

# Synthese eines chemischen Vektors zur Translokation von Reportermolekülen in Zellen

**Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
vom Fachbereich Chemie der  
Universität Dortmund  
angenommene**

## DISSERTATION

**von  
Diplom-Chemiker**

**Timo Krämer**

**aus Heilbronn**

**1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann  
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht  
Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2002**



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann in der Zeit von November 1997 bis Oktober 1999 am Institut für Organische Chemie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH) und in der Zeit von November 1999 bis Januar 2001 im Fachbereich Chemie der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund angefertigt.



Meinen Eltern



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>2</b>
	2.1. Viren als Genföhren	2
	2.2. Nicht-virale Transfermechanismen	4
	2.3. Natürliche Kerntransportmechanismen	7
	2.4. Enzymlabile Linker	12
<b>3.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>Spezieller Teil</b>	<b>18</b>
	4.1. Aufbau des Linkerderivats	18
	4.1.1. Spaltung und Fragmentierung	18
	4.1.2. Synthese von 2-Acetoxy-5-hydroxymethyl- benzoesäure	20
	4.1.3. Alternative Syntheseroute für 2-Acetoxy-5-hydroxy- methylbenzoesäure	23
	4.1.4. Darstellung des Modellpeptids	26
	4.1.5. Versuche zur Verknüpfung von Linker und Modell- peptid	28
	4.1.6. Synthese des modifizierten Linkers	29
	4.2. Synthese des Linkersegments	33
	4.2.1. Retrosynthese	33
	4.2.2. Aufbau der Grundstruktur des Linkers	34
	4.2.3. Versuche zur direkten Funktionalisierung der Doppel- bindung zum Amin	36
	4.2.4. Funktionalisierung der Doppelbindung	39
	4.2.5. Aufbau der Aminofunktion durch reduktive Aminierung	42
	4.2.6. Anbindung einer Aminosäure an das Linkergrundgerüst	44
	4.3. Aufbau des NLS-MPS-Konjugats	47
	4.3.1. Vorüberlegungen	47

4.3.2. Aufbau des beladenen Hycronlinkers	48
4.3.3. Anbindung des Linkers an die feste Phase	50
4.3.4. Festphasensynthese	52
4.3.5. Synthese der fluoreszenzmarkierten Aminosäure	58
4.3.6. Aufbau des voll geschützten Lysins	62
4.3.7. Synthese des Peptidkonjugates an der festen Phase	64
4.4. Biologische Tests	69
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>71</b>
5.1. Zusammenfassung	71
5.2. Ausblick	76
<b>6. Experimenteller Teil</b>	<b>77</b>
6.1. Allgemeines und Messgeräte	77
6.2. Versuche zu Kapitel 4.1.	79
6.2.1. Versuche zu Kapitel 4.1.1.	79
6.2.2. Versuche zu Kapitel 4.1.2.	80
6.2.3. Versuche zu Kapitel 4.1.3.	82
6.2.4. Versuche zu Kapitel 4.1.4.	84
6.2.5. Versuche zu Kapitel 4.1.6.	89
6.3. Versuche zu Kapitel 4.2.	92
6.3.1. Versuche zu Kapitel 4.2.2.	92
6.3.2. Versuche zu Kapitel 4.2.3.	94
6.3.3. Versuche zu Kapitel 4.2.4.	95
6.3.4. Versuche zu Kapitel 4.2.5.	99
6.3.5. Versuche zu Kapitel 4.2.6.	102
6.4. Versuche zu Kapitel 4.3.	105
6.4.1. Versuche zu Kapitel 4.3.2.	105
6.4.2. Versuche zu Kapitel 4.3.3.	109
6.4.3. Versuche zu Kapitel 4.3.4.	113
6.4.4. Versuche zu Kapitel 4.3.6.	115
6.4.5. Versuche zu Kapitel 4.3.7.	119
6.4.6. Versuche zu Kapitel 4.3.8.	120

	6.5. Versuche zu Kapitel 4.4.	123
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>125</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>131</b>



# 1. Einleitung

Das aufstrebende Feld der Proteomanalyse (Proteomics) basiert auf der Erkenntnis, dass die durchschnittliche eukariotische Zelle 10000 Proteine enthält, welche die Signaltransduktion, Gentranskription, Zell-Zell Kommunikation und den intrazellulären Proteintransport regulieren. Diese Funktionen lebender Zellen hängen von intrazellulären Protein-Protein-, Protein-Lipid- und Protein-DNA-Wechselwirkungen ab. Diese Proteine enthalten mehr oder weniger definierte Domänen oder übereinstimmende Sequenzen. Das Humane Genom Projekt lieferte eine weitere Fülle an struktureller Information über diese Proteine.<sup>[1,2]</sup>

Allerdings ist die Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen durch das Fehlen analytischer Werkzeuge, wie zum Beispiel sequenzspezifischen Antikörpern oder synthetischen Peptiden, welche die Plasmamembran überwinden können, beeinträchtigt. Deshalb werden normalerweise invasive Techniken wie Mikroinjektion oder membran-unterbrechende, porenbildende Reagenzien verwendet, um Antikörper, synthetische Peptide oder andere nicht membrangängige Moleküle in Zellen einzuschleusen. Während solche Ansätze wertvolle Informationen liefern, erschweren ihre inhärenten Limitierungen die Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen existierender, beziehungsweise neu entdeckter intrazellulärer Proteine.

Um diese Einschränkungen zu überwinden und auf einfachem, nicht invasivem Wege Peptide, Proteine und Reportermoleküle in großem Maßstab in intakte Zellen einzubringen werden neue Methoden entwickelt. Die Entwicklung breit anwendbarer Techniken für diesen Zweck ermöglicht die Untersuchung zellulärer Prozesse wie Zellteilung, -wachstum und des induzierten Zelltodes. Diese Techniken sollten auch neue Möglichkeiten eröffnen, effizientere und milde diagnostische Methoden zu entwickeln sowie neue therapeutische Ansätze bei der Gentherapie liefern.<sup>[3,4]</sup>

## 2. Allgemeiner Teil

In der Molekularbiologie sind zahlreiche Verfahren etabliert, um *in vivo* genetisches Material in Zellen einzuschleusen.<sup>[5,6]</sup> Eine Triebkraft dafür ist die Entwicklung neuer Ansätze zur Gentherapie. Hiermit können genetisch bedingte und somit vererbte Krankheiten wie z. B. Mukoviszidose, sowie auch von außen verursachte Fehler im genetischen Material, die unter anderem zu Krebs führen, angegangen und behandelt werden. Zwar sind genetisch bedingte Krankheiten teilweise heute schon gut therapierbar, allerdings werden hierbei nur die Symptome und nicht die Ursachen behandelt.

Die Strategie, die dahinter steht, ist die sogenannte Genadditionsstrategie. Dabei soll versucht werden, eine korrekte Kopie eines fehlerhaften Gens in Zellen einzuschleusen.<sup>[7]</sup> Durch die Bereitstellung des korrekten Erbmaterials soll die richtige Funktionsweise der Zelle, zumindest für einen bestimmten Zeitraum, gewährleistet sein. Im selektiven, effizienten Gentransfer liegen auch die größten Schwierigkeiten. Hierfür wurden eine Reihe von Lösungsansätzen entwickelt, denn der Schlüssel zum Erfolg jeder gentherapeutischen Strategie ist ein sicheres und zugleich effizientes Verfahren für den Transfer von Erbmaterial.

### 2.1. Viren als Genfähren

Seit dem Beginn der Forschung auf diesem Gebiet wurden Viren als potentielle Vektoren ins Auge gefasst.<sup>[8,9]</sup> Viren enthalten nur wenige eigene Gene in einer Proteinhülle und sind speziell darauf ausgelegt, ihr Erbgut in Zellen einzubringen und dort ausprägen zu lassen. Man kann Abschnitte, die für die Vermehrung oder die Virulenz des Virus zuständig sind, ausschneiden und durch ein oder mehrere Gene ersetzen, die therapeutischen Nutzen versprechen. Theoretisch sollte dann ein derart verändertes Virus die Fracht in Zellen transferieren, ohne sich dort zu vermehren oder pathogen zu wirken.

Eine Eigenschaft, die Viren mitbringen, ist eine gewisse Selektivität, da in der Regel nur bestimmte Zelltypen infiziert werden. Diese Selektivität kann jedoch von Nachteil sein, da eben nicht alle Arten von Zellen erreicht werden können. Von

den unterschiedlichen Arten von Viren sind die Retroviren die am besten erforschte Gruppe. Retroviren bauen DNA-Kopien ihres RNA-Erbguts dauerhaft in die Chromosomen befallener Zellen ein. Somit wird die DNA auch bei den Zellteilungen weitergegeben. Ideale Empfänger für stabil eingebaute Gene wären somit Stammzellen, das heisst dauerhaft teilungsfähige Zellen. Ein Manko der Retroviren ist der Mangel an Zielgenauigkeit, das heisst sie nisten sich gleich in eine ganze Reihe von Zelltypen ein, was zu einem unerwünschten Transfer mit unerwünschten physiologischen Folgen führen kann.

Ein weiteres Problem ist, dass Retroviren für Zelltypen ungeeignet sind, welche sich nicht mehr oder nur sehr selten teilen. Denn nur wenn sich die Membran um den Zellkern vor der Teilung auflöst, erreichen die retroviralen Vektoren die Chromosomen. Desweiteren ist der Einbau der DNA-Kopien problematisch, da der Einbau an beliebigen Stellen erfolgt. Dies könnte dazu führen, daß wichtige chromosomale Gene funktionslos gemacht oder in einer Weise verändert werden, die die Entwicklung von Krebs fördern könnte.

Die beliebteste Alternative zu Retroviren als Basis für Genfähren sind die weit verbreiteten menschlichen Adenoviren. Natürlich vorkommende Formen verursachen bei gesunden Personen gewöhnlich lediglich Infektionen der Atemwege. Adenovirale Vektoren infizieren leicht menschliche Zellen und erzeugen am Anfang gewöhnlich grosse Mengen des therapeutischen Proteins. Sie transportieren zwar Erbmaterial in den Zellkern, aber bauen es nicht in Chromosomen ein. Auch sind die Adenoviren nicht spezifisch genug, wobei durch z.B. Austausch von bestimmten Hüllproteinen die Selektivität erhöht beziehungsweise verändert werden kann.

Allerdings besitzen die viralen Genfähren immer noch große Nachteile. Unter anderem lösen sie durch den unerwünschten Cotransfer von viralem Material in der Regel eine starke körpereigene Immunantwort aus. Ein weiterer großer Nachteil ist die geringe Größe der Viren. So ist die Kapazität der Viren auf ca. 8 kb große Fremdgene begrenzt.

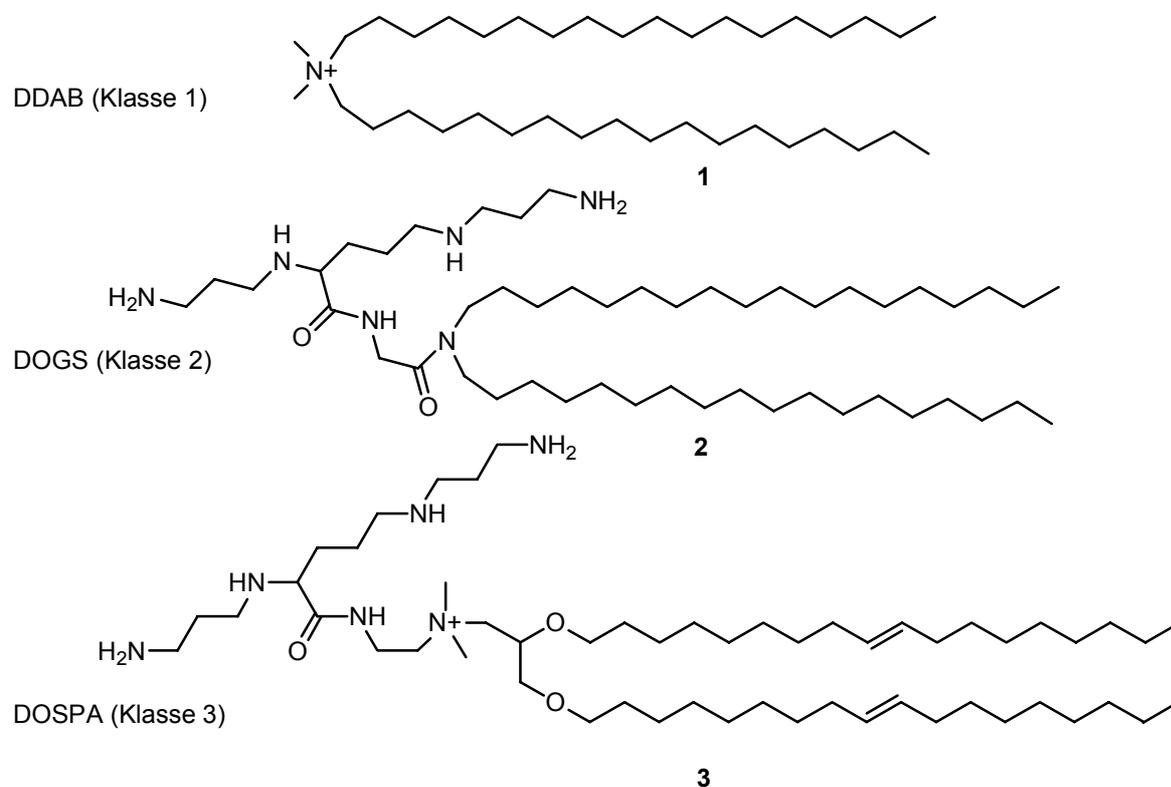
Aufgrund dieser Nachteile ist die Verwendung physikalischer und chemischer Methoden mit gesteigertem Interesse in den letzten Jahren untersucht worden. Nicht virale Techniken werden auch als einfacher und breiter anwendbar eingeschätzt.

## 2.2. Nicht-virale Transfermethoden

Die Virenhülle dient als Schutz der zu transportierenden DNA. Diese kann auch direkt ohne Schutzhülle injiziert werden. Allerdings ist dieser Gentransfer sehr ineffizient und in den meisten Geweben des Körpers ist die DNA instabil. Andere nicht-virale Transfermechanismen außer der Mikroinjektion sind z.B. die Calciumphosphat Copräzipitation,<sup>[10]</sup> Transfer durch Liposomen<sup>[11]</sup> und die Verwendung kationischer Polymere<sup>[12-14]</sup> welche plasmidische DNA über ionische Wechselwirkungen binden können. Bei den beiden letzteren Methoden wird die DNA wiederum durch eine Ummantelung vor dem Abbau geschützt.

Liposomen sind wohl die bekanntesten künstlichen Vehikel. Sie basieren auf kleinen Hohlkugelchen aus Lipid-, also Fettmolekülen. Die Lipidmoleküle bestehen aus drei Teilen, einem kationischen polaren Kopf, einem Linker und einem lipophilen Rest. Die kationischen Lipide<sup>[15-17]</sup> werden in drei Klassen unterteilt:

- quarternäre Ammoniumsalz-Lipide
- Lipoamine
- kat. Lipide, welche ein quarternäres Ammoniumsalz und ein Lipoamin enthalten



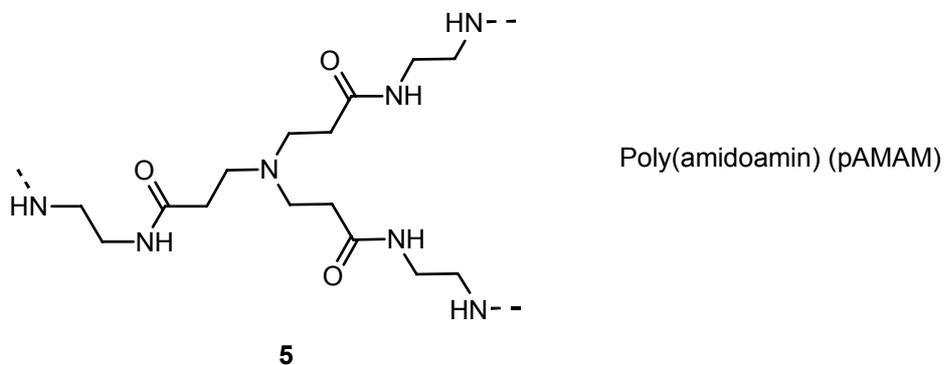
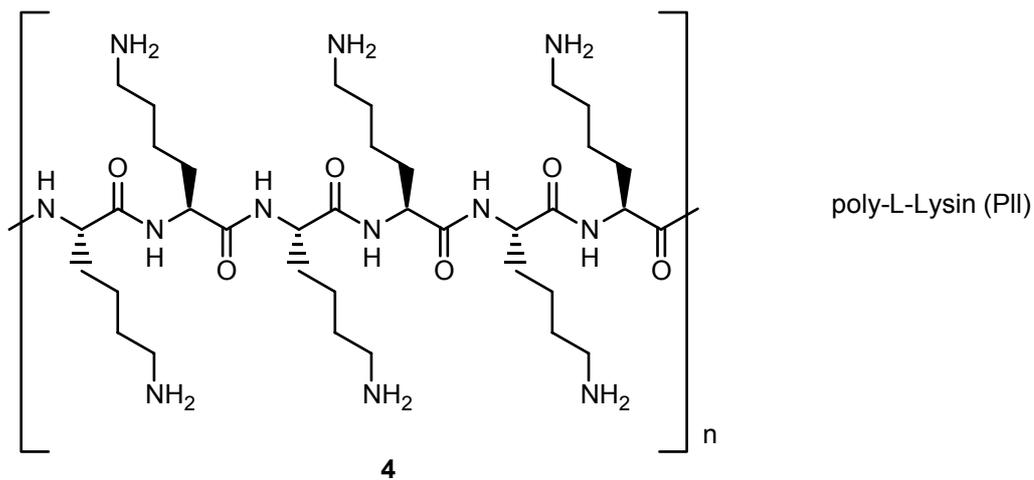
**Abbildung 1:** Repräsentative kationische Lipide für den DNA-Transfer.

Die kationische Ladung soll die negative Ladung der zu kapselnden DNA kompensieren. Die DNA-Lipidpartikel werden als Lipoplexe bezeichnet.

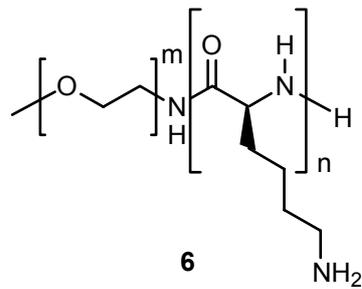
Analog zu den kationischen Lipiden wird auch bei den kationischen Polymeren die negative Ladung des Ribosephosphat-Grundgerüsts der DNA neutralisiert, was für die Transfektion fast aller Zellen notwendig ist. <sup>[18,19]</sup> Desweiteren kondensieren diese Polymere große Gene in kleinere Strukturen. Im Gegensatz dazu, schützen neutrale Polymere nur die DNA vor Degradation, können sie aber nicht kompakt verpacken.

Auch die kationischen Polymere sind in Untergruppen unterteilt:

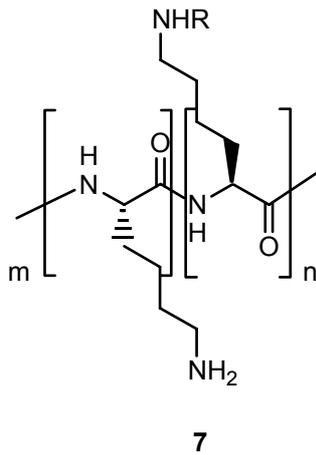
- Polymere mit linearem Rückgrad
- Polymere mit verzweigten Rückgrad
- Block-Copolymere
- Pfopf-Copolymere



**Abbildung 2:** Beispiele für kationische Polymere mit linearem bzw. verzweigtem Rückgrad.



Polyethylenglycol-Poly-L-Lysin (pEG-pLL)



Poly-L-Lysin-Pfropfpolymer

R = z.B. Polyethylenglycol (pEG)

**Abbildung 3:** Beispiele für kationische Block- bzw. Pfropf-Copolymere.

Die Bildung der sogenannten Polyplexe, bestehend aus dem kationischen Polymer und der DNA, geschieht spontan. Das heißt, werden beide Komponenten zusammen gegeben bilden sich abhängig von der Größe der DNA-Fragmente und der Art des kationischen Polymers unterschiedlich große Partikel. Auch die Aggregationsbildung zwischen den Partikeln sowie ihre Stabilität ist stark vom entsprechenden Polymer abhängig. Die Geschwindigkeit der Dissoziation ist allerdings sehr stark mitentscheidend, ob das genetische Material wieder freigesetzt werden kann. Mikroinjektion von Plasmiden in das Cytosol bewirkten nur eine schwache Expression der injizierten Gene, während die Injektion direkt in den Kern eine relativ starke Expression des genetischen Materials zur Folge hat. Polyplexe hingegen, haben in *in vivo* Tests gezeigt, dass sie über längere Zeit (mehrere Wochen), aufgrund der langsamen Freisetzung der DNA, eine konstante Expression bewirken können.

*In vitro* Tests haben allerdings auch gezeigt, dass die Transfektion von Zellen mit Polyplexen bzw. Lipoplexen noch sehr viel geringere Erfolgsraten aufweist als die

Transfektion mit Viren. Dies liegt in erster Linie daran, dass Viren über rezeptorvermittelte Mechanismen sehr gut diverse Zellen infizieren. Deshalb gibt es Bestrebungen, die Polymere mit entsprechenden Liganden zu verknüpfen um z.B. rezeptorvermittelte Endocytose auszulösen und um die Selektivität für bestimmte Zellen zu erhöhen. Bei diesen Ansätzen werden allerdings keine natürlichen Transportmechanismen ausgenutzt, welche die Rate der transportierten DNA-Ladung im Kern erhöhen.

### 2.3. Natürliche Kerntransportmechanismen

In eukaryotischen Zellen ist der Kern, der die Erbinformation der Zelle beinhaltet, durch eine Membran vom Cytosol getrennt. In der aus zwei Membranen bestehenden Kernhülle befinden sich die Kernporen, Multiproteinkomplexe, durch die der Austausch zwischen den beiden Kompartimenten stattfindet. Diese Kernporen-komplexe haben eine geschätzte Masse von ca. 125 Millionen Dalton, einen Durchmesser von ungefähr 9 nm und sind vermutlich aus mehr als 100 Proteinen zusammengesetzt. Kleine Moleküle bis ca. 60 kDa können passiv durch diese Poren diffundieren. Bei größeren Molekülen findet ein aktiver, energieabhängiger Transport statt, der allerdings noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt ist.<sup>[20-23]</sup>

Zwischen dem Kern und dem Cytosol findet ein ständiger Austausch in beide Richtungen statt. Die vielen Proteine, die – wie Histone, DNA- und RNA-Polymerasen, genregulatorischen und RNA-prozessierende Proteine – ihre Funktion im Kern ausüben, werden selektiv aus dem Cytosol, wo sie gebildet werden, in das nukleäre Kompartiment eingeschleust. Gleichzeitig werden tRNA und mRNA im Zellkern synthetisiert und in das Cytosol entlassen. Eine essentielle Forderung an das nukleare Transportsystem ist Selektivität und Spezifität. Das System muß sicherstellen, daß nur die korrekte Ladung zum richtigen Zeitpunkt importiert oder exportiert wird.<sup>[24,25]</sup> Solche Transportsysteme existieren auch für andere Zellkompartimente, wie z.B. die Mitochondrien.

Um selektiven Import zu gewährleisten, existieren sogenannte Kernlokalisierungssequenzen (NLS).<sup>[26, 27]</sup> Die zu transportierenden Peptide sind entweder terminal

mit diesen Sequenzen markiert oder sie enthalten sogenannte Lokalisierungsbereiche (Signalbereiche), die aufgrund der Faltung das entsprechende Signal zum Transport generieren.

In der nachfolgenden Tabelle sind Beispiele für Kernlokalisierungssequenzen und die dazugehörigen Proteine aufgeführt.

<u>Protein</u>	<u>Sequenz (NLS)</u>
HIV-1 gag MA	GRKKYKLVH <sup>[28,29]</sup>
SV40 large T	PKKKRKY <sup>[26]</sup>
NF-κB	VQRKRQKLVH <sup>[30]</sup>
Maus c-abl	KKKKK <sup>[31]</sup>
Menschl. c-myc	PAAKRVKL <sup>[31]</sup>

**Tabelle 1:** Ausgewählte Kernlokalisierungssequenzen.

Die meisten Kernlokalisierungssequenzen sind 5-15 Aminosäuren lang und bestehen hauptsächlich aus Aminosäuren mit basischen Seitenketten.

Auch für die Zellmembran existieren Sequenzen, welche dafür sorgen, dass Peptide durch die Membran in die Zelle gelangen können. Diese Membranpermeabilitätssequenzen (MPS) beinhalten in der Regel Aminosäuren mit lipophilen Seitenketten.

#### Sequenz (MPS)

Myr-GARASVL<sup>[29]</sup>

AAVALLPAVLLALLAP<sup>[30]</sup>

ILVIILAPAAPLVAPL<sup>[32]</sup>

**Tabelle 2:** Beispiele für Membranpenetrationssequenzen.

Aus der Kombination dieser beiden Sequenztypen wurden neue Ansätze zur Einschleusung von Genmaterial in Zellen entwickelt.<sup>[33-36]</sup>

Heitz<sup>[37]</sup> und Mitarbeiter haben neue Typen von peptidischen Transportern entworfen, welche die zwei unterschiedliche Sequenzen enthalten. Die Rollen der

beiden einzelnen Peptide sind die folgenden: die MPS soll die Translokation durch die Membran ermöglichen, während die NLS die Zelladressierung garantiert. Das biologische Interesse an diesen neuen Peptidfamilien liegt darin, ob mit diesen Transportern ein Einbringen von Fremdmaterial in Zellen ermöglicht werden kann. Außerdem könnte die Konjugation dieser Peptide an Oligonukleotide die Anwendung von Antisensestrategien ermöglichen.

Die von Heitz ausgesuchten Peptide wurde aus folgenden Gründen ausgewählt:

1. Einfache Synthese.
2. Trp-Rest als intrinsische Probe um die Interaktionen zwischen Peptiden und Lipiden zu kontrollieren.
3. Anwesenheit eines peptidischen Linkers zwischen den hydrophobischen und den NLS-Sequenzen
4. Beinhalten einer reaktiven funktionellen Gruppe am C-Terminus um Reporter-moleküle anbinden zu können.

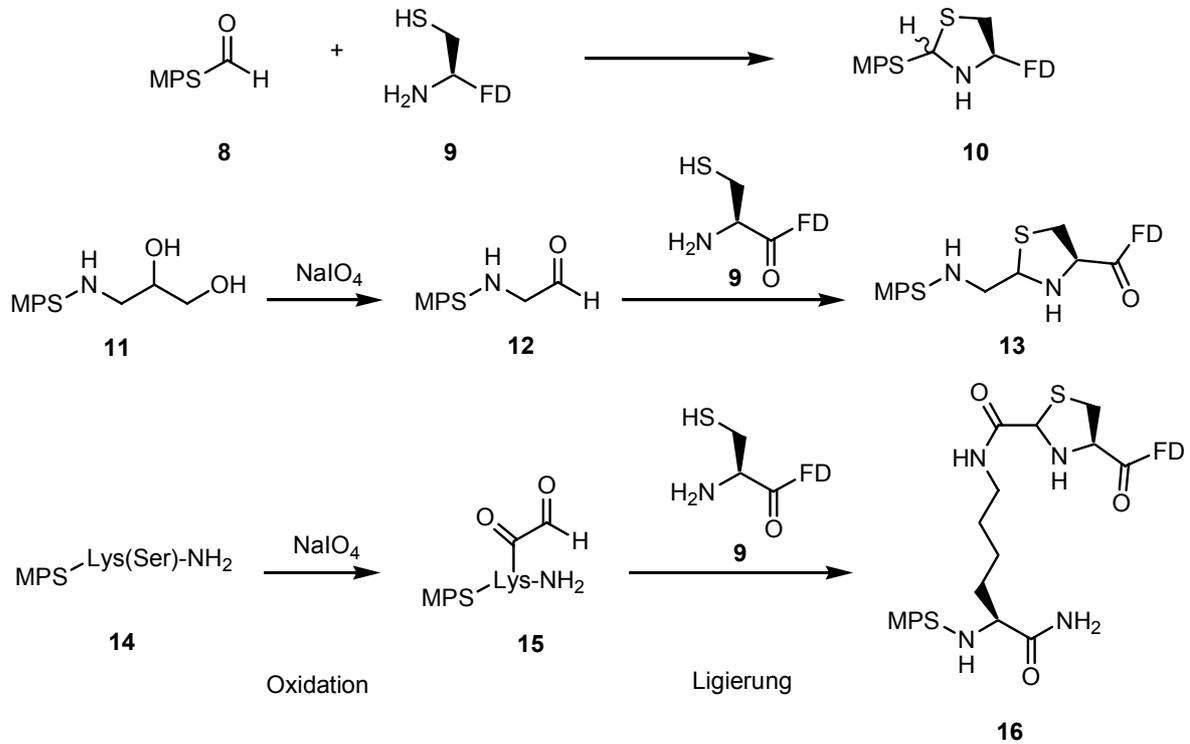
Mit diesen Kriterien wählten sie 2 unterschiedliche Sequenzen für den Membrandurchtritt aus. Auf der einen Seite die Signalsequenz von *caiman crocodylus* Ig(v): Met-Gly-Leu-Gly-Leu-His-Leu-Leu-Val-Ala-Ala-Ala-Leu-Gln-Gly-Ala und auf der anderen Seite eine Sequenz aus gp41, bei der der Phenylrest an Position 7 durch ein Tryptophan ersetzt wurde: Gly-Ala-Leu-Phe-Leu-Trp-Leu-Gly-Ala-Ser-Thr-Met-Gly-Ala. Als NLS-Sequenz selektierten sie die Sequenz aus SV40, eine kurze, basenreiche Sequenz: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Als funktionelle Gruppe wurde am C-Terminus ein Cysteamin (Cya) eingeführt. Um die Rolle der unterschiedlichen Sequenzen zu verstehen, wurden aus diesen Peptiden neun unterschiedliche Peptidkonjugate synthetisiert, wobei Teilsequenzen teilweise modifiziert oder weggelassen wurden.

Peptidkonjugate	Lokalisation
1. Ac-G-A-L-F-L-G-W-L-G-A-A-G-S-T-M-G-A-W-S-Q-P-K-K-K-R-K-V-Cya	Kern+Membran
2. Ac-G-A-L-F-L-G-W-L-G-A-A-G-S-T-M-G-A----R-----K-K-K-R-K-V-Cya	Membran
3. Ac-M-G-L-G-L-H-L-L-V--L-A-A-A--L-Q-G-A-W-S-Q-P-K-K-K-R-K-V-Cya	hptsI. Kern
3a. Biot.	
4. Ac- M-G-L-G-L-H-L-L-V--L-A-A-A--L-Q-G-A-----K-K-K-R-K-V-Cya	diffus
4a. Biot.	
5. Ac-M-G-L-G-L-H-L-L----L-A-A-A--L-Q-G-A-----K-K-K-R-K-V-Cya	
6. Ac- M-G-L-G-L-H-L-L-V--L-A-A-A--L-Q-G-A-----K-S-K-R-K-V-Cya	
6a. Biot.	

**Tabelle 3:** Von Heitz synthetisierte Peptidkonjugate (Cya = Cysteamin).

Der N-terminale Teil ist jeweils von der MPS und der C-terminale Teil von der NLS abgeleitet. Die Studien zeigten, dass diese Konjugate als Transporter verwendet werden können. Mit Hilfe dieser Peptidkonjugate konnte z. B. ein Antisense-Oligonukleotid in Zellen eingeschleust werden.

Unabhängig davon entwickelten Tam und Hawiger eigene zellpermeable Konjugate.<sup>[38,39]</sup> Durch eine spezifische Ligierung von zwei Peptidmodulen, einer membranpermeablen Sequenz und einer funktionellen Domäne konnten biologisch aktive Konjugate hergestellt werden.



**Schema 1:** Thiazolidin-Verknüpfung.

Die Verknüpfung ergibt sich aus einem C-terminalen Aldehyd der MPS (**8**) und aus einem N-terminalen Cystein der funktionellen Domäne (**9**). Die Verknüpfung wurde erreicht durch die Umsetzung von stöchiometrischen Mengen der vollständig ungeschützten MPS und dem funktionalen Peptid in einem wässrigen Puffer, wobei eine weitere Aufreinigung oder chemische Manipulation für die biologischen Assays unnötig war. Es wurden zwei unterschiedliche membranpermeable Sequenzen mit unterschiedlichen funktionellen Peptiden verknüpft.

In den anschließenden biologischen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Konstrukte (**13/16**) in Zellen eingeschleust werden. Desweiteren war die voll-

ständige Funktionalität der Peptide gewährleistet. In Kombination mit einer NLS konnte das Konstrukt zusätzlich im Zellkern lokalisiert werden.

Im allgemeinen konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Import von diesen MPS beinhaltenden Konjugaten konzentrations- bzw. temperaturabhängig ist. Allerdings ist der Import unabhängig vom Zelltyp.

Auch in anderen Fällen wurden membranpenetrierende lipophile Peptide erfolgreich als Internalisierungsvektoren für andere Peptide und Antisensenukleotide verwendet. Es existieren noch andere Beispiele, bei denen Peptide, welche eine Kernlokalisierungssequenz beinhalten, in den Zellkern eingeführt werden konnten. Durch die Verwendung anderer Lokalisierungssequenzen konnten auch DNA-Fragmente z. B. in Mitochondrien eingeschleust werden.<sup>[40]</sup>

Der Nachteil dieser Konstrukte ist die in allen Fällen kovalente Verknüpfung zwischen der membranpenetrierenden Sequenz respektive der Kernlokalisierungssequenz und dem zu transportierenden Protein beziehungsweise Oligonukleotid. Zwar konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Sequenzen (MPS, NLS) die Funktionalität teilweise nicht stören, doch ist dies nicht auszuschließen, vorallem wenn DNA in den Zellkern eingeschleust und transkribiert werden soll. Es wäre weiterhin wünschenswert auch kleinere Inhibitoren oder Reportermoleküle in Zellen einzuschleusen, dafür müssten diese aber in der Zelle von dem Transportermolekül freigesetzt werden.

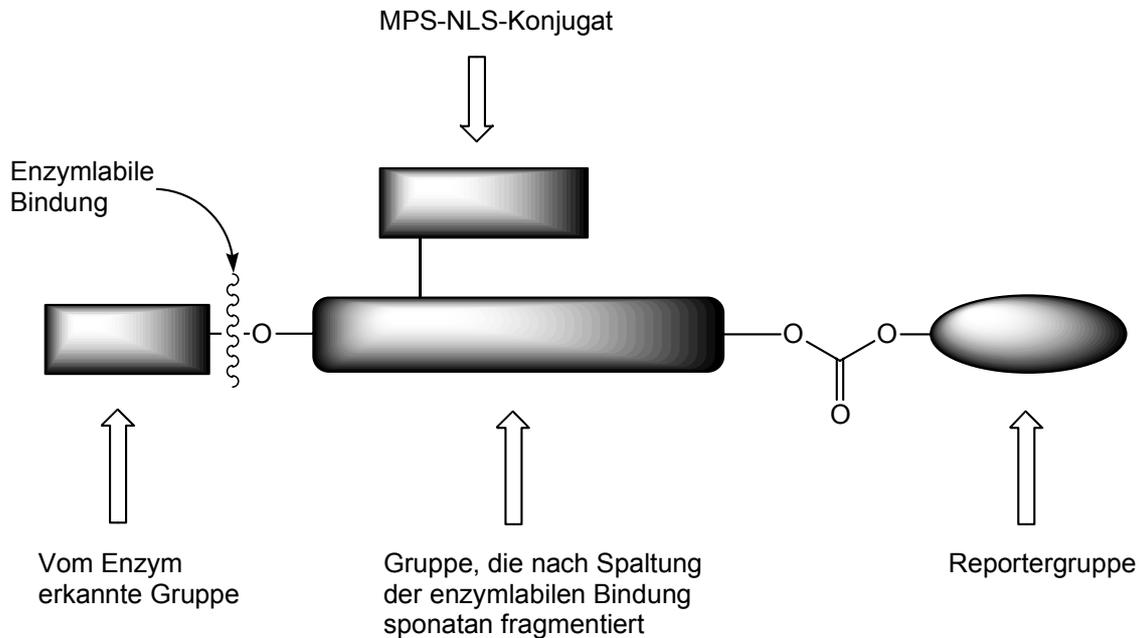
## **2.4. Enzymlabile Linker**

Um nichtpeptidische Moleküle und kleine Oligonukleotide durch Ausnutzung von natürlichen Transportmechanismen in Zellen beziehungsweise den Zellkern einzuschleusen muss ein Linker entwickelt werden, der unter physiologischen Bedingungen gespalten wird.

Ein solcher Linker müsste einige Eigenschaften mitbringen, um die an ihn gestellte Aufgabe erfüllen zu können. Die erste geforderte Eigenschaft ist die Existenz einer funktionellen Gruppe die ein Biokatalysator erkennen und angreifen kann. Die zweite wichtige Eigenschaft ist die spontane Fragmentierung, die, ausgelöst durch die Spaltung der funktionellen Gruppe, die Freisetzung des Reportermoleküls zur

Folge hat. Die dritte Eigenschaft ist eine Anknüpfungsstelle für die Membranpermeabilitäts- beziehungsweise Kernlokalisierungssequenz, die für die Translokation in die Zelle und den Zellkern verantwortlich ist.

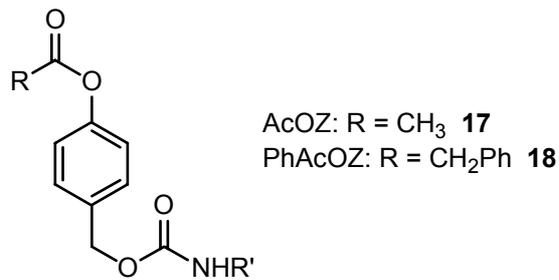
Damit ergäbe sich folgender schematischer Aufbau für ein derartiges Transfer-system.



**Abbildung 4:** Schematischer Aufbau eines „chemischen Vektors“.

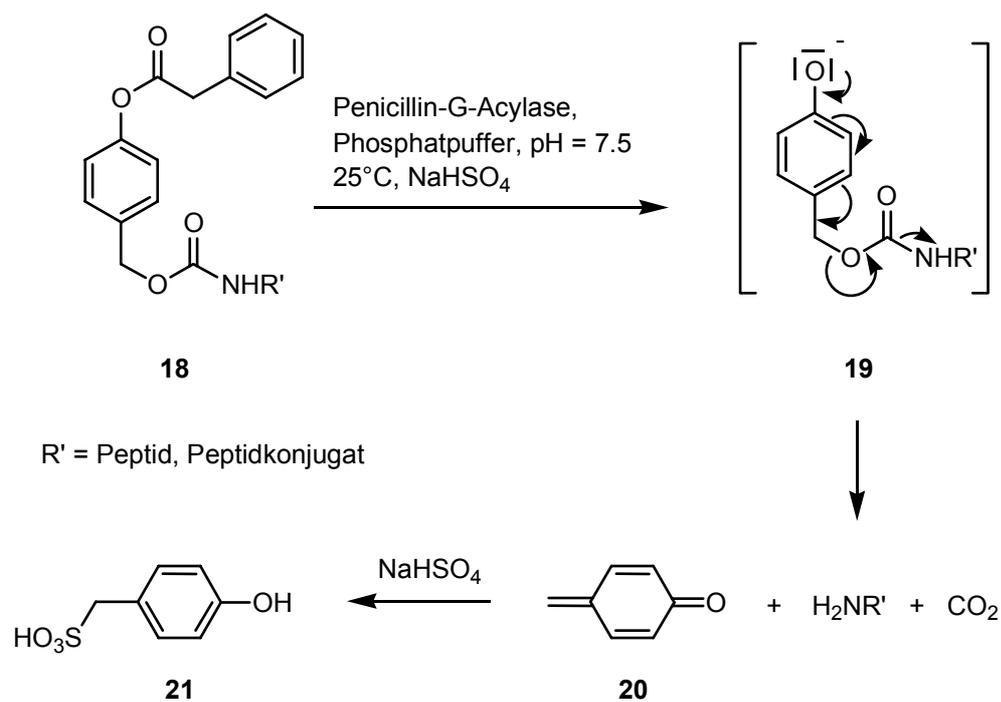
Als erkennbare, spaltbare Gruppen kämen z.B. Ester (Phosphate oder Glucoside) in Frage, welche von einer Esterase (beziehungsweise Phosphatase oder Glycosidase) gespalten werden. So wird zum Beispiel ein Acetylester von unterschiedlichen Lipasen, Esterasen und unter anderem auch von der Acetylcholinesterase gespalten.

In früheren Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe Waldmann enzymlabile Schutzgruppen für die Peptidsynthese entwickelt. Sie boten die Möglichkeit unter sehr milden Bedingungen und orthogonal zu anderen Schutzgruppen N-Termini sowie C-Termini zu deblockieren. Als erkennbare Gruppen wurden der Acetyl- und der Phenylacetylrest verwendet. Daraus resultierten als Urethanschutzgruppen die Acetoxybenzyloxycarbonyl- (AcOZ-) (**17**)<sup>[41,42]</sup> und die Phenylacetoxybenzyloxycarbonyl- (PhAcOZ-) (**18**)<sup>[43]</sup> Schutzgruppe (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Die enzymlabile AcOZ- (**17**) und PhAcOZ-Schutzgruppe (**18**).

Beide Schutzgruppen können unter sehr milden Bedingungen abgespalten werden. Die PhAcOZ-Schutzgruppe (**18**) zum Beispiel kann durch die Behandlung des geschützten Peptides mit dem Enzym Penicillin-G-Acylase in einem Phosphat-Puffer bei  $\text{pH} = 7.5$  und  $25^\circ\text{C}$  gespalten werden (Schema 2).

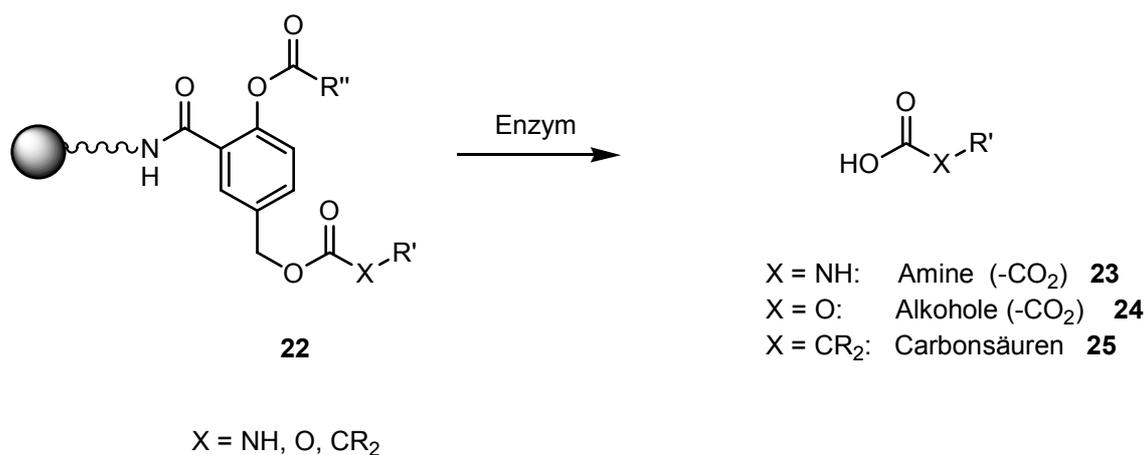


**Schema 2:** Spaltung und Fragmentierung der PhAcOZ-Schutzgruppe (**18**).

Nach Spaltung der enzymlabilen Esterbindung fragmentiert das p-Hydroxy-benzylurethan (**19**) spontan und setzt ein Carbaminsäurederivat frei. Dieses decarboxyliert, und es entsteht das entsprechende Peptidkonjugat. Das intermediär ge-

bildete Chinonmethid (**20**) wird in diesem Fall von Natriumhydrogensulfit unter Bildung der entsprechenden Sulfonsäure (**21**) abgefangen (Schema 2).

Die Weiterentwicklung dieser enzymatisch spaltbaren Schutzgruppe führte zu einem Festphasenlinker (**22**), welcher ebenfalls unter den schon oben beschriebenen Bedingungen gespalten werden kann.<sup>[44]</sup> Der Festphasenlinker musste, im Gegensatz zur Schutzgruppe, eine weitere funktionelle Gruppe mit sich bringen um eine Anknüpfungsstelle für das feste Trägermaterial zu haben.



**Schema 3:** Enzymlabiler Festphasenlinker (**22**).

Dabei können Amine (**23**) als Urethane, Alkohole (**24**) als Carbonate und Säuren (**25**) als Ester angebunden, modifiziert und abgespalten werden.

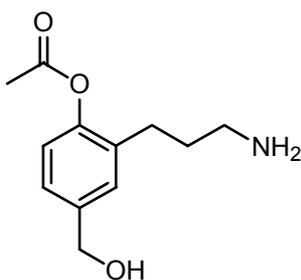
Dieser Linker bringt somit alle oben aufgeführten Eigenschaften, erkennbare Gruppe für einen Biokatalysator, spontane Fragmentierung nach der Spaltung und eine Anknüpfungsstelle für die MPS-NLS-Sequenzen, mit. Aufgrund dieser Tatsache sollte dieser Linker weiterentwickelt werden, um damit die zentrale Einheit eines chemischen Vektors zur Translokation von Reportergruppen zu erhalten.

### 3. Aufgabenstellung

Die Entwicklung neuer Transportsysteme würde eine gezieltere Manipulation zellulärer Abläufe ermöglichen. Vorhandene Transportsysteme hingegen, wie z.B. Viren, besitzen eine Reihe von Nachteilen, wie die mögliche Immunantwort bei mehrfacher Gabe. Dagegen bietet die Ausnutzung natürlich vorhandener Transportwege und Adressierung sicherlich das größte Potential, Fracht unterschiedlichster Art effektiv und selektiv in bestimmte Zellen beziehungsweise Zellkompartimente einzuschleusen.

Bisher ist die Ausnutzung natürlicher Transportmechanismen dadurch limitiert, daß die entsprechenden Signalsequenzen aufgrund der kovalenten Verknüpfung am Molekül verbleiben, so daß auf diese Art und Weise keine kleineren Moleküle translokiert werden können beziehungsweise die Funktionalität der transportierten Proteine, Oligonukleotide gestört werden kann.

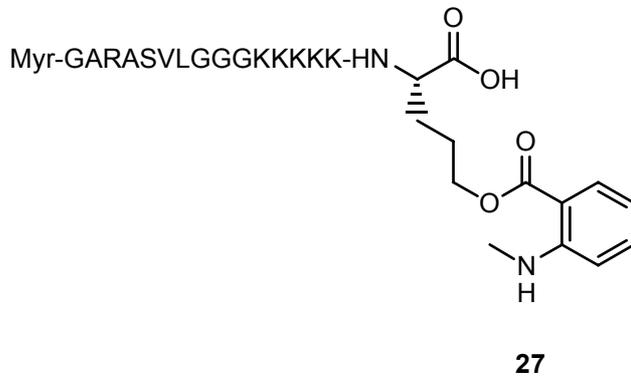
Darum sollte in einem Teil dieser Arbeit ein Linker entwickelt werden, welcher in der Zelle das zu transportierende Molekül unter physiologischen Bedingungen freisetzt. Dieser Linker sollte weiterhin unter Ausnutzung natürlicher Transportmechanismen mittels Adress-Sequenzen einen gezielten Transport in Zellen und Zellkompartimente ermöglichen. Das Linkersegment (**26**) ist der zentrale Baustein eines chemischen Vektors (Abbildung 6).



**26**

**Abbildung 6:** Darstellung des Linkersegments (**26**) des chemischen Vektors.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte ein MPS-NLS-Konjugat (**27**) an der festen Phase aufgebaut werden (Abbildung 7). Durch Fluoreszenzmarkierung sollte seine Funktionalität als Adress-Sequenz überprüft werden.



**Abbildung 7:** Fluoreszenzmarkiertes MPS-NLS-Konjugat (**27**).

Die Synthesestrategie war dabei so gewählt, dass eine spätere direkte Verknüpfung des Linkers mit dem Peptid an der festen Phase möglich ist.

Anschließend biologische Untersuchungen sollten die Eigenschaften des Peptidkonjugates (**27**) überprüfen, um die Anwendbarkeit als Adress-Sequenz für einen chemischen Vektor zu belegen.

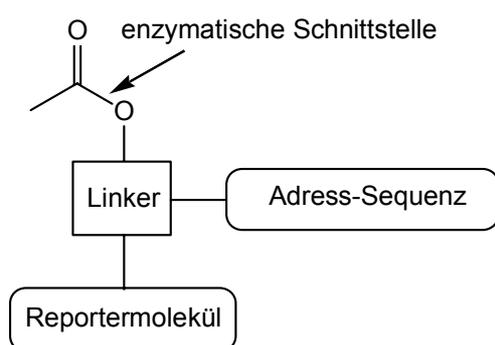
## 4. Spezieller Teil

### 4.1. Aufbau des Linkerderivats

#### 4.1.1. Spaltung und Fragmentierung

Selektivität ist unter anderem bei Schutzgruppen eine zentrale Frage. In früheren Arbeiten wurde ein Linker entwickelt, der für den Einsatz am festen Träger konzipiert war. Dabei wurde ein System in Betrachtung gezogen, welches nach einer enzymatischen Behandlung des Trägerharzes das am festen Träger synthetisierte Molekül freisetzt. Aufgrund der Eigenschaften, enzymatische Spaltung und anschließender Fragmentierung des Linkers sollte dieser für den Zweck, als Verknüpfungseinheit in einem chemischen Vektor zu dienen, weiterentwickelt werden. Besonders wichtig bei der Entwicklung einer Verknüpfungseinheit, welche unter physiologischen Bedingungen spaltbar sein soll, ist ihre intrinsische Labilität.

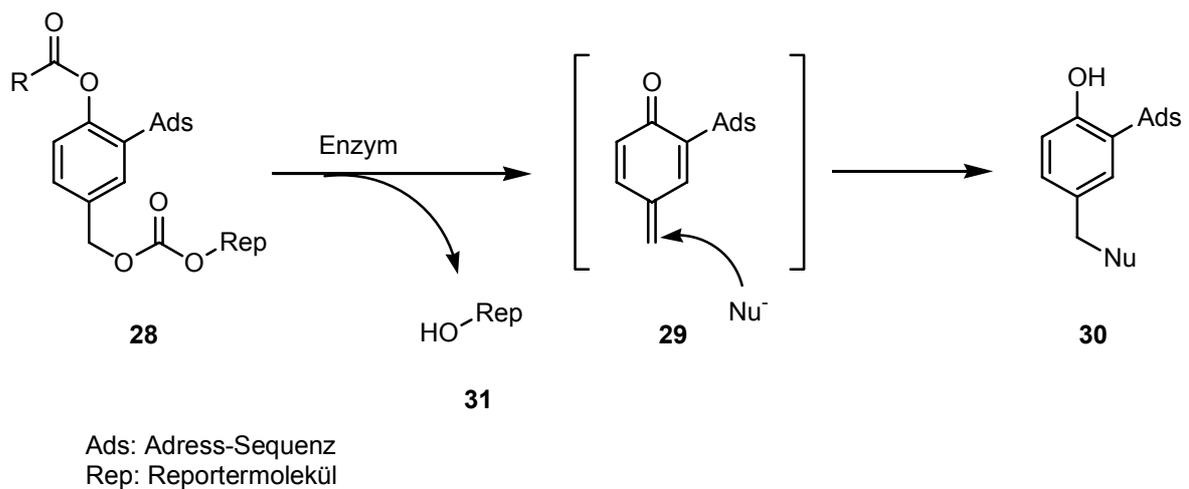
Die Spaltung von Bindungen unter physiologischen Bedingungen ist entweder auf enzymatischem Wege oder unspezifisch möglich. Das heißt, eine wichtige Voraussetzung ist eine enzymlabile spaltbare Bindung, welche nach der Spaltung eine spontane Fragmentierung auslöst, die das transportierte Molekül freisetzt (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des chemischen Vektors.

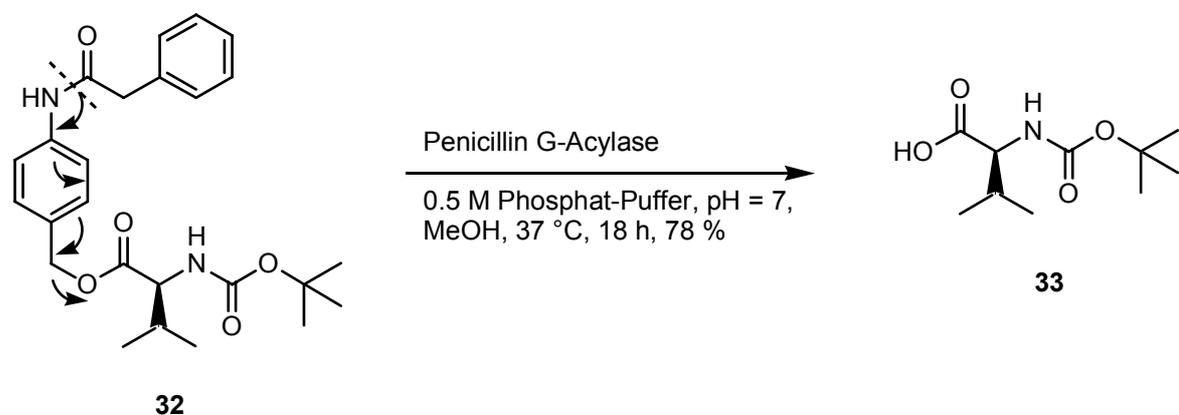
Mit Hilfe der Adress-Sequenz soll der Vektor durch spontanen Transfer durch die Zellmembran in die Zelle gebracht werden. Dort angelangt wird er durch Ausnutzen aktiver Transportsysteme weiter in den Zellkern geschleust.

Wie schon in Kapitel 2.3 beschrieben, kann durch die mild durchführbare Spaltung der enzymlabilen Bindung die Fragmentierung ausgelöst werden.<sup>[45]</sup> Das dabei intermediär gebildete Chinonmethid (**29**) wird von Nucleophilen abgefangen und so das Reportermolekül (**31**) wieder freigesetzt (Schema 4).



**Schema 4:** Spaltung mit anschließender Fragmentierung.

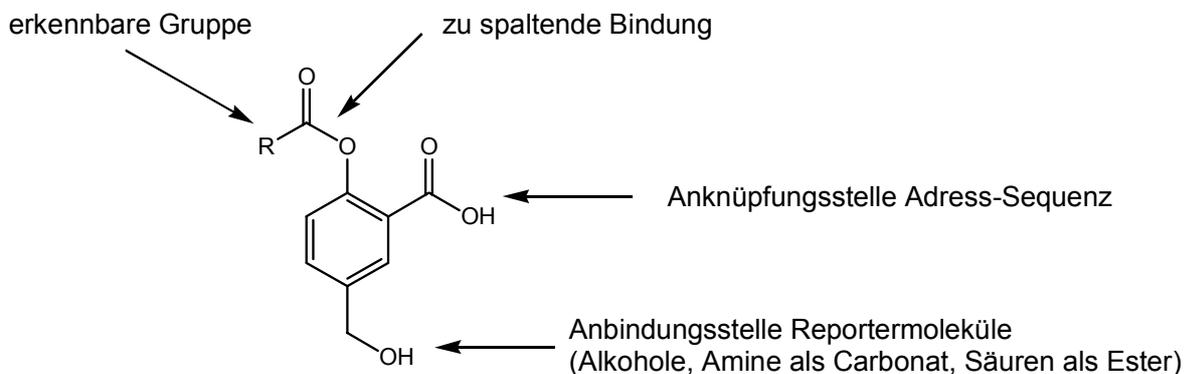
Die Spaltung kann hierbei nicht nur bei phenolischen Derivaten, sondern auch bei anilinischen Derivaten erfolgen (Schema 5).<sup>[46,47]</sup>



**Schema 5:** Spaltung eines Anilinderivates.

Das Anilinderivat (**32**) wurde in einem mit 10-20% Methanol als Löslichkeitsvermittler versetzten Phosphat-Puffer mit Penicillin G-Acylase behandelt. Die Penicillin G-Acylase erkennt die Phenyllessigsäure und spaltet die Amidbindung selektiv. Nach 18 h bei 37 °C wurde das Enzym abgetrennt und die Pufferlösung extrahiert. Dabei konnte das abgespaltene Boc-L-Valin (**33**) mit Ausbeuten >75 % isoliert werden. Analog zu den enzymlabilen Schutzgruppen für den N-Terminus existiert für den C-Terminus der PAOB-Ester, welcher sich ebenfalls mit der Penicillin G-Acylase spalten lässt.<sup>[42a]</sup>

Für den Aufbau des Modells eines „chemischen Vektors“ wurde zuerst ein Phenol-derivat gewählt (Abbildung 9).



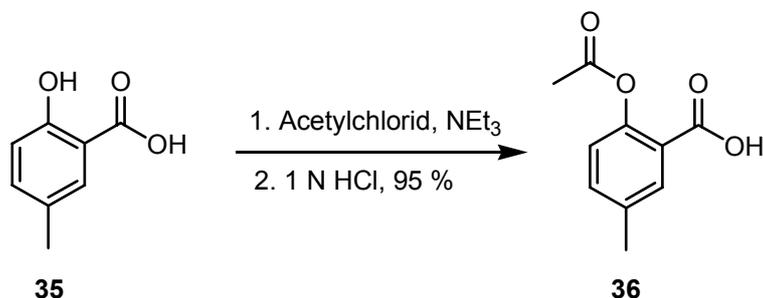
**Abbildung 9:** Modell eines chemischen Vektors.

Als erstes wurde versucht ein Salicylsäurederivat so zu modifizieren, dass es als Linkersegment eingesetzt werden kann.

#### 4.1.2. Synthese von 2-Acetoxy-5-hydroxymethylbenzoesäure

Als Ausgangssubstanz wurde die käufliche p-Kresotinsäure (5-Methylsalicylsäure) (**35**) eingesetzt. Die Bildung von 2-Acetoxy-5-methylsalicylsäure (**36**) gelang durch Veresterung der Methylsalicylsäure mit Acetylchlorid (Schema 6). Das zwischenzeitlich gebildete gemischte Anhydrid konnte durch verdünnte Salzsäure gespalten

werden. Nach Umkristallisation erhält man das acetylierte Produkt in 95 % Ausbeute.

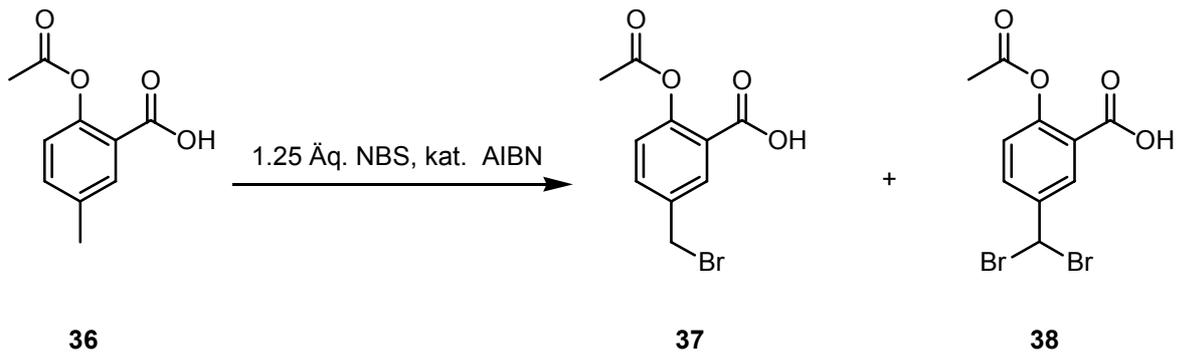


**Schema 6:** Synthese von 2-Acetoxy-5-methylsalicylsäure (**36**).

Für die spätere Umsetzung von 2-Acetoxy-5-hydroxymethylsalicylsäure (**34**) mit Phosgen zum resultierenden Chlorameisensäureester (**37**) musste der Methylsubstituent am Aromaten in eine Hydroxymethylgruppe überführt werden. Der labile Chlorameisensäureester (**37**) wird benötigt um das Reportermolekül, sofern Alkohole beziehungsweise Amine angeknüpft werden sollen, bei der Fragmentierung freizusetzen. Die Bruchstelle kann aber auch von der Seite des Reportermoleküls mitgebracht werden. Die Anbindung von Säuren als Ester hingegen kann direkt erfolgen, da dabei eine „Abgangsgruppe“ erzeugt wird.

Da eine direkte Einführung der Hydroxygruppe aufgrund der Labilität der Esterfunktion im Molekül nicht direkt möglich war, wurde in Benzylposition zuerst bromiert und dann in die Hydroxyfunktion überführt.

Die Bromierung erfolgte radikalisch mit N-Bromsuccinimid (NBS) und N, N'-Azodiisobutyronitril (AIBN) als Radikalstarter (Schema 7). Neben 60 % Produkt (**38**) entstanden noch 25 % dibromiertes Nebenprodukt (**39**) was auf die geringe Selektivität dieser Radikalreaktion zurückzuführen ist. Bei verkürzten Reaktionszeiten oder niedrigeren Temperaturen wurde weniger Nebenprodukt (**39**) generiert, aber die Ausbeute am gewünschten Produkt (**38**) war ebenfalls geringer. Auf eine Separierung der beiden Bromverbindungen wurde verzichtet, da in der nächsten Synthesestufe die Aufreinigung leichter zu bewerkstelligen war.

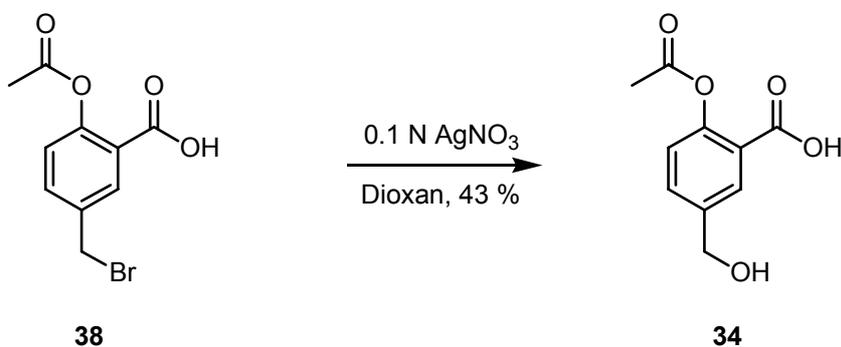


**Schema 7:** Bromierung von 2-Acetoxy-5-methylsalicylsäure (**36**).

Für die Überführung der Brommethylgruppe in die Hydroxymethylgruppe von 2-Acetoxy-5-hydroxymethylsalicylsäure (**34**) wurde das Produktgemisch aus der vorhergehenden Stufe eingesetzt.

Da es sich bei der nukleophilen Substitution eines Bromatoms durch eine Hydroxygruppe um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, wurden die Bedingungen so gewählt, dass das Gleichgewicht in die gewünschte Richtung verschoben wird. Dies gelang durch die Umsetzung der 2-Acetoxy-5-bromomethylsalicylsäure (**38**) mit wässriger AgNO<sub>3</sub>-Lösung in Dioxan.

Das Silberkation abstrahiert ein Bromidanion und bildet das schwerlösliche Silberbromid, welches ausfällt. Dadurch wurde es der Reaktion entzogen und sollte somit das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschieben. Das gebildete Benzylkation konnte mit dem schwachen Nucleophil Wasser zum gewünschten Produkt 2-Acetoxy-5-hydroxymethylsalicylsäure (**34**) reagieren (Schema 8).



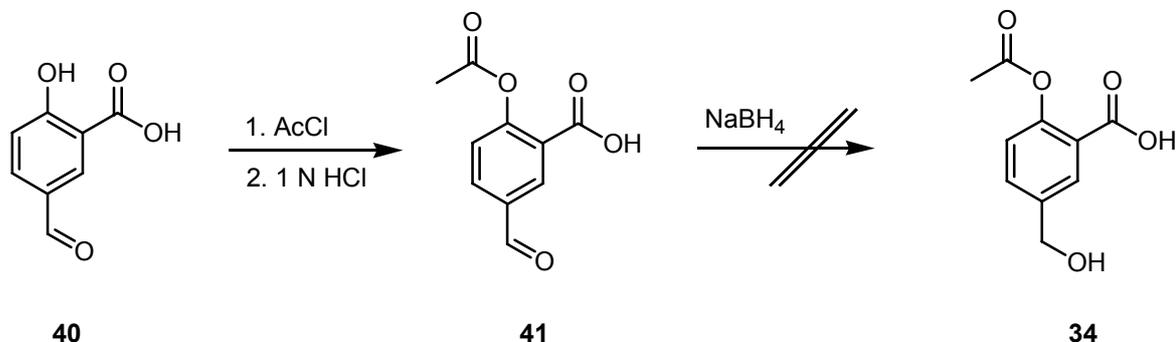
**Schema 8:** Hydroxylierung der Bromverbindung.

Die Standardbedingungen, um ein Halogenatom durch eine Hydroxyfunktion zu substituieren, fanden in diesem Fall keine Anwendung, da die basischen Bedingungen die Spaltung des aktiven Phenolesters herbeiführten.

Die Ausbeute von 43 % ist aufgrund von Nebenreaktionen sowie nicht umgesetztem Edukt nicht befriedigend. Da die beiden Stufen der Bromierung und der anschließende Austausch zur Hydroxyfunktion nur sehr schlechte Ausbeuten lieferten, wurde ein anderer Syntheseweg gesucht.

Diese modifizierte Synthesestrategie begann mit 5-Formylsalicylsäure (**40**) als Ausgangsverbindung. Diese ließ sich unter analogen Bedingungen, wie bei der Synthese von 2-Acetoxy-5-methylsalicylsäure (**36**), mit Acetylchlorid an der phenolischen Hydroxyfunktion verestern (Schema 9).

Anschließend sollte die Aldehydfunktion der 2-Acetoxy-5-formylsalicylsäure (**41**) durch  $\text{NaBH}_4$  selektiv reduziert werden (Schema 9). Dies war nicht möglich, da entweder keine Reaktion stattfand oder nur der reaktive Phenolester (**41**) gespalten wurde. Stärkere Reduktionsmittel führten ebenfalls zur Totalreduktion.

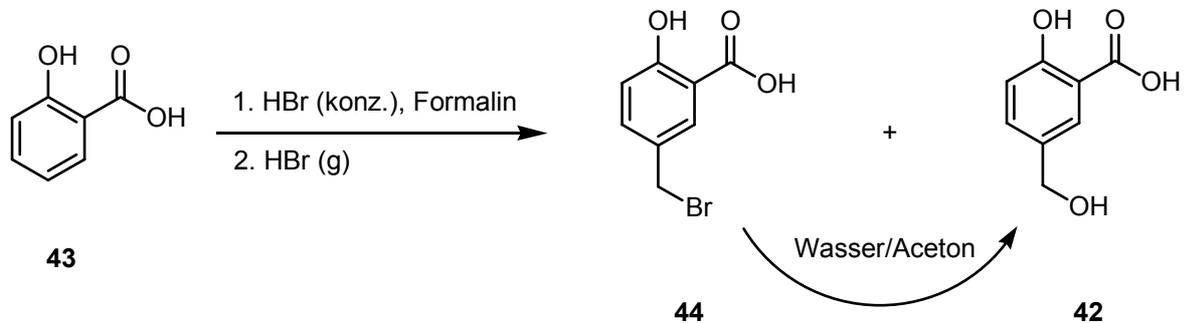


**Schema 9:** modifizierte Synthesestrategie.

#### 4.1.3. Alternative Syntheseroute für 2-Acetoxy-5-hydroxymethylbenzoesäure

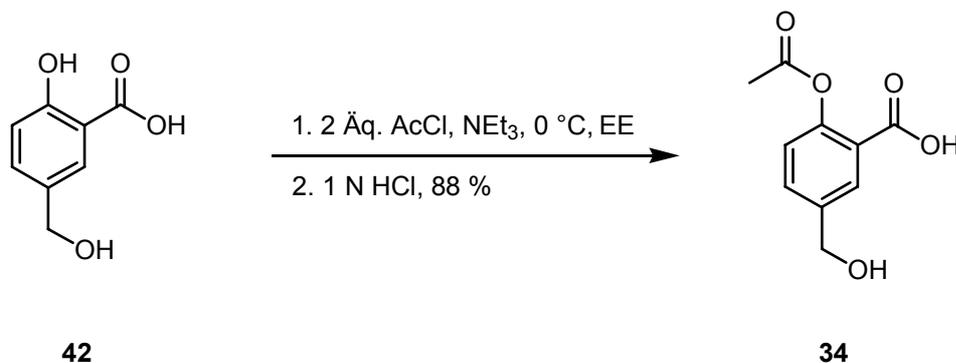
Eine weitere Möglichkeit, 2-Hydroxy-5-hydroxymethylsalicylsäure (**42**) darzustellen, war die Brommethylierung<sup>[48-50]</sup> von Salicylsäure (**43**) mit anschließender Hydrolyse (Schema 10). Die Brommethylierung von Salicylsäure ließ sich durch die Umsetzung mit Formalin in konzentrierter Bromwasserstoffsäure und drei-

stündigem Einleiten von Bromwasserstoff durchführen. Nach Abfiltrieren des Niederschlags und Umkristallisation aus Dichlorethan wurden das gewünschte Produkt (**44**), sowie die Hydroxyverbindung (**45**) erhalten.



**Schema 10:** Darstellung von 5-Bromomethyl-2-hydroxybenzoesäure (**44**).

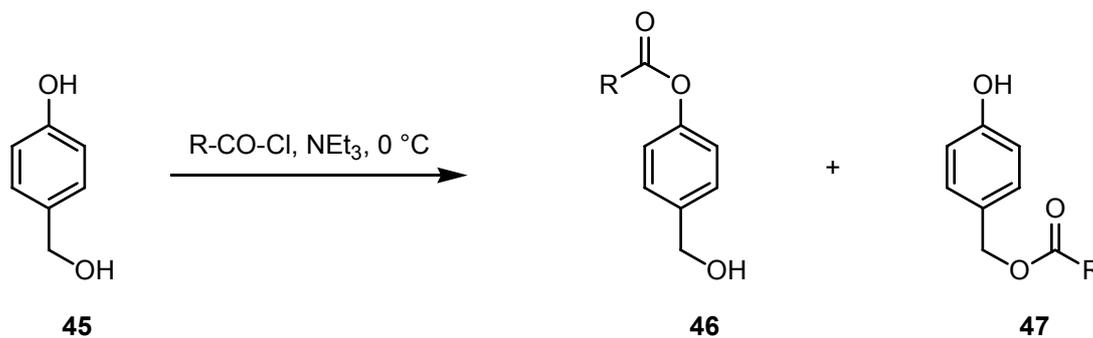
Die Bromverbindung (**44**) ließ sich durch Reaktion in einem Gemisch aus Wasser und Aceton in die 2-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoesäure (**42**) überführen. Die Umsetzung zur 2-Acetoxy-5-hydroxymethylsalicylsäure (**34**) ließ sich wiederum mit Acetylchlorid und Triethylamin als Base mit 88 % Ausbeute erreichen (Schema 11).



**Schema 11:** Selektive Acetylierung der phenolischen OH-Funktion.

Die Differenzierung zwischen der phenolischen und der benzylicischen Hydroxyfunktion ist abhängig von der Sterik und der Nukleophilie der beiden OH-Funktionen. Die Umsetzung mit Acetylchlorid lieferte fast ausschließlich das an der phenolischen Hydroxyfunktion veresterte Produkt (**46**). Wurde statt des Acetylchlorids das sterisch anspruchsvollere Phenylacetylchlorid eingesetzt, entstand

unter gleichen Bedingungen ein Produktgemisch, wobei die an der benzylicchen Position veresterte Verbindung das Hauptprodukt (**47**) darstellt (Schema 12).



R: sterisch anspruchsvoll, z.B. PhAcCl

NP

HP

R: weniger sterisch anspruchsvoll, z. B. AcCl

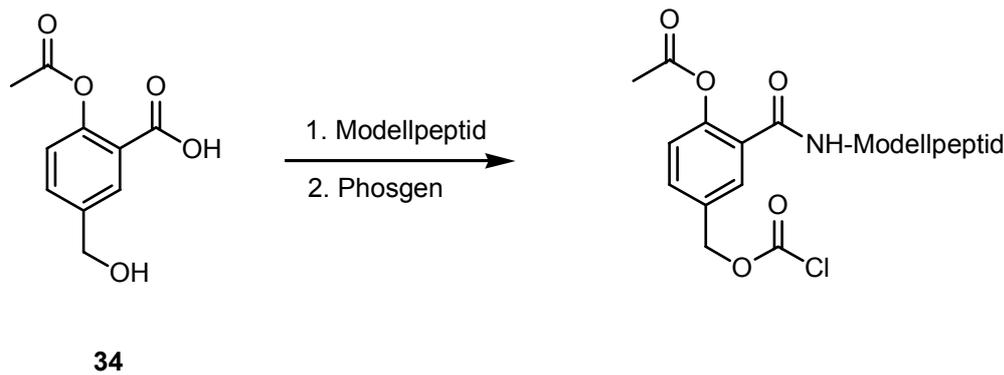
HP

NP

**Schema 12:** Differenzierung zwischen phenolischer und benzylicher Hydroxyfunktion.

Eine Strategie, zuerst die benzylicche Funktion mit einer sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe wie z. B. der *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe zu blockieren, um dann sterisch anspruchsvolle Reste mit der phenolischen OH-Funktion umzusetzen, konnte hier nicht angewandt werden. Da die geschützte benzylicche Hydroxygruppe eine gute Abgangsgruppe darstellt, führt die Deprotonierung der phenolischen OH-Funktion aufgrund der intrinsischen Labilität zur direkten Fragmentierung des Moleküls.

Bevor die Hydroxymethylgruppe mit Phosgen in den Chlorameisensäureester (**37**) überführt beziehungsweise ein Reportermolekül angeknüpft werden konnte, wurde versucht an die Säurefunktion des Linkers (**34**) ein Modellpeptid zu kuppeln. Überführt man den Linker (**34**) zuerst in den Chlorameisensäureester (**37**) ist eine selektive Anknüpfung eines Peptids an die Säurefunktion nicht mehr möglich (Schema 13).



**Schema 13:** Syntheseplanung eines Modells für einen chemischen Vektor.

Damit wird auch ein bausteinartiger Charakter des chemischen Vektors ermöglicht. Das heißt, Linker und Adress-Sequenz und natürlich auch das Reporter-molekül werden getrennt aufgebaut und erst am Ende der Synthese miteinander verknüpft. Dieser bausteinartige Aufbau bietet bessere Möglichkeiten bei der Variation von Adress-Sequenzen, enzymlabilen Gruppen und Reporter-molekülen. Als Modell für ein MPS-NLS-Konjugat wurde ein Tetrapeptid aus Leucin gewählt.

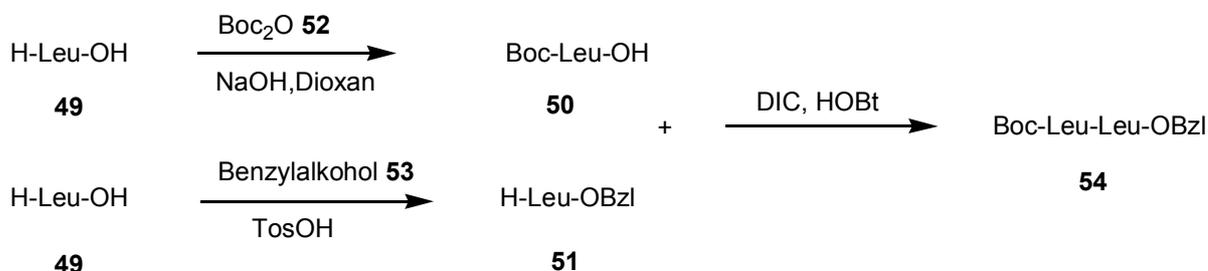
#### 4.1.4. Darstellung des Modellpeptides

Das Modelltetrapeptid soll den sterischen Anspruch einer Signalsequenz für die enzymatische Spaltung des in weiteren Arbeiten vollständig zu synthetisierenden chemischen Vektors simulieren. Als Tetrapeptid wurde (*L*-Leu)<sub>3</sub>-*L*-Leucin-O-Bzl (**48**) gewählt, da es sich bei Leucin (**49**) um eine sterisch anspruchsvolle, hydrophobe Aminosäure handelt, die außerdem, wie in Abschnitt 2.3.2 erwähnt, in vielen Signalsequenzen als (Leu)<sub>2</sub> oder (Leu)<sub>3</sub> vorkommt.

Für die Synthese des Tetrapeptids (**48**) wurde durchgängig als N-terminaler Schutz die *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc-) Gruppe und auf der C-terminalen Seite der zur Boc-Gruppe orthogonale Benzylester verwendet.

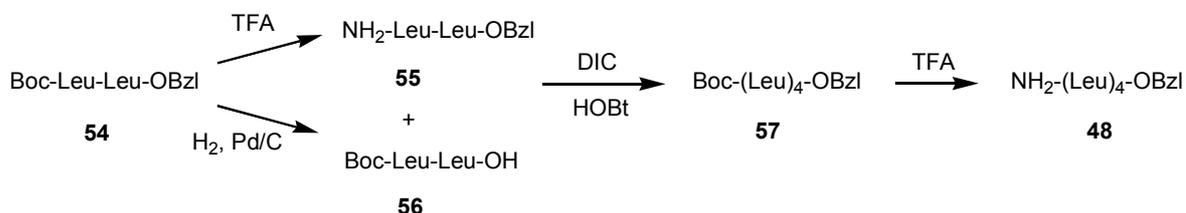
Die Einführung der *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde durch die Schotten-Baumann-Methode realisiert (Schema 14).<sup>[51]</sup> Die C-terminale Blockierung der Aminosäure (**49**) als Benzylester wurde über die gängige Methode der säurekatalysierten azeotropen Veresterung mit Benzylalkohol erreicht. Die beiden ge-

geschützten Aminosäurederivate (**50**) und (**51**) dienten als Bausteine für die Synthese des Dipeptides (**54**). Die Kupplung wurde nach der Carbodiimid-Methode mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) durchgeführt.



**Schema 14:** Aufbau des geschützten Dipeptides (**54**).

Für die weitere Synthese zum Tetrapeptid (**57**) war es notwendig das Dipeptid einmal auf der N-terminalen und einmal auf der C-terminalen Seite zu entschützen und die so erhaltenen einseitig geschützten Dipeptide (**55,56**) zum Zieltetrapeptid (**48**) zu verknüpfen (Schema 15).



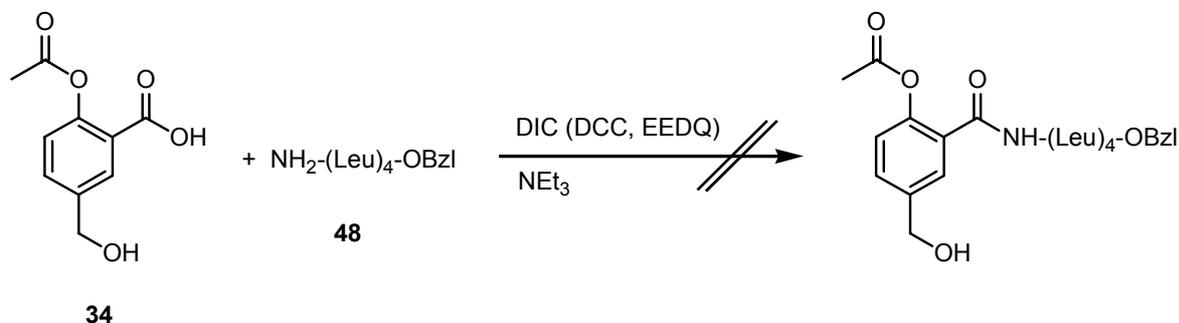
**Schema 15:** Synthese des Tetrapeptides (**48**).

Die Deblockierung der Aminofunktion konnte durch acidolytische Spaltung mit Trifluoressigsäure erreicht werden. Ebenfalls in quantitativer Ausbeute gelang die C-terminale Entschützung durch katalytische Hydrogenolyse mit Palladium auf Kohle. In beiden Fällen war die Reinigung leicht, da alle Nebenprodukte leicht entfernbar waren. Die Synthese des Tetrapeptides (**57**) erfolgte analog zur Dipeptidknüpfung nach der DIC/HOBt-Methode (Schema 15). Die Ausbeute ist mit 90 % sehr zufriedenstellend.

Für die spätere Anknüpfung des Modellpeptids (**48**) an den enzymlabilen Linker (**34**) wurde der freie N-Terminus benötigt. Die Deblockierung der Aminofunktion von *N-tert*-Butyl-(*L*-Leu)<sub>3</sub>-*L*-leucinbenzylester (**57**) kann analog zur Entschützung des Dipeptids (**54**) durch acidolytische Spaltung mit Trifluoressigsäure in quantitativer Ausbeute erreicht werden (Schema 15), was zu einer Gesamtausbeute bei der Darstellung des N-terminal freien Tetrapeptids (**48**) von 66 % führte.

#### 4.1.5. Versuche zur Verknüpfung von Linker und Modellpeptid

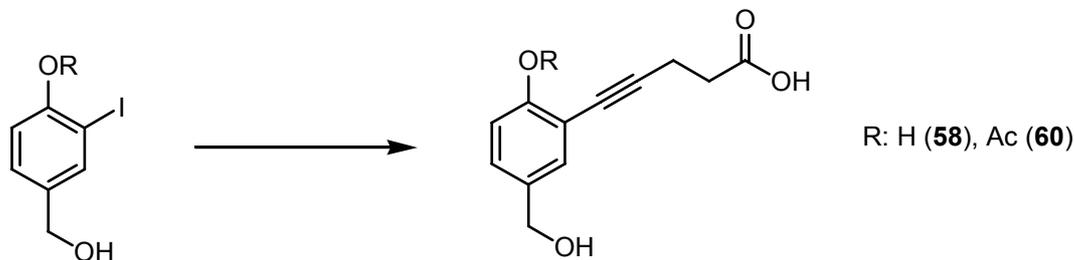
Die Verknüpfung des synthetisierten, N-terminal freien Tetrapeptids (**48**) mit 2-Acetoxy-5-hydroxymethylsalicylsäure (**34**) konnte nicht realisiert werden (Schema 16). Bei Versuchen die Kupplung mit Carbodiimiden oder anderen Kupplungsreagentien und 1-Hydroxybenzotriazol durchzuführen, konnte anhand des NMR-Spektrums entweder keine Reaktion oder nur eine Spaltung des reaktiven Acetylestere (**34**) beobachtet werden.



**Schema 16:** Versuch zur Kupplung von Linker (**34**) und Modellpeptid (**48**).

Aufgrund der Probleme bei der Verknüpfung von 2-Acetoxy-5-hydroxymethylsalicylsäure (**34**) mit dem Modelltetrapeptid (**48**), welche mit der räumlichen Nähe der aktivierten Säureverbindung bzw. des aktiven Phenolestere zu erklären wären, wurde versucht zwischen die Carboxyfunktion und Ring ein Spacer einzubauen. Um die Carbonylgruppe räumlich weit genug vom Ring zu entfernen, sollten mehrere Methyleneinheiten zwischen den Ring und der Carbonylgruppe gebracht werden. Am besten wäre eine lineare Abstandsgruppe zwischen Ring und

Carbonylgruppe. Dazu würden sich Dreifachbindungen eignen, welche sich durch Umsetzung einer Aryliod bzw -bromverbindung mit einem Alkin generieren ließen (Schema 17).



**Schema 17:** Einführung einer Spacergruppe.

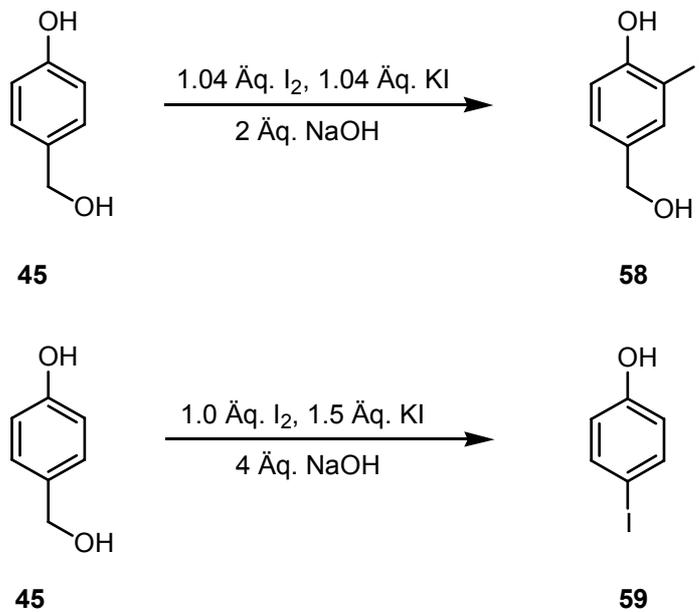
#### 4.1.6. Synthese des modifizierten Linkers

Um C-C-Verknüpfungen an Aromaten zu generieren existieren eine Reihe von Synthesemethoden.<sup>[52]</sup> Prinzipiell können halogenierte Aromaten übergangsmetallkatalysiert mit Alkenen beziehungsweise Alkinen umgesetzt werden. Dabei sollten Iodaryl-Verbindungen in Heck- bzw. Sonogashira-Reaktionen die besten Ausbeuten liefern. Darum wurde versucht, 4-Hydroxybenzylalkohol (**45**) in *ortho*-Position zu iodieren. Hierbei sollten sich elektronenreiche Aromaten wie zum Beispiel Phenole direkt mit Iod substituieren lassen.<sup>[53]</sup> Die nachstehende Tabelle zeigt für diesen Reaktionsschritt die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung von 4-Hydroxybenzylalkohol (**45**).

	Edukt	Lösungsmittel	Bedingungen	Produkt
<b>45</b>	1 Äq. I <sub>2</sub>	Tetrachlorkohlenstoff	0 °C, 2.5-10 h	Edukt
<b>45</b>	1 Äq. I <sub>2</sub>	Toluol	18 h-2 d, RT	Kein
<b>45</b>	1 Äq. I <sub>2</sub> 0.3 Äq. FeCl <sub>3</sub>	Toluol	18 h, RT	Kein
<b>45</b>	1 Äq. I <sub>2</sub> 1.5 Äq. KI	0.5 N NaOH (4 Äq.)	2 h, RT	4-Iodphenol ( <b>59</b> ) <sup>[54,55]</sup>
<b>45</b>	1.04 Äq. I <sub>2</sub> 1.04 Äq. KI	0.0625 N NaOH (1 Äq.)	2 h, RT	3-Iod-4-hydroxybenzylalkohol ( <b>58</b> )
<b>45</b>	1.1 Äq. I <sub>2</sub> 1.1 Äq. NaHCO <sub>3</sub>	THF:Wasser 1:1	3 h, RT	3-Iod-4-hydroxybenzylalkohol ( <b>58</b> ) <sup>[56]</sup>
<b>45</b>	0.1 Äq. I <sub>2</sub> 2.8 Äq. KI	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1/15 M), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1/15 M),	18 h, RT	teilweise Edukt <sup>[57]</sup>

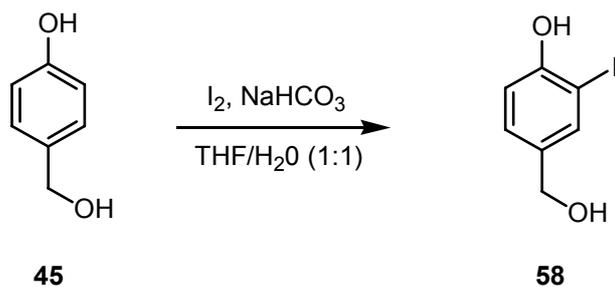
**Tabelle 4:** Bedingungen für die Iodierung von 4-Hydroxybenzylalkohol (**45**).

Die Umsetzungen mit Iod ohne Lewis-Säuren oder Iodiden in unterschiedlichen Lösungsmitteln lieferten nicht das gewünschte Iodphenolderivat. Auch Zusatz von Lewissäuren wie FeCl<sub>3</sub> erbrachten nicht das gewünschte mono-iodierte Produkt. Die Zugabe von Kaliumiodid in basischen Medien allerdings lieferte je nach eingesetzter Basenmenge entweder 4-Iodphenol (**59**) oder den gewünschten 3-Iod-4-hydroxybenzylalkohol (**58**) in ca. 50 % Ausbeute. Bei der Verwendung von 4 Äquivalenten entsteht 4-Iodphenol (**59**), da die reaktivste Position für einen elektrophilen Angriff die para-Position ist. Die Hydroxymethylgruppe an dieser Position wurde anschließend als Formaldehyd abgespalten, so dass eine ipso-Substitution des Benzylalkohols stattfindet. Beim Einsatz von 2 Äquivalenten NaOH wurde hingegen als Hauptprodukt das gewünschte moniodierte Produkt (**58**) gebildet (Schema 18).



**Schema 18:** Selektivität der Iodierung von 4-Hydroxybenzylalkohol (**45**) in Abhängigkeit der Basenmenge.

Die besten Ergebnisse für 4-Hydroxy-3-iod-benzylalkohol (**58**) wurden mit einem Zwei-Phasensystem aus THF und Wasser mit Natriumhydrogencarbonat als Base erzielt (Schema 19). Natriumhydrogencarbonat ist im Gegensatz zur stärkeren Base Natriumhydroxid nicht in der Lage die benzylicke Hydroxyfunktion zu deprotonieren, so dass die Rückreaktion des Angriffs von I<sub>2</sub> begünstigt ist.



**Schema 19:** Mono-Iodierung von 4-Hydroxybenzylalkohol (**45**).

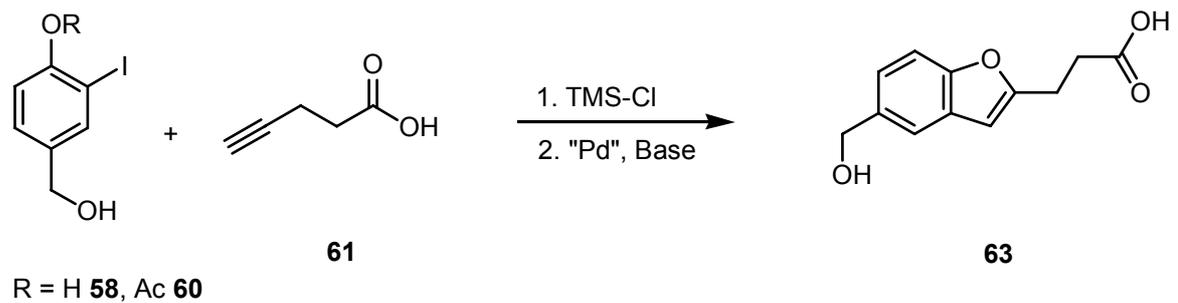
Das synthetisierte Iodphenol sollte anschließend mit 4-Pentinsäure umgesetzt werden.<sup>[57]</sup> In der untenstehenden Tabelle sind die einzelnen Bedingungen der Versuche aufgeführt 4-Hydroxy-3-iodbenzylalkohol (**58**) beziehungsweise 4-

Acetoxy-3-iodbenzylalkohol (**60**) mit 4-Pentinsäure (**61**) oder Hexin (**62**) als Modell zu verknüpfen.<sup>[58-64]</sup>

Iodverbindung	Alkin	Katalysator		Bedingungen
<b>58</b>	1.1 Äq. <b>61</b>	PdCl <sub>2</sub> (PhCN) <sub>2</sub> (0.5-5mol%)	3.2 Äq. NEt <sub>3</sub> , 0.1 Äq. Cul	THF, Diethylether, 18 h, RT
<b>58</b>	1 Äq. <b>61</b>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 mol%)	5 Äq. DIPEA, 0.1 Äq. Cul	THF, 2 - 18 h, RT
<b>58</b>	1.1 Äq. <b>61</b>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 mol%)	5 Äq. DIPEA, 0.1 Äq. Cul	THF, 0 °C, 2 - 8 h
<b>58</b>	1.1-2.0 Äq. <b>61</b>	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0.5-5 mol %)	3.3 Äq. NEt <sub>3</sub> , 0.0-0.5 Äq. Cul	THF, DMF, RT
<b>58</b>	1.1-2.0 Äq. <b>61</b>	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0.5-5 mol %)	3.3 Äq. NEt <sub>3</sub> , 0.1-0.5 Äq. Cul	THF, 65 °C, 2- 10 h
<b>60</b>	2 Äq. <b>61</b>	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 5 mol%	3 Äq. DIPEA	DMF, 80 °C, 5 h
<b>60</b>	2 Äq. <b>61</b>	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 5 mol%	2 Äq. DIPEA 1 Äq. PPh <sub>3</sub>	DMF, 80 °C, 5 h
<b>58, 60</b>	2 Äq. <b>62</b>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 mol%)	3. Äq. DIPEA	DMF, 80 °C, 5 h

**Tabelle 5:** Verknüpfungen der Aryliodide (**58**), (**60**) mit Alkinen (**61**),(**62**).

Bei den Umsetzungen mit den Iodarylverbindungen (**58**) und (**60**) wurde die Säurefunktion von 4-Pentinsäure (**61**) generell in situ als Trimethylsilylester geschützt. Die Umsetzungen mit Verbindung lieferten in fast allen Fällen, auch bei niedrigen Temperaturen beziehungsweise kurzen Reaktionszeiten, hauptsächlich die entsprechenden Benzofurane (**63**), neben nicht weiter charakterisierten Nebenprodukten (Schema 20).<sup>[65-67]</sup>



**Schema 20:** Umsetzung der Verbindung (**58**), (**60**) mit 4-Pentinsäure (**61**).

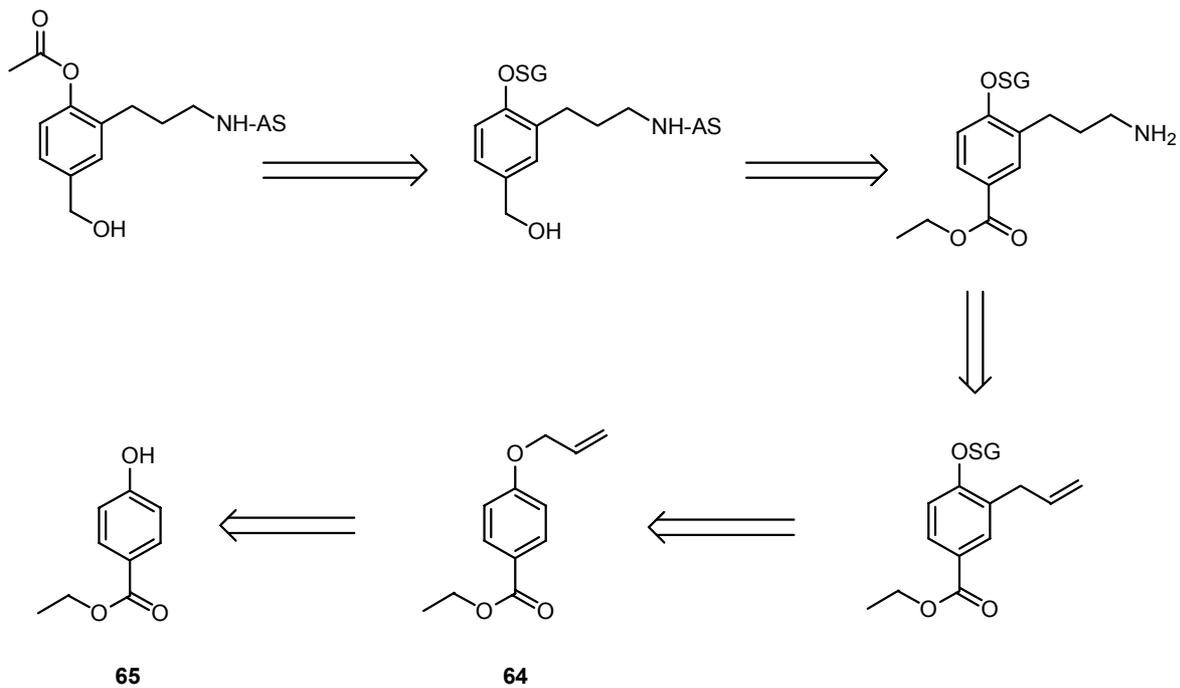
Auch die Umsetzung mit der an der phenolischen Hydroxyfunktion acetylierten Verbindung lieferte nicht das gewünschte Produkt. Hier wurde unter anderem ebenfalls das Benzofuran (**63**) gebildet.

Aufgrund dieser negativen Ergebnisse und die Entscheidung als Adress-Sequenz ein Peptid mit einem myristoyliertem N-Terminus zu verwenden, wurde der Linker modifiziert.

## 4.2. Synthese des Linkersegments

### 4.2.1. Retrosynthese

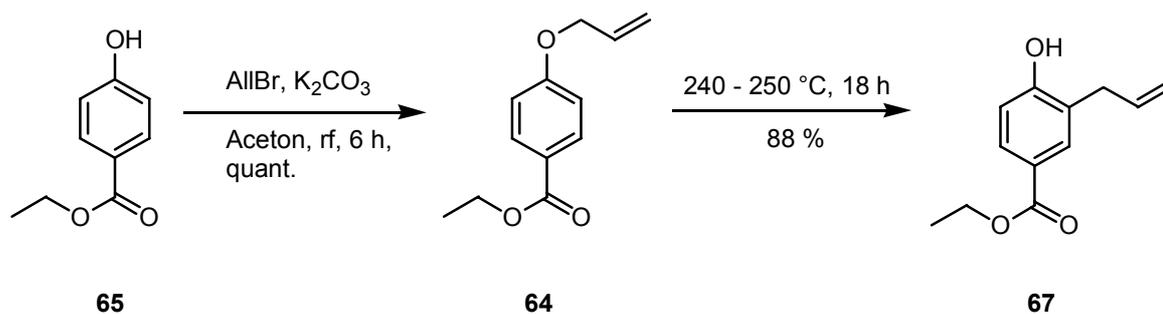
Die Carbonsäure sollte durch eine Aminofunktion ersetzt werden, um die Adress-Sequenz über den C-Terminus anzubinden. Damit wäre auch die Verknüpfung des Linkers mit der Adress-Sequenz an der festen Phase möglich. Die Aminofunktion in der Seitenkette sollte durch Funktionalisierung einer Doppelbindung generiert werden. Die Seitenkette, inklusive der Doppelbindung wurde durch eine Claisen-Umlagerung auf den entsprechenden Allylether (**64**) zurückgeführt (Schema 21).



**Schema 21:** Retrosynthese modifizierter Linker.

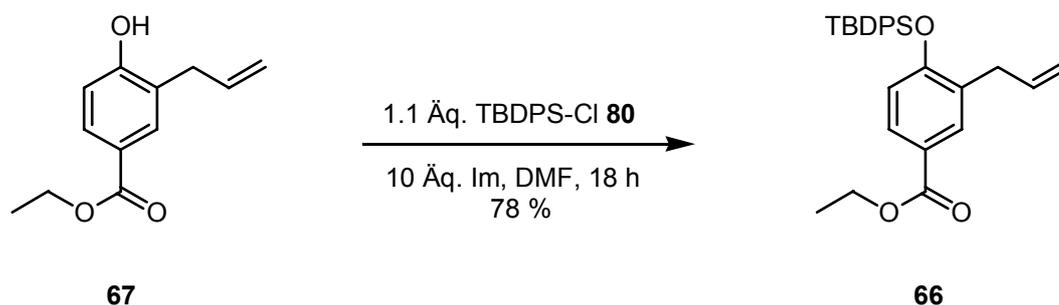
#### 4.2.2. Aufbau der Grundstruktur des Linkers

Die Synthese von 3-Allyl-4-(*tert*-butyl-diphenylsilanyloxy)-benzoesäureethylester (**66**) geht von 4-Hydroxybenzoesäureethylester (**65**) aus (Schema 22). Dazu wurde der Hydroxyester (**65**) mit Kaliumcarbonat deprotoniert und 6 Stunden mit Allylbromid in Aceton unter Rückfluß umgesetzt. Die Umsetzung ist quantitativ, so dass ohne weitere Aufreinigung das entstandene Produkt einer Claisen-Umlagerung unterworfen werden konnte.<sup>[68]</sup> Um die Umlagerung zu initiieren wurde der Allylether (**64**) ohne zusätzliches Lösungsmittel über Nacht auf 240 - 250 °C erhitzt. Säulenchromatographische Auftrennung lieferte einen weißen Feststoff mit 88 % Ausbeute (Schema 22).



**Schema 22:** Veretherung von Verbindung (**65**) und anschließende Claisen-Umlagerung

Die wieder freigesetzte phenolische Hydroxyfunktion wurde anschließend mit der TBDPS-Schutzgruppe blockiert, um bei der weiteren Synthese Nebenreaktionen zu vermeiden. Dazu wurde das dreifach substituierte Benzolderivat (**67**) mit Imidazol und 1.1 Äquivalenten *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (**80**) umgesetzt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte die TBDPS-geschützte Verbindung (**66**) mit 78 % Ausbeute (Schema 23).



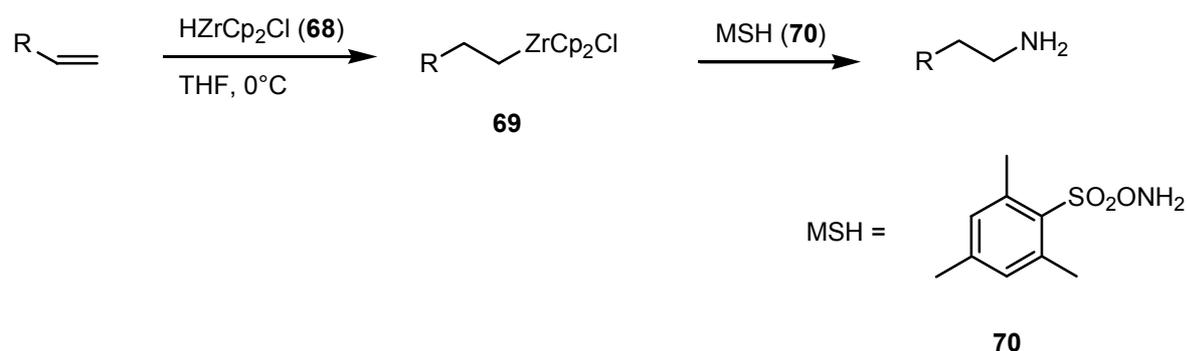
**Schema 23:** TBDPS-Schützung.

Die direkte Einführung des später gewünschten Acetylrestes anstatt der Silylschutzgruppe wäre an dieser Stelle zwar möglich, würde aber aufgrund der Labilität der Bindung zu Problemen bei der Funktionalisierung der Doppelbindung der Allylseitenkette führen.

### 4.2.3. Versuche zur direkten Funktionalisierung der Doppelbindung zum Amin

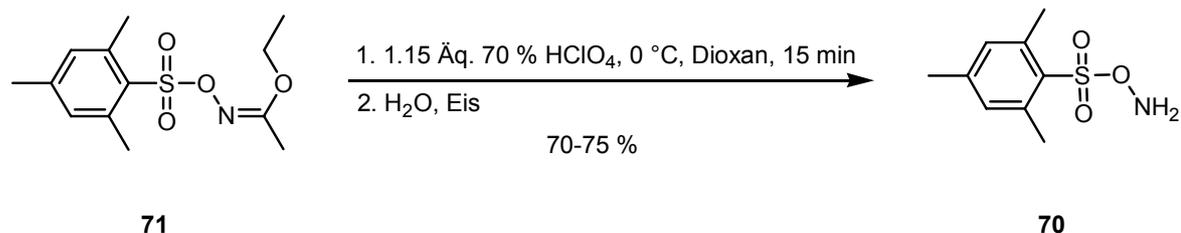
Ausgehend von einer Doppelbindung sind mehrere Synthesewege denkbar, um diese in eine Aminofunktion umzuwandeln.

Eine Möglichkeit, primäre Amine aus Doppelbindungen zu generieren, ist die Umsetzung der Doppelbindung mit dem „Schwartz-Reagenz“ (**68**). In der Literatur sind mehrere Beispiele beschrieben, in denen Doppelbindungen in primäre Amine überführt wurden.<sup>[69-71]</sup> Dazu wurde das „Schwartz-Reagenz“ (HZrCp<sub>2</sub>Cl) (**68**) mit Alkenen umgesetzt und das entstandene Zirconocen-Alkylchlorid konnte durch Umsetzung mit Elektrophilen in unterschiedliche funktionelle Gruppen überführt werden. Die Umsetzung eines Alkens mit dem „Schwartz-Reagenz“ (**68**) und anschließender Reaktion mit einem Elektrophil ergibt in fast allen Fällen Reaktion am terminalen Ende bzw. an der geringer substituierten Seite (Schema 24).<sup>[72]</sup>



**Schema 24:** Funktionalisierung einer Doppelbindung zu einem primären Amin.

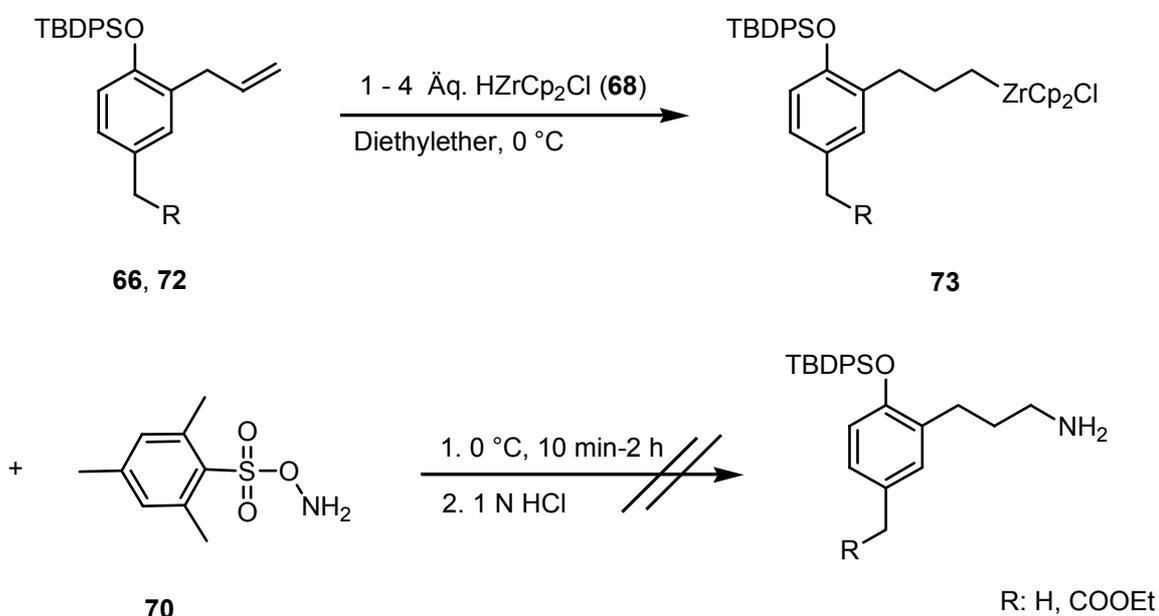
Um ein primäres Amin zu generieren haben sich O-Arylhydroxylamine als die besten elektrophilen Aminierungsreagenzien erwiesen. Deshalb wurde versucht die Doppelbindung nach Umsetzung mit HZrCp<sub>2</sub>Cl (**68**) durch O-(Mesitylsulfonyl)-hydroxylamin (MSH)<sup>[73-76]</sup> (**70**) in das primäre Amin zu überführen. Das Hydroxylaminderivat (**70**) ließ sich in einer Stufe aus O-(Mesityl-sulfonyl)-acetohydroxamsäureethylester (**71**) durch Umsetzung mit 1.1 Äquivalenten 70 %-iger Perchlorsäure und anschließender Fällung in Eiswasser generieren (Schema 25). Der Nachteil dabei ist die Instabilität des MSH (**70**), welches sich beim Trocknen in mehreren Fällen selbst entzündete.



**Schema 25:** Synthese O-(Mesitylsulfonyl)-hydroxylamin (**70**).<sup>[77]</sup>

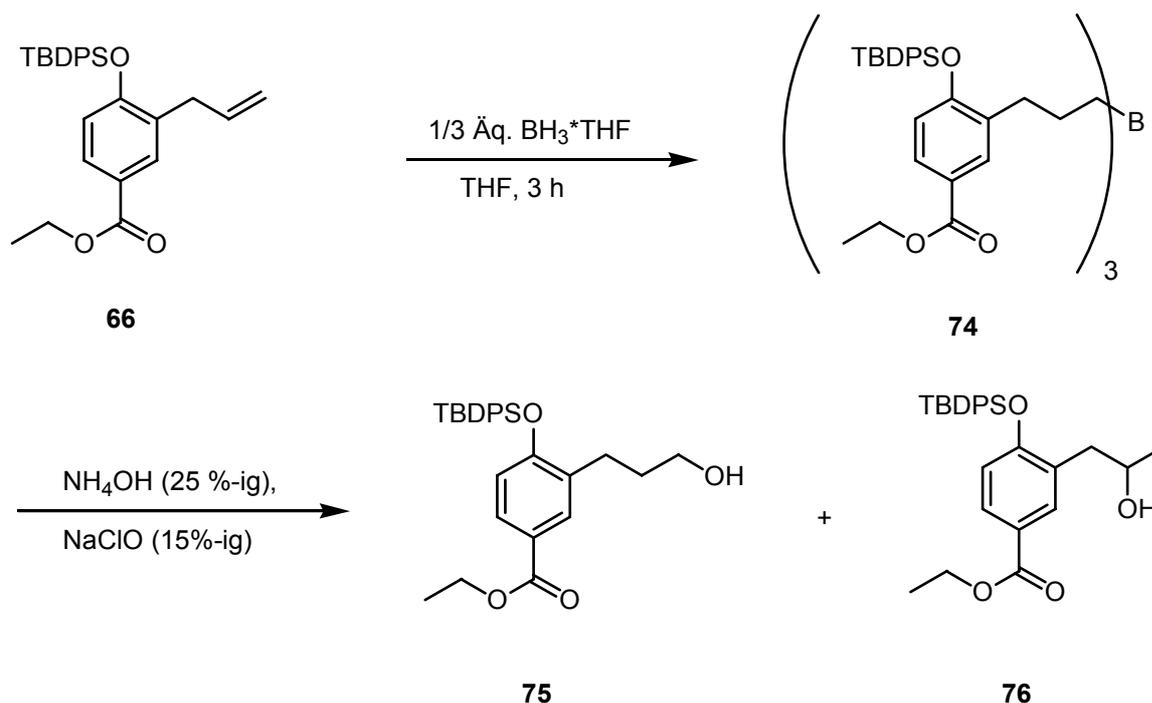
Um das primäre Amin zu generieren wurde 3-Allyl-4-(*tert*-butyl-diphenyl-silanyl-oxy)-benzoesäureethylester (**66**) mit HZrCp<sub>2</sub>Cl (**68**) in Ether bei 0°C umgesetzt. Dabei erkennt man die Bildung der Zirconocen-Alkylspezies (**73**) an der nach 15 min auftretenden gelben, klaren Lösung. Anschließende Zugabe von frisch hergestelltem MSH (**70**) und quenchen der Reaktion mit Salzsäure lieferte kein gewünschtes Produkt. Ebenso die Umsetzung von 3-Allyl-4-(*tert*-butyl-diphenylsilanyloxy)-benzylalkohol (**72**) mit 4 Äquivalenten Zirconocen und anschließender Zugabe variabler Äquivalente MSH (**70**) lieferte kein Produkt (Schema 26).

Der Benzylalkohol (**72**) konnte durch Reduktion des Ethylesters (**66**) mit Lithiumaluminiumhydrid in einer Ausbeute von 90 % dargestellt werden.



**Schema 26:** Funktionalisierung der Doppelbindung mit MSH (**70**).

Eine weitere Möglichkeit, aus einer Doppelbindung ein Amin zu generieren, ist die „Aminoborierung“.<sup>[78-80]</sup> Analog zur Hydroborierung wurde zuerst das Alken (**66**) mit Boran bzw. Alkylboranen (z.B. 9-BBN) umgesetzt. Das entstandene Alkylboran (**74**) wurde dann anschließend mit diversen Aminierungsreagenzien abgefangen. Als Aminierungsreagenzien wurden dabei unter anderem Ammoniumhydroxid und Trimethylsilylazid verwendet (Schema 27).



**Schema 27:** „Aminoborierung“.

Zuerst wurde 3-Allyl-4-(*tert*-butyl-diphenyl-silyloxy)-benzoesäureethylester (**66**) in absolutem Tetrahydrofuran mit Boran als THF-Komplex umgesetzt. Nachdem sich das Alkylboran (**74**) gebildet hatte, wurde Ammoniaklösung und Natriumhypochloridlösung zugegeben. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt allerdings nicht isoliert werden. Anstatt der Aminoverbindung wurde nur die entsprechende Hydroxyverbindung (**75**) mit 8 % Ausbeute sowie das Regioisomer (**76**) mit 2 - 3 % Ausbeute isoliert (Schema 27).

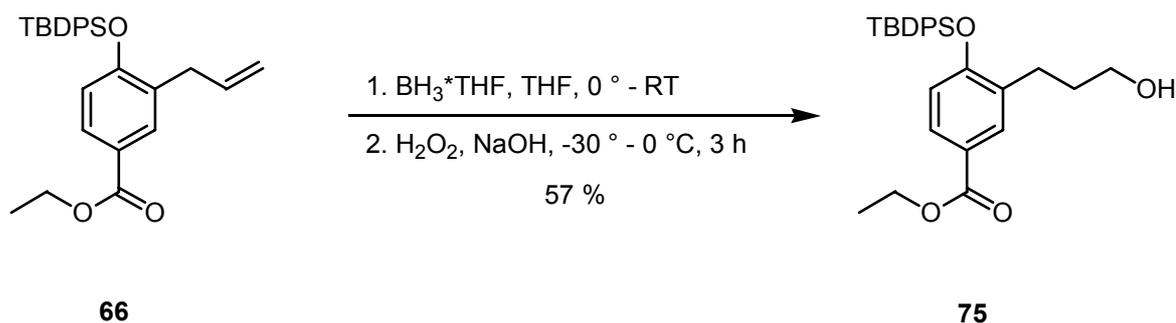
Ebenso lieferte die Umsetzung des aus  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  und 3-Allyl-4-(*tert*-butyl-diphenyl-silyloxy)-benzoesäureethylester (**66**) hergestellten Alkylborans mit Trimethyl-

silylazid als Nukleophil nur die Hydroxyverbindungen (**75/76**) als charakterisierte Produkte.

#### 4.2.4. Funktionalisierung der Doppelbindung

Da auf direktem Wege die Darstellung des Amins nicht möglich war, musste ein Umweg über drei Stufen in Kauf genommen werden.

Dazu wurde zuerst die Doppelbindung hydroboriert. Dies konnte durch die schon oben beschriebene Umsetzung von 3-Allyl-4-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzoesäureethylester (**66**) mit  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  in absolutem Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre erreicht werden. Das generierte Alkylboran (**74**) wurde anschließend bei  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  mit Wasserstoffperoxid und 3 N Natriumhydroxidlösung versetzt. Nach 3 h Reaktionszeit bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser abgefangen. Die Zugabe des Wasserstoffperoxides musste bei niedrigen Temperaturen ( $-30\text{ }^\circ\text{C}$ ) erfolgen, um eine Spaltung des Ethylesters zu vermeiden. Desweiteren wirkte sich eine hohe Verdünnung der Reaktion gut auf die Ausbeute aus.<sup>[81]</sup> Auf diesem Wege konnte die Verbindung (**75**) in 57 % Ausbeute hergestellt werden. Als Nebenprodukt entstanden unter anderem 7 % des anderen Regioisomers 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(2-hydroxypropyl)-benzoesäure-ethylester (**76**) (Schema 28).

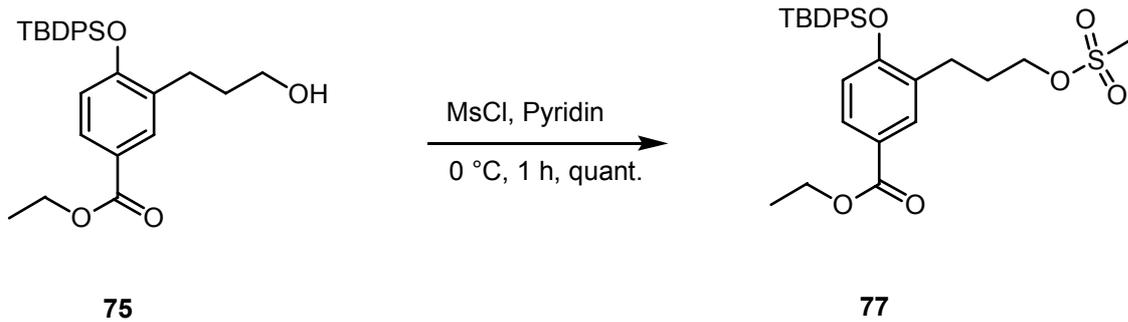


**Schema 28:** Hydroborierung der Allylgruppe.

Ausgehend von der synthetisierten Alkoholfunktion (**75**) waren mehrere Synthesestrategien möglich, um die gewünschte Aminofunktion zu generieren. Die erste

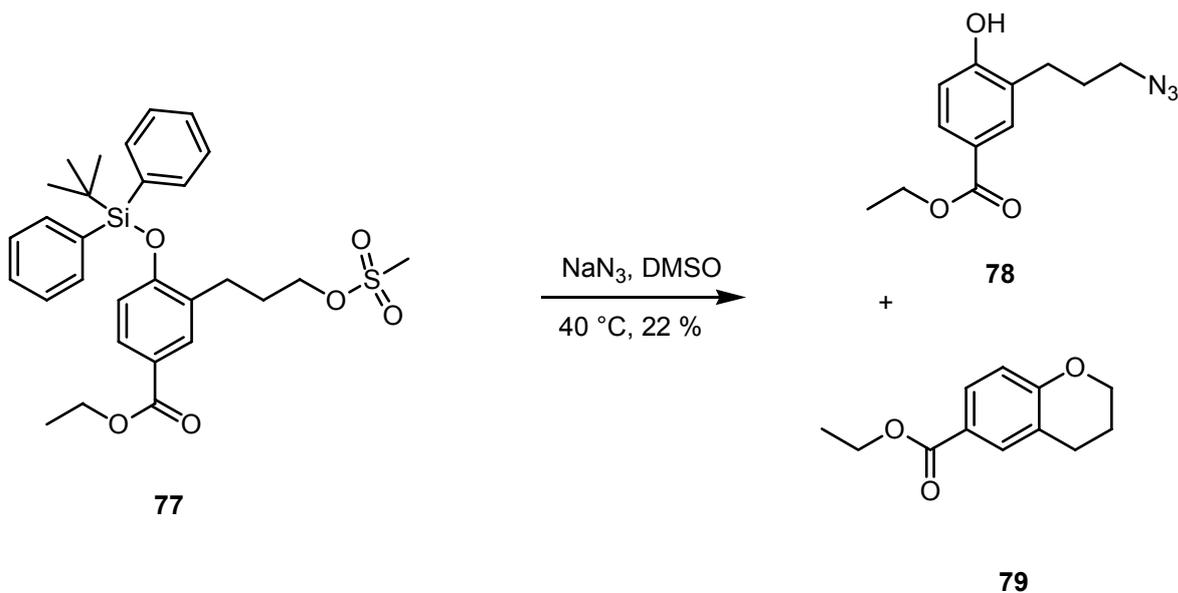
Möglichkeit ist die Einführung eines Azidrestes, welcher mit unterschiedlichen Reduktionsmitteln zum Amin reduziert werden kann.<sup>[82-84]</sup>

Um den Azidrest einzuführen, wurde die Hydroxyfunktion von 4-(*tert*-Butyldi-phenylsilanyloxy)-3-(3-hydroxypropyl)-benzoesäureethylester (**75**) mit Methylsulfonchlorid (MsCl) umgesetzt um eine bessere Abgangsgruppe zu generieren, welche eine nukleophile Substitution zu einer Azidgruppe möglich macht.<sup>[85-88]</sup>



**Schema 29:** Überführung der Alkoholfunktion (**75**) in eine bessere Abgangsgruppe.

Die Umsetzung der Verbindung (**75**) mit MsCl und Pyridin als Base ist quantitativ, so dass keine weitere Aufreinigung vor der Umsetzung mit  $\text{NaN}_3$  notwendig war (Schema 29).

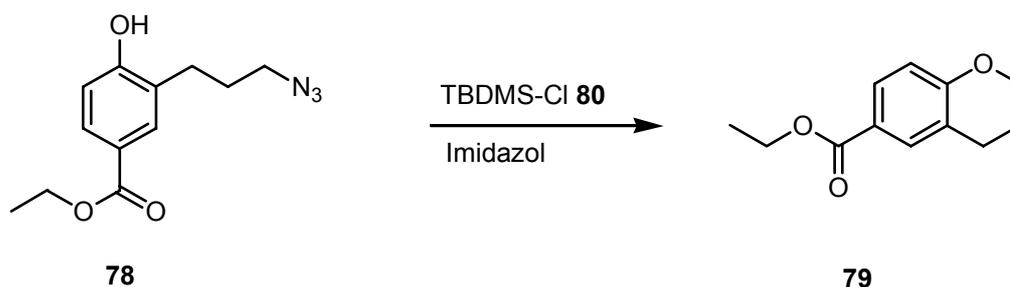


**Schema 30:** Einführung der Azidgruppe.

Die Umsetzung von 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-methansulfonyloxy-propyl)-benzoesäureethylester (**77**) mit  $\text{NaN}_3$  in DMSO bei 40 °C sollte dann die gewünschte Azidfunktion liefern (Schema 30).<sup>[89]</sup>

Allerdings lieferte die Umsetzung im besten Fall nur 22 % des TBDPS-entschützten Produktes (**78**). Die geschützte Verbindung konnte auch durch Variation der Reaktionsbedingungen nicht erhalten werden. Ein weiteres Nebenprodukt ist die Verbindung (**79**), welche durch Abspaltung der TBDPS-Gruppe und nachfolgendem nukleophilem Angriff auf die Abgangsgruppe entstand. Diese Reaktion wird begünstigt durch die Entstehung eines annelierter Sechsrings.

Auch die neuerliche Schützung von 3-(3-Azidopropyl)-4-hydroxy-benzoesäureethylester (**78**) mit *tert*-Butyl-diphenylsilylchlorid (**80**) ist nicht mehr möglich, da die Deprotonierung der phenolischen Hydroxyfunktion den nukleophilen Angriff auf die Azid-Gruppe begünstigt und wiederum fast ausschließlich Chroman-6-carbonsäureethylester (**79**) entsteht (Schema 31).



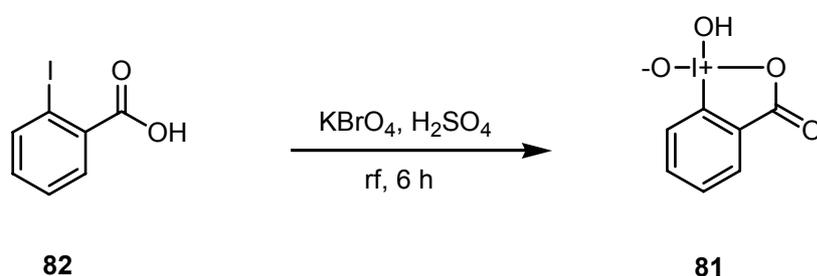
**Schema 31:** Unerwünschte Nebenreaktion bei der Schützung der phenolischen Hydroxyfunktion.

Da auch der Umweg über die Azidfunktion nicht die gewünschte geschützte Verbindung lieferte, wurde die direkte Umwandlung der OH-Funktion in die  $\text{NH}_2$ -Gruppe verworfen.

Die Aminofunktion sollte nun ausgehend von der Hydroxyfunktion über eine reduktive Aminierung generiert werden.

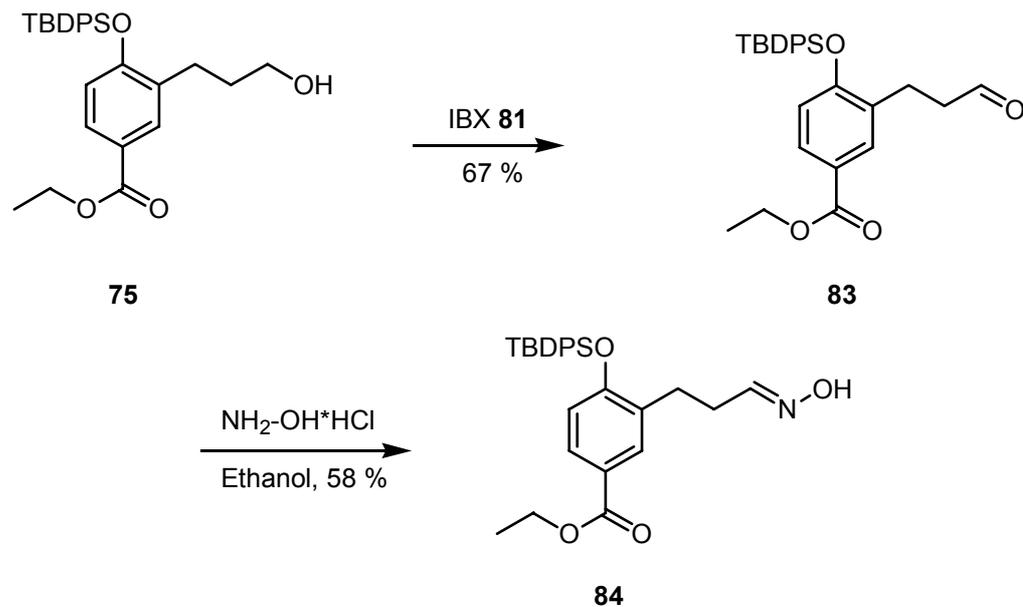
#### 4.2.5. Aufbau der Aminofunktion durch reduktive Aminierung

Um primäre oder sekundäre Alkohole in die entsprechenden Aldehyde bzw. Ketone umzuwandeln, sind die Oxidationen nach Dess-Martin oder Swern geeignete Methoden. Ebenso konnte zu dieser Oxidation auch 1,1-Dihydroxy-1H-1 $\lambda^5$ -benzo[d][1,2]iodoxol-3-on (IBX) (**81**)<sup>[90]</sup>, die Vorstufe zum Dess-Martin-Periodinan, verwendet werden. Dieses Hydroxyiodinanoxid (**81**) ließ sich in einer Stufe aus 2-Iodbenzoesäure (**82**) herstellen. Das explosive Produkt (**81**) konnte direkt nach dem Abfiltrieren weiter eingesetzt werden (Schema 32).



**Schema 32:** Synthese der Dess-Martin-Periodinan-Vorstufe IBX (**81**).

Die Umsetzung von 4-(*tert*-Butyldiphenylsilanyloxy)-3-(3-hydroxypropyl)-benzoesäureethylester (**75**) mit dem Periodinan (**81**) in DMSO lieferte nach Säulenchromatographischer Aufreinigung den gewünschten Aldehyd (**83**) in 67 %-iger Ausbeute. Der Aldehyd (**83**) ist bei  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  lichtgeschützt über längere Zeit stabil. Bei ungeschützter Lagerung findet relativ schnell eine Autoxidation statt (Schema 33).

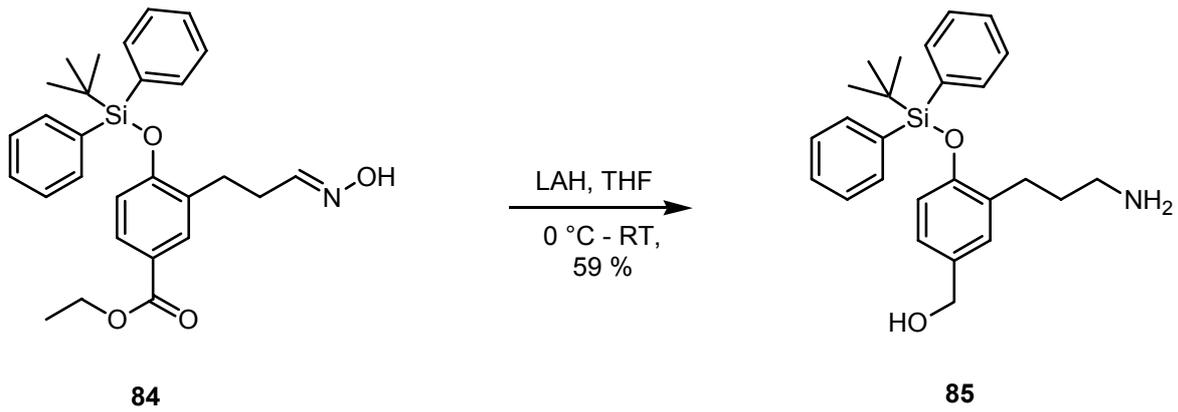


**Schema 33:** Oxidation zum Aldehyd (**83**) mit anschließender Aminierung.

Die Ketoverbindung (**83**) wurde anschließend durch die Umsetzung mit Hydroxylamin-Hydrochlorid in Ethanol mit Natriumhydrogencarbonat als Base in das entsprechende Oxim (**84**) umgewandelt. Diese Reaktionsbedingungen lieferten die besseren Ausbeuten im Vergleich zur Umsetzung des Aldehyds (**83**) in einem Natriumacetatpuffer.

Das Oxim kann nun gleichzeitig mit dem Ethylester reduziert werden. Für die Kupplung einer Aminosäure an die Aminofunktion sollte die freie Hydroxyfunktion keinen Einfluss haben. Man würde sich durch die gleichzeitige Reduktion der funktionellen Gruppen eine Reaktionsstufe ersparen.

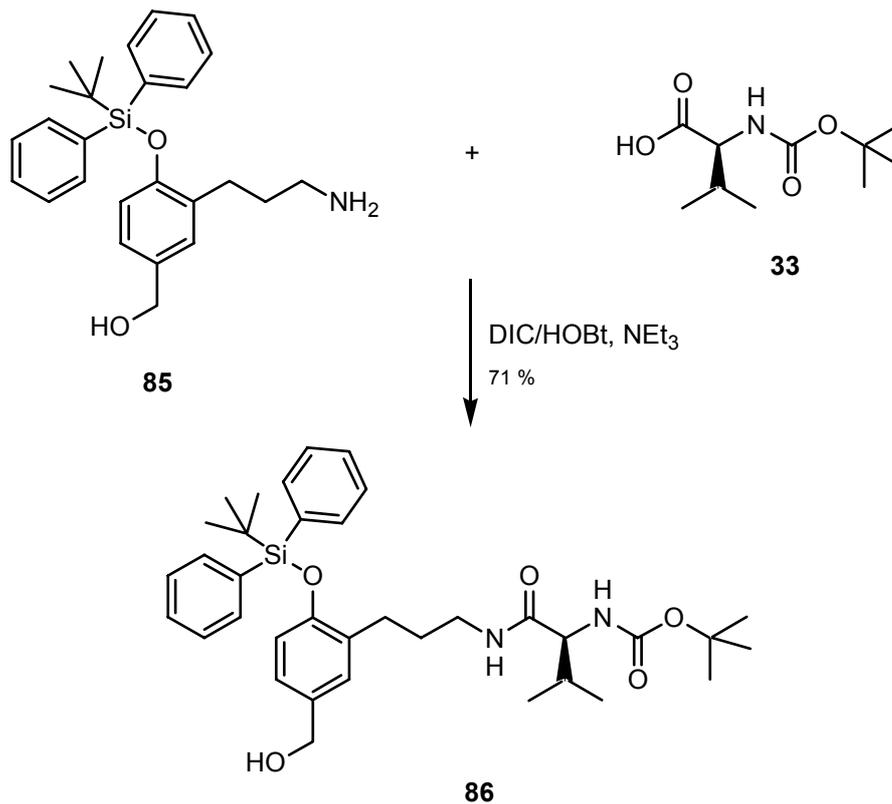
Die Reduktion der beiden Funktionalitäten zum Amin respektive zum Alkohol lässt sich mit Lithiumaluminiumhydrid bewerkstelligen. Um überschüssiges LAH abzutrennen wurde es als Aluminiumhydroxid gefällt und abfiltriert. Es wurde keine weitere Aufreinigung vorgenommen. Der Nachteil bei der gleichzeitigen Reduktion des Oxims mit der Esterfunktion ist, dass der sich bildende Aminoalkohol (**85**) mit dem Aluminium sehr gut komplexiert, wodurch die geringe Ausbeute von 59 % zu erklären ist (Schema 34).



**Schema 34:** Gleichzeitige Reduktion des Oxims und des Ethylesters.

#### 4.2.6. Anbindung einer Aminosäure an das Linkergrundgerüst

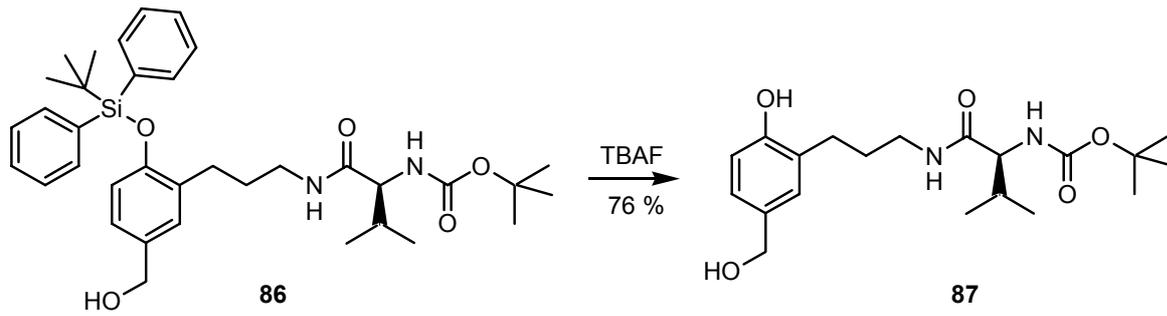
An die Aminofunktion sollte nun eine Aminosäure beziehungsweise ein Peptid angebunden werden. Um die Synthese zu vervollständigen wurde zuerst nur Boc-geschütztes *L*-Valin (**33**) angekuppelt. Dies konnte durch Umsetzung von (**85**), nach der DIC/HOBt-Methode voraktiviert, mit der Aminosäure (**33**) erreicht werden. Die anschließende Säulenchromatographie lieferte das ölige Linker-Aminosäure-Konjugat in 71 % Ausbeute (Schema 35).



**Schema 35:** Anknüpfung des Boc-geschützten *L*-Valins (**33**) an das Linkergrundgerüst (**85**).

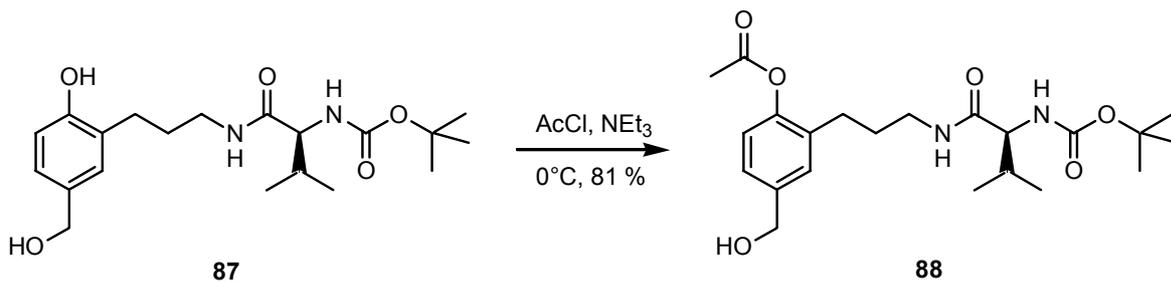
Die beiden im Molekül vorhandenen Schutzgruppen, TBDMS und Boc, sollten unter unterschiedlichen Bedingungen abgespalten werden können. Beide sind zwar säurelabil, aber die Abspaltung der TBDPS-Schutzgruppe kann auch im Gegensatz zur Boc-Schutzgruppe durch die Umsetzung mit Fluoridionen erreicht werden.

Um die Silylschutzgruppe abzuspalten, wurde die gelöste Verbindung (**86**) mit einer einmolaren Lösung aus Tetrabutylammoniumfluorid in THF bei Raumtemperatur versetzt (Schema 36).<sup>[91]</sup> Man erhält das Diol in 76 % Ausbeute.



**Schema 36:** Abspaltung der TBDPS-Schutzgruppe.

Der erhaltene Hydroxybenzylalkohol (**87**) konnte nun im nächsten Schritt an der phenolischen Hydroxyfunktion acetyliert werden. Wie schon in Kapitel 4.1.3 gezeigt, ist die Reaktivität der einzelnen Hydroxyfunktionen von der Sterik beziehungsweise der Nukleophilie abhängig. Die Umsetzung von (**87**) mit Acetylchlorid lieferte die gewünschte Verbindung (**88**) in 81 % Ausbeute (Schema 37).



**Schema 37:** Einführung der Acetylgruppe.

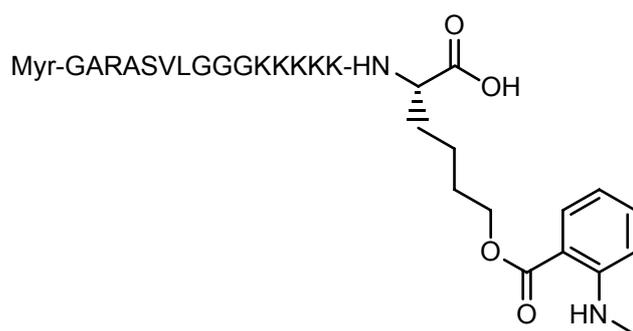
Auf diesem Wege konnte das Linkerfragment (**88**) als zentrale Einheit eines „chemischen Vektors“ dargestellt werden.

### 4.3. Aufbau des NLS-MPS-Konjugats

#### 4.3.1. Vorüberlegungen

Beim Aufbau von Peptiden ist eine sinnvolle Schutzgruppenstrategie unerlässlich. Um Peptide an der festen Phase aufzubauen hat sich unter anderem die Fmoc-Strategie bewährt, da man während der Synthese die Beladung zwischen den einzelnen Kupplungs-schritten einfach durch die Bestimmung der UV-Absorption der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppe messen kann.<sup>[92]</sup> Als Seitenketten-schutzgruppen bieten sich dann, da die Fmoc-Schutzgruppe basisch abgespalten wird, sauer bzw. Palladium(0)-katalysiert abspaltbare Schutzgruppen an. Beispiele hierfür sind die Aloc-Schutzgruppe für die Aminogruppen von Lysin oder die Pmc-Schutzgruppe für die Guanidinofunktion von Arginin.<sup>[93-95]</sup>

Als Konjugat aus einer MPS und einer NLS wurde folgende Sequenz ausgewählt: Myr-Gly-Ala-Arg-Ala-Ser-Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys(O-Mant)-COOH (**89**). Dabei stammen die letzten sieben Aminosäuren inklusive des Myristoylrestes aus der MPS, die fünf Lysinbausteine ergeben die NLS. Die beiden Untereinheiten wurden durch einen Glycinspacer getrennt. Die kursiv markierte Aminosäure ist die aus einem Lysin abgewandelte Aminohexansäure, welche den Fluorophor tragen soll (Schema 38).



**89**

**Schema 38:** Fluoreszenzmarkiertes MPS-NLS-Konjugat (**89**).

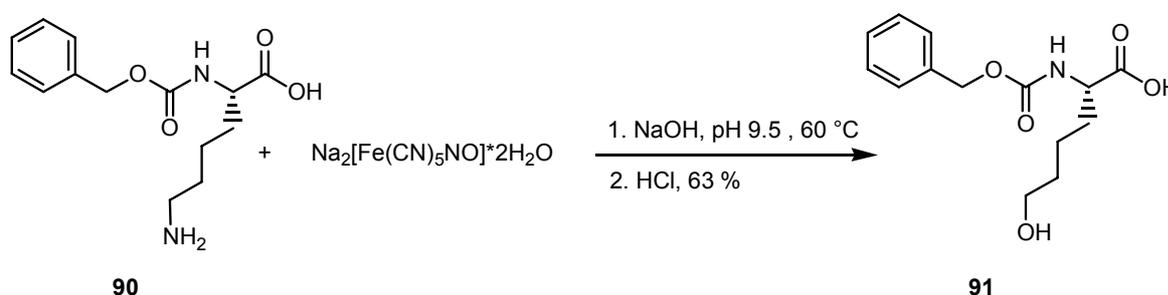
### 4.3.2. Aufbau des beladenen Hycronlinkers

Als Linker zur festen Phase wurde der Hycronlinker (**98**)<sup>[96]</sup> ausgewählt, welcher sich Palladium-katalysiert spalten lässt. Als Schutz für die Aminofunktionen der Lysinseitenketten wurde die Aloc-Gruppe gewählt, welche sich ebenfalls Palladium(0)-katalysiert spalten lässt. Für die Argininseitenkette wurde die sauer spaltbare 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonylschutzgruppe (Pmc) verwendet. Die Hydroxyfunktion des Serins wurde durch eine Tritelgruppe blockiert.

Die Synthese wurde dabei so geplant, dass die fluoreszierende Gruppe als letztes angebunden werden sollte um, erstens eine gewisse Wahlmöglichkeit zu haben und zweitens die oft empfindlichen Fluorophore erst gegen Ende der Synthese einführen zu müssen. Dazu musste die erste Aminosäure, ein Lysin derart modifiziert werden, dass eine Schutzgruppe gewählt werden konnte, welche sich orthogonal zum Linker bzw. sauer abspaltbaren Schutzgruppen verhält.

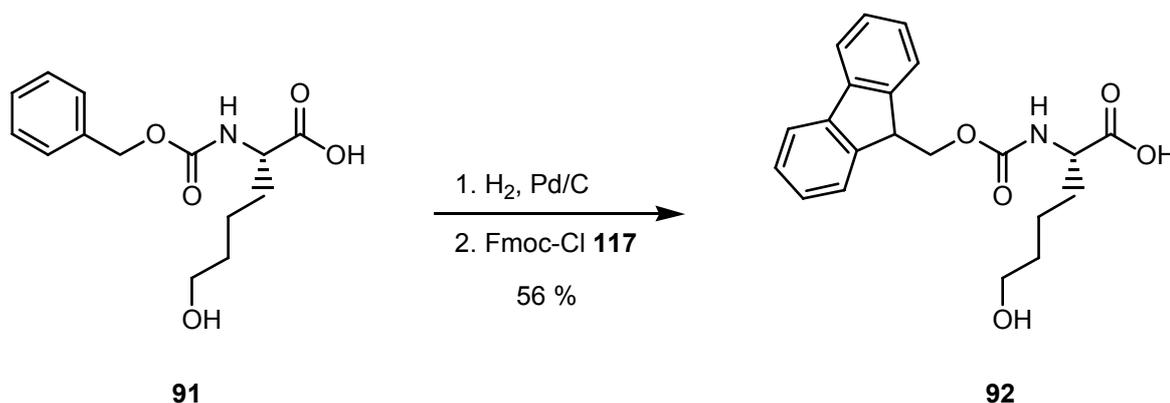
Eine Möglichkeit sind Silylschutzgruppen, welche aber in der Regel nur bei Hydroxyfunktionen die notwendige Stabilität mitbringen. Deshalb wurde die Aminosäure Lysin in der Seitenkette modifiziert und die  $\epsilon$ -Aminofunktion in eine Hydroxyfunktion umgewandelt, welche mit der *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe geschützt werden konnte.

Dazu wurde das  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-geschütztes *L*-Lysin (**90**) in Natronlauge gelöst und zu der erhitzten Lösung Natrium-Nitroprussid zugegeben. Nach Säulenchromatographischer Aufreinigung erhält man mit 63 %-iger Ausbeute die gewünschte Hydroxyhexansäure (**91**) (Schema 39).<sup>[97]</sup>



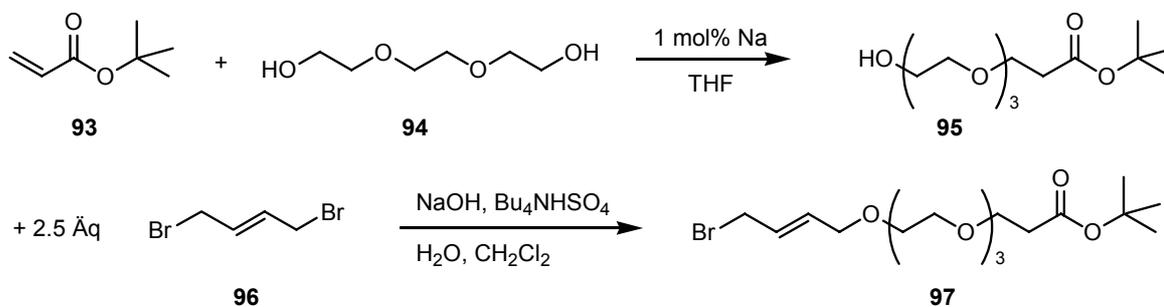
**Schema 39:** Umfunktionalisierung der *L*-Lysin-Seitenkette.

Da die Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie geplant wurde, musste die 2-(S)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-6-hydroxyhexansäure (**91**) umgeschützt werden. Die Verbindung (**91**) wurde nach Hydrogenolyse der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl) (**117**) umgesetzt (Schema 40).



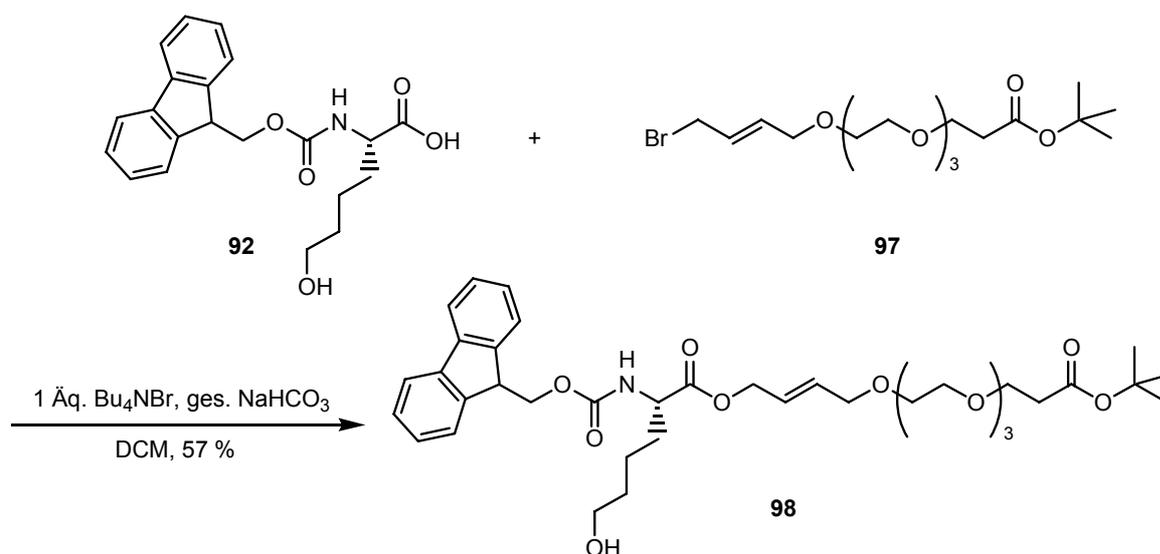
**Schema 40:** Umschützen des Lysinderivats (**91**).

Das Fmoc-geschützte Aminosäurederivat (**92**) lässt sich so über zwei Stufen in einer Ausbeute von 56 % herstellen. Diese Verbindung konnte im nächsten Schritt mit dem Hycronlinker verknüpft werden. Dieser lässt sich in drei Stufen ausgehend von Acrylsäure-*tert*-Butylester (**93**) und Triethylenglycol (**94**) aufbauen. Die Umsetzung zu (*E*)-17-Brom-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecensäure-*tert*-butylester (**97**) geschieht in einem 2-Phasensystem mit Tetrabutylammoniumsulfat als Phasentransferkatalysator. Säulenchromatographische Reinigung lieferte 58 % eines gelblichen Öls (Schema 41).



**Schema 41:** Aufbau des Hycronlinkers.

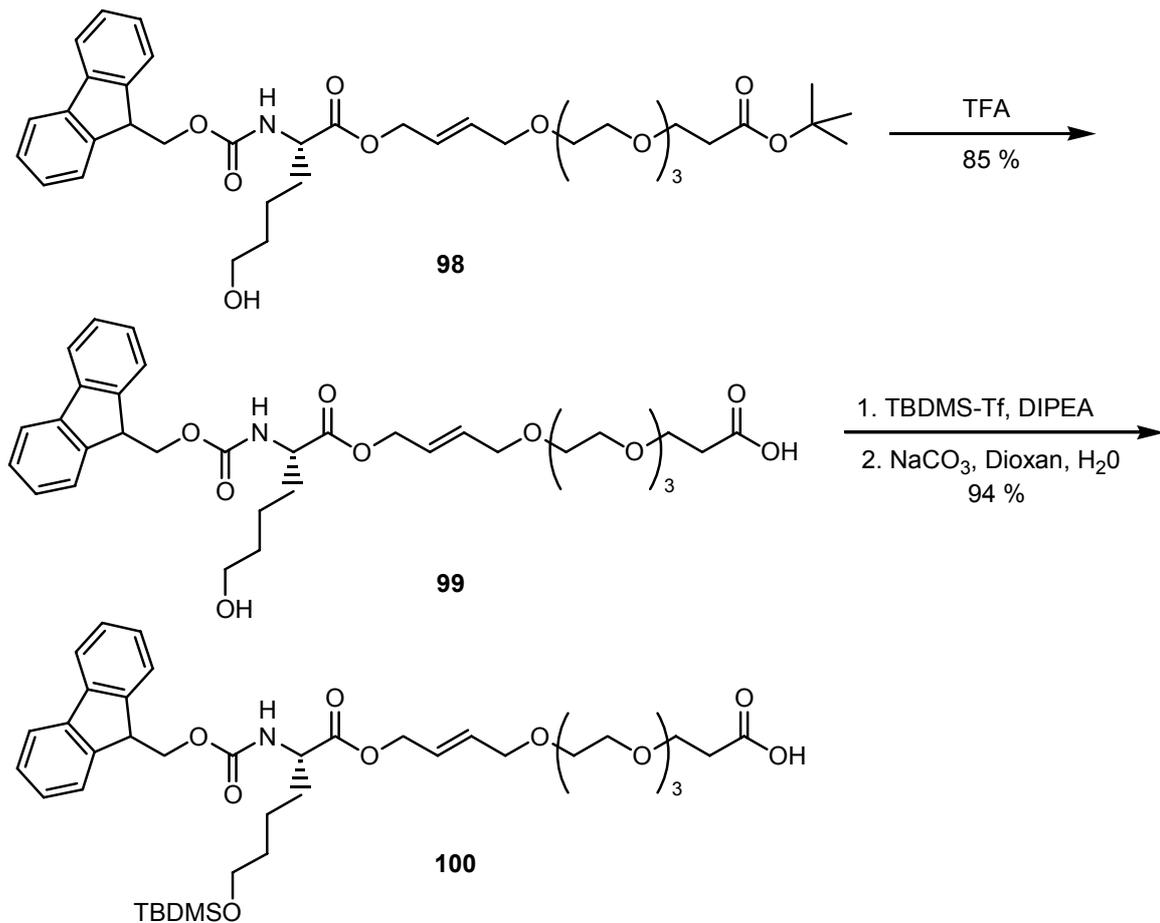
Das Bromatom am Linker konnte nun im nächsten Schritt durch nukleophile Esterbildung mit der Fmoc-geschützten Aminosäure (**92**) ersetzt werden. Die Anbindung des Hydroxylysins (**92**) erfolgte Phasentransfer-katalysiert mit Tetra-*n*-butyl-ammoniumbromid und Natriumhydrogencarbonatlösung in Dichlormethan (Schema 42).



**Schema 42:** Anbindung des Hydroxylysins (**92**) an den Hycronlinker (**97**).

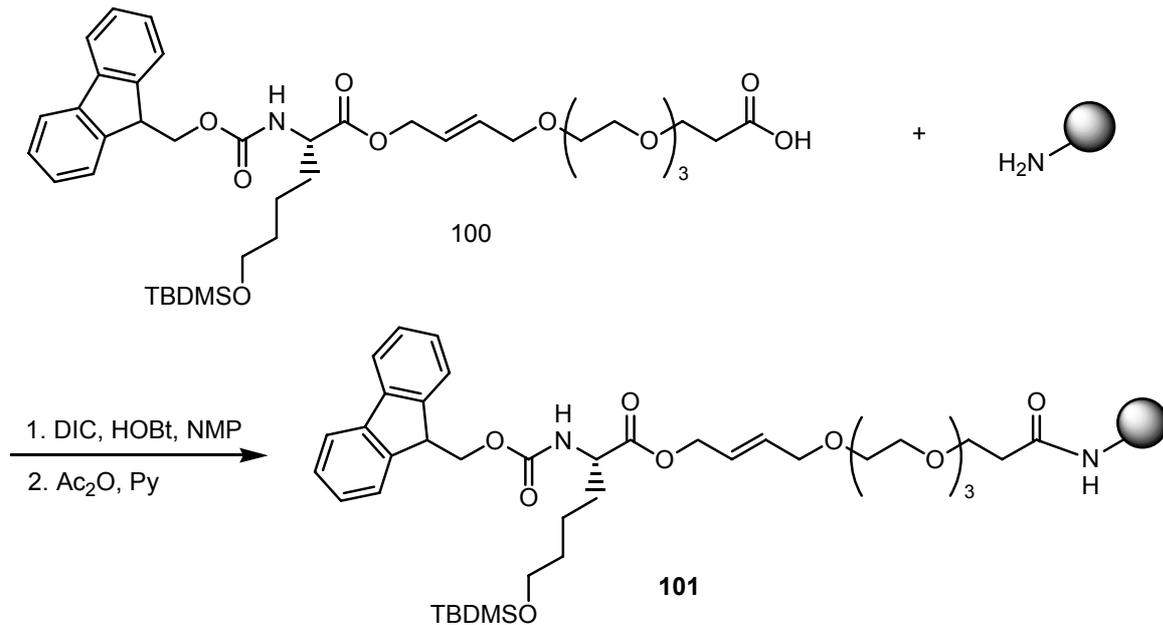
#### 4.3.3. Anbindung des Linkers an die feste Phase

Um die Anknüpfungsstelle für den festen Träger zu haben wurde die Carboxygruppe mit Trifluoressigsäure mit 85 %-iger Ausbeute entschützt (Schema 43). Bevor der beladene Linker (**98**) an das Harz angebunden werden konnte, musste noch die freie Hydroxyfunktion der modifizierten Aminosäure mit der *tert*-Butyl-dimethylsilyl-Schutzgruppe blockiert werden<sup>[98]</sup> um Nebenreaktionen bei späteren Peptidkupplungen zu vermeiden. Die Umsetzung der Verbindung (**99**) mit *tert*-Butyl-dimethylsilyltriflat und anschließender Verseifung des Silylesters lieferte den kupplungsfähigen Baustein (**100**) in 94 % Ausbeute (Schema 43).



**Schema 43:** Schützung der freien Hydroxyfunktion des Lysin-Hycron-Derivates (**99**).

Die Verbindung (**100**) konnte nun an Aminopolystyrolharz angebunden werden. Die Anbindung konnte mit gängigen Peptidkupplungsmethoden erreicht werden. Dazu wurde zuerst das Harz in Dichlormethan mit 10 % Diisopropylethylamin gewaschen. Für die Anknüpfung an das Harz wurden 0.5 mmol des beladenen Linkersystems (**100**) mit Diisopropylcarbodiimid und 1-Hydroxybenzotriazol voraktiviert und nach 5 min zu 1 Äq. Harz (max. Beladung 1.2 mmol/g) gegeben. Anschließend wurde das Harz im Vakuum getrocknet um danach die Beladung zu bestimmen (Schema 44).



**Schema 44:** Anknüpfung des beladenen Linkers (**100**) an Aminopolystyrolharz.

Dazu wurde von einem Teil des Harzes die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die UV-Absorption des Fmoc-Piperidinkomplexes bei 290 nm Wellenlänge gemessen. Es resultierte eine Beladung von 0.45 mmol/g Harz (max. Beladung 1.2 mmol/g). Die im Vergleich zur Maximalbeladung geringe gemessene Beladung ist erwünscht, um bei den später folgenden Modifikationen am Peptid Nebenreaktionen und die Ausbildung von Überstrukturen der Peptide zu vermeiden.

#### 4.3.4. Festphasensynthese

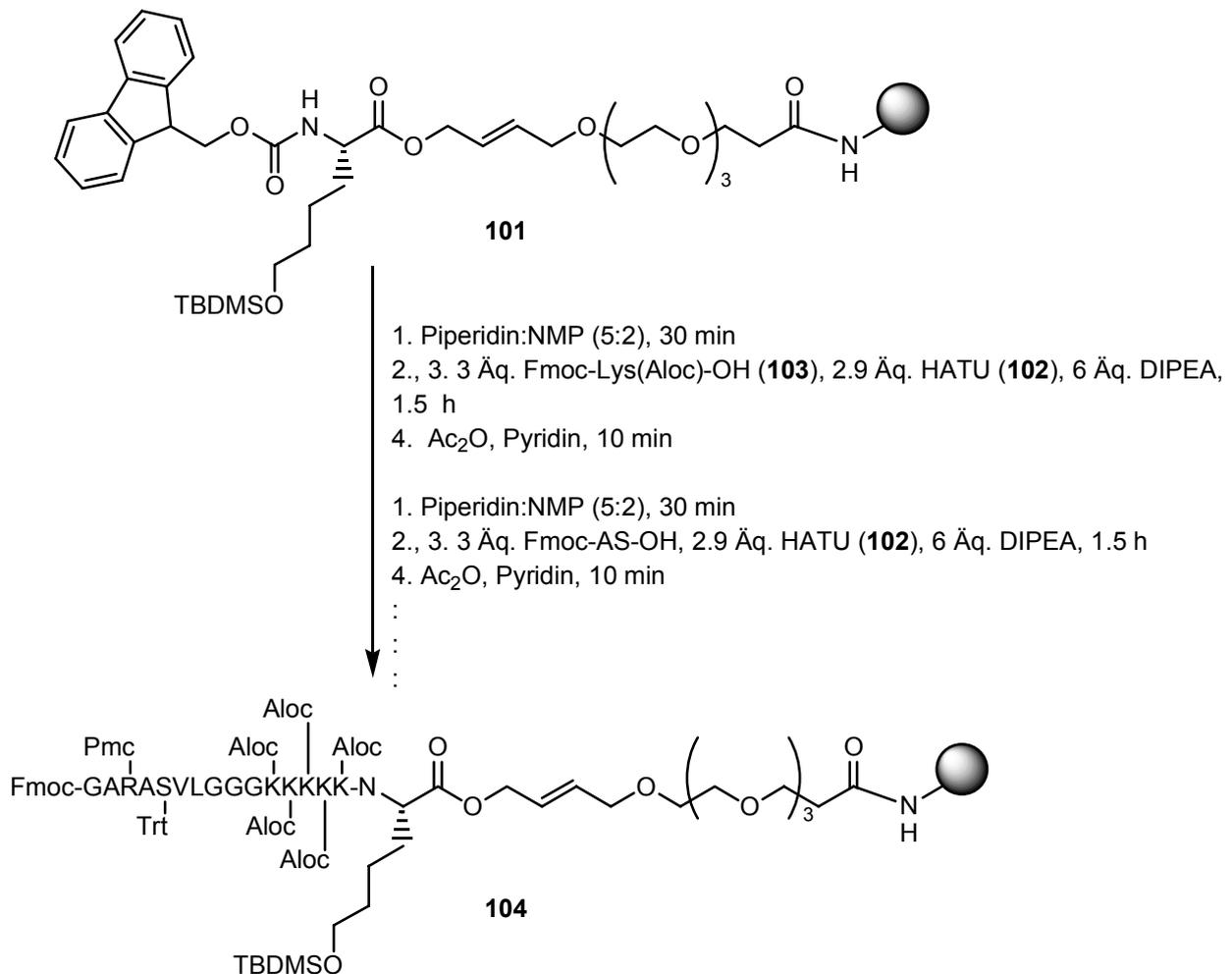
Der Aufbau des Peptides an fester Phase erfolgte mit 2-(1H-9-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) (**102**)<sup>[99]</sup> als Kupplungsreagenz und konsequentem Capping zwischen den einzelnen Kupplungsschritten, um Fehlsequenzen zu minimieren.

## Generelle Vorgehensweise bei der Kupplung der einzelnen Aminosäurebausteine

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus des am festen Träger angeknüpften Peptids erfolgte mit einer 40 %-igen Lösung von Piperidin in N-Methylpyrrolidinon (NMP). Dazu wurde das Harz in der Abspaltungsmischung geschüttelt und danach mit NMP und DMF gewaschen. Um die nächste Aminosäure anzubinden wurden 3 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure mit 6 Äquivalenten *N*-Ethyl-diisopropylamin und 2.95 Äq. HATU (**102**) in NMP für 2 min voraktiviert und danach zum Harz gegeben. Das Harz wird 1.5 h bei Raumtemperatur geschüttelt, danach gewaschen und die Kupplung nochmals wiederholt, um möglichst vollständigen Umsatz zu erhalten.

Um trotz Doppelkupplungen Fehlsequenzen durch freie N-Termini zu vermeiden wurde nach jedem Kupplungsschritt die unreaktierten Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid blockiert. Dazu wurde das Harz in einer Lösung von 10 % Essigsäureanhydrid in Pyridin geschüttelt und anschließend mit DMF und NMP gewaschen.

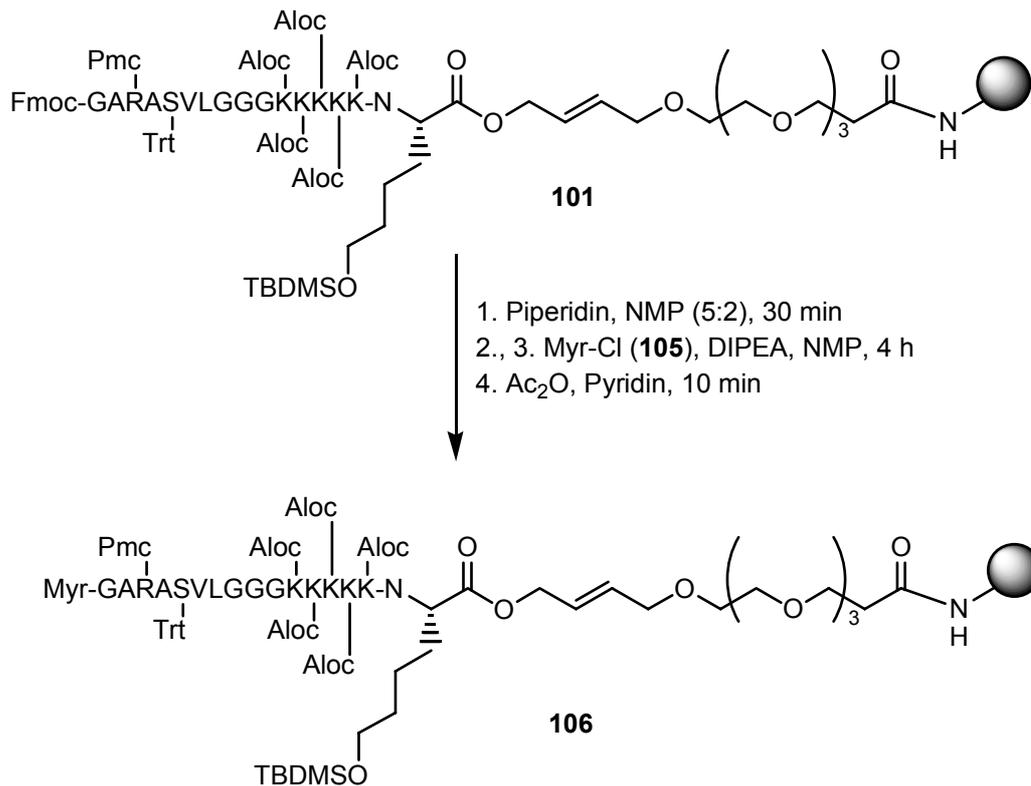
Als Seitenkettenschutzgruppe bei Lysin wurde die Aloc-Schutzgruppe gewählt, welche sich analog zum Hycronlinker mit Palladium(0) abspalten lässt. Für Serin wurde die Tritylschutzgruppe verwendet, welche unter sauren Bedingungen abgespalten werden kann, analog zur Pentamethylcromanylschutzgruppe für die Seitenkette des Arginins. Damit ist die Orthogonalität zwischen den einzelnen Schutzgruppen gewährleistet (Schema 45).



**Schema 45:** Aufbau des Peptides am festen Träger.

Nach obigen Bedingungen wurden die Aminosäuren an das an der festen Phase angebundene Peptid angeknüpft. Zwischen den Kupplungsschritten wurde durch Bestimmung der UV-Absorption des abgespaltenen Fmoc-Piperidin-Addukts die Beladung des Harzes kontrolliert. Nach Anknüpfung der letzten Aminosäure wurde eine Beladung von 0.21 mmol/g Harz errechnet.

Die Anbindung des Myristoylrestes konnte ebenfalls an der festen Phase durchgeführt werden. Dazu wurde zuerst die Fmoc-Schutzgruppe des letzten Glycins unter den gleichen, wie oben beschriebenen, Bedingungen mit Piperidin in NMP abgespalten (Schema 46).

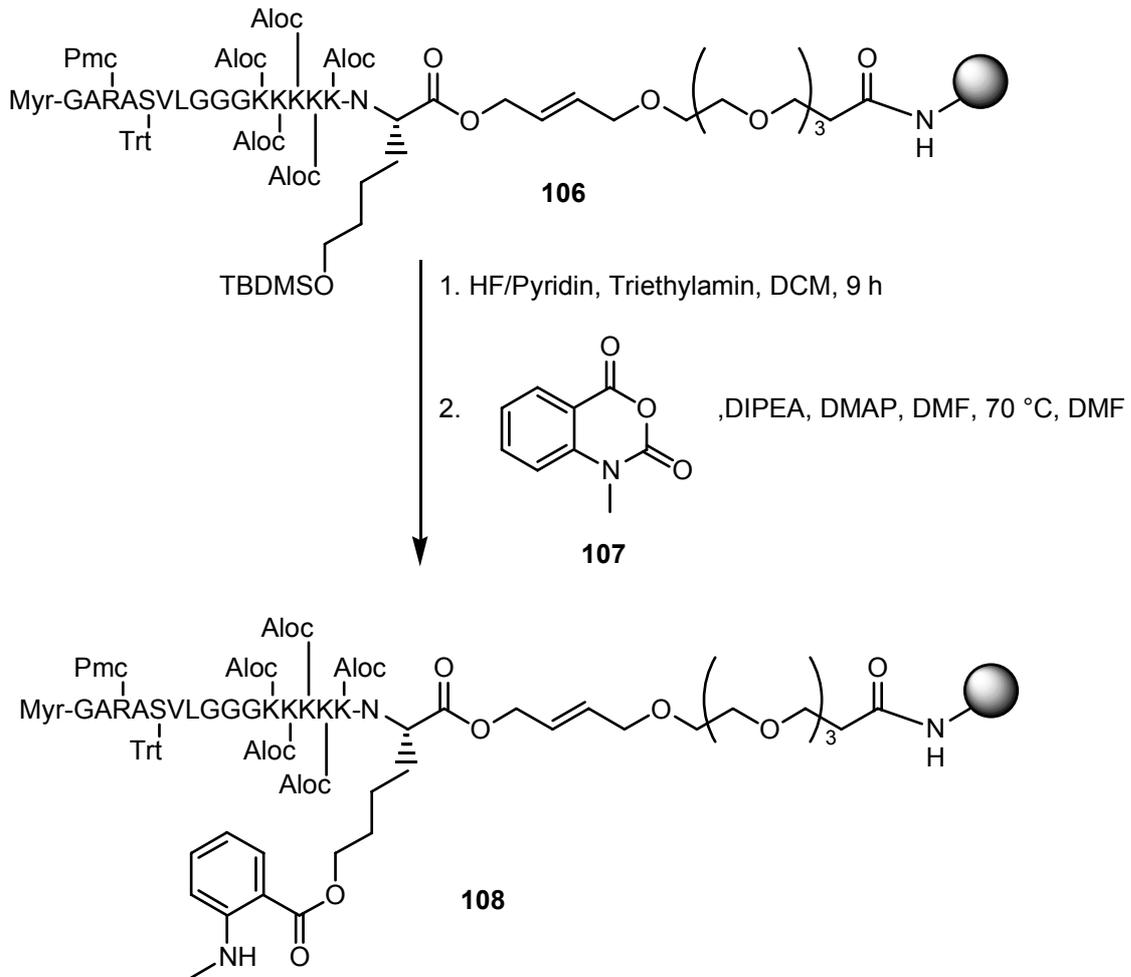


**Schema 46:** Anbindung des Fettrestes an das Peptid am festen Träger.

Das freie Amin wurde danach mit drei Äquivalenten Myristoylchlorid (**105**) und 6 Äquivalenten Ethyldiisopropylamin in NMP umgesetzt. Die Reaktionszeit wurde hierbei allerdings auf 4 h pro Kupplung verlängert. Der Kupplungsschritt wurde zweimal wiederholt bevor wiederum eine Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erfolgte, um Nebenreaktionen bei der nun folgenden Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers zu vermeiden.

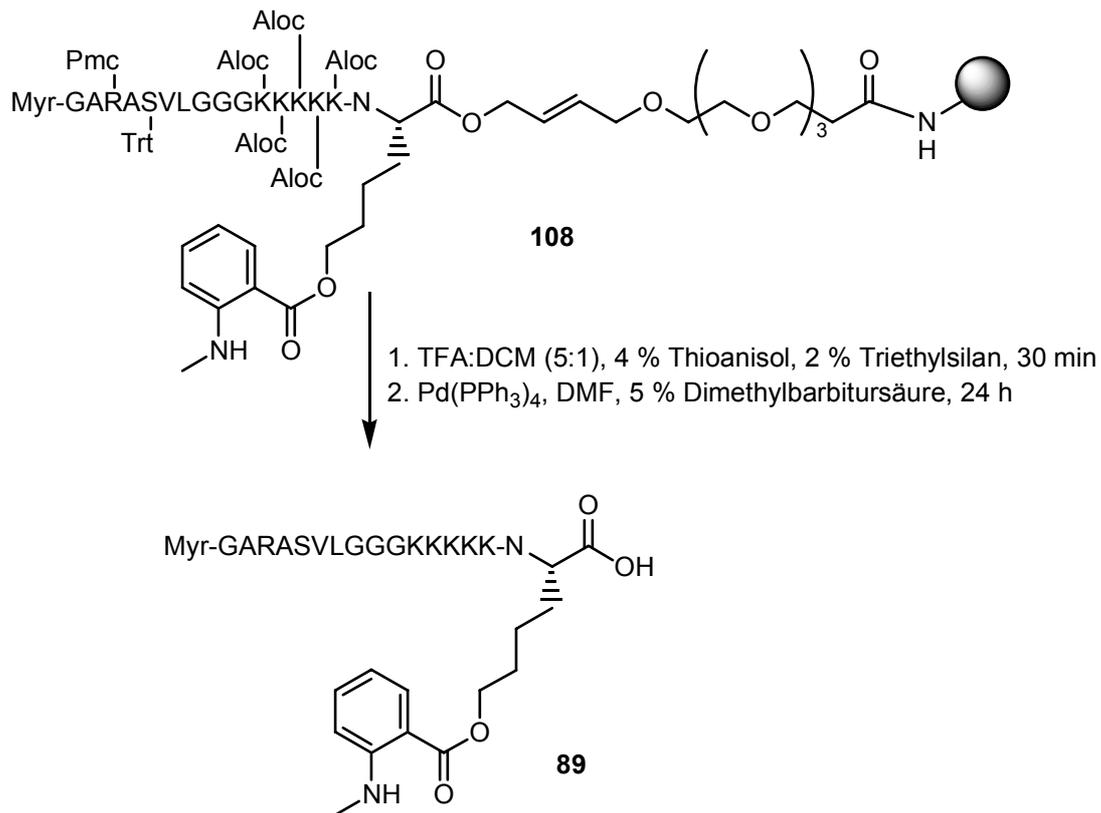
Um den Mantil-Rest an die modifizierte Aminosäure anzuknüpfen, musste zuerst die Schutzgruppe entfernt werden. Silylschutzgruppen können entweder sauer oder mit Fluoridionen abgespalten werden. Da auf der Serin- bzw. Argininseitenkette sauerabspaltbare Schutzgruppen gewählt wurden, konnte die Silylschutzgruppe selektiv nur mit Fluoridionen abgespalten werden (Schema 47). Die Deblockierung erfolgte mit HF/Pyridin in Dichlormethan bei Raumtemperatur.

Das nun entschützte Harz wurde danach mit einer Lösung aus *N*-Methylanthranilsäureanhydrid (**107**), Ethyldiisopropylamin und Dimethylaminopyridin in Dimethylformamid für 24 h bei 70 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF und Dichlormethan gewaschen und getrocknet.



**Schema 47:** Anknüpfung der Mantgruppe.

Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen wurde in einer Mischung aus 4 % Thioanisol, 2 % Triethylsilan in Dichlormethan : Trifluoressigsäure innerhalb von 30 min durchgeführt (Schema 48).



**Schema 48:** Abspaltung der Schutzgruppen und Ablösung vom Harz.

Um das Peptid (**89**) vom festen Träger abzuspalten, beziehungsweise die noch mit den Aloc-Schutzgruppen geschützten Lysinseitenketten freizusetzen, wurde das Harz mit einer Lösung von Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium (0) in Dimethylformamid mit 5 % Dimethylbarbitursäure behandelt. Das Lösungsmittel für die Palladium-Abspaltung wurde vorher entgast um unerwünschten Sauerstoff zu entfernen. Um die abgespaltenen Allylreste abzufangen wurde noch 5 % Dimethylbarbitursäure der Lösung beigesetzt (Schema 48). Nach 24 h wurde das Harz abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Danach wurde der Rückstand, um den Palladiumkatalysator zu entfernen über eine kurze Sephadexkartusche gereinigt.

Die anschließende Untersuchung mit MALDI und ESI-MS lieferte allerdings nicht die korrekte Masse. Desweiteren wurden auch keine Massen gefunden, welche auf Abbruchsequenzen bei der Synthese des Peptides schließen ließen. Auch wurde vor der Anknüpfung des Myristoylrestes noch eine Beladung von 0.21 mmol/g gemessen. Als Grund für die Degradierung des Peptides kamen daher nur

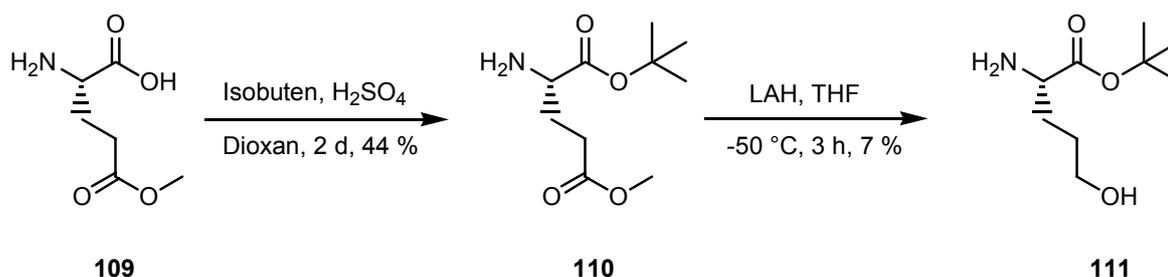
die harschen Bedingungen zur Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers in Frage. Da auf diesem Wege die Synthese des MPS-NLS-Konjugates (**89**) nicht möglich war wurde das Konzept umgestellt.

Einerseits wurde die Festphasensynthese so abgeändert, dass die Anknüpfung an den festen Träger über eine Seitenkette eines der Lysinbausteine erfolgen sollte. Dadurch konnte zuerst in N-terminaler Richtung das Peptid aufgebaut und anschließend in C-terminaler Richtung der fluoreszenzmarkierte Baustein angebunden werden. Andererseits wurde auch die Synthese des fluoreszenzmarkierten Bausteins geändert, da die Umsetzung von Benzoyloxycarbonyllysin (**90**) mit dem Natriumnitroprussid mit 63 % Ausbeute zwar befriedigend aber die Aufreinigung sehr aufwendig war.

#### 4.3.5. Synthese der fluoreszenzmarkierten Aminosäure

Die Synthese der fluoreszenzmarkierten Aminosäure lässt sich ausgehend von *L*-Glutaminsäure-5-methylester (**109**) erreichen. Dazu wurde zuerst die Säurefunktion in den *tert*-Butylester (**110**) umgewandelt. Dies konnte durch Schwefelsäure-katalysierte Umsetzung von *L*-Glutaminsäure-5-methylester (**109**) mit Isobuten in einem Druckgefäß mit Dioxan als Lösungsmittel erreicht werden.<sup>[100]</sup> Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte in 44 % Ausbeute die Verbindung (**110**) (Schema 49).

Die selektive Reduktion des Methylesters (**110**) konnte auf dieser Stufe mit Lithiumaluminiumhydrid bei -50 °C mit 7 % Ausbeute durchgeführt werden. Die nicht befriedigende Ausbeute lässt sich darauf zurückführen, dass der resultierende Aminoalkohol (**111**) sehr stark das Aluminium komplexiert.

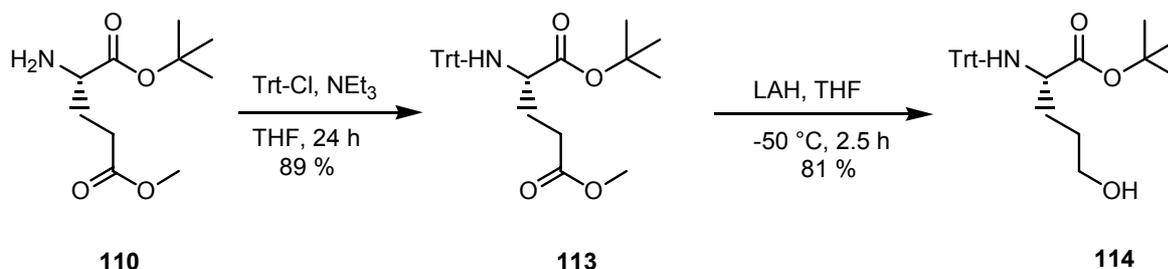


**Schema 49:** *tert*-Butylester-Schützung und selektive Reduktion des Methylesters.

Um die Ausbeute zu erhöhen wurde die Aminofunktion Trityl-geschützt. Die Trityl-Schutzgruppe wurde aufgrund ihrer Labilität gewählt, da sie sich unter deutlich schwächer sauren Bedingungen abspalten lässt als der *tert*-Butylester.

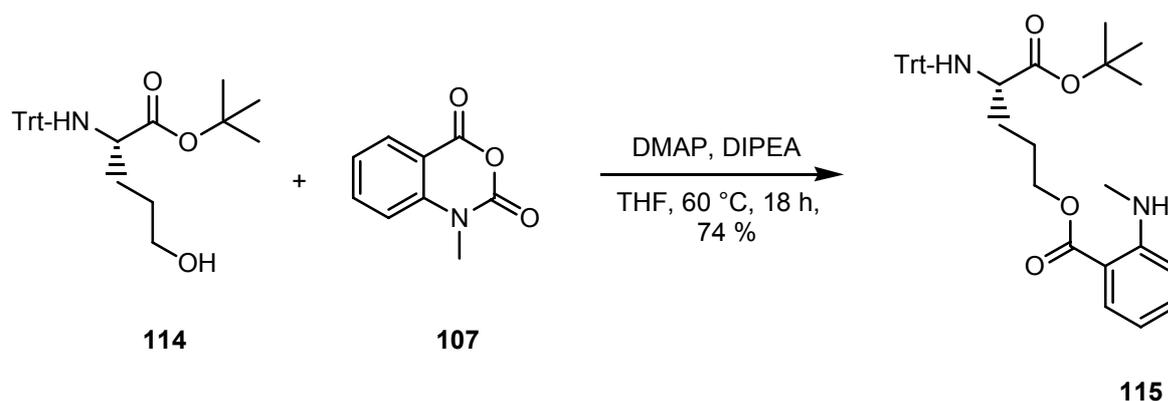
Die Blockierung der Aminofunktion wurde durch die Umsetzung von *L*-Glutaminsäure-5-methylester-*tert*-butylester (**110**) mit Triphenylmethylchlorid (**112**) erreicht. Um befriedigende Ausbeuten >85 % zu erreichen war die Wahl des Lösungsmittels und lange Reaktionszeiten von Bedeutung. Bei der Verwendung von DMF war kaum Umsatz zu beobachten, genauso waren bei Reaktionszeiten unter 4 h nur Ausbeuten um 20 % zu erzielen. Durch Umsetzung der geschützten Aminosäure mit 1.1 Äquivalenten Triethylamin und einem Äquivalent Tritylchlorid (**112**) in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur über 24 Stunden lässt sich die vollständig geschützte Aminosäure (**113**) in fast 90 % Ausbeute synthetisieren (Schema 50). Danach konnte die selektive Reduktion des Methylesters mit Lithiumaluminiumhydrid durchgeführt werden. Um zwischen dem Methyl- und dem *tert*-Butylester zu diskriminieren, wurde die Reaktion bei tiefen Temperaturen durchgeführt.

Dazu wurde die komplett geschützte Aminosäure (**113**) in Tetrahydrofuran gelöst und unter Argonatmosphäre auf -50 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 2.8 Äquivalente Lithiumaluminiumhydrid zugegeben und die Reaktionsmischung für 2.5 Stunden bei -50 °C gerührt. Um das überschüssige Hydrid abzufangen, wurde die Lösung anschließend bei Raumtemperatur mit gesättigter Natriumsulfatlösung versetzt. Nach 30 min konnte das entstandene Aluminiumhydroxid abfiltriert werden. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte mit 81 % Ausbeute ein farbloses Öl.<sup>[101]</sup>



**Schema 50:** Tritylschützung und selektive Reduktion des Methylesters.

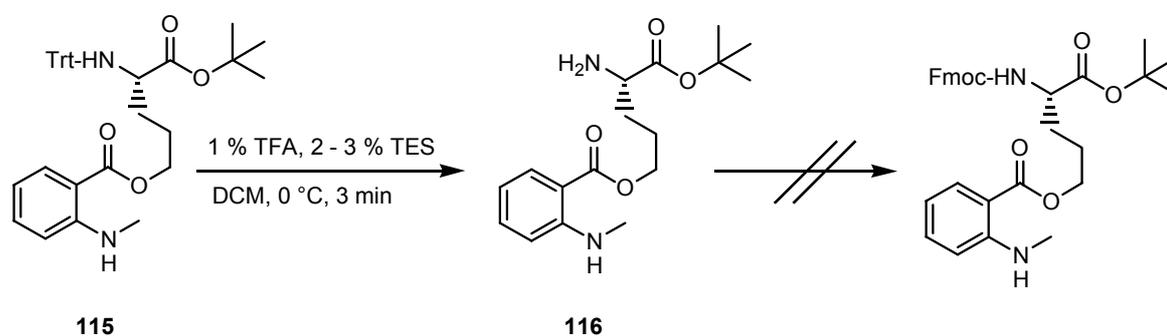
Die freigesetzte Hydroxyfunktion konnte nun mit *N*-Methylantranilsäureanhydrid (**107**) umgesetzt werden. Dazu wurde das N- und C-terminal geschützte Aminosäurederivat (**114**), DIPEA und eine katalytische Menge Dimethylaminopyridin in Tetrahydrofuran gelöst und auf 60 °C erhitzt und anschließend mit 1.1 Äquivalenten des Anhydrids (**107**) versetzt. Entscheidend für eine akzeptable Ausbeute war die langsame Zugabe des *N*-Methylantranilsäureanhydrids (**107**) (Schema 51). Direkte Zugabe der kompletten Menge ergab Ausbeuten von 10 - 30 %. Wurde die Zugabedauer auf 1-2 Stunden gestreckt, ließen sich bei Reaktionszeiten von 12 - 16 h ausreichende Ausbeuten von >70 % erreichen. Das technische *N*-Methylantranilsäureanhydrid (**107**) wurde vor der Umsetzung durch Umkristallisation aus Toluol gereinigt.



**Schema 51:** Anknüpfung der Mant-Gruppe.

Bei der Festphasensynthese sollte die Fmoc-Strategie in Kombination mit einem Chlortrityllinker<sup>[102,103]</sup> verwendet werden, deshalb musste die fluoreszenzmarkierte Aminosäure (**115**) am N-Terminus umgeschützt werden. Die Differenzierung

zwischen den beiden sauer abspaltbaren Schutzgruppen Trityl bzw. *tert*-Butyl war auf Grund der großen Labilität der Tritylschutzgruppe gegenüber Säuren möglich. Die Abspaltung der Tritylschutzgruppe konnte durch Behandlung der Verbindung (**115**) mit 1 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan bei 0 °C innerhalb von 3 Minuten mit Ausbeuten >75 % realisiert werden (Schema 52). Trotz der sehr kurzen Reaktionszeiten ist es notwendig ca. 2 - 3 % Triethylsilan der Abspaltungsmischung zuzugeben. Ohne Zugabe des Fängers für das Tritylkation wurde innerhalb der kurzen Reaktionszeit der Aromat der fluorophoren Gruppe in para-Position zur Aminogruppe quantitativ trityliert.



**Schema 52:** Abspaltung der Tritylschutzgruppe.

Die weitere Synthese war derart geplant, dass nach der Freisetzung der Aminofunktion diese wiederum mit der Fmoc-Schutzgruppe zu blockieren war, um im nächsten Schritt den *tert*-Butylester abzuspalten. Mit der freien Carboxyfunktion sollte anschließend das fluoreszenzmarkierte Aminosäurederivat an die feste Phase geknüpft werden. Die Schützung der freien Aminofunktion mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (**117**) konnte nicht durchgeführt werden.

Da auf der einen Seite die Schützung der freien Aminofunktion der Verbindung (**116**) nicht gelang, und auf der anderen Seite auch die selektive Abspaltung der *tert*-Butylgruppe in Gegenwart der Tritylgruppe schwierig ist, wurde die Strategie bei der Festphasensynthese geändert.

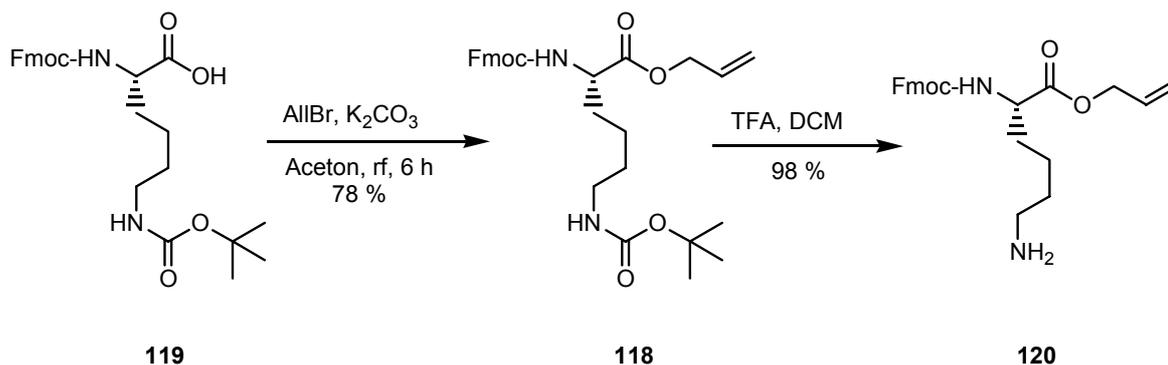
Die Anknüpfung an den festen Träger sollte nun über eine Seitenkette eines der Lysine erfolgen. Danach wurde das Peptid in N-terminaler Richtung inklusive der Anbindung des Myristoylrestes aufgebaut, wobei nach Freisetzung des C-Terminus die fluoreszenzmarkierte Aminosäure (**116**) angebunden werden sollte.

Für die Schutzgruppenstrategie ergab sich dadurch die folgende Möglichkeit. Die Anknüpfung an das Harz erfolgt über einen Trityllinker, welcher sauer gespalten werden kann. Da die Schutzgruppen der Seitenketten der einzelnen Aminosäuren erst nach der Synthese des kompletten Peptides abgespalten werden, können hier ebenfalls sauer abspaltbare Gruppen gewählt werden. Für die Argininseitenkette die Pmc-Gruppe<sup>[104]</sup>, welche mit 70 %-iger Trifluoressigsäure abgespalten werden kann. Unter diesen Bedingungen werden gleichfalls Boc-Schutzgruppen und Tritylgruppen abgespalten. Daraus ergaben sich die Schutzgruppen für die Lysinseitenketten und für die Hydroxyfunktion des Serins.

Die Synthese in N-terminaler Richtung wurde nach der Fmoc-Strategie durchgeführt, da bei dieser, wie weiter oben schon ausgeführt, die Beladung während der Synthese, und somit indirekt die Ausbeute, kontrolliert werden kann. Um danach in C-terminaler Richtung noch die fluoreszenzmarkierte Aminosäure anzubinden, musste die Carboxyfunktion des mit dem festen Träger verbundenen Lysins freigesetzt werden. Sauer bzw. basisch spaltbare Schutzgruppen konnten nicht verwendet werden, deshalb wurde für diese Position der Allylester gewählt, da dieser Palladium(0)-katalysiert abgespalten werden konnte.

#### 4.3.6. Aufbau voll geschützts Lysins

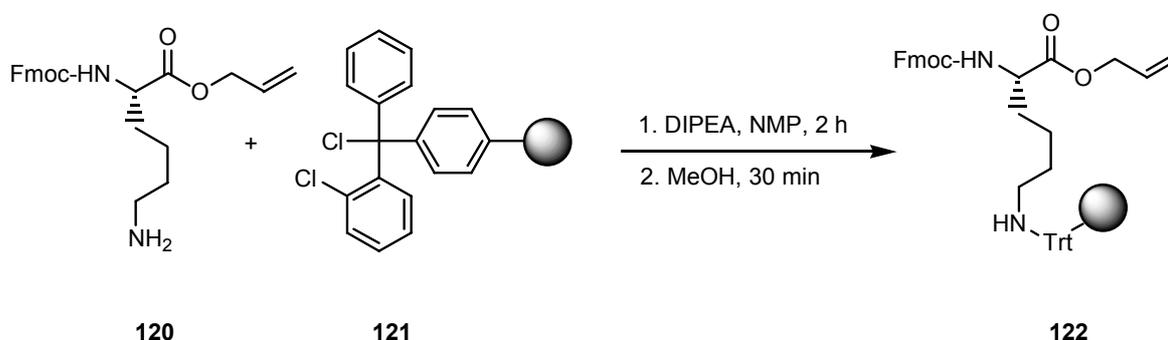
Ausgehend von  $N^{\alpha}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl- $N^{\epsilon}$ -*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysin (**119**) lässt sich durch Umsetzung mit Allylbromid die dreifach geschützte Aminosäure (**118**) darstellen.<sup>[105, 106]</sup> Die Umsetzung gelang in Aceton mit Kaliumcarbonat als Base in einer Ausbeute von 78 % (Schema 50). Um die Aminosäure über die Seitenkette an die feste Phase anzuknüpfen, musste diese zuerst geschützt werden. Die Boc-Schutzgruppe konnte durch Umsetzung der dreifach geschützten Aminosäure (**118**) mit TFA in Dichlormethan in 98 %-iger Ausbeute abgespalten werden (Schema 53).



**Schema 53:** Schützung des C-Terminus und Deblockierung der Seitenkette.

Die N- und C-terminal mit zueinander orthogonalen Schutzgruppen blockierte Aminosäure (**120**) bietet nun, nach der Anknüpfung an den festen Träger die Möglichkeit selektiv erst in N-terminaler und anschließend in C-terminaler Richtung das Peptid aufzubauen.

Als fester Träger wurde ein Chlortritylharz<sup>[107]</sup> mit einer maximalen Beladung von 1.47 mmol/g ausgewählt, welches die Abspaltung des Peptides unter schwach sauren Bedingungen ermöglichte. Um die Aminosäure anzubinden, wurde das Harz zuerst im Vakuum getrocknet und danach mit 10 % Diisopropylethylamin in DCM gewaschen. Für die Anknüpfung der ersten Aminosäure (**120**) wurde das Harz mit drei Äquivalenten der Aminosäure und sechs Äquivalenten *N*-Ethyl-diisopropylamin für zwei Stunden geschüttelt. Um nicht belegte Anknüpfungsstellen zu blockieren, wurde nach der zweiten Anknüpfung das Harz 30 min mit Methanol behandelt (Schema 54).



**Schema 54:** Anknüpfung der ersten Aminosäure (**120**) über die Seitenkette.

Die Beladung wurde über die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit anschließender Messung der UV-Absorption bestimmt.<sup>[108]</sup>

Dazu wurden 2 mg des getrockneten Harzes in einer UV-Küvette mit 3 ml einer 20 %-igen Piperidin-DMF-Lösung versetzt. Die Messung der UV-Adsorption bei 290 nm lieferte eine Beladung von 0.92 mmol/g Harz (63 %).

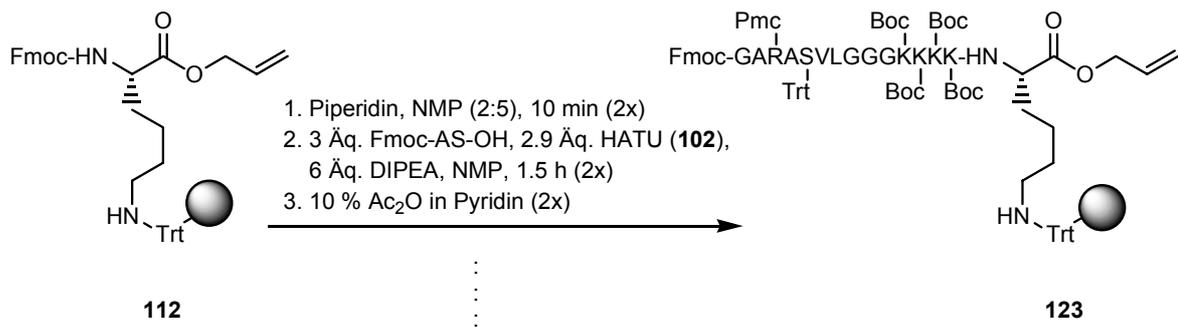
#### 4.3.7. Synthese des Peptidkonjugates an festen Phase

Der Aufbau des Peptides an fester Phase erfolgte wiederum mit 2-(1H-9-Aza-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HATU) (**102**) als Kupplungsreagenz und konsequentem Capping zwischen den einzelnen Kupplungsschritten um Fehlsequenzen zu minimieren.

#### Generelle Vorgehensweise bei der Kupplung

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus des am festen Träger angeknüpften Peptids erfolgte mit einer 40 %-igen Lösung von Piperidin in N-Methylpyrrolidinon (NMP). Dazu wurde das Harz in der Abspaltungsmischung geschüttelt und danach mit NMP und DMF gewaschen. Um die nächste Aminosäure anzubinden, wurden drei Äquivalenten der Fmoc-geschützten Aminosäure mit sechs Äquivalenten Hünigsbase und 2.95 Äq. HATU (**102**) in NMP für zwei Minuten voraktiviert und danach zum Harz gegeben. Das Harz wird 1.5 h bei Raumtemperatur geschüttelt, danach gewaschen und die Kupplung nochmals wiederholt um möglichst vollständigen Umsatz zu erhalten.

Um trotz Doppelkupplungen Fehlsequenzen durch freie N-Termini zu vermeiden wurde nach jedem Kupplungsschritt mit Essigsäureanhydrid gecapped. Dazu wurde das Harz in einer Lösung von 10 % Essigsäureanhydrid in Pyridin geschüttelt und anschließend mit DMF und NMP gewaschen (Schema 55).

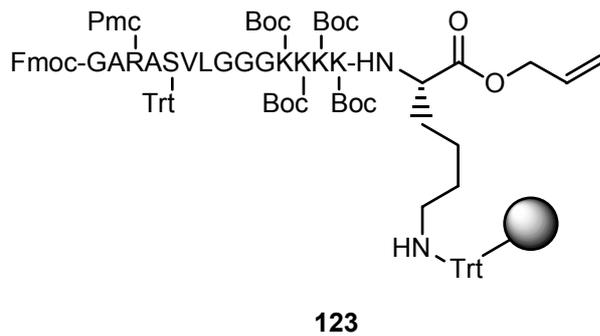


**Schema 55:** Aufbau des Peptides (**113**) an der festen Phase.

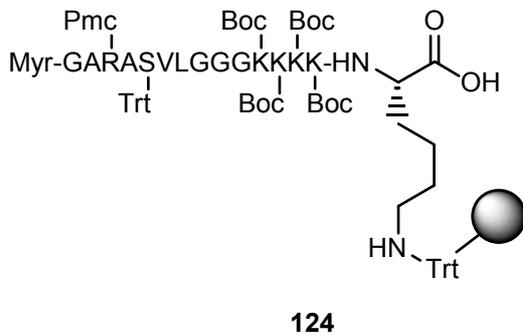
Nach jedem dritten Kupplungszyklus wurde jeweils die UV-Absorption gemessen. Nach Anknüpfung der letzten Aminosäure in N-terminaler Richtung wurde noch eine Beladung von 0.2 mmol/g bestimmt.

Die Anknüpfung des Myristoylrestes wurde ebenfalls an der festen Phase durchgeführt. Dazu wurde zuerst die Fmoc-Schutzgruppe des letzten Glycins unter den gleichen, wie oben beschriebenen, Bedingungen mit Piperidin in NMP abgespalten (Schema 53). Das freie Amin wurde danach mit vier Äquivalenten Myristoylchlorid (**105**) und acht Äquivalenten *N*-Ethyldiisopropylamin in NMP umgesetzt. Die Reaktionszeit wurde auch hier auf zwei Stunden pro Kupplung verlängert. Der Kupplungsschritt ist zweimal wiederholt worden, wonach wiederum eine Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erfolgte.

Um die Reaktion beziehungsweise den Peptidaufbau zu kontrollieren, wurde hier, nachdem der Fettsäurerest angebunden war, ein kleiner Teil des Peptides vom Harz abgespalten. Dazu wurden 5 mg des Harzes mit TFA für 2 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde direkt ein MALDI-Spektrum gemessen. Dieses lieferte die Massen des teilweise entschützten Peptides, da die Abspaltung der PMC-Schutzgruppe längere Abspaltungszeiten erfordert.



1. Piperidin:NMP (2:5), 10 min (2x)
2. 4 Äq. Myr-Cl (**102**), 8 Äq. DIPEA, NMP, 2 h (2x)
3. Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, 5 min (2x)
4. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 3 % Dimethylbarbitursäure, DMF, 4 h (2x)

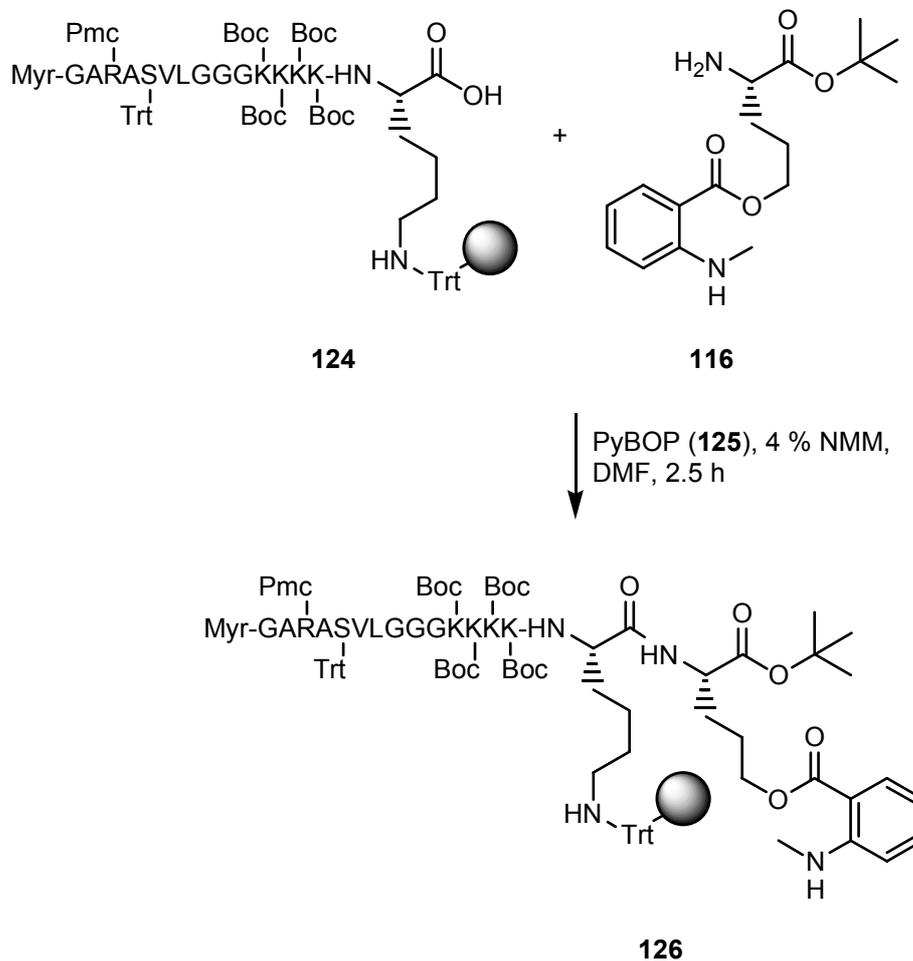


**Schema 56:** Anknüpfung des Myristoylrestes und C-terminale Entschützung.

Um nun C-terminal die fluoreszenzmarkierte Aminosäure (**116**) anzubinden, musste der Allylester gespalten werden. Dazu wurde ein Teil des mit dem myristoyliertem Peptid beladenen Harzes mit einer entgasten Lösung von Tetra-kistriphenyl-phosphinpalladium(0) in DMF mit 3 % Dimethylbarbitursäure versetzt um den abgespaltenen Allylrest abzufangen (Schema 56).

An das C-Terminal entschützte Peptid konnte nun das fluoreszenzmarkierte Aminosäurederivat (**116**) angekuppelt werden. Dazu wurde die fluoreszenzmarkierte Aminosäure (**116**) in einer Lösung von 4 % *N*-Methylmorpholin in Dimethylformamid gelöst. Als Kupplungsreagenz wurde für diesen Schritt Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphat (PyBOP) (**125**) verwendet. Dieses wurde mit dem Harz, ebenfalls in einer Lösung aus 4 % *N*-

Methylmorpholin in Dimethylformamid gelöst beziehungsweise suspendiert. Die Kupplungsdauer der Reaktion betrug 2.5 Stunden. (Schema 57).

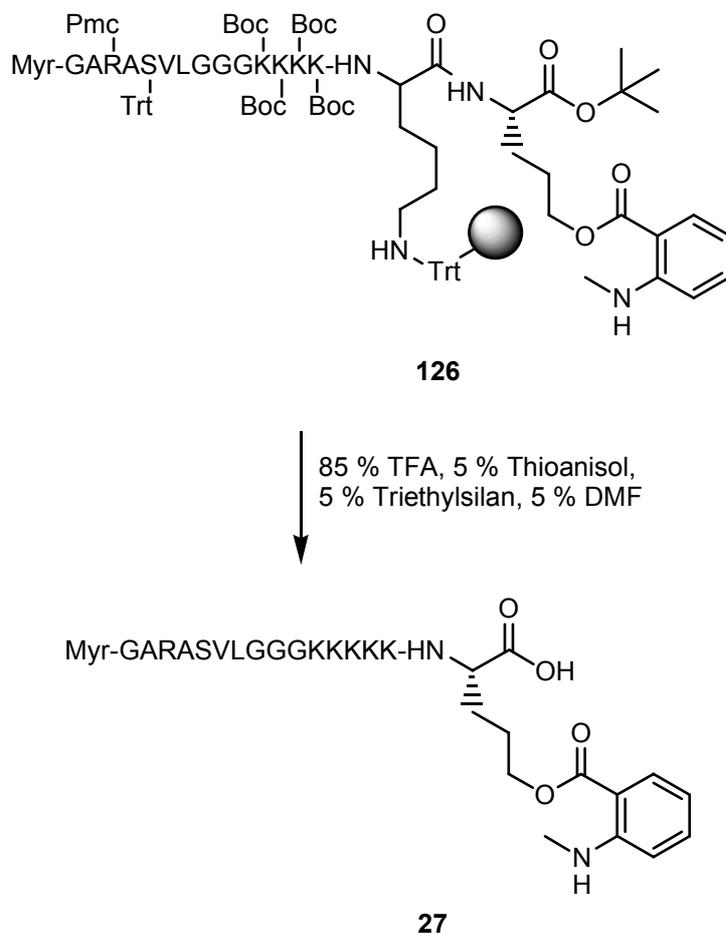


**Schema 57:** Anknüpfung der fluoreszenzmarkierten Aminosäure (**116**).

Das vollständig geschützte Peptid musste nun noch vom Harz abgespalten beziehungsweise entschützt werden. Da alle Schutzgruppen, die Pmc-Schutzgruppe des Arginins, die Tritylschutzgruppe des Serins und die Boc-Schutzgruppen der Lysine als auch der Linker säurekatalysiert gespalten werden, konnte dies in einem Schritt durchgeführt werden.

Während die Tritylschutzgruppe beziehungsweise der Trityllinker schon bei sehr geringen Säurekonzentrationen von 1 - 10 % gespalten werden, sind für die Boc-beziehungsweise für die Pentamethylcroman-6-sulfonylschutzgruppe des Arginins Säurekonzentrationen von 50 - 70 % Trifluoressigsäure erforderlich. Um weiterhin

Nebenreaktionen der abgespaltenen Kationen zu vermeiden, wurde als Fänger für das Tritylkation und das *tert*-Butylkation Triethylsilan zugesetzt. Die Abspaltung der Pmc-Schutzgruppe konnte durch den Zusatz von Thioanisol beschleunigt werden. Dadurch ergaben sich die Bedingungen für die Abspaltung des Peptides. Als Abspaltungsmischung wurde eine Lösung von 85 % TFA, 5 % Thioanisol, 5 % Triethylsilan und 5 % absolutem Dimethylformamid verwendet. Mit dieser Lösung wurde das Harz 30 Minuten behandelt, und anschließend mit Dimethylformamid gewaschen (Schema 58).



**Schema 58:** Abspaltung und gleichzeitige Entschützung des Peptides (**27**).

Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Peptid (**27**) durch präparative HPLC über eine C18HD-Trennsäule gereinigt. Eine anschließende massenspektroskopische Untersuchung des Produktes mittels MALDI lieferte die korrekte Masse des Peptides (**27**).

Damit konnte die Synthese des fluoreszenzmarkierten MPS-NLS-Konjugats (**27**) mit einer Ausbeute von 11 mg abgeschlossen werden, es wurde allerdings nur ein Teil des myristoylierten Peptides mit der markierten Aminosäure umgesetzt. Abschließende biologische Tests sollten die Funktion des Konjugats überprüfen.

#### 4.4. Biologische Tests

Um zu überprüfen ob das fluoreszenzmarkierte MPS-NLS-Konjugat (**27**) auch die gewünschten Eigenschaften besitzt, wurden biologische Tests durchgeführt.

Dazu sollten Zellen in einem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptidkonjugates über unterschiedlich lange Zeiten inkubiert werden.

Das an der festen Phase synthetisierte NLS-MPS-Konjugat (**27**) mit der Mant-Gruppe als Fluorophor sollte ins Medium gegeben werden. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen entnommen, gewaschen und auf einem Objektträger fixiert. Anschließend wurde eine mikroskopische Analyse zur Bestimmung der aufgenommenen Fluoreszenz durchgeführt. So kann gegebenenfalls eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Sequenzen in die Zelle beziehungsweise in den Kern importiert werden. Voraussetzung hierfür ist, daß die Mantfluoreszenz detektiert werden kann.

Zuerst wurden 20 Hela- und 4 RK13- Kulturschalen angeimpft. Diese wurden benötigt, um verschiedene Konzentrationen des Peptids einsetzen zu können, die zu definierten Zeitpunkten entnommen wurden. Dazu wurden die Endkonzentrationen von 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und von 30  $\mu\text{M}$  und die Zeitpunkte 4 min, 10 min, 30 min, 60 min und 180 min ausgewählt.

Den über Nacht angewachsenen Zellen wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  die jeweilige Peptidkonzentration beigemischt. Pro Zeitreihe wurden die verschiedenen Konzentrationen und eine Negativkontrolle betrachtet.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium gespült, zentrifugiert und nochmals gewaschen und mit Formaldehydlösung fixiert. Anschließend nochmal gewaschen und auf Objektträgern fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Die Fluoreszenz der mit dem Peptidkonjugat behandelten Zellen zeigte nur in sehr wenigen Fällen eine zu der Negativkontrolle vergleichbare bis gegebenenfalls

leicht stärkere Fluoreszenz. Wobei dies schon bei sehr niedrigen Konzentrationen und kurzen Zeiten der Fall war. Aber um eine definitive Aussage darüber zu fällen ob das Konjugat in die Zelle aufgenommen und in den Zellkern importiert wurde war die Fluoreszenz gegenüber der Eigenfluoreszenz zu schwach. Einer der Gründe warum kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte, liegt vielleicht darin, daß die Mant-Gruppe sehr schnell ausbleicht, was nur zu einer sehr kurzen Fluoreszenz führt.

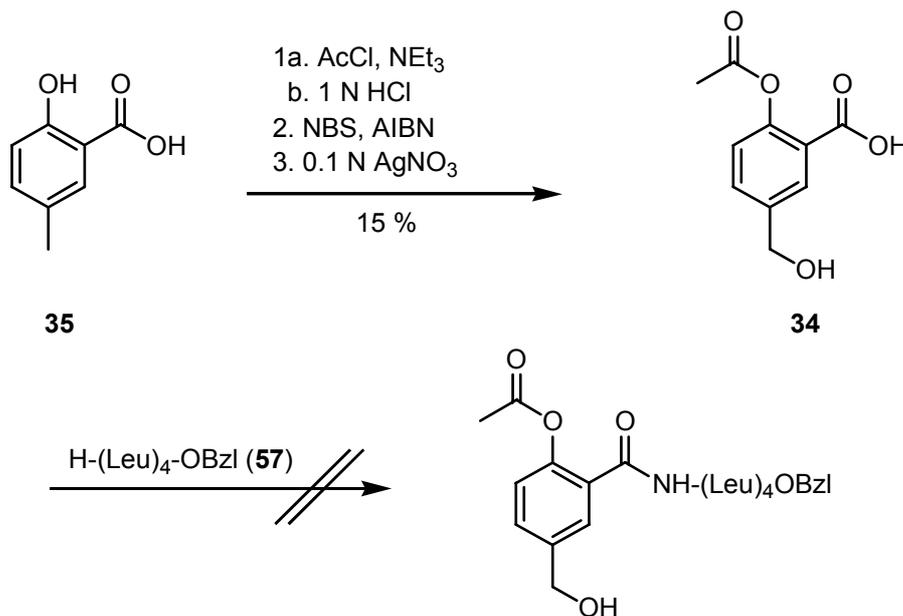
## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Synthese eines chemischen Vektors für die gezielte und einfache Einschleusung kleiner Reportermoleküle, Inhibitoren oder von genetischem Material in Zellen durchgeführt werden.

Dazu sollte im ersten Teil der Arbeit ein Linkersystem (**88**) aufgebaut werden, welches unter physiologischen Bedingungen fragmentiert oder enzymatisch gespalten wird um die transportierte Ladung freizusetzen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein fluoreszenzmarkiertes MPS-NLS-Konjugat (**27**) an der festen Phase aufgebaut, welches in biologischen Tests seine Funktionalität als Adress-Sequenz unter Beweis stellen sollte.

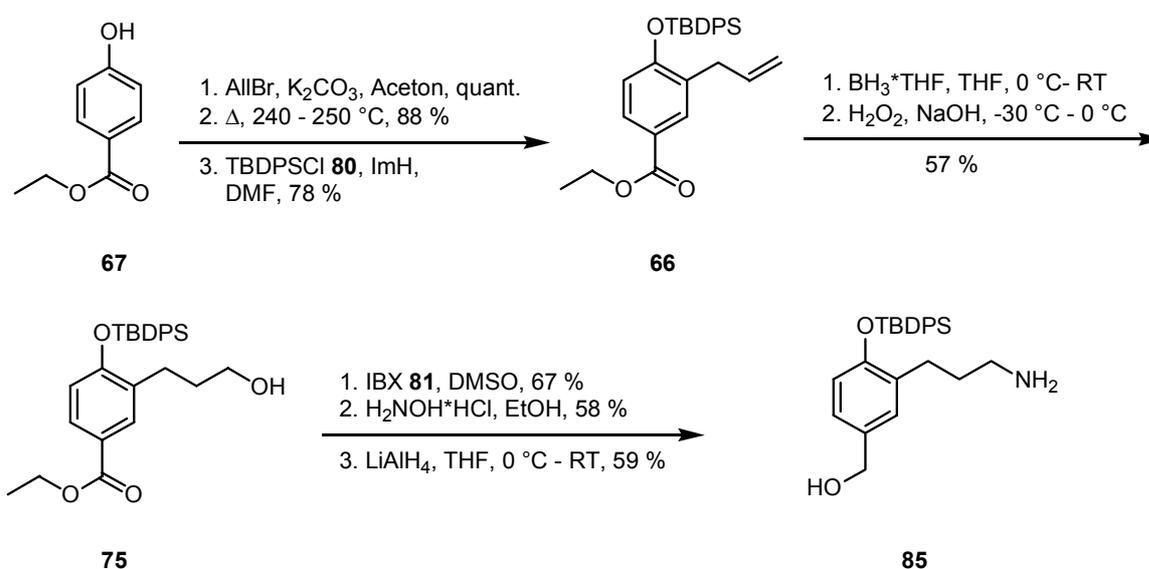


#### Schema 59:

Nach der zunächst verfolgten Synthesestrategie für das Linker-System konnte ausgehend von 5-Methylsalicylsäure (**35**) nach Acetylierung, radikalischer Bromierung und anschließender Hydrolyse die zu kuppelnde Carbonsäure (**34**) in einer Gesamtausbeute von 15 % dargestellt werden. Eine Verknüpfung mit dem in

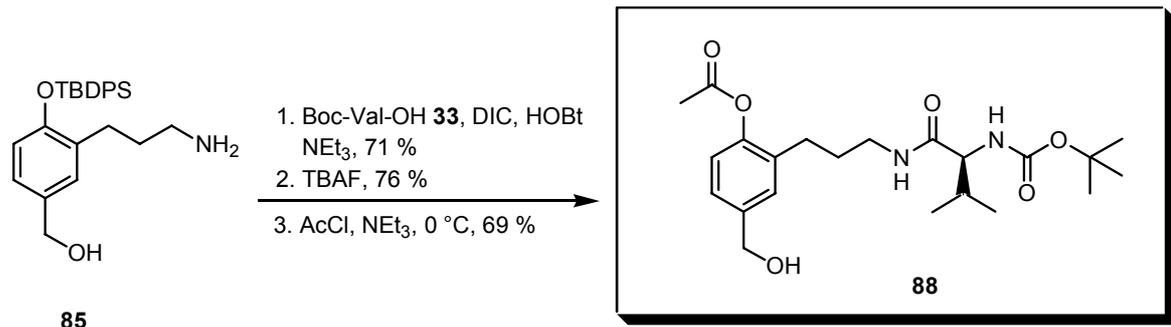
66 % Ausbeute synthetisierten Tetrapeptid (**57**) zur Modellverbindung gelang jedoch nicht (Schema 59). Auch die Variation des Abstandes der Carboxylgruppe vom aromatischen Ring führte zu keinem brauchbaren Ergebnis.

Im weiteren Verlauf der Dissertation wurde aufgrund dieser Tatsache entschieden, die Anknüpfung der Adress-Sequenz über eine Aminofunktion zu bewerkstelligen. Hierfür wurde 4-Hydroxybenzoesäureethylester (**67**) durch Allylierung, nachfolgende Claisen-Umlagerung und abschließende Blockierung der phenolischen Hydroxyfunktion zur Verbindung (**66**) umgesetzt. Diese konnte durch Hydroborierung und anschließender Hydrolyse in den Alkohol (**75**) überführt werden. Oxidation mit IBX (**81**), Umsetzung mit Hydroxylamin und finale Reduktion lieferte den Linkerbaustein (**85**) (Schema 60).



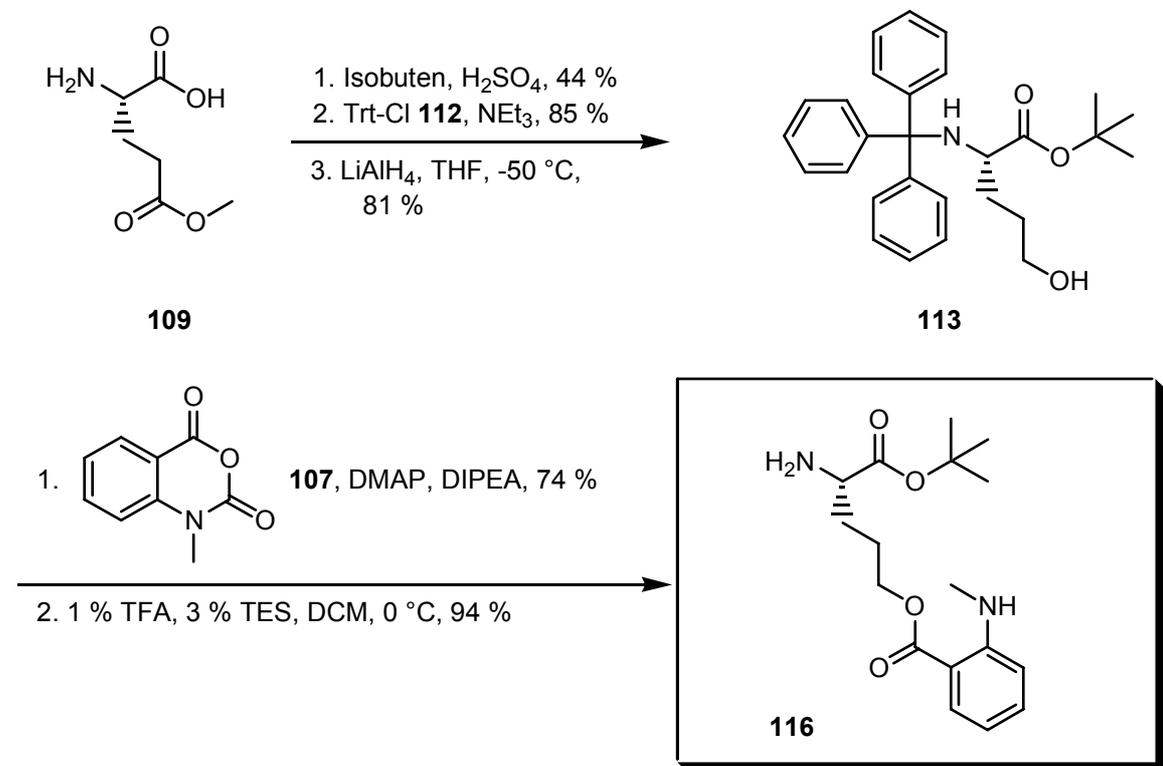
**Schema 60:** Synthese des Linkervorläufers (**85**).

Nach erfolgter Kupplung mit Boc-*L*-Valin (**33**) wurde desilyliert und abschließend acetyliert. Auf diesem Wege konnte das Linkersystem (**88**) als die zentrale Einheit für den chemischen Vektor dargestellt werden.



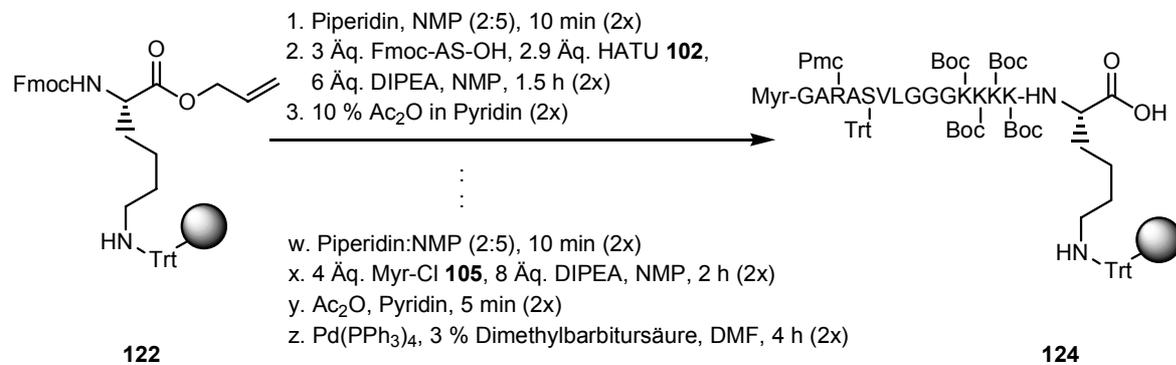
**Schema 61:** Anknüpfung der ersten Aminosäure an das Linkersegment (**88**).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte ein MPS-NLS-Konjugat an fester Phase aufgebaut werden. Hierfür wurde folgende Sequenz ausgewählt: Myr-Gly-Ala-Ser-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Glu(O-Mant)-COOH (**27**). Die Mant-Gruppe als Fluorophor trägt hierbei ein in der Seitenkette modifiziertes Glutaminsäurederivat. Für dessen Darstellung wurde *L*-Glutaminsäure-5-methylester (**109**) nach vollständiger Schützung selektiv reduziert. Anschließend wurde die Mant-Gruppe eingeführt und abschließend selektiv entschützt. So konnte die kupplungsfähige, modifizierte Glutaminsäure (**116**) dargestellt werden.



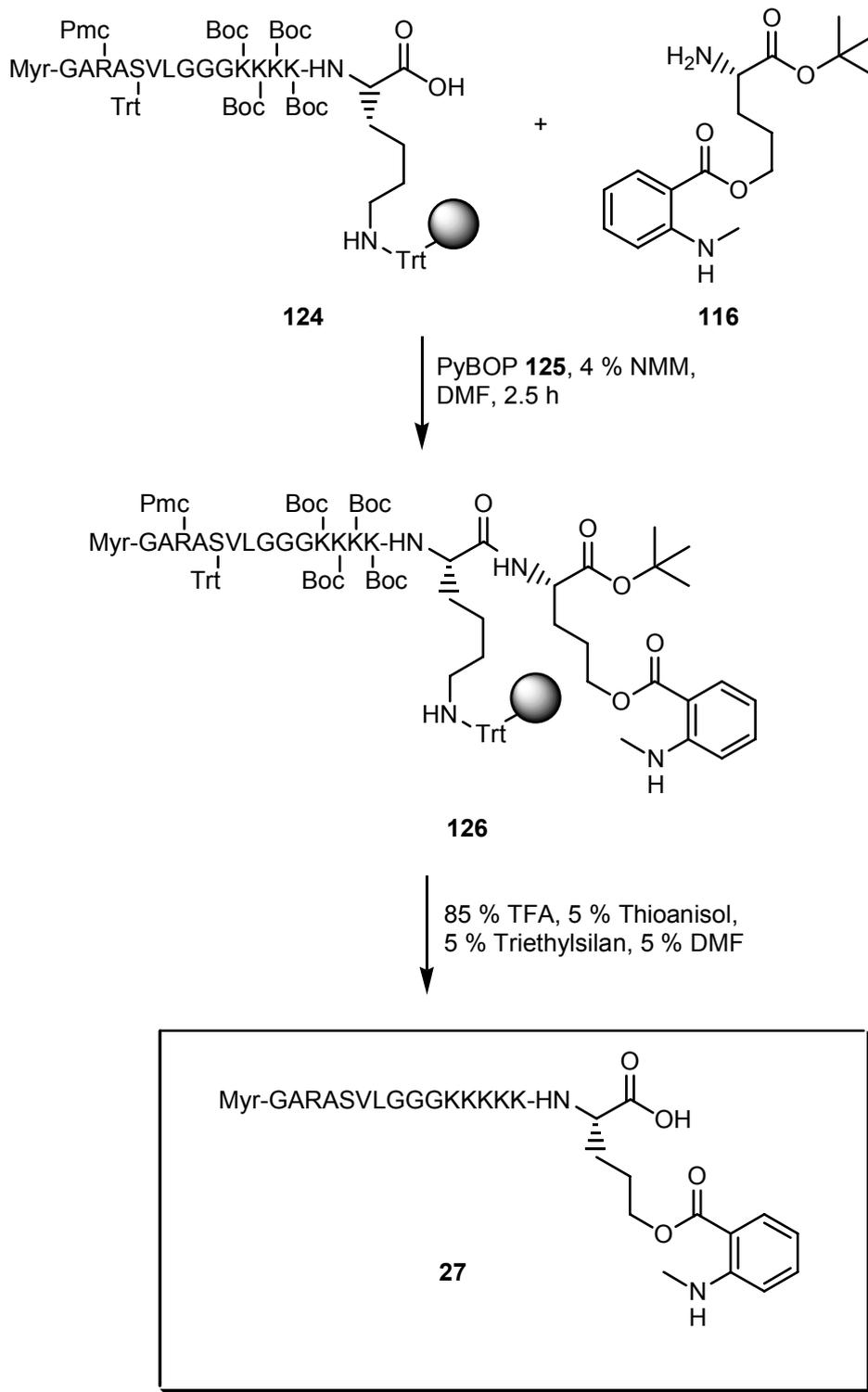
**Schema 62:** Aufbau der fluoreszenzmarkierten Aminosäure (**116**).

Die Festphasensynthese der Peptid-Sequenz erfolgte an Chlortrityl-modifiziertem Polystyrolharz nach einer Schutzgruppenstrategie, die sämtlich sauer abspaltbare Gruppen beinhaltet. Die Anknüpfung erfolgte über die Seitenkette des ersten Lysins von der C-terminalen Seite her betrachtet. Dazu wurde Fmoc-Lys(Boc)-OH (**118**) am C-Terminus als Allylester blockiert. Die Abspaltung der Boc-Gruppe in der Seitenkette lieferte in quantitativer Ausbeute das an C- und N-Terminus blockierte Lysin (**120**). Dieses wurde an den festen Träger angebunden und anschließend das Peptid in N-terminaler Richtung mit HATU (**102**) als Kupplungsreagenz aufgebaut. Die Anbindung des N-terminalen Myristoylrestes konnte ebenfalls an der festen Phase durchgeführt werden (Schema 63).



**Schema 63:** Aufbau des myristoylierten N-terminalen Teil des Peptidkonjugats.

Da die Anbindung des Peptides an das Harz über eine Seitenkette erfolgte, konnte aufgrund der Wahl der Schutzgruppen selektiv der C-Terminus Palladium(0) katalysiert entschützt werden und das fluoreszenzmarkierte Aminosäurederivat angeknüpft werden. Die Abspaltung beziehungsweise vollständige Entschützung wurde nun in einem letzten Schritt, da alle Schutzgruppen und der Linker sauer abspaltbar waren, durchgeführt. Nach erfolgter Reinigung durch präparative HPLC konnten 11 mg des fluoreszenzmarkierten MPS-NLS-Konjugates erhalten werden (Schema 64).



**Schema 64:** Anbindung der fluoreszenzmarkierten Aminosäure (116) und Abspaltung bzw. Entschützung

Die durchgeführten biologischen Tests zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Peptidkonjugats lieferten auf Grund der schwachen Fluoreszenz-Ausbeute keine brauchbare Aussagen bezüglich des Zell-Imports des MPS-NLS-Konjugats (**27**).

## **5.2. Ausblick**

In weiterführenden Arbeiten ist geplant, die biologischen Tests mit einem anderen Fluorophor zu wiederholen. Es sollten MPS-Sequenzen gefunden werden, die einen selektiven Transport in Zellen ermöglichen. Mit diesen Sequenzen ließe sich dann die Funktionsfähigkeit des dargestellten chemischen Vektors beweisen. Man hätte damit ein wertvolles Werkzeug in der Hand, um Reportermoleküle und Inhibitoren nicht invasiv in Zellen einzuschleusen.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1. Allgemeines und Messgeräte

#### Kernresonanzspektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -, und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

250 MHz $^1\text{H}$ -NMR	Bruker AC 250
400 MHz $^1\text{H}$ - und 100.6 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR	Bruker AM 400
400 MHz $^1\text{H}$ -, 100.6 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR	Varian Mercury 400
500 MHz $^1\text{H}$ -, 125.7 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR	Bruker DRX 500

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  beziehen sich auf Tetramethylsilan als internen Standard und sind in ppm angegeben. Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben und die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br = stark verbreitertes Signal.

#### Massenspektrometrie

Die 70 eV Elektronenionisations- (EI) und die FAB-Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Als Matrix wurde bei den FAB-MS-Spektren *m*-Nitrobenzylalkohol benutzt.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einer Voyager BioSpectrometry<sup>TM</sup> Workstation und einer Voyager-DE Pro BioSpectrometry<sup>TM</sup> Workstation der Firma PerSeptive Biosystems aufgenommen mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix.

#### Spezifische Drehwerte

Die spezifischen Drehwerte  $[\alpha]_D^{20}$  wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 und einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 gemessen. Das verwendete Lösungsmittel und die Konzentration ist jeweils angegeben.

## Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Schmelzpunktmessgerät 530 gemessen und sind nicht korrigiert.

## Chromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) benutzt. Zur Detektion wurde UV-Licht ( $\lambda = 254\text{nm}$ ,  $366\text{nm}$ ) und zur Anfärbung folgende Reagenzien verwendet:

1. 2.5 g Molybdätdiphosphorsäure, 1 g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure in 94 ml Wasser.
2. 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure in 997 ml Ethanol.
3. 5 g Kaliumpermanganat in 100 ml Wasser.
4. 1 ml 3-Methoxyphenol, 499 ml Ethanol, 56 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 444 ml Wasser.

Die entsprechenden Laufmittel und R<sub>f</sub>-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel der Firma Baker (Korngröße 40-60  $\mu\text{m}$ ) mit einem Überdruck von 0.3-0.8 bar.

Für die präparative Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie (HPLC) wurde eine Varian Pro Star Anlage mit einem Varian Detektor Model 340 benutzt. Die verwendeten Säulen sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

Für die analytische HPLC wurde eine Hewlett Packard Serie 1100 Anlage genutzt. Die verwendeten Säulen sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

## Chemikalien

Alle benutzten L-Aminosäuren wurden von der Degussa AG gespendet. Alle übrigen Chemikalien und Harze wurden je nach Verfügbarkeit von den Firmen Acros Chimica, Aldrich, Bachem, Fluka, Riedel de Haen und Senn Chemicals bezogen.

## Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach Standardverfahren absolutiert.<sup>[110]</sup>

## 6.2. Experimentelles

### 6.2.1. Versuche zu Kapitel 4.1.1.

#### Enzymatische Spaltung von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-valinyl-*p*-phenylacetylaminobenzylester (**32**)

Zu einer Lösung von 10.7 mg (0.025 mmol) 2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-methylbutansäure-4-phenylacetylaminobenzylester (**32**) in 0.2 ml Methanol und 1.8 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7) werden 100 u immobilisierte Penicillin-G-Acylase gegeben. Die Pufferlösung wird für 24 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wird das polymergebundene Enzym abfiltriert und das Filtrat mit 1 N HCl auf pH 2 angesäuert und 3 mal mit 10 ml Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 4.2 mg (0.0195 mmol, 78 %)

R<sub>f</sub>: (Hexan:Ethylacetat 1:2 (v/v) + 1 % Essigsäure) = 0.31

$[\alpha]_D^{20}$ : - 6.9 ° (c = 0.01, MeOH)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, MeOD): δ = 5.02 (bs, 1H, NH), 4.31-4.25 (m, 1H, α-CH), 2.32-2.10 (m, 1H, β-CH), 1.42 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 1.05-0.90 (d, d, J = 8 Hz, 6H, 2 CH<sub>3</sub>, γ-CH<sub>3</sub>).

## 6.2.2. Versuche zu Kapitel 4.1.2.

### 2-Acetoxy-5-methylbenzoesäure (36)

Zu einer Lösung von 1.00 g (6.57 mmol) 5-Methylsalicylsäure (**35**) und 1.83 ml (13.2 mmol) Triethylamin in 100 ml Ethylacetat werden bei 0 °C 0.94 ml (13.2 mmol) Acetylchlorid langsam über 10 min zugegeben. Danach wird das Eisbad entfernt und die Reaktion eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid wird abfiltriert und das Filtrat mit 100 ml 1 N Salzsäure versetzt. Nach 10 Stunden Rühren wird die Lösung durch Zugabe gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH = 4 eingestellt. Die leicht saure Lösung wird 3 mal mit je 50 ml Chloroform extrahiert, die organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das farblose Produkt wird aus Ethylacetat:Hexan umkristallisiert.

Weisse Kristalle

Ausbeute: 1.21 g (95 %)

R<sub>f</sub>: (Chloroform:Methanol 5:1 (v/v)) = 0.77

Schmelzpunkt: 137 °C

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.92 (d, J = 2 Hz, 1H, arom. H), 7.42 (dd, J = 2 Hz, J' = 8 Hz, 1H, arom. H), 7.02 (d, J' = 8 Hz, 1H, arom. H), 2.40 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-).

### 2-Acetoxy-5-brommethylbenzoesäure (38)

Unter Argon-Atmosphäre werden 1 g (5.15 mmol) 2-Acetoxy-5-methylbenzoesäure (**36**), 0.58 g (6.52 mmol) N-Bromsuccinimid und 17 mg AIBN in abs. CCl<sub>4</sub> gelöst und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Danach kühlt man auf 0 °C, filtriert den Niederschlag ab und wäscht dreimal mit Pentan nach. Der Kristallbrei wird in Chloroform aufgenommen und dreimal mit je 15 ml kaltem Wasser gewaschen

und die organische Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Es erfolgt keine weitere Aufarbeitung, die Reinigung erfolgt nach der nächsten Stufe.

gelbliches Feststoffgemisch

Ausbeute: 814 mg (58 % abgeschätzt anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums)

Im  $^1\text{H-NMR}$  wurde 26 % dibromiertes Produkt gefunden

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.14 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, arom H), 7.64 (dd,  $J$  = 2 Hz,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, arom. H), 7.11 (d, 1H, arom. H), 4.49 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ), 2.36 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CO-}$ ).

### **2-Acetoxy-5-hydroxymethylbenzoesäure (34)**

Vom Rohprodukt aus der Darstellung der 2-Acetoxy-5-brommethylbenzoesäure (**38**) löst man 1.3 g (2.76 mmol, entspricht 0.8 g oder 2.98 mmol vom monobromierten Edukt) in 25 ml Dioxan. Dazu gibt man 30 ml wässrige 0.1 N  $\text{AgNO}_3$ -Lösung und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Wasser/Dioxan-Gemisch 10 mal mit je 30 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet.

Nach Entfernen des Lösungsmittels bei reduziertem Druck wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie, Eluens Chloroform:Methanol 15:1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 0.16 g (26 %)

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.03 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, arom. H), 7.55 (dd,  $J$  = 2 Hz,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, arom. H), (d, 1H, arom. H), 4.67 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2.31 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).

### 2-Acetoxy-5-formylbenzoesäure (41)

Zu einer Lösung von 1.00 g (6 mmol) 5-Formylsalicylsäure (**40**) und 1.67 ml (12 mmol) Triethylamin in 80 ml Ethylacetat werden bei 0 °C 0.85 ml (12 mmol) Acetylchlorid gegeben. Nach 5 min wird das Eisbad entfernt und danach wird die Lösung eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Hydrosalz wird abfiltriert und das Filtrat mit 100 ml 1 N HCl versetzt. Nach 18 h wird die Lösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 4 gebracht und 3 mal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird aus Ethylacetat und Hexan umkristallisiert und liefert 0.96 g eines weissen Feststoffes.

Ausbeute: 0.96 g (4.6 mmol, 77 %)

Smp.: 124 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 10.08 (s, 1H, -CHO), 8.63 (d, J = 2 Hz, 1H, arom. H, H-6), 8.15 (dd, J = 2 Hz, J' = 10 Hz, 1H, arom. H, H-4), 7.33 (d, J' = 10 Hz, 1H, arom. H, H-3), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### 6.2.3. Versuche zu Kapitel 4.1.3.

#### 4-Brommethyl-2-hydroxybenzoesäure (44)

In eine Lösung von 20 g (145 mmol) Salicylsäure (**43**) und 10 g (127 mmol) einer 38 %-igen Formalinlösung in 150 g (88.9 mmol) einer 48 %-iger Bromwasserstoffsäure wird durch Zutropfen von 25 ml Brom in 250 ml Tetralin über 3 h Bromwasserstoff eingeleitet. Dabei wird die Lösung stark gerührt. Nach dem Einleiten wird die Lösung noch eine Stunde weiter bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird filtriert und der Kristallbrei in 60 ml Ethylenchlorid umkristallisiert.

Ausbeute: 17.34 g (75 mmol, 52 %)

Schmelzpunkt: 183 °C

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, MeOD):  $\delta$  = 7.92 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, arom. H), 7.53 (dd,  $J$  = 2 Hz,  $J'$  = 8 Hz, 1H, arom. H), 6.94 (d,  $J'$  = 8 Hz, 1H, arom. H), 4.52 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ).

### **2-Hydroxy-4-hydroxymethylbenzoesäure (42)**

12.3 g (53.4 mmol) 4-Brommethyl-2-hydroxybenzoesäure (**44**) werden für 19 h in einem Gemisch aus 50 ml Wasser und 200 ml Aceton gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rückstandes erfolgt durch Umkristallisation aus 50 ml Ethylenchlorid.

Ausbeute: 4.0 g (23.8 mmol, 45 %)

Schmelzpunkt: 137 °C

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, MeOD):  $\delta$  = 8.01 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, arom. H), 7.59 (dd,  $J$  = 2 Hz,  $J'$  = 8 Hz, 1H, arom. H), 6.96 (d,  $J'$  = 8 Hz, 1H, arom. H), 4.74 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ).

### **2-Acetoxy-5-hydroxymethylbenzoesäure (34)**

Zu einer Lösung von 0.10 g (0.6 mmol) 4-Hydroxymethylsalicylsäure (**34**) und 0.16 ml (1.2 mmol) Triethylamin in 5 ml Ethylacetat werden bei 0 °C 85  $\mu\text{l}$  (1.2 mmol) Acetylchlorid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Hydrochlorid wird abfiltriert und die Lösung durch Zugabe von 3 ml 1 N Salzsäure angesäuert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der pH-Wert mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf 4 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird 3 mal mit 15 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulen-

chromatographische Aufreinigung, Eluens Chloroform:Methanol (15 : 1 (v/v)) lieferte 112 mg eines farblosen Öls.

Ausbeute: 112 mg (5,3 mmol, 88 %)

$R_f$ : (Chloroform:Methanol 10:1 (v/v)) = 0.46

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.03 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, arom. H), 7.55 (dd,  $J$  = 2 Hz,  $J'$  = 7.6 Hz, 1H, arom. H), (d, 1H, arom. H), 4.67 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2.31 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).

#### 6.2.4. Versuche zu Kapitel 4.1.4.

##### **L-Leucinbenzylester-Hydrotosylat (51)**

Man verreibt 6.6 g (0.05 mol) *L*-Leucin (**49**) mit 11.5 g (0.06 mol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 37 ml Benzylalkohol (**53**) und versetzt mit 350 ml Benzol. Es wird solange unter Rückfluss erhitzt, bis sich alles Wasser abgeschieden hat. Beim Abkühlen fällt der *L*-Leucinbenzylester (**51**) als weisser Feststoff aus. Zur Reinigung wird aus MeOH:Et<sub>2</sub>O umkristallisiert.

weisser Feststoff

Ausbeute: 15.01 g (76 %)

$R_f$ : (Hexan/Essigester 1:1 (v/v)) = 0.33

$[\alpha]_D^{20}$ : - 1.4 ° (c = 1, MeOH)      [-1.7 °, c = 0.5, MeOH<sup>[111]</sup>]

Schmelzpunkt: 154 °C      [157 °C<sup>[112]</sup>]

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.73-7.16 (m, 9H, arom. H), 5.34-5.22 (m, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-Ph}$ ), 4.04 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 2.36 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  Tos), 1.83-1.57 (m, 3H,  $\beta\text{-CH}_2$ ,  $\gamma\text{-CH}$ ), 1.00-0.90 (m, 6H, 2  $\delta\text{-CH}_3$ ).

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*L*-leucin (50)**

In 150 ml eines Gemisches aus Dioxan und Wasser im Verhältnis 2:1 (v/v) werden 6.55 g (0.05 mol) *L*-Leucin (**49**) gelöst und 50 ml 1 N NaOH zugegeben. Unter Eiskühlung wird mit 12.00 g (0.055 mol) Boc<sub>2</sub>O versetzt und bei Raumtemperatur 5 Stunden gerührt. Bei reduziertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt.

farbloses Öl

Ausbeute: quantitativ

R<sub>f</sub>:(Hexan/Essigester 1:1 v/v + 1% Essigsäure) = 0.45

$[\alpha]_D^{20}$ : - 19.3 ° (c = 1, MeOH)     [-24.2 °<sup>[42]</sup>]

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.60 (br, 1H, NH), 5.25 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, NH), 4.39-4.25 (m, 1H, α-CH), 1.86-1.44 (m, 3H, β-CH<sub>2</sub>, γ-CH), 1.40 (s, 9H, CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 1.00-0.90 (m, 6H, 2 δ-CH<sub>3</sub>).

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-leucinbenzylester (54)**

Zu einer Lösung von 2.32 g (10 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*L*-leucin (**50**), 4.6 g (11.6 mmol) *L*-Leucinbenzylester-Hydrotosylat (**51**), 2.70 g (20 mmol) *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 1.77 ml (12.8 mmol) Triethylamin in 75 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> tropft man bei 0 °C 1.86 ml Diisopropylcarbodiimid (DIC) und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren von ausgefallenem Diisopropylharnstoff (**17b**) wird das Filtrat mit jeweils 20 ml 0.5 N HCl, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung sowie mit Wasser gewaschen und anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der Rückstand in 3 - 5 ml Aceton aufgenommen, auf - 20 °C gekühlt und der restliche ausgefallene Harnstoff abgetrennt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Säulenchromatographie (Hexan/Essigester 3:1 (v/v)).

Weisser Feststoff

Ausbeute: 3.86 g (89 %)

R<sub>f</sub>:(Hexan/Essigester 3:1 (v/v)) = 0.68

$[\alpha]_D^{20}$ : -28.0 ° (c = 0.5, Essigester)      [-48 °, c = 1, MeOH<sup>[113]</sup>]

Schmelzpunkt: 76 °C      [82 °C<sup>[113]</sup>]

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.34 (s, 5H, arom. H), 6.38 (br, 1H, NH), 5.13 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4.85 (br, 1H, NH), 4.70-4.60 (m, 1H, α-CH), 4.15-4.01 (m, 1H, α-CH), 1.73-1.47 (m, 6H, 2 β-CH<sub>2</sub>, 2 γ-CH), 1.41 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 0.94-0.87 (m, 12H, 4 δ-CH<sub>3</sub>).

### **L-Leucyl-L-leucinbenzylester-Hydrotrifluoracetat (55)**

Zu einer Lösung von 1.93 g (4.44 mmol) *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucinbenzylester (**54**) in 10 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> werden unter Eiskühlung 10 ml Trifluoressigsäure zugegeben. Man rührt 3 h bei Raumtemperatur und filtriert das ausgefallene Hydrosalz ab.

weisser Feststoff

Ausbeute: quantitativ

R<sub>f</sub>: (Hexan/Essigester 1 : 3 (v/v)) = 0.2

$[\alpha]_D^{20}$ : -14.8 ° (c = 0.5 MeOH)

Schmelzpunkt: 160 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.34 (s, 5H, arom. H), 5.16 (d, 1H, J<sub>gem</sub> = 13.7 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 5.12 (d, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.58-4.47 (m, 1H, α-CH), 3.89-3.80 (m, 1H, α-CH), 1.77-1.53 (m, 6H, 2 β-CH<sub>2</sub>, 2 γ-CH), 0.99-0.86 (m, 12H, 4 δ-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.98 (C=O Amid), 169.83 (C=O, Amid), 161.90 (q, J = 37 Hz, C=O, TFA), 135.17 (C<sub>q</sub>, arom. C), 128.58 (2 CH, arom. C), 128.46 (CH, arom. C), 128.27 (2 CH, arom. C), 67.17 (CH<sub>2</sub>-Ph), 52.09, 51.93 (2 α-

CH), 40.62, 40.01 (2  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 24.58, 24.04 (2  $\gamma$ -CH), 22.41, 22.20, 21.96, 21.59 (4  $\delta$ -CH<sub>3</sub>).

MS (EI): ber. für C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 334.46 gef.: 334.42 [M<sup>+</sup>]

### ***N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucin (56)**

In 20 ml eines 1:1-Gemisches aus Ethylacetat und Ethanol werden 1.89 g (4.4 mmol) des vollständig geschützten Dipeptids Boc-Leu-Leu-O-Benzylester (**54**) gelöst und 10 mol-% Pd auf Kohle zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt.

weisser Feststoff

Ausbeute: quantitativ

R<sub>f</sub>..(Hexan/Essigester 1:1 (v/v) + 1 % HAc) = 0.46

$[\alpha]_D^{20}$ : -17.5 ° (c = 1.0, MeOH)

Schmelzpunkt: 74 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6.71 (br, 1H, NH), 5.08 (br, 1H, NH), 4.67-4.55 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 4.21-4.10 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 1.78-1.51 (m, 6H, 2  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, 2  $\gamma$ -CH), 1.42 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 0.99-0.86 (m, 12H, 4  $\delta$ -CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 175.83, 172.93 (2 C=O, Amid), 156.11 (C=O, Urethan), 80.52 (C<sub>q</sub>, Boc), 52.98, 50.67 (2  $\alpha$ -CH), 41.33, 40.77 (2  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 28.28 (3 CH<sub>3</sub>, Boc), 22.96, 22.71, 22.28, 21.76 (4  $\delta$ -CH<sub>3</sub>).

MS (EI): ber. für C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 344.231 gef.: 344.233 [M<sup>+</sup>]

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-leucin-benzylester (57)**

Bei 0 °C werden zu einer Lösung von 1.03 g (3 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-leucin (**56**), 1.48 g (3.3 mmol) *L*-Leucyl-*L*-leucin-benzylester-Hydrotrifluoracetat (**75**), 0.81 g (6 mmol) *N*-Hydroxybenzotriazol und 0.5 ml (3.6 mmol) Triethylamin in 50 ml abs. Dichlormethan 0.56 ml (3.6 mmol) Diisopropylcarbodiimid getropft. Man rührt bei Raumtemperatur über Nacht.

Die organische Phase wird jeweils mit 20 ml 0.5 N HCl, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Hexan/Essigester 2:1 (v/v)).

Weisser Feststoff.

Ausbeute: 1.78 g (90 %)

R<sub>f</sub>: (Hexan/Essigester 2 : 1 (v/v)) = 0.4

$[\alpha]_D^{20}$ : -84.1 ° (c = 1, MeOH)

Schmelzpunkt: 199 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.35 (s, 5H, arom. H), 6.72 (br, 2H, 2 NH), 6.47 (br, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph), 4.85 (br, 1H, NH), 4.68-4.55 (m, 1H, α-CH), 4.54-4.41 (m, 1H, α-CH), 4.40-4.28 (m, 1H, α-CH), 4.06-3.94 (m, 1H, α-CH), 1.80-1.49 (m, 12H, 4 β-CH<sub>2</sub>, 4 γ-CH), 1.43 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 0.97-0.82 (m, 24H, 4 δ-CH<sub>3</sub>).

***L*-Leucyl-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-leucinbenzylester-Hydrotrifluoracetat (48)**

Zu einer Lösung von 661 mg (1 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-leucin-benzylester (**57**) in 10 ml abs. Methylenchlorid gibt man 5 ml Trifluoressigsäure und rührt 3 h. Bei vermindertem Druck wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit Toluol codestilliert.

weisser Feststoff

Ausbeute: quantitativ

R<sub>f</sub>: (Hexan/Essigester 1 : 2 (v/v)) = 0.18

$[\alpha]_D^{20}$ : - 84,1 ° (c = 1, MeOH)

Schmelzpunkt: 216 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sup>4</sup>-MeOD): δ = 7.34 (s, 5H, arom. H), 5.23-5.06 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph), 4.62-4.48 (m, 1H, α-CH), 4.47-4.33 (m, 2H, 2 α-CH), 3.90-3.80 (m, 1H, α-CH), 1.75-1.48 (m, 12H, 4 β-CH<sub>2</sub>, 4 γ-CH), 1.05-0.80 (m, 24H, 8 δ-CH<sub>3</sub>).

### 6.2.5. Versuche zu Kapitel 4.1.6.

#### 4-Iodphenol (59)<sup>[54,55]</sup>

Zu einer Lösung von 2.48 g (20 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol (**45**) in 160 ml 0.5 N Natriumhydroxidlösung (4 Äq.) werden 6.16 g (24 mmol) Iod und 5.80 g (35 mmol) Kaliumiodid gelöst in 200 ml Wasser gegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Um das überschüssige Iod abzufangen werden 50 ml einer 5 %-igen Natriumthiosulfatlösung zugeben und die Reaktionslösung mit 1 N HCl auf pH 3 eingestellt. Danach wird die Lösung 3 mal mit je 70 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Hexan:Ethylacetat 5:1 lieferte 3.32 g (15 mmol) eines bräunlichen Öls.

Ausbeute: 3.32 g (15 mmol, 75 %)

R<sub>f</sub>: (Hexan:Ethylacetat 3:1 (v/v)) = 0.41

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.47 (d, J = 8 Hz, 2H, arom. H), 6.52 (d, J = 8 Hz, 2H, arom. H), 5.16 (s, 1H, OH).

MS (GCMS) *m/z*: ber. für C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>I: 220.01      gef.: 220.1 [M<sup>+</sup>]

#### 4-Hydroxy-3-iodbenzylalkohol (58)

Zu einer Lösung von 1.24 g (10 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol (**45**) in einem Gemisch aus 10 ml THF und 10 ml Wasser werden 2.40 g (11 mmol) Iod und 0.92 g (11 mmol) Natriumhydrogencarbonat gegeben und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Um das überschüssige Iod zu reduzieren werden 50 ml einer 5%-igen Natriumthiosulfatlösung zugegeben und die Lösung wird mit 1 N HCl auf pH = 4 eingestellt. Danach wird die Lösung 3 mal mit 70 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Hexan:Ethylacetat 5:1, lieferte 1.42 g eines gelblichen Öls.

Ausbeute: 1.42 g (5.6 mmol, 56 %)

R<sub>f</sub>: (Hexan:Ethylacetat 2:1 (v/v)) = 0.23

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.69 (d, *J* = 1 Hz, 1H, arom. H, H-2), 7.18 (dd, *J* = 1 Hz, *J'* = 10 Hz, 1H, arom. H, H-6), 6.83 (d, *J'* = 10 Hz, 1H, arom. H, H-5), 4.50 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-OH).

MS (GCMS) *m/z*: ber. für C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>IO<sub>2</sub>: 250.03                      gef.: 250.2 [M<sup>+</sup>]

#### 4-Acetoxy-3-iodbenzylalkohol (60)

Zu einer Lösung von 0.50 g (2 mmol) 4-Hydroxy-3-iodbenzylalkohol (**58**) und 0.27 ml (2 mmol) Triethylamin in 5 ml Ethylacetat werden bei 0 °C unter Argonatmosphäre 0.14 ml (2 mmol) Acetylchlorid zugegeben. Die Reaktionsmischung wird weitere 5 h bei RT gerührt. Das ausgefallene Hydrosalz wurde abfiltriert und die Lösung 3 mal mit 5 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es ist keine weitere Aufreinigung nötig.

Ausbeute 0.56 g (1.9 mmol, 95 %)

R<sub>f</sub>: (Hexan:Ethylacetat 3:2 (v/v)) = 0.55

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.83 (d, *J* = 2 Hz, 1H, arom. H, H-2), 7.34 (dd, *J* = 2 Hz, *J'* = 8 Hz, 1H, arom. H, H-6), 7.06 (d, *J'* = 8 Hz, 1H, arom. H, H-5), 4.65 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>-OH), 2.36 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 168.9 (CO), 150.1 (arom. C, C-4), 140.1 (arom. C, C-1), 137.4 (arom. C, C-2), 127.8 (arom. C, C-6), 122.6 (arom. C, C-5), 90.4 (arom. C, C-3), 63.1 (CH<sub>2</sub>-O-), 21.2 (CH<sub>3</sub>).

### 3-(5-Hydroxymethyl-benzofuran-2-yl)-propionsäure (63)

Zu einer Lösung von 240 mg (2.46 mmol) 4-Pentinsäure (**61**) und 0.34 ml (2.50 mmol) Triethylamin werden bei 0°C unter Argonatmosphäre 0.32 ml Trimethylsilylchlorid zugetropft und die Reaktionsmischung wird 1 h bei 0 °C gerührt. Danach werden 84 mg (0.24 mmol) CuI, 560 mg (2.24 mmol) 4-Hydroxy-3-iodbenzylalkohol (**58**), 0.66 ml (4.8 mmol) Triethylamin, gelöst in 10 ml abs. THF, zugegeben. Die Lösung wird entgast und es werden 84 mg (0.12 mmol) PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 16 h bei RT gerührt. Anschließend werden 15 ml 1 N HCl zugegeben und die Lösung wird eine weitere Stunde gerührt. Die Lösung wird 3 mal mit 30 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte 187 mg (0.85 mmol) eines gelblichen Öls.

Ausbeute 187 mg (0.85 mmol, 38 %)

R<sub>f</sub>: (Hexan:Ethylacetat 2:1 (v/v) + 1 % HOAc) = 0.3

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.32-7.20 (m, 2 H, arom. H), 7.08-7.00 (m, 1 H, arom. H), 6.21 (s, 1 H, CH), 3.15-3.00 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H), 2.79-2.70 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H).

MS (GCMS) *m/z*: ber. für C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>: 220.2

gef.: 220.1 [M<sup>+</sup>]

## 6.2. Versuche zu Kapitel 4.2.

### 6.2.1. Versuche zu Kapitel 4.2.2

#### 4-Allyloxybenzoesäureethylester (64)

Zu einer Lösung von 2.5 g (15 mmol) 4-Hydroxybenzoesäureethylester (**65**) und 2.1 g (15,2 mmol) Kaliumcarbonat in 40 ml Aceton, werden 1.3 ml Allylbromid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 6 Stunden rückflusiert. Man lässt die Reaktionsmischung abkühlen und versetzt die Lösung mit 50 ml Ethylacetat. Die Lösung wird 3 mal mit 40 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Es ist keine weitere Aufreinigung notwendig. Es resultiert ein farbloses Öl in quantitativer Ausbeute.

Ausbeute: 3.1 g (15 mmol, quantitativ)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1 (v/v)) = 0.6

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.01 (d, J = 11 Hz, 2H, arom. H), 6.93 (d, J = 11 Hz, 2H, arom. H), 6.12-5.98 (m, 1H, allyl. CH), 5.41 (d, J = 21 Hz, 1H, allyl. CH-CH<sub>2</sub>), 5.30 (d, J = 12 Hz, allyl. CH-CH<sub>2</sub>), 4.58 (d, J = 5 Hz, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.34 (q, J = 8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Et), 1.38 (t, J = 8 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 167.0 (CO), 166.0 (arom. C, C-4), 137.5 (allyl. C, C=CH<sub>2</sub>), 130.7, 122.8, 114.0 (arom. C), 115.1 (allyl. C, CH=C<sub>2</sub>), 75.5 (allyl. C, O-CH<sub>2</sub>), 59.1 (CH<sub>2</sub>, Ethyl), 13.6 (CH<sub>3</sub>, Ethyl).

#### 3-Allyl-4-hydroxybenzoesäureethylester (67)

3.1 g (15 mmol) 4-Allyloxybenzoesäureethylester (**64**) werden 18 h auf 240 °C erhitzt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1) lieferte 2.7 g (88 %) eines weißen Feststoffes.

Ausbeute: 2.7 g (13.2 mmol, 88 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1(v/v)) = 0.23

Schmelzpunkt: 126 °C

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.85-7.82 (m, 2H, arom. H, C2, C6), 6.83-6.81 (m, 1H, arom. H, C4), 6.05-5.96 (m, 1H, allyl. H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.53 (s, 1H, OH), 5.19-5.14 (m, 2 H, allyl H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.33 (q, J = 7 Hz, 2 H, -CH<sub>2</sub>-O-), 3.43 (d, J = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 1.41-1.35 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.9 (Carbonyl-C), 158.5 (arom. C, C4), 135.73 (Allyl CH), 132.3 (arom. C, C2), 129.9 (arom. C, C6), 125.4, 122.7 (quart. arom. C), 116.8, 115.4 (arom. C, C4, Allyl. CH<sub>2</sub>=CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>, Ethyl), 34.7 (Allyl. CH<sub>2</sub>-Ph), 14.3 (CH<sub>3</sub>, Ethyl).

HRMS *m/z*: ber. für C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> : 206.0943

gef.: 206.0943 [M<sup>+</sup>]

### 3-Allyl-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzoesäureethylester (66)

Zu einer Lösung von 1.06 g (5.1 mmol) 3-Allyl-4-hydroxybenzoesäureethylester (**67**) und 1.75 g (25.7 mmol) Imidazol in 6 ml absolutem Dimethylformamid werden bei 0 °C und unter Argonatmosphäre 1.70 ml *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (**80**) zu gegeben. Nach 10 min wird das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 10 ml Wasser zugegeben und 30 min gerührt. Die Reaktionsmischung wird 3 mal mit je 25 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens (Cyclohexan:Ethylacetat 10:1) lieferte 1.80 g eines farblosen Öls.

Ausbeute: 1.80 g (4 mmol, 78 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 10:1 (v/v)) = 0.6

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.79 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H, arom. CH), 7.63-7.60 (m, 4H, arom. H), 7.43-7.27 (m, 7H, arom. H), 6.33 (d,  $J$  = 8 Hz, arom. H, C5), 6.07-6.00 (m, 1H, Allyl CH), 5.07-5.02 (m, 2H, Allyl  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 4.20 (q,  $J$  = 7 Hz,  $\text{CH}_2$ , Ethyl), 3.52 (d,  $J$  = 7 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 1.24 (t,  $J$  = 7 Hz,  $\text{CH}_3$ , Ethyl), 1.03 (s, 9H, 3  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 168.2 (CO), 159.1 (quart. arom. C), 138.4, 137.5, 136.8, 133.7, 131.9, 131.1, 130.4, 129.5 (arom. C,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 124.9 (quart. arom. C), 117.8 ( $=\text{CH}_2$ ), 62.1 ( $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ), 36.1 ( $\text{Ph}-\text{CH}_2$ ), 27.8 ( $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ), 21.0 (quart. C,  $^t\text{Bu}$ ), 15.6 ( $\text{CH}_3$ , Et).

MS (EI)  $m/z$ : ber. für  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Si}$ : 444.64      gef.: 443.4 [M-H]; 388.5 [M- $^t\text{Bu}$ ]

### 6.3.2. Versuche zu Kapitel 4.2.3.

#### O-(Mesitylsulfonyl)-hydroxylamin (MSH) (70)

Zu einer Lösung von 5.0 g (17.5 mmol) O-(Mesitylsulfonyl)-acetoxyhydroxamsäureethylester (**71**) in 3 ml Dioxan werden bei 0 °C tropfenweise 1.7 ml (20 mmol) 70 %-ige Perchlorsäure zugegeben. Das erstarrte Reaktionsgemisch wird weitere 15 min von Hand weitergerührt und danach auf 30 ml Eis/Wasser gegeben. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 30 ml eiskaltem Wasser und 20 ml Pentan gewaschen. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet. Man erhält 2.3 g wasserfreies Produkt. In mehreren Fällen entzündete sich das Produkt beim Trocknen selbst.

Ausbeute: 2.3 g (10.5 mmol, 60 %)

Schmelzpunkt: 96 - 99 °C

**[3-Allyl-4-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-phenyl]-methanol (72)**

Zu einer Suspension von 0.76 g Lithiumaluminiumhydrid in 50 ml absolutem Diethylether werden bei 0 °C 1.78 g 3-Allyl-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzoesäureethylester (**66**), gelöst in 10 ml absolutem Diethylether, gegeben. Nach 30 min wird das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt.

Danach werden 0.2 ml Wasser, 0.2 ml 4 N NaOH-Lösung und nochmals 0.6 ml Wasser zugegeben. Es wird eine Stunde gerührt und das ausgefallene Aluminiumhydroxid abfiltriert. Die Reaktionslösung wird mit 3 mal mit 10 ml Wasser gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird bei reduziertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 5:1, lieferte 1.44 g (3.6 mmol) eines farblosen Öls.

Ausbeute: 1.44 g (3.6 mmol, 90 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1 (v/v)) = 0.34

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.71-7.69 (m, 4H, arom. H), 7.42-7.34 (m, 6H, arom. H), 7.16 (s, 1H, arom. H), 6.76 (d, J = 6 Hz, arom. H), 6.37 (d, J = 8 Hz, 1H, arom. H), 6.15-6.03 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.10 (d, J = 12Hz, 2H, CH=CH<sub>2</sub>), 4.52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-OH), 3.58 (d, J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 1.09 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>).

MS (EI) *m/z*: ber. für C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>Si: 402.60 gef. 402.91 [M<sup>+</sup>]; 346.34 [M-<sup>t</sup>Bu]<sup>+</sup>

**6.3.3. Versuche zu Kapitel 4.2.4.****4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-hydroxypropyl)-benzoesäureethylester (75)**

Zu einer Lösung von 3.60 g (8.0 mmol) 3-Allyl-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzoesäureethylester (**66**) in 40 ml absolutem Tetrahydrofuran werden bei 0 °C und Argonatmosphäre 2.70 ml (2,7 mmol) einer 1 molaren Lösung von Boran in Tetra-

hydrofuran zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei 0 °C gerührt. Danach wird die Lösung auf -30 °C gekühlt und es werden 2 ml (18.7 mmol) einer 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und 6.2 ml einer 3 molaren NaOH-Lösung zugegeben. Nach 10 min lässt man die Reaktionsmischung auf 0 °C erwärmen und rührt 3 h bei dieser Temperatur. Anschließend werden 30 ml Wasser zugegeben und die Lösung wird 3 mal mit 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 5:1, lieferte 2.11 g eines farblosen Öls.

Ausbeute: 2.11g (4.56 mmol, 57 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1 (v/v)) = 0.35

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.88 (s, 1H, arom. H), 7.69-7.67 (m, 4H, arom. H), 7.43-7.37 (m, 7H, arom. H), 6.41 (d, J = 8 Hz, 1H, arom. H), 4.26 (q, J = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O-CO), 3.76 (t, J = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OH), 2.92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>-OH), 1.31 (t, J = 7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>, Et), 1.10 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.5 (CO), 157.4 (quart. arom. C, C-O-SiR<sub>3</sub>), 135.2, 131.9, 131.7, 130.1, 128.6, 127.8, 122.9, 118.6 (arom. C), 62.3 (CH<sub>2</sub>-OH), 60.5 (CH<sub>2</sub>-O-CO), 33.0 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 26.9, 26.8, 26.4 (3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 23.3 (CH<sub>3</sub>, Et), 19.4 (CH<sub>2</sub>-Ph), 14.1 (quart C, <sup>t</sup>Bu).

MS (EI) *m/z*: ber. für C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>Si: 462.65 gef. 406.67 [M-<sup>t</sup>Bu]<sup>+</sup>

#### **4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-methansulfonyloxypropyl)-benzoesäureethylester (77)**

Zu einer Lösung von 0.17 g (0.37 mmol) 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-hydroxy-propyl)-benzoesäureethylester (**75**) und 0.16 ml (1.16 mmol) Triethylamin in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran werden bei 0 °C unter Argonatmosphäre 0.03 ml (0.40 mmol) Methylsulfonylchlorid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 0 °C gerührt, danach werden 10 ml Wasser zugegeben. Die Lösung wird 3 mal mit

je 15 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Es ist keine weitere Aufreinigung notwendig.

Ausbeute: quantitativ

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 4 :1 (v/v)) = 0.27

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7.86 (d, J = 2 Hz, 1H, arom. H), 7.68-7.66 (m, 4H, arom. H), 7.51-7.35 (m, 6H, 1H, arom. H), 6.43 (d, J = 12 Hz, 1H, arom. H), 4.32-4.26 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-O-SO<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CO-), 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, Ms), 2.97-2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.22 - 2.15 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 1.34-1.30 (t, J = 7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>, Et), 1.11 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

### 3-(3-Azidopropyl)-4-hydroxybenzoesäureethylester (78)

Zu einer Lösung von 167 mg (0.31 mmol) 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-methansulfonyloxypropyl)-benzoesäureethylester (**77**) in 5 ml Dimethylsulfoxid unter Argonatmosphäre werden 24 mg Natriumazid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h auf 45 °C erhitzt. Danach wird die Lösung mit 10 ml Wasser und 10 ml Diethylether versetzt und 2 mal mit 10 ml Diethylether extrahiert. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 20:1, lieferte 33 mg (0.13 mmol) eines farblosen Öls.

Ausbeute: 33 mg (0.13 mmol, 42 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 10:1 (v/v)) = 0.48

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7.83-7.80 (m, 2H, arom. H), 6.79 (d, J = 9 Hz, 1 H, arom. H), 4.35 (q, J = 7 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-O-CO-), 3.33 (t, J = 7 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.74 (t, J = 7 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph), 1.96-1.89 (m, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.37 (t, J = 7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>, Et).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 167.0 (Carbonyl C), 161.4 (arom. C, C<sub>4</sub>), 130.9, 128.4, 125.9, 123.2, 115.7 (arom. C), 59.1 ( $\text{CH}_2$ , Et), 53.2 (C-N<sub>3</sub>), 34.5 (Ph- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -), 22.7 (Ph- $\text{CH}_2$ -), 13.6 ( $\text{CH}_3$ , Et).

MS (GCMS)  $m/z$ : ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ : 249.3 gef. 249.2 [ $\text{M}^+$ ]

### Chroman-6-carbonsäureethylester (79)

Zu einer Lösung von 167 mg (0.31 mmol) 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-methansulfonyloxypropyl)-benzoesäureethylester (**77**) in 5 ml Dimethylsulfoxid unter Argonatmosphäre werden 24 mg Natriumazid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h auf 45 °C erhitzt. Danach wird die Lösung mit 10 ml Wasser und 10 ml Diethylether versetzt und 2 mal mit 10 ml Diethylether extrahiert. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 20:1, lieferte 23 mg (0.11 mmol) eines farblosen Öls.

Ausbeute: 23 mg (0.11 mmol, 35 %)

$R_f$ : (Cyclohexan:Ethylacetat 10:1 (v/v)) = 0.6

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.78 (m, 2H, arom. H), 6.71 (d,  $J$  = 7 Hz, 1H, arom. H), 4.33 (q,  $J'$  = 8 Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{OCO}-$ ), 4.22 (t,  $J''$  = 5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O-Ph}$ ), 2.81 (t,  $J'''$  = 6 Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.04 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 1.37 (t,  $J'$  = 8 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

MS (GCMS)  $m/z$ : ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$ : 206.24 gef. 206 [ $\text{M}^+$ ]

### 6.3.4. Versuche zu Kapitel 4.2.5.

#### 1-Hydroxy-1-oxo-benzo[d][1,2]iodoxol-3-on (IBX) (81)

Zu einer Lösung von 10 g (0.04 mol) 2-Iodbenzoesäure (**82**) gelöst in 150 ml 0.73 molarer Schwefelsäure werden bei einer Temperatur von 55 °C über einen Feststofftrichter in einer halben Stunde 8.7 g (0.05 mol) Kaliumbromat zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für weitere 5 Stunden auf 70 °C erhitzt. Nachdem die Lösung mit einem Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt wurde wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert und einmal mit 100 ml Wasser und 2 mal mit 10 ml absolutem Ethanol gewaschen. Der Feststoff wird im Vakuum getrocknet und kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Ausbeute: 10.64 g (0.038 mol, 95 %)

#### 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-oxopropyl)-benzoesäureethylester (**83**)

Zu einer Lösung von 338 mg (1.2 mmol) 1,1-Dihydroxy-1H-1 $\lambda$ <sup>5</sup>-benzo[d][1,2]-iodoxol-3-on (IBX) (**81**) in 5 ml Dimethylsulfoxid werden 464 mg (1 mmol) 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-hydroxypropyl)-benzoesäureethylester (**75**) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 3 ml Wasser und 3 ml Diethylether zugegeben und die Lösung wird 3 mal mit 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat (5:1), lieferte 310 mg eines farblosen Öls.

Ausbeute: 310 mg (0.67 mmol, 67 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 10:1 (v/v)) = 0.57

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 9.89 (s, 1H, CHO), 7.87(d, J = 1Hz, 1H, arom. H), 7.68-7.66 (m, 4 H, arom. H), 7.44-7.35 (m, 6H, 1H, arom. H), 6.35 (d, J = 8Hz, 1H,

arom. H), 4.21 (q,  $J = 8$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-O-}$ , Et), 3.08 (t,  $J = 7$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 2.81 (t,  $J = 7$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$ ), 1.25 (t,  $J = 7$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -, Et), 1.03 (s, 9H, 3  $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 236.5$  (CHO), 166.5 (CO), 157.4 (quart. arom. C, C-O-SiR<sub>3</sub>), 135.2, 131.9, 131.7, 130.1, 128.6, 127.8, 122.9, 118.6 (arom. C), 60.5 ( $\text{CH}_2\text{-O-CO}$ ), 44.4 ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$ ), 26.9, 26.8, 26.4 (3  $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ), 23.9 ( $\text{CH}_3$ , Et) 19.4 ( $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 14.7 (quart C,  $^t\text{Bu}$ ).

MS (EI)  $m/z$ : ber. für  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Si}$ : 460.21      gef. 460 [ $\text{M}^+$ ], 403 [ $\text{M}^+ - ^t\text{Bu}$ ]

#### **4-(tert-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-hydroxyiminopropyl)-benzoesäureethylester (84)**

Zu einer Lösung von 550 mg (1.19 mmol) 4-(tert-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-oxopropyl)-benzoesäureethylester (**83**) und 200 mg (2.39 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 15 ml Ethanol werden 248 mg (3.57 mmol) Hydroxylamin-Hydrochlorid gegeben. Die Reaktionslösung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend werden 10 ml Wasser zugegeben. Danach wird die Lösung 3 mal mit je 15 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan: Ethylacetat 5:1, ergab 328 mg eines farblosen Öls.

Ausbeute: 328 mg (0.69 mmol, 58 %)

$R_f$ : (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1 (v/v)) = 0.45

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.85$  (d,  $J = 2$  Hz, 1H, arom. H), 7.70-7.68 (m, 4H, arom. H, TBDPS), 7.56-7.48, 7.46-7.42, 7.39-7.36 (3 m, 6H, 1H, 1H, arom. H, TBDPS, arom. H,  $-\text{CH}=\text{N-OH}$ ), 6.44-6.42 (m, 1H, arom. H), 4.28 (q,  $J = 7$  Hz, 2H,  $-\text{CO-CH}_2$ -, Et), 3.05-3.02 (m, 2H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 2.87-2.83, 2.66-2.62 (2m, 2 H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}=\text{N-}$ ), 1.43 (s, 1H,  $-\text{OH}$ ), 1.34-1.31 (t,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_3$ , Et), 1.11 (s, 9H, 3  $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 166.4 (CO, Ethyl), 157.5 (quart. Arom, C), 151.6 (C=N-OH), 135.2, 131.8, 131.5, 130.7, 130.1, 129.1, 127.9, 125.6, 123.1, 118.7 (arom. C), 60.5 ( $\text{CH}_2$ , Ethyl), 29.9 ( $\text{CH}_2\text{-CH=N-}$ ), 26.4 ( $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ), 19.4 ( $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 14.3 (quart. C,  $^t\text{Bu}$ ).

MS (EI)  $m/z$ : ber. für  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{Si}$ : 475.65    gef. 475.20 [ $\text{M}^+$ ], 418 [ $\text{M}^+ - ^t\text{Bu}$ ]

### [3-(3-Aminopropyl)-4-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-phenyl]-methanol (85)

Zu einer Suspension von 37 mg (1 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 3 ml absolutem Tetrahydrofuran wird bei 0 °C unter Argonatmosphäre eine Lösung von 117 mg (0.24 mmol) 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(3-hydroxyiminopropyl)-benzoesäureethylester (**84**) in 2 ml Tetrahydrofuran gegeben. Die Lösung wird 30 min bei 0 °C gerührt und danach über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend werden 0.2 ml Wasser, 0.2 ml 1 molare Natriumhydroxidlösung und nochmals 0.6 ml Wasser zugegeben. Die Lösung wird weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das ausgefallene Aluminium-hydroxid abfiltriert und die Lösung wird 3 mal mit 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt. Es resultieren 59 mg eines farblosen Öls.

Ausbeute: 59 mg (0.14 mmol, 59 %)

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.73-7.65 (m, 4H, arom. H, TBDPS), 7.42-7.33 (m, 6H, arom. H, TBDPS), 7.15 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, arom. H), 6.71 (dd,  $J$  = 2 Hz,  $J'$  = 6 Hz, 1H, arom. H), 6.37 (d,  $J'$  = 6 Hz, 1H, arom. H), 4.46 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2.82-2.75 (m, 4 H,  $\text{Ph-CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ), 1.88-1.82 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.09 (s, 9h, 3  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 152.8 (quart. Arom. H), 135.7, 135.3, 132.6, 129.9, 129.5, 129.2, 128.3, 127.8, 118.8 (arom. C), 64.9 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 41.9 ( $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ), 33.7 ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ), 26.4 ( $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ), 19.4 ( $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 14.3 (quart. C,  $^t\text{Bu}$ ).

### 6.3.5. Versuche zu Kapitel 4.2.6.

#### ***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-valinyl)-2-*tert*-butyldiphenylsilanyloxy-5-hydroxymethyl-phenylpropylamin (86)**

Zu einer Lösung von 100 mg (0.24 mmol) [3-(3-Aminopropyl)-4-(*tert*-butyldiphenylsilanyloxy)-phenyl]-methanol (**85**), 52 mg (0.24 mmol) Boc-*L*-Valin (**33**), 64 mg (0.48 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.1 ml (0.6 mmol) Triethylamin in 20 ml absolutem Dichlormethan werden 37  $\mu$ l (0.25 mmol) Diisopropylcarbodiimid gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung nacheinander mit jeweils 10 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung, 1 N HCl und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan: Ethylacetat 3:1, lieferte 108 mg (0.17 mmol) eines farblosen Öls.

Ausbeute: 108 mg (0.17 mmol, 71 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1 (v/v)) = 0.20

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.66-7.64 (m, 4H, arom. H, TBDPS), 7.40-7.30 (m, 6 H, arom. H, TBDPS), 7.11 (d,  $J$  = 1 Hz, 1 H, arom. H), 6.71 (dd,  $J$  = 1 Hz,  $J'$  = 7 Hz, 1 H, arom. H), 6.35 (d,  $J$  = 7 Hz, 1 H, arom. H), 6.28-6.22 (m, 1 H, NH), 5.28-5.22 (m, 1 H, NH), 4.45 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>-OH), 3.81-3.76 (m, 1 H,  $\alpha$ -CH), 3.37-3.28 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH-), 2.82-2.78 (m, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>-), 2.15-2.00 (m, 1 H,  $\beta$ -CH), 1.96-1.86 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.41 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu, Boc), 1.06 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu, TBDPS), 0.96-0.86 (m, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 171.8 (CO, Amid), 156.5 (CO, Urethan), 152.9 (quart. arom. C), 135.5, 133.8, 132.8, 132.6, 131.5, 130.0, 129.5, 128.2, 126.0, 118.9 (arom. C), 69.2 (quart. C, <sup>t</sup>Bu, Boc), 64.9 (CH<sub>2</sub>-OH), 60.3 ( $\alpha$ -CH), 39.5 (CH<sub>2</sub>-NH-), 36.3 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 30.4 (Ph-CH<sub>2</sub>-), 29.7 ( $\beta$ -CH), 28.3 (CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu, Boc), 26.4 (CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu, TBDPS), 19.3 ( $\gamma$ -CH<sub>3</sub>), 14.0 (quart. C, TBDPS).

MS (EI)  $m/z$ : ber. für  $C_{36}H_{50}N_2O_5Si$ : 618.88 gef. 619.47  $[M+H]^+$ , 562.77  $[M-tBu]^+$

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-valinyl)-2-hydroxy-5-hydroxymethylphenylpropylamin (87)**

Zu einer Lösung von 34.3 mg (0.052 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-valinyl)-2-*tert*-butyldiphenylsilanyloxy-5-hydroxymethylphenylpropylamin (**86**) in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran werden 0.5 ml (0.5 mmol) einer 1 Molaren Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und anschließend mit 10 ml 0.5 molarer HCl gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 1:1, lieferte 15.4 mg (0.04 mmol) eines farblosen Öls.

Ausbeute: 15.4 mg (0.04 mmol, 76 %)

$R_f$ : (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1 (v/v)) = 0.1

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 7.05-6.90 (m, 2 H, arom. H), 6.71-6.63 (m, 1 H, arom. H), 6.28-6.22 (m, 1 H, NH), 5.28-5.22 (m, 1 H, NH), 4.45 (s, 1 H,  $CH_2$ -OH), 4.36 (s, 1 H,  $CH_2$ -OH), 3.81-3.68 (m, 1 H,  $\alpha$ -CH), 3.20-3.07 (m, 2 H,  $-CH_2$ -NH-), 2.62-2.50 (m, 2 H, Ph- $CH_2$ -), 2.01-1.93 (m, 1 H,  $\beta$ -CH), 1.85-1.60 (m, 2 H,  $-CH_2$ - $CH_2$ -), 1.41 (s, 9 H, 3  $CH_3$ ,  $tBu$ , Boc), 0.96-0.86 (m, 6 H, 2  $CH_3$ ,  $\gamma$ - $CH_3$ ).

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-valinyl)-2-acetoxy-5-hydroxymethylphenylpropylamin (88)**

Zu einer Lösung von 28.5 mg (0.075 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-valinyl)-2-hydroxy-5-hydroxymethylphenylpropylamin (**87**) und 30  $\mu$ l (0.18 mmol) Triethylamin in 2 ml Ethylacetat werden bei 0 °C 8  $\mu$ l (0.113 mmol) Acetylchlorid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend

wird das ausgefallene Hydrosalz abfiltriert. Die Lösung wird 3 mal mit 10 ml 0.5 N HCl gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan : Ethylacetat 1:1, lieferte ein gelbliches Öl.

Ausbeute: 22.0 mg (0.052 mmol, 69 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1 (v/v)) = 0.12

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.10 (m, 2 H, arom. H), 6.98 (d, *J* = 8 Hz, 1 H, arom. H), 6.03 (bs, 1 H, NH), 5.04 (bs, 1 H, NH), 4.66-4.57 (m, 1 H, α-CH), 4.23 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>-OH), 3.81-3.68 (m, 1 H, α-CH), 3.20-3.07 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH-), 2.62-2.50 (m, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>-), 2.32 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>, Acetyl), 2.01-1.93 (m, 1 H, β-CH), 1.85-1.60 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.41 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu, Boc), 0.96-0.86 (m, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>, γ-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.8 (CO, Amid), 168.0 (CO, Ester), 157.5 (CO, Urethan), 151.5 (quart. arom. C), 135.5, 131.8, 128.2, 126.0, 121.9 (arom. C), 70.2 (quart. C, <sup>t</sup>Bu, Boc), 64.9 (CH<sub>2</sub>-OH), 60.3 (α-CH), 39.5 (CH<sub>2</sub>-NH-), 36.3 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 30.4 (Ph-CH<sub>2</sub>-), 29.7 (β-CH), 28.3 (CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu, Boc), 19.3 (γ-CH<sub>3</sub>), 16.9 (CH<sub>3</sub>, Acetyl).

MS (EI) *m/z*: ber. für C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 422.52      gef. 422.24 [M<sup>+</sup>]

## 6.4. Versuche zu Kapitel 4.3.

### 6.4.1. Versuche zu Kapitel 4.3.2.

#### 2(S)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-6-hydroxyhexansäure (91)

Zu einer Lösung von 1.75 g (6.25 mmol) N-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (**90**) in 40 ml Wasser, mit 4 N Natronlauge pH auf 9,5 eingestellt, werden 2.24 g Natriumprussid über 20 min unter starkem Rühren zugegeben. Die Lösung wird 6 Stunden auf 60 °C erhitzt. Dabei wird der pH mit 4 N Natronlauge auf 9.5 gehalten. Die Reaktionslösung wird über Celite abfiltriert. Danach wird mit 1 N HCl der pH auf 1 eingestellt und die Lösung 3 mal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 2 Mal mit 50 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert und danach über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes durch Säulen chromatographie, Eluens Ethylacetat, lieferte 1.11 g (3.92 mmol) 2(S)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-6-hydroxyhexansäure (**91**).

Ausbeute: 1.11 g (3.92 mmol, 63 %), gelbliches Öl

R<sub>f</sub>: (Ethylacetat) = 0.3

$[\alpha]_D^{20}$ : + 14.9 ° (c = 1.05 in CHCl<sub>3</sub>) [+ 15 ° (c = 1.07 (CHCl<sub>3</sub>))]<sup>[97]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.38-7.26 (m, 5H, ArH), 6.30-6.00 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>OH, CO<sub>2</sub>H), 5.53 (d, J = 10 Hz, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 4.52-4.43 (m, 1H, α-CH), 3.69-3.56 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.92-1.35 (m, 6H, 3 CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR ( CDCl<sub>3</sub>): δ = 175.37, 156.35 (2 CO), 136.18, 128.46, 128.11, 127.97 (arom. C), 67.01 (PhCH<sub>2</sub>), 62.06 (CH<sub>2</sub>OH), 53.82 (α-CH), 31.95, 31.62, 21.36 (3 CH<sub>2</sub>).

MS (EI, 70 eV): *m/z* ber. für C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> 281.30 gef. 282 [M<sup>+</sup>+1], 281 [M<sup>+</sup>]

**(S)-2-Fluorenylmethyloxycarbonylamino-6-hydroxyhexansäure (92)**

Zu einer Lösung von 1.11 g (3.92 mmol) (S)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-6-hydroxyhexansäure (**91**) in einem Gemisch aus 7.5 ml Methanol und 2.5 ml Wasser werden eine katalytische Menge 10 mol% Palladium auf Kohle gegeben und 16 h bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in einem Gemisch von 12 ml 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 6 ml Dioxan aufgenommen. Dazu werden 1.04 g (4.00 mmol) Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (**117**), gelöst in 6 ml Dioxan, gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wird mit 1 N Salzsäure auf pH=1 eingestellt. Die saure Lösung wird anschließend 3 mal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird 2 mal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Die Reinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie, Eluens Ethylacetat mit 1 % Essigsäure, lieferte 0.51 g (1.44 mmol) (S)-2-(9-Fluorenylmethyl-oxycarbonylamino)-6-hydroxyhexansäure (**92**) als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 0.51 g (1.44 mmol, 37 %)

R<sub>f</sub>: (Ethylacetat) = 0.3

$[\alpha]_D^{20}$ : -28,6 ° (c = 0.9 MeOH)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 7.76 (d, J = 7,6 Hz, 2H, Ar-H), 7.67-7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.37-7.29 (m, 4H, Ar-H), 4.40-4.30 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.21-4.15 (m, 2H, Fmoc-CH, α-CH), 3.56 (t, J' = 6,4 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.88-1.85, 1.73-1.70, 1.59-1.43 (3 m, 6H, 3 CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125,8 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 176.0 (CO<sub>2</sub>H), 158.7 (Urethan CO), 145.3, 145.1, 142.5 (arom. quart. C), 128.7, 128.0, 126.4, 126.2, 120.9 (arom. C), 67.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 62.6 (CH<sub>2</sub>OH), 55.3 (α-CH), 48.3 (Fmoc-CH), 33.0, 32.5, 23.3 (3 CH<sub>2</sub>).

MS (EI) *m/z*: ber. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>: 369,16 gef. 369 [M]<sup>+</sup>, 351 [M-OH]<sup>+</sup>

HRMS  $m/z$ : ber.  $C_{21}H_{23}NO_5$  [ $M^+$ ] 369,1576, gef. 369,1565

### **3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propionsäure-*tert*-butylester (95)**

Zu einer Lösung von 64.0 ml (0.47 mol) wasserfreiem Triethylenglycol (**94**) und 0.1 g (4.35 mmol) Natrium in 250 ml absolutem Tetrahydrofuran werden, nach dem Auflösen des Natriums, 24 ml (0.17 mol) Acrylsäure-*tert*-butylester (**93**) gegeben. Es wird 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, danach wird die Lösung mit 4 ml 1 N Salzsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung aufgenommen. Die wässrige Lösung wird 3 mal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nochmals mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es ist keine weitere Aufreinigung des farblosen Öls notwendig.

Ausbeute: 35.9 g (0.13 mol, 78 %)

$R_f$ : (Cyclohexan : Ethylacetat 2:1 (v/v)) = 0.34

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 3.78-3.58 (m, 14 H, 7  $CH_2$ ), 2.52 (t,  $J$  = 10 Hz, 2H,  $CH_2$ ), 1.42 (s, 9H,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  = 172.0 (CO), 73.2 (quart. C), 73.1 (11-C), 70.9, 70.6 (C-5, C-6, C-8, C-9), 65.3 (C-2), 63.7 ( $CH_2OH$ ), 29.0 ( $CH_3$ ).

### **(E)-17-Brom-4,7,10,13-tetraoxo-15-heptansäure-*tert*-butylester (97)**

Zu einer Lösung von 33.4 g (0.12 mol) 3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propionsäure-*tert*-butylester (**95**) und 51.6 g (0,24 mol) (*E*)-1,4-Dibrom-2-buten (**96**) in 375 ml Dichlormethan wird eine Lösung von 40.7 g (0.12 mol) Tetrabutylammoniumsulfat und 9.8 g (0.24 mol) Natriumhydroxid in 195 ml Wasser zugegeben. Das 2 Phasensystem wird für 45 min stark bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird 2 mal mit 150 ml Di-

chlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in 400 ml Diethylether aufgenommen. Das nicht gelöste Tetrabutylammoniumsulfat wird abfiltriert, und die etherische Phase 3 mal mit 100 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Die Reinigung mittels Säulenchromatographie, Eluens Cyclohexan: Ethylacetat 1:1 (v/v) lieferte 23.4 g eines gelblichen Öls.

Ausbeute: 23.4 g (57 mmol, 48 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1(v/v)) = 0.13

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.02-5.79 (m, 2H, H-15, H-16), 4.03 (d, J = 4 Hz, 2H, H-14), 3.95 (d, J = 10, 2H, H-17), 3.72 (t, J = 8 Hz, 2H, H-3), 3.65-3.55 (m, 12H, H-5, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12), 2.5 (t, J = 8 Hz, 2H, H-2), 1.41 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.2 (CO), 131.6 (C-15), 129.1 (C-16), 73.2 (quart C, <sup>t</sup>Bu), 72.2 (C-14), 71.0, 70.9, 70.6 ((CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>3</sub>), 67.3 (C-3), 36.6 (C-17), 34.9 (C-2), 28.5 (3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

### **2-(9H-Fluorenylmethoxycarbonylamino)-6-hydroxyhexansäure-4-(2-(2-(2-(2-tert-butoxycarbonylethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-but-2-enylester (98)**

Zu einer Lösung von 0.51 g (1.4 mmol) (S)-2-Fluorenylmethoxy-carbonylamino-6-hydroxyhexansäure (**92**) und 0.62 g (1.5 mmol) (E)-17-Brom-4,7,10,13-tetraoxo-15-heptansäure-*tert*-butylester (**93**) in 20 ml eines Gemisches aus 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 10 ml Dichlormethan werden 0.45 g (1.4 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumbromid gegeben. Das 2 phasige System wird bei Raumtemperatur 24 Stunden stark gerührt. Das Gemisch wird mit 10 ml Dichlormethan verdünnt und die wässrige Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird noch 2 mal mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 1:1 (v/v), gereinigt. Es resultieren 0.58 g (0.8 mmol) eines farblosen Öls.

Ausbeute: 0.58 g (0.8 mmol, 57 %)

R<sub>f</sub>: (Ethylacetat:Cyclohexan 2:1 (v/v)) = 0.11

$[\alpha]_D^{20}$ : -7,1 ° (c = 2.5, MeOH)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.76 (d, J = 7.7 Hz, 2H, arom. H), 7.61-7.59 (m, 2H, arom. H), 7.40 (t, J' = 7.7 Hz, 2H, arom. H), 7.33-7.30 (m, 2H, arom. H), 5.89-5.80 (m, 2H, H-15, H-16), 5.42 (d, J'' = 8,3 Hz, 1H, NH), 4.69, 4.61 (2 dd, J''' = 5,4, 12,9 Hz jedes, 1 H jedes, H-17), 4.42-4.38 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, α-CH), 4.22 (t, J = 7 Hz, Fmoc-CH), 4.02 (d, J = 4,8 Hz, 2H, H-14), 3.70, 3.67-3.58 (t, m, J = 6.5 Hz, 2H, 14H, H-3, H-5, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12, ε-CH<sub>2</sub>), 2.50 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-2), 1.90-1.86, 1.78-1.70, 1.62-1.52, 1.47-1.41 (4 m, 2H, 1H, 2H, 2H, β-CH<sub>2</sub>, γ-CH<sub>2</sub>, δ-CH<sub>2</sub>, OH), 1.44 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.2, 170.9 (C-1, C-19), 155.6 (Urethan CO), 143.9, 143.8, 141.3 (arom. Quart. C), 131.8, 127.7, 127.1, 125.8, 125.1, 120.0 (C-15, C-16, arom. C), 73.2 (quart. C, tBu), 73.0, 72.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>, C-14), 71.0, 70.9, 70.6, 69.7 (C-5, C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-17), 65.3 (C-3), 63.0 (ε-CH<sub>2</sub>), 56.9 (α-CH), 34.9 (C-2), 32.9, 31.4 (δ-CH<sub>2</sub>, β-CH<sub>2</sub>), 29.0 (tBu, CH<sub>3</sub>), 20.6 (γ-CH<sub>2</sub>).

HRMS (POSFAB, 3-NBA) *m/z*: ber. C<sub>38</sub>H<sub>54</sub>NO<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup> 700,3627 gef. 700,3657

#### 6.4.2. Versuche zu Kapitel 4.3.3.

##### **2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-6-hydroxy-hexansäure-4-(2-{2-[2-(2-carboxy-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-but-2-enylester (99)**

Eine Lösung von 1.68 g (2.4 mmol) 2-(9H-Fluorenylmethoxycarbonylamino)-6-hydroxyhexansäure-4-(2-(2-(2-(2-*tert*-butoxycarbonylethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-but-2-enylester (**98**) in 20 ml absolutem Dichlormethan und 10 ml Trifluoressigsäure wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Mit Toluol wird die Trifluoressigsäure koevaporiert. Der Rückstand wird in 18 ml eines Gemisches aus 9 ml Dioxan und 9 ml 3 % Natriumcarbonatlösung gelöst und 5 min gerührt. Das Gemisch wird mit 10 % Salzsäure auf den pH-Wert = 2 gebracht und 3 mal mit 30

ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nochmals 3 mal mit je 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie, Eluens Ethylacetat mit 1 % Essigsäure, gereinigt. Es resultieren 1.10 g (1.7 mmol) eines farblosen Öls.

Ausbeute: 1.10 g (1.7 mmol, 71 %)

$R_f$ : (Ethylacetat + 1% Essigsäure) = 0.3

$[\alpha]_D^{20}$ : -11,1 ° (c = 0.3, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 2H, arom. H), 7.62-7.53 (m, 2H, arom. H), 7.39 (t, J = 7.5 Hz, 2H, arom. H), 7.31 (t, J = 7.5 Hz, 2H, arom. H), 5.91-5.77 (m, 4H, H-15, 16-H, OH,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 5.61 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.72-4.57 (m, 2H, H-17), 4.42-4.35 (m, 3H, Fmoc- $\text{CH}_2$ , H-20), 4.22 (t, J = 7 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.03 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H-14), 3.73, 3.63-3.59 (t, m, J = 5.9 Hz, 2H, 14 H, H-3, H-5, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 2.58 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-2), 1.90-1.82, 1.79-1.70, 1.58-1.50, 1.49-1.42 (4 m, 1H, 1H, 2H, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 175.1, 172.3 (C-1, C-19), 156.0 (Urethan CO), 143.9, 143.7, 141.3 (arom. quart. C), 131.4, 128.3, 127.7, 126.1, 125.1, 120.0 (C-15, C-16, arom. C), 70.7, 70.3, 70.2, 69.4, 67.0, 65.0, 62.1 (C-3, C-5, C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-17,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ , Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 53.8 ( $\alpha$ -CH), 47.1 (Fmoc-CH), 32.2, 31.9 (C-2,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 21.4 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ).

HRMS (POSFAB, 3-NBA)  $m/z$ : ber.:  $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{NO}_{11}\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  666.2890, gef.: 666.2870  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**(S)-24-(tert-Butyldimethylsiloxy)-20-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino-4,7,10,13,18-pentaoxo-19-oxo-tetracos-15E-ensäure (100)**

Zu einer Lösung von 1.12 g (1.74 mmol) 2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy-carbonyl-amino)-6-hydroxy-hexansäure-4-(2-(2-(2-(2-carboxy-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-but-2-enylester (**99**) und 0.68 ml Diisopropylethylamin in 30 ml absolutem Dichlormethan werden 0.80 ml *tert*-Butyldimethylsilyltriflat gegeben und es wird eine Stunde gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 30 ml Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in einem Gemisch aus 20 ml Dioxan, 10 ml Methanol und 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst und 30 min gerührt. Das Gemisch wird vorsichtig mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH = 4 angesäuert und 3 mal mit 40 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 60 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie, Eluens Ethylacetat mit 1 % Essigsäure, gereinigt, es resultierten 560 mg eines farblosen Öls.

Ausbeute.: 0.56 g (0.73 mmol, 42 %)

R<sub>f</sub>.: (Ethylacetat + 1 % Essigsäure) = 0.2

$[\alpha]_D^{20}$ : -6.2 ° (c = 1.2, MeOH)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.77 (d, J = 7.5 Hz, 2H, arom. H), 7.64-7.55 (m, 2H, arom. H), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H, arom. H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, arom. H), 5.94-5.80 (m, 2H, H-15, H-16), 5.44 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.72-4.61 (m, 2H, H-17), 4.46-4.36 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, α-CH), 4.25 (t, J = 7 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.06 (d, J = 4.7 Hz, 2H, H-14), 3.78, 3.67-3.62 (t, m, J = 6.2 Hz, 2H, 14H, H-3, H-5, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12, ε-CH<sub>2</sub>), 2.64 (t, J = 6.2 Hz, 2H, H-2), 1.93-1.87, 1.77-1.68, 1.58-1.47, 1.46-1.41 (4m, 1H, 1H, 2H, 2H, β-CH<sub>2</sub>, γ-CH<sub>2</sub>, δ-CH<sub>2</sub>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu), 0.07 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 175.1 (C-1), 172.4 (C-19), 156.0 (Urethan CO), 143.9, 143.7, 141.3 (arom. quart. C), 131.5, 127.7, 127.1, 126.0, 125.1, 120.0 (C-15, C-16, arom. C), 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 69.6, 67.0, 66.4, 65.2, 62.8 (C-3, C-5, C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-17,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ , Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 56.2 ( $\alpha$ -CH), 47.1 (Fmoc-CH), 34.9, 32.2 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 26.0 ( $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ), 21.7 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ), 18.3 (quart. C,  $^t\text{Bu}$ ), -5.3 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{SiCH}_3$ ).

HRMS (POSFAB, 3-NBA)  $m/z$ : ber. für  $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{NO}_{11}\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  758,3857 gef.: 758,3810

Elementaranalyse: ber. für  $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{NO}_{11}\text{Si}$ : C, 63,38; H, 7,85; N, 1,85  
gef.: C, 63,07; H, 7,80; N, 1,94

**Anknüpfung von (S)-24-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-20-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino-4,7,10,13,18-pentaoxo-19-oxo-tetracos-15*E*-ensäure an Aminopolystyrolharz (1.41 mmol/g).**

Das Harz wird im Vakuum über Nacht getrocknet und dann 10 min in einer Lösung von abs. Dichlormethan und 10 % Ethyldiisopropylamin geschüttelt.

Zu einer Lösung von 0.33 g (S)-24-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-20-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino-4,7,10,13,18-pentaoxo-19-oxo-tetracos-15*E*-ensäure (**100**) und 0.12 g *N*-Hydroxybenzotriazol in 3 ml abs. Dichlormethan werden 0.15 ml Diisopropylcarbodiimid gegeben. Nach 5 min wird die voraktivierte Lösung zum Harz gegeben. Nach 12 h wird das Harz mit jeweils 10 ml Dichlormethan, Dimethylformamid und Isopropylalkohol gewaschen. Die Belegung des Harzes wurde mittels UV-Absorption nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe bestimmt.

Beladung 0.45 mmol/g

### **Bestimmung der Beladung mittels Messung der UV-Absorption des Fmoc-Piperidinaddukts**

Zuerst wird das Harz im Vakuum getrocknet. Danach wird ein Teil des Harzes in eine Lösung aus 3 ml 20 % Piperidin in DMF gegeben ( $C \sim 1 \mu\text{molar}$ ). Nach 5 Minuten wird die UV-Absorption bei 290 nm gemessen. Mit folgender Formel lässt sich die Beladung des Harzes bestimmen:

$$\text{Beladung [mmol/g]} = (\text{Abs}_{\text{Probe}} - \text{Abs}_{\text{Referenz}}) / (1.65 \cdot \text{mg Harz})$$

#### **6.4.3. Versuche zu Kapitel 4.3.4.**

##### **Generelle Vorschrift für einen Kupplungszyklus:**

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das Harz 2 mal für jeweils 10 min in 5 ml einer 40% Lösung von Piperidin in N-Methylpyrrolidinon (NMP) geschüttelt und anschließend mit 2 mal 10 ml DMF und 2 mal 10 ml NMP gewaschen.

Zur Anknüpfung der Fmoc-geschützten Aminosäuren werden 3 Äquivalente der Aminosäure mit 6 Äquivalenten Hünigsbase und 2.95 Äquivalenten HATU (**102**) in 3 ml NMP voraktiviert und danach zum Harz gegeben. Das Harz wird 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung wird nochmals mit den gleichen Bedingungen wiederholt. Anschließend wird das Harz wieder 2 mal mit je 10 ml DMF und 2 mal mit je 10 ml NMP gewaschen.

Zum Cappen wird das Harz 2 mal für 5 min in 5 ml einer Lösung von 1 % Essigsäureanhydrid in Pyridin geschüttelt. Anschließend wird das Harz wieder 2 mal mit je 10 ml DMF und 2 mal mit je 10 ml NMP gewaschen.

### **Anknüpfung des Myristoylrestes**

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das Harz 2 mal für jeweils 10 min in 5 ml einer 40 % Lösung von Piperidin in N-Methylpyrrolidinon (NMP) geschüttelt und anschließend mit 2 mal 10 DMF und 2 mal 10 ml NMP gewaschen.

Zur Anknüpfung des Myristoylrestes werden 3 Äquivalente Myristoylchlorid (**105**) und 6 Äquivalente Ethyldiisopropylamin in 5 ml NMP zum Harz gegeben und das Harz 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung wird unter gleichen Bedingungen wiederholt.

Zum Cappen wird das Harz 2 mal für 5 min in 5 ml einer Lösung von 1 % Essigsäureanhydrid in Pyridin geschüttelt. Anschließend wird das Harz wieder 2 mal mit je 10 ml DMF und 2 mal mit je 10 ml NMP gewaschen.

### **Entschützung der Hydroxyfunktion und Anbindung des Fluoreszenzmarkers**

Das Harz wird 9 h mit einer Lösung von 0.3 ml HF in Pyridin, 0.4 ml Triethylamin und 10 ml absolutem Dichlormethan behandelt. Danach wird das Harz nacheinander mit je 4 ml DMF, Isopropylalkohol und Dichlormethan gewaschen.

Das im Vakuum getrocknete Harz wird mit einer Lösung von 3 Äq. Methylantranilsäureanhydrid (**107**), 6 Äq. Ethyldiisopropylamin und 3 Äquivalente Dimethylaminopyridin in 5 ml Dimethylformamid versetzt und unter Argonatmosphäre bei 70 °C für 24 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit je 10 ml Dimethylformamid und Dichlormethan gewaschen.

### **Abspaltung Schutzgruppen und Ablösung vom Harz**

Zu 5 ml einer Mischung von Trifluoressigsäure und Dichlormethan 5:1 mit 4 % Thioanisol und 2 % Triethylsilan wird das getrocknete Harz gegeben. Nach 30 min wird das Harz mit jeweils 10 ml Dimethylformamid und 10 ml Dichlormethan gewaschen. Anschließend wird das Harz mit 5 ml einer Lösung von 0.2 Äq. Tetrakis(triphenyl)palladium mit 5 % Dimethylbarbitursäure in Dimethylformamid für

24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

#### 6.4.4. Versuche zu Kapitel 4.3.6.

##### **L-Glutaminsäure-1-*tert*-butyl-5-methylester (110)**

In einem Druckgefäß werden 3.22 g (20 mmol) *L*-Glutaminsäure-5-methylester (**109**) und 3 ml konzentrierte Schwefelsäure in 30 ml Dioxan gelöst. Dazu werden 50 ml Isobuten, mit flüssigem Stickstoff einkondensiert, gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung auf ein Gemisch von 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 100 ml Ethylacetat gegeben. Man extrahiert 2 mal mit 50 ml Ethylacetat. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographie, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 3:1 mit 1 % Triethylamin, liefert 1.92 g (8.8 mmol) eines farblosen Feststoffes.

Ausbeute: 1.92 g (8,8 mmol, 44 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1 (v/v)) = 0.23

$[\alpha]_D^{20}$ : +12.9 ° (c = 0.07, CHCl<sub>3</sub>)

Schmelzpunkt: 87 °C

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 3.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, Me), 3,37 (m, 1H, α-CH), 2,49 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>), 2.19-2.04, 1.95-1.89 (2m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 1,42 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 178.1, 171.5 (2 CO), 56.5 (α-CH), 54.7 (CH<sub>3</sub>, Me), 30.1 (γ-CH<sub>2</sub>), 29.0 (3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 26.5 (β-CH<sub>2</sub>).

***N*-Trityl-*L*-Glutaminsäure-1-*tert*-butyl-5-methylester (111)**

Zu einer Lösung von 4.11 g (18.9 mmol) *L*-Glutaminsäure-1-*tert*-butyl-5-methylester (**110**) und 2.8 ml (20 mmol) Triethylamin in 50 ml abs. Dichlormethan werden 5.26 g (18.9 mmol) Triphenylchlormethan (**112**) gegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Man wäscht die organische Phase 3 mal mit 20 ml Wasser und trocknet über Magnesiumsulfat. Säulenchromatographie, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat 10:1, liefert 7.38 g eines farblosen Öls.

Ausbeute: 7.38 g (16.1 mmol, 85 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 10:1 (v/v)) = 0.45

$[\alpha]_D^{20}$ : +23.8 ° (c = 0.03, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.55-7.49, 7.35-7.22 (2m, 5H, 10H, arom. H, Trt), 3.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, Me), 3.23-3.18 (m, 1H, α-CH), 2.45-2.35, 2.15-2.05 (2m, 1H, 1H, γ-CH<sub>2</sub>), 1.98-1.86, 1.85-1.72 (2m, 1H, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 1.10 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 174.6, 174.2 (2 CO), 146.6 (quart. arom. C), 129.4, 128.7, 127.9, 127.0 (arom. C), 81.6 (quart. <sup>t</sup>Bu), 72.0 (quart. Trt), 56.2 (α-CH), 52.1 (CH<sub>3</sub>, Me), 31.0, 29.1 (β-CH<sub>2</sub>, γ-CH<sub>2</sub>), 28.2 (CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

MS (FAB) *m/z*: ber. für C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>4</sub>: 460,24      gef.: 460,30 [M+H]<sup>+</sup>

**5-Hydroxy-2-(tritylamino)-pentansäure-*tert*-butylester (114)**

Zu einer Lösung von 1.70 g (3.7 mmol) *N*-Trityl-*L*-Glutaminsäure-1-*tert*-butyl-5-methylester (**113**) in 70 ml absolutem Tetrahydrofuran werden bei -50 °C und unter einer Argonatmosphäre 0.39 g (10.3 mmol) Lithiumaluminiumhydrid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2,5 h bei -50 °C gerührt. Danach werden zu der 20 °C warmen Lösung 20 ml gesättigte Natriumsulfatlösung gegeben. Nach ca. 15 min wird das ausgefallene Aluminiumhydroxid abfiltriert und die Lösung 3 mal mit 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden

über Magnesiumsulfat getrocknet. Säulenchromatographie, Eluens Cyclohexan: Ethylacetat 7:1, liefert 1.30 g (3 mmol) eines farblosen, sirupösen Öls.

Ausbeute: 1.3 g (3 mmol, 81 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 4:1 (v/v)) = 0.22

$[\alpha]_D^{20}$ : +17.6 ° (c = 0.04, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.52-7.48 (m, 6H, arom. H), 7.32-7.15 (m, 9H, arom. H), 3.73-3.65 (m, 1H, δ-CH<sub>2</sub>), 3.59-3.50 (m, 1H, δ-CH<sub>2</sub>), 3.49-3.41 (m, 1H, α-CH), 1.85-1.60, 1.59-1.47 (2 m, 4 H, β-CH<sub>2</sub>, γ-CH<sub>2</sub>), 1.24 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

MS (FAB) *m/z*: ber. für C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>3</sub>: 431.56    gef. 432.32 [M<sup>+</sup>+H]

### **5-*N*-Methylantranilsäureester-2-tritylamino-pentansäure-*tert*-butylester (115)**

Eine Lösung von 1.69 g (3.9 mmol) 5-Hydroxy-2-(tritylamino)-pentansäure-*tert*-butylester (**114**), 1.23 ml (8.8 mmol) Ethyldiisopropylamin und 50 mg (0.4 mmol) *N,N*-Dimethylaminopyridin in 70 ml Tetrahydrofuran wird auf 60 °C erhitzt. Dazu werden 0.96 g (5.5 mmol) *N*-Methyl-*o*-antranilsäureanhydrid (**107**) gelöst in 10 ml Tetrahydrofuran langsam über 1 Stunde zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei 60 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 20 ml Wasser und 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und 3 mal mit 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Cyclohexan:Ethylacetat (5:1 (v:v)) lieferte 1.65 g eines gelblichen Öls.

Ausbeute: 1.65 g (3.0 mmol, 74 %)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan : Ethylacetat 5:1 (v:v)) = 0.55

$[\alpha]_D^{20}$ : -1.7 ° (c = 0.05, CHCl<sub>3</sub>)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.89 (d,  $J$  = 7 Hz, 1 H, arom. H), 7.51-7.48 (m, 6 H arom. H), 7.40-7.36 (m, 1 H, arom. H), 7.34-7.22, 7.17-7.13 (m, 9 H, arom. H), 6.67 (d,  $J$  = 8 Hz, 1 H, arom. H), 6.60-6.56 (m, 1 H, arom. H), 4.26-4.21 (m, 2 H,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 3.38-3.35 (m, 1 H,  $\alpha$ -CH), 2.90 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.99-1.93, 1.84-1.77, 1.67-1.60 (3 m, 4 H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ), 1.43 (s, 9 H, 3  $\text{CH}_3$ ,  $^t\text{Bu}$ ).

### 5-*N*-Methylantranilsäureester-2-aminopentansäure-*tert*-butylester (116)

Zu einer Lösung von 371 mg (0.67 mmol) 5-*N*-Methylantranilsäureester-2-tritylaminopentansäure-*tert*-butylester (**112**) in 10 ml absolutem Dichlormethan werden 0.3 ml Triethylsilan gegeben und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden bei 0 °C 0.1 ml Trifluoressigsäure gegeben. Nach 3 min wird das Lösungsmittel bei 0 °C entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung, Eluens Chloroform:Methanol (100:3 (v/v)), lieferte 199 mg (0.62 mmol) eines gelblichen Öls.

Ausbeute: 199 mg (0.62 mmol, 94 %)

$R_f$ : (Cyclohexan:Ethylacetat (v/v) + 1 % Triethylamin) = 0.17

$[\alpha]_D^{20}$ : -10.4 ° ( $c$  = 0.04,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.93 (dd,  $J$  = 8 Hz,  $J'$  = 1 Hz, 1H, arom. H), 7.44 (dt,  $J$  = 7 Hz,  $J'$  = 2 Hz, 1 H, arom. H), 6.92 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H, arom. H), 6.79 (t,  $J$  = 7 Hz, 1H, arom. H), 4.38-4.28 (m, 2 H,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 4.06-4.02 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 2.96 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ , Me), 2.17-2.12, 2.06-1.94 (2 m, 4 H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ), 1.46 (s, 9 H, 3  $\text{CH}_3$ ).

MS (EI)  $m/z$ : ber. für  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ : 322.40 gef. 322.67 [ $\text{M}^+$ ]

### 6.4.5. Versuche zu Kapitel 4.3.7.

#### ***N*<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>0</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysinallylester (118)**

Zu einer Lösung von 2.27 g (5 mmol) *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>0</sup>-Boc-*L*-Lysin-OH (**119**) und 0.69 g (5 mmol) Kaliumcarbonat in 60 ml Aceton werden 0.74 ml (5.5 mmol) Allylbromid gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und mit 100 ml Ethylacetat versetzt. Anschließend wird die Lösung 3 mal mit 80 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Es resultiert ein weisser Feststoff. Es ist keine weitere Aufreinigung notwendig.

Ausbeute: 1.78 g (72 %, 3.6 mmol)

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1 (v/v)) = 0.45

$[\alpha]_D^{20}$ : +1.2 ° (c = 0.02, CHCl<sub>3</sub>)

Schmelzpunkt: 113 °C

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.77 (d, *J* = 8 Hz, 2H, arom. H), 7.57 (d, *J*' = 8 Hz, 2H, arom. H), 7.38 (t, *J* = 8 Hz, 2H, arom. H), 7.30 (t, *J*' = 8 Hz, 2H, arom. H), 5.97-5.82 (m, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>, Allyl), 5.36-5.22 (m, 2H, CH=CH<sub>2</sub>, Allyl), 4.61 (d, *J*" = 7 Hz, -O-CH<sub>2</sub>-, Allyl), 4.46-4.32 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH-, Fmoc), 4.22-4.18 (m, 1H, α-CH), 3.13-3.04 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.92-1.65 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 1.60-1.49 (m, 2H, δ-CH<sub>2</sub>), 1.41 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 1.34-1.27 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>).

#### ***N*<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-lysinallylester (120)**

1.6 g (3.2 mmol) *N*<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>0</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysinallylester (**118**) werden in 10 ml einer Lösung von Trifluoressigsäure:Dichlormethan (abs) 1:1 für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die

Lösung mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck coevaporiert. Es resultiert ein farbloses Öl.

Ausbeute: quantitativ

R<sub>f</sub>: (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1) = 0.22

$[\alpha]_D^{20}$ : +6.5 ° (c = 0.04, MeOH)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.77 (d, *J* = 8 Hz, 2H, arom. H), 7.57 (d, *J*' = 8 Hz, 2H, arom. H), 7.38 (t, *J* = 8 Hz, 2H, arom. H), 7.30 (t, *J*' = 8 Hz, 2H, arom. H), 5.97-5.82 (m, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>, Allyl), 5.36-5.22 (m, 2H, CH=CH<sub>2</sub>, Allyl), 4.61 (d, *J*'' = 7 Hz, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-, Allyl), 4.46-4.32 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH-, Fmoc), 4.22-4.18 (m, 1H, α-CH), 2.97-2.84 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 2.13-2.01 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 1.92-1.65 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 1.60-1.49 (m, 2H, δ-CH<sub>2</sub>), 1.34-1.27 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>).

#### 6.4.6. Versuche zu Kapitel 4.3.8.

##### Anbindung von N<sup>α</sup>-Fmoc-Lys-OAll (120) an das Tritylharz

Nach Trocknen des Harzes im Vakuum wird zu einer Lösung von 1.06 g (2.6 mmol) N<sup>α</sup>-Fmoc-Lys-Allylester (**120**) und 0.9 ml (5.2 mmol) Ethyl-diisopropylamin in 5 ml N-Methylpyrrolidon 0.59 g Chlortritylharz (max. Bel. 1.47 mmol/g) gegeben. Das Harz wird 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend abfiltriert und mit 10 ml Dichlormethan und 10 ml DMF gewaschen. Anschließend wird das Harz für 30 min in einer Lösung von 50 % Methanol in NMP geschüttelt um nicht beladene Linkerstellen zu blockieren. Anschließend wird das Harz mit 10 ml Dichlormethan und 10 ml Dimethylformamid gewaschen und getrocknet.

### **Bestimmung der Beladung durch UV-Messung**

2 mg des trockenen Harzes werden in 3 ml einer 20 % Lösung von Piperidin in Dimethylformamid gegeben. Nach 5 Minuten wird die UV-Absorption bei 290 nm gemessen. Mit folgender Formel lässt sich die Beladung des Harzes bestimmen:

$$\text{Beladung [mmol/g]} = (\text{Abs}_{\text{Probe}} - \text{Abs}_{\text{Referenz}}) / (1.65 * \text{mg Harz})$$

Danach resultierte eine Beladung von 0.92 mmol/g Harz

### **Generelle Vorschrift für einen Kupplungszyklus**

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das Harz 2 mal 10 min in 3 ml einer Lösung von 40 % Piperidin in N-Methylpyrrolidon geschüttelt. Um die nächste Fmoc-geschützte Aminosäure anzubinden werden 3 Äq. der Aminosäure, 2.9 Äq. HATU (**102**), 6 Äq. Ethyldiisopropylamin in 4 ml NMP für 2 min voraktiviert und anschließend zum Harz gegeben und 1.5 h bei RT geschüttelt. Die Kupplung wird jeweils einmal wiederholt. Das Capping der nicht umgesetzten Aminofunktionen wird durch zweimal 5 minütiges behandeln des Harzes mit 3 ml 1 % Essigsäureanhydrid in Pyridin erreicht.

### **Anbindung des Myristoylrestes an der festen Phase**

Zu einer Lösung von 0.19 ml Myristoylchlorid (**105**) und 0.40 ml Ethyldiisopropylamin in 3 ml NMP wird das Harz gegeben. Die Polymerkügelchen werden 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die feste Phase abfiltriert und die Kupplung unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Danach wird das abfiltrierte Harz zweimal in 3 ml einer Lösung von 1 % Essigsäureanhydrid in Pyridin für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit je 10 ml NMP, DMF und Dichlormethan gewaschen und getrocknet.

### **Abspaltung des Allylesters, Anbindung der fluoreszenzmarkierten Aminosäure**

200 mg des mit dem myristoylierten Peptid beladenen Harzes (**123**) werden mit 5 ml einer entgasten Lösung von 10 % Tetrakistriphenylpalladium (0), 3 % Dimethylbarbitursäure in Dimethylformamid für 4 h behandelt. Die Abspaltungs-prozedur wird einmal wiederholt. Anschließend wird das Harz in 5 ml einer Lösung aus 728 mg PyBOP (**125**) und 452 mg 5-*N*-Methylantranilsäureester-2-amino-pentansäure-*tert*-butylester (**116**) in 4 % *N*-Methylmorpholin in DMF gegeben und 2.5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird das Harz abfiltriert und mit jeweils 10 ml Dimethylformamid, NMP und Dichlormethan gewaschen.

### **Abspaltung des Peptides vom Harz**

Das Harz wird für 30 min in 5 ml eines Lösungsgemisches aus 85 % Trifluoressigsäure, 5 % Thioanisol, 5 % Triethylsilan und 5 % Dimethylformamid bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz abfiltriert und das Filtrat unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird über eine C18HD-Trennsäule mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten (20 % Acetonitril – 70 % Acetonitril in 30 min) getrennt. Es resultierten 11 mg des fluoreszenzmarkierten Peptides (**27**).

### ***N*-[*N'*-Myristoyl-*L*-glycyl-*L*-alanyl-*L*-aspargyl-*L*-alanyl-*L*-seryl-*L*-valyl-*L*-leucyl-*L*-glycyl-*L*-glycyl-*L*-glycyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl]-2-amino-5-(*O*-mantyl)-hydroxypentansäure (**27**)**

Ausbeute: 11 mg,  $5.6 \cdot 10^{-6}$  Mol

$[\alpha]_D^{20}$ : -6.2 ° (c = 0.0017, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ :MeOD):  $\delta$  = 7.80 (d,  $J$  = 7 Hz, 1 H, arom. H), 7.32 (t,  $J$  = 7 Hz, 1H, arom. H), 6.64 (d,  $J$  = 7 Hz, 1 H, arom. H), 6.52 (t,  $J$  = 7 Hz, 1H, arom.

H), 4.42-4.35 (m, 2 H, 2  $\alpha$ -CH), 4.24-4.18 (m, 10 H, 10  $\alpha$ -CH), 4.14-4.06 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-OCO-), 3.88-3.74 (m, 6 H, 4  $\alpha$ -CH,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> (Ser)), 2.94 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>, Mant), 2.86-2.78 (m, 13 H,  $\beta$ -CH (Val), 5  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> (Lys),  $\delta$ -CH<sub>2</sub> (Arg)), 2.02-1.94 (m, 3 H,  $\gamma$ -CH (Leu), CH<sub>2</sub>-CO (Myr)), 1.86-1.76 (m, 16 H, 5  $\beta$ -CH<sub>2</sub> (Lys),  $\beta$ -CH<sub>2</sub> (Leu), 2 CH<sub>2</sub> (Pentansre)), 1.75-1.68 (m, 6 H, 2 CH<sub>3</sub> (Ala)), 1.66-1.52 (m, 14 H, 5  $\delta$ -CH<sub>2</sub> (Lys),  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> (Arg), CH<sub>2</sub> (Myr)), 1.46-1.26, 1.20-1.10 (m, 20 H, 10 CH<sub>2</sub> (Myr)), 0.94-0.78 (m, 15 H, 2 CH<sub>3</sub> (Leu), 2 CH<sub>3</sub> (Val), CH<sub>3</sub> (Myr)).

MS (MALDI-TOF) *m/z*: ber. für C<sub>91</sub>H<sub>163</sub>N<sub>25</sub>O<sub>21</sub> 1943.42  
gef: 1944.48 [M+H]<sup>+</sup>  
1966.60 [M+Na]<sup>+</sup>

HPLC: Waters Xterra C18 100\*4.6, Gradient xx% Acetonitril zu 100 % Acetonitril in 25 min.

## 6.5. Versuche zu Kapitel 4.4.

Zuerst werden 20 Hela- und 4 RK13 Kulturschalen angeimpft (Medium: MEM 41090 028; 10 % FCS; 1 % Phe/Streptomycin; Kultivierung bei 37 °C und 6,8 % CO<sub>2</sub>. Zu den über Nacht gewachsenen Zellen werden zum Zeitpunkt  $t = 0$  die entsprechenden Mengen der Petidlösung zugesetzt, so daß die Endkonzentrationen 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 30  $\mu$ M resultieren. Nach den entsprechenden Zeitpunkten  $t = 4$  min, 10 min, 30 min, 60 min und 180 min wurde das Medium gespült. Dazu wurde das Medium mit 1 ml BPS-Puffer (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) gespült und anschließend die Zellen mit Trypsine EDTA von der Oberfläche des Gefäßes gelöst. Die abgelösten Zellen werden in der doppelten Menge Medium aufgenommen und 3 min bei 800 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird das Medium verworfen und das Pellet mit 90-100  $\mu$ l BPS-Puffer resuspendiert. Danach wird 1 ml 3.7 % Formaldehydlösung zum fixieren der Zellen zugegeben. Die fixierten Zellen werden bei 600 rpm 2 min zentrifugiert. Die Phase mit der Formaldehydlösung wird abgenommen und nochmals 1 ml BPS-Puffer zugegeben und wiederum die Zellen abzentrifugiert.

Der Puffer wird so weit wie möglich entfernt. Die Zellen werden auf einem Objektträger fixiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

## 7. Literatur

- [1] J. C. Venter et al., *Science* **2001**, 291, 12304.
- [2] Y. Baba, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 13, 3-4.
- [3] P. L. Felgner, *Spektrum der Wissenschaft* **Nov 1997**, 50-55.
- [4] C. O'Driscoll, *Chemistry in Britain* **1997**, 9, 66-69.
- [5] R. A. Morgan, W. F. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 191-217.
- [6] K. W. Culver, *Trends in Genetics* **1994**, 10, 174.
- [7] P. Seibel, J. Trappe, *Chemie in unserer Zeit* **1996**, 30, 235-243.
- [8] T. Friedmann, *Spektrum der Wissenschaft* **Okt 1997**, 50-56.
- [9] C. P. Hodgson, *Bio/Technology* **1995**, 222-225.
- [10] A. Pellicier, D. Robins, B. Wold, R. Sweet, J. Jackson, I. Lowy, J.M. Roberts, G. K. Sim, S. Silverstein, R. Axel, *Science* **1980**, 209, 1414-1422.
- [11] P. L. Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84, 7413-7417.
- [12] P. Vierling, H. V. J. Kolbe, R. Bischoff, C. Santaella, O. Boussif, N. van Craynest, G. Verderone, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1367-1379.
- [13] J.-P. Behr, B. Demeneix, D. Scherman, M. D. Mergny, M. A. Zanta, F. Lezoulac'h, O. Boussif, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 7297-7301.
- [14] R. N. Zuckermann, V. Dwarki, F. E. Cohen, J. D. Hamer, T. Uno, J. E. Murphy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 1517-1522.
- [15] G. Byk, C. Dubertret, V. Escriou, M. Frederic, G. Jaslin, R. Rangara, B. Pitard, J. Crouzet, P. Wils, B. Schwartz, D. Scherman, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 224-235.
- [16] G. Jaslin, B. Wetzer, G. Byk, M. Frederic, C. Dubertret, B. Pitard, D. Scherman, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4377-4387.
- [17] T. Imaniski, T. Doi, K. Miyashita, T. Uneda, A. Shimogama, S. Obika, W. Yu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 14, 1817-1820.
- [18] W. E. Hennink, J. Demester, S. C. De Swedt, *Pharmaceutical research* **2000**, 17, 113-126.
- [19] R. N. Zuckermann, *Chemistry & Biology* **1998**, 5, 345-354.
- [20] D. Görlich, *EMBO J.* **1998**, 17, 2721-2727.
- [21] C. Dingwall, R. Laskey, *Science* **1992**, 258, 942-947.
- [22] J. A. Hanover, M. Miller, M. K. Park, *Physiol. Rev.* **1991**, 71, 909-949.

- [23] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, VCH, Weinheim **1995**.
- [24] I. W. Mattaj, E. Conti, *Nature* **1999**, 399, 208-210.
- [25] E. M. DeRobertis, T. R. Bürglin, J. M. Lucocq, D. D. Newmeyer, *EMBO J.* **1986**, 5, 501-510.
- [26] D. Görlich, I. W. Mattaj, *Science* **1996**, 271, 1513-1518.
- [27] P. A. Silver, *Cell* **1991**, 64, 489-497.
- [28] M. I. Bukrinsky, S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, M. Stevenson, *Nature* **1993**, 365, 666-669.
- [29] A. G. Bukrinskaya, A. Ghorpade, N. K. Heinzinger, T. E. Smithgall, R. E. Lewis, M. Stevenson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 367-371.
- [30] Y.-Z. Lin, S. Yao, R. A. Veach, T. R. Torgerson, J. Hawinger, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14255-14258.
- [31] J. A. Hanover, *FASEB J.* **1992**, 6, 2288-2295.
- [32] H. Hall, E. J. Williams, S. E. Moore, F. S. Walsh, A. Prochiantz, P. Doherty, *Current Biology* **1996**, 6, 580-587.
- [33] D. R. Corey, C. G. Simmons, A. E. Pritts, L. D. Mayfield, J. W. Shay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1987**, 23, 3001-3006.
- [34] M. Pooga et al., *FASEB J.* **1998**, 12, 67-77.
- [35] M. Pooga et al., *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 619-626.
- [36] J.-P. Behr, P. Belguise-Valladies, M. A. Zanta, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 91-96.
- [37] F. Heitz, G. Divita, L. Chaloin, P. Vidal, P. Lory, J. Mèrey, N. Lautredon. *Biochemical and Biophysical Research Commun.* **1998**, 243, 601-608.
- [38] J. Hawiger, J. P. Tam, A. D. Colosia, S. Timmons, X-Y. Lin, T. R. Torgerson, L. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 9184-9189.
- [39] J. Hawiger, *Curr. Opinion in Chem. Biology* **1999**, 3, 89-94.
- [40] C.- H. Tung, A. Moore, T. Nakakoshi, R. Weissleder, R. Bhorade, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 301-305.
- [41] E. Nägele, H. Waldmann, *Angew. Chemie* **1995**, 107, 2425-2428.
- [42] E. Nägele, *Dissertation* **1995**, Karlsruhe.
- [42a] F. Eisele, *Dissertation* **2000**, Dortmund.

- [43] T. Pohl, H. Waldmann, *Angew. Chemie* **1996**, *108*, 1829-1832.
- [44] B. Sauerbrei, V. Jungmann, H. Waldmann, *Angew. Chemie* **1998**, *110*, 1187-1190.
- [45] K. D. Turnbull, R. G. Dyer, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7988-7995.
- [46] O. Hindsgauls, L. Jobron, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5835-5836.
- [47] H. W. Scheeren, R. G. G. Leenders, E. W. P. Damen, E. J. A. Bijsterveld, P. H. J. Houba, I. H. van der Meulen-Muileman, E. Boven, H. J. Haisma, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1597-1610.
- [48] A. McKillup, F. A. Madjadabadi, D. A. Louf, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1933-1936.
- [49] A. W. van de Made, R. H. van de Made, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1262-1263.
- [50] A. T. Carpenter, R. F. Hunter, *J. Appl. Chem.* **1953**, *3*, 486-495.
- [51] L. Moroder, A. Hallet, E. Wüsch, O. Keller, G. Wersin, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **1976**, *357*, 1651.
- [52] M. Reetz, G. Lohmer, R. Schickardi, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 492-494.
- [53] B. Dunning, F. Dunning, E. E. Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1565-1568.
- [54] K. J. Edgar, S. N. Falling, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5287-5291.
- [55] G. W. Holzappel, D. B. G. Williams, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8555-8564.
- [56] H. R. de Rossi, A. V. Veglia, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5963-5966.
- [57] A. Arcadi, A. Burini, S. Cacchi, M. Delmastro, F. Marinelli, B. R. Pietroni, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 976-982.
- [58] S. Cacchi, G. Fabrizi, L. Moro, P. Pace, *Synlett* **1997**, 1367-1370.
- [59] A. P. Kozikowski, S. Wang, D. Ma, J. Yao, S. Ahmed, R. I. Glacer, K. Bogi, S. Madarres, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1316.
- [60] D. Sinon, J. F. Nguetock, V. Bolitt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *31*, 5527-5530.
- [61] G. Fabrizi, A. Arcadi, S. Cacchi, M. Del Rosario, F. Marinelli, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9280-9288.
- [62] D. Chemin, G. Linstrumelle, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5335-5345.
- [63] N. A. Bumagin, L. I. Sakhomlinova, E. V. Luzikova, T. P. Tolstaya, I. B. Beletskaya, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 897-900.

- [64] R. Bates, G. J. Gabel, J. Ji, T. Rama-Devi, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8199-8212.
- [65] O. Haglund, M. Nilsson, *Synlett* **1991**, 723-724.
- [66] N. G. Kundu, M. Pal, J. S. Mahanty, M. De, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 2815-2820.
- [67] S. K. Dasgupta, J. S. Mahanty, M. Pal, N. G. Kundu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 41-42.
- [68] Claisen, Eisleb, *Chem. Berichte* **1962**, 84-87.
- [69] B. Zheng, M. Srebnik, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1912-1913.
- [70] B. Zheng, M. Srebnik, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 486-487.
- [71] J. Schwartz, J. A. Labinger, *Angew. Chem.* **1976**, *88*, 402-409.
- [72] U. Annby, S. Karlsson, S. Gronowitz, A. Hallberg, J. Alvhall, R. Svenson, *Acta Chem. Scand.* **1993**, *47*, 425-433.
- [73] J. G. Krause, *Synthesis* **1972**, 140.
- [74] D. R. M. Walton, F. D. King, *Synthesis* **1975**, 788-789.
- [75] M. Ikeda, S. Matsugashita, Y. Miki, J. Minamikawa, M. Tamura, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *40*, 4133-4135.
- [76] M. Ikeda, S. Fujii, K. Sumoto, J. Minamikawa, M. Tamura, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1239-1241.
- [77] M. Stumpf, H. Balli, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 1049-1053.
- [78] G. W. Kabalka, K. R. Sastry, G. W. McCollum, H. Yoshika, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4296-4298.
- [79] G. W. Kabalka, N. M. Goudaguon, Y. Lang, *Synthetic commun.* **1988**, *18*, 1363-1369.
- [80] H. C. Brown, K. W. Kim, M. Srebnik, B. Singuram, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4071-4078.
- [81] M. D. Erion, S. R. Kasibhalta, B. C. Bockser, P. D. van Poelje, M. R. Reddy, H. E. Gruber, J. R. Appleman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 308-319.
- [82] J. A. Sikorki et al., *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1422-1438.
- [83] T. Takeuchi, Y. Okami, M. Nakajima, M. Toyoshima, H. Adachi, E. Shitara, Y. Nishimura, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2-11.
- [84] S. J. Danishefsky, N. Rosen, L. Sepp-Lorenzino, F. F. Zheng, S. D. Kuduk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1233-1238.

- [85] H. Morishima, T. Hashizume, K. Yamoda, R. Ushijima, P. Nagano, H. Sato, H. Jona, A. Shimizu, N. Otake, H. Imamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 109-113.
- [86] T. Taguchi, N. Fujita, O. Kitagawa, H. Izawa, H. Hasegawa, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1108-1114.
- [87] A. B. Smith III, A. B. Benowitz, D. A. Favor, P. A. Sprengeler, R. Hirschmann, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3809-3812.
- [88] P. Reanut, E. Jost, L. Lebreton, B. Carboni, J. Annat, M. Vaultier, P. Dutartre, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4749-4763.
- [89] B. Devadas, S. K. Freeman, C. A. McWherter, N. S. Kishore, J. K. Lodge, E. Jackson-Machelski, J. I. Gordon, J. A. Sikorski, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 996-1000.
- [90] J. C. Martin, D. B. Dess, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
- [91] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, B. Chen, S. L. Cooper, W. McConell, G. J. Pritchard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *13*, 1689-1694.
- [92] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heiner, F. J. Lambros, R. C. Makofske, C. Chang, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1979**, *13*, 35-42.
- [93] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.
- [94] R. Ramage, J. Green, A. S. J. Stewart, O.-M. Ogunjoki, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4341-4344.
- [95] L. A. Carpino, H. Schroff, S. A. Triolo, E. S. Mansour, H. Wendschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *49*, 7829-7832.
- [96] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [97] J. E. Baldwin, S. J. Killin, R. M. Adlington, U. Spiegel, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2633-2636.
- [98] P. M. Fischer, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7605-7608.
- [99] T. Koch, H. F. Hausen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Oerum, *J. Peptide Res.* **1997**, *49*, 80-88.
- [100] H. Roeske, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1252-1258.
- [101] K. Barlos, P. Mamos, D. Papaionnon, C. Samida, W. Schäfer, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 1025-1030.
- [102] W. J. Hoekstra, M. N. Greco, S. C. Yabut, B. L. Hulshizer, B. E. Marganoff, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2629-2632.

- [103] K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, G. Papaphotin, W. Schäfer, Y. Wenqing, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3950.
- [104] T. W. Greene, P. O. M. Wuts, *Protective Groups in org. Synthesis* **1999**, 3. Ed., Wiley.
- [105] F. Guibé, *Tetrahedron* **1997**, *50*, 13509, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2967.
- [106] C. M. Krell, D. Seebach, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *7*, 1207-1218.
- [107] K. Barlos, D. Gatos, W. Schäfer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 572-575.
- [108] *Novabiochem Catalog* **2000**, P4.
- [109] *Novabiochem Catalog* **2000**
- [110] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, Oxford, **1998**.
- [111] L. Zervas, M. Winitz, J. P. Greenstein, *J. Org. Chem.* **1957**, *22*, 1515-1517.
- [112] Crofts et al., *J. Chem. Soc.* **1959**, 3610-3613.
- [113] W. Steglich, *Synthesis* **1982**, *10*, 826-829.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

9-BBN	9-Bora-bicyclo[2,2,0] nonan
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AcOZ	Acetyloxybenzyloxycarbonyl
AIBN	Azo- <i>bis</i> -isobutyronitril
All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyldiisopropylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N, N</i> – Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroxychinolin
EI	electron impact
FAB	fast atom bombardement
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	gefunden
h	Stunde
HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBX	1,1 Dihydroxy-1H-1λ <sup>5</sup> -benzo[d][1,2]iodoxol-3-on
Im	Imidazol
LAH	Lithiumaluminiumhydrid

---

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MANT	Methylathranyl
min	Minuten
MPS	Mebranpermeable Sequenz
MS	Methylsulfonyl
MSH	O-(Mesitylsulfonyl)-hydroxylamin
Myr	Myristoyl
N	Normalität
NBS	N-Bromsuccinimid
NLS	nuclear localization sequence
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
PhAc	Phenylacetyl
PhAcOZ	Phenylacetyloxybenzyloxycarbonyl
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
Py	Pyridin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphat
quant.	quantitativ
rf	Rückfluß
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
SG	Schutzgruppe
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
<i>tert.</i>	tertiär
TES	Triethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
v	Volumen

---

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. H. Waldmann danke ich für die interessante Themenstellung, die Unterstützung meiner Arbeit und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Aktivitäten abseits des Labors. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Chem. Patrick Deck und Frau Dipl. Chem. Jantje Gerdes für die Durchsicht des Manuskripts. Frau Carmen Kull und Frau Heike Rimpel danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Den analytischen Abteilungen des Instituts für Organische Chemie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH), des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund und des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie Dortmund danke ich für die Durchführung der Analysen und die Aufnahme von Spektren. Besonders danke ich Herrn Dipl.-Biol. Andreas Henkel und Frau Dipl.-Chem. Stefanie Schlummer für die Unterstützung bei der Durchführung der biologischen Tests.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion durch ein Stipendium.

---

## **Lebenslauf**

Name: Timo Alexander Krämer  
geboren: am 9. Mai 1972 in Heilbronn  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

1978 - 1982 Besuch der Grundschule in Neuenstadt  
1982 - 1988 Besuch des Mörike Pro Gymnasiums in Neuenstadt  
1988 - 1991 Besuch des Albert Schweitzer Gymnasium in Neckarsulm  
13. Juni 1991 Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst:**

08.1991 - 10.1992 Zivildienst in der Gemeinschaftspraxis Drs. Wallmaier/  
Rambausek, Dialysestation in Heilbronn

### **Studium:**

10.1992 - 09.1997 Studium der Chemie an der Universität Fridericiana zu  
Karlsruhe  
02. - 09.1997 Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann:  
Synthese eines Modellsystems für den Transport von  
Nucleotiden durch Membranen  
05.09.1997 Diplom (Gesamtnote 1)

### **Promotion:**

11.1997 - 10.1999 Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität  
Fridericiana zu Karlsruhe (TH) unter der Betreuung von Prof.  
Dr. H. Waldmann  
11.1999 – 01.2001 Fortführung der Promotion am Fachbereich Chemie der  
Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für  
molekulare Physiologie

---

**Berufserfahrung:**

Seit 02.2001      Anstellung als Medizinischer Chemiker bei Semaia  
Pharmaceuticals GmbH & Co. KG, Dortmund