

5 Zusammenfassung

Die schnelle Parallelsynthese (*RPS*) hat sich als eine leistungsfähige Synthesestrategie im Bereich der kombinatorischen Chemie bei der Pharmawirkstoffsuche etabliert. Obwohl die kombinatorische Chemie ihren Aufschwung hauptsächlich der Weiterentwicklung der ursprünglich von *Merrifield* für die Synthese von Biomolekülen entwickelten polymergestützten Festphasensynthese verdankt, ist diese mit einer Reihe methodischer Nachteile behaftet, die die Entwicklung alternativer *RPS*-Strategien stimuliert hat. Insbesondere bleibt der Transfer der konventionellen Flüssigphasenchemie auf die feste Phase durch die unvermeidliche Verwendung heterogener Reaktionsbedingungen problematisch und die Reaktionsanalytik ist erschwert. Beide Problemfelder können durch die Verwendung löslicher Polymerträger (*Liquid-Phase Methode*) umgangen werden, ohne gleichzeitig die operativen Vorteile der Festphasensynthese zu opfern. Als lösliche Polymerträger wurden mehrfach PEGs (Polyethylenglykole und Polyethylenglykol-monomethylether) für die Synthese von Biomolekülen (Peptide, Oligonucleotide, Oligosaccharide) beschrieben, die Synthese kleiner organischer Moleküle an PEGs ist jedoch noch weitgehend unerforscht. In den vorausgegangenen Kapiteln wurden nacheinander die Wahl der richtigen PEG-Polymere sowie analytische und verschiedene synthetische Beiträge beschrieben, die diese Methode in der schnellen Parallelsynthese kleiner organischer Molekülbibliotheken etabliert. Zusätzlich wurden alternative Methoden diskutiert, die höhere Beladungskapazitäten der Träger zuließen.

Da die untersuchten PEGs und deren Konjugate in den meisten organischen Lösungsmitteln löslich waren, konnten die Reaktionen dünnstichtchromatographisch verfolgt und alle PEG-Konjugate durch ^1H -, ^{13}C - oder zweidimensionale NMR-Techniken charakterisiert werden. Die unterschiedliche Tieffeldverschiebung der Signale der α -Methylengruppen in Abhängigkeit vom jeweiligen Ester ermöglichte eine exakte Quantifizierung der Reaktionsprodukte. Eventuelle Esterspaltungen vom Polymer wurden direkt durch die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren in d_6 -DMSO quantifiziert. Auch mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten Reaktionen verfolgt und z.B. Fragmentierungen des Polyetherrückgrates detektiert werden.

Um die geeignetsten Träger sowie die optimale Aufarbeitungsmethode für die parallele Flüssigphasensynthese an löslichen PEG-Polymeren zu ermitteln, wurden kleinere Biaryl-Bibliotheken synthetisiert. Die quantitative Umsetzung der teilweise sterisch gehinderten Ausgangsverbindungen in homogener Phase wurde ^1H -NMR-spektroskopisch verfolgt. Exzellente Ausbeuten und analytisch reine Verbindungen wurden durch Kristallisation der PEG-Konjugate mit einem geeigneten Fällungsmittel erhalten, in dem die PEG-Konjugate nahezu quantitativ mikrokristalline Niederschläge bildeten und Verunreinigungen gut gelöst wurden.

Die Umkristallisation aus warmen Ethanol oder die Ultrazentrifugation erwiesen sich für schnelle Parallelsynthesen als zu zeitaufwendig. Infolge der Polydispersität der PEG-Träger wurde bei der parallelen Säulenfiltration über Kieselgel gelegentlich ein ausgeprägtes Tailing beobachtet, das den Reinigungseffekt und die Ausbeute verminderte. Alle weiteren Bibliotheken wurden daher parallel nach der Kristallisationsmethode gereinigt.

PEGs mit einer mittleren Molmasse von 4000 bis 6000 waren für die schnelle Parallelsynthese am geeignetsten, da sie hohe Beladungskapazitäten (0.50 mmol/g und 0.33 mmol/g) und gute Fällungseigenschaften besaßen. Die Beladungskapazität von mPEG 2000 war zwar ebenfalls gut, die Fällung der Konjugate wurde jedoch erheblich durch Verunreinigungen, Größe und Polarität der Substituenten beeinflusst. Die mPEG 2000-Konjugate wurden nur unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen in guten Ausbeuten erhalten und waren daher für die parallele Synthese wenig geeignet. Analytisch reine Verbindungen wurden zwar in guten Ausbeuten mit mPEG 5000 erhalten, nachteilig war hier allerdings die geringe Beladungskapazität von 0.2 mmol/g.

Die intrinsischen phasentransferkatalytischen Eigenschaften der PEGs eröffneten neue, synthetisch interessante Möglichkeiten. Dies wurde bei der hochstereoselektiven Synthese von 28 sterisch gehinderten (*E*)- und (*Z*)-3,3-disubstituierten Acrylsäureestern ausgenutzt. Die monosubstituierten (*E*)-Acrylsäuren wurden zunächst durch eine Wadsworth-Emmons Reaktion von aromatischen und cycloaliphatischen Aldehyden mit PEG-veresterter Diethylphosphonoessigsäure synthetisiert. Die Einführung eines zweiten Arylsubstituenten durch eine Heck-Reaktion führte quantitativ zu 3,3-disubstituierten Acrylaten. In der Literatur erfordert dieser Schritt den Zusatz quaternärer Ammoniumsalze als Phasentransferkatalysatoren. Dies war bei der Synthese an PEG-Estern unnötig. Überraschend wurde außerdem gefunden, daß die in der Literatur berichtete Isomerisierung der ursprünglich stereodefinierten Olefine unter thermodynamischen Bedingungen an den PEG-gebundenen Substraten nicht eintritt, obwohl unter deutlich höheren als in der Literatur beschriebenen Temperaturen gearbeitet wurde. ¹H-NMR-Untersuchungen zeigten, daß das Verhältnis der Stereoisomeren sogar bei 145°C im wesentlichen erhalten blieb. Hochstereoselektive Produkte wurden mit allen (*E*)-3-monoarylierten Acrylaten erhalten, deren Phenylrest in *ortho*-Position sterisch gehindert war. Durch Kontrollexperimente an nicht polymergebundenen Analogen konnte gezeigt werden, daß der polymere Träger die Stereoselektivität der Heck-Reaktion verbesserte.

Die Optimierung der schnellen Parallelsynthese erfolgte an einer Bibliothek von 25 biarylischen Benzimidazolen und Imidazopyridinen. In der ersten Stufe wurden PEG 6000 veresterte Formyl-biaryle durch die Kupplung von PEG-gebundenen Arylhalogeniden mit *o*-, *m*-, und *p*-Formyl-phenylboronsäuren erhalten.

Die Aldehyde wurden dann mit *o*-Aryldiaminen in Nitrobenzol als Oxidations- und Lösungsmittel zu den Zielmolekülen umgesetzt. Für die quantitative Umsetzung war dreitägiges Erhitzen auf 180 °C erforderlich. Im Gegensatz zu den in der Festphasensynthese verwendeten funktionalisierten Polystyrolharzen, deren thermische Stabilität auf maximal 150 °C begrenzt ist, blieb der polymere Träger unter diesen drastischen Reaktionsbedingungen stabil, wie durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie belegt wurde. Die PEG-Konjugate wurden parallel durch Kristallisation gereinigt. Die Zielmoleküle wurden mit Natriummethanolat in Methanol abgespalten und durch parallele Festphasenextraktion mit einem stark sauren Ionenaustauscher gereinigt.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß durch das hohe Solubilisierungs- und Phasentransferpotential der PEGs Reaktionen auch in Wasser durchgeführt werden konnten. Beispielhaft wurden die PEG-Ester von Brom-, Iod-, Triflat-, und Nonafat- parasubstituierten Benzoaten glatt mit sterisch gehinderten und elektronenarmen Arylboronsäuren unter phosphinfreien Bedingungen mit Palladiumacetat als Katalysator in Wasser umgesetzt. Die Reaktionen erfolgten ohne organische Co-Solventien unter konventionellen thermischen Bedingungen (70°C, 2h) und unter Mikrowellenbestrahlung (75 W, 2 bis 4 min). Der Polymerträger blieb unter beiden Reaktionsbedingungen stabil. Während unter thermischen Bedingungen eine Esterspaltung bis zu 45% erfolgte, trat diese Nebenreaktion bei Mikrowellenbestrahlung nicht auf. Die mikrowellengestützte Kreuzkupplung von 4-Iodobenzoesäuremethylester mit sterisch gehinderten und elektronenarmen Arylboronsäuren verlief ebenfalls unter hohen Ausbeuten in Wasser, wenn underivatisiertes PEG 6000 als Phasentransferkatalysator zugesetzt wurde.

Durch die Verwendung verzweigter PEG-Polymere konnte die Beladungskapazität der löslichen Träger gesteigert werden, die Kristallinität der Niederschläge wurde jedoch beeinträchtigt und die verzweigten Polymere zeigten keine Vorteile gegenüber den linearen PEGs mit gleicher Beladungskapazität. Kürzere PEGs mit einer höheren Beladungskapazität wie z.B. das mPEG 750, konnten mit einer gesättigten α -Cyclodextrinlösung in hohen Ausbeuten ausgefällt und nach der Reinigung wieder freigesetzt werden. Dieses Verfahren war jedoch aufwendiger und erreichte nicht die fast quantitative Wiederfindung der analysenreinen PEG-Konjugate durch Kristallisation mit geeigneten Fällungsmitteln.

Es wurde gezeigt, daß die Liquid-Phase Methode unter Verwendung von PEG-Trägern zur schnellen parallelen Synthese kleiner organischer Molekülbibliotheken geeignet ist. Gegenüber der heterogenen Synthese an funktionalisierten, quervernetzten Polystyrolen weist die parallele Flüssigphasensynthese an PEGs einige Vorzüge auf: Homogene Reaktionsbedingungen, dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktionen und die Anwendbarkeit spektroskopischer Analysemethoden sowie die einfachere Übertragung von konventionellen Syntheseprotokollen.

Die im Vergleich zu quervernetzten Polystyrolen höhere thermische Stabilität der PEG-Träger ermöglichte Reaktionen auch oberhalb von 150°C. Zusätzlich eröffneten die solubilisierenden und die intrinsischen phasentransferkatalytischen Eigenschaften der PEGs auch Reaktionen ohne organisches Co-Solvenz. Die parallele Aufarbeitung unter weitgehend standardisierten Bedingungen konnte ebenfalls verwirklicht werden, wogegen der hohe Automatisierungsgrad der Festphasen-Methodik bei der Liquid-Phase-Synthesis bisher nicht erreicht werden konnte.

6 Summary

Rapid Parallel Synthesis (RPS) is well established as an important tool within the area of Combinatorial Chemistry for the identification of drug candidates in the vast majority of pharmaceutical companies. Despite the efficiency of the purification method, the simple transfer of solution-phase chemistry to solid-phase supported synthesis originally developed by *Merrifield* for the synthesis of biomolecules remains problematic and the reaction-monitoring is limited, because of the inevitable use of heterogeneous reaction conditions. This has stimulated the development of alternative RPS-strategies. Utilising PEG as soluble support (liquid-phase method) provides a homogeneous reaction medium while maintaining the ease of solid phase synthesis. PEG has been used as a support for the synthesis of biomolecules (peptides, oligonucleotides, oligosaccharides) but PEG-supports have rarely been used for the synthesis of small organic molecules. In the previous chapters the choice of polymers as well as the analytical and various synthetic contributions were described to employ this method for the rapid parallel synthesis of small organic molecule libraries. Additionally, alternative methods to increase the loading of the polymers were discussed.

Since PEG and its conjugates are soluble in common organic solvents, all reactions could be monitored by thin layer chromatography and all PEG-conjugates were characterised by ^1H -, ^{13}C - or two dimensional NMR-techniques. The chemical shift of the signal of the α -methylene group next to the ester bond allowed exact quantification of the product on the PEG by ^1H -NMR. Cleavage of the ester bond off the polymeric support could be detected by ^1H -NMR in d_6 -DMSO. Most of the reactions could be monitored by MALDI-TOF-MS experiments which additionally allowed information about fragmentation of the polyether-backbone during the reaction sequence.

The optimal workup procedure and the right choice of PEG was evaluated during the syntheses of libraries of 28 biaryls. The reactions were run in the homogeneous phase and quantitative conversion in the Suzuki couplings including sterically hindered substrates was verified by ^1H -NMR analysis. It was shown that excellent yields and highly pure PEG-bound products could be obtained by crystallisation with suitable solvents inducing nearly quantitative precipitation of the PEG-polymer while impurities remained in solution. Recrystallisation of the PEGs from warm ethanol or ultra-centrifugation were too time-consuming for parallel synthesis. Due to the polydispersity of the PEGs distinct tailing was observed during parallel flash column filtration over silica gel affecting the purity and the recovery of the PEG-polymer. The crystallisation method was therefore the method of choice for the parallel workup of libraries.

It was shown that PEGs with an average molecular mass of 4000 to 6000 offered the best loading capacity (0.50 mmol/g and 0.33 mmol/g) and ease of workup *via* the parallel crystallisation method and were therefore the polymers of choice in most syntheses. mPEG 2000 esters provided a loading of 0.47 mmol/g, but the precipitation was strongly influenced by impurities, the size and the polarity of the ester residue. High recovery of the mPEG 2000 conjugates were only obtained under carefully controlled conditions not suitable for parallel synthesis. mPEG 5000 provided crystalline precipitates and high recoveries of the PEG-bound products, but the polymer suffered a loading capacity of only 0.2 mmol/g.

The intrinsic phase-transfer-catalytic properties of PEGs were utilised for the highly stereoselective preparation of 28 sterically hindered (*E*)- and (*Z*)-3,3-disubstituted acrylic acid esters. Stereoselective formation of the (*E*)-olefinic bond was achieved using PEG-esterified diethyl phosphono acetic acid in a Wadsworth-Emmons reaction with aromatic and cycloaliphatic aldehydes. Subsequent reaction of the PEG-bound (*E*)-olefin using a Heck reaction quantitatively produced the title 3,3-disubstituted acrylates. The addition of tertiary ammonium salts as phase-transfer-catalyst as described in the literature was not necessary when PEG-polymers were employed. Increasing isomerisation of the initially stereodefined alkene at higher temperatures has been reported. Surprisingly, the diastereomeric ratio was essentially maintained during the Heck reaction even under prolonged heating (3d) at 145°C as indicated by ¹H-NMR. Under these conditions highly stereoselective reactions were observed with an *ortho*-substituent present in 3-aryl acrylates. It could be shown that the polymeric support additionally improved the stereoselectivity of the Heck reaction.

The parallel methodology was optimised for the synthesis of 25 biaryl 1H-benzimidazoles, 1H-imidazo[4,5-b]pyridines and 1H-imidazo[4,5-c]pyridines. PEG 6000-esterified biaryl aldehydes were prepared in parallel fashion by coupling PEG-bound aryl halides with *o*-, *m*-, and *p*-formyl phenylboronic acid in a first step. Subsequently the aldehydes were treated with *o*-arylenediamines to form the title compounds. Nitrobenzene was used as solvent and oxidant in this one-pot conversion. MALDI-TOF-experiments showed that the polymeric supports remained stable under the drastic conditions (180°C, 3d) necessary for quantitative conversion whereas the thermal stability of solid-phase supports is limited to temperatures below 150°C. The parallel recovery of the PEG-bound products *via* the crystallisation method was good to excellent and the transesterification with sodium methanolate and subsequent purification by parallel solid phase extraction with strongly acidic ion exchange resin yielded the desired methyl esters.

Due to the high solubilising- and phase-transfer-catalytic power of PEG, reactions could also be performed in water. This was exemplified in the smooth cross-coupling of PEG-esters of bromo-, iodo-, triflate- and nonaflate parasubstituted benzoates with sterically hindered and electronically poor aryl boronic acids (Suzuki reaction) under phosphine-free palladium acetate-catalysis in water. The reactions proceeded without organic cosolvent under conventional thermal conditions (70 °C, 2h) and under microwave irradiation (75 W, 2 to 4 min). The polymeric support remained stable under both reaction conditions. Whereas conventional thermal conditions induced ester cleavage (up to 45%), this side reaction was suppressed when microwave conditions were employed. Non-polymer-bound aryl halides formed biaryls in good to excellent yields in water under microwave irradiation (4 min, 75 W) when underivatized PEG was employed as phase-transfer-catalyst.

The use of branched polymers with increased loading capacity led to less crystalline precipitation products and therefore hampered the parallel workup of the polymers and the branched polymers showed no advantage over linear PEGs with the same loading capacity. Linear PEGs with a higher loading capacity such as mPEG 750 could be precipitated in saturated α -cyclodextrin solutions and released after purification. Although this procedure could be performed in parallel fashion, the efficiency of the method and the purity of the compounds did not reach that of the crystallisation method.

It could be shown that the liquid-phase method with PEG as polymeric support is suitable for the rapid parallel syntheses of small organic molecule libraries. Because of the inevitable use of heterogeneous reaction conditions with functionalized, cross-linked polystyrene, the parallel liquid-phase synthesis on soluble PEG-supports shows various advantages: Homogeneous reaction conditions, reaction-monitoring by thin-layer-chromatography, spectroscopic methods and easy transfer of solution-phase protocols. Reactions on PEG could be run above temperatures of 150°C and the high solubilising- and phase-transfer-catalytic power of PEGs allowed reactions to proceed without an organic cosolvent. The workup of PEG-bound products could be usually performed in parallel fashion under standardised conditions, but the high grade of automation achieved in solid-phase synthesis could not yet be reached in the liquid-phase method.