolgt im hingegen durch die Addition von L-Cystein, wodurch Dihydroxy-1,4-benzothiazin entsteht, welches zum Phäomelanin polymerisiert. Melanin wird in den Melanozyten gebildet und bei UVB-Exposition biosynthetisiert, vesikulär abgegeben und von Keratinozyten aufgenommen. Dort lagert sich das Melanin um den Zellkern an, um vor der UV-Strahlung zu schützen. Man bezeichnet das als supranukleares Capping.

1.4.6 Melanocortinrezeptoren³¹

Es existieren fünf verschiedene Melanocortinrezeptoren, welche alle G-Protein-gesteuert sind. Der MC1-Rezeptor wird in verschiedenen Geweben exprimiert, der wichtigste Ort sind die kutanen Melanozyten, was zur Farbgebung der Haut und der Haare beiträgt. Er ist der klassische Rezeptor für das α -MSH. Der MC2-Rezeptor hingegen ist ein Rezeptor für ACTH und wird in der Nebennierenrinde in der Zona reticularis und in der Zona fasciculata exprimiert, was zur Sekretion von Cortisol führt. Dieser Rezeptor kann nur von ACTH aktiviert werden, nicht aber von den Melanozytenstimulierenden Hormonen. Der MC3-Rezeptor wird in vielen Teilen des ZNS exprimiert, aber auch in peripheren Gewebe wie dem Gastrointestinaltrakt und der Plazenta. γ -MSH hat die höchste Aktivität an diesem Rezeptor. Der MC3-Rezeptor ist an der Energiehomöostase beteiligt. Der MC4-Rezeptor kommt hauptsächlich im ZNS vor, und ist wie der MC3-Rezeptor in der Energiehomöostase beteiligt, aber es gibt auch Hinweise auf eine

Beteiligung in der Sexualfunktion. Der MC5-Rezeptor kommt in verschiedensten peripheren Geweben vor, wie in der Nebenniere, in Adipozyten und Leukozyten. Wichtig scheint seine Beteiligung in der exokrinen Sekretion durch Talgdrüsen zu sein.

1.4.7 Afamelanotid^{32, 33}

Afamelanotid ist ein synthetisches Analogon des α -MSH. Es wurden Studien durchgeführt, welche die Repigmentierung von Vitiligo-Patienten als Ziel hatten. Dabei wurde Afamelanotid in Kombination mit UVB-Strahlung eingesetzt, sodass eine schnellere und tiefere Pigmentierung durch Eumelanin auftritt. Ein großer Nachteil ist, dass es in Form eines subkutanen Implantats verabreicht wird, was vielleicht mit dem Nutzen bei Vitiligo vereinbar ist, jedoch bei der Anwendung als UV-Schutz unpraktikabel ist. Aktuell befindet es sich in Zulassungsstudien der Phasen 2 und 3 für die Behandlung von Vitiligo und zur Prophylaxe von aktinischen Keratosen.

1.4.8 Bremelanotid

Auch bei Bremelanotid handelt es sich um ein Analogon des α -MSH, genauer gesagt um ein cyclisches heptapeptidisches Melanocortinanalogen, welches agonistisch am MC3-R und am MC4-R wirkt. Das Haupteinsatzgebiet ist hier aber nicht die Hautbräunung, sondern die Behandlung einer gestörten Sexualfunktion.³⁴ Aktuell sind Phase 3-Studien in Vorbereitung.³⁵

1.5 Sonnenschutz und Hautbräuner

1.5.1 Der Hauttyp nach Fitzpatrick³⁶

Die Haut-Licht-Typ-Bestimmung nach Fitzpatrick wird verwendet, um Menschen aller Hautfarben zu kategorisieren und das Risiko zusammenzufassen, welches von Sonnenexposition ausgeht. Die Unterscheidung erfolgt in 6 Kategorien von sehr heller Haut (Typ I) bis zu sehr dunkler Haut (Typ VI). Es werden zwei Parameter angegeben, um den Typ zu bestimmen: Die grundlegende Hautfarbe und auch die Reaktion der Haut auf Sonnen- und UV-Licht.

Die Einteilung nach Fitzpatrick:

- I) Typ I wird definiert durch eine sehr helle Hautfarbe. Bei Sonnenexposition kommt es immer zum Sonnenbrand, eine Möglichkeit der Bräunung besteht jedoch nie.
- II) Typ II wird ebenfalls durch seine helle Hautfarbe definiert. Bei Sonnenexposition kommt es normalerweise zum Sonnenbrand, eine Hautbräunung ist schwierig.
- III) Typ III besitzt eine helle Hautfarbe. Es kommt manchmal zu Sonnenbrand, die Bräunung ist durchschnittlich.
- IV) Typ IV ist schwach braun. Es kommt selten zum Sonnenbrand, eine Bräunung fällt leicht.
- V) Typ V ist braun. Sonnenbrände treten sehr selten auf, die Bräunung ist üppig.
- VI) Typ VI ist dunkelbraun bis schwarz. Es treten keine Sonnenbrände auf und die Bräunung ist sehr dunkel.

1.5.2 UV-Filter

UV-Filter können sowohl organischer als auch anorganischer Natur sein. Dabei werden heutzutage strenge Anforderungen an die Zusammensetzung gestellt: Sie sollen einerseits einen hohen Sonnenschutzfaktor im UVB-Bereich besitzen, aber auch einen breiten Schutz vor UVA-Strahlung. Die Substanzen müssen photostabil sein, und eine hohe Wasserresistenz wird gefordert. Der Anteil an chemischen Filtern soll so gering wie möglich sein, der Anteil des physikalischen Filters relativ hoch.³⁷

1.5.2.1 Physikalischer Sonnenschutz ³⁸

Unter physikalischem Sonnenschutz versteht man Zubereitungen, welche auf die Haut aufgetragen werden und dabei eine Barrierefunktion für die einfallende UV-Strahlung bewirken. Diese enthalten für gewöhnlich anorganische Substanzen wie Titanoxid oder Zinkoxid, welche das Sonnenlicht reflektieren, streuen, aber auch absorbieren, was dazu führt, dass UVA und UVB Strahlung abgeblockt wird. Um zu verhindern, dass die Haut mit einer sichtbaren weißen Schicht überzogen wird, werden Zinkoxid- und Titanoxid-Mikropartikel eingesetzt. Der Schutz bleibt vorhanden, der Sonnenschutz fällt allerdings nicht auf. ³⁹

1.5.2.2 Chemischer Sonnenschutz und Lichtschutzfaktor

Eine der ersten Sonnenschutzcremes wurde vom österreichischen Chemiker Franz Greiter erfunden, welche er „Gletschercreme“ benannte. Die Idee kam ihm nach der Besteigung des Piz Buins, nachdem er einen schweren Sonnenbrand erlitten hatte. Einen wichtigen Beitrag lieferte er durch die Entwicklung des Sonnenschutzfaktors. (SPF).⁴⁰

Der Sonnenschutzfaktor ist ein ganzzahliger Wert, welcher die Effektivität einer UV-protektiven Zubereitung definiert. ⁴¹ Man bildet hier den Quotient aus der Zeit, die man mit Schutz in der Sonne bis zum Auftreten eines Erythems verbringen kann, mit der Zeit die man sich der Sonne ohne Protektion aussetzen kann.

Bestandteile von chemischen Sonnenschutzmittel sind Substanzen, welche UV-Strahlung, aufgrund ihrer konjugierten Doppelbindungen absorbieren und in Form von Infrarotstrahlung wieder abgeben. Man unterscheidet zwischen UVB-Filter, wie Zimtsäureester⁴², und p-Aminobenzoesäurederivate. Ein typischer UVA Filter ist Butyl-methoxydibenzoylmethan. Benzophenone wirken sowohl als UVA wie auch als UVB-Filter.⁴³ Aber auch eine Mischung von UV-Filter mit anorganischen Substanzen ist nichts entgegenzusetzen.

1.5.3 Solarien

Die Bräunung auf Sonnenbänken kommt durch künstliche UVA-Strahlung zustande, welche durch Quecksilberdampflampen erzeugt wird. Dies führt zwar zu einer schnell einsetzenden Bräunung, ein nachhaltiger Schutz wird allerdings nicht aufgebaut. Der Besuch eines Solariums bringt zwar einen dunkleren Hautton, ist aber trotzdem schädlich. Man bedenke, dass nicht nur UVB, sondern auch UVA-Strahlung gefährlich ist, da ROS gebildet werden können, welche Moleküle verändern, Zellen schädigen und auf Dauer sogar Schaden an Organen verursacht können. Besonders bei jungen Personen ist das Risiko für maligne Melanome aber auch andere Hautkrebsarten erhöht, wenn diese Sonnenbänke benutzen. Das führte dazu, dass es in Österreich seit 1.9.2010 ein Verbot für Minderjährige gibt. ⁴⁴

1.5.4 Bräunungstabletten und Bräunungsbeschleuniger

Eine andere Möglichkeit der sonnenlosen Hautbräunung ist die Verwendung von Bräunungstabletten. Diese führen zur Veränderung der Hautfarbe, indem der Inhaltsstoff Canthaxanthin sich in die Haut einlagert. ⁴⁵ Die FDA⁴⁶ rät aber davon ab, da Nebenwirkungen wie Übelkeit, Krämpfe, Diarrhoe, Juckreiz und Quaddeln auftreten können. Außerdem können gelbe Flecken in den Augen auftreten, die zu einer verschlechterten Sehleistung führen. Bräunungsbeschleuniger enthalten hingegen Aminosäuren, besonders Tyrosin, welches man oral oder topisch zu sich nimmt. Die Idee dahinter ist es, ein Substrat für die Melaninbiosynthese bereitzustellen. Laut FDA⁴⁵ wurde nicht bewiesen, dass dieses Prinzip funktioniert.

1.5.5 Selbstbräuner

Dihydroxyaceton ist die Substanz, welche verantwortlich ist für eine UV-freie Bräunung. Es wird auf die Haut in Form von Cremes oder öligen Zubereitungen aber auch mittels Airbrush aufgetragen. Es kommt zu einer Reaktion des Dihydroxyacetons mit freien Aminogruppen des Keratins und freien Guanidinogruppen von Arginin.⁴⁷ Die Reaktion ist nach ca. sechs Stunden abgeschlossen. Hier kommt es nicht zu einer Produktion von Melanin, was wiederum dazu führt, dass kein UV-Schutz aufgebaut wird. Diese Bräune hält maximal für drei bis vier Tage an.

1.6 Histidin

1.6.1 Allgemeines zu Histidin

Histidin gehört zu den 22 proteinogenen Aminosäuren. Chemisch differenziert es sich von den anderen Aminosäuren durch den Imidazolring, und zählt sowohl zu den basischen, als auch zu den aromatischen Aminosäuren. Histidin spielt eine Rolle in der enzymatischen Katalyse und hat eine stabilisierende Funktion im Übergangszustand bei Serinproteasen. Weitere Funktionen hat Histidin bei Protonenpumpen, photosynthetischen Komplexen und Metallproteinen.⁴⁸ Das bekannteste Produkt, welches im humanen Organismus aus Histidin synthetisiert wird, ist das Decarboxylierungsprodukt Histamin. Dieses sorgt einerseits zu schnellen Entzündungsreaktionen, was zu allergischen Symptomen führt, andererseits auch ein Neurotransmitter im ZNS ist. Da Histidin eine essentielle Aminosäure ist, muss es über die Nahrung zugeführt werden.

1.6.2 Tautomerie des Histidins

Aufgrund der Verknüpfung des Imidazolrings an Position 4 ergibt sich eine asymmetrische Struktur, die dazu führt, dass Histidin als Tautomer vorliegt. Es existieren drei verschiedene vom pH-Wert abhängige Formen. Dabei unterscheidet man zwischen der biprotonierten Form, dem häufiger vorkommenden τ -Tautomer und π -Tautomer. Diese Tautomerie ist wahrscheinlich für die Unterschiede in der Aktivität von histidinhaltigen Peptiden verantwortlich.⁴⁹

Im sauren Milieu liegt der Imidazolring als Imidazoliumkation mit delokalisierter positiver Ladung vor, während man im neutralen Milieu zwei Stickstofftypen unterscheiden kann. Der α -Typ-Stickstoff liegt in protonierter Form vor und beteiligt sich mit seinem freien Elektronenpaar am π -Elektronensystem. Der β -Typ-Stickstoff ist unprotoniert, beteiligt sich nur mit einem π -Elektron am aromatischen System, das freie Elektronenpaar kann protoniert werden.⁵⁰

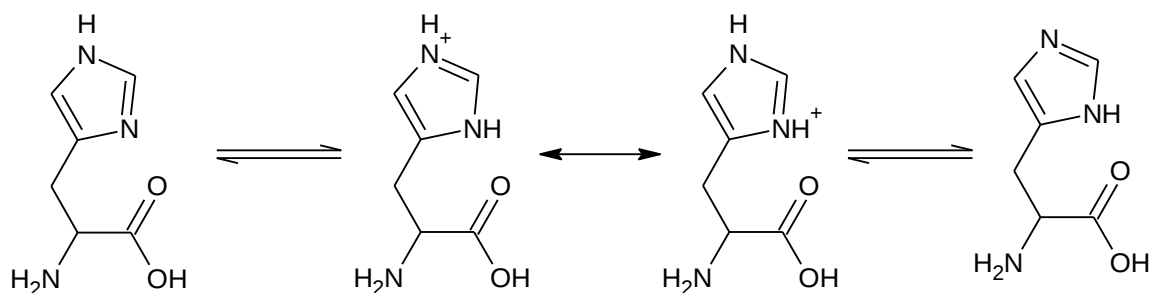


Abb.2: Tautomere Formen des Histidins

1.6.3 Racemisierung des Histidins⁵¹

Histidin neigt zur Racemisierung, die besonders während der Kopplung in der Peptidsynthese, nach Aktivierung durch Dicyclohexylcarbodiimid auftritt. Dies tritt auch dann auf, wenn die α -Aminogruppe durch eine Alkoxycarbonylgruppe geschützt ist. Diese sollte eigentlich vor der Racemisierung schützen. Dafür scheint ein aber der π -Stickstoff verantwortlich zu sein, wenn an dieser Position keine Schutzgruppe eingeführt wurde. Das bedeutet, dass eine Schutzgruppe an diesem Amin die Racemisierung verhindern kann, um enantiomer reine Peptide herzustellen. Beim präparativen Arbeiten ist die Racemisierung ein Problem, da sich die Ausbeute der Substanz verringert und ein erhöhter Aufwand entsteht, um die Diastereomere wieder zu trennen. Bei der Synthese neuer Wirkstoffe, kann man dieses Phänomen auch als Vorteil nutzen und nach der Synthese das Racemat auftrennen, um beide Substanzen zu screenen.

Man vermutet hier zwei verschiedene Mechanismen, in welchem der π -Stickstoff entweder als intramolekularer Basenkatalysator fungiert, oder als Nucleophil. Im zweiten Fall soll dabei ein konfigurationslabiles, cyclisches Imidazolid entstehen. Bei der Aktivierung durch Carbodiimide kann man diesen Mechanismus ausschließen. Der erste Mechanismus gilt als der wahrscheinlichere.

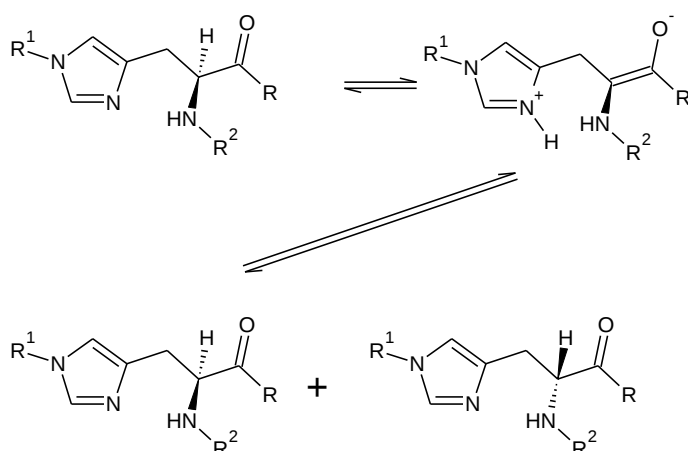


Abb.3: Intramolekulare Basenkatalyse führt zur Racemisierung während des Kupplungsschrittes nach Mechanismus A

1.6.4 Chemische Eigenschaften des Histidins

Ein weiteres Problem bei Histidin ergibt sich aus der Löslichkeit. Histidin ist in Wasser gut löslich, schwierig aber in Ethanol (96%).⁵² Das führt zu weiteren Problemen in der Synthese, da es außerdem nicht in organischen Lösungsmitteln gelöst werden kann. Daher ist es nötig, Histidin zu derivatisieren, was Hand in Hand mit der Einführung von Schutzgruppen einhergeht. Auch wenn man vermutet, dass sich alle Aminosäuren aufgrund ihrer zwitterionischen Struktur gut in Wasser lösen, so sind einige hingegen relativ schlecht in Wasser löslich. In verdünnter Säure oder Lauge sind diese trotzdem in einer wässrigen Phase löslich. Zu vergleichen ist die Löslichkeit mit der des Serins, Leucin oder Methionin. Histidin kann an folgenden Stellen derivatisiert werden: Neben der Carboxygruppe und der α -Aminogruppe, ist der Imidazolring offen für eine Derivatisierung. Dabei kann sowohl an den Stickstoffen, als auch die Ringkohlenstoffe eine Umsetzung stattfinden. Titriert man Histidin, so erhält man mehrere Umschlagspunkte⁵³. Im sauren Milieu bei pH-Werten um 0 liegt Histidin als zweifaches Kation vor. Neben der Carboxylgruppe sind die α -Aminogruppe protoniert, der Imidazolring liegt als Imidazoliumkation vor. Der pK_s -Wert der Carboxylgruppe liegt bei 1.82, jener des Imidazolrings bei 6.0 und der pK_s -Wert der α -Aminogruppe ist 9.17. Die einem pH von in etwa 14 können sogar der Imidazolstickstoff deprotoniert werden, wodurch dieser dann als Imidazolat-Anion vorliegt⁵⁴. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 7.47.⁵⁵

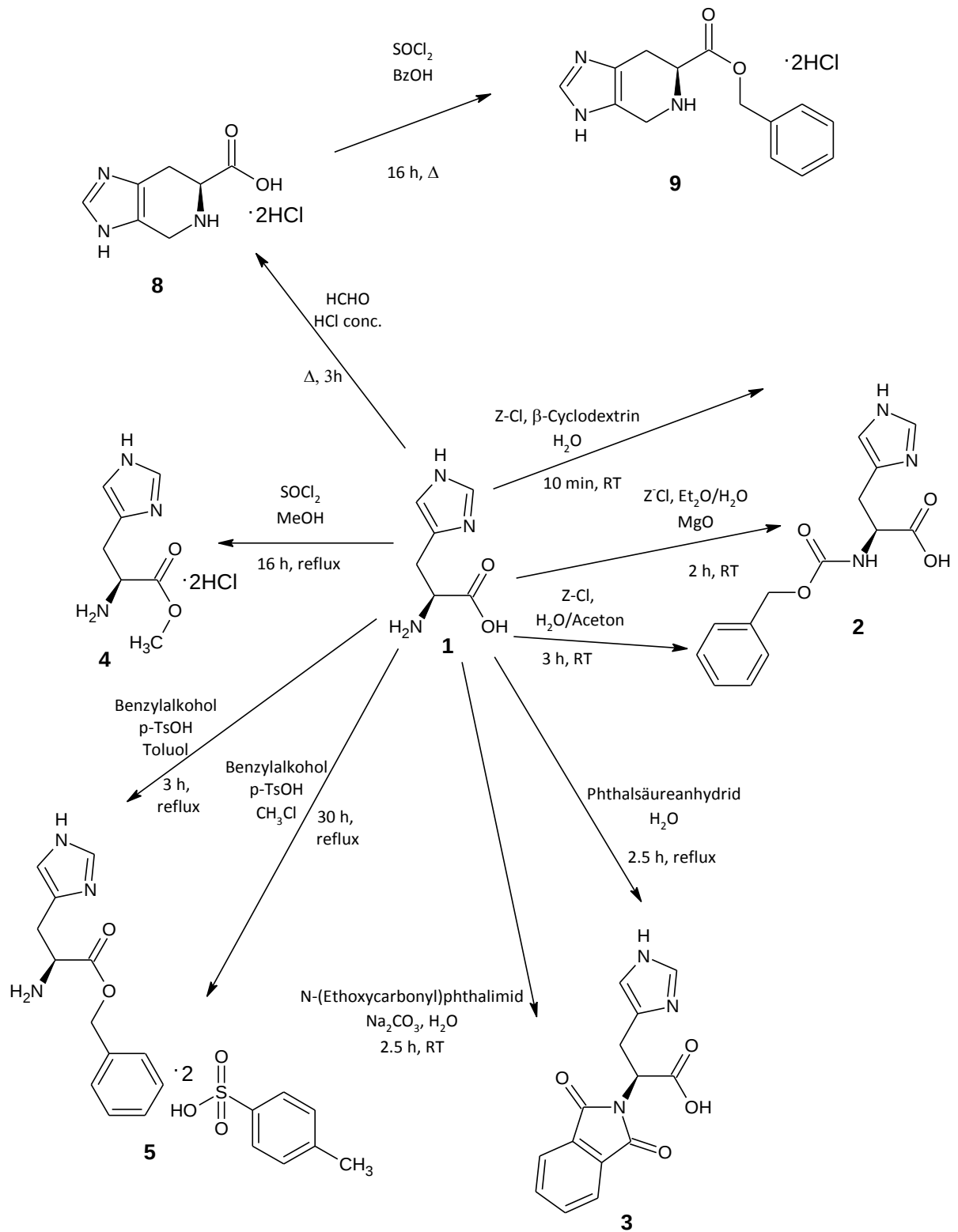
1.7 Synthetische Ziele dieser Diplomarbeit

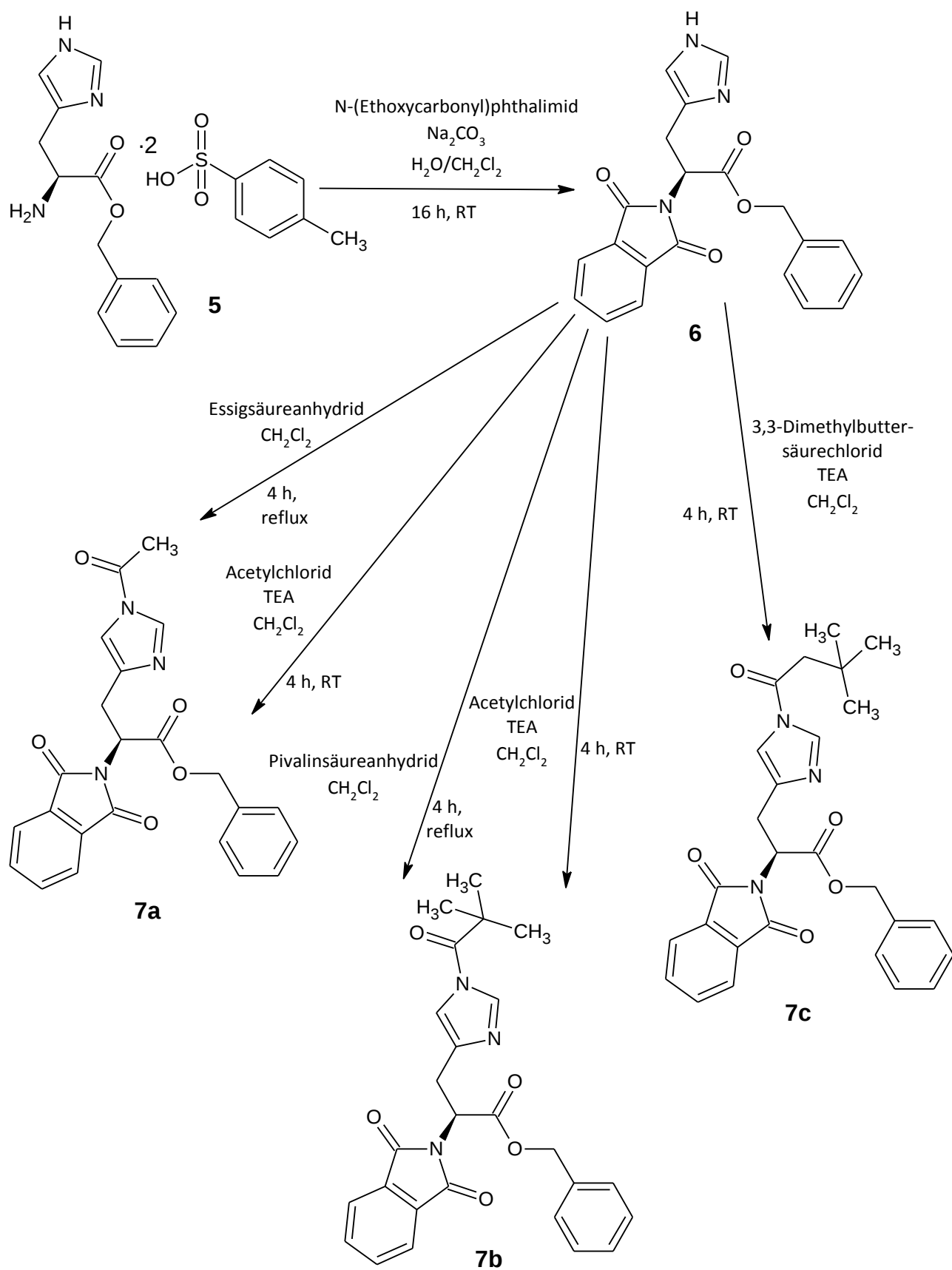
In dieser Diplomarbeit soll der Zugang zu Derivaten oder Isomeren des L-Histidins geprüft werden. Die synthetisierten Substanzen dienen als Edukte für die Bildung von Peptiden. Bei L-Histidin muss sowohl die α -Amino- als auch die Carboxylgruppe geschützt werden. Nach der Einführung der Schutzgruppen können Reaktionen selektiv am Imidazolring durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit der Synthese von Histidinderivaten ist die Rigidisierung des Imidazolrings.

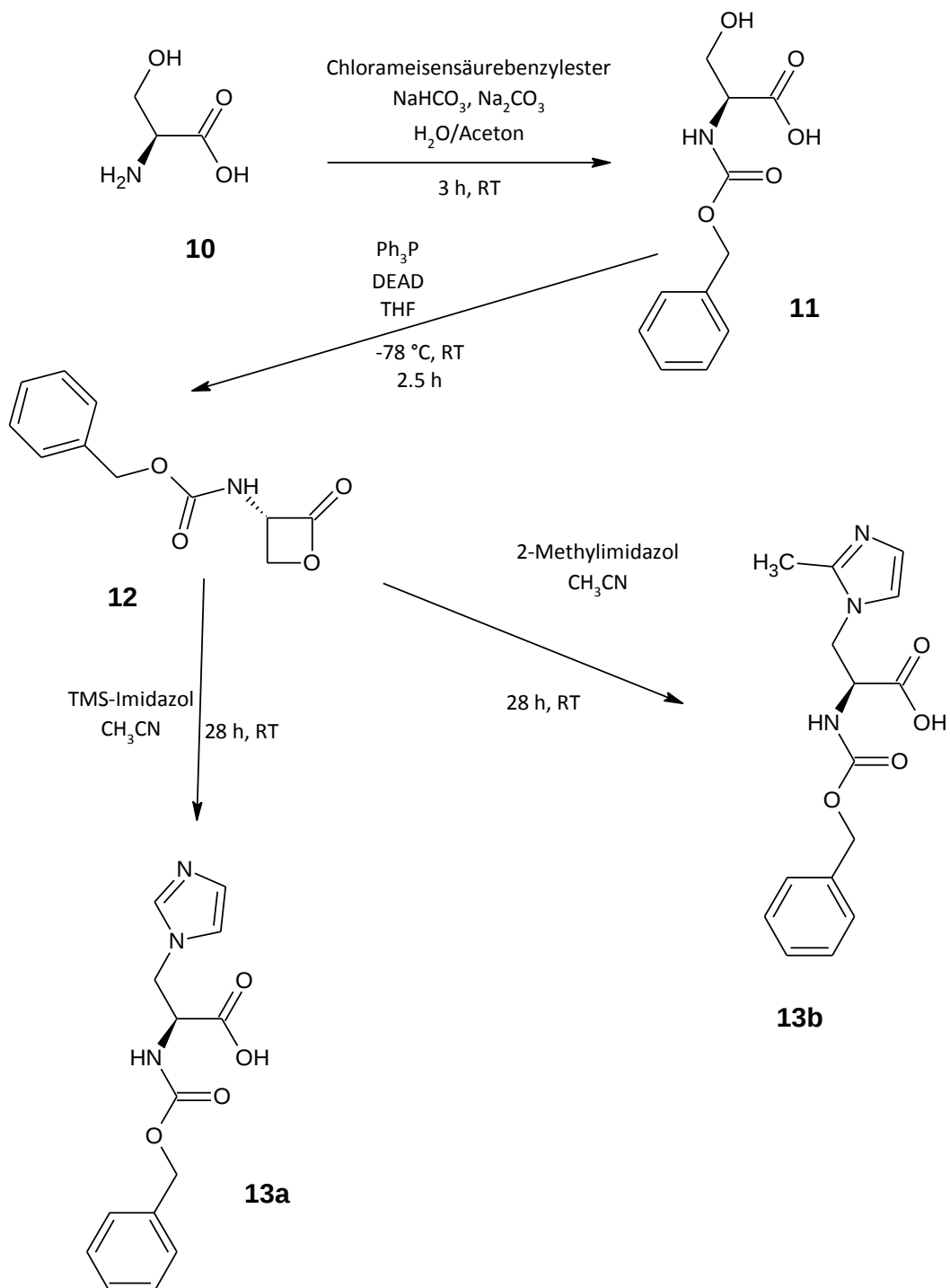
Auch Histidinisomere sollen hergestellt werden, indem man N(α)-geschütztes L-Serin zu einem Lacton umgesetzt. Während der Ringöffnung sollen dabei eine N(2)-geschützte-2-Amino-3-(Imidazo-1-yl)propansäurederivate entstehen.

2 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

thema







2.1 N(α)-Schutz von Aminosäuren

Die Derivatisierung der Aminogruppe bei Aminosäuren hat mehrere Zwecke. So kann man dadurch Schutzgruppen einführen. Hauptaufgabe von Schutzgruppen ist es, funktionelle Gruppen selektiv vor der Umsetzung mit einem anderen Reagens zu schützen, falls mehrere Angriffspunkte bestehen. Während der Peptidsynthese an der Festphase dient die Schutzgruppe

auch dazu, selektiv das gewünschte freie Amin an der Festphase mit der freien Carboxylgruppe der nächsten Aminosäure zu kuppeln, um das gewünschte Peptid zu erzeugen. Diese Schutzgruppen müssen sich sowohl leicht, aber auch selektiv abspalten lassen, um das zu erwartende Peptid in einer hohen Ausbeute und mit hoher Reinheit zu erhalten. Aminosäuren liegen aufgrund ihrer sauren und basischen Funktion zwitterionisch vor. Nach einem Schutz der α -Aminogruppe bleibt nur noch die saure Funktion über, weshalb nach dem Ansäuern mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden kann. Manche Aminosäuren, wie z.B. Histidin, besitzen zwei ähnliche funktionelle Gruppen. Besonders in diesem Fall muss man Derivatisierungsreagentien für einen selektiven Schutz der gewünschten funktionellen Gruppen finden.

Ein weiterer wichtiger Grund für die Umsetzung der funktionellen Gruppen, besonders bei Aminosäuren, ist die Herstellung eines apolaren Produktes. Dieses kann in organischen Lösungsmitteln gelöst werden, was für weitere Synthesen vorteilhaft ist. Geschützt werden kann ein Amin durch Umsetzung zu Amiden oder Urethanen mittels Carbonsäureanhydriden oder Carbonsäurechloriden.

2.1.1 Schutz mittels Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe

Ein Beispiel für die Umsetzung zu Carbamaten ist die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe. Diese ist auch als Z- oder Cbz-Schutzgruppe bekannt. Durch die Einführung dieser Gruppe erhält man ein apolares Produkt und das α -Amin wird geschützt. Außerdem führt die Bildung von Carbamaten bei Aminosäuren zu einem Schutz vor Racemisierung während der Kopplungsreaktion. Der Schutz wird mittels eines Chlorameisensäurebenzylesters im alkalischen Milieu durchgeführt.

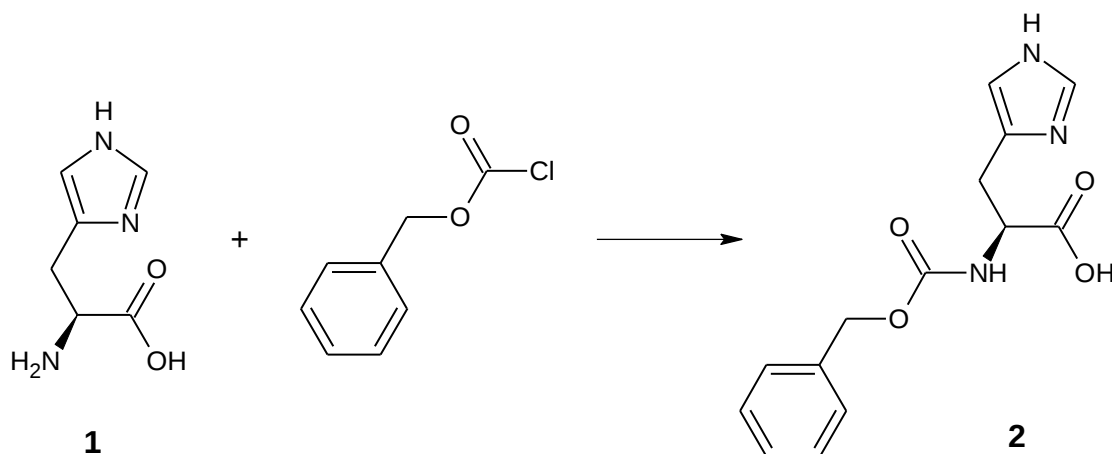
In der Literatur wird erwähnt, dass die Reaktion des Anhydrids $[(\text{PhCH}_2\text{OCO})_2\text{O}]$ in Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NaOH}$ (bzw. Triethylamin) beim Schutz von Aminosäuren besser sein und zu höheren Ausbeuten führen soll.⁵⁶ Eine selektive Abspaltung des Z-Restes kann durch Hydrogenolyse mittels H_2 und Pd-C-Katalysator erfolgen.⁵⁷

2.1.1.1 Syntheseversuche von N(α)-Z-L-Histidin

Der Schutz am α -Amin erfolgt einerseits zur selektiven Umsetzung an den Stickstoffen am Imidazolring andererseits auch um eine höhere Lipophilie zu erreichen. Bekannte Schutzgruppen wie Benzyloxycarbonyl (Cbz, Z), tert.-Butyloxycarbonyl (Boc) oder Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) besitzen den Vorteil, dass die Erfahrung mit diesen sehr hoch ist. Bei der Umsetzung von Anhydriden oder Säurechloriden zu Carbamaten, entsteht das Problem, dass neben dem α -Amin auch die Imidazolstickstoffe reagieren und dadurch Konkurrenzprodukte gebildet werden

können. Als Folge dessen müssen weitere Trennschritte in Kauf genommen werden. Einen Vorteil besitzt hier hingegen der Phthalylschutz, da dieser selektiv das α -Amin schützt. Man kann sich dadurch eine größere Effizienz durch die höhere Selektivität erwarten und an den Imidazolstickstoffen können selektiv umgesetzt werden. Außerdem erhält man dadurch eine starke Fluoreszenzlöschung, was in der Analytik Vorteile besitzt.

2.1.1.1.1 Synthese mit β -Cyclodextrin als Katalysator



Um Z-L-Histidin zu erhalten benötigt man eine Synthese, bei der man eine hohe Ausbeute erwartet, die Reaktionsdauer hingegen relativ kurz ist. Es wurde in der Literatur⁵⁸ eine Synthese entdeckt, welche das auch verspricht. So wird β -Cyclodextrin in Wasser oder Carbonatpuffer (pH 8) bei Raumtemperatur gelöst. Dann wird L-Histidin (**1**) hinzugegeben und für fünf Minuten gerührt. Der Chlorameisensäurebenzylester wird hinzugefügt und es wird weiter bei Raumtemperatur gerührt. In der Literatur wurde kein Hinweis auf eine Kühlung der Reaktion gegeben, welche in Anbetracht der exothermen Reaktion sicherer wäre. Die Reaktionsmischung wird danach für zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit Ethylacetat extrahiert, im Fall der wässrigen Lösung vorher noch mit 10%-iger Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert. Nun muss auf 5 °C gekühlt werden, wodurch das β -Cyclodextrin ausfallen soll. Man soll dieses abfiltrieren und kann es in einer weiteren Synthese wieder einsetzen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotavapor entfernt.

Diese Synthese wurde in zwei Versuchen durchgeführt. Beim ersten Mal wurde die Reaktionszeit von zehn Minuten eingehalten, jedoch konnte nur nicht umgesetzter Chlorameisensäurebenzylester gewonnen werden. In einem weiteren Ansatz wurde die Synthesedauer auf 16 Stunden erhöht. Auch in diesem Fall wurde keine Umsetzung beobachtet werden. Gründe dafür können sein, dass eben diese Reaktionsbedingungen nicht für einen Umsatz zum Z-L-Histidin(**2**) geeignet sind.

2.1.1.1.2 Syntheseversuch mittels Zweiphasensystem

Eine weitere Möglichkeit, bei Aminosäuren eine Benzyloxycarbonylschutzgruppe einzuführen ist die Verwendung eines Zweiphasensystems. Laut einer persönlichen Mitteilung⁵⁹ von Dr. Martin Kratzel wird deshalb L-Aminosäure in Wasser gelöst und Magnesiumoxid hinzugefügt um zu alkalisieren, wobei eine Suspension erzeugt wird. Man überschichtet mit Diethylether und tropft unter Eiskühlung Z-Chlorid hinzu. Anschließend wird die Suspension für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wird entfernt, auf pH 2 angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen reinigt man mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung. Man trocknet die organische Phase mit Natriumsulfat und dampft unter Vakuum ein.

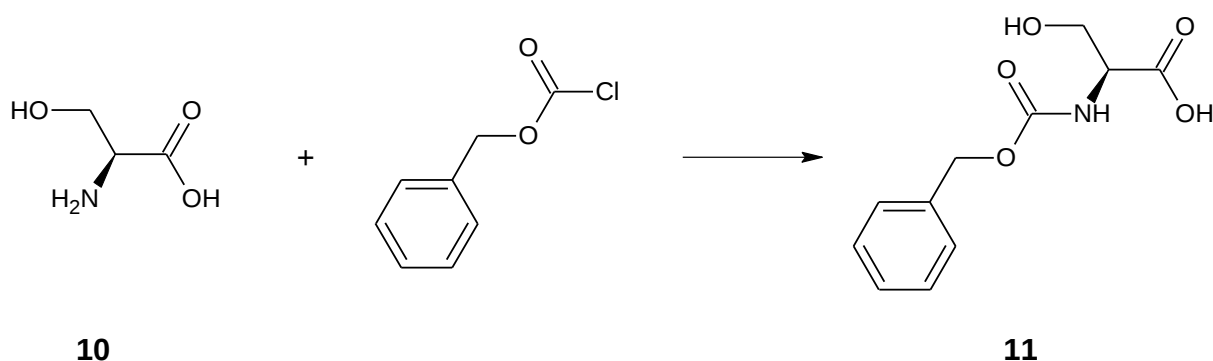
Diese Synthese besitzt den Vorteil, dass Z-Chlorid sich in der Diethylether-Phase befindet und der Überschuss durch Abtrennung dieser entfernt wird. Die Extraktion mittels Ethylacetat führte aber zu keiner Produktgewinnung aus der organischen Phase. Auch unter diesen Bedingungen kam es zu keinem Umsatz.

2.1.1.1.3 Synthese in Wasser/Aceton (30+4)

Als weitere Option wurde die Vorschrift nach Peheré et al.⁶⁰ adaptiert, weil publiziert wurde, dass gewisse Aminosäuren auf diese Art und Weise in großtechnischem Ausmaß geschützt werden können. Der Schutz von L-Histidin wird zwar nicht erwähnt, es wurde aber versucht analog zu arbeiten, um Z-Histidin (**2**) zu gewinnen. Es wird Z-Chlorid tropfenweise in einer Mischung aus der zu schützenden Aminosäure, Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat in Wasser (30 Volumenanteile) und Aceton (4 Volumenanteile) hinzugefügt. Die Reaktion wird für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wird mit Ether gewaschen, danach wird mit Salzsäure angesäuert. Zum Schluss extrahiert man mit Ethylacetat, trocknet mit Natriumsulfat und dampft die organische Phase ein. Auch in diesem Fall konnte keine Umsetzung beobachtet werden.

Diese Synthese wurde analog zur Herstellung von Z-L-Serin angewendet, wobei 72% Ausbeute erzielt werden konnten. Die Synthese von Z-L-Histidin (**2**) mittels Chlorameisensäurebenzylester war trotz der unterschiedlichen Wahl an Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich.

2.1.1.2 Synthese von Z-L-Serin



Z-L-Serin (**10**) wird als Ausgangssubstanz verwendet, um das N(α)-geschützte Z-L-Serin-β-lacton (**12**) zu synthetisieren. Dieses wird wiederum für die Synthese von Z-L-3-(1H-imidazo-1-yl)propansäurederivaten, verwendet, welche Isomere des Z-L-Histidins sind. Als Synthesevorschrift wurde wiederum jene von Peheré et al.⁶⁰ angewendet, welche bereits beim Syntheseversuch des Z-Histidins verwendet wurde. Im Gegensatz zur Einführung der Z-Schutzgruppe am Histidin, wurde dort die Synthese von Z-L-Serin (**11**) beschrieben. Während die Synthese des Z-Histidins fehlschlug, war die Synthese des Z-L-Serins mit 72% Ausbeute erfolgreich.

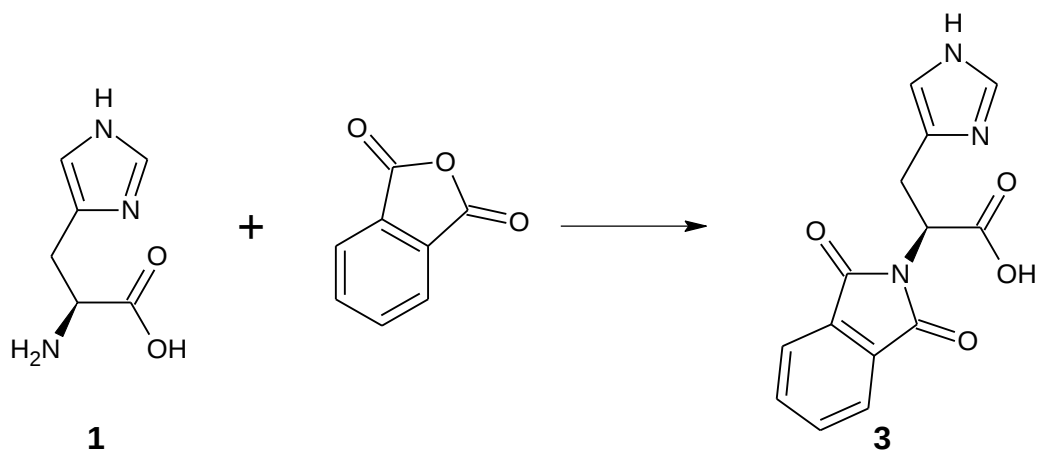
2.1.2 Phthalylschutz von Aminosäuren

Wie schon zuvor erwähnt liegen im Falle des Histidins drei Amine vor, wobei zwei, abhängig von der Tautomerie mit Carbonsäurechloriden umgesetzt werden können. Wenn man L-Histidin auf diese Art und Weise schützt, kann eine Umsetzung an beiden Stickstoffen erfolgen, was wiederum zur Bildung von Konkurrenzprodukten führt, und deshalb mit weiteren Trennschritten einhergeht. Da die Umsetzung zu Z-L-Histidin(**2**) nicht möglich war, musste eine Alternative gefunden werden, bei der selektiv das α-Amin geschützt wird. Dafür wird ein Reagens benötigt, welches selektiv ein primäres Amin schützt, wofür sich der Phthalylschutz eignet.

2.1.2.1 Phthalylschutz von L-Histidin

Der Phthalylschutz bietet einen Vorteil gerade bei Histidin, da dieses zwei unterschiedliche Amine besitzt. Der Phthalylschutz kann nur am α -Stickstoff erfolgen, der andere bleibt unbeeinflusst.

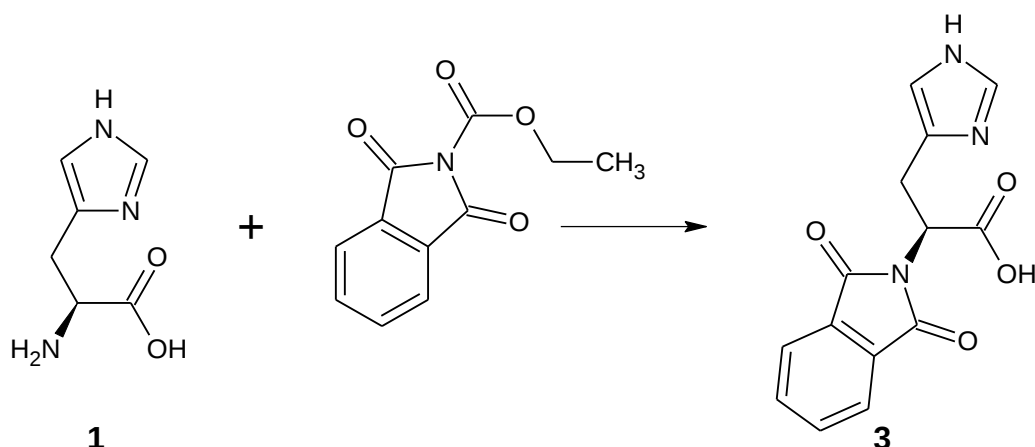
2.1.2.1.1 Umsatz mit Phthalsäureanhydrid



Es werden in der Literatur⁶¹ äquimolare Mengen von Phthalsäureanhydrid und der gewünschten Aminosäure in Wasser gelöst. Danach erhitzt man den Ansatz für zwei Stunden unter Rückfluss. Die heiße Mischung wird in ein Becherglas eingebracht und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Es soll ein in Benzol und Chloroform unlösliches Produkt aufgefunden werden, das aber in heißem Wasser löslich ist. Dieses wird gesammelt, filtriert und getrocknet. Die überschüssigen Reaktionsprodukte werden durch wiederholtes Ausschütteln mit Benzol und Chloroform abgetrennt, danach wird der Rückstand abgenutscht und in heißem Wasser umkristallisiert.

Diese Synthese befasst sich in der Literatur nur allgemein mit dem Phthalylschutz von Aminosäuren, es fehlen aber NMR-Daten, welche den Erfolg der Synthese bestätigen. Wichtig ist es, Benzol durch Toluol zu ersetzen, da Benzol cancerogen ist, Dichlormethan kann statt Chloroform bei den Reinigungsschritten verwendet werden. Bei dieser Synthese ist es zu keiner Umsetzung gekommen. Das Produkt kristallisiert weder im Becherglas bei Raumtemperatur noch im Kühlschrank nach mehreren Tagen aus. Auch nach dem Eindampfen des Wassers und anschließendem Versuch der Umkristallisierung des Rückstandes mittels Wasser kommt es zu keiner Kristallisation des Rohprodukts. Durch DC-Analytik wurde festgestellt, dass es nicht einmal zur Umsetzung gekommen ist. Es wurde ein Histidinspot bei $R_f=0.08$ gefunden. Dieser wurde durch Ninhydrinlösung sichtbar gemacht. Phthalsäureanhydrid wurde davor schon abgetrennt und es wurde neben dem Histidin kein Spot, welcher Fluoreszenzlöschung aufwies, beobachtet.

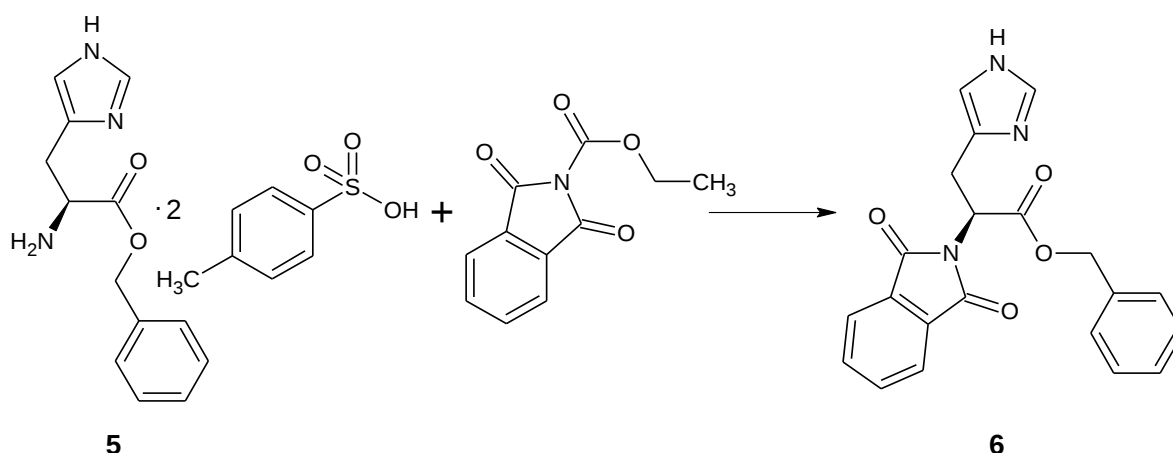
2.1.2.1.2 Syntheseversuch mittels Nefkens-Reagens



Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung des Nefkens-Reagens, dabei handelt es sich um *N*-(Ethoxycarbonyl)phthalimid. Laut Literatur⁶² werden L-Histidin und Natriumcarbonat in Wasser gelöst und *N*-(Ethoxycarbonyl)phthalimid dieser Lösung hinzugefügt. Die Mischung wird für zwei Stunden gerührt. Nachdem mit 2 M HCl angesäuert wurde, wird das Lösungsmittel bei reduziertem Druck eingedampft. Der farblose Rückstand wird mit zehn Milliliter Methanol für 20 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Rückstand abfiltriert und mit Methanol gewaschen, was das kristalline Produkt ergeben soll.

Diese Synthese wurde so durchgeführt, wie sie beschrieben ist. Jedoch fehlt hier ein Schritt, bei dem mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert wird. Arbeitet man diese Vorschrift genau nach, so erhält man als Hauptprodukt Natriumchlorid. Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln war auch in diesem Fall nicht erfolgreich. Des Weiteren verwendet der Autor womöglich nicht L-Histidin, sondern L-Histidin-Hydrochlorid-Monohydrat. Grund dafür ist die Angabe, dass drei Gramm 14 mmol entsprechen, was einem Molekulargewicht von 214.29 g/mol entspricht. L-Histidin-Monohydrochlorid-Monohydrat besitzt ein Molekulargewicht von 209.63 g/mol. In den hier beschriebenen Experimenten wurde jedoch L-Histidin verwendet. Auch in diesem Fall war es nicht möglich eine Schutzgruppe am α -Amin einzuführen. Jedoch wird in der Literatur häufig über die Verwendung des Nefkens-Reagens zur Einführung von einer Phthalylschutzgruppe erwähnt. Ein Umsetzungsversuch wurde auch mit L-Histidinbenzylester ditosylat (**5**), dessen Synthese später erwähnt wird, durchgeführt.

2.1.2.2 Phthalylschutz am L-Histidinbenzylester



Für dieses Experiment wurden zwei Ansätze parallel gestartet. Der eine Ansatz enthält nur Dichlormethan, der andere Ansatz ist ein Zweiphasensystem aus Wasser und Dichlormethan. Im Einphasensystem wird **5** in der organischen Phase suspendiert, Nefkens-Reagens hinzugefügt und für 16 Stunden gerührt. Dabei wurde festgestellt, dass das Produkt nicht umgesetzt wurde, vermutlich aufgrund der schlechten Löslichkeit von **5** in Dichlormethan. Im 2-Phasensystem wird **5** in der wässrigen Phase gelöst und mit Natriumcarbonat alkalisiert, sodass ein pH von 8 erreicht wird. Das Nefkens-Reagens wird in der organischen Phase gelöst. Die Phasen werden in einem Rundkolben vereinigt und intensiv für 16 Stunden gerührt. Danach wird mittels gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Man trocknet die organische Phase mit Natriumsulfat und dampft anschließend ein. Zurück bleibt ein farbloses Öl, welches in Ethanol unter Erwärmen gelöst wird. Anschließend fällt mit Wasser das erwünschte Produkt aus, welches abgenutscht und mit Wasser und Diethylether gereinigt wird. Man lässt es im Anschluss im Trockenschrank bei 50 °C trocknen.

Die Reinigungsschritte im Scheidetrichter sind von einer langen Phasentrennungsdauer charakterisiert, weshalb Kochsalz zur verbesserten Phasentrennung hinzugefügt wurde. Die Synthese ist mit einer Ausbeute von 78% erfolgreich gewesen. Das Produkt wird weiter aufgereinigt, indem man es in verdünnter Säure löst, die wässrige Phase mit organischen Lösungsmitteln wäscht, danach schwach alkalisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Das Produkt kann danach noch in Ethanol umkristallisiert werden, um nicht umgesetztes Nefkens-Reagens abzutrennen.

Das Zweiphasensystem besitzt den Vorteil, dass beide Reagentien gelöst vorliegen. **5** kann nicht als freie Base mit organischen Lösungsmittel extrahiert werden. Das Nefkens-Reagens löst sich kaum in der wässrigen Phase. Durch gutes Mischen an der Phasengrenze findet die Reaktion dort statt. Um einen Phthalylrest wiederum abzuspalten, bedient man sich der Hydrazinolyse.

Für die Synthese von Peptiden im Batch-Verfahren eignet sich die Verwendung von Hydrazin in Ethanol bei 25 °C für zwölf Stunden, unter saurer Katalyse. Es wird eine Ausbeute von 76% beschrieben. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von Phenylhydrazin in Tributylamin. Man erhitzt für zwei Stunden zum Rückfluss und erhält laut Literatur eine Ausbeute von 83%.⁶³ Diese Art der Abspaltung hat sowohl eine höhere Ausbeute und eine kürzere Reaktionsdauer, weshalb diese Vorschrift vorgezogen werden kann. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass sie sich nicht für die Festphasensynthese in der Spritze eignet. Auf diese Art und Weise könnte man nun auch **3** gewinnen.

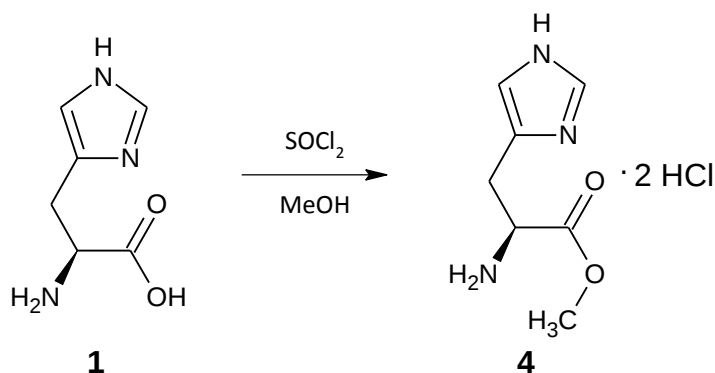
2.2 Veresterung von L-Histidin

Histidin ist sehr polar, was dazu führt, dass Synthesen in Lösung in polaren und damit schwer zu entfernenden Lösungsmitteln stattfinden müssen. Eine Möglichkeit um ein apolareres Molekül zu erhalten, das in organischen Lösungsmitteln gelöst, aber auch mit diesen extrahiert werden kann, ist die Umsetzung der Carboxylgruppe zu einem Ester.

Ein weiterer Grund, der für eine Veresterung von Aminosäuren spricht, ist, dass die saure Funktion neutralisiert wird, weshalb man ein basisches Molekül vorliegen hat. Das führt dazu, dass die Aminosäure nicht mehr als inneres Salz vorliegt, weshalb das Molekül schon aus diesem Grund apolarer wird. Aus Histidin wird ein zweifach basisches Molekül.

2.2.1 Synthese von L-Histidinmethylester

Die Veresterung von Carbonsäuren zu Methylestern ist eine Standardmethode zum Schutz von Carboxylgruppen, da die Synthese relativ einfach ist, der Methylrest führt auch zu keiner sterischen Hinderung und auch die Abspaltung kann leicht durchgeführt werden.



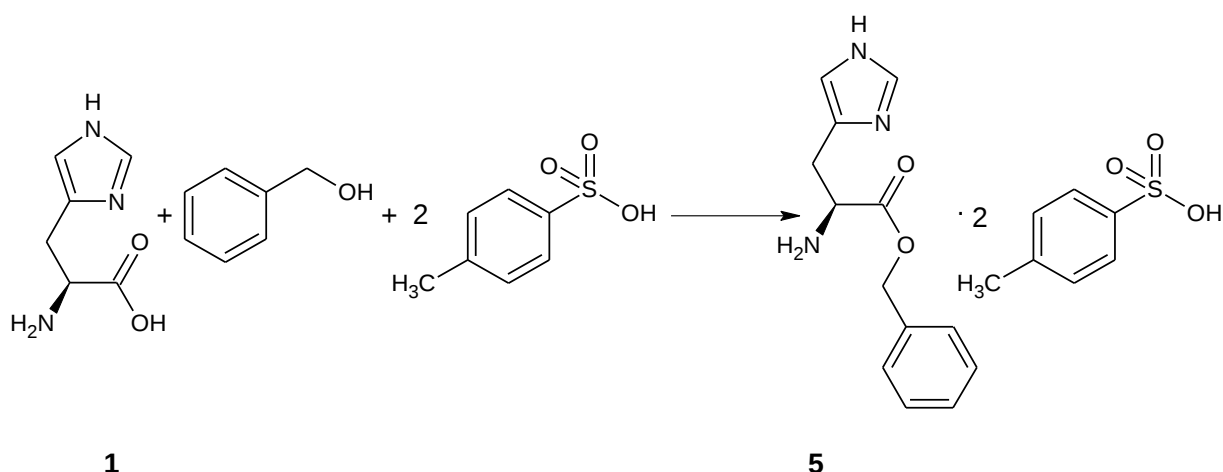
In Anlehnung an Turtaut et al.⁶⁴ wird Thionylchlorid zu einer Suspension von L-Histidin (**1**) in Methanol tropfenweise bei 0 °C hinzugefügt. Die Reaktion wird danach für 16 Stunden unter

Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird zur Trockene eingedampft und mehrfach mit Methanol coevaporiert, um das Reaktionswasser herauszuschleppen.

Die Synthese des L-Histidinmethylesters (**4**) war erfolgreich, jedoch liegt der Ester als Dihydrochlorid vor. Das Freisetzen der freien Base und anschließende Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel war nicht möglich, da der Ester zu polar zu sein scheint. Aus diesem Grund wurde der Ester nicht weiterverwendet, die Synthese eines lipophileren Esters, des Benzylesters wurde angestrebt. Eine Möglichkeit der Abspaltung des Esters erfolgt in Methanol/Wasser (3:1) und LiOH bei 5 °C für 15 Stunden.⁶⁵

2.2.2 Synthese von L-Histidinbenzylester

Histidinbenzylester ist weitaus lipophiler als der Methylester. Er kann leicht eingeführt werden und auch leicht wieder entfernt werden. Am Benzylrest vorhandene Substituenten können die Reaktivität beeinflussen.⁶⁶



2.2.2.1 Umsetzung von Histidinbenzylester in der Mikrowelle

Um zu überprüfen, ob es möglich sei, einen Benzylester des Histidins herzustellen, wurde ein Experiment in der Mikrowelle durchgeführt. Es wurde Histidin mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und Bentonit verrieben und in drei Eppendorf-Vials gleichmäßig aufgeteilt. Danach wurde Benzylalkohol in jedes der Vials hinzugefügt und gut vermischt. Die drei Proben wurden mehrmals bei voller Leistung in der Mikrowelle erhitzt, zwischenzeitlich wieder abgekühlt. Probe A wurde mehrmals erhitzt, währenddessen Probe B weiters nach dem Erhitzen Dimethylformamid hinzugefügt wurde. Danach wurde wieder mehrfach in der Mikrowelle erhitzt. Probe C wurde wie Probe B behandelt, nur wurde der Ansatz öfter erhitzt als

Probe B. Danach wurde Ethylacetat extrahiert und der Rückstand abfiltriert. Das Filtrat wurde eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst um dann per ESI-MS analysiert zu werden. Man konnte feststellen, dass in allen 3 Experimenten L-Histidin (**1**) zum Benzylester umgesetzt wurde. Der in allen drei Experimenten aufgefundene Molpeak bei $[M+H]^+ = 246$ entspricht dem freien Ester.

2.2.2.2 Umsetzungsversuch in Toluol

Aufgrund des Erfolges des Mikrowellenversuchs, wurde versucht, diesen Ester in größeren Maßstab herzustellen. Einer Angabe⁵⁹ nach kann man einen Benzylester bilden, wenn eine Aminosäure mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat verrieben und dann mit Benzylalkohol verrührt wird. Die ölige Masse wird in einen Rundkolben übergeführt und mit Toluol versetzt. Die Reaktionsmischung wird drei Stunden lang am Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen sollte das Produkt ausfallen. Das Aminosäurebenzylester-Salz wird in Ether suspendiert, abgenutscht, mit Ether gewaschen und im Vakuumtrockenschrank (bei 50 °C) getrocknet. Es wurden für diese Synthese 2,2 Äquivalente von *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat eingesetzt. Bei dieser Synthese konnte keine Ausbeute erzielt werden. Nach den drei Stunden war noch immer eine Suspension vorhanden. Eine Möglichkeit wäre gewesen, die Synthese noch weiter laufen zu lassen. Es wurden auch nur drei Milliliter Wasser im Wasserabscheider gemessen, was nicht einmal dem gesamten Kristallwasser der *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat entspricht. Hier hätte bei den eingesetzten 220 mmol *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in etwa vier Milliliter Wasser abgeschieden werden müssen.

Um sicher zu gehen, dass Produkt entstanden ist, wurde der Feststoff aus der heißen Reaktionsmischung abfiltriert, auch nach dem Abkühlen fiel kein Produkt aus. Beim Feststoff handelte es sich um nicht umgesetztes Histidin.

2.2.2.3 Umsetzung in Dichlormethan

Eine weitere Synthese eines Benzylesters wird mit 93% Ausbeute beschrieben. Laut Jones et al.⁶⁷ wird eine Suspension mit L-Histidin-Hydrochlorid-Monohydrat, *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat, Benzylalkohol und Chloroform für 30 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das produzierte Wasser wird in einem Wasserabscheider für Lösungsmittel, die schwerer als Wasser sind, gewonnen. Es wird mit Ether verrieben, danach abgekühlt, filtriert und das Chloroform eingedampft, was eine weiße Substanz ergibt. Diese wird auf eine Glassinternutsche gegeben und mit Ether gewaschen. Danach wird in einem Vakuumexsikkator für zwei Stunden getrocknet. Die Synthese wurde mit L-Histidin (**1**), anstatt L-Histidin-Hydrochlorid-Monohydrat durchgeführt, und führte zu einer etwas höheren Ausbeute als in der Literatur. Der Gewinn eines weißen Feststoffes durch Verreiben mit Diethylether war nicht möglich, es wurde immer ein Öl

erhalten. Als beste Methode zum Auskristallisieren wurde das Öl mit Diethylether in einem Rundkolben überschichtet und für mehr als zwei Tage im Kühlschrank stehen gelassen, da sich Tosylate laut Literatur auf diese Weise gut kristallisieren lassen. Auch das anschließende Waschen mittels Diethylether ist von großer Bedeutung und muss intensiv durchgeführt werden um den überschüssigen Benzylalkohol vollständig abzutrennen. Die erhaltene Ausbeute von 97% war sogar knapp über der Literaturangabe.

Eine Abspaltung dieser Schutzgruppe kann nach Literaturangabe durch Hydrogenolyse mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle als Katalysator erfolgen. Die Abspaltung wird bei 25 °C durchgeführt⁶⁸.

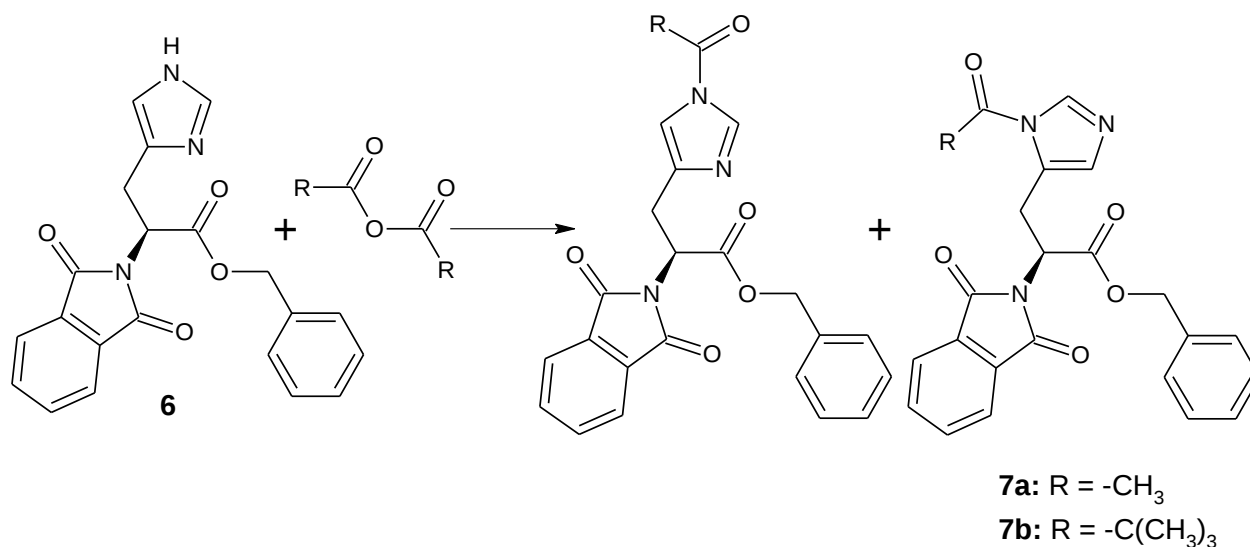
Die Synthese von Histidin-Estern war erfolgreich. Der Methylester wurde erfolgreich synthetisiert, allerdings konnte er nicht als freie Base mittels organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Die Umsetzung des Benzylesters wurde zuerst in einem Experiment mittels Mikrowelle durchgeführt. Dieses war erfolgreich, weshalb versucht wurde einen großen Ansatz des Benzylesters herzustellen. Die erste Herstellungsvorschrift für Aminosäurebenzylester führte noch zu keiner Ausbeute, die von Jones et al. jedoch zu einer sehr hohen. Die Synthesen unterscheiden sich in zwei Punkten: 1) wird ein anderes Lösungsmittel verwendet, 2) scheint ein entscheidender Faktor die Reaktionszeit zu sein. So dauert die Reaktion im ersten Experiment nur drei Stunden, während im anderen Experiment 30 Stunden gefordert werden. Auch der Benzylester konnte nicht als freie Base mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden.

Das Produkt (**5**) aus dieser Synthese wurde, wie schon zuvor erwähnt, weiter mit Nefkens-Reagens zu **6** umgesetzt.

2.3 Versuche der τ -Acylierung des Imidazol-Stickstoffs von N(α)-geschützten Histidinbenzylestern

Eine weitere Umsetzungsmöglichkeit ist die Bildung eines Amids mit den Imidazolstickstoffen. Dadurch geht zwar nicht die Basizität verloren, weil die Reaktion am α -Typ-Stickstoff stattfindet und die freie Doppelbindung am Imidazolring erhalten bleibt. Durch die Reaktion am es wird aber ein apolareres Produkt gebildet und auch die Racemisierung während des Kopplungsschrittes verhindert, falls die Umsetzung am π -Stickstoff erfolgt ist. Als Angriffspunkte wären aufgrund der Tautomerie sowohl der Stickstoff an der τ -Position als auch an der π -Position möglich. So müssten aufgrund der Tautomerie zwei Produkte entstehen.

2.3.1 Syntheseversuche von τ -acylierten Derivaten mittels Anhydriden



Gerade die τ -Position bietet sich für eine Synthese an. So wird laut Jones et al.⁶⁹ bei der Umsetzung eines geschützten Histidins mittels Essigsäureanhydrid eben diese Position acyliert. Mit einem weiteren Schritt wird dann mit dem, aus dieser Synthese erhaltenen Produkt, eine selektive Alkylierung am π -Stickstoff, unter Abspaltung des τ -Acetylrests durchgeführt. So wird in der Literatur das NH₂(α) und Carboxyl-geschütztes Histidin in Essigsäureanhydrid gelöst. Nach fünf Minuten wird das Lösungsmittel eingedampft und Diethylether hinzugefügt, wobei ein kristallines Produkt erhalten wird, welches in Chloroform/Hexan umkristallisiert wird. Der Interpretation nach wird nur das τ -acylierte Derivat gewonnen.

2.3.1.1 Syntheseversuch mittels Essigsäureanhydrid

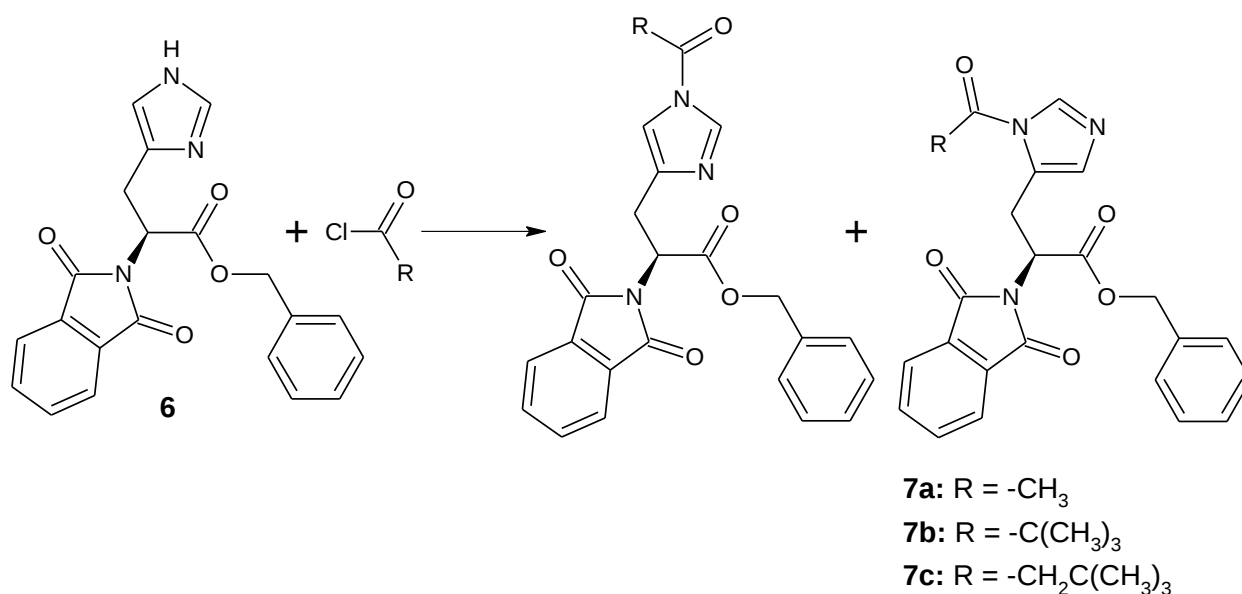
In den hier beschriebenen Experimenten wurde das Essigsäureanhydrid nicht als Lösungsmittel verwendet, da es im weiteren Verlauf Probleme bei der Abtrennung geben würde. Es wurde deshalb **6** in getrocknetem Dichlormethan gelöst und Essigsäureanhydrid hinzugeetropt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur für vier Stunden, anstatt für fünf Minuten gerührt. Es kam aber zu keiner Umsetzung. Auch ein Erhitzen der Reaktionsmischung führte nicht zu einer Produktbildung.

2.3.1.2 Syntheseversuch mittels Pivalinsäureanhydrid

Dieselbe Synthese wurde auch mit Pivalinsäureanhydrid durchgeführt. Der Grund dafür ist, dass der Pivalinsäurerest sehr sperrig und raumfordernd ist. Am Rezeptor kann das sowohl die Aktivität erhöhen, falls die Bindungstasche sehr groß ist, aber auch antagonistische Effekte

hervorrufen, falls die Bindungstasche klein ist. Dafür wurde **6** in Dichlormethan gelöst und Pivalinsäureanhydrid hinzugetropft. Die Reaktion wurde für vier Stunden bis zum Rückfluss erhitzt. Es wurde kein Produkt umgesetzt, als einzige Substanz ist Pivalinsäure entstanden. Auch hier könnte, im Nachhinein betrachtet, ein Katalysator gefehlt haben.

2.3.2 Syntheseversuche mittels Säurechloriden



Da die Synthese mithilfe der Anhydride nicht funktioniert hat, wurden Säurechloride eingesetzt. Es wurden Synthesen gesucht, bei denen Imidazol acyliert wurde, um diese analog auf das geschützte Histidin anzuwenden. Laut Literatur⁷⁰ wird Imidazol in getrockneten Dichlormethan gelöst. Man fügt Triethylamin hinzu und kühlt auf 0 °C ab. Dabei setzt man den Ansatz unter Argonatmosphäre. Das entsprechende Säurechlorid, welches mit Dichlormethan vermischt ist, wird für mehrere Minuten tropfenweise der rührenden Lösung bei 0 °C hinzugefügt. Die Mischung wird auf 25 °C erwärmt und für zwei Stunden gerührt. Anschließend wird sie mit Diethylether verdünnt, filtriert und chromatographisch gereinigt.

2.3.2.1 Umsetzungsversuch mit Acetylchlorid

Für diese Synthese wurde **6** in getrocknetem Dichlormethan gelöst. Spätestens nach der Zugabe von Triethylamin war die Substanz vollständig gelöst. Es wurde Acetylchlorid, welches mit Dichlormethan versetzt war, unter Eiskühlung hinzugetropft. Danach wurde auf Raumtemperatur erhöht und für vier Stunden gerührt. Es kam dabei zu keiner Umsetzung.

2.3.2.2 Umsetzungsversuch mit Pivalinsäurechlorid

Dasselbe Experiment wurde auch mit Pivalinsäurechlorid durchgeführt. Dafür wurde wiederum **6** in getrocknetem Dichlormethan gelöst. Auch in diesem Fall war das Edukt nach der Zugabe von Triethylamin vollständig gelöst. Man tropft Pivalinsäurechlorid, welches mit Dichlormethan vermischt war, unter Eiskühlung dazu. Danach wurde auf Raumtemperatur erhöht und für vier Stunden gerührt. Es kam zu keiner Umsetzung. Das Einzige was durch diesen Ansatz gewonnen werden konnte, war Pivalinsäure. Diese konnte durch DC und NMR nachgewiesen werden.

2.3.2.3 Umsetzungsversuch mit 3,3-Dimethylbuttersäurechlorid

In einem weiteren Experiment wurde ein weiteres Säurechlorid verwendet. Erneut wurde **6** in getrocknetem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin war die Ausgangssubstanz vollständig gelöst. Es wurde wiederum die Reaktion mit Eiswasser gekühlt und 3,3-Dimethylbuttersäurechlorid mit Dichlormethan vermischt, wurde hinzugegeben. Danach wurde für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. In diesem Fall wurde eine Produktbildung beobachtet. Diese organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gereinigt, danach wurde eingeeengt und mittels Flash-Chromatographie mit Ethylacetat aufgetrennt. Nach dem Eindampfen des Ethylacetats wurde ein orange-brauner Feststoff erhalten. Es gestaltete sich aber schwierig das NMR-Spektrum auszuwerten, um eine Aussage zu treffen, ob es sich um ein τ - oder ein π -acyliertes Derivat handelt. Es wird vermutet, dass das τ -Acylderivat entstanden ist, da beide Signale für die Imidazolprotonen tieffeldverschoben sind, da durch die Acylierung an dieser Stelle die chemische Verschiebung beider Protonen beeinflusst werden kann. Wäre die Acylierung am π -Stickstoff erfolgt, wäre nur das Imidazol H(2) tieffeldverschoben.

Die Bildung der gewünschten Produkte durch die Anhydride war nicht von Erfolg gekennzeichnet. Im Nachhinein betrachtet, hätte man Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator einsetzen können. Anstatt weiter mit Anhydriden zu arbeiten, fiel die Wahl auf die reaktiveren Carbonsäurechloride. Auch in diesem Fall kam es zu keiner Umsetzung, sowohl bei der Verwendung von Acetylchlorid als auch Pivalinsäurechlorid. Erst die Verwendung von 3,3-Dimethylbuttersäurechlorid führte zur Produktbildung. Dabei wurde das nicht umgesetzte Edukt mittels Flash-Chromatographie abgetrennt, weil die Aufreinigung weder durch Umkristallisation noch durch Extraktion möglich war.

2.4 Rigidisierungsversuche an Histidin

Um die freie Drehbarkeit der Einfachbindung am β -Kohlenstoff einzuschränken, besteht die Möglichkeit eine Brücke zwischen der α -Aminogruppe und dem Imidazolring herzustellen. Man bezeichnet diese Einschränkung der Drehbarkeit als Rigidisierung. Wenn man Aldehyde einsetzt, so soll sich laut Literatur ein eine Brücke zwischen dem α -Amin und dem C-2 des imidazolrings bilden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass sich bei Aminosäuren ein 1,3-Oxazolidin-5-on-Derivat bildet. Dieses wäre zwar ein Konkurrenzprodukt zu behandeln, es liegt aber nichtmehr zwitterionisch vor und könnte vielleicht gut abgetrennt werden.

2.4.1 Syntheseveruche von Spinacin⁷¹

Der Name der Verbindung Spinacin leitet sich vom Spinat ab, weil es unter anderem aus dessen grünen Blättern isoliert wurde. Spinacin hat eine besondere Bedeutung in der Analytik von Käse, da Formaldehyd bei der Grana Padano Herstellung als antimikrobieller Zusatz in die Milch zugefügt wird, wobei es zu einer Reaktion mit den Histidin im den Casein kommt. Bei Spinacin handelt es sich um ein Additionsprodukt des Formaldehyds an Histidin.

Diese Reaktion eines Aldehyds Arylethylaminen ist auch als Pictet-Spengler-Reaktion bekannt. Der Reaktionsmechanismus⁷² wird anhand des L-Histidins erklärt. Es kommt zuerst zur Bildung eines Iminium-Ions und anschließend zu einer elektrophilen Substitution an der ortho-Position am Imidazolring.

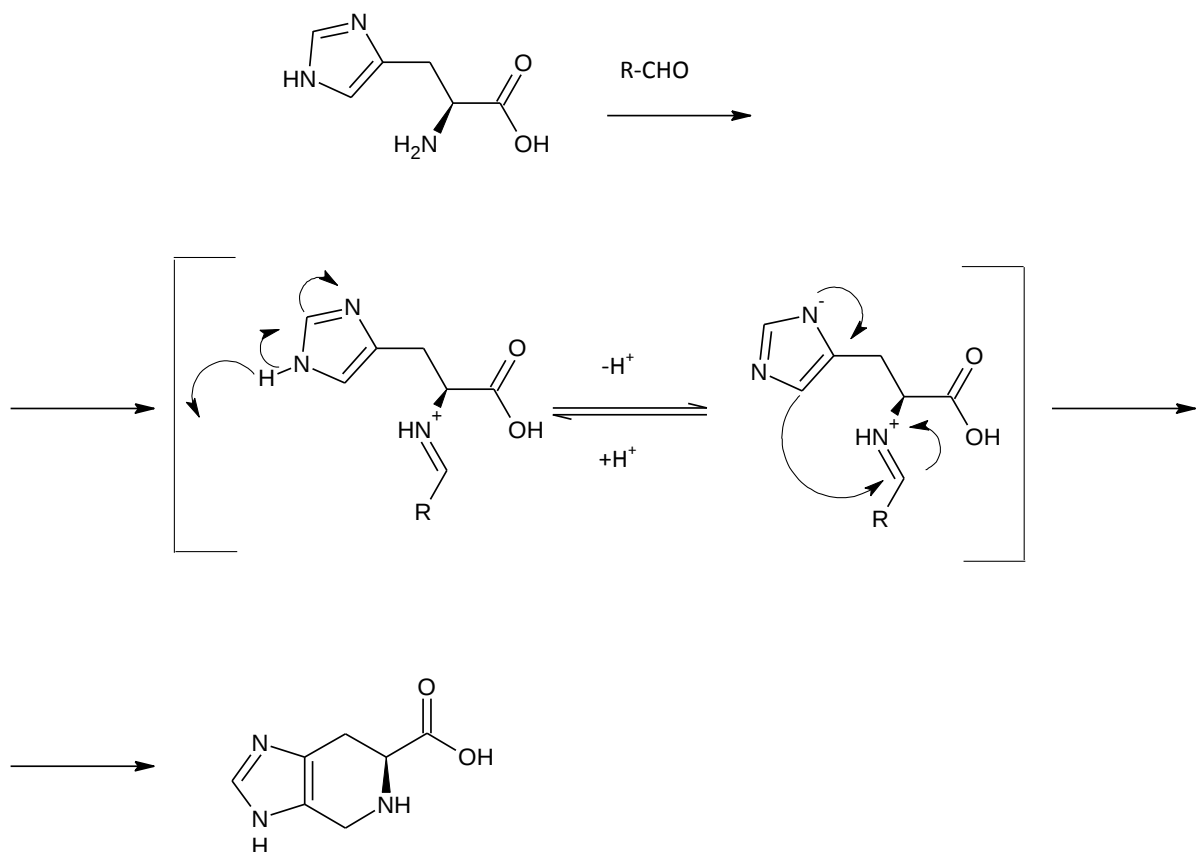


Abb.4: Die Pictet-Spengler-Reaktion anhand des L-Histidins

Auf diese Art und Weise lassen sich auch andere aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tryptophan umsetzen⁷³.

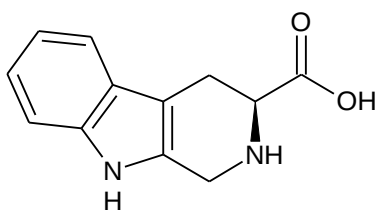


Abb.5: Das rigidisierte Tryptophan

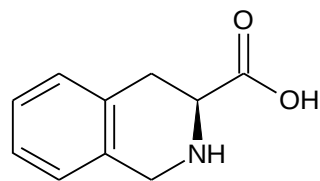
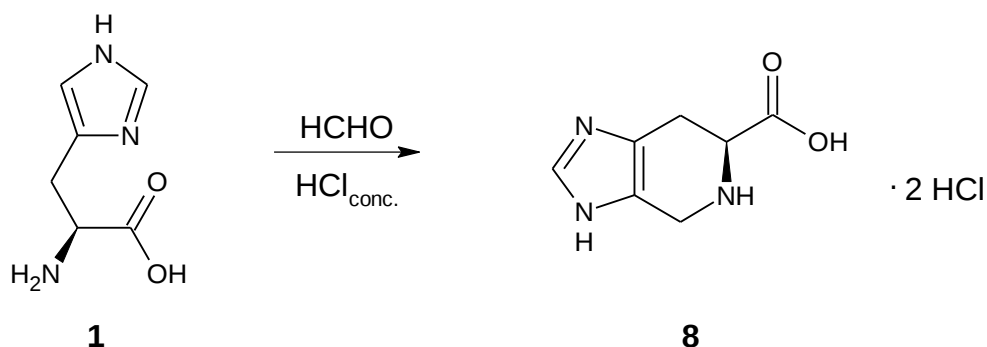


Abb.5: Das rigidisierte Phenylalanin

2.3.1.1 Umsetzung von L-Spinacin in konzentrierter Salzsäure



Laut Remelli et al.⁷⁴ wird eine Mischung aus L-Histidin (**1**), konzentrierter Salzsäure und Formaldehydlösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Es wird weitere Formaldehydlösung hinzugefügt und am Dampfbad für drei Stunden erhitzt. Die erhaltene Lösung wird unter reduziertem Druck konzentriert. Der pH-Wert dieser konzentrierten wässrigen Lösung wird mit Pyridin auf 3,5 eingestellt, danach wird das Dihydrochlorid mittels Ethanol ausgefällt. Die Darstellung der freien Base erfolgt durch ein Kationenaustauscherharz.

Bei dieser Synthese wurde das Rohprodukt als gelbes Öl erhalten, welches nach Trocknen im Vakuumexsikkator zu einem Feststoff erstarrte. Es wurde der Rückstand in Wasser gelöst (ca. 5 g/mL) und der pH-Wert mittels Pyridin auf 3,5 eingestellt. Dabei veränderte die Lösung die Farbe von gelb nach blau. Es wurde Ethanol hinzugefügt, was aber nicht zu einer Ausfällung des Produktes führte. Das Produkt konnte weder mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden, noch mit der Säule aufgetrennt werden, auch eine Lösung in Methanol und anschließender Fällung mit Diethylether führte zu keiner weiteren Aufreinigung. Anhand des Massenspektrums erfuhr man, dass als Konkurrenzprodukt auch andere Produkte entstanden sein müssten, welche eine höhere Molekülmasse besitzen. Auch wenn das aufgenommene NMR-Spektrum nicht aussagekräftig ist, da viele sich überlagernden Signale sichtbar sind, so stechen zwei Charakteristika hervor. Mittels ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) wurde bei 9.03 ppm ein Singulett festgestellt, welches das C(2)-H des Imidazolrings darstellt. Es gibt aber kein Signal mehr bis in etwa 4.7 ppm, was bedeutet, dass die Reaktion am Imidazol-C(5) stattgefunden haben muss und dort kein Proton mehr zu finden ist. Um das eigentliche Produkt zu erhalten, kann man das Rohprodukt weiter zum Ester umsetzen um die Abtrennung von Nebenprodukten zu ermöglichen. Durch die Umsetzung zum Benzylester soll man wie beim Histidinbenzylester ein apolareres Produkt gewinnen, welches leichter aufzutrennen ist.

2.4.2 Syntheseversuch von Spinacinbenzylester

2.4.2.1 Syntheseversuch des Spinacinbenzylesters im Mikrowellenversuch

Die Synthese des Spinacinbenzylesters kann aus mehreren Ausgangssubstanzen erfolgen. Eine der Möglichkeiten ist die Verwendung des Histidinbenzylesters. Die Umsetzung des Histidinbenzylesters zum Spinacinbenzylesters wurde anhand eines Mikrowellenexperiments getestet, ob der Umsatz aus dem Ester möglich ist. Dafür wurde **5** mit Bentonit verrieben und auf drei Eppendorfgefäße gleichmäßig aufgeteilt. Danach wurde Formaldehydlösung hinzugefügt und gut vermischt. Bei Probe A wurde Formaldehyd im Unterschuss hinzugefügt, Probe B enthielt eine äquimolare Menge an Formaldehyd und bei Probe C wurde Formaldehyd im Überschuss hinzugefügt. Danach wurden die Gefäße verschlossen, in die Mikrowelle gestellt und bei voller Leistung fünfmal für sechs Sekunden erhitzt, danach wieder 30 Sekunden abgekühlt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und nach jedem Mal wurde wieder gemischt. Danach wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert und der Rückstand abfiltriert. Das Filtrat wurde eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und ein Massenspektrum wurde angefertigt. Es wird ein Molpeak bei $[M+H]^+ = 258$ erwartet.

Der Peak bei $[M+H]^+ = 258$ gefunden, sowie die korrespondierenden Peaks bei $[M+Na]^+ = 280$ und $[M+K]^+ = 296$. Auch Peak von $[M+H]^+ = 246$ wurde gefunden. Dabei handelt es sich mit Sicherheit um nicht umgesetzten Histidinbenzylester. Mit Erhöhung der Menge des eingesetzten Formaldehyds, vergrößerte sich das Verhältnis der Produktpeaks zum Eduktpeak. Des Weiteren muss es nicht sein, dass das gewünschte Produkt entstanden ist. Andere Strukturen wie das Imin könnten auch entstanden sein und die weitere Reaktion zum Spinacin muss nicht passiert sein, daher muss man den Rückstand chromatographisch auftrennen und mittels eines NMR-Experiments aufklären.

Die Umsetzung des Histidinbenzylesters mittels Formaldehyd in conc. Salzsäure, ähnlich der Synthese des Spinacinhydrochlorids würde auch nicht zum gewünschten Ergebnis führen, da der Benzylester das nicht aushalten würde und Benzylalkohol abgespalten wird.

Die Synthese von Spinacinmethylester wurde schon in der Literatur⁶⁹ beschrieben, trotzdem wurde versucht einen lipophileren Spinacinbenzylester herzustellen.

2.4.2.2 Syntheseversuch des Spinacinbenzylesters mittels Thionylchlorid

In der Literatur wird die Synthese von Aminosäurenbenzylester mittels Thionylchlorid folgendermaßen beschrieben⁷⁵: Thionylchlorid wird tropfenweise einer Suspension der Aminosäure in Benzylalkohol unter Kühlung hinzuge tropft. Danach erhitzt man über dem

Dampfbad für fünf Stunden. Man fügt so lange Diethylether, hinzu bis eine Trübung entsteht und stellt den Ansatz danach in den Kühlschrank. In diesem Syntheseversuch wurde mit dem Rohprodukt aus der Spinacinsynthese gearbeitet. Die Reaktionsdauer wurde auf 24 Stunden erhöht und anstatt über einem Dampfbad zu arbeiten, wurde auf 90-100 °C erhitzt. Nach den 24 Stunden war noch immer eine Suspension vorhanden. Es wurde Ether hinzugefügt und filtriert. Der Filterkuchen wurde noch mit weiterem Ether gewaschen. Bei dieser Synthese kam es zu keinem Umsatz, weil sich das Edukt nicht gelöst hat.

2.5 Syntheseversuche von 2-Amino-3-(1H-Imidazol-1-yl)-propansäure-Derivaten

2.5.1 Synthese von Z-L- β -lacton

Die Idee hinter der Synthese von Z-L- β -lactonen ist die Herstellung von optisch reinen 2-Amino-3-(1H-Imidazol-1-yl)propansäurederivaten, die, wenn man die Struktur betrachtet, dem Histidin strukturell sehr ähnlich sind, genauer gesagt ein Isomer darstellen. Man bedient sich für die Herstellung des β -lactons der sogenannten Mitsunobu-Reaktion, welche in diesem Fall zu einer Cyclisierung von $\text{NH}_2(\alpha)$ geschützten Beta-Lactonen verwendet wird. Diese sind aufgrund ihrer Ringspannung relativ reaktiv und können bei der Öffnung sowohl Amide, aber auch die in diesem Fall die gewünschten Aminosäuren bilden. In den meisten Vorschriften wurde Dimethylazodicarboxylat (DMAD) verwendet. Dieses ist aktuell aber nicht erhältlich⁵⁹. Anstatt dessen verwendet man Diethylazodicarboxylat (DEAD) oder Diisopropylazodicarboxylat (DIAD).

Bei der Mitsunobu-Reaktion handelt es sich um die oxidative-reduktive Kupplung eines Pronucleophils, wie einer Carbonsäure, mit z.B. primären und sekundären Alkoholen unter Wasserabspaltung. Einerseits setzt man ein oxidatives Azo-Reagens, andererseits ein Phosphan-Reagens, welches zur Reduktion dient, ein. Man kann dadurch neben Estern auch Lactone herstellen.⁷⁶ Als reduktives Reagens verwendet man Triphenylphosphin, als oxidatives Reagens Azodicarbonsäurealkylester.).

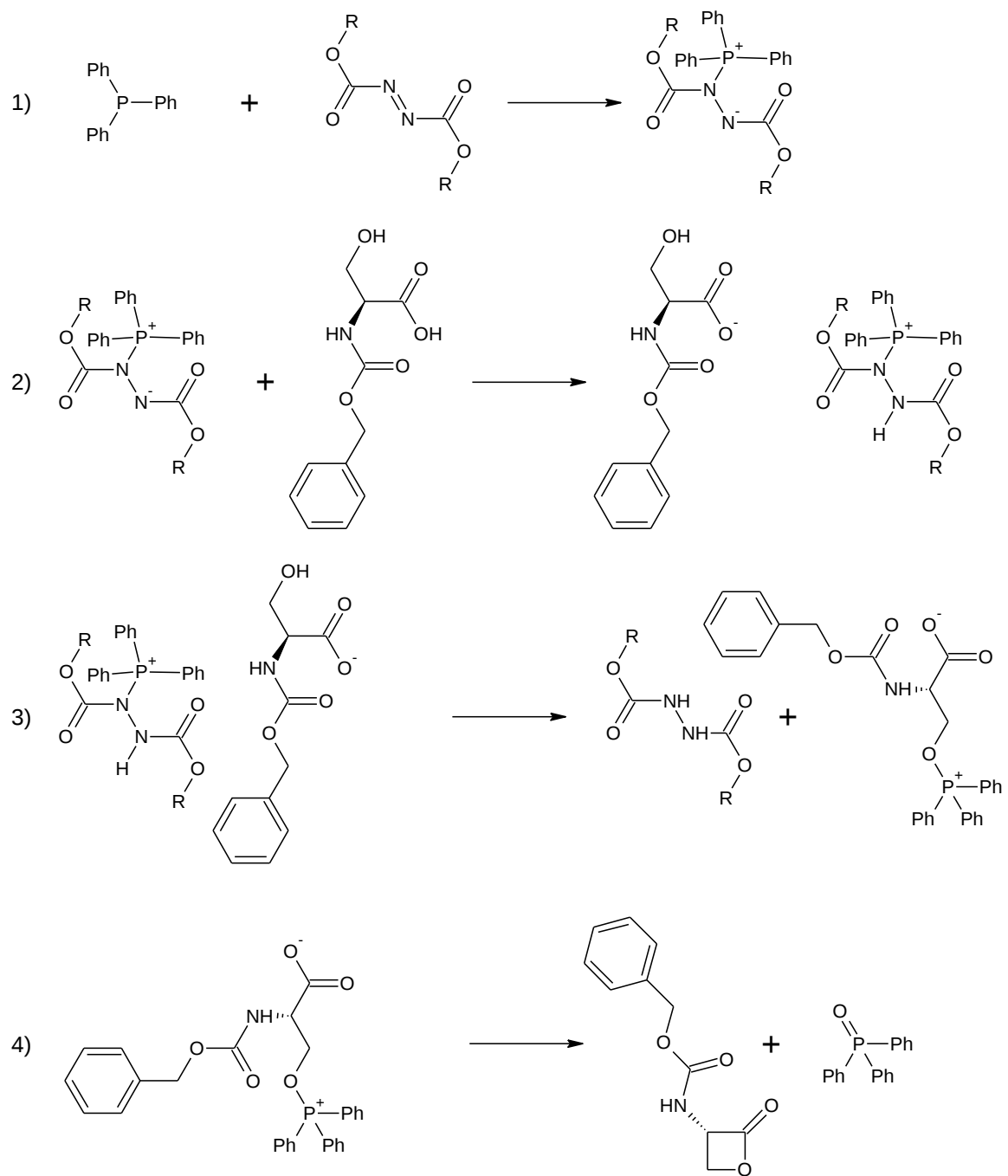
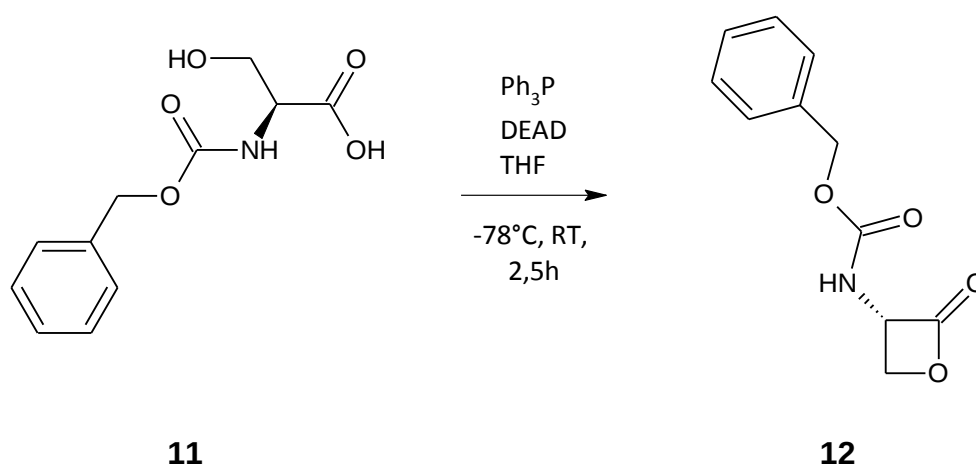


Abb.6: der Reaktionsmechanismus des L-Z-Serins zum β -Lacton

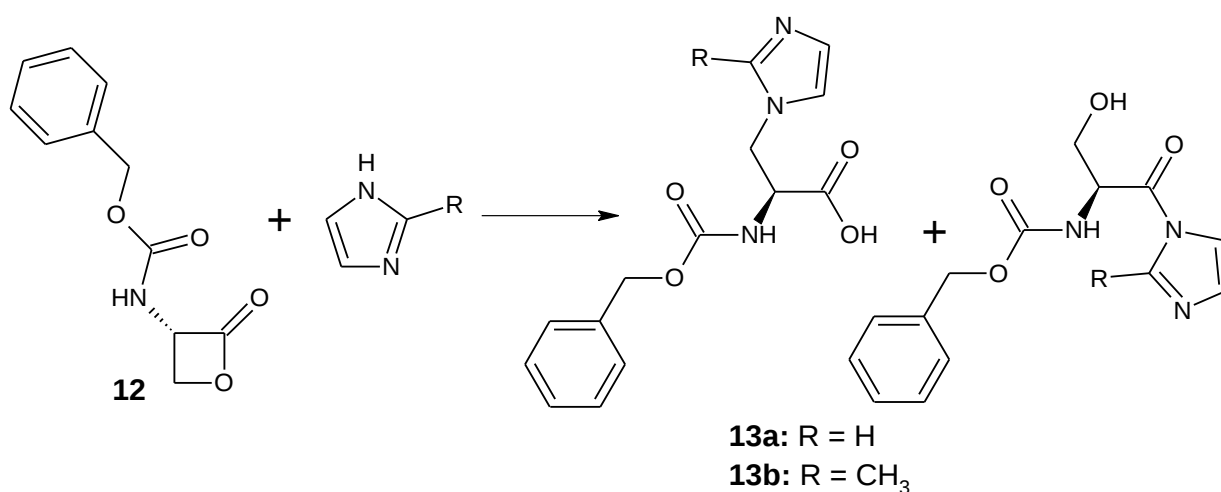
2.5.1.1 Umsetzung unter Mitsunobu-Bedingungen



Laut Literatur⁷⁷ arbeitet man unter Argon und alle Reagentien sind werden frisch destilliert oder getrocknet. Einer Lösung aus getrocknetem Triphenylphosphin in wasserfreiem Tetrahydrofuran wird unter Rühren destilliertes Dimethylazodicarboxylat tropfenweise bei -78°C über zehn Minuten hinzugefügt. Nach zehn Minuten wird getrocknetes Z-Serin in Tetrahydrofuran über 15 Minuten tropfenweise der weißen schlammigen Masse bei -78°C hinzugefügt. Die Mischung wird für 20 Minuten bei -78°C und danach zweieinhalb Stunden bei 20°C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Rückstand mit Flashchromatographie aufgetrennt. Laufmittel ist 45% Ethylacetat/55% Petrolether.

Um eine Temperatur von -78°C zu erreichen wurde eine Kältemischung aus Trockeneis in Aceton hergestellt. Zur Detektion auf der DC-Platte verwendet man eine 0,04% Bromkresolgrünlösung, die durch Zugabe von Natronlauge blau gefärbt wurde. Im Anschluss erhitzt man die Platte. Dadurch erhält man ein gelb gefärbtes β -Lacton auf blauen Hintergrund. Hier entsteht ein Problem in der Aufreinigung, aber auch in der Detektion. Es wurden DC-Platten auch mit einem Tauchreagens behandelt, wodurch ein neuer Spot entdeckt wurde, welcher einen etwas geringeren Rf-Wert als das Lacton besitzt. Die Trennleistung bei der Verwendung von DEAD ist höher als bei der Verwendung von DIAD, wodurch man zu DEAD tendieren sollte.

2.5.1.2 Umsetzung des Z-L-β-lactons zu Histidinisomeren



Ausgehend vom β-Serin-Lacton (**12**) versucht man eine Aminosäure herzustellen, indem man den Lactonring öffnet. Es wird bei Ratemi et al.⁷⁸ erwähnt, dass die Ausbeute der Aminosäure bei Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel im Vergleich zu Serinamid bei 95:5 liegt. Bei der Öffnung des Lactons bestehen nämlich zwei Möglichkeiten: 1) Der Imidazolring bildet an der Carbonsäure ein Amid, oder er bildet 2) die gewünschte Aminosäure indem eine *N*-Alkylbindung zum β-Kohlenstoff entsteht. Um die Ausbeute zu erhöhen, kann außerdem zuerst das reaktivere TMS-Imidazol hergestellt werden. Laut Literatur⁷⁹ wird Hexamethyldisilazan (HMDS) tropfenweise einer Lösung mit Imidazol in Toluol unter Argon hinzugefügt, dann wird die Reaktionsmischung für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird unter reduziertem Druck bis zur Trockene eingengt. Die Destillation des Rückstandes ergibt ein farbloses Öl. Das Produkt kann bei 0 °C unter Argon aufbewahrt werden. Nun wird laut Literatur Trimethylsilylimidazol in trockenem Acetonitril Boc-Serin-Lacton in trockenem Acetonitril über fünf Minuten tropfenweise unter Argon hinzugefügt. Die Mischung wird für 28 Stunden gerührt. Danach wird die Reaktion in einem Eis-Wasserbad gekühlt und eine kalte wässrige 0.1 M Ammonchlorid-Lösung hinzugefügt. Die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und für fünf Minuten gerührt. Die wässrige Phase soll dreimal mit Dichlormethan extrahiert und mittels C₁₈-Kartuschen [Gradient, Wasser:Methanol, (100:00)bis (90:10)] extrahiert werden, wodurch man eine weiße Festsubstanz erhält.

Zuerst wurde versucht TMS-Imidazol herzustellen. Zwar war es nicht möglich, dieses durch Destillation weiter aufzureinigen, das nach der Synthesevorschrift erhaltene Rohprodukt, ein klares, schwach gelbes Öl, wurde trotzdem weiter eingesetzt.

2.5.1.2.1 Syntheseversuch von 2-Benzoyloxycarbonylamino-3-(1H-imidazol-1-yl)-propansäure

Um dieses Produkt herzustellen, wurde TMS-Imidazol hergestellt und in Acetonitril unter Argon gelöst. Danach wurde eine Suspension des Z-Serin-Lactons (**12**) hinzuge tropft und für 28 Stunden gerührt. Es wurde mit Eiswasser gekühlt und kalte 0.1 M Ammoniumchloridlösung hinzugefügt. Es wurde versucht sowohl mit Dichlormethan, als auch mit Ethylacetat zu extrahieren, jedoch wurde auf diese Weise kein Produkt gewonnen. Die wässrige Phase wurde eingedampft, was ein gelbes Öl ergab. Dieses Öl wurde in Methanol gelöst und mit Diethylether gefällt. Vom gefällten Produkt wurde ein Massenspektrum bestimmt. Es wurde der Molpeak $[M+H]^+ = 290$ gefunden. Das NMR-Spektrum hingegen gab keinen Aufschluss darüber, ob es sich um die Aminosäure oder das Amid handelte. Leider wurden von Ratemi et al.⁷⁸ keine spektroskopischen Daten angegeben, um diese zu vergleichen. Deshalb wird diese Synthese als Fehlschlag bewertet. In einem weiteren Versuch wurde die organische Phase nach den 28 Stunden eingedampft, der Rückstand in Methanol gelöst und unter Eiskühlung Thionylchlorid hinzuge tropft, um den Methylester zu erhalten. Aber auch dieser konnte nicht extrahiert werden.

2.5.1.2.2 Syntheseversuch von 2-Benzoyloxycarbonylamino-3-(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)-propansäure

Es wurden auch Syntheseveruche ohne die Verwendung des TMS-Imidazols und nur durch Verwendung von Methylimidazol anstatt des Imidazols durchgeführt. So wurde Imidazol in Acetonitril unter Argon gelöst und Z-Serin-Lacton (**12**), welches in Acetonitril gelöst war, hinzuge tropft. Danach wurde wieder für 28 Stunden gerührt. Nun wurde die organische Phase eingedampft und der Rückstand in Methanol gelöst und durch Zugabe von Diethylether ausgefällt.

Auch hier wurde mittels des Massenspektrums der passende Molpeak von $[M+H]^+ = 304$ gefunden, jedoch war das NMR aufgrund anderer Substanzen nicht auswertbar. Eine weitere Methode zur Trennung wurde nicht angewandt, weshalb diese Synthese als Fehlversuch bewertet wurde.

Bei den vorherigen zwei Synthesen wurde zwar der gewünschte Molpeak gefunden, jedoch konnte nicht festgestellt werden, ob es sich dabei um die Aminosäure oder das Serinamid handelte. NMR-Daten in der Literatur hätten das erleichtert. Außerdem war die Extraktion nicht einmal mittels Ethylacetat möglich. Das Produkt scheint sehr polar zu sein. Die Umsetzung zum Methylester und anschließender Extraktion war auch nicht möglich.

2.6 Resultate/Diskussion

Ziel war es Histidinderivate und Isomere des Histidins herzustellen. Dies stellte sich schwieriger heraus als erwartet. Zuerst mussten die Carbonsäuregruppe und die α -Aminogruppe geschützt werden. Der Schutz des α -Stickstoffs mittels Benzyloxycarbonylschutzgruppe hat zum Beispiel nicht funktioniert, unabhängig von der verwendeten Synthesevorschrift. Dies wurde durch Einführung der Phthalylgruppe gelöst. Auch die Einführung der Phthalylschutzgruppe bereitete Probleme, es konnte aber ein Histidinbenzylester auf diese Art umgesetzt werden. Durch Abspalten des Benzylesters kann man **3** erhalten.

Der Schutz der Carboxylgruppe erfolgte durch Veresterung. Sowohl die Synthese des Benzylesters als auch des Methylesters erwiesen sich als erfolgreich. Es wurde versucht die Aminosäureester als freie Base zu extrahieren. Das war nicht einmal mit Ethylacetat möglich. Daher wird vermutet, dass der freie Aminosäureester trotzdem noch zu polar für eine Extraktion ist. Die Derivatisierung durch Acylierung am Imidazolstickstoff wurde sowohl mit Carbonsäureanhydriden als auch mit Carbonsäurechloriden durchgeführt. Die Umsetzung mit Anhydriden war nicht erfolgreich, die Synthese mittels Säurechloriden war nur mit 3,3-Dimethylbuttersäurechlorid möglich. Da am π -Stickstoff des Imidazolrings möglicherweise keine Umsetzung erfolgte, wird es bei weiteren Synthesen zur Racemisierung im Kopplungsschritt kommen.

Die Synthese des Histidinisomers konnte nicht verwirklicht werden, da es nicht aufgereinigt werden konnte und deshalb keine Aussage getroffen werden kann, welches Produkt entstanden ist. Auch die Umsetzung zu einem Methylester war nicht erfolgreich, zumindest konnte nach Zugabe von Thionylchlorid in Methanol dieser nicht extrahiert werden. Die Rigidisierung durch Formaldehyd brachte zwar ein Ergebnis und deutet darauf hin, dass eine Umsetzung erfolgt ist, konnte aber auch nicht aufgetrennt werden. Trotzdem hätte gerade dieser Ansatz sehr viel Potential. Um die große Anzahl an Konkurrenzprodukten zu verringern, sollte eine Synthese mit mildereren Bedingungen gefunden werden.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Geräte und Methoden

3.1.1 Geräte und Reagenzien

Glasgeräte wurden, wenn wasserfrei gearbeitet wurde, im Trockenschrank bei 150 °C gelagert, danach zum Abkühlen in den Exsikkator gestellt. Um unter Schutzgas zu arbeiten, wurde das eingeleitete Argon getrocknet. Flüssige Reagenzien wurden vor der Verwendung mit der Büchi-Apparatur oder Bachit-Apparatur destilliert.

Reagens	Firma
2-Methylimidazol	Sigma-Aldrich
3,3-Dimethylbuttersäurechlorid	Sigma-Aldrich
Benzylalkohol	Riedel-de Haën
β-Cyclodextrin	Fluka
Chlorameisensäurebenzylester	Acros Organics
Diethylazodicarboxylat (DEAD)	Sigma-Aldrich
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich
Formaldehydlösung 37%	Sigma-Aldrich
Hexamethyldisilazan (HMDS)	Acros Organics
Imidazol	Acros Organics
L-Histidin	Acros Organics
L-Serin	Bachem
N-(Ethoxycarbonyl)phthalimid	Acros Organics
Para-Toluolsulfonsäure-Monohydrat	Fluka
Phthalsäureanhydrid	Sigma-Aldrich
Pivalinsäureanhydrid	Sigma-Aldrich
Pivalinsäurechlorid	Sigma-Aldrich
Thionylchlorid	Sigma-Aldrich
Triphenylphosphin	Sigma-Aldrich

3.1.2 Lösungsmittel

Lösungsmittel wurden, wenn wasserfrei gearbeitet wurde, getrocknet. Tetrahydrofuran wurde in einer Destillationsapparatur unter Argon mit elementarem Natrium getrocknet und Benzophenon als Indikator getrocknet. Die Trocknung von Dichlormethan erfolgte in derselben Destillationsapparatur durch Phosphorpentoxid. Acetonitril wurde in HPLC-Qualität verwendet und ist deshalb als wasserfrei anzunehmen, weiters wurde das Acetonitril mit einem Molekularsieb 3 Å getrocknet.

3.1.3 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden fertige KG60 F254- Folien der Firma Macherey-Nagel verwendet. Detektiert wurde bei Tageslicht nach Derivatisierung mittels eines Tauchreagens mit folgender Zusammensetzung: 12.5 g Phosphormolybdänsäure, 5 g Cer(IV)-Sulfat•4H₂O, 30 mL H₂SO₄ conc., 470 mL Wasser, oder bei 254 nm.

3.1.4 Säulenchromatographie

Die Rohprodukte wurden an Kieselgel 60 chromatographiert. Die Fraktionen, jeweils 20-40 mL, wurden in Erlenmeyerkolben aufgefangen.

3.1.5 NMR

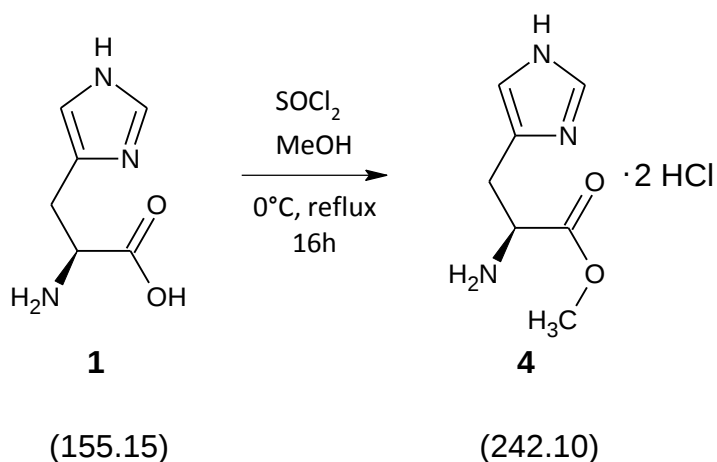
Für die Aufnahme von ¹H-NMR und ¹³C NMR-Spektren wurden Bruker-Advance-Geräte (200 MHz und 400 MHz) verwendet. Die Proben wurden in CDCl₃, aber auch DMSO-*d*₆ gelöst.

3.1.6 Massenspektrometer

MS-Spektren wurden am Thermo Fischer LCQ Deca gemessen. Die Proben wurden in Methanol gelöst um eine Konzentration von 1 mg/mL zu erhalten.

3.2. Vorschriften für erfolgreiche Umsetzungen

3.2.1 Histidinmethylesterdihydrochlorid(4)



Durchführung:

Einer Suspension aus L-Histidin (5 g, 32.2 mmol, **1**) in Methanol wurde Thionylchlorid (2.8 mL, 38.6 mmol, $\rho = 1.631 \text{ g/mL}$ bei 25°C) tropfenweise bei 0°C hinzugefügt. Die Reaktion wurde danach für 16 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde zur Trockene eingedampft und mehrfach mit Methanol co-evaporiert. Man erhielt als Produkt 7,56 g (97%) eines weißen Pulvers.

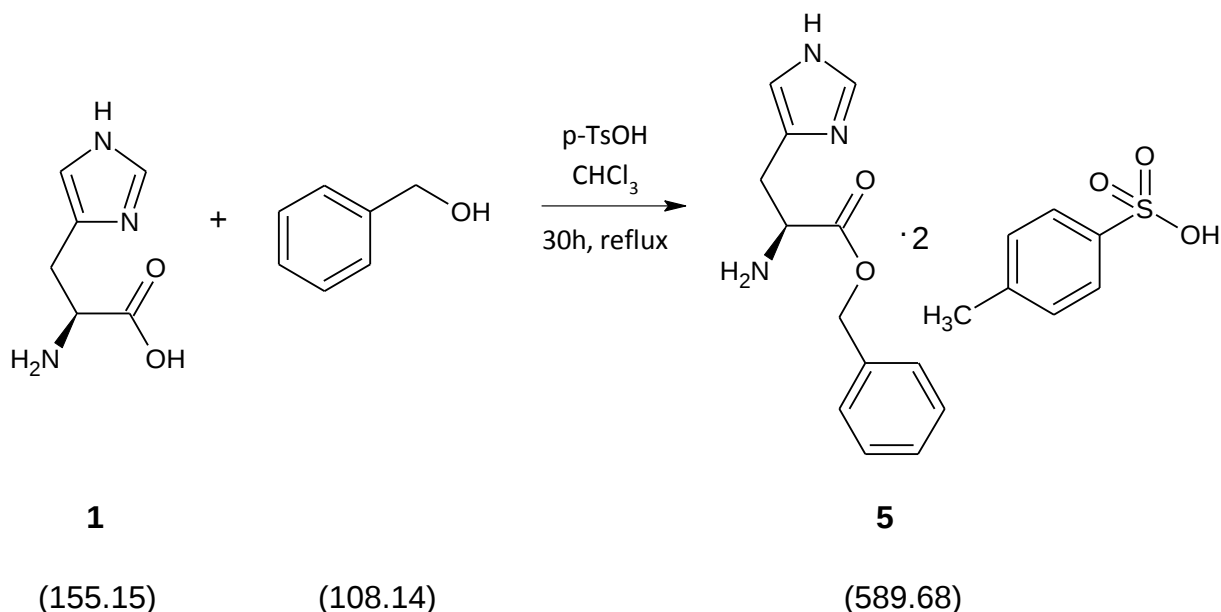
Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$

Analytik(**4**):

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 170$

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 9.07$ (s, 1 H, Imidazol-C(2)**H**), 7.50 (s, 1 H, Imidazol-C(4)**H**), 4.34 (t, 1 H, $J = 7.45 \text{ Hz}$, α -**CH**), 3.72 (s, 3 H, $-\text{OCH}_3$), 3.29 (d, 2 H, $J = 5.91 \text{ Hz}$, β -**CH**₂)

3.2.2 Histidinbenzylesterditosylat(5)



Durchführung:

Eine Suspension aus L-Histidin(95.4 mmol; 14.81 g) und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat(232.4 mmol, 44.21 g) wurde in 100 mL CHCl_3 und 100 mL Benzylalkohol für 30 Stunden an einem Wasserabscheider für Lösungsmittel mit höherer Dichte als Wasser, unter Rückfluss erhitzt. Dabei wurden 9 mL Wasser abgeschieden. Danach kühlt man ab, entfernt das CHCl_3 mit dem Rotavapor und wurde über das Wochenende (mehr als ein Tag!) unter Kühlung mit 300 mL Diethylether im Kühlschrank stehen gelassen. Man nutsch das ausgefallene Produkt ab und reinigt es indem man es zuerst wieder in 300 mL Ether resuspendiert, und dann erneut abnutschen mit 1000 mL Ether wäscht. Man erhält 54,55 g (97%) eines weißes Pulvers.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$

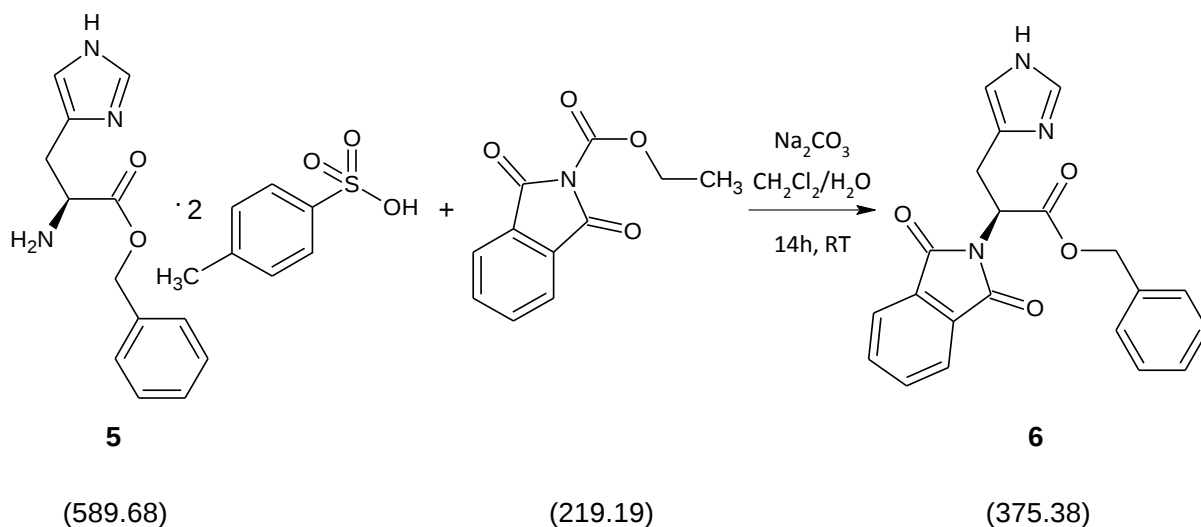
Analytik(**5**):

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 246$ (freier Ester)

DC (Methanol/Dichlormethan 3+7): $R_f=0.37$

^1H NMR (200MHz $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 8.98$ (s, 1 H, Imidazol-C(2)**H**), 7.11-7.52 (m, 14 H, arom. **H**), 5.20 (s, 2 H, Phenyl-**CH**₂O), 4.41 (t, 1 H, $J=7.2$, α -**CH**) 2.29 (s, 6 H, β -**CH**₂)

3.2.3 Benzyl(2S)-2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoat (**6**)



Durchführung:

Für die Synthese wurde **5** (17.70 g, 30 mmol) eingesetzt und in 30 mL Wasser gelöst. Es wurde mit Na_2CO_3 (2.70 g 25.47 mmol) auf ca. pH 8 alkalisiert. Es wurde *N*-(Ethoxycarbonyl)phthalimid (7.23 g, 33 mmol) in 30 mL Dichlormethan gelöst. Die beiden Phasen wurden vereint und für 14 Stunden intensiv gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das entstandene Rohprodukt wird mit in Ethanol unter Erhitzen gelöst und mit Wasser ausgefällt. Das Fällungsprodukt wurde abgenutscht und mit Wasser und Diethylether gereinigt und danach bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 8,63 g (77%)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$

Analytik (**6**):

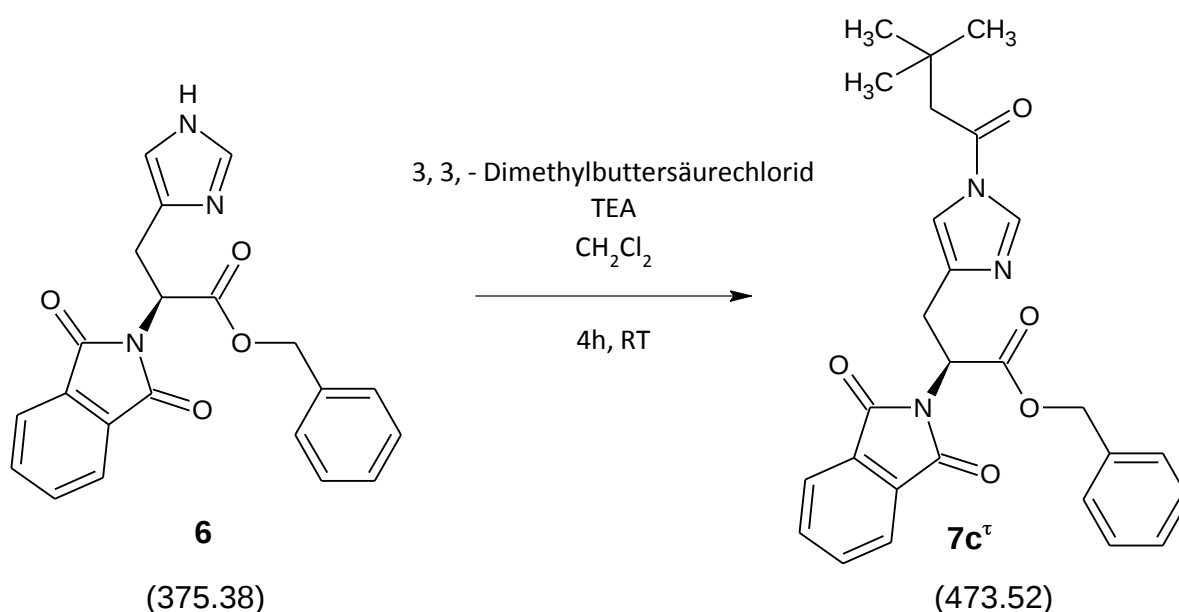
DC: (Ethylacetat): $R_f=0.30$

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 376$

Gefunden wurden weiters: $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{H}+\text{MeOH}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.81 – 7.67(m, 4 H, aromatische Phthalyl-**H's**), 7.47(s, 1 H, Imidazol-C(2)**H**), 7.30(br, 5 H, aromatische Benzyl-**H's**), 6.75(s, 1 H, Imidazol-C(5)**H**), 5.25(dd, 1H, J = 4.95 Hz, J = 9.98 Hz α -**CH**)-5.18(s, 2 H Phenyl-**CH**₂O), 3.56(d, 2 H, J = 8.10 Hz, β -**CH**₂)

3.2.5 Benzyl(2S)-3-[1-(3,3-dimethylbutanoyl)-1H-imidazol-4-yl]-2-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-2-yl)propanoat (**7c^r**)



Durchführung:

6 (0.75 g, 2 mmol) wurde in einer Mischung aus 5 mL getrockneten Dichlormethan und Triethylamin (0.33 mL, 2.4 mmol, ρ = 0.726 g/mL bei 25 °C) gelöst. 3,3-Dimethylbuttersäurechlorid (0.30 g, 2.2 mmol) wurden mit 2 mL getrocknetem Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung zugetropft. Danach rührt man für 4 Stunden bei Raumtemperatur. Danach reinigt man die Phase mit gesättigter NH_4Cl -Lösung, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung, Nun trocknet man die organische Phase mit Na_2SO_4 und dampft das Lösungsmittel unter Vakuum ein. Das Rohprodukt reinigt man mittels Flash-Chromatographie, um 0,30g (32%) **7c^r** zu erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{48}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_9$

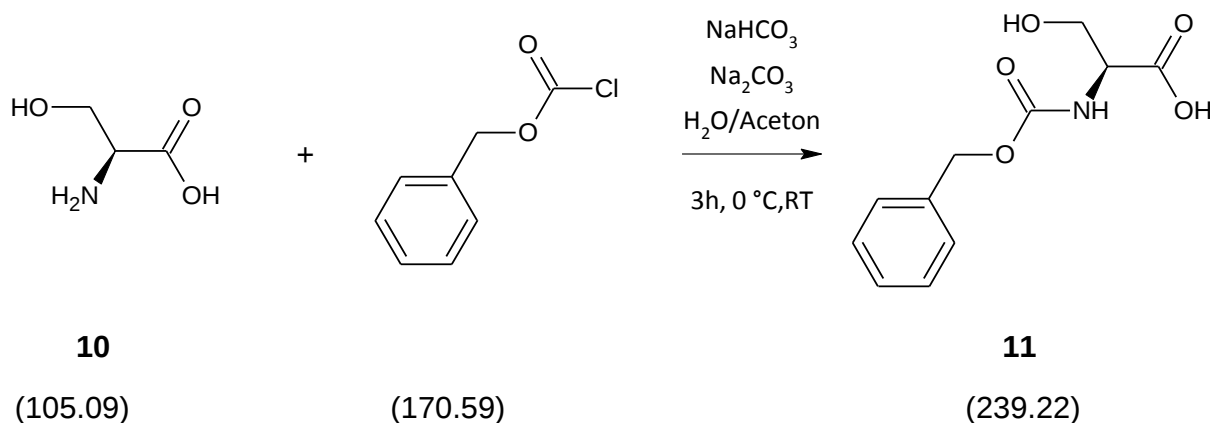
Analytik (**7c[†]**):

DC: (Ethylacetat) R_f = 0.85

ESI-MS: [M+H]⁺ = 474

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.28(s, 1 H, Imidazol-C(2)**H**), 7.87(br, 4 H, aromatische Phthalyl-**H**'s), 7.49(s, 1 H, Imidazol-C(5)**H**), 7.31(br, 5 H, aromatische Phenyl-**H**'s), 5.24(dd, 1 H, J = 3.83 Hz, J = 9.64 Hz, α-**CH**)-5.20(s, 1 H, Phenyl-**CH**₂O), 3.36(d, 2 H, J = 4.27 Hz, C(β)**H**₂), 2.74(s, 2 H, Dimethylbuttersäureamid C(2)**H**₂), 0.90(s, 9 H, Dimethylbuttersäureamid-C(**CH**₃)₃)

3.2.6 Z-L-Serin(**11**)



Durchführung:

Zuerst wurde Na₂CO₃ (1.06 g, 10 mmol) und NaHCO₃ (0.42 g, 5 mmol) in 34 mL Wasser/Aceton (30+4) gelöst. Danach wurde L-Serin (0.53 g, 5 mmol, **10**) gelöst und Chlorameisensäurebenzylester (1.07 g, 6.25 mmol) unter Eiskühlung hinzuge tropft. Danach rührt man bei Raumtemperatur für drei Stunden. Diese Mischung wurde mit Ether gewaschen, danach wird mit Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und eingedampft. Man erhält 0,87 g (72% Ausbeute) Z-L-Serin (**11**).

Summenformel: C₁₁H₁₃NO₅

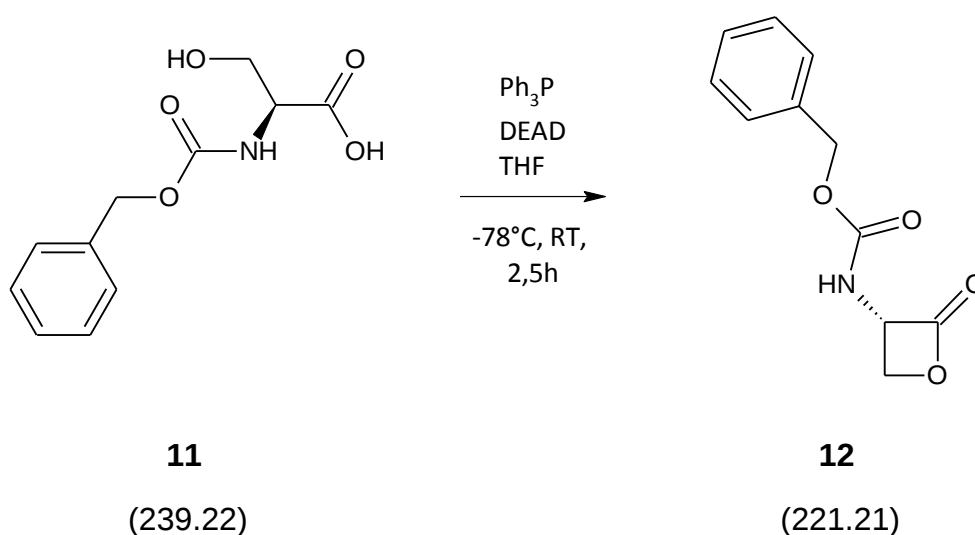
Analytik (**11**):

DC: (Methanol/Dichlormethan 7+3): $R_f = 0.5$

MS-ESI: $[M+H]^+ = 240$

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.36$ (m, 5 H, aromatische **H**'s), 5.04 (s, 2 H, Ph-**CH**₂), 4.12-4.03 (m, 1 H, α -**CH**), 3.67 (d, 2 H, $J = 4.76$ Hz, β -**CH**₂)

3.2.7 Benzyl *N*-[(3*S*)-2-oxo-oxetan-3-yl]carbamat (**12**)



Durchführung:

Man arbeitet bei dieser Synthese mit Argon als Schutzgas. Einer Lösung aus getrocknetem Triphenylphosphin (6.43 g, 24.5 mmol) in 100 mL getrocknetem Tetrahydrofuran wird unter Rühren destilliertes Diethylazodicarboxylat (2.70 mL, 3.58 g, 24.5 mmol) tropfenweise bei -78°C über 10 Minuten hinzugefügt. Nach 10 Minuten wird getrocknetes Z-L-Serin (5.84 g, 24.4 mmol, **11**) in 100 mL getrocknetem Tetrahydrofuran über 15 Minuten tropfenweise der weißen schlammigen Masse bei -78°C hinzugefügt. Die Mischung wird für 20 min bei -78°C und danach 2.5 h bei 20°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde danach unter Vakuum entfernt und der Rückstand mit Flashchromatographie (PE/EtOAc = 55+45) aufgetrennt.

Man erhält 1.82 g (34% Ausbeute) reines Produkt (Qualität 1) und 1.73 g (32% Ausbeute) mit DEAD verunreinigten Fraktion (Qualität 2).

Summenformel: $C_{22}H_{24}N_2O_9$

Analytik(**12**)

DC Petrolether/Ethylacetat (1+1): $R_f=0.40$

MS-ESI: $[M+H]^+ = 222$

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.42-7.33(m, 5 H, \text{aromatische } \mathbf{H's})$, $5.61(d, 1 H, \alpha-NH-CO-)$, $5.19-5.12(m, 3 H, \text{Phenyl-}\mathbf{CH_2O}, \alpha-\mathbf{CH})$, $4.49-4.44(m, 2 H, \beta-\mathbf{CH_2})$

^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 168.73$ (Carboxyl-**C**), 155.21 (Carbamat-**C**), 135.43 (quartäres Phenyl-**C**), $128.62-128.34$ (aromatische Phenyl-**C**), 67.79 (β -**C**), 66.32 (Phenyl-**CH₂O**), 59.60 (α -**C**)

4 LITERATURVERZEICHNIS

1. Garbe C, Büttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Krüger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, et al;
Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society; J. Invest. Dermatol. (1994); Vol. 102, S.695-699
2. Abdel-Malek ZA, Ruwe A, Kavanagh-Starner R, Kadekaro AL, Swope V, Haskell-Luevano C, Koikov L, Knittel JJ; alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes; Pigment Cell Melanoma Res. (2009), Vol. 22, S.635-644
3. Bos JD, Meinardi MM; The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs; Exp. Dermatol. (2000), Vol.9, S.165-169
4. WHO, 2015 (www.who.int)
5. Drouin R, Therrien JP; UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in p53; Photochem. Photobiol. (1997), Vol.66, S.719-726
6. Rainer Wolber, Kathrin Schlenz, Kazumasa Wakamatsu, Christoph Smuda, Yukiko Nakanishi, Vincent J. Hearing, and Shosuke Ito; Pigmentation effects of solar simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation; Pigment Cell Melanoma Res. (2008), Vol.21, S.487-491
7. Wolfram Sterry, Ralf Paus, Walter Burgdorf; Thieme Clinical Companions Dermatology; Thieme-Verlag, Stuttgart (2006), S.296
8. Van Laethem A, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P; The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte; Int. J. Biochem. Cell Biol. (2005), Vol.37, S.1547-1553
9. Hans-Dieter Klimm, Hans-Ulrich Comberg; Allgemeinmedizin; Thieme Verlag, Stuttgart (2004), S.403
10. Walter Mooi, Thomas Krausz; Pathology of Melanocytic Disorders; Taylor & Francis Group Boca Raton (2007), S.255f
11. Statistik Austria, 2015 (www.statistik.at, Suche: Haut)
12. Dirk Schadendorf, Corinna Kochs, Elisabeth Livingstone; Handbook of Cutaneous Melanoma: A Guide to Diagnosis and Treatment; Springer Healthcare Ltd, London (2013), S.30
13. Que SK, Weston G, Suchecki J, Ricketts J; Pigmentary disorders of the eyes and skin; Clin. Dermatol. (2015), Vol.33, S.147-158

14. Lee-Ellen C. Copstead-Kirkhorn, Jacquelyn L. Banasik; Pathophysiology; Saunders, St. Louis (2013), S.102
15. Carol Porth; Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States; Wolters Kluwer Health|Lippincott Williams & Wilkins (2011), S.1168
16. Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al. (eds), GeneReviews® (Datenbank, Suche: "albinism"), University of Washington, Seattle (1993-2015)
17. Christina Wasmeier, Alistair N. Hume, Giulia Bolasco, Miguel C. Seabra; Melanosomes at a glance; J. Cell Sci. (2008), Vol.121, S.3995-3999
18. Peter Fritsch; Dermatologie und Venerologie für das Studium; Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2009), S.252
19. Sima Jain; Dermatology: Illustrated Study Guide and Comprehensive Board Review; Springer Science+Business Media, Berlin (2012), S.137
20. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M; Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B; Biochim. Biophys. Acta (1996), Vol.1313, S.130-138
21. Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ishigaki Y, Ohnishi T, Mori T; Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis; J. Invest. Dermatol., (1998), Vol.110, S.806-810
22. Ingrid Moll; Duale Reihe Dermatologie 7. Auflage; Thieme-Verlag, Stuttgart (2010), S.478
23. Walter Siegenthaler, Hubert E. Blum; Klinische Pathophysiologie; Thieme-Verlag, Stuttgart (2006), S.332
24. RCSB PDB (2015), (www.rcsb.org; Datenbank, Suche: POMC-Homo sapiens)
25. Guo HW, Deng J, Yang XC, Zhong BY, Shen Z, Yang SY, Liu BH, Hao F; Melanocortin receptor type 2 (MC2R, ACTH receptor) expression in patients with alopecia areata; Exp. Dermatol. (2010), Vol.19, S.1020-1022
26. Richter WO, Schwandt P; Melanotropin potentiating factor inhibits lipolytic activity of beta-lipotropin but not of melanocyte stimulating hormones; Neuropeptides (1986), Vol.7, S.73-77
27. Harmer SC, Bicknell AB; Role of gamma-MSH peptides in the regulation of adrenal steroidogenesis; Peptides (2005), Vol.26, S.1944-1951
28. Luger TA, Brzoska T; alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs; Ann. Rheum. Dis. (2007), Vol.66, S.52-55

29. Kathpalia PP, Charlton C, Rajagopal M, Pao AC; The natriuretic mechanism of Gamma-Melanocyte-Stimulating Hormone; *Peptides* (2011), Vol.32, S.1068-1072
30. Carletti G, Nervo G, Cattivelli L; Flavonoids and Melanins: a common strategy across two kingdoms; *Int. J. Biol. Sci.* (2014), Vol.10, S.1159-1170
31. Ira Gantz, Tung M. Fong; The melanocortin system; *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* (2003), Vol.284, S.468-474
32. Grimes PE, Hamzavi I, Lebwohl M, Ortonne JP, Lim HW; The efficacy of afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for repigmentation of vitiligo; *JAMA Dermatol.* (2013); Vol.149, S.68-73
33. Fabrikant J, Toulouei K, Brown SM; A review and update on melanocyte stimulating hormone therapy: afamelanotide; *J. Drugs Dermatol.* (2013), Vol.12; S.775-779
34. Bridges TM.; Pharmaceutical aphrodisia; *Curr. Top. Med. Chem.* (2007), Vol.7, S.1152
35. U.S. National Institutes of Health 2015 (www.nih.gov, Suche: "bremelanotide")
36. Miranda A. Farage, Kenneth W. Miller, Howard I. Maibach; *Textbook of Aging Skin*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2010), S.1020
37. Jean Krutmann, Thomas Diepgen, Claudia Billmann-Krutmann; *Hautalterung: Grundlagen - Prävention – Therapie*; Springer Medizin Verlag Heidelberg (2008), S.230
38. Tharwat F. Tadros; *Applied Surfactants: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2005), S.429
39. P.U. Giacomoni; *Sun Protection in Man*; Elsevier Science B.V., Amsterdam (2001), S.513f
40. Henry W. Lim, Herbert Honigsmann, John L. M. Hawk; *Photodermatology*; Taylor & Francis Group, Boca Raton (2007), S.268
41. P.U. Giacomoni; *Sun Protection in Man*; Elsevier Science B.V., Amsterdam (2001), S.548-549
42. de Freitas ZM, dos Santos EP, da Rocha JF, Dellamora-Ortiz GM, Gonçalves JC; A new sunscreen of the cinnamate class: synthesis and enzymatic hydrolysis evaluation of glyceryl esters of p-methoxycinnamic acid; *Eur. J. Pharm. Sci.* (2005), Vol.25, S.67-72
43. Jean Krutmann, Thomas Diepgen, Claudia Billmann-Krutmann; *Hautalterung: Grundlagen - Prävention – Therapie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2008), S.229-230
44. Österreichisches Bundesministerium für Gesundheit (2015) (www.bmg.gv.at)
45. Corona Brezina; *Frequently Asked Questions about Tanning and Skin Care*; The Rosen Publishing Group, Inc., New York (2010), S.21

46. U.S. Food and Drug Administration; Sunscreens and Tanning, (2015) (www.fda.gov)
47. Ingrid Moll; Dermatologie; Thieme-Verlag, Stuttgart (2005), S.294 ff
48. Li S, Hong M.; Protonation, tautomerization, and rotameric structure of histidine: a comprehensive study by magic-angle-spinning solid-state NMR; J. Am. Chem. Soc. (2011), Vol.133, S.1534-1544
49. National Research Council (US). Tenth Edition of the Recommended Dietary Allowances. National Academies of Science, Washington (DC) (1989)
50. F. Blomberg, W. Maurer, and H. Ruterjans; Nuclear Magnetic Resonance Investigation of 5*N*-Labeled Histidine in Aqueous Solution; J. Am. Chem. Soc. (1977), Vol.99, S. 8149–8159
51. Jones JH, Ramage WI, Witty MJ.; Mechanism of racemisation of histidine derivatives in peptide synthesis; Int. J. Pept. Protein Res. (1980), Vol.15, S.301-303
52. [EUAB 8.0]
53. Mary Campbell, Shawn Farrell; Biochemistry Eight Edition; Cengage Learning, Boston (2015), S.67
54. Chain Koji Hasegawa, Taka-aki Ono, Takumi Noguchi; Vibrational Spectra and Ab Initio DFT Calculations of 4-Methylimidazole and Its Different Protonation Forms: Infrared and Raman Markers of the Protonation State of a Histidine Side; J. Phys. Chem. (2000), Vol.104, S.4253-4265
55. Chen N, Chrambach A.; Enhanced field strength and resolution in gel electrophoresis upon substitution of buffer by histidine at its isoelectric point; Electrophoresis (1996), Vol.17, S.699-703
56. Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts; Protective Groups in organic Synthesis, 2nd Edition, Jan Wiley and Sons, Inc., Hoboken (1991), S. 335
57. Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts; Protective Groups in organic Synthesis, 2nd Edition, Jan Wiley and Sons, Inc., Hoboken (1991), S. 335
58. Pavan Kumar, Somi Reddy, Narender, Surendra, Nageswar, Rama Rao ; Aqueous phase mono-protection of amines and amino acids as *N*-benzyloxycarbonyl derivatives in the presence of β -cyclodextrin; Tetrahedron Lett. (2006), Vol.47S.6393–6396
59. Persönliche Mitteilung von ao. Univ. Prof. Dr. Mag. Pharm. Martin Kratzel
60. Ashok D. Pehere, Andrew D. Abell; An improved large scale procedure for the preparation of *N*-Cbz amino acids; Tetrahedron Lett. (2011) Vol.52, S.1493–1494
61. Reddy C. Uma Maheswara, Jayakar B., Srinivasan R.; Synthesis and antimicrobial activity of a *N*-phthalimido and acetimido derivatives from amino acids and anhydrides; Int. J. Pharm. Biol. Sci. (2010), Vol.1, S.81-86

62. Griesbeck A., Neudörfl J., de Kiff A.; Photoinduced electron-transfer chemistry of the bielelectrophoric *N*-phthaloyl derivatives of the amino acids tyrosine, histidine and tryptophan; *Beilstein J. Org. Chem.* (2011), Vol.7, S. 518-524
63. Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts; *Protective Groups in organic Synthesis*, 2nd Edition, Jan Wiley and Sons, Inc., Hoboken (1991), S. 358
64. Turtaut F., Ouahrani-Bettache S., Montero J., Köhler S. Winum J.; Synthesis and biological evaluation of a new class of anti-brucella compounds targeting histidinol dehydrogenase: α -O-arylketones and α -S-arylketones derived from histidine, *Med. Chem. Commun.* (2011), Vol.2, S.995
65. Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts; *Protective Groups in organic Synthesis*, 2nd Edition, Jan Wiley and Sons, Inc., Hoboken (1991), S. 232
66. Philip J. Kocienski, *Protecting Groups* 3rd Edition, Thieme-Verlag, Stuttgart (2005), S.409
67. Jones J.H., Wood M.E.; *Synth. Commun.* (1986), Vol.16, S.1515–1516
68. Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts; *Protective Groups in organic Synthesis*, 2nd Edition, Jan Wiley and Sons, Inc., Hoboken (1991), S. 251
69. J. H. Jones , D. L. Rathbone, P. B. Wyatt, The Regiospecific Alkylation of Histidine Side Chains; *Synthesis* (1987), S.1110-1113
70. Bryan Vernal Jermaine, *Dissertation: Indium-mediated allylations in aqueous media: an expansion of the scope and a demonstration of the synthetic utility of the reaction*, McGill University Qubec (1999), S.50
71. P. Restani, P. Campagner, A. Fiecchi, P. Resmini, C.L. Galli, Identification of spinacine as the principal reaction product of γ -casein with formaldehyde in cheese, *Food Chem. Toxicol.* (1988), Vol.26, S.441-446
72. Shiraiwa Tadashi, Furukawa Tsuyoshi, Tsuchida Tamotsu, Sakata Shinji, Sunami m Michio, Kurokawa Hidemoto ; *Bull. Chem. Soc. Jpn* (1991), Vol.64,S.3729–3731
73. Ikeda Reiko, Iwaki Toshie, Iida Tomoko, Okabayashi Takasumi, Nishi Eishiro, Kurosawa Masaki, Sakai Norio, Konakahara Takeo ; 3-Benzylamino- β -carboline derivates induce apoptosis through G₂/M arrest in human carcinoma cells HeLa S-3; *Eur. J. Med. Chem.* (2011), Vol.46, S.636–646
74. Remelli Maurizio, Pulidori Fernando, Guerrini Remo, Bertolasi Valerio; Synthesis of spinacine and spinacine derivates: crystal and molecular structures of Nⁿ-hydroxymethyl spinacine and Nⁿ-methyl spinaceamine; *J. Chem. Crystallogr.* (1997), Vol.27, S.507–513
75. Patel R.P.; Price S.; Synthesis of Benzyl Esters of α -Amino Acids; *J. Org. Chem.* (1965) , Vol.30, S.3575-3576

76. Tracy Yuen Sze But, Patrick, H. Toy; The Mitsunobu Reaction: Origin, Mechanism, Improvements, and Applications; Chem. Asian J. (2007), Vol.2, S.1340-1355
77. Arnold Lee D., Drover John C. G., Vederas John C.; Conversion of Serine to Stereochemically Pure β -Substituted α -Amino Acids via β -Lactones, J. Am. Chem. Soc. (1985), Vol.107, S.7105-7109
78. Ratemi Elaref S.; Vederas, John C.; Reaction of trimethylsilylamines with *N*-Cbz-L-serine- β -lactone: A convenient rout to optically pure β -amino-L-alanine derivatives; Tetrahedron Lett. (1994), Vol.35, S.7605-7608
79. Marsault E., Fraser G., Benakli K., St-Louis C., Rouillard A., Thomas H.; Macrocyclic antagonists of the motilin receptor for treatment of gastrointestinal dysmotility disorders, WO 2008033328, S.88f

5 ANHANG

Zusammenfassung:

Für die Herstellung von peptidischen MC1-Rezeptoragonisten wurde der Zugang zu Derivaten und Isomeren des L-Histidins geprüft. Die Bildung des L-Histidinmethylesters als auch des L-Histidinsbenzylesters war erfolgreich. Hingegen war die Einführung der Z-Schutzgruppe, als auch der Phthalylschutzgruppe am L-Histidin nicht möglich. Trotzdem konnte ein Phthalylschutz am Histidinbenzylester erfolgreich durchgeführt werden. Die anschließende Acylierung am Imidazolring durch Essigsäureanhydrid und Pivalinsäureanhydrid führte zu keiner Umsetzung. Während die Verwendung von Acetylchlorid und Pivalinsäurechlorid auch nicht zur Produktbildung führten, war die Acylierung durch 3,3-Dimethylbuttersäurechlorid hingegen erfolgreich. Bei der Synthese von Spinacin wurde zwar Produkt erhalten, jedoch war eine Auftrennung des Rohproduktes nicht möglich. Ausgehend von L-Serin wurde Z-L-Serin erfolgreich hergestellt. Auch die Umsetzung zum Z-L-Serin- β -Lacton war möglich. Die Ringöffnung und Bildung von Histidinisomeren war nicht von Erfolg gekennzeichnet.

Abstract:

To produce a peptide melanocortine-1-receptor agonist, the access of derivatives and isomers of L-Histidine was tested. The synthesis of L-Histidine methyl ester and L-Histidine benzyl ester was successful. The introduction of the Z- and phthaloyl protecting group to L-Histidine was not possible. The phthaloyl protection of the Histidine benzyl ester could be performed. The following acylation of the imidazole ring was not possible by using acetic anhydride and pivalic anhydride. Also the use of acetyl chloride and pivalic acid chloride didn't lead to generation of product. However the use of 3,3-dimethylbutyric acid chloride was successful. The synthesis of spinacine lead to a raw product, the separation was impossible. The conversation of L-Serine to Z-L-Serine could be performed just as the generation of the Z-L-Serine- β -Lactone. The opening of the lactone ring to get a histidine isomer could not be achieved.

Lebenslauf:

Zur Person

Name: Philipp Wagner

Geboren am: 22.07.1990 in Zwettl (NÖ)

Schulische und universitäre Ausbildung

seit 2010: Studium der Pharmazie an der Uni Wien

2000-2009: BG/BRG Zwettl

1996-2000: Volksschule Kirchbach

Berufserfahrung

2006, 2008 Privatbrauerei Zwettl Karl Schwarz GmbH
Ferialpraktikum

2008 Niederösterreichische Nachrichten
Ferialpraktikum

2009-2010: Grundwehrdienst und Dienst als Zeitsoldat beim
Österreichischen Bundesheer

2011, 2012, 2013 Österreichische Post AG
Ferialpraktikum

2012 NUA-Umweltanalytik GmbH
Ferialpraktikum