

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Oktober 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/087656 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07D 207/16**,
211/34, A61K 31/401, 31/4025, 31/445, A61P 43/00,
C07C 229/16, 229/76

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/003003

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. März 2004 (20.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 16 824.9 3. April 2003 (03.04.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT**
[DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder: **LEHMANN, Lutz**; Bornemannstrasse 6,
13357 Berlin (DE). **FRIEBE, Matthias**; Räuschstrasse 8,
13509 Berlin (DE). **BRUMBY, Thomas**; Lepsiusstrasse
60, 12163 Berlin (DE). **SÜLZLE, Detlev**; Scheinerweg
4, 10589 Berlin (DE). **PLATZEK, Johannes**; Grottkauer
Strasse 55, 12621 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

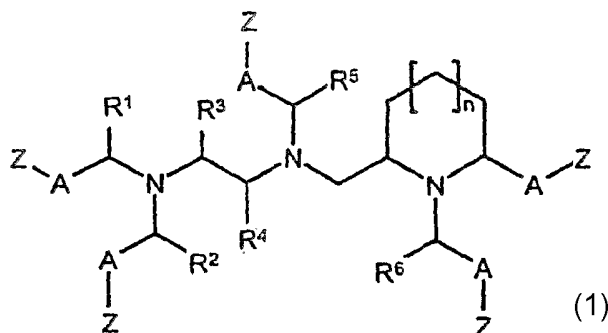
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CONJUGATES OF 2,4-ETHANO-BRIDGED AND 2,4-PROPANO-BRIDGED 3,6,9-TRIAZA-NONANOIC ACID, ³N, ⁶N, ⁹N-TETRAETHANOIC ACID, AND CORRESPONDING PHOSPHORIC ACID METHYLENE DERIVATIVES AND THE SUBSTITUTION PRODUCTS THEREOF WITH BIOMOLECULES, METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF, AND THE USE OF THE SAME FOR PRODU

(54) Bezeichnung: KONJUGATE 2,4-ETHANO- UND 2,4-PROPANO-ÜBERBRÜCKTER 3,6,9-TRIAZA-NONANSÄURE-³N, ⁶N, ⁹N-TETRAESSIGSÄURE- UND ENTSPRECHENDER PHOSPHORSÄUREMETHYLEN-DERIVATE UND DEREN ABKÖMMLINGE MIT BIOMOLEKÜLEN, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG ZUR HERSTELLUNG



(57) Abstract: The invention relates to conjugates of 2,4-ethano-bridged and 2,4-propano-bridged 3,6,9-triaza-nonanoic acid, N,N,N-tetraethanoic acid, and corresponding phosphoric acid ester methylene derivatives of formula (1) - wherein the substituents are defined as cited in patent claim 1 - and the substitution products thereof with biomolecules. The invention also relates to methods for producing said conjugates and to the use of the same as contrasting media in NMR diagnosis and radiodiagnosis, and for radiotherapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Konjugate 2,4-Ethano- und 2,4-Propano- überbrückter 3,6,9-Triaza-no-

nansäure-N,N,N-tetraessigsäure- und entsprechender phosphorsäureestermethylen-Derivate der Formel (1) und deren Abkömmlinge mit Biomolekülen, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung als Kontrastmittel in der NMR- und Radiagnostik sowie für die Radiotherapie, wohin die Substituenten wie in Anspruch 1 definiert sind.

WO 2004/087656 A1

Konjugate 2,4-Ethano- und 2,4-Propano- überbrückter 3,6,9-Triaza-nonansäure-³N,⁶N,^{9,9}N-tetraessigsäure- und entsprechender phosphorsäuremethylen-Derivate und deren Abkömmlinge mit Biomolekülen, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung zur Herstellung pharmazeutischer Mittel

Die Erfindung betrifft die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstände, das heißt, Konjugate 2,4-Ethano- und 2,4-Propano- überbrückter 3,6,9-Triaza-
10 nonansäure-³N,⁶N,^{9,9}N-tetraessigsäure- und entsprechender phosphorsäuremethylen-Derivate und deren Abkömmlinge mit Biomolekülen, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung zur Herstellung pharmazeutischer Mittel für die Radiodiagnostik, Radiotherapie oder NMR-Diagnostik.

15 Die Anwendung von Radiopharmaka für diagnostische und therapeutische Zwecke ist seit langem im Bereich der biologischen und medizinischen Forschung bekannt. Insbesondere werden Radiopharmaka dazu benutzt, um bestimmte Strukturen wie beispielsweise das Skelett, Organe oder Gewebe darzustellen. Die diagnostische Anwendung setzt den Gebrauch solcher radioaktiver Mittel voraus, die sich nach
20 Applikation spezifisch in den Strukturen im Patienten anreichern, die untersucht werden sollen. Diese sich lokal anreichernden radioaktiven Mittel können dann mittels geeigneter Detektoren, wie beispielsweise Szintillationskameras oder anderer geeigneter Aufnahmeverfahren, aufgespürt, aufgenommen oder szintigraphiert werden. Die Verteilung und relative Intensität des detektierten radioaktiven Mittels kennzeichnet
25 den Ort einer Struktur, in dem sich das radioaktive Mittel befindet, und kann die Anwesenheit von Anomalien in Strukturen und Funktionen, pathologische Veränderungen etc. darstellen.

In ähnlicher Weise können Radiopharmaka als therapeutische Mittel dem Patienten
30 verabreicht werden, um bestimmte krankhafte Gewebe oder Bereiche zu bestrahlen. Solche Behandlung erfordert die Bereitstellung radioaktiver therapeutischer Mittel, die sich in bestimmten Strukturen, Organen oder Geweben anreichern. Ein von der Firma IDEC Pharmaceuticals Corp. entwickeltes Radiopharmakon zur Therapie des non-Hodgkin-Lymphoms stellt Zevalin® dar (s. z.B. *Cancer* (2002) Feb 15; 94, (4
35 Suppl):1349-57). Strahlendes Ion sind hierbei ¹¹¹In oder ⁹⁰Y, die über einen

-2-

Chelator (Methylsubstituiertes-Diethylen-Triamin-Penta-Essigsäure-Derivat (mx-DTPA) an einen Tumor-spezifischen Antikörper gebunden sind.

5 Die kernmagnetische Resonanz (NMR oder MRI) ist heute eine breit angewandte, für die *in vivo*-Bildgebung ausgenutzte Methode der medizinischen Diagnostik, mit der über die Messung der magnetischen Eigenschaften der Protonen im Körperwasser, Körpergefäße und Körpergewebe (einschließlich Tumore) dargestellt werden können. Es werden hierzu z.B. Kontrastmittel eingesetzt, die durch Beeinflussung bestimmter
10 NMR-Parameter der Körperprotonen (z.B. der Relaxationszeiten T^1 und T^2) eine Kontrastverstärkung in den resultierenden Bildern bewirken bzw. diese Bilder erst lesbar machen. Vor allem kommen Komplexe paramagnetischer Ionen, wie z.B. Gadolinium-enhaltende Komplexe (z.B. Magnevist®) aufgrund des Effekts der paramagnetischen Ionen auf die Verkürzung der Relaxationszeiten zur Anwendung.

15

Sowohl paramagnetische Ionen, wie z.B.: Gd^{3+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} und Cu^{2+} als auch viele metallische Radionuklide können nicht in freier Form als Lösungen verabreicht werden, da sie hoch toxisch sind. Um diese Ionen für eine *in vivo*-Anwendung geeignet zu machen, werden sie in der Regel komplexiert. Beispielsweise wird in der EP-A-0 071
20 564 u.a. das Megluminsalz des Gadolinium(III)-Komplexes der Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) als Kontrastmittel für die NMR-Tomographie beschrieben. Ein Präparat, das diesen Komplex enthält, wurde unter dem Namen Magnevist® weltweit als erstes NMR-Kontrastmittel zugelassen. Dieses Kontrastmittel verteilt sich nach intravenöser Applikation extrazellulär und wird durch glomeruläre
25 Sekretion renal ausgeschieden. Eine Passage intakter Zellmembranen wird praktisch nicht beobachtet. Magnevist® ist besonders gut für die Darstellung pathologischer Bereiche (z.B. Entzündungen, Tumore) geeignet.

Die bekannten Radiotherapeutika und Kontrastmittel sind jedoch nicht für alle
30 Anwendungsfälle befriedigend einzusetzen. So verteilen sich viele dieser Mittel im gesamten extrazellulären Raum des Körpers. Um die Effizienz dieser Mittel in der *in vivo*-Diagnostik und der Therapie zu steigern, wird versucht, deren Spezifität und Selektivität beispielsweise zu Targetzellen oder gewünschten Bereichen und Strukturen des Körpers zu erhöhen. Eine Verbesserung dieser Eigenschaften ist beispielsweise
35 durch Kopplung der Metallkomplexe an Biomoleküle nach dem "Drug-Targeting"-

-3-

Prinzip zu erreichen. Als Biomoleküle bieten sich Plasmaproteine, Antikörper, deren Fragmente, Hormone, Wachstumsfaktoren und Substrate von Rezeptoren und Enzymen an (z.B. WO 97/12850, Institut für Diagnostikforschung an der FU Berlin). Doch bislang ist z.B. die Tumorspezifität (Tumoranreicherung) in vielen Fällen noch
5 nicht ausreichend hoch, was besonders bei der Radioimmuntherapie ein wichtiges Ziel ist.

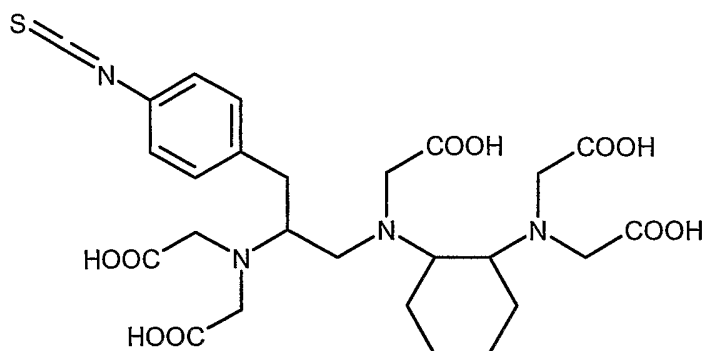
Es ist weiterhin wünschenswert, Mittel für die Diagnostik und Therapie zur Verfügung zu stellen, die neben einer möglichst hohen Zielspezifität eine große *in vivo*-Stabilität
10 hinsichtlich der zumeist toxischen komplexierten Metallionen besitzen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, neue Mittel für die Radio- und NMR-Diagnostik sowie die Radiotherapie zur Verfügung zu stellen, die die genannten Nachteile nicht aufweisen und insbesondere eine hohe *in vivo*-Stabilität, gute
15 Verträglichkeit und vor allem organspezifische Eigenschaften aufweisen. Einerseits soll die Retention in den zu untersuchenden Tumorgeweben oder Organen ausreichend sein, um bei möglichst geringer Dosierung die für eine effiziente Diagnose und Therapie notwendige Qualität von Bildern bzw. ausreichende Bestrahlung zu erzielen. Andererseits aber soll anschließend eine möglichst schnelle und weitestgehend
20 vollständige Ausscheidung der Metalle aus dem Körper gewährleistet sein. Ferner sollen die NMR-Kontrastmittel eine hohe Protonen-Relaxivität zeigen und damit bei einer Steigerung der Signalintensität eine Reduzierung der Dosis erlauben.

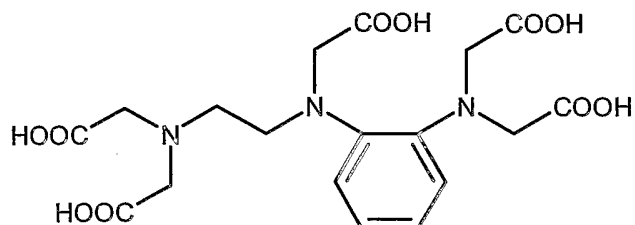
Es wurden verschiedene Versuche unternommen, Metallionen mit diagnostischem oder
25 therapeutischem Nutzen zu komplexieren und somit in eine nicht-toxische Form zu überführen. Dabei haben sich zyklische und azyklische Polyaminocarbonsäuren als geeignete Chelatoren erwiesen.

Das oben genannte und von der Firma IDEC Pharmaceuticals Corp. entwickelte Radiopharmakon Zevalin® zur Therapie des non-Hodgkin-Lymphoms nutzt ein DTPA-
30 Derivat, welches an zwei definierten Positionen substituiert ist.

In dem Patent US 528650 wird eine DTPA beschrieben, bei der einer der beiden Ethylenreste Bestandteil eines Cyclohexanringes ist.



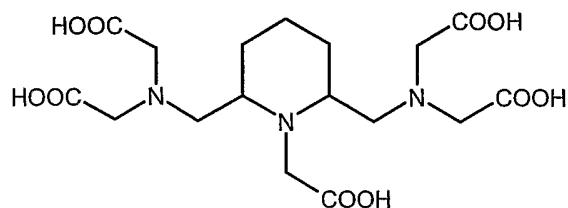
- 5 In dem Patent US 4880008 wird ein weiterer Typ der DTPA beschrieben, bei dem der Cyclohexanring durch einen Benzolring ersetzt wird. In diesem Patent wird auch die Dibenzo-DTPA als für das MR-Imaging geeignete Verbindung genannt.



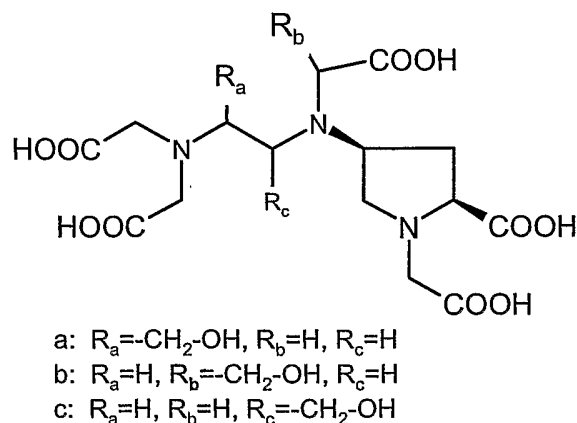
10

In dem Europäischen Patent EP 250350 wird nicht ein carbocyclischer, sondern ein Pipe-razinring als Strukturelement der DTPA verwendet, wobei der *mittlere* Stickstoff Teil dieses Ringes ist.

15



In *J. Org. Chem.* (**2000**), 65, 4048-57 beschreiben Pickersqill und Rapoport einen weiteren DTPA-Typ, bei dem eine der beiden Ethylengruppen Bestandteil eines 3-Amino-pyrrolidins ist.



5

Obwohl die modifizierten DTPA's mitunter verbesserte Eigenschaften - z.B. erhöhte Komplexstabilität verglichen mit der unsubstituierten DTPA - zeigen, besteht unverändert ein Bedarf, die Metallkomplexstabilität weiter zu erhöhen und Mittel für die Diagnose und die Therapie zur Verfügung zu stellen, die eine möglichst hohe Spezifität aufweisen.

10

Es wurde nun gefunden, dass überraschenderweise DTPA-Derivate, bei denen eine Ethano- bzw. Propanobrücke über einen der beiden äußeren Stickstoffe hinweg verknüpft ist, so dass 2,5-substituierte Pyrrolidine bzw. 2,6- substituierte Piperidine entstehen, eine größere kinetische Stabilität *in vivo* und somit geringere akute Toxizität der entsprechenden Metallkomplexe aufweisen.

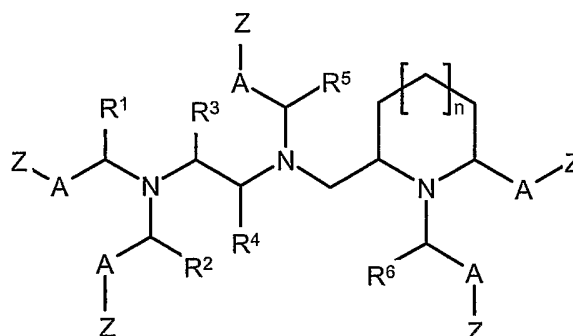
15

Weiterhin ist auch erstaunlich, dass durch die strukturelle Veränderung keine Verringerung der thermodynamischen Stabilität erfolgt. Darüber hinaus zeigen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine erhöhte Relaxivität und/oder Wasserlöslichkeit und/oder Spezifität, so dass sie sich als pharmazeutische Mittel insbesondere für die Radio- und NMR-Diagnostik sowie Radiotherapie eignen.

20

Die Erfindung betrifft somit Konjugate der allgemeinen Formel I

-6-



I

5 worin

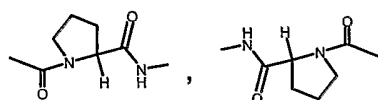
Z für ein Wasserstoffatom oder ein Metallionenäquivalent eines Elements der Ordnungszahlen 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 oder 83 steht,

A für eine Gruppe -COO-, eine Gruppe -P(O)(OC₁-C₆-alkyl)-O- oder
10 eine Gruppe -P(O)(OH)-O- steht,

n für die Ziffern 0 oder 1 steht,

R¹ - R⁶ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, einen geradkettigen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten und gegebenenfalls durch ein bis sechs O-Atome, Phenyl-, -NHCO-, -CONH-, -O-(CO)-

15



und/oder -NH-(C=S)-NH-Gruppen unterbrochenen C₁ - C₂₅ -Alkylrest, der
20 gegebenenfalls an einer beliebigen Stelle mit ein bis sechs Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen, Aminogruppen und/oder einer anderen funktionellen bindenden Gruppe, die mit einem Biomolekül verknüpft sein kann, substituiert ist, oder für eine Phenyl-C₁-C₂₅-alkylgruppe stehen, deren Phenylrest gegebenenfalls mit einer Nitrogruppe, einer Aminogruppe oder einer anderen funktionellen bindenden Gruppe,
25 die mit einem Biomolekül verknüpft sein kann, substituiert ist, sowie deren Salze mit organischen oder anorganischen Basen, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten R¹-R⁶ nicht für H steht und dass mindestens einer der Substituenten R¹-

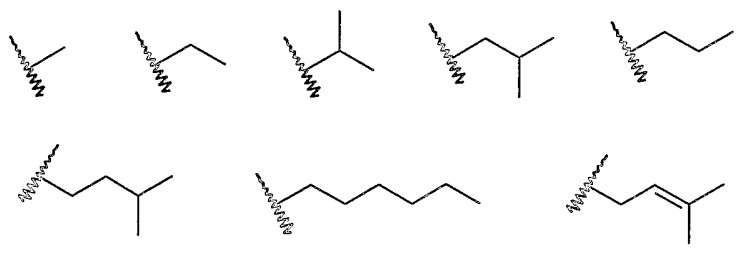
R⁶ ein über eine funktionelle Gruppe verknüpftes Biomolekül enthält und mindestens zwei Z für ein Metallionenäquivalent stehen.

Der Carboazaring ist vorzugsweise *cis*-verknüpft.

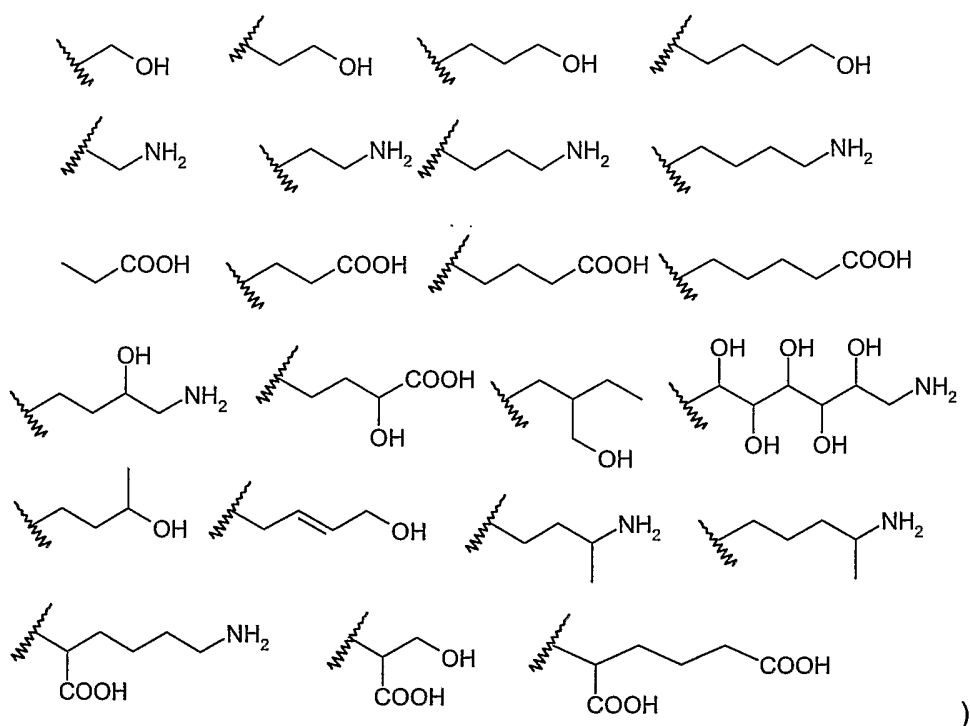
- 5 Wenn in der erfindungsgemäßen Verbindung Phosphorsäureester zum Einsatz kommen (-P(O)-(O-C₁-C₆)-alkyl-O—), so steht Alkyl bevorzugt für Ethyl.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen enthalten mindestens drei Chiralitätszentren. Auch wenn in der Beschreibung und den Ansprüchen nicht zwischen den verschiedenen Enantiomeren unterschieden wird, umfassen die genannten Verbindungen immer beide Enantiomeren und bei Vorliegen mehrerer Stereozentren auch alle möglichen Diastereomeren sowie deren Mischungen.

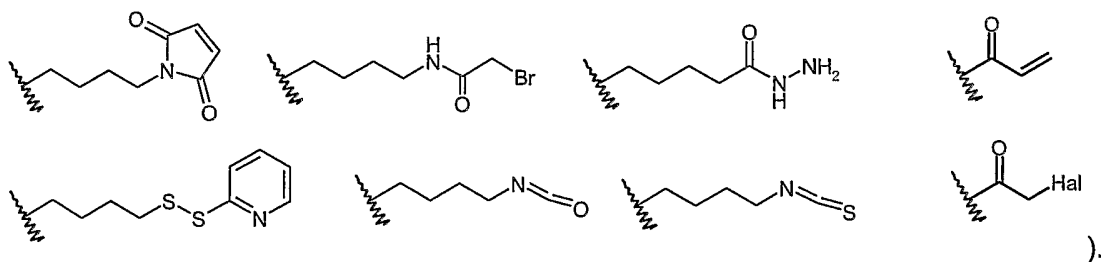
- Die Reste R¹ - R⁶ können unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom oder
15 einen Alkylrest mit 1 - 25 Kohlenstoffatomen stehen (wobei mindestens einer der Reste
ein über eine funktionelle Gruppe gebundenes Biomolekül enthält). Dieser Alkylrest
kann geradkettig oder verzweigt, gesättigt oder ungesättigt sein (z.B.:



- 20 und ist gegebenenfalls an einer beliebigen Stelle mit ein bis sechs Carboxyl-, Hydroxyl-,
und/oder Aminogruppen (z.B.:

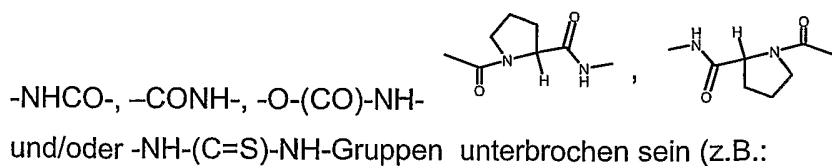


oder mindestens einer anderen funktionellen bindenden Gruppe versehen, die mit einem Biomolekül verknüpft sein kann - wie z.B. Carboxyl, aktiviertem Carboxyl, Amino, Nitro, Isocyanat, Isothiocyanat, Hydrazin, Semicarbazid, Thiosemicarbazid, Chloracetamid, Bromacetamid, Iodacetamid, Acryl, Acylamino, gemischten Anhydriden, Azid, Säurechlorid, Hydroxid, Sulfonylchlorid, Vinylsulphon, Carbodiimid, Maleimid, Dioxo oder einer anderen funktionellen bindenden Gruppe (z.B.

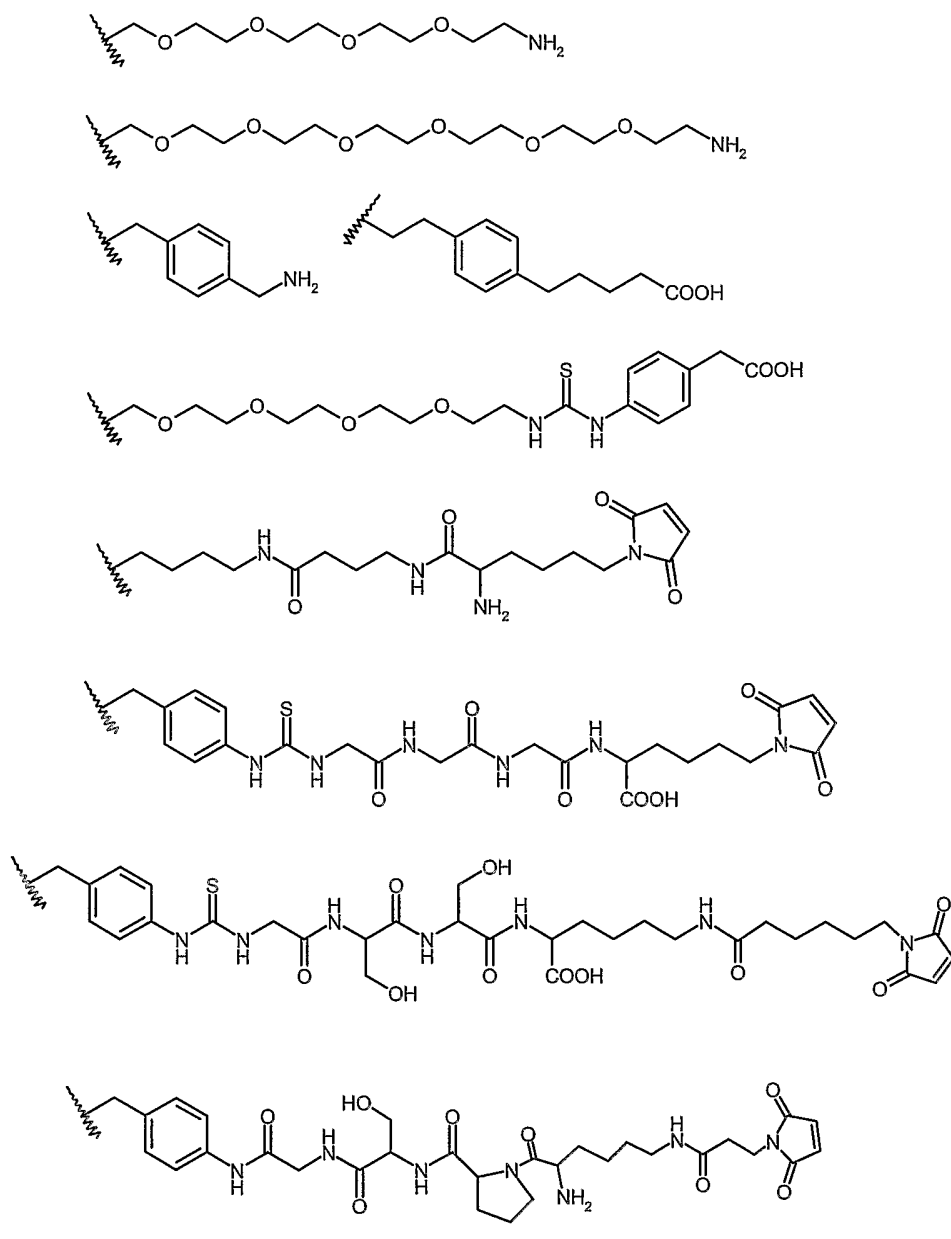


10

Der C₁ – C₂₅ Alkylrest kann gegebenenfalls durch ein bis sechs O-Atome, Phenylen-,

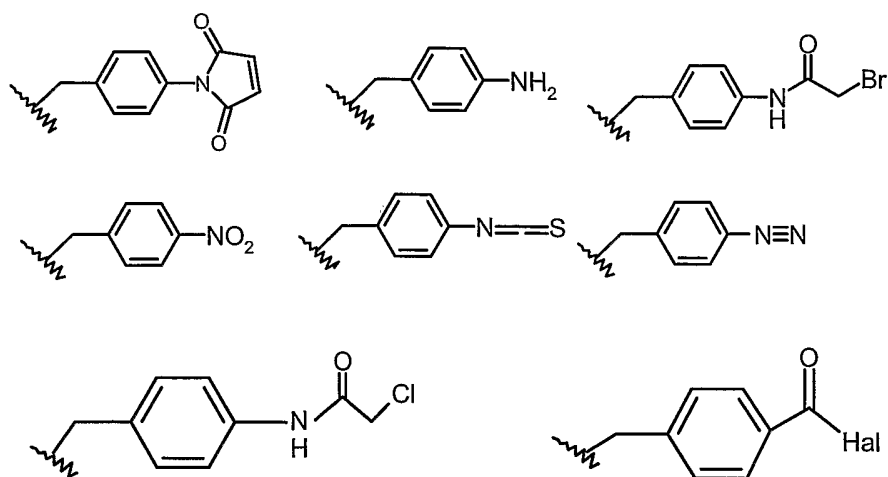


-9-



R¹-R⁶ kann auch für eine Phenyl-C₁-C₂₅-aralkylgruppe stehen, deren Phenylrest z.B. mit Carboxyl, aktiviertem Carboxyl, Amino, Nitro, Isocyanat, Isothiocyanat, Hydrazin, Semicarbazid, Thiosemicarbazid, Chloracetamid, Bromacetamid, Iodacetamid, Acryl, Acylamino, gemischten Anhydriden, Azid, Hydroxid, Sulfonylchlorid, Vinylsulphon, Carbodiimid, einem Maleimid, Diazo (z.B.:

-10-



)

oder einer anderen funktionellen bindenden Gruppen substituiert sein kann über die ein Biomolekül verknüpft ist..

- 5 Die Ethylenbrücke, die die Substituenten R^3 und R^4 trägt, kann unsubstituiert sein ($R^3=H$ und $R^4=H$). Wenn sie aber substituiert ist, dann kommen vorzugsweise Methyl-, Ethyl-, Benzyl-, Nitrobenzyl-, Hydroxymethyl- oder Aminobenzylgruppen in Betracht.

- 10 Eine Vielzahl der oben genannten R^1 - R^6 -Substituenten gestattet eine selektive Umsetzung mit funktionellen Gruppen der Biomoleküle im optimalen pH-Bereich, beispielsweise die Addition an -SH-Gruppen (Cystein im Biomolekül), und zwar ausschließlich von -SH-Gruppen, z.B. an Maleimide ((2,5-Dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-Verbindungen, s.o.) oder Bromacetamide, wenn die Kopplung im schwach sauren pH-Bereich stattfindet.

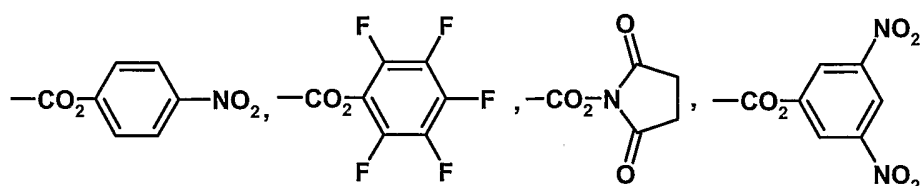
15

Unter aktivierter Carboxylgruppe werden vorstehend solche Carboxylgruppen verstanden, die so derivatisiert sind, daß sie die Reaktion mit einem Biomolekül erleichtern. Welche Gruppen zur Aktivierung verwendet werden können, ist bekannt und es kann beispielsweise auf M. und A. Bodanszky, "The Practice of Peptide

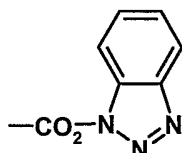
20 Synthesis", Springer-Verlag 1984 verwiesen werden. Beispiele sind Adukte der Carbonsäure mit Carbodiimiden oder aktivierter Ester wie z.B. Hydroxybenzotriazolester. Besonders bevorzugt wird die aktivierte Carboxylgruppe ausgewählt aus

25

-11-

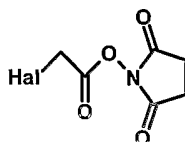


und



Die aktivierten Ester der vorstehend beschriebenen Verbindungen werden wie dem
 5 Fachmann bekannt hergestellt. Für den Fall von Isothiocyanaten oder α -Halogen-
 acetaten werden die entsprechenden terminalen Aminvorstufen nach
 literaturbekannten Methoden mit Thiophosgen oder 2-Halo-Essigsäure-Halogeniden
 umgesetzt. Auch die Umsetzung mit entsprechend derivatisierten Estern von N-
 Hydroxysuccinimid wie beispielsweise:

10



ist möglich (Hal = Halogen).

Allgemein können für diesen Zweck alle üblichen Aktivierungsmethoden für
 15 Carbonsäuren verwendet werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Enthalten die
 R^1 - R^6 -Substituenten eine Amidgruppe, so wird diese beispielsweise hergestellt, indem
 eine aktivierte Carbonsäure mit einem Amin umgesetzt wird. Die Aktivierung der
 Carbonsäure erfolgt nach den üblichen Methoden. Beispiele für geeignete
 Aktivierungsreagentien sind Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 1-Ethyl-3-(3-
 20 dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC), Benzotriazol-1-
 yloxytris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) und O-(Benzotriazol-
 1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), vorzugsweise DCC. Auch
 der Zusatz von O-nukleophilen Katalysatoren, wie z.B. N-Hydroxysuccinimid (NHS)
 oder N-Hydroxybenzotriazol ist möglich.

25

Handelt es sich beim Substituenten um eine Carbonsäurefunktion, so kann diese in geschützter Form (z.B. in Form des Benzylesters) eingesetzt werden, die Abspaltung der Schutzgruppe kann dann hydrogenolytisch erfolgen.

- 5 Um diese Carbonsäurefunktion an eine geeignete funktionelle Gruppe eines geeigneten Biomoleküls (zur Beschreibung von Biomolekülen: s.u.) zu knüpfen, sollte diese im Regelfall zunächst aktiviert werden. Bevorzugt werden dazu aktivierte Ester intermediär erzeugt, welche dann von einer nukleophilen Gruppe des Biomoleküls angegriffen werden. Auf diese Weise entsteht eine kovalente Verknüpfung zwischen
- 10 dem Biomolekül und der Verbindung der Formel I. Bevorzugte aktivierte Ester sind die Ester des N-Hydroxysuccinimids, die Ester des Paranitrophenols oder die Ester des Pentafluorphenols. Soll die funktionelle Gruppe in Form eines Isothiocyanats an das Biomolekül geknüpft werden, so wird bevorzugt zunächst ein terminales Amin verwendet, welches, wenn notwendig, mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen
- 15 sein kann. Geeignete Schutzgruppen sind aus der Peptidchemie bekannt. Nach Abspaltung der Schutzgruppe kann durch Umsetzung des primären terminalen Amins mit Thiophosgen das Isothiocyanat erzeugt werden. An dieses können nukleophile Gruppen des Biomoleküls addiert werden.
- 20 In einer Ausführungsform stellt die funktionelle Gruppe ein Maleinimid dar, welches z.B. selektiv mit Thiofunktionen des Biomoleküls reagieren kann.

In einer anderen Ausführungsform ist die funktionelle Gruppe ein Nukleophil (NH_2 , SH), welches an einer geeigneten Funktionalität des Biomoleküls angreift (aktivierter Ester,

25 Maleinimid, etc.). Zahlreiche mit Maleinimiden funktionalisierte Biomoleküle sind kommerziell erhältlich.

Die Synthese der Konjugate erfolgt in der Regel derart, dass zunächst ein derivatisierter und funktionalisierter Ligand oder Chelatkomplex erzeugt wird, welcher

30 dann an das Biomolekül geknüpft wird. Es ist aber auch möglich, daß im Falle der Verwendung von synthetisch hergestellten Biomolekülen der erfindungsgemäße Ligand oder Chelatkomplex während der Synthese des Biomoleküls in dieses eingebaut wird. Dies kann beispielsweise während der sequentiellen Synthese von Oligopeptiden am Syntheseroboter erfolgen. Falls erforderlich, können dazu die in der Synthese des

35 entsprechenden Biomoleküls üblichen Schutzgruppen in die erfindungsgemäße

Verbindung eingeführt werden. Diese werden dann im Zuge der üblichen Synthesealgorithmen am Synthesizer wieder abgespalten.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen enthalten mindestens drei Chiralitätszentren.
5 Auch wenn in der Beschreibung und den Ansprüchen nicht zwischen den verschiedenen Enantiomeren unterschieden wird, umfassen die genannten Verbindungen immer beide Enantiomeren und bei Vorliegen mehrerer Stereozentren auch alle möglichen Diastereomeren sowie deren Mischungen.

- 10 Unter "Biomolekül" wird vorliegend jedes Molekül verstanden, das entweder natürlich beispielsweise im Körper auftritt oder mit analoger Struktur synthetisch hergestellt wurde. Darüber hinaus werden hierunter solche Moleküle verstanden, die mit einem biologisch, beispielsweise im Körper auftretenden Molekül oder einer dort auftretenden Struktur in Wechselwirkung treten können, so daß sich beispielsweise die Konjugate an
15 bestimmten, gewünschten Stellen des Körpers anreichern. Unter "Körper" wird vorliegend jeder pflanzliche oder tierische Körper verstanden, wobei tierische und insbesondere menschliche Körper bevorzugt sind.

- Biomoleküle sind insbesondere die in Lebewesen auftretenden Moleküle, die als
20 Produkte einer evolutionären Selektion durch geordnetes und komplexes Zusammenwirken spezifische Aufgaben für den Organismus erfüllen und die Grundlage seiner Lebensfunktionen (Stoff- und Formwechsel, Fortpflanzung, Energiehaushalt) ausmachen. In Biomolekülen sind zumeist aus einfachen Bausteinen (Aminosäuren, Nucleobasen, Monosacchariden, Fettsäuren, etc.) größere Moleküle
25 (Proteine, Nucleinsäuren, Polysaccharide, Lipide, etc.) aufgebaut. Entsprechende Makromoleküle werden auch als Biopolymere bezeichnet.

- Vorteilhaft kann das Biomolekül beispielsweise ein Polypeptidgerüst aus Aminosäuren mit Seitenketten aufweisen, die mit der reaktiven Gruppe der Verbindungen der Formel
30 I' (s. weiter unten) eine Reaktion eingehen können. Solche Seitenketten schließen beispielsweise die Carboxylgruppen von Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten, die Aminogruppen von Lysinresten, die aromatischen Gruppen von Tyrosin- und Histidinresten und die Sulphydrylgruppen von Cysteinresten ein.

Eine Übersicht über Biomoleküle mit zahlreichen Beispielen findet sich in dem Skriptum "Chemie der Biomoleküle" der TU-Graz (H. Berthold et al., Institut für Organische Chemie, TU-Graz, 2001), das auch über das Internet unter www.orgc.tu-graz.ac.at eingesehen werden kann. Der Inhalt dieses Dokuments wird durch Bezugnahme in die
5 vorliegende Beschreibung aufgenommen.

Zur Bildung der erfindungsgemäßen Konjugate sind folgende Biomoleküle besonders geeignet:

Biopolymere, Proteine, wie Proteine, die eine biologische Funktion haben, HSA, BSA,
10 etc., Proteine und Peptide, die sich an bestimmten Stellen im Organismus anreichern (z.B. an Rezeptoren, Zellmembranen, Kanälen etc.), durch Proteasen spaltbare Peptide, Peptide mit synthetischen Sollbruchstellen (z.B. labile Ester, Amide etc.), Peptide, die durch Metalloproteasen gespalten werden, Peptide mit photospaltbaren Linkern, Peptide mit oxydativen Mitteln (Oxydasen) spaltbaren Gruppen, Peptide mit
15 natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren, Glycoproteine (Glycopeptide), Signal-Proteine, antivirale Proteine und Apoptosis, synthetisch modifizierte Biopolymere, wie mit Linkern derivatisierte Biopolymere, modifizierte Metalloproteasen und derivatisierte Oxydase etc., Kohlenhydrate (Mono- bis Polysaccharide), wie derivatisierte Zucker, im Organismus spaltbare Zucker, Cyclodextrine und dessen Derivate, Aminozyucker,
20 Chitosan, Polysulfate und Acetylneuraminsäure-Derivate, Antikörper, wie monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente, polyklonale Antikörper, Minibodies, Single Chains (auch solche, die mit Linkern zu mehrfachen Fragmenten verknüpft sind), rote Blutkörperchen und andere Blutbestandteile, Cancermarker (z.B. CAA) und Zell-Adhäsions-Stoffe (z.B. Lewis X und Anti-Lewis X-Derivate), DNA und RNA Fragmente,
25 wie derivatisierte DNAs und RNAs (z.B. solche, die durch das SELEX-Verfahren gefunden wurden), synthetische RNA und DNA (auch mit unnatürlichen Basen), PNAs (Hoechst) und Antisense, β -Aminosäuren (Seebach), Vektoramine zur Einschleusung in die Zelle, biogene Amine, Pharmazeutika, onkologische Präparate, synthetische Polymere, die auf ein biologisches Target (z.B. Rezeptor) gerichtet sind, Steroide
30 (natürliche und modifizierte), Prostaglandine, Taxol und dessen Derivate, Endotheline, Alkaloide, Folsäure und deren Derivate, bioaktive Lipide, Fette, Fettsäureester, synthetisch modifizierte Mono-, Di- und Triglyceride, Liposome, die an der Oberfläche derivatisiert sind, Micellen aus natürlichen Fettsäuren oder aus Perfluoralkyl-Verbindungen, Porphyrine, Texaphrine, erweiterte Porphyrine, Cytochrome, Inhibitoren,
35 Neuramidasen, Neuropeptide, Immunomodulatoren, wie FK 506, CAPE und Gliotoxin,

- Endoglycosidasen, Substrate, die durch Enzyme aktiviert werden wie Calmodulin Kinase, Casein-Kinase II, Gluthathion-S-Transferase, Heparinase, Matrix-Metalloproteinasen, β -Insulin-Rezeptor-Kinase, UDP-Galactose 4-Epimerase, Fucosidasen, G-Proteine, Galactosidasen, Glycosidasen, Glycosyltransferasen und
- 5 Xylosidase, Antibiotika, Vitamin und Vitamin-Analoga, Hormone, DNA-Interkalatoren, Nucleoside, Nucleotide, Lektine, Vitamin B12, Lewis-X und Verwandte, Psoralene, Dientrienantibiotika, Carbacycline, VEGF (vascular endothelial growth factor), Somatostatin und dessen Derivate, Biotin-Derivate, Antihormone, tumorspezifische Proteine und Synthetika, Polymere, die sich in sauren oder basischen Bereichen des
- 10 Körpers anreichern (pH-gesteuerte Verteilung), Myoglobine, Apomyoglobine etc., Neurotransmitter-Peptide, Tumornecrosefaktoren, Peptide, die sich in entzündetem Gewebe anreichern, Bloodpool-Reagenzien, Anionen und Kationen-Transporterproteine, Polyester (z.B. der Milchsäure), Polyamide und Polyphosphate.
- 15 Die meisten der vorgenannten Biomoleküle sind kommerziell beispielsweise bei Merck, Alderich, Sigma, Calbiochem oder Bachem erhältlich.

Außerdem können als Biomoleküle alle in der WO 96/23526 und der WO 01/08712 offenbarten "Plasmaproteinbindungsgruppen" bzw. "Zielbindungsgruppen" eingesetzt

20 werden. Der Inhalt dieser beiden Offenlegungsschriften wird daher durch Bezugnahme in die vorliegende Beschreibung aufgenommen.

Es können auch mehrere (z.B. 2 bis 12) Metallchelate an ein einziges Biomolekül (falls dieses mehrere reaktive Gruppen hat) gebunden sein.

25

Ferner eignen sich die Verbindungen der Formel I zur Konjugation an all diejenigen Moleküle, welche im Stand der Technik mit Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt werden, um beispielsweise ihre Lokalisation durch Epifluoreszenzmikroskopie innerhalb der Zelle zu bestimmen. Auch können die Verbindungen mit prinzipiell beliebigen

30 Medikamenten konjugiert werden, um dann nach Verabreichung des Medikaments den Transport innerhalb des Organismus durch die NMR-Technik zu verfolgen. Ferner ist es möglich, daß die erfindungsgemäßen Konjugate aus den Verbindungen der Formel I und den Biomolekülen weitere zusätzliche Moleküle enthalten, die an die Biomoleküle konjugiert worden sind. Mit dem Begriff "Biomolekül" im Sinne der Erfindung sind also

alle Moleküle umfasst, die in biologischen Systemen vorkommen und alle Moleküle, die biokompatibel sind (s. auch oben).

Die Relaxivität der erfindungsgemäßen Komplexe und insbesondere deren Konjugate mit Biomolekülen ist so hoch, dass sie sich, wenn sie ein paramagnetisches Ion enthalten, besonders gut für die NMR-Diagnostik eignen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen binden überraschenderweise an Proteine. Diese Eigenschaft ermöglicht es ihnen, gebunden an Plmaproteine, länger im Blutstrom zu verweilen und so eine Darstellung des Vasalraumes zu ermöglichen. Darüber hinaus wird auch eine Darstellung von Stellen erhöhter Permeabilität, wie sie beispielsweise in Tumoren zu finden ist, möglich. Diese erhöhte Gefäßpermeabilität ist weiterhin Grundlage der Tumorthherapie mit radioaktiven Metallkomplexen. Das Pharmakon verlässt innerhalb des Tumors das Gefäß, bleibt im Gewebe und setzt dieses seiner therapeutisch wirksamen Strahlung aus.

Die Plasmaproteinbindung ermöglicht auch eine bildgebende Diagnostik zur Lokalisation von Infarkten oder Nekrosen infolge der Anreicherung der erfindungsgemäßen Substanzen im Infarkt oder der Nekrose.

Detektion, Lokalisierung und Überwachung von Nekrosen oder Infarkten ist ein wichtiger Bereich in der Medizin. So resultiert der Myokardinfarkt nicht sofort in einem unwiederbringlich funktionsuntüchtigen Gewebe, sondern leitet einen dynamischen Prozess ein, der sich über einen längeren Zeitraum (Wochen bis Monate) erstreckt. Die Erkrankung verläuft in etwa drei Phasen, die nicht scharf voneinander getrennt, sondern überlappend sind. Die erste Phase, die Entwicklung des Myokardinfarktes, umfasst die 24 Stunden nach dem Infarkt, in denen die Zerstörung wie eine Stoßwelle (Wellenfrontphänomen) vom Subendokard zum Myokard fortschreitet. Die zweite Phase, der bereits bestehende Infarkt, umfasst die Stabilisierung des Bereiches, in dem Faserbildung (Fibrose) als Heilprozess erfolgt. Die dritte Phase, der ausgeheilte Infarkt, beginnt, nachdem alles zerstörte Gewebe durch fibröses Narbengewebe ersetzt ist. Während dieser Periode findet eine umfangreiche Restrukturierung statt.

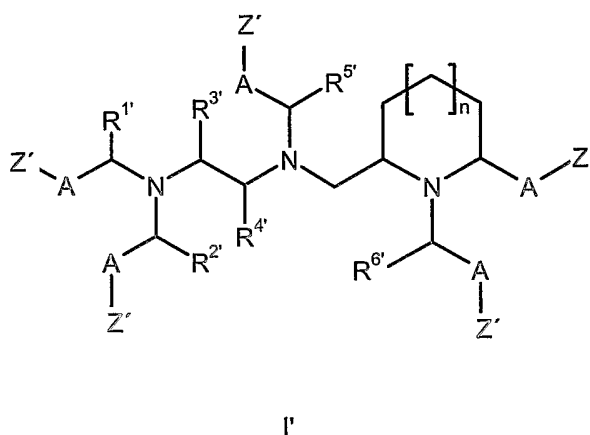
30

Für die Beurteilung eines Myokardinfarktes ist es von entscheidender Bedeutung, zu wissen, wie groß der Anteil des bei dem Infarkt definitiv verlorenen Gewebes ist und an welcher Stelle der Verlust erfolgte, denn von dieser Kenntnis hängt die Art der Therapie ab.

35 Infarkte erfolgen nicht nur im Myokard, sondern auch in anderen Geweben wie im Hirn oder in der Niere.

Während der Infarkt in gewissem Umfang heilbar ist, können bei einer Nekrose, dem lokal begrenzten Gewebetod, nur die schädlichen Folgen für den Restorganismus verhindert oder wenigstens gemildert werden. Nekrosen können auf vielfache Weise entstehen: durch Verletzungen, Chemikalien, Sauerstoffdefizit oder durch Strahlung. Wie beim Infarkt ist die Kenntnis von Umfang und Art einer Nekrose wichtig für das weitere ärztliche Vorgehen.

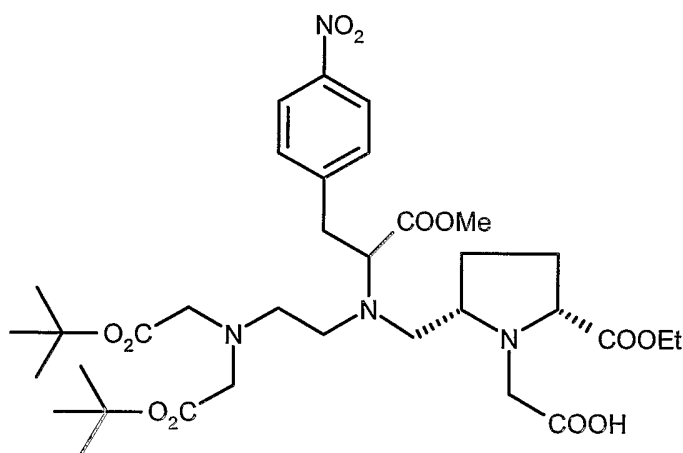
- 10 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate der allgemeinen Formel I erfolgt dadurch, dass man in an sich bekannter Weise in Verbindungen der allgemeinen Formel I'



- 15 worin Z' eine Carboxylschutzgruppe bedeutet und R^{1'}-R^{6'} die für R¹-R⁶ angegebene Bedeutung haben, wobei jedoch die in ihnen enthaltenen funktionellen Gruppen frei, d.h. nicht an ein Biomolekül gebunden sind, gegebenenfalls nach Abspaltung der Schutzgruppen Z' mit einem Biomolekül umgesetzt und anschließend (nach Abspaltung der Schutzgruppen Z') die so erhaltenen Säuren in an sich bekannter Weise mit
- 20 mindestens einem Metalloxid oder Metallsalz eines Elements der Ordnungszahlen 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 oder 83 umgesetzt und anschließend, falls gewünscht, vorhandene acide Wasserstoffatome mit anorganischen und/oder organischen oder Aminosäuren in physiologisch verträgliche Salze überführt.
- 25 Als Carboxylschutzgruppen Z' kommen niedere Alkyl-, Aryl- und Aralkylgruppen infrage, beispielsweise die Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, Diphenylmethyl-, Triphenylmethyl-, Bis(4-nitrophenyl)-methylgruppe sowie Trialkylsilylgruppen.

-18-

- Die Abspaltung der Schutzgruppen Z' erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Hydrolyse, alkalische Verseifung der Ester, vorzugsweise mit Alkali in wässrig -alkoholischer Lösung bei Temperaturen von 0° C bis 50° C oder im
- 5 Falle von Benzylestern durch katalytische Hydrierung und im Falle von t-Butylestern durch saure Hydrolyse, beispielsweise mit Salz- oder Trifluoressigsäure (Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd Edition, T.W. Greene and P.G. M. Wutz, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991).
- 10 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I wird im folgenden am Beispiel der ausgewählten Verbindung 1, erläutert.



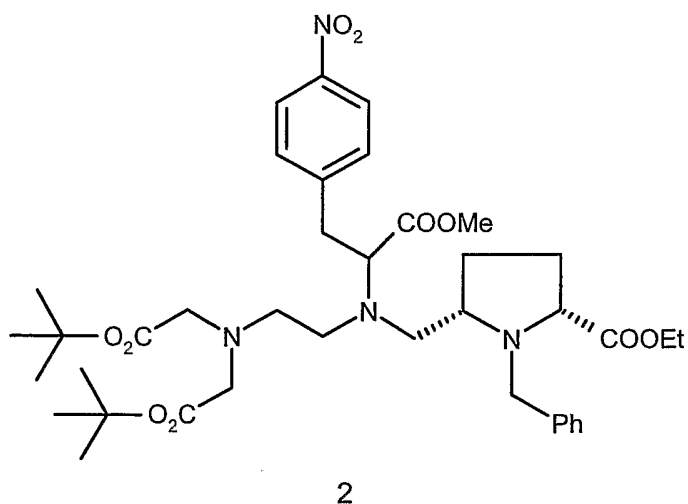
1

15

Durch alkalische Verseifung und anschließende Ionenaustauscherbehandlung kann die Verbindung 1 in die Verbindung I' mit freien Carbonsäuren überführt werden.

- Die Verbindung 1, in der die Carbonsäuren noch als Ester vorliegen, kann durch
- 20 katalytische Oxidation der Benzylverbindung der Formel 2 erhalten werden.

-19-

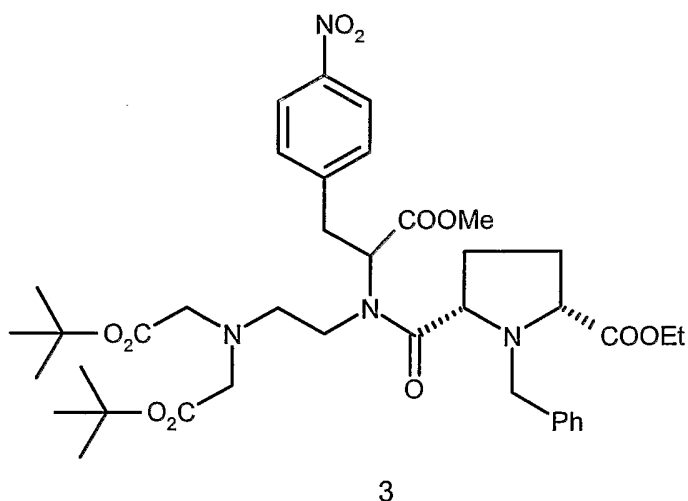


Die Oxidation wird dabei analog der Vorschrift von Ishibashi et al., *Tetrahedron*, (1996), 13867 - 13880 mit Natriumperodat unter Verwendung von Rutheniumchlorid als

5 Katalysator durchgeführt.

Die N-Benzylverbindung 2 ist durch Reduktion des Amides 3 mit Boran-Tetrahydrofurankomplex zugänglich. Man folgt dabei den Bedingungen, wie sie beispielsweise in *J. Amer. Chem. Soc.*, (1990), 9608 beschrieben werden.

10



Das Amid 3 wird aus dem Nitrophenylalaninderivat 4 durch Umsetzen mit N-Benzylpyrrolidin-2,5-dicarbonsäuremonoethylester 5 hergestellt. Die Bildung des Amides 3

15 er-

folgt dabei nach den dem Fachmann wohlbekannten Methoden, beispielsweise der Säure-aktivierung durch:

- Oxalylchlorid: J. Org. Chem., 29: 843 (1964)

- Thionylchlorid: Helv., 42: 1653 (1959)

5 - Carbodiimide. Helv. 46: 1550 (1963)

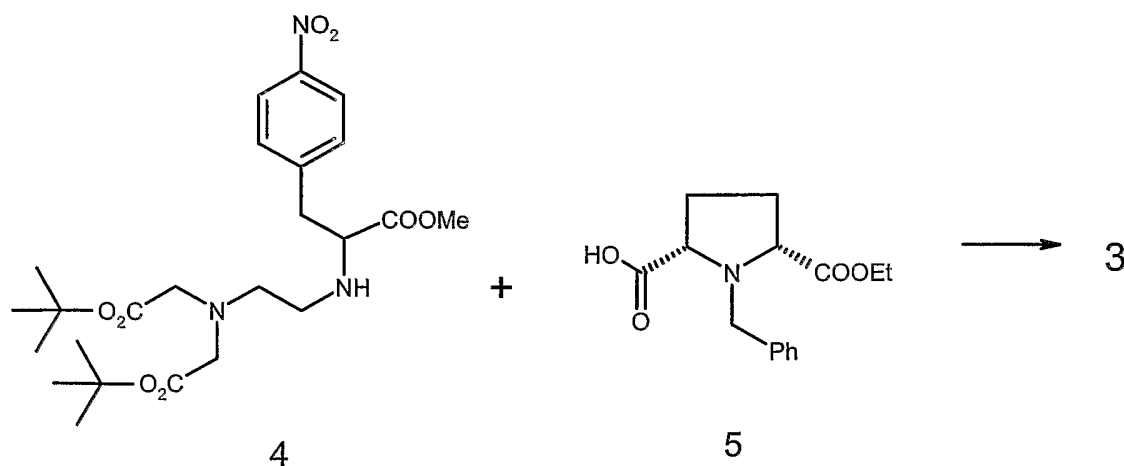
- Carbodiimide/Hydroxysuccinimid: J. Am. Chem. Soc. 86: 1839 (1964) sowie J. Org. Chem. 53: 3583 (1988); Synthesis 453 (1972)

- Anhydridmethode, 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin: J. Am. Chem. Soc. 90:1651 (1968); Int. J. Pept. Prot. Res., 26:493 (1985); Am. Soc. 73: 3547 (1951)

10 - Imidazolid-Methode: Am. Soc. 91:2691 (1969)

J. Med. Chem. 1996, 39:2596; Tetrahedron Letters 1994, 35, 5981; Bioorg. Med. Letters 1996, 6, 55; J. Chem. Soc. Commun. 1994, 201.

15

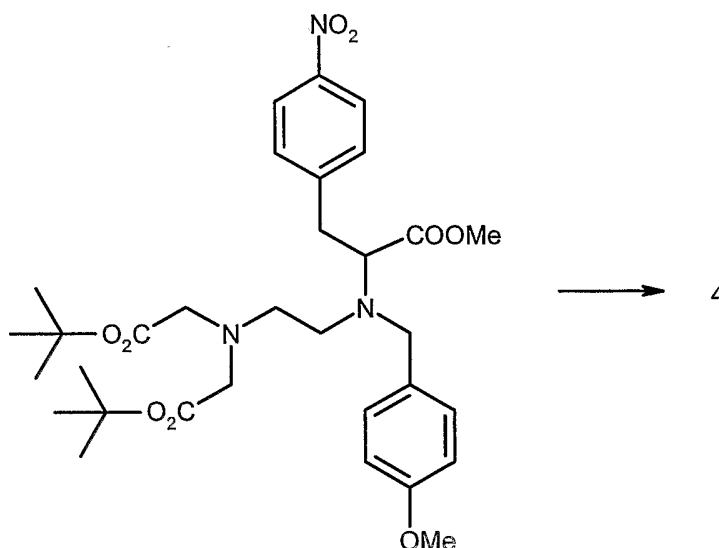


20

Die Säure 5 ist nach Literaturvorschriften (Colombo et al., Gazz. Chim. Ital. 126. 8, 1996, 543-554) leicht aus 2,5-Dibromadipinsäurediethylester und Benzylamin mit anschließender enantioselektiver enzymatischer Verseifung erhältlich.

-21-

Die Verbindung 4 wird durch Abspalten der Schutzgruppe aus Verbindung 6 erhalten. Die N-Methoxybenzylgruppe ist bequem oxidativ mit Cerammoniumnitrat (CAN) abzuspalten (Smith *et al.* Tetrahedron Lett. (1991), 4859).



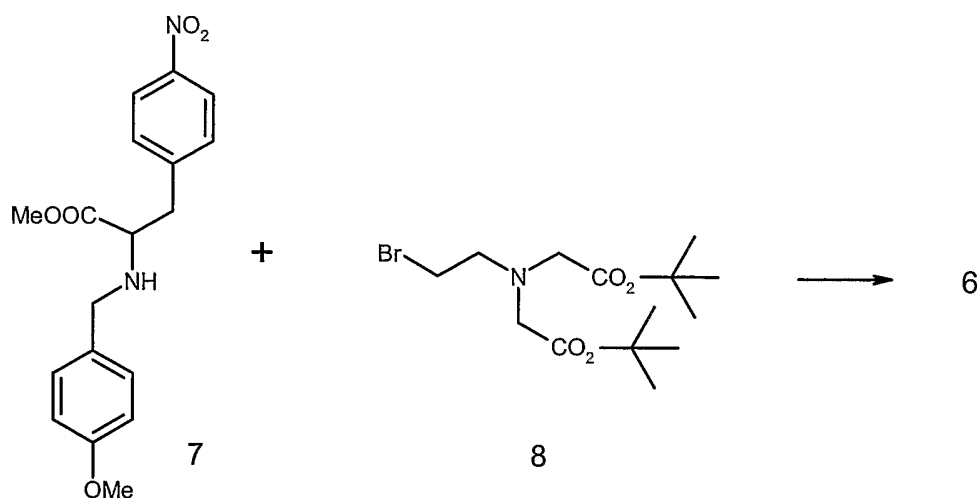
5

6

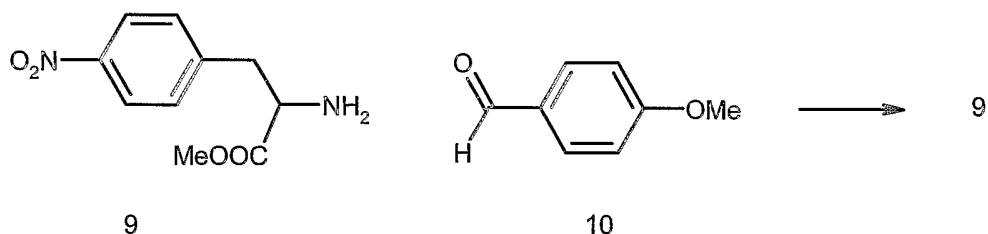
Die Verbindung 6 ihrerseits wird durch Alkylierung des 4-Methoxybenzyl- 4-nitrophenylalanins 7 mit dem nach Rappoport erhältlichen N,N-Bis-(t-butyloxycarbonylmethyl)-2-bromethylamin 8 unter mit Phosphat gepufferten Bedingungen, wie sie ebenfalls Rappoport in *J. Org. Chem.*, 58,1151 (1993) beschreibt, dargestellt.

Die von Rappoport beschriebene Form der N-Alkylierung kann hier angewendet werden. Prinzipiell sind aber auch die dem Fachmann wohlbekannten Methoden der N-Alkylierung anwendbar, beispielsweise Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie XI/2 Stickstoffverbindungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1957 S. 680; J. E. Rickman and T. J. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96 2268 .

-22-



Das Phenylalaninderivat 7 ist durch reduktive Aminierung des 4-Nitro-phenylalanins 9 mit 4-Nitrobenzaldehyd 10 erhältlich. Die reduktive Aminierung erfolgt mit
 5 Natriumcyanoborhydrid nach den dem Fachmann bekannten Methoden, beispielsweise wie sie in Eicher-Tietze, Reaktionen und Synthesen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage 1991, S. 85, beschrieben sind.



10

Die Verbindung 10 ist als Kaufware bei Bachem oder Fluka erhältlich.

Die in Verbindung 1 enthaltene Nitrogruppe dient nach ihrer Umwandlung in die
 15 Amino-gruppe unmittelbar als Bindungsstelle für Biomoleküle, beispielsweise über eine Amidbildung mit Hilfe aktivierter Ester oder reduktive Aminierung mit Carbonylgruppen oder nach Umwandlung in selektiv reagierende Gruppen. Diese Umwandlungsreaktionen sind dem Fachmann wohlbekannt.

So beschreiben Gansow (EP 484984) und Meares (US 4622420) die Darstellung von Halogenacetamiden von acyclischen Komplexbildnern, die zur Kopplung mit -SH-Gruppen oder -NH₂-Gruppen Verwendung finden.

Eine selektive Kopplung mit Aminogruppen ermöglicht die Isothiocyanatogruppe. Ihre
5 Darstellung und die Umsetzung mit Aminen zu den entsprechenden Thioharnstoffen ist beispielsweise in dem Patent US 4680338 von Immunomedics beschrieben worden. Die Umsetzung mit Hydraziden zu den Thio-semicarbaziden wird in der Anmeldung WO 95/15335 der Neorx Corp. geschildert..

Eine selektive Umsetzung mit -SH-Gruppen ermöglichen Maleimide. Ihre Darstellung
10 und Umsetzung werden beispielsweise in den Patenten US 5273743 und EP 446071 von Hybritech oder in EP 345723 von Nihon-Medi Physics beschrieben.

Die Einführung der gewünschten Metallionen von Komplexen für die Herstellung von NMR-Diagnostika kann in der Weise erfolgen, wie sie in den Patentschriften EP 71564,
15 EP 130934 und DE-OS 34 01 052 offenbart worden ist. Dazu wird das Metalloxid oder ein Metallsalz (beispielsweise ein Chlorid, Nitrat, Acetat, Carbonat oder Sulfat) des gewünschten Elements in Wasser und/oder einem niederen Alkohol (wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol) gelöst oder suspendiert und mit der Lösung oder Suspension der äquivalenten Menge des erfindungsgemäßen Komplexbildners
20 umgesetzt.

Die Neutralisation eventuell noch vorhandener freier Carboxygruppen erfolgt mit Hilfe anorganischer Basen (z.B. Hydroxyden, Carbonaten oder Bicarbonaten) von z.B. Natrium, Kalium, Lithium, Magnesium oder Calcium und/oder organischer Basen wie unter anderem primärer, sekundärer und tertiärer Amine, wie z.B. Ethanolamin,
25 Morpholin, Glucamin, N-Methyl- und N,N-Dimethylglucamin, sowie basischer Aminosäuren, wie z.B. Lysin, Arginin und Ornithin oder von Amiden ursprüngliche neutraler oder saurer Aminosäuren.

Zur Herstellung der neutralen Komplexverbindungen kann man beispielsweise in
30 sauren Komplexsalzen in wässriger Lösung oder Suspension soviel der gewünschten Base zusetzen, dass der Neutralpunkt erreicht wird. Die erhaltene Lösung kann anschließend im Vakuum zur Trockne eingeeengt werden. Häufig ist es von Vorteil, die gebildeten Neutralsalze durch Zugabe von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, wie z.B. niederen Alkoholen (Methanol, Ethanol, Isopropanol und andere), niederen
35 Ketonen (Aceton und andere), polaren Ethern (Tetrahydrofuran, Dioxan, 1,2-

Dimethoxyethan und andere) auszufällen und so leicht zu isolierende und gut zu reinigende Kristallisate zu erhalten. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, die gewünschte Base bereits während der Komplexbildung der Reaktionsmischung zuzusetzen und dadurch einen Verfahrensschritt einzusparen,

- 5 Sollen die Komplexbildner zur Herstellung von Radiodiagnostika oder -therapeutika Verwendung finden, kann die Herstellung der Komplexe aus den Komplexbildnern nach den in "Radiotracers for Medical Applications", Vol I, CRC Press, Boca Raton, Florida (1983) beschriebenen Methoden erfolgen.

- 10 Es kann wünschenswert sein, den Komplex erst kurz vor seiner Verwendung herzustellen, insbesondere, wenn er als Radiopharmakon eingesetzt werden soll. Daher umfasst die Erfindung auch einen Kit zur Herstellung von Radiopharmaka, umfassend eine Verbindung der Formel I, worin Z für ein Radioisotop steht. Gegenstand der Erfindung sind ferner pharmazeutische Mittel, die mindestens eine
- 15 physiologisch verträgliche Verbindung der allgemeinen Formel I enthalten, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen.

- Die Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel erfolgt in an sich bekannter Weise, indem man die erfindungsgemäßen Komplexverbindungen -
- 20 gegebenenfalls unter Zugabe der in der Galenik üblichen Zusätze - in wässrigem Medium suspendiert oder löst, und anschließend die Suspension oder Lösung gegebenenfalls sterilisiert. Geeignete Zusätze sind beispielsweise physiologisch unbedenkliche Puffer (wie z.B. Tromethamin), Zusätze von Komplexbildnern oder schwachen Komplexen (wie z.B. Diethylentriaminpentaessigsäure oder die zu den
- 25 erfindungsgemäßen Metallkomplexen korrespondierenden Ca-Komplexe) oder - falls erforderlich - Elektrolyte wie z.B. Natriumchlorid oder - falls erforderlich - Antioxidantien wie z.B. Ascorbinsäure.

- Sind für die enterale Verabreichung oder andere Zwecke Suspensionen oder Lösungen
- 30 der erfindungsgemäßen Mittel in Wasser oder physiologischer Salzlösung erwünscht, werden sie mit einem oder mehreren in der Galenik üblichen Hilfsstoff(en) [z.B. Methylcellulose, Lactose, Mannit] und/oder Tensid(en) [z.B. Lecithine, Tween®, Myrj®] und/oder Aromastoff(en) zur Geschmackskorrektur [z.B. ätherischen Ölen] gemischt.

Prinzipiell ist es auch möglich, die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel auch ohne Isolierung der Komplexsalze herzustellen. In jedem Fall muss besondere Sorgfalt darauf verwendet werden, die Chelatbildung so vorzunehmen, dass die erfindungsgemäßen Salze und Salzlösungen praktisch frei sind von nicht komplexierten toxisch wirkenden Metallionen.

Dies kann beispielsweise mit Hilfe von Farbindikatoren wie Xylenolorange durch Kontrolltitrationen während des Herstellungsprozesses gewährleistet werden. Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung der Komplexverbindungen und ihrer Salze. Als letzte Sicherheit bleibt eine Reinigung des isolierten Komplexsalzes.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel enthalten vorzugsweise 1 fMol-1,3 Mol/l des Komplexsalzes und werden in der Regel in Mengen von 0,0001-5 mMol/kg dosiert. Sie sind zur enteralen und parenteralen Applikation bestimmt. Die erfindungsgemäßen Komplexverbindungen kommen zur Anwendung

1. für die NMR-Diagnostik in Form ihrer Komplexe mit den paramagnetischen Ionen der Elemente mit den Ordnungszahlen 21-29, 42, 44 und 58-70. Geeignete Ionen sind beispielsweise das Chrom(III)-, Eisen(II)-, Cobalt(II), Nickel(II)-, Kupfer(II)-, Praseodym(III)-, Neodym(III)-, Samarium(III)- und Ytterbium(III)-ion. Wegen ihres starken magnetischen Moments sind für die NMR-Diagnostik besonders bevorzugt das Gadolinium(III)-, Terbium(III)-, Dysprosium(III)-, Holmium(III)-, Erbium(III)-, Mangan(II)- und Eisen(III)-ion.
2. für die Radiodiagnostik und Radiotherapie in Form ihrer Komplexe mit den Radioisotopen der Elemente mit den Ordnungszahlen 26, 27, 29, 31, 32, 37-39, 43, 46, 47, 49, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 75, 77, 82 und 83.

Die erfindungsgemäßen Mittel erfüllen die vielfältigen Voraussetzungen für die Eignung als Kontrastmittel für die Kernspintomographie. So sind sie hervorragend dazu geeignet, nach oraler oder parenteraler Applikation durch Erhöhung der Signalintensität das mit Hilfe des Kernspintomographen erhaltene Bild in seiner Aussagekraft zu verbessern. Ferner zeigen sie die hohe Wirksamkeit, die notwendig ist, um den Körper mit möglichst geringen Mengen an Fremdstoffen zu belasten, und die gute

Verträglichkeit, die notwendig ist, um den nichtinvasiven Charakter der Untersuchungen aufrechtzuerhalten.

- Die gute Wasserlöslichkeit und geringe Osmolalität der erfindungsgemäßen Mittel erlaubt es, hochkonzentrierte Lösungen herzustellen, damit die Volumenbelastung des Kreislaufs in vertretbaren Grenzen zu halten und die Verdünnung durch die Körperflüssigkeit auszugleichen, das heißt NMR-Diagnostika müssen 100- bis 1000fach besser wasserlöslich sein als für die NMR-Spektroskopie. Weiterhin weisen die erfindungsgemäßen Mittel nicht nur eine hohe Stabilität *in vitro* auf, sondern auch eine überraschend hohe Stabilität *in vivo*, so dass eine Freigabe oder ein Austausch der in den Komplexen nicht kovalent gebundenen - an sich giftigen - Ionen innerhalb der Zeit, in der die neuen Kontrastmittel vollständig wieder ausgeschieden werden, nur äußerst langsam erfolgt.
- Im allgemeinen werden die erfindungsgemäßen Mittel für die Anwendung als NMR-Diagnostika in Mengen von 0,0001-5 mMol/kg, vorzugsweise 0,005-0,5 mMol/kg, dosiert. Details der Anwendung werden z.B. in H.-J. Weinmann et al., *Am. J. of Roentgenology* 142, 619 (1984) diskutiert.
- Niedrige Dosierungen (unter 1 mg/kg Körpergewicht) von organspezifischen NMR-Diagnostika sind zum Beispiel zum Nachweis von Tumoren und von Herzinfarkt einsetzbar. Besonders niedrige Dosierungen der erfindungsgemäßen Komplexe sind für die Anwendung in der Radiotherapie und Radiodiagnostik geeignet. So kommen sowohl für therapeutische wie auch diagnostische Zwecke Dosierungen von 0,5 pM/kg – 5 µM/kg, vorzugsweise 50 pM/kg - 500 nMol/kg zur Anwendung. Üblicherweise werden hinsichtlich des radioaktiven Metallions ca. 100 – 100.000-fach geringere molare Konzentrationen verwendet als dies für die Chelatoren bzw. Chelator-Biokonjugate der Fall ist, so dass also die Chelatoren bzw. Chelator-Biokonjugate im Überschuss vorliegt.
- Ferner können die erfindungsgemäßen Komplexverbindungen vorteilhaft als Suszeptibilitäts-Reagenzien und als *shift*-Reagenzien für die *in vivo*-NMR-Spektroskopie verwendet werden.

-27-

Die erfindungsgemäßen Mittel sind aufgrund ihrer günstigen radioaktiven Eigenschaften und der guten Stabilität der in ihnen enthaltenen Komplexverbindungen auch als Radiodiagnostika und Radiotherapeutika geeignet. Details ihrer Anwendung und Dosierung werden z.B. in "Radiotracers for Medical Applications", CRC-Press, 5 Boca Raton, Florida, 1983, sowie in Eur. J. Nucl. Med. 17 (1990) 346-364 und Chem. Rev. 93 (1993) 1137-1156 beschrieben.

Für SPECT geeignet sind die Komplexe mit den Isotopen ^{111}In und $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

10 Eine weitere bildgebende Methode mit Radioisotopen ist die Positronen-Emissions-Tomographie, die positronenemittierende Isotope wie z.B. ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y und $^{94\text{m}}\text{Tc}$ verwendet (Heiss, W.D.; Phelps, M.E.; Positron Emission Tomography of Brain, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1983).

15 Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind überraschenderweise auch zur Differenzierung von malignen und benignen Tumoren in Bereichen ohne Blut-Hirn-Schranke geeignet.

Sie zeichnen sich auch dadurch aus, dass sie vollständig aus dem Körper eliminiert 20 werden und somit gut verträglich sind.

Da sich die erfindungsgemäßen Substanzen in malignen Tumoren anreichern (keine Diffusion in gesunde Gewebe, aber hohe Durchlässigkeit von Tumorgefäßen), können sie auch die Strahlentherapie von malignen Tumoren unterstützen. Diese unterscheidet 25 sich von der entsprechenden Diagnostik nur durch die Menge und Art des verwendeten Isotops. Ziel ist dabei, die Zerstörung von Tumorzellen durch energiereiche kurzwellige Strahlung mit einer möglichst geringen Reichweite. Hierzu werden Wechselwirkungen der in den Komplexen enthaltenen Metalle (wie z.B. Eisen oder Gadolinium) mit ionisierenden Strahlungen (z.B. Röntgenstrahlen) oder mit Neutronenstrahlen 30 ausgenutzt. Durch diesen Effekt wird die lokale Strahlendosis am Ort, wo sich der Metallkomplex befindet (z.B. in Tumoren) signifikant erhöht. Um die gleiche Strahlendosis im malignen Gewebe zu erzeugen, kann bei Anwendung solcher Metallkomplexe die Strahlenbelastung für gesunde Gewebe erheblich reduziert und damit belastende Nebenwirkungen für die Patienten vermieden werden. Die 35 erfindungsgemäßen Metallkomplex-Konjugate eignen sich deshalb auch als

-28-

- radiosensibilisierende Substanz bei der Strahlentherapie von malignen Tumoren (z.B. Ausnutzen von Mössbauer-Effekten oder bei Neutroneneinfangtherapie). Geeignete β -emittierende Ionen sind z.B. ^{46}Sc , ^{47}Sc , ^{48}Sc , ^{72}Ga , ^{73}Ga , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re und ^{188}Re , wobei ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{72}Ga , ^{153}Sm und ^{67}Cu bevorzugt werden. Geeignete geringe Halbwertszeiten aufweisende α -emittierende Ionen sind z.B. ^{211}At , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi und ^{214}Bi , wobei ^{212}Bi bevorzugt ist. Ein geeignetes Photonen- und Elektronen-emittierendes Ion ist ^{158}Gd , das aus ^{157}Gd durch Neutroneneinfang erhalten werden kann.
- 10 Ist das erfindungsgemäße Mittel zur Anwendung in der von R. L. Mills et al. [Nature Vol. 336, (1988), S. 787] vorgeschlagenen Variante der Strahlentherapie bestimmt, so muß sich das Zentralion von einem Mößbauer-Isotop wie beispielsweise ^{57}Fe oder ^{151}Eu ableiten.
- 15 Bei der *in vivo*-Applikation der erfindungsgemäßen therapeutischen Mittel können diese zusammen mit einem geeigneten Träger wie z.B. Serum oder physiologischer Kochsalzlösung und zusammen mit einem anderen Protein wie z.B. Human Serum Albumin verabreicht werden. Die Dosierung ist dabei abhängig von der Art der zellulären Störung, dem benutzten Metallion und der Art der bildgebenden Methode.
- 20 Die erfindungsgemäßen therapeutischen Mittel werden vorzugsweise parenteral, bevorzugt i.v., appliziert.
- Details der Anwendungen von Radiotherapeutika werden z.B. in R. W. Kozak et al. TIBTEC, Oktober 1986, 262, diskutiert (s. a. Bioconjugate Chem. 12 (2001) 7-34).
- 25

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstands:

Die Beispiele 20, 21, 27, 29 und 30 beschreiben Konjugate mit Antikörpern. Konjugate mit anderen Biomolekülen können nach folgenden allgemeinen Arbeitsvorschriften hergestellt werden:

- 5 Hierin steht "AAV" für allgemeine Arbeitsvorschrift, "RP-18" bezeichnet eine "reversed phase" stationäre Chromatographiephase. Die Anzahl der Komplexe pro Biomolekül wurde mittels Szintigraphie oder ICP (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) bestimmt.

10 **Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) I: Albumin-Amid-Konjugate**

- 3 mmol der Säure werden in 15 mL DMF gelöst, unter Eiskühlung mit 380 mg (3,3 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 681 mg Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 1 Stunde im Eis voraktiviert. Die Aktivestermischung wird innerhalb von 30 Minuten in eine
15 Lösung von 16,75 g (0,25 mmol) Rinderserumalbumin (BSA) in 150 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) eingetropft und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Ansatzlösung wird filtriert, das Filtrat über eine AMICON® YM30 (cut off 30.000 Da) ultrafiltriert, das Retentat über eine Sephadex® G50 -Säule chromatographiert und die Produktfraktionen gefriergetrocknet.

20

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) II: Albumin-Maleimid-Konjugate

- 0,0438 mmol des Maleimids in 1 mL DMF werden zu 0,84 g (0,0125 mmol) Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in 15 mL Phosphatpuffer (pH 7,4), gegeben und
25 eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Ansatzlösung wird filtriert, das Filtrat über eine AMICON® YM30 (cut off 30.000 Da) ultrafiltriert, das Retentat über eine Sephadex® G50 -Säule chromatographiert und die Produktfraktionen gefriergetrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) III: Herstellung von Amid-Konjugaten

30

- 3 mmol der Säure werden in 15 mL DMF gelöst, unter Eiskühlung mit 380 mg (3,3 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 681 mg Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 1 Stunde im Eis voraktiviert. Die Aktivestermischung wird in eine Lösung von 2,5 mmol Aminkomponente in 15-150 mL DMF eingetropft und über Nacht bei Raumtemperatur
35 gerührt. Die Ansatzlösung wird filtriert und an Kieselgel chromatographiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) IV: Herstellung von Maleimido-SH-Konjugaten

3 mmol des Maleimids in 15 mL DMF werden zu 2,5 mmol SH-Komponente in 15-150
5 mL DMF eingetropt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Ansatzlösung
wird filtriert, das Filtrat über eine AMICON® YM30 (cut off 30.000 Da) ultrafiltriert, das
Retentat über eine Sephadex® G50 -Säule chromatographiert und die
Produktfraktionen gefriergetrocknet.

10 **Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) V: Herstellung von Halogenacetamido-SH-Konjugaten**

3 mmol des Halogenacetamids in 15 mL DMF werden zu 2,5 mmol SH-Komponente in
15-150 mL DMF eingetropt und acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die
15 Ansatzlösung wird filtriert, das Filtrat über eine AMICON® YM30 (cut off 30.000 Da)
ultrafiltriert, das Retentat über eine Sephadex® G50 -Säule chromatographiert und die
Produktfraktionen gefriergetrocknet.

Beispiel 1

a) *cis*-1-Benzyl-piperidin-2,6-dicarbonsäure dimethyl ester

- 5 Zu 1000 ml gerührtem Methanol wurden bei -5° C 236 g (2,00 mol) Thionylchlorid hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 40 min gerührt. Es wurden tropfenweise 83,6 g (0,50 mol) 2,6-Dicarboxypyridin, gelöst in 150 ml Methanol, hinzugefügt. Die Lösung wurde für 2 h gerührt und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40° C eingeengt. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung für die folgende
- 10 Umsetzung eingesetzt. Die folgende Hydrierung und Alkylierung mit Benzylbromid wurden analog zu einer bekannten Synthese (*Syn. Lett.*, 8, (1999), 1292-1294) vorgenommen. Es wurden 77,21 g (265 mmol) 1a in 53% Ausbeute erhalten.

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 292

- 15 b) (2*R*,6*S*)-1-Benzyl-piperidin-2,6-dicarbonsäure-2-methyl ester

- In Anlehnung zu einer Literatur bekannten Synthesevorschrift (*Gazz. Chim. Ital.*, 126, 8, (1996), 543-545) wurden 58,27 g (200 mmol) 1a in 4,5 l Phosphatpuffer (pH = 7) mit 900 mg Schweineleberesterase (Fluka) für 5,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die
- 20 Reaktionslösung wurde durch eine Membranfiltration (< 10.000 U) vom Enzym befreit und mit verdünnter wässriger HCl-Lösung auf pH = 6 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit einem Dichlormethan-Isopropanolgemisch (10:1) extrahiert, mit $MgSO_4$ getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde einer Kieselgelfiltration unterzogen (Dichlormethan-Methanol 10:1). Es ergaben sich 44,92 g (162 mmol) des gewünschten
- 25 Produkts 1b in 81% Ausbeute mit einem Enantiomerenüberschuss von 94 % ee (bestimmt durch Analyse mittels enantioselektiver HPLC).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 278

- c) (2*R*,6*S*)-1-Benzyl-6-{*tert*-butoxycarbonylmethyl-[2-(*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-carbamoyl}-piperidin-2-carbonsäure methyl ester
- 30

- 41,60 g (150 mmol) 1b wurden in 400 ml trockenem Dichlormethan bei 0° C mit 3,57 g (170 mmol) Diisopropylethylamin und 23 g (170 mmol) HOBt versetzt. Es wurden 108 g (375 mmol) 1,2-Diessigsäure-*tert*-butylester-ethylen-diamin (*J. Med. Chem.*, 29, 7, (1986), 1231-1237) in 50 ml trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Es wurden 62 g
- 35 (300 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 50 ml trockenem Dichlormethan

-32-

hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 500 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (1:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 1c mit 82,7 % Ausbeute (67,9 g, 124 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 548

10

d) (2R,6S,2'R)-1-Benzyl-6-(*tert*-butoxycarbonylmethyl-{2-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(1-ethoxycarbonyl-2-propionyloxy-ethyl)-amino]-ethyl}-carbamoyl)-piperidin-2-carbonsäure methyl ester

15 Zu einer gerührten Lösung von 66,8 g (122 mmol) 1c in 400 ml trockenem Dichlormethan wurden 47 g (146 mmol) 3-Propionyloxy-2-trifluoromethanesulfonyloxy-propionsäure ethyl ester (*Angew. Chem.*, 95, 1, (1983), 50) welches in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst worden war, bei -65° C hinzuge tropft. Die Lösung wurde für 2h gerührt, über 5h langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 8 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 400 ml heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (2:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 1d mit 69,0 % Ausbeute (60,6 g, 84,2 mmol).

20

25

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 720

e) (2R,2'R,6S) 1-Benzyl-6-[(*tert*-butoxycarbonylmethyl-{2-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(1-ethoxycarbonyl-2-propionyloxy-ethyl)-amino]-ethyl)-amino)-methyl]-piperidin-2-carbonsäure methyl ester

30

Analog zu *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 40 g (55,6 mmol) 1d in 150 ml trockenem THF wurden 389,2 ml (389,2 mmol) BH₃-THF-Lösung (1M) hinzuge tropft. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung

35

-33-

wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in 600 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Hexan-Essigester (3:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 1e mit
5 71,0 % Ausbeute (27,9 g, 39,5 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 706

f) (2R,2'R,6S)-6-[(*tert*-Butoxycarbonylmethyl-{2-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(1-ethoxycarbonyl-2-propionyloxy-ethyl)-amino]-ethyl}-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-
10 piperidin-2-carbonsäure methyl ester

Analog zu *Tetrahedron*, 52, 44, (1996), 13867-13880: Zu einer Lösung von 26,8 g (38,0 mmol) in 150 ml CCl₄ und 150 ml Acetonitril wurden ~ 200 mg Rutheniumdioxid monohydrat und 163 g (0,76 mol) Natriumperiodat in 220 ml Wasser hinzugegeben. Die
15 Reaktionslösung wurde für 3 Tage gerührt. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl-Lösung auf pH = 6 eingestellt und dreimal mit je 250 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (1:1))
20 gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 1e mit 72,0 % Ausbeute (18,46 g, 27,4 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 674

g) (2R,2'R,6S)-6-[(2-[(1-Carboxy-2-hydroxy-ethyl)-carboxymethyl-amino]-ethyl)-carboxymethyl-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-piperidin-2-carbonsäure
25

16,87 g (25 mmol) 1f wurden in 200 ml MeOH bei 0° C mit 100 ml (200 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Lösung wurde auf 40° C erwärmt und für 14 Std. gerührt. Die Lösung wurde mit Ionenaustauscherharz (IR 120) versetzt bis der pH-Wert
30 3 erreichte. Das Harz wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde gefriertrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 1g mit 76 % Ausbeute (8,81 g, 19 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 464

Beispiel 2

a) (R)-2-(4-Methoxy-benzylamino)-3-(4-nitro-phenyl)-propionsäure methyl ester

5 Zu einer Lösung von 29,1 g (112 mmol) *p*-Nitro-phenylalanin-methylester hydrochlorid und 15,51 g (120 mmol) Di-*iso*-propyl-ethylamin in 250 ml trockenem THF wurden bei 0°C 15,25 g (112 mmol) Anisaldehyd in etwas THF hinzuge tropft. Die Lösung wurde für 3h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 5,04 g (80 mmol) NaBH₃CN versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und auf ein Viertel des
10 Volumens eingeeengt. Es wurden 300 ml Gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (2:1))
15 gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 2a mit 68 % Ausbeute (26,23 g, 76,16 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 345

b) (R)-2-[[2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-(4-methoxy-benzyl)-amino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionsäure methyl ester

Zu einer Lösung von 49,3 g (140 mmol) [(2-Bromo-ethyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino]-essigsäure *tert*-butyl ester (*Synth. Commun.*, 30, (2000), 3755) in 150 ml Acetonitril und 150 ml Phosphatpuffer (pH = 8) wurden 22,38 g (65 mmol) 2a
25 hinzugefügt. Die Lösung wurde für 10 h bei Raumtemperatur gerührt und auf 300 ml eiskalte Gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gegossen. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch
30 Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (3:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 2b mit 85 % Ausbeute (34,0 g, 55,25 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 616

c) (R)-2-[2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionsäure methyl ester

Zu einer Lösung von 32 g (52,0 mmol) 2b in 180 ml Acetonitril und 20 ml Wasser wurden bei -10°C 82,23 g (150 mmol) Cer-(IV)-ammoniumnitrat hinzugefügt. Die Lösung wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf 300 ml eiskalte Gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gegossen. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Essigester extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (1,5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 2c mit 83 % Ausbeute (21,4 g, 43,2 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 43): 496

d) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-[[2-(bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-[1-methoxycarbonyl-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-carbamoyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

11,4 g (41 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 150 ml trockenem Dichlormethan wurden bei 0°C mit 5,82 g (45 mmol) Diisopropylethylamin und 6,1 g (45 mmol) HOBt versetzt. Es wurden 20,0 g (40,4 mmol) 2c in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzugeetropt. Es wurden 16,5 g (80 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 50 ml trockenem Dichlormethan hinzugeetropt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 300 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 1d mit 80,4 % Ausbeute (24,5 g, 32,5 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 755

e) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-([2-(bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-[1-methoxycarbonyl-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-amino)-methyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 24,0 g (31,8 mmol) 2d in 100 ml trockenem THF wurden 223 ml (223 mmol) BH_3 -THF-Lösung (1M) hinzugegeben. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde in 400 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Hexan-Essigester (3:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 2e mit 70,0 % Ausbeute (18,84 g, 25,4 mmol).

MS-FAB ($\text{M}^+ + 1$, 21): 741

10

f) (1'R,2R,5S)-5-({[2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-[1-methoxycarbonyl-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-amino}-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

15 Analog zu *Tetrahedron*, 52, 44, (1996), 13867-13880: Zu einer Lösung von 18,5 g (25,0 mmol) 2e in 150 ml CCl_4 und 150 ml Acetonitril wurden 150 mg (1,13 mmol) Rutheniumdioxid monohydrat und 107 g (500 mmol) Natriumperodat in 220 ml Wasser hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 Tage gerührt. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl-Lösung auf pH = 6 eingestellt und dreimal mit je 250 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (1,5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 2f mit 69,0 % Ausbeute (12,2 g, 17,3 mmol).

25 MS-FAB ($\text{M}^+ + 1$, 21): 709

g) (1'R,2R,5S)-5-({[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-[1-carboxy-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-amino}-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

30 16,3 g (23 mmol) 1f wurden in 200 ml Dioxan bei 0° C mit 115 ml (230 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Lösung wurde auf 40° C erwärmt und für 14 Std. gerührt. Die Lösung wurde mit Ionenaustauscherharz (IR 120) versetzt bis der pH=3 betrug. Ionenaustauscherharz wurde abfiltriert. Dioxan wurde im Vakuum entfernt. Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt und durch Gefriertrocknung konzentriert. Es ergab sich das gewünschte Produkt 2g mit 78 % Ausbeute (9,95 g 17,9 mmol).

35

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 555

Beispiel 3

- 5 a) (2R,5S)-1-Benzyl-5-[[2-(bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-*tert*-butoxycarbonylmethyl-carbamoyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

11,4 g (41 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 150 ml trockenem Dichlormethan wurden
10 bei 0° C mit 5,82 g (45 mmol) Diisopropylethylamin und 6,1 g (45 mmol) HOBT versetzt. Es wurden 16,3 g (40,4 mmol) {*tert*-Butoxycarbonylmethyl-[2-(*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure *tert*-butyl ester (*J. Org. Chem.*, 65, 5, (2000), 1562-1565) in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Es wurden 16,5 g (80 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 50 ml trockenem Dichlormethan
15 hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 300 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und
20 eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (3,5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 3a mit 83,3 % Ausbeute (22,3 g, 33,7 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 662

- 25 b) (2R,5S)-1-Benzyl-5-([2-(bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 21,05 g (31,8 mmol) 3a in 100 ml trockenem THF wurden 223 ml (223 mmol) BH_3 -THF-Lösung (1M)
30 hinzuge tropft. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde in 400 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Hexan-Essigester (3:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 3b mit
35 69,1 % Ausbeute (14,24 g, 22,0 mmol).

-38-

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 648

c) (2R,5S)-5-({[2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino}-methyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

5

Zu einer Lösung von 14,1 g (21,8 mmol) 2b in 200 ml *iso*-Propanol wurden 2 g Pd/C (10%) hinzugefügt. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 3c mit 11,9 g (21,36 mmol) und 98% Rohausbeute. 3c wurde ohne Reinigung für die folgende Reaktion eingesetzt. MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 558

10

d) (1'R,2R,5S)-1-(1-Benzoyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-5-({[2-(bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino}-methyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

15

Zu einer Lösung von 11,7 g (21,0 mmol) 3c in 300 ml Dichlormethan wurden bei -20°C 9,86 g (21 mmol) 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-trifluoromethansulfonyloxy-hexansäurebenzylester (der entsprechende Alkohol, dessen Synthese in JOC [2000] 7667 beschrieben ist, wurde zuvor mit Triflatanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -20°C in das Triflat umgewandelt) in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Die Lösung wurde für 2 Std. gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 5 Stunden gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 3d mit 78,8 % Ausbeute (14,51 g, 16,55 mmol).

20

25

30 MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 878

e) (1'R,2R,5S)-1-(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-5-({[2-(bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-carboxymethyl-amino}-methyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

Zu einer Lösung von 14,0 g (16,0 mmol) 3d in 220 ml *iso*-Propanol wurden 2,2 g Pd/C (10%) hinzugefügt. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 5 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt. Der Rückstand wurde in 150 ml Dichlormethan aufgenommen, auf –5 °C abgekühlt und mit 150 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer zügig eingengt. Der Rückstand wurde mittels Ölpumpenvakuum konzentriert und in 200 ml Dioxan aufgenommen. Es wurden 100 ml destilliertes Wasser und 25 ml (50 mmol) einer 2N Natriumhydroxydlösung hinzugefügt. Die Lösung wurde für 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde abgekühlt. Es wurde saurer Ionenaustauscher IRA 120 hinzugegeben bis der pH-Wert bei 3 lag. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert. Dioxan wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 3e mit 72,0 % Ausbeute (5,56 g; 11,5 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 491

Beispiel 4

a) (S)-2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-3-(4-nitro-phenyl)-propionsäure methyl ester

100 g (446 mmol) (S)-p-Nitro-phenylalaninmethylester wurden in 500 ml Acetonitril und 500 ml dest. Wasser gelöst und mit 281 g (2,23 mol) Kaliumcarbonat versetzt. Es wurden 347 g (1,78 mol) Bromessigsäure-*tert*-butylester hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 70° C gerührt. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt und mit 500 ml Diethylether verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (3:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 4a mit 73,2 % Ausbeute (148 g, 326 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 453

-40-

b) (S)-{*tert*-Butoxycarbonylmethyl-[2-hydroxy-1-(4-nitro-benzyl)-ethyl]-amino}-essigsäure *tert*-butyl ester

- Zu einer Suspension von 80 g (177 mmol) 4a in 200 ml THF und 10,0 g (265 mmol) Natriumborhydrid wurden bei 0° C 300 ml Methanol tropfenweise hinzugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde vorsichtig am Rotationsverdampfer auf ein Viertel des Volumens eingeeengt. Es wurden 400 ml Wasser und 400 ml Diethylether hinzugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 300 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (1,5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 4b mit 76,8 % Ausbeute (57,7 g, 136 mmol).
- MS-FAB (M⁺ +1, 21): 425

c) (S)-{*tert*-Butoxycarbonylmethyl-[1-(4-nitro-benzyl)-2-oxo-ethyl]-amino}-essigsäure *tert*-butyl ester

- Analog zu *Synthesis* (1981), 165-185: Zu einer gerührten Lösung von 8,9 g (70,7 mmol) Oxalylchlorid in 800 ml trockenem Dichlormethan wurden bei -65° C 11 g (141 mmol) Dimethylsulfoxid in 50 ml Dichlormethan hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 20 min gerührt. Es wurden 20 g (47,1 mmol) 4b in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Die Lösung wurde 45 Minuten bei -60°C gerührt. Es wurden 28,6 g (283 mmol) Triethylamin hinzugegeben. Die Lösung wurde für 30 Minuten gerührt und langsam auf 0° C erwärmt. Die Lösung wurde auf 500 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt (18 g) wurde ohne weitere Reinigung für die folgende Reaktion eingesetzt.
- MS-FAB (M⁺ +1, 21): 423

- d) (S)-{*tert*-Butoxycarbonylmethyl-[2-(*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-1-(4-nitro-benzyl)-ethyl]-amino}-essigsäure *tert*-butyl ester

Zu einer gerührten Lösung von 18 g Rohprodukt 4c in 200 ml Methanol wurden bei 0° C 4,22 g (42,6 mmol) t-Bu-O-Gly-NH₂ (Bachem) in 30 ml Methanol hinzugetropft. Es wurden 4,03 g (63,9 mmol) Natriumcyanoborhydrid hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden gerührt. Es wurde auf 200 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die methanolisch-wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (1:2)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 4d mit 16,0 g (29,7 mmol; 63,1 % Ausbeute bezogen auf 4b).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 538

e) (2R,5S,2'S)-1-Benzyl-5-([2-(bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-3-(4-nitro-phenyl)-propyl]-*tert*-butoxycarbonylmethyl-carbamoyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

7,62 g (27,4 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 100 ml trockenem Dichlormethan wurden bei 0° C mit 3,89 g (30,1 mmol) Diisopropylethylamin und 4,1 g (30,1 mmol) HOBt versetzt. Es wurden 14,5 g (27,0 mmol) 4d in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Es wurden 11,0 g (53,5 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 30 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 200 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (3:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 4e mit 76,9 % Ausbeute (16,5 g, 20,8 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 798

f) (2R,5S,2'S)-1-Benzyl-5-([2-(bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-3-(4-nitro-phenyl)-propyl]-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 14,3 g (18 mmol) 4e in 60 ml trockenem THF wurden 126 ml (126 mmol) BH₃-THF-Lösung (1M) hinzuge tropft. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde in 230 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Hexan-Essigester (3:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 4f mit 72,0 % Ausbeute (10,1 g, 13,0 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 782

g) (2R,5S,2'S)-5-([2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-3-(4-nitro-phenyl)-propyl]-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu *Tetrahedron*, 52, 44, (1996), 13867-13880: Zu einer Lösung von 9,40 g (12,0 mmol) 4f in 50 ml CCl₄ und 50 ml Acetonitril wurden ~ 100 mg Rutheniumdioxid monohydrat und 51,5 g (0,24 mol) Natriumperodat in 80 ml Wasser hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 3 Tage gerührt. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl-Lösung auf pH = 6 eingestellt und dreimal mit je 80 ml Dichlormethan-*iso*-Propanol-Gemisch (10:1) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (1:2)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 4g mit 74,0 % Ausbeute (6,67 g, 8,88 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 751

h) (2R,5S,2'S)-5-([2-(Bis-carboxymethyl-amino)-3-(4-nitro-phenyl)-propyl]-carboxymethyl-amino)-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

6,01 g (8,00 mmol) 4g wurden in 90 ml MeOH bei 0° C mit 40 ml (80 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Lösung wurde auf 40° C erwärmt und für 14 Std. gerührt. Die Lösung wurde mit Ionenaustauscherharz (IR 120) versetzt bis der Wert pH=3 erreicht wurde. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde durch Gefriertrocknung konzentriert. Es ergab sich das gewünschte Produkt 4h mit 77,5 % Ausbeute (3,44 g; 6,20 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 555

Beispiel 5

- 5 a) (2R,5S)-1-Benzyl-5-{*tert*-butoxycarbonylmethyl-[2-(*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-carbamoyl}-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

12,9 g (46,3 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 170 ml trockenem Dichlormethan wurden
10 bei 0° C mit 6,58 g (50,9 mmol) Diisopropylethylamin und 6,9 g (50,9 mmol) HOBT versetzt. Es wurden 29,3 g (101,7 mmol) [2-(*tert*-Butoxycarbonylmethyl-amino)-ethylamino]-essigsäure *tert*-butyl ester in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Es wurden 18,6 g (90,4 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 60 ml trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde bei
15 Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 350 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch
20 Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (1:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 5a mit 72,5 % Ausbeute (18,4 g, 33,6 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 548

- 25 b) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-({2-[(1-benzoyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino]-ethyl}-*tert*-butoxycarbonylmethyl-carbamoyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Zu einer Lösung von 18,2 g (33,2 mmol) 5a in 300 ml Dichlormethan wurden bei -20° C
15 15,6 g (33,2 mmol) 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-trifluoromethansulfonyloxy-hexansäure-benzylester (der entsprechende Alkohol, dessen Synthese in *J. Org. Chem.* (2000) 7667 beschrieben ist, wurde zuvor mit Trifluoromethansulfonsäureanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -
20° C in das entsprechende Triflat umgewandelt) in 150 ml trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Die Lösung wurde für 2 Std. gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und
35 über Nacht gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die

wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich
5 das gewünschte Produkt 5b mit 76,4 % Ausbeute (22,0 g, 25,4 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 868

c) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-[(2-[(1-benzyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino]-ethyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester
10

Analog zu *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 21,8 g (25,1 mmol) 5b in 150 ml trockenem THF wurden 176 ml (176 mmol) BH₃-THF-Lösung (1M) hinzugegeben. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung
15 wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in 300 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Hexan-Essigester (3:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 5c mit 75,7 % Ausbeute (16,2 g, 19,0 mmol).
20 MS-FAB (M⁺ +1, 21): 854

d) (1'R,2R,5S)-5-[(2-[(1-Benzyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino]-ethyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester
25

Analog zu *Tetrahedron*, 52, 44, (1996), 13867-13880: Zu einer Lösung von 15,9 g (18,6 mmol) 5c in 80 ml CCl₄ und 80 ml Acetonitril wurden ~ 250 mg Rutheniumdioxid monohydrat und 79,8 g (372 mmol) Natriumperodat in 105 ml Wasser hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 Tage gerührt. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl-
30 Lösung auf pH = 6 eingestellt und dreimal mit je 250 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (1:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 5d mit 76,7 % Ausbeute (11,7 g, 14,3
35 mmol).

-45-

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 822

e) (1'R,2R,5S)-5-[(2-[(5-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-carboxy-pentyl)-carboxymethyl-amino]-ethyl)-carboxymethyl-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

5

9,0 g (11,0 mmol) 5d wurden in 110 ml MeOH bei 0° C mit 55 ml (110 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Lösung wurde auf 40° C erwärmt und für 14 Std. gerührt. Die Lösung wurde mit Ionenaustauscherharz (IR 120) versetzt bis der Wert pH=3 erreicht wurde. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde durch
10 Gefriertrocknung konzentriert. Es ergab sich das gewünschte Produkt 5e mit 81,2 % Ausbeute (5,26 g; 8,90 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 591

f) (1'R,2R,5S)-5-[(2-[(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-carboxymethyl-amino]-ethyl)-carboxymethyl-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

15

Zu einer Lösung von 5,0 g (8,46 mmol) 5e in 110 ml Dichlormethan wurden 60g (526 mmol) Trifluoressigsäure hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. In
20 destilliertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde erneut in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 5f in 88,4 % Ausbeute (3,67 g; 7,48 mmol)

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 491

25 Beispiel 6

(1'S,2R,5S)-5-[(2-[(1-Benzoyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino]-ethyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl]-1-(diethoxy-phosphorylmethyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

30

Zu einer Lösung von 9,60 g (12,6 mmol) 5c in 120 ml iso-Propanol wurden 0,5 g Palladium auf Kohle (10%) hinzugegeben. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wurde eingeeengt. Die Lösung wurde in Toluol aufgenommen.

35 Mit 1,8 g (13 mmol) Diethylphosphit, 2,72 g (27 mmol) Triethylamin und 450 g (15

-46-

mmol) Paraformaldehyd versetzt. Die Lösung wurde für 10 h am Wasserabscheider azeotrop destilliert. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt. Der Rückstand wurde in Diethylether aufgenommen, mit MgSO_4 getrocknet und erneut eingeeengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel gereinigt. (SiO_2 , Hexan-Essigester (1:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 6a mit 61 % Ausbeute (6,33 g, 7,7 mmol).
MS-FAB ($M^+ + 1$, 27): 824

b) (1'R,2R,5S)-5-[(2-[(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-carboxymethyl-amino]-ethyl)-carboxymethyl-amino)-methyl]-1-(ethoxy-hydroxy-phosphorylmethyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

6,3 g (7,7 mmol) 6a wurden mit 30 ml Dichlormethan und 30 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde für 1 h gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 50 ml Dioxan aufgenommen und mit 30 ml (60 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 26 Stunden bei 40° C gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt. Es wurde saurer Ionenaustauscher IRA 120 hinzugegeben bis der pH-Wert bei 3 lag. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert. Dioxan wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 6b in 68,3 % Ausbeute (2,94 g; 5,26 mmol)
MS-FAB ($M^+ + 1$, 23): 555

Beispiel 7

(2R,5S)-1-Benzyl-5-((diethoxy-phosphorylmethyl)-{2-[(diethoxy-phosphorylmethyl)-amino]-ethyl}-carbamoyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

5,70 g (20,5 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 80 ml trockenem Dichlormethan wurden bei 0° C mit 2,91 g (22,5 mmol) Diisopropylethylamin und 3,1 g (22,5 mmol) HOBt versetzt. Es wurden 7,21 g (20,2 mmol) ({2-[(Diethoxy-phosphorylmethyl)-amino]-ethylamino}-methyl)-phosphorsäure diethyl ester (beschrieben in: *Bull.Acad.Sci.USSR Div.Chem.Sci. – Engl.Transl.* (1960), 616-621) in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Es wurden 8,25 g (40 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 20 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei

Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 150 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit
5 Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (2:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 7a mit 79,8 % Ausbeute (9,99 g, 16,1 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 620

- 10 b) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-[[2-[(1-benzyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-(diethoxy-phosphorylmethyl)-amino]-ethyl]-(diethoxy-phosphorylmethyl)-carbamoyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Zu einer Lösung von 9,91 g (16,0 mmol) 7a in 300 ml Dichlormethan wurden bei –20° C
15 7,52 g (16,0 mmol) 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-trifluoromethansulfonyloxy-hexansäure-benzylester (der entsprechende Alkohol, dessen Synthese in *J. Org. Chem.* (2000) 7667 beschrieben ist, wurde zuvor mit Trifluoromethansulfonsäureanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei –
20° C in das entsprechende Triflat umgewandelt) in 80 ml trockenem Dichlormethan
20 hinzuge tropft. Die Lösung wurde für 2 Std. gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde
25 durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (3:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 7b mit 78,3 % Ausbeute (11,8 g, 12,5 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 940

- 30 c) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-[[2-[(1-benzyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-(diethoxy-phosphorylmethyl)-amino]-ethyl]-(diethoxy-phosphorylmethyl)-amino]-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 11,7 g (12,5 mmol) 7b in 150 ml trockenem THF wurden 87,2 ml (87,2 mmol) BH₃-THF-Lösung (1M)
35 hinzuge tropft. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung

-48-

wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in 200 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Hexan-Essigester (2:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 7c mit
5 64,2 % Ausbeute (7,40 g, 8,00 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 926

d) (1'R,2R,5S)-5-[[{2-[(1-Benzyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-(diethoxy-phosphorylmethyl)-amino]-ethyl}-(diethoxy-phosphorylmethyl)-amino]-methyl]-
10 1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu *Tetrahedron*, 52, 44, (1996), 13867-13880: Zu einer Lösung von 7,39 g (7,99 mmol) 7c in 40 ml CCl₄ und 40 ml Acetonitril wurden ~ 150 mg Rutheniumdioxid monohydrat und 34,3 g (0,16 mol) Natriumperodat in 60 ml Wasser hinzugegeben. Die
15 Reaktionslösung wurde für 3 Tage gerührt. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl-Lösung auf pH = 6 eingestellt und dreimal mit je 60 ml Dichlormethan-*iso*-Propanol-Gemisch (10:1) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-
20 Essigester (1:2,5)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 7d mit 72,4 % Ausbeute (5,16 g, 5,78 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 893

e) (1'R,2R,5S)-5-[[{2-[(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-(ethoxy-hydroxy-phosphorylmethyl)-amino]-ethyl}-(ethoxy-hydroxy-phosphorylmethyl)-amino]-methyl]-1-carboxymethyl-
25 pyrrolidin-2-carbonsäure

Zu einer gerührten Lösung von 6,50 g (7,83 mmol) 7d in 100 ml *iso*-Propanol wurden 1,1 g Palladium auf Kohle (5%) hinzugegeben. Die Atmosphäre über der
30 Reaktionslösung wurde bei Normaldruck mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde eingengt. Der Rückstand wurde in 70 ml Dioxan aufgenommen und mit 40 ml (80 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden bei 40° C gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt. Es wurde saurer Ionenaustauscher IRA 120
35 hinzugegeben bis der pH-Wert bei 3 lag. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert.

Dioxan wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 80 ml Dichlormethan aufgenommen und tropfenweise mit 30 g (263 mmol) Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. In destilliertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde erneut in Wasser aufgenommen und wieder gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 7e in 71,7 % Ausbeute (3,47 g; 5,61 mmol)

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 619

10

Beispiel 8

a) (4-Methoxy-benzylamino)-essigsäure *tert*-butyl ester

15

Zu einer gut gerührten Lösung von 25,0 g (185 mmol) Glycin *tert*-butyl ester (Bachem) in 250 ml Methanol wurden 25,2 g (185 mmol) Anisaldehyd in 50 ml Methanol hinzugegeben. Es wurden 16,9 g (278 mmol) Natriumcyanoborhydrid in fester Form hinzugegeben. Die Lösung wurde für 5 Stunden gerührt, eingeeengt und mit Wasser und Essigester (je 450 ml) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (1:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 8a mit 73,7 % Ausbeute (34,3 g, 136 mmol).

20

b) (2R,5S)-1-Benzyl-5-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(4-methoxy-benzyl)-carbamoyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

30

17,5 g (63,0 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (Gazz.Chim.Ital. 126, 8, (1996), 543-554) in 220 ml trockenem Dichlormethan wurden bei 0° C mit 8,95 g (69,2 mmol) Diisopropylethylamin und 9,34 g (69,2 mmol) HOBt versetzt. Es wurden 15,6 g (62,1 mmol) 8a in 220 ml trockenem Dichlormethan hinzugegeben. Es wurden 25,3 g (123 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 80 ml

35

trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 500 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 250 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen
5 Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (3:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 8b mit 71,8 % Ausbeute (22,8 g, 44,6 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 511

10

c) (2R,5S)-1-Benzyl-5-[[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(4-methoxy-benzyl)-amino]-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 22,5 g (44,1
15 mmol) 8b in 150 ml trockenem THF wurden 308 ml (308 mmol) BH₃-THF-Lösung (1M) hinzuge tropft. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in 250 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch
20 gereinigt (SiO₂, Hexan-Essigester (2:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 8c mit 61,8 % Ausbeute (13,5 g, 27,3 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 497

d) (2R,5S)-1-Benzyl-5-[(*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl]-pyrrolidin-2-
25 carbonsäure ethyl ester

Zu einer gerührten Lösung von 6,8 g (30 mmol) 2,3-Dichloro-5,6-dicyanbenzochinon in 120 ml Dichlormethan und 7,5 ml Wasser wurden 9,39 g (20 mmol) 8c in 30 ml Dichlormethan hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 Stunden gerührt. Die
30 Reaktionslösung wurde auf 100 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-

Essigester (1,5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 8d mit 72,4 % Ausbeute (5,45 g, 14,5 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 377

- 5 e) (2R,2'R,2''R,5S)-1-Benzyl-5-[(2-[bis-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl)-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Zu einer gerührten Suspension von 30 ml Acetonitril, 30 ml Phosphatpuffer (pH = 8) und 5,40 g (14,3 mmol) 8d wurden 4,63 g (14,3 mmol) 2-[(2-Bromo-ethyl)-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-propionsäure ethyl ester (dessen Darstellung im nächsten Absatz beschrieben wird) in 10 ml Acetonitril hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 10 Stunden gerührt. Der Suspension wurden 100 ml Diethylether und 100 ml Eiswasser hinzugesetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen
15 Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 8e mit 69,7 % Ausbeute (6,18 g; 9,97 mmol).

- 20 Synthese von 2-[(2-Bromo-ethyl)-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-propionsäure ethyl ester

Zu einer Lösung von 17,0 g (279 mmol) Aminoethanol in 200 ml Dichlormethan wurden bei -20°C 140g g (558 mmol) 2-Trifluoromethansulfonyloxy-propionsäure-ethylester (der entsprechende Alkohol (Aldrich) wurde zuvor mit Triflatanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -20°C in das Triflat umgewandelt) gelöst in 80 ml Dichlormethan hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 Stunden bei -20°C und 6 Stunden bei 0°C gerührt. Die Lösung wurde auf 300 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal
30 mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (2:1)) gereinigt. Das Zwischenprodukt wurde in 200 ml Dichlormethan gelöst und bei 0°C mit 73 g (279 mmol) Triphenylphosphin und 93 g
35 (279 mmol) Tetrabrommethan in 100 ml Dichlormethan, versetzt. Die Lösung wurde

über Nacht gerührt und auf 400 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde in 400 ml Hexan aufgenommen und über Nacht bei 0° C gerührt. Die Suspension wurde filtriert. Das Filtrat wurde eingeengt und durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 2-[(2-Bromo-ethyl)-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-propionsäure ethyl ester mit 63,5 % Ausbeute (57 g, 177 mmol).

f) (1''R,2R,2'R,2''R,5S)- 1-(1-Benzoyloxycarbonyl-5-tert-butoxycarbonylamino-pentyl)-5-[(2-[bis-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl)-tert-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Zu einer gerührten Lösung von 6,10 g (9,84 mmol) 8e in 70 ml iso-Propanol wurden 0,5 g Palladium auf Kohle (10%) hinzugegeben. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden gerührt und dann filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 80 ml Dichlormethan aufgenommen und bei -20° C mit 4,62 g (9,84 mmol) 6-tert-Butoxycarbonylamino-2-trifluoromethansulfonyloxy-hexansäurebenzylester (der entsprechende Alkohol, dessen Synthese in *J. Org. Chem.* (2000) 7667 beschrieben ist, wurde zuvor mit Trifluoromethansulfonsäureanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -20° C in das entsprechende Triflat umgewandelt) in 30 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Die Lösung wurde für 2 Std. gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (6:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 8f mit 69,3 % Ausbeute (4,97 g, 6,82 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 729

g) (1''R,2R,2'R,2''R,5S)- 1-(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-5-[(2-[bis-(1-carboxy-ethyl)-amino]-ethyl)-carboxymethyl-amino)-methyl]-pyrrolidine-2-carboxylic acid

4,90 g (6,72 mmol) 8f wurden in 70 ml Dioxan gelöst und mit 40 ml (80 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden bei 40° C gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt. Es wurde saurer Ionenaustauscher IRA 120
5 hinzugegeben bis der pH-Wert bei 3 lag. Der Ionenaustauscher wurde durch Filtration abgetrennt. Dioxan wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 80 ml Dichlormethan aufgenommen und tropfenweise mit 30 g (263 mmol) Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde am
10 Rotationsverdampfer eingeengt. In destilliertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde erneut in Wasser aufgenommen und wieder gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 8g in 67,9 % Ausbeute (2,37 g; 4,56 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 519

15

Beispiel 9

a) (R)-2-{tert-Butoxycarbonylmethyl-[2-(tert-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethyl]-amino}-propionsäure ethyl ester

20

Eine -40° C kalten, gerührten Lösung von 28,8 g (100 mmol) 1,2-Diessigsäure-*tert*-butylester-ethylen-diamin (*J. Med. Chem.*, 29, 7, (1986), 1231-1237), 7,4 g (57 mmol) Diisopropyl-ethylamin und 250 ml Dichlormethan wurde tropfenweise mit 6,1 g (28 mmol) 2-Trifluoromethansulfonyloxy-propionsäure-ethylester (um das Rohprodukt
25 dieser Verbindung zu erhalten wurde (-)-Milchsäureethylester mit Triflatanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -20° C in das entsprechende Triflat umgewandelt) in 20 ml Dichlormethan versetzt. Die Lösung wurde für 1 Std. gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 2 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase
30 wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (2:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 9a mit 70,4 % Ausbeute (7,66 g, 19,7
35 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 389

- b) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-(*tert*-butoxycarbonylmethyl-{2-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl}-carbamoyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Eine Lösung von 5,7 g (20 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 80 ml trockenem Dichlormethan wurde bei 0° C mit 2,84 g (22 mmol) Diisopropylethylamin und 3 g (22 mmol) HOBt versetzt. Es wurden 7,60 g (19,6 mmol) 9a in 50 ml trockenem Dichlormethan hinzugegeben. Es wurden 8,3 g (40 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 50 ml trockenem Dichlormethan hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 300 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 9b mit 78,2 % Ausbeute (9,93 g, 15,3 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 648

- c) (1'R,2R,5S)-5-(*tert*-Butoxycarbonylmethyl-{2-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl}-carbamoyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Zu einer gerührten Lösung von 9,85 g (15,2 mmol) 9b in 100 ml *iso*-Propanol wurden 1,5 g Pd/C (10%) hinzugefügt. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und eingeengt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 9c mit 8,25 g (14,8 mmol) und 97,4 % Rohausbeute. 9c wurde ohne Reinigung für die folgende Reaktion eingesetzt.

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 558

d) (1'R,2R,5S)-1-(1-Benzoyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-5-(*tert*-butoxycarbonylmethyl-{2-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl}-carbamoyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

- 5 Zu einer Lösung von 8,10 g (14,5 mmol) 9c in 80 ml Dichlormethan wurden bei -30° C 8,45 g (18 mmol) 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-trifluoromethansulfonyloxy-hexansäurebenzylester (der entsprechende Alkohol, dessen Synthese in J. Org. Chem. [2000] 7667 beschrieben ist, wurde zuvor mit Triflatanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -20° C in das Triflat umgewandelt) in 50 ml trockenem
10 Dichlormethan hinzuge tropft. Die Lösung wurde für 2 Std. gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 5 Stunden gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit
15 Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 9d mit 75,6 % Ausbeute (9,61 g, 11,0 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 878

- 20 e) (1'R,2R,5S)-1-(1-Benzoyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-5-[(*tert*-butoxycarbonylmethyl-{2-[*tert*-butoxycarbonylmethyl-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl}-amino)-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

- Analog zu J. Am. Chem. Soc., 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 9,5 g (10,8 mmol)
25 9d in 50 ml trockenem THF wurden 70 ml (70 mmol) BH₃-THF-Lösung (1M) hinzuge tropft. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in 100 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch
30 gereinigt (SiO₂, Hexan-Essigester (5:2)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 9e mit 73,8 % Ausbeute (6,90 g, 7,99 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 864

- f) (1'R,2R,5S)-1-(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-5-[(2-[(1-carboxy-ethyl)-carboxymethyl-amino]-ethyl)-carboxymethyl-amino)-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure
35

Zu einer Lösung von 6,8 g (7,88 mmol) 9e in 80 ml *iso*-Propanol wurden 1 g Pd/C (10%) hinzugefügt. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 5 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und eingengt. Der Rückstand wurde in 50 ml Dichlormethan aufgenommen, auf -5 °C abgekühlt und mit 50 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer zügig eingengt. Der Rückstand wurde mittels Ölpumpenvakuum konzentriert und in 40 ml Dioxan aufgenommen. Es wurden 50 ml destilliertes Wasser und 15 ml (30 mmol) einer 2N Natriumhydroxydlösung hinzugefügt. Die Lösung wurde für 2 Stunden bei 40° C gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt. Es wurde saurer Ionenaustauscher IRA 120 hinzugegeben bis der pH-Wert bei 3 lag. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert. Dioxan im Filtrat wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 9f mit 74,1 % Ausbeute (2,95 g; 5,83 mmol).

MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 505

Beispiel 10

20

a) (1'R,2R)-2-(Benzyl-{2-[benzyl-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl}-amino)-propionsäure ethyl ester

Zu einer Lösung von 12,0 g (50 mmol) N,N-Dibenzyl-ethan-1,2-diamin in 150 ml Dichlormethan wurden 26,1 g (120 mmol) 2-Trifluoromethansulfonyloxy-propionsäure-ethylester (um das Rohprodukt dieser Verbindung zu erhalten wurde (-)-Milchsäureethylester mit Triflatanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -20° C in das entsprechende Triflat umgewandelt) in 40 ml Dichlormethan hinzugefügt. Die Lösung wurde für 1 Std. gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 2 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde durch

-57-

Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 10a mit 72,7 % Ausbeute (16,0 g, 36,4 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 441

5 b) (1'R,2R)-2-[2-(1-Ethoxycarbonyl-ethylamino)-ethylamino]-propionsäure ethyl ester

Zu einer gerührten Lösung von 15,5 g (35,2 mmol) 10a in 100 ml *iso*-Propanol wurden 2,5 g Pd/C (10%) hinzugefügt. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 6,5 Stunden gerührt. Die
10 Reaktionslösung wurde filtriert und eingeeengt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 10b mit 8,71 g (33,5 mmol) und 95,1 % Rohausbeute. 10b wurde ohne Reinigung für die folgende Reaktion eingesetzt.

15 c) (1'R,1''R,2R,5S)-1-Benzyl-5-[(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-[2-(1-ethoxycarbonyl-ethylamino)-ethyl]-carbamoyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

15,3 g (55,0 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 180 ml trockenem Dichlormethan wurden bei 0° C mit 7,81 g (60,4 mmol) Diisopropylethylamin und 8,1 g (60,4 mmol) HOBt
20 versetzt. Es wurden 20,8 g (80 mmol) 10b in 120 ml trockenem Dichlormethan hinzugegotropft. Es wurden 22,7 g (110 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 70 ml trockenem Dichlormethan hinzugegotropft. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 300 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase
25 wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 10c mit 79,3 % Ausbeute (22,6 g, 43,6 mmol).

30 MS-FAB (M⁺ +1, 21): 520

d) (1'R,1''R,1'''R,2R,5S)-1-Benzyl-5-[[2-[(1-benzyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl)-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-carbamoyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

35

Zu einer Lösung von 13,0 g (25,0 mmol) 10c in 120 ml Dichlormethan wurden bei -30°C 12,7 g (27,0 mmol) 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-trifluoromethansulfonyloxyhexansäure-benzylester (der entsprechende Alkohol, dessen Synthese in J. Org. Chem. [2000] 7667 beschrieben ist, wurde zuvor mit Triflatanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei -20°C in das Triflat umgewandelt) in 70 ml trockenem Dichlormethan hinzugegeben. Die Lösung wurde für 2 Std. gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 5 Stunden gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (3,5:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 10d mit 72,9 % Ausbeute (15,3 g, 18,23 mmol).

MS-FAB ($\text{M}^+ + 1$, 21): 840

15

e) (1'R,1''R,1'''R,2R,5S)-5-[[2-[(1-Benzoyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl]-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-carbamoyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

20 Analog zu J. Am. Chem. Soc., 112, 26, (1990): Zu einer Lösung von 15,0 g (17,9 mmol) 10d in 150 ml trockenem THF wurden 125 ml (125 mmol) BH_3 -THF-Lösung (1M) hinzugegeben. Die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt und für 2h gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde in 600 ml Methanol aufgenommen und für 2h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Hexan-Essigester (3:1)). Es ergab sich das gewünschte Produkt 10e mit 59,7 % Ausbeute (8,79 g, 10,7 mmol).

30 f) (1'R,1''R,1'''R,2R,5S)-5-[[[2-[(1-Benzoyloxycarbonyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-pentyl)-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-ethyl]-(1-ethoxycarbonyl-ethyl)-amino]-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

Analog zu Tetrahedron, 52, 44, (1996), 13867-13880: Zu einer Lösung von 14,0 g (16,5 mmol) 10d in 60 ml CCl_4 und 60 ml Acetonitril wurden katalytische Mengen (ca. 0,5 g) Rutheniumdioxid-monohydrat und 71,6 g (0,334 mol) Natriumperodat in 100 ml

-59-

Wasser hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 3 Tage gerührt. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl-Lösung auf pH = 6 eingestellt und dreimal mit je 100 ml Dichlormethan-*iso*-Propanol-Gemisch (10:1) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit
5 Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (1:1,5)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 10f mit 73 % Ausbeute (9,85 g, 12,0 mmol).

MS-FAB: 794 (M⁺ +1, 35)

10 g) (1'R,1''R,1'''R,2R,5S)-5-[[2-[(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-(1-carboxy-ethyl)-amino]-ethyl)-(1-carboxy-ethyl)-carbonyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

4,92 g (6,0 mmol) 10f wurden in 30 ml Trifluoressigsäure gelöst und für 4 Std. gerührt. Die Lösung wurde eingeengt und mit 15 ml (30 mmol) 2N Lithiumhydroxidlösung
15 versetzt. Die Lösung wurde auf 40° C erwärmt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt. Es wurde mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Das Methanol im Filtrat wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 10g nach RP-Chromatographie mit Wasser-Acetonitril-Gemisch (9:1 → 4:1) mit 70,1 % Ausbeute
20 (4,2 mmol).

MS-FAB: 533 (M⁺ +1, 38)

Beispiel 11

25

(1'R,2R,5S)-5-([2-({1-Carboxy-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-pentyl}-carboxymethyl-amino)-ethyl]-carboxymethyl-amino)-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

30 Zu einer gerührten Lösung von 981 mg (2 mmol) 5f und 774 mg (6 mmol) Diisopropylethylamin in 20 ml DMF wurden bei 0° C 800 mg (3 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionsäure 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester (Aldrich) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde tropfenweise auf 120 ml heftig gerührten Diethylether gegeben. Die Suspension

-60-

wurde für 30 Minuten gerührt und filtriert. Der Rückstand wurde an der Ölpumpe getrocknet. Ein Teil des Rückstands wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt.
MS-FAB: 642 ($M^+ + 1$, 11)

5 Beispiel 12

(1'R,2R,5S)-5-([2-(4-Amino-phenyl)-1-carboxy-ethyl]-[2-(bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-amino)-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidine-2-carbonsäure

- 10 Zu einer Lösung von 1,11 g (2,0 mmol) 2g in 20 ml *iso*-Propanol und 5 ml dest. Wasser wurden 300 mg Pd/C (10%) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 7 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt. *iso*-Propanol wurde weitgehend am Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Lösung wurde gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde als
- 15 Rohprodukt für nachfolgende Reaktionen eingesetzt: 1,03 g (1,96 mmol) mit 98 % Ausbeute.

MS-FAB: 525 ($M^+ + 1$, 23)

Beispiel 13

20

(1'R,2R,5S)-5-([2-(Bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-[1-carboxy-2-(4-isothiocyanato-phenyl)-ethyl]-amino)-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-carbonsäure

- Zu einem heftig gerührten Zwei-Phasen-System aus 0,53 g (1 mmol) 12, 3 ml Wasser,
- 25 605 mg (6 mmol) Triethylamin und 3 ml Chloroform wurden bei 0° C 114 mg (1 mmol) Thiophosgen in wenig Chloroform hinzugetropft. Die Lösung wurde für 3 Stunden gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gewaschen, mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Die Substanz wurde per HPLC
- 30 auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5µm, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt 13 mit 91% Ausbeute (520 mg, 910 µmol).

MS-FAB: 571 ($M^+ + 1$, 37)

35 Beispiel 14

(1'R,2R,5S)-5-[[[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-{2-[4-(2-bromo-acetylamino)-phenyl]-1-carboxy-ethyl}-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 5 Zu einer Lösung von 0,53 g (1 mmol) 12 und 606 mg (6 mmol) Triethylamin in 10 ml DMF wurden 202 mg (1,1 mmol) Bromessigsäurebromid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührten Diethylether gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser aufgenommen und unverzüglich gefriergetrocknet. Die Substanz wurde per
- 10 HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5µm, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt mit 82 % Ausbeute (520 mg, 820 µmol).
MS-FAB: 635 (M⁺ +1, 37)

15 **Beispiel 15**

(1'R,2R,5S)-5-[[[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-{1-carboxy-2-[4-(2-iodo-acetylamino)-phenyl]-ethyl}-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 20 Zu einer Lösung von 0,53 g (1 mmol) 12 und 606 mg (6 mmol) Triethylamin in 10 ml DMF wurden 274 mg (1,1 mmol) Iodessigsäurebromid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührten Diethylether gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser aufgenommen und unverzüglich gefriergetrocknet. Die Substanz wurde per
- 25 HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5µm, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt mit 88 % Ausbeute (mg, 880 µmol).
MS-FAB: 682 (M⁺ +1, 29)

30 **Beispiel 16**

(1'R,2R,5S)-5-[[[2-{[5-(2-Bromo-acetylamino)-1-carboxy-pentyl]-carboxymethyl-amino}-ethyl)-carboxymethyl-amino]-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

-62-

Zu einer Lösung von 0,49 g (1 mmol) 5 und 606 mg (6 mmol) Triethylamin in 10 ml DMF wurden 202 mg (1,1 mmol) Bromessigsäurebromid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührten Diethylether gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in
 5 Wasser aufgenommen und unverzüglich gefriergetrocknet. Die Substanz wurde per HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5 μ m, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 $\rightarrow$ 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt mit 69 % Ausbeute (423 mg, 690 μ mol).
 MS-FAB: 613 ($M^+ + 1$, 27)

10

Beispiel 17

(1'R,2R,5S)-5-({[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-[1-carboxy-2-(4-{3-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-ethyl]-thioureido}-phenyl)-ethyl]-amino}-methyl)-1-
 15 carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

Zu einer gerührten Lösung von 570 mg (1 mmol) 13 in 5 ml DMF wurde eine Lösung von 154 mg (1,1 mmol) 1-(2-Amino-ethyl)-pyrrol-2,5-dion in 2 ml Dioxan hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt und zu 80 ml heftig gerührten
 20 Diethylether tropfenweise hinzugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde gefriergetrocknet. Ein Teil des Rückstands wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt. Acetonitril-Wasser-Gemisch (20:80). Die Substanz wurde per HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5 μ m, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 $\rightarrow$ 99,9 : 0 :
 25 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt mit 0,11 g (0,15 mmol) in hoher Reinheit.
 MS-FAB: 707 ($M^+ + 1$, 13)

Beispiel 18

30

(2'R,2R,6S)-1-Carboxymethyl-6-{{[carboxymethyl-(2-{[carboxymethyl-[1-carboxy-2-(4-nitro-phenyl)carbamoyloxy]-ethyl]-amino}-ethyl)-amino]-methyl}-piperidin-2-carbonsäure

Zu einer Lösung von 4 g (8,6 mmol) 1g in 50 ml DMF wurden 879 mg (8,7 mmol)
 35 Triethylamin hinzugegeben. Die Lösung wurde für 20 min gerührt. Es wurden 1,48 g (9

-63-

mmol) 1-Isocyanato-4-nitro-benzol (J.Med.Chem.; 40; 11; (1997); 1755-1761) in 5 ml DMF hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 8 h bei 60°C gerührt. Die Lösung wurde auf 600 ml gerührten Ether getropft. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Ein Teil des Rückstands wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt (Acetonitril-Wasser-Gemisch (15:85)). Die Substanz wurde per HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5 µm, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt mit 103 mg (0,15 mmol) in 98 % Reinheit.

MS-FAB: 628 ($M^+ + 1$, 13).

Beispiel 19

(2'R,2R,6S)-6-({[2-({[1-Carboxy-2-(4-isocyanato-phenylcarbamoyloxy)-ethyl]-carboxymethyl-amino}-ethyl)-carboxymethyl-amino]-methyl}-1-carboxymethyl-piperidin-2-carbonsäure

Zu einer Lösung von 4 g (8,6 mmol) 1g in 50 ml DMF wurden 879 mg (8,7 mmol) Triethylamin hinzugegeben. Die Lösung wurde für 20 min gerührt. Es wurden 12,8 g (80 mmol) 1,4-Diisocyanato-benzol (J.Org.Chem.; 41; 1976; 2070-2071) in 10 ml DMF in einem Schuss zur Reaktionslösung hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 8 h bei 60°C gerührt. Die Lösung wurde auf 600 ml gerührten Ether getropft. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Ein Teil des Rückstands wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt (Acetonitril-Wasser-Gemisch (15:85)). Die Substanz wurde per HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5 µm, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt mit 103 mg (0,15 mmol) in 98 % Reinheit.

MS-FAB: 624 ($M^+ + 1$, 22).

Beispiel 20

Antikörperkonjugat von (1'R,2R,5S)-5-({[2-({[1-Carboxy-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-pentyl]-carboxymethyl-amino}-ethyl)-carboxymethyl-amino]-methyl}-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

200 µg eines Antikörpers mit freizugänglichen Thiolgruppen (z.B. HuM195 (vgl. Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; im Handel erhältlich bei Protein Design Labs Inc., Mountainview, CA, USA) - besitzt der Antikörper keine frei zugänglichen Thiolgruppen, können diese durch die Verwendung von 2-Iminothiolan HCl erzeugt werden (z.B. EP 0 607 222 B1)) wurden in 1,2 ml Boratpuffer (50 mM, pH 8,5) verdünnt, mit 154 µg (240 nmol) Produkt aus Beispiel 11, gelöst in 50 µl Boratpuffer (s.o.), versetzt und 3 Stunden bei 37°C gerührt. Es wurde über eine NAP-5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, Mobile Phase: PBS) gereinigt.

10

Beispiel 21

Indiumkomplex des Antikörperkonjugats von (1'R,2R,5S)-5-([2-({1-Carboxy-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-pentyl}-carboxymethyl-amino)-ethyl]-carboxymethyl-amino)-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

200 µg eines Antikörpers mit freizugänglichen Thiolgruppen (z.B. HuM195 (vgl. Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; im Handel erhältlich bei Protein Design Labs Inc., Mountainview, CA, USA) - besitzt der Antikörper keine frei zugänglichen Thiolgruppen, können diese durch die Verwendung von 2-Iminothiolan HCl erzeugt werden (z.B. EP 0 607 222 B1)) wurden in 1,2 ml Boratpuffer (50 mM, pH 8,5) verdünnt, mit 154 µg (240 nmol) Produkt aus Beispiel 11, gelöst in 50 µl Boratpuffer (s.o.), versetzt und 3 Stunden bei 37°C gerührt. Die Borat-Pufferlösung wurde gegen einen Acetatpuffer ausgetauscht, indem die Probelösung dreimal für 1h im Slide-A-Lyzer 10000, Pierce MWCO (Dialyse-Verfahren) gegen jeweils 200 ml NaOAc-Puffer 0,1 M (pH 6,0) gestellt wurde. Abschließend wurde über Nacht gegen 400 ml NaOAc-Puffer 0,1M (pH 6) gestellt. Die Lösung wurde mit 80 µl (0.05M HCl) [¹¹¹In]InCl₃ (27,88 MBq) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde über eine NAP-5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, Mobile Phase: PBS) gereinigt.

Beispiel 22

-65-

(1'R,2R,5S)-5-[[[2-[(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-(ethoxy-hydroxy-phosphorylmethyl)-amino]-ethyl]-(ethoxy-hydroxy-phosphorylmethyl)-amino]-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 5 Zu einer gerührten Lösung von 6,50 g (7,83 mmol) 7d in 100 ml iso-Propanol wurden 1,1 g Palladium auf Kohle (5%) hinzugegeben. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde bei Normaldruck mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde eingeeengt. Der Rückstand wurde in 70 ml Dioxan aufgenommen und mit 10 ml
- 10 (20 mmol) Lithiumhydroxydlösung (2N) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 16 Stunden bei 45° C gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt. Es wurde saurer Ionenaustauscher IRA 120 hinzugegeben bis der pH-Wert bei 3 lag. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert. Dioxan wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in
- 15 80 ml Dichlormethan aufgenommen und tropfenweise mit 30 g (263 mmol) Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. In destilliertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde erneut in Wasser aufgenommen und wieder gefriergetrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 22
- 20 in 65,3 % Ausbeute (3,5 g; 5,11 mmol)
- MS-FAB ($M^+ + 1$, 21): 619

Beispiel 23

- 25 (1'R,2R,5S)-5-[[[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-[1-carboxy-2-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-phenyl]-ethyl]-amino]-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

In Anlehnung an *Tetrahedron Lett.*; 38; 46; 1997; 8089-8092:

- 30 Ein Gemisch aus ca. 1 g getrocknetem Kieselgel, 100 mg (1,0 mmol) Maleinsäureanhydrid, 550 mg (1,0 mmol) 2g und 35,6 mg (0,1 mmol) Tantal-(V)-chlorid wurden in der Mikrowelle (300W) für 5 min erhitzt. Der Rückstand wurde über einer Fritte mit Methanol eluiert. Das Filtrat wurde eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde gefriergetrocknet. Ein Teil des Rückstands
- 35 wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt. Acetonitril-Wasser-Gemisch (20:80).

-66-

Die Substanz wurde per HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5 μ m, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 $\rightarrow$ 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt 23 mit 99 mg (0,16 mmol) in 96 % Reinheit.

5 MS-FAB: 605 (M^+ +1, 21)

Beispiel 24

(1'R,2R,5S)-5-{[(2-{[1-Carboxy-5-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-pentyl]-carboxymethyl-amino}-ethyl)-carboxymethyl-amino]-methyl}-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

10

In Anlehnung an *Tetrahedron Lett.*; 38; 46; 1997; 8089-8092:

Ein Gemisch aus ca. 1 g getrocknetem Kieselgel, 100 mg (1,0 mmol) Maleinsäureanhydrid, 550 mg (1,0 mmol) 2g und 35,6 mg (0,1 mmol) Tantal-(V)-chlorid wurden in der Mikrowelle (300W) für 5 min erhitzt. Der Rückstand wurde über einer Fritte mit Methanol eluiert. Das Filtrat wurde eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde gefriergetrocknet. Ein Teil des Rückstands wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt. Acetonitril-Wasser-Gemisch (20:80).

15

20 Die Substanz wurde per HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5 μ m, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 $\rightarrow$ 99,9 : 0 : 0,1). Es ergab sich das gewünschte Produkt 23 mit 85 mg (0,15 mmol) in 96 % Reinheit.

MS-FAB: 572 (M^+ +1, 21)

25

Beispiel 25

a) (1'R,2R,5S)-1-Benzyl-5-[[tert-butoxycarbonylmethyl-(2-{tert-butoxycarbonylmethyl-[1-methoxycarbonyl-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-amino}-ethyl)-amino]-methyl]-pyrrolidine-2-carbonsäureethyl ester

30

Zu einer Lösung von 9,1 g (16,6 mmol) 5a in 150 ml Dichlormethan wurden bei -20° C 5,93 g (16,6 mmol) (S)-3-(4-Nitro-phenyl)-2-trifluoromethanesulfonyloxy-propionsäure methylester (der entsprechende Alkohol, dessen Synthese in *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1*; 24; 1996; 2895-2900 beschrieben ist, war zuvor mit

35

-67-

Trifluormethansulfonsäureanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei – 20° C in das entsprechende Triflat umgewandelt worden) in 150 ml trockenem Dichlormethan hinzugetropft. Die Lösung wurde für 2 Std. gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde auf heftig gerührtes Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 25a mit 68 % Ausbeute (8,37 g, 11,3 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 741

b) (1'R,2R,5S)-5-[[tert-Butoxycarbonylmethyl-(2-{tert-butoxycarbonylmethyl-[1-methoxycarbonyl-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-amino}-ethyl)-amino]-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidine-2-carbonsäureethyl ester

Analog zu *Tetrahedron*, 52, 44, (1996), 13867-13880: Zu einer Lösung von 2,82 g (3,8 mmol) 25a in 15 ml CCl₄ und 15 ml Acetonitril wurden ~50 mg Rutheniumdioxid monohydrat und 16,3 g (76 mmol) Natriumperodat in 22 ml Wasser hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 3 Tage gerührt. Die Lösung wurde mit verdünnter HCl-Lösung auf pH = 6 eingestellt und dreimal mit je 250 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (2:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 25b mit 70,0 % Ausbeute (1,88 g, 2,66 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 21): 709

c) (1'R,2R,5S)-1-Carboxymethyl-5-[[carboxymethyl-(2-{carboxymethyl-[1-carboxy-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-amino}-ethyl)-amino]-methyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure

1,60 g (2,26 mmol) 25b wurden in 10 ml Dichlormethan und 3 ml Anisol gelöst. Es wurden 2 ml Trifluoressigsäure hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 5 Stunden gerührt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 20 ml MeOH bei 0° C mit

-68-

10 ml (20 mmol) Natronlauge (2N) versetzt. Die Lösung wurde auf 40° C erwärmt und für 14 Std. gerührt. Die Lösung wurde mit Ionenaustauscherharz (IR 120) versetzt bis der pH-Wert 3 erreichte. Das Harz wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt und gefriertrocknet. Ein Teil des Rückstands wurde durch semipräparative
5 RP-HPLC gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 25c in 123 mg (0,22 mmol). Die Substanz wurde per HPLC auf Reinheit überprüft: HyPurity C18 (5 µm, 150 x 3,0 mm) mit Acetonitril- : Wasser- : Trifluoressigsäure-Gradient (3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1).
MS-FAB (M⁺ +1, 21): 555

10

Beispiel 26

15 a) (2R,5S)-1-Benzyl-5-(2-tert-butoxycarbonylamino-propylcarbamoyl)-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

11,4 g (41 mmol) (2R,5S)-1-Benzyl-pyrrolidin-2,5-dicarbonsäure-2-ethylester (*Gazz.Chim.Ital.* 126, 8, (1996), 543-554) in 150 ml trockenem Dichlormethan wurden
20 bei 0°C mit 5,82 g (45 mmol) Diisopropylethylamin und 6,1 g (45 mmol) HOBt versetzt. Es wurden 7 g (40 mmol) (2-Amino-1-methyl-ethyl)-carbaminsäure tert-butyl ester (WO 00/51976) in 100 ml trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Es wurden 16,5 g (80 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 50 ml trockenem Dichlormethan hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die
25 Reaktionslösung wurde auf 300 ml gerührtes Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-
30 Essigester (4:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 26a mit 78 % Ausbeute (24,5 g, 13,5 mmol).
MS-FAB (M⁺ +1, 41): 434

b) (2R,5S)-5-[(2-Amino-propylamino)-methyl]-1-benzyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl
35 ester

20 g (46,2 mmol) 2a wurden in 100 ml Dichlormethan gelöst und mit 100 ml Trifluoressigsäure versetzt. Es wurde für eine Stunde gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in 150 ml THF aufgenommen und mit 150 ml (150 mmol) Borandimethylsulfid-Komplex versetzt. Die Lösung wurde für 3 Stunden bei 40°C gerührt. Die Lösung wurde eingeeengt und mit 200 ml HCl-Gas gesättigtem Essigester versetzt. Das Hydrochlorid der obengenannten Verbindung fiel als weißer Niederschlag aus und wurde filtriert und an der Ölpumpe getrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt als Dihydrochlorid mit 82% (14,8 g, 37,9 mmol).

10 MS-FAB ($M^+ + 1$, 38): 320

c) (2R,5S)-1-Benzyl-5-([2-(bis-tert-butoxycarbonylmethyl-amino)-propyl]-tert-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

15 14 g (36 mmol) 2b wurden in 150 ml Acetonitril und 150 ml dest. Wasser gelöst und mit 19,9 g (144 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Es wurden 28,1 g (144 mol) Bromessigsäure-*tert*-butylester hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 70° C gerührt. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt und mit 500 ml Diethylether verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 200 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan-Essigester (2:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 26c mit 73 % Ausbeute (17,4 g, 26,3 mmol).

20

25 MS-FAB ($M^+ + 1$, 43): 663

d) (1'R,2R,5S)-5-([2-[Bis-(2-tert-butoxy-ethyl)-amino]-propyl]-tert-butoxycarbonylmethyl-amino)-methyl]-1-[1-methoxycarbonyl-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure ethyl ester

30

17 g (25,8 mmol) 26 c wurden in 200 ml iso-Propanol gelöst mit 0,8 g Pd/C (10%) versetzt. Die Atmosphäre über der Reaktionslösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. Die Reaktionslösung wurde für 6 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und eingeeengt. Es ergab sich das gewünschte Zwischenprodukt, welches in 150 ml Dichlormethan aufgenommen wurde und bei -20°C mit 10,7 g (30 mmol) 3-(4-Nitro-

35

-70-

phenyl)-2-trifluoromethanesulfonyloxy-propionsäure methyl ester, welches aus 2-Hydroxy-3-(4-nitro-phenyl)-propionsäure methyl ester (J.Chem.Soc.Perkin Trans.1; 24; 1996; 2895-2900) mit Triflatanhydrid (2eq.) und Pyridin (2,2 eq.) in Dichlormethan bei – 20° C erhalten worden war, versetzt wurde. Die Lösung wurde langsam auf 0°C erwärmt. Die Lösung wurde über Nacht nachgerührt. Die Lösung wurde auf 200 ml Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Hexan-Essigester (2:1)) gereinigt. Es ergab sich das gewünschte Produkt 26d mit 69 % Ausbeute (13.9 g, 17,8 mmol).

MS-FAB (M⁺ +1, 24): 780

15

e) (1'R,2R,5S)-5-({[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-propyl]-carboxymethyl-amino}-methyl)-1-[1-carboxy-2-(4-nitro-phenyl)-ethyl]-pyrrolidin-2-carbonsäure

Zu einer Lösung von 9,20 g (11,8 mmol) 26d in 50 ml MeOH und 50 ml Wasser wurden 40 ml (80 mmol) einer 2M LiOH Lösung hinzuge tropft. Die Lösung wurde für 12 h bei 40°C gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt und mit Ionenaustauscherharz (IR 120) versetzt bis der pH-Wert 3 erreichte. Das Harz wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde gefriertrocknet. Es ergab sich das gewünschte Produkt 26e mit 74 % Ausbeute (8,81 g 8,73 mmol).

25 MS-FAB (M⁺ +1, 35): 569

Beispiel 27

30 Yttriumkomplex des Antikörperkonjugats von (1'R,2R,5S)-5-({[2-({1-Carboxy-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-pentyl}-carboxymethyl-amino)-ethyl]-carboxymethyl-amino}-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

200 µg eines Antikörpers mit freizugänglichen Thiolgruppen (z.B. HuM195 (vgl. Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; im Handel erhältlich bei Protein Design Labs

-71-

Inc., Mountainview, CA, USA) - besitzt der Antikörper keine frei zugänglichen Thiolgruppen, können diese durch die Verwendung von 2-Iminoethanol HCl erzeugt werden (z.B. EP 0 607 222 B1)) wurden in 1,2 ml Boratpuffer (50 mM, pH 8,5) verdünnt, mit 154 µg (240 nmol) Produkt aus Beispiel 11, gelöst in 50 µl Boratpuffer (s.o.), versetzt und bei 3 Stunden bei 37° C gerührt. Die Borat-Pufferlösung wurde gegen einen Acetatpuffer ausgetauscht, indem die Probelösung dreimal für 1h im Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (Dialyse-Verfahren) gegen jeweils 200 ml NaOAc-Puffer 0,1 M (pH 6,0) gestellt wurde. Abschließend wurde über Nacht gegen 400 ml NaOAc-Puffer 0,1M (pH 6) gestellt. Die Lösung wurde mit 50 MBq [⁹⁰Y]YCl₃ versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde über eine NAP-5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, Mobile Phase: PBS) gereinigt .

Beispiel 28

15 Gadolinium-Komplex von (1'R,2R,5S)-5-[(2-[(5-Amino-1-carboxy-pentyl)-carboxymethyl-amino]-ethyl)-carboxymethyl-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

122,8 mg (0,25 mmol) 5f wurden in 4 ml destilliertem Wasser suspendiert, auf 80°C erwärmt und in Lösung gebracht. Es wurde portionsweise mit 45,3 mg (0,125 mmol) Gd₂O₃ versetzt. Die Suspension wurde auf 80° C erwärmt und für eine Stunde gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Natronlauge (1M) auf pH=7 eingestellt. Es wurde das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Es ergab sich das gewünschte mit 161,1 mg (0,25 mmol, 99,8%).

25 MS-FAB (M⁺ +1, 21): 645

Beispiel 29

30 Lutetiumkomplex des Antikörperkonjugats von (1'R,2R,5S)-5-[(2-[(1-Carboxy-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-pentyl)-carboxymethyl-amino)-ethyl]-carboxymethyl-amino)-methyl]-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

200 µg eines Antikörpers mit freizugänglichen Thiolgruppen (z.B. HuM195 (vgl. Michael R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; im Handel erhältlich bei Protein Design Labs

Inc., Mountainview, CA, USA) - besitzt der Antikörper keine frei zugänglichen Thiolgruppen, können diese durch die Verwendung von 2-Iminoethanol HCl erzeugt werden (z.B. EP 0 607 222 B1)) wurden in 1,2 ml Boratpuffer (50 mM, pH 8,5) verdünnt, mit 154 µg (240 nmol) Produkt aus Beispiel 11, gelöst in 50 µl Boratpuffer
5 (s.o.), versetzt und bei 3 Stunden bei 37° C gerührt. Die Borat-Pufferlösung wurde gegen einen Acetatpuffer ausgetauscht, indem die Probelösung dreimal für 1h im Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (Dialyse-Verfahren) gegen jeweils 200 ml NaOAc-Puffer 0,1 M (pH 6,0) gestellt wurde. Abschließend wurde über Nacht gegen 400 ml NaOAc-Puffer 0,1M (pH 6) gestellt. Die Lösung wurde mit 50 MBq [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ versetzt
10 und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde über eine NAP-5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, Mobile Phase: PBS) gereinigt .

Beispiel 30

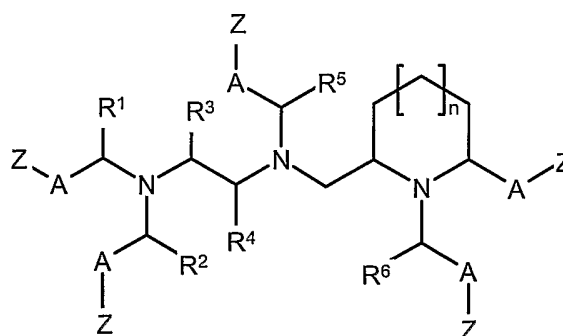
15 Scandiumkomplex des Antikörperkonjugats von (1'R,2R,5S)-5-({[2-({1-Carboxy-5-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionylamino]-pentyl}-carboxymethyl-amino)-ethyl]-carboxymethyl-amino)-methyl)-1-carboxymethyl-pyrrolidin-2-carbonsäure

200 µg eines Antikörpers mit freizugänglichen Thiolgruppen (z.B. HuM195 (vgl. Michael
20 R. McDevitt, J. Nuc. Med. 40, 1999, 1722; im Handel erhältlich bei Protein Design Labs Inc., Mountainview, CA, USA) - besitzt der Antikörper keine frei zugänglichen Thiolgruppen, können diese durch die Verwendung von 2-Iminoethanol HCl erzeugt werden (z.B. EP 0 607 222 B1)) wurden in 1,2 ml Boratpuffer (50 mM, pH 8,5) verdünnt, mit 154 µg (240 nmol) Produkt aus Beispiel 11, gelöst in 50 µl Boratpuffer
25 (s.o.), versetzt und bei 3 Stunden bei 37° C gerührt. Die Borat-Pufferlösung wurde gegen einen Acetatpuffer ausgetauscht, indem die Probelösung dreimal für 1h im Slide-A-Lyzer 10000, Pierce, MWCO (Dialyse-Verfahren) gegen jeweils 200 ml NaOAc-Puffer 0,1 M (pH 6,0) gestellt wurde. Abschließend wurde über Nacht gegen 400 ml NaOAc-Puffer 0,1M (pH 6) gestellt. Die Lösung wurde mit [⁴⁶Sc]ScCl₃ [⁴⁷Sc]ScCl₃ oder
30 [⁴⁸Sc]ScCl₃ versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde über eine NAP-5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sephadex G-25, Mobile Phase: PBS) gereinigt .

-73-

Patentansprüche

1. Konjugate der allgemeinen Formel I

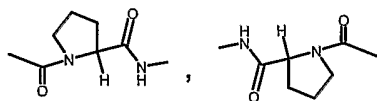


5

I

worin

- Z für ein Wasserstoffatom oder ein Metallionenäquivalent eines Elements der Ordnungszahlen 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 oder 83 steht,
- A für eine Gruppe -COO-, eine Gruppe -P(O)(OC₁-C₆-alkyl)-O- oder eine Gruppe -P(O)(OH)-O- steht,
- n für die Ziffern 0 oder 1 steht,
- 15 R¹ - R⁶ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, einen geradkettigen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten und gegebenenfalls durch ein bis sechs O-Atome, Phenyl-, -NHCO-, -CONH-, -O-(CO)-



20

- und/oder -NH-(C=S)-NH-Gruppen unterbrochenen C₁ - C₂₅ -Alkylrest, der gegebenenfalls an einer beliebigen Stelle mit ein bis sechs Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen, Aminogruppen und/oder einer anderen funktionellen bindenden Gruppe, die mit einem Biomolekül verknüpft sein kann, substituiert ist, oder für eine Phenyl-C₁-C₂₅-alkylgruppe stehen, deren Phenylrest gegebenenfalls mit einer Nitrogruppe, einer Aminogruppe oder einer anderen funktionellen bindenden Gruppe, die mit einem Biomolekül verknüpft sein kann, substituiert ist, sowie deren
- 25

Salze mit organischen oder anorganischen Basen, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten R^1 - R^6 nicht für H steht und dass mindestens einer der Substituenten R^1 - R^6 ein über eine funktionelle Gruppe verknüpftes Biomolekül enthält und mindestens zwei Z für ein Metallionenäquivalent stehen.

5

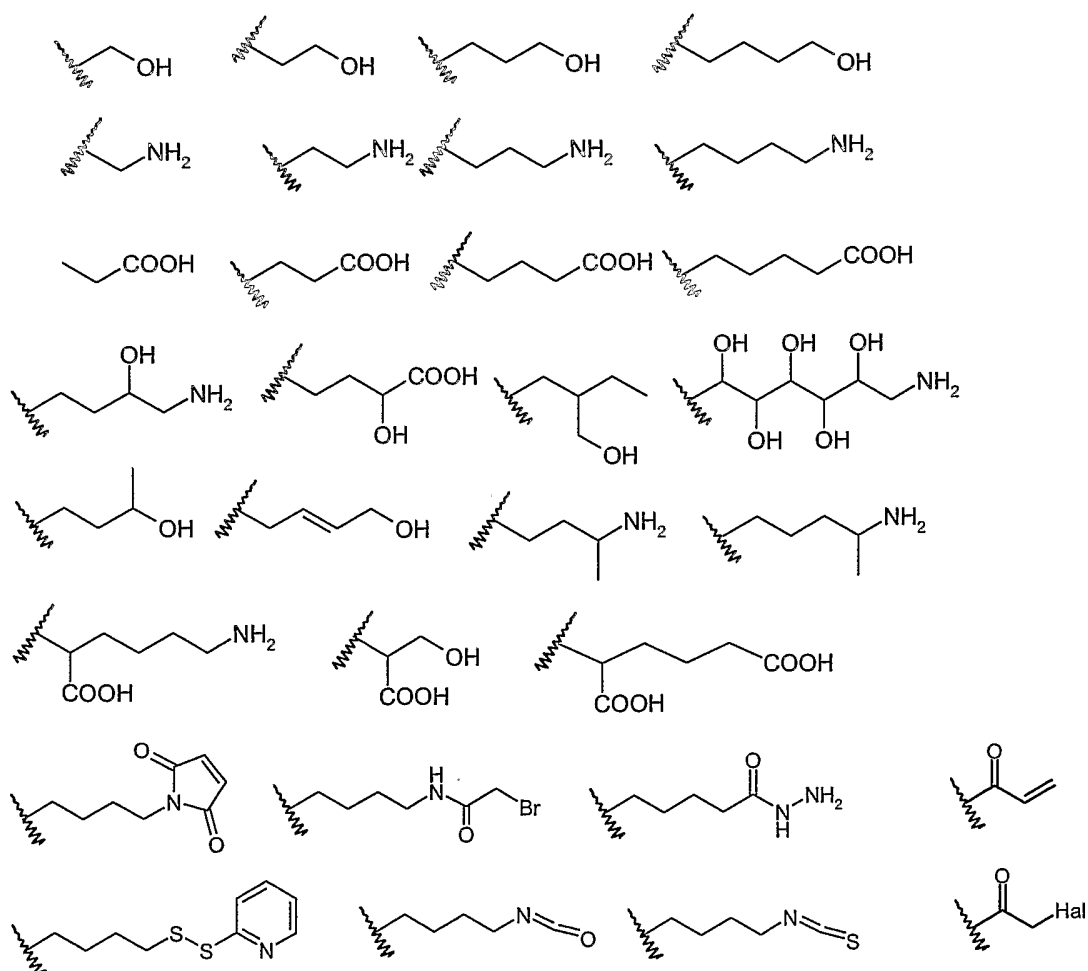
2. Konjugate nach Anspruch 1, worin mindestens zwei der Reste Z für ein Metallionenäquivalent eines paramagnetischen Elements der Ordnungszahlen 21-29, 42, 44 und 58-70 stehen.

10

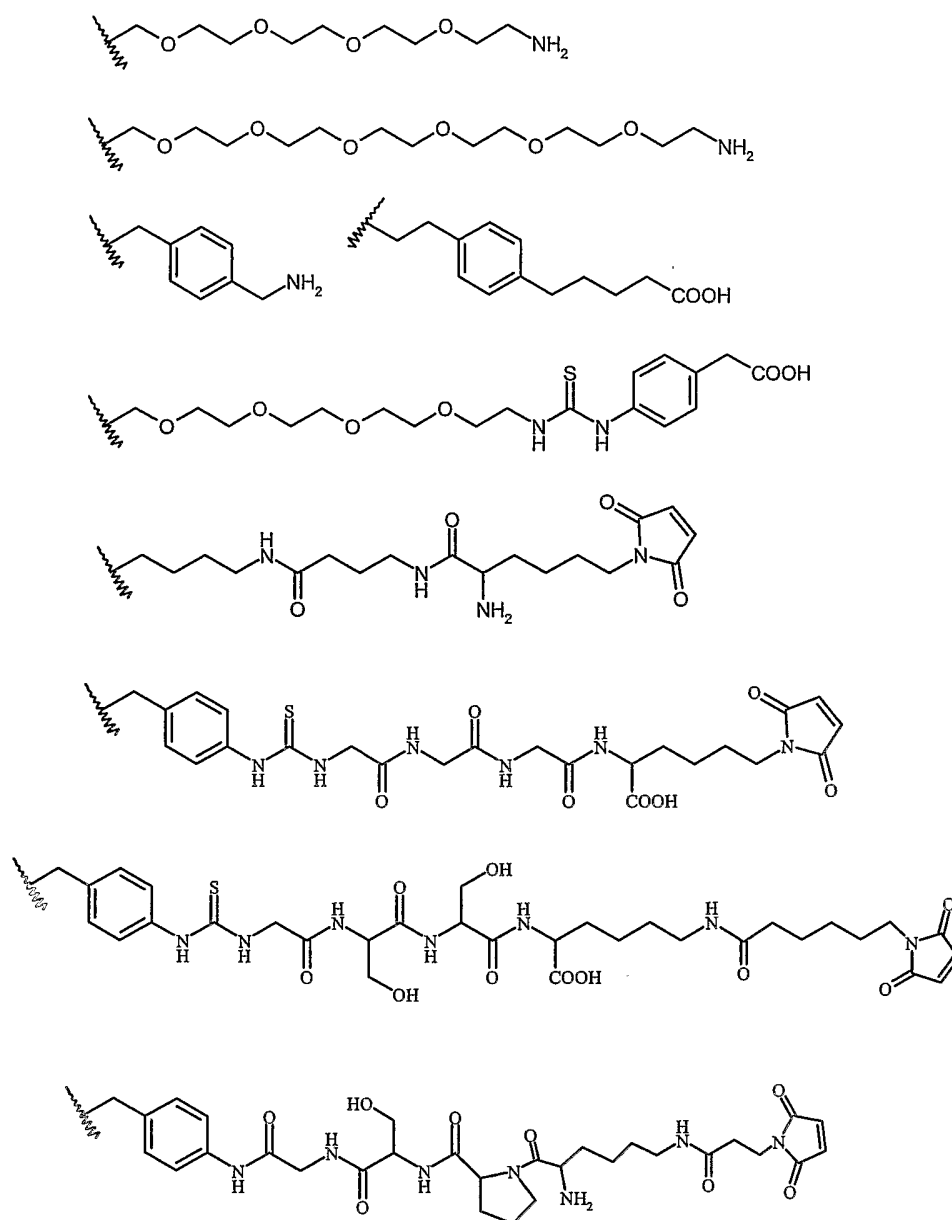
3. Konjugate nach Anspruch 1, worin mindestens zwei der Reste Z für ein Metallionenäquivalent eines radioaktiven Elements der Ordnungszahlen 26, 27, 29, 31, 32, 37-39, 43, 46, 47, 49, 61, 62, 64, 70, 71, 75, 77, 82 und 83 stehen.

15

4. Konjugate nach Anspruch 1, worin die Reste R^1 - R^6 ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

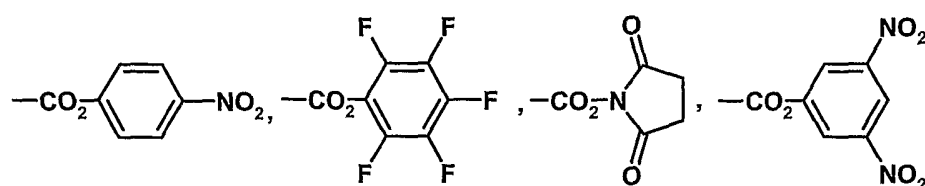


-75-

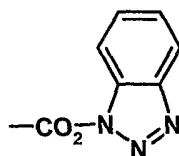


5. Konjugate nach Anspruch 1, worin die in R^1 - R^6 enthaltene funktionelle Gruppe Carboxyl, aktiviertes Carboxyl, Amino, Nitro, Isocyanat, Isothiocyanat, Hydrazin, Semicarbazid, Thiosemicarbazid, Chloracetamid, Bromacetamid, Iodacetamid, Acryl, Acylamino, gemischten Anhydrid, Azid, Säurechlorid, Säurebromid, Hydroxid, Sulfonylchlorid, Vinylsulphon, Carbodiimid, Maleimid oder Diazo ist über die ein Biomolekül verknüpft ist.

6. Verbindungen nach Anspruch 5, worin die aktivierte Carboxylgruppe ausgewählt ist aus



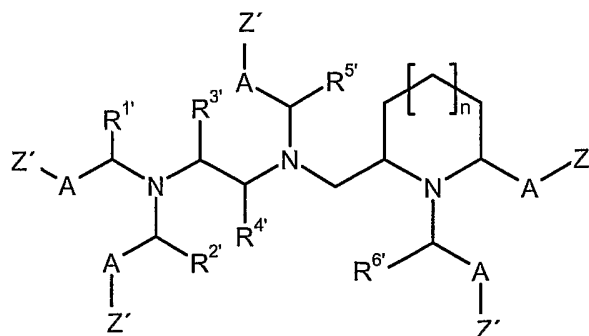
und



7. Verbindungen nach Anspruch 1, worin die Reste R^3 und R^4 ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoffatom, Methyl-, Ethyl-, Benzyl-, Nitrobenzyl-, Hydroxymethyl- und Aminobenzylgruppe.
8. Konjugate nach Anspruch 1, worin das Biomolekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- Biopolymere, Proteine, wie Proteine, die eine biologische Funktion haben, HSA, BSA, etc., Proteine und Peptide, die sich an bestimmten Stellen im Organismus anreichern (z.B. an Rezeptoren, Zellmembranen, Kanälen etc.), durch Proteasen spaltbare Peptide, Peptide mit synthetischen Sollbruchstellen (z.B. labile Ester, Amide etc.), Peptide, die durch Metalloproteasen gespalten werden, Peptide mit photospaltbaren Linkern, Peptide mit oxydativen Mitteln (Oxydasen) spaltbaren Gruppen, Peptide mit natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren, Glycoproteine (Glycopeptide), Signal-Proteine, antivirale Proteine und Apoptosis, synthetisch modifizierte Biopolymere, wie mit Linkern derivatisierte Biopolymere, modifizierte Metalloproteasen und derivatisierte Oxydase etc., Kohlenhydrate (Mono- bis Polysaccharide), wie derivatisierte Zucker, im Organismus spaltbare Zucker, Cyclodextrine und dessen Derivate, Aminozucker, Chitosan, Polysulfate und Acetylneuraminsäure-Derivate, Antikörper, wie monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente, polyklonale Antikörper, Minibodies, Single Chains (auch solche, die mit Linkern zu mehrfachen Fragmenten verknüpft sind), rote Blutkörperchen und andere Blutbestandteile, Cancermarker (z.B. CAA) und Zell-Adhäsions-Stoffe (z.B. Lewis X und Anti-Lewis X-Derivate), DNA und RNA

- Fragmente, wie derivatisierte DNAs und RNAs (z.B. solche, die durch das SELEX-Verfahren gefunden wurden), synthetische RNA und DNA (auch mit unnatürlichen Basen), PNAs (Hoechst) und Antisense, β -Aminosäuren (Seebach), Vektoramine zur Einschleusung in die Zelle, biogene Amine, Pharmazeutika, onkologische Präparate, synthetische Polymere, die auf ein biologisches Target (z.B. Rezeptor) gerichtet sind, Steroide (natürliche und modifizierte), Prostaglandine, Taxol und dessen Derivate, Endotheline, Alkaloide, Folsäure und deren Derivate, bioaktive Lipide, Fette, Fettsäureester, synthetisch modifizierte Mono-, Di- und Triglyceride, Liposome, die an der Oberfläche derivatisiert sind, Micellen aus natürlichen Fettsäuren oder aus Perfluoralkyl-Verbindungen, Porphyrine, Texaphrine, erweiterte Porphyrine, Cytochrome, Inhibitoren, Neuramidasen, Neuropeptide, Immunomodulatoren, wie FK 506, CAPE und Gliotoxin, Endoglycosidasen, Substrate, die durch Enzyme aktiviert werden wie Calmodulin Kinase, Casein-Kinase II, Gluthathion-S-Transferase, Heparinase, Matrix-Metalloproteinasen, β -Insulin-Rezeptor-Kinase, UDP-Galactose 4-Epimerase, Fucosidasen, G-Proteine, Galactosidasen, Glycosidasen, Glycosyltransferasen und Xylosidase, Antibiotika, Vitamin und Vitamin-Analoga, Hormone, DNA-Interkalatoren, Nucleoside, Nucleotide, Lektine, Vitamin B12, Lewis-X und Verwandte, Psoralene, Dientrienantibiotika, Carbacycline, VEGF (vascular endothelial growth factor), Somatostatin und dessen Derivate, Biotin-Derivate, Antihormone, tumorspezifische Proteine und Synthetika, Polymere, die sich in sauren oder basischen Bereichen des Körpers anreichern (pH-gesteuerte Verteilung), Myoglobine, Apomyoglobine etc., Neurotransmitter-Peptide, Tumornecrosefaktoren, Peptide, die sich in entzündetem Gewebe anreichern, Bloodpool-Reagenzien, Anionen und Kationen-Transporterproteine, Polyester (z.B. der Milchsäure), Polyamide und Polyphosphate.
9. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in an sich bekannter Weise Verbindungen der allgemeinen Formel I'

-78-



I'

worin Z' eine Carboxylschutzgruppe bedeutet und R^{1'}-R^{6'} die für R¹-R⁶ angegebene Bedeutung haben, wobei jedoch die in ihnen enthaltenen funktionellen Gruppen
 5 frei, d.h. nicht an ein Biomolekül gebunden sind,

gegebenenfalls nach Abspaltung der Schutzgruppen Z' mit einem Biomolekül umgesetzt und anschließend (nach Abspaltung der Schutzgruppen Z') die so erhaltenen Säuren in an sich bekannter Weise mit mindestens einem Metalloxid
 10 oder Metallsalz eines Elements der Ordnungszahlen 21-29, 31, 32, 37-39, 42-44, 46, 47, 49, 58-71, 75, 77, 82 oder 83 umgesetzt und anschließend, falls gewünscht, vorhandene acide Wasserstoffatome mit anorganischen und/oder organischen oder Aminosäuren in physiologisch verträgliche Salze überführt.

15 10. Pharmazeutische Mittel enthaltend mindestens eine physiologisch verträgliche Verbindung nach Anspruch 2.

11. Pharmazeutische Mittel enthaltend mindestens eine physiologisch verträgliche Verbindung nach Anspruch 3.

20

12. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 2 zur Herstellung von Mitteln für die NMR-Diagnostik.

13. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 3 zur Herstellung von Mitteln für die
 25 Radiodiagnostik oder Radiotherapie.

14. Kit zur Herstellung von Radiopharmaka, umfassend eine Verbindung nach Anspruch 1, worin Z ein Wasserstoffatom ist, und eine Verbindung eines radioaktiven Elements der Ordnungszahlen 26, 27, 29, 31, 32, 37-39, 43, 46, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 75, 77, 82 und 83.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/003003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D207/16 C07D211/34 A61K31/401 A61K31/4025 A61K31/445
A61P43/00 C07C229/16 C07C229/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D A61K A61P C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PICKERSGILL ET AL: J. ORG. CHEM., vol. 65, 2000, pages 4048-4057, XP002285310 Verbindung 14, Schema 1, Seite 4049 page 4049; compound 14 -----	1-14
A	CHONG ET AL.: J. ORG. CHEM., vol. 66, 2001, pages 7745-7750, XP002285311 Verbindung 19, Schema 3, Seite 7747 -----	1-14

☐

Further documents are listed in the continuation of box C.

☐

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the International filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 2004

Date of mailing of the international search report

14/07/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cortés, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/003003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07D207/16 C07D211/34 A61K31/401 A61K31/4025 A61K31/445
A61P43/00 C07C229/16 C07C229/76

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07D A61K A61P C07C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PICKERSGILL ET AL: J. ORG. CHEM., Bd. 65, 2000, Seiten 4048-4057, XP002285310 Verbindung 14, Schema 1, Seite 4049 Seite 4049; compound 14 -----	1-14
A	CHONG ET AL.: J. ORG. CHEM., Bd. 66, 2001, Seiten 7745-7750, XP002285311 Verbindung 19, Schema 3, Seite 7747 -----	1-14

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/07/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cortés, J