

Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Mathematisch-Wissenschaftliche Fakultät

Pharmazeutisches Institut

Bereich Pharmazeutische Chemie I

**Synthese von funktionalisierten Malonsäure-
Derivaten als Bausteine für Elastase-Inhibitoren**

Diplomarbeit

vorlegt von

Marie Hrušková

in Domažlice in Tschechien

geboren

Bonn, 2011

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Masterarbeit von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und Zitate wurden kenntlich gemacht

Bonn, den 28. Februar 2011

Marie Hrušková

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gütschow für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe eine Diplomarbeit anzufertigen, für seine sehr gute Betreuung und für seine wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge bedanken.

Ich danke auch dem gesamten Arbeitskreis für die gute Zusammenarbeit und das angenehme und freundliche Arbeitsklima im Büro und Labor.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern der analytischen Abteilung für die Messung von NMR-Spektren und die Anfertigung von Massenspektren.

Ich möchte auch meiner heimischen Karls-Universität in Prag danken, dass ich die Möglichkeit ein Programm ERASMUS absolvieren konnte und meine Diplomarbeit in Bonn ausarbeiten konnte.

Mein Dank gilt auf jeden Fall Frau doc. RNDr. Opletalová, Ph.D., meiner Betreuerin in Tschechien in Hradec Králové, für guten Ideen und Beratungen.

Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während dieser Zeit immer unterstützt hat und für mich da war.

Inhaltverzeichnis:

1	Einleitung	6
1.1.	Einführung	6
1.2.	Ziel der Arbeit	7
1.3.	Elastasen.....	8
2	Hauptteil	12
2.1.	Schützung und Alkylierung von 2-Aminomalonsäurediethylester (1)	12
2.1.1.	Schützung von 1	12
2.1.2.	Alkylierung von 2	13
2.1.3.	Die magnetische Nichtäquivalenz.....	13
2.1.4.	Die Nichtäquivalenz von CH ₂ -Gruppen, Literatur.....	15
2.2.	Hydrolyse des 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäurediethylesters (4)	28
2.3.	Versuche zur Herstellung von dem Azetidin-2,4-dion-Derivat 13	42
2.3.1.	Umsetzung von 4 und Anilin	42
2.3.1.1.	Reaktion bei 110 °C Ölbadtemperatur mit 1 äquiv. Anilin und TEA..	42
2.3.1.2.	Reaktion bei 80 °C Ölbadtemperatur mit 1 äquiv. Anilin und TEA....	43
2.3.1.3.	Reaktion bei 80 °C Ölbadtemperatur mit 1 äquiv. Anilin und TEA....	45
2.3.1.4.	Reaktion bei 80 °C Ölbadtemperatur mit 2 äquiv. Anilin und TEA....	46
2.3.1.5.	Reaktion bei RT mit 2 äquiv. Anilin und TEA	47
2.3.1.6.	Reaktion bei RT mit 3 äquiv. Anilin und TEA	48
2.3.2.	Umsetzung von 17 und Anilin	51
2.3.2.1.	Reaktion bei 80 °C mit 1 äquiv. Anilin und TEA	51
2.3.3.	Umsetzung von 17 und Dicyandiamid.....	52
2.3.3.1.	Reaktion bei RT mit 1 äquiv. Dicyandiamid und TEA.....	52
2.3.4.	Umsetzung von 4 und Dicyandiamid.....	53
2.3.4.1.	Reaktion bei RT mit 1 äquiv. Dicyandiamid und TEA.....	53
2.3.5.	Umsetzung von 4 und Benzylamin	54
2.3.5.1.	Reaktion bei RT mit 2 äquiv. Benzylamin und TEA	54
2.3.6.	Umsetzung von 4 und Isopropylamin	56
2.3.6.1.	Reaktion bei RT mit 2 äquiv. Isopropylamin und TEA	56
3	Zusammenfassung	58

4	Experimenteller Teil	60
4.1.	Allgemeines.....	60
4.2.	Synthesevorschriften	61
4.2.1.	2-(Benzyloxycarbonylamino)malonsäurediethylester (2).....	61
4.2.2.	2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäurediethylester (3)	62
4.2.3.	2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (4).....	63
4.2.4.	(<i>S</i>)-2-(Benzyloxycarbonylamino)buttersäure (5)	65
4.2.5.	4-Ethyl-2,5-dioxo- <i>N</i> ,1-diphenylimidazolidin-4-carboxamid (14)	65
4.2.6.	<i>N</i> -Benzylanilin (15).....	66
4.2.7.	Die Substanz 16	67
4.2.8.	Die Substanz 26	68
4.2.9.	Triethylamin-Hydrochlorid (27)	68
4.3.	NMR-Spektren-Anhang	70
5	Abkürzungsverzeichnis	80
6	Literaturverzeichnis.....	82
	Abstract.....	86
	Abstrakt	88

1. Einleitung

1.1. Einführung

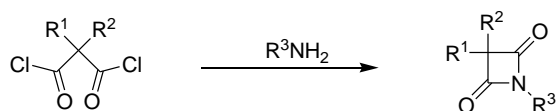
Die Serinprotease humane Leukozyten-Elastase (HLE), auch humane neutrophile Elastase (HNE) genannt, gehört zur großen Familie von Chymotrypsin-artigen Proteasen. HLE wird von neutrophilen Granulozyten sekretiert und spielt eine große Rolle bei Entzündungsprozessen. ^[1]

Die Elastase-Inhibitoren vom Typ der 4-Oxo- β -Laktame (Azetidin-2,4-dion) können die übermäßige Elastin-Proteolyse und die Zerstörung von Bindegewebe inhibieren. Sie können potentiell viele entzündliche Erkrankungen wie Lungen-Emphyseme, akutes Atemnotsyndrom, chronische Bronchitis, rheumatische Arthritis oder chronische obstruktive Lungenerkrankungen heilen. ^{[2][3][4]}

1.2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist, aufbauend auf die Publikationen von Mulchande et al.,^[2]^[3] zur Zyklisierung von Malonsäuredichloriden (Schema 1) potentielle Elastase-Inhibitoren zu synthetisieren. Dazu sollte in die 1-Aryl-azetidin-2,4-dion-Struktur eine geschützte Aminofunktion in Position 3 eingeführt werden. Diese strukturelle Modifizierung sollte den peptidischen Charakter der Moleküle erhöhen und vielleicht damit die Affinität zu HLE verbessern. Azetidin-2,4-dione mit einer Arylgruppe in Position 1 und einer Amino- und Alkygruppe in Position 3 sind unbekannt. Deshalb sollten ausgehend von Malonsäure-Derivaten synthetische Zugänge untersucht werden. Mit dieser Arbeit sollte ein Beitrag zu Heterozyklisierung von Malonsäure-Derivaten erbracht werden.

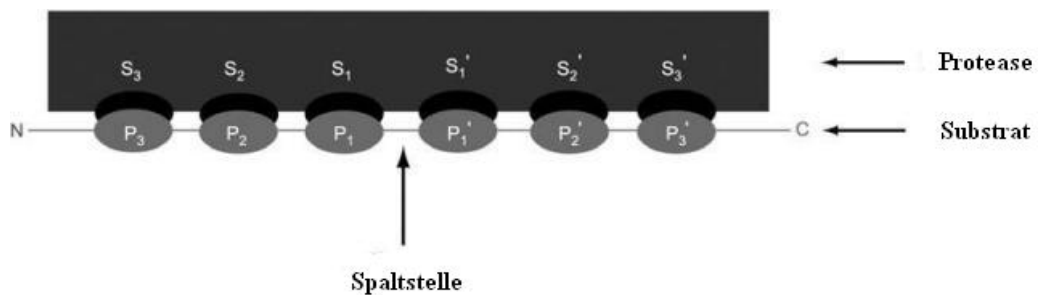
Schema 1



1.3. Elastasen

Die humane Leukozyten-Elastase ist eine Serinprotease, die zur Chymotrypsin-Superfamilie gehört. Serinproteasen sind Enzyme, die Proteine und Peptide spalten. Sie haben im aktiven Zentrum die katalytische Triade mit einem aktiven Ser-Rest. Zur Familie von Chymotrypsin gehören unter andere neben Elastasen, auch Proteinase 3 und Cathepsin G. ^{[1] [4]} Für Serinproteasen wird die allgemeine Nomenklatur der Protease-Spezifität angewendet (Abb. 1).

Abb. 1



Die Nomenklatur der Protease-Spezifität. ^[5] Das aktive Zentrum von Proteasen besteht aus Taschen. In jeder Tasche bindet ein Substrat-Rest. Die Taschen werden S und die Reste P genannt. Sie sind nach dem Ort der Spaltung nummeriert. In C-terminaler Richtung von der Spaltstelle werden die Taschen und Reste mit den Symbolen (S'/P') bezeichnet.

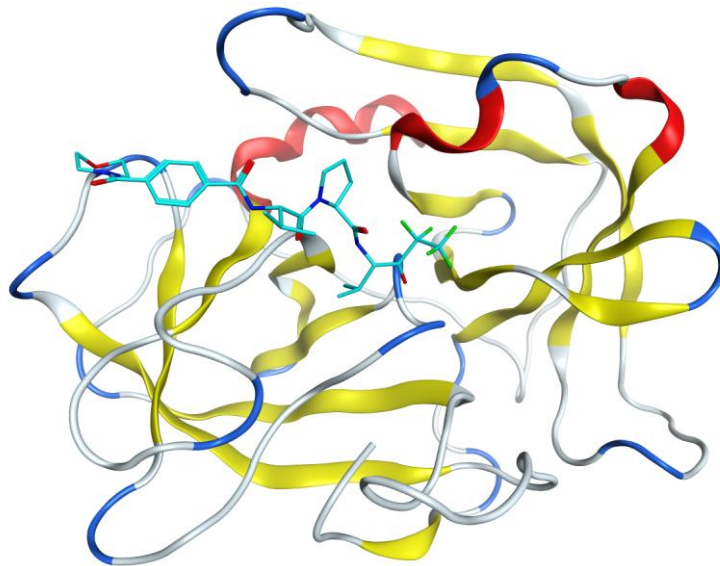
Beim Menschen sind mehrere Sorten von Elastasen vorhanden, neben der Leukozyten-Elastase unter anderem auch die Pankreas-Elastase. Sie wird in der Bauchspeicheldrüse als inaktive Proelastase, das Zymogen der Elastase, produziert und im Dünndarm durch eine einzige tryptische Spaltung, durch die ein kurzes N-terminales Polypeptid ausgeschnitten wird, zum Enzym Elastase aktiviert. Das aktive Verdauungsenzym Elastase kann das sonst praktisch unverdaubare, an Ala-, Gly- und Val-Resten reiche Protein Elastin, ein Faserprotein, wirksam hydrolysieren. ^[6]

HLE befindet sich in den azurophilen Granula in den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Ihre Aktivität ist abhängig von der katalytischen Triade bestehend aus einem Asp-, His- und Ser-Rest, die in der primären Sequenz weiter von einander entfernt liegen, aber in der tertiären Struktur des Proteins als aktives Zentrum zusammengebracht werden. PMNs sind die ersten Zellen, die im Falle einer Bakterieninfektion zum Ort des Geschehens gelangen. Sie gehören zur ersten Abwehr gegen Bakterieninfektionen.^[1]

Die EC-Nummer von HLE ist EC 3.4.21.37,^[1] wobei die erste Ziffer 3 für die Enzym-Klasse der Hydrolasen, die die hydrolytische Spaltung katalysieren, steht. Zur EC 3-Klasse gehören Esterasen, Lipasen, Phosphatasen und Proteasen^[7].

Das Gen für HLE, *ELA2*, ist innerhalb des 50 kb-Segments in der terminalen Region des kürzeren Armes vom Chromosom 19p13.3 lokalisiert.^[1] HLE ist ein Protein, das aus 218 Aminosäurenresten mit einer Molekülmasse von 29-33 kDa besteht. Der isoelektrische Punkt pI ist etwa 10.5 und der optimale pH-Wert für die Aktivität liegt bei 8.0-8.5.

Abb. 2



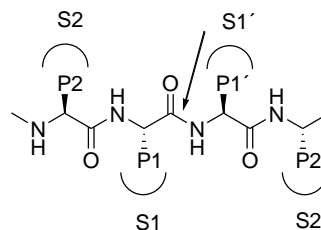
3D-Struktur von HLE, Komplex mit dem Inhibitor **E** (Peptidylpentafluorethylketon ,
pdb) ID: 1B0F.^[9]

Die Röntgenkristall-3D-Strukturen von HLE (Abb. 2) sind Komplexe mit dem Protein-Inhibitor *turkey ovomucoid third domain* (OMTKY-III) oder mit synthetischen Inhibitoren.^[1] HLE hat zwei sechssträngige β -Faltblatt-Domänen, die

für die Proteasen der Chymotrypsin-Familie typisch sind. Nur das mittlere und C-terminale Segment sind in einer α -Helix-Struktur organisiert. Das aktive Zentrum ist in der Spalte von zwei β -Faltblättern lokalisiert. Die Peptid-Kette von HLE wird durch vier Disulfidbrücken stabilisiert.

HLE bevorzugt kleine hydrophobe Reste in P1-Position (Abb. 3), z. B. Val-, Cys-, Ala-, Met-, Ile-, Leu- oder Ser-Reste. Die S1-Tasche ist hemisphärisch und hydrophob, besteht aus Val190, Phe192, Ala213, Val216, Phe228 und aus der Disulfidbrücke Cys191-Cys220. Der Boden der S1-Tasche ist durch den Rest Asp226 negativ geladen. Die S2-Tasche besteht aus Phe215, Leu99, His57 und ist hydrophob. Die S1'-Tasche ist relativ hydrophob und ist mit Cys42-Cys58 und Phe41 gesäumt.^[1]

Abb. 3



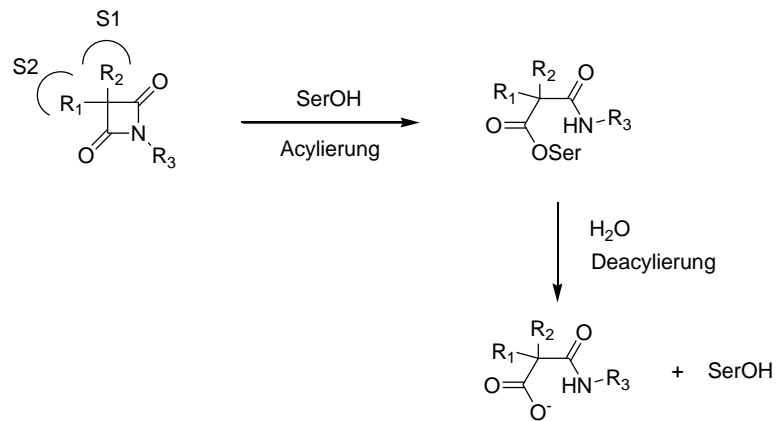
Das Substrat im aktiven Zentrum von HLE.

Der erste Schritt in der durch Serinproteasen katalysierten Reaktion ist die Formation eines Acyl-Enzym-Intermediats zwischen dem Substrat und dem essentialen Ser-Rest des aktiven Zentrums, wobei die Peptidbindung gespalten wird. Das Acyl-Enzym-Intermediat wird mit Wasser in der Deacylierung hydrolysiert und der freie Ser-Reste vom Enzym erneuert. Bei der Deacylierung greift das Wassermolekül als Nukleophil die Ester-Gruppe an.^[1]

Abb. 4 zeigt die durch Serinproteasen katalysierte Spaltung von Azetidin-2,4-dion-Inhibitoren. Es wurde vermutet, dass diese Heterozyklen als Substrat-analoge Inhibitoren wirken. Die Interaktion entspricht dem Mechanismus der Protease-katalysierten Hydrolyse eines Peptid-Substrates.^[3]

Je langsam die Deacylierung der Azetidin-2,4-dion-Intermediate erfolgt, desto stärker ist die Hemmung.^[3]

Abb. 4 ^[3]



Katalytischer Mechanismus der Spaltung von Azetidin-2,4-dionen durch Serinproteasen.

In der Literatur ^[8] ist das Peptidylpentafluorethylketon **E** als HLE-Inhibitor beschrieben, dessen Bindung an Elastase von Dr. Mihiret Tekeste Sisay durch *Docking* simuliert wurde (Abb. 5).

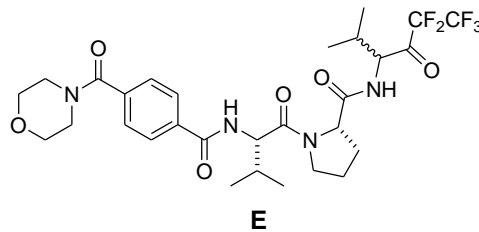
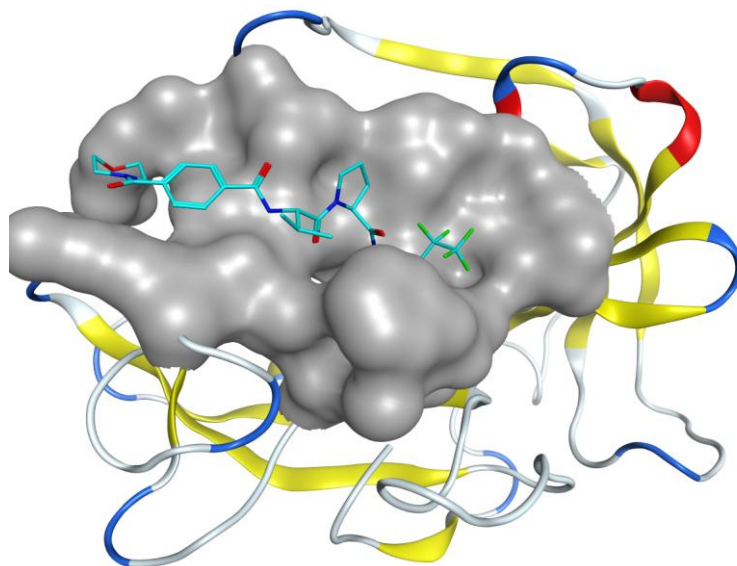


Abb. 5



Docking mit HLE und E, , pdb ID: 1B0F. ^[9]

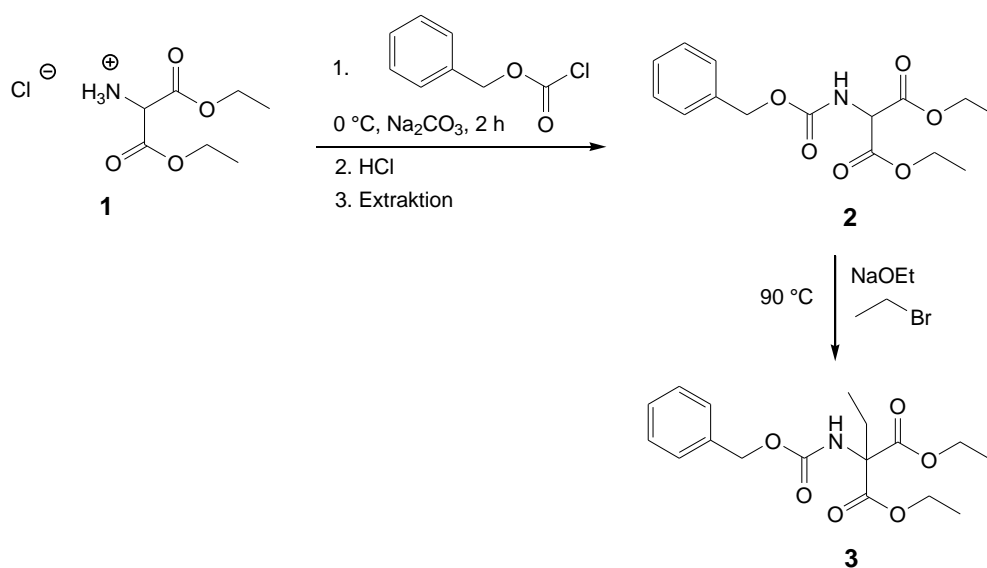
2. Hauptteil

2.1. Schützung und Alkylierung von 2-Aminomalonsäurediethylester (1)

2.1.1. Schützung von 1

Die Aminogruppe vom Ausgangsstoff 2-Aminomalonsäurediethylester-Hydrochlorid (1) sollte in erstem Schritt geschützt (Schema 2) und dann dieses Malonsäureester-Derivat 2 alkyliert werden. 2-Aminomalonsäurediethylester-hydrochlorid (1) wurde im Wasser gelöst, Na_2CO_3 und dann Chlorameisensäurebenzylester zugegeben. Die Reaktion wurde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die dünnschichtchromatographische Kontrolle der Reaktionslösung zeigte, dass nach 2 h ein vollständiger Umsatz vorlag. Die Reaktionslösung wurde mit Salzsäure angesäuert und dann mit Ethylacetat extrahiert. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels Ethylacetat wurde das Produkt aus Petrolether/Ethylacetat umkristallisiert. Im Tiefkühlschrank war aus der Lösung ein Niederschlag ausgefallen. Dieser Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Bei der Trocknung entstand ein weißer Feststoff 2, der manchmal bei RT schmolz (hellgelbes Öl) und manchmal fest blieb. In der Literatur wurden beide Aggregatzustände beschrieben, ein weißer Feststoff^[10] oder ein farbloses Öl^[11].

Schema 2

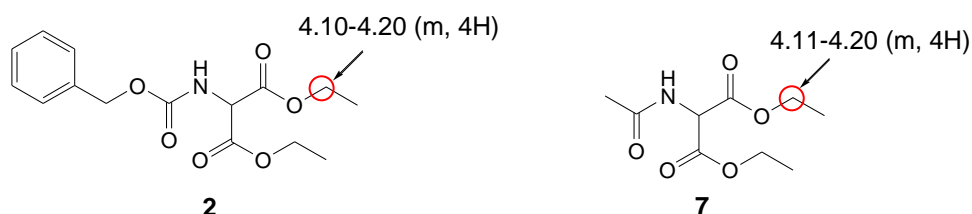


2.1.2. Alkylierung von 2

In zweiten Schritt wurde **2** alkyliert. Zuerst wurde Natrium-Ethanolat hergestellt. Natrium wurde in getrockneten Ethanol bei RT bis zum Ende der Gasentwicklung gelöst. Ethylbromid und die Lösung von Natrium-Ethanolat wurden zu **2** zugegeben und unter Rückflusskühler bei 90 °C Ölbadtemperatur 10 h erhitzt und gerührt. Nach der Zugabe von Dichlormethan wurde unlösliches Material durch die Filtration abgetrennt. Kieselgel, Natriumcarbonat und Aktivkohle wurden zum Filtrat zugegeben. Die Mischung wurde filtriert, das Lösungsmittel entfernt und das gewonnene Öl durch Säulenchromatographie (Ethylacetat/Petrolether 1+3) gereinigt. [12] [13] [14] [15] Es wurde ein hellgelbes Öl gewonnen. Das Malonsäureester-Derivat **3** ist bislang in der Literatur nicht beschrieben.

2.1.3. Die magnetische Nichtäquivalenz

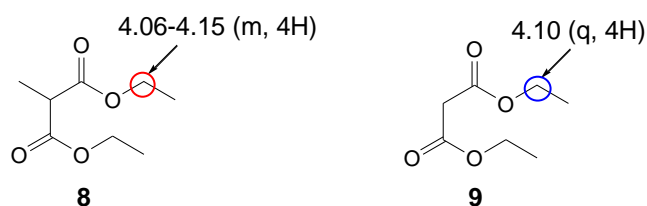
Einen interessanten Sachverhalt erbrachten die ^1H NMR-Spektren von **2** und **3**. Die CH_2 -Gruppen des Esters **2** zeigten ein unerwartetes Multiplett an Stelle des erwarteten Quartetts. Der CH-Kohlenstoff im Malonsäure-Derivat **2** ist achiral, trotzdem zeigte unser NMR-Signal bei 4.10-4.20 ppm (m, 4H, OCH_2CH_3) diastereotope Eigenschaften der CH_2 -Gruppen an (Abb. 5).



Unsere Substanz **3** hatte als entsprechendes ^1H NMR-Signal ein Quartett bei 4.12 ppm (q, 4H, OCH_2CH_3). Dieses Quartett war aber nicht so schön und deutlich (Abb. 8). Deshalb wurde vermutet, dass dieses Phänomen mit einem freien Wasserstoffatom in Position 2 verbunden sein könnte.

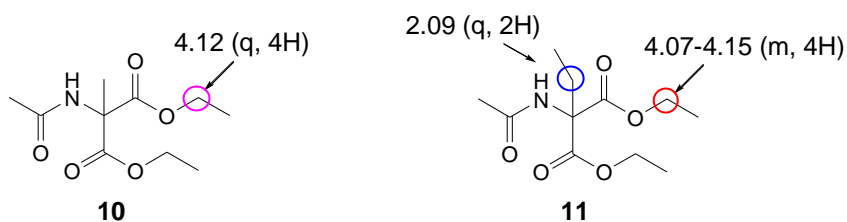
In der Literatur wurde nach ähnlichen Malonsäurediethylester-Derivaten gesucht und verwandte Moleküle aus der Substanzbibliothek wurden einbezogen. Es könnte

möglich sein, dass die kommerziell erworbenen Substanzen **7**, **8** und **9** das unerwartete Multipllett zeigen könnten. Deshalb wurden die Substanzen **7**, **8** und **9** zur NMR-Spektroskopie abgegeben. Die Substanz **7** zeigte im ^1H NMR-Spektrum das gleiche Multipllett bei 4.11-4.20 ppm (m, 4H, CH_2CH_3) (Abb. 5). Die Substanz **8** zeigte ebenfalls ein Multipllett bei 4.06-4.15 ppm (m, 4H, OCH_2CH_3) (Abb. 6) und **9** ein Quartett bei 4.10 ppm (q, 4H, OCH_2CH_3) (Abb. 6).



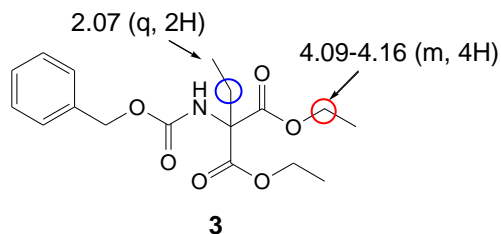
Auch einige Stoffe ohne Wasserstoff-Substitution wurden einbezogen um zu prüfen, ob diese Nichtäquivalenz von Methylengruppen des Esters vom Wasserstoff in Position 2 abhängig sein könnte.

Die Substanzen **10** und **11** wurden in der Doktorarbeit von Dr. Agnieszka Ambrozak beschrieben. ^[12] Dort gab es keine NMR-Spektren-Abbildungen von diesen Substanzen. Die Substanzen **10** und **11** wurden in der Substanzbibliothek von AK Gütschow gefunden und erneuert gemessen.



Die Substanz **10** zeigte im ^1H NMR-Spektrum ein Quartett bei 4.12 ppm (q, 4H, OCH_2CH_3) statt des erwarteten Multiplletts (Abb. 7). Es könnte nur eine Ausnahme sein. Die chemischen Verschiebungen der Protonen könnten gleich sein und dann keine geminale Kopplungskonstante aufweisen. Das heißt, dass dann nur ein Quartett sichtbar wird. Die Substanz **11** zeigte im ^1H NMR-Spektrum ein Multipllett bei 4.07-4.15 ppm (m, 4H, OCH_2CH_3).

Nach diesen Ergebnissen wurde noch einmal die Substanz **3** gemessen. Jetzt wurde die doppelte Zeit zur NMR-Messung benutzt. Das undeutliche Quartett bei 4.12 ppm ähnelte jetzt mehr einem Multipllett bei 4.09-4.16 ppm (m, 4H, OCH₂CH₃) (Abb. 8).



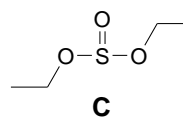
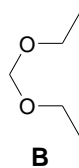
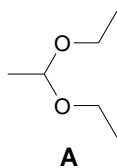
Die magnetische Nichtäquivalenz von CH₂-Gruppen von Malonester-Derivaten ist nicht abhängig von einer Wasserstoff-Substitution in Position 2. Beide Beispiele ohne Wasserstoff (Substanzen **3**, **11**) oder mit Wasserstoff in Position 2 (**2**, **7**, **8**) zeigen ähnliche magnetische Nichtäquivalenz, ein Multipllett an Stelle des erwarteten Quartetts. Die CH₂-Gruppe in Position 2 (d.h. nicht am Ester-Substituenten) bei Substanzen **3** und **11** ist immer ein normales Quartett bei 2.07 ppm (2H, CH₂CH₃) für Substanz **3** und bei 2.09 ppm (2H, CH₂CH₃) für Substanz **11**.

Die Malonsäure-Derivate **2**, **3**, **7**, **8**, **10** und **11** haben ein prochirales Zentrum, deshalb verhalten sich die CH₂-Protonen der Ester-Substituenten diastereotop und zeigten ein entsprechenden Kopplungsmuster (ein Multipllett). Nur die Substanz **10** stellte hier eine Ausnahme dar. Malonsäurediethylester (**9**) ist nicht prochiral, deshalb gibt es nur ein Quartett.

2.1.4. Die Nichtäquivalenz von CH₂-Gruppen, Literatur

In der Arbeit von Sano et al.,^[11] aus der wir den Vorschrift für die Schätzung von 2-Aminomalonsäurediethylester-hydrochlorid (**1**) (Schema 2) übernommen haben, war auch ein Multipllett bei 4.03-4.53 ppm (m, 4H, OCH₂CH₃). In dieser Arbeit war die magnetische Nichtäquivalenz als Multipllett ohne Erklärung beschrieben. Es wurde auch in den Büchern über NMR-Spektroskopie gesucht. Wie in einem Buch^[16] beschrieben, sind in manchen CH₂-Gruppen die beiden H-Atome diastereotop, obwohl das Molekül als Ganzes achiral ist. Das klassische Beispiel ist

Acetaldehyddiethylacetal **A**, in dem die beiden Methylenprotonen der Ethylgruppen diastereotop sind.

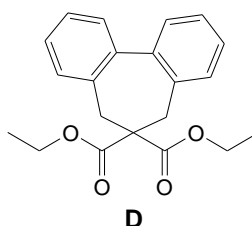


Man erhält ein für Ethylgruppen sehr kompliziertes Spektrum. C-Atom 1 stellt hier ein prochirales Zentrum dar. Analog ist die Situation in der Zitronensäure. Auch hier sind die beiden Methylengruppen diastereotop. ^[16]

Die Nachbarschaft von chiralen oder prochiralen Zentren kann zur Nichtäquivalenz (Anisochronie) der Protonen einer CH₂-Gruppe führen. Diastereotopie Gruppen sind chemisch nicht äquivalent und können allenfalls zufällig isochron sein. ^[17]

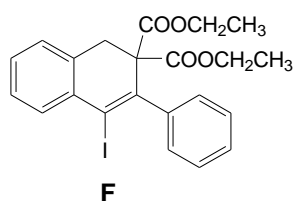
Die Substanz **A** wurde auch in der Literatur früher beschrieben. Das ¹H NMR-Spektrum von Acetaldehyddiethylacetal **A** zeigte höhere Multiplizität im CH₂-Bereich als nach dem einfachen Spin-System erwartet wurde. Dies wurde auf eine Kopplung mit dem Sauerstoffatom zurückgeführt. Die ¹³C-H Kopplungs-Werte reflektierten wieder diese Nichtäquivalenz von Methylengruppen. Aber das Molekül **B** hat äquivalente Methylenwasserstoffe. Nach der Meinung dieser Autoren könnte die Nichtäquivalenz von CH₂-Gruppen durch Rotationsisomere, die verschiedene Stabilität haben, verursacht werden. ^[18] Auch die Substanz **C** zeigte Multiplizität der CH₂-Gruppen wie bei **A** und unserer Substanz **2**. ^[19]

Es wurde festgestellt, dass die geminale Kopplungskonstante (J_{gem}) in Acetal **A** und Acetal-Derivaten sensitiv für das Lösungsmittel und die Konzentration war. Diese Ergebnisse zeigten, dass offenkettige sp³-hybridisierte Systeme mittlere geminale Kopplungen aufweisen und als strukturell diverse Systeme betrachten werden können. ^[20] Die geminale Kopplung in Acetal **A** war größer als die entsprechende Kopplung in Methan, was als *back donation effect* vom Sauerstoffatom bezeichnet wurde. ^[21]

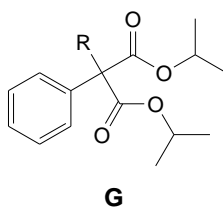


Bei dem Molekül **D** wurde die magnetische Nichtäquivalenz von den CH₂-Gruppen des Esters ebenfalls beschrieben. Die Nichtäquivalenz war von der Temperatur abhängig. ^[22] Die mehrfache Nichtäquivalenz von Methylenprotonen bzw. Isopropyl-Methylgruppen wurde in Malonaten des Typs R*CH(COOCH₂R)₂ bzw. R*CH(COOCHMe₂)₂ beobachtet, wobei R* ein chiraler Substituent ist. ^[23]

Auch die CH₂- und CH₃-Protonen von COOCH₂CH₃-Gruppen in einigen Malonat-1,2-Dihydronaphthalen-Derivaten, z.B. **F**, wiesen interessante Spin-Spin-Kopplung und Signal-Multiplizität auf. ^[24]

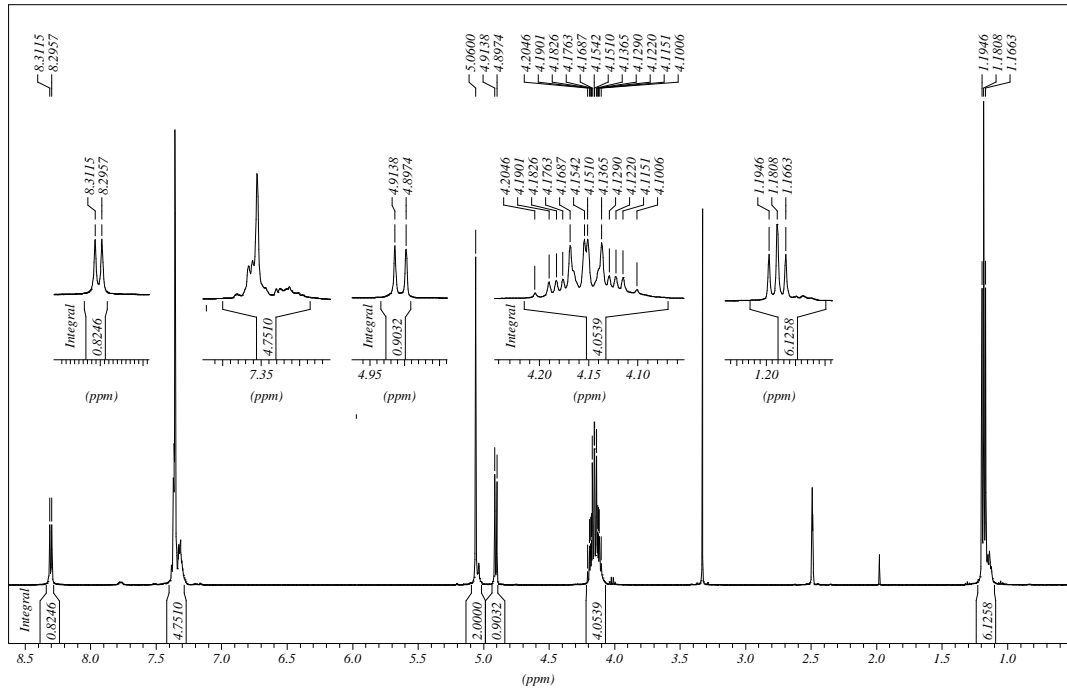


Die Rolle von sterischen Faktoren für die magnetische Nichtäquivalenz in komplexen geminalen Gruppen in Substanzen wie z. B. **G** wurde ebenfalls untersucht. Die Carboalkoxy-Gruppen waren anisochron. ^[25]

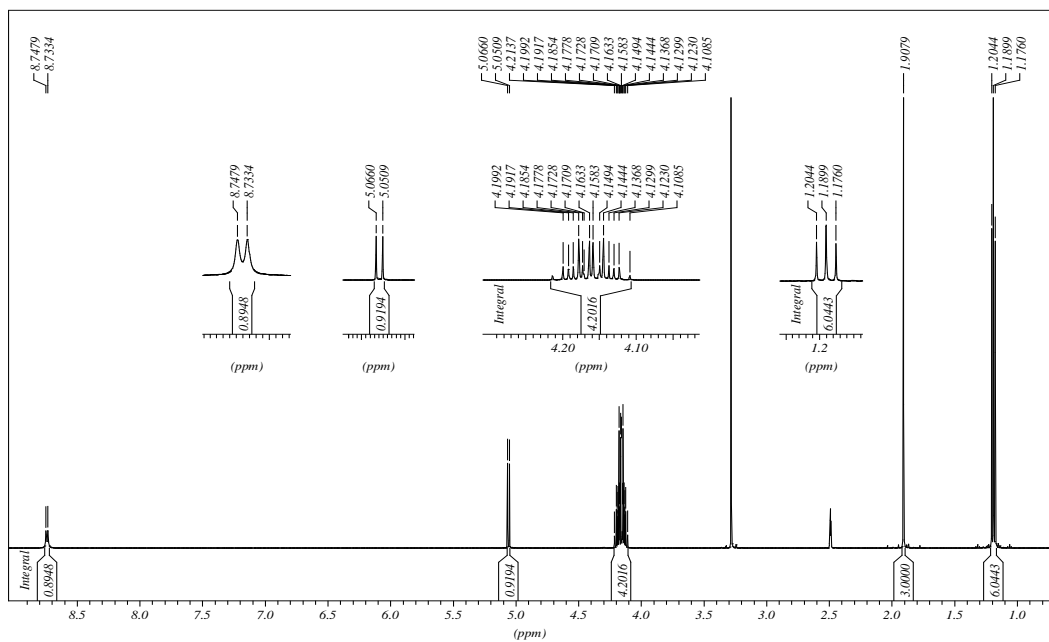


Einige Autoren schrieben, dass diese Wasserstoff-Nichtäquivalenz von CH₂-Gruppen abhängig vom Vorliegen von Rotationsisomeren und vom Lösungsmittel oder der Konzentration oder der Temperatur kann sein. Die Aufklärung von solchen Ursachen für die Nichtäquivalenz in unseren Molekülen würde den Rahmen dieser Diplomarbeit überschreiten. Allerdings kann man sagen, dass es in unseren Molekülen **2** und **3** ein prochirales Zentrum ^[16] gibt und deshalb benehmen sich die Methylenprotonen diastereotop, obwohl kein chirales Zentrum vorliegt.

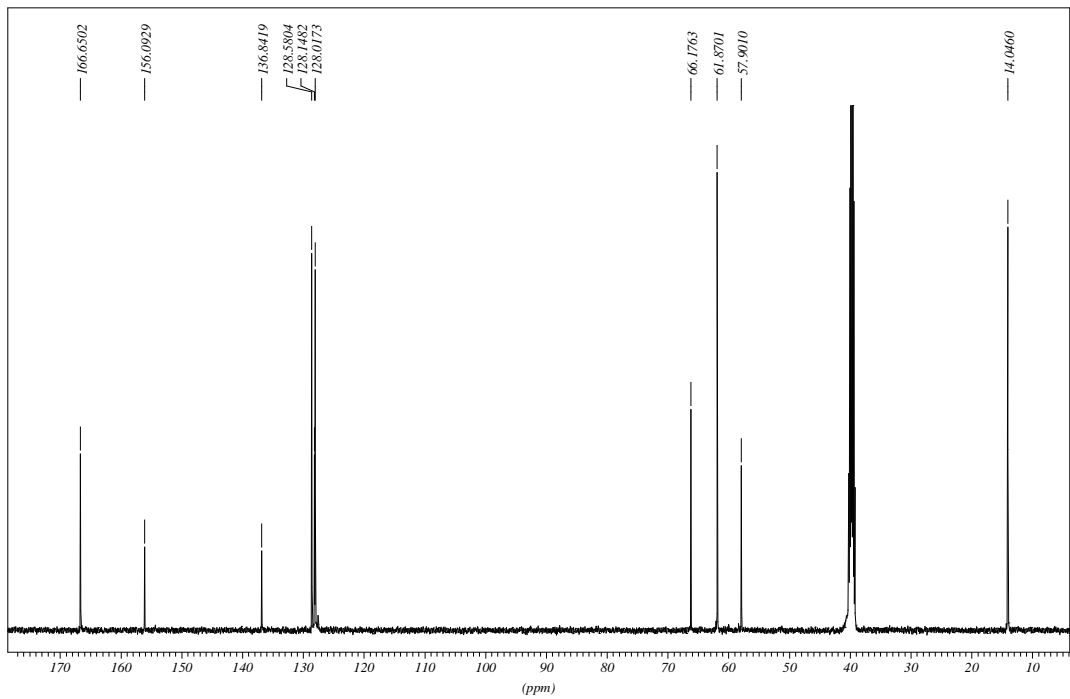
Abb. 5



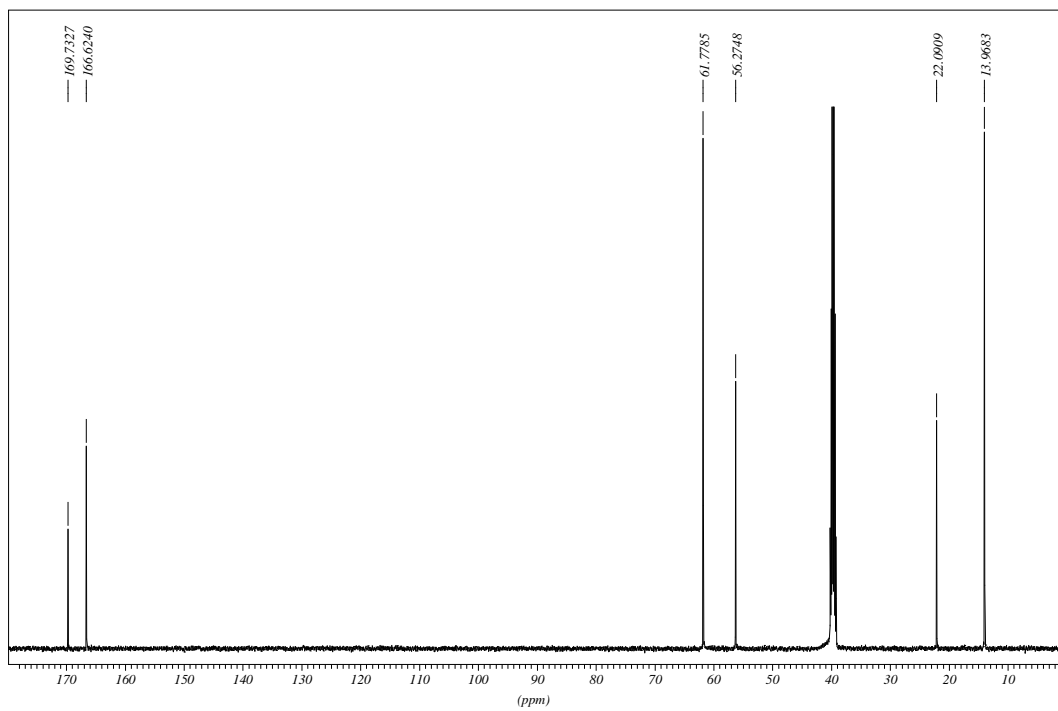
(A) ^1H NMR-Spektrum von 2.



(B) ^1H NMR-Spektrum von 7.

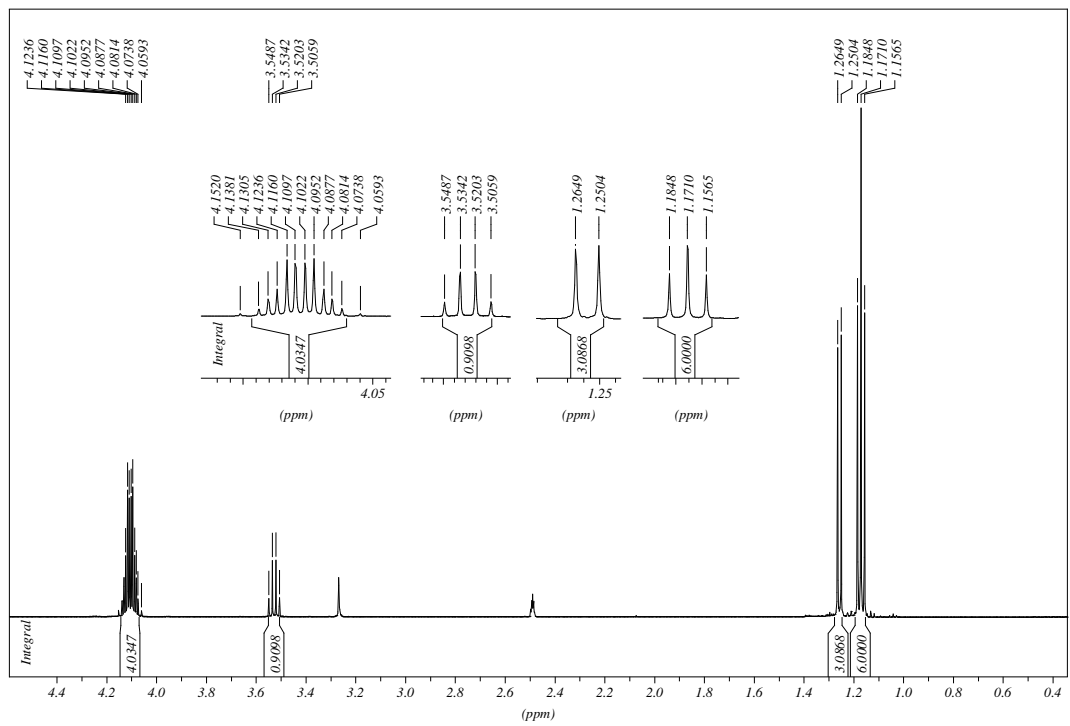


(C) ^{13}C NMR-Spektrum von 2.

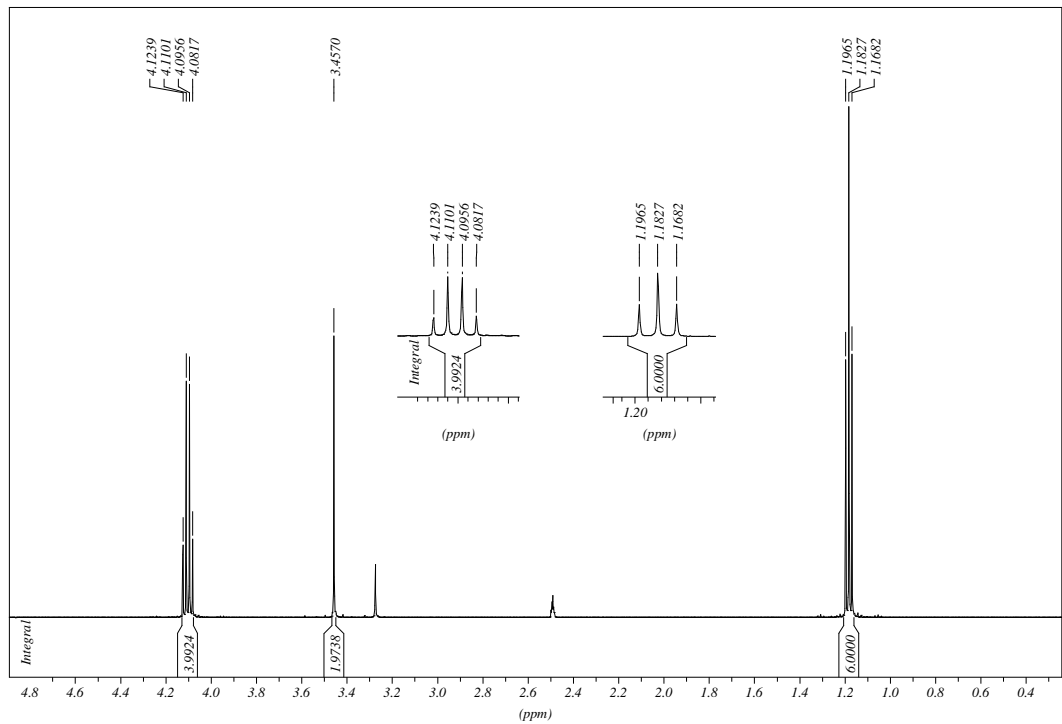


(D) ^{13}C NMR-Spektrum von 7.

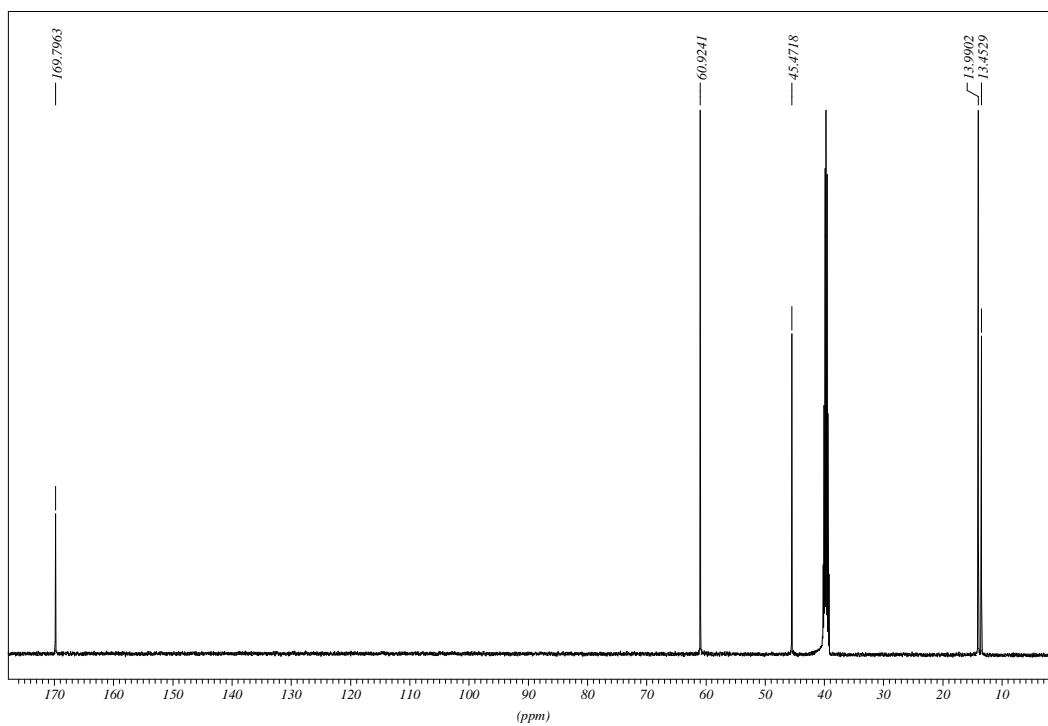
Abb. 6



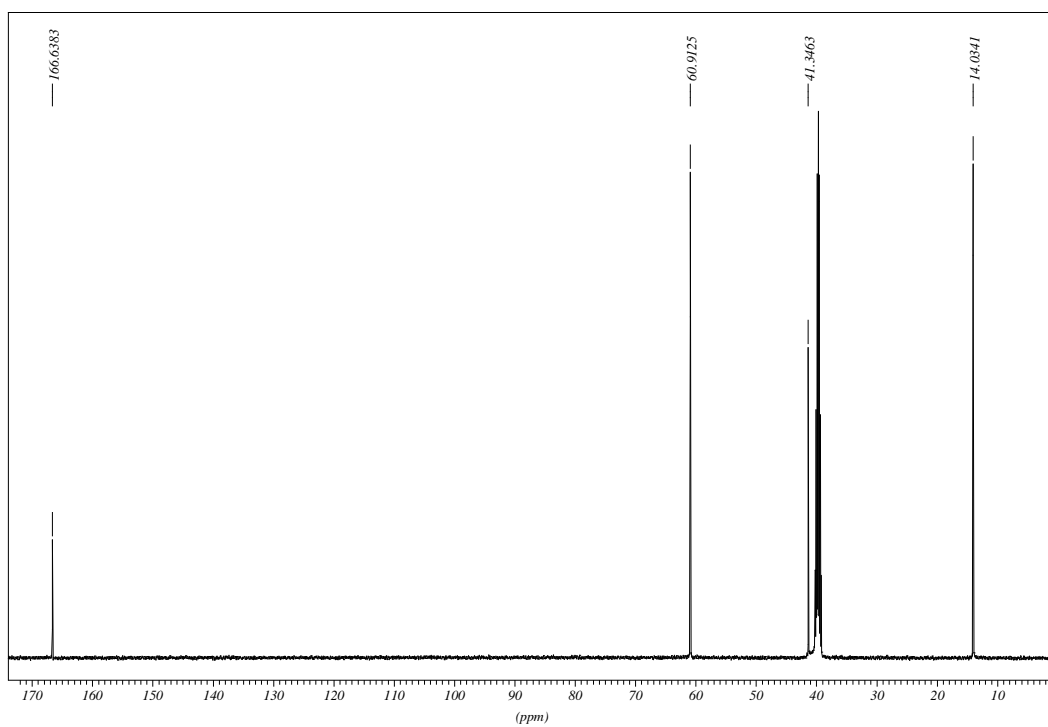
(A) ^1H NMR-Spektrum von **8**.



(B) ^1H NMR-Spektrum von **9**.

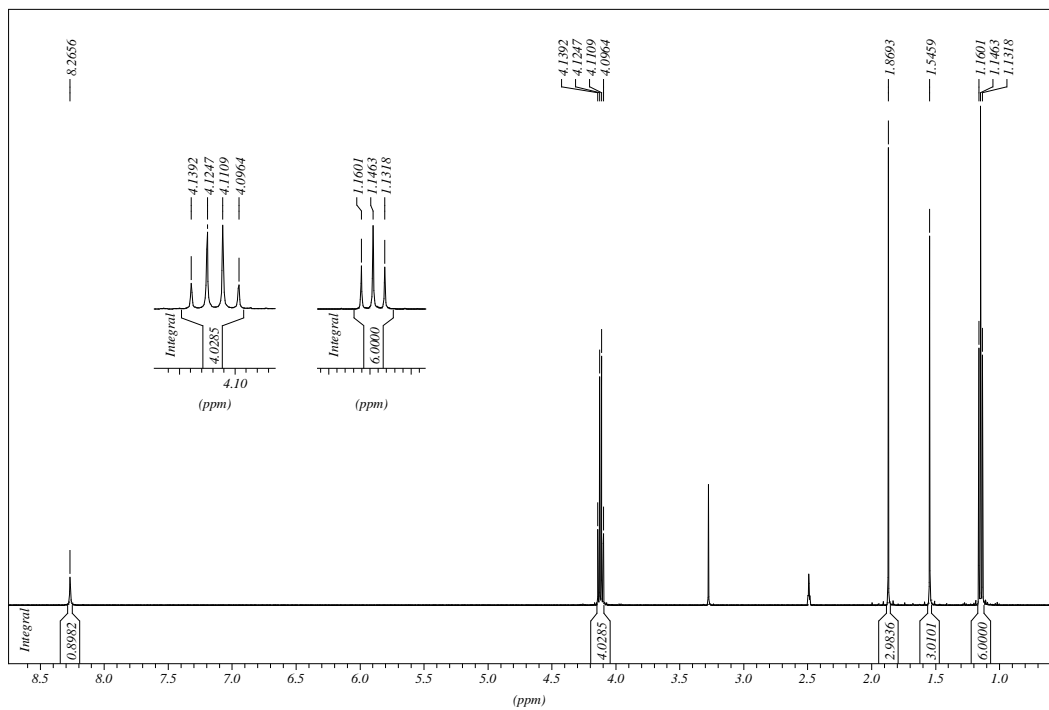


(C) ^{13}C NMR-Spektrum von 8.

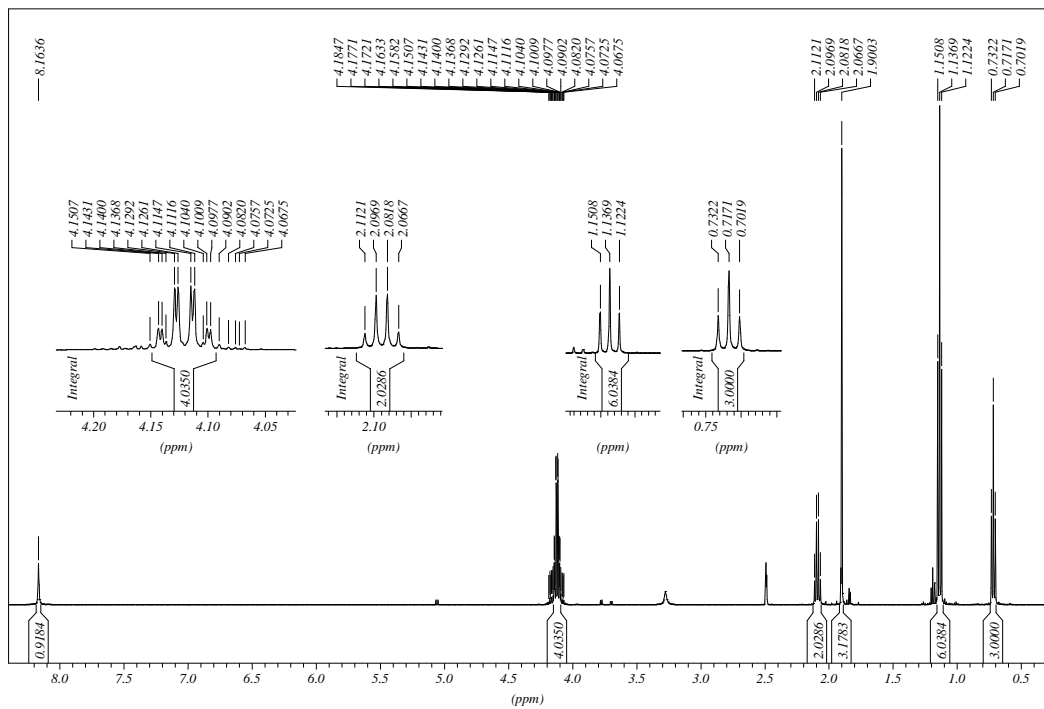


(D) ^{13}C NMR-Spektrum von 9.

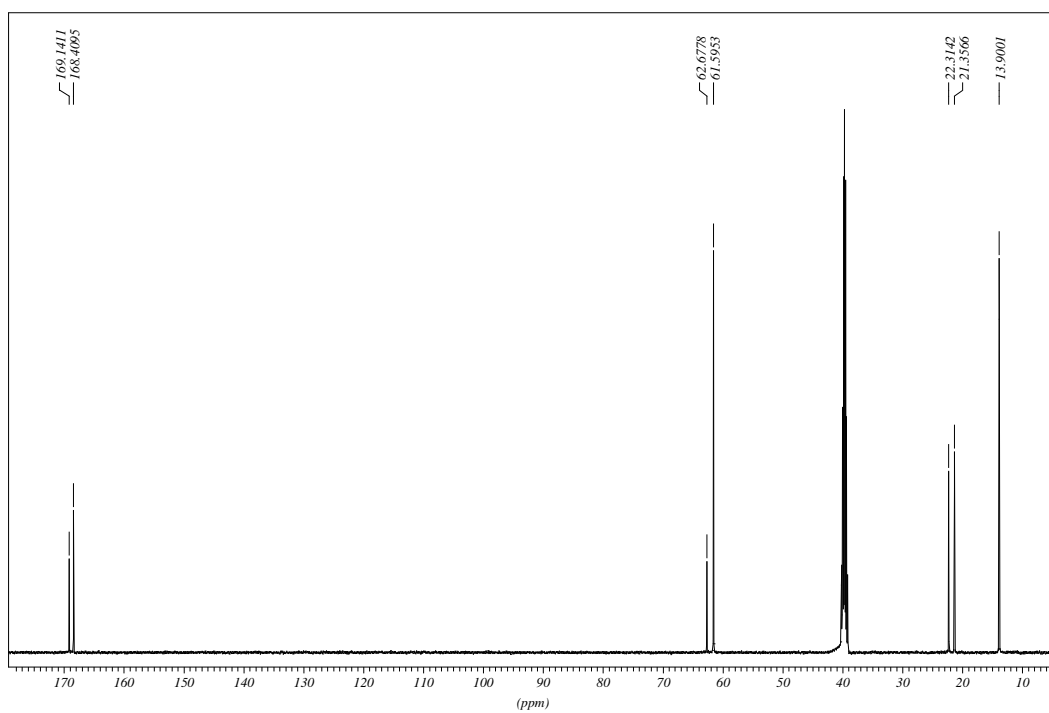
Abb. 7



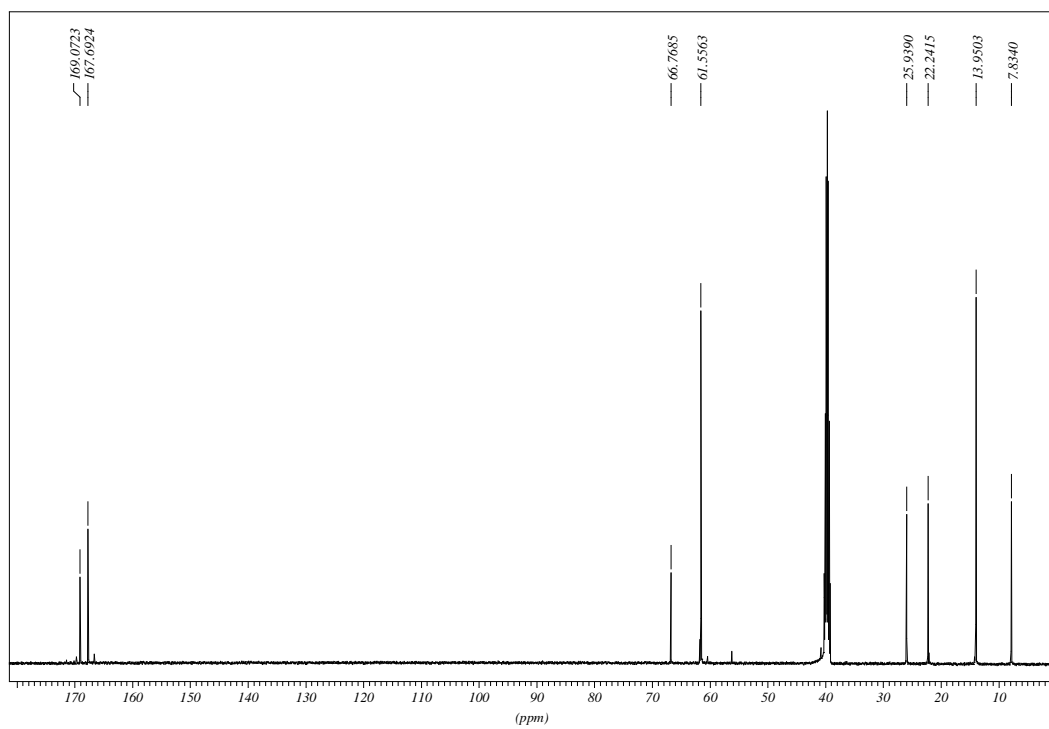
(A) ^1H NMR-Spektrum von 10.



(B) ^1H NMR-Spektrum von 11.

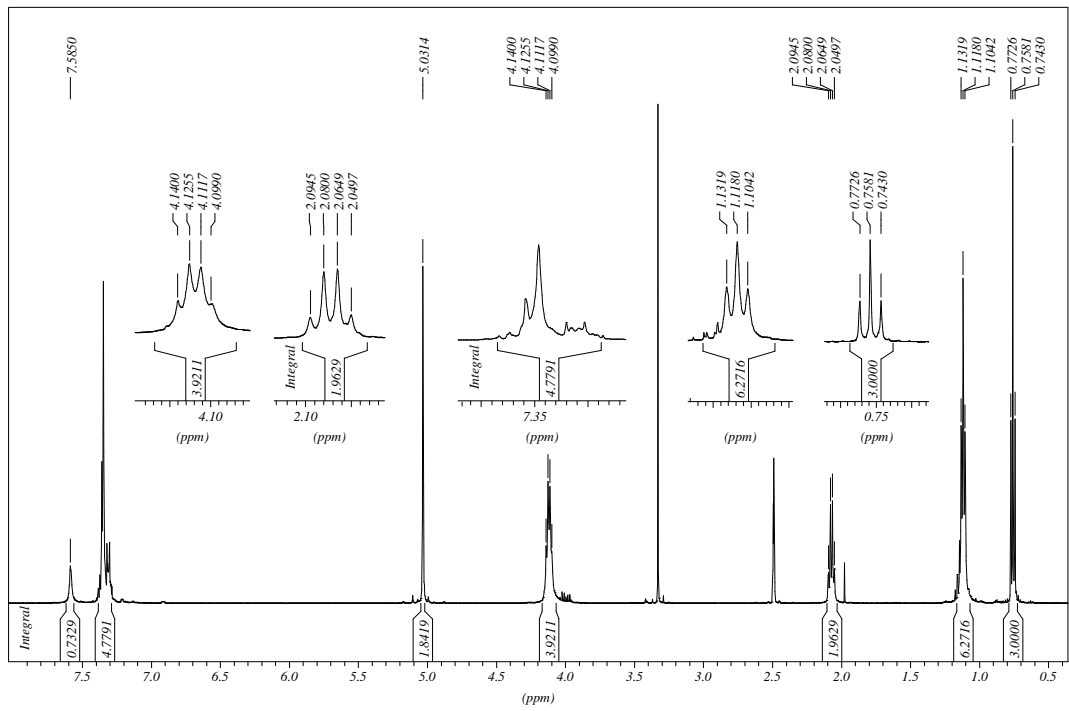


(C) ^{13}C NMR-Spektrum von **10**.

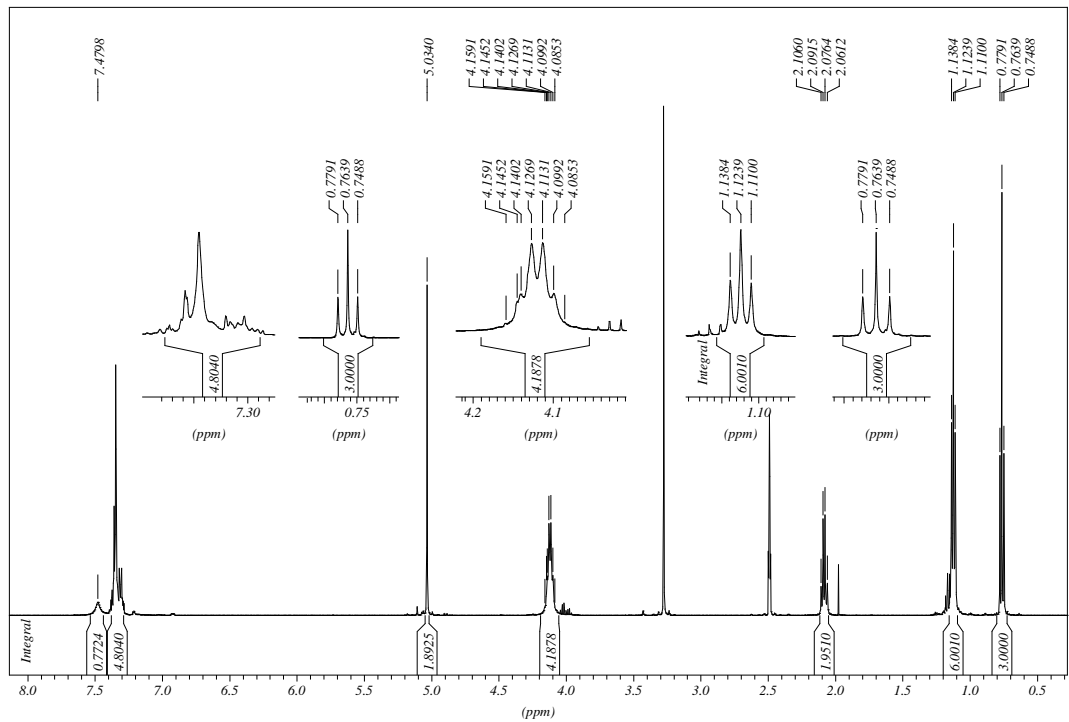


(D) ^{13}C NMR-Spektrum von **11**.

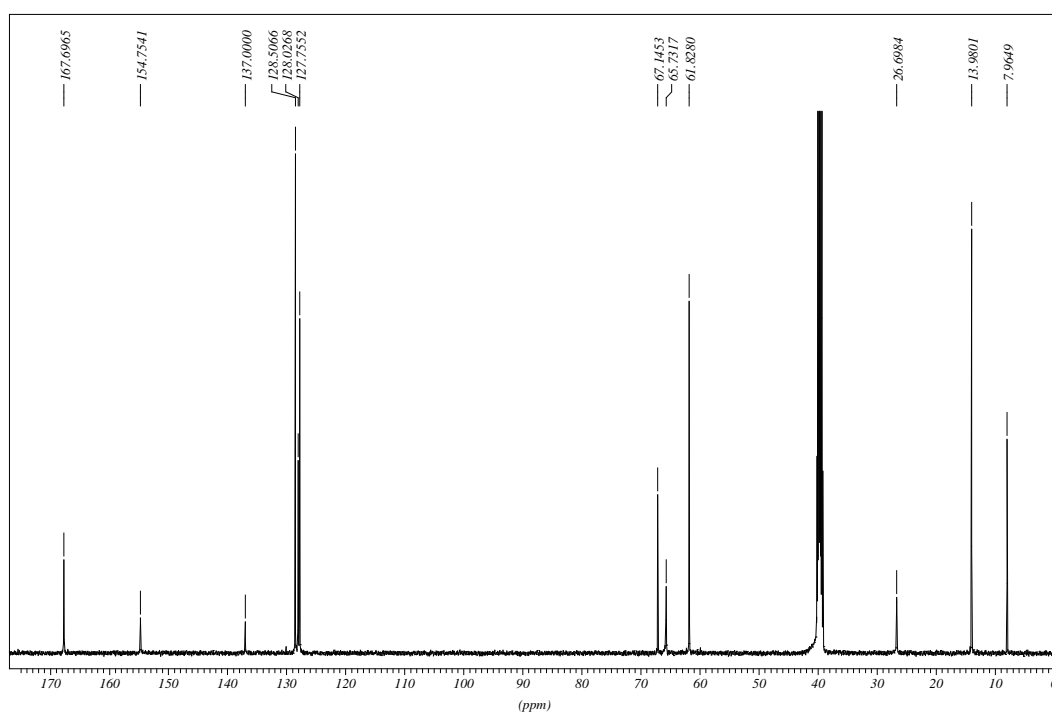
Abb. 8



(A) ^1H NMR-Spektrum von 3, normale Messzeit.



(B) ^1H NMR-Spektrum von 3, doppelte Messzeit.



(C) ^{13}C NMR-Spektrum von 3, normale Messzeit.

Tabelle 1. Chemische Verschiebungen, Multiplizität und Kopplungskonstanten der NMR-Spektren von ausgewählten Verbindungen.

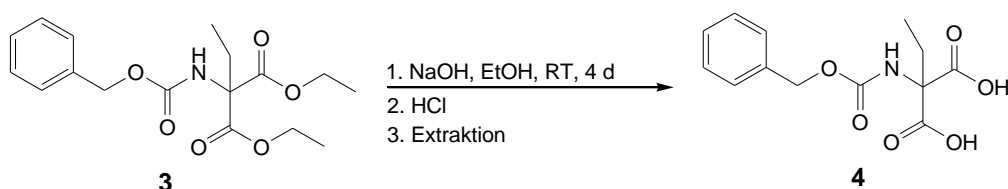
¹ H NMR-Spektrum von 2	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.18 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 6H, OCH ₂ CH ₃), 4.10-4.20 (m, 4H, OCH ₂ CH ₃), 4.91 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, CH), 5.05 (s, 2H, CH ₂ C ₆ H ₅), 7.30-7.38 (m, 5H, C ₆ H ₅), 8.30 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH)
¹ H NMR-Spektrum von 7	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.19 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H, CH ₂ CH ₃), 2.10 (s, 3H, CH ₃), 4.11-4.20 (m, 4H, CH ₂ CH ₃), 5.06 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, CH), 8.74 (d, 1H, <i>J</i> = 7.4 Hz, NH)
¹³ C NMR-Spektrum von 2	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 14.05 (CH ₂ CH ₃), 57.90 (CH), 61.87 (CH ₂ CH ₃), 66.18 (CH ₂ C ₆ H ₅), 128.02, 128.15, 128.58, 136.84 (C ₆ H ₅), 156.09 (CONH), 166.65 (COCH ₂)
¹³ C NMR-Spektrum von 7	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13.97 (CH ₃ CH ₂), 22.09 (CH ₃), 56.27 (CH), 61.78 (CH ₃ CH ₂), 166.62 (COOCH ₂), 169.73 (CONH)
¹ H NMR-Spektrum von 8	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.17 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H, OCH ₂ CH ₃), 1.26 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, CCH ₃), 3.53 (q, 1H, CH), 4.06-4.15 (m, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, OCH ₂ CH ₃)
¹ H NMR-Spektrum von 9	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.18 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H, OCH ₂ CH ₃), 3.46 (s, 2H, CH ₂), 4.10 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, OCH ₂ CH ₃)
¹³ C NMR-Spektrum von 8	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13.45(CCH ₃), 13.99 (OCH ₂ CH ₃), 45.47 (CH), 60.92 (OCH ₂ CH ₃), 169.80 (COOC ₂ H ₅)
¹³ C NMR-Spektrum von 9	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 14.03 (OCH ₂ CH ₃), 41.35 (CH ₂), 60.91 (OCH ₂ CH ₃), 166.64 (COOC ₂ H ₅)
¹ H NMR-Spektrum von 10	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.15 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H, OCH ₂ CH ₃), 1.55 (s, 3H, CCH ₃), 1.87 (s, 3H, COCH ₃), 4.12 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, OCH ₂ CH ₃), 8.27 (s, 1H, NH)

¹ H NMR-Spektrum von 11	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.71 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃), 1.14 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H, OCH ₂ CH ₃), 1.90 (s, 3H, CCH ₃), 1.87 (s, 3H, COCH ₃), 2.09 (q, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃), 4.07-4.15 (m, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, OCH ₂ CH ₃), 8.16 (s, 1H, NH)
¹³ C NMR-Spektrum von 10	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13.90 (OCH ₂ CH ₃), 21.36 (CCH ₃), 22.31 (COCH ₃) 61.60 (OCH ₂ CH ₃), 62.68 (CCOOC ₂ H ₅), 168.41 (COOC ₂ H ₅), 169.14 (CONH)
¹³ C NMR-Spektrum von 11	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 7.83 (CH ₂ CH ₃), 13.95 (OCH ₂ CH ₃), 22.24 (COCH ₃), 25.94 (CCH ₃), 61.56 (OCH ₂ CH ₃), 66.77 (CCOOC ₂ H ₅), 167.69 (COOC ₂ H ₅), 169.07 (CONH)
¹ H NMR-Spektrum von 3 , normale Messzeit	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.76 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃), 1.12 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H, OCH ₂ CH ₃), 2.07 (q, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃), 4.12 (q, <i>J</i> = 6.9 Hz, 4H, OCH ₂ CH ₃), 5.03 (s, 2H, C ₆ H ₅ CH ₂), 7.29-7.38 (m, 5H, C ₆ H ₅), 7.59 (s, 1H, NH)
¹ H NMR-Spektrum von 3 , doppelte Messzeit	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.76 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃), 1.12 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H, OCH ₂ CH ₃), 2.07 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃), 4.09-4.16 (m, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H, OCH ₂ CH ₃), 5.03 (s, 2H, C ₆ H ₅ CH ₂), 7.29-7.38 (m, 5H, C ₆ H ₅), 7.48 (s, 1H, NH)
¹³ C NMR-Spektrum von 3 , normale Messzeit	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 7.96 (CH ₂ CH ₃), 13.98 (OCH ₂ CH ₃), 26.70 (CH ₂ CH ₃), 61.83 (OCH ₂ CH ₃), 65.73, 67.15 (CH ₂ C ₆ H ₅ , CCOOC ₂ H ₅), 127.76, 128.03, 128.51, 137.00 (C ₆ H ₅), 154.75 (CONH), 167.70 (COOC ₂ H ₅)

2.2. Hydrolyse des 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäurediethylesters (4)

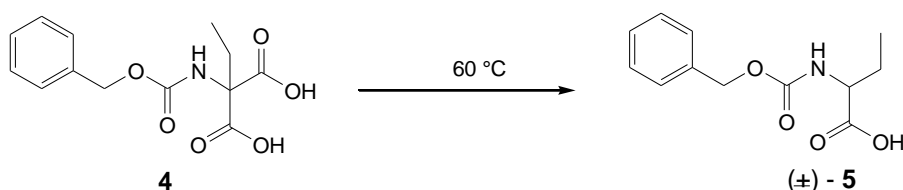
Das Malonsäureester-Derivat **3** sollte im nächsten Schritt verseift werden. Die Reaktion wurde in einer Mischung von 2.5 mol/l NaOH/Ethanol (3+1) bei RT durchgeführt. Die dünnschichtchromatographische Kontrolle der Reaktionslösung zeigte, dass nach 4 d ein vollständiger Umsatz vorlag. Die Reaktionslösung wurde unter Rühren bei 0 °C mit vorgekühlter 1 mol/l HCl vorsichtig angesäuert (Schema 3).^{[26] [27]}

Schema 3



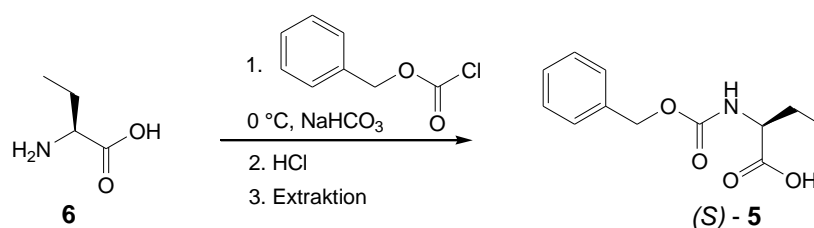
Beim ersten Mal wurde nach der Spaltung des Esters **3** zur Extraktion Ethylacetat benutzt. Die Entfernung des organischen Lösungsmittels wurde bei vollem Vakuum (etwa 20 mbar), 30 °C Wasserbadtemperatur und 15 min durchgeführt. Der ölige Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und mittels NMR-Spektren analysiert (Abb. 9). Nach den NMR-Spektren blieb eine große Menge des Ethylacetats an der Säure **4**. Deshalb wurde beim zweiten Mal eine höhere Temperatur und längere Zeit für die Entfernung des Lösungsmittels benutzt. Es wurde bei vollem Vakuum, 60 °C Wasserbadtemperatur und 30 min abrotiert. An der Säure **4** blieb eine geringere Menge Ethylacetat und dazu entstand noch das Nebenprodukt **5** (Schema 4, Abb. 10).

Schema 4



Wir vermuteten, dass das Nebenprodukt durch Decarboxylierung der Malonsäure entstanden war. Deswegen wurde diese decarboxylierte Säure **5** separat synthetisiert (Schema 5, Abb. 12). Es wurde kommerziell zugängliches (*S*)-H-Abu-OH **6** eingesetzt.

Schema 5



Alle Signale in den NMR-Spektren von (*S*)-**5** entsprachen denen des Nebenproduktes. Unsere Vermutung wurde bestätigt. Das Nebenprodukt **5**, das bei dem Erhitzen von **4** entstand, war die decarboxylierte Malonsäure **5** in racemischer Form.

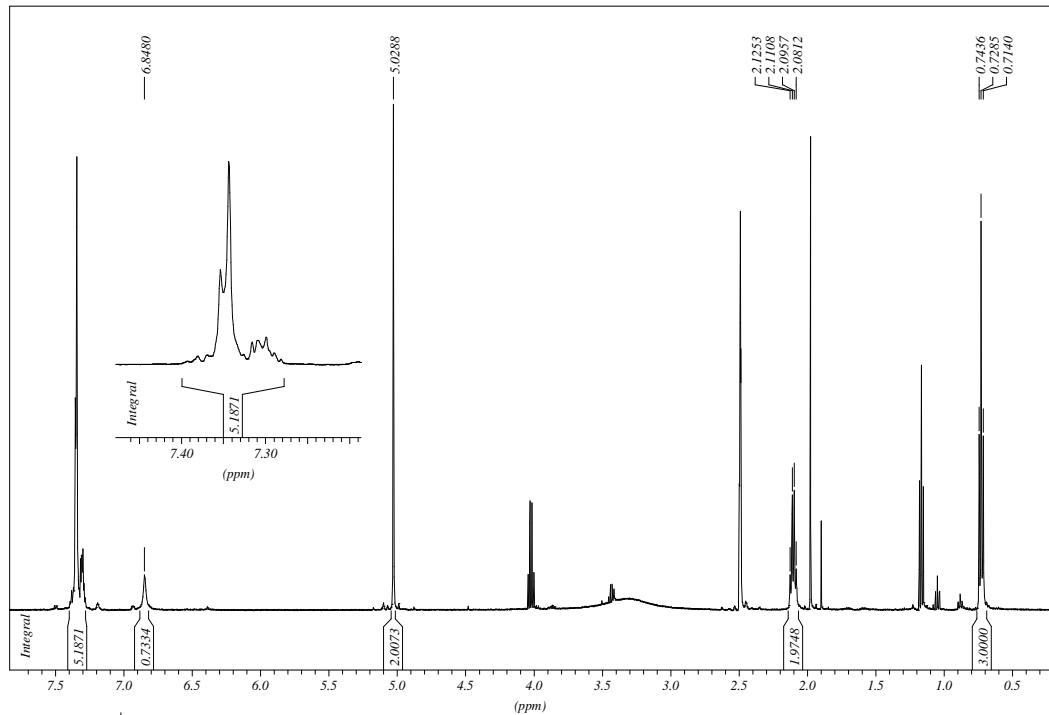
Im ^{13}C NMR-Spektrum von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 oder $60\text{ }^\circ\text{C}$) konnte man das Signal bei 169.59 ppm nicht eindeutig zuordnen. Es könnte entweder der COOH-Gruppe von **4** oder dem Carbonylkohlenstoff von Ethylacetat zugehören. Der Carbonylkohlenstoff von Ethylacetat bei 170.31 ppm^[28] sollte eine ähnliche chemische Verschiebung wie der Carbonylkohlenstoff der Säure **4** aufweisen. Deshalb wurde in einem dritten Experiment die Extraktion mit Diethylether durchgeführt. Diethylether hat keine CO-Gruppe. Das Signal bei 170 ppm war jedoch im ^{13}C NMR-Spektrum des neu gewonnenen Produktes wieder sichtbar (Abb. 11). So konnte man dieses Signal zu unserer Substanz zuordnen.

Bei diesem dritten Mal wurde die Entfernung des organischen Lösungsmittels Diethylether bei vollem Vakuum, $30\text{ }^\circ\text{C}$ Wasserbadtemperatur und 15 Minuten durchgeführt. Es war zu keiner Abspaltung von Kohlendioxid unter Bildung von **5** gekommen. An der Säure **4** blieb aber noch Ethanol aus der vergangenen Synthesestufe. Der Siedepunkt Ethanols ($78\text{ }^\circ\text{C}$)^[29] ist etwa zwei Mal höher als der Siedepunkt Diethylethers ($35\text{ }^\circ\text{C}$)^[29]. Der Siedepunkt Ethylacetats ($77\text{ }^\circ\text{C}$)^[29] ist ähnlich wie der Siedepunkt Ethanols. Deshalb wurde beim ersten und zweiten Mal

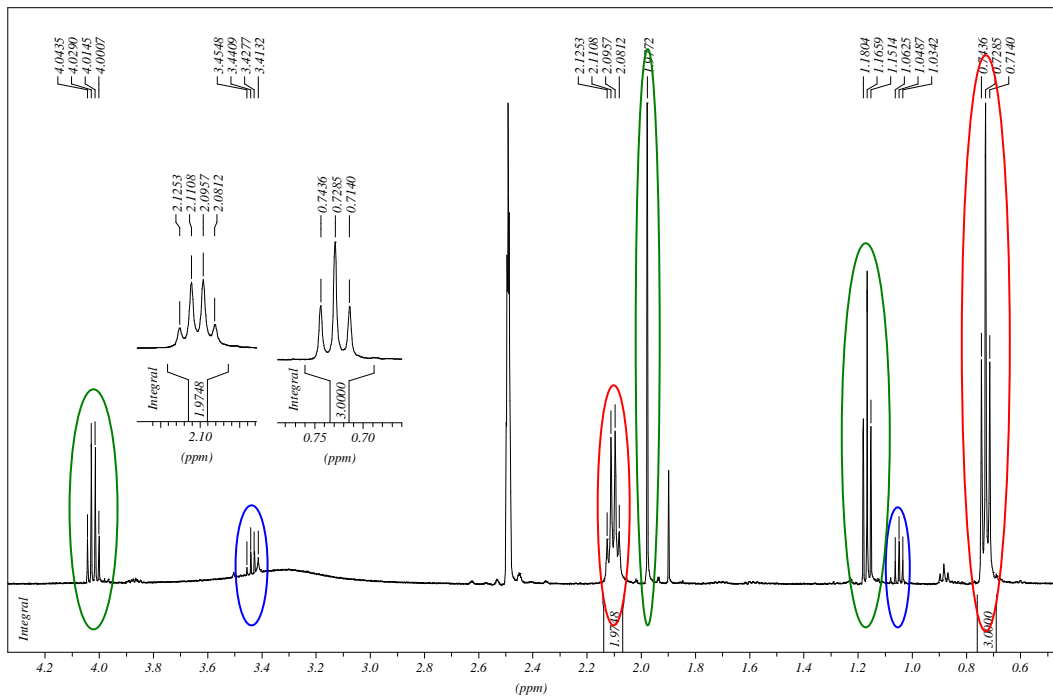
Ethanol mit Ethylacetat zusammen abrotiert und an der Säure **4** blieb nur Ethylacetat. Wenn man Ethanol mit Diethylether abrotierte, wurde nicht das gesamte Ethanol entfernt, weil Diethylether einen niedrigen Siedepunkt hat, und Ethanol anteilig an der Säure **4** haften blieb.

Nach unserer Meinung ist die beste Möglichkeit zur Gewinnung von **4** die Extraktion mit Ethylacetat und Entfernung bei 30 °C Wasserbadtemperatur. Es ist besser an der Säure **4** organisches Lösungsmittel Ethylacetat und kein Nebenprodukt **5** zu erhalten. Die Malonsäure **4** ist bislang in der Literatur nicht beschrieben.

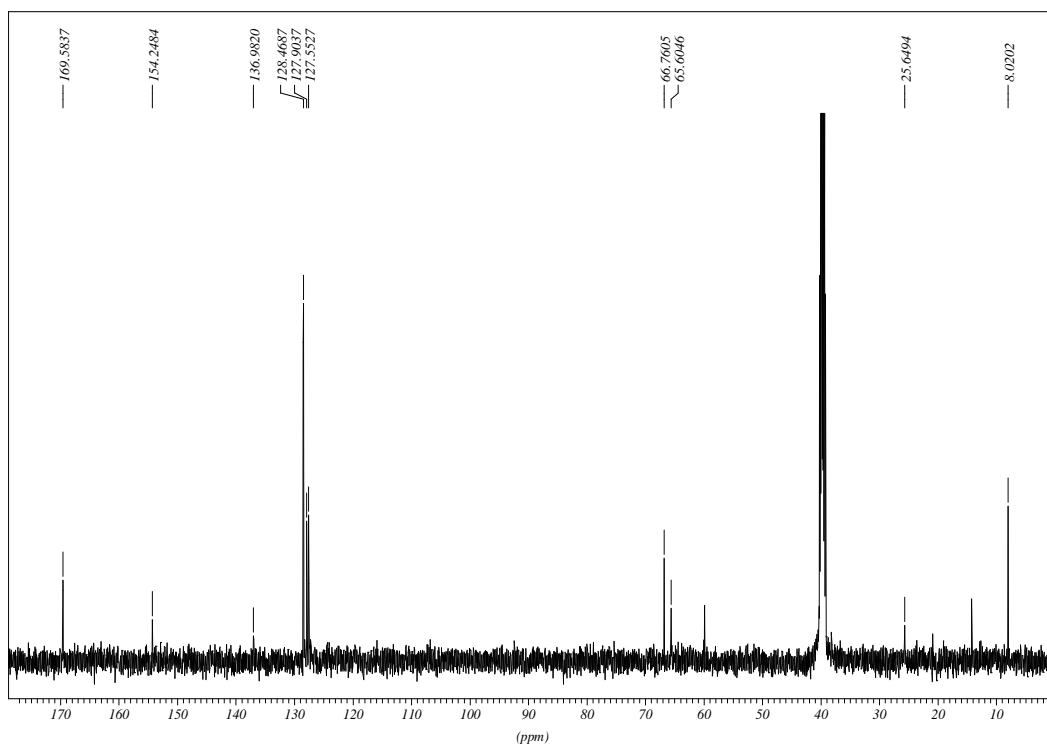
Abb. 9



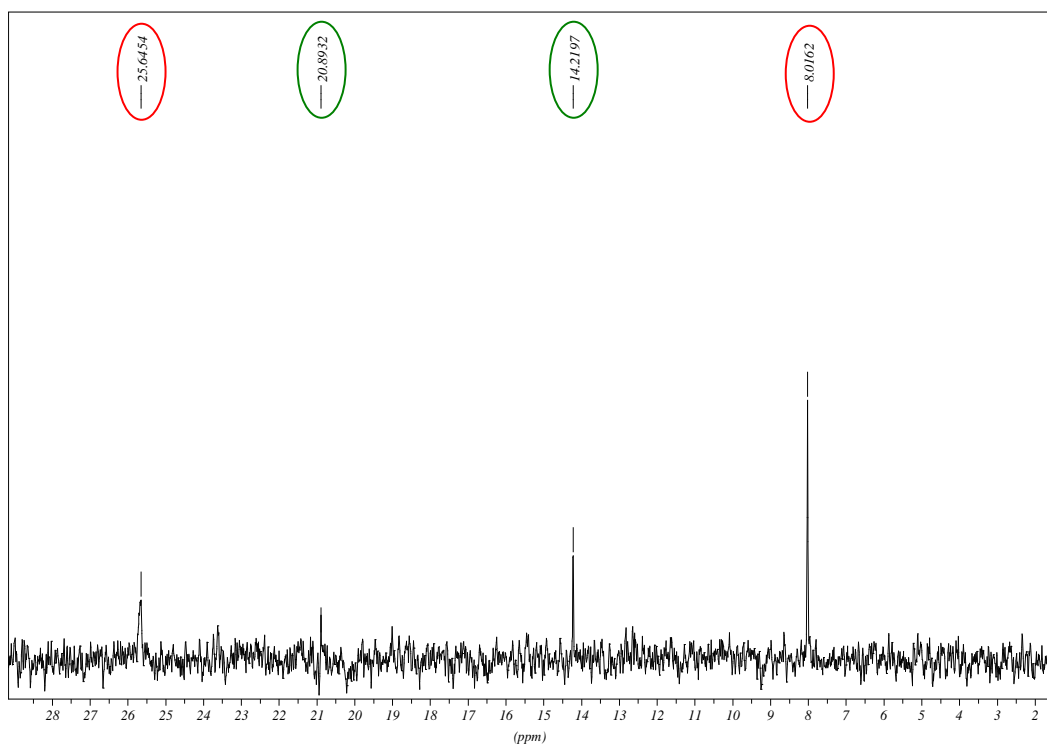
(A) ^1H NMR-Spektrum von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30°C).



(B) ^1H NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C). Die Signale von **4** (rot), Ethylacetat (grün) und Ethanol (blau) sind gekennzeichnet.

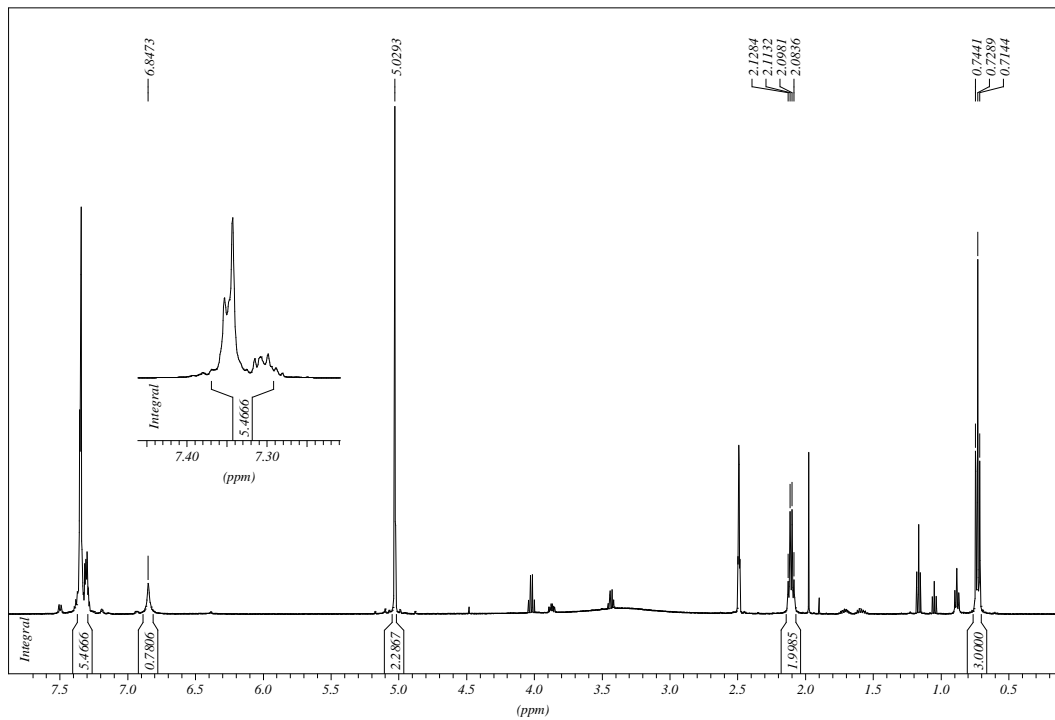


(C) ^{13}C NMR-Spektrum von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C).

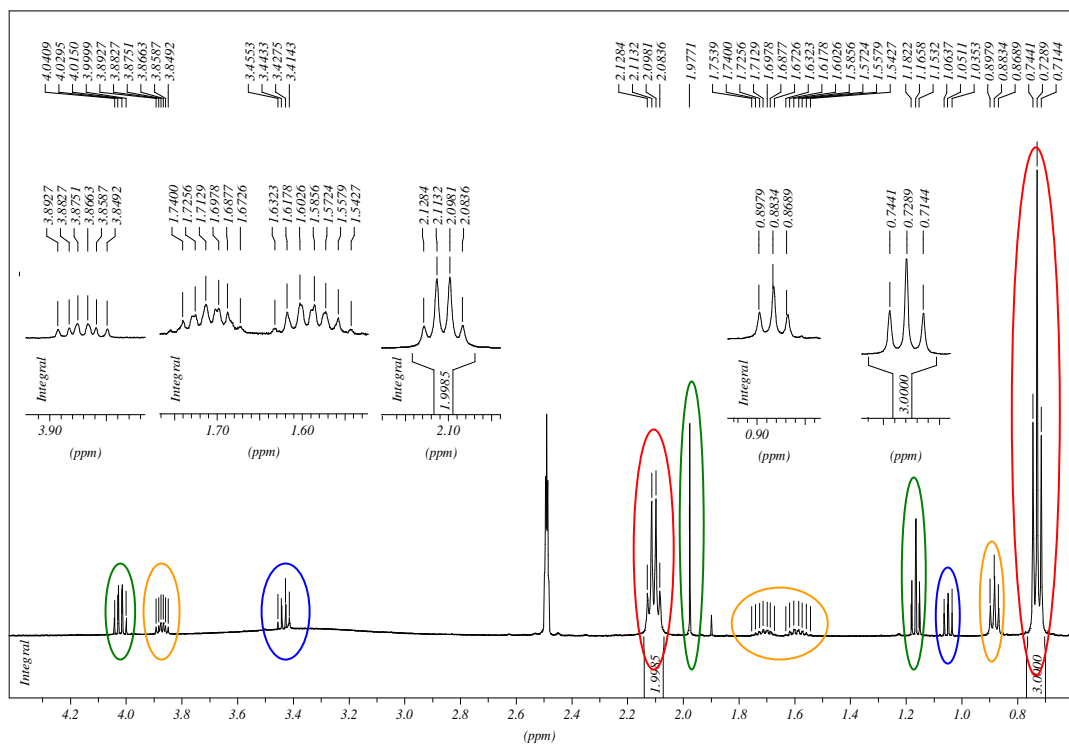


(D) ^{13}C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C). Die Signale von **4** (rot) und Ethylacetat (grün) sind gekennzeichnet.

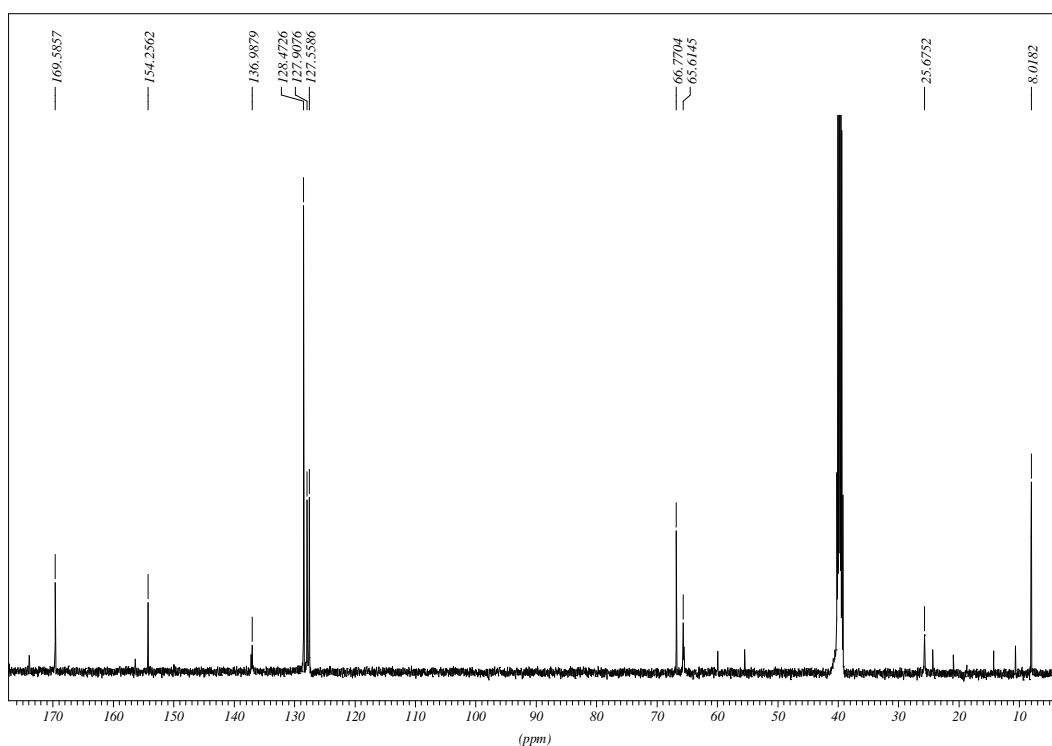
Abb. 10



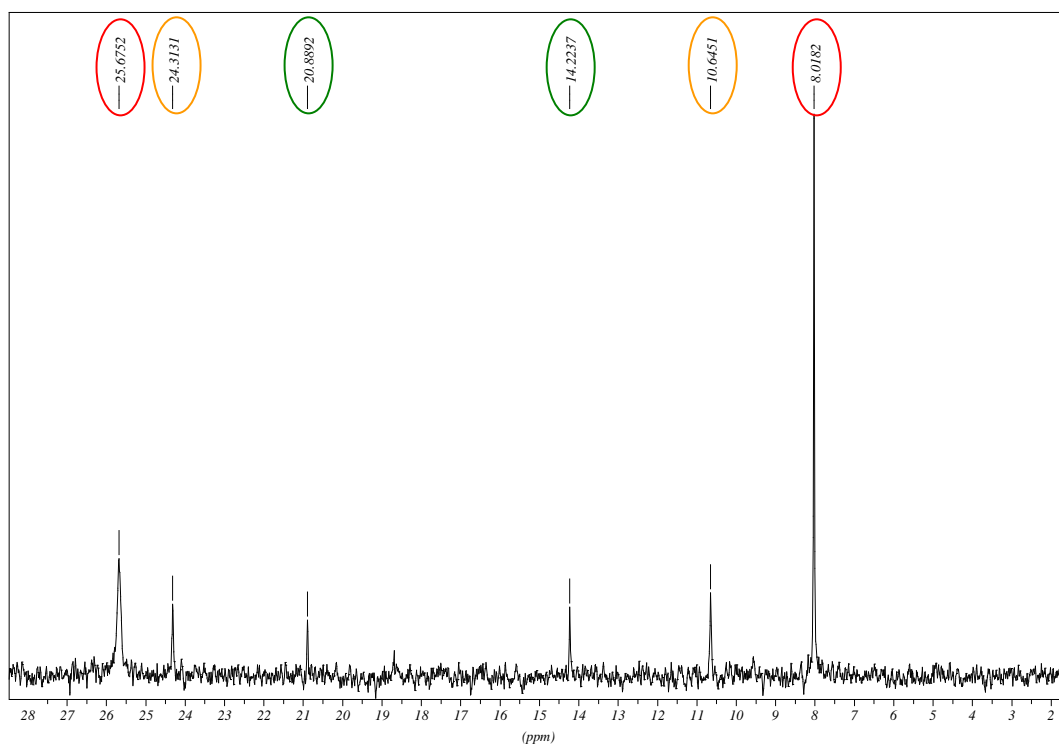
(A) ^1H NMR-Spektrum von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C).



(B) ^1H NMR-Spektrum, (Ausschnitt) von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C). Die Signale von **4** (rot), Ethylacetat (grün), Nebenprodukt **5** (gelb) und Ethanol (blau) sind gekennzeichnet.

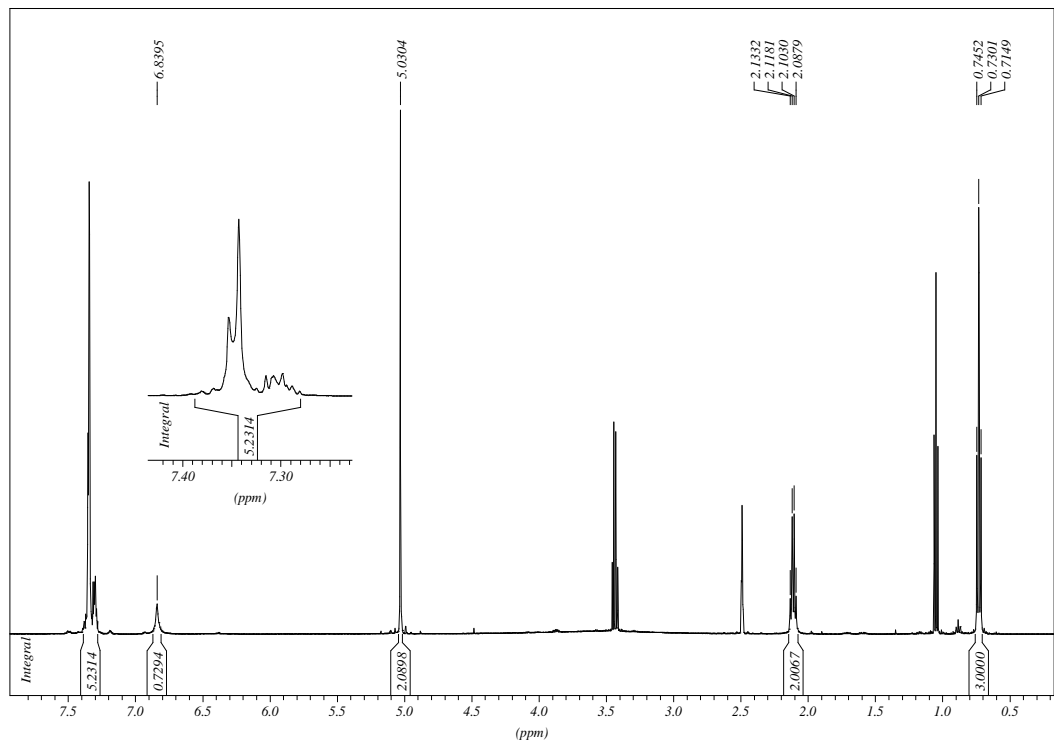


(C) ^{13}C NMR-Spektrum von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C).

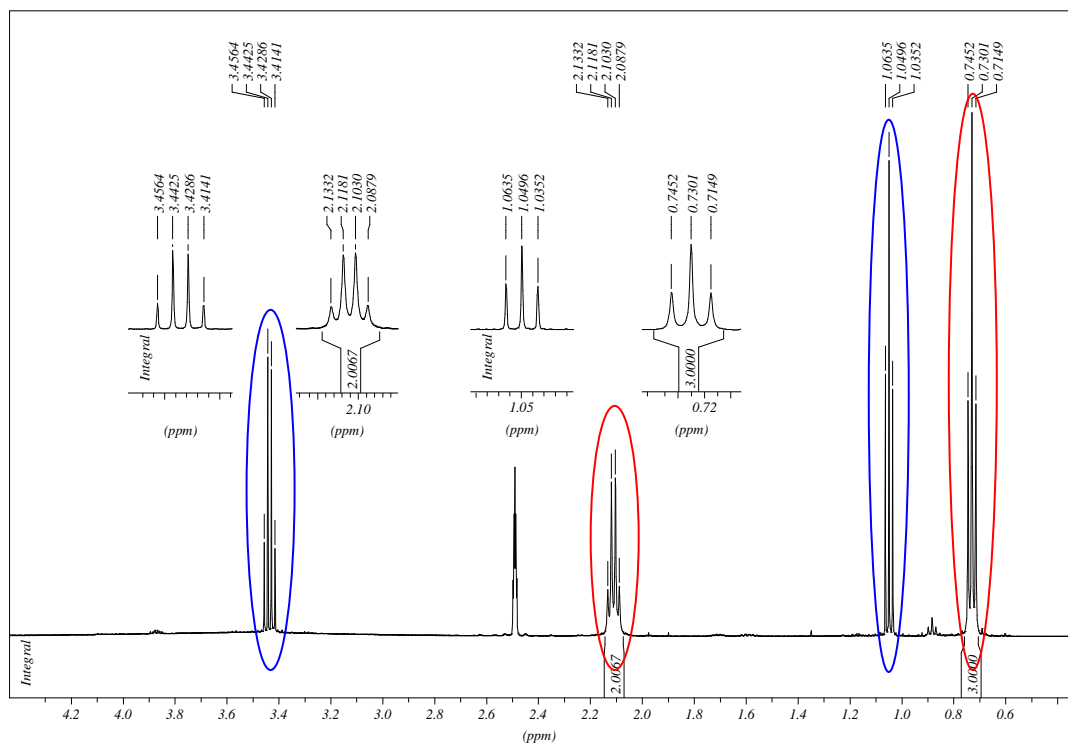


(D) ^{13}C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **4** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C). Signale von **4** (rot), Ethylacetat (grün) und Nebenprodukt **5** (gelb) sind gekennzeichnet.

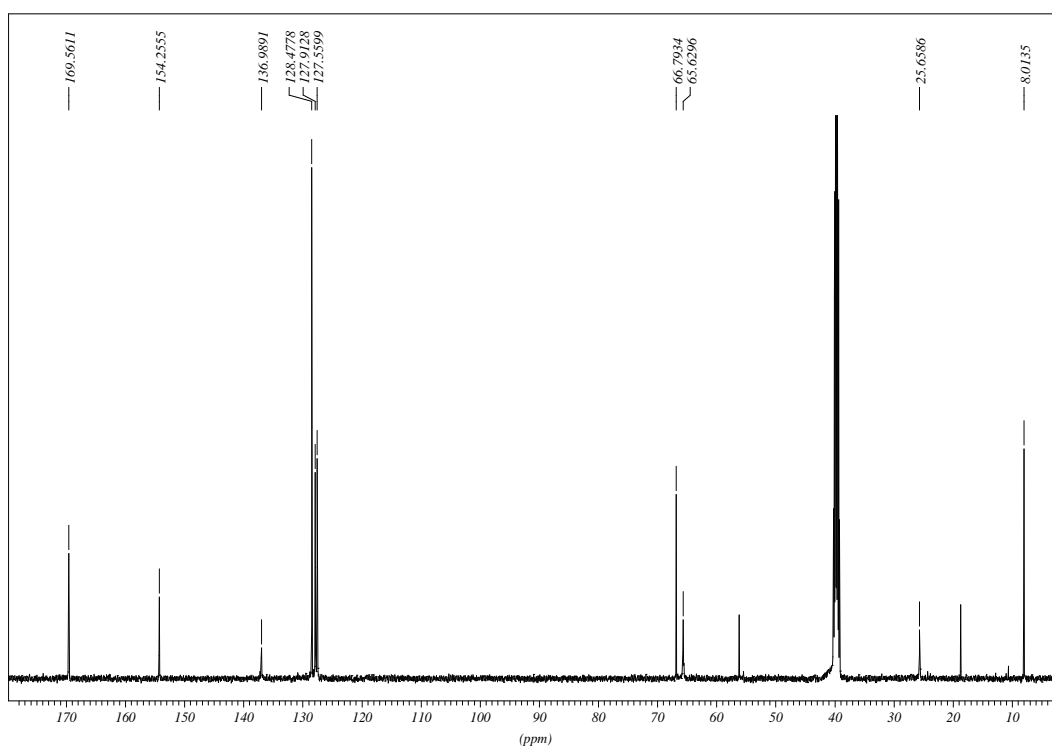
Abb. 11



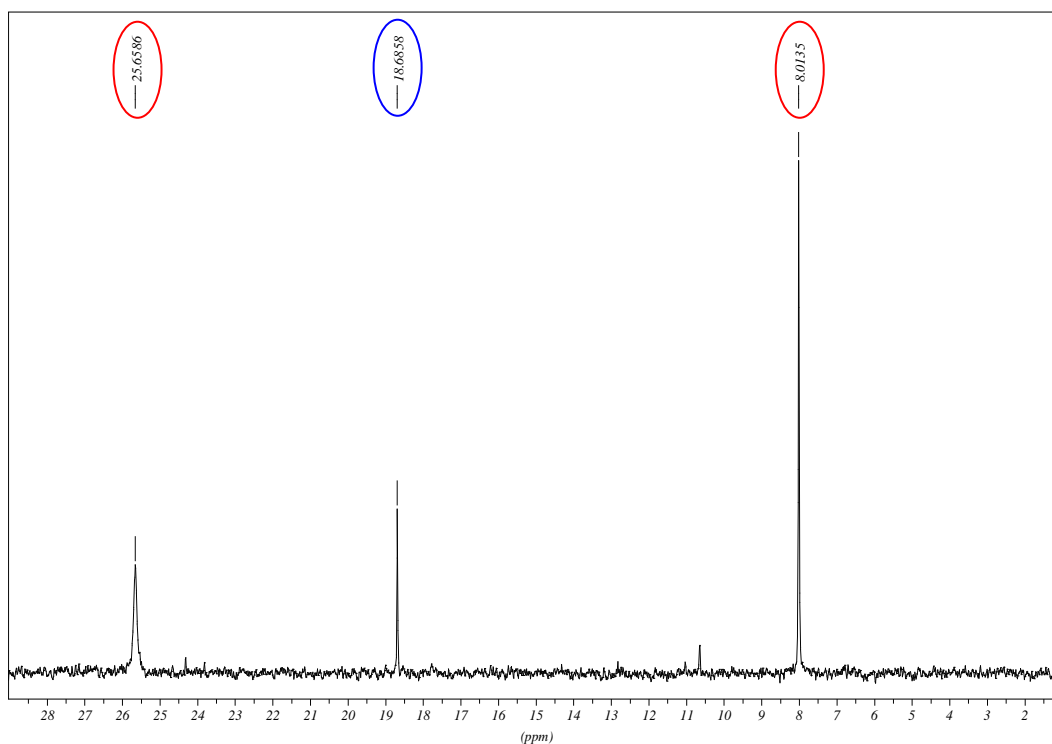
(A) ^1H NMR-Spektrum von **4** (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C).



(B) ^1H NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **4** (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C). Die Signale von **4** (rot) und Ethanol (blau) sind gekennzeichnet.

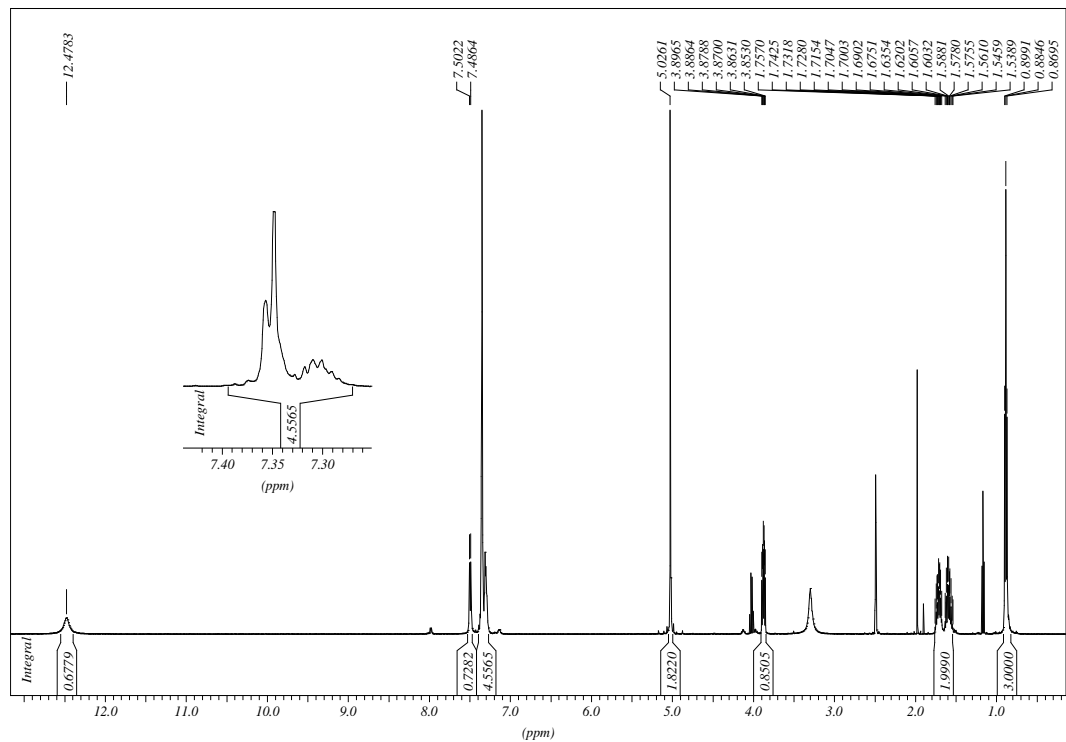


(C) ^{13}C NMR-Spektrum von **4** (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C).

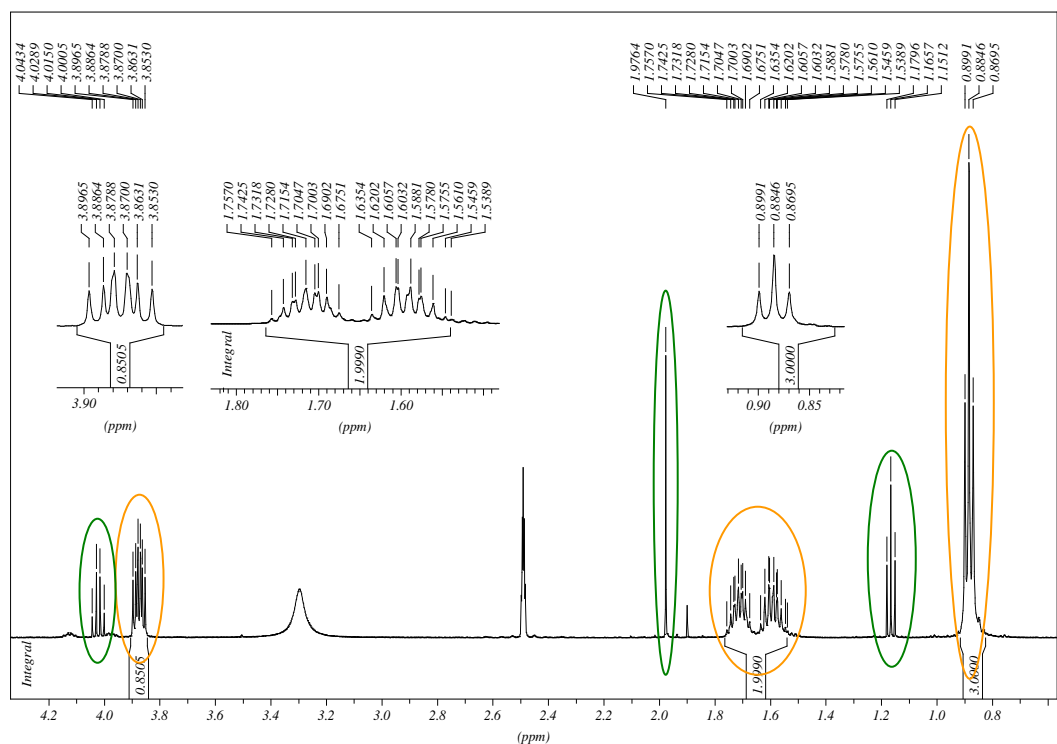


(D) ^{13}C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **4** (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C). Die Signale von **4** (rot) und Ethanol (blau) sind gekennzeichnet.

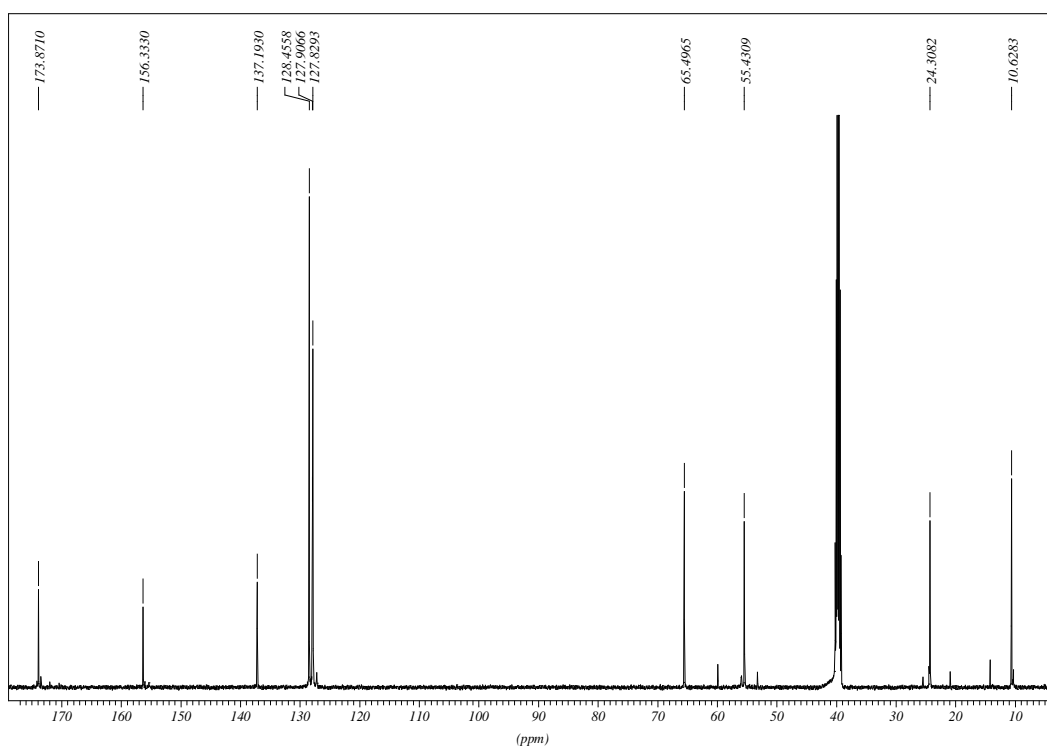
Abb. 12



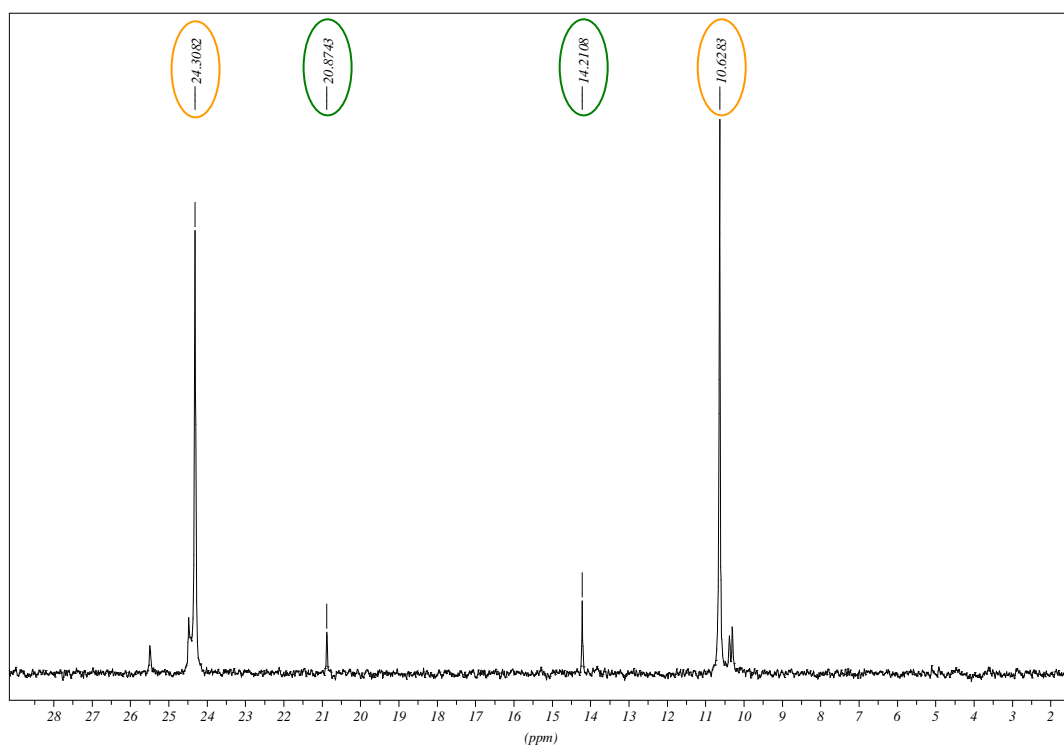
(A) ^1H NMR-Spektrum von **5** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C).



(B) ^1H NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **5** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C). Die Signale von Ethylacetat (grün) und **5** (gelb) sind gekennzeichnet.



(C) ^{13}C NMR-Spektrum von **5** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C).



(D) ^{13}C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von **5** (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C). Die Signale von Ethylacetat (grün) und Nebenprodukt **5** (gelb) sind gekennzeichnet.

Tabelle 2. Chemische Verschiebungen, Multiplizität und Kopplungskonstanten der NMR-Spektren von ausgewählten Verbindungen ^a.

¹ H NMR-Spektrum von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.73 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH ₃), 2.10 (q, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃), 5.03 (s, 2H, OCH ₂), 6.85 (s, 1H, NH), 7.28-7.38 (m, 5H, C ₆ H ₅)
¹ H NMR-Spektrum (Ausschnitt) von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.73 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH ₃), 2.10 (q, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃); Ethanol ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.05 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H, CH ₃), 3.43 (q, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H, CH ₂); Ethylacetat ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.17 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃), 1.98 (s, 3H, CH ₃ CO), 4.02 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃)
¹³ C NMR-Spektrum von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.02 (CH ₃), 25.65 (CH ₂ CH ₃), 65.60, 66.76 (OCH ₂ , CCOOH), 127.55, 127.90, 128.47, 136.98 (C ₆ H ₅), 154.25 (CONH), 169.58 (COOH)
¹³ C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.02 (CH ₃), 25.64 (CH ₂ CH ₃); Ethylacetat ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 14.22 (CH ₂ CH ₃), 20.89 (CH ₃ CO)
¹ H NMR-Spektrum von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.73 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 3H, CH ₃), 2.11 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃), 5.03 (s, 2H, OCH ₂), 6.85 (s, 1H, NH), 7.29-7.39 (m, 5H, C ₆ H ₅)
¹ H NMR-Spektrum, (Ausschnitt) von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.73 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 3H, CH ₃), 2.11 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃); Ethanol ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.05 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 3H, CH ₃), 3.43 (q, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H, CH ₂); Ethylacetat ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.16 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃), 1.98 (s, 3H, CH ₃ CO), 4.02 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃); Nebenprodukt ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.90 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH ₃), 1.55-1.76 (m, 2H, CH ₂ CH ₃), 3.85-3.90 (m, 1H, CH)

¹³ C NMR-Spektrum von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.02 (CH ₃), 25.68 (CH ₂ CH ₃), 65.61, 66.77 (OCH ₂ , CCOOH), 127.56, 127.91, 128.47, 136.99 (C ₆ H ₅), 154.26 (CONH), 169.59 (COOH)
¹³ C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von 4 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 60 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.01 (CH ₃), 25.68 (CH ₂ CH ₃); Ethylacetat ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 14.22 (CH ₂ CH ₃), 20.89 (CH ₃ CO); Nebenprodukt ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.65 (CH ₃), 24.31 (CH ₂ CH ₃)
¹ H NMR-Spektrum von 4 (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.73 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H, CH ₃), 2.10 (q, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃), 5.03 (s, 2H, OCH ₂), 6.84 (s, 1H, NH), 7.28-7.39 (m, 5H, C ₆ H ₅)
¹ H NMR-Spektrum (Ausschnitt) von 4 (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.73 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H, CH ₃), 2.10 (q, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃); Ethanol ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.05 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H, CH ₃), 3.44 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, CH ₂)
¹³ C NMR-Spektrum von 4 (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.01 (CH ₃), 25.66 (CH ₂ CH ₃), 65.63, 66.79 (OCH ₂ , CCOOH), 127.56, 127.91, 128.48, 136.99 (C ₆ H ₅), 154.26 (CONH), 169.56 (COOH)
¹³ C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von 4 (Extraktion mit Diethylether, Entfernung bei 30 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.01 (CH ₃), 25.66 (CH ₂ CH ₃); Ethanol ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 18.69 (CH ₃)
¹ H NMR-Spektrum von 5 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.88 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH ₃), 1.54-1.76 (m, 2H, CH ₂ CH ₃), 3.85-3.90 (m, 1H, CH), 5.03 (s, 2H, OCH ₂), 7.28-7.37 (m, 5H, C ₆ H ₅), 7.49 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H, NH), 12.48 (s, 1H, COOH)
¹ H NMR-Spektrum (Ausschnitt) von 5 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.88 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH ₃), 1.54-1.76 (m, 2H, CH ₂ CH ₃), 3.85-3.90 (m, 1H, CH); Ethylacetat ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.17 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H, CH ₃), 1.98 (s, 3H, CH ₃ CO), 4.02 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃)

¹³ C NMR-Spektrum von 5 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.63 (CH ₃), 24.31 (CH ₂ CH ₃), 55.43, 65.50 (OCH ₂ , CCOOH), 127.83, 127.91, 128.46, 137.19, (C ₆ H ₅), 156.33 (CONH), 173.87 (COOH)
¹³ C NMR-Spektrum (Ausschnitt) von 5 (Extraktion mit Ethylacetat, Entfernung bei 30 °C)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.63 (CH ₃), 24.31 (CH ₂ CH ₃); Ethylacetat ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 14.21 (CH ₂ CH ₃), 20.87 (CH ₃ CO)

^a Die chemischen Verschiebungen von Lösungsmitteln sind in der Literatur beschrieben ^[28]

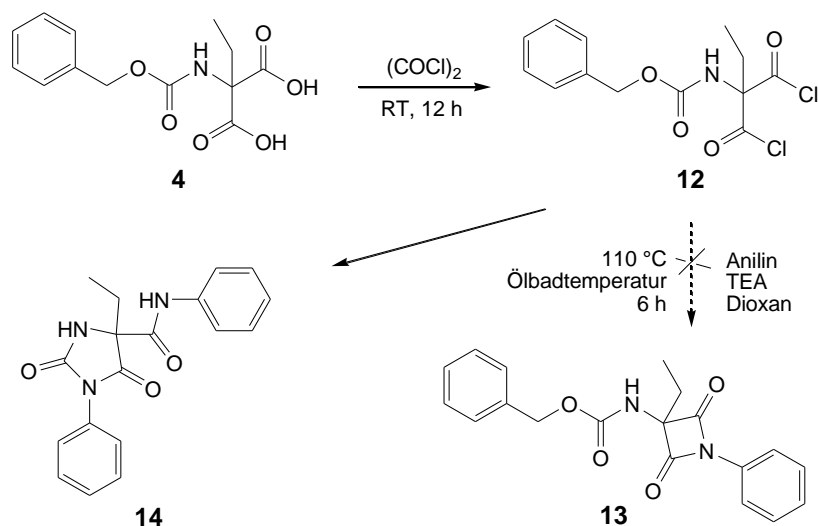
2.3. Versuche zur Herstellung von dem Azetidin-2,4-dion-Derivat **13**

2.3.1. Umsetzung von **4** und Anilin

2.3.1.1. Reaktion bei 110 °C Ölbadtemperatur mit 1 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan

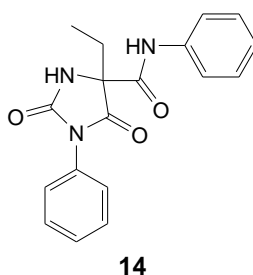
Mit dem Ziel, das Produkt **13** zu erhalten, wurden im ersten Experiment die in der Literatur beschriebenen Reaktionsbedingungen verwendet. ^[2] ^[3] Das Malonsäure-Derivat **4** sollte zunächst in das Säurechlorid umgewandelt werden. Im absolutierten Dichlormethan wurden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (5 mmol), Oxalylchlorid (23 mmol) und 3 Tropfen DMF (Dimethylformamid) bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde ^[30]. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels Dichlormethan wurde der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wurde unter Argonatmosphäre 1 äquiv. (Äquivalent) Anilin zugegeben und dann tropfenweise eine Lösung von TEA (Triethylamin) in Dioxan 1 h zugespritzt. Danach wurde die Reaktionslösung 6 h bei 110 °C (Ölbadtemperatur) erhitzt (Schema 6). Triethylamin-Hydrochlorid (**27**) wurde durch Absaugen abgetrennt, das Lösungsmittel wurde vom Filtrat entfernt und der ölige braune Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt. ^[2] ^[3] Es wurden 5 Fraktionen gewonnen.

Schema 6



Die erste Fraktion (m = 0.08 g, oranges Öl) wurde nicht zur NMR-Spektroskopie gegeben, weil es nur eine geringere Menge war. Auch die zweite Fraktion (m = 0.10 g, braunes Öl mit Niederschlag) wurde aus diesem Grund nicht zur NMR-Spektroskopie gegeben. Die dritte Fraktion (m = 0.11 g, hellorange Niederschlag) war den NMR-Spektren zufolge kein sauberes Material. Nach dem NMR-Spektrum der vierten Fraktion (m = 0.11 g, orange Kristalle) konnten wir nicht die Struktur eindeutig zuordnen. Dieser Stoff wurde zur MS (Massenspektroskopie) gegeben und seine Molekülmasse war 193 g/mol. Die Struktur von **16** (Formel nicht abgebildet) konnte in Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Die fünfte Fraktion, das Hauptprodukt (m = 0.35 g, helloranger Niederschlag) wurde zur NMR-Spektroskopie und zur MS gegeben. Molekülmasse war 323 g/mol, die Summenformel C₁₈H₁₇N₃O₃. Es wurde demnach ein Hydantoin **14** erhalten.



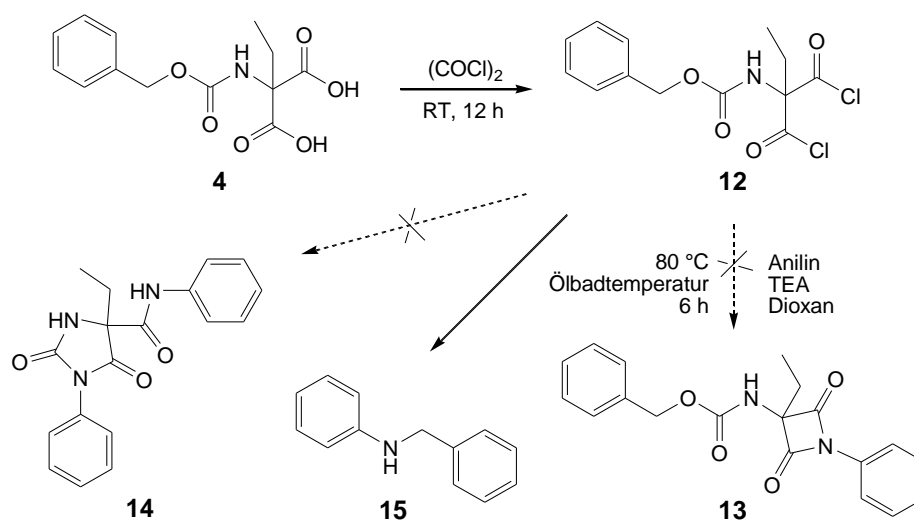
Es wurde kein Azetidin-2,4-dion-Derivat **13** gewonnen, deshalb wir die Reaktionsbedingungen verändert haben.

2.3.1.2. Reaktion bei 80 °C Ölbadtemperatur mit 1 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan

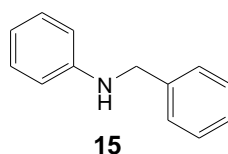
In absolutiertem Dichlormethan wurden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (5 mmol), Oxalylchlorid (23 mmol) und 3 Tropfen DMF bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Nach der Entfernung von Dichlormethan wurde der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wurde unter Argonatmosphäre tropfenweise eine Lösung von 1 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan 1 h bei 80 °C Ölbadtemperatur zugespritzt. Danach wurde die Reaktionslösung noch

6 h bei 80 °C erhitzt (Schema 7). Triethylamin-Hydrochlorid (**27**) wurde abgesaugt und der nach dem Abrotieren anfallende ölige, orange-braune Rückstand wurde durch Säulenchromatographie gereinigt. Es wurden wieder 5 Fraktionen gewonnen.

Schema 7



Die erste Fraktion (m = 0.19 g, orange Kristalle) ist nach den NMR-Spektren N-Benzylanilin (**15**). Die Zuordnung erfolgte auf der Grundlage der NMR-Daten aus der Literatur.^[31]



Die zweite Fraktion (m = 0.02 g, orange Niederschlag) und die dritte Fraktion (m = 0.06 g, oranges Öl) wurden nicht zur NMR-Spektroskopie gegeben, weil es nur geringere Mengen waren. Nach den NMR-Spektren der vierten Fraktion (m = 0.19 g, oranges Öl) waren dort die gleichen Signale wie bei **16** (Formel nicht abgebildet), aber dazu noch Anilin^[31]. Deshalb wurde dieser Stoff in Ethylacetat gelöst und mit HCl (0.05 mol/l, 5 ml) und zwei Mal mit Wasser ausgeschüttelt. Essigesterphase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und abrotiert. Nach DC (Dünnschichtchromatographie) entstand noch ein Produkt. Wahrscheinlich wurde das Molekül **16** gespalten. Es wurde versucht, dieses Öl aus Petrolether umzukristallisieren. Einige ockergelbe Kristalle waren ausgefallen, aber nur 2 mg.

Die fünfte Fraktion (m = 0.09 g, orange Kristalle) wurden nicht zur NMR-Spektroskopie gegeben.

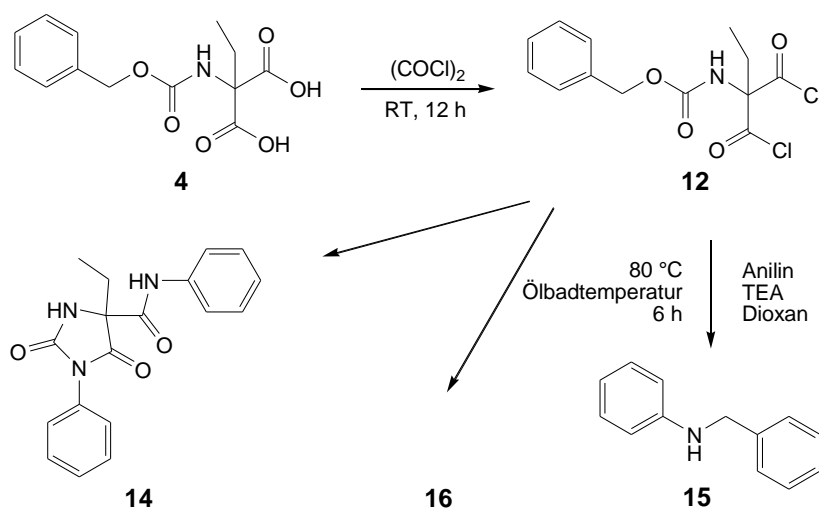
Die sechste Fraktion, das Hauptprodukt (m = 0.40 g, orange, schmierige Masse) war nach den NMR-Spektren kein sauberer Material. Wir versuchten, diesen Stoff aus Aceton umzukristallisieren, es entstand ein Niederschlag, aber wahrscheinlich hatte dieser Stoff mit Aceton reagiert, weil weitere Signale in den NMR-Spektren entstanden.

In diesem Experiment wurde kein Hydantoin **14** und kein Azetidin-2,4-dion-Derivat **13** gewonnen. An der eingesetzten Malonsäure **4** haftet sehr viel Ethanol an, und das konnte der Grund des Fehlschlages sein.

2.3.1.3. Reaktion bei 80 °C Ölbadtemperatur mit 1 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan

In diesem Ansatz wurden die gleichen Bedingungen wie im vergangenen Experiment noch einmal benutzt. Bei 80 °C Ölbadtemperatur und unter Argonatmosphäre wurden 1 äquiv. Anilin mit TEA in Dioxan zusammen 1 h zugegeben, dann 6 h erhitzt und am nächsten Tag abgesaugt. Das Filtrat wurde abrotiert und der ölige Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt (Schema 8).

Schema 8



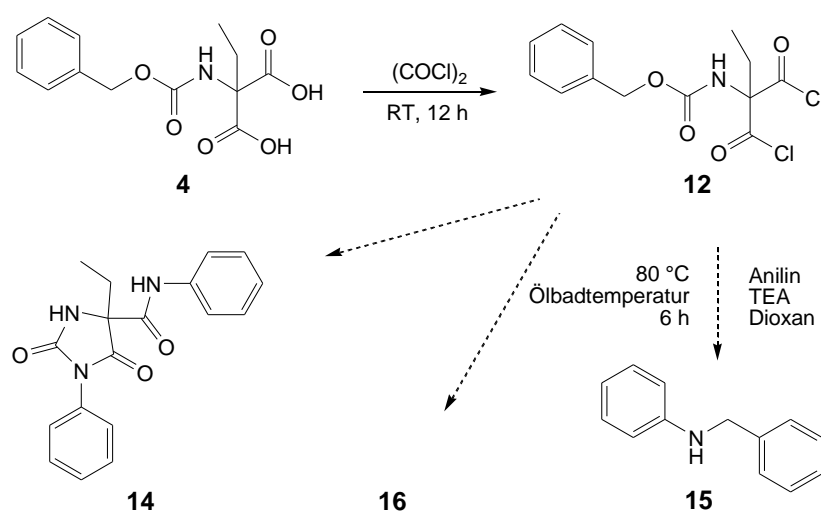
Die erste Fraktion (m = 0.12 g, orange Kristalle) wurde nach der NMR-Spektroskopie der Substanz **15** zugeordnet. Die zweite Fraktion (m = 0.05 g, hellbraunes Öl) war nach NMR-Spektroskopie die Substanz **16**. Nach dem NMR-Spektrum war die dritte Fraktion (m = 0.07 g, oranges Öl) nicht sauber. Die vierte Fraktion (m = 0.27 g, orange Kristalle) wurden analysiert und das Ergebnis war ein Hydantoin, Substanz **14**.

In diesem Ansatz wurden *N*-Benzylanilin (**15**), **16** und Hydantoin **14** synthetisiert.

2.3.1.4. Reaktion bei 80 °C Ölbadtemperatur mit 2 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan

Wenn die Reaktion nach einem Mechanismus, wie er in Schema 12 gezeichnet ist, ablaufen würde, sollte mehr Anilin zur höheren Ausbeute führen. In diesem Ansatz wurden die gleichen Bedingungen wie im vergangenen Experiment benutzt, nur die Menge von Anilin wurde verdoppelt. Bei 80 °C Ölbadtemperatur und unter Argonatmosphäre wurden 2 äquiv. Anilin mit TEA in Dioxan zusammen 1 h zugegeben, dann 6 h erhitzt und am nächsten Tag abgesaugt. Das Filtrat wurde abrotiert und der ölige Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt (Schema 9).

Schema 9



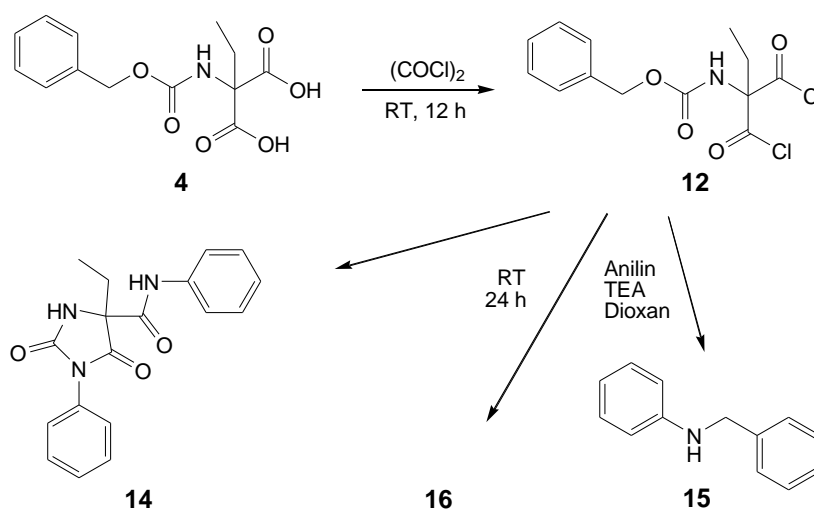
Es wurden 5 Fraktionen gewonnen. Nach den NMR-Spektren waren leider keine der Substanzen sauber. In den Spektren waren die entsprechenden Signale für die Moleküle *N*-Benzylanilin (**15**), **16** und das Hydantoin **14**.

2.3.1.5. Reaktion bei RT mit 2 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan

Wir vermuteten, dass die niedrigere Temperatur des Reaktionsablaufes kleinere Mengen von Nebenprodukten bringen würde. In diesem Ansatz wurden die gleichen Bedingungen wie im vergangenen Experiment benutzt, nur die Reaktion wurde bei RT durchgeführt. Unter Argonatmosphäre wurden 2 äquiv. Anilin mit TEA in Dioxan zusammen 1 h zugegeben, 24 h gerührt und dann abgesaugt. Das Filtrat wurde abrotiert und der ölige Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt (Schema 10).

Alle Fraktionen außer der zweiten ($m = 0.07$ g, oranges Öl) und der fünften Fraktion ($m = 0.07$ g war dunkelorange Öl) wurden analysiert. Die erste Fraktion ($m = 0.25$ g, orange Kristalle) war die Substanz **15**, die dritte Fraktion ($m = 0.30$ g, hellbraunes Öl) war die Substanz **16** und die vierte Fraktion ($m = 0.53$ g, orange Kristalle), das Hydantoin **14**.

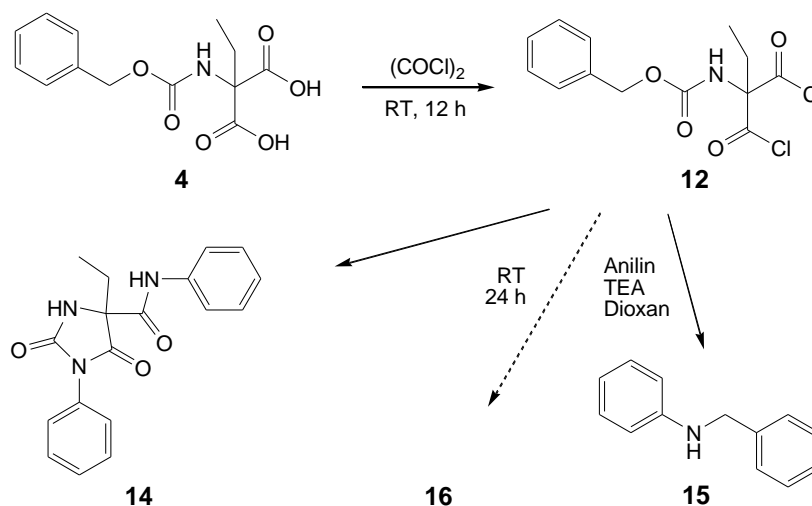
Schema 10



2.3.1.6. Reaktion bei RT mit 3 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan

Wenn die Reaktion nach einem Mechanismus, wie er in Schema 12 gezeichnet ist, ablaufen würde, sollten 3 äquiv. Anilin eingesetzt werden. In diesem Ansatz wurden die gleichen Bedingungen wie im vergangenen Experiment benutzt, nur mit 3 äquiv. Anilin. Bei RT und unter Argonatmosphäre wurde Anilin mit TEA in Dioxan zusammen 1 h zugegeben und dann 24 h gerührt, am nächsten Tag abgesaugt, das Filtrat abrotiert und der ölige Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt (Schema 11).

Schema 11



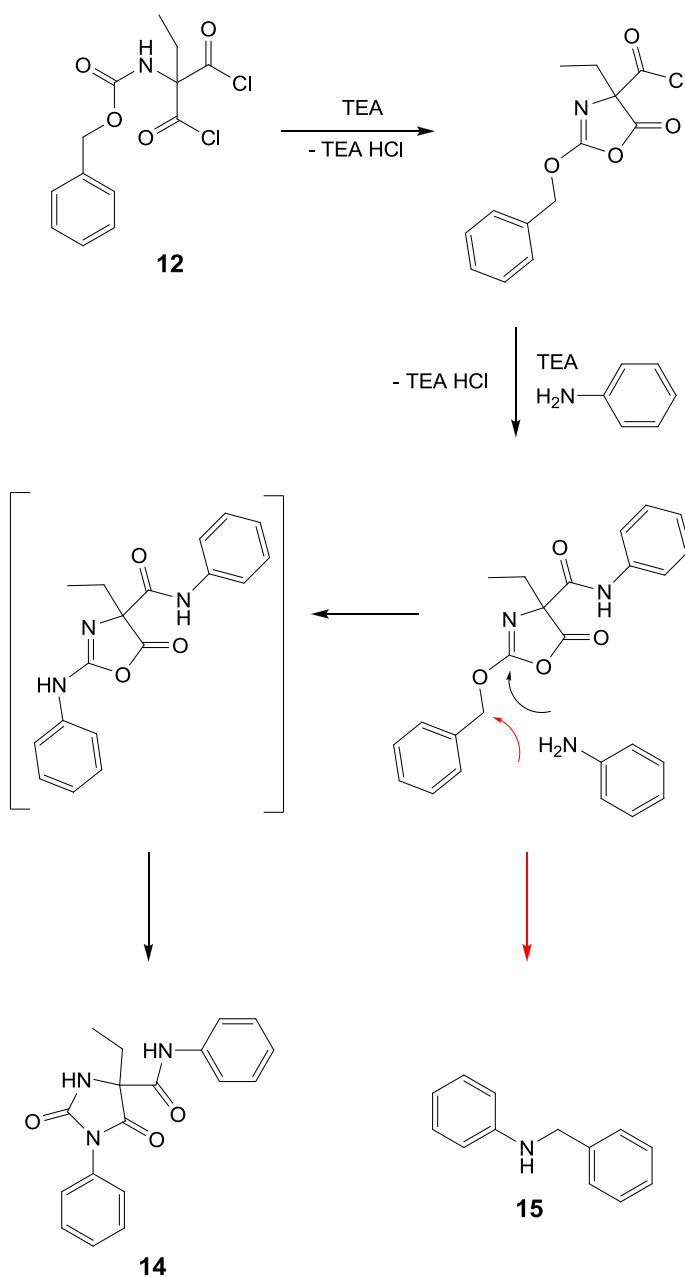
Es wurden 6 Fraktionen gewonnen. Die erste Fraktion ($m = 0.25$ g, orange Kristalle) war nach den NMR-Spektren die Substanz **15**. Die vierte Fraktion ($m = 0.11$ g, hellgelbes Öl) war nach der Analyse die Substanz **16**, aber verunreinigt. Die fünfte Fraktion, das Hauptprodukt ($m = 0.56$ g, helloranges Feststoff) war das Hydantoin, die Substanz **14**. Die anderen Fraktionen enthielten nur geringe Mengen und wurden nicht analysiert.

Die Herstellung von dem Azetidin-2,4-dion-Derivat **13** war leider unmöglich. Es wurden verschiedene Bedingungen nach der Literatur^{[2] [3]} und später nach unseren eigenen Meinungen und Überlegungen benutzt. Es hat sich immer ein Hydantoin **14** und *N*-Benzylamin (**15**) durch den unten vorgeschlagenen Mechanismus gebildet (Schema 12).

Die Ausbeuten mit 2 oder 3 äquiv. Anilin waren ähnlich. Die besten Bedingungen zur Herstellung des Hydantoins **14** waren der Einsatz von 3 äquiv. Anilin, 2.4 äquiv. TEA^{[2][3]} und die Durchführung der Reaktion in Dioxan bei RT unter Argon.

Der postulierte Mechanismus zur Bildung von **14** ist in Schema 12 dargestellt. Es wird vermutet, dass ein cyclisches Intermediat mit 2-Benzyloxy-5(4*H*)-Oxazol-Struktur durchlaufen wird. Dieses könnte durch den Angriff von Anilin an der Benzylgruppe *N*-Benzylanilin (**15**) liefern, das ja auch isoliert wurde.

Schema 12

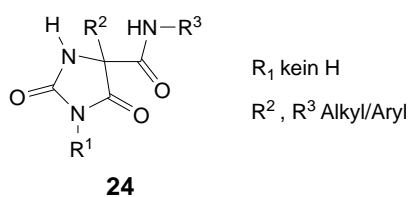


4-Ethyl-2,5-dioxo-*N*,1-diphenylimidazolidin-4-carboxamid (**14**) ist eine neue Substanz, die noch nicht beschrieben ist. Ähnliche Hydantoinen hat Dr. Agnieszka Ambrozak hergestellt.^[12] Es wurde unser Hydantoin **14** und die Hydantoinen von ihr verglichen. Diese Moleküle haben ähnliche chemische Verschiebungen der CO-Gruppen im ¹³C NMR-Spektrum (Tabelle 3). Deshalb unterstützten die ¹³C NMR-Daten die vorgeschlagene Struktur **14**.

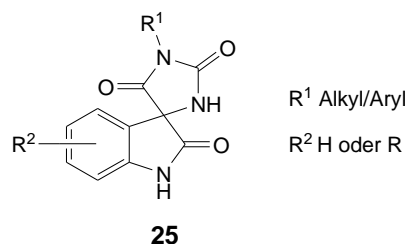
Tabelle 3. ¹³C NMR-Daten von Hydantoinen.

Unser Hydantoin 14		Hydantoinen von Dr. Ambrozak	
<i>CO-Gruppe</i>	δ (ppm)	<i>CO-Gruppe</i>	δ (ppm)
NHCON	155.41	NHCON	155-157
CONR ¹	164.58	CONR ¹	164-167
CONHR ³	170.50	CONHR ³	170-174

In der Literatur wurden keine Substanzen der allgemeinen Formel **24**, die unserem Hydantoin **14** entspricht, beschrieben.



In der Literatur gibt es ähnliche Substanzen wie **14**, bei denen die beiden Substituenten am sp³-hybridisierten C-Atom ihrerseits einen Ring bilden. Solche Spiro-Verbindungen **25** zeigt die untenstehende Formel. Dieser Typ der Verbindungen wurde von Khalil et al. synthetisiert.^{[32] [33]}



2.3.2. Umsetzung von **17** und Anilin

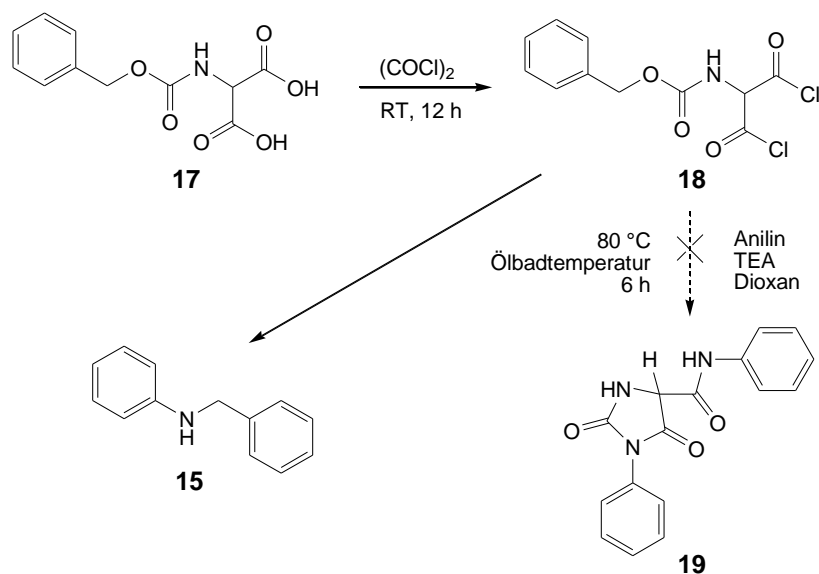
2.3.2.1 Reaktion bei 80 °C mit 1 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan

In den nächsten Versuchen wurde 2-(Benzyloxycarbonylamino)-malonsäure (**17**) eingesetzt. Dieser Malonsäure fehlt die Ethylgruppe. Sie wurde kommerziell erworben. In absolutiertem Dichlormethan wurden die Substanz **17** (5 mmol), Oxalylchlorid (23 mmol) und 6 Tropfen DMF bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Nach der Entfernung von Dichlormethan wurde der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Zur Lösung von **18** in Dioxan wurde unter Argon tropfenweise eine Lösung von 1 äquiv. Anilin und TEA in Dioxan 1 h bei 80 °C Ölbadtemperatur zugespritzt. Danach wurde die Reaktionslösung noch 6 h bei 80 °C erhitzt (Schema 13). Triethylamin-Hydrochlorid (**27**) wurde abgesaugt, das Lösungsmittel vom Filtrat wurde entfernt und der ölige orange-braune Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt. Es wurden 6 Fraktionen gewonnen.

Die erste Fraktion, das Hauptprodukt (m = 0.09 g, orange Kristalle) wurde nach dem NMR-Spektrum als Substanz **15** festgelegt. Die anderen Fraktionen waren nur kleine Mengen (die zweite, dritte und vierte Fraktion) oder nach den NMR-Spektren nicht sauber (die fünfte und sechste Fraktion).

Wenn es in dem Molekül (**17**) keine Ethyl-Gruppe gibt, läuft die Reaktion offenbar nicht nach dem gleichen Mechanismus wie bei der Herstellung von Substanz **14** (Schema 12).

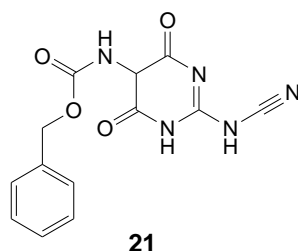
Schema 13



2.3.3. Umsetzung von 17 und Dicyandiamid

2.3.3.1. Reaktion bei RT mit 1 äquiv. Dicyandiamid und TEA in Dioxan

In absolutiertem Dichlormethan wurden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-malonsäure (**17**), Oxalylchlorid und 6 Tropfen DMF bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Nach der Entfernung von Dichlormethan wurde der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Zur Lösung von **18** in Dioxan wurde in Argonatmosphäre und bei RT 1 äquiv. Dicyandiamid und eine Lösung von TEA in Dioxan etwa 5 min zugegeben. Nach Zugabe von einer kleinen Menge von TEA in Dioxan war die Reaktionslösung schwarz geworden. Nach 24 h wurde die Lösung filtriert, das Lösungsmittel des Filtrates entfernt und dann durch Säulenchromatographie gereinigt. Es wurde eine Fraktion (m = 0.14 g, braunes Öl) gewonnen. Nach den NMR-Spektren konnte man die Struktur nicht eindeutig zuordnen.



In diesem Versuch sollte man die Substanz **21** erwarten, aber die Reaktion hat leider nicht geklappt. Von dem Cyanamid-Derivat **21** wären Eigenschaften als Cysteinprotease-Inhibitor zu erwarten gewesen. ^[34]

2.3.4. Umsetzung von **4** und Dicyandiamid

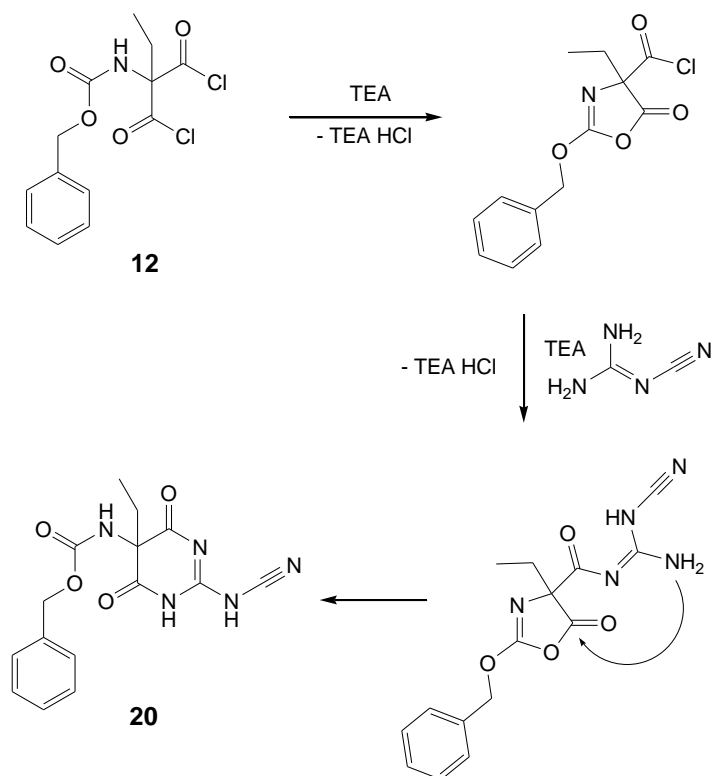
2.3.4.1. Reaktion bei RT mit 1 äquiv. Dicyandiamid und TEA in Dioxan

Im absolutierten Dichlormethan wurden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (5 mmol), Oxalylchlorid (23 mmol) und 3 Tropfen DMF (Dimethylformamid) bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Nach der Entfernung von Dichlormethan wurde der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wurde in Argonatmosphäre und bei RT 1 äquiv. Dicyandiamid und eine Lösung von TEA in Dioxan etwa 5 min zugegeben und dann 6 h bei 80 °C erhitzt. Es entstand eine braune Masse im Kolben und eine überstehende gelbe Lösung. Die Lösung wurde filtriert, das Lösungsmittel entfernt und das erhaltene Öl säulenchromatographisch gereinigt. Es wurden 2 Fraktionen (m = 0.04 g und m = 0.02 g) gewonnen, die nach den NMR-Spektren nicht sauber waren.

Die braune Masse wurde in Ethylacetat bei Erhitzen teilweise gelöst, filtriert und in dem Tiefkühlschrank aufbewahrt, aber leider ohne die Bildung von organischen Kristallen.

Die braune Masse, die sich nicht in Ethylacetat gelöst hatte, wurde aus Isopropylalkohol umkristallisiert. Es entstand ein heller Niederschlag (m = 0.27 g). Wahrscheinlich reagierte der Stoff mit Isopropanol, weil in den NMR-Spektren viele Signale im Alkyl-Bereich waren.

Schema 14



In diesem Versuch sollte man die Substanz **20** erwarten. Der Mechanismus von dieser Reaktion sollte so laufen, wie es im Schema 14 eingezeichnet ist. Aber dieser Versuch hat auch nicht geklappt. Alle Reaktionen mit Dicyandiamid waren leider nicht erfolgreich und deshalb waren nicht in Experimenteller Teil eingeführt.

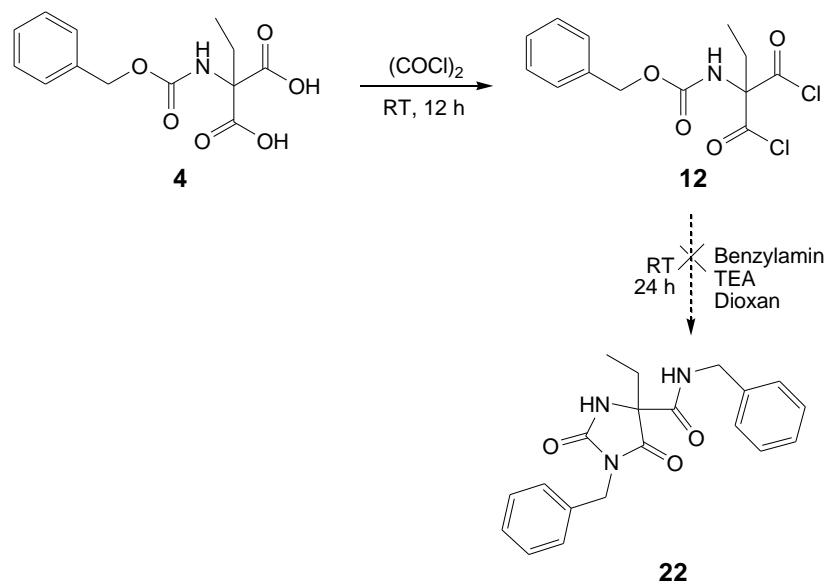
2.3.5. Umsetzung von **4** und Benzylamin

2.3.5.1. Reaktion bei RT mit 2 äquiv. Benzylamin und TEA in Dioxan

In absolutiertem Dichlormethan wurden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (5 mmol), Oxalylchlorid (23 mmol) und 3 Tropfen DMF bei RT unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels Dichlormethan wurde der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wurde in Argonatmosphäre tropfenweise eine Lösung von 2 äquiv. Benzylamin und TEA in

Dioxan 1 h bei RT zugespritzt und die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt (Schema 15). Am nächsten Tag wurde Triethylamin-hydrochlorid (**27**) durch Absaugen abgetrennt, das Lösungsmittel vom Filtrat entfernt und der ölige orange Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt. Es wurden 5 Fraktionen gewonnen.

Schema 15



Die erste, zweite und dritte Fraktion waren nur kleine Mengen, ohne NMR-Spektren. Die vierte Fraktion ($m = 0.12$ g, hellgelbe Niederschlag) war nach den NMR-Spektren nicht sauber. Nach den NMR-Spektren war die fünfte Fraktion, das Hauptprodukt ($m = 0.34$ g, ockergelbes Öl) nicht sauber, aber es könnte ein Hydantoin sein. Deshalb wurde das Öl aus Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert. Im Tiefkühlschrank war ein ockergelber Niederschlag ausgefallen, der nach den NMR-Spektren wieder nicht sauber war. Dann wurde diese Stoff ($m = 0.17$ g) noch einmal aus Ethylacetat umkristallisiert. Im Tiefkühlschrank waren weiße Kristalle ($m = 0.014$ g) ausgefallen. In den NMR-Spektren erschienen vermutlich Signale von zwei verschiedenen Stoffen. Der Schmelzpunkt war $132\text{-}137$ °C.

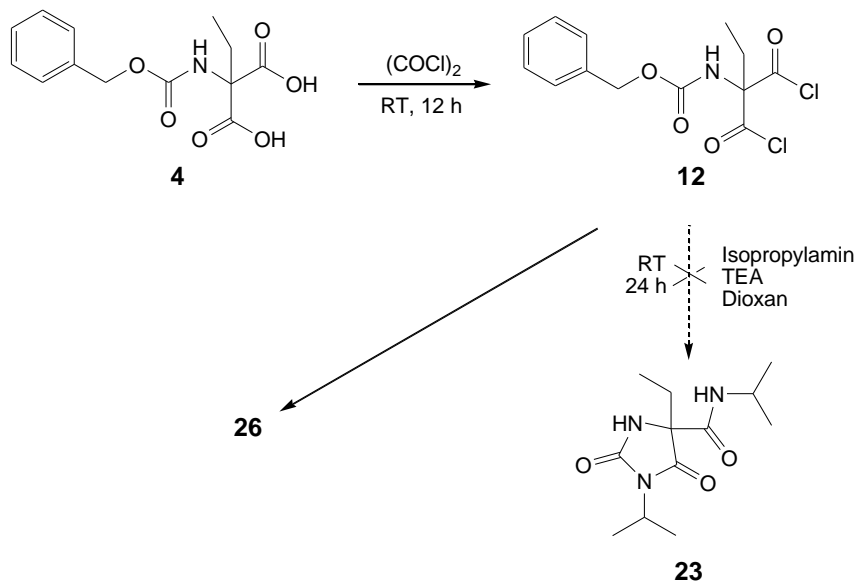
In diesem Versuch haben wir nicht die Substanz **22** gewonnen. Es hat sich immer ein Produkt mit seinem Nebenprodukt gebildet, die man nicht trennen konnte.

2.3.6. Umsetzung von **4** und Isopropylamin

2.3.6.1. Reaktion bei RT mit 2 äquiv. Isopropylamin und TEA in Dioxan

In absolutiertem Dichlormethan wurden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (5 mmol), Oxalylchlorid (23 mmol) und 3 Tropfen DMF RT unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Nach der Entfernung von Dichlormethan wurde der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wurde in Argonatmosphäre tropfenweise eine Lösung von 2 äquiv. Isopropylamin und TEA in Dioxan 1 h bei RT zugespritzt. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei RT gerührt (Schema 16) und am nächsten Tag Triethylamin-hydrochlorid (**27**) durch Absaugen abgetrennt. Das Lösungsmittel wurde vom Filtrat entfernt und der ölige orange Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt. Es wurden 2 Fraktionen gewonnen.

Schema 16



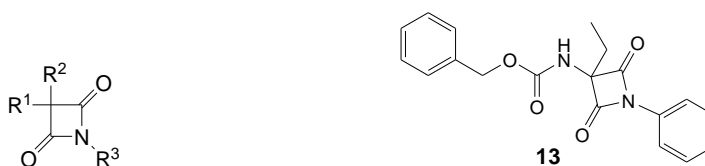
Die erste Fraktion ($m = 0.24$ g, hellgelber Feststoff) war nach den NMR-Spektren nicht sauber, deshalb wurde aus Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert. Kleine weiße Kristalle waren ausgefallen, die den Schmelzpunkt zwischen 230-231 °C hatten. Nach den NMR-Spektren und MS (255 Molpeak) konnte man die Struktur nicht eindeutig zuordnen, deshalb wurde die Substanz als **26** (keine Formel

abgebildet) bezeichnet. Nach MS hat **26** das gleiche Molekulgewicht wie **23**, aber die NMR-Spektren passen nicht dazu. Die zweite Fraktion (m = 0.20 g, oranges Öl) war nach den NMR-Spektren verunreinigt und wurde daraufhin in heißem Ethylacetat gelöst. Nach der Zugabe von Petrolether war ein oranger Niederschlag ausgefallen, die Lösung wurde filtriert und im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Keine Kristalle waren ausgefallen. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt und der ölige Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert, auch ohne Bildung von Kristallen. Nachfolgend wurde diese Lösung erhitzt und Petrolether in kleinen Mengen zugegeben und wieder in Tiefkühlschrank aufbewahrt, aber leider auch ohne Ergebnisse.

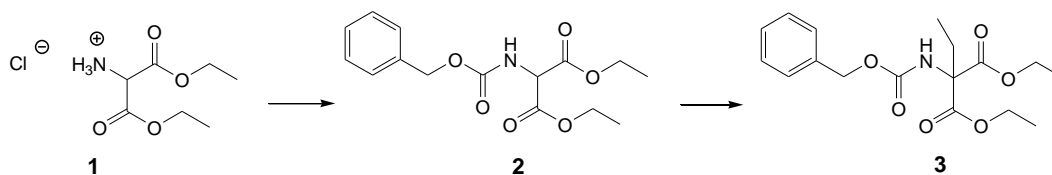
Die Reaktion mit Isopropylamin war nicht erfolgreich, die Substanz **23** wurde nicht synthetisiert, aber es wurde eine andere Substanz **26** hergestellt, deren Struktur noch aufgeklärt werden muss. Die Substanz **26** war nach der Mikroskopie amorph.

3. Zusammenfassung

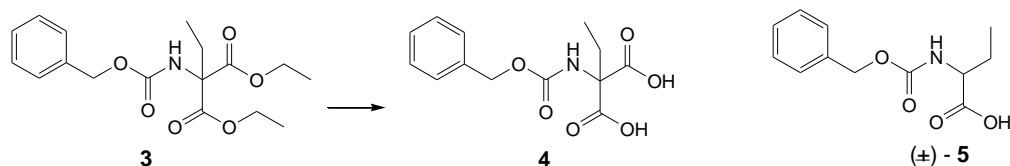
Humane Leukozytenelastase (HLE) ist eine Serinprotease, die eine wichtige Rolle bei Entzündungen und bakteriellen Infektionen spielt. Deshalb gilt es, niedermolekulare Hemmstoff für HLE zu entwickeln bzw. zu verbessern. In der vorliegenden Diplomarbeit sollten Untersuchungen zur Herstellung von Inhibitoren von humaner Leukozytenelastase (HLE) vorgenommen werden. Dazu sollte in die Azetidin-2,4-dion-Struktur in Position 3 für R^1 eine geschützte Aminogruppe, z.B. Z-NH, und für R^2 eine Ethylgruppe eingeführt werden. R^3 sollte z.B. ein Phenylrest sein. Das Zielmolekül besitzt die Struktur **13**. Es ist bekannt, dass Azetidin-2,4-dione mit $R^1 = R^2 = \text{Et}$, $R^3 = \text{Aryl}$ wirksame Inhibitoren von HLE sind. Durch die anvisierte Einführung einer geschützten Aminogruppe wurde eine Verbesserung der Affinität zu HLE erwartet, da der peptidische Charakter der Moleküle erhöht würde. Azetidin-2,4-dione mit einer Arylgruppe in Position 1 und einer Amino- und Alkygruppe in Position 3 sind unbekannt.



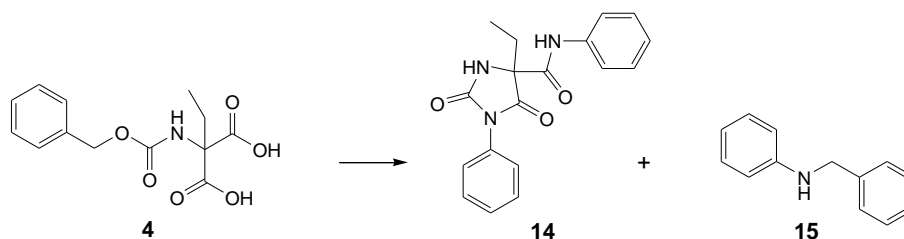
Ausgehend von Aminomalonsäurediethylester-Hydrochlorid **1** wurde die Aminofunktion geschützt und in **2** die Ethylgruppe durch Alkylierung eingeführt. Das Diethylmalonat-Derivat **3** ist literaturunbekannt. An Hand der Diester **2** und **3** wurde das Phänomen von diastereotopen Methylenprotonen bei nicht-chiralen Substanzen beobachtet und im Hinblick auf Literaturbefunde diskutiert. Als Ursache für die Nichtäquivalenz der Ester- CH_2 -Protonen wird die Prochiralität der Moleküle benannt.



Die Malonsäure **4** wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal hergestellt und ein geeignetes Verfahren zur Gewinnung von **4** wurde entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass **4** in der Hitze zu der Monocarbonsäure **5** decarboxyliert. Dies muss für die Gewinnung von **4** beachtet werden.



Die Malonsäure **4** wurde mit Oxalylchlorid zum Säurechlorid aktiviert und in situ mit Anilin umgesetzt. An Stelle von **13** wurde jedoch das Carbamoylhydantoin **14** erhalten. Dessen Bildung wird diskutiert. Es wird vermutet, dass ein cyclisches Intermediat mit 2-Benzyloxy-5(4*H*)-Oxazolone-Struktur durchlaufen wird. Dieses könnte durch den Angriff von Anilin an der Benzylgruppe *N*-Benzylanilin (**15**) liefern, das ebenfalls isoliert wurde.



Die Struktur des Hydantoins **14** wurde mittels Massenspektroskopie und hauptsächlich auf der Basis vergleichender NMR-Daten zugeordnet. Die beste Ausbeute an **14** konnte beim Einsatz von drei Äquivalenten Anilin und der Reaktionsführung bei Raumtemperatur erreicht werden. Ausgehend von diesem Befund können in zukünftigen Arbeiten vielleicht weitere neuartige Hydantoinne auf diesem Weg synthetisiert werden.

4. Experimenteller Teil

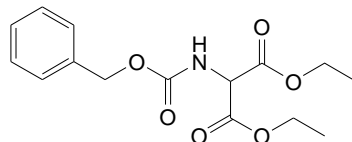
4.1. Allgemeines

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Acros, Alfa-Aesar, Bachem, Grüssing GMBH, Merck und Chemcube bezogen. Die verwendeten Lösungsmittel wurden in getrocknetem Zustand gekauft oder vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach literaturbekannten Methoden getrocknet. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit Aluminiumfolien der Firma Merck, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ durchgeführt und die Substanzen wurden nach Entwicklung der Chromatogramme mit Ethylacetat/Petrolether, als Laufmittel mittels UV-Detektion (254 nm) visualisiert. Für die säulenchromatographische Reinigung der Synthesestufen wurde Kieselgel der Firma Acros (0.06-0.20 mm, 60 Å) verwendet.

NMR-spektroskopische Messungen erfolgten von S. Terhart-Krabbe, A. Reiner und M. Schneider an einem Bruker Advance DRX-500 Spektrometer bei 303 K in DMSO-*d*₆, welches zudem als interner Standard (¹H 2.49 ppm, ¹³C 39.70 ppm) diente. ¹H NMR-Spektren werden bei 500 MHz und ¹³C bei 125 MHz aufgenommen. Die Signale werden in ppm (*parts per million*) angegeben. Die Kopplungskonstanten *J* der ¹H-Signale werden in Hz, ihre Spinmultiplizitäten werden als Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), und Multiplett (m) angegeben. Die Massenspektren wurden an einem A.E.I. MS-50 Spektrometer (EI, 70 eV) aufgenommen. Die Schmelzpunkte wurden an einem Büchi B545-Apparat bestimmt und sind unkorrigiert angegeben. Alle Stoffe wurden im Exsikkator beim vollen Vakuum (20 mbar) 24 h getrocknet.

4.2. Synthesevorschriften

4.2.1. 2-(Benzyloxycarbonylamino)malonsäurediethylester (2)



2-Aminomalonsäurediethylester-Hydrochlorid (**1**) (5.30 g, 25 mmol) wird in H₂O (30 ml) gelöst. Na₂CO₃ (3.18 g, 30 mmol) und Chlorameisensäurebenzylester (3.55 ml, 4.27 g, 25 mmol) werden zugegeben. Alles wird 2 Stunden bei 0 °C gerührt. Es wird über Nacht bei RT stehen gelassen. Es ist eine Emulsion (weißes Öl mit Wasser) entstanden. Zu der Mischung wird Ethylacetat (15 ml) im Rundkolben zugegeben. Der pH-Wert war alkalisch, deshalb wird mit Salzsäure (10 ml, 1 mol/l) angesäuert. Dann wird die Mischung im Schütteltrichter 5 min geschüttelt und in zwei Phasen geteilt. Zur Wasserphase wird wieder Ethylacetat (15 ml) zugegeben, dann 5 min geschüttelt und dann noch einmal mit Ethylacetat (15 ml) extrahiert. Das Produkt soll aus der Wasserphase in Ethylacetat übergehen. Dann wird als Trockenmittel wasserfreies Natriumsulfat (etwa 10 g) zugegeben. Nach 10 min Rühren wird filtriert und das Lösungsmittel abrotiert. Das Produkt ist ein hellgelbes Öl (7.37 g). Dann wird aus Petrolether wie folgt umkristallisiert. Die Mischung aus dem Produkt und Petrolether (50 ml) wird erhitzt. Es wird Ethylacetat (in kleinen Mengen) zugegeben und man erhitzt so lange bis eine klare Lösung entsteht (Zugabe von etwa 20 ml Ethylacetat). Dazu wird als Trockenmittel wasserfreies Natriumsulfat (10 g) zugegeben, und nach 10 min Rühren wird filtriert. Die Lösung wird im Tiefkühlschrank (-8 °C) aufbewahrt. Es entsteht ein weißer Niederschlag. Nach dem Absaugen wird er mit tiefgekühltem Petrolether gewaschen. Der Feststoff schmilzt bei RT. Es entsteht ein durchsichtiges hellgelbes Öl (6.13 g). Das Filtrat des Absaugens wird wieder im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Dann entsteht noch einmal der Feststoff. Nach Absaugen und Trocknung werden 0.31 g des Öls zusätzlich erhalten. Manchmal entsteht hellgelbes Öl und manchmal weißer Feststoff, der bei Raumtemperatur schmilzt. Das Filtrat des Absaugens wird noch zur nächsten Umkristallisation eines anderen Absatzes benutzt.

Ausbeute: 6.44 g, 83 % (in der Literatur 97^[11] - 99 %^[10])

Schmelzpunkt: 31 °C

Literaturschmelzpunkt: 31 – 32 °C weißer Feststoff^[10] oder farblose Öl^[11]

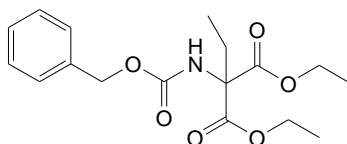
Summenformel: C₁₅H₁₉NO₆

Molekülmasse: 309.31 g/mol

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 6H, OCH₂CH₃), 4.10-4.20 (m, 4H, OCH₂CH₃), 4.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH), 5.05 (s, 2H, CH₂C₆H₅), 7.30-7.38 (m, 5H, C₆H₅), 8.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 14.05 (CH₂CH₃), 57.90 (CH), 61.87 (CH₂CH₃), 66.18 (CH₂C₆H₅), 128.02, 128.15, 128.58, 136.84 (C₆H₅), 156.09 (CONH), 166.65 (COCH₂).

4.2.2. 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäurediethylester (**3**)



Zuerst wird Natrium-Ethanolat hergestellt. Natrium (0.48 g, 20.8 mmol) wird im getrockneten Ethanol (42 ml) unter Rückflusskühler gelöst und etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

2-(Benzyloxycarbonylamino)malonsäurediethylester **2** (6.44 g; 20.8 mmol) und Ethylbromid (2.47 g; 1.7 ml; 22.9 mmol) werden zusammen gegeben. Dazu wird die Natrium-Ethanolatlösung zugegeben. Die Mischung wird unter Rückfluss bei 90 °C Ölbadtemperatur 10 Stunden erhitzt und gerührt. Nach 10 Stunden wird Dichlormethan (62 ml) zugegeben. Die Mischung wird in der Fritte abgesaugt. Zu dem Filtrat werden Natriumsulfat (2.1 g), Aktivkohle (0.8 g), Kieselgel (0.8 g) zugegeben. Die Mischung wird abgesaugt, aber das Filtrat war nicht farblos, sondern milchig grau (Suspension von Natriumbromid, Aktivkohle und Produkt). Dann wird das Lösungsmittel abrotiert. Nach der Trocknung entsteht eine graue Suspension vom Öl und Feststoff (5.89 g). Zur Reinigung wird die Säulenchromatographie benutzt (etwa 750 ml Kieselgel und das Lösungsmittel Ethylacetat und Petrolether im Verhältnis 1+3). 11 Fraktionen waren sauber. Diesen 11 Fraktionen werden

zusammen gesammelt und abrotiert und im Exsikkator über Nacht bei vollem Vakuum (20 mbar) getrocknet.

Es wird 4.38 g durchsichtiges hellgelbes Öl gewonnen.

Ausbeute: 4.38 g, 63 %

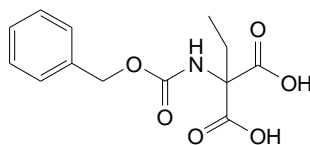
Summenformel: $C_{17}H_{23}NO_6$

Molekülmasse: 337.37 g/mol

1H NMR (DMSO- d_6) δ 0.76 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.12 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 2.07 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.12 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 5.03 (s, 2H, $C_6H_5CH_2$), 7.29-7.38 (m, 5H, C_6H_5), 7.59 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 7.96 (CH_2CH_3), 13.98 (OCH_2CH_3), 26.70 (CH_2CH_3), 61.83 (OCH_2CH_3), 65.73, 67.15 ($CH_2C_6H_5$, $CCOOC_2H_5$), 127.76, 128.03, 128.51, 137.00 (C_6H_5), 154.75 (CONH), 167.70 ($COOC_2H_5$).

4.2.3. 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (4)



Zu 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäurediethylester **3** (2.96 g, 8.8 mmol) wird die Mischung von Ethanol (35 ml) und Natriumhydroxid (2.5 mol/l, 105ml) im Verhältnis 1:3 zugegeben. Bei RT wird die Mischung des Öls und des Lösungsmittels 4 Tagen gerührt. Der Reaktionsablauf wird durch die dünnschichtchromatographische Kontrolle der Reaktionslösung beobachtet (Ethylacetat/Petrolether im Verhältnis 1+3). Nach dem ersten Tag wird das Öl nur ein bisschen gelöst, nach dem zweiten Tag auch ein bisschen mehr, aber nach 4 Tagen wird alles Öl gelöst und entstand eine kleine Menge vom Feststoff auf der Wasserfläche. Die Reaktionslösung wird bei 0 °C mit abgekühlter Salzsäure (1 mol/l, etwa 240 ml) langsam und vorsichtig angesäuert. Wenn der pH-Wert sauer war, wird die Lösung mit Ethylacetat (50 ml) 5 min geschüttelt und in zwei Phasen geteilt. Zur Wasserphase wird wieder Ethylacetat (50 ml) zugegeben, dann 5 min geschüttelt und dann noch einmal mit Ethylacetat (50 ml) extrahiert. Zu Ethylacetat wird das Trockenmittel wasserfreies Natriumsulfat (15 g) zugegeben, 10 min gerührt und dann

filtriert. Die Entfernung des organischen Lösungsmittels Ethylacetat wird dann bei 30 °C Wasserbadtemperatur und 15 min bei vollem Vakuum (etwa 20 mbar) durchgeführt.

Es wird 1.71 g des hellgelben Öls gewonnen.

Ausbeute: 1.71 g, 69 %

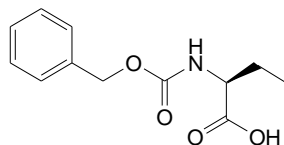
Summenformel: C₁₃H₁₅NO₆

Molekülmasse: 281.26 g/mol

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 2.10 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.03 (s, 2H, OCH₂), 6.85 (s, 1H, NH), 7.28-7.38 (m, 5H, C₆H₅).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.02 (CH₃), 25.65 (CH₂CH₃), 65.60, 66.76 (OCH₂, CCOOH), 127.55, 127.90, 128.47, 136.98 (C₆H₅), 154.25 (CONH), 169.58 (COOH).

4.2.4. (*S*)-2-(Benzyloxycarbonylamino)buttersäure (**5**)



(*S*)-2-Aminobuttersäure ((*S*)-H-Abu-OH) (**6**) (0.31 g, 3 mmol) wird in H₂O (6 ml) gelöst. NaHCO₃ (0.5 g, 6 mmol) und Chlorameisensäurebenzylester (0.47 ml, 0.56 g, 3.3 mmol) werden zugegeben. Alles wird 2 Stunden bei 0 °C gerührt. Es wird über Nacht bei RT stehen gelassen. Es ist eine Emulsion (weißes Öl mit Wasser) entstanden. Die Reaktionsmischung wird drei Mal mit Diethylether (10 ml) ausgeschüttelt. Diethylether wird verworfen. Die Wasserphase wird dann mit Salzsäure (4 ml, 1 mol/l) bis zum pH-Wert 2 angesäuert. Die Mischung wird mit Ethylacetat (10 ml) im Schütteltrichter 5 min geschüttelt und in zwei Phasen geteilt. Zur Wasserphase wird wieder Ethylacetat (10 ml) zugegeben, dann 5 min geschüttelt und dann noch einmal mit Ethylacetat (10 ml) extrahiert. Das Produkt soll aus der Wasserphase in Ethylacetat übergehen. Dann wird als Trockenmittel wasserfreies Natriumsulfat (etwa 5 g) zugegeben. Nach 10 min Rühren wird filtriert und das Lösungsmittel abrotiert.

Das Produkt ist ein hellgelbes Öl (0.56 g), das nach der Trocknung im vollen Vakuum (etwa 20 mbar) ein weißer Feststoff wird.

Ausbeute: 0.71 g, 79 %

Schmelzpunkt: 76 – 77 °C

Literaturschmelzpunkt: 78.5 – 79 °C ^[35]

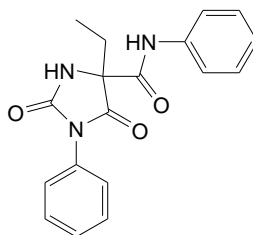
Summenformel: C₁₂H₁₅NO₄

Molekülmasse: 237.25 g/mol

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.54-1.76 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.85-3.90 (m, 1H, CH), 5.03 (s, 2H, OCH₂), 7.28-7.37 (m, 5H, C₆H₅), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 12.48 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.63 (CH₃), 24.31 (CH₂CH₃), 55.43, 65.50 (OCH₂, CCOOH), 127.83, 127.91, 128.46, 137.19, (C₆H₅), 156.33 (CONH), 173.87 (COOH).

4.2.5. 4-Ethyl-2,5-dioxo-N,1-diphenylimidazolidin-4-carboxamid (**14**)



In absolutiertem Dichlormethan (100 ml) werden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (1.40 g, 5 mmol), Oxalylchlorid (2.92 g, 2.0 ml, 23 mmol) und 3 Tropfen DMF bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels Dichlormethan wird der ölige Rückstand in Dioxan (20 ml) gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wird in Argonatmosphäre tropfenweise eine Lösung von Anilin (1.49 g, 1.5 ml, 15 mmol) und TEA (1.21 g, 1.7 ml, 12 mmol) in Dioxan (5 ml) 1 h bei RT zugespritzt. Danach wurde die Reaktionslösung noch 24 h bei RT gerührt. Triethylamin-hydrochlorid wird beim Absaugen abgetrennt, das Lösungsmittel vom Filtrat entfernt und der ölige orange-braune Rückstand durch Säulenchromatographie (750 ml Kiesegel, Ethylacetat/Petrolether im Verhältnis 1+5) gereinigt. Es werden 5 Fraktionen gewonnen. Die vierte Fraktion wird ein

Hydantoin. Nach der Entfernung des Lösungsmittels und der Trocknung im vollen Vakuum (etwa 20 mbar) entsteht orange-hellbrauner Feststoff ($m = 0.56$ g).

Ausbeute: 0.56 g, 35 %

Schmelzpunkt: 130-134 °C

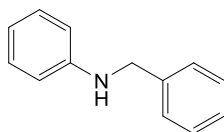
Summenformel: $C_{18}H_{17}N_3O_3$

Molekülmasse: 323.35 g/mol

1H NMR (DMSO- d_6) δ 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 2.11-2.18 (m, 1H, CH_2CH_3), 2.23-2.30 (m, 1H, CH_2CH_3), 7.10-7.36 (m, 10H, C_6H_5), 9.01 (s, 1H, NHC_6H_5), 9.85 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 7.63 (CH_3), 28.00 (CH_2CH_3), 69.49 (CCH_2CH_3), 120.96, 124.42, 126.89, 128.26, 128.71, 128.97, 131.93, 138.18 (C_6H_5), 155.41 (NHCON), 164.58 (CONC $_6H_5$), 170.50 (CONHC $_6H_5$).

4.2.6. *N*-Benzylanilin (**15**)



In absolutiertem Dichlormethan (100 ml) werden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (1.40 g, 5 mmol), Oxalylchlorid (2.92 g, 2.0 ml, 23 mmol) und 3 Tropfen DMF bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels Dichlormethan wird der ölige Rückstand in Dioxan (20 ml) gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wird in Argonatmosphäre tropfenweise eine Lösung von Anilin (1.02 g, 1.0 ml, 11 mmol) und TEA (1.21 g, 1.7 ml, 12 mmol) in Dioxan (5 ml) 1 h bei RT zugespritzt. Danach wurde die Reaktionslösung noch 24 h bei RT gerührt. Triethylamin-hydrochlorid wird beim Absaugen abgetrennt, das Lösungsmittel vom Filtrat entfernt und der ölige orange-braune Rückstand durch Säulenchromatographie (750 ml Kiesegel, Ethylacetat und Petrolether im Verhältnis 1+5) gereinigt. Es werden 5 Fraktionen gewonnen. Die erste Fraktion wird ein *N*-Benzylanilin. Nach der Entfernung des Lösungsmittels und der Trocknung im vollen Vakuum (etwa 20 mbar) entstehen orange-hellbraune Kristalle ($m = 0.25$ g).

Ausbeute: 0.25 g, 28 %

Schmelzpunkt: 35-37 °C

Literaturschmelzpunkt: 35-38 °C ^[36]

Summenformel: C₁₃H₁₃N

Molekülmasse: 183.25 g/mol

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.24 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂), 6.15 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 6.49-6.57 (m, 3H, C₆H₅), 7.00-7.03 (m, 2H, C₆H₅), 7.19-7.35 (m, 5H, C₆H₅).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 46.60 (CH₂), 112.40, 115.83, 126.68, 127.28, 128.35, 128.90, 140.44, 148.79 (10C, C₆H₅).

Die Substanz **15** wurde bei dem Experiment 4.2.5. in einer Ausbeute von 0.11 g und 17 % erhalten.

4.2.7. Die Substanz **16**

In absolutiertem Dichlormethan (100 ml) werden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (1.40 g, 5 mmol), Oxalylchlorid (2.92 g, 2.0 ml, 23 mmol) und 3 Tropfen DMF bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels Dichlormethan wird der ölige Rückstand in Dioxan (20 ml) gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wird in Argonatmosphäre bei 80 °C oder bei 110 °C tropfenweise eine Lösung von Anilin (1.02 g, 1.0 ml, 11 mmol) und TEA (1.21 g, 1.7 ml, 12 mmol) in Dioxan (5 ml) 1 h zugespritzt und noch 6 h bei 80 °C erhitzt. Triethylamin-hydrochlorid wird abgesaugt, das Lösungsmittel vom Filtrat entfernt und der ölige orange-braune Rückstand durch Säulenchromatographie (750 ml Kiesegel, Ethylacetat und Petrolether im Verhältnis 1+5) gereinigt. Es werden 5 Fraktionen gewonnen. Die zweite Fraktion (*m* = 0.07 g, hellbraunes Öl) wird gewonnen. Nach den NMR-Spektren und MS kann man die Struktur nicht eindeutig zuordnen, deshalb wird für die Substanz **16** keine Formel abgebildet.

Ausbeute: 0.07 g, 8 %

Molekülmasse: 193 g/mol

Die Substanz **16** wurde bei dem Experiment 4.2.5. in einer Ausbeute von 0.25 g und 20 % erhalten, war aber nicht sauber.

4.2.8. Die Substanz **26**

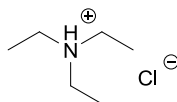
In absolutiertem Dichlormethan (100 ml) werden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (1.40 g, 5 mmol), Oxalylchlorid (2.92 g, 2.0 ml, 23 mmol) und 3 Tropfen DMF bei RT unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird. Nach der Entfernung von Dichlormethan wird der ölige Rückstand in Dioxan (20 ml) gelöst. Zur Lösung von **12** in Dioxan wird in Argonatmosphäre tropfenweise eine Lösung von 2 äquiv. Isopropylamin (0.65 g, 0.9 ml, 12 mmol) und TEA (1.21 g, 1.7 ml, 12 mmol) in Dioxan (5 ml) 1 h bei RT zugespritzt. Die Reaktionslösung wird 24 h bei RT gerührt und am nächsten Tag Triethylamin-hydrochlorid durch Absaugen abgetrennt. Das Lösungsmittel vom Filtrat wird entfernt und der ölige orange Rückstand durch Säulenchromatographie (750 ml Kiesegel, Ethylacetat und Petrolether im Verhältnis 5+1) gereinigt. Es werden 2 Fraktionen gewonnen. Die erste Fraktion (m = 0.24 g, hellgelbes Feststoff) war nach den NMR-Spektren nicht sauber, deshalb wird aus Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert. Kleine weiße Kristalle (m = 0.014 g) sind ausgefallen. Nach den NMR-Spektren und MS kann man die Struktur nicht eindeutig zuordnen, deshalb wird für die Substanz **26** keine Formel abgebildet.

Ausbeute: 0.014 g, 9 %

Schmelzpunkt: 230-231 °C

Molekülmasse = 255 g/mol

4.2.9. Triethylamin-hydrochlorid (**27**)



27

In absolutiertem Dichlormethan (100 ml) werden 2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonsäure (**4**) (1.40 g, 5 mmol), Oxalylchlorid (2.92 g, 2.0 ml, 23 mmol) und 3 Tropfen DMF bei RT unter Argonatmosphäre gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird. Nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels Dichlormethan wird der ölige Rückstand in Dioxan (20 ml) gelöst. Zur Lösung von

12 in Dioxan wird in Argonatmosphäre tropfenweise eine Lösung von Anilin (1.02 g, 1.0 ml, 11 mmol) und TEA (1.21 g, 1.7 ml, 12 mmol) in Dioxan (5 ml) 1 h bei 80 °C Ölbadtemperatur zugespritzt. Danach wurde die Reaktionslösung noch 6 h bei 80 °C erhitzt. Triethylamin-hydrochlorid blieb beim Absaugen in der Fritte und wird mit Dioxan gewaschen.

Es wird weißer Feststoff (m = 0.72 g) gewonnen.

Ausbeute: 0.72 g, 44 %

Schmelzpunkt: 258-261 °C

Literaturschmelzpunkt: 261 °C ^[37]

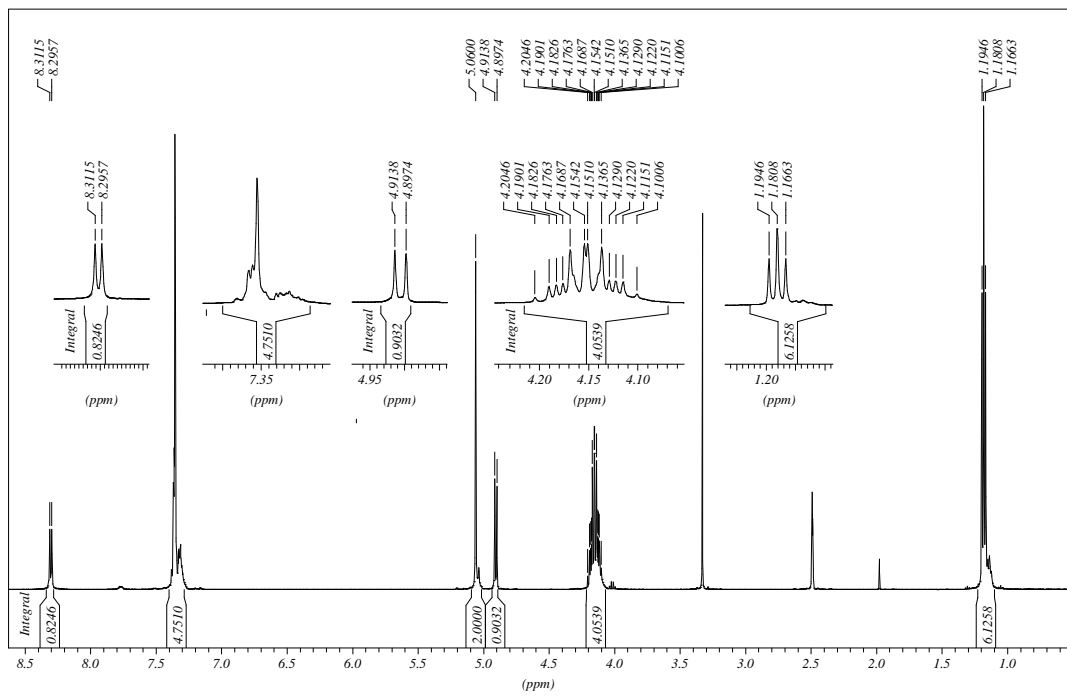
Summenformel: C₆H₁₆NCl

Molekülmasse: 137.65 g/mol

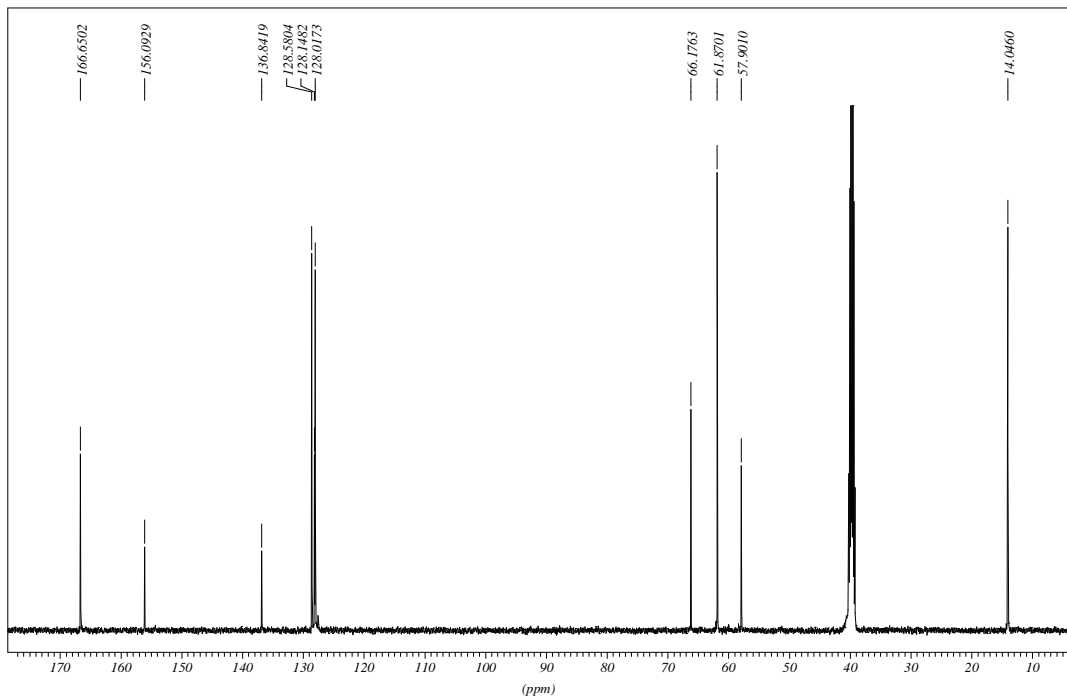
¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 9H, CH₂CH₃), 3.03 (q, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH₂CH₃), 10.67 (s, 1H, NH⁺).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.49 (CH₂CH₃), 45.40 (CH₂CH₃).

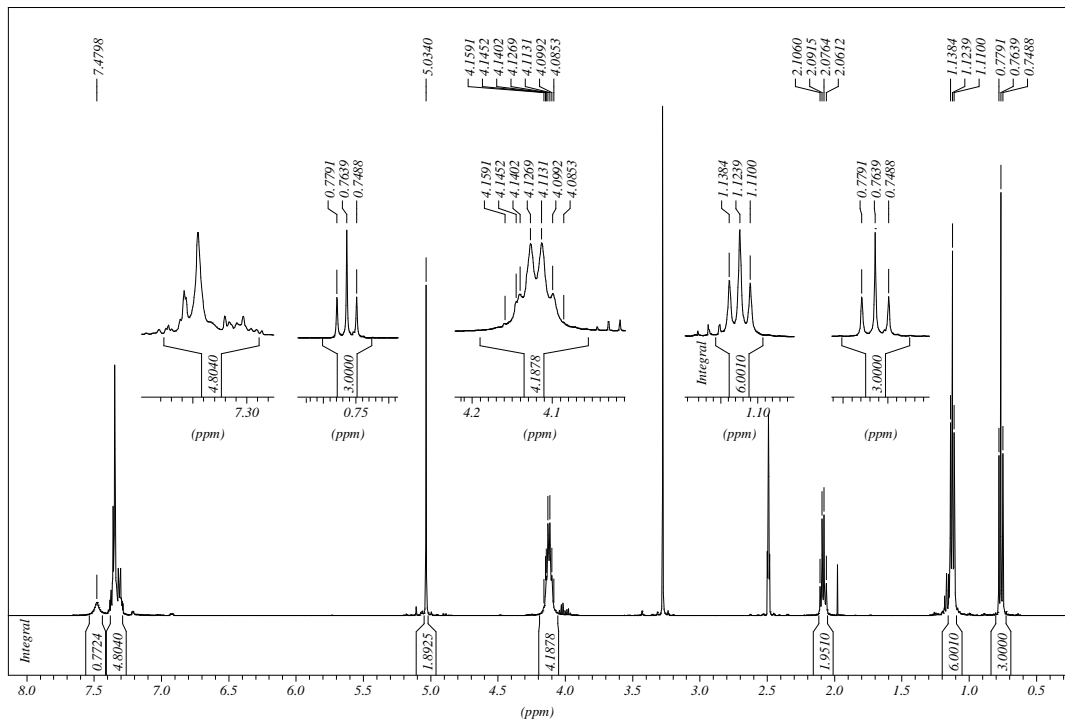
4.3. NMR-Spektren-Anhang



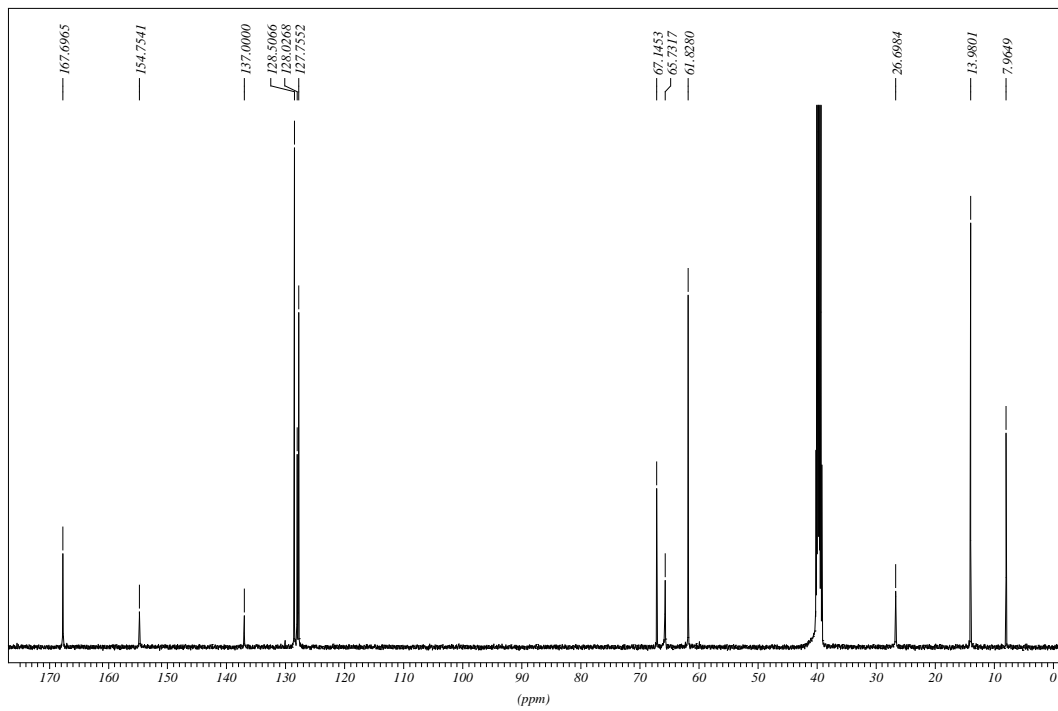
^1H NMR-Spektrum von 2.



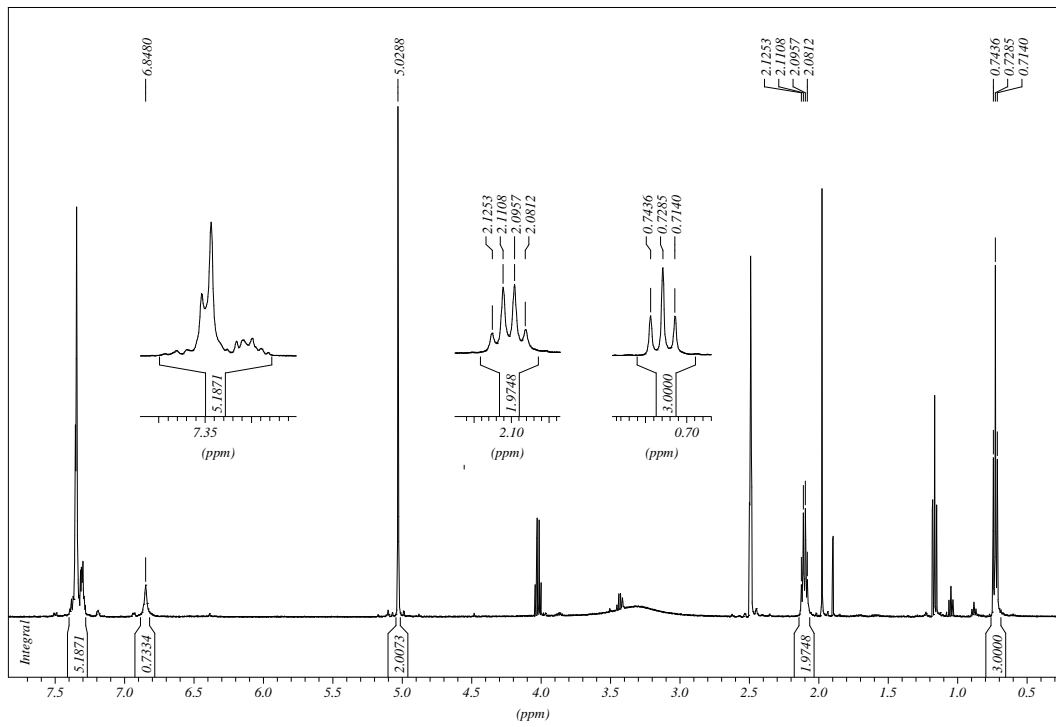
^{13}C NMR-Spektrum von 2.



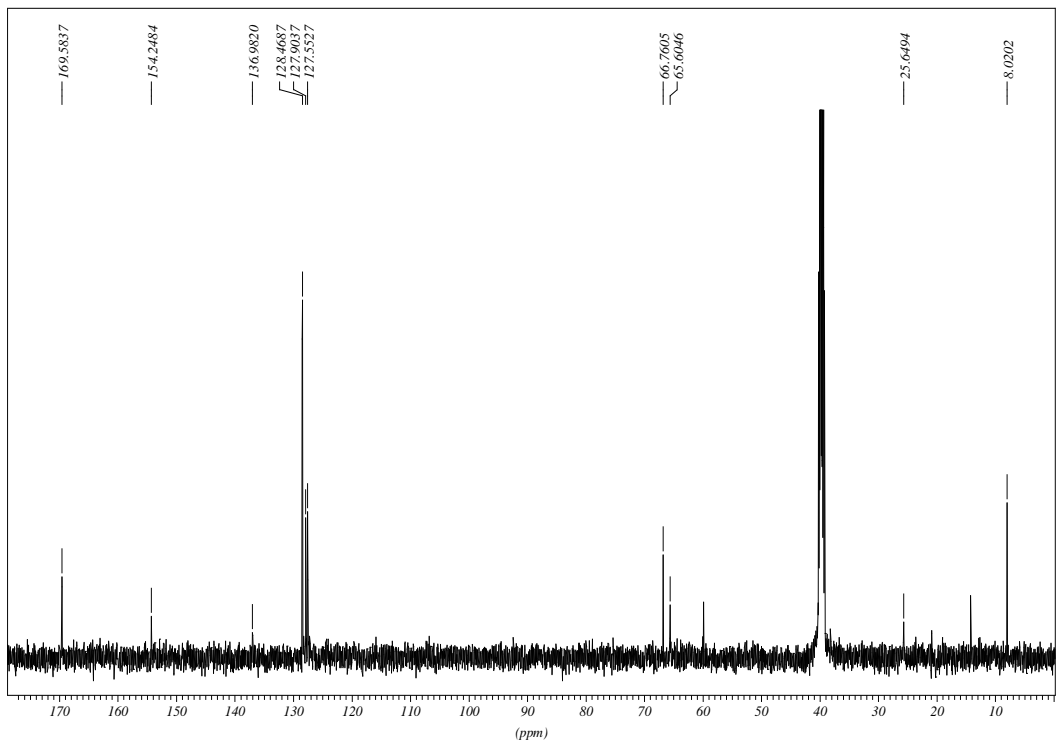
^1H NMR-Spektrum von 3.



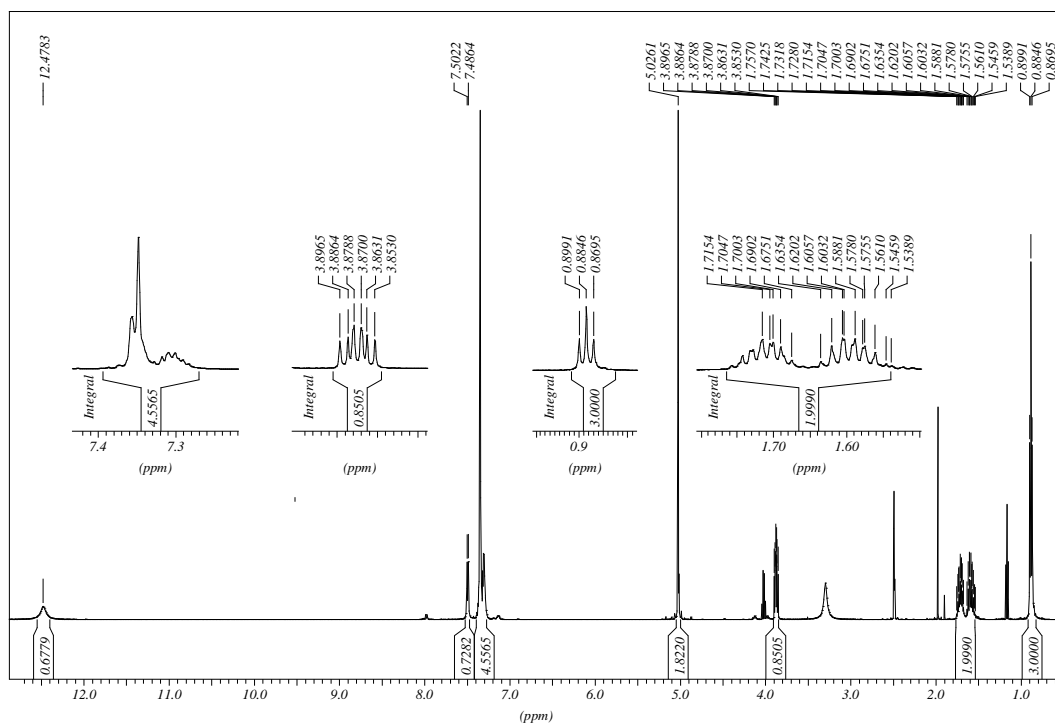
^{13}C NMR-Spektrum von 3.



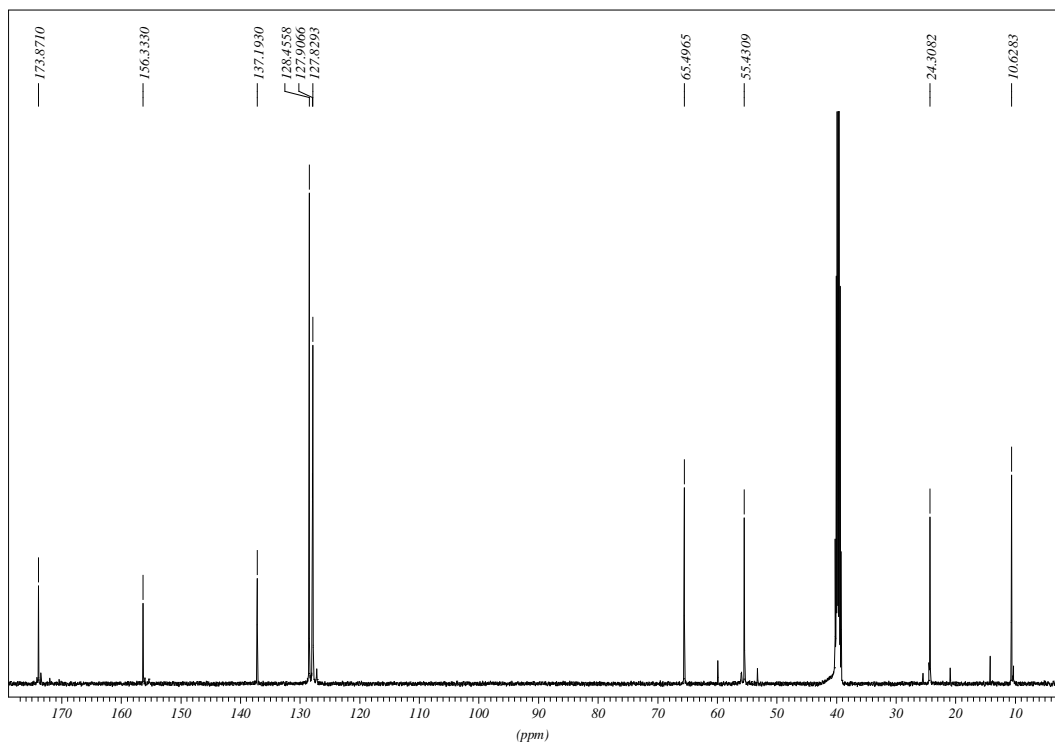
^1H NMR-Spektrum von 4.



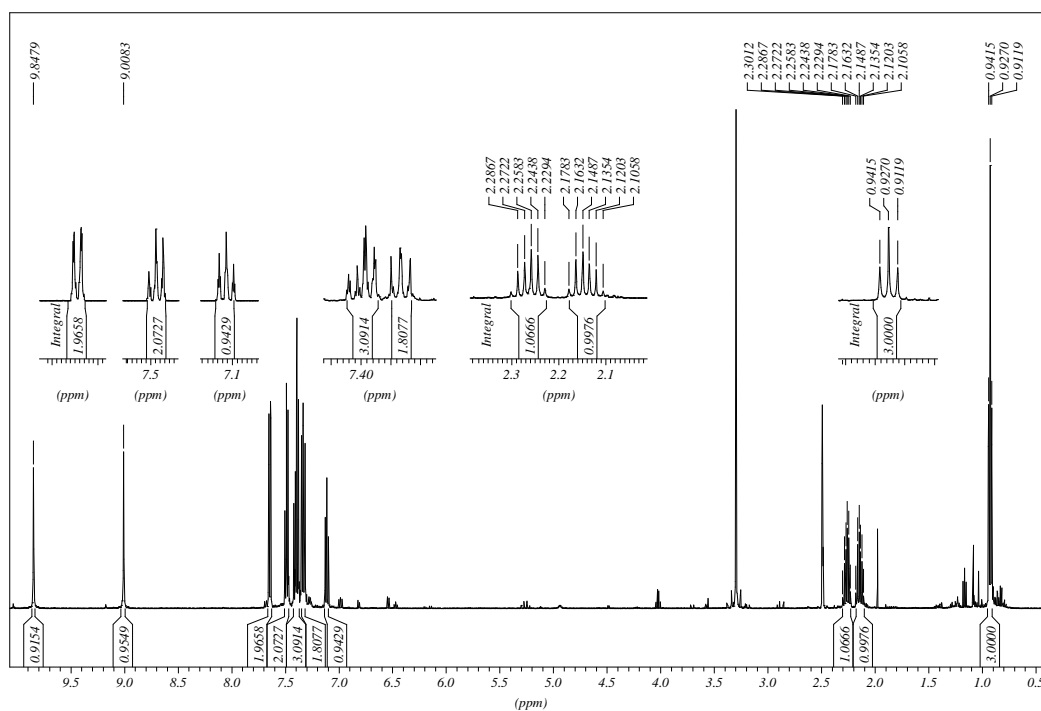
^{13}C NMR-Spektrum von 4.



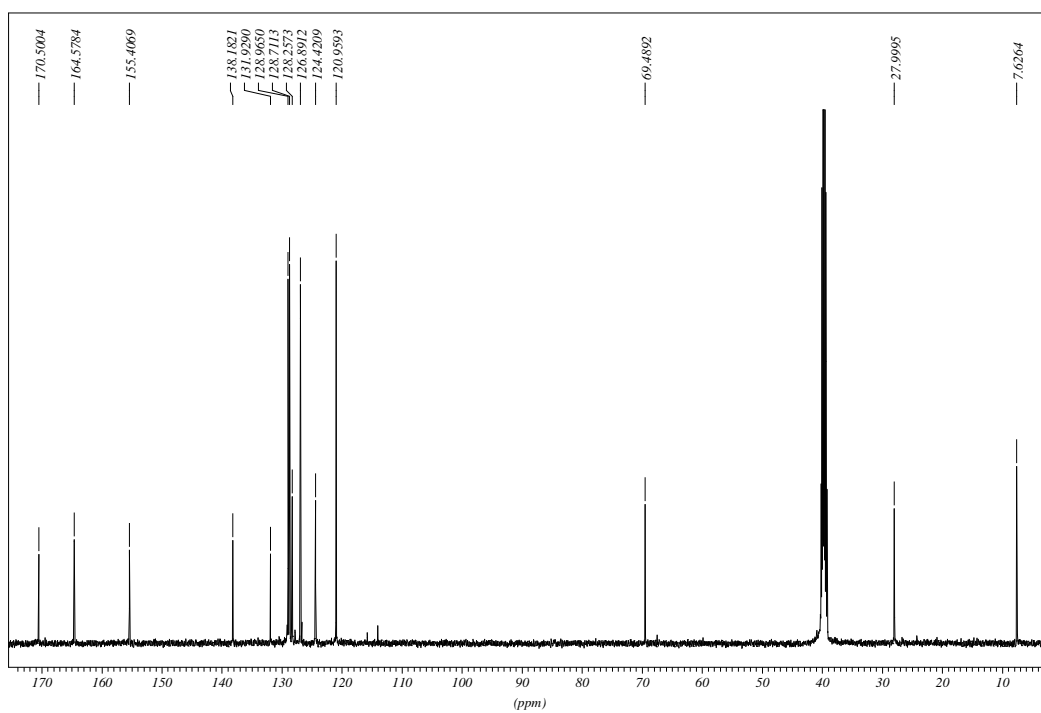
^1H NMR-Spektrum von 5.



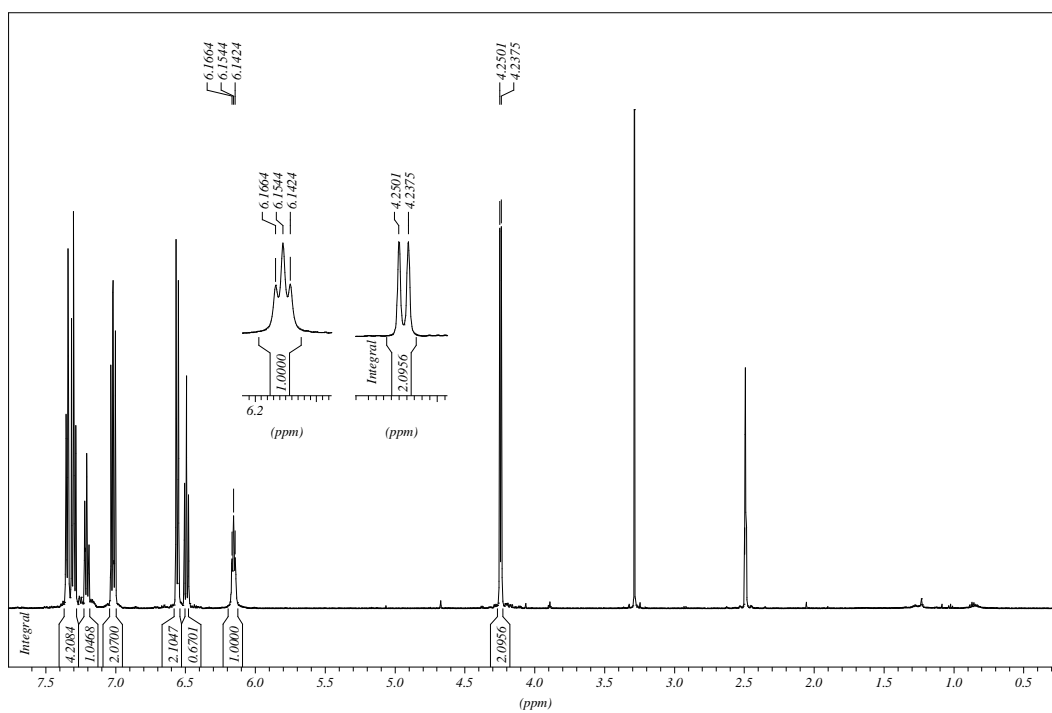
^{13}C NMR-Spektrum von 5.



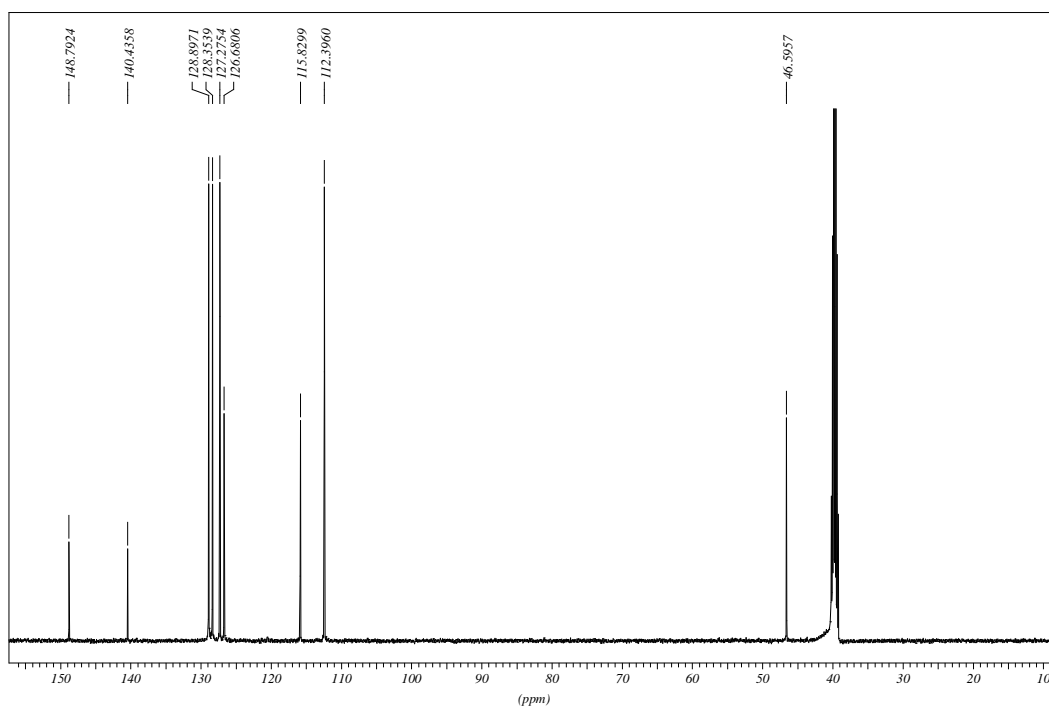
^1H NMR-Spektrum von **14**.



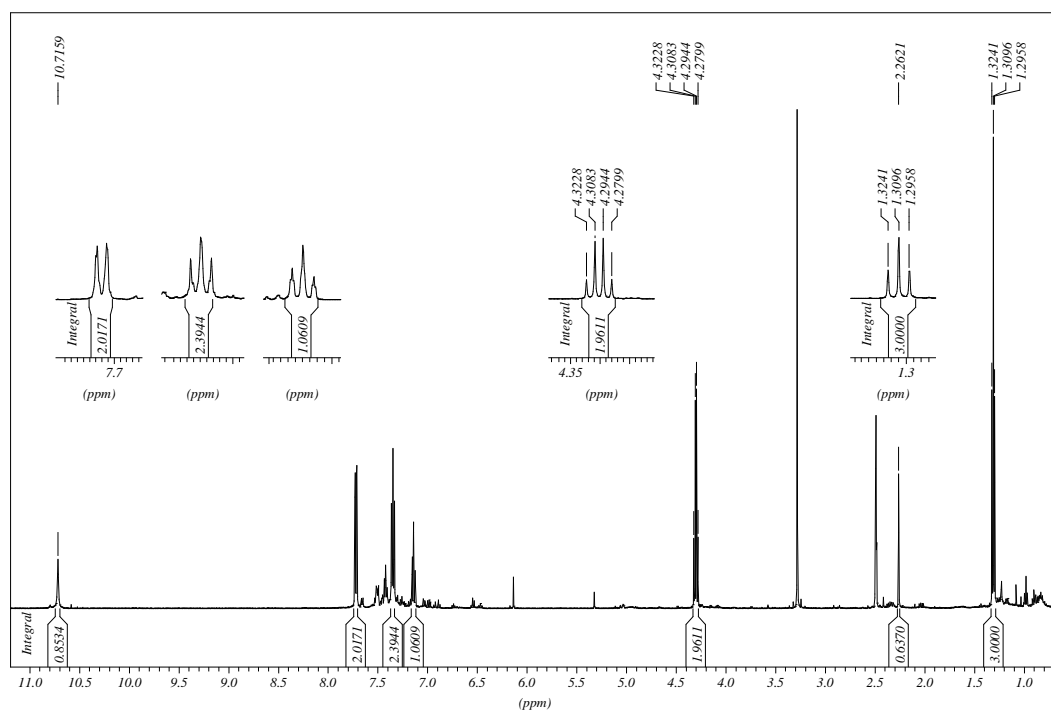
^{13}C NMR-Spektrum von **14**.



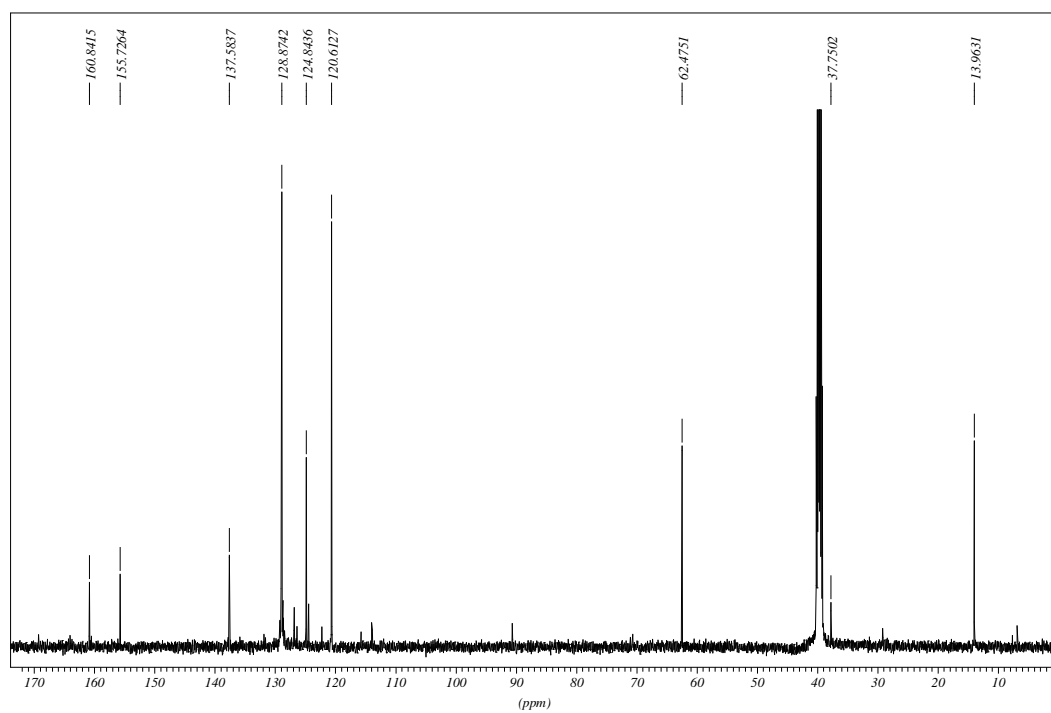
^1H NMR-Spektrum von **15**.



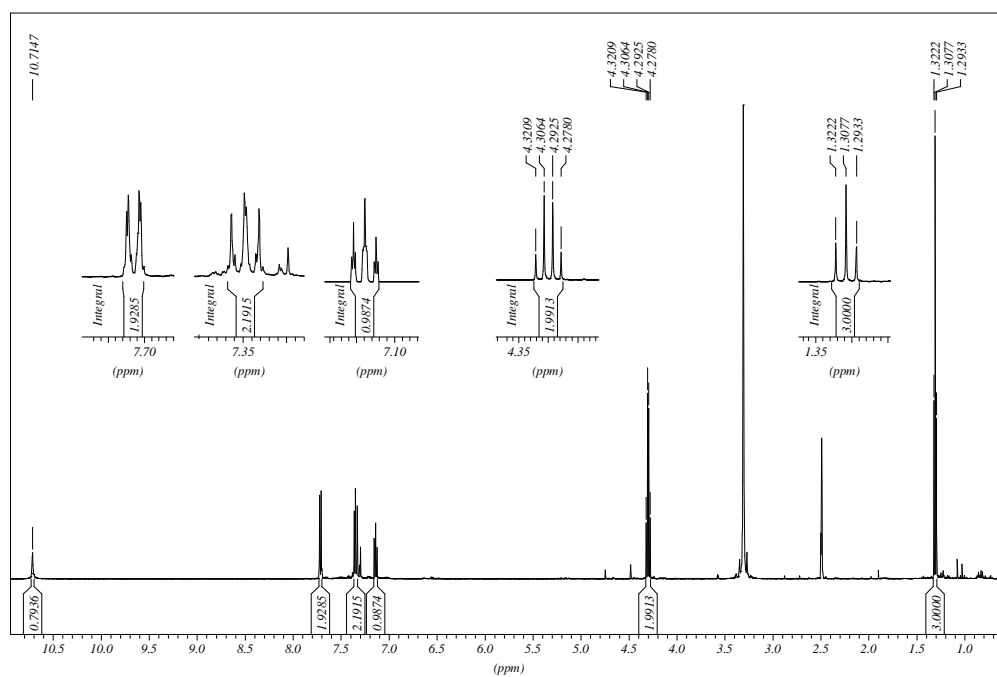
^{13}C NMR-Spektrum von **15**.



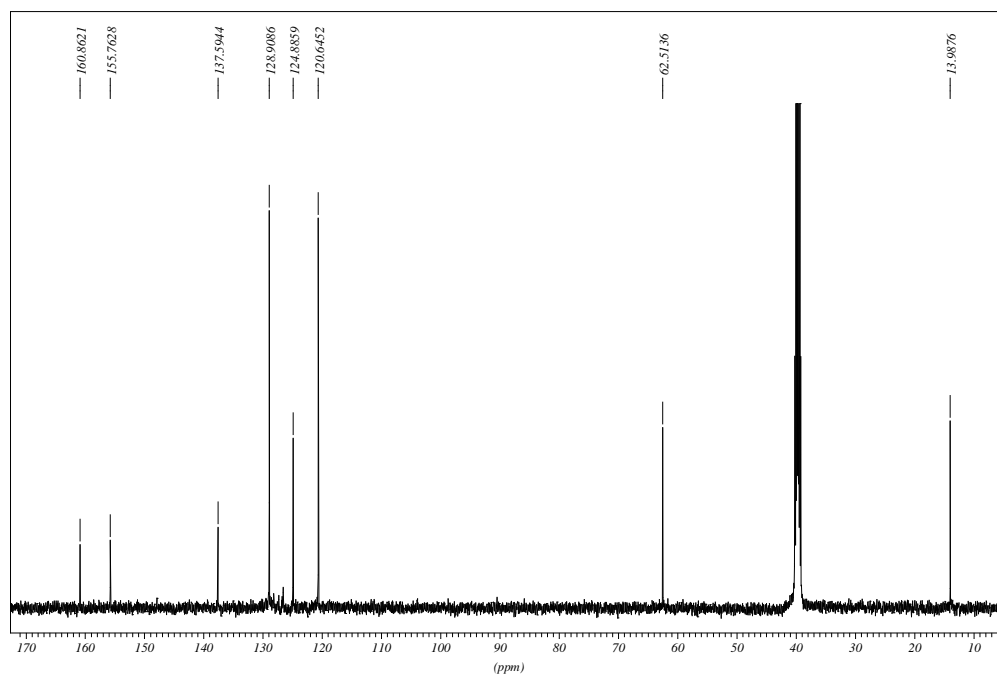
^1H NMR-Spektrum von **16**, die Durchführung bei 80 °C Ölbadtemperatur.



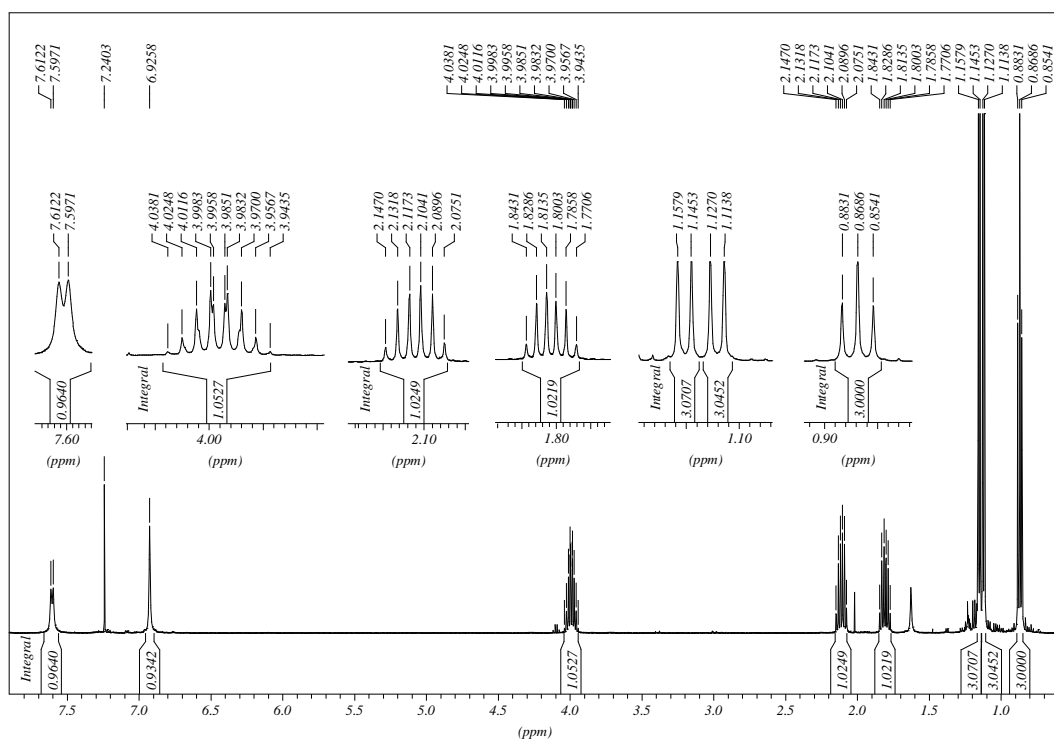
^{13}C NMR-Spektrum von **16**, die Durchführung bei 80 °C Ölbadtemperatur.



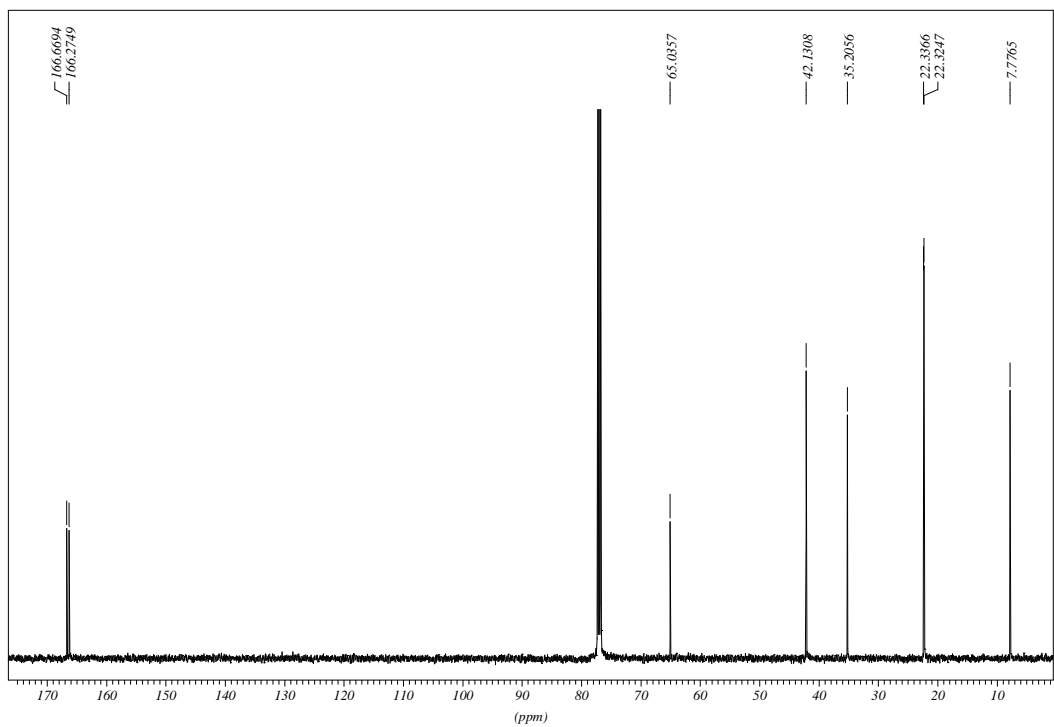
^1H NMR-Spektrum von **16**, die Durchführung bei 110 °C Ölbadtemperatur.



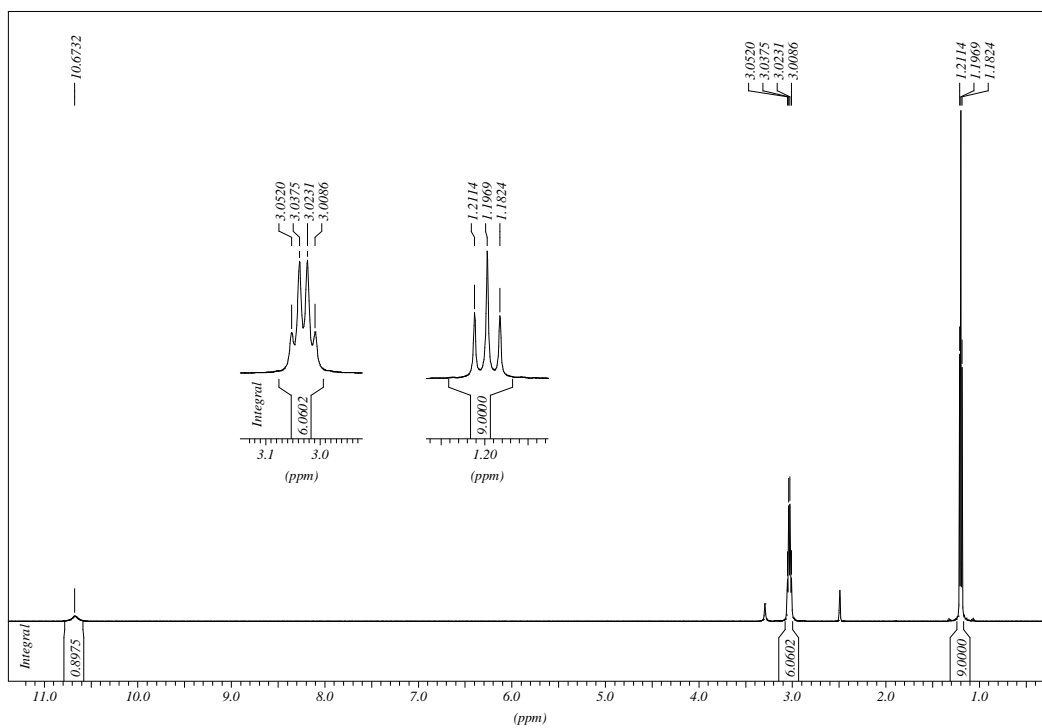
^{13}C NMR-Spektrum von **16**, die Durchführung bei 80 °C Ölbadtemperatur.



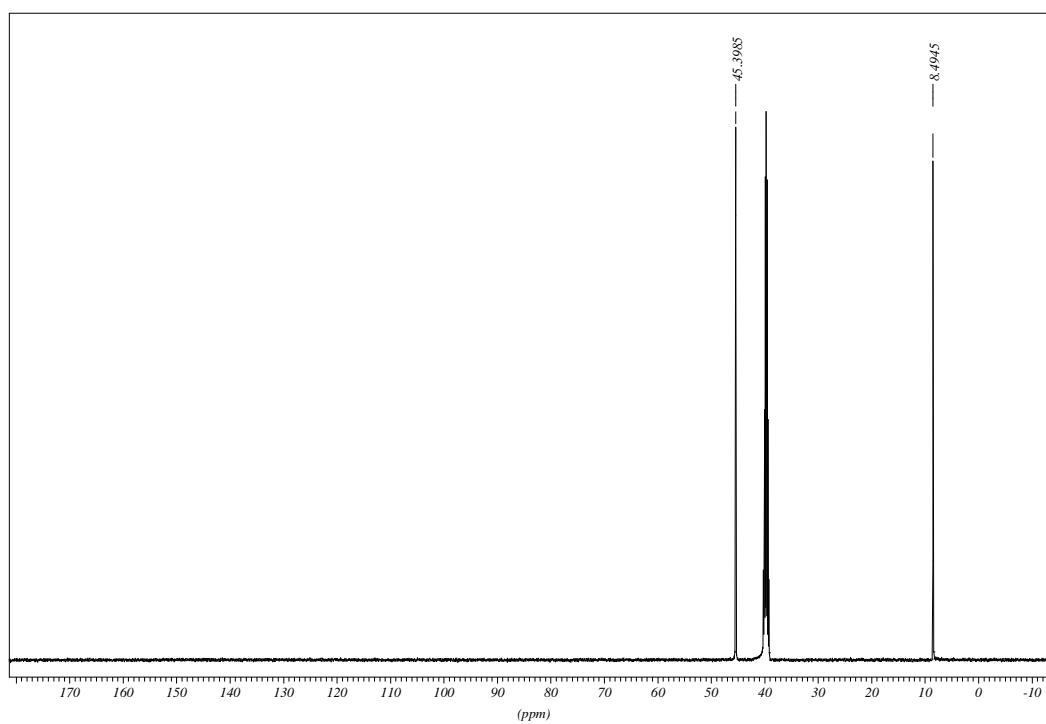
^1H NMR-Spektrum von 26.



^{13}C NMR-Spektrum von 26.



^1H NMR-Spektrum von 27.



^{13}C NMR-Spektrum von 27.

5. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (Einheit)
Abb.	Abbildung
A.E.I	Advanced Electronic Ignition
Ala	Alanin
äquiv.	Äquivalent
bzw.	beziehungsweise
Cys	Cystein
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterisiertes Dimethylsulfoxid
et al.	et alii
g	Gramm
h	Stunde
His	Histidin
HLE	humane Leukozyten-Elastase
HNE	humane neutrophile Elastase
Hz	Herz
Ile	Isoleucin
<i>J</i> _{gem}	geminale Kopplungskonstante
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
Leu	Leucin
m	Multiplett
mbar	Millibar
Met	Methionin
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mmol	Millimol
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
nm	Nanometer
Phe	Phenylalanin
pI	isoelektrische Punkt
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
ppm	parts per million
q	Quartett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Ser	Serin
t	Triplett
TEA	Triethylamin
Val	Valin
Z-	Benzyloxycarbonylamino-
z. B.	zum Beispiel

6. Literaturverzeichnis

- [¹] Korkmaz, B.; Moreau, T.; Gauthier, F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, **2008**, *90*, 227-242.
- [²] Mulchande, J.; Oliveira, R.; Carrasco, M.; Gouveia, L.; Guedes, R. C.; Iley, J.; Moreira, R. 4-Oxo- β -lactams (Azetidine-2,4-diones) Are Potent and Selective Inhibitors of Human Leukocyte Elastase. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 241-253.
- [³] Mulchande, J.; Guedes, R. C.; Tsang, W.-Y.; Page, M. I.; Moreira, R.; Iley, J. Azetidine-2,4-diones (4-Oxo- β -lactams) as Scaffolds for Designing Elastase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1783-1790.
- [⁴] Groutas, W. C.; Dou, D.; Alliston, K. R. Neuprophil elastase inhibitors. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2011**, *21*, 339-354.
- [⁵] Ng, N. M.; Pike, R. N.; Boyd, S. E. Subsite cooperativity in protease specificity. *Biol. Chem.*, **2009**, *390*, 401-407.
- [⁶] Voet, D.; Voet, J.G. Biochemie, VCH, 1. Aufgabe, 1. korrigierter Nachdruck, Weinheim, **1992**, **1994**, 370-375.
- [⁷] Voet, D.; Voet, J.G. Biochemie, VCH, 1. Aufgabe, 1. korrigierter Nachdruck, Weinheim, **1992**, **1994**, 320-321.
- [⁸] Cregge, R. J.; Durham, S. L., Farr, R. A.; Gallion, S. L.; Hare, C. M.; Hoffman, R. V.; Janusz, M. J.; Kim, H.-O.; Koehl, J. R.; Mehdi, S.; Metz, W. A.; Peet, N. P.; Pelton, J. T.; Schreuder, H. A.; Sunder, S.; Tardif, Ch. Inhibition of Human Neutrophil Elastase. 4. Design, Synthesis, X-ray Crystallographic Analysis, and Structure-Activity Relationships for a Serin of P₂-Mdified, Orally Active Peptidyl Pentafluorylethyl Ketones. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 2461-2480.
- [⁹] <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1B0F>
- [¹⁰] Jacob, L.; Chen, B.-N.; Stec, D.; A. Further Studies on the Iodination of Aryltrimethylsilanes. *Synthesis*, June **1993**, 611-614.
- [¹¹] Sano, S.; Nakao, M.; Takeyasu, M.; Yamamoto, Ch.; Kitaike, S.; Yoshioka, Y.; Nagao, Y. Chemoenzymatic synthesis of α -Substituted Serines via Enantiodivergent Transformation. *Open Org. Chem. J.*, **2009**, *3*, 22-34.
- [¹²] Ambrozak, A. Synthesis of 5-Aminobarbituric Acids and Their Conversion to Hydantoins and Bioactive Phthalimido Derivatives. Dissertation Rheinische Friedrichs-Willhelms Universität Bonn, **2006**.

- [13] Albertson, N. F. The Synthesis of Amino Acids from Ethyl Acetamidomalonate and Ethyl Acetamidocyanoacetate. III. The Use of Primary Halides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, *68*, 450-453.
- [14] Singh, P.; Berlinguet, L. Synthesis of 5-Acetamido Substituted Barbiturates. *Can. J. Chem.*, **1964**, *42*, 605-609.
- [15] Badarau, E.; Suzenet, F.; Fînaru, A.-L.; Guillaumet, G. Synthesis of 3-Amino-8-azachromans and 3-Amino-7-azabenzofurans via Inverse Electron Demand Diels-Alder reaction. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, *21*, 3619-3627.
- [16] Friebolin, H. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, WILEY-VCH, 4. Auflage, Weinheim, **2006**, 76-77.
- [17] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie, Thieme, 7. überarbeitete Auflage, Stuttgart, **2005**, 92-93.
- [18] Rattet, L. S.; Mandell, L.; Goldstein, J. H. The ^{13}C -H Satellite Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of Nonequivalent Protons in Acetal. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 2253-2255.
- [19] Deghenghi, R.; Gaudry, R. Nuclear Magnetic Spectroscopy. Abnormal Splitting of Ethyl Groups due to molecular asymmetry. II. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 4666-4668.
- [20] Rattet, L. S.; Williamson, A. D.; Goldstein, J. H. Medium Dependent Geminal SCoupling in Open Chain sp^3 -Hybridized Systems (Acetals). *J. Mol. Spectrosc.*, **1968**, *26*, 281-282.
- [21] Rattet, L. S.; Williamson, A. D.; Goldstein, J. H. Dependence of sp^3 Geminal Coupling Constants in Acetal and some Haloacetals on Solvent and Concentration. *J. Phys. Chem.*, **1968**, *72*, 2954-2958.
- [22] Carter, R. E.; Dahlqvist, K.-I.; Berntsson, P. N.m.r. Studies of Rate Process in a Bridged Biphenyl: Resolution of a Discrepancy between N.m.r. and Polarimetric Kinetic Data. *Magn. Reson. Chem.*, **1977**, *9*, 44-48.
- [23] Eliel, E. L.; Prostereoisomerism (Prochirality). *Top. Curr. Chem.*, **1982**, *105*, 1-76.
- [24] Zhang, L.; He, W.; Liang, Y.; Cui, Y. Some interesting CH_2CH_3 spin systems in several diethyl malonate indene derivatives studied with NMR and molecular modelling. *Sci China Ser B-Chem*, **2009**, *52*, 937-942.

[25] Biernacki, W.; Dabrowski, J.; Ejchart, A. Anisochronism of Large *geminal* Groups in the ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *Magn. Reson. Chem.*, **1972**, *4*, 443-447.

[26] Kienzle, G. J.; Reischl, G.; Machulla, H.-J. Electrochemical radiofluorination. 3. Direct labeling of phenylalanine derivatives with [^{18}F] fluoride after anodic oxidation. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **2005**, *48*, 259-273.

[27] Watanabe, H.; Kuwata, S.; Nakajima, S.; Koshida, K.; Hayashi, M. A Study of Unnatural Amino Acids and Their Peptides. I. The Synthesis of DL- β -(2-Furyl)- α -alanine. *Bull Chem Soc Jpn.*, **1965**, *38*, 1461-1464.

[28] Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7514.

[29] Becker H. G. O., *Organicum*, WILEY-VCH, 21. Auflage, Weinheim, 2001, 749-750.

[30] Dosa, S. Sulfamoylbenzamidine als Arginin-Mimetika: Hemmung von Trypsin-artigen Serinproteasen und Mapping des aktiven Zentrums von Martiptase-2. Dissertation Rheinische Friedrichs-Willhelms Universität Bonn, **2010**.

[31] http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng

[32] Khalil, O. M.; Abdou, N. M.; El-Zanfaly, S. H. Synthesis of pharmacologically interesting derivatives of isatinspirohydantoin Part I. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*, **1990**, *28*, 39-42.

[33] Khalil, O. M.; Abdou, N. M.; El-Zanfaly, S. H. Synthesis of pharmacologically interesting derivatives of isatinspirohydantoin Part I. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*, **1990**, *28*, 43-46.

[34] Frizler, M.; Stirnberg, M.; Sisay, M. T.; Gütschow, M. Development of Nitrile-Based Peptidic Inhibitors of Cysteine Cathepsins. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2010**, *10*, 294-322.

[35] Arnold, L. D.; Drover, J. C. G.; Vederas, J. C. Conversion of Serine β -Lactones to Chiral α -Amino Acids by Copper-Containing Organolithium and Organomagnesium Reagents. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 4649-4659.

[36]

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=128937%7CALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC

[37]

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=96249%7CFLUKA&N25=0&QS=ON&F=SPEC

Abstract

Rheinische Friedrich-Wilhelms University Bonn
The Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Pharmaceutical Institute, Pharmaceutical Chemistry I
Diploma Thesis

Synthesis of Functional Derivatives of Malonic Acid as Buildings Blocs for Elastase Inhibitors

Marie Hrušková

Human leukocyte elastase (HLE) is a serine protease, which plays an important role in inflammatory diseases. Low molecular weight inhibitors can be therapeutically used for example for the treatment of chronic obstructive pulmonary diseases. In this thesis, azetidin-2,4-dione derivatives should be prepared as HLE inhibitors. In particular, 3-(benzyloxycarbonylamino)-3-ethyl-*N*-phenyl-azetidine-2,4-dione should be synthesized. The protected amino group was expected to increase the peptidic character of this molecule and thus, affinity to HLE.

The starting compound was 2-aminomalonic acid diethylester hydrochlorid. The amino function was protected in the first step, followed by alkylation and then hydrolysis of 2-(benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonic acid diethylester to 2-(benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonic acid. Both the ester of 2-(benzyloxycarbonylamino)malonic acid and the 2-(benzyloxycarbonylamino)ethylmalonic acid showed in their ¹H NMR spectra a multiplet in place of the expected quartet. This phenomenon was explained as a result of the prochiral center present in both molecules. The 2-(benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonic decarboxylated at 60 °C to 2-(benzyloxycarbonylamino)butyric acid.

The 2-(benzyloxycarbonylamino)-2-ethylmalonic acid was reacted with oxalyl chloride to give the acid chloride and then *in situ* with aniline to a carbamoylhydantoin, namely 4-ethyl-2,5-dioxo-*N*,1-diphenylimidazolidine-4-carboxamide. The postulated cyclic intermediate, a 2-benzyloxy-5(4*H*)-oxazolone derivative, has probably been attacked by aniline at the benzyl group to afford *N*-benzylaniline. The reaction conditions were optimal when 3 equivalents of aniline

were used at room temperature. Similar carbamoylhydantoin should be synthesized in future experiments. Several further experiments were performed, but they were not successful.

Abstrakt

Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Fakulta matematických a přírodních věd

Farmaceutický institut, Farmaceutická chemie I

Diplomová práce

Syntéza funkčních derivátů kyseliny malonové jako stavebních kamenů pro inhibitory elastasy

Marie Hrušková

Lidská leukocytární elastáza (HLE) patří mezi serinové proteasy, které hrají významnou roli v zánětlivých onemocněních. Nízkomolekulární inhibitory mohou být využity například k léčbě chronické obstrukční plicní nemoci. V této práci mají být připraveny azetidín-2,4-diony jako HLE inhibitory. Zejména má být syntetizován 3-(benzyloxykarbonylamino)-3-ethyl-*N*-fenyl-azetidín-2,4-dion. Bylo očekáváno, že chránění aminoskupiny této molekuly zvýší afinitu k HLE.

Výchozí sloučeninou byl hydrochlorid diethylesteru kyseliny 2-aminomalonové. V prvním kroku byla chráněna aminoskupina, následovala alkylace a poté hydrolyza diethylesteru kyseliny 2-(benzyloxykarbonylamino)-2-ethylmalonové na kyselinu 2-(benzyloxykarbonylamino)-2-ethylmalonovou. Jak ester 2-(benzyloxykarbonylamino)malonové kyseliny, tak ester 2-(benzyloxykarbonylamino)ethylmalonové kyseliny vykazovaly ve svých ¹H NMR spektrech multiplet místo očekávaného kvartetu. Tento fenomén byl vysvětlen přítomností prochirálního centra v obou molekulách. Kyselina 2-(benzyloxykarbonylamino)-2-ethylmalonová při 60 °C dekarboxylovala na kyselinu 2-(benzyloxykarbonylamino)máselnou.

Kyselina 2-(benzyloxykarbonylamino)-2-ethylmalonová reagovala s oxalylchloridem za vzniku chloridu kyseliny a pak *in situ* s anilinem za vzniku karbamoylhydantoinového derivátu 4-ethyl-2,5-dioxo-*N*,1-difenyylimidazolidin-4-karboxamidu. Předpokládaný cyklický intermediát, derivát 2-benzyloxy-5(4*H*)-oxazolonu, byl pravděpodobně atakován anilinem na benzylskupinu za vzniku *N*-benzylanilinu. Reakční podmínky byly optimalizovány za použití 3 ekvivalentů

anilinu při pokojové teplotě. V budoucích experimentech by měly být syntetizovány další karbamoylhydantoiny. Byly prováděny další experimenty, ale nebyly úspěšné.