

Festphasensynthese lipidierter Peptide und Benzodiazepindione

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von Diplom-Chemiker

Björn Ludolph

geboren in Gronau

Dekan: Prof. Dr. K. Jurkschat

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2004

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, in der Zeit von Februar 2000 bis November 2003 angefertigt.

meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Aca	6-Aminocaproyl-
All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
APT1	Acyl-Protein-Thioesterase 1
arom.	aromatisch
ber.	berechnet
Bn	Benzoyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
CDCl ₃	Deuteriochloroform
ClTrt	2-Chlorotrityl
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMB	Dimethylbarbitursäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid-hydrochlorid
EI-MS	<i>electron impact</i> -Massenspektrometrie
Et	Ethyl
FAB-MS	<i>fast atom bombardment</i> -Massenspektrometrie
Far	Farnesyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FTase	Farnesyltransferase
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
gef.	gefunden
GEF	<i>Guanidinin nucleotide exchange factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HAc	Essigsäure
HATU	<i>N</i> -[(dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl-methyl-en]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid

HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HFIP	Hexafluoro- <i>iso</i> -propanol
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HODhbt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
Hz	Hertz
MALDI-TOF MS	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i> -Massenspektrometrie
Mant	<i>N</i> -Methylanthranyl
Me	Methyl
MIC	Maleinimidocaproyl
Mmt	<i>para</i> -Methoxytrityl
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Pal	Palmitoyl
PS	Polystyren
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tri(pyrrolidino) phosphonium-hexafluorophosphat
quart	quartär
R _f	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
SG	Schutzgruppe
tert	tertiär
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Tri- <i>iso</i> -propylsilan
TMS	Tetramethylsilan
Trt	Trityl
verd.	verdeckt

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 1517 und 1525.) und haben L-Konfiguration nach der FISCHER-Projektion.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 ALLGEMEINER TEIL	2
2.1 LIPIDIERTE PROTEINE	2
2.2 RAS-PROTEINE	3
2.2.1 <i>Ras als molekularer Schalter in der Signaltransduktion</i>	3
2.2.2 <i>Posttranslationaler Modifikationen und Membranlokalisierung von Ras-Proteinen</i> ..	5
2.3 PALMITOYLIERUNG VON PROTEINEN	7
2.3.1 <i>APT1 – eine Thioesterase</i>	9
2.3.2 <i>Inhibitoren der APT1</i>	10
2.4 PEPTIDE UND PROTEINE ALS WERKZEUGE ZUR AUFKLÄRUNG BIOLOGISCHER VORGÄNGE	11
2.5 PEPTIDSYNTHESE AN DER FESTEN PHASE.....	13
2.5.1 <i>Peptidkupplungen</i>	13
2.5.2 <i>Strategien für die Festphasensynthese von Peptiden</i>	15
2.5.3 <i>Ausgewählte Linker und Schutzgruppen</i>	16
2.5.4 <i>Polymere Träger in der Festphasensynthese</i>	19
2.6 SYNTHESE LIPIDIERTER PEPTIDE.....	21
3 ZIEL DER ARBEIT.....	24
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	27
4.1 SYNTHESE VON K-RAS PEPTIDEN	27
4.1.1 <i>Synthese des lipidierten und biotinylierten K-Ras4B-Terminus</i>	28
4.1.2 <i>Synthese von nicht-lipidierten, biotinylierten K-Ras Peptiden</i>	33
4.1.3 <i>Exkurs: Biophysikalische Studien zur Membranbindung von K-Ras4B Peptiden</i> ..	36
4.2 ALLGEMEINE FESTPHASENSYNTHESE VON LIPOPEPTIDEN	38
4.2.1 <i>Peptidsynthese mit dem Phenylhydrazidlinker</i>	39
4.2.2 <i>Synthese von farnesylierten und palmitoylierten Cysteinmethylestern</i>	43
4.2.3 <i>Synthese einfach und doppelt lipidiertes Peptide</i>	45
4.2.4 <i>Exkurs: Sind C-terminale Thioester mit dem Phenylhydrazid-Linker direkt darstellbar?</i>	53
4.2.5 <i>Synthese von lipidierten und fluoreszenz- oder MIC-markierten Peptiden</i>	54

4.2.6 <i>Exkurs: Biophysikalische Evaluierung der Wechselwirkung von lipidierten, BODIPY-markierten Peptiden mit Modellbiomembranen</i>	62
4.3 BAUSTEIN-GESTÜTZTE SYNTHESE ZUM AUFBAU LIPIDIERTER PEPTIDE	64
4.4 PARALLELSYNTHESE VON LIPIDIERTEN BENZODIAZEPINDIONEN	69
4.4.1 <i>Retrosynthetische Analyse</i>	69
4.4.2 <i>Benzodiazepindionsynthese in Lösung</i>	71
4.4.3 <i>Parallelsynthese von lipidierten Benzodiazepindionen an der festen Phase</i>	74
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	84
6 EXPERIMENTELLER TEIL	92
6.1 ALLGEMEINES	92
6.2 VERSUCHE ZUR SYNTHESE VON K-RAS PEPTIDEN	95
6.3 VERSUCHE ZUR ALLGEMEINEN FESTPHASENSYNTHESE VON LIPOPEPTIDEN MIT DEM HYDRAZIDLINKER	104
6.3.1 <i>Allgemeine Arbeitsweisen</i>	104
6.3.2 <i>Festphasensynthesen</i>	106
6.4 VERSUCHE ZUR BAUSTEIN-GESTÜTZTEN SYNTHESE	126
6.5 PARALLELSYNTHESE VON LIPIDIERTEN BENZODIAZEPINDIONEN	129
6.5.1 <i>Versuche zur Benzodiazepindionsynthese in Lösung</i>	129
6.5.2 <i>Versuche zur Parallelsynthese von lipidierten Benzodiazepindionen an der festen Phase</i>	137
7 LITERATURVERZEICHNIS	165

1 Einleitung

Eine Vielzahl biologischer Phänomene kann heute bis zu den ihnen zugrundeliegenden chemischen Prozessen zurückverfolgt werden. Für das Verständnis der entsprechenden molekularen Interaktionen und chemischen Transformationen kommt der Chemie eine zentrale Rolle zu. So besteht ein wichtiger Ansatz zur Gewinnung biologischer Erkenntnisse im molekularen Detail in der chemischen Synthese von Verbindungen, die mit ihren genau definierten Eigenschaften als molekulare Werkzeuge in biologischen und biophysikalischen Experimenten eingesetzt werden. Der Zugang zu den hierfür benötigten Substanzen kann jedoch mit beträchtlichen synthetischen Herausforderungen verbunden sein. Wachsende Nachfrage an Verbindungen sowie ihre steigende Komplexität machen die stetige Entwicklung effizienter Synthesemethodiken erforderlich.

Lipidmodifizierte Proteine spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen biologischen Prozessen. Prominente Vertreter dieser Substanzklasse sind die Ras-Proteine, kleine GTPasen, die in Signaltransduktionskaskaden involviert sind, über die unter anderem Zellwachstum und Zellteilung gesteuert werden. Mutationen von Ras werden in 30 % aller menschlichen Tumore gefunden,¹ und das Verständnis der Funktion von Ras bildet die Grundlage für neuartige Strategien zur Krebsbekämpfung. Zum Studium der Rolle von Ras-Lipoproteinen wurden Methoden für die Synthese verschieden lipidierter Peptide und Proteine entwickelt. Diese basieren im Gegensatz zu der für unmodifizierte Peptide heute üblichen Festphasensynthese hauptsächlich auf Syntheseschritten in Lösung. Dies gilt insbesondere für mehrfach und unterschiedlich lipidierte Produkte, die durch ihre Säure- als auch Basenlabilität äußerst empfindliche Substanzen darstellen.

Ziel dieser Dissertation ist es, leistungsfähige Festphasenmethoden zu entwickeln, die den schnellen und effizienten Zugang zu lipidierten Ras-Peptiden als molekulare Werkzeuge zur Aufklärung von zellulären Signaltransduktionsprozessen ermöglichen. Weiterhin wird eine kombinatorische Festphasensynthese von lipidierten Benzodiazepinen entwickelt, um potentielle Acyl-Protein-Thioesterase 1 (APT1) Inhibitoren zu generieren. Diese von lipidierten Protein- bzw. Peptid-Substraten abgeleiteten Peptidomimetika sollen weitere Einblicke in die zelluläre Prozessierung von Proteinen mit einer Palmitoyl-Gruppe als Lipidmodifikation ermöglichen. Die Motivation dieser Arbeit besteht darin, einen Beitrag zur Aufklärung der Funktion von lipidierten Proteinen insbesondere in Signaltransduktions-

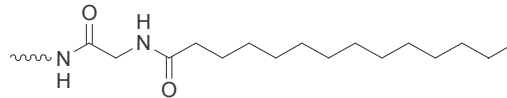
prozessen und damit auch in Bezug auf ihre potentiell krebsauslösende Wirkung zu leisten. Die Übertragung der hier entwickelten Methoden zur Synthese von Lipopeptiden mag aber auch für andere Bereiche, in denen lipidierte Proteine eine Rolle spielen, interessant sein.

2 Allgemeiner Teil

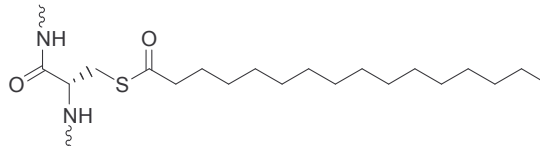
2.1 Lipidierte Proteine

Die ersten lipidmodifizierten Proteine wurden 1951 von *Folch*² entdeckt, doch es dauerte 20 Jahre, bis gezeigt werden konnte, dass es sich dabei um eine kovalente Bindung eines Fettsäurerestes mit einem Protein handelt.³ Im Gegensatz zur Glycosylierung und Phosphorylierung rückte die Lipidierung von Proteinen allerdings erst seit den achtziger Jahren verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Heute unterscheidet man fünf solcher Lipidmodifikationen:

Myristoylierung



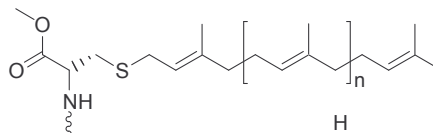
S-Palmitoylierung



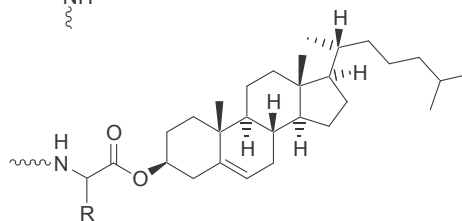
Prenylierung

n=1: Farnesylierung

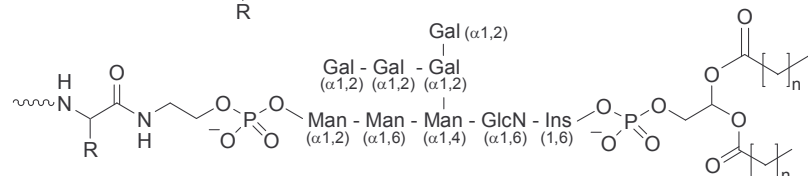
n=2: Geranylgeranylierung



Cholesterol



Glykosylphosphatidyl-Inositol
n=14 oder 16



1. Die *N*-Myristoylierung, bei der ein *N*-terminales Glycin mit Myristinsäure acyliert ist.⁴
2. Die *S*-Palmitoylierung, bei der Palmitinsäure als Thioester an Cysteine gebunden ist.^{4,5} Zudem wurden einige *O*-acylierte⁶ und *N*-acylierte⁷ Proteine identifiziert.

3. Die Prenylierung, bei der ein terpenoider Farnesyl(C₁₅)- oder Geranylgeranyl(C₂₀)-Rest als Thioether an ein Cystein gebunden ist.⁸
4. Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure eines Proteins mit Cholesterol.⁹
5. Die C-terminale Verknüpfung von Proteinen mit der Phosphoethanolamin-Einheit eines Glycosylphosphatidyl-Inositol (GPI)-Ankers.¹⁰

Die Funktion der Lipidierung besteht sowohl in der Verankerung der Proteine an Membranen als auch in der Modulierung von Protein-Protein-Interaktionen.¹¹ Bis auf die S-Palmitoylierung, die ein dynamischer Prozess ist, sind die bekannten Lipidmodifizierungen metabolisch stabil.¹²

2.2 Ras-Proteine

Lipidierte Proteine sind oftmals an Zellmembranen gebunden und spielen wichtige Rollen in einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Besonders prominente Beispiele solcher lipidierter Proteine sind die menschlichen H-, N- und K-Ras Proteine, welche zu einer Subfamilie der Ras Superfamilie gehören und manchmal auch als klassische Ras Proteine bezeichnet werden. Neben der Ras-Subfamilie sind noch Rho, Ran, Rab, Arf und Kir/Rem/Rad Subfamilien bekannt. K-Ras kommt durch Proteinspleißung in den beiden Isoformen K-Ras4A und K-Ras4B vor, wobei K-Ras4B die Hauptpleißvariante ist.¹³ Die vier Ras-Proteine haben ein Molekulargewicht von 21 kDa und unterscheiden sich nur in den letzten 25 C-terminalen Aminosäuren, der sogenannten hypervariablen Domäne (HVR). Ras-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Die regulierten Prozesse umfassen insbesondere Zellwachstum und -differenzierung, die Steuerung des Zellzyklusses und der Apoptose.¹⁴ Mutationen im *ras*-Onkogen führen zu deren Fehlregulation und sind häufig bei verschiedenen Typen von Krebs zu finden.¹⁵ So wird geschätzt, dass bei 30% der menschlichen Tumoren ein *ras*-Gen mutiert ist, gewöhnlich bei N- oder K-Ras.

2.2.1 Ras als molekularer Schalter in der Signaltransduktion

Ras-Proteine wirken als molekulare Schalter, indem sie zwischen einem GTP-gebundenen aktiven Zustand und einem GDP-gebundenen inaktiven Zustand wechseln.¹⁶ Da der intrinsische Übergang zwischen den Zuständen sehr langsam verläuft, wird die Regulation durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), welche einen Übergang zum GTP-gebundenen Zustand, und durch *GTPase activating proteins* (GAPs), welche eine Rückkehr

zum inaktiven Zustand bewirken, bestimmt (Abbildung 1). Eine Reihe GEFs wurden identifiziert, einige davon aktivieren die verschiedenen Ras Isoformen mit unterschiedlicher Effizienz.¹⁷ Aktiviertes Ras interagiert mit einer Vielzahl von Effektorproteinen.¹⁷ Einige der am besten charakterisierten sind die Raf Kinasen, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), RalGEFs und NORE/MST1. In intakten Zellen ist auch die Aktivierungseffizienz der unterschiedlichen Ras-Proteine gegenüber Effektoren verschieden.¹⁸ Es wurde außerdem nachgewiesen, dass die Bindung von einigen Effektoren, darunter Raf¹⁹, PI3K²⁰ und SOS²¹ an Ras die Farnesylgruppe einschließen. Demnach scheint die Farnesylgruppe über ihre Funktion als Membrananker hinaus auch aktiv bestimmte Protein-Proteinwechselwirkungen zu steuern.²²

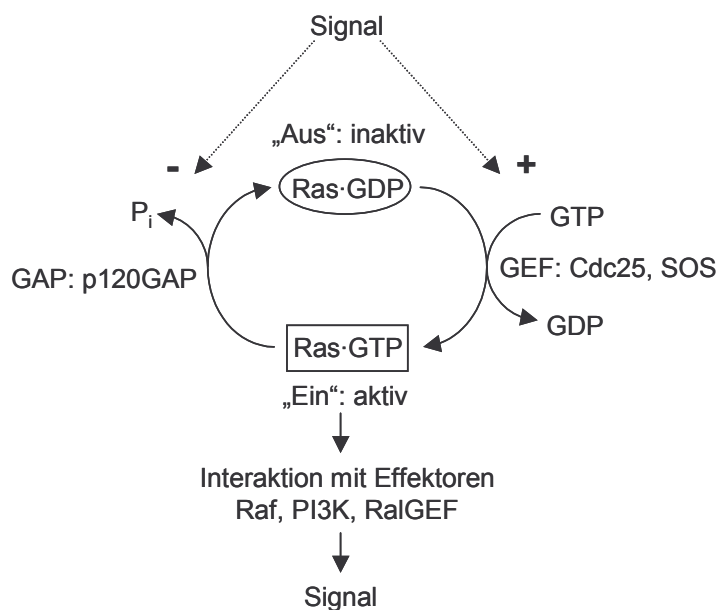


Abbildung 1: Der Aktivierungszyklus von Ras.

In Abbildung 2 ist vereinfacht die Aktivierung von Ras dargestellt. Das Signal wird durch die Bindung von z.B. dem *epidermal growth factor* (EGF) an die extrazelluläre Domäne des entsprechenden transmembranen Rezeptors initiiert. Über die intrazelluläre *receptor tyrosine kinase* (RTK)-Domäne wird das Signal weitergeleitet. Eine Aktivierung von Ras kann aber auch über z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Tyrosinkinase wie Src erfolgen. Durch Ras wird das Signal auf verschiedene Signaltransduktionskaskaden übertragen. Diese sind untereinander noch einmal stark vernetzt.²³ Die letztendliche zelluläre Antwort wird damit nicht nur von einer einzelnen Kaskade bestimmt, sondern von dem Gesamtzustand eines komplexen Netzwerks.¹⁶

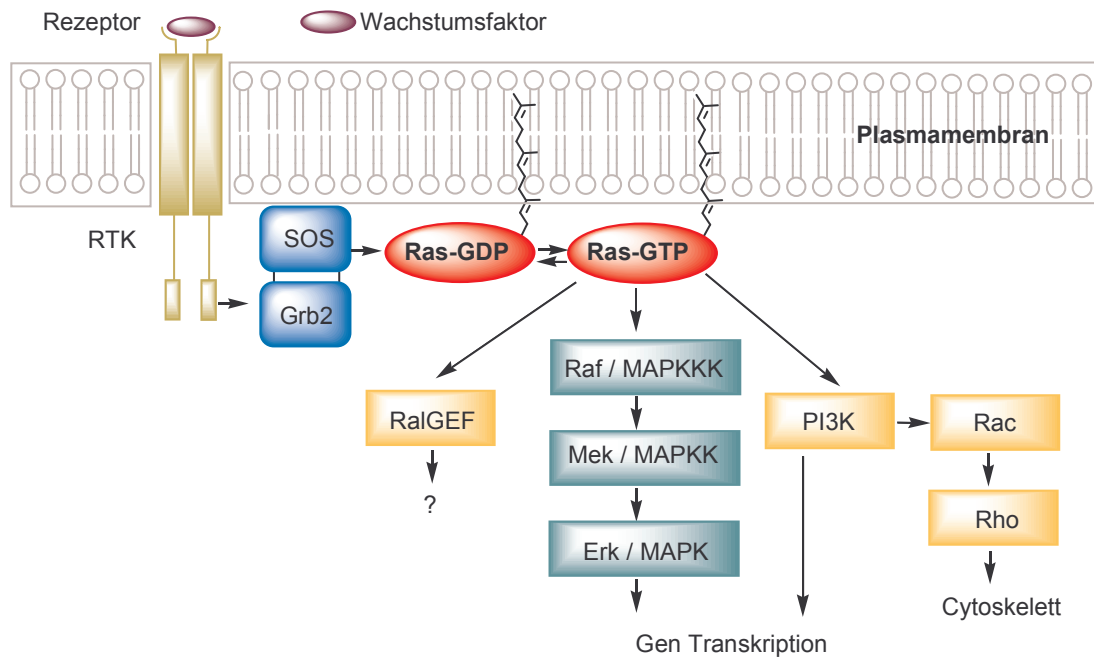


Abbildung 2: Die Ras Signaltransduktionskaskade.

2.2.2 Posttranslationale Modifikationen und Membranlokalisation von Ras-Proteinen

Die korrekte biologische Funktion der Ras-Proteine setzt eine Lokalisierung an der Innenseite der Plasmamembran (PM) voraus.²⁴ Hierzu durchlaufen die Proteine eine Serie posttranslationaler Modifikationen. Die ersten drei werden durch das C-terminale CAAX-Aminosäuremotiv bestimmt, das allen Ras-Proteinen gemeinsam ist. Zunächst wird durch das cytosolische Enzym Farnesyltransferase ein Farnesylrest als Thioether an das Cystein gebunden.²⁵ Das nun farnesylierte CAAX-Motiv dirigiert Ras zur cytosolischen Oberfläche des Endoplasmatischen Reticulums (ER), wo eine Endoprotease, welche in Hefe sowie in Säugetieren als Rce1 identifiziert wurde, das AAX-Tripeptid abspaltet.²⁶ Das nun C-terminale Cystein wird anschließend durch die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) zum Methylester umgesetzt.²⁷

Nach der Veresterung wird der weitere Weg der Ras-Proteine zur Plasmamembran durch ein zweites Strukturmotiv bestimmt.²⁸ Während N- und H-Ras an einem bzw. an zwei weiteren Cystein(en) in ihren HVRs palmitoyliert werden, findet sich bei K-Ras dort stattdessen eine polybasische Lysinsequenz. Als eine Möglichkeit zur Lokalisation von N- und H-Ras an der Plasmamembran wird das sogenannte „kinetic trapping“-Modell diskutiert (Abbildung 3). Tragen Ras-Proteine nur einen Farnesylrest, erfolgt eine schnelle Adsorption aber auch

Desorption von Ras an Membranen.²⁹ Erst durch einen zweiten Lipidrest wird eine irreversible Bindung an die Membran erreicht. Findet die Einführung des zweiten Lipidrestes durch enzymatische oder spontane Palmitoylierung eines weiteren Cysteins von N- oder H-Ras an der Plasmamembran statt, so bleiben die Proteine dort lokalisiert. Ein alternatives Modell nimmt an, dass H-Ras und N-Ras nach der Assoziation mit dem ER und dem Golgi durch vesikulären Transport zur Plasmamembran gelangen.²⁴ Der Mechanismus, durch den H- und N-Ras an die Transportvesikel gebunden werden, ist jedoch unklar. Möglicherweise werden sie zuvor palmitoyliert, so dass beide Lipidreste eine stabile Verankerung in den Vesikeln ermöglichen. Dieses würde die Existenz einer Palmitoyltransferase (PAT) im ER oder Golgi voraussetzen. Ein möglicher Kandidat dafür könnte das kürzlich gefundene Erf2p sein (vgl. Kapitel 2.3).

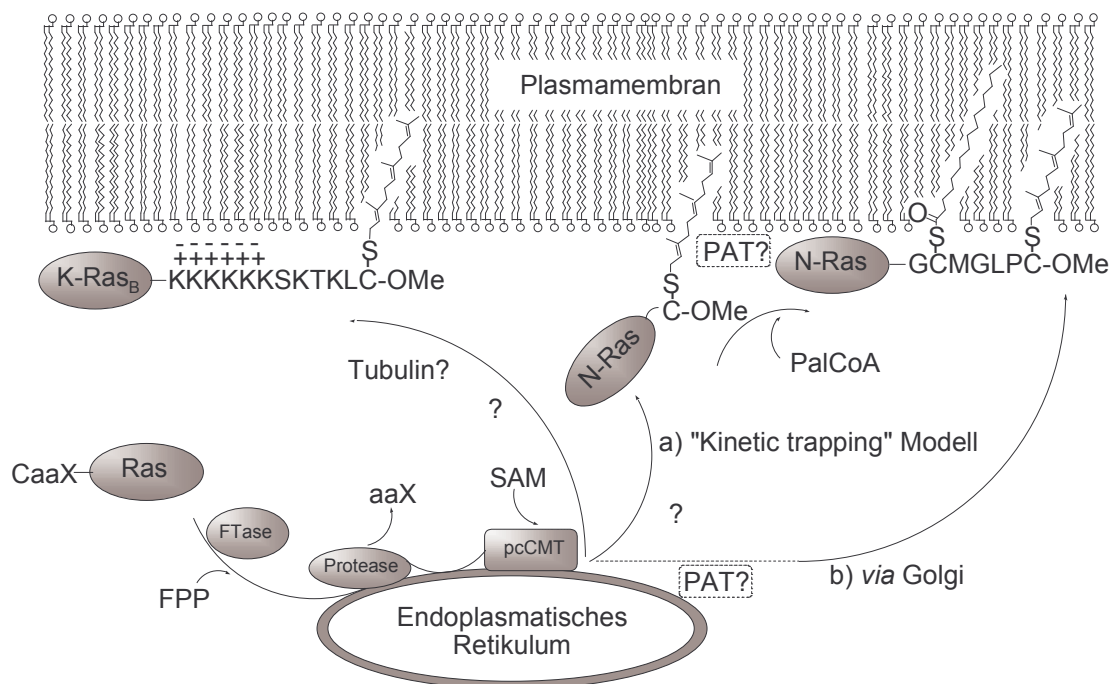


Abbildung 3: Posttranslational Modifikationen und Membranlokalisation von K-Ras4B und N-Ras. Abkürzungen: FPP: Farnesylpyrophosphat, FTase: Farnesyl Transferase, pcCMT: proteocytosolische Carboxymethyltransferase, PalCoA: Palmitoyl-Coenzym A.

Im Gegensatz zu N- und H-Ras finden sich bei K-Ras keine palmitoylierbaren Cysteine in der HVR. Die stabile Verankerung in der Plasmamembran wird hier durch den Farnesylrest in Kombination mit einer polybasischen, unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Polylysinsequenz bewirkt. Offensichtlich verläuft der Transport von K-Ras zur Plasmamembran über einen zu N- und H-Ras verschiedenen Weg (Abbildung 3). Bislang wurden drei verschiedene Mechanismen vorgeschlagen.²⁴ Ersten, die polybasische Sequenz in

K-Ras sorgt für eine Diffusion von K-Ras entlang eines elektrostatischen Gradienten bis hin zur negativ geladenen Plasmamembran.³⁰ Zweitens, ein bislang nicht identifiziertes Chaperon-Protein, welches möglicherweise analog zum bekannten RhoGDI ist, ist beteiligt oder drittens, der Transport ist ein Prozess, der Mikrotubuli involviert.

In den letzten Jahren hat sich das Bild von der Assoziation von Ras-Proteinen an die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran weiter verkompliziert. Neuere Übersichten finden sich bei *J. R. Silvius*²⁴ und *J. F. Hancock*³¹. Zum einen wurde zunehmend realisiert, dass die Plasmamembran nicht eine uniforme Lipiddoppelschicht ist, sondern aus Mikrodomänen besteht. Erste Untersuchungen zeigten, dass verschiedenen Ras-Proteine unterschiedlich mit Mikrodomänen wechselwirken und dass diese Wechselwirkung ebenfalls abhängig davon ist, ob GTP oder GDP gebunden ist. Dieses wird als eine mögliche Erklärung für die Beobachtung diskutiert, dass sich die strukturellen Variationen in der HVR der ansonsten homologen Ras-Proteine tatsächlich in unterschiedlichen Signalverhalten bemerkbar macht. Die Struktur der Mikrodomänen und deren Wechselwirkung mit Ras-Proteinen bzw. mit anderen lipidierten Proteinen sowie die Frage nach Ras-Rezeptoren in der Plasmamembran sind Gegenstand aktueller Forschung. Darüber hinaus zeigte sich auch eine Aktivität von Ras Proteinen, die an intrazellulären Membranen assoziiert sind, insbesondere am Golgi und ER.^{31,32} Die biologische Rolle, die dieser Beobachtung zukommt, ist noch zu klären.

2.3 Palmitoylierung von Proteinen

Keineswegs nur N- oder H-Ras Proteine werden palmitoyliert, sondern eine Vielfalt an weiteren *S*-, *O*-, und *N*-palmitoylierten Proteinen wurde beschrieben. Sie umfasst sowohl mitochondriale wie auch Membran-Proteine,³³ darunter z. B. α -Untereinheiten von G-Proteinen, Kinasen aus der Src-Familie, virale Glykoproteine und eNOS. Die Funktion der Palmitoylierung hängt von dem betrachteten Protein ab. Palmitoylierung erhöht die Hydrophobie von Proteinen oder Protein-Domänen und trägt somit, wie am Beispiel von H- und N-Ras ausgeführt, zur Membranassoziation bei. Die Palmitoylierung spielt außerdem eine Rolle beim subzellulären Transport von Proteinen zwischen Membranen oder Membranmikrodomänen sowie bei der Modulation von Protein-Protein-Interaktionen. Da die Thioacetylierung ein reversibler Prozess ist, wird eine regulatorische Funktion dieser Lipidmodifikation angenommen. Der molekulare Mechanismus der Palmitoylierung ist relativ wenig verstanden, sowohl spontane, wie auch enzymkatalysierte Palmitoylierungen werden

diskutiert. Aufgrund der Vielfalt der palmitoylierten Proteine wäre es jedoch nicht erstaunlich, wenn verschiedene Mechanismen involviert wären.³³

So wurde beschrieben, dass Palmitoyl-CoA spontan Thiolgruppen der Cysteinseitenkette sowohl bei Peptiden, als auch bei Proteinen acylieren kann. Offenbar variiert die Effizienz dieser Reaktion jedoch bei unterschiedlichen Substraten. Während z.B. für Rhodopsin³⁴ und einige Tripeptide^{35,36} eine spontane Acylierung beobachtet wird, konnten andere Cystein-enthaltene Peptide³⁶ oder Proteine wie SNAP-25 oder GAP-43^{12b} nicht palmitoyliert werden. Eine Abschätzung der Bedeutung spontaner Palmitoylierung *in vivo* wird außerdem durch die Tatsache erschwert, dass zumindest das meiste cytosolische Acyl-CoA nicht frei, sondern in an *acyl-CoA binding proteins* (ACBPs) gebundener Form vorliegt.³⁷

Die Identifizierung von Protein-Acyltransferasen wird dadurch erschwert, dass PAT Aktivität auch durch Enzyme aus dem Lipid-Metabolismus gezeigt wird. So wurde zunächst eine aus Rattenleber-Mikrosomen isolierte Protein-Acyltransferase beschrieben, die als Substrat H-Ras akzeptiert.³⁸ Später zeigte sich jedoch, dass es sich dabei um peroxysomale Thiolase A handelt³⁹, welche aufgrund ihrer subzellularen Verteilung kein wahrscheinlicher Ras-PAT Kandidat ist. Andere Studien kämpften mit dem Problem, dass aufgrund von inhärenter Instabilität von PAT Aktivität nur eine sehr beschränkte Aufreinigung möglich war, die eine Identifikation des beteiligten Proteins nicht erlaubte.

Genetische Screeningverfahren zusammen mit Mutationsanalysen in *S. cerevisiae* identifizierten zwei Gene, ERF2 und SHR5/ERF4, als aussichtsreiche Kandidaten für die PAT. Erf2p und Erf4p zeigen *in vitro* Palmitoyltransferase-Aktivität gegenüber dem Ras-Homologen Ras2p.^{40,41} Eine Reihe von Homologen von Erf2p sind sowohl in Hefe als auch in höheren Organismen bekannt. Menschliches Erf2p ist im ER und im Golgi lokalisiert.²⁴ Ein charakteristisches Merkmal von Erf2p besteht neben vier vermutlich transmembranen Domänen in einer cysteinreichen Domäne (CRD), in der ein DHHC (Asp-His-His-Cys) Motiv enthalten ist. Ein weiteres Hefe CRD-Protein ist Akr1p, für das eine Palmitoyltransferase-Aktivität gegenüber Yck2p nachgewiesen wurde.⁴² Bei Akr1p ist das DHHC Motiv durch ein DHYC Motiv abgelöst. Beide Proteine zeigen in Palmitoylierungsversuchen Substratspezifität.

Die Familie der DHHC-CRD Proteine ist recht groß, im Hefe Genom sind sieben DHH(Y)C-CRD Gene enthalten, im Genom der Maus und dem menschlichen Genom wird die Anzahl von DHHC-CRD Genen auf 23 geschätzt. Es ist allerdings zu zeigen, ob andere Vertreter der DHHC-CRD Proteine ebenfalls eine palmitoylierende Aktivität aufweisen.

2.3.1 APT1 – eine Thioesterase

Bislang konnten nur wenige Enzyme identifiziert werden, welche eine Depalmitoylierung von Proteinen bewirken. Ein Vertreter dieser Thiolasen ist die Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1), die aus Rattenleber isoliert wurde und H-Ras und G_{α} -Untereinheiten deacyliert.⁴³ Die lysosomale Lokalisation lässt PPT1 allerdings als nicht relevant in Bezug auf Deacylierung von Signalproteinen an der Plasmamembran erscheinen.⁴⁴ Eine zweite lysosomale Thioesterase, PPT2, welche ein mit PPT1 überlappendes Substratprofil besitzt, konnte ebenfalls isoliert und charakterisiert werden.⁴⁵

Eine wichtiger Kandidat für ein Regulationsenzym in der reversiblen Proteinpalmitylierung ist die cytoplasmatische Acyl-Protein-Thioesterase 1 (APT1). APT1 wurde von *Duncan* und *Gilmann* aus dem Cytosol von Rattenlebern isoliert und charakterisiert.⁴⁶ Zuvor wurde dasselbe Enzym schon in Rattenlebern als Lysophospholipase identifiziert.⁴⁷ Eine Kristallstruktur zeigte, dass humane APT1 zur Familie der α/β -Hydrolasen mit einer katalytischen Triade, die Ser-114, Asp-169 und His-203 umfasst, gehört.⁴⁸ In der Kristallstruktur liegt APT1 als Homodimer vor, wobei der Zugang zum aktiven Zentrum durch die Dimerisierung stark eingeschränkt ist. Dieser unerwartete Befund ließ die Vermutung aufkommen, dass APT1 bei der Bindung eines Substrates dissoziiert. Die Dimerengrenzflächen umschließen einen Hohlraum in der Größenordnung von 200 Å³, in dem 10 Wassermoleküle Platz finden können. Weiterhin ist die Bindungstasche für die Acyl-Protein-Substrate mit zahlreichen hydrophoben Aminosäuren wie Trp-140, Leu-68, Leu-73 und Phe-176 ausgekleidet, was auf eine Interaktion des Enzyms mit langen Fettsäureketten von palmitoylierten Proteinen hinweist. In direkter Umgebung des aktiven Zentrums weist das elektrostatische Potential eine stark negative Polarisierung auf, wodurch nach erfolgter Hydrolyse des Thioesters eine Dissoziation der Palmitatanionen erleichtert wird. Orthologe von APT1 finden sich in einer großen Anzahl von Spezies, darunter z.B. alle bislang untersuchten Säugetierzellen sowie auch *S. cerevisiae* und *C. elegans*.

APT1 ist in der Lage, *in vivo* und *in vitro* verschiedene Signalproteine zu depalmitoylieren, darunter die α -Untereinheiten von G-Proteinen, H-Ras, Endothel-Stickstoffmonooxid-Synthase und verschiedene virale Glycoproteine.⁴⁹ Aus Ratten sowie Hefe isolierte APT1 weist eine Substratspezifität von Acylproteinen gegenüber Lipid-Substraten auf.⁴⁶ Zwischen verschiedenen palmitoylierten Proteinen bestehen Unterschiede in der katalytischen Effizienz.⁵⁰

2.3.2 Inhibitoren der APT1

Zur Klärung der biologischen Funktion von APT1 in Zellen entwickelte *P. Deck* in seiner Dissertation eine Reihe hochpotenter Inhibitoren.⁵¹ Einige repräsentative Beispiele sind in Abbildung 4 zusammengefasst.

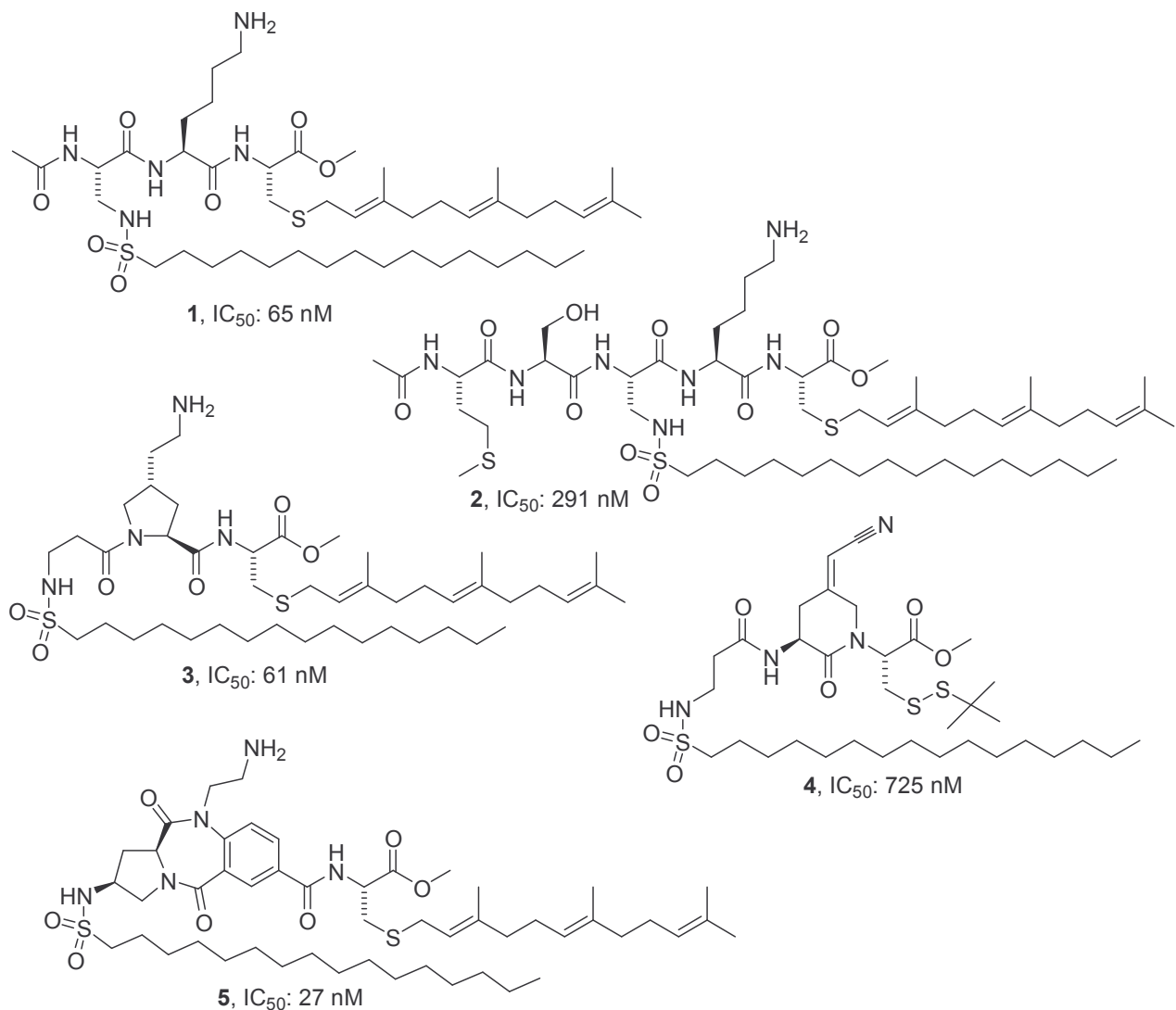


Abbildung 4: Inhibitoren der APT1.

Ausgehend von dem C-Terminus von H-Ras, welches ein Substrat der APT1 ist, wurden Tri- und Pentapeptide (z.B. **1** und **2**) synthetisiert. Diese Übergangszustandsanaloga enthalten anstelle eines hydrolysierbaren Thioesters eine tetraedrische Sulfonamid-Gruppe. Überlegungen zur konformativen Fixierung des Peptidrückgrats führten zum Ersatz des Peptidrückgrats durch Prolin-(**3**), Lactam (**4**)- und Benzodiazepindion (**5**)-Strukturen.

Die synthetisierten 16 Verbindungen wurden auf ihre antagonistische Wirkung gegen APT1, welche aus Rattenlebern isoliert wurde, getestet. Der mit einem IC_{50} -Wert von 27 nM beste Inhibitor **5** gehört zur Klasse der Benzodiazepindione. Aus den Tests ließen sich folgende Trends ableiten: 1) Substanzen mit einer Hexadecansulfonamidgruppe inhibieren im nanomolaren Bereich, fehlt diese lange Kette, so verschlechtern sich die IC_{50} -Werte deutlich; 2) Verbindungen mit freier Aminogruppe sind aktiver als solche mit geschützter oder nicht vorhandener Aminofunktion; 3) Tripeptide sind genauso wirksam wie Pentapeptide, d. h. ihre strukturelle Information reicht für ein gutes Inhibitionsverhalten bereits aus; 4) ein Farnesylrest scheint nicht essentiell zu sein.

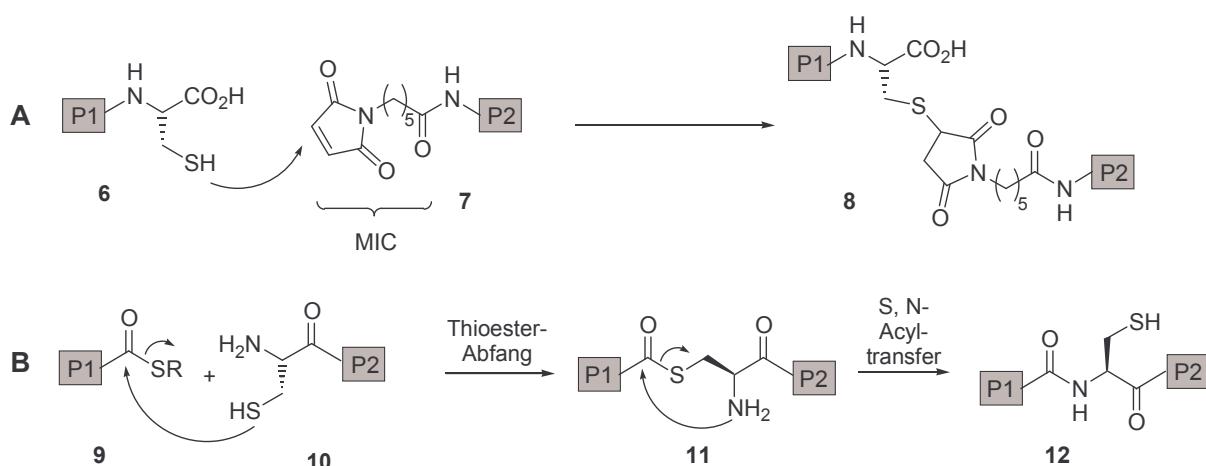
Nach Mikroinjektion einiger der erhaltenen Inhibitoren zusammen mit einem palmitoylierbaren H-Ras Protein-Peptid-Konjugat in PC12-Zellen zeigte sich erstaunlicherweise kein Neuriten-Wachstum mehr.⁵² Dieses Ergebnis zusammen mit weiteren Kontrollexperimenten lässt vermuten, dass die Palmitoylierung des Protein-Peptid-Konjugat durch Zusatz des APT1-Inhibitors verhindert wurde. Es stellt sich damit die Frage, ob APT1 vielleicht ebenfalls PAT Aktivität aufweist.

2.4 Peptide und Proteine als Werkzeuge zur Aufklärung biologischer Vorgänge

Die ribosomale Biosynthese von Peptidenketten verläuft vom N- zum C-Terminus und unter vollständiger Retention der L-Konfiguration der chiralen, proteinogenen Aminosäuren. In der Zelle findet die weitere Prozessierung des Proteins, insbesondere posttranslationale Modifizierungen, zu seiner biologisch aktiven Form hoch selektiv und enzymkatalysiert statt. Leider ist die Nutzung dieses Weges für die Herstellung von vollständig modifizierten Proteinen oft schwierig, manchmal sogar unmöglich, insbesondere da in prokaryontischen Expressionssystemen keine posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Lipidreste eingeführt werden. Für zellbiologische oder biophysikalische Untersuchungen bieten sich chemisch

synthetisierte lipidierte Peptide als Modellsubstanzen für lipidierte Proteine an. Dieser synthetische Ansatz ermöglicht außerdem, gezielte Veränderungen in den Peptiden z. B. in Bezug auf die Lipidgruppe selber oder durch zusätzliche Einführung von Fluoreszenzmarkern zur späteren Detektion in der Zelle einzubringen. So wurden verschiedene modifizierte Lipopeptide, die den C-Termini von Ras-Proteinen entsprechen, z.B. erfolgreich zur Aufklärung der Funktion von Palmitoyl- und Prenylgruppen, der Membranbindung und der Verteilung der Peptide in Zellen eingesetzt.⁵³ Die verwendeten Methoden hierfür reichten von der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) mit biotinylierten Lipopeptiden und Laser-Fluoreszenz-Spektroskopie mittels fluoreszenzmarkierter Lipopeptide bis hin zur MAS-NMR-Spektroskopie.

Obwohl sich lipidierte Peptide als äußerst wertvolle Werkzeuge erwiesen haben, können nicht alle Eigenschaften von Proteinen durch Modellpeptide simuliert werden. Dementsprechend ist eine Bestätigung der gewonnenen Erkenntnisse auf der Proteinebene wünschenswert. Hierzu eignen sich Peptid-Protein-Konjugate,⁵⁴ bei denen das durch organische Synthese hergestellte lipidierte Peptid an ein zuvor in Bakterien exprimiertes, verkürztes Protein gekuppelt wird. Eine Möglichkeit der Bindungsknüpfung zwischen Peptid und Protein besteht in der Verwendung der Maleinimidocaproyl (MIC)-Gruppe. Diese am N-Terminus des Peptids **7** angeknüpfte elektrophile Gruppe reagiert mit einem Schwefelnukleophil eines C-terminalen Cysteins des exprimierten Proteins **6** unter Ausbildung einer stabilen Thioetherverknüpfung **8** (Schema 1, **A**).



Schema 1: **A**: Verknüpfung eines Proteins mit einem Peptid über die MIC-Gruppe; **B**: *native chemical ligation* (NCL).

Obwohl es sich um eine artifizielle Verknüpfung handelt, konnte gezeigt werden, dass so erhaltene H-Ras-Proteinkonjugate biologisch aktiv sind.⁵⁴ Dieses gilt selbst dann noch, wenn die MIC-Peptid-Protein-Konjugate im Lipidrest als weitere Modifikation eine photoaktivierbare Benzophenon-Gruppe, welche für „cross-linking“ Experimente genutzt wird, tragen.⁵⁵

Eine weitere Verknüpfungsmethode von exprimierten Proteinen mit Peptiden besteht in der Verwendung der „*native chemical ligation*“ (NCL)⁵⁶, bei der ein Proteinthioester des Fragmentes **9** mit der Thiolgruppe eines N-terminalen Cysteins des zweiten Fragmentes **10** zu dem Thioester **11** reagiert (Schema 1, **B**). Ein intramolekularer Acyltransfer führt anschließend zur Bildung einer Amidbindung zwischen beiden Segmenten (**12**). Das Prinzip der NCL wird bei der als Verknüpfung exprimierter Proteine (*expressed protein ligation*, *EPL*)⁵⁷ bzw. der als Intein-vermittelten Proteinverknüpfung (*intein-mediated protein ligation*, *IPL*)⁵⁸ bezeichneten Methoden genutzt. Ein Vorteil der Produkte besteht darin, dass sie im Gegensatz zu MIC-Konjugaten eine native Peptidstruktur aufweisen, zumindest wenn der Verknüpfungspunkt der Ligation an einem natürlich vorkommenden Cystein liegt. Die auf der NCL aufbauende Methodik ist vielseitig einsetzbar, beschrieben sind mittlerweile unter anderem die Synthese von Lipo⁵⁹- Glyko⁶⁰- und Nucleopeptiden⁶¹.

2.5 Peptidsynthese an der festen Phase

Es sind zahlreiche Standardwerke verfügbar, die einen Überblick über den Kenntnisstand und die Methoden der modernen Peptidsynthese bieten.^{62,63,64} Im Folgenden werden deshalb nur einige ausgewählte Aspekte der Festphasensynthese hervorgehoben.

2.5.1 Peptidkupplungen

Die kontrollierte Bildung einer Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren verläuft in zwei Schritten. Zuerst wird die Carboxylfunktion einer Aminosäure aktiviert, die dann im zweiten Schritt mit der Aminogruppe der zweiten Aminosäure unter Bildung einer stabilen Amidbindung reagiert. In den letzten Jahren wurde besonders der erste Schritt, die Aktivierung der Carbonsäure, durch eine Reihe neuer Methoden ergänzt.^{63,65} Ein wichtiges Kriterium für Kupplungsreagenzien sind die Effizienz der Amidbildung aber auch die Unterdrückung von Nebenreaktionen, insbesondere der Racemisierung der aktivierten Aminosäure bzw. des aktivierten Peptids. Die gebräuchlichsten Kupplungsreagenzien sind

zum einen Carbodiimide, zum anderen Aminium oder Phosphonium Salze. Carbodiimide werden häufig zusammen mit Hydroxylaminderivaten wie HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) **13**⁶⁶, HOAt (1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol) **14**⁶⁷ oder auch HODhbt (3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin)⁶⁸ eingesetzt (Abbildung 5). Der Hauptvorteil bei Verwendung dieser Additive besteht in der Unterdrückung der Racemisierung. Durch Reaktion des Hydroxylderivates mit dem racemisierungsanfälligen intermediären *O*-Acylisoharnstoff wird ein weniger gefährdeter Aktivester gebildet, der anschließend mit einem Amin unter Bildung einer Amidbindung reagiert.⁶⁸ Dabei wird HOAt **14** im Vergleich zu HOBt **13** als überlegen angesehen, da die Kupplung über den reaktiveren OAt-Aktivester schneller und das Risiko zur Racemisierung weiter verringert ist.⁶⁹ In der Festphasensynthese sind *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) gebräuchliche Carbodiimide, wobei DIC aufgrund seiner besseren Löslichkeit in DMF meistens bevorzugt wird. Für die Lösungssynthese dagegen erweist sich *N*-(3-Di-methylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC) **15** (Abbildung 5) aufgrund der guten Löslichkeit in Wasser und der damit verbundenen leichten Abtrennung des entsprechenden Harnstoffderivates nach der Reaktion als vorteilhaft. Kupplungsreaktionen laufen am schnellsten in unpolaren Lösungsmittel wie Dichlormethan ab, aber auch die Verwendung von DMF führt zu guten Resultaten.

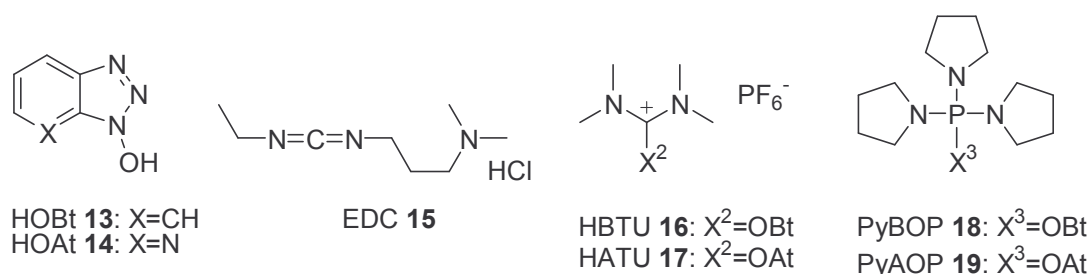


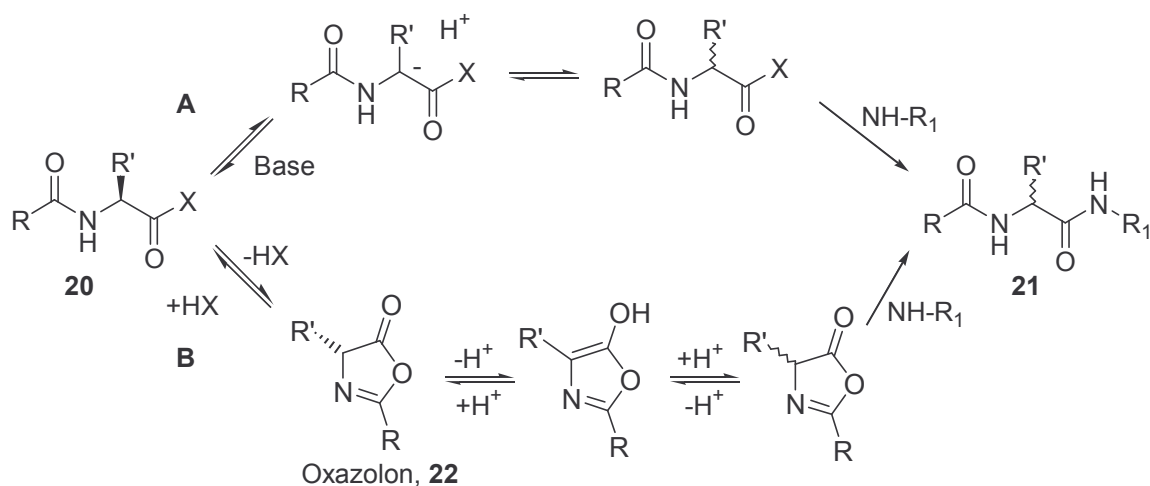
Abbildung 5: Kupplungsreagenzien und -zusätze.

Insbesondere zur Festphasensynthese von Peptiden sind heutzutage Aminium und Phosphonium-Kupplungsreagenzien bevorzugt, da ihre Effizienz im Vergleich zu Carbodiimiden als höher gilt.⁷⁰ Gebräuchliche Vertreter der Aminiumsalze sind z.B. HBTU **16**⁷¹ und HATU **17**⁶⁹, der Phosphoniumsalze PyBOP **18**⁷² oder PyAOP **19**⁷³ (Abbildung 5). Zur Bildung des entsprechenden Aktivesters ist der Zusatz von 1-2 eq einer tertiären Stickstoff-Base wie z. B. *N,N'*-Diisopropylethylamin (DIEA) oder *N*-Methylmorpholin (NMM) erforderlich. Im Falle von HBTU **16** oder PyBOP **18** verläuft die Reaktion über OBt-Aktivester, im Falle von HATU **17** oder PyAOP **19** über die aktiveren OAt-Aktivester. Aminiumsalze können im Gegensatz zu Phosphoniumsalzen mit den N-terminalen

Aminogruppen zu Guanidinderivaten reagieren und somit die Peptidkettenverlängerung irreversibel blockieren. Dementsprechend setzt man das Aminiumsalz oft im leichten Unterschuss im Vergleich zur anzukuppelnden Carbonsäure ein und aktiviert die Reagenzmischung in Gegenwart von Base vor, bevor sie zur festphasengebundenen Aminogruppe gegeben wird.

2.5.2 Strategien für die Festphasensynthese von Peptiden

Im Gegensatz zur Biosynthese von Proteinen verläuft die chemische Festphasensynthese vom C- zum N-Terminus, indem die C-terminal angebundene Aminosäure bzw. Peptidkette schrittweise mit entsprechend geschützten und an der Carboxylgruppe aktivierten Aminosäuren verlängert wird. In einer unerwünschten Nebenreaktion kann die Aktivierung der anzuknüpfende Aminosäure **20** zu ihrer Enantiomerisierung (**21**) führen. Zum einen begünstigt die erhöhte Acidität des α -Protons die Enolisierung, eine Reprotonierung führt anschließend zu D/L-Gemischen (Weg A, Schema 2). Als Hauptmechanismus der Enantiomerisierung wird allerdings die Bildung des Oxazolons **22** und dessen anschließende De- und Reprotonierung betrachtet (Weg B, Schema 2).



Schema 2: Mechanismen der Racemisierung.

Oxazolonebildung kann besonders leicht mit C-terminal aktivierten Peptiden oder acylierten Aminosäuren erfolgen. Bei der Kupplung von urethangeschützten Aminosäuren wird dagegen allgemein nicht von Problemen durch Enantiomerisierung ausgegangen, da hier die Oxazolonebildung bzw. deren Enolisierung unterdrückt wird. Ausnahmen bleiben allerdings

die besonders anfälligen Aminosäuren Cystein und Histidin.⁷⁴ Zur Minimierung ihrer Enantiomerisierung wurde der Einsatz sterischer Basen⁷⁵ empfohlen, für die Anknüpfung von Cystein wurden zudem optimierte Protokolle, insbesondere Carbodiimid-vermittelte Kupplungen unter nichtbasischen Bedingungen, entwickelt.⁷⁶

Das Problem der Epimerisierung tritt verstärkt auf, wenn Peptide statt in der heute allgemein üblichen C- zu N-Richtung in umgekehrter Reihenfolge, also N- zu C-terminal, aufgebaut werden, besonders wenn zur Aktivierung der Carboxylgruppe Carbodiimid/HOBt oder Aminium Salze verwendet werden.⁷⁷ Obwohl einige Methoden zur Unterdrückung der Racemisierung entwickelt wurden,^{68,81,78} darunter z. B. der Zusatz des Kupfersalzes $[\text{Cu}(\text{OBt})_2]$ ⁷⁹, wird diese Synthesestrategie nur in ausgewählten Fällen empfohlen.

Ein weiterer Ansatz zum Aufbau insbesondere von komplexen Peptiden oder kleinen Proteinen ist die konvergente Peptidsynthese.^{80,81} Hierbei werden zunächst entweder durch Festphasen- oder Lösungssynthese Peptidfragmente synthetisiert, die anschließend zum Zielpeptid kondensiert werden. Um einer möglichen Racemisierungsgefahr aus dem Wege zu gehen, wird der Verknüpfungspunkt bevorzugt so gewählt, dass die C-terminal zu aktivierende Aminosäure des Peptidfragmentes ein Glycin oder Prolin ist. Obwohl einige funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren für die Kupplungsreaktion nicht zwingend geschützt vorliegend müssen (bei Ser, Thr, Tyr, His, Trp, Gln, Asn), besteht bei der Peptidsynthese trotzdem eine Tendenz zur Verwendung einer maximale Schützung. Ein Problem, welches bei der Synthese und der Aufreinigung geschützter Peptidfragmente auftreten kann, ist ihre schlechten Löslichkeit, welche insbesondere von der Aminosäuresequenz und auch von der Länge der Peptidkette abhängt.^{82,83}

2.5.3 Ausgewählte Linker und Schutzgruppen

Ein wichtiger Punkt in der Festphasensynthese ist die Immobilisierung des ersten Bausteins bzw. der Aminosäure am polymeren Träger. Die hierfür benutzten Linker können im Prinzip als an unlöslichen Trägern immobilisierte Schutzgruppen betrachtet werden. Häufig wurde ihre Entwicklung durch Schutzgruppen aus der Lösungssynthese inspiriert. Die Eigenschaften des Linkers müssen genau auf die verwendete Schutzgruppenstrategie abgestimmt sein. Er muss gegenüber allen Reaktionsbedingungen während der Synthese an der festen Phase stabil sein und erst im letzten Schritt die selektive Abspaltung des Produktes ermöglichen.

Der von *Merrifield* Anfang der 60er Jahre beschriebenen Festphasensynthese von Peptiden⁸⁴ lag die Nutzung einer abgestuften Säurelabilität für die Abspaltung der temporären und der permanenten Schutzgruppen bzw. des Linkers zugrunde. Die heute üblicheren Strategien dagegen nutzen orthogonale Schutzgruppentechniken. Bei z.B. der häufig verwendeten Fmoc-Strategie wird ein säurelabiler Linker bzw. säurelabile permanente Schutzgruppen in Kombination mit der basenlabilen temporären Fmoc-Schutzgruppe verwendet. Eine Übersicht über die mittlerweile große Vielfalt an Linkern für die allgemeine organische Festphasensynthese und die Peptidsynthese findet sich in der neueren Literatur.^{85,86,87} Im Folgenden wird kurz auf die in dieser Arbeit verwendeten tritylbasierten Schutzgruppen und Linker und auf den Phenylhydrazid-Linker eingegangen.

Auf der Tritylgruppe basierende Schutzgruppen oder Linker können für eine Vielzahl von Funktionalitäten verwendet werden: für Säuren, Amide, Amine, Hydroxamsäuren, Alkohole, Phenole und Thiole. Die Abspaltung erfolgt sauer und beruht auf der leichten Bildung eines Tritylkations. Durch Substitution an der Tritylgruppe kann dieses stabilisiert oder destabilisiert werden, was sich in einer erhöhten bzw. erniedrigten Säurelabilität widerspiegelt. So kann die Abspaltung durch Einbringen von Methoxygruppen so erleichtert werden, dass selbst methoxytritylgeschützte Thiole **25** mit verdünnter Säure spaltbar sind. Gute Abgangsgruppen, wie z.B. Carbonsäuren können dagegen schon nicht mehr in ausreichender Stabilität an unsubstituierten Trityl-Linkern als Tritylester immobilisiert werden.⁸⁸ In der Festphasensynthese wird deshalb zur C-terminalen Verankerung von Carbonsäuren die weniger empfindliche, mit Chlor substituierte Tritylgruppe **26** verwendet.⁸⁹ Durch Behandlung mit verdünnter Trifluoressigsäure (TFA), Essigsäure (HAc) oder Hexafluor-*iso*-propanol (HFIP) kann sie wieder freigesetzt werden. Gegenüber basischen Bedingungen sind Tritylschutzgruppen stabil.

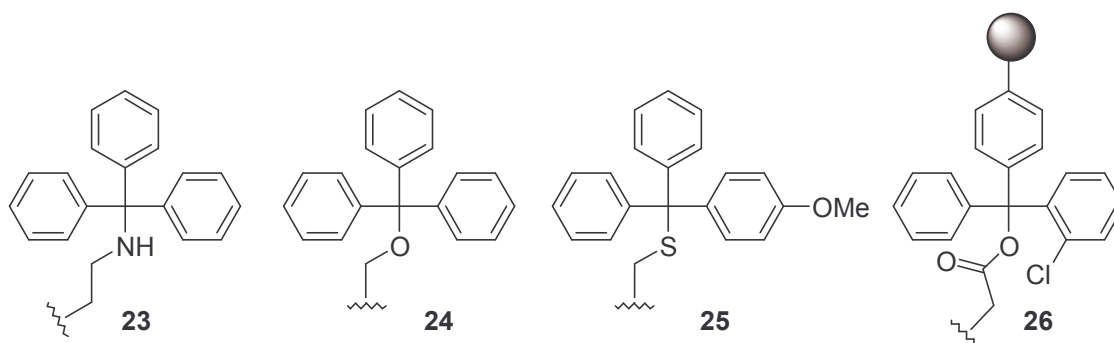
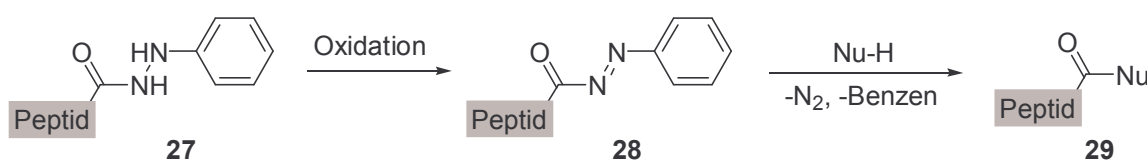


Abbildung 6: Beispiele für Tritylschutzgruppen und -linker. **23** und **24**: Tritylschutzgruppe für primäre Amine und Alkohole; **25**: Methoxytritylschutzgruppe für Thiole; **26**: 2-Chlortrityllinker zur Immobilisierung von Carbonsäuren.

Durch die Sperrigkeit der Tritylgruppe bleibt die in der Peptidsynthese beobachtete Diketopiperazinbildung bei Verwendung des Cl-Trityl-Linkers für die C-terminale Verankerung aus. Ein weiterer Vorteil der Verankerung von Aminosäuren als Tritylester liegt in deren epimerisierungsfreien Anknüpfung.⁸⁹ Denn hierbei ist keine Aktivierung der Carbonsäure mit Kupplungsreagenzien erforderlich, wie z.B. bei der Veresterung mit dem Wang-Linker, stattdessen wird die Anknüpfung durch nukleophile Substitution erreicht. Dieser Vorteil ist insbesondere bei Cystein als erste C-terminale Aminosäure von Bedeutung.⁹⁰

Die Phenylhydrazid-Gruppe wird seit langem als C-terminale Schutzgruppe in der Peptidsynthese eingesetzt, bereits 1957 wurde ihr Einsatz beschrieben.⁹¹ Zur Freisetzung der Carbonsäure wird das Arylhydrazid **27** durch Oxidation in das elektrophile Acyldiazon **28** überführt, welches anschließend durch den nukleophilen Angriff von z. B. Wasser in das Produkt **29**, Stickstoff und Benzol gespalten wird (Schema 3). Verschiedene Arten der Oxidation sind bekannt. Sie lassen sich in zweistufige Abspaltungen, bei denen das Acyldiazonintermediat isoliert wird und einstufige Prozesse, bei denen in einer Eintopfreaktion gleich das Produkt gebildet wird, unterteilen.

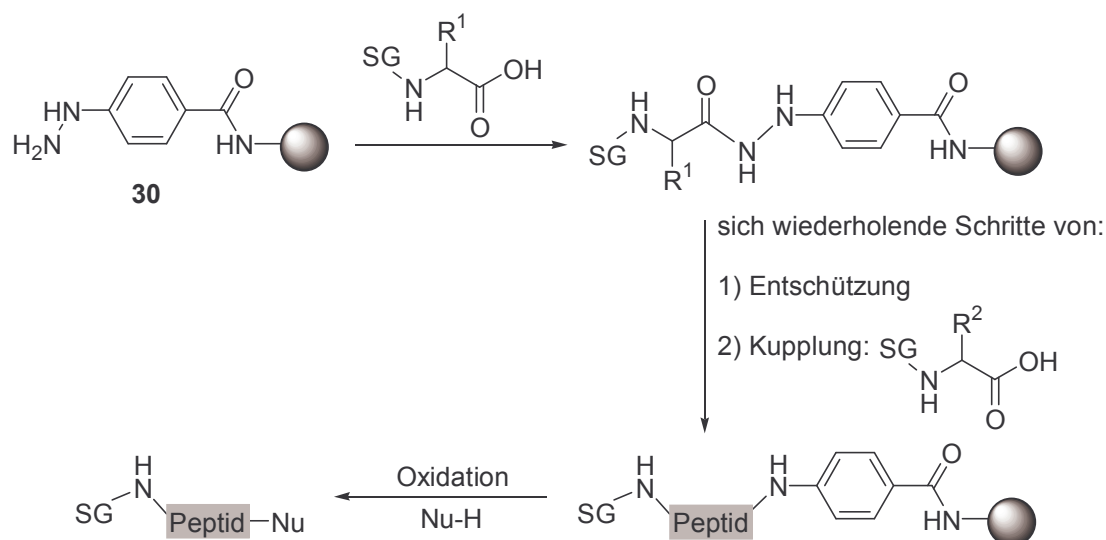


Schema 3: Abspaltung der oxidationslabilen Phenylhydrazid-Schutzgruppe in der Peptidsynthese in Lösung (Nu-H: Nukleophil, z.B. MeOH).

Zweistufige Prozesse umfassen die Oxidation des Phenylhydrazides mit *N*-Bromsuccinimid und Pyridin⁹² oder Pb(OAc)₄ in Dichlormethan.⁹³ Nach Isolierung des Acyldiazons wird die Spaltung durch Zugabe von Wasser zur Säure, von Alkohol zum Ester oder von Amin zum Amid initiiert. Einstufige Prozesse verwenden zur Oxidation unter anderem FeCl₃,⁹⁴ Braunstein⁹⁵ oder Kupfer(II)-salze^{94,96}. Eine besonders milde und selektive Methode besteht in der enzymatischen Spaltung der Phenylhydrazid-Gruppe mit Tyrosinase.⁹⁷

In einer abgewandelten Form, wurde die Phenylhydrazid-Gruppe als C-terminaler Linker in der Peptid-Festphasensynthese von *T. Wieland*⁹⁸ sowie von *A. N. Semenov* und *K. Y. Gordeev*⁹⁹ eingeführt. Die Anknüpfung an den polymeren Träger erfolgte bei *Wieland* über eine Amidbindung (**30**) in 4-Position des Phenylrings. *Semenov* und *Gordeev* wählten als

einzigste bislang eine Verknüpfungsvariante über ein Sulfon. Der heute übliche amidgebundene Linker **30** ist mittlerweile kommerziell erhältlich.



Schema 4: Festphasensynthese von Peptiden unter Verwendung des Phenylhydrazid-Linkers. SG: Schutzgruppe.

Der Phenylhydrazid-Linker wurde bisher erfolgreich zur Synthese kleinerer Modellpeptide eingesetzt (vgl. Schema 4). *G. Lowe*¹⁰⁰ zeigte, dass neben der Abspaltung von Tri- und Tetrapeptiden als Carbonsäuren auch Methylester und Amide dargestellt werden können. Die Verwendung verschiedener Alkohole als Nucleophile sowohl im einstufigen, wie auch im zweistufigen Abspaltprozess wurde kürzlich von *H. Waldmann* beschrieben.¹⁰¹ Damit sind neben Methylestern unter anderem auch Allyl-, 2-Propanol-, Benzyl- und Decalolester zugänglich. Der selben Arbeitsgruppe gelang ebenfalls die Darstellung cyclischer Peptide durch eine „capture and release“-Strategie, bei der die Ablösung vom polymeren Träger durch den intramolekularen Angriff der freien N-terminalen Aminogruppe erfolgt.¹⁰² In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass die Abspaltung vom Hydrazid-Linker racemisierungsfrei verläuft.

2.5.4 Polymere Träger in der Festphasensynthese

Der grundlegende Vorteil der Festphasensynthese gegenüber der Synthese in Lösung liegt in der Vermeidung arbeits- und zeitintensiver Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte, die bei jeder Lösungssynthese zwischen den Arbeitsschritten anfallen. Durch Immobilisierung der ersten Aminosäure und damit der im Laufe der Synthese anwachsenden Peptidkette an einem

geeigneten, unlöslichen Träger, ist die Abtrennung der Reagenzien durch einfaches Filtrieren und Waschen möglich. Als Trägermaterialien werden häufig schwach quervernetzte, mikroporöse Polymere verwendet, die eine sphärische Form mit einem Durchmesser von 10 bis 200 μm aufweisen.¹⁰³ Im Gegensatz zu makroporösen Polymeren müssen diese Polymere zunächst in geeigneten Lösungsmitteln quellen, wodurch Lösungsmittel in die polymere Matrix eindringen und zu einer gelartige Struktur führen. In diesem gequollenen Gelsystem, welches man auch als „polymere Lösung“ beschreiben kann, sind die Polymerketten solvatisiert und die an ihnen sitzenden reaktiven Gruppen sind für Reagenzien zugänglich. Das Erreichen dieses Zustandes ist für eine erfolgreiche Synthese essentiell, da reaktive Gruppen statistisch auf der Polymerkette verteilt sind und somit sich über 99 % innerhalb der Harzkugel befinden.¹⁰⁴ Die Quelleigenschaft eines Polymers bestimmt die Diffusionseigenschaften innerhalb des Harzes und damit die Reaktionskinetik. Sie ist das Ergebnis aus einer Kombination des Polymertyps, des verwendeten Lösungsmittels und des am Polymer immobilisierten Peptids. Eines der immer noch am meisten genutzten polymeren Träger für die Peptidfestphasensynthese, ist Polystyren, welches durch Copolymerisation mit Divinylbenzen (typischerweise 1%) quervernetzt wurde. Die Quelleigenschaften dieses Polymeres sind am Besten in unpolaren Lösungsmitteln wie z. B. Toluol oder Dichlormethan, in polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder Wasser sind sie durch die hydrophobe Struktur der Polymermatrix begrenzt.¹⁰⁵ Im Laufe einer Peptidsynthese kann sich die Quelleigenschaft ändern. Während sie anfangs hauptsächlich von dem verwendeten Polymer bestimmt wird, macht sich nach einigen Syntheszyklen die wachsende Länge der Peptidkette ebenfalls bemerkbar.¹⁰⁶ Obwohl z.B. für reines Polystyren Dichlormethan ein besseres Quellmittel als DMF ist, wird aufgrund der sich bei der Peptidsynthese bildenden Polymer-Peptidkonjugate normalerweise DMF bevorzugt. Dem Kompositcharakter der Konjugate kann auch Rechnung getragen werden, indem binäre oder ternäre Lösungsmittelssysteme verwendet werden.

Im Bemühen um eine Verbesserung der Polymereigenschaften wurde eine wachsende Anzahl von neuen unlöslichen Trägern für die Festphasensynthese entwickelt. Eine Übersicht findet man in der neueren Literatur.^{103,104,107} Wegen ihrer Bedeutung in der vorliegenden Arbeit seien hier nur die Ethylenglykol-tragenden Polystyren-Hybride erwähnt. Sie bestehen aus einer Polystyrenmatrix, an die Polyethylenglykolketten (PEG) kovalent angeknüpft sind. Aufgrund der Polyethylenglykoleinheiten sind diese Polymere wesentlich polarer als reines Polystyren und quellen in einem weiten Polaritätsbereich unterschiedlicher Lösungsmittel, von Methanol oder Wasser bis hin zu DMF, Dichlormethan, THF oder Dioxan, sehr gut.¹⁰⁵

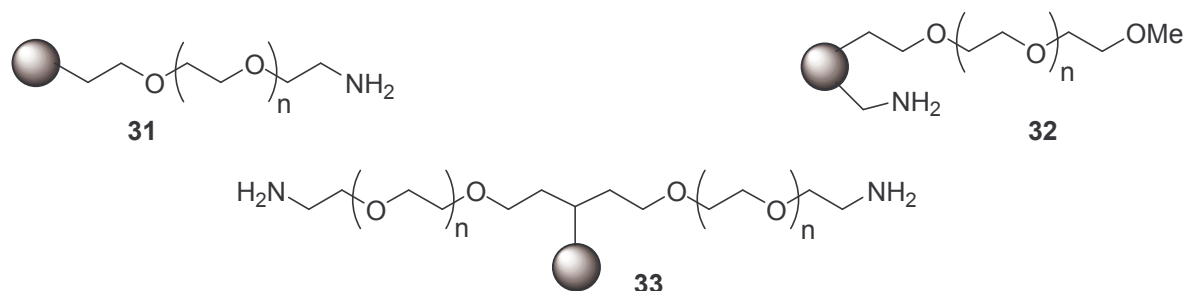


Abbildung 7: Chemische Struktur von TentaGel **31**, NovaGel **32** und ArgoGel **33**.

Einige Varianten von PEG-Polystyren-Hybrid-Harzen sind unter den Namen TentaGelTM **31**, ArgoGelTM **33** sowie NovaGelTM **32**¹⁰⁸ kommerziell erhältlich (Abbildung 7). Gewöhnlich haben sie aufgrund der PEG-Einheiten eine deutlich geringere Beladung an funktionellen Gruppen als vergleichbare Polystyren-Polymere.

2.6 Synthese lipidierter Peptide

Die Synthese lipidierter Peptide ist durch die ausgeprägte Labilität der einzelnen Lipidmodifikationen erschwert (Abbildung 8). So sind die beiden Isoprenylgruppen Farnesyl und Geranylgeranyl durch die vorhandenen 3-fach substituierten Doppelbindungen empfindlich gegenüber Säuren. Umlagerungen und Additionsreaktionen unter sauren Bedingungen sind beschrieben worden.^{109,110} Der Einsatz von Schutzgruppen und, wie auch im Falle der Festphasensynthese, von Linkern ist damit sehr eingeschränkt. Zusätzlich verbieten sich hydrogenolytisch abzuspaltende Schutzgruppen wie z. B. vom Benzyl-Typ. Damit sind die in der Peptidchemie häufig verwendeten Kombinationen mit Boc-, *tert*-Butyl- oder Z-Schutzgruppen oder der Einsatz des Wang-Linkers ausgeschlossen. Eine Alternative können hingegen extrem säurelabile Schutzgruppen vom Trityl-Typ bieten, da zumindest farnesylierte Peptide Abspaltbedingungen mit verdünnter TFA (bis zu 5 % in CH₂Cl₂ v/v) für 1 h tolerieren.¹¹¹

Im Gegensatz zu Isoprenylgruppen wird die Thioesterfunktion palmitoylierter Cysteine von Nukleophilen angegriffen, was zu einer Spaltung des Thioesters und einer Freisetzung von Palmitat führt.¹¹² Insbesondere ist die Verwendung von Piperidin zur Abspaltung von Fmoc-Gruppen ausgeschlossen. Starke Base können das α -Proton vom palmitoylierten Cystein abstrahieren, was in einer Eliminierung zum Dehydroalanin resultiert. Bei N-terminal freiem S-palmitoyliertem Cystein tritt als Nebenreaktion eine *S,N*-Acylwanderung auf,¹¹³ wonach die terminale Aminfunktion für die weitere Synthese irreversibel blockiert ist.

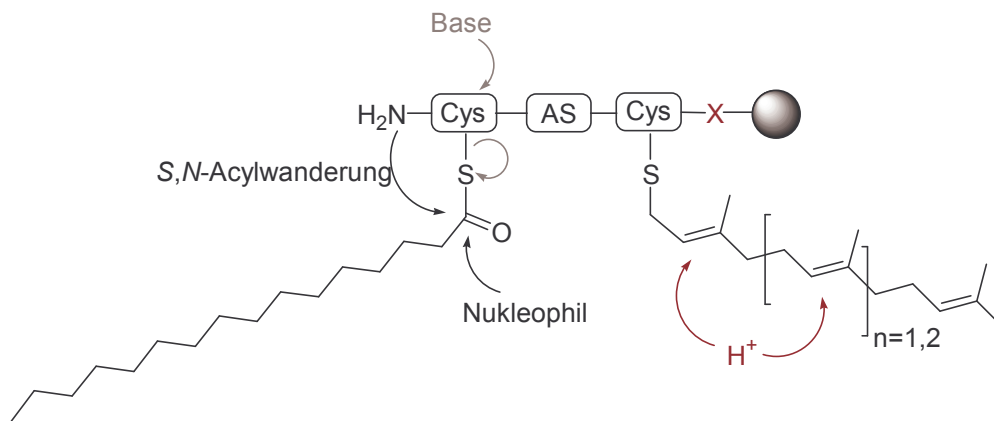


Abbildung 8: Nebenreaktionen des basen-labilen Palmitoylthioesters und des säurelabilen Prenylthioethers. AS: Aminosäure; X: Linkergruppe.

Im folgenden wird aufgrund der verfügbaren Übersichtsartikel⁵³ nur kurz auf die Synthese *S*-prenylierter oder *S*-palmitoylierter Peptide eingegangen. Die Darstellung von Peptiden mit nur einer Lipidmodifikation kann oft noch mittels Standardschutzgruppen-Methodiken bewerkstelligt werden. Zur Einführung von Prenylgruppen lassen sich hauptsächlich zwei Synthesestrategien unterscheiden. Bei der ersten Strategie wird eine Prenylierung an geschützten oder ungeschützten Peptiden in den letzten Schritten der Synthese in Lösung unter sauren, neutralen oder basischen Bedingungen sowie enzymkatalysiert durchgeführt.^{114,115,116,117} Die zweite Strategie beruht auf der Prenylierung kleiner Bausteine, insbesondere von Cysteinmethylester und deren nachfolgende Kondensation mit Peptiden in Lösung.^{109,115,118} Auch eine Festphasensynthese prenylierter Peptide wurde beschrieben, bei der die Einführung der Lipidgruppe durch Anknüpfung eines prenylierten Cystein-Bausteins an die festen Phase erreicht wurde.¹¹⁹

Zur Darstellung *S*-palmitoylierter Peptide sind selektiv *S*-entschützte Peptide zum einen in Lösung³⁵ oder zum anderen an der festen Phase¹²⁰ acyliert worden. Da häufig mit einem Überschuss an Acylierungsreagenz gearbeitet wird, müssen alle anderen Funktionalitäten geschützt vorliegen. Alternativ dazu kann eine Palmitoylierung auch an entschützten Peptiden unter leicht sauren Bedingungen realisiert werden.¹²¹ Der Einsatz palmitoylierter Di- oder Tripeptide als Synthone für eine Lösungssynthese ist ebenfalls beschrieben.¹²²

Sehr viel schwieriger gestaltet sich die Synthese, wenn unterschiedliche Lipidierungsarten mit ihren unterschiedlichen Labilitäten im selben Peptid enthalten sind. Im Falle der Anwesenheit säureempfindlicher Prenylthioether neben basenempfindlichen Palmitoylthioestern wie sie

z. B. im C-Terminus von N-, H- und K-Ras4A-Proteinen vorkommt, ist die mögliche Auswahl an Schutzgruppen drastisch beschränkt. Zur Synthese mehrfach lipidierter Peptide musste daher vor allem auf edelmetall- und enzym-ablesbare Schutzgruppen zurückgegriffen werden, wobei ein Aufbau der Peptide durch schrittweise Kondensation lipidierter Fragmente in Lösung gelang.^{53,118,123} Eine Methodik für die Festphasensynthese steht aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten noch nicht zur Verfügung.

Das fertige Produkt sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *J. Kuhlmann*, MPI-Dortmund, auf Bindungskinetiken an artifiziellen Membransystemen untersucht werden. Um den Einfluss der Farnesyl- oder Methylester-Modifikationen zu ermitteln, sollten für zusätzliche Untersuchungen, die zwei nicht farnesylierten polybasischen Peptide **35** und **36** dargestellt werden. Die Einführung einer Biotin-Gruppe war für die weitere Kupplung an Streptavidin (ca. 60 kDa) oder einen Anti-Biotin-Antikörper (ca. 150 kDa) gedacht. Auf diese Weise wird der Zugang zu verschiedenen großen Peptid-Protein-Konjugaten ermöglicht.

Weiterhin sollte eine breiter anwendbare Festphasenmethodik zur Darstellung von unterschiedlichen lipidierten Peptiden entwickelt werden. Solch eine Methodik existierte bis dahin nicht. Die aus der Lösungssynthese bekannte Labilität der verschiedenen säure- und basenlabilen Lipidmodifikationen sollte dafür eine Grundlage bilden. Genutzt werden sollten weiterhin die Erfahrungen von *F. Eisele*¹²⁷ zur Festphasensynthese mit dem sehr mild spaltbaren Phenylhydrazid-Linker. Insbesondere da dieser Linker gleichzeitig die Darstellung der für Ras-Peptide benötigten Methylester erlaubt. Mehrfach und unterschiedlich lipidierte Peptide, wie z.B. der farnesylierte und palmitoylierte C-Terminus von N-Ras **37** (Abbildung 10), waren erstes Ziel der Entwicklung der Festphasensynthese.

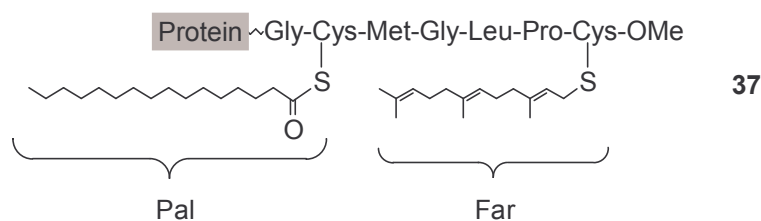


Abbildung 10: Der C-Terminus von N-Ras **37** als beispielhaftes Syntheseziel eines säure- und basenlabilen Lipopeptids.

Die nächste Stufe der Entwicklung sollte die zusätzliche Einführung von verschiedenen Fluoreszenzmarkern sowie der MIC-Gruppe ermöglichen. Darunter fiel auch die Darstellung verschiedener lipidierte Peptide, die einen BODIPY-Fluoreszenzmarker tragen. Diese Peptide sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *R. Winter*, Universität Dortmund, auf ihre Bindungseigenschaften an Domänen artifizieller Lipidvesikel charakterisiert werden.

Während die Farnesylierung von Proteinen in der Zelle relativ gut verstanden ist, herrscht über die Regulation der Palmitoylierung von Proteinen nach wie vor Unklarheit. Zum einen

ist nicht genau verstanden, wie und wo Proteine palmitoyliert werden, zum anderen sind die weiteren Regulationsmechanismen, in die auch APT1 involviert scheint, weitgehend unbekannt. In seiner Dissertationsarbeit hat *P. Deck*, konzeptionell ausgehend von dem C-Terminus von H-Ras als Leitstruktur, eine Reihe sehr wirksamer Inhibitoren der APT1 gefunden, die helfen können, die Rolle dieses Enzym besser zu verstehen. Erste Zellexperimente mit diesen Inhibitoren zeigten unerwartete Ergebnisse, die durch die Annahme einer palmitoylierenden Funktion der APT1 erklärt werden können. In Fortführung seiner Arbeit sollte nun, aufbauend auf dem aktivsten Inhibitor, dem doppelt-lipidierten Benzodiazepindion **5**, als Leitstruktur eine kombinatorische Festphasensynthese entwickelt werden, welche einen schnellen und effektiven Zugang zu einer Reihe weiterer Derivate gestattet. Die Peptidmimetika werden in nachfolgenden Untersuchungen auf ihre inhibitorische Aktivität bzw. auf ihre Selektivität hin getestet.

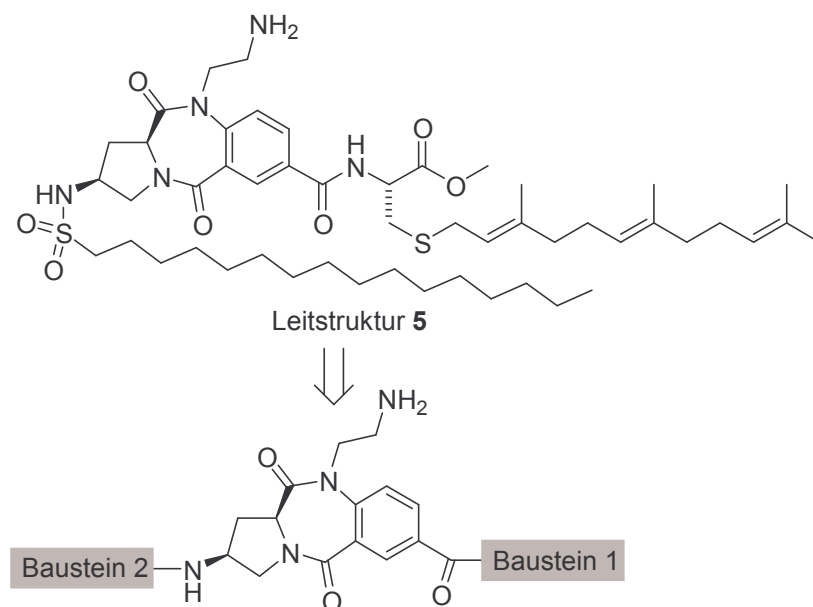


Abbildung 11: Leitstruktur und abgeleitete Konzeption der Benzodiazepindion-Bibliothek.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese von K-Ras Peptiden

Der C-Terminus von K-Ras4B **38** wird von folgenden Merkmalen bestimmt (Abbildung 12):

- eine hochfunktionalisierte polybasische Sequenz bestehend aus sechs aufeinanderfolgenden Lysinen, sowie zwei weiteren Lysinen und jeweils einem Serin und einem Threonin,
- ein C-terminaler Cysteinmethylester,
- ein säureempfindlicher Farnesylrest, welcher als Thioether an das Cystein gebunden ist.

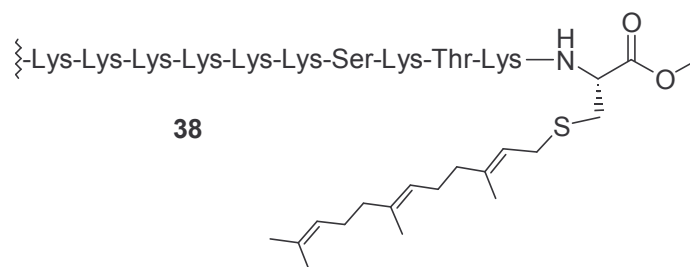
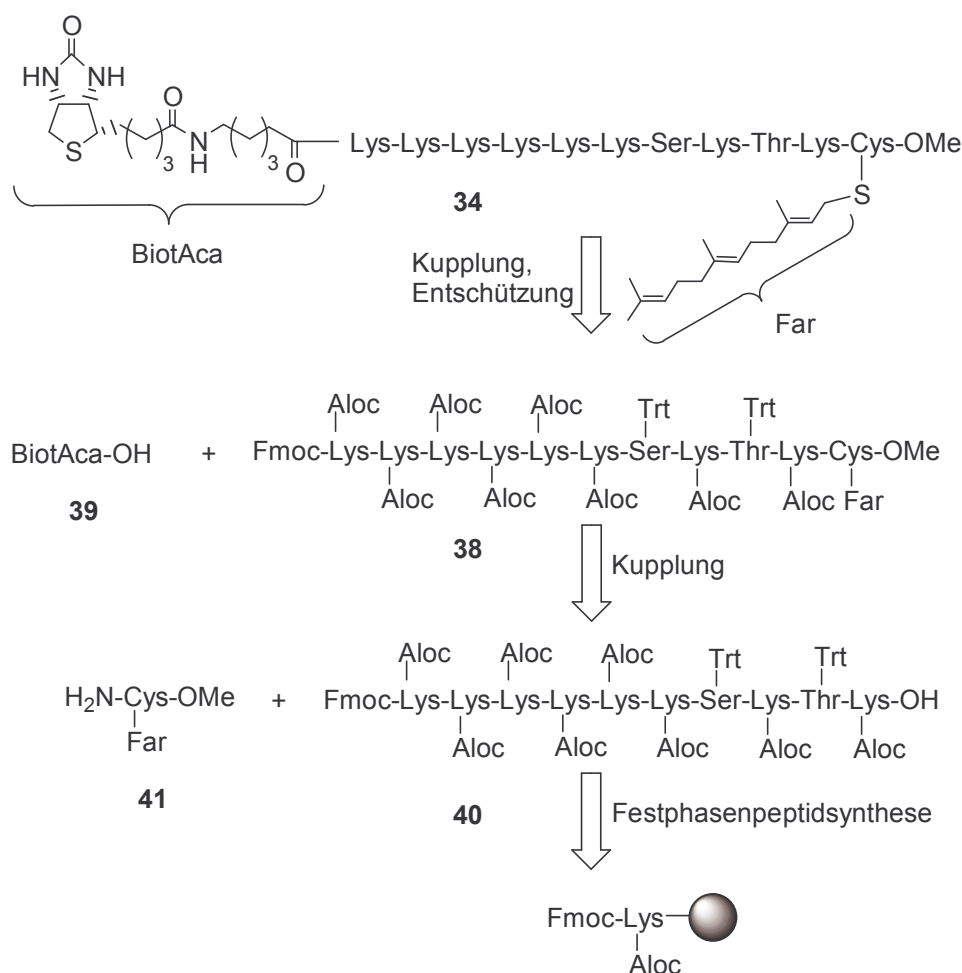


Abbildung 12: Der polybasische, farnesylierte C-Terminus von K-Ras4B **38**.

Die Kombination dieser Merkmale erschwert die Synthese von Peptidderivaten, welche dem C-Terminus von K-Ras4B **38** entsprechen, außerordentlich. Dementsprechend konnten bislang keine zufriedenstellenden Synthesen entwickelt werden. Einige auftretende Schwierigkeiten lassen sich am Beispiel der Synthese des C-Terminuses von K-Ras4B von *M. H. Gelb*¹²⁴ aufzeigen. Der Schlüsselschritt bestand hierbei aus einer Farnesylierung des vollständig geschützten Peptids in Lösung. Als Konkurrenzreaktion wurde jedoch ebenso eine Alkylierung der vorliegenden freien Aminogruppen der insgesamt acht Lysinseitenketten beobachtet. Obwohl diese Reaktion durch den Einsatz von Zink-Kationen als Lewisäuren und unter der Verwendung von sauren Reaktionsbedingungen deutlich zurückgedrängt werden konnte, wurde keine völlige Chemoselektivität der Farnesylierung erreicht. Ein weiterer Syntheseansatz von *J. R. Silvius*¹²⁵ beruhte auf der Verwendung eines polybasischen Hexalysinfragmentes, welches mit einem zweiten, lipidierten Peptidfragment zum Zielpeptid kondensiert werden sollte. Da hierbei der intakte C-Terminus von K-Ras4B jedoch nicht erhalten werden konnte, musste der Farnesylrest im Zielmolekül durch einen in der Synthese unempfindlichen Hexadecylrest ersetzt werden.

4.1.1 Synthese des lipidierten und biotinylierten K-Ras4B-Terminus

Zur Synthese des farnesylierten und biotinylierten C-Terminus des K-Ras4B-Proteins **34** wurde zunächst eine konvergente Synthesestrategie nach Schema 5 verfolgt. Das Zielpeptid wird hierbei durch Kondensation des farnesylierten Undeca-peptidmethylesters **38** mit dem Biotinbaustein **39** und anschließender Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erhalten. Zur Schützung der Aminofunktionen der Lysin-Seitenketten wird die palladiumlabile Aloc-Schutzgruppe verwendet, die Hydroxylfunktionen von Threonin und Serin sind durch Tritylschutzgruppen maskiert. Der farnesylierte Undeca-peptidmethylester **38** ist durch Kupplung des Decapeptids **40** mit farnesyliertem Cysteinmethylester **41** zugänglich. Lineare Standard-Festphasensynthese wird zur Synthese der geschützten Decapeptids verwendet.

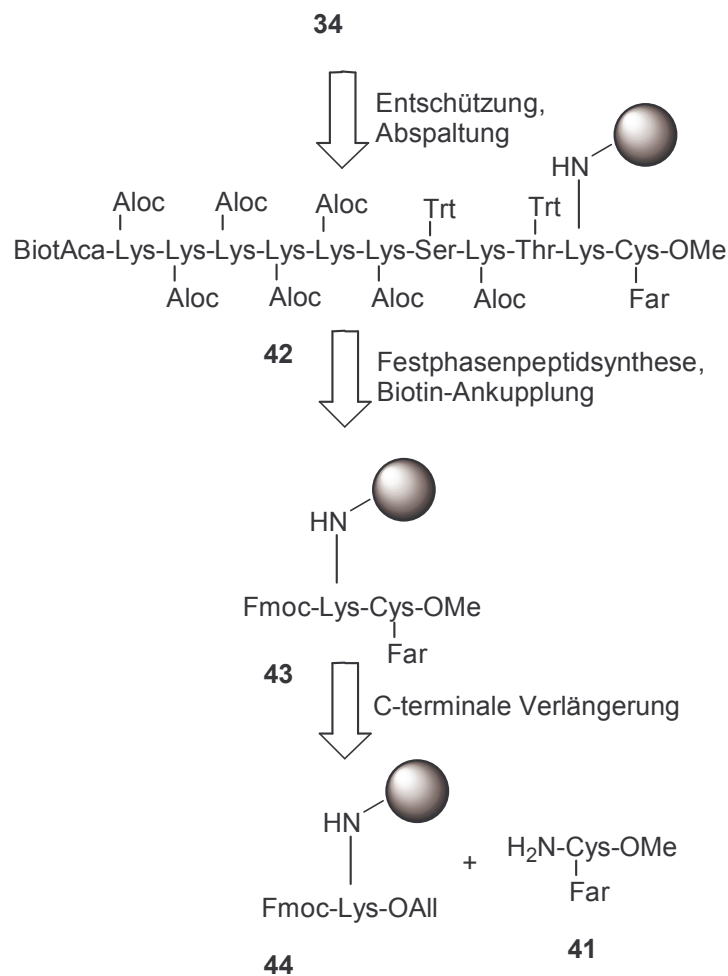


Schema 5: Erste Synthesestrategie von K-Ras4B-Peptiden unter Verwendung einer Kombination von Festphasen- und Lösungssyntheseschritten.

Die Durchführung der Synthese der Peptidkette **40** erfolgte mittels eines 2-Chlortrityl-Linkers und der Fmoc-Schutzgruppen-Methodik an einem Polystyren-Träger. Die Abspaltung erfolgte durch 2 % TFA und in der Anwesenheit von TES. Die anschließende HPLC-Aufreinigung

und Charakterisierung von **40** wurde erheblich durch die geringe Löslichkeit erschwert. Nach Kupplung des Rohproduktes **40** mit Cys(Far)-OMe **41** unter Verwendung von EDC/HOBt konnten mittels MALDI-Spektrometrie zwar sowohl Edukt **41** wie auch Produkt **38** nachgewiesen werden, eine Aufreinigung durch HPLC gelang jedoch nicht. Eine vorzeitige Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen auf dieser Stufe mittels Pd(PPh₃)₄ und Phenylsilan blieb erfolglos.

Die bei dieser Synthese aufgetretenen Probleme begründeten sich hauptsächlich in der schlechten Löslichkeit der Intermediate, ein durchaus bekanntes Problem in der konvergenten Peptidsynthese (vgl. Kapitel 2.5.2). Die weitere Verfolgung dieser Route hätte sehr zeit- und materialaufwendige Optimierungen erfordert und erschien daher als wenig praktikabel. Dementsprechend wurde eine neue Synthesestrategie konzipiert, bei der ein Auftreten von unlöslichen Zwischenstufen vermieden wird. Hierzu erfolgt die komplette Synthese am polymeren Träger, und erst das vollständig entschützte Zielpeptid **34** wird im letzten Schritt der Synthese vom Harz abgespalten (Schema 6).

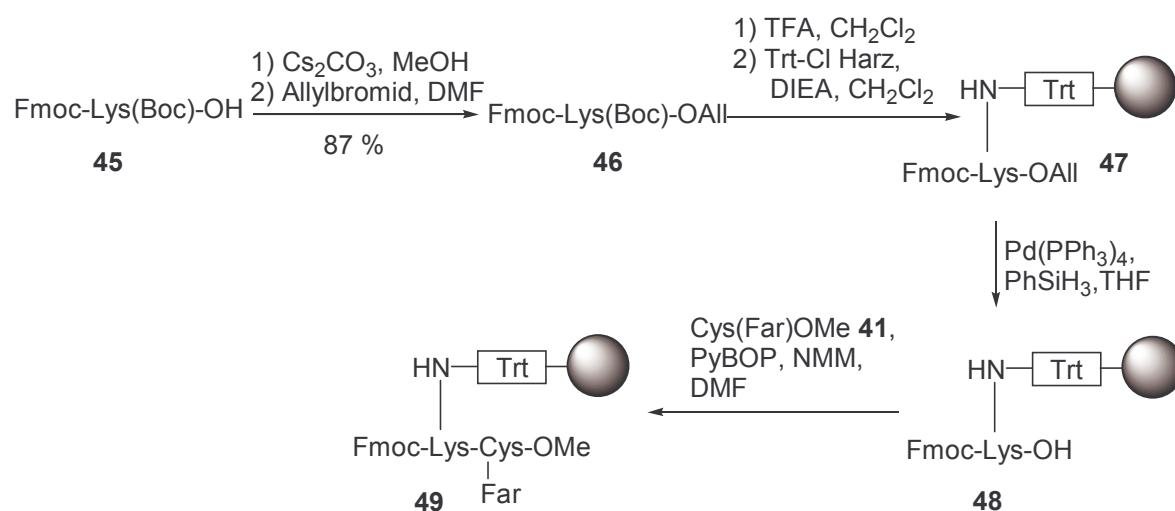


Schema 6: Modifizierte Synthesestrategie für das K-Ras4B-Peptid **34**. Die Synthese erfolgt komplett an der festen Phase, erst im letzten Schritt wird das Peptid abgespalten.

Die Anknüpfung an die feste Phase erfolgt über die Seitenkette des ersten C-terminalen Lysins. Als Linker wird der sehr säurelabile Trityl-Linker **23** verwendet, der die spätere Abspaltung unter Bedingungen erlaubt, die die Farnesylgruppe nicht angreifen.¹¹¹ Nach C-terminaler Verlängerung des Fmoc-geschützten Lysins **44** mit dem farnesylierten Cysteinmethylester **41** zum Dipeptid erfolgt die Peptidfestphasensynthese mittels Fmoc-Schutzgruppenstrategie in N-terminaler Richtung. Der Biotinbaustein wird an der festen Phase angeknüpft und die palladiumlabilen Aloc-Schutzgruppen entfernt. Die Abtrennung des Palladiumkatalysators sollte anschließend bequem durch einfaches Waschen des Harzes gelingen. Durch Behandlung mit verdünnter Säure wird das Zielpeptid **34** von der festen Phase abgespalten.

Neben dem Vermeiden von unlöslichen Intermediaten während der gesamten Synthese und der einfachen Abtrennung des Palladium-Katalysators nach der Aloc-Schutzgruppenabspaltung besteht bei dieser Strategie ein weiterer Vorteil darin, dass nur Kupplungen mit weniger racemisierungsgefährdeten Fmoc-geschützten Aminosäuren durchgeführt werden und nicht mehr mit Peptidfragmenten (vgl. Kapitel 2.5.2).

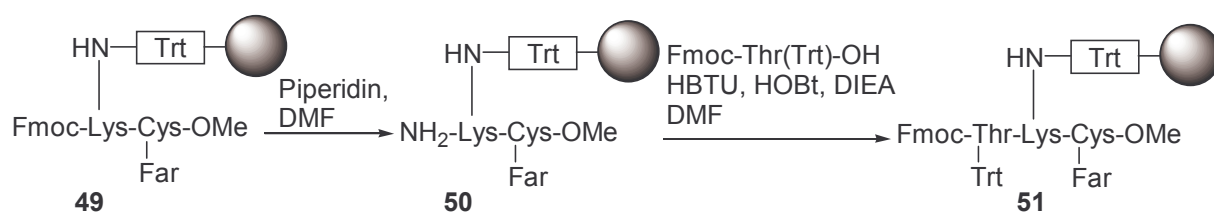
Zu Beginn der Synthese von **34** wurde kommerziell erhältliches Fmoc-Lys(Boc)-OH **45** in das nukleophile Cäsiumsalz überführt, und durch Umsetzung mit Allylbromid wurde der entsprechende Allylester **46** in 87 % Ausbeute erhalten. Von dem erhaltenen Lysinbaustein **46** wurde mit TFA selektiv die Boc-Schutzgruppe entfernt und das freigesetzte Amin in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit festphasengebundenem Tritylchlorid an den Polystyren-Träger geknüpft (Schema 7).



Schema 7: Anknüpfung des ersten Lysinbausteins an Trityl-Harz und C-terminale Verlängerung am polymeren Träger mit farnesyliertem Cystein-Methylester.

Typischerweise wurden dabei Belegungsraten von 0.49 mmol/g erhalten. Die Bestimmung der Belegung erfolgte mittels der UV-Fmoc-Methode. Von der harzgebundenen Aminosäure **47** wurde der Allylester selektiv durch Behandlung mit Pd(PPh₃)₄ abgespalten. Als Allyl-„Fänger“ wurde hierbei Phenylsilan verwendet. Optional kann auch *N*-Methylanilin benutzt werden. Beide Methoden führten zu einer quantitativen Entschützung. Eine Reaktionskontrolle am polymeren Träger erfolgte im Allgemeinen durch eine Testabspaltung der Produkte von einigen Kügelchen des Polymers und anschließender Analyse durch analytische HPLC oder LCMS. Im nächsten Schritt wurde die freie Aminosäure **48** mit dem zuvor in Lösung nach der Vorschrift von *K. Kuhn*¹²⁶ hergestellten farnesylierten Cysteinmethylester **41** zum festphasengebundenen Dipeptid **49** verlängert. Diese Reaktion verlief mit PyBOP als Kupplungsreagenzien innerhalb von 3 h quantitativ. Dagegen zeigte DIC zeigt eine wesentlich geringere Aktivität, nach 4 h waren noch 35 % Edukt vorhanden. Die ebenfalls sehr gebräuchlichen Aminiums Salze wie HBTU oder HATU erfordern eine Voraktivierung mit der Säurekomponente, nicht abreagiertes Reagenz neigt dazu, auch mit Aminogruppen zu reagieren. Um eine kontinuierliche Reaktion am polymeren Träger zu gewährleisten, wurden sie für diese Reaktion daher nicht in Betracht gezogen.

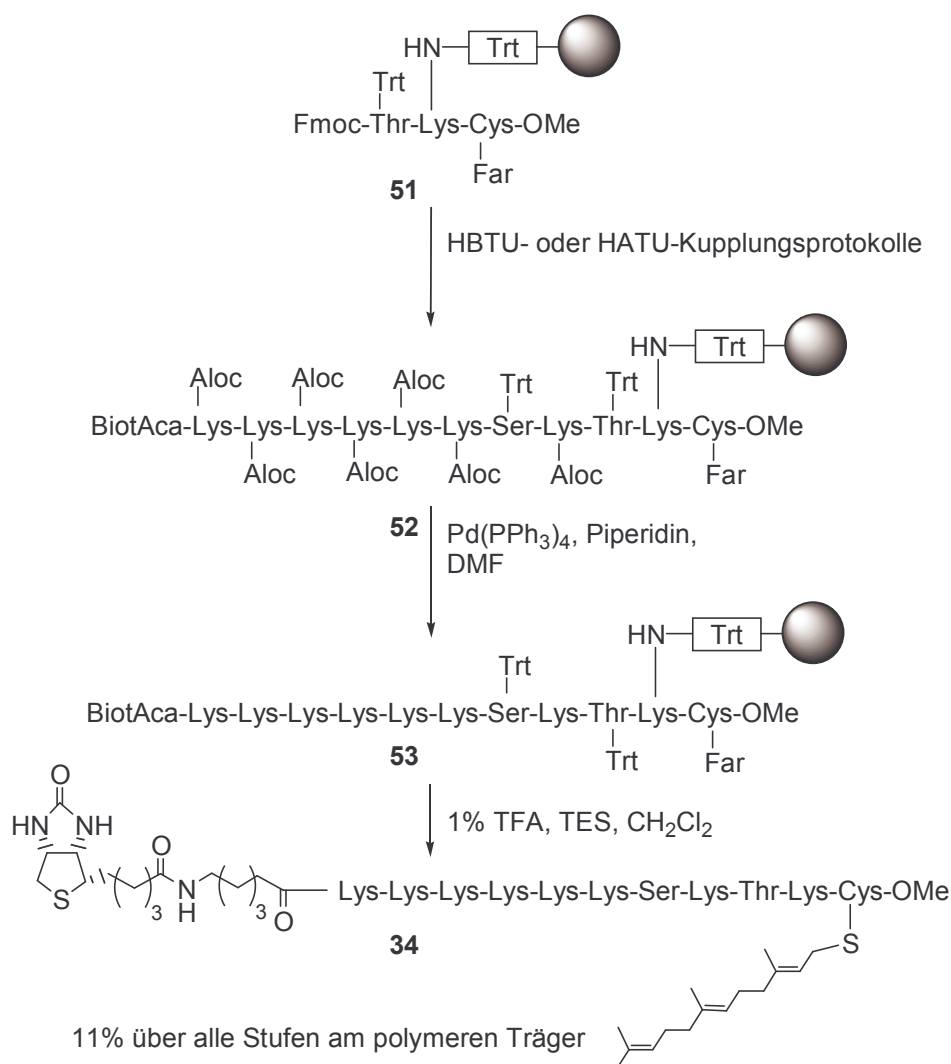
Im nächsten Schritt erfolgte eine Entschützung der Fmoc-Gruppe von **49** mit Piperidin (Schema 8). Die Reaktionszeiten wurden mit zweimal vier Minuten bewusst kurz gewählt, um eine mögliche Diketopiperazin-Bildung durch den nukleophilen Angriff der freigesetzten Aminogruppe an dem C-terminalen Methylester zu vermeiden. Die Ankupplung von Fmoc-Thr-OH an **50** erfolgte direkt im Anschluss unter der Verwendung von HBTU/HOBt als Kupplungsreagenzien. Bei Verwendung dieser Reaktionsbedingungen lieferten anschließende Testabspaltungen keinen Hinweis auf das Diketopiperazin-Nebenprodukt.



Schema 8: N-terminale Verlängerung des harzgebundenen Dipeptids.

Das harzgebundene entschützte Tripeptid **51** wurde mit den entsprechenden geschützten Aminosäuren unter Verwendung der Fmoc-Methodik und mit HBTU und HOBt als

Kupplungsreagenzien zum Undecapeptid verlängert (Schema 9). Die Biotingruppe wurde in Form von Biotinyl-aminocapronsäure analog zu den anderen Aminosäuren eingeführt (**52**). Die geplante Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen an der festen Phase mittels $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und Phenylsilan in DMF zu **53** gelang auch unter Verwendung von langen Reaktionszeiten von bis zu 15 h nicht. Dagegen führte die Verwendung von $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ mit Piperidin in DMF innerhalb von vier Stunden zu einer vollständigen Entschützung. Ein Grund hierfür liegt möglicherweise in dem effektiveren Aufbrechen der Aggregationen der geschützten Peptide auf dem polymeren Träger durch das verwendete Piperidin.



Schema 9: Aufbau der polybasischen Sequenz, Biotinylierung und Abspaltung von der festen Phase.

Die Abspaltung des Zielpeptids **34** von der festen Phase gelang mit 1 % TFA und 2 % Triethylsilan in Dichlormethan. In diesem Reaktionsschritt wurden ebenfalls die Tritylschutzgruppen der Hydroxylgruppen in den Seitenketten von Serin und Threonin entfernt.

Die Abspaltung vom polymeren Träger lieferte neben dem Ziepeptid auch einige Nebenprodukte, die als Lysin-Deletionspeptide identifiziert wurden. Ihre Ursache lag offensichtlich in einer unvollständigen Kettenverlängerung mit Lysinbausteinen während der Synthese. Bei Wiederholung der Synthese konnte dieses Problem vermieden werden, indem zur Anknüpfung von der dritten Aminosäure Threonin an die effizienteren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt verwendet wurden. Die Kupplungszeiten wurden auf vier Stunden verlängert. Zusätzlich wurden nach Anknüpfung des dritten bis sechsten Lysinbausteins nicht-acylierte Aminogruppen durch einen „Capping“-Schritt mit 10 % Essigsäure in Pyridin irreversibel blockiert. Das nach diesen Synthesemodifizierungen erhaltene biotinylierte und farnesylierte Zielpeptid **34** wurde nach Abspaltung vom polymeren Träger durch präparative HPLC mit einer C18-RP-Säule aufgereinigt. Es wurde in sehr reiner Form (Abbildung 13) nach 24 Stufen am polymeren Träger mit einer Gesamtausbeute von 11 %, beides bezogen auf das festphasengebundene geschützte Lysinderivat **47**, erhalten.

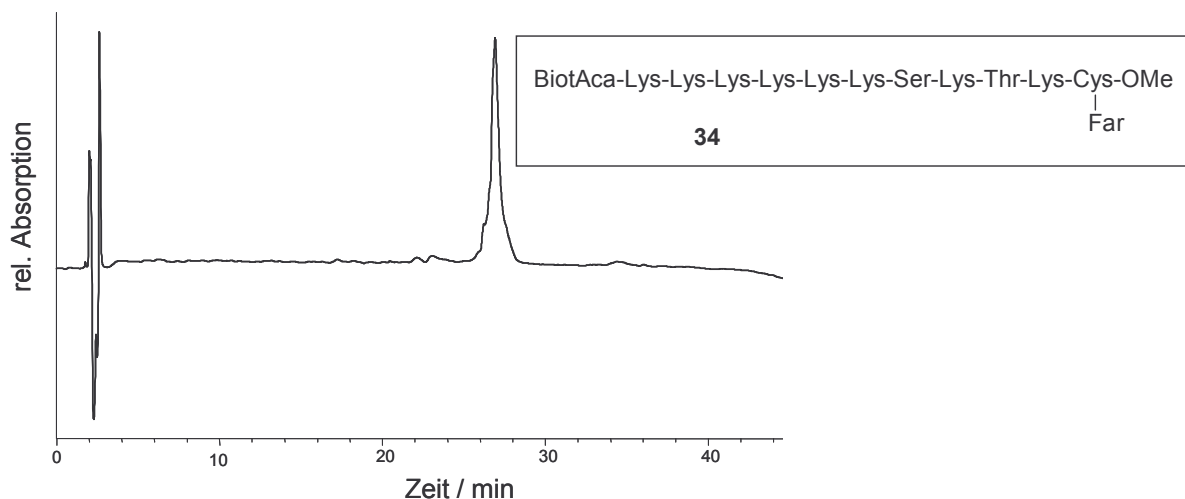
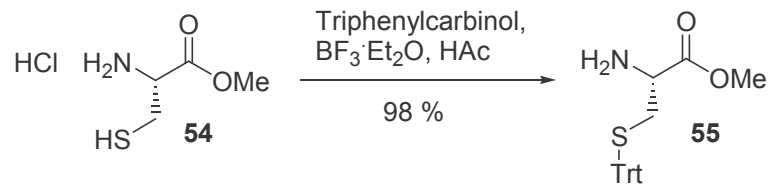


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm von **34**. Detektionswellenlänge: 210 nm.

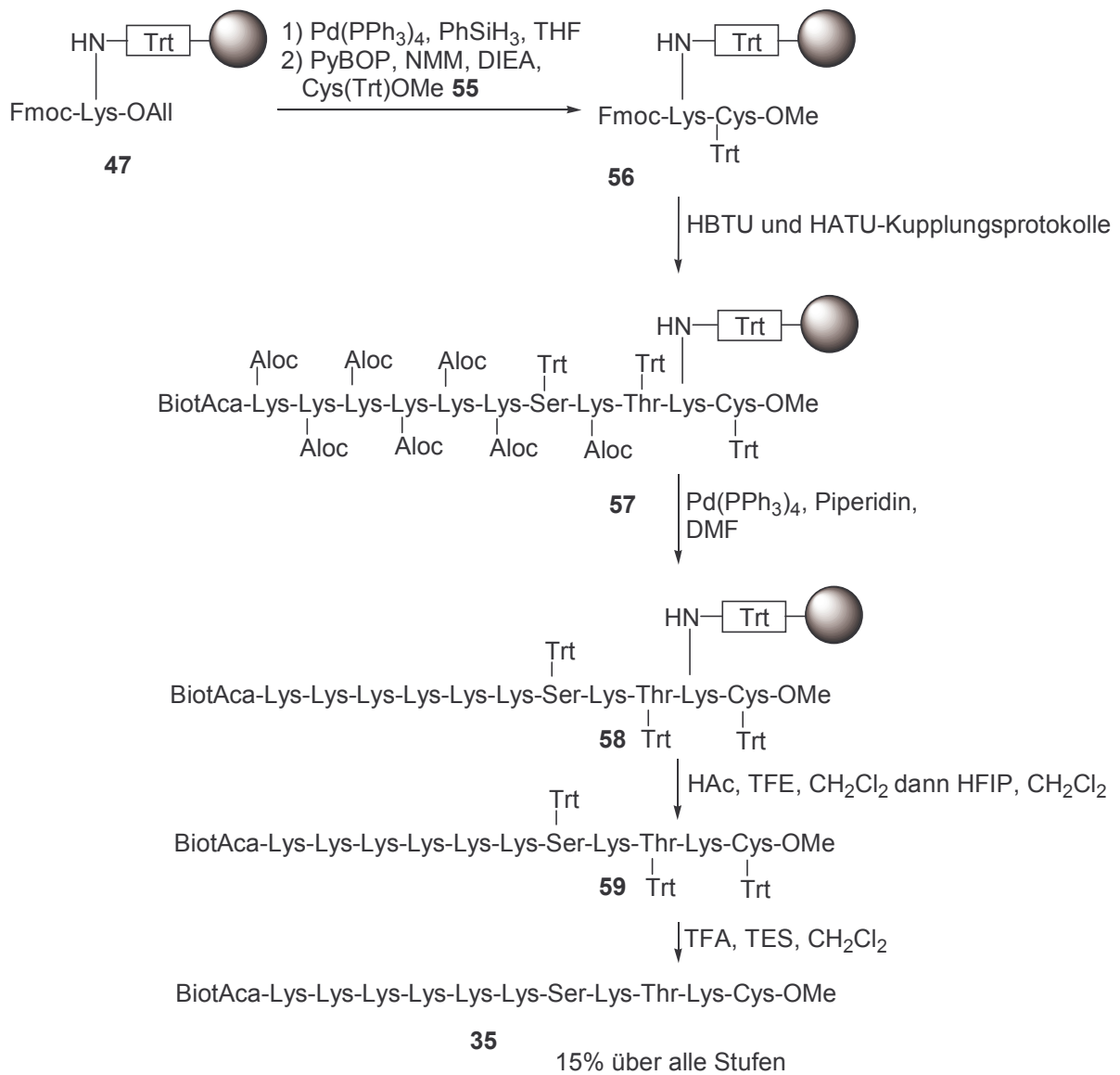
4.1.2 Synthese von nicht-lipidierten, biotinylierten K-Ras Peptiden

Zur Synthese des nicht-lipidierten, biotinylierten C-Terminus des K-Ras4B-Proteins **35** wurde eine analoge Synthesestrategie wie für **34** gewählt. Anstelle des farnesylierten Cysteinmethylesters wurde ein Cysteinmethylester **55**, dessen Thiolgruppe durch eine Tritylgruppe maskiert war, verwendet. Dieser Baustein wurde zuvor in Lösung aus dem freien Cysteinmethylester Hydrochlorid **54**, wie in Schema 10 gezeigt, erhalten.



Schema 10: Darstellung des tritylgeschützten Cysteinmethylesters **55**.

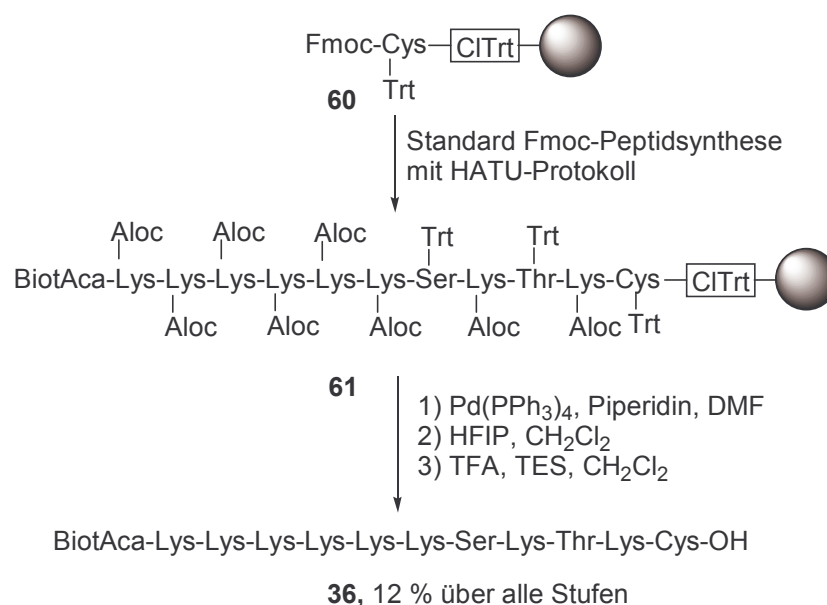
Das festphasengebundene Lysinderivat **47** wurde C-terminal entschützt und mit **55** zum festphasengebundenen Dipeptid **56** gekuppelt (Schema 11).



Schema 11: Festphasensynthese des biotinylierten K-Ras4B Peptids **35**.

Wie bei der Synthese von **34** beschrieben, wurde die Fmoc-Gruppe entfernt und das geschützte Threonin mittels HBTU/HOBt-Protokollen angekuppelt. Die folgende N-terminale Verlängerung zu **57** wurde wieder mit HATU/HOAt Kupplungsreagenzien durchgeführt. Nach Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen zu **58** wurde das Peptid zunächst unter Verwendung von 50 % TFA und 5 % TES in CH_2Cl_2 abgespalten. Da unter diesen stark sauren Bedingungen eine Oxidation der Thiolgruppe in der Cysteinseitenkette beobachtet wurde, wurde der Abspaltungsprozess modifiziert und in zwei Stufen durchgeführt. Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgte durch Behandlung mit Essigsäure/TFE und anschließend mit HFIP. Das tritylgeschützte und oxidationsunempfindliche Peptid **59** wurde mittels präparativer HPLC unter Verwendung einer C18-RP Säule aufgereinigt. Anschließend wurden unter Schutzgas mit 50 % TFA und unter Verwendung von TES die Tritylgruppen der Hydroxylgruppen von Serin und Threonin sowie die Tritylgruppe der Thiolgruppe vom Cystein abgespalten. Nach weiterer Aufreinigung mittels präparativer HPLC wurde das biotinylierte Zielpeptid **35** nach 25 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 15 %, beides bezogen auf das festphasengebundene geschützte Lysinderivat **47**, erhalten.

Das biotinylierte Zielpeptid **36** enthält statt eines Methylesters eine freie Säuregruppe am C-Terminus. Zur Synthese bot sich die in der Peptidchemie standardmäßige Verknüpfung der C-terminalen Aminosäure mit dem polymeren Träger über die Säuregruppe an (Schema 12).



Schema 12: Festphasensynthese des biotinylierten Peptids **36**.

Kommerziell erhältliches Fmoc-Cys(Trt)-OH wurde mittels festphasengebundenem 2-Chlorotriylchlorid an den Polystyren-Träger geknüpft (60). Standard-Fmoc-Strategie mit HATU/HOAt als Kupplungsreagenzien führte zum festphasengebundenen biotinylierten Undecapeptid 61. Die Abspaltung vom Harz und die Entfernung der restlichen Triylgruppen wurde ähnlich wie bei 35 in zwei Stufen einmal mittels HFIP und anschließend unter Schutzgas mit TFA/TES durchgeführt. Nach der zweiten, abschließenden Aufreinigung mittels präparativer HPLC wurde das biotinylierte Zielpeptid 36 nach 25 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 12 %, beides bezogen auf das festphasengebundene Fmoc-Cystein 60, erhalten.

4.1.3 Exkurs: Biophysikalische Studien zur Membranbindung von K-Ras4B Peptiden

Die drei synthetisierten, vom C-Terminus des K-Ras4B Proteins abgeleiteten, polybasischen Peptide 34, 35 und 36 werden zur Zeit im Rahmen einer Kooperation mit Dipl.-Biochem. C. Grunwald aus der Arbeitsgruppe von J. Kuhlmann am MPI für molekulare Physiologie biophysikalisch untersucht. Eine umfassende Darstellung und Diskussion findet sich in seiner Diplom- und Dissertationsarbeit, so dass hier lediglich einige Ergebnisse kurz umrissen werden.

Untersuchungen zur Membranbindung von 34 wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) auf dem Biacorechip L1 durchgeführt. Hierbei wird die Membran wie in Abbildung 14 gezeigt auf einer flexiblen Dextranschicht durch Zugabe von Lipidvesikeln erzeugt. Sie bietet den Vorteil, dass sie als planare Membran die zellulären Systeme wesentlich besser beschreibt als bisher hauptsächlich verwendete Lipidvesikel-Systeme mit ihren stark gekrümmten Oberflächen.

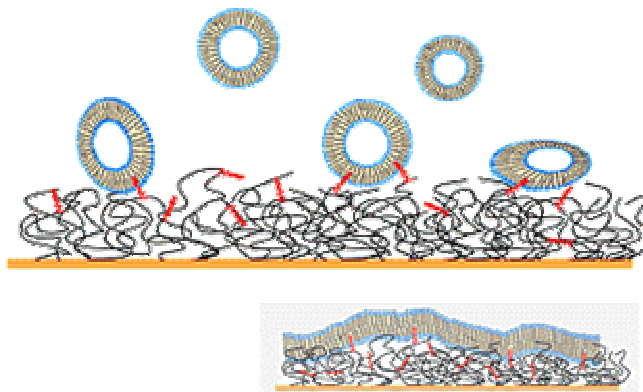


Abbildung 14: Lipidmembran auf dem Biacorechip L1.

Die Biotin-Gruppen der Peptide ermöglichen die Generierung verschieden großer Peptid-Proteinkonjugate. Als Proteine stehen hierfür Streptavidin (ca. 60 kDa) sowie der größere Anti-Biotin-Antikörper (ca. 150 kDa) zur Verfügung. Die Effektivität der Membranverankerung durch **34**, **35**, und **36** kann somit sowohl in Abhängigkeit der Proteingröße des Konjugates wie auch für unterschiedliche Membranzusammensetzungen untersucht werden.

Erste Ergebnisse zur Membranbindung des reinen Peptids **34** sind in Abbildung 15 gezeigt. Je stärker die Bindung des Peptids an die Membran, desto langsamer wird es eluiert und desto flacher ist der Abfall der SPR-Meßkurve. Die verwendeten Membranen bestanden aus einem variierenden Anteil von negativ geladenem Phosphatidylserin (PS) in einer Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC)-Membran. Bei einer reinen POPC-Membran ist die Bindung des polybasischen Peptids **34** am geringsten, bei 20 % PS hat die Membranbindung ihr Maximum. Bei einer weiteren Erhöhung des PS-Anteils ist zunächst reproduzierbar wieder ein Abfall, dann ein Anstieg der Membranaffinität zu beobachten.

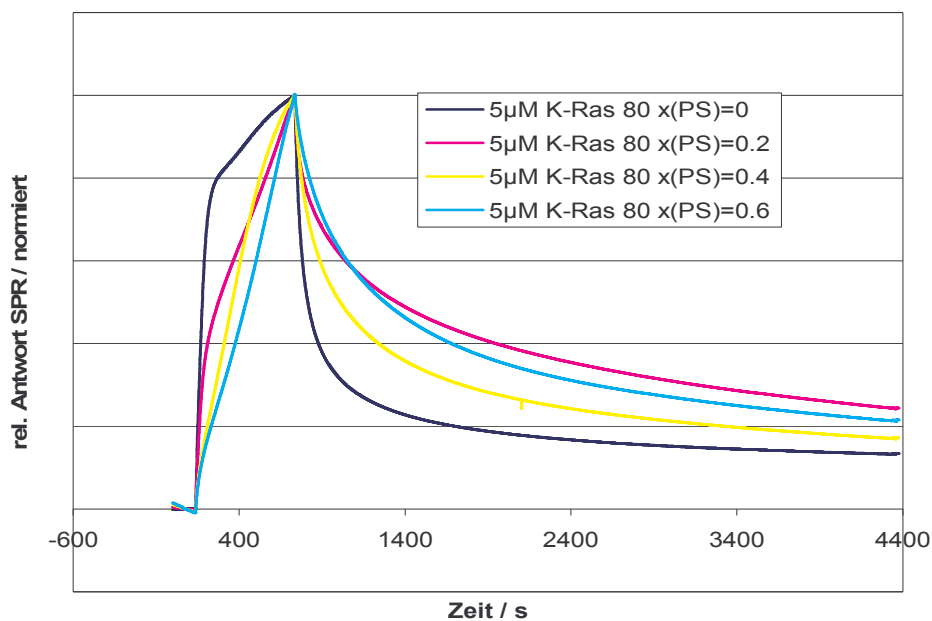


Abbildung 15: Bestimmung der Membranbindung von **34** mit SPR an einer Mischmembran von POPC und PS.

Inwieweit Domänenbildung in der Membran zur Erklärung der Ergebnisse herangezogen werden kann, ist noch zu klären. Weitere Experimente u.a. mit verschiedenen Peptid-Proteinkonjugaten werden zurzeit durchgeführt.

4.2 Allgemeine Festphasensynthese von Lipopeptiden

In Kapitel 4.1 ist die Entwicklung einer effizienten Synthese zur Darstellung eines polybasischen, farnesylierten Lipopeptids beschrieben. Ein Schlüsselement dieser Synthese ist die Anknüpfung des Peptids an den polymeren Träger über die Aminogruppe in der Seitenkette der zweiten Aminosäure Lysin. Die allgemeine Anwendbarkeit dieser Synthesestrategie ist damit auf Peptide beschränkt, deren C-Terminus und dort idealerweise die zweite Aminosäure eine zur Verankerung geeignete funktionelle Gruppe enthält. Eine breiter anwendbare Festphasenmethodik sollte jedoch auch Zugang zu Lipopeptiden ermöglichen, die keine weiteren funktionalisierten Seitenketten enthalten. Ein prominenter Vertreter solcher Lipopeptide ist zum Beispiel der farnesylierte und palmitoylierte C-Terminus von N-Ras **62** (Abbildung 16).

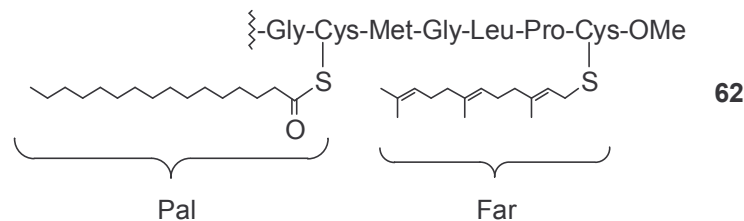


Abbildung 16: C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins.

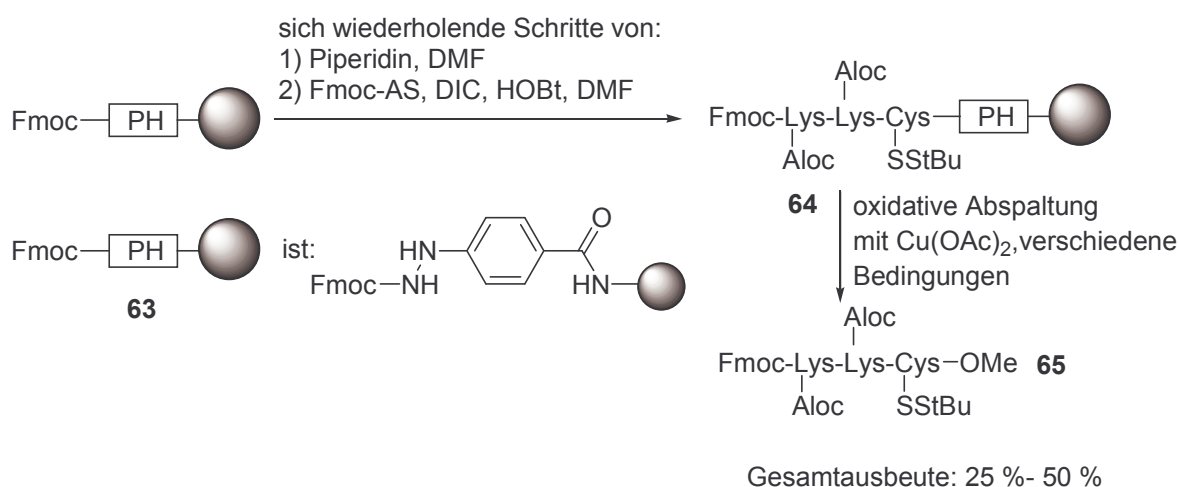
Idealerweise weist eine flexible und breit anwendbare Festphasen-Methodik zur Darstellung verschiedener Lipopeptide somit folgende Eigenschaften auf:

- Lipopeptide, die gleichzeitig sowohl säurelabile Prenylgruppen wie auch basenlabile Palmitoylgruppen enthalten, sollten zugänglich sein.
- Die verwendeten Schutzgruppen und der Linker und müssen den selektiven Aufbau der Peptidkette an und die Abspaltung des Produktes von der festen Phase erlauben, ohne die Lipidgruppen in Mitleidenschaft zu ziehen.
- Die Lipopeptide sollten sowohl als Methylester (wie sie z.B. bei den Ras-Proteinen vorkommen) wie auch als Säuren (wie z.B. am C-Terminus von Rab-Proteinen gefunden) nach der Abspaltung zugänglich sein.
- Die Einführung weiterer Fluoreszenz-Gruppen oder der MIC-Gruppe sollte möglich sein.

4.2.1 Peptidsynthese mit dem Phenylhydrazidlinker

Erste Vorarbeiten zur Lipopeptidsynthese unter Verwendung des Phenylhydrazid-Linkers wurden von *F. Eisele*¹²⁷ durchgeführt. Unter Verwendung des Phenylhydrazidlinkers gelang ihm die Darstellung eines farnesylierten, Fmoc-geschützten Cysteinmethylesters in 48 % Ausbeute und eines farnesylierten Tripeptids in 31 % Ausbeute. Die Darstellung eines Undecapeptids, welches dem C-Terminus von K-Ras4B entsprach, verlief dagegen erfolglos.

Eine Ursache für die Ausbeuteverluste bzw. für das Scheitern der Darstellung des Undecapeptids war bei Beginn dieser Arbeit unbekannt. Vermutet wurde eine unerwünschte zusätzliche Acylierung der Hydrazid-Gruppe, die eine spätere oxidative Abspaltung des Produktes verhindert. In orientierenden Arbeiten wurde zunächst als nichtlipidiertes Modellpeptid das Tripeptid Fmoc-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Cys(SStBu) **64** mittels DIC/HOBt Kupplungsprotokollen und der Fmoc-Schutzgruppenstrategie an der festen Phase aufgebaut (Schema 13). Als polymerer Träger wurde der kommerziell erhältliche Phenylhydrazid-Linker **63** an sowohl reinem Polystyren als auch an NovaGelTM Harz verwendet.



Schema 13: Synthese des Modellpeptids **65** unter Verwendung des Hydrazid-Linkers. AS: Aminosäure, hier in der Reihenfolge Fmoc-Cys(SStBu)-OH und 2 × Fmoc-Lys(Aloc)-OH, die Aminosäureseitenketten sind verkürzt und nur in Bezug auf ihre funktionelle Gruppe dargestellt, PH: Phenylhydrazid, die Gesamtausbeute bezieht sich auf die Menge an erster immobilisierte Aminosäure am polymeren Träger.

Vor und nach der Abspaltung wurde jeweils die Beladung des Harzes mit der UV-Fmoc-Methode bestimmt. Die Ausbeute nur für den Abspaltungsschritt wurde durch Isolierung des gewünschten Produktes **65** nach Säulenchromatographie bestimmt (Tabelle 1). Sie betrug zwischen 41 % und 60 %. Das restliche Peptid ließ sich anhand der Fmoc-Gruppen und mit

Hilfe der UV-Fmoc-Methode auch nach der Abspaltung noch auf dem polymeren Träger nachweisen. Die Peptidausbeute und der am Harz verbliebene Peptidanteil summieren sich zu 83 % - 93 %. Nach Wiederholung der Abspaltung konnte kein weiteres Produkt mehr isoliert werden, was auf eine irreversible Verankerung des restlichen Peptids auf dem polymeren Träger schließen lässt.

Festphase	Abspaltung (mit 0.7 eq Cu(OAc) ₂)	Ausbeute der Abspaltung / [%]	Beladung vor Abspaltung	Beladung nach Abspaltung	harzgebundenes Fmoc / [%]**
Polystyren	Pyridin MeOH:THF 1:1	42	0.41 mmol·g ⁻¹	0.20 mmol·g ⁻¹	41
Polystyren	Pyridin, HAc,* MeOH:CH ₂ Cl ₂ 1:1	60	0.41 mmol·g ⁻¹	0.15 mmol·g ⁻¹	27
NovaGel™	Pyridin MeOH:THF 1:1	44	0.31 mmol·g ⁻¹	0.17 mmol·g ⁻¹	48
NovaGel™	Pyridin MeOH	41	0.31 mmol·g ⁻¹	0.18 mmol·g ⁻¹	52

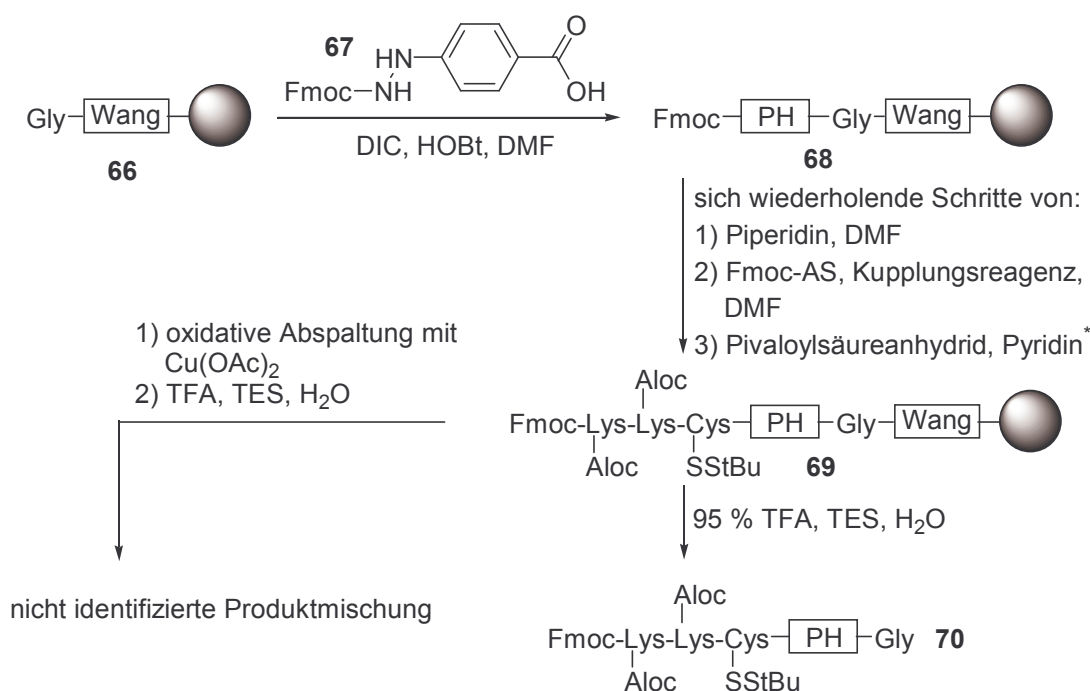
* Pyridin:Essigsäure 47 eq : 32 eq; ** Eine Verringerung der Harzmasse durch die Abspaltung des Produktes wurde eingerechnet.

Tabelle 1: Ausbeute für den Abspaltungsschritt des Tripeptids **65** von dem polymergebundenen Peptidintermediat **64**.

Die Bestimmung der Fmoc-Beladung des Harzes *nach* der Abspaltung und dessen Vergleich mit der Beladung *vor* der Abspaltung ließ sich damit als guter Indikator für die Effizienz dieser Reaktion verwenden. In einem sehr einfachen Modellsystem wurde Fmoc-Leucin auf Phenylhydrazid-Polystyrenharz immobilisiert und eine Reihe von verschiedenen Abspaltungsbedingungen wurde getestet. Die Abspaltungseffizienz war hierbei insgesamt mit der des Tripeptids vergleichbar. Verschiedene Lösungsmittelkombinationen, unterschiedliche Temperaturen und weitere Additive wie Iod, HOBt und HOAt zeigten bemerkenswert wenig Effekt. Lediglich die Verwendung von Essigsäure führte, wie auch bei der Abspaltung von **65**, zu einer geringen Verbesserung der Abspaltungseffizienz.

Ob eine Acylierung des Hydrazid-Linkers durch Reagenzien der Peptidsynthese ursächlich für die geringe Abspaltungseffizienz am polymeren Träger ist, sollte ein

Doppellinkerexperiment zeigen. Dazu wurde zuvor hergestellte Fmoc-Hydrazinbenzoesäure **67** mittels DIC/HOBt an Glycin abgekuppelt, welches selber über einen säurelabilen Wang-Linker an Polystyren immobilisiert war (**66**, Schema 14). Das Tripeptid **69** wurde unter Verwendung der Fmoc-Strategie und mittels DIC/HOBt zur Generierung der entsprechenden OBt-Aktivester als acylierende Spezies oder mittels HATU zur Generierung der OAt-Aktivester an dem Doppellinker **68** aufgebaut. Dieser erlaubt die Spaltung des Wang-Linkers durch Säure unter Freisetzung der peptidgebundenen Phenylhydrazid-Gruppe.



Schema 14: Verwendung des Doppellinker **68** zum Nachweis von Nebenreaktionen der Phenylhydrazid-Gruppe. *: Als „Capping“-Reagenz wurde Pivaloylsäureanhydrid in Pyridin verwendet, da *C. Rosenbaum*¹²⁸ und *F. Stieber*¹²⁹ zeigen konnten, dass reaktiveres Essigsäureanhydrid oder Essigsäurechlorid im Gegensatz zu Pivaloylsäureanhydrid zu einer Acylierung von Phenylhydrazidsystemen führen können. Bei nachfolgenden Synthesen wurde ein „Capping“-Schritt nicht mehr durchgeführt.

Das Produkt **70** wurde mit 95 % TFA vom Wang-Linker abgespalten. Mittels LCMS wurde neben dem gewünschten Hauptprodukt **70** noch 14 % eines Nebenproduktes mit einer um 14 Da höheren Masse gefunden, welches einer oxidierten Spezies des Hydrazid-Linkers entsprechen könnte (Abbildung 17). Dieses wurde bei Verwendungen beider Kupplungsreagenzien, bei DIC/HOBt und auch bei HATU, beobachtet. Acylierte Nebenprodukte der Phenylhydrazidgruppe oder weitere Produkte, die auf eine kovalente Modifikation des Linkers hindeuten, wurden nicht erhalten.

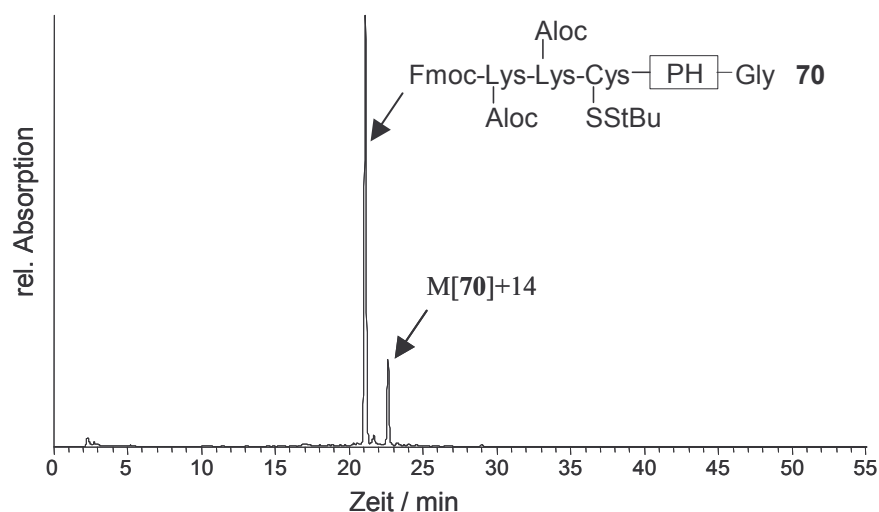


Abbildung 17: LCMS-Chromatogramm der Abspaltung von **69** mittels 95 % TFA. Detektionswellenlänge 254 nm.

Wurde zuerst der Hydrazid-Linker des polymergebundenen Peptids **69** oxidativ mittels Kupferacetat gespalten und das verbleibende Produkt mit TFA abgespalten, so erhielt man eine komplexe Mischung von Nebenprodukten, die eine genauere Identifizierung nicht ermöglichte.

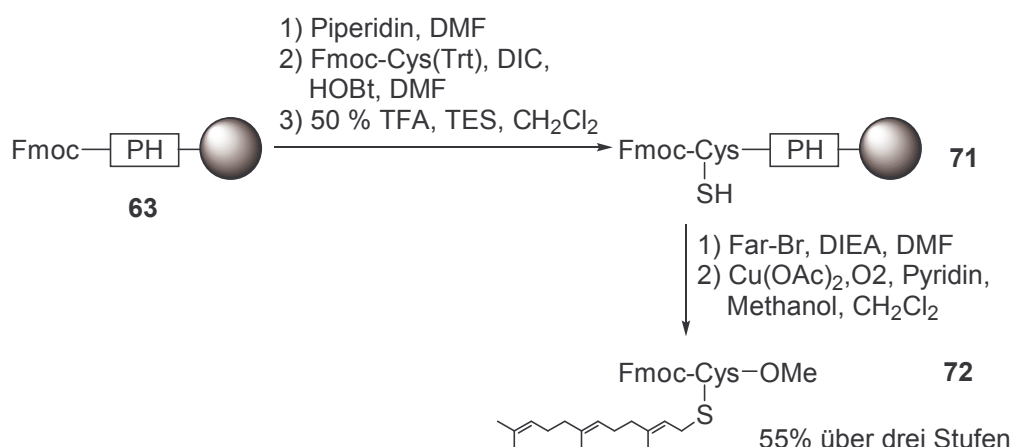
Eine Schlussfolgerung zur Ursache der unvollständigen Abspaltung vom Hydrazid-Linker bleibt auch nach dem Doppellinkerexperiment schwierig. Eine irreversible Immobilisierung des Produktes scheint erst in der Abspaltungsreaktion selber aufzutreten. Der Abspaltungsprozess wird außerdem erst durch die Anwesenheit von Nukleophilen initiiert, worauf die Möglichkeit der Abspaltung in zwei Schritten und die Synthese von zyklischen Peptiden hinweist. Bisherige Untersuchungen an Phenylhydrazidsystemen deuten auf einen Radikalprozess hin, allerdings konnten dabei bislang keine Acylradikale nachgewiesen werden.¹³⁰ Die irreversible Immobilisierung eines Teils des Produktes auf dem polymeren Träger könnte die unerwünschte Rekombination von Radikalintermediaten einschließen.

Obwohl der Verlust von 30 % - 50 % Produkt bei der Abspaltung ein klarer Nachteil bei der Verwendung des Phenylhydrazid-Linkers ist, bietet er für die Festphasensynthese auch eine Reihe von außergewöhnlichen Vorteilen. Die Stabilität gegenüber Säuren und Basen bei der Synthese erlaubt sowohl Fmoc- wie Boc-Schutzgruppenstrategien. Die äußerst milde oxidative Abspaltung ist sehr robust gegenüber unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und kann in einem pH-Bereich von schwach sauer bis basisch (Essigsäurepuffer bis reines Pyridin) durchgeführt werden. Dieses ermöglicht insbesondere die Anpassung an die unterschiedlichen Labilitäten des Produktes. Durch Variation des Nukleophils sollten sowohl

freie Säuregruppen wie auch (Methyl)ester zugänglich sein. Da sich diese Eigenschaften hervorragend mit den Anforderungen deckten, die die Lipopeptidsynthese an der festen Phase stellen würde, wurde er als Linker für die weiteren Synthesen gewählt.

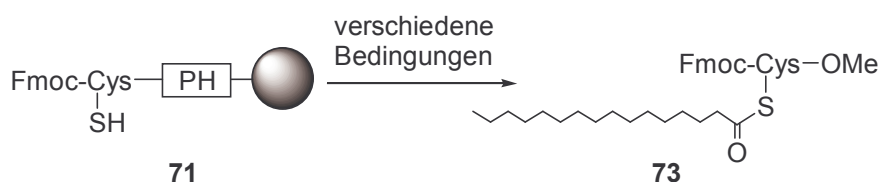
4.2.2 Synthese von farnesylierten und palmitoylierten Cysteinmethylestern

Um die Eignung des Phenylhydrazid-Linkers für die Lipopeptidsynthese zu prüfen, wurden Farnesylierung als auch Palmitoylierung an der festen Phase an dem einfachen Beispiel von immobilisiertem Fmoc-Cys(Trt) durchgeführt. Von kommerziell erhältlichem Fmoc-geschützten Phenylhydrazid-NovaGelTM-Harz **63** wurde mit Piperidin die Fmoc-Gruppe entfernt und Fmoc-Cys(Trt)-OH mittels DIC/HOBt angekuppelt (Schema 15). Die ermittelte Harzbeladung, bestimmt durch die UV-Fmoc-Methode, betrug anschließend $0.35 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$. Die Tritylgruppe wurde mit 50 % TFA in CH_2Cl_2 und in Gegenwart von TES zu **71** entfernt. Die freie Thiolgruppe wurde unter Argon mit 5 eq. Farnesylbromid und DIEA in DMF farnesyliert. Die Abspaltung des Produktes **72** wurde mittels einer Lösung von $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Sauerstoff, Methanol und Pyridin in CH_2Cl_2 durchgeführt. Nach Flashchromatographie wurde das gewünschte farnesylierte Produkt **72** in 55 % Ausbeute erhalten. Da die Qualität der kommerziell erhältlichen Harze variiert, beziehen sich im folgenden alle Syntheseäquivalente und Ausbeuten standardmäßig immer auf die Menge an festphasengebundener erster Aminosäure. Nebenprodukte wurden nicht gefunden.



Schema 15: Synthese von farnesyliertem Cysteinmethylester.

In weiteren Experimenten wurde die Palmitoylierung von festphasengebundenem Cystein **71** und dessen anschließende Abspaltung untersucht (Schema 16).



Schema 16: Synthese von palmitoyliertem Cysteinmethylester. Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 2.

Bei Verwendung sehr starker Acylierungsmittel wie das häufig verwendete Pamitoylchlorid mit DMAP musste eine Acylierung des Hydrazid-Linkers befürchtet werden. Da beim Einsatz von OBt-Aktivestern diese Gefahr nachweislich nicht bestand (vgl. Kapitel 4.2.1), wurde die gewünschte chemoselektive Palmitoylierung der Thiolgruppe in Gegenwart des Phenylhydrazid-Linkers mit Palmitoyl-OBt Aktivestern durchgeführt. Diese wurden durch Voraktivierung von Palmitoylchlorid (Pal-Cl) mit HOBt und DIEA in CH₂Cl₂ gebildet und dann unter Schutzgas zur harzgebundenen freien Cystein-Thiolgruppe gegeben. Die anschließende Abspaltung von **73** vom Phenylhydrazid-Linker wird aufgrund der Labilität des Palmitoylthioesters gegen basische Bedingungen bzw. gegen Nucleophile unter schwach sauren Bedingungen in einem Pyridin-Essigsäurepuffer durchgeführt. Bei Verwendung von 10 eq Pal-Cl und 10 eq HOBt für 15 h wurden mit 56 % Ausbeute die besten Ergebnisse erzielt (Tabelle 2). Eine Hydrolyse des Thioesters wurde nicht beobachtet.

Palmitoylierung	Abspaltung	Isolierte Ausbeute an 73 / [%]
4 eq Pal-Cl, 4 eq HOBt, 2 h	0.5 eq Cu(OAc) ₂ , 20 eq Pyridin, 40 eq HAc	17
10 eq Pal-Cl, 10 eq HOBt, 15 h	5 eq FeNO ₃	34
10 eq Pal-Cl, 10 eq HOBt, 15 h	0.5 eq Cu(OAc) ₂ , 20 eq Pyridin, 40 eq HAc	56

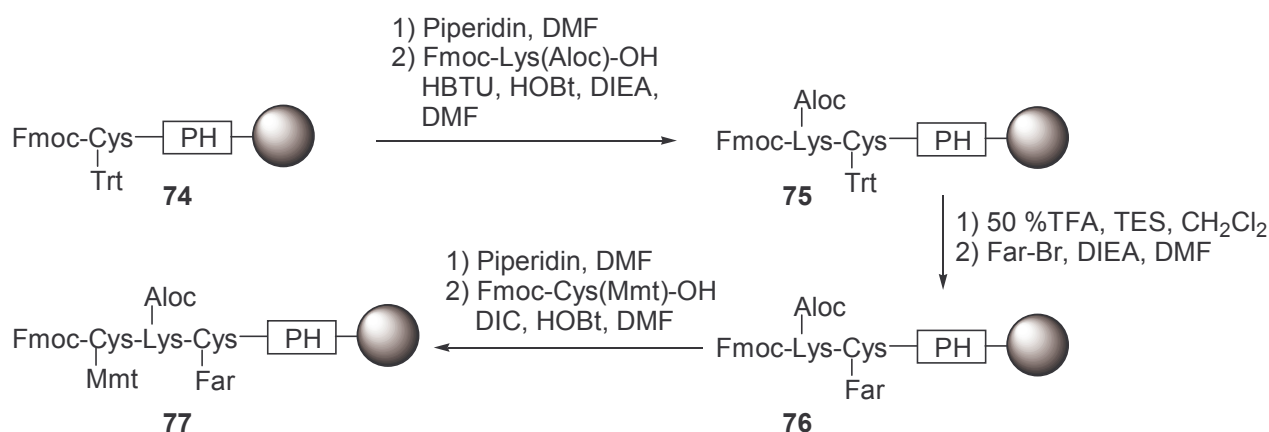
Tabelle 2: Palmitoylierungs- und Abspaltungsbedingungen für den palmitoylierten Cysteinmethylester **73**.

Die Verwendung von nur 4 eq von Pal-Cl und HOBt für 2 h führten dagegen zu einer Isolierung des Produktes **73** in nur 17 % Ausbeute. Die Abspaltung mittels FeNO₃ als

Oxidationsmittel anstatt von $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ resultierte ebenfalls in einer verringerten Ausbeute von 34 %.

4.2.3 Synthese einfach und doppelt lipidierter Peptide

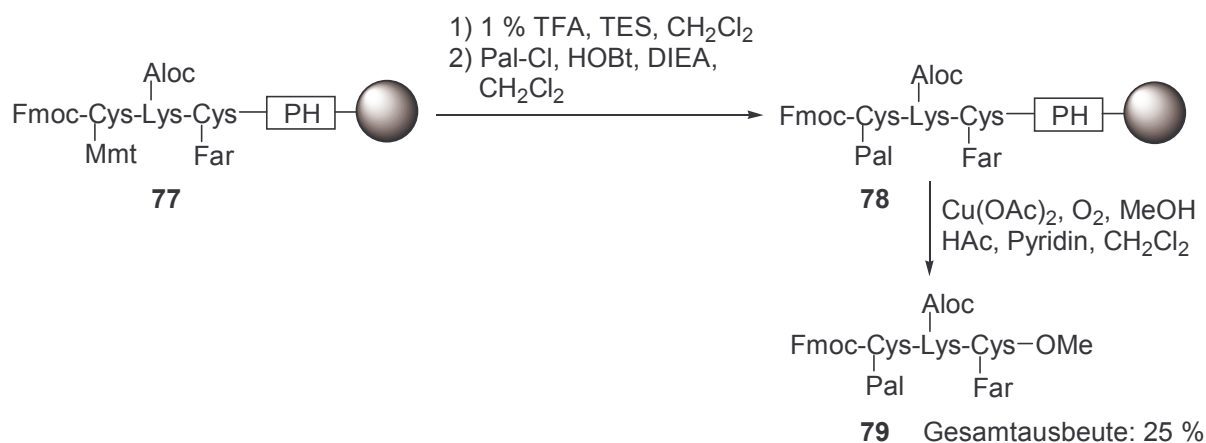
Die unter Kapitel 4.2.2 beschriebenen Methoden für die Synthese von farnesylierten oder palmitoylierten Fmoc-Cysteinmethylestern wurden bei der Synthese von Lipopeptiden verwandt. Startpunkt der Synthese war jeweils N-terminal Fmoc-geschütztes und an der Seitenkette Trityl- oder *tert*-Buthio-geschütztes Cystein, welches an kommerziellem NovaGelTM-Polymer mit einer Beladung von $0.35 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ bis $0.43 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ immobilisiert war (**74**). Die Bevorzugung von NovaGel-Polymeren gegenüber Polystyren beruht auf ihren besseren Quelleigenschaften in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Zur Synthese des farnesylierten und palmitoylierten Peptids **77** wurde festphasengebundenen Cystein **74** unter Verwendung der Fmoc-Strategie und mit HBTU/HOBt zum festphasengebundenen Dipeptid **75** verlängert (Schema 17).



Schema 17: Festphasensynthese des farnesylierten und palmitoylierten Tripeptids **79** – Teil 1: Synthese eines farnesylierten Tripeptids auf dem polymeren Träger. Mmt: Methoxytrityl.

Die Trityl-Gruppe wurde mit 50 % TFA und TES abgespalten und das freigesetzte Thiol zu **76** farnesyliert. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe von **76** mit Piperidin wurde Cystein mittels DIC/HOBt angekuppelt. Diese Reagenzien wurden bei allen Synthesen zur N-terminalen Ankuppelung von Cysteinen benutzt, da die Verwendung von HBTU/HOBt Protokollen zu einer Epimerisierung führt (vgl. Kapitel 2.5.1). Die äußerst säurelabile Methoxytrityl-Gruppe wurde durch Behandlung von **77** mit 1 % TFA und TES abgespalten

(Schema 18). Unter diesen milden Bedingungen wird der Farnesylrest nicht beeinträchtigt (vgl. Kapitel 2.6).



Schema 18: Festphasensynthese des farnesylierten und palmitoylierten Tripeptids **79** – Teil 2: Palmitoylierung und Abspaltung vom polymeren Träger.

Die Palmitoylierung des freien Thiols zu **78** wurde mit den für die Festphasensynthese optimierten Bedingungen durchgeführt. Nach oxidativer Abspaltung des Produktes **79** in einem Essigsäure-Pyridin-Puffer mittels Cu(OAc)₂ und Aufreinigung durch Flashchromatographie wurde das gewünschte Produkt **79** in einer Gesamtausbeute von 25 % erhalten. In Abbildung 18 ist ein LCMS-Chromatogramm von **79** gezeigt.

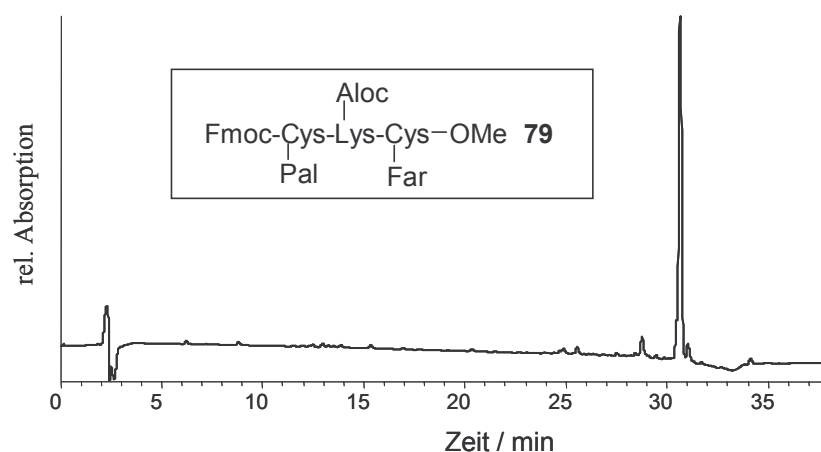


Abbildung 18: LCMS-Chromatogramm von **79**. Detektionswellenlänge: 210 nm.

Das Peptid **79** ist damit das erste durch Festphasensynthese hergestellte Peptid, welches sowohl eine säurelabile Prenyl- als auch eine basenlabile Palmitoyl-Gruppe trägt. Da keine weiteren Nebenprodukte erhalten wurden, war es jedoch erstaunlich, dass die Ausbeute nur

25 % beträgt, insbesondere da die Ausbeuten für die Darstellung beider lipidierter Cysteinmethylester **72** und **73** um die 55 % beträgt und der Verlust dort hauptsächlich durch die unvollständige Abspaltung vom polymeren Träger bedingt ist. Die Beladung am polymeren Träger wurde für die einzelnen Schritte der Synthese von **79** bestimmt und mit der theoretisch zu erwartenden Beladung verglichen (Tabelle 3). Die Berechnung der zu erwartenden Beladung erfolgte mittels Formel 1 ausgehend von der experimentell bestimmten Beladung der ersten Aminosäure

Nach Ankupplung von Aminosäure	Beladung [mmol·g ⁻¹], experimentell	Beladung [mmol·g ⁻¹], berechnet
2 (Lys)	0.30	0.35
3 (Cys)	0.22	0.31

Tabelle 3: Vergleich der berechneten und der gemessenen Beladung des polymeren Trägers bei der Synthese von **79**. Die Beladung wurde mit der Fmoc-Methode bestimmt, die Anfangsbeladung an erster Aminosäure betrug 0.38 mmol·g⁻¹.

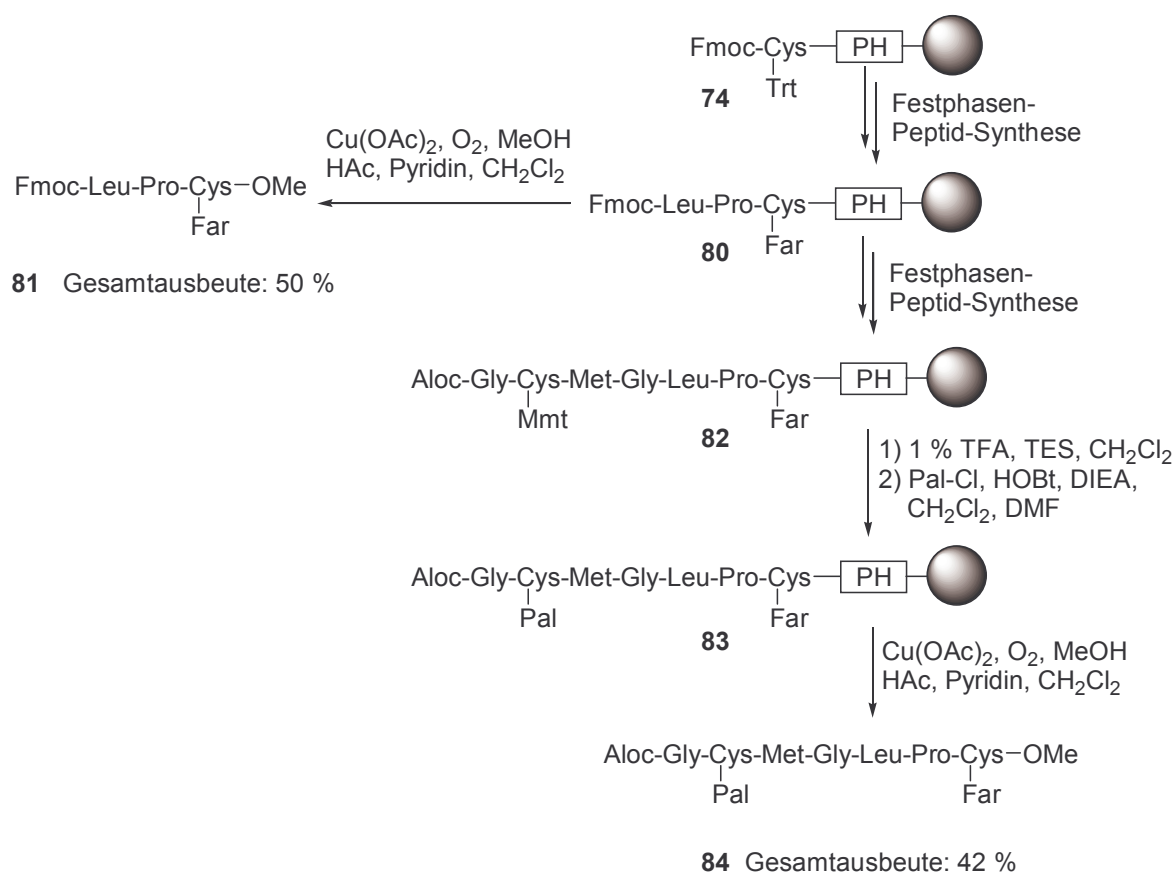
$$l_2 = \frac{l_1}{l_1 \cdot M_p + 1}$$

Formel 1: Berechnung der zu erwartenden Beladung l_2 nach Ankupplung eines Moleküls mit der Molmasse M_p an ein Harz mit der Anfangsbeladung l_1 .

Es zeigt sich eine deutlich zu geringe Beladung während der Synthese, die auf eine unerwünschte Abspaltung des Peptids hindeutet. Dasselbe Phänomen wurde schon bei der Synthese des Tripeptids **65** aus Kapitel 4.2.1 beobachtet, das zwar mit 41 % - 60 % abgespalten wurde, dessen Gesamtausbeute jedoch mit 25 % -50 % geringer ausfällt. Die Frage stellte sich, ob die unerwünschte Spaltung des Linkers bei einem spezifischen Syntheseschritt auftritt und wenn ja, bei welchem. Zuvor wurde bereits von *F. Stieber*¹²⁹ beobachtet, dass ein Phenylhydrazid-basiertes Linkersystem bei Anwesenheit von Aminen nicht stabil gegenüber Luftsauerstoff ist, so dass der Fmoc-Entschützungsprozess mit Piperidin als unerwünschter Abspaltungsschritt des Peptids vom polymeren Träger vermutet wurde. Weitere Experimente zeigten ebenfalls eine Verringerung der Beladung bei Verwendung von DBU und Morpholin anstatt Piperidin zur Fmoc-Abspaltung, was auf einen basenkatalysierten Prozess hindeutet. Im Lichte dieser Überlegungen kann auch der Befund des Doppellinkerexperiments aus Kapitel 4.2.1 verstanden werden: die Spezies mit der um 14 Da höhere Masse ist durch einen teiloxidierten Hydrazidlinker zu erklären. Zur Vermeidung

dieses Problems wurde bei weiteren Synthesen nur frisch entgastes, über Calciumhydrid refluxiertes Piperidin verwendet, und der Fmoc-Entschützungsschritt sowie andere Schritte mit basischen Reaktionsbedingungen wurden unter einer Argonatmosphäre durchgeführt.

In Schema 19 ist die Synthese eines farnesylierten und palmitoylierten Heptapeptids **84**, welches dem C-Terminus von N-Ras entspricht, gezeigt. Entsprechend dem oben Ausgeführten wurden alle basischen Schritte und insbesondere die Fmoc-Entschützungen unter Schutzgas durchgeführt. Die Farnesylierung wurde auf der Stufe des Dipeptids, wie bei der Synthese von **79** beschrieben, durchgeführt. Nach Ankupplung der dritten Aminosäure, Leucin, zu **80** wurde das Produkt **81** oxidativ als Methylester von polymeren Träger mit einer Gesamtausbeute von 50 % abgespalten.



Schema 19: Synthese des palmitoylierten und farnesylierten C-Terminus **84** des N-Ras-Peptids.

Die Verlängerung des polymergebundenen farnesylierten Tripeptids **80** führte zu dem festphasengebundenen Heptapeptid **82**. Wie bei **79** beschrieben, wurde die Mmt-Gruppe abgespalten. Eine Palmitoylierung der freien Thiolgruppe unter den Bedingungen, die für **79**

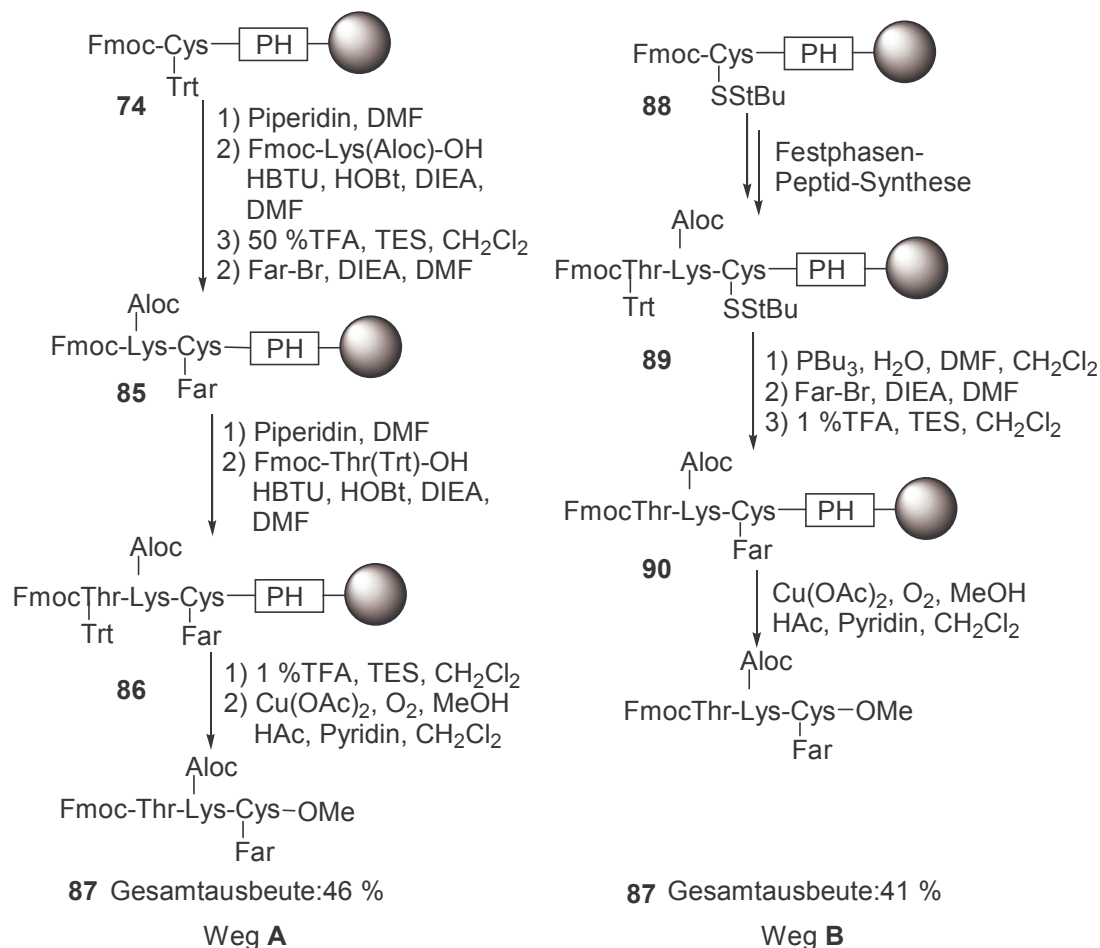
erfolgreich waren, scheiterte jedoch in diesem Fall. Da als Grund eine Aggregation des Peptids auf dem polymeren Träger vermutet wurde (vgl. dazu Kapitel 2.5.4), wurde als Lösungsmittel für die Palmitoylierung statt reinem CH_2Cl_2 ein Gemisch von CH_2Cl_2 und DMF im Verhältnis 3:1 verwendet. Unter diesen Bedingungen verlief die Palmitoylierung zu **83** erfolgreich und das gewünschte Produkt **84** wurde nach oxidativer Abspaltung in einem Essigsäure-Pyridin-Puffers in 42 % Gesamtausbeute isoliert. Eine Oxidation des oxidationsempfindlichen Methionins wurde nicht beobachtet. Für eine weitere Modifikation des Peptids **84** kann die N-terminale Aloc-Gruppe in Lösung unter Bedingungen entfernt werden, die keine Gefahr für die Farnesyl- oder die Palmitoyl-Gruppe darstellen.¹³¹ Der Vergleich zwischen der experimentellen und der berechneten Beladungen am polymeren Träger nach der Ankupplung der zweiten, dritten und sechsten Aminosäure zeigt eine annähernde Übereinstimmung. Das Problem der vorzeitigen Spaltung des Phenylhydrazid-Linkers wurde somit durch die Verwendung von Schutzgas-Bedingungen in den basischen Reaktionsschritten größtenteils vermieden.

Nach Ankupplung von Aminosäure	Beladung [$\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$], experimentell	Beladung [$\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$], berechnet
2 (Pro)	0.34	0.34
3 (Leu)	0.32	0.33
6 (Cys)	0.25	0.28

Tabelle 4: Vergleich der berechneten und der gemessenen Beladungen des polymeren Trägers bei der Synthese von **84**. Die Beladung wurde mit der Fmoc-Methode bestimmt, die Beladung an erster Aminosäure betrug $0.35 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$.

Während die beschriebene Trityl- und Fmoc-basierte Schutzgruppentechnik für die Synthese von doppelt-lipidierten Peptiden ohne weitere Seitenkettenfunktionalität bzw. mit Aloc-Gruppen geschützte Seitenketten ausreicht, ist für die Synthese von darüber hinaus funktionalisierten Lipopeptiden der Einsatz einer weiteren, zu den anderen funktionellen Gruppen orthogonalen Schutzgruppe erforderlich. Die Wahl fiel hierbei auf die reaktiv-spaltbare *tert*-Buthio-Gruppe für die Thiolseitenkette von Cystein. Um Verwechslung mit der *tert*-Butyl-Schutzgruppe zu vermeiden wird sie, wie in der Literatur üblich, im Folgenden mit SStBu abgekürzt. Lipopeptid **87** wurde über zwei verschiedene Wege synthetisiert (Schema 20). Weg **A** nutzt die bewährte säurelabile Trityl-Schutzgruppe für die Thiolfunktion der Cysteinseitenkette (**74**), Weg **B** dagegen die reaktiv spaltbare *tert*-Buthio-Gruppe (**88**). Bei Weg **A** wurde auf der Stufe des Dipeptids zu **85** farnesyliert. Trityl-geschütztes Fmoc-

Threonin wurde angekuppelt (**86**) und die Trityl-Gruppe vor der Abspaltung vom polymeren Träger mit 1 % TFA und TES entfernt. Die Abspaltung von **87** mit freier Hydroxylgruppe verlief ohne größere Verluste und mit einer Gesamtausbeute von 46 %.

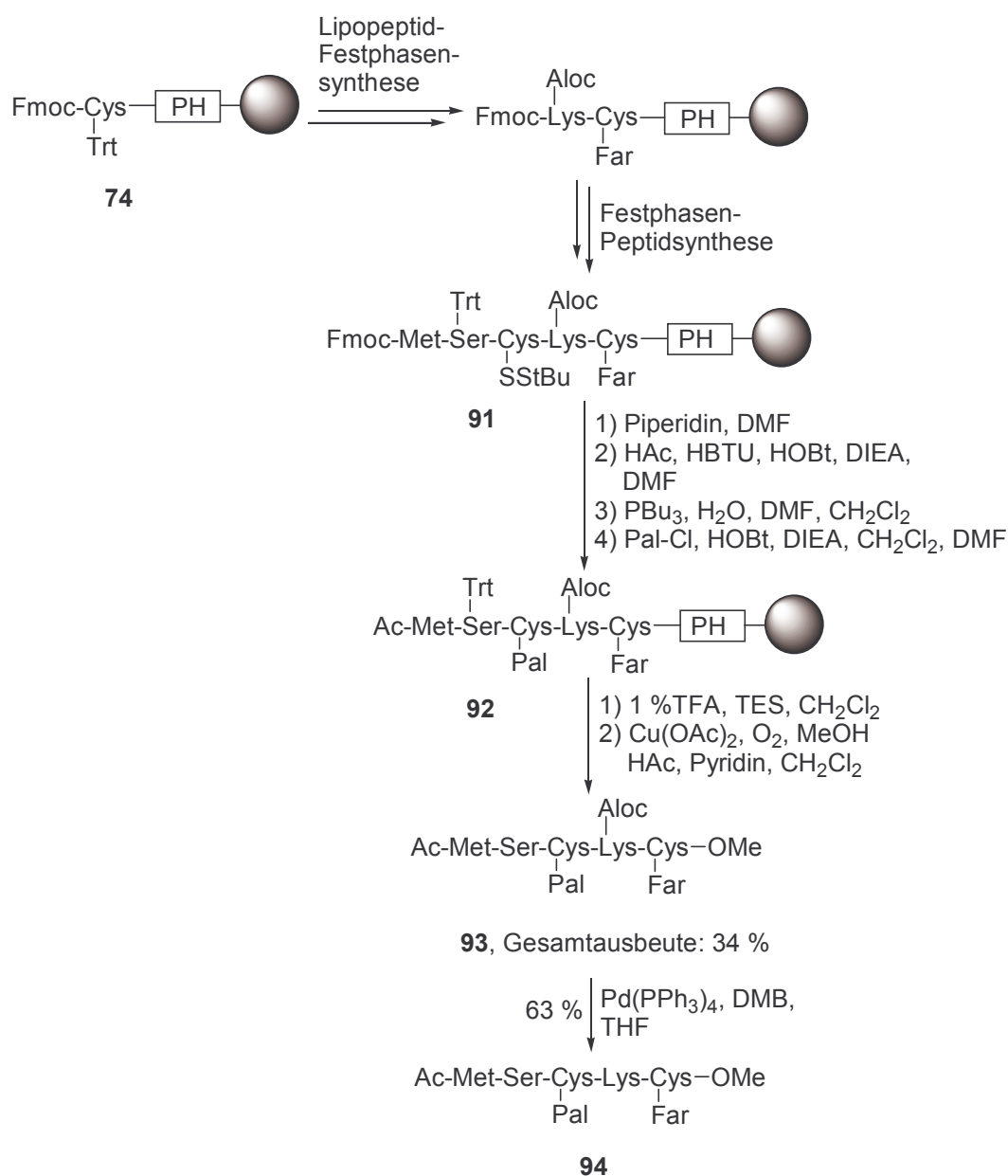


Schema 20: Synthese von Lipopeptid **87** mittels Trt- oder SStBu-Schutzgruppen für die Cysteinseitenkette.

Die Abspaltung der *tert*-Buthio-Gruppe vom Tripeptid **89** bei Weg **B** wurde reduktiv mit Tributylphosphan in Anwesenheit von Wasser in einem Lösungsmittelgemisch von DMF und CH₂Cl₂ durchgeführt. Für eine vollständige Reaktion waren Reaktionszeiten von 12 h erforderlich, kürzere Reaktionszeiten um 5 h resultierten in einer unvollständigen Entschützung. NovaGelTM-Harz erwies sich bei dieser Reaktion als vorteilhafter als Polystyren, welches unter den Reaktionsbedingungen weniger gute Quelleigenschaften aufweist. Nach der Farnesylierung und Abspaltung der Trityl-Gruppe von Threonin wurde **90** erhalten. Das Produkt **87** wurde daraus nach dem Abspalten in 41 % Gesamtausbeute isoliert. Wurde vor der Abspaltung die Fmoc-Gruppe mit Piperidin entfernt, so konnte nur eine geringe Menge des Peptids Thr-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe in einer Gesamtausbeute von 5 %

(nach präparativer HPLC) erhalten werden. Die niedrige Ausbeute ist vermutlich auf eine Komplexierung des Kupfers durch die freie Aminogruppe zurückzuführen, die dann eine weitere oxidative Abspaltung erschwert. Während freie Aminogruppen nicht vorteilhaft für die Abspaltung sind, bereitet dagegen die Anwesenheit von ungeschützten Hydroxylgruppen keine Probleme.

Die SStBu-Schutzgruppe wurde nun zur Synthese des doppelt-lipidierten Pentapeptids **94**, welches dem C-Terminus von H-Ras entspricht, verwandt (Schema 21). Mittels der entwickelten Methoden der Lipopeptid-Festphasensynthese wurde zunächst das vollständig geschützte Pentapeptid **91** auf dem polymeren Träger aufgebaut.



Schema 21: Synthese des palmitoylierten und farnesylierten C-Terminus **94** von H-Ras. DMB: *N,N'*-Dimethylbarbitursäure.

Die N-terminale Acylierung wurde durch Ankupplung von Essigsäure mittels HBTU/HOBt eingeführt. Die Verwendung der stärkeren acylierenden Reagenzien Essigsäureanhydrid oder Essigsäurechlorid kam aufgrund einer möglichen Acylierung der Phenylhydrazid-Gruppe nicht in Betracht. Die Trt-Schutzgruppe für die Hydroxylgruppe in der Serin-Seitenkette sollte in dieser Synthese bis nach dem Palmitoylierungsschritt beibehalten werden, was die Verwendung der ebenfalls säurelabilen Mmt-Gruppe als Cystein-Schutzgruppe ausschloss. OBt-Aktivester acylieren unter Standard-Reaktionsbedingungen zwar keine Hydroxylgruppen, ob dieses jedoch bei den drastischeren Bedingungen zur Einführung der Palmitoylgruppe, größere Überschüsse und lange Reaktionszeiten, garantiert bleibt, war nicht bekannt. Die SStBu-Schutzgruppe wurde reduktiv entfernt und das Peptid palmitoyliert. Trotz der sterische Abschirmung durch den benachbarten sperrigen Tritylrestes verliefen sowohl Reduktion wie auch Palmitoylierung zu **92** problemlos, es wurden keine Nebenprodukte beobachtet. Nach Entfernung der Tritylgruppe und Abspaltung von der festen Phase konnte Peptid **93** in reiner Form und in 34 % Gesamtausbeute erhalten werden. In Abbildung 19 ist das entsprechende LCMS-Chromatogramm gezeigt. Die anschließende Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe mittels $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und DMB in 63 % Ausbeute führte zum C-Terminus von H-Ras **94**.

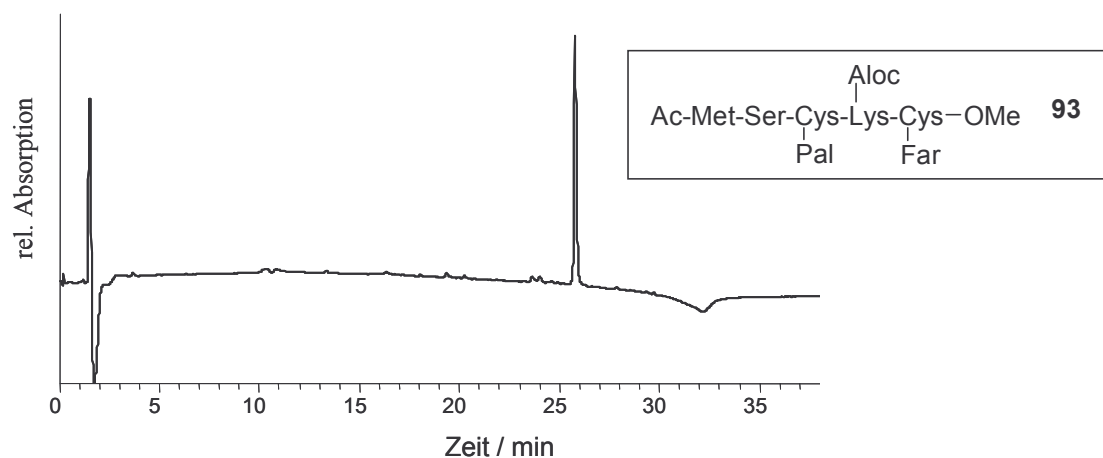


Abbildung 19: LCMS-Chromatogramm von **93**. Detektionswellenlänge: 210 nm.

Die Lösungssynthese des geschützten Peptids **93** wurde von *P. Deck* beschrieben.⁵¹ Unter Verwendung einer konvergenten Synthesestrategie wurde **93** nach sechs Stufen in der längsten linearen Synthesesequenz und mit 27 % Gesamtausbeute isoliert. In diesem beispielhaften Vergleich zeigte sich, dass die in dieser Arbeit entwickelte Lipopeptid-

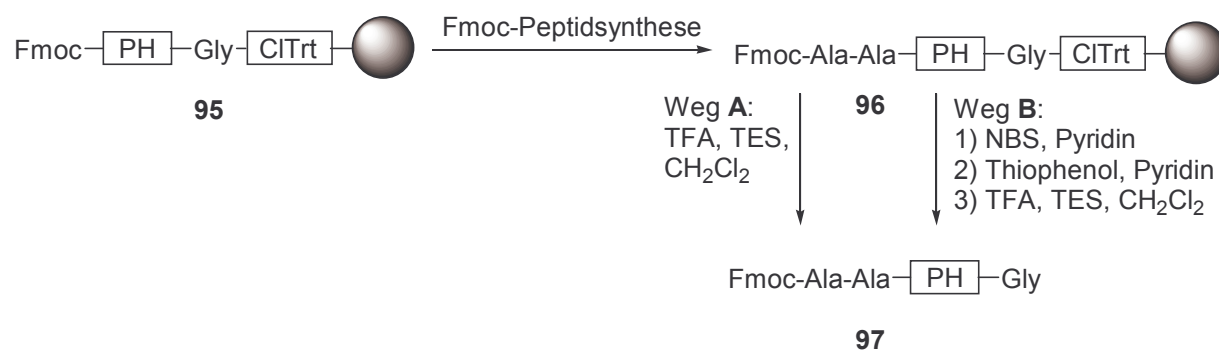
Festphasensynthese bei einer vergleichbaren Ausbeute wesentlich schneller zu dem gewünschten Zielpeptid führt.

Allgemein gesehen bietet die entwickelte Methode einen deutlichen Geschwindigkeitsvorteil in der Synthese lipidierter Peptide: braucht man in der Lösungssynthese für Lipopeptide oft mehrere Wochen, so ist mit den hier beschriebenen Methoden eine Synthese im Multimilligramm-Maßstab in wenigen Tagen realisierbar.

4.2.4 Exkurs: Sind C-terminale Thioester mit dem Phenylhydrazid-Linker direkt darstellbar?

Thioester sind wertvolle Aktivester für z.B. die *native chemical ligation*. Es stellte sich daher die Frage, ob durch Einsatz von Schwefelnukleophilen Peptide auch als Thioester vom Hydrazid-Linker abspaltbar sind. Dazu wurden N-terminal mit Fmoc- oder Boc-geschützte Di- und Tripeptide am Phenylhydrazid-Harz aufgebaut und einem zweistufigen Abspaltprozess unterworfen. Zuerst wurde das Polymer mit NBS und Pyridin behandelt, um die Phenylhydrazid-Gruppe zum Phenyl diazen zu oxidieren. Nach einem Waschschrift zur Entfernung der Reagenzien wurde mit einer Lösung von Benzylmercaptan, Thiophenol oder Nitrothiophenol in CH_2Cl_2 und mit und ohne Pyridin als Base versetzt. Das gewünschte Produkt konnte jedoch in keinem Fall erhalten werden. Im Falle der Fmoc-Peptide wurde nach der Abspaltung kaum eine Verringerung der Beladung, bestimmt durch die UV-Fmoc-Methode, beobachtet. Bei Benzylmercaptan wurde einzig das *S,S*-verbrückte Benzylmercaptan-Dimer, welches bei der Oxidation von Benzylmercaptan entsteht, nach Flashchromatographie isoliert und charakterisiert. Da unklar war, wieso Thiole als sehr gute Nukelophile keine Abspaltung initiieren, wurde ein Doppellinkerexperiment analog zu dem unter Kapitel 4.2.1 beschriebenen durchgeführt (Schema 22). Dazu wurde an dem Doppellinkersystem **95** das Fmoc-geschützte Dipeptid **96** aufgebaut. Zum einen wurden der säurelabile 2-Chlortrityl-Linker von **96** sofort mit TFA und TES gespalten (Schema 22, Weg **A**), zum anderen wurde zuerst eine Oxidation mit NBS durchgeführt, nach dem Waschen des Harzes wurde mit einer Lösung von Thiophenol und Pyridin in CH_2Cl_2 versetzt. Das Produkt der anschließenden Abspaltung vom 2-Chlortrityl-Linker mit TFA und TES (Schema 22, Weg **B**) zeigte hierbei im Vergleich mit dem der ersten Abspaltung von Weg **A** identische LCMS-Chromatogramme. Da in Kontrolleexperimenten mit Methanol anstelle von Thiolen die gewünschte Oxidation mit NBS und nachfolgende Abspaltung vom Phenylhydrazid-Linker

erfolgreich verliefen, lässt sich vermuten, dass Thiole eine Rück-Reduktion des Phenylldiazens zum Phenylhydrazid bewirken.



Schema 22: Doppellinkerexperiment zur Abspaltung mit Schwefelnukleophilen. Nachfolgende Analyse der Rohprodukte mittels LCMS zeigte identische Chromatogramme für beide Routen.

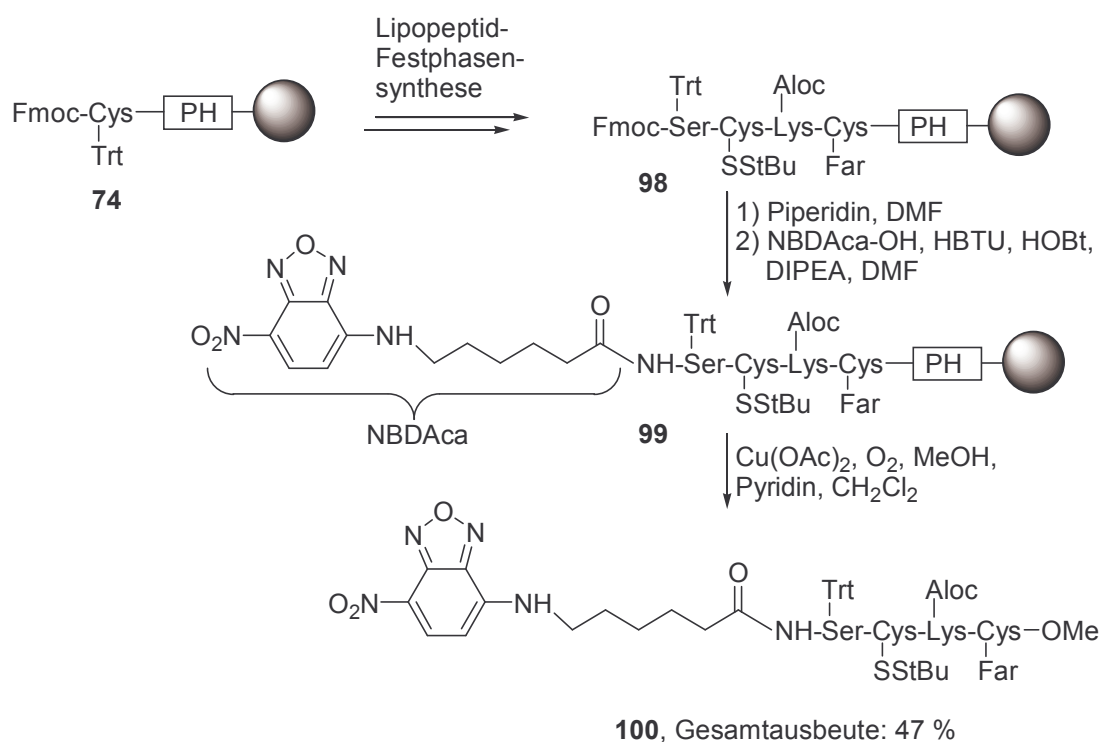
Eine einfache Abspaltung mit Thiolen scheint aus diesem Grund prinzipiell nicht möglich. Vergleichbare Experimente zur Abspaltung der Produkte als OBT-, Azid-, oder Cyanid-Aktivester verliefen ebenfalls ohne Erfolg.

4.2.5 Synthese von lipidierten und fluoreszenz- oder MIC-markierten Peptiden

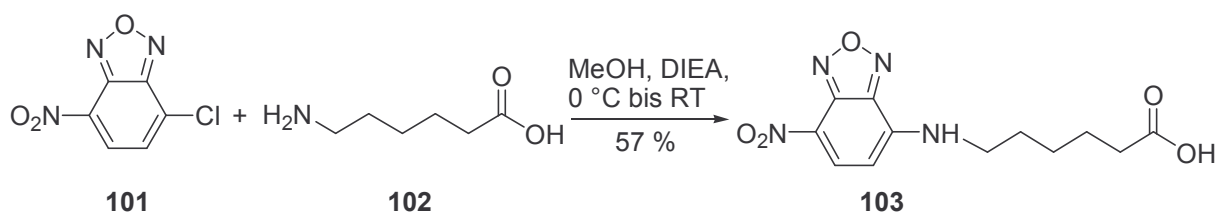
Ein wichtiger Aspekt in der Synthese von lipidierten Peptiden besteht in der zusätzlichen Markierung mit Fluoreszenzmarkern oder aber der MIC-Gruppe, welche eine Kupplung an Proteine ermöglicht. Dementsprechend wurde untersucht, ob die entwickelte Lipopeptid-Festphasensynthese die zusätzliche Einführung solcher Gruppen erlaubt.

Unter Anwendung der erarbeiteten Methodik wurde das farnesylierte Tetrapeptid **100**, welches als Fluoreszenzmarker die 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD)-Gruppe trägt, synthetisiert (Schema 23). Nach dem Aufbau des vollständig geschützten und farnesylierten Tetrapeptids **98** an der festen Phase, wurde der N-Terminus mit Piperidin entschützt und NBD in Form der NBDACA-Gruppe **103** angekuppelt. Die Darstellung von NBDACA **103** erfolgte zuvor durch Umsetzung von NBD-Cl **101** mit Aminocaprinsäure **102** in Gegenwart von DIEA als Base (Schema 24). Das erhaltene fluoreszenzmarkierte Peptid **99** wurde oxidativ unter basischen Bedingungen vom polymeren Träger abgespalten, und das Produkt **100** wurde

in 47 % Gesamtausbeute erhalten. Weder die sehr säureempfindliche Tritylgruppe noch die reduktionsempfindlichen NBD- oder SStBu-Gruppen wurden beeinträchtigt.



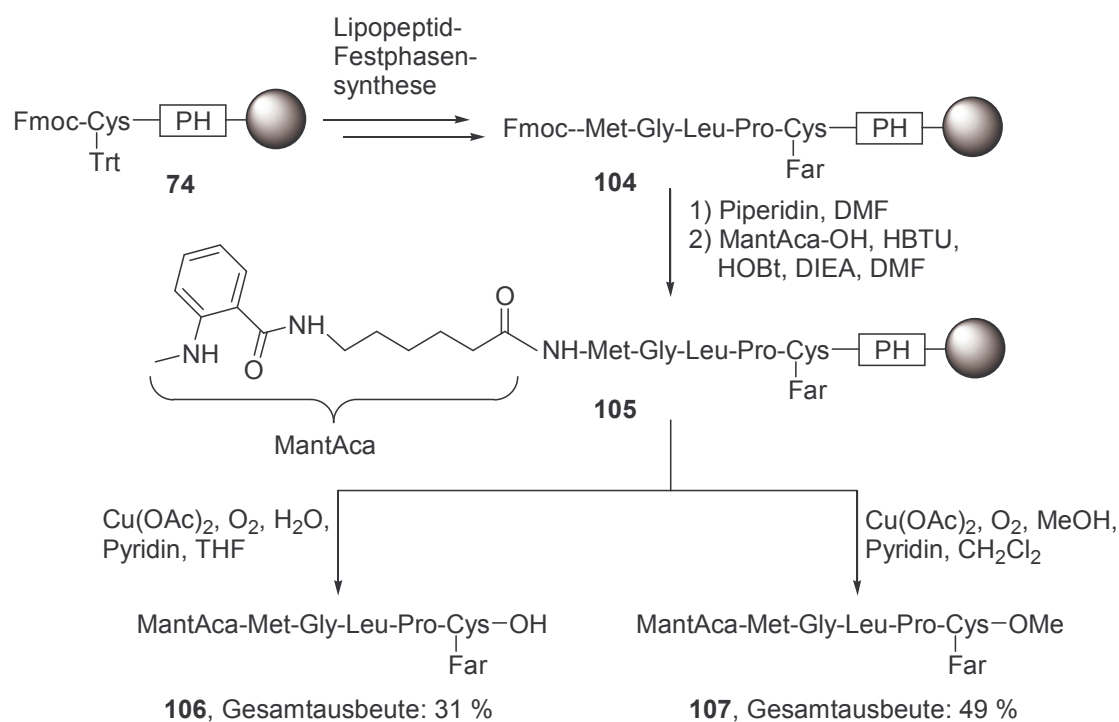
Schema 23: Synthese des farnesylierten und NBDaca-markierten Peptids **100**.



Schema 24: Synthese des Fluoreszenzmarkers NBDaca-OH **103**.

Eine ähnliche Strategie ist, wie in Schema 25 gezeigt, zum Aufbau der Peptide **106** und **107**, welche als Fluoreszenzmarker die *N*-Methylantraniloyl (Mant)-Gruppe tragen, verwendet worden. MantAca-OH wurde nach einer leicht modifizierten Vorschrift zu der von *F. Eisele*¹²⁷ beschriebenen Methode über das Intermediat *N*-Methyl-isatosäure-anhydrid dargestellt.

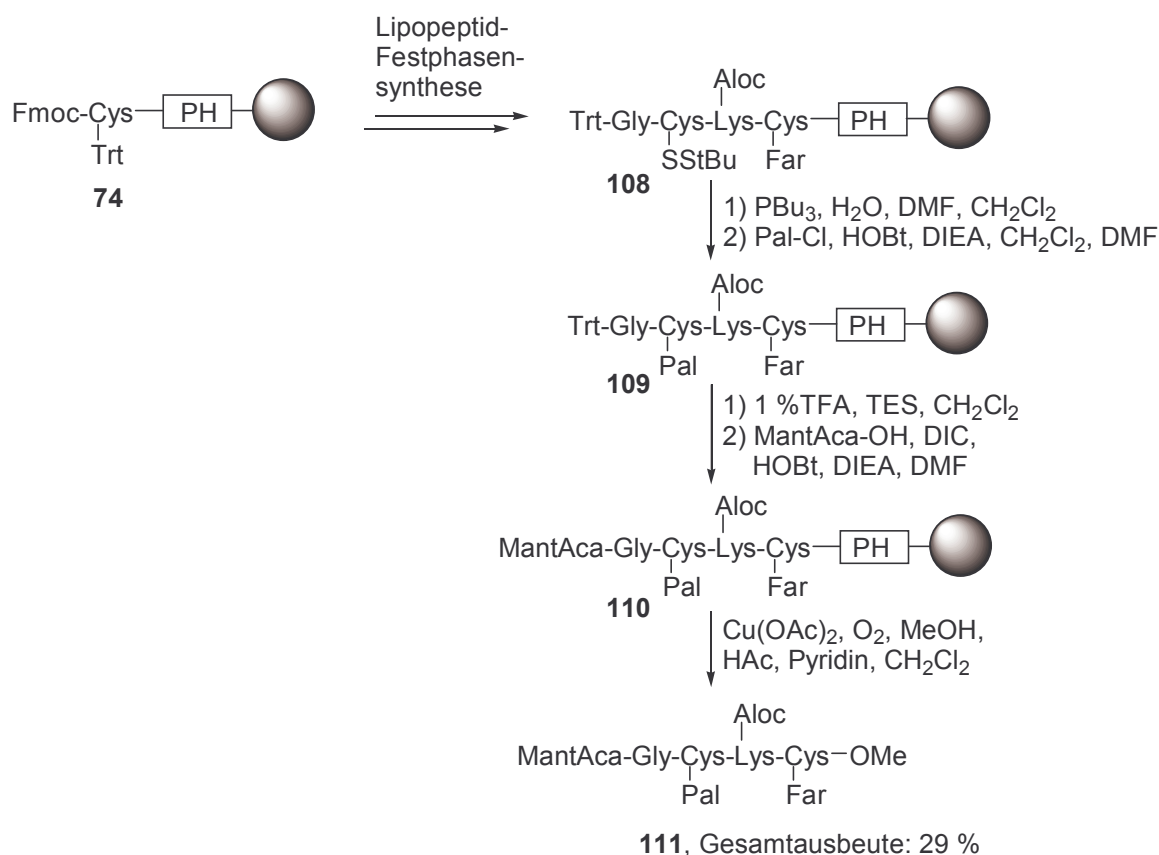
Lipopeptid **107** konnte nach Abspaltung vom polymeren Träger in 49 % Gesamtausbeute erhalten werden. Zur Abspaltung von **106** wurde anstelle von Methanol Wasser in THF im letzten Schritt benutzt. Das aktive Phenyldiazenderivat, welches durch die Oxidation des Linkers gebildet wird, wurde durch Wasser als Nukleophil angegriffen, und die entsprechende freie Säure **106** wurde in 31 % Ausbeute erhalten. Die anschließende Abtrennung des Kupfersalzes erfolgte durch Verwendung von Tris-aminoethyl-Harz. Somit konnte gezeigt werden, dass lipidierte Peptide mit sowohl C-terminaler freier Säure- als auch Methylesterfunktion über den Phenylhydrazid-Linker zugänglich sind.



Schema 25: Synthese einer farnesylierten und Mant-markierten Peptidsäure und eines Peptidmethylesters.

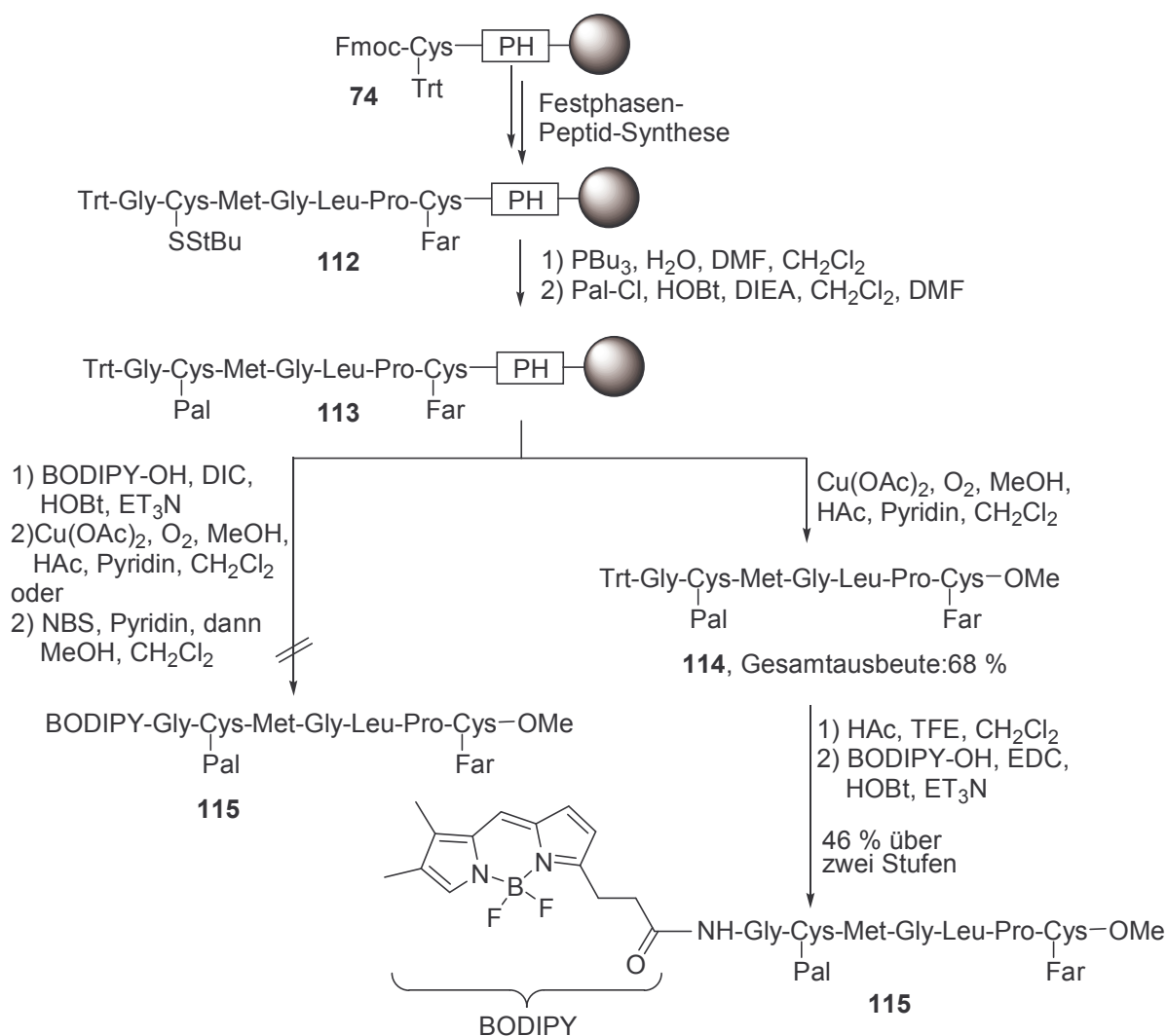
Im nächsten Schritt wurde durch Kombination der entwickelten Methoden Peptid **111** dargestellt. Es trägt als Lipidmodifikationen sowohl eine Farnesyl- wie auch eine Palmitoylgruppe und ist zusätzlich durch die Mant-Gruppe fluoreszenzmarkiert. Wie in Schema 26 gezeigt, wurde zunächst das farnesylierte Tetrapeptid **108** auf dem polymeren Träger aufgebaut. Die Thiofunktion des zweiten Cysteins ist durch die reduktions-labile SStBu-Gruppe geschützt, die N-terminale Aminogruppe durch eine säurelabile Trityl-Gruppe und die Aminogruppe der Lysinseitenkette durch die palladium-spaltbare Aloc-Gruppe. Diese Schutzgruppen und der Hydrazid-Linker sind orthogonal zueinander spaltbar.

Das *tert*-Butyl-Disulfid von **108** wurde durch Behandlung von PBU_3 und Wasser gespalten und das freie Thiol palmitoyliert. Da eine *S,N*-Acylumlagerung an N-terminal freien, palmitoylierten Cysteinen auftritt (ein Prinzip was der NCL zugrunde liegt, vgl. Kapitel 2.4) ist das Vorliegen einer Acylierung der Cystein-Aminogruppe, in diesem Fall durch die Aminosäure Glycin, für diesen Reaktionsschritt erforderlich. Vom Intermediat **109** wurde die Tritylgruppe unter schwach sauren Bedingungen entfernt und die Mant-Gruppe mittels DIC/HOBt und Triethylamin angekuppelt. Triethylamin ist zur Deprotonierung der Aminogruppe für diese Reaktion zwingend erforderlich, ohne die Base findet keine Kupplung statt. Da ebenfalls TFA als Ammoniumsalz an das Harz gebunden ist, wurde außerdem eine Voraktivierung von Mant-Aca-OH mit DIC zum OBt-Aktivester vorgenommen. Ein Unterschuss an DIC garantierte, dass kein Aktivierungsreagenz mehr überbleibt, welches mit TFA reagieren könnte. Ein Überschuss an HOBt dagegen sollte zu basische Reaktionsbedingungen und damit eine Spaltung des Thioesters vermeiden. Das gewünschte Produkt **111** wurde oxidativ in einem Essigsäure-Pyridin-Puffer von **110** abgespalten und wurde nach 13 Stufen am polymeren Träger in 29 % Gesamtausbeute erhalten.



Schema 26: Synthese des doppelt lipidierten und fluoreszenz-markierten Peptids **111**.

Neben der gezeigten Kompatibilität des Phenylhydrazid-Linkers zu den Fluoreszenzgruppen Mant und NBD, wurde nun die BODIPY-Gruppe als Fluorophor eingesetzt. Zur Darstellung von Peptid **115**, welches als Fluoreszenzmarker eine BODIPY-Gruppe trägt, wurde mittels Lipopeptid-Festphasen-Synthese das farnesylierte und palmitoylierte Heptapeptid **113** am polymeren Träger aufgebaut (Schema 27).

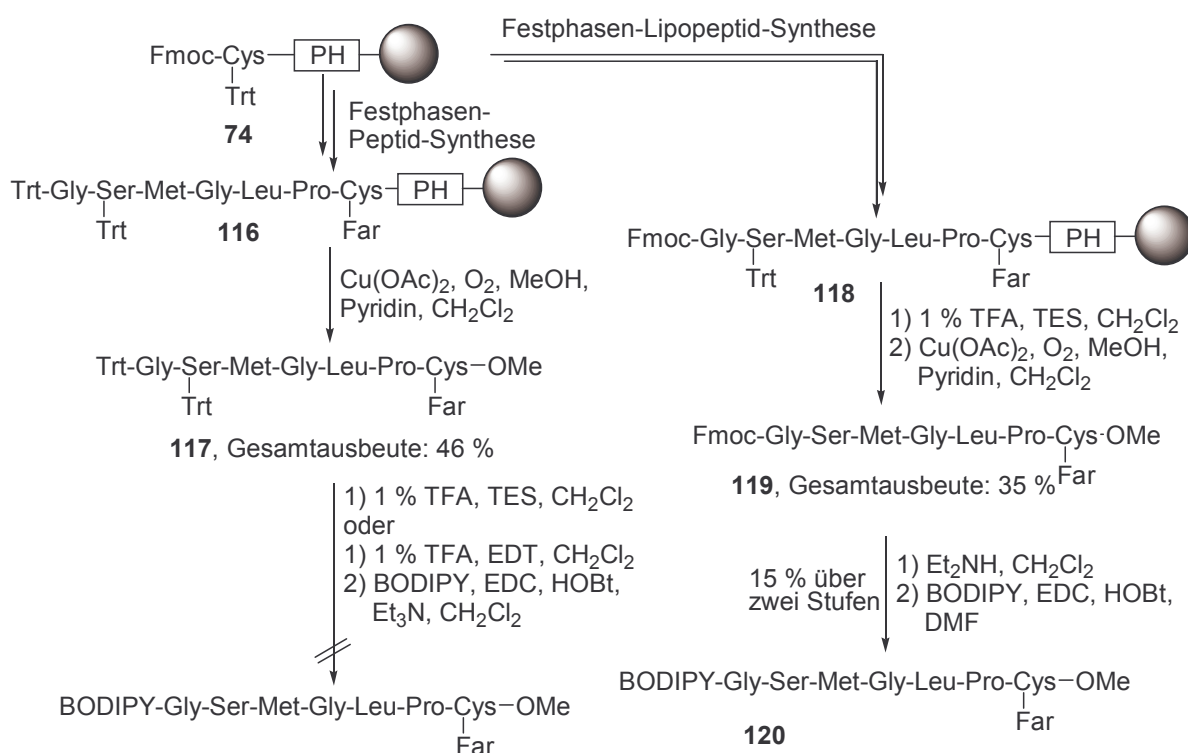


Schema 27: Darstellung des doppelt-lipidierten und BODIPY-markierten Peptids **115**.

Abspaltung der Trityl-Gruppe und Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers wurden unter analogen Bedingungen wie für **111** beschrieben, durchgeführt. Nach oxidativer Abspaltung vom Phenylhydrazid-Linker mittels $\text{Cu(OAc)}_2/\text{O}_2$ oder NBS/Pyridin konnte jedoch das gewünschte Produkt **115** nicht erhalten werden. Beide Abspaltungs-Reagenzien führen zu einer Zersetzung. Die Einführung der BODIPY-Gruppe musste dementsprechend in Lösung

vorgenommen werden. Dazu wurde Peptid **114** vom polymeren Träger unter sehr schwach sauren Bedingungen mit nur einem leichten Überschuss an Essigsäure abgespalten. Unter diesen Bedingungen wurde bei 10 % des Abspaltungsproduktes eine Hydrolyse des Palmitoylthioesters beobachtet. Die sehr säureempfindliche N-terminale Trityl-Gruppe wurde dagegen nicht beeinträchtigt. Insgesamt wurde Verbindung **114** in 68 % Ausbeute erhalten. Die Trityl-Gruppe wurde mit Essigsäure und TFE abgespalten und die BODIPY-Gruppe N-terminal angekuppelt. Das doppelt lipidierte und BODIPY-markierte Peptid **115** wurde in 46 % Ausbeute nach beiden Stufen erhalten.

Eine analoge Strategie wurde zur Synthese des einfach-lipidierten und BODIPY-markierten Peptids **120** verwendet (Schema 28). Am polymeren Träger wurde das farnesylierte Peptid **116** aufgebaut. Anstelle des palmitoylierten Cysteins befindet sich in der Sequenz hier ein Trityl-geschütztes Serin.

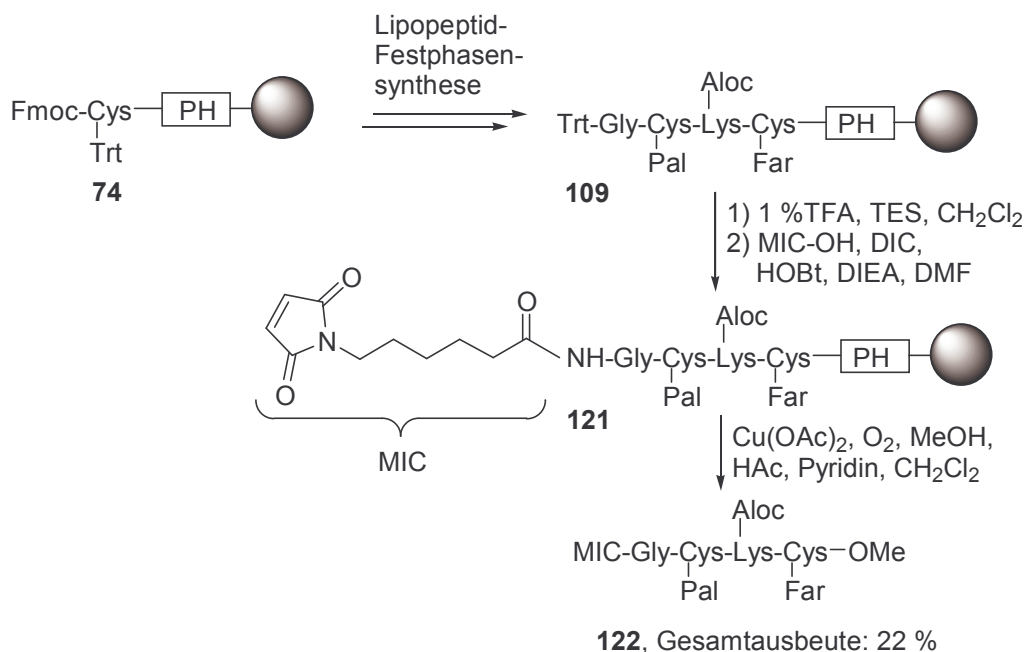


Schema 28: Darstellung des farnesylierten und BODIPY-markierten Peptid **120**. EDT: Ethandithiol.

Nach Abspaltung vom Phenylhydrazid-Linker wurde das vollständig geschützte Peptid **117** in 46 % Gesamtausbeute erhalten. Im nächsten Schritt sollten die beiden Tritylgruppen abgespalten und die Aminogruppe selektiv mit einem BODIPY-OBt-Aktivester acyliert werden. Zur Abspaltung der hydroxy-ständigen Tritylgruppe ist dabei zumindest 1 % TFA zu

verwenden, da essigsäure Bedingungen, wie bei der Synthese von **115** für die Abspaltung der amin-ständigen Tritylgruppe verwendet, dafür nicht ausreichen. Beim Einsatz von TES als erforderlichem „Fänger“ für das Tritylkation erwies sich die anschließende Aufreinigung als problematisch. Beim Einsatz von Ethandithiol als Alternative und anschließender direkter Kupplung des BODIPY konnte kein Produkt isoliert werden. Um diese Probleme zu umgehen, wurde mittels Festphasenpeptidsynthese Peptid **118** an der festen Phase synthetisiert. N-terminal trägt es die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe, so dass eine Abspaltung der orthogonalen Trityl-Gruppe an der festen Phase vorgenommen werden konnte. Die anschließende Abspaltung ergab Peptid **119** in 35 % Gesamtausbeute. Die Fmoc-Gruppe wurde durch Diethylamin in Lösung abgespalten und das Intermediat ohne weitere Aufreinigung mit BODIPY zum gewünschten Zielpeptid **120** gekuppelt. Die Ausbeute für beide Stufen und nach anschließender HPLC-Aufreinigung betrug 15 %.

Die Möglichkeit der Einführung einer Maleinimido (MIC)-Gruppe durch die Lipopeptid-Synthese auf der festen Phase wurde in der Synthese des farnesylierten und palmitoylierten Peptids **122** gezeigt (Schema 29). Ausgehend vom festphasen-gebundenem Tetrapeptid **109** wurde, wie bei der Synthese von **111** beschrieben, die Tritylgruppe abgespalten und dann die kommerziell erhältliche MIC-Gruppe mittels DIC/HOBt angekuppelt. Das gewünschte Zielpeptid **122** wurde nach oxidativer Abspaltung von **121** in einer Gesamtausbeute von 22 % erhalten.



Schema 29: Synthese des doppelt-lipidierten und MIC-markierten Peptids **122**.

Durch die entwickelte, effiziente Festphasenmethodik unter Verwendung des Phenylhydrazid-Linkers sind verschiedene einfach und doppelt lipidierte Peptide zugänglich. Ebenso erlaubt sie die zusätzliche Einführung von Fluoreszenz- oder MIC-Gruppen. In Abbildung 20 und Abbildung 21 sind HPLC-Chromatogramme der verschiedenen erhaltenen fluoreszenz- oder MIC-markierten Peptide gezeigt.

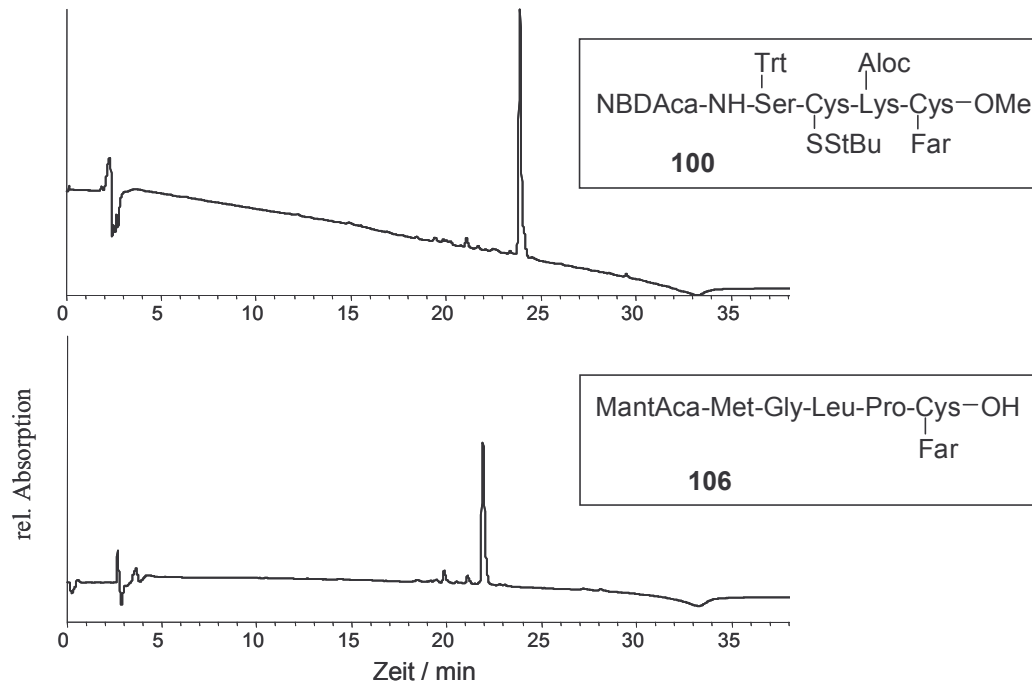


Abbildung 20: LCMS-Chromatogramme von **100** (oben) und **106** (unten). Detektionswellenlänge: 210 nm.

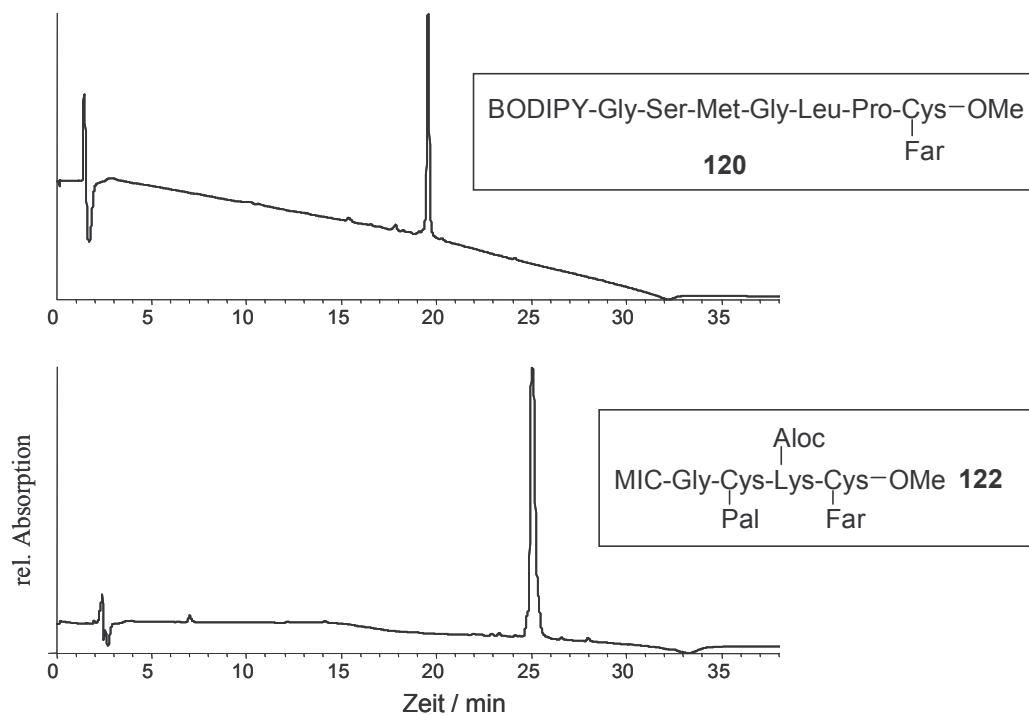


Abbildung 21: LCMS-Chromatogramme von **120** (oben) und **122** (unten). Detektionswellenlänge: 210 nm.

Die Produkte der Lipopeptidsynthese am Phenylhydrazid-Linker wurden in reiner Form erhalten, einfache Säulenchromatographie diente zur Abtrennung der Kupfersalze. In dieser Arbeit wurde damit erstmalig eine Festphasenmethodik entwickelt, die einen einfachen, schnellen und flexiblen Zugang zu einer Vielzahl von Lipopeptiden, wie sie für biologische oder biophysikalische Experimente benötigt werden, eröffnet.

4.2.6 Exkurs: Biophysikalische Evaluierung der Wechselwirkung von lipidierten, BODIPY-markierten Peptiden mit Modellbiomembranen

Mit den synthetisierten BODIPY-markierten Lipopeptiden **115** und **120** wurde von *S. Janosch*¹³² aus dem Arbeitskreis von *R. Winter*, Universität Dortmund, im Rahmen einer Kooperation die Wechselwirkung zwischen Modellbiomembranen und lipidierten Peptiden untersucht. Ziel war es, die Verteilung der lipidierten Peptide in den verschiedenen Lipidphasen von Vesikeln zu erfassen. Eine umfassende Darstellung und Diskussion findet sich in seiner Dissertationsarbeit, so dass hier lediglich einige Ergebnisse in aller Kürze zusammengefasst werden.

Die Verteilung der Lipopeptide in unterschiedlichen Modellmembranen von ca 30 μm durchmessenden unilamellaren Vesikeln bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Membranzusammensetzungen wurde untersucht. In Abbildung 22 ist die Verteilung des farnesylierten Peptids **120** dargestellt.

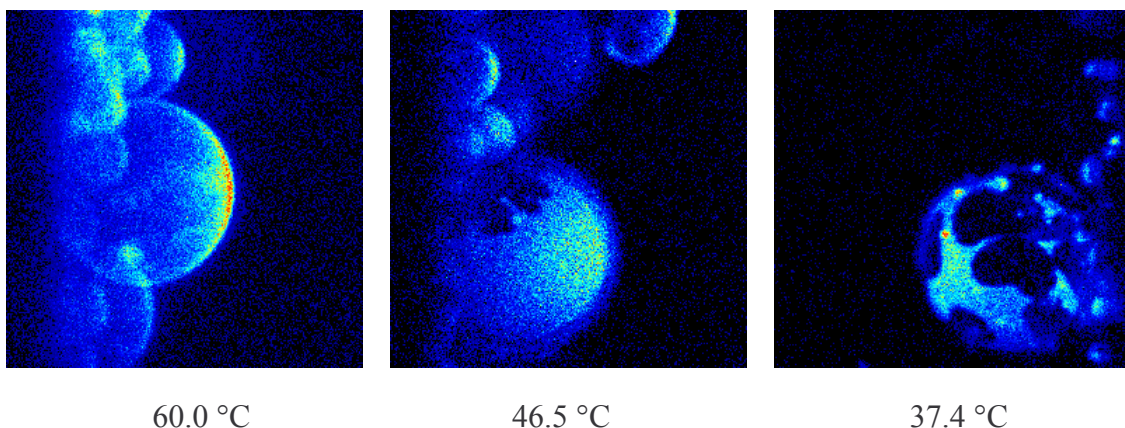


Abbildung 22: Verteilung des farnesylierten Peptids **120** in den Domänen eines Vesikels aus DMPC/DSPC in der Zusammensetzung 1:1 für drei Temperaturen.

Bei 60 ° C ist das Peptid homogen über das Vesikel verteilt, welches aus Di-myristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) und Di-stearoyl-Phosphatidylcholin (DSPC) im Verhältnis 1:1 (n/n) zusammengesetzt ist. Die blaue Farbe im Bild wird durch die Fluoreszenz des peptidgebundenen BODIPY-Markers hervorgerufen. Mit abnehmender Temperatur wird das Zweiphasengebiet von DMPC/DSPC erreicht. Die zweite Phase, welche im Bild als schwarzer Fleck sichtbar ist, wurde in weiteren Experimenten als Gel-Phase charakterisiert. Das Peptid reichert sich in der verbleibenden fluiden Phase an. Ein ähnliches Verhalten zeigt sich bei dem doppelt lipidierten Peptid **115**, welches sowohl einen Farnesylrest wie auch einen Palmitoylrest trägt (Abbildung 23). Auch hier wird die Ausbildung einer Gelphase beobachtet, welche mit abnehmender Temperatur an Größe zunimmt. Das doppelt lipidierte Peptid reichert sich, genau wie bei dem einfach lipidierten Peptid beobachtet, in der fluiden Phase an.

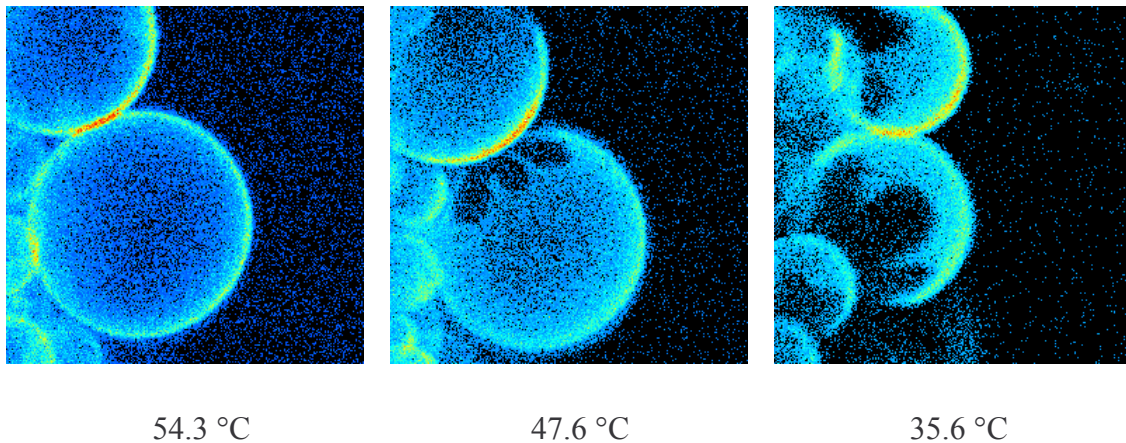


Abbildung 23: Verteilung des palmitoylierten und farnesylierten Peptids **115** in den Domänen eines Vesikels aus DMPC/DSPC in der Zusammensetzung 1:1 (n/n) für drei Temperaturen.

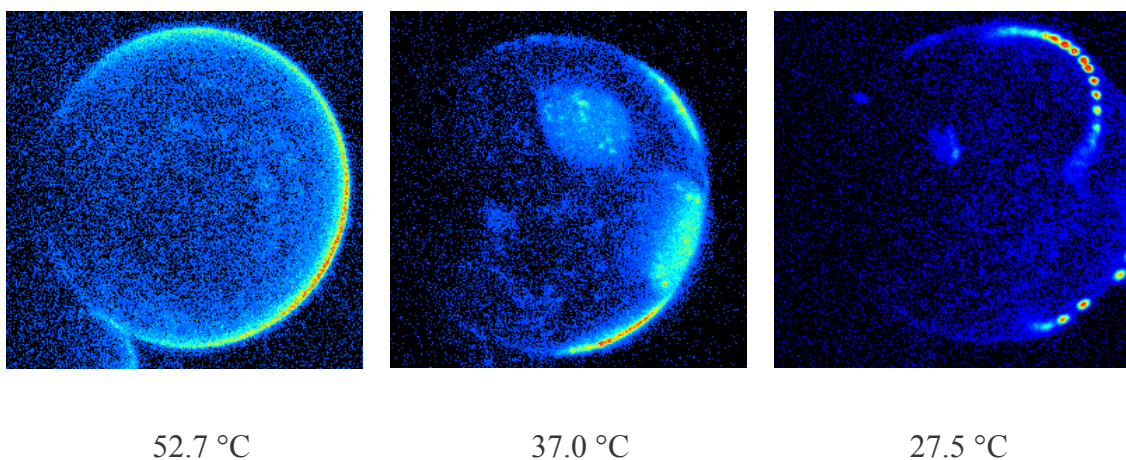


Abbildung 24: Verteilung des palmitoylierten und farnesylierten Peptids **115** in den Domänen eines Vesikels aus DMPC/DSPC in der Zusammensetzung 1:1 (n/n) und mit 20 % Cholesterol für drei Temperaturen.

Etwas anderes zeigt sich bei Vesikeln, deren Membran zusätzlich zu DSPC und DMPC auch aus 20 % Cholesterol besteht. Diese Lipidzusammensetzung bildet gewöhnlich über den untersuchten Temperaturbereich eine geordnet fluide Phase („*liquid ordered*“) aus. Das doppelt lipidierte Peptid **115** reichert sich in dem Lipidsystem mit abnehmender Temperatur in Domänen an, deren Größe stetig abnimmt. Die Ausbildung dieser Domänen wird wahrscheinlich durch die Anwesenheit des Peptids induziert. Bei 27.5 °C sind sie sehr klein und weisen eine hohe Fluoreszenz auf, die durch eine hohe Konzentration an Peptid hervorgerufen wird. Weitere Experimente deuten daraufhin, dass dieses fluide („*liquid disordered*“), DMPC-reiche Phasen sind, die neben der, in dem Bild nicht sichtbaren, cholesterolreichen geordneten fluiden Phase koexistieren. Die Befunde deuten damit daraufhin, dass die zweifache Lipidierung von Peptiden mit einer Palmitoyl- und einer Farnesyl-Gruppe die Assoziation an geordnete fluide Phasen und an Gel-Phasen von Membrandoppelschichten nicht begünstigt.

4.3 Baustein-gestützte Synthese zum Aufbau lipidierter Peptide

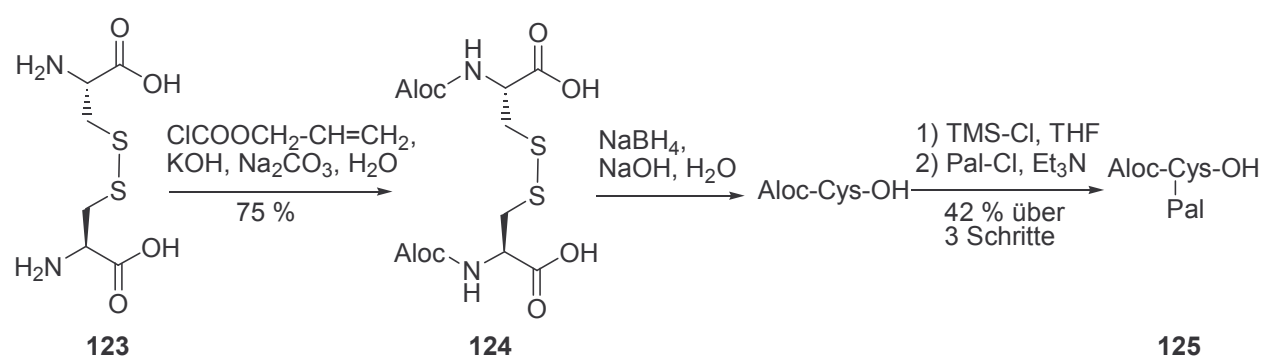
Während in Kapitel 4.1 die Darstellung des lipidierten, polybasischen K-Ras Peptids unter Verwendung eines farnesylierten Cystein-Bausteins beschrieben ist, bestand die Synthesestrategie für die Lipopeptidsynthesen mit dem Phenylhydrazid-Linker in Kapitel 4.2 in einer Lipidierung der selektiv entschützten Cysteine auf dem polymeren Träger. Insbesondere die zweite Strategie hat sich hervorragend bewährt, es gibt jedoch Fälle, in denen der Einsatz von zuvor in Lösung lipidierten Bausteinen wünschenswert ist. Dieses ist der Fall, wenn die eingesetzten Lipidgruppen selber weiter modifiziert sind, etwa durch Fluoreszenzmarker oder Photoaffinitäts-Gruppen, und dementsprechend in der Herstellung zu zeitaufwendig und teuer sind, um im Überschuss für die Lipidierung auf dem polymeren Träger eingesetzt zu werden. Ein weiterer Aspekt zum Einsatz von Bausteinen besteht in der besseren Automatisierbarkeit der Synthese mit kommerziellen Peptidsynthesizern.

Während die Verwendung von prenylierten Cystein-Bausteinen, wie gezeigt, keine größeren Schwierigkeiten erwarten lässt, ist der Einsatz palmitoylierter Cysteine problematisch. Nach Ankupplung an das Peptid, besteht der nächste Schritt der Synthese in der Abspaltung der N-terminalen Aminoschutzgruppe. Hiernach ist mit einer *S,N*-Acylwanderung der Palmitoylgruppe des Thioesters zu rechnen. Derartige Reaktionen sind z.B. Grundlage in der NCL (vgl. Kapitel 2.4). Der N-Terminus des Peptids wird für weitere Verlängerungen in der

Synthese irreversibel blockiert und die Kettenverlängerung hat die nun freie Thiolgruppe als Ausgangspunkt, was zu einem Regioisomer gleicher Masse führt.

Eine Möglichkeit zur Umgehung des geschilderten Problems besteht in der Verwendung von Dipeptid-Bausteinen mit palmitoyliertem Cystein am C-Terminus. Nachteile sind hierbei zum einen, dass für jedes unterschiedliche Peptid eigens angefertigte Dipeptid-Bausteine benötigt werden und zweitens, dass bei Aktivierung des Dipeptids Racemisierungsgefahr besteht. Der hier stattdessen verfolgte Ansatz zur Vermeidung der *S,N*-Acylwanderung beruht darauf, die Zeitspanne zwischen der N-terminalen Entschützung des palmitoylierten Cysteins in der Peptidkette und der folgenden Ankupplung der nächsten Aminosäure zu minimieren. Hierzu wird eine *in situ* Entschützung/Kupplung verwandt, bei der die anzukuppelnde Aminosäure aktiviert und zum festphasengebundenen Peptid gegeben wird, *bevor* die N-terminale Aminoschutzgruppe des Cysteins abgespalten wird. Voraussetzung dafür ist natürlich, dass beide vorhandenen Aminogruppen durch orthogonale Schutzgruppen maskiert sind.

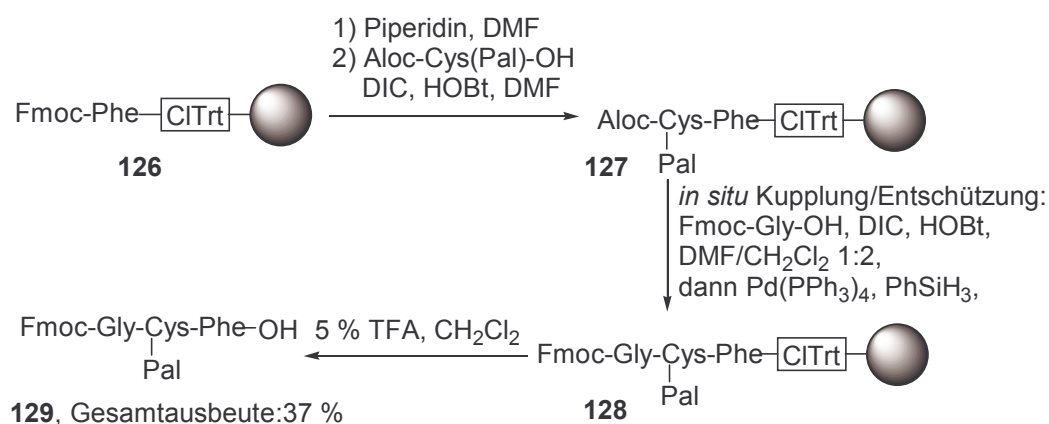
Die palladiumlabile Aloc- und die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe wurden als N-terminale Aminoschutzgruppen gewählt. Der palmitoylierte Cysteinbaustein wurde nach einer Vorschrift von *M. Schelhaas*¹³³ hergestellt. Dazu wurde Cystin **123** mit Aloc geschützt (Schema 30, Verbindung **124**) und die Disulfid-Brücke mittels NaBH_4 gespalten. Die Säurefunktion wurde intermediär mit der Trimethylsilyl-Gruppe geschützt und das entstandene Thiol zur Zielverbindung **125** palmitoyliert.



Schema 30: Darstellung des Aloc-geschützten, palmitoylierten Cysteins **125**.

Die *in situ* Entschützung/Kupplungs-Strategie wurde beim Aufbau des Tripeptids **129** verwendet (Schema 31). Als Linker wurde der 2-Chlortrityl-Linker, angekoppelt an Polystyren, gewählt. Von dem festphasengebundenen Phenylalanin **126** wurde die Fmoc-

Schutzgruppe entfernt und der palmitoylierte Cysteinbaustein **125** mittels DIC und HOBt zu **127** angekuppelt.



Schema 31: *In situ* Entschützung/Kupplung zum Aufbau des palmitoylierten Tripeptids **129**.

Für die *in situ* Entschützung/Kupplung zu **128** wurde Fmoc-geschütztes Glycin mit DIC/HOBt für 1 h in einem Gemisch von DMF und CH₂Cl₂ 1:2 zum OBt-Aktivester voraktiviert und dann zum Harz **127** gegeben. Unter Schutzgas wurden anschließend Pd(PPh₃)₄ und Phenylsilan zugefügt, um die Aloc-Schutzgruppe abzuspalten. Nach 12-stündiger Reaktionszeit und dem Waschschrift wurde mittels TFA vom polymeren Träger abgespalten. Das Produkt **129** konnte in 37 % Ausbeute erhalten werden. In Abbildung 25 ist das LCMS-Chromatogramm gezeigt. Es ist noch ein weiterer Peak mit 6 % bezogen auf das Hauptprodukt bei kürzerer Retentionszeit sichtbar. Die Masse der zugehörigen Verbindung entspricht der des Produktes **129**, es handelt sich hier um ein Regio- oder Stereoisomer.

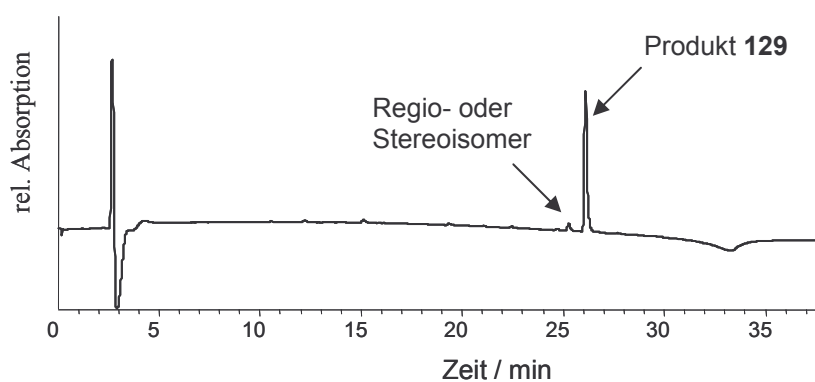
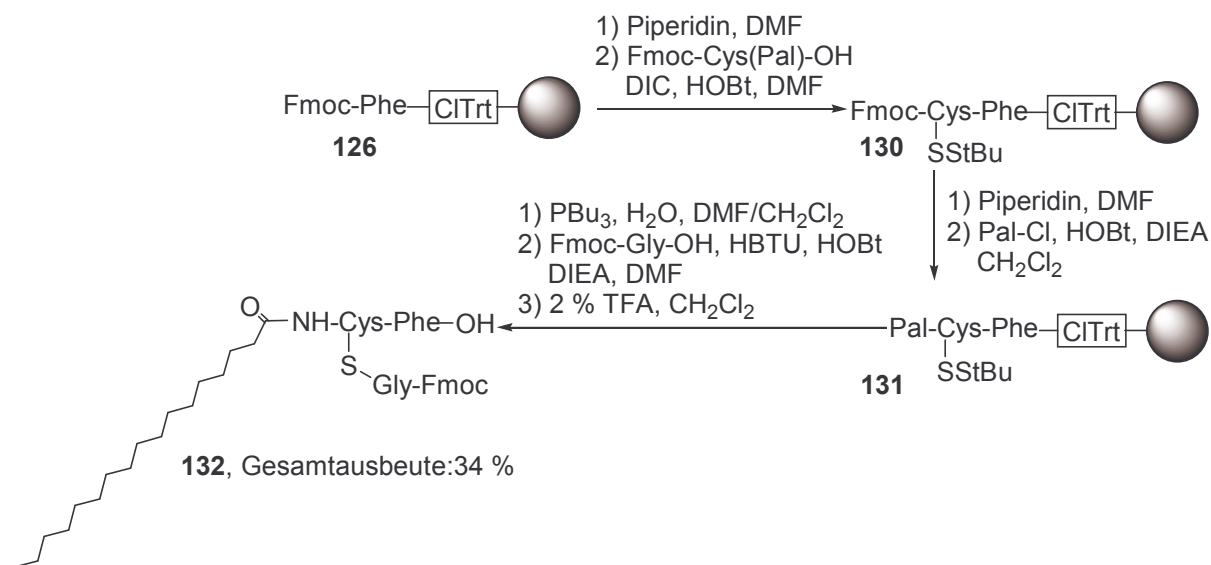


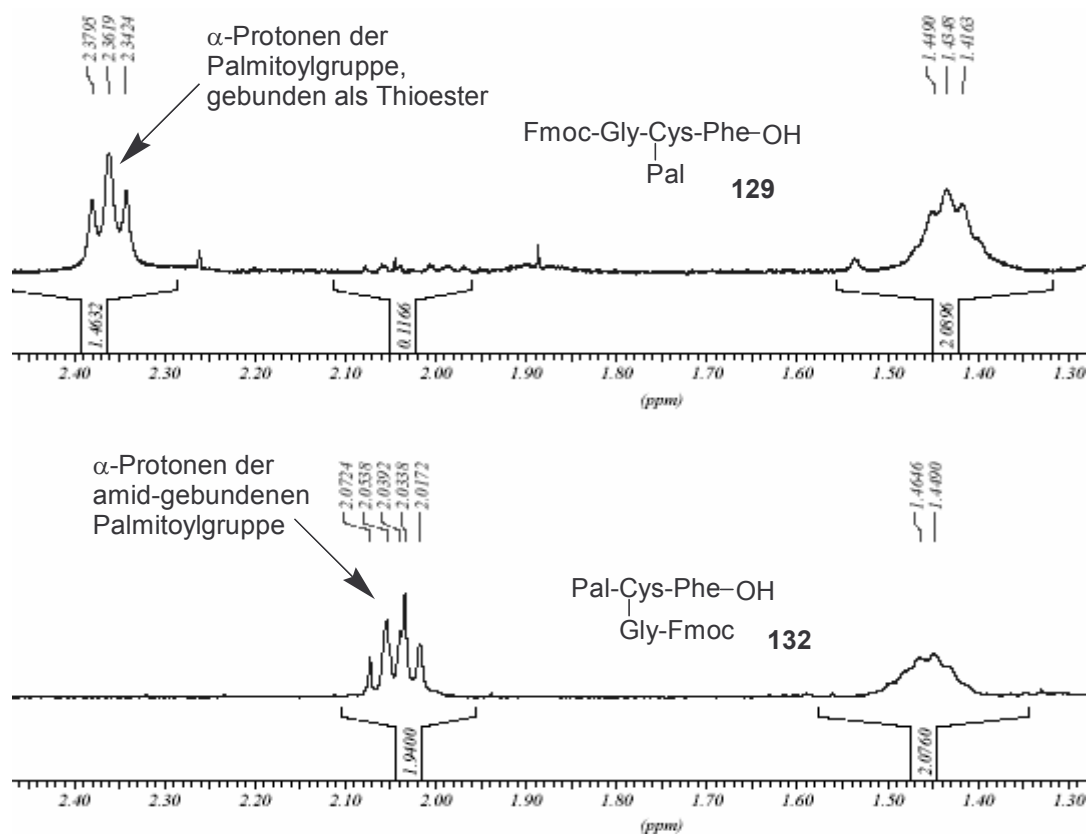
Abbildung 25: LCMS-Chromatogramm von **129**. Detektionswellenlänge 210 nm.

Eine Identifizierung der möglichen Regioisomere kann durch NMR-Spektroskopie erfolgen. Für einen Vergleich mit dem Produkt **129** sowie dessen Charakterisierung wurde das Regioisomer **132** synthetisiert (Schema 32). An festphasengebundenes Phenylalanin **126** wurde Fmoc-Cys(SStBu)-OH mit DIC und HOBT angekuppelt (**130**). Die Fmoc-Gruppe wurde basisch mit Piperidin entfernt und die Palmitoyl-Gruppe an die N-terminale freie Aminogruppe zu **131** gekuppelt.



Schema 32: Synthese des Regioisomers **132**.

Die Disulfid-Gruppe wurde reaktiv mit PBU₃ und Wasser gespalten, und das freie Thiol wurde mit aktiviertem, Fmoc-geschütztem Glycin acyliert. Das Produkt **132** wurde in 34 % Gesamtausbeute mit TFA vom polymeren Träger abgespalten. Es ist das Regioisomer zu **129**, die Palmitoyl-Gruppe ist durch eine N-terminale Amid-Gruppe und Fmoc-Glycin als Thioester an das Peptid geknüpft. Ein Vergleich der Verschiebung der α -Protonen der Palmitoyl-Gruppe im NMR-Spektrum zeigt für **129** die erwartete Verschiebung von ca. 2.3 ppm. Beim Regioisomer **132** beobachtet man dagegen eine deutliche Verschiebung auf ca. 2.0 ppm.



Schema 33: Ausschnitt aus den NMR-Spektren des palmitoylierten Peptids **129** (Synthese in Schema 31, oberes Spektrum) und dessen Regioisomers **132** (Synthese in Schema 32, unteres Spektrum).

Die Verwendung der *in situ* Entschützung/Kupplungs-Methode erlaubt damit den Einsatz von palmitoylierten Cystein-Bausteinen zum Aufbau palmitoylierter Peptide. Voraussetzung ist dabei der Gebrauch zweier unterschiedlicher orthogonaler Aminoschutzgruppen. Die Effizienz dieser Methode bzw. das Ausmaß einer *S,N*-Acylwanderung kann mittels NMR-Spektroskopie und HPLC leicht überprüft werden. Kürzlich wurde von *G. Kragol*¹³⁴ eine zweite Methode zum Baustein-Einsatz palmitoylierter Peptide entwickelt. Er konnte zeigen, dass die Wahl des Lösungsmittels während der Kupplung einen großen Einfluss auf die *S,N*-Acylwanderung hat. Bei reinem DMF wird unter Standard-Kupplungsbedingungen (bei einem anderen Modellpeptid) 100 % *S,N*-Acylwanderung beobachtet, wird das unpolare Lösungsmittelgemisch DMF/CH₂Cl₂ 1:1 verwendet, so sind es nur noch 45 %, und bei einer Zusammensetzung von DMF/CH₂Cl₂ 1:4 wird noch 2 % - 5 % Acylwanderung beobachtet. Diese Lösungsmittelleffekte sollten auch bei der hier vorgestellten *in situ* Entschützung/Kupplungs-Methode eine Rolle spielen. Eine Option besteht in der Kombination beider Methoden für die Peptidsynthese, insbesondere wenn die freie Wahl des

Lösungsmittels durch Aggregation des festphasengebundenen Peptids beschränkt ist (vgl. z.B. Kapitel 4.2.3, Synthese von **84**).

4.4 Parallelsynthese lipidierter Benzodiazepindione

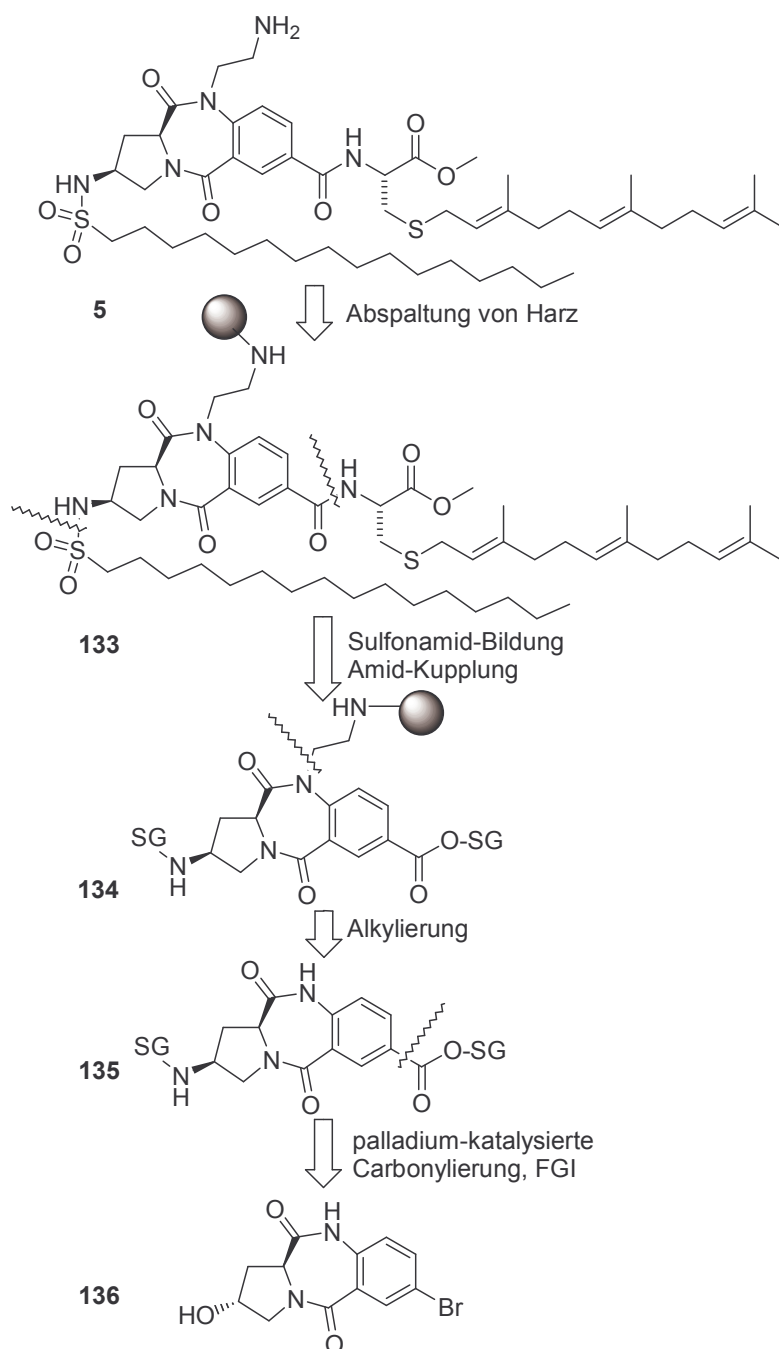
Nachdem die vorherigen Kapiteln die Festphasensynthese lipidierter Peptide zum Inhalt hatten, wird im folgenden die Festphasensynthese lipidierter Benzodiazepindione, welche Peptidomimetika sind, beschrieben. Bei der Planung der Synthese wurde Benzodiazepindion **5** als repräsentatives Beispiel für alle Bibliotheksmitglieder betrachtet. Die bei der Lösungssynthese von **5** gemachten Erfahrungen von *P. Deck*⁵¹ bildeten die Grundlage für die geplante Analoga-Synthese an der festen Phase. Für die kombinatorische Festphasensynthese mussten jedoch einige Punkte berücksichtigt werden, die eine Neukonzeption der Syntheseroute erforderten. So sollte die Diversität möglichst am Ende der Synthese eingeführt werden, d.h. die Anknüpfung der C- und N-terminalen* Bausteine sollte in den letzten Syntheseschritten stattfinden. Ebenso sollten nur sehr effiziente Reaktionen auf der festen Phase durchgeführt werden, um die Entstehung komplexer Substanzgemische zu vermeiden. Da sich Verbindungen mit freier Aminogruppe durchweg als aktiver als solche mit geschützter oder nicht vorhandener Aminofunktion erwiesen hatten, wurden sie auch bei einer weiteren Optimierung der Inhibitoren beibehalten. Die Aminofunktion bot sich damit für den Anknüpfungspunkt an den polymeren Träger an. Die verwendete Linker-Gruppe musste sowohl alle Syntheseschritte an der festen Phase tolerieren, wie auch die Abspaltung des Produktes in sehr milder Form erlauben, da insbesondere prenylierte Produkte, ähnlich wie die entsprechenden Peptide, säureempfindlich sind.

4.4.1 Retrosynthetische Analyse

Da als Anknüpfungspunkt an die Linker-Gruppe die freie Aminogruppe gewählt wurde und die Abspaltung unter sehr milden Bedingungen stattfinden sollte, fiel die Wahl auf den Trityl-Linker. Dieser hatte sich bei der Festphasensynthese des polybasischen, farnesylierten K-Ras-Peptids **34** bewährt und auch dort konnte in der Synthese sowohl eine C- als auch eine N-terminale Verlängerung realisiert werden. Die Abspaltung vom polymeren Träger sollte im

* Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur für Peptide wurde auf die der Benzodiazepine übertragen. In Anlehnung an die Peptid-Nomenklatur wird die Molekülhälfte mit der an den Aromaten gebundenen Carboxylgruppe als C-terminal und die mit der NH-Gruppe am Prolin-Ring als N-terminal bezeichnet.

letzten Schritt der Synthese erfolgen, um direkten Zugang zu dem gewünschten Produkt **5** zu gewährleisten (Schema 34).



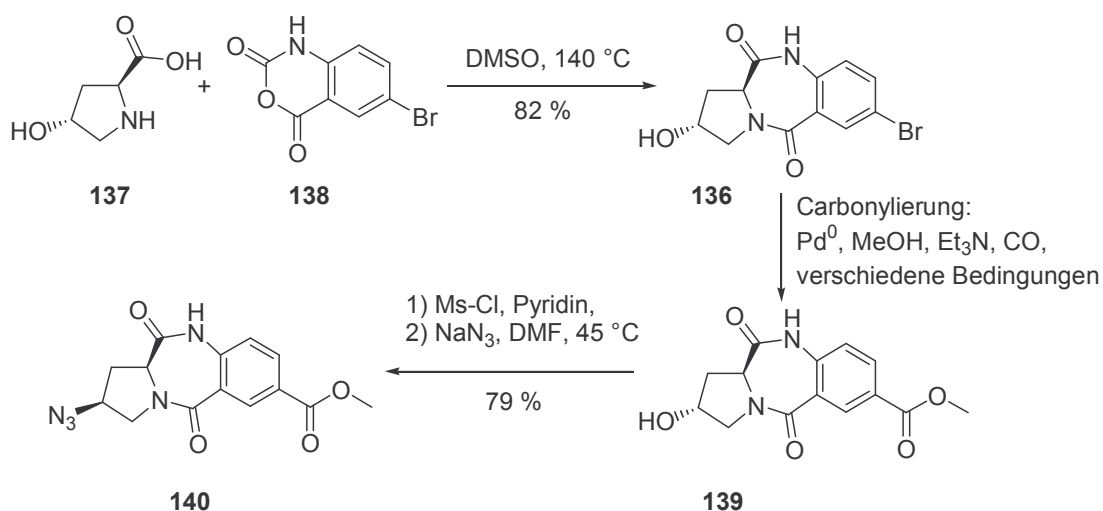
Schema 34: Retrosynthese zur kombinatorischen Festphasensynthese von lipidierten Benzodiazepinen. FGI: funktionelle Gruppen-Interkonversion.

Der entsprechende, festphasengebundene Vorläufer **133** wird in der Synthese durch C- und N-terminale Verlängerung der Verbindung **134** dargestellt. Hierbei kann auf die bewährte Schutzgruppen-Technik der K-Ras-Synthese zurückgegriffen werden. Verbindung **134** ist

durch Alkylierung von **135** und anschließender Anbindung an die feste Phase zugänglich. Die Synthese von **135** kann in Lösung erfolgen. Diese Strategie erlaubt so eine zwischenzeitliche Reinigung der Intermediate. Die Carbonylgruppe in **135** wird durch vorhergehende palladium-katalysierte Carbonylierung und die Aminogruppe durch eine nukleophile Substitution aus **136** erhalten.

4.4.2 Benzodiazepindionsynthese in Lösung

Im ersten Schritt der Synthese wurde das Benzodiazepindion-Grundgerüst **136** über eine Kondensationsreaktion von *trans*-Hydroxy-L-prolin **137** und 5-Bromisatosäureanhydrid **138** mit 82 % Ausbeute aufgebaut (Schema 35).¹³⁵



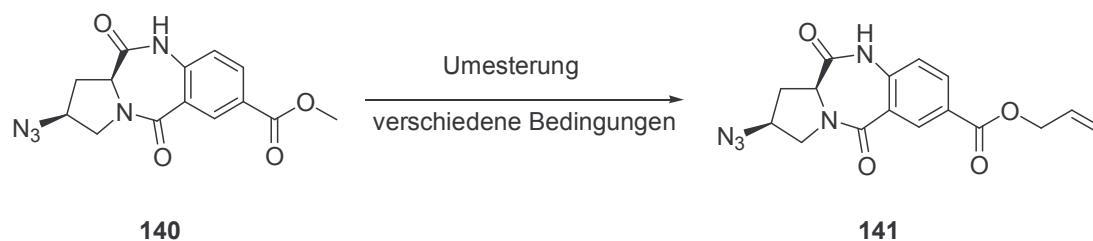
Schema 35: Lösungssynthese des Benzodiazepindions **140**.

Die nachfolgende Carbonylierung von **136** zur Einführung des C-terminalen Methylesters wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt (Tabelle 5). Die Verwendung von 1,3-Bis(diphenylphosphino)propan¹³⁶ (dppp) als Palladium-Ligand führte in einer CO-Atmosphäre von 1 bar und in 12 h zu einem vollständigen Umsatz zum Produkt **139**. Die Verwendung der anderen Liganden PPh₃ und P(o-tolyl)₃ war dagegen nicht erfolgreich. Bemerkenswerterweise war eine Verfolgung der Carbonylierungs-Reaktion oder eine präparative Auftrennung des Produkt-Edukt-Gemisches aufgrund der nahezu identischen Chromatographieigenschaften auf Kieselgel nicht möglich.

Ligand	Bedingungen	Verhältnis (NMR) Produkt:Edukt	Ausbeute nach Säulenchromatographie
PPh ₃	70 °C, 4 h	0:100	Edukt
P(o-tolyl) ₃	80 °C, 12 h	0:100	Edukt
dppp	70 °C, 4 h	58:42	Produkt-Edukt-Gemisch*
dppp	75 °C, 12 h	100:0	87 % Produkt

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für die palladium-katalysierte Carbonylierung. Weitere Bedingungen: Pd(OAc)₂, Et₃N, MeOH, DMF, CO 1bar; P(o-tolyl)₃: Tri-*o*-tolylphosphin; *: Produkt und Edukt konnten nicht durch Säulenchromatographie getrennt werden.

Die Hydroxylgruppe von **139** wurde unter Standardbedingungen mesyliert und nachfolgend mit 50 Äquivalenten NaN₃ in DMF für 4 Tage und in 79 % Gesamtausbeute zum Azid **140** umgesetzt.¹³⁵ Die nachfolgende Umesterung sollte zum Allylester **141** führen (Schema 36). Es wurden verschiedene Bedingungen probiert, darunter Säurekatalyse mit para-Toluensulfonsäure (PTSA) und TFA, Katalyse mittels Lewis-Säuren (Ti(OiPr)₄,¹³⁷ Al(OiPr)₃¹³⁸ und Bu₂SnO¹³⁹) sowie eine Umesterung unter basischen Bedingungen mittels DBU und LiBr.

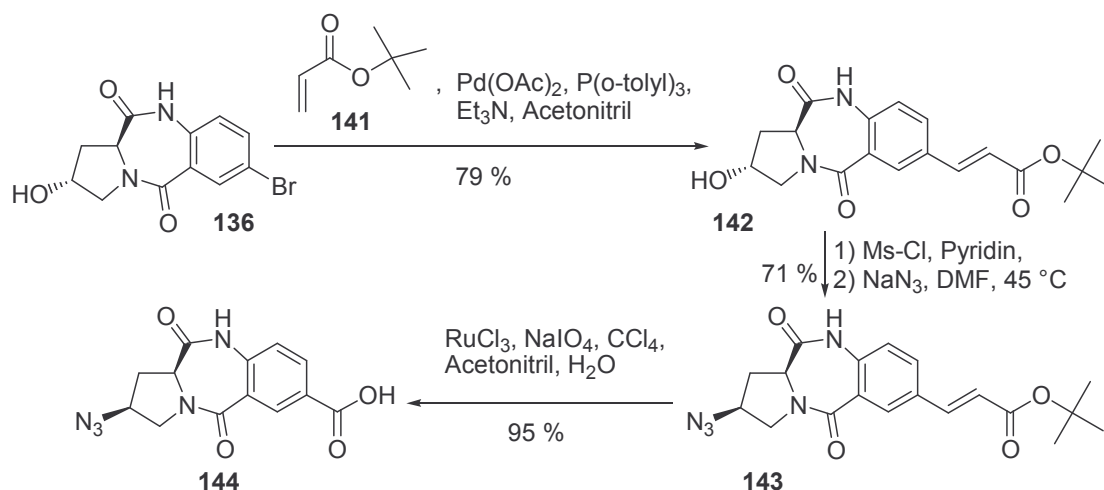


Schema 36: Umesterung zum Allylester **141**.

Sowohl Säure- als auch Lewis-Säure-Katalyse führten zu keinem Umsatz. Die Verwendung von DBU und LiBr wurde von *D. Seebach*¹⁴⁰ u.a. zur Umesterung von Peptidestern beschrieben. Hierfür sind Bedingungen entwickelt worden, die eine Epimerisierung bei Peptiden vermeiden. Die Anwendung dieses Protokolls führte im Falle von **140** innerhalb von 8 h zu ca. 50 % Umsatz. Erstaunlicherweise wurde hierbei jedoch eine fast vollständige Epimerisierung beobachtet. Weitere Umesterung mit Trimethylsilylethanol anstatt Allylalkohol zum geschützten fluorid-labilen Trimethylsilylether unter Verwendung großer Überschüsse an Lewisäure von 1.3 eq - 2.8 eq sowie langen Reaktionszeit von 16 h bei 110 °C ergaben zwar Umsätze von bis zu 100 %, doch auch hier wurde das Auftreten von

Nebenprodukten beobachtet, die wahrscheinlich auf eine Epimerisierung zurückzuführen sind.

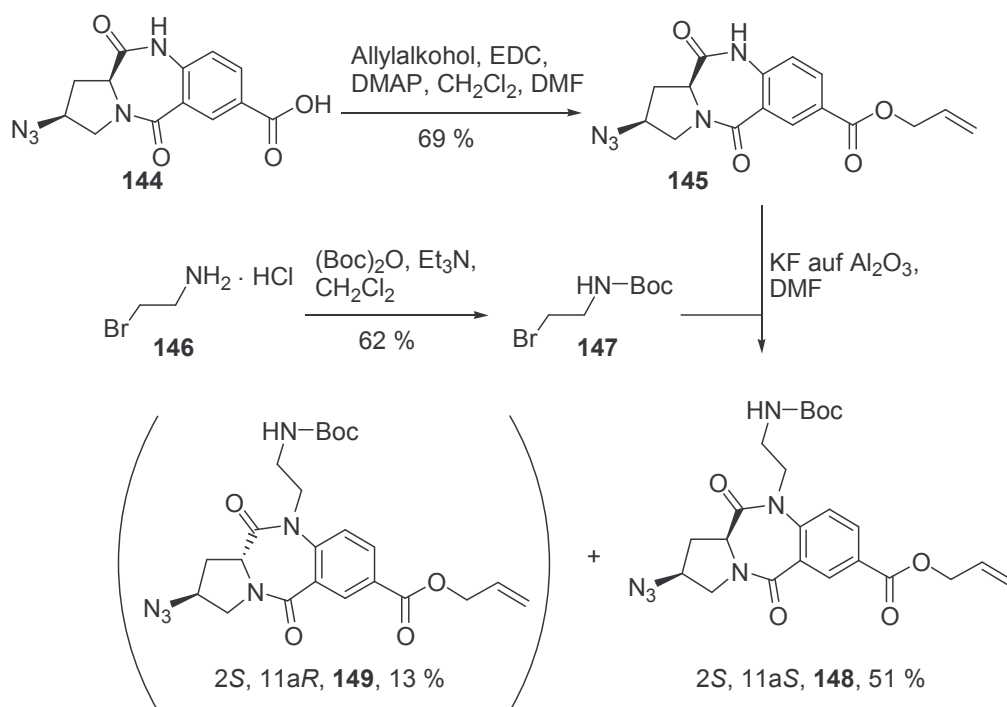
Die eingeschlagene Syntheseroute wurde aufgrund der Schwierigkeiten bei der Umesterung verlassen. Benzodiazepindion **136** wurde in einer Heck-Reaktion mit Acrylsäure-*tert*-butylester **141** und unter Verwendung von Tri-*o*-tolylphosphin als Ligand für das Palladium in 79 % Ausbeute zu **142** umgesetzt (Schema 37). Mesylierung und Substitution mit Natriumazid analog zu den oben beschriebenen Reaktionen lieferte das Benzodiazepindion **143** in 71 % Ausbeute für beide Schritte. Die freie Säure **144** wurde durch oxidative Spaltung der Doppelbindung erhalten. Als Spaltungsreagenzien wurden Ruthenium(III)-chlorid und Natriumperiodat unter analogen Bedingungen, zu den von *P. Deck*⁵¹ beschrieben, verwendet. Hierbei wird zunächst die Doppelbindung durch *in situ* generiertes Ruthenium(VIII)-oxid bishydroxyliert und anschließend mit Natriumperiodat einer Glycolspaltung unterzogen.



Schema 37: Synthese von Benzodiazepindion **144**.

Die freie Säurefunktion von **144** wurde mit DMAP und EDC zum Allylester **145** umgesetzt (Schema 38). Für die folgende Alkylierung wurde Verbindung **147** nach einer Vorschrift von *R. M. J. Liskamp*¹⁴¹ durch Schützung des Hydrobromids **146** mittels (Boc)₂O und Triethylamin synthetisiert. Die Alkylierung sollte zunächst durch Deprotonierung des Amids **145** mit Natriumhydrid bei -20 °C in THF und anschließender Zugabe von **147** erfolgen. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch kein Produkt erhalten werden. Die Alkylierung wurde stattdessen mit einem Überschuss von **147** in DMF und in der Gegenwart von Kaliumfluorid auf Aluminiumoxid¹⁴² durchgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeit erwies sich hierbei als abhängig von der Ansatzgröße. Während bei kleineren Ansätzen um 0.027 mmol

eine vollständige Reaktion nach 12 h beobachtet wurde, musste bei Ansätzen von 0.36 mmol bis 0.88 mmol die Reaktionszeit selbst bei starkem Rühren auf 48 h verlängert werden. Als Nebenreaktion wurde eine teilweise Epimerisierung von **148** beobachtet. Die beiden Diastereomeren, welche im Verhältnis 4.6:1 für das gewünschte Produkt **148** auftraten, wurden nach Säulenchromatographie mittels HPLC getrennt.



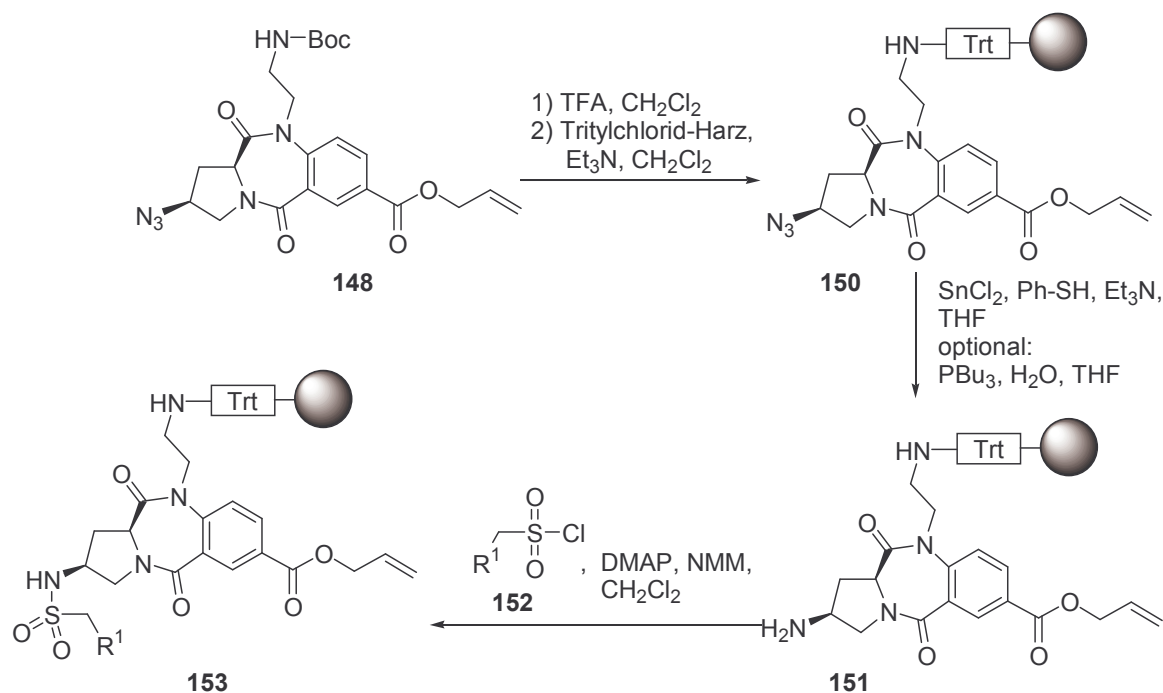
Schema 38: Veresterung und Alkylierung zum Benzodiazepindion **148**.

Nach beiden Aufreinigungen wurde **148** in 51 % Gesamtausbeute isoliert. Das zweite Diastereomer wurde in 13 % Ausbeute isoliert, die ¹H-NMR-Daten stehen im Einklang mit dem (2*S*, 11*aR*)-Produkt **149** bzw. mit seinem Enantiomer.

4.4.3 Parallelsynthese von lipidierten Benzodiazepindionen an der festen Phase

Von dem erhaltenen Produkt **148** wurde mit 50 % TFA in CH₂Cl₂ die Boc-Gruppe entfernt. Das Produkt wurde über die freie Aminogruppe unter basischen Bedingungen an einem polystyren-gebundenen Trityl-Linker immobilisiert (Schema 39). Um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten, wurde ein dreifacher Überschuss der Tritylgruppen verwendet. Das festphasengebundene Produkt **150** konnte nun mittels sequenzieller Freisetzung der

funktionellen C- und N-terminalen Gruppen und deren Umsetzung zu den entsprechenden Amid-Bindungen verlängert und derivatisiert werden.

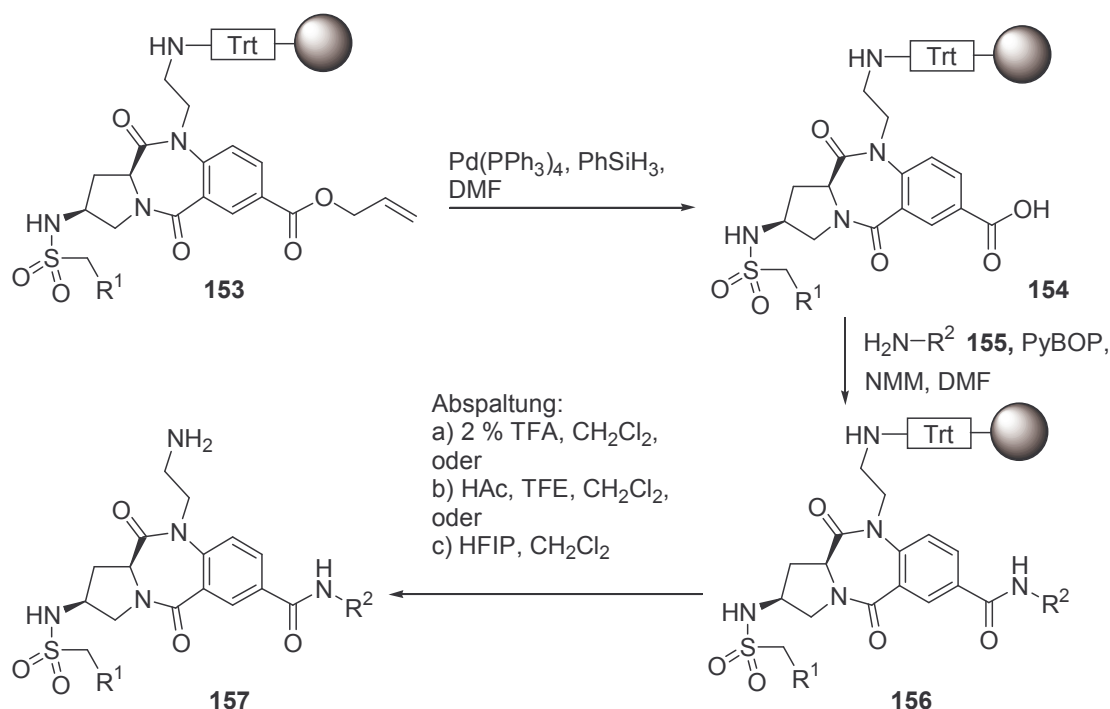


Schema 39: Immobilisierung auf dem polymeren Träger, Reduktion und Umsetzung zum Sulfonamid **153**. R¹: die verschiedene Alkylketten C₃H₇, C₁₁H₂₃ und C₁₅H₃₁.

Die Reduktion der Azid-Gruppe auf dem polymeren Träger wurde mit Zinn(II)-chlorid, Thiophenol und Triethylamin in THF analog zu der Vorschrift von *J. A. Ellman*¹⁴³ durchgeführt. Ein quantitativer Umsatz kann in vergleichbarer Effizienz auch mit PBu₃ und H₂O in THF erreicht werden. Die Staudinger-Reaktion unter Verwendung von PPh₃ und H₂O verlief dagegen nicht erfolgreich, es wurde hierbei nur Edukt erhalten. Nachdem die Azid-Gruppe zur sekundären Amino-Gruppe (**151**) reduziert worden war, konnte der erste Sulfonsäurechlorid-Baustein als Sulfonamid angeknüpft werden. Einfache Umsetzung mit dem entsprechenden Sulfonylchlorid **152** und Triethylamin führten zu Produktgemischen. Die zusätzliche Zugabe von DMAP oder HOBt war für die Kupplung zum Sulfonamid erforderlich. Die hier gewählten Kupplungsbedingungen mit Alkylsulfonylchlorid, NMM und DMAP richteten sich nach einem Protokoll von *C. Gennari*.¹⁴⁴ Während für die Testreaktion mit Methylsulfonylchlorid eine Kupplung für eine quantitative Acylierung ausreichte, benötigten Analoga mit längerer Alkylkette Mehrfachkupplungen. Dieses ist vermutlich auf die Zersetzung des Sulfonylchlorids unter basischen Bedingungen zurückzuführen. Insgesamt wurden kommerziell erhältliches Butylsulfonylchlorid, Dodecylsulfonylchlorid und

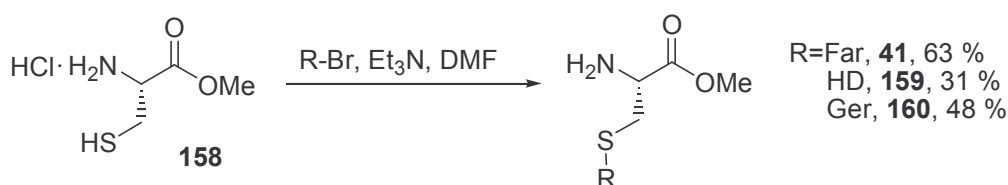
Hexadecylsulfonfylchlorid zur Darstellung von Butylsulfonamiden, Dodecylsulfonamiden und Hexadecylsulfonamiden verwendet.

Nachdem die N-terminale Sulfonamidgruppe eingeführt war, wurde nun C-terminal verlängert (Schema 40). Der Allylester in **153** wurde unter Palladiumkatalyse in Gegenwart von Phenylsilan gespalten. Die freie Carboxylgruppe in **154** wurde anschließend mit verschiedenen Amin-Bausteinen **155** unter Verwendung von den in Kapitel 4.1 beschriebenen Bedingungen mit dem Kupplungsreagenz PyBOP und in Gegenwart von NMM als Base verknüpft.



Schema 40: C-terminale Verlängerung und Abspaltung vom Trityl-Linker. R²: Reste der verschiedenen Amin-Bausteine **155**.

Die eingesetzten Amine waren kommerziell erhältlich, die Aminosäuremethylester wurden entweder ebenfalls kommerziell erworben oder selbst synthetisiert. Die Darstellung von Cys((Far)-OMe **41** und Cys(HD)-OMe **159** wurde nach bekannten Verfahren durchgeführt,¹²⁶ die Bedingungen zur Synthese von Cys(Ger)-OMe **160** entsprachen denen für Cys(Far)-OMe (Schema 41).

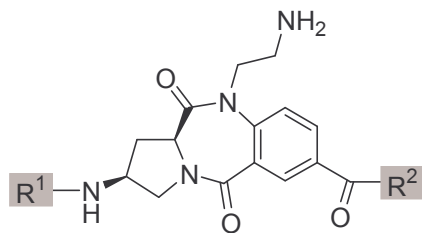


Schema 41: Synthese der verschiedenen lipidierten Cysteinmethyl ester **41**, **159** und **160**.

Nachdem beide Bausteine **152** und **155** angekuppelt waren, wurde das gewünschte Produkt **157** im letzten Schritt der Synthese von der festen Phase abgespalten. Die Abspaltungsbedingungen richteten sich nach den eingeführten Aminbausteinen. Als Standardprotokoll wurde die mehrfache Behandlung des Harzes mit 2 % TFA in CH₂Cl₂ verwendet. Diese Bedingungen eigneten sich jedoch nicht für die prenylierten Cysteinbausteine. Weitere Testabspaltungen zeigten, dass in diesem Fall selbst bei 1 % TFA in CH₂Cl₂ schon eine signifikante Zersetzung des Produktes beobachtet werden kann. Produkte mit Cysteinbausteinen wurden daher generell unter milderer Bedingungen mit Essigsäure und TFE in CH₂Cl₂ oder mit Hexafluor-*iso*-propanol (HFIP) in CH₂Cl₂ abgespalten. Die Aufreinigung aller Produkte erfolgte mittels präparativer HPLC unter Verwendung von C4- oder C18-RP-Säulen.

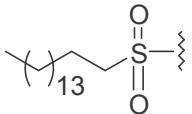
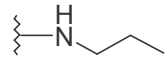
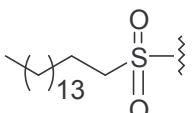
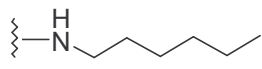
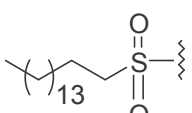
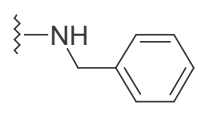
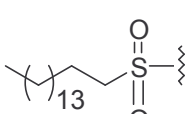
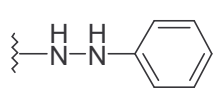
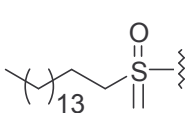
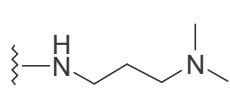
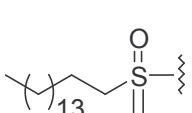
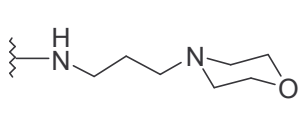
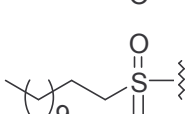

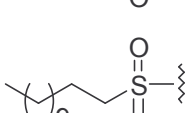

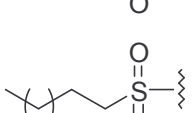
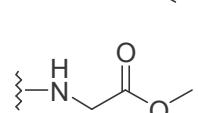

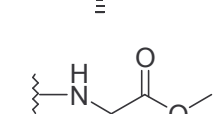
Die synthetisierten Benzodiazepindione mit N-terminaler Sulfonamid-Gruppe sind in Tabelle 6 dargestellt. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die letzten sieben Schritte, ausgehend von dem geschützten Benzodiazepindion **148** und nachfolgender Aufreinigung mittels präparativer HPLC. Sie sind das Resultat aus der Effizienz der einzelnen Schritte am polymeren Träger sowie der Chromatographieigenschaften des Produktes. Die Ausbeute variiert von 16 % bis 59 %.

Als C-terminale Komponenten wurden zwei Arten von hydrophoben Amin-Bausteinen verwendet: zum einen, entsprechend der Leitstruktur, unterschiedlich lipidierte Cysteine (vgl. Verbindungen **165**, **166**, und **167**) und, zur Vereinfachung der Molekülstruktur, Alkylamine (vgl. Verbindung **168** und **169**). Zum zweiten wurden auch Amine verwandt, die flache, aromatische Gruppen beinhalten (vgl. Verbindung **164**, **170** und **171**). Eine Analyse der Kristallstruktur von APT1 zeigte, dass sich im aktiven Zentrum weitere saure Aminosäuren befinden (vgl. Kapitel 2.3.1). Diese Beobachtung lässt sich leicht mit der Tatsache in Einklang bringen, dass in den vorhergehenden Inhibitionstests Substanzen mit freier Aminogruppe deutlich aktiver waren. Zur Verstärkung dieses Effekts wurden darum zusätzlich Amin-Komponenten gewählt, welche eine weitere basische Gruppe tragen (vgl. Verbindungen **172** und **173**).

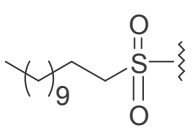
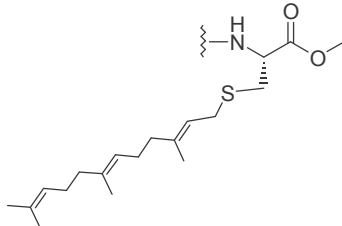
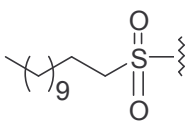
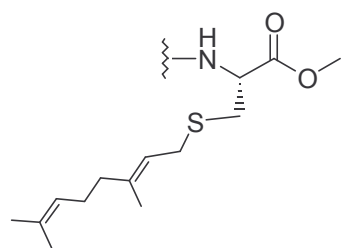
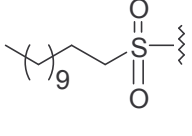
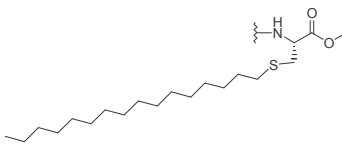
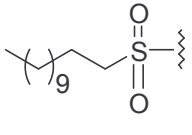
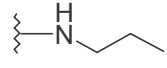
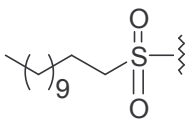
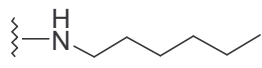
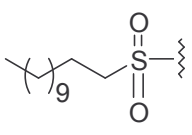
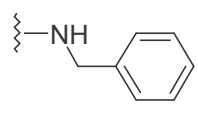
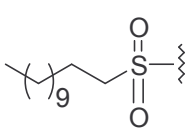
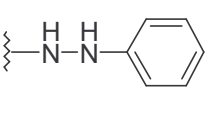
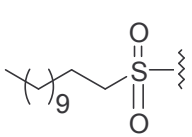
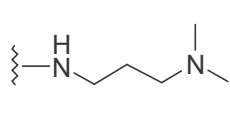
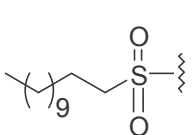
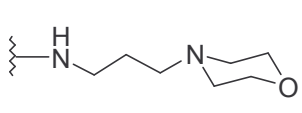


Eintrag	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute / [%]
1			161	16
2			162	68
3			163	16
4			164	27
5			165	59
6			166	57
7			167	28

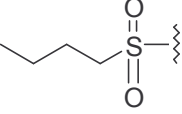

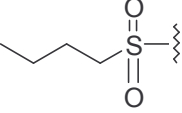
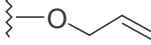
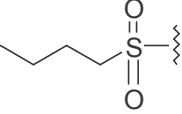
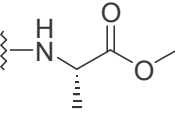
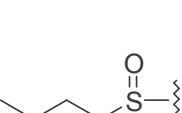
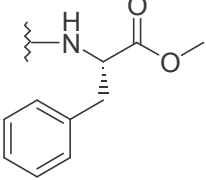
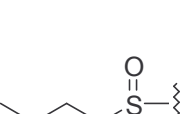
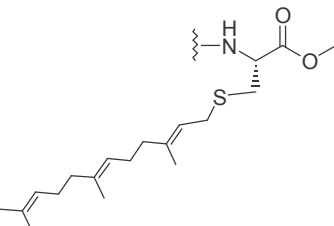
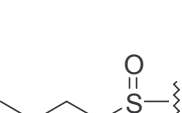
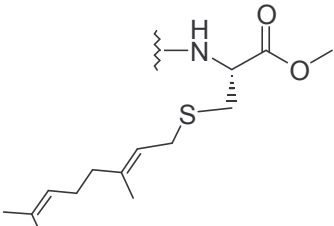
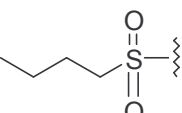
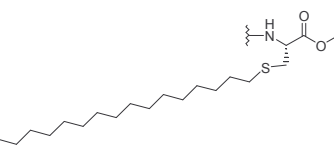
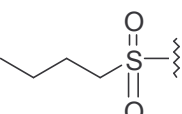
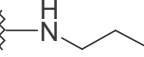
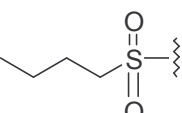
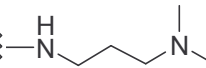
Tabelle 6: Synthetisierte Benzodiazepindione mit einem N-terminalen Sulfonamid. Die Ausbeute ist bezogen auf die letzten sieben Stufen und anschließender Aufreinigung mit präparativer HPLC.

Eintrag	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute / [%]
8			168	28
9			169	50
10			170	17
11			171	16
12			172	26
13			173	36
14			174	36
15			175	30
16			176	24
17			177	29

Fortsetzung Tabelle 6: Synthetisierte Benzodiazepindione mit einem N-terminalen Sulfonamid. Die Ausbeute ist bezogen auf die letzten sieben Stufen und anschließender Aufreinigung mit präparativer HPLC.

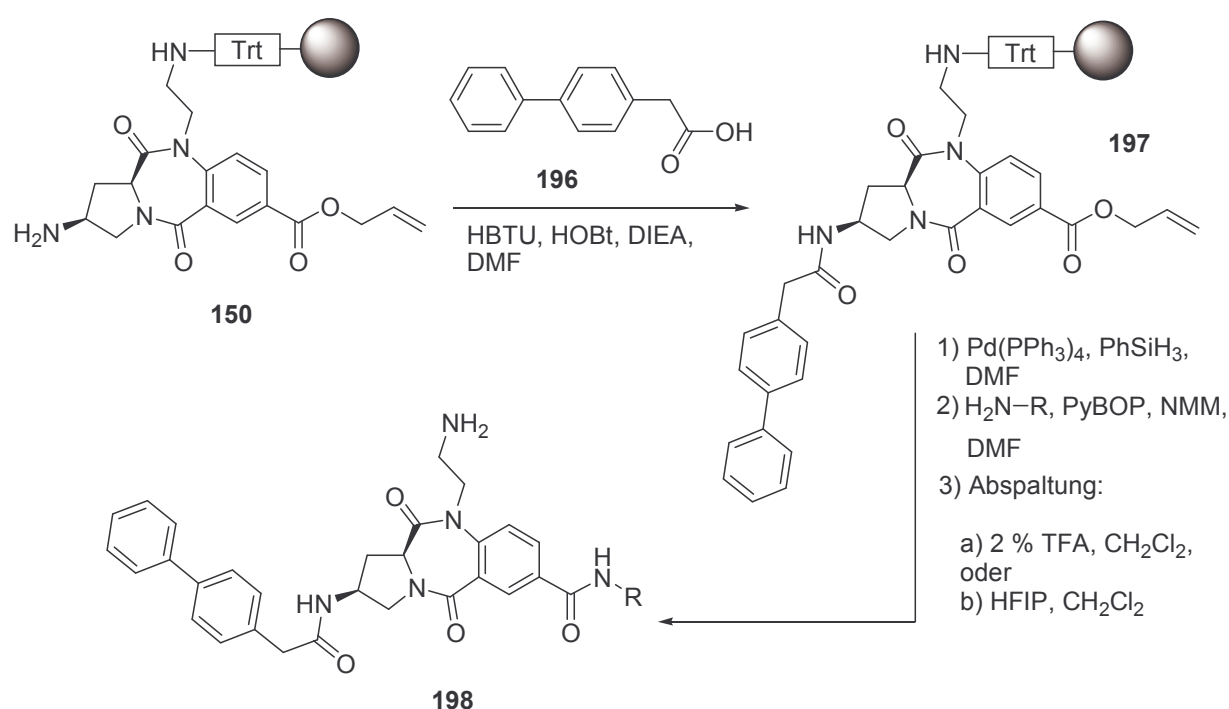
Eintrag	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute / [%]
18			178	16
19			179	30
20			180	52
21			181	22
22			182	36
23			183	32
24			184	25
25			185	35
26			186	31

Fortsetzung Tabelle 6: Synthetisierte Benzodiazepindione mit einem N-terminalen Sulfonamid. Die Ausbeute ist bezogen auf die letzten sieben Stufen und anschließender Aufreinigung mit präparativer HPLC.

Eintrag	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute / [%]
27			187	21
28			188	17
29			189	25
30			190	27
31			191	35
32			192	32
33			193	43
34			194	24
35			195	24

Fortsetzung Tabelle 6: Synthetisierte Benzodiazepindione mit einem N-terminalen Sulfonamid. Die Ausbeute ist bezogen auf die letzten sieben Stufen und anschließender Aufreinigung mit präparativer HPLC.

Nachdem Benzodiazepindione mit unterschiedlich langen hydrophoben Alkylketten, welche als Sulfonamide N-terminal an den Benzodiazepindion-Grundkörper geknüpft waren, synthetisiert waren, wurde als weitere lipophile C-terminale Komponente eine Biphenyl-Gruppe gewählt. Diese privilegierte Struktur ist in einer Reihe von Wirkstoffen zu finden und führt oftmals zu einer besonders günstigen Interaktion mit entsprechenden Proteinen.¹⁴⁵ Die Anknüpfung erfolgte über eine Amidbindung, die durch Kupplung von 4-Biphenyllessigsäure **196** an **150** mittels HBTU/HOBt-Protokoll gebildet wurde (Schema 42). In Analogie zu den oben diskutierten Schritten wurden insgesamt sieben Biphenyl-Benzodiazepindion-Konjugate **198** (Tabelle 7) erhalten. Die Ausbeute lag zwischen 23 % und 63 %.



Schema 42: Synthese von Benzodiazepindionen mit N-terminaler Biphenyl-Gruppe.

Durch eine effektive Kombination von Flüssig- und Festphasensynthese sind lipidierte Benzodiazepindione in insgesamt 14 Stufen zugänglich. Der Grundkörper wurde in Lösung dargestellt. Die Diversität wurde in den letzten Schritten der Synthese an der festen Phase eingeführt. Insgesamt wurden 42 verschiedene Benzodiazepindione synthetisiert. Der Abspaltung vom polymeren Träger folgte eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC. Ergebnisse zur inhibitorischen Aktivität der Substanzen auf APT1 waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht verfügbar.

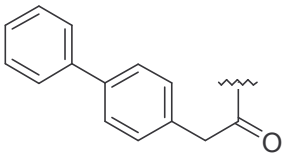

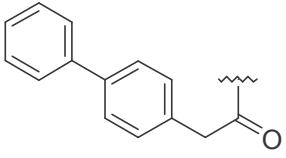
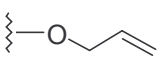
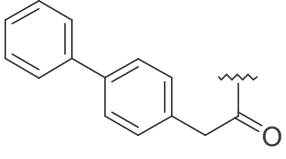
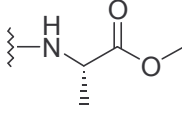
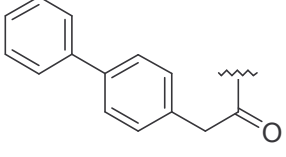
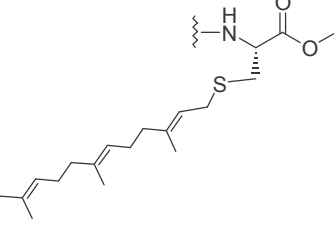
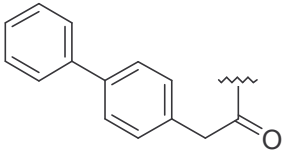
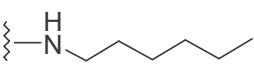
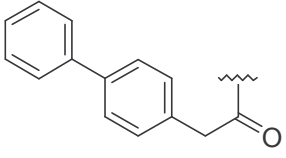
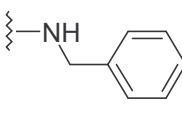
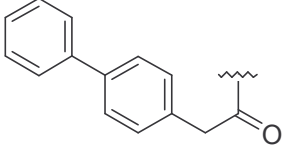
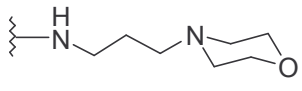
Eintrag	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute / [%]
1			199	23
2			200	41
3			201	63
4			202	41
5			203	50
6			204	43
7			205	60

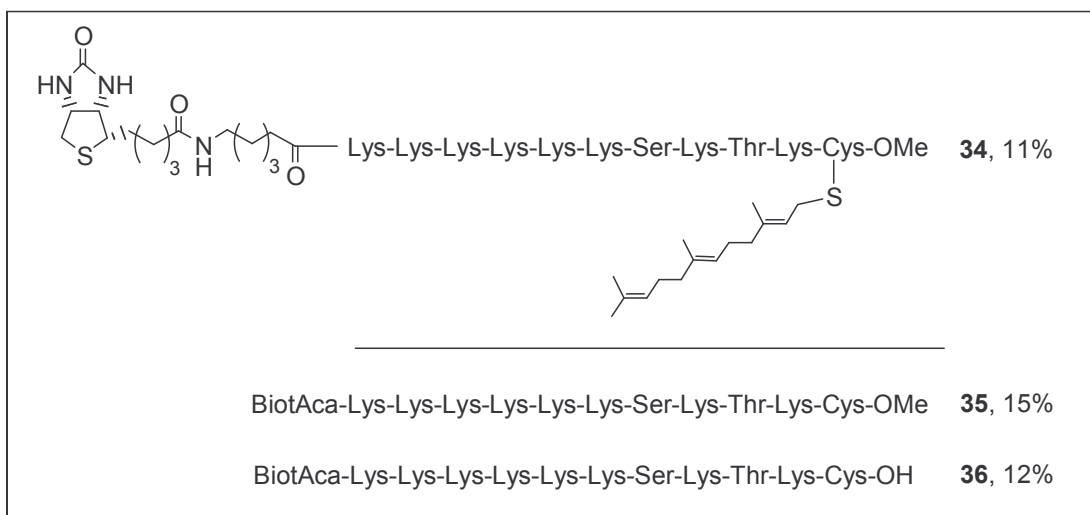
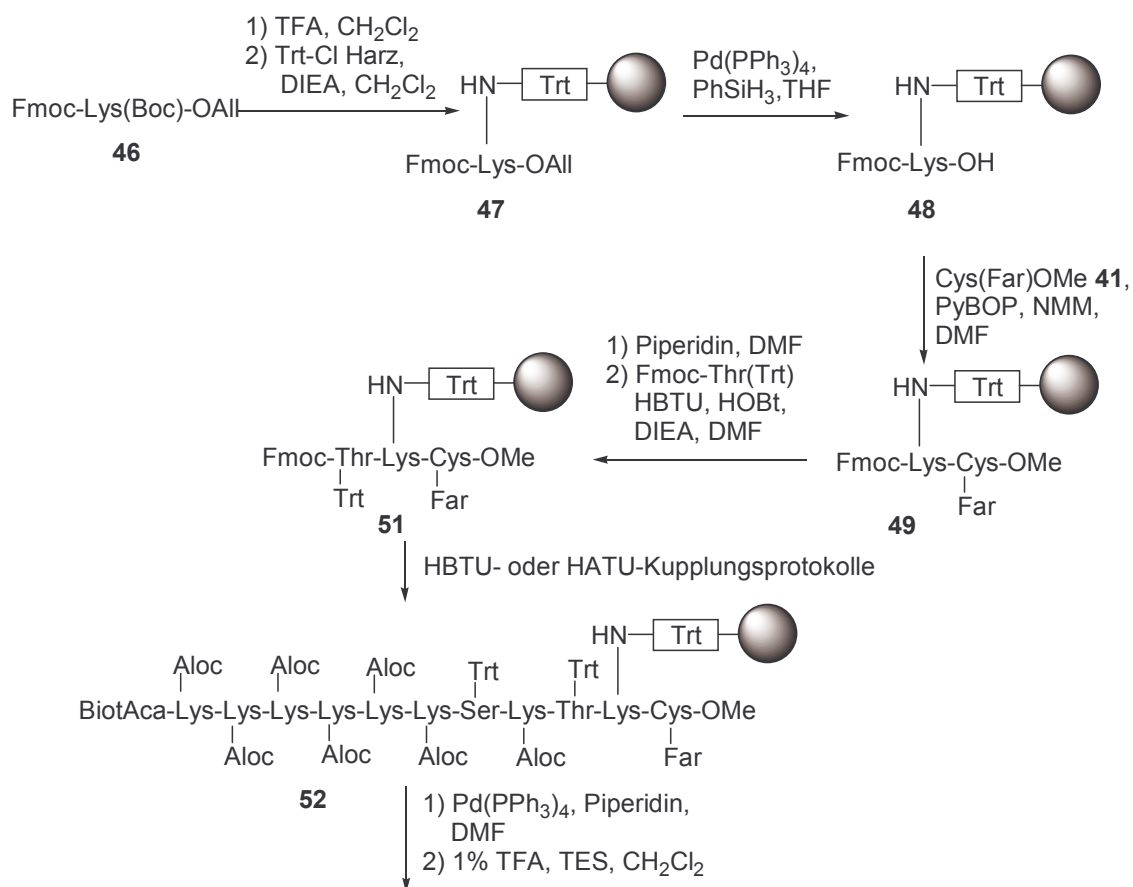
Tabelle 7: Synthetisierte Benzodiazepindione mit N-terminaler Biphenyl-Gruppe. Die Ausbeute ist bezogen auf die letzten sieben Stufen und anschließender Aufreinigung mit präparativer HPLC.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Maßgeschneiderte Lipopeptide in Kombination mit biophysikalischen und biologischen Methoden haben sich zur Aufklärung biologischer Fragestellungen im molekularen Detail als wichtige Hilfsmittel erwiesen. Ihre Synthese ist hingegen durch die Säureempfindlichkeit der Isoprenylthioethern und die Basenlabilität der Palmitoylthioester außerordentlich erschwert, insbesondere wenn *beide* Modifikationen im *selben* Peptid vorkommen. Zur Synthese muss daher auf sehr mild spaltbare Schutzgruppen zurückgegriffen werden. Bislang waren verschieden funktionalisierte und lipidierte Peptide nur über mehrstufige Lösungssynthesen unter Verwendung von z.B. enzym- oder palladium-spaltbaren Schutzgruppen zugänglich. In dieser Arbeit werden hierfür erstmals Festphasenmethodiken beschrieben. Die entwickelten Synthesen ermöglichen damit einen effizienten und schnellen Zugang zu unterschiedlichsten Lipopeptiden. Darüber hinaus wurde eine kombinatorische Festphasensynthese von lipidierten Benzodiazepindionen als Peptidomimetika etabliert. Als potentielle Inhibitoren der APT1 sollen diese Verbindungen zur Aufklärung der Funktion der APT1 in der Regulation von palmitoylierten Proteinen beitragen.

Erstes Ziel einer Festphasensynthese war die Darstellung des polybasischen, biotinylierten und farnesylierten C-Terminus von K-Ras4B **34**. Die beiden bislang in der Literatur beschriebenen Strategien zur Darstellung hatten sich als wenig zufriedenstellend herausgestellt bzw. sie waren gar nicht erfolgreich. Nachdem sich eine Fragmentkupplung aufgrund der sehr schlechten Lösungseigenschaften des entsprechend geschützten polybasischen Peptidfragmentes als unpraktikabel erwiesen hatte, wurde eine Synthesestrategie entwickelt, die einen vollständigen Aufbau des Zielpeptids an der festen Phase gestattet. Erst im letzten Schritt der Synthese fand die Abspaltung vom polymeren Träger statt. Dazu wurde vom Lysin **46** die Boc-Schutzgruppe entfernt und der Baustein mit der freien Amino-Gruppe der Lysinseitenkette über einen Trityl-Linker an die feste Phase angekuppelt (Schema 43). Die C-terminale Allylschutzgruppe wurde entfernt (Verbindung **48**) und der farnesylierte Cysteinmethylester **41** mit PyBOP als Kupplungsreagenz C-terminal zu **49** angekuppelt. Das festphasengebundene Dipeptid **49** wurde mittels Fmoc-Strategie und HBTU- oder HATU-Protokollen N-terminal zum biotinylierten, vollständig geschützten Undecapeptid **52** verlängert. Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen der Seitenketten fand auf dem polymeren Träger statt. Im letzten Schritt wurde das fertige Produkt unter sehr

milden sauren Bedingungen vom Trityl-Linker abgespalten. Nach präparativer HPLC wurde das Zielpeptid **34** in 11 % Gesamtausbeute erhalten.



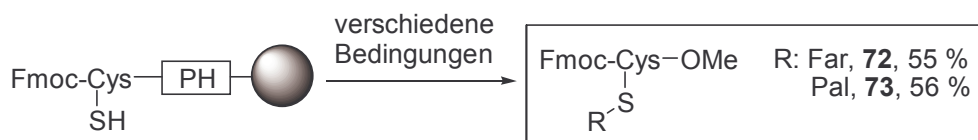
Schema 43: Festphasensynthese des farnesylierten, polybasischen C-Terminus von K-Ras4B **34**, sowie der polybasischen Peptide **35** und **36**.

Eine analoge Festphasenstrategie wurde zum Aufbau der nicht-farnesylierten polybasischen Peptide **35** und **36** verwendet. Für die Synthese von **35** wurde anstatt des farnesylierten

Cysteinmethylesters ein Trityl-geschützter Cysteinmethylester für die Kupplung zum festphasengebundenen Dipeptid verwendet. Nach Aufreinigung durch HPLC konnte das Peptid **35** in 15 % Ausbeute erhalten werden. Peptid **36** wurde mittels C-terminaler Anknüpfung an einem 2-Chlortrityl-Linker in 12 % Gesamtausbeute synthetisiert.

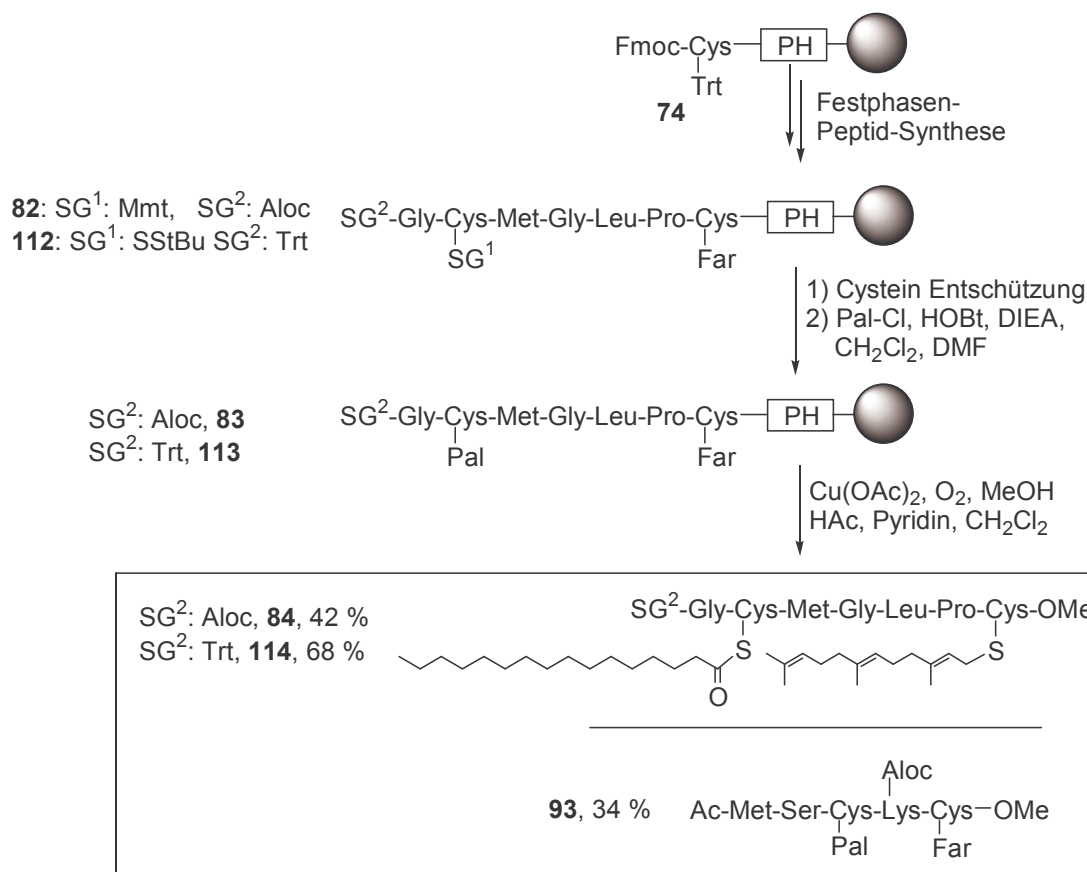
Der Schlüsselschritt der sehr effizienten Synthese der K-Ras Peptide war die Anknüpfung des Peptids an die feste Phase über die Amino-Gruppe der Seitenkette. Die allgemeine Anwendbarkeit dieser Synthesestrategie ist damit auf Peptide beschränkt, deren C-Terminus, und dort idealerweise die zweite Aminosäure, eine zur Verankerung geeignete funktionelle Gruppe enthält. Eine breiter anwendbare Festphasenmethodik wurde unter Verwendung des sehr mild oxidativ spaltbaren Phenylhydrazid-Linkers entwickelt, bei dem das Peptid C-terminal an die feste Phase gebunden ist und im Abspaltungsschritt sowohl als Säure wie auch als Ester abgespalten werden kann.

Zunächst wurden Bedingungen gefunden, die eine zuverlässige Lipidierung von Cystein-Bausteinen an der festen Phase gewährleisten. Der Phenylhydrazid-Linker gestattet sehr milde Abspaltungsbedingungen von leicht sauer bis basisch und ermöglichte den Zugang zu sowohl säureempfindlichen farnesylierten als auch basenlabilen palmitoylierten Cysteinen (Schema 44).



Schema 44: Darstellung von farnesylierten oder palmitoylierten fmoc-geschützten Cysteinmethylestern.

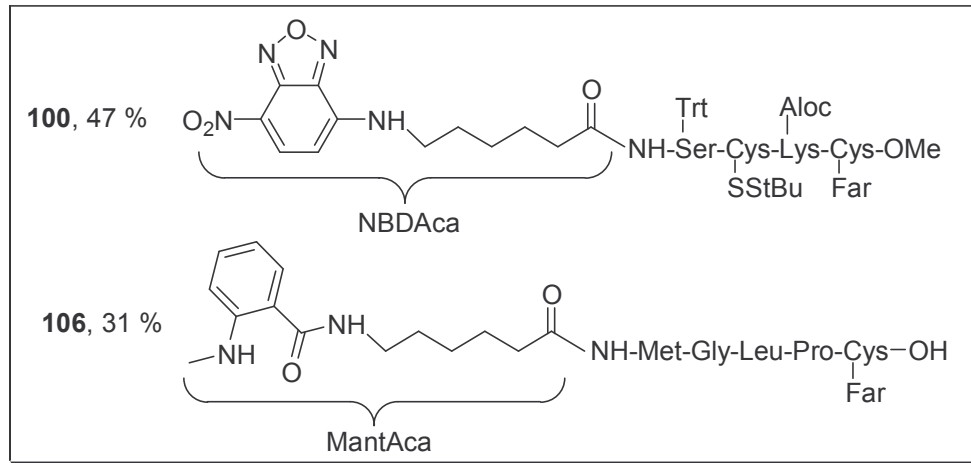
Weiterhin wurden insbesondere die Verwendung von Mmt- und *tert*-Buthio-Schutzgruppen als temporäre Schutzgruppen für die Cysteinseitenkette in der Lipopeptid-Festphasensynthese etabliert. Die Kombination der entwickelten Festphasenmethodiken erlaubte die Darstellung von farnesylierten und gleichzeitig palmitoylierten Lipopeptiden, welche den C-Termini von Ras-Proteinen entsprechen (**84**, **114** und **94**, Schema 45). Ausgehend von festphasengebundenem Cystein **74** wurden durch Fmoc-Strategie und Farnesylierung auf dem polymeren Träger die Heptapeptide **82** und **112** aufgebaut. Die Cystein-Schutzgruppe wurde im Fall von Mmt mittels schwacher Säure und im Fall von SStBu reaktiv mittels $\text{PBu}_3/\text{H}_2\text{O}$ entfernt. Die freie Thiolgruppe wurde am polymeren Träger palmitoyliert.



Schema 45: Synthese von farnesylierten und palmitoylierten Peptiden.

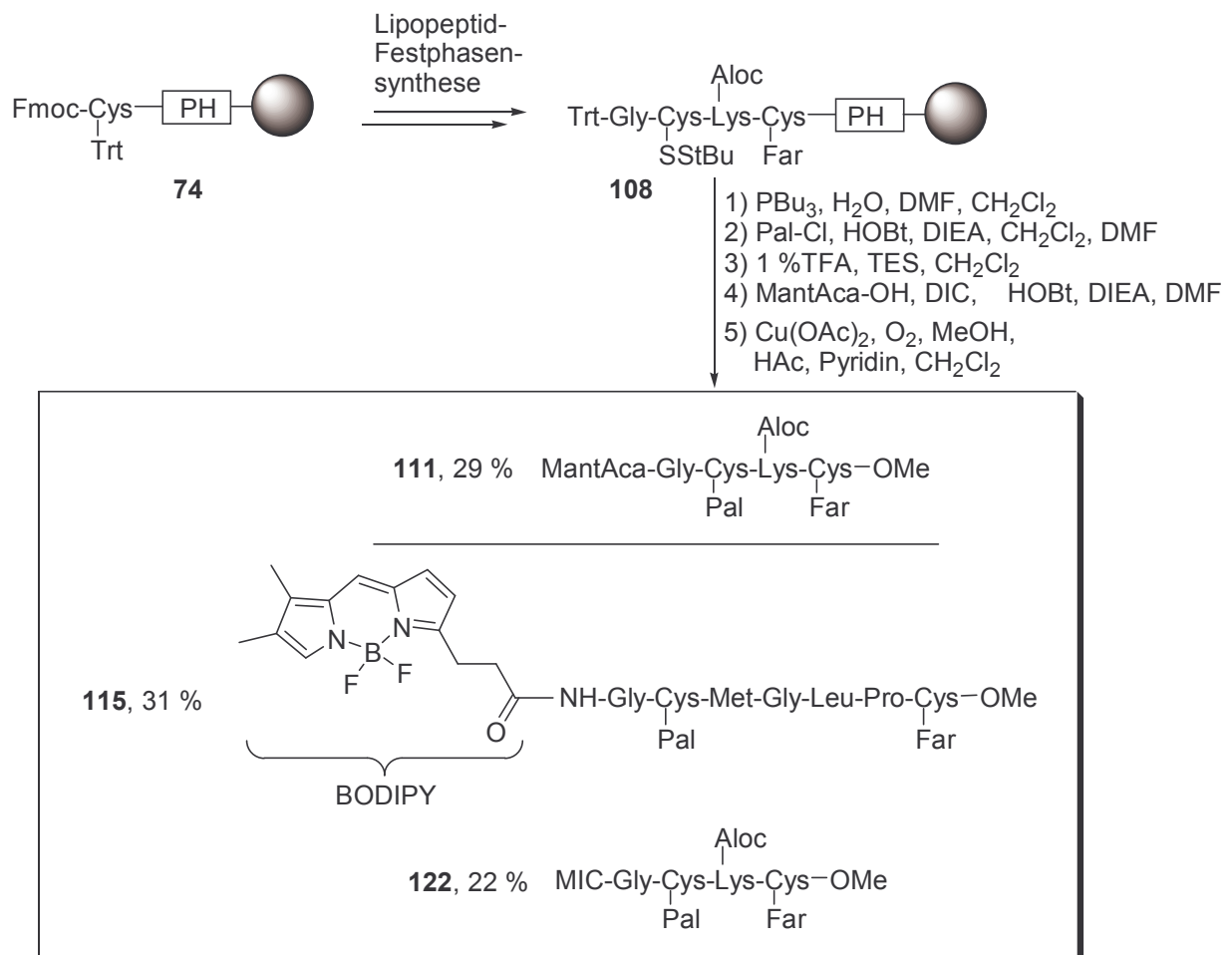
Nach Abspaltung der doppelt lipidierten Peptide in einem Essigsäure-Pyridin-Puffer wurden die Zielpeptide **84**, **114** und (nach einer analogen Synthese) **93** in 34 % bis 68 % Ausbeute erhalten. Die hier entwickelte Lipopeptid-Festphasensynthese bietet bei einer vergleichbaren Ausbeute einen wesentlich schnelleren Zugang zu dem gewünschten Zielpeptid als Lösungssynthesen. Braucht man in der Lösungssynthese für einige Lipopeptide oft mehrere Wochen, so ist mit den hier entwickelten Methoden eine Synthese im Multimilligramm-Maßstab in wenigen Tagen realisierbar.

Da für biophysikalische und biologische Untersuchungen die Einführung von Fluoreszenzgruppen von großer Bedeutung ist, wurde die Kompatibilität des Phenylhydrazid-Linkers zu Mant und NBD-Fluoreszenzgruppen gezeigt. Diese wurden in den letzten Schritten der Synthese an die farnesylierten Peptide angekuppelt. In Schema 46 sind zwei der synthetisierten Peptide gezeigt. Durch Verwendung von Wasser als Nukleophil bei der Abspaltung war neben dem Methylester auch die Peptidsäure **106** zugänglich.



Schema 46: Beispiele für synthetisierte fluoreszenzmarkierte und farnesylierte Peptiden.

Die Darstellung von farnesylierten und gleichzeitig palmitoylierten Peptiden, welche eine zusätzliche Fluoreszenz-Gruppe tragen, ist in Schema 47 am Beispiel von **111** gezeigt. Das farnesylierte und geschützte Tetrapeptid **108** wurde an der festen Phase aufgebaut.

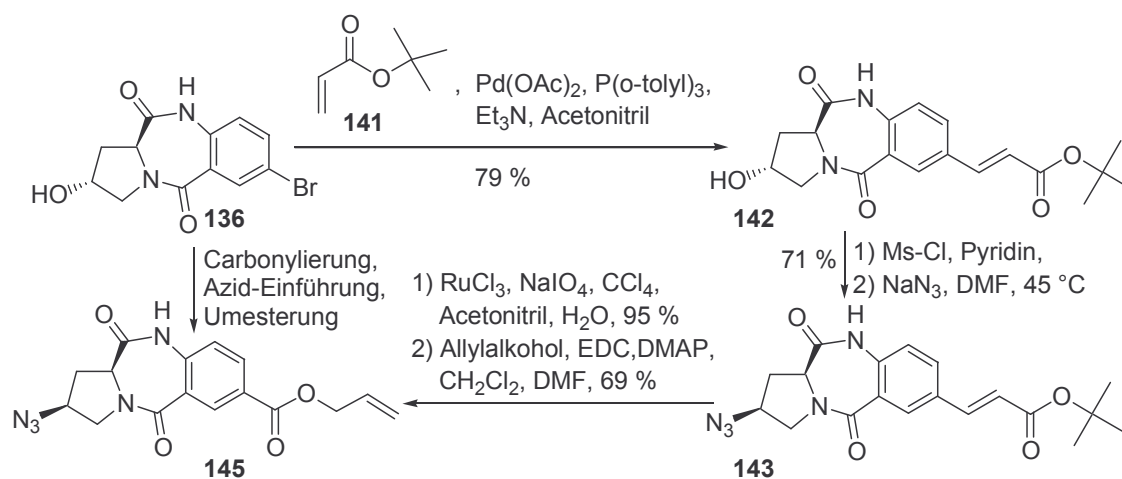


Schema 47: Synthese von zweifach-lipidierten und fluoreszenz- oder MIC markierten Peptiden.

Die *tert*-Buthio-Schutzgruppe des Cysteins wurde reduktiv entfernt und das freie Thiol palmitoyliert. Anschließend wurde die Trityl-Schutzgruppe von der N-terminalen Amino-Gruppe unter milden sauren Bedingungen entfernt und die Mant-Gruppe angekuppelt. Nach Abspaltung vom polymeren Träger wurde das Peptid **111** in 29 % Gesamtausbeute erhalten. Eine analoge Strategie wurde bei der Synthese des Peptids **122**, welches eine MIC-Gruppe für die spätere Ankupplung der Lipopeptide an exprimierte Peptide enthält, verwendet. Die BODIPY-Fluoreszenz-Gruppe stellte sich dagegen als nicht kompatibel mit den Abspaltungsbedingungen des Phenylhydrazid-Linkers heraus. Zur Synthese von **115** wurde das entsprechend N-terminal Trityl-geschützte Peptid vom polymeren Träger abgespalten und das BODIPY in einem zweistufigen Entschützungs- und Kupplungsprozess in Lösung an die Peptidkette angehängt.

Die Verwendung der Synthesemethodik des Phenylhydrazid-Linkers ermöglichte einen effizienten und schnellen Zugang zu einer Vielfalt unterschiedlicher, optional auch fluoreszenz- oder MIC-markierter, säure- und basenlabiler Lipopeptide. Zusammen mit der Synthese des extrem hochfunktionalisierten, polybasischen K-Ras-Peptids **34** wurden damit zwei leistungsfähige, sich hervorragend ergänzende Synthesemethoden für die Darstellung unterschiedlicher lipidierter Peptide entwickelt. Diese sollten den Zugang zu Lipopeptiden für nachfolgende biophysikalische und biologische Untersuchungen erheblich vereinfachen und beschleunigen.

Eine ähnliche Synthesestrategie wie zur Synthese von **34** wurde bei der kombinatorischen Festphasensynthese von lipidierten Benzodiazepindionen als Peptidomimetika verwendet. Diese Substanzen sind für nachfolgende Tests auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber APT1, einem Enzym welches Peptide und Proteine depalmitoyliert, synthetisiert worden. Ausgehend vom Benzodiazepin **136** wurde zunächst eine palladium-katalysierte Carbonylierungsreaktion verwendet, die zum Methylester führt. Nach Einführung der Azid-Gruppe erwies sich die nachfolgende Umesterung zum Allylester **145** jedoch als problematisch. Neben einer schlechten Umsetzung wurde eine Epimerisierung des Produktes beobachtet. Daraufhin wurde die Einführung des Allylesters mit einer dreistufigen Synthesesequenz, bestehend aus Heck-Reaktion, oxidativer Doppelbindungsspaltung und Veresterung mittels EDC und DMAP, erreicht (Schema 48).

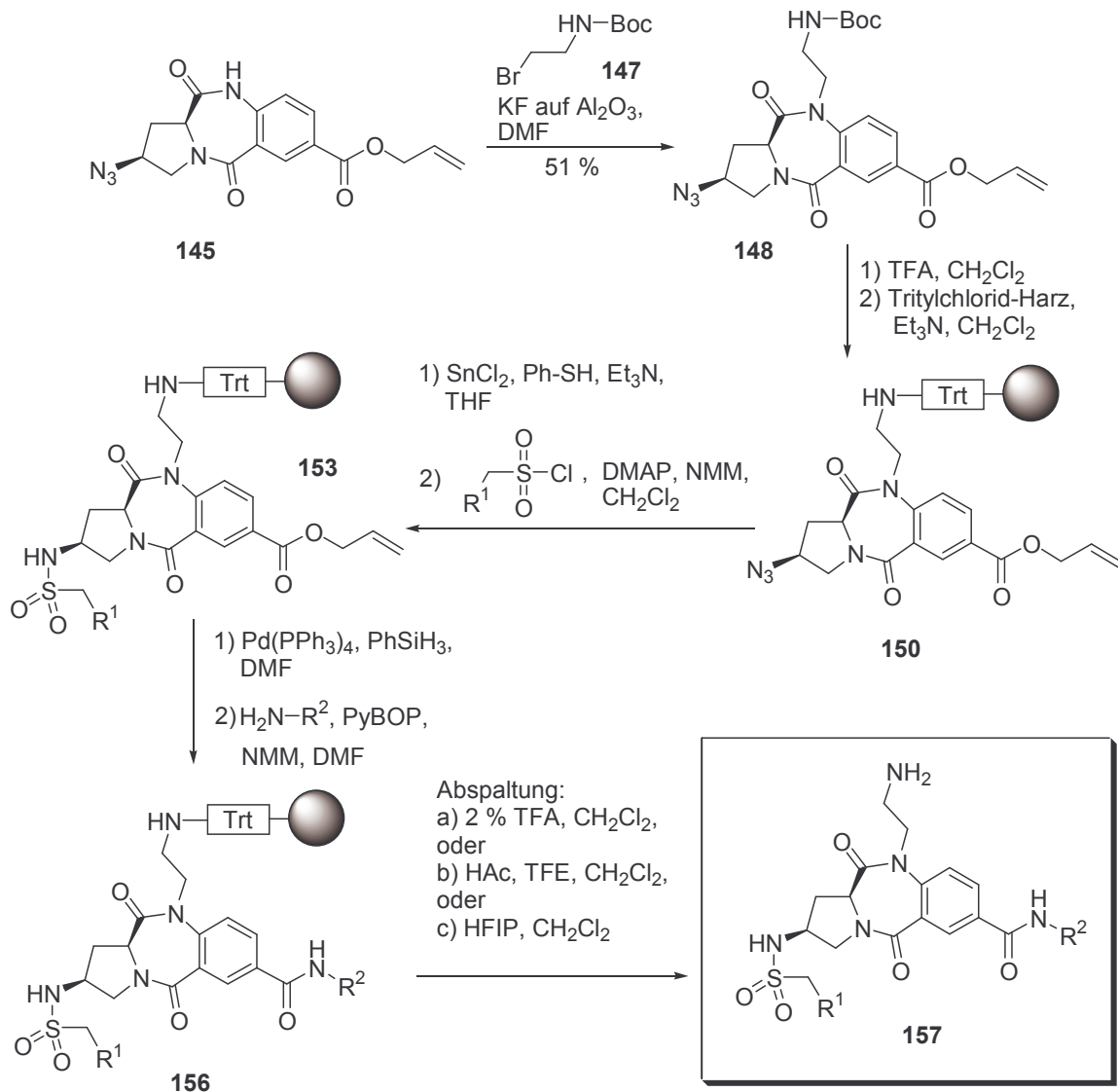


Schema 48: Lösungssynthese von Benzodiazepindion **145**.

Die Alkylierung des Amids **145** mit **147** wurde in der Gegenwart von KF auf Al₂O₃ durchgeführt (Schema 49). Die Boc-Gruppe wurde entschützt und das Produkt über die freie Amino-Gruppe an Trityl-Harz angeknüpft (Verbindung **148**). Nach Reduktion des Azids mit Zinn(II)-chlorid und Thiophenol wurde durch Mehrfachkupplungen mit DMAP und dem entsprechenden Sulfonylchlorid das festphasengebundene Sulfonamid **153** gebildet. Der Allylester wurde mit Palladium(0) entfernt und die freie Säure mit PyBOP, NMM und einem Aminbaustein zum festphasengebundenen Benzodiazepindion **156** verlängert. Die Abspaltung wurde, abhängig vom Aminbaustein, unter leicht sauren Bedingungen mit TFA, Essigsäure oder HFIP durchgeführt. Alle Produkte **157** wurden durch präparative HPLC gereinigt.

Über die letzten sieben Stufen und nach Aufreinigung betrug die Ausbeute zwischen 16 % bis 59 %. Diese Syntheseroute erlaubte so durch eine Kombination von Flüssig- und Festphasensynthese in insgesamt 14 Stufen einen effizienten und schnellen Zugang zu lipidierten Benzodiazepindionen. Anstelle von Sulfonamiden wurden zudem Biphenyl-Bausteine über eine Amidbindung angekuppelt. Insgesamt wurden 42 Zielverbindungen synthetisiert (allgemeine Struktur in Abbildung 30).

Der nächste Schritt wird die Bestimmung des inhibitorischen Potentials der Verbindungen für APT1 sein. Verbindung **161** wird für Kokristallisationsexperimente mit exprimierter und gereinigter APT1 verwendet werden. In Verbindung mit Experimenten zur Bestimmung der Selektivität der besten Inhibitoren sollen weitere Zelltests zur Aufklärung der biologischen Rolle der APT1 folgen.



Schema 49: Alkylierung, Anknüpfung an die feste Phase, Bildung des Sulfonamids **153** und Abspaltung der Benzodiazepindione **157**.

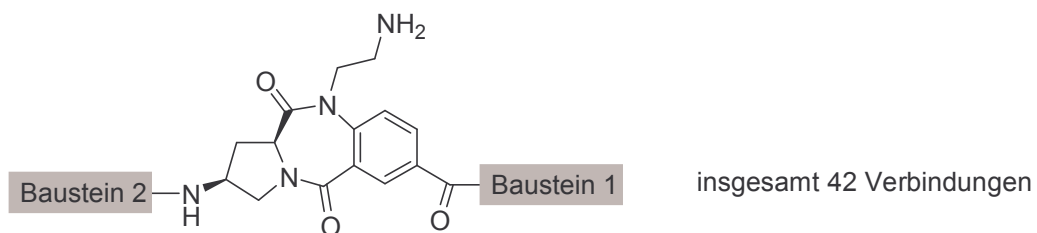


Abbildung 26: Allgemeine Struktur der synthetisierten lipidierten Benzodiazepindione.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

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

Varian Mercury 400 400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR

Bruker DRX 500 500 MHz ^1H -NMR, 125.8 MHz ^{13}C -NMR.

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$ ppm) als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, ddd = Dublett vom Doppeldublett, t = Triplett, m = Multiplett, br = breites Signal, m_{verd} = Signal teilweise vom Lösungsmittel verdeckt

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 oder 241 bestimmt und beziehen sich auf die Na-D-Linie. Die Lösungsmittel und Konzentrationen (in g/100 ml) sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Die UV-Vis-Spektren wurden auf einem Cary 50 UV-Vis-Spektrometer der Firma Varian gemessen.

Schmelzpunkte wurden auf einem Schmelzpunktmessgerät Büchi 530 bestimmt und sind unkorrigiert angegeben.

FAB-Massenspektren wurden mit einem Jeol SX 102A aufgenommen. Die Messung der MALDI-TOF Massenspektren erfolgte auf einer Voyager-DE Pro BioSpectrometryTM Workstation der Firma PerSeptive Biosystems mit 2,5 Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) als Matrix.

Chromatographie:

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumplatten, beschichtet mit Kieselgel 60_{F254}, der Firma Merck verwendet. Die entsprechenden Laufmittel und R_f -Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und die folgenden Anfärbereagenzien verwendet:

Reagenz A: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser.

Reagenz B: 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure und 997 ml Ethanol.

Reagenz C: 5 g Kaliumpermanganat auf 100 g Wasser

Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Flash-Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße 40-60 μm) mit einem Druck von 0.3- 0.8 bar.

HPLC-ESI-MS Spektren wurden mit einer Hewlett-Packard 1100 HPLC und einem Finnegan LCQ Massenspektrometer aufgenommen. Die Detektion erfolgte bei 210 nm, 254 nm und 301 nm. Alle Säulen stammten von der Firma Macherey-Nagel und wurden mit einem Gemisch von $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\%$ Ameisensäure / $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ Ameisensäure und einer Flussrate von 1ml/min betrieben. Einmal verwendete Gradienten sind direkt bei den einzelnen Substanzen angegeben. Mehrfach verwendete Gradienten sind im folgenden aufgeführt:

LCMS1: Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient: 0 min: 10:90; 35 min: 90:10.

LCMS2: Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient: 0 min: 20:80; 30 min: 100:0, 40 min: 100:0.

LCMS3: Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient: 0 min: 50:50; 30 min: 100:0, 40 min: 100:0.

LCMS4: Säule: Nucleosil 100-5 C18PPN, Gradient: 0 min: 10:90; 35 min: 90:10, 40 min: 90:10.

LCMS5: Säule: Nucleosil 100-5 C18PPN, Gradient: 0 min: 10:90; 30 min: 60:40, 34 min: 90:10.

LCMS6: Säule: Nucleodur C18 Gravity 3 μ , Gradient: 0 min: 10:90; 1 min: 10:90; 10 min: 0:100, 12 min: 0:100.

LCMS7: Säule: Nucleosil 100-5 C18 Nautilus, Gradient: 0 min: 1:99; 5 min: 5:95; 10 min: 15:85; 22 min: 95:5; 25 min 95:5.

LCMS8: Säule: Nucleosil 100-5 C8, Gradient: 0 min: 10:90; 35 min: 90:10.

Analytische HPLC Chromatogramme wurden mit einer Hewlett-Packard 1100 HPLC aufgenommen. Die Detektion erfolgte bei 210 nm und 254 nm. Alle Säulen stammten von der Firma Macherey-Nagel und wurden mit einem Gemisch von $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ und einer Flussrate von 1mL/min betrieben. Folgende Gradienten wurden verwendet:

HPLC1: Säule: Nucleosil 100-5 C18 PPN, Gradient: 0 min: 1:99:0.1; 30 min: 30:70:0.1.

HPLC2: Säule: Nucleosil 100-5 C8, Gradient: 0 min: 10:90:0.1; 35 min: 90:10:0.1.

HPLC3: Nucleosil 100-5 C18 PPN, Gradient: 0 min: 10:90:0.1; 35 min: 90:10:0.1.

HPLC4: Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient: 10:90:0.1; 3 min: 10:90:0.1; 23 min: 85:15:0.1; 26 min: 100:0:0.

HPLC5: Säule: Nucleosil 100-5 C18 Nautilus, Gradient: 0:100:0.1; 3 min: 0:100:0.1; 23 min: 70:30:0.1; 26 min: 100:0:0.

Für die präparative HPLC wurden Säulen der Firma Macherey-Nagel in folgenden Systemen verwendet:

P1: Varian Pro Star, Nucleosil 100-5 C18PPN; Detektion: 210 nm; Flussrate: 15 mL/min; Gradient: 0 min, (CH₃CN + 0.1 % TFA/H₂O + 0.1 % TFA): 5:95; 5 min: 5:95; 65 min: 60:40.

P2: Varian Pro Star, Nucleosil 100-5 C18PPN; Detektion: 210 nm; Flussrate: 15 mL/min; Gradient: (CH₃CN + 0.1 % Ameisensäure/H₂O + 0.1 % Ameisensäure): 0 min: 2:98; 8 min: 2:98; 15 min: 25:75; 55 min: 50:50.

P3: Varian Pro Star, Nucleosil 100-5 C18HD; Detektion: 210 nm; Flussrate: 4 mL/min; Gradient: (CH₃CN + 0.1 % TFA/H₂O + 0.1 % TFA): 0 min: 2:98; 8 min: 2:98; 45 min: 30:70.

P4: Varian Pro Star, Nucleosil 100-5 C18PPN; Detektion: 210 nm; Flussrate: 15 mL/min; Gradient: (CH₃CN + 0.1 % TFA/H₂O + 0.1 % TFA): 0 min: 10:90; 8 min: 10:90; 13 min: 30:70; 38 min: 60:40.

P5: Agilent (1100 Series), Nucleodur C18 Gravity 5 μ ; Detektion: 254 nm und 210 nm; Flussrate: 15 mL/min; Gradient: 0 min, (CH₃CN + 0.1 % TFA/H₂O + 0.1 % TFA): 45:55; 25 min: 56:44; 28 min: 100:0.

P6: Agilent (1100 Series), Nucleosil 120-7 C4; Detektion: 215 nm; Flussrate: 15 mL/min; Gradient: 0 min, (CH₃CN + 0.1 % TFA/H₂O + 0.1 % TFA): 20:80; 3 min: 20:80; 22 min: 100:0; 25 min: 100:0.

P7: Agilent (1100 Series), Nucleosil 120-7 C4; Detektion: 215 nm; Flussrate: 15 mL/min; Gradient: 0 min, (CH₃CN + 0.1 % TFA/H₂O + 0.1 % TFA): 10:90; 3 min: 10:90; 22 min: 100:0; 25 min: 100:0.

P8: Agilent (1100 Series), Nucleodur C18 Gravity 5 μ ; Detektion: 215 nm; Flussrate: 15 mL/min; Gradient: 0 min, (CH₃CN + 0.1 % TFA/H₂O + 0.1 % TFA): 10:90; 3 min: 10:90; 22 min: 100:0; 25 min: 100:0.

Das Lösungsmittel der Produktfraktionen wurde anschließend durch Lyophilisieren entfernt.

Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Bestimmung des Harz-Belegungsgrades von Fmoc-Gruppen mittels UV-Spektroskopie

Eine eingewogene Menge zwischen 5 und 10 mg Polymer wird mit 18 mL einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und für 10 min geschüttelt. Die UV-Absorption der Lösung bei 301 nm wird bestimmt. Die Konzentration und damit der Belegungsgrad lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnen ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

6.2 Versuche zur Synthese von K-Ras Peptiden

AAV 2: Abspaltung von einer Polymerprobe mit 1% TFA zwecks nachfolgender Analytik

Einige Harzkügelchen ($\leq 1 \text{ mg}$) werden abgenommen und fünfmal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Es wird 1 mL einer Lösung von 1 % TFA in CH_2Cl_2 hinzugefügt und für 1 h geschüttelt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Gemisch aus Methanol/Acetonitril 1:1 (v/v) aufgenommen.

AAV 3: Abspaltung von einer Polymerprobe mit 50% TFA zwecks nachfolgender Analytik

Einige Harzkügelchen ($\leq 1 \text{ mg}$) werden abgenommen und fünfmal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Es wird 1 mL einer Lösung von 50 % TFA und 5 % TES in CH_2Cl_2 hinzugefügt und für 1 h geschüttelt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Gemisch aus Methanol/Acetonitril 1:1 (v/v) aufgenommen.

AAV 4: Basenvermittelten Spaltung von Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppen an der festen Phase, Trityl-Linker

Das Polymer wird in einem Gemisch von 20 % Piperidin in DMF suspendiert und 10 min geschüttelt. Nach Abfiltrieren wird der Vorgang einmal wiederholt. Es wird anschließend fünfmal mit DMF gewaschen.

AAV 5: Aminosäurekupplung mit HATU/HOAt

Eine Lösung von 4 eq Aminosäure, 3.6 eq HATU, 4 eq HOAt und 8 eq DIEA in DMF wird für drei Minuten voraktiviert und dann zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird für 3 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen.

AAV 6: Blockierung der nach der Kupplung verbleibenden freien Aminogruppen

Das Polymer wird zweimal in einem Gemisch von 10 % Essigsäureanhydrid in Pyridin suspendiert und für jeweils 5 min geschüttelt. Nach dem zweiten Abfiltrieren wird mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen.

Fmoc-Lys(Boc)-OAlI (46)

Zu einer Lösung von 4.560 g (9.74 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-OH in trockenem Methanol werden langsam 1.587 g (4.87 mmol) Cäsiumcarbonat gegeben. Die Lösung wird für 10 min gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und mehrmals mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wird in 30 mL trockenem DMF aufgenommen, und 8.47 mL (97.4 mmol) Allylbromid werden zugetropft. Die Lösung wird 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt, durch Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie mit Essigester/Cyclohexan 1:10 und 1:2 (v/v) als Eluens.

Ausbeute: 4.330 g (8.50 mmol, 87 %, farbloser Feststoff)

$$[\alpha]_D^{20} = +1.2^\circ \text{ (CHCl}_3, c = 1.0)$$

Smp.: 124.0 °C

R_f = 0.25 (Essigester/Cyclohexan 1:10, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.68 (d, ³J=7.2 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.53 (d, ³J=7.2 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.32 (t, ³J=6.8 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.24 (t, ³J=7.2 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 5.87-5.78 (m, 1H, CH allyl), 5.35-5.32 (m, 1H, NH), 5.26 (d, 1H, ³J=17.6 Hz, CH=CH_{2a} allyl), 5.18 (d, ³J=10.0 Hz, CH=CH_{2b} allyl), 4.57-4.30 (m, 5H, α-CH Lys, CH₂-O Allyl, CH₂-O Fmoc), 4.15 (t, ³J=6.8 Hz, CH Fmoc), 3.03 (m, 2H, ω-CH₂ Lys), 1.82-1.79 (m, 1H, β-CH_{2a}), 1.67-1.63 (m, 1H, β-CH_{2b}), 1.5-1.2 (m, 13H, γ-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys, 3 × CH₃ Boc)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 172.4, 156.3, 156.2, 144.1, 144.0, 141.5, 131.7, 127.9, 127.3, 125.3, 120.3, 119.3, 79.5, 67.3, 66.2, 54.0, 47.4, 40.5, 32.4, 29.8, 28.6, 22.6

LC-MS (LCMS1): ber. [M+Na] 531.3 gef. 531.2, R_t = 20.65 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{29}H_{37}N_2O_6$ $[M+H]^+$: ber.: 509.2652; gef.: 509.2675
 $C_{29}H_{36}N_2O_6$ (508.61)

Beladung von Trityl-Harz: Fmoc-Lys(-NH-Trt-Harz)-OAll 47

Zu 0.500 g (0.983 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-OAll wird eine Lösung von 50 % TFA in CH_2Cl_2 gegeben. Es wird 3 h gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und für 15 h im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 20 mL CH_2Cl_2 aufgenommen, mit 0.650 mL (3.822 mmol) DIEA versetzt und zu 1.250 g (Beladung $1.47 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 2.701 mmol reaktive Gruppen) Tritylchlorid-PS-Harz gegeben. Die Reaktionsmischung wird 3.5 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und dreimal mit einem Gemisch von CH_2Cl_2 /MeOH/DIEA 34:4:1 (v/v/v), dreimal mit CH_2Cl_2 , dreimal mit DMF und wieder dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Es wurden 1.564 g Harz **47** erhalten. Die Beladung wurde mittels UV-Spektroskopie (AAV 1) zu $0.49 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ bestimmt.

Testabspaltung nach AAV 2:

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient: 0 min: 10:90:0.1; 35 min: 90:10:0.1): $R_t = 7.33 \text{ min}$

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 409.2, gef. 409.2

Allyl-Entschützung zu Fmoc-Lys(-NH-Trt-Harz)-OH 48

Eine Lösung von 0.234 mL (1.898 mmol) $PhSiH_3$ und 7.7 mg (0.007 mmol) $Pd(PPh_3)_4$ in 10 mL THF wird zu 0.255 g (Beladung $0.49 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.125 mmol reaktive Gruppen) Harz **47** gegeben und für 12 h geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und jeweils fünfmal mit THF, CH_2Cl_2 , DMF and CH_2Cl_2 /MeOH, und wieder CH_2Cl_2 gewaschen. Die Beladung des erhaltenen Harzes **48** wird nach AAV 1 zu $0.41 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ bestimmt.

Testabspaltung nach AAV 2:

HPLC (HPLC2): $R_t = 13.12 \text{ min}$

LC-MS (LCMS1): ber. $[M+H]^+$ 369.2, gef. 369.1, $R_t = 13.8 \text{ min}$

Fmoc-Lys(-NH-Trt-Harz)-Cys(Far)-OMe 49

Zu dem gesamten Harz **48** wird eine Lösung aus 169 mg (0.500 mmol) Cys(Far)-OMe, 260 mg (0.500 mmol) PyBOP und 0.500 mL (4.548 mmol) NMM in 12 mL DMF gegeben.

Es wird für 3 h geschüttelt, das Harz **49** abfiltriert und jeweils fünfmal mit CH₂Cl₂ und DMF gewaschen.

Testabspaltung nach AAV 2:

HPLC (HPLC2): R_t = 28.93 min

LC-MS (LCMS8): ber. [M+H]⁺ 690.4, gef. 690.3, R_t = 30.66 min

Fmoc-Thr(Trt)-Lys(-NH-Trt-Harz)-Cys(Far)-OMe 51

Von Harz **49** werden mittels Piperidin die Fmoc-Gruppen entfernt (modifizierte AAV **4**: die Reaktionszeit wird auf zweimal 4 min verkürzt.) Die anschließende Kupplung wird ohne Verzögerung durchgeführt: eine voraktivierte Lösung von 292 mg (0.500 mmol) Fmoc-Thr(Trt)-OH, 171 mg (0.450 mmol) HBTU, 77 mg (0.500 mmol) HOBt und 171 µL (1.000 mmol) DIEA in 15 mL DMF wird zum Polymer gegeben, und es wird für 2 h geschüttelt. Das Polymer wird jeweils fünfmal mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen.

Testabspaltung nach AAV 2:

HPLC (HPLC2): R_t = 28.17 min

LC-MS (LCMS1): ber. für Fmoc-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe [M+H]⁺ 791.4, gef. 791.3, R_t = 30.51 min

BiotAca-[Lys]₆-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe 34

Das festphasengebundene Tripeptid (Harz **51**) wird unter Verwendung von HATU/HOAt-Protokollen (AAV **4** und AAV **5**) in 16 Schritten zum festphasengebundenen Undecapeptid verlängert. Nach Kupplung der ersten sechs Aminosäuren wird jeweils ein *Capping*-Schritt (AAV **6**) durchgeführt. Die Kupplung von BiotAca-OH erfolgt ebenfalls mit dem HATU/HOAt-Protokoll. Zur Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen wird das Polymer mit einer Lösung von 113 mg (0.098 mmol) Pd(PPh₃)₄ in einem Gemisch von DMF/Piperidin 4:1 (v/v) versetzt und für 4 h geschüttelt. Es wird jeweils fünfmal mit DMF, CH₂Cl₂ und CH₂Cl₂/MeOH gewaschen. Zur Entschützung der Hydroxylgruppen und der Abspaltung vom Harz wird das festphasengebundene Peptid jeweils viermal mit 15 mL einer Lösung von 1 % TFA und 1 % TES in CH₂Cl₂ behandelt. Das Harz wird anschließend viermal mit 15 mL eines Methanol/CH₂Cl₂ (1:10, 2:10, 1:1, 5:1) Gemisches gewaschen. Die vereinten Methanol/CH₂Cl₂ Lösungen werden mit 562 µL (3.300 mmol) DIEA versetzt, und das Lösungsmittel

wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird in Methanol gelöst und mittels präparativer HPLC (P1) aufgereinigt.

Ausbeute: 31.7 mg (0.0135 mmol (M + 4×TFA), 11%)

$[\alpha]_D^{20} = -50.6^\circ$ (MeOH/Wasser 1:10 (v/v), c = 0.083)

HPLC (Nucleosil 100-5 C18 PPN, Gradient: 0 min: 10:90:0.1; 40 min: 55:45:0.1): $R_t = 26.91$ min

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, D_2O): $\delta = 5.11$ (m, 1H, CH Far), 5.06-5.03 (m, 2H, 2 × CH Far), 4.51-4.46 (m, 1H, CH Biotin), 4.36- 4.04 (m, 13H, 11 × α -CH, β -CH Thr, CH Biotin), 3.73 (d, J = 5.8 Hz, 2H, β -CH₂ Ser), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.23-3.04 (m, 7H, CH₂, CH, Biotin, CH₂ Aca, α -CH₂ Far), 2.88 (m, 18H, 8 × ϵ -CH₂, Lys, β -CH₂, Cys), 2.73-2.65 (m, 2H, CH₂, Biotin), 2.19-2.11 (m, 4H, CH₂ Aca, CH₂ Biotin), 2.05- 1.98 (m, 6H, 3 × CH₂ Far), 1.91-1.89 (m, 2H, CH₂ Far), 1.67-1.25 (m, 70H, 8 × β,γ,δ CH₂, Lys, 2 × CH₂ Biotin, 3 × CH₂ Aca, 4 × CH₃ Far), 1.11-1.10 (d, J = 6.3 Hz, 3H, γ CH₃, Thr)

MS (MALDI-TOF, DHB): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1892.2, gef. 1892.6, ber. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1914.2, gef. 1914.7, ber. $[\text{M}+\text{K}]^+$ 1930.3, gef. 1930.7

MS (ESI): ber. $[\text{M}+\text{H}]$ 1892.2, gef. 1892.2, ber. $[(\text{M}+2\text{H})/2]$ 946.6, gef. 946.8, ber. $[(\text{M}+3\text{H})/3]$ 631.4, gef. 631.8, ber. $[(\text{M}+4\text{H})/4]$ 473.8, gef. 474.3

$\text{C}_{90}\text{H}_{166}\text{N}_{22}\text{O}_{17}\text{S}_2$ (1892.55)

Cys(Trt)-OMe 55

Einer Lösung von 1.00 g (5.84 mmol) Cysteinmethylester Hydrochlorid in 10 mL Eisessig wird mit 1.520 g (5.84 mmol) Triphenylcarbinol und 0.82 mL (10.26 mmol) $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ versetzt. Es wird bei 84 °C für 35 min gerührt, innerhalb von 45 min auf RT abgekühlt und mit 15 mL Methanol und 75 mL Wasser versetzt. Die Lösung wird mit Na_2CO_3 versetzt bis sie basischen pH-Wert hat und mit Diethylether extrahiert. Die Etherphase wird über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert.

Ausbeute: 2.15 g (5.70 mmol, 98% , farbloses Öl)

$[\alpha]_D^{20} = -21.0^\circ$ (CHCl_3 , c = 2.2)

$R_f = 0.81$ (MeOH/DCM 1:8 (v/v)); 0.26 (Essigester/Cyclohexan 1:1 (v/v))

HPLC (LCMS1, Gradient : 0 min: 10:90; 35 min 100:0): $R_t = 17.27$ min

¹H-NMR 400 MHz, CDCl₃): δ = 7.46-7.20 (m, 15H, Trt), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.24-3.20 (m, 1H, α-H, Cys), 2.64-2.59 (m, 1H, β-H_a, Cys), 2.52-2.49 (m, 1H, β-H_b, Cys), 1.6-1.4, m_{br}, 2H, NH₂)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.2, 144.6, 129.8, 127.7, 126.9, 66.9, 53.9, 52.2, 15.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₂₃H₂₄NO₂S [M+H]⁺: ber.: 378.1528; gef.: 378.1523

C₂₃H₂₃NO₂S (377.50)

Fmoc-Lys(-NH-Trt-Harz)-Cys(Trt)-OMe 56

Eine Lösung von 0.234 mL (1.898 mmol) PhSiH₃ und 7.7 mg (0.007 mmol) Pd(PPh₃)₄ in 10 mL THF wird zu 0.257 g (Beladung 0.49 mmol g⁻¹, 0.126 mmol reaktive Gruppen) Harz **47** gegeben und für 12 h geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und jeweils fünfmal mit THF, CH₂Cl₂, DMF and CH₂Cl₂/MeOH und wieder CH₂Cl₂ gewaschen. Eine Lösung aus 189 mg (0.500 mmol) Cys(Trt)-OMe, 260 mg (0.500 mmol) PyBOP und 0.500 mL (4.548 mmol) NMM in 12 mL DMF wird zum Harz gegeben. Es wird für 3 h geschüttelt, das Harz **56** abfiltriert und jeweils fünfmal mit CH₂Cl₂ und DMF gewaschen.

Testabspaltung nach AAV 3:

LC-MS (LCMS1): ber. für Fmoc-Lys-Cys-OMe [M+H]⁺ 587.3, gef. 587.2, R_t = 14.51 min

Fmoc-Lys(Aloc)-Ser(Trt)-Lys(Aloc)-Thr(Trt)-Lys(-NH-Trt-Harz)-Cys(Trt)OMe

Die Verlängerung des harzgebundenen Dipeptids **56** verläuft analog zu der Synthese von Verbindung **34**. Auf der Stufe des Hexapeptids wird eine Testabspaltung durchgeführt.

Testabspaltung nach AAV 3:

LC-MS (LCMS1): ber. für Fmoc-Lys(Aloc)-Ser-Lys(Aloc)-Thr-Lys-Cys-OMe [M+H]⁺ 1098.5, gef. 1098.6, R_t = 18.85 min

Biotin-[Lys]₆-Ser(Trt)-Lys-Thr(Trt)-Lys-Cys(Trt)-OMe 59

Die Ankupplung der restlichen fünf Lysine und BiotAca-OH sowie die Abspaltung der Aloc-Gruppen wird, wie bei Verbindung **34** beschrieben, durchgeführt. Zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase wird das Polymer zweimal mit 20 mL einer Mischung von Essigsäure/TFE/CH₂Cl₂ 1:1:3 und zweimal mit einer Lösung von 30 % HFIP in CH₂Cl₂ behandelt. Die Lösungen werden vereint und das Lösungsmittel durch Koevaporation mit

Toluol entfernt. Das Rohprodukt wird in 5 mL TFE gelöst und durch präparative HPLC (P2) aufgereinigt.

Ausbeute: 104.2 mg ((M + 4×TFA): 0.0363 mmol, 29 %, farbloser Feststoff)

$$[\alpha]_D^{20} = -16.5^\circ \text{ (MeOH, } c = 0.405 \text{)}$$

HPLC (HPLC3): $R_t = 20.83$ min

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.50\text{--}7.19$ (m, 45H, Trt), 4.58–4.50 (m, 1H, CH Biotin), 4.40–3.92 (m, 13H, 11 × α -CH, β -CH Thr, CH Biotin), 3.62 (m, 3H, OMe), 3.45 (d, $J = \text{Hz}$, 2H, CH₂, Ser), 3.18–3.12 (m, 3H, CH₂ Aca, CH, Biotin), 2.94–2.60 (m, 22H, 18H, 8 × ϵ -CH₂, Lys, β -CH₂, Cys, 2 × CH₂, Biotin), 2.32 (m, CH₂, Biotin), 2.18 (m, 2H, CH₂, Aca), 1.79–1.28 (m, 58H, 8 × β,γ,δ CH₂, Lys, 2 × CH₂ Biotin, 3 × CH₂ Aca), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, γ CH₃, Thr)

MS (MALDI-TOF, THAP): ber. [M+H] 2414.37, gef. 2414.56, ber. [M+Na]⁺ 2436.37, gef. 2436.58

LC-MS (LCMS4): ber. [(M+2H)/2] 1207.7, gef. 1207.6, $R_t = 16.41$ min

C₁₃₂H₁₈₄N₂₂O₁₇S₂ (2415.14)

BiotAca-[Lys]₆-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys-OMe 35

Eine entgaste Lösung von 41 μL (0.261 mmol) TES in 10 mL CH₂Cl₂/TFA 1:1 wird zu 21.0 mg (0.00731 mmol) Biotin-[Lys]₆-Ser(Trt)-Lys-Thr(Trt)-Lys-Cys(Trt)-OMe **59** gegeben. Es wird für 1 h gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird in 400 mL TFE aufgenommen und mittels präparativer HPLC (P3) aufgereinigt.

Ausbeute: 7.8 mg ((M + 4×TFA): 0.00364 mmol, 50 %, farbloser Feststoff)

$$[\alpha]_D^{20} = -25.1^\circ \text{ (MeOH, } c = 0.05 \text{)}$$

Smp.: 196 °C (Zersetzung)

HPLC (HPLC1): $R_t = 13.34$ min

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 4.60\text{--}4.49$ (m, 1H, CH Biotin), 4.38–4.04 (m, 13H, , 11 × α -CH, β -CH Thr, CH Biotin), 3.74 (d, ($J = 5.9$ Hz, 2H, β -CH₂ Ser), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.25–3.22 (m, 1H, CH Biotin), 3.09–3.05 (m, 2H, CH₂ Aca), 2.91–2.66 (m, 22H, m, 8 × ϵ -CH₂ Lys, β -CH₂, Cys, 2 × CH₂ Biotin), 2.22–2.13 (m, 4H, CH₂ Aca, CH₂ Biotin), 1.78–1.19 (m, 58H, 8 × β,γ,δ CH₂, Lys, 2 × CH₂ Biotin, 3 × CH₂ Aca), 1.11 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, γ CH₃, Thr)

MS (MALDI-TOF, DHB): ber. $[M+H]^+$ 1688.0, gef. 1688.6, ber. $[M+Na]$ 1710.0, gef. 1710.6, ber. $[M+K]^+$ 1726.1, gef. 1726.6

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 1688.0, gef. 1688.0, ber. $[(M+2H)/2]$ 844.5, gef. 844.8, ber. $[(M+3H)/3]$ 563.3, gef. 563.7, ber. $[(M+4H)/4]$ 422.8, gef. 423.2

$C_{75}H_{142}N_{22}O_{17}S_2$ (1688.2)

Beladung von ClTrt-Harz zu 60

Zu 1.00 g Chlortritylchlorid-PS-Harz (Beladung 1.08 mmol/g, 1.08 mmol reaktive Gruppen) wird eine Lösung von 633 mg (1.08 mmol) Fmoc-Cys(Trt)-OH und 735 mL (4.32 mmol) DIEA in 20 mL gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und dreimal mit einem Gemisch von CH_2Cl_2 /MeOH/DIEA 34:4:1 (v/v/v), dreimal mit CH_2Cl_2 , dreimal mit DMF und wieder dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Es wird 1.26 g Harz **60** erhalten. Die Bestimmung der Beladung mittels UV-Spektroskopie (AAV 1) ergibt $0.35 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$.

Biotin-[Lys]₆-Ser(Trt)-Lys-Thr(Trt)-Lys-Cys(Trt)-OH

Es werden 357 mg (Harz **60**, Beladung $0.35 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.125 mmol reaktive Gruppen) festphasengebundenes Fmoc-Cys(Trt) unter Verwendung des HATU/HOAt Protokolls (AAV 4 und AAV 5) zum festphasengebundenen, biotinylierten Undecapeptid Biotin-[Lys(Aloc)]₆-Ser(Trt)-Lys(Aloc)-Thr(Trt)-Lys(-NH-Trt-Harz)-Cys(Trt) **61** verlängert. Von zwei Zwischenstufen werden Testabspaltungen durchgeführt:

Fmoc-Thr(Trt)-Lys(Aloc)-Cys(Trt)-ClTrt-Harz

Testabspaltung nach AAV 3:

LC-MS (LCMS1, Gradient: 0 min: 10:90; 35 min: 100:0): ber. Fmoc-Thr-Lys(Aloc)-Cys-OH $[M+H]^+$ 657.3, gef. 657.0, $R_t = 15.16 \text{ min}$

Fmoc-Lys(Aloc)-Ser(Trt)-Lys(Aloc)-Thr(Trt)-Lys(Aloc)-Cys(Trt)-ClTrt-Harz

Testabspaltung nach AAV 3:

LC-MS (LCMS1): ber. für Fmoc-Lys(Aloc)-Ser-Lys(Aloc)-Thr-Lys(Aloc)-Cys-OH $[M+H]^+$ 1168.5, gef. 1168.3, $R_t = 18.17 \text{ min}$

Die Aloc-Gruppen des festphasengebundenen Undecapeptids **61** werden, wie bei Verbindung **34** beschrieben, abgespalten. Zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase wird das Polymer viermal mit 20 mL einer Lösung von 30 % HFIP in CH₂Cl₂ behandelt. Die Lösungen werden vereint und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird in 5 mL TFE gelöst und durch präparative HPLC (P2) aufgereinigt.

Ausbeute: 106 mg ((M + 4×TFA): 0.03703 mmol, 30 %, farbloser Feststoff)

$[\alpha]_D^{20} = -11.8^\circ$ (MeOH, c = 1.165)

HPLC (HPLC3): R_t = 16.74 min

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.56-7.12 (m, 45H, Trt), 4.58-4.54 (m, 1H, CH Biotin), 4.50-3.90 (m, 13H, 11 × α-CH, β-CH Thr, CH Biotin), 3.50-3.44 (m, 2H, CH₂, Ser), 3.20-3.10 (m, 3H, CH₂ Aca, CH Biotin), 2.94-2.60 (m, 22H, 18H, 8 × ε-CH₂, Lys, β-CH₂ Cys, 2 × CH₂, Biotin), 2.34-2.28 (m, CH₂, Biotin), 2.22-2.18 (m, 2H, CH₂, Aca), 1.90-1.30 (m, 58H, 8 × β,γ,δ CH₂ Lys, 2 × CH₂ Biotin, 3 × CH₂ Aca), 0.84 (d, J = 6.5 Hz, 3H, γ CH₃, Thr)

MS (MALDI-TOF, THAP): ber. [M+H] 2400.35, gef. 2400.85, [M+Na] 2422.34, gef. 2422.85, [M+K] 2438.31, gef. 2438.84

C₁₃₁H₁₈₂N₂₂O₁₇S₂ (2401.12)

Biotin-[Lys]₆-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys-OH 36

Eine entgaste Lösung von 25 µL (0.157 mmol) TES in 10 mL CH₂Cl₂/TFA 1:1 (v/v) wird zu 14.9 mg (0.00522 mmol) Biotin-[Lys]₆-Ser(Trt)-Lys-Thr(Trt)-Lys-Cys(Trt)-OMe gegeben. Es wird für 1 h gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird in 200 mL TFE aufgenommen und mittels präparativer HPLC (P3) aufgereinigt.

Ausbeute: 4.5 mg ((M + 4×TFA): 0.00211mmol, 41 %, farbloser Feststoff)

$[\alpha]_D^{20} = -22.1^\circ$ (MeOH, c = 0.05)

HPLC (HPLC1): R_t = 11.86 min

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.54 - 4.49 (m, 1H, CH Biotin), 4.39-4.10 (m, 13H, 11 × α-CH, β-CH Thr, CH Biotin), 3.76-3.74 (m, 2H, β-CH₂ Ser), 3.24-3.22 (m, 1H, CH Biotin), 3.09-3.05 (m, 2H, CH₂, Aca), 2.87-2.65 (m, 22H, 8 × ε-CH₂, Lys, β-CH₂, Cys, 2 × CH₂ Biotin), 2.22-2.12 (m, 4H, CH₂ Aca, CH₂ Biotin), 1.80-1.19 (m, 58H, 8 × β,γ,δ CH₂ Lys, 2 × CH₂ Biotin, 3 × CH₂ Aca), 1.10 (d, J=6.5 Hz, 3H, γ CH₃, Thr)

MS (MALDI-TOF, DHB): ber. [M+H] 1674.0, gef. 1674.5, ber. [M+Na] 1696.0, gef. 1696.4, ber. [M+K] 1712.1, gef. 1712.5

MS (ESI): ber. [M+H] 1674.0, gef. 1674.0, ber. [(M+2H)/2] 837.5, gef. 837.9, ber. [(M+3H)/3] 558.7, gef. 559.1, ber. [(M+4H)/4] 419.3, gef. 419.7

$C_{74}H_{140}N_{22}O_{17}S_2$ (1674.17)

6.3 Versuche zur allgemeinen Festphasensynthese von Lipopeptiden mit dem Hydrazidlinker

6.3.1 Allgemeine Arbeitsweisen

Es wurden 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl NovaGelTM oder 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl PS Harze (Beladungen: 0.52 mmol·g⁻¹, 0.56 mmol·g⁻¹ oder 0.67 mmol·g⁻¹) der Firma Calbiochem-Novabiochem GmbH verwendet. Alle Reaktionen wurden in einem Festphasenreaktor (50 mL oder 100 mL) unter einer Argonatmosphäre durchgeführt. Durchmischung wurde durch Schütteln auf einem Orbitalschütteler oder mittels Durchleiten von Argon durch den Reaktor erreicht. Zur Beladung der gekauften Harze wurde die Fmoc-Gruppe nach AAV 7 abgespalten, die erste Aminosäure nach AAV 8 angekuppelt (Acylierung ca. 75 % der nominellen Beladung) und das Harz im Hochvakuum getrocknet. Die angegebenen Ansatzgrößen und Ausbeuten für isolierte Endprodukte beziehen sich auf die Menge der ersten festphasengebundenen Aminosäure. Deren Beladung wurde nach AAV 1 bestimmt.

AAV 7: Basenvermittelten Spaltung von Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppen an der festen Phase, Hydrazid-Linker

Ein Gemisch von DMF/frisch destilliertem Piperidin 1:1 (v/v) wird entgast und zum Polymer gegeben. Ein Argonstrom wird zum Durchmischen für 5 min durch die Suspension geleitet. Nach dem Abfiltrieren wird der Vorgang einmal wiederholt. Es wird anschließend fünfmal mit DMF gewaschen.

AAV 8: Aminosäurekupplungen

Eine Lösung von 4 eq Aminosäure, 3.6 eq HBTU, 4 eq HOAt und 8 eq DIEA in DMF wird für drei Minuten voraktiviert und dann zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird für 2 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen. Zur Kupplung von Cystein wird als Kupplungsreagenz DIC verwendet. Hierbei wird eine Lösung von 4 eq

geschütztem Cysteins, 4 eq DIC und 6 eq HOBt in DMF zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird 4 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen.

AAV 9: Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe von der Cystein-Seitenkette

Das Harz wird fünfmal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Eine Lösung von 50 % TFA und 3 % TES in CH_2Cl_2 wird hinzugefügt, und es wird für 1 h geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und siebenmal mit CH_2Cl_2 , dann fünfmal mit DMF gewaschen.

AAV 10: Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe vom Amin / Abspaltung der Methoxytrityl-Schutzgruppe von der Cystein-Seitenkette

Das Harz wird fünfmal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Eine Lösung von 1 % TFA und 2 % TES in CH_2Cl_2 wird hinzugefügt, und es wird für 30 min geschüttelt. Die Abspaltung wird einmal wiederholt. Das Harz wird abfiltriert und siebenmal mit CH_2Cl_2 , dann fünfmal mit DMF gewaschen.

AAV 11: Reduktive Abspaltung der SStBu-Gruppe von Cystein

Es werden 100 eq PBU_3 einer entgasten Lösung von 400 eq H_2O in DMF/ CH_2Cl_2 1:1 (v/v) hinzugefügt. Diese wird zum Harz gegeben, es wird 12 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und jeweils fünfmal mit CH_2Cl_2 und DMF gewaschen. Typischerweise verwendet man 3.2 mL PBU_3 zusammen mit 1 mL H_2O in 20 mL Lösungsmittelgemisch.

AAV 12: Farnesylierung von Thiolen an der festen Phase

Eine Lösung von 5 eq Far-Br und 12 eq DIEA in DMF wird zu frisch entschützten, harzgebundenen Thiolen gegeben. Es wird für 4 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und sechsmal mit DMF gewaschen.

AAV 13: Palmitoylierung von Thiolen an der festen Phase

Eine Lösung von 20 eq Pal-Cl, 21 eq HOBt und 22 eq Triethylamin in DMF/ CH_2Cl_2 1:3 (v/v) wird zu frisch entschützten, harzgebundenen Thiolen gegeben. Es wird 15 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und sechsmal mit CH_2Cl_2 und DMF gewaschen.

6.3.2 Festphasensynthesen

Fmoc-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Cys(SStBu)-OMe **65**

Methode A:

Durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV **7**) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV **8** werden 204 mg (Beladung $0.56 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.114 mmol Cystein) festphasengebundenen Fmoc-Cys(SStBu) mit Fmoc-Lys(Aloc)-OH zum festphasengebundenen Tripeptid Fmoc-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Cys(SStBu) verlängert. Zur Abspaltung wird das Harzes in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 7.4 mg (0.041 mmol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ und 66 μL (0.818 mmol) Pyridin in 8 mL eines 1:1 (v/v) Gemisches von Methanol und THF geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit Methanol/ CH_2Cl_2 1:5 (v/v) gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigester/Cyclohexan 5:2 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 31.0 mg (0.0356 mmol, 31 %);

$$[\alpha]_D^{20} = -11.7^\circ (\text{CHCl}_3, c = 0.91)$$

Ausbeuten für NovaGel-Harze: 25 % - 28 %

Methode B:

Das Tripeptid **65** wird analog zu Methode A synthetisiert. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 7.4 mg (0.0411 mmol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 266 μL (3.296 mmol) Pyridin, 140 μL (2.448 mmol) Essigsäure in 8 mL eines 1:1 (v/v) Gemisches von Methanol und CH_2Cl_2 geschüttelt.

Ausbeute: 34 mg (0.0392 mmol, 50 %)

$$[\alpha]_D^{20} = -11.3^\circ (\text{CHCl}_3, c = 0.82)$$

HPLC (HPLC4, Gradient: 0 min: 30:70:0.1; 5 min: 30:70:0.1; 40 min: 90:10:0.1): $R_t =$

19.70 min

$R_f = 0.52$ (Essigester/Cyclohexan 3:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 7.74 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.58 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, Fmoc), 7.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, Fmoc), 7.29 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, HN), 6.86 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH), 5.85 (m, 2H, $2 \times \text{CH}=\text{CH}_2$ allyl), 5.75 (m, 1H, NH), 5.23 (d, $J = 17.1$ Hz, 2H, $2 \times \text{CH}=\text{CH}_{2a}$ allyl), 5.16-5.10 (m, 4H, $2 \times \text{CH}=\text{CH}_{2b}$ allyl, $2 \times \text{NH}$), 4.83 (m, 1H, α -CH), 4.51-4.17 (m, 6H, $2 \times \alpha$ -CH, $2 \times \text{O-CH}_2$ allyl), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.17-

3.10 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2$ ϵ -Lys, β - CH_2 Cys), 1.88-1.24 (m, 12H, $2 \times \beta$ - CH_2 , δ - CH_2 , γ - CH_2 Lys), 1.34 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

^{13}C -NMR (100 MHz, δ / ppm: 172.0, 171.2, 170.7, 156.6, 156.5, 143.8, 143.7, 141.2, 132.9, 127.7, 127.0, 125.0, 119.9, 117.5, 67.1, 65.4, 54.7, 53.0, 52.6, 51.9, 48.2, 47.1, 41.7, 40.2, 40.0, 32.0, 31.2, 30.5, 29.7, 29.2, 22.2, 22.0

MS (ESI): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 870.4, gef. 870.2

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 870.3782; gef.: 870.3748

$\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$ (870.09)

Fmoc-Cys(Far)-OMe 72

Von 137 mg (Beladung $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 0.047 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird nach AAV 9 die Tritylgruppe abgespalten. Nach AAV 12 wird die freie Thiolgruppe farnesyliert. Zur Abspaltung wird das Harzes in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 18 mg (0.10 mmol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 280 μL (3.46 mmol) Pyridin und 1 mL Methanol in 10 mL CH_2Cl_2 geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit Methanol/ CH_2Cl_2 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Cyclohexan 1:4 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 14.5 mg (0.026 mmol, 55 %, farbloser Film)

$[\alpha]_D^{20} = -48.4^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.5$)

$R_f = 0.35$ (Essigester/Cyclohexan 1:4, (v/v))

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.76$ (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc), 7.62-7.60 (m, 2H, Fmoc), 7.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc), 5.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 5.21 (t, $J = 7.7$ Hz, 1 H, $\text{C}=\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{-S}$), 5.10-5.07 (m, 2H, $2 \times \text{C}=\text{CH}$ Far), 4.62-4.58 (m, 1H, α -CH Cys), 4.35-4.45 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.22-4.26 (m, 1H, CH Fmoc), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.21-3.12 (m, 2H, CH_2 Far), 2.85-3.00 (m, 2H, β - CH_2 Cys), 2.12-1.95 (m, 8H, CH_2 Far), 1.68 (s, 3H, CH_3 Far), 1.66 (s, 3H, CH_3 Far), 1.60 (s, 6H, CH_3 Far)

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.4$, 155.8, 143.9, 141.33, 140.2, 135.4, 131.4, 127.8, 127.2, 125.2, 124.4, 123.7, 120.0, 119.6, 67.4, 53.8, 52.8, 47.3, 40.0, 38.9, 33.8, 30.3, 26.9, 26.7, 25.9, 17.9, 16.4, 16.3

LC-MS (LCMS1, Gradient: 0 min: 50:50; 1 min: 50:50; 10 min: 100:0; 12 min: 100:0): ber. $[M+H]^+$ 562.3, gef. 562.2, $R_t = 9.25$ min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{34}H_{44}NO_4S$ $[M+H]^+$: ber.: 562.2991, gef.: 562.3004
 $C_{34}H_{43}NO_4S$ (561.78)

Fmoc-Cys(Pal)-OMe 73

Von 210 mg (Beladung $0.38 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.080 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird nach AAV 9 die Tritylgruppe abgespalten. Die Palmitoylierung der freien Thiolgruppe wird nach AAV 13 durchgeführt, anstelle eines DMF/ CH_2Cl_2 Gemisches wird jedoch reines CH_2Cl_2 als Lösungsmittel verwendet. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 6 mg (0.033 mmol) $Cu(OAc)_2$, 123 μL (1.52 mmol) Pyridin, 175 μL (3.06 mmol) Essigsäure und 0.4 mL Methanol in 20 mL CH_2Cl_2 geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit Methanol/ CH_2Cl_2 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Cyclohexan 1:2 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 26.7 mg (0.045 mmol, 56 %, farbloser Film)

$[\alpha]_D^{20} = +18.9^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1.04$)

$R_f = 0.56$ (Essigester/Cyclohexan 1:2, (v/v))

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.76$ (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, Fmoc), 7.60 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, Fmoc), 7.40 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 5.56 (s, 1H, NH), 4.61 (m, 1H, α -CH Cys), 4.38 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -O Fmoc), 4.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.39 (m, 2H, β - CH_2 Cys), 2.57 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, α - CH_2 Pal), 1.65 (m, 2H, β - CH_2 Pal), 1.25 (m, 24H, Pal), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, ω - CH_3 Pal)

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, 10% CD_3OD): $\delta = 199.0, 170.9, 155.9, 144.0, 141.6, 127.9, 127.3, 125.4, 120.2, 67.5, 53.9, 53.0, 47.3, 44.3, 32.2$ -29.1 (mehrere Signale), 25.8, 22.9, 14.2

LC-MS (LCMS2): ber. $[M+H]^+$ 596.3, gef. 596.1, $R_t = 24.91$ min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{35}H_{50}NO_5S$ $[M+H]^+$: ber.: 596.3410; gef.: 596.3419

$C_{35}H_{49}NO_5S$ (595.83)

Fmoc-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe 79

Von 488 mg (Beladung $0.38 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 0.185 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird nach AAV 7 die Fmoc-Gruppe abgespalten. Fmoc-Lys(Aloc)-OH wird entsprechend AAV 8 angekuppelt, die Tritylgruppe nach AAV 9 abgespalten und das Dipeptid farnesyliert (AAV 12). Die Fmoc-Gruppe wird abgespalten und Fmoc-Cys(Mmt)-OH entsprechend AAV 8 mit DIC/HOBt angekuppelt. Die Methoxytrityl-Gruppe wird nach AAV 10 entfernt. Das freie Thiol wird nach AAV 13 palmitoyliert, anstelle eines DMF/CH₂Cl₂ Gemisches wird hierbei jedoch reines CH₂Cl₂ als Lösungsmittel verwendet. Zur Abspaltung wird das Harzes in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 8 mg (0.043 mmol) Cu(OAc)₂, 140 μL (1.74 mmol) Pyridin, 200 μL (3.50 mmol) Essigsäure und 0.4 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 (v/v) gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Cyclohexan 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 51.8 mg (0.047 mmol , 25%)

$[\alpha]_D^{20} = +46.8^\circ$ (CHCl₃, $c = 2.06$)

$R_f = 0.45$ (Essigester/Cyclohexan 1:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.68$ (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H, Fmoc), 7.52 (d, $J = 9.6 \text{ Hz}$, 2H, Fmoc), 7.32 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, Fmoc), 7.23 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, Fmoc), 6.94 (s, 1H, NH), 6.82 (s, 1H, NH), 5.83 - 5.75 (m, 2H, NH, CH=CH₂), 5.19 (d, $J = 18 \text{ Hz}$, 1H, CH=CH_{2a}), 5.15 - 4.97 (m, 5H, CH=CH_{2b}, C=CH-CH₂-S, $2 \times$ C=CH Far, NH), 4.66 (m, 1H, α -CH Cys), 4.50 - 4.24 (m, 6H, Fmoc, CH α -Lys, O-CH₂ allyl), 4.14 (m, 1H, α -CH Cys), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.30 - 2.75 (m, 8H, β -CH₂ Cys, β -CH₂ Cys, β -CH₂ Lys, α -CH₂ Far), 2.51 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, α -CH₂ Pal), 2.1 - 1.81 (m, 8H, CH₂ Far), 1.68 - 1.28 (m, 20H, β -CH₂ Pal, $4 \times$ CH₃ Far, β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂ Lys), 1.28 - 1.12 (m, 24H, Pal), 0.81 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, ω -CH₃ Pal)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 200.6$, 171.3, 171.2, 170.3, 156.7, 144.0, 141.5, 140.4, 135.6, 133.3, 131.5, 128.0, 127.3, 125.4, 124.5, 124.0, 120.2, 119.7, 117.7, 67.8, 65.7, 55.8, 53.3, 52.9, 52.0, 47.3, 44.3, 40.5, 39.9, 33.1-22.3 mehrere Signale, 17.9, 16.4, 16.2, 14.3

LC-MS (LCMS3): ber. $[M+H]^+$ 1115.7, gef. 1115.3, $R_t = 30.65 \text{ min}$

MS (FAB, 3-NBA) für C₆₃H₉₄N₄O₉S₂ $[M+H]^+$: ber.: 1115.7; gef.: 1115.4, für $[M+H]^+$: ber.: 1137.6, gef.: 1137.4

C₆₃H₉₄N₄O₉S₂ (1115.57)

Fmoc-Thr-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe 87

Methode A: Von 322 mg (Beladung 0.37 mmol·g⁻¹, 0.123 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird wie bei Verbindung 79 beschrieben die Fmoc-Gruppe abgespalten. Es wird Fmoc-Lys(Aloc)-OH angekuppelt, die Tritylgruppe abgespalten und das Dipeptid farnesyliert. Die zweite Fmoc-Gruppe wird abgespalten und Fmoc-Thr(Trt)-OH entsprechend AAV 8 mit HBTU/HOBt angekuppelt. Die Trityl-Gruppe des Threonins wird nach AAV 10 entfernt. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 10 mg (0.055 mmol) Cu(OAc)₂, 280 µL (3.47 mmol) Pyridin, 409 µL (7.15 mmol) Essigsäure und 1.0 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Methode B: Das Peptid wird analog zu Methode A aufgebaut. Anstatt festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wurde Fmoc-Cys(SStBu) verwendet. Nach Ankupplung vom Fmoc-Lys(Aloc)-OH wird die Fmoc-Gruppe abgespalten und mit Fmoc-Thr(Trt)-OH zum Tripeptid verlängert. Die SStBu-Gruppe wird nach AAV 11 gespalten und das freigesetzte Thiol farnesyliert.

Ausbeute: Methode A: 49.6 mg (0.057 mmol, 46%)

Methode B: 41 %

$[\alpha]_D^{20} = -20.7^\circ$ (CHCl₃, c = 0.99)

Smp.: 141.3 °C

R_f = 0.4 (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 7.76 (d, J = 7.3 Hz, 2H, Fmoc), 7.60 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.40 (t, J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.05 (s, 1H, NH), 6.99 (s, 1H, NH), 5.89-5.87 (m, 2H, CH=CH₂ allyl), 5.27 (d, J = 18 Hz, 1H, CH=CH_{2a} allyl), 5.20-5.17 (m, 2H, CH=CH_{2b} allyl, C=CH-CH₂-S), 5.10-5.07 (m, 2H, C=CH Far), 4.98 (s, 1H, NH), 4.73-4.72 (m, 1H, α-CH Cys), 4.54-4.21 (m, 8H, Fmoc, 2 × α-CH, CH β-Thr, O-CH₂ allyl), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.19-3.10 (m, 4H, α-CH₂ Far, CH₂ ε-Lys), 2.97-2.92

(m, 1H, β -CH₂ Cys), 2.85-2.80 (m, 1H, β -CH₂ Cys), 2.10-1.91 (m, 8H, 4 \times CH₂ Far), 1.68 (s, 3H, CH₃ Far), 1.66 (s, 3H, CH₃ Far), 1.59 (s, 6H, CH₃ Far), 1.51-1.36 (m, 6H, β -CH₂, δ -CH₂, γ -CH₂ Lys), 1.19 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃ Thr)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 171.6, 171.4, 171.1, 156.9, 143.9, 141.5, 140.4, 135.6, 133.2, 131.6, 128.0, 127.3, 125.3, 124.5, 123.9, 120.2, 119.6, 117.9, 67.5, 65.8, 59.1, 53.6, 53.4, 52.9, 52.0, 47.3, 40.4, 40.0, 33.2, 31.4, 30.0, 29.5, 27.0, 26.7, 25.9, 22.4, 18.7, 17.9, 16.4, 16.2

LC-MS (LCMS2): ber. [M+H]⁺ 875.5, gef. 875.2, ber. [M+Na]⁺ 897.5, gef. 897.4; R_t = 23.43 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₄₈H₆₇N₄O₉S [M+H]⁺: ber.: 875.4629; gef.: 875.4617

C₄₈H₆₆N₄O₉S (875.13)

Fmoc-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 81

Von 119 mg (Beladung 0.35 mmol·g⁻¹, 0.0042 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird nach AAV 7 die Fmoc-Gruppe abgespalten. Fmoc-Pro-OH wird entsprechend AAV 8 angekuppelt, die Tritylgruppe nach AAV 9 abgespalten und das Dipeptid farnesyliert (AAV 12). Die Fmoc-Gruppe wird abgespalten und Fmoc-Leu-OH entsprechend AAV 8 angekuppelt. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 6.7 mg (0.037 mmol) Cu(OAc)₂, 119 μ L (1.47 mmol) Pyridin, 170 μ L (2.97 mmol) Essigsäure und 0.4 mL Methanol in 15 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Cyclohexan 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 15.8 mg (0.021 mmol, 50%)

$[\alpha]_D^{20} = -102.4^\circ$ (CHCl₃, c = 0.41)

R_f = 0.4 (Essigester/Cyclohexan 1:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.59 (m, 2H, Fmoc), 7.39 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 5.48 (d, J = 9.0 Hz, 1H, NH), 5.19, (t, J = 7.6 Hz, 1H, C=CH-CH₂-S Far), 5.08 (m, 2H, 2 \times C=CH Far), 4.70-4.65 (m, 1H, α -CH), 4.60-4.56 (m, 1H, α -CH), 4.37-4.34 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.22-4.19 (m, 1H, CH Fmoc), 3.50-

3.80 (m, 5H, OMe, CH₂ Pro), 3.18-3.08 (m, 2H, CH₂ Far), 2.94-2.97 (m, 1H, β-CH_{2a} Cys), 2.80-2.75 (m, 1H, β-CH_{2b} Cys), 2.20-1.10 (m, 27H, γ-CH Leu, β-CH₂ Leu, 4 × CH₂ Far, 2 × CH₂ Pro, 4 × CH₃ Far), 1.01-0.94 (m, 6H, 2 × δ-CH₃ Leu)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 173.2, 171.3, 171.0, 156.5, 144.1, 141.5, 140.2, 135.6, 131.5, 129.7, 127.9, 127.3, 125.4, 124.5, 124.0, 120.2, 119.8, 67.3, 60.0, 52.7, 52.0, 51.1, 47.4, 42.7, 42.4, 39.9, 33.5, 30.0, 27.4, 27.0, 26.7, 25.9, 25.2, 24.9, 23.7, 21.8, 17.9, 16.4, 16.2

LC-MS (LCMS2): ber. [M+H]⁺ 772.4, gef. 772.3, R_t = 21.29 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₄₅H₆₂N₃O₆S [M+H]⁺: ber.: 772.4359; gef.: 772.4387

C₄₅H₆₁N₃O₆S (772.05)

Aloc-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 84

Von 302 mg (Beladung 0.35 mmol·g⁻¹, 0.106 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **81** beschrieben, das festphasengebundene Tripeptid Fmoc-Leu-Pro-Cys(Far) synthetisiert. Durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 7) und der Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 8 wird das Tripeptid mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH und Aloc-Gly-OH zum Heptapeptid verlängert. Die Methoxytrityl-Gruppe wird abgespalten (AAV 10) und das freie Thiol palmitoyliert (AAV 13). Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 20 mg (0.11 mmol) Cu(OAc)₂, 280 μL (3.47 mmol) Pyridin, 400 μL (6.99 mmol) Essigsäure und 0.9 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 53.3 mg (0.044 mmol, 42%)

$[\alpha]_D^{20} = -52.8^\circ$ (CHCl₃, c = 0.74)

R_f = 0.2 (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.96 (s, 1H, NH), 7.60 (s, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, NH), 7.34 (s, 1H, NH), 7.05 (s, 1H, NH), 5.88-5.84 (s, 1H, CH=CH₂ allyl), 5.31 (d, J = 17.4 Hz, 1H, CH=CH_{2a} allyl), 5.21 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CH=CH_{2b} allyl), 5.19-5.16 (m, 1H, C=CH-CH₂-S), 5.08 (m, 2H, 2 × C=CH Far), 4.8-4.36 (m, 11H, 5 × α-CH, O-CH₂ allyl, 2 × CH₂ Gly), 3.5-4.0 (m, 7H, CH₂ Pro, OMe, β-CH₂ Cys), 3.36-2.76 (m, 4H, CH₂ Far, β-CH₂ Cys), 2.54 (m, 4H, γ-

CH₂ Met, α-CH₂ Pal), 2.3-1.8 (m, 17H, 4 × CH₂ Far, 2 × CH₂ Pro, γ-CH₂ Met, SCH₃), 1.70-1.30 (m, 17H, γ-CH Leu, β-CH Leu, 4 × CH₃ Far, β-CH₂ Pal), 0.90-1.20 (m, 24H, Pal), 0.88-0.70 (m, 9H, ω-CH₃ Pal, 2 × δ-CH₃ Leu)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): δ = 200.5, 173.2, 172.6, 171.6, 171.2, 170.5, 169.6, 196.0, 157.4, 140.3, 135.6, 132.8, 131.5, 124.5, 123.9, 119.8, 118.1, 66.3, 60.1, 53.9, 53.0, 52.7, 52.0, 49.3, 47.6, 45.0, 44.3, 43.4, 42.0, 41.2, 33.3-24.0 (mehrere Signale), 17.9, 16.4, 16.2, 16, 14.3

LC-MS (LCMS2, Gradient: 0 min: 20:80; 25 min 100:0; 40 min: 100:0): ber. [M+H]⁺ 1220.7, gef. 1220.5, R_t = 27.10 min

MS (MALDI-TOF, DHB) ber. für C₆₂H₁₀₅N₇O₁₁S₃Na [M+Na]⁺: 1242.7; gef.: 1243.1, ber.

[M+K]⁺: 1258.8; gef.: 1259.0

C₆₂H₁₀₅N₇O₁₁S₃ (1220.74)

Trt-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 113

Von 127 mg (Beladung 0.34 mmol·g⁻¹, 0.043 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **84** beschrieben, das festphasengebundene Pentapeptid Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far) synthetisiert. Es wird mit Fmoc-Cys(SStBu)-OH und Trt-Gly-OH wie verlängert, die SStBu-Gruppe wird gespalten (AAV **11**) und das freie Thiol palmitoyliert (AAV **13**). Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 18 mg (0.10 mmol) Cu(OAc)₂, 280 μL (3.47 mmol) Pyridin, 228 μL (3.99 mmol) Essigsäure und 1.0 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 40.6 mg (0.029 mmol, 68%)

$[\alpha]_D^{20} = -36.1^\circ$ (CHCl₃, c = 0.76)

R_f = 0.35 (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.4-7.1 (m, 15H, Trt), 5.10-4.95 (m, 3H, 3 × C=CH Far), 4.8-4.1 (m, 9H, 5 × α-CH, 2 × α-CH₂ Gly), 3.6-3.3 (m, 7H, CH₂ Pro, OMe, β-CH₂ Cys), 3.3-2.7 (m, 4H, CH₂ Far, β-CH₂ Cys), 2.4-2.6 (m, 4H, γ-CH₂ Met, α-CH₂ Pal), 2.2-1.6 (m, 17H, 4

× CH₂ Far, 2 × CH₂ Pro, β-CH₂ Met, SCH₃), 1.6-1.3 (m, 17H, γ-CH Leu, β-CH₂ Leu, 4 × CH₃ Far, β-CH₂ Pal), 1.2-0.95 (m, 24H, Pal), 0.9-0.6 (m, 9H, ω-CH₃ Pal, 2 × δ-CH₃ Leu)

LC-MS (LCMS3): ber. [M+H]⁺ 1378.8, gef. 1378.8, ber. [M+Na]⁺ 1400.8, gef. 1400.7, R_t = 27.81 min

MS (FAB, 3-NBA) für C₇₇H₁₁₅N₇O₉S₃Na [M+H]⁺: ber.: 1400.8; gef.: 1400.1

C₇₇H₁₁₅N₇O₉S₃ (1378.98)

Trt-Gly-Ser(Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 117

Von 316 mg (Beladung 0.39 mmol·g⁻¹, 0.123 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **84** beschrieben, das festphasengebundene Pentapeptid Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far) synthetisiert. Es wird mit Fmoc-Ser(Trt)-OH und Trt-Gly-OH verlängert. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 10 mg (0.055 mmol) Cu(OAc)₂, 140 μL (1.73 mmol) Pyridin und 0.4 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 (v/v) gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 76.7 mg (0.0561 mmol, 46 %). Bei 38 % des Produktes ist eine Tritylgruppe abgespalten (LCMS, Integration bei 210 nm).

$[\alpha]_D^{20} = -12.0^\circ$ (CHCl₃, c = 2.0)

R_f = 0.25 (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

HPLC (HPLC4): R_t = 20.36 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 7.40-6.90 (m, 30H, 2 × Trt), 5.03 (t, J = 7.3 Hz, 1H, C=CH Far), 4.99-4.90 (m, 2H, 2 × C=CH Far), 4.7-4.1 (m_{verd}, 9H, 5 × α-CH, 2 × α-CH₂ Gly), 3.86 (dd, J = 16.9 Hz, J = 4.3 Hz, 1H, β-CH_{2a} Ser), 3.71 (dd, J = 9.3 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, β-CH_{2b} Ser), 3.70-3.45 (m, 5H, CH₂ Pro, OMe), 3.12-2.90 (m, 2H, α-CH₂ Far), 2.78 (dd, J = 13.7 Hz, J = 5.1 Hz, 1H, β-CH_{2a} Cys), 2.61 (dd, J = 13.7 Hz, J = 6.8 Hz, 1H, β-CH_{2b} Cys), 2.52-2.38 (m, 2H, γ-CH₂ Met), 2.3-1.7 (m, 17H, 4 × CH₂ Far, 2 × CH₂ Pro, β-CH₂ Met, SCH₃), 1.6-1.3 (m, 15H, γ-CH Leu, β-CH₂ Leu, 4 × CH₃ Far), 0.82-0.70 (m, 6H, 2 × δ-CH₃ Leu)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 10% CD_3OD): $\delta = 173.9, 172.2, 171.8, 171.1, 171.0, 170.6, 169.2, 144.8, 142.9, 139.7, 135.0, 130.8, 128.1, 128.1, 127.9, 127.8, 127.1, 126.4, 124.0, 123.4, 119.2, 86.8, 70.6, 62.4, 59.7, 54.3, 52.4, 51.8, 47.7, 47.3, 42.3, 41.0, 39.6, 32.8, 30.7, 30.5, 29.6, 27.8, 26.6, 26.4, 25.5, 24.8, 24.5, 23.1, 21.5, 17.5, 16.0, 15.8, 14.9$

LC-MS (LCMS3, Gradient: 0 min: 50:50; 1 min: 50:50, 7 min: 100:0; 12 min: 100:0): ber.

$[\text{M}+\text{H}]^+$ 1366.7 gef. 1366.3, $R_t = 9.47$ min

$\text{C}_{80}\text{H}_{99}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}_2$ (1366.82)

Fmoc-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 118

Von 246 mg (Beladung $0.34 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.0835 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **84** beschrieben, das festphasengebundene Pentapeptid Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far) synthetisiert. Es wird mit Fmoc-Ser(Trt)-OH und Fmoc-Gly-OH verlängert. Die Tritylschutzgruppe wird nach AAV **10** entfernt. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 10 mg (0.055 mmol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 140 μL (1.73 mmol) Pyridin und 0.4 mL Methanol in 20 mL CH_2Cl_2 geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit Methanol/ CH_2Cl_2 1:5 (v/v) gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH_2Cl_2 /Methanol 15:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 32.0 mg (0.0290 mmol, 35 %)

$[\alpha]_D^{20} = -57.7^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.92$)

$R_f = 0.17$ (CH_2Cl_2 /Methanol 15:1, (v/v))

HPLC (HPLC4): $R_t = 15.97$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 7.65$ (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc), 7.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, Fmoc), 7.28 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, Fmoc), 7.20 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc), 5.06, (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, $\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-\text{S}$ Far), 5.01-4.93 (m, 2H, $2 \times \text{C}=\text{CH}$ Far), 4.40-4.09 (m, 11H, $5 \times \alpha\text{-CH}$, $2 \times \alpha\text{-CH}_2$ Gly, CH, CH_2 Fmoc), 4.15-4.09 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Ser), 3.91-3.45 (m_{verd} , 7H, CH_2 Pro, OMe, $\beta\text{-CH}_2$ Ser), 3.17-2.93 (m_{br} , 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Far), 2.78-2.61 (m_{br} , 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys), 2.50-2.30 (m_{br} , 2H, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.22-1.70 (m, 17H, $4 \times \text{CH}_2$ Far, $2 \times \text{CH}_2$ Pro, $\beta\text{-CH}_2$ Met, SCH_3), 1.68-1.25 (m, 15H, $\gamma\text{-CH}$ Leu, $\beta\text{-CH}_2$ Leu, $4 \times \text{CH}_3$ Far), 0.88-0.72 (m, 6H, $2 \times \delta\text{-CH}_3$ Leu)

LC-MS (LCMS1, Gradient: 0 min: 10:90; 1 min: 10:90; 10 min: 100:0, 12 min: 100:0): ber. $[M+H]^+$ 1104.5, gef. 1104.2, $R_t = 10.27$ min

$C_{57}H_{81}N_7O_{11}S_2$ (1104.43)

BODIPY-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 115

Eine Lösung von 12.2 mg (0.00885 mmol) Trt-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe **114** in 3 mL CH_2Cl_2 wird mit 1 mL TFE und 1 mL Eisessig versetzt und für 1.5 h gerührt. Das Lösungsmittel wird mit Toluol koevaporiert und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Es wird eine Lösung von 4.5 mg (0.0133 mmol) BODIPY-OH, 2.5 mg (0.0133 mmol) EDC und 2.7 mg (0.0177 mmol) HOBt und 2 μ L Et_3N in 2 mL CH_2Cl_2 zugefügt und für 12 h gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH_2Cl_2 /Methanol 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt

Ausbeute: 5.7 mg (0.00404 mmol, 46 %)

$R_f = 0.21$ (CH_2Cl_2 /Methanol 20:1, (v/v))

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.03$ (s, 1H, BODIPY), 6.80 (s, 1H, BODIPY), 6.20 (s, 1H, BODIPY), 6.03 (s, 1H, BODIPY), 5.03-5.10 (m, 1H, C=CH Far), 5.02-4.94 (m, 2H, C=CH Far), 4.64-3.90 (m, 9H, 5 \times α -CH, 2 \times α - CH_2 Gly, β - CH_{2a} Ser), 3.83-3.44 (m, 8H, β - CH_{2b} Ser, CH_2 Pro, OMe, CH_2 BODIPY), 3.22-2.78 (m, α - CH_2 Far, β - CH_2 Cys), 2.70-2.42 (m, 9H, CH_3 , CH_2 BODIPY, α - CH_2 Pal, γ - CH_2 Met), 2.16 (m, 3H, CH_3 BODIPY), 2.04-1.82 (m, 17H, 4 \times CH_2 Far, 2 \times CH_2 Pro, β - CH_2 Met, SCH_3), 1.70-1.35 (m, 17H, γ -CH Leu, β - CH_2 Leu, 4 \times CH_3 Far, β - CH_2 Pal), 1.25-1.08 (m, 24H, 12 \times CH_2 Pal), 0.89-0.75 (m, 9H, 2 \times δ - CH_3 Leu, ω - CH_3 Pal)

LC-MS (LCMS3): ber. $[M+H]^+$ 1410.8, gef. 1410.5, ber. $[M-H]^-$ 1408.8, gef. 1408.6, $R_t = 24.88$ min

$C_{72}H_{114}BF_2N_9O_{10}S_3$ (1410.74)

BODIPY-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 120

Eine Lösung von 27.0 mg (0.0244 mmol) Fmoc-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe **119** in 3 mL CH_2Cl_2 wird mit 1 mL Diethylamin versetzt und für 4 h gerührt. Das Lösungsmittel wird mit Toluol koevaporiert. Es werden 2 mL CH_2Cl_2 , 0.5 mL Methanol,

0.5 mL Triethylamin und 5 mL Toluol hinzugefügt, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und mit 2 mL eines Gemisches von CH₂Cl₂/DMF/ TFE 20:10:1 aufgenommen. Es wird eine Lösung von 11.4 mg (0.0390 mmol) BODIPY-OH, 7.5 mg (0.0391 mmol) EDC und 7.4 mg (0.0483 mmol) HOBt in 1 mL DMF zugefügt und für 12 h gerührt. Die Aufreinigung erfolgt durch präparative HPLC (P4).

Ausbeute: 4.1 mg (0.00354 mmol, 15 %)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.09 (s, 1H, BODIPY), 6.88 (s, 1H, BODIPY), 6.29 (s, 1H, BODIPY), 6.12 (s, 1H, BODIPY), 5.20-5.00 (m, 3H, C=CH Far), 4.76-4.00 (m, 9H, 5 × α-CH, 2 × α-CH₂ Gly, β-CH_{2a} Ser), 3.98-3.38 (m, 8H, β-CH_{2b} Ser, CH₂ Pro, OMe, CH₂ BODIPY), 3.33-2.85 (m, α-CH₂ Far, β-CH₂ Cys), 2.76-2.61 (m, 2H, CH₂ BODIPY), 2.60-2.45 (m, 5H, γ-CH₂ Met, CH₃ BODIPY), 2.40-1.82 (m, 20H, CH₃ BODIPY, 4 × CH₂ Far, 2 × CH₂ Pro, β-CH₂ Met, SCH₃), 1.78-1.35 (m, 15H, γ-CH Leu, β-CH₂ Leu, 4 × CH₃ Far), 1.00-0.75 (m, 6H, 2 × δ-CH₃ Leu)

LC-MS (LCMS2): ber. [M+H]⁺ 1156.6, gef. 1156.3, ber. [M-H]⁺ 1154.6, gef. 1154.5, R_t = 19.57 min

C₅₆H₈₄BF₂N₉O₁₀S₂ (1156.26)

Ac-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe 93

Von 500 mg (Beladung 0.38 mmol·g⁻¹, 0.190 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **79** beschrieben, das festphasengebundene Dipeptid Fmoc-Lys(Aloc)-Cys(Far) synthetisiert. Durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV **7**) und Ankupplung von Carbonsäuren nach AAV **8** wird das Dipeptid mit Fmoc-Cys(SStBu)-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH und Essigsäure verlängert. Die SStBu-Gruppe wird nach AAV **11** gespalten, das freie Thiol nach AAV **13** palmitoyliert und die Trityl-Gruppe entsprechend AAV **10** entfernt. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 18 mg (0.10 mmol) Cu(OAc)₂, 280 μL (3.47 mmol) Pyridin, 409 μL (6.99 mmol) Essigsäure und 0.9 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 15:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 74.4 mg (0.0686 mmol, 34 %)

$[\alpha]_D^{20} = -12.8^\circ$ (CHCl₃, c = 0.5)

$R_f = 0.20$ (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): $\delta = 5.86$ -5.70 (m, 1H, CH=CH₂ allyl), 5.20-4.92 (m, 5H, 3 × C=CH Far, CH=CH₂ allyl), 4.60-4.25 (m, 7H, 5 × α -CH, OCH₂ Allyl), 3.67-3.51 (m, 5H, β -CH₂ Ser, OMe), 3.30-2.95 (m, 8H, CH₂ Far, β -CH₂ Cys, β -CH₂ Cys, ϵ -CH₂ Lys), 2.64-2.50 (m, 4H, α -CH₂ Pal, γ -CH₂ Met), 2.05-1.65 (m, 18 H, β -CH₂ Met, SCH₃, CH₃, Acetyl, CH₂ Lys, 4 × CH₂ Far), 1.60-1.20 (m, 42H, 4 × CH₃ Far, 2 × CH₂ Lys, Pal), 0.75 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω -CH₃ Pal)

LC-MS (LCMS2): ber. [M+H]⁺ 1152.7, gef. 1153.6, $R_t = 25.79$ min

C₅₈H₁₀₀N₆O₁₁S₃ (1153.65)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.⁵¹ überein.

Ac-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys-Cys(Far)-OMe 94

Zu einer entgasten Lösung von 29.8 mg (0.026 mmol) Ac-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe **93** und 5.0 mg (0.032 mmol) *N,N'*-Dimethylbarbitursäure in 3.6 ml Tetrahydrofuran werden 5.0 mg (0.0043 mmol) Pd(PPh₃)₄ gegeben. Es wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethanol 10:1 (v/v), dann 5:1 (v/v), dann CH₂Cl₂/Methanol 5:1 (v/v) + 1 % Triethylamin als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 17.4 mg (0.0163 mmol, 63 %)

HPLC (HPLC4): $R_t = 17.93$ min

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 5.24$ -5.15 (m, 1H, C=CH Far), 5.12-5.03 (m, 2H, C=CH Far), 4.65-4.31 (m, 5H, 5 × α -CH), 3.90-3.70 (m, 5H, β -CH₂ Ser, OMe), 3.49-3.08 (m, 4H, -SCH₂-, β -CH₂ Cys), 3.00-2.88 (m, 3H, β -CH_{2a} Cys, ϵ -CH₂ Lys), 2.83-2.72 (m, 1H, β -CH_{2b} Cys), 2.64-2.50 (m, 4H, α -CH₂ Pal, γ -CH₂ Met), 2.15-1.85 (m, 18 H, β -CH₂ Met, SCH₃, CH₃, Acetyl, CH₂ Lys, 4 × CH₂ Far), 1.80-1.20 (m, 42H, 4 × CH₃ Far, 2 × CH₂ Lys, Pal), 0.91-0.84 (m, 3H, ω -CH₃ Pal)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 1069.7, gef. 1069.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₅₄H₉₇N₆O₉S₃ [M+H]⁺: ber.: 1069.6479; gef.: 1069.6500

C₅₄H₉₆N₆O₉S₃ (1069.57)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.⁵¹ überein.

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminocaprinsäure 103**

Bei 0 °C werden zu einer Lösung von 401 mg (2.01 mmol) NBD-Cl **101** in 20 mL Methanol 850 µL (5.00 mmol) DIEA gegeben. Es werden langsam im Zeitraum einer Stunde 315 mg (2.40 mmol) fester 6-Aminocaprinsäure hinzugefügt. Die Reaktion wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie mit Essigester/Methanol 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Es wird in Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 339 mg (1.15 mmol, 57 %, dunkelbraune Kristalle)

Smp.: 156.5 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 9.4 (s, 1 H; COOH), 8.41 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH NBD), 6.32 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH NBD), 3.41 (m, 2H, CH₂ Aca), 2.18 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂ Aca), 1.65 (m, 2H, CH₂ Aca), 1.53 (m, 2H, CH₂ Aca), 1.35 (m, 2H, CH₂ Aca)

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO): δ = 175.0, 145.7, 145.0, 144.7, 138.5, 121.1, 99.6, 49.2, 34.2, 28.0, 26.6, 24.8

LC-MS (LCMS1): ber. [M+H]⁺ 295.1, gef. 295.2, R_t = 9.14 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₁₂H₁₅N₄O₅ [M+H]⁺: ber.: 295.1042; gef.: 295.1042

C₁₂H₁₄N₄O₅ (294.26)

NBD Aca-Ser(Trt)-Cys(SStBu)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe 100

Von 269 mg (Beladung 0.38 mmol·g⁻¹, 0.102 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **79** beschrieben, das farnesylierte, festphasengebundene Dipeptid Fmoc-Lys(Aloc)-Cys(Far) synthetisiert. Durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV **7**) und Ankupplung von Carbonsäuren nach AAV **8** wird das Dipeptid mit Fmoc-Cys(SStBu)-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH und NBD-Aminocaprinsäure **103** verlängert. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 7.8 mg (0.043 mmol) Cu(OAc)₂, 140 µL (1.74 mmol) Pyridin und 0.44 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 (v/v) gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das

Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigester/Cyclohexan 1:5 (v/v) und 2% Triethylamin als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 64.5 mg (0.048 mmol, 47%)

$[\alpha]_D^{20} = -55.1^\circ$ (CHCl₃, c = 0.118)

R_f = 0.5 (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H, CH NBD), 7.45-7.06 (m, 19H, Trt, 4 × NH), 6.28 (m, 1H, CH NBD), 6.07 (s, 1H, NH), 5.79 (m, 1H, CH=CH₂ allyl), 5.34 (s, 1H, NH), 5.19-5.00 (m, 7H, CH=CH₂ allyl, C=CH-CH₂-S, 2 × C=CH Far, 2 × α-CH), 4.72-4.59 (m, 2H, 2 × α-CH), 4.45-4.35 (m, 4H, 2 × α-CH, O-CH₂ allyl), 3.80-3.55 (m, 4H, OMe, β-CH_{2a} Ser), 3.4-3.6 (m, 2H, α-CH₂ Aca), 3.35-3.04 (m, 7H, β-CH_{2b} Ser, α-CH₂ Far, β-CH₂ Cys, ε-CH₂ Lys), 2.85-2.84 (m, 1H, β-CH₂ Cys), 2.76-2.71 (m, 1H, β-CH₂ Cys), 2.18-2.16 (m, 2H, ε-CH₂ Aca), 1.99-1.86 (m, 8H, 4 × CH₂ Far), 1.71-1.30 (m, 24H, β-CH₂ Lys, γ-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys, 4 × CH₃ Far, β-CH₂ Aca, γ-CH₂ Aca, δ-CH₂ Aca), 1.21 (s, 9H, SStBu)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 174.0, 171.5, 171.4, 170.6, 170.0, 156.8, 144.5, 144.3, 143.6, 143.4, 140.2, 136.8, 135.6, 133.2, 131.5, 128.7, 128.4, 127.7, 124.5, 123.9, 119.8, 117.6, 98.7, 87.7, 65.7, 63.0, 54.9, 54.9, 53.9, 52.8, 52.1, 49.1, 41.6, 40.7, 39.9, 36.0, 33.1, 31.2, 30.0, 29.8, 29.6, 28.2, 27.0, 26.7, 26.6, 25.9, 24.9, 24.8, 23.0, 17.9, 16.4, 16.2

LC-MS (LCMS3): ber. [M-H] 1346.6, gef. 1346.5, ber. [M+Cl] 1382.6, gef. 1382.5, R_t = 23.90 min

C₇₀H₉₃N₉O₁₂S₃ (1348.74)

***N*-Methyl-isatosäure-anhydrid**

Zu 3.037 g (20.12 mmol) *N*-Methylantranilsäure werden 6.272 mL (60.40 mmol) Chlorameisensäureethylester gegeben. Es wird für 2 h unter Rückfluss erhitzt, nach Abkühlen wird mit 1.58 mL (22.15 mmol) Acetylchlorid versetzt und noch mal für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Rohprodukt aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 2.478 g (13.99 mmol, 70 %, brauner Feststoff)

R_f = 0.41 (Essigester/Cyclohexan 1:1 (v/v), + 1 % Essigsäure)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.12 (dd, J = 7.7 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, Aromat), 7.78 (ddd, J = 8.4 Hz, J = 7.4 Hz, J = 1.6 Hz, 1H, Aromat), 7.30 (dd, J = 7.6 Hz, J = 7.6 Hz, 1H, Aromat), 7.19 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Aromat), 3.58 (s, 3H, CH₃)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 158.5, 148.0, 142.1, 137.4, 130.8, 124.2, 114.0, 111.7, 31.9

C₉H₇NO₃ (177.16)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.¹²⁷ überein.

***N*-Methylanthranyloylaminocaprinsäure (MantAca-OH)**

Zu 1.000 g (5.84 mmol) *N*-Methyl-isatosäure-anhydrid und 0.75 g (5.84 mmol) Aminocaprinsäure werden 40 mL DMF gegeben und, es wird für 2 h bei 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert, und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigester/Cyclohexan 1:1 (v/v) und 1% Essigsäure als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.253 g (4.74 mmol, 82 %, farbloser Feststoff)

R_f = 0.38 (Essigester/Cyclohexan 1:1 (v/v), + 1% Essigsäure)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.34-7.26 (m, 2H, Aromat), 6.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Aromat), 6.58 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Aromat), 6.05-6.14 (s_{br}, 1H, NH), 3.43-3.36 (m, 1H, α -CH₂ Aca), 2.85 (s, 3H, CH₃), 2.37 (t, J = 7.4 Hz, 2H, ϵ -CH₂ Aca), 1.73-1.53 (m, 4H, 2 \times CH₂ Aca), 1.48-1.39 (m, 2H, γ -CH₂ Aca)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 179.2, 170.1, 150.5, 132.8, 127.3, 115.5, 114.6, 111.2, 39.5, 33.9, 29.77, 29.4, 26.4, 24.4

C₁₄H₂₀N₂O₃ (264.32)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.¹²⁷ überein.

MantAca-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 107

Von 517 mg (Beladung 0.38 mmol·g⁻¹, 0.196 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **81** beschrieben, das farnesylierte, festphasengebundene Tripeptid Fmoc-Leu-Pro-Cys(Far) synthetisiert. Durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 7) und Ankupplung von Carbonsäuren nach AAV 8 wird das Tripeptid

mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH und *N*-Methylantranilolyaminocaprinsäure (MantAca-OH) verlängert. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 7.8 mg (0.043 mmol) Cu(OAc)₂, 140 µL (1.74 mmol) Pyridin und 0.44 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 95 mg (0.097 mmol, 49 %)

$$[\alpha]_D^{20} = -37.6^\circ \text{ (CHCl}_3, c = 2.5)$$

R_f = 0.3 (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.81 (m, 1H, NH), 7.53 (m, 1H, NH), 7.43-7.39 (m, 2H, NH), 7.34 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Mant), 7.22 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Mant), 6.87-6.85 (m, 1H, NH), 6.73 (m, 1H, NH), 6.59 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Mant), 6.50 (t, J = 7.0 Hz, 1H, Mant), 5.12 (t, J = 7.4 Hz, 1 H; C=CH-CH₂-S), 5.06-5.03 (m, 2H, 2 × CH=C Far), 4.79-4.76 (m, 1H, α-CH), 4.65-4.58 (m, 4H, 4 × α-CH), 4.00 (m, 2H, α-CH Gly), 3.76-3.73 (m, 1H, CH_{2a} Pro), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.61-3.57 (m, 1H, CH_{2b} Pro), 3.33-3.29 (m, 2H, α-CH₂ Aca), 3.16-3.11 (m, 1H, α-CH_{2a} Far), 3.04-2.98 (m, 1H, α-CH_{2b} Far), 2.85-2.89 (m, 1H, β-CH_{2a} Cys), 2.79 (d, J = 4.9 Hz, 3H, NCH₃), 2.67-2.64 (m, 3H, β-CH_{2b} Cys, γ-CH₂ Met), 2.48-2.45 (m, 2H, ε-CH₂ Aca), 2.20- 2.16 (m, 3H, CH₂ Pro, CH_{2a} Pro), 2.10-1.90 (m, 15H, β-CH₂ Met, CH₃-S Met, γ-CH, Leu, 4 × CH₂ Far, CH_{2b} Pro), 1.63-1.30 (m, 20H, β-CH₂ Aca, γ-CH₂ Aca, δ-CH₂ Aca, 4 × CH₃ Far, β-CH₂ Leu), 0.90-0.87 (m, 6H, 2 × CH₃ Leu)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 173.5, 172.4, 172.0, 171.5, 171.3, 170.1, 168.6, 150.6, 140.1, 135.5, 132.7, 131.4, 127.6, 124.4, 123.8, 119.7, 115.6, 114.5, 111.0, 60.0, 52.5, 52.3, 52.1, 49.1, 47.5, 43.1, 41.7, 39.8, 39.5, 36.1, 32.9, 31.8, 30.1, 29.8, 29.7, 29.2, 28.4, 26.8, 26.6, 26.5, 25.8, 25.2, 24.9, 24.7, 23.4, 22.0, 17.8, 16.2, 16.1, 15.4.

LC-MS (LCMS2): ber. [M+H]⁺ 984.6, gef. 984.6, R_t = 24.37 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₅₁H₈₂N₇O₈S₂ [M+H]⁺: ber.: 984.5666; gef.: 984.5728

C₅₁H₈₁N₇O₈S₂ (984.36)

MantAca-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OH 106

Von 239 mg (Beladung $0.39 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.093 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **107** beschrieben, das farnesylierte, festphasengebundene Pentapeptid MantAca-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far) synthetisiert. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 10.0 mg (0.055 mmol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 280 μL (3.47 mmol) Pyridin, 400 μL (6.99 mmol) Essigsäure und 0.35 mL Wasser in 10 mL THF geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit THF/ H_2O 20:1 (v/v) gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet und mit wenig CH_2Cl_2 aufgenommen. Die blaue Lösung wird auf 200 mg Tris-aminoethyl HL Harz (Novabiochem) gegeben. Das Harz wird mit CH_2Cl_2 gewaschen und das Produkt mit THF/ H_2O 20:1 (v/v) und THF/ H_2O / AcOH 20:1:0.5 (v/v/v) eluiert.

Ausbeute: 28 mg (0.029 mmol, 31%)

$$[\alpha]_D^{20} = -31.5^\circ (\text{CHCl}_3, c = 1.3)$$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.38$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Mant), 7.29-7.26 (m, 1H, Mant), 7.06 (m, 1H, NH), 6.75 (m, 1H, NH), 6.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Mant), 6.54 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, Mant), 5.15 (m, 1H, $\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2\text{-S}$), 5.07 (m, 2H, $2 \times \text{CH}=\text{C}$, Far), 4.76-4.31 (m, 5H, $5 \times \alpha\text{-CH}$), 4.0-4.38 (m, 2H, $4 \times \alpha\text{-CH Gly}$), 3.72 (m, 1H, CH_{2a} Pro), 3.56 (m, 1H, CH_{2b} Pro), 3.33 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Aca), 3.31-2.91 (m, 4H, $\alpha\text{-CH}_2$ Far, $\beta\text{-CH}_2$ Cys), 2.86-2.66 (m, 5H, NCH_3 , $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.50 (m, 2H, $\epsilon\text{-CH}_2$ Aca), 2.26-1.86 (m, 15H, $2 \times \text{CH}_2$ Pro, $\text{CH}_3\text{-S}$ Met, $4 \times \text{CH}_2$ Far), 1.66-1.57 (m, 21H, $\beta\text{-CH}_2$ Aca, $\gamma\text{-CH}_2$ Aca, $\delta\text{-CH}_2$ Aca, $4 \times \text{CH}_3$ Far, $\beta\text{-CH}_2$ Leu, $\gamma\text{-CH}$ Leu), 0.87 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$ Leu)

LC-MS (LCMS2): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 970.5, gef. 970.5, ber. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 968.5, gef. 968.5 $R_t = 21.92$ min.

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{50}\text{H}_{79}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber.: 992.5329; gef.: 992.5376

$\text{C}_{50}\text{H}_{79}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2$ (970.34)

MantAca-Gly-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe 111

Von 249 mg (Beladung $0.43 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.107 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt) wird, wie für Verbindung **79** beschrieben, das farnesylierte, festphasengebundene Dipeptid Fmoc-Lys(Aloc)-Cys(Far) synthetisiert. Durch repetitive Schritte des Abspaltens von

Fmoc-Gruppen (AAV 7) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 8 wird das Dipeptid mit Fmoc-Cys(SStBu)-OH und Trt-Gly zum Tetrapeptid verlängert. Die SStBu-Gruppe wird nach AAV 11 gespalten und das freie Thiol entsprechend AAV 13 palmitoyliert. Die N-terminale Tritylgruppe wird gespalten (AAV 10) und das Harz mit einer Lösung von 111 mg (0.42 mmol) MantAca-OH, 61.9 μ L (0.40 mmol) DIC, 97 mg (0.64 mmol) HOBt und 15 μ L (0.11 mmol) Triethylamin für 4 h geschüttelt. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 18.0 mg (0.10 mmol) Cu(OAc)₂, 280 μ L (3.47 mmol) Pyridin, 400 μ L (6.99 mmol) Essigsäure und 0.9 mL Methanol in 20 mL CH₂Cl₂ geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit Methanol/CH₂Cl₂ 1:5 gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 36.7 mg (0.031 mmol, 29 %)

$$[\alpha]_D^{20} = -19.3^\circ \text{ (CHCl}_3, c = 1.6)$$

$R_f = 0.3$ (CH₂Cl₂/Methanol 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.35$ (d, J = 6.6 Hz, 1H, Mant), 7.28 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Mant), 6.62 (m, 1H, Mant), 6.56-6.52 (m, 1H, Mant), 5.88-5.81 (m, 1H, CH=CH₂ allyl), 5.25-5.07 (m, 5H, CH=CH₂ allyl, C=CH-CH₂-S, 2 \times C=CH Far), 4.80-4.39 (m, 5H, 3 \times α -CH, OCH₂ allyl), 4.08-3.96 (m, 2H, CH₂ α -Gly), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.37-3.09 (m, 8H, β -CH₂ Cys, ϵ -CH₂ Lys, α -CH₂ Far, α -CH₂ Aca), 2.92-2.80 (m, 2H, β -CH₂ Cys), 2.82 (s, 3H, CH₃ Mant), 2.54 (t, J = 7.1 Hz, 2H, α -CH₂ Pal), 2.31-2.27 (m, 2H, ϵ -CH₂ Aca), 2.07-1.95 (m, 8H, 4 \times CH₂ Far), 1.90-1.37 (m, 26H, β -CH₂ Aca, γ -CH₂ Aca, δ -CH₂ Aca, 4 \times CH₃ Far, β -CH₂, δ -CH₂, γ -CH₂ Lys, β -CH₂ Pal), 1.23 (s, 24H, Pal), 0.87 (t, J = 6.6 Hz, 3H, ω -CH₃ Pal)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 200.4, 174.2, 171.8, 171.4, 170.2, 169.8, 169.6, 156.7, 150.7, 140.3, 135.6, 133.3, 132.8, 131.5, 127.6, 124.7, 123.9, 119.7, 117.6, 115.7, 114.6, 111.2, 65.6, 53.2, 52.7, 52.5, 44.3, 43.9, 40.8, 39.9, 39.6, 35.9, 32.8-22.5$ (mehrere Signale), 17.9, 16.4, 16.2, 14.3

LC-MS (LCMS3): ber. [M+H]⁺ 1196.7, gef. 1196.7, $R_t = 27.85$ min

C₆₄H₁₀₅N₇O₁₀S₂ (1196.69)

MIC-Gly-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe 122

Die Synthese wird mit 128 mg (Beladung $0.43 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.055 mmol Cystein) festphasengebundenem Fmoc-Cys(Trt), analog wie für Verbindung **111** beschrieben, durchgeführt. Nach Spaltung der Trityl-Gruppe wird das Harz mit einer Lösung von 73.9 mg, (0.35 mmol) MIC-OH, $31 \mu\text{L}$ (0.20 mmol) DIC, 46 mg (0.30 mmol) HOBt und $34 \mu\text{L}$ (0.20 mmol) Triethylamin in 15 mL DMF versetzt und 3 h geschüttelt. Es wird fünfmal mit DMF und fünfmal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Zur Abspaltung wird das Harz in einer Sauerstoffatmosphäre für 2 h mit einer Lösung von 19.0 mg (0.10 mmol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, $140 \mu\text{L}$ (1.74 mmol) Pyridin, $200 \mu\text{L}$ (3.50 mmol) Essigsäure und 0.44 mL Methanol in 20 mL CH_2Cl_2 geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit Methanol/ CH_2Cl_2 1:5 (v/v) gewaschen. Von den vereinten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH_2Cl_2 /Methanol 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 13.9 mg (0.012 mmol , 22 %)

$[\alpha]_D^{20} = -12.2^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.85$)

$R_f = 0.3$ (CH_2Cl_2 /Methanol 20:1, (v/v))

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.40$ (s, 1H, NH), 7.18 (s, 1H, NH), 6.67 (s, 2H, CH=CH MIC), 6.52 (s, 1H, NH), 5.90 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$ allyl), 5.29-5.08 (m, 5H, CH=CH $\underline{2}$, C=CH-CH $\underline{2}$ -S, $2 \times$ C=CH Far), 4.68-4.52 (m, 5H, $3 \times \alpha$ -CH, OCH_2 allyl), 4.00-3.85 (m, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ -Gly), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.52-3.48 (m, 2H, NCH_2 MIC), 3.27-3.09 (m, 6H, β - CH_2 Cys, ϵ - CH_2 Lys, α - CH_2 Far), 2.95-2.78 (m, 2H, β - CH_2 Cys), 2.57 (t, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 2H, α - CH_2 Pal), 2.28-2.24 (m, 2H, CH_2 MIC), 2.1- 1.90 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$ Far), 1.8-1.1 (m, 48H, β - CH_2 Aca, γ - CH_2 Aca, δ - CH_2 Aca, β - CH_2 , δ - CH_2 , γ - CH_2 Lys, $4 \times \text{CH}_3$ Far, Pal), 0.87-0.85 (m, 3H, ω - CH_3 Pal)

MS (MALDI-TOF, DHB): ber. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1165.7, gef. 1165.9

LC-MS (LCMS3): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1143.7, gef. 1143.6, $R_t = 25.04 \text{ min}$

$\text{C}_{60}\text{H}_{98}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}_2$ (1143.59)

6.4 Versuche zur Baustein-gestützten Synthese

(Aloc-Cys-OH)₂ 124

Zu 5.00 g (20.8 mol) Cystin **123** und 3.00 g (53.5 mmol) KOH in 80 mL einer halbgesättigten Natriumcarbonat-Lösung werden unter Eiskühlung 5.30 mL (50.4 mmol) Chlorameisensäureallylester getropft. Es wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wird zweimal mit Diethylether gewaschen und mit konz. HCl auf pH 1 eingestellt, dann fünfmal mit je 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 6.417 g (15.7 mmol, 75 %, farbloses Öl)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 7.55 (m, 2H, OH), 5.89-5.82 (m, 2H, CH₂=CH), 5.25 (d, ³J=17.2 Hz, 2H, CH_{a2}=CH), 5.14 (d, ³J= 10.4 Hz, 2H, CH_{b2}=CH), 4.44 (m, 4H, OCH₂), 4.26-4.20 (m, 2H, α-CH Cys), 3.14-3.09 (m, 2H, β-CH_{2a} Cys), 2.92-2.86 (m, 2H, β-CH_{2b} Cys)

LC-MS (LCMS1): ber. [M+H]⁺ 409.1, gef. 409.0; ber. [M+Na]⁺ 431.1, gef. 431.1, R_t = 12.87 min

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.¹³³ überein.

Aloc-Cys(Pal)-OH 125

Zu 1.730 g (4.24 mmol) (Aloc-Cys-OH)₂ **124** in 28 mL 1M Natriumhydroxidlösung werden 0.640 g (16.8 mmol) NaBH₄ gegeben. Es wird zwei Tage gerührt und mit konz. HCl auf pH 2 eingestellt. Die Lösung wird fünfmal mit je 40 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende Rückstand wird mit 25 mL THF aufgenommen und mit 0.956 g (8.80 mmol) TMSCl versetzt. Es wird 2 h bei 45 °C gerührt. Zu dem eisgekühlten Reaktionsgemisch werden unter Argon 1.189 mL (8.58 mmol) Triethylamin und 2.020 g (6.66 mmol) Palmitoylchlorid gegeben. Es wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Cyclohexan 1:1 (v/v) und 1 % Essigsäure als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.779 g (1.76 mmol, 42 %, farbloser Feststoff)

R_f = 0.68 (Essigsäureethylester/Cyclohexan 2:1 (v/v), + 1 % Essigsäure)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.12 (br, 1H, COOH), 5.94-5.85 (m, 1H, CH₂=CH), 5.60 (m_{br}, 1H, NH Urethan), 5.29 (d, ³J=17.2 Hz, 1H, CH_{a2}=CH), 5.20 (³J=10.4 Hz, 1H, CH_{b2}=CH), 4.60-4.55 (m, 3H, α-CH Cys, OCH₂), 3.46-3.28 (m, 2H, β-CH Cys), 2.56 (t, ³J=

7.4 Hz, 2H, α -CH₂, Pal), 1.64-1.59 (m, 2H, β -CH₂, Pal), 1.4-1.2 (m, 24H, CH₂, Pal), 0.87 (t, ³J=7.2 Hz, 3H, ω -CH₃ Pal)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 199.4, 174.4, 156.2, 132.5, 118.1, 66.3, 53.9, 44.1, 32.0, 22.8-30.5 (mehrere Signale), 14.2

LC-MS (LCMS1): ber. [M-H]⁻ 442.3, gef. 442.1, R_t = 31.87 min

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.¹³³ überein.

Fmoc-Gly-Cys(Pal)-Phe-OH 129

Zu einer Lösung von 0.111 g (0.29 mmol) Fmoc-Phe-OH und 0.190 mL (1.12 mmol) DIEA in 15 mL CH₂Cl₂ werden 0.133 mg 2-Chlortrityl-Chlorid-Harz (Beladung 1.08 mmol/g, 0.144 mmol reaktive Gruppen) gegeben. Es wird 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wird fünfmal mit einem Gemisch aus CH₂Cl₂/Methanol/DIEA 17:2:1 (v/v/v) gewaschen. Von 75 mg des erhaltenen Harzes mit der Beladung 0.66 mmol·g⁻¹ (0.050 mmol) wird die Fmoc-Gruppe abgespalten und Aloc-Cys(Pal)-OH angekuppelt. Fmoc-Gly-OH wird an das *in situ* entschützte, harzgebundene Dipeptid angekuppelt:

in situ – Entschützung und Kupplung:

Es werden 54.7 mg (0.184 mmol), Fmoc-Gly-OH in einem Gemisch von DMF/ CH₂Cl₂ 1:2 mit 28.5 mL (0.184 mmol) DIC und 25.0 mg (0.184 mmol) HOBt für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 136.0 mL (1.104 mmol) PheSiH₃ wird im Ultraschall entgast und die klare Lösung unter Argon zum Harz geben. Es wird Pd(PPh₃)₄ hinzugefügt und über Nacht geschüttelt.

Nach Waschen mit DMF und CH₂Cl₂ wird das Produkt mit 5 % TFA in CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten und durch Säulenchromatographie mit CH₂Cl₂/MeOH 30:1 und 0.6 % Essigsäure als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 14.5 mg (0.0184 mmol, 37 % bezogen auf die Menge von Fmoc-Phe am Harz, farbloser Feststoff)

$[\alpha]_D^{20} = +2.0^\circ$ (CHCl₃/MeOH 1:1, c = 0.26)

R_f = 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1 (v/v) + 0.6 % Essigsäure)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/MeOD 6:1): δ = 7.76 (d, 2 H, ³J=7.6 Hz, Fmoc), 7.65-7.10 (m, 11 H, Fmoc, arom. CH Phe), 4.68-4.64 (m, 1 H, α -CH), 4.50-4.47 (m, 1 H, α -CH), 4.40 (d, ³J= 7.2 Hz, 2 H, CH₂ Fmoc), 4.24 (t, ³J= 7.2 Hz, H, CH Fmoc), 3.85 (d, ¹J=17.2 Hz, 1 H,

CH_{2a} Gly), 3.73 (d, ¹J=17.2 Hz, 1 H, CH_{2b} Gly), 3.26-3.20 (m, 2 H, CH₂-Ph), 3.13-3.01 (m, 2 H, β-CH₂ Cys), 2.50 (t, ³J=7.0 Hz, 2 H, α-CH₂ Pal), 1.59-1.55 (m, 2 H, β-CH₂ Pal), 1.35-1.1 (24 H, CH₂ Pal), 0.87 (t, ³J=7.0 Hz, 3 H, ω-CH₃ Pal)

LC-MS (LCMS2): ber. [M-H]⁻ 784.4, gef. 784.3; ber. [2M-H]⁻ 1569.8, gef. 1569.5, R_t = 26.09 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₄₅H₅₉N₃NaO₇S [M+Na]⁺: ber. 808.3971, gef. 808.3969

C₄₅H₅₉N₃O₇S (786.03)

Pal-Cys(Fmoc-Gly)-Phe-OH 132

Zu einer Lösung von 0.093 g (0.24 mmol) Fmoc-Phe-OH und 0.130 mL (0.95 mmol) Triethylamin in 15 mL CH₂Cl₂ werden 120 mg 2-Chlortrityl-Chlorid-Harz (Beladung 1.0 mmol/g, 0.120 mmol reaktive Gruppen) gegeben. Es wird 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, das Harz wird fünfmal mit einem Gemisch aus CH₂Cl₂/Methanol/DIEA 17:2:1 (v/v/v) gewaschen. Man erhält 0.142 g Harz mit der Beladung 0.4 mmol·g⁻¹ (0.057 mmol). Die Fmoc-Schutzgruppe wird entschützt und Fmoc-Cys(SStBu)-OH angekuppelt. Nach Entschützen der Fmoc-Gruppe wird zu dem Harz eine Lösung aus 0.155 mL (0.57 mmol) Palmitoylchlorid, 0.087 g (0.57 mmol) HOBt und 0.157 mL (1.13 mmol) Triethylamin in CH₂Cl₂ gegeben, und es wird 12 h geschüttelt. Die StBu-Gruppe wird reaktiv entfernt und eine Lösung von 0.134 g (0.45 mmol) Fmoc-Gly-OH, 0.154 mg (0.41 mmol) HBTU, 0.069 g (0.45 mmol) HOBt und 0.117 mL (0.904 mmol) DIEA in 20 mL DMF wird zugefügt. Nach 12 h Schütteln bei Raumtemperatur wird das Harz mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen und das Produkt mit 2 % TFA in CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie mit CH₂Cl₂/MeOH 30:1 und 0.6 % Essigsäure als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 15.1 mg (0.0192 mmol, 34 % bezogen auf die Menge von Fmoc-Phe am Harz, farbloser Feststoff).

$[\alpha]_D^{20} = -1.9^\circ$ (CHCl₃/MeOH 1:1, c = 0.26)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/MeOD 6:1): δ = 7.66 (d, 2 H, ³J=7.4 Hz, Fmoc), 7.76 (d, 2 H, ³J=7.4 Hz, Fmoc), 7.38-7.05 (m, 9 H, Fmoc, arom. CH Phe), 4.64-4.57 (m, 1 H, α-CH), 4.48-4.43 (m, 1 H, α-CH), 4.32 (d, ³J= 7.0 Hz, 2 H, CH₂ Fmoc), 4.14 (t, ³J= 7.0 Hz, H, CH Fmoc), 3.94 (m, 2 H, CH₂ Gly), 3.30-2.90 (m, 4 H, CH₂ Phe, β-CH₂ Cys), 2.07-1.97 (m, 2 H, α-CH₂ Pal), 1.50-1.40 (m, 2 H, β-CH₂ Pal), 1.25-1.10 (24 H, CH₂ Pal), 0.78 (t, ³J=6.8 Hz, 3 H, ω-CH₃ Pal)

LC-MS (LCMS2): ber. $[M+H]^+$ 786.4, gef. 786.4; ber. $[M+Na]^+$ 808.4, gef. 808.5; ber. $[M-H]^-$ 784.4, gef. 784.6; ber. $[2M-H]^-$ 1569.8, gef. 1569.7; $R_t = 22.53$ min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{45}H_{59}N_3NaO_7S$ $[M+Na]^+$: ber. 808.3971, gef. 808.3958
 $C_{45}H_{59}N_3O_7S$ (786.03)

6.5 Parallelsynthese von lipidierten Benzodiazepindionen

6.5.1 Versuche zur Benzodiazepindionsynthese in Lösung

(2*R*, 11*aS*)-7-Brom-2-hydroxy-1,2,3,11*a*-tetrahydro-10*H*-benzo[e]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11-dion **136**

HO-5-7-6-Br

Eine Lösung von 10.550 g (43.59 mmol) 5-Bromisatosäureanhydrid **138** und 6.860 g (52.23 mmol) 4-(*R*)-Hydroxy-*L*-prolin **137** in 60 ml DMSO wird 5 h bei 140 °C gerührt. Die erkaltete Mischung wird auf 300 ml Wasser gegossen und viermal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt **136** wird in Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 11.168 g (35.89 mmol, 82 %, farbloser Feststoff)

$R_f = 0.22$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:10 (v/v))

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.98$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.65 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 4.52-4.48 (m, 1H, $CHC(O)$), 4.33-4.28 (m, 1H, $CHOH$), 3.79 (ddd, 1H, $J = 12.5$ Hz, $J = 3.5$ Hz, $J = 1.1$ Hz, $-CH_{2a-N}$), 3.62 (m, 1H, $J = 12.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, $-CH_{2b-N}$), 2.88-2.79 (m, 1H, $-CH_{2a-}$), 2.14-2.05 (m, 1H, $-CH_{2b-}$)

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO): $\delta = 170.9, 164.5, 136.4, 135.5, 133.2, 128.4, 124.3, 116.5, 68.1, 55.9, 54.8, 35.1$

LC-MS (LCMS8): ber. $[M+H]^+$ 311.0, gef. 311.1; ber. $[M-H]^-$ 309.0, gef. 309.3; $R_t = 8.90$ min

$C_{12}H_{11}N_2O_3Br$ (311.13)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.¹³⁵ überein.

(2R, 11aS)-2-Hydroxy-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure-methylester 139

HO-5-7-6-COOMe

Zu 100 mg (0.321 mmol) HO-5-7-6-Br **136**, 18.7 mg (0.083 mmol) Pd(OAc)₂ und 44.6 mg (0.108 mmol) dppp wird eine entgaste Lösung von 1.2 mL Methanol und 0.4 mL (2.886 mmol) Triethylamin in 3 mL DMF gegeben. Es wird für 10 min CO durch das Reaktionsgemisch geleitet, anschließend wird unter einer CO-Atmosphäre von 1 bar für 20 h bei 75 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit CH₂Cl₂/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 80.9 g (0.279 mmol, 87 %, farbloser Feststoff).

$[\alpha]_D^{20} = + 509.7^\circ$ (MeOH:CHCl₃ 1:4, c = 0.32)

$R_f = 0.13$ (CH₂Cl₂/MeOH 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.47 (s, 1H, arom. CH), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom. CH), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom. CH), 4.42-4.37 (m, 1H, CHC(O)), 4.15-4.09 (m, 1H, CHOH), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.72 (dd, 1H, J = 12.5 Hz, J = 3.5 Hz, -CH_{2a}-N), 3.51 (dd, 1H, J = 12.6 Hz, J = 4.6 Hz, -CH_{2b}-N), 2.77-2.68 (m, 1H, -CH_{2a}-), 2.04-1.94 (m, 1H, -CH_{2b}-)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ = 170.5, 166.1, 165.9, 140.3, 133.1, 132.2, 126.3, 125.8, 121.4, 68.4, 56.0, 54.3, 51.8, 34.5

LC-MS (LCMS1): ber. [M+H]⁺ 291.1, gef. 291.2, R_t = 6.92 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₁₄H₁₅N₂O₅ [M+H]⁺: ber.: 291.0981; gef.: 291.0961

C₁₄H₁₄N₂O₅ (290.27)

(2S, 11aS)-2-Azido-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure-methylester 140

N₃-5-7-6-COOMe

Eine Lösung von 80.0 mg (0.279 mmol) HO-5-7-6-COOMe **139** in 1.5 ml Pyridin wird bei 0 °C mit 33.5 µL (0.433 mmol) Methansulfonsäurechlorid versetzt. Es wird 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 5 ml 1 N Salzsäure gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Es werden 94.2 mg (0.256 mmol, 92 %) eines bräunlichen Feststoffs als Zwischenprodukt erhalten. Das Zwischenprodukt wird in 4 ml Dimethylformamid gelöst, mit 0.415 g (6.40 mmol) Natriumazid versetzt und 4 d bei

45 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert, und das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 69.4 mg (0.220 mmol, 79 %, farbloser Feststoff)

$[\alpha]_D^{20} = +445.5^\circ$ (CHCl₃, c = 0.73)

Smp.: 119.5 °C

R_f = 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1, (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.57 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 8.05 (dd, J = 8.3 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, arom. CH), 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom. CH), 4.36-4.30 (m, 1H, CHC(O)), 4.16-4.11 (m, 1H, CHOH), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.75 (dd, 1H, J = 12.9 Hz, J = 5.1 Hz, -CH_{2a}-N), 3.67 (d, 1H, J = 12.9 Hz, -CH_{2b}-N), 3.05-2.98 (m_{verd}, 1H, -CH_{2a}-), 2.34 (ddd, J = 14.2 Hz, J = 9.0 Hz, J = 5.3 Hz, 1H, -CH_{2b}-)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ = 170.4, 165.7, 165.2, 139.4, 133.6, 133.1, 126.4, 125.0, 121.2, 57.9, 56.2, 53.0, 52.4, 30.9

LC-MS (LCMS4): ber. [M+H]⁺ 316.1, gef. 316.1, ber. [M-H]⁻ 314.1, gef. 314.2, R_t = 11.21 min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₁₄H₁₄N₅O₄ [M+H]⁺: ber.: 316.1046; gef.: 316.1035

C₁₄H₁₃N₅O₄ (315.28)

(2R, 11aS)- 3-(2-Hydroxy-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl)-acrylsäure-tert-butylester 142

HO-5-7-6-C₂H₂CO₂ tBu

Zu einer entgasten Lösung von 5.000 g (16.07 mmol) HO-5-7-6-Br **136**, 0.500 g (1.60 mmol) Tri-*o*-tolylphosphin, 6.72 ml (48.22 mmol) Triethylamin und 7.10 ml (48.43 mmol) *tert*-Butylacrylat in 20 ml Acetonitril in einem Druckglas werden 0.180 g (0.79 mmol) Pd(OAc)₂ gegeben. Die Lösung 18 h bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 4.560 g (12.71 mmol, 79 %, farbloser Feststoff)

R_f = 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1, (v/v))

HPLC (HPLC5): R_t = 18.63 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.52 (s, 1 H, NH),), 7.95 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, arom. CH), 7.53 (dd, J = 8.5 Hz, J = 2.1 Hz, 1 H, arom CH), 7.44 (d, J = 15.8 Hz, 1 H, -CH=CHC(O)-), 7.06 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, arom. CH), 6.29 (d, J = 16.0 Hz, 1 H, -CH=CHC(O)-), 4.57-4.48 (m, 1 H, -CHC(O)-), 4.30-4.20 (m, 1 H, -CHOH-), 3.92 (d, J = 13.9 Hz, 1 H, -CH_{2a}N-), 3.59 (dd, J = 12.5 Hz, J = 4.3 Hz, 1 H, -CH_{2b}N-), 2.88-2.77 (m, 1 H, -CH_{2a}-), 2.20-2.07 (m, 1 H, -CH_{2b}-), 1.49 (s, 9 H, -C(CH₃)₃)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 170.4, 166.0, 165.7, 141.4, 136.4, 131.5, 131.4, 131.1, 126.3, 121.9, 120.9, 81.3, 68.7, 55.9, 54.7, 34.7, 28.4

LC-MS (LCMS5): ber. [M+H]⁺ 359.2, gef. 359.2 ; ber. [M-H]⁻ 357.2, gef. 357.3; R_t = 19.55 min

C₁₉H₂₂N₂O₅ (358.39)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.⁵¹ überein.

(2S, 11aS)-3-(2-Azido-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl)- acrylsäure-*tert*-butylester 143

N₃-5-7-6-C₂H₂CO₂ tBu

Eine Lösung von 1.880 g (5.24 mmol) HO-5-7-6-C₂H₂CO₂ tBu **142** in 20 ml Pyridin wird bei 0 °C mit 0.609 ml (7.87 mmol) Methansulfonsäurechlorid versetzt. Es wird 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 30 ml 1 N Salzsäure gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Es werden 1.666 g (3.82 mmol, 79 %) eines bräunlichen Feststoffs als Zwischenprodukt erhalten. Das Zwischenprodukt wird in 60 ml Dimethylformamid gelöst, mit 6.307 g (97.02 mmol) Natriumazid versetzt und 4 d bei 45 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert, und das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.426 g (3.718 mmol, 71 %, farbloser Feststoff)

R_f = 0.24 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:10 (v/v))

HPLC (HPLC5): R_t = 21.37 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.53 (s, 1 H, NH), 8.13 (s, 1 H, arom. CH), 7.62 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, arom. CH), 7.55 (d, J = 15.9 Hz, 1 H, -CH=CHC(O)-), 7.14 (m, 1 H, arom. CH),

6.38 (d, $J = 15.9$, Hz, 1H, -CH=CHC(O)-), 4.40-4.33 (m, 1 H, -CHC(O)-), 4.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, -CHN₃), 3.81 (d, $J = 12.9$ Hz, 1 H, -CH_{2a}N-), 3.72 (d, $J = 12.7$ Hz, 1 H, -CH_{2b}N-), 3.12 (d, $J = 14.1$ Hz, 1 H, -CH_{2a}-), 2.43-2.33 (m, 1 H, -CH_{2b}-), 1.52 (s, 9 H, -C(CH₃)₃)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.5, 165.6, 164.9, 141.0, 136.2, 131.4, 131.3, 131.0, 125.3, 121.5, 120.9, 80.6, 57.7, 55.8, 52.8, 30.7, 25.1$

LC-MS (LCMS5): ber. [M+H]⁺ 384.2, gef. 384.2, 2 ; ber. [M-H]⁻ 382.2, gef. 382.2; R_t = 24.45 min

C₁₉H₂₁N₅O₄ (383.40)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.⁵¹ überein.

(2S, 11aS)-2-Azido-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure 144

N₃-5-7-6-COOH

Zu einer Lösung von 5.580 g (25.82 mmol) Natriumiodat in 75 ml eines Gemisches von Wasser/Acetonitril/Tetrachlormethan im Verhältnis 2:1:1 (v/v/v) wird eine Lösung von 0.073 g (0.351 mmol) Ruthenium(III)chlorid Hydrat in 37 mL 1 mM Salzsäure getropft. Es wird 20 min gerührt. Eine Lösung von 0.978 g (2.55 mmol) N₃-5-7-6-C₂H₂CO₂ tBu **143** in 75 ml Acetonitril/Tetrachlormethan 1:1 (v/v) wird zugetropft, und es wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 100 ml 1 N Salzsäure aufgenommen. Die wässrige Phase wird fünfmal mit je 50 mL Chloroform/*iso*-Propanol 4:1 (v/v) extrahiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethanol/Dichlormethan 1:10 (v/v) + 1 % Essigsäure als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.730 g (2.42 mmol, 95 %, farbloser Feststoff)

$[\alpha]_D^{20} = +365.3^\circ$ (MeOH, $c = 0.544$)

Smp.: 115 °C (Zersetzung)

HPLC (HPLC5): R_t = 14.38 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:1 (v/v)): $\delta = 8.11$ (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.65 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1 H, arom. CH), 6.73 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, arom. CH), 4.00-3.93 (m, 1 H, -CHC(O)-), 3.82 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, -CHN₃), 3.31 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.18 (d, $J = 12.7$ Hz, 1 H, -CH_{2b}N-), 2.53 (ddd, $J = 14.1$ Hz, $J = 3.8$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1 H, -CH_{2a}-), 1.96 (ddd, $J = 14.2$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1 H, -CH_{2b}-)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 (v/v)): $\delta = 170.0, 166.4, 165.3, 139.4, 133.1, 132.3, 126.2, 124.3, 120.6, 57.6, 55.8, 52.4, 30.1, 26.7$

LC-MS (LCMS7): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 302.1, gef. 302.1; ber. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 300.2, gef. 300.2; $R_t = 18.31$ min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 302.0889; gef.: 302.0879
 $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4$ (301.26)

(2*S*, 11*aS*)-2-Azido-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11*a*-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-carbonsäure-allylester 145

N_3 -5-7-6-COOAll

Zu einer Lösung von 2.360 g (7.83 mmol) N_3 -5-7-6- $\text{C}_2\text{H}_2\text{COOH}$ **144** in 65 ml eines Gemisches von Dichlormethan/DMF im Verhältnis 50:15 (v/v) werden 1.859 g (9.70 mmol) EDC, 0.139 g (1.14 mmol) DMAP und 5.317 mL (78.3 mmol) Allylalkohol gegeben. Es wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Essigsäureethylester/ Cyclohexan 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.833 g (5.37 mmol, 69 %)

$[\alpha]_D^{20} = +456.9^\circ$ (MeOH:CHCl₃ 1:4, $c = 0.32$)

Smp.: 162 °C (Zersetzung)

$R_f = 0.49$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2 (v/v))

HPLC (HPLC5): $R_t = 18.58$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.97$ (s, 1H, NH), 8.62 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, arom. CH), 8.09 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, arom. CH), 6.02-5.90 (m, 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.36 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_{2a}$), 5.25 (d, $J = 10.4$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_{2b}$), 4.83-4.70 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.40-4.35 (m, 1 H, -CHC(O)-), 4.21 (d, $J = 8.8$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1 H, -CHN₃), 3.77 (dd, $J = 12.9$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.68 (d, $J = 12.7$ Hz, 1 H, -CH_{2b}N-), 3.07 (d, $J = 14.2$ Hz, 1 H, -CH_{2a}-), 2.37 (ddd, $J = 14.2$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1 H, -CH_{2b}-)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.0, 165.0, 164.7, 139.3, 133.7, 133.3, 131.9, 126.6, 125.1, 121.5, 117.7, 66.2, 58.5, 56.4, 55.9, 53.4, 31.2, 28.5$

LC-MS (LCMS6): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 341.2, gef. 342.1, $R_t = 6.82$ min

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 342.1202; gef.: 342.1203
 $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4$ (341.32)

Br-C₂H₄-NHBoc 147

Zu einer eisgekühlten Lösung von 5.120 g (25.0 mmol) (2-Bromethyl)amin Hydrobromid **146** und 5.460 g (25.0 mmol) Di-tert-butyldicarbonat in 13 mL Dichlormethan werden langsam 4.17 mL (30.1 mmol) Triethylamin getropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit Dichlormethan auf 50 mL aufgefüllt und je zweimal mit gesättigter KHSO₄-Lösung, Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Es wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 3.478 g (15.5 mmol, 62 %)

R_f = 0.24 (Dichlormethan)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.0-4.90 (s_{br}, 1H, NH), 3.60-3.38 (m, 4H, -CH₂-CH₂-), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 155.5, 80.0, 42.6, 33.0, 28.6

C₇H₁₄BrNO₂ (224.10)

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.¹⁴¹ überein.

2-Azido-10-(2-tert-butoxycarbonylamino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure-allylester 148

N₃-5-7(C₂H₄NHBoc)-6-CO₂All

Zu einer Lösung von 0.710 g (2.08 mmol) N₃-5-7-6-COOAll **145** in 24 mL DMF werden 0.932 g (4.48 mmol) Br-(C₂H₄)-NHBoc **147** und 2.640 g KF auf Al₂O₃ (~5.5 mmol F/g) gegeben. Es wird für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.001 g (2.07 mmol, 99 %) eines Gemisches der (2S, 11aS, **148**) und (2S, 11aR, **149**)- Diastereomere im Verhältnis 4.6:1 (HPLC5)

R_f = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1, (v/v))

C₂₃H₂₈N₆O₆ (484.5053)

Die beiden Diastereomere werden mittels präparativer HPLC (P5) aufgetrennt.

(2*S*, 11*aS*)-2-Azido-10-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11*a*-hexahydro-1*H*-benzo[e]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-carbonsäure-allylester 148

(11*aS*)-N₃-5-7(C₂H₄NHBoc)-6-CO₂All

Ausbeute: 0.510 g (1.05 mmol, 51 %)

$[\alpha]_D^{20} = +453.9^\circ$ (CHCl₃, c = 1.0)

Smp.: 69-73 °C

HPLC (HPLC5): R_t = 21.78 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.54 (s, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, arom. CH), 8.18 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, arom. CH), 7.50 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 6.04-5.94 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.38 (d, ³J = 17.2 Hz, 1H, OCH₂CH=CH_{2a}), 5.28 (d, ³J = 10.4 Hz, 1H, OCH₂CH=CH_{2b}), 4.90-5.05 (m, 1H, NH), 4.90-4.70 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.35-4.27 (m, 1H, CHN₃), 4.15-4.07 (m, 2H, CHC(O) und NCH_{2a}CH₂NHAloc), 4.05-3.95 (m, 1H, NCH_{2b}CH₂NHAloc), 3.85 (dd, 1H, ²J = 12.9 Hz, ³J = 5.9 Hz, CHN₃-CH_{2a}-N), 3.64 (dd, 1H, ²J = 12.9 Hz, ³J = 2.6 Hz, CHN₃-CH_{2b}-N), 3.45-3.35 (m, 2H, NCH₂CH₂NHAloc), 3.03 (ddd, J = 14.0 Hz, J = 2.9 Hz, J = 2.9 Hz, 1H, CHN₃-CH_{2a}-CHC(O)), 2.36 (ddd, J = 14.0 Hz, J = 9.0 Hz, J = 6.1 Hz, 1H, CHN₃-CH_{2b}-CHC(O)), 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 168.6, 164.6, 164.4, 155.9, 143.3, 133.6, 132.3, 131.7, 128.8, 127.7, 122.8, 118.8, 79.8, 66.1, 58.2, 56.7, 52.1, 49.3, 39.2, 31.4, 28.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₂₃H₂₈N₆O₆Na [M+Na]⁺: ber.: 507.1968; gef.: 507.1955

(2*S*, 11*aR*)-2-Azido-10-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11*a*-hexahydro-1*H*-benzo[e]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-carbonsäure-allylester 149

(11*aR*)-N₃-5-7(C₂H₄NHBoc)-6-CO₂All

Ausbeute: 0.124 g (0.26 mmol, 13 %)

$[\alpha]_D^{20} = -269.1^\circ$ (CHCl₃, c = 1.0)

Smp.: 64-69 °C

HPLC (HPLC5): R_t = 22.33 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.58 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, arom. H), 8.21 (dd, 3J=8.4 Hz, 4J= 2.0 Hz, 1H, arom. CH), 7.51 (d, 3J=8.4 Hz, 1H, arom. CH), 6.02-5.96 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.40 (d, 3J=17.2 Hz, 1H, OCH₂CH=CH_{2a}), 5.30 (d, ³J = 10.4 Hz, 1H, OCH₂CH=CH_{2b}), 4.87-4.73 (m, 3H, NH, OCH₂CH=CH₂), 4.40-4.34 (m, 1H, CHN₃), 4.19 (m, 1H, CHC(O)), 4.12-4.06 (m, 1H, NCH_{2a}CH₂NHAloc), 4.00-3.94 (m, 1H, NCH_{2b}CH₂NHAloc), 3.83-3.75 (m, 2H, CHN₃-CH₂-N), 3.45-3.30 (m, 2H,

NCH₂CH₂NHAlOc), 3.05 (ddd, J=13.5 Hz, J= 5.67 Hz, J=5.67 Hz, CHN₃-CH_{2a}-CHC(O) 2.14 (ddd, J=19.0 Hz, J=8.01 Hz, J= 5.67, CHN₃-CH_{2b}-CHC(O)), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃)
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 168.1, 164.4, 155.8, 143.1, 133.6, 132.3, 131.8, 129.2, 128.1, 122.8, 118.9, 79.9, 66.2, 58.7, 56.1, 51.2, 49.3, 39.2, 32.6, 28.5
HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₂₃H₂₉N₆O₆ [M+H]⁺: ber.: 485.2149; gef.: 485.2114

6.5.2 Versuche zur Parallelsynthese von lipidierten Benzodiazepindionen an der festen Phase

Beispielhafte Vorschrift: Boc-Abspaltung und Anknüpfung an die feste Phase zu 150

Zu 0.244 g (0.504 mmol) N₃-5-7(C₂H₄NHBoc)-6-CO₂All **148** werden 15 mL CH₂Cl₂ und 15 mL TFA gegeben. Es wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wird in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 0.858 mL (6.19 mmol) Triethylamin und 1.22 g Chlortrityl-Polystyren Harz (Beladung 1.3 mmol·g⁻¹, 1.59 mmol reaktive Gruppen) versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, das Harz wird abfiltriert und fünfmal mit einem Gemisch aus CH₂Cl₂/Methanol/DIEA 17:2:1 (v/v/v) anschließend mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen. Man erhält 0.504 mmol festphasengebundenes N₃-5-7(C₂H₄NH-TrtHarz)-6-CO₂All **150**.

Testabspaltung nach AAV 2:

HPLC (HPLC5): R_t = 14.07 min

LC-MS (LCMS7, Gradient: 0 min: 0:100; 3 min 0:100; 23 min: 70:30): ber. [M+H]⁺ 385.2, gef. 385.1, R_t = 13.91 min

Beispielhafte Vorschrift: Azidreduktion an der festen Phase mit Zinn(II)-chlorid zu 151

Zu einer Lösung von 0.663 g (3.50 mmol) Zinn(II)-chlorid in 13 mL THF werden 1.199 mL (11.73 mmol) Thiophenol und 2.045 mL (14.75 mmol) Triethylamin gegeben. Die Suspension wird zu 0.504 mmol festphasengebundenem N₃-5-7(C₂H₄NH-TrtHarz)-6-CO₂All **150** gegeben und es wird 12 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert und siebenmal mit CH₂Cl₂ und DMF gewaschen.

Testabspaltung nach AAV 2:

HPLC (HPLC5): R_t = 11.24 min

Beispielhafte Vorschrift: Azidreduktion an der festen Phase mit Tributylphosphan

Zu 0.040 mmol festphasengebundenem N_3 -5-7(C_2H_4NH -TrtHarz)-6- CO_2 All **150** wird eine Lösung von 200 μ L (0.811 mmol) Tributylphosphan und 100 μ L (5.56 mmol) Wasser in 3 mL THF gegeben, und es wird 12 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert und siebenmal mit CH_2Cl_2 und DMF gewaschen.

Kupplung zum Sulfonamid: C_4H_9 - SO_2NH -5-7(C_2H_4 -NH-TrtHarz)-6-OAll

Es werden 0.176 mmol festphasengebundenen NH_2 -5-7(C_2H_4NH -TrtHarz)-6- CO_2 All **151** in wenig CH_2Cl_2 suspendiert. Nach Hinzufügen einer Lösung von 129 μ L (0.998 mmol) 1-Butanilsulfonylchlorid, 21 mg (0.172 mmol) DMAP und 151 μ L (1.38 mmol) NMM in 20 mL CH_2Cl_2 wird für 12 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert und siebenmal mit CH_2Cl_2 und DMF gewaschen. Die Kupplung wird zweimal wiederholt.

Kupplung zum Sulfonamid: $C_{12}H_{25}$ - SO_2NH -5-7(C_2H_4 -NH-TrtHarz)-6-OAll

Es werden 0.495 mmol festphasengebundenen NH_2 -5-7(C_2H_4NH -TrtHarz)-6- CO_2 All **151** in wenig CH_2Cl_2 suspendiert. Nach Hinzufügen einer Lösung von 771.8 mg (2.871 mmol) 1-Dodecanylsulfonylchlorid, 61 mg (0.495 mmol) DMAP und 435 μ L (3.96 mmol) NMM in 20 mL CH_2Cl_2 wird für 12 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert und siebenmal mit CH_2Cl_2 und DMF gewaschen. Die Kupplung wird viermal wiederholt.

Kupplung zum Sulfonamid: $C_{16}H_{33}$ - SO_2NH -5-7(C_2H_4 -NH-TrtHarz)-6-OAll

Es werden 0.137 mmol festphasengebundenen NH_2 -5-7(C_2H_4NH -TrtHarz)-6- CO_2 All **151** in wenig CH_2Cl_2 suspendiert. Nach Hinzufügen einer Lösung von 324 mg (0.998 mmol) 1-Hexadecylsulfonylchlorid, 21 mg (0.172 mmol) DMAP und 151 μ L (1.38 mmol) NMM in 20 mL CH_2Cl_2 wird für 12 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert und siebenmal mit CH_2Cl_2 und DMF gewaschen. Die Kupplung wird einmal wiederholt.

Ankupplung von 4-Biphenylelessigsäure: $C_{10}H_9$ - SO_2NH -5-7(C_2H_4 -NH-TrtHarz)-6-OAll

Eine Suspension von 0.170 mmol festphasengebundenem NH_2 -5-7(C_2H_4NH -TrtHarz)-6- CO_2 All **151** in wenig CH_2Cl_2 wird mit einer voraktivierten Lösung von 183 mg (0.860 mmol) 4-Biphenylelessigsäure, 261 mg (0.688 mmol) HBTU, 132 mg (0.860 mmol) HOBt und 293 μ L (1.72 mmol) Triethylamin in 20 mL DMF für 12 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert und siebenmal mit CH_2Cl_2 und DMF gewaschen.

Beispielhafte Vorschrift: Allylabspaltung an der festen Phase zu 154

Eine Suspension von 0.176 mmol festphasengebundenem Benzodiazepindionallylester **153** wird mit einer Lösung von 30.0 mg (0.026 mmol) Pd(PPh₃)₄ und 850 µl (6.90 mmol) PhSiH₃ in 14 mL DMF versetzt und für 12 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert und siebenmal mit CH₂Cl₂ und DMF gewaschen.

Cys(Ger)-OMe 160

Eine Lösung von 2.00 g (11.6 mmol) Cysteinmethylester Hydrochlorid **158**, 2.52 g (11.6 mmol) Geranyl bromid und 4.02 mL (29.0 mmol) Triethylamin in 20 mL DMF wird 4 h bei 0 °C und 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in 150 mL Diethylether aufgenommen, zweimal mit je 60 mL 1 M Salzsäure und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Essigester/Cyclohexan 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.512 g (5.57 mmol, 48 %, farbloses Öl)

$$[\alpha]_D^{20} = -8.4^\circ \text{ (CHCl}_3, c = 1.0)$$

R_f = 0.27 (Essigester/Cyclohexan 2:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.18 (t, J = 7.7 Hz, 1H, C=CH Ger), 5.03 (t, J = 6.7 Hz, 1H, C=CH Ger), 3.69 (s, 9H, OMe), 3.60-3.55 (m, 1H, α-CH Cys), 3.18-3.06 (m, 2H, CH₂ Ger), 2.83 (dd, J = 13.5 Hz, J = 4.7 Hz, 1H, β-CH_{2a} Cys), 2.63 (dd, J = 13.5 Hz, J = 7.6 Hz, 1H, β-CH_{2b} Cys), 2.08-1.95 (m, 4H, 2 × CH₂ Ger), 1.78-1.53 (m, 9H, 3 × CH₃ Ger)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 174.3, 139.3, 131.5, 123.8, 119.9, 54.3, 52.2, 39.7, 36.5, 29.9, 26.6, 25.8, 17.8, 16.2

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₁₄H₂₆NO₂S [M+H]⁺: ber.: 272.1684; gef.: 272.1661

C₁₄H₂₅NO₂S (271.42)

Allgemeine Arbeitsvorschrift: Kupplung der Aminkomponenten zu 156

A: Das festphasengebundene Benzodiazepindion **154** wird in wenig CH₂Cl₂ suspendiert und mit einer Lösung von 5 eq PyBOP, 5 eq Aminkomponente und 15 eq NMM in DMF versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 12 h geschüttelt, das Polymer abfiltriert und siebenmal mit CH₂Cl₂ und DMF gewaschen.

B: siehe A; es werden 20 eq NMM zur Kupplung verwendet.

AAV 14: Abspaltung der Benzodiazepindione mittels TFA

Das festphasengebundene Benzodiazepindion wird fünfmal mit CH₂Cl₂ gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 2 % TFA (v/v) in CH₂Cl₂ fünfmal für 1 min und zweimal für 10 min geschüttelt. Das Harz wird mit einer Mischung von Methanol/CH₂Cl₂ 1:10 (v/v) gewaschen. Die Abspaltung wird wiederholt. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol koevaporiert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in einer Mischung von Acetonitril/Methanol 1:1 (v/v) gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

AAV 15: Abspaltung der Benzodiazepindione mittels Essigsäure/TFE

Das festphasengebundene Benzodiazepindion wird fünfmal mit CH₂Cl₂ gewaschen und anschließend mit einer Mischung von Essigsäure/TFE/CH₂Cl₂ 1:1:3 für zweimal 1 h geschüttelt. Das Harz wird mit CH₂Cl₂ und einer Mischung von Methanol/CH₂Cl₂ 1:10 (v/v) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol koevaporiert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in einer Mischung von Acetonitril/Methanol 1:1 (v/v) gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

AAV 16: Abspaltung der Benzodiazepindione mittels HFIP

Das festphasengebundene Benzodiazepindion wird fünfmal mit CH₂Cl₂ gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 30 % HFIP in CH₂Cl₂ für zweimal 1 h geschüttelt. Das Harz wird mit CH₂Cl₂ und einer Mischung von Methanol/CH₂Cl₂ 1:10 (v/v) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol koevaporiert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in einer Mischung von Acetonitril/Methanol 1:1 (v/v) gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure 161

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-COOH

Kupplung der Aminkomponente: -

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 6.0 mg, 0.0083 mmol, 17 %

$[\alpha]_D^{20} = +222.8^\circ$ (MeOH, c = 0.07)

HPLC (HPLC4): R_t = 13.35 min

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.50 (d, J = 2.0 Hz, 1H, arom. CH), 8.24 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, arom. CH), 7.55 (d, J = 8.5 Hz, 1H, arom. CH), 4.40-4.02 (m, 6H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂, NCH₂CH₂NH₂), 3.50 (dd, J = 11.7 Hz, J = 4.64 Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.33-3.27 (m_{verd}, 1H, -CH_{2b}N-), 3.15-3.05 (m, 2H, α -CH₂ Hexadecyl), 2.75-2.67 (m, 1H, -CH_{2a}-), 2.52-2.41 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.82-1.73 (m, 2H, β -CH₂ Hexadecyl), 1.53-1.22 (m, 26H, 13 \times CH₂ Hexadecyl), 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω -CH₃ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 607.3, gef. 607.5; ber. [M-H]⁻ 605.3, gef. 605.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₁H₅₁N₄O₆S [M+H]⁺: ber.: 607.3529; gef.: 607.3507

C₃₁H₅₀N₄O₆S (606.82) · TFA

Die analytischen Daten stimmen mit Lit.⁵¹ überein.

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäureallylester 162

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-COOAll

Kupplung der Aminkomponente: - Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: Säulenchromatographie Ausbeute: 11 mg, 0.0145 mmol, 68 %

$[\alpha]_D^{20} = +149.2^\circ$ (CHCl₃, c = 0.55)

HPLC (HPLC4): R_t = 15.02 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.45 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 8.14 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.40 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 5.95-5.85 (m, 1H, -OCH₂CH=CH₂), 5.30 (d, J = 17.2 Hz, 1H, -OCH₂CH=CH_{2a}), 5.20 (d, J = 10.4 Hz, 1H, -OCH₂CH=CH_{2b}), 4.30-3.80 (m, 5H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂, -CH_{2a}N-), 3.68 (dd, J = 12.6 Hz, J = 3.0 Hz, 1H, -CH_{2b}N-), 3.15-3.20 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 2.9-3.0 (m, 2H, α -CH₂ Hexadecyl), 2.64 (d, J = 14.5 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.42-2.3 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.75-1.65 (m, 2H, β -CH₂ Hexadecyl), 1.39-1.08 (m, 26H, 13 \times CH₂ Hexadecyl), 0.76 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω -CH₃ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 647.4, gef. 647.4

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₄H₅₅N₄O₆S [M+H]⁺: ber.: 647,3842; gef.: 647,3853

C₃₄H₅₄N₄O₆S (646.88) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-alaninmethylester 163

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-Ala-OMe

Kupplung der Aminkomponente: B Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 7.3 mg, 0.0091 mmol, 16 %

$[\alpha]_D^{20} = 167.4^\circ$ (CHCl₃, c = 0.82)

HPLC (HPLC4): R_t = 14.58 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.98 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.34 (d, J = 8.5 Hz, 1H, arom. CH), 4.70-4.65 (m, 1H, α-CH Ala), 4.30-3.95 (m, 4H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂), 3.83 (dd, J = 12.8 Hz, J = 5.9 Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.80-3.65 (m_{verd}, 4H, -CH_{2b}N-, OMe), 3.37-3.20 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 2.9-3.0 (m, 2H, α-CH₂ Hexadecyl), 2.68 (d, J = 14.5 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.43-2.35 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.75-1.65 (m, 2H, β-CH₂ Hexadecyl), 1.37-1.07 (m, 26H, 13 × CH₂ Hexadecyl), 0.76 (t, J = 6.8 Hz, 3H, ω-CH₃ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 692.4, gef. 692.6; ber. [M-H]⁻ 690.4, gef. 690.7

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₅H₅₈N₅O₇S [M+H]⁺: ber.: 692.4057; gef.: 692.4067

C₃₅H₅₇N₅O₇S (691.92) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-phenylalaninmethylester 164

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-Phe-OMe

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 5.7 mg, 0.0065 mmol, 27 %

$[\alpha]_D^{20} = +148.7^\circ$ (CHCl₃, c = 0.27)

HPLC (HPLC4): R_t = 14.19 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.13 (d, J = 2.3 Hz, 1H, arom. CH), 7.85 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.3 Hz, 1H, arom. CH), 7.35-7.05 (m, 6H, 5 × arom. CH Phe), 4.93-4.86 (m, 1H, α-CH Phe), 4.27-3.90 (m, 4H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂), 3.80 (dd, J = 12.9 Hz, J = 5.9 Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.75-3.65 (m, 4H, OMe Phe, -CH_{2b}N-), 3.25-3.12 (m, 3H, β-CH_{2a} Phe, NCH₂CH₂NH₂), 3.06 (dd, J = 14.0 Hz, J = 7.7 Hz, 1H, β-CH_{2b} Phe), 3.00-2.90 (m, 2H, α-CH₂ Hexadecyl), 2.63 (d, J = 14.1 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.40-2.30 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.75-1.65 (m, 2H, β-CH₂ Hexadecyl), 1.37-1.07 (m, 26H, 13 × CH₂ Hexadecyl), 0.78 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω-CH₃ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 768.4, gef. 768.4; ber. [M-H]⁻ 766.4, gef. 766.7

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₄₁H₆₂N₅O₇S [M+H]⁺: ber.: 768.4370; gef.: 768.4360

C₄₁H₆₁N₅O₇S (768.02) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-farnesyl-cysteinmethylester 165

$C_{16}H_{33}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-Cys(Far)-OMe$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 16

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 19.3 mg, 0.0185 mmol, 59 %

$[\alpha]_D^{20} = +127.0^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.35$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 17.37$ min

^1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.30-8.20$ (m, 1H, arom. CH), 8.05-7.98 (m, 1H, arom. CH), 7.40-7.32 (m, 1H, arom. CH), 5.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, C=CH Far), 5.07-4.97 (m, 2H, 2 \times C=CH Far), 4.88-4.79 (m, 1H, α -CH Cys), 4.6-3.8 (m_{br} , 9H, CHNH, -CHC(O)-, $NCH_2CH_2NH_2$, $-CH_2N-$, OMe), 3.50-2.94 (m, 7H, $NCH_2CH_2NH_2$, α - CH_2 Hexadecyl, CH_2 Far, β - CH_{2a} Cys), 2.90-2.80 (m, 1H, β - CH_{2a} Cys), 2.67 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H, $-CH_{2a-}$), 2.45-2.33 (m, 1H, $-CH_{2b-}$), 2.10-1.83 (m, 8H, 4 \times CH_2 Far), 1.80-1.40 (m, 14H, β - CH_2 Hexadecyl, 4 \times CH_3 Far), 1.40-1.05 (m, 26H, 13 \times CH_2 Hexadecyl), 0.80 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, ω - CH_3 Hexadecyl)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 928.6, gef. 928.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{50}H_{82}N_5O_7S_2$ $[M+H]^+$: ber.: 928.5655; gef.: 928.5644

$C_{50}H_{81}N_5O_7S_2$ (928.34) \cdot TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-geranyl-cysteinmethylester 166

$C_{16}H_{33}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-Cys(Ger)-OMe$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 16

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 17.8 mg, 0.0183 mmol, 57 %

$[\alpha]_D^{20} = +101.9^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.36$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 16.00$ min

^1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.21$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.97 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, arom. CH), 5.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, C=CH Ger), 5.00-4.90 (m, 1H, C=CH Ger), 4.81-4.75 (m, 1H, α -CH Cys), 4.30-3.75 (m_{verd} , 5H, CHNH, -CHC(O)-, $NCH_2CH_2NH_2$, $-CH_{2a}N-$), 3.70-3.60 (m, 4H, OMe Phe, $-CH_{2b}N-$), 3.30-2.90 (m_{verd} , 7H, $NCH_2CH_2NH_2$, α - CH_2 Hexadecyl, CH_2 Ger, β - CH_{2a} Cys), 2.81 (dd, $J = 13.9$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H, β - CH_{2b} Cys), 2.63 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H, $-CH_{2a-}$), 2.42-2.30 (m, 1H, $-CH_{2b-}$), 2.02-1.88 (m, 4H, 2 \times CH_2 Ger), 1.75-1.40 (m, 11H, β - CH_2 Hexadecyl,

3 × CH₃ Ger), 1.38-1.05 (m, 26H, 13 × CH₂ Hexadecyl), 0.76 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω-CH₃ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 860.5, gef. 860.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₄₅H₇₄N₅O₇S₂ [M+H]⁺: ber.: 860.5029; gef.: 860.4999

C₄₅H₇₃N₅O₇S₂ (860.22) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-hexadecyl-cysteinmethylester 167

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-Cys(HD)-OMe

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 13.3 mg, 0.0125 mmol, 28 %

$[\alpha]_D^{20} = +115.5^\circ$ (CHCl₃, c = 0.56)

HPLC (HPLC4): R_t = 19.81 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.23 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom. CH), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom. CH), 4.88-4.80 (m, 1H, α-CH Cys), 4.32-3.94 (m, 4H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂), 3.90-3.67 (m, 5H, OMe, -CH₂N-), 3.20-3.13 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 3.08-2.88 (m, 4H, β-CH₂ Cys, α-CH₂ Hexadecyl Sulfonamid), 2.67 (d, J = 13.5 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.54-2.45 (m, 2H, α-CH₂ Hexadecyl), 2.45-2.34 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.80-1.65 (m, 2H, β-CH₂ Hexadecyl Sulfonamid), 1.60-1.44 (m, 2H, β-CH₂ Hexadecyl), 1.42-1.10 (m, 52H, 13 × CH₂ Hexadecyl, 13 × CH₂ Hexadecyl Sulfonamid), 0.83-0.75 (m, 6H, ω-CH₃ Hexadecyl, ω-CH₃ Hexadecyl Sulfonamid)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 948.6, gef. 948.6

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₅₁H₉₀N₅O₇S₂ [M+H]⁺: ber.: 948.6281; gef.: 948.6298

C₅₁H₈₉N₅O₇S₂ (948.41) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurepropylamid 168

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-CONH-C₃H₇

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 11.9 mg, 0.0156 mmol, 28 %

$[\alpha]_D^{20} = +149.4^\circ$ (CHCl₃, c = 0.51)

HPLC (HPLC4): R_t = 14.30 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.20-8.10 (m, 1H, arom. CH), 7.96-7.89 (m, 1H, arom. CH), 7.40-7.30 (m, 1H, arom. CH),), 4.30-3.9 (m, 6H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂, -CH₂N-), 3.60-3.20 (m, 4H, NCH₂CH₂NH₂, CH₂ Propyl), 3.10-2.90 (m, 2H, α-CH₂ Hexadecyl), 2.70-2.60 (m, 1H, -CH_{2a}-), 2.38-2.25 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.80-1.70 (m, 2H, β-CH₂ Hexadecyl), 1.65-1.53 (m, 2H, CH₂ Propyl), 1.45-1.05 (m, 26H, 13 × CH₂ Hexadecyl), 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H, γ-CH₃ Propyl), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω-CH₃ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 648.4, gef. 648.6

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₄H₅₈N₅O₅S [M+H]⁺: ber.: 648.4158; gef.: 648.4131

C₃₄H₅₇N₅O₅S (647.91) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurehexylamid 169

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-CONH-C₆H₁₃

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 11.2 mg, 0.0139 mmol, 50 %

[α]_D²⁰ = +154.6° (CHCl₃, c = 0.50)

HPLC (HPLC4): R_t = 14.53 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.15 (s, 1H, arom. CH), 7.99 (d, J = 7.8 Hz, 1H, arom. CH), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H, arom. CH), 4.40-4.00 (m, 4H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂), 3.84 (dd, J = 12.6 hz, J = 5.8 Hz, -CH_{2a}N-), 3.74 (d, J = 11.7 Hz, -CH_{2b}N-), 3.40-2.90 (m, 6H, NCH₂CH₂NH₂, CH₂ Hexyl, α-CH₂ Hexadecyl), 2.68 (d, J = 14.1 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.45-2.33 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.80-1.70 (m, 2H, β-CH₂ Hexadecyl), 1.60-1.50 (m, 2H, CH₂ Hexyl), 1.38-1.05 (m, 34H, 13 × CH₂ Hexadecyl, 4 × CH₂ Hexyl), 0.88-0.78 (m, 6H, ω-CH₃ Dodecyl, ω-CH₃ Hexyl)

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₇H₆₄N₅O₅S [M+H]⁺: ber.: 690.4628; gef.: 690.4594

C₃₇H₆₃N₅O₅S (689.99) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurebenzylamid 170

C₁₆H₃₃-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-CONH-CH₂C₆H₅

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 6.0 mg, 0.0074 mmol, 17 %

[α]_D²⁰ = +145.4° (CHCl₃, c = 0.26)

HPLC (HPLC4): $R_t = 14.97$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.20$ (s, 1H, arom. CH), 8.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, arom. CH), 7.40-7.15 (m, 6H, arom. CH), 4.62-4.49 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.20-3.95 (m, 5H, CHNH , $-\text{CHC(O)-}$, $-\text{CH}_{2a}\text{N-}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.68 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2b}\text{N-}$), 3.35-3.15 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.00-2.94 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Dodecyl), 2.66 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a-}$), 2.45-2.35 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b-}$), 1.80-1.68 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Dodecyl), 1.40-1.05 (m, m, 26H, $13 \times \text{CH}_2$ Hexadecyl), 0.81 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H, $\omega\text{-CH}_3$ Dodecyl)

MS (ESI): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 696.4, gef. 696.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 696.4159; gef.: 696.4156

$\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ (695.96) · TFA

**Hexadecan-1-sulfonsäure [10-(2-amino-ethyl)-5,11-dioxo-7-(N'-phenyl-hydrazino-carbonyl)-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-yl]-amid
171**

$\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{-SO}_2\text{NH-5-7(C}_2\text{H}_4\text{-NH}_2\text{)-6-CONH-NH-C}_6\text{H}_5$

Kupplung der Aminkomponente: B

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 3.0 mg, 0.0037 mmol, 16 %

$[\alpha]_D^{20} = +192.2^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.10$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 14.28$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.25$ (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 8.02 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, arom. CH), 7.13–7.08 (m, 2H, arom. CH), 6.82–6.74 (m, 2H, arom. CH), 4.25-3.75 (m, 4H, CHNH , $-\text{CHC(O)-}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_{2a}\text{N-}$), 3.69 (m, $J = 12.1$, 1H, $-\text{CH}_{2b}\text{N-}$), 3.25-3.13 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.98-2.90 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Hexadecyl), 2.62 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a-}$), 2.40–2.30 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b-}$), 1.75-1.64 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Hexadecyl), 1.38-1.03 (m, 26H, $13 \times \text{CH}_2$ Hexadecyl), 0.76 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, $\omega\text{-CH}_3$ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 697.4, gef. 697.5; ber. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 695.4, gef. 695.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 697.4111; gef.: 697.4097

$\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ (696.94) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure (3-dimethylamino-propyl)-amid 172 $C_{16}H_{33}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-CONH-C_3H_6NMe_2$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 5.0 mg, 0.0062 mmol, 26 %

 $[\alpha]_D^{20} = +138.5^\circ$ (MeOH, c = 0.27)HPLC (HPLC4): $R_t = 13.29$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.18$ (m, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.93 (dd, J = 8.7 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, arom. CH), 7.30 (d, J = 8.6, 1H, arom. CH), 4.20-3.85 (m, 4H, $CHNH$, $-CHC(O)-$, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.78 (dd, J = 12.7 Hz, J = 6.1 Hz, 1H, $-CH_{2a}N-$), 3.60 (dd, J = 12.6 Hz, J = 3.2 Hz, 1H, $-CH_{2b}N-$), 3.40-3.30 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2NMe_2$), 3.23-3.10 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.05-2.95 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2NMe_2$), 2.94-2.86 (m, 2H, α - CH_2 Hexadecyl), 2.71 (s, 6H, NMe_2), 2.58 (d, J = 13.7 Hz, 1H, $-CH_{2a}-$), 2.40-2.27 (m, 1H, $-CH_{2b}-$), 1.97-1.82 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2NMe_2$), 1.70-1.60 (m, 2H, β - CH_2 Hexadecyl), 1.32-1.00 (m, 26H, $13 \times CH_2$ Hexadecyl), 0.72 (t, J = 7.0 Hz, 3H, ω - CH_3 Hexadecyl)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 691.5, gef. 691.6HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{36}H_{63}N_6O_5S$ $[M+H]^+$: ber.: 691.4581; gef.: 691.4600 $C_{36}H_{62}N_6O_5S$ (690.98) · TFA**10-(2-Amino-ethyl)-2-(hexadecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure (2-morpholin-4-yl-ethyl)-amid 173** $C_{16}H_{33}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-CONH-C_3H_6NC_4H_8O$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 7.2 mg, 0.0085 mmol, 36 %

 $[\alpha]_D^{20} = +84.5^\circ$ (MeOH, c = 0.38)HPLC (HPLC4): $R_t = 12.27$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.20$ (d, J = 1.8 Hz, 1H, arom. CH), 7.96 (d, J = 9.0 Hz, 1H, arom. CH), 7.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H, arom. CH), 4.28-3.73 (m_{verd} , 13H, $CHNH$, $-CHC(O)-$, $NCH_2CH_2NH_2$, $4 \times CH_2$ Morpholin, $-CH_{2a}N-$), 3.66 (d, J = 13.1 Hz, 1H, $-CH_{2b}N-$), 3.47-3.10 (m_{verd} , 4H, $NCH_2CH_2CH_2N$ morpholin, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.10-3.00 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2NM$ morpholin), 2.98-2.92 (m, 2H, α - CH_2 Hexadecyl), 2.61 (d, J = 13.1 Hz,

1H, -CH_{2a}-), 2.43-2.27 (m, 1H, -CH_{2b}-), 2.03-1.90 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂NMorpholin), 1.74-1.63 (m, 2H, β-CH₂ Hexadecyl), 1.40-1.00 (m, 26H, 13 × CH₂ Hexadecyl), 0.75 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω-CH₃ Hexadecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 733.5, gef. 733.7

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₈H₆₅N₆O₆S [M+H]⁺: ber.: 733.4686; gef.: 733.4700

C₃₈H₆₄N₆O₆S (733.02) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure 174

C₁₂H₂₅-SO₂NH-5-7-(C₂H₄-NH₂)-6-COOH

Kupplung der Aminkomponente: - Abspaltung von der festen Phase: AAV **114**

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 8.6 mg, 0.013 mmol, 36 %

$[\alpha]_D^{20} = +175.3^\circ$ (MeOH, c = 0.43)

HPLC (HPLC4): R_t = 9.56 min

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.49 (d, J = 2.0 Hz, 1H, arom. CH), 8.23 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, arom. CH), 7.56 (d, J = 8.5 Hz, 1H, arom. CH), 4.40-4.02 (m, 6H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂, NCH₂CH₂NH₂), 3.51 (dd, J = 11.7 Hz, J = 4.64 Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.35-3.28 (m_{verd}, 1H, -CH_{2b}N-), 3.15-3.05 (m, 2H, α-CH₂ Dodecyl), 2.75-2.68 (m, 1H, -CH_{2a}-), 2.52-2.41 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.85-1.73 (m, 2H, β-CH₂ Dodecyl), 1.51-1.21 (m, 13H, 9 × CH₂ Dodecyl), 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω-CH₃ Dodecyl)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 5510.3, gef. 551.4

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₂₇H₄₃N₄O₆S [M+H]⁺: ber.: 550.2904; gef.: 551.2916

C₂₇H₄₂N₄O₆S (550.71) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäureallylester 175

C₁₂H₂₅-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-COOAll

Kupplung der Aminkomponente: - Abspaltung von der festen Phase: AAV **14**

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 8.4 mg, 0.0119 mmol, 30 %

$[\alpha]_D^{20} = +175.0^\circ$ (CHCl₃, c = 0.51)

HPLC (HPLC4): R_t = 12.25 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.47 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 8.14 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, arom. CH), 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 6.0-5.9 (m,

^1H , $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.32 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_{2a}$), 5.22 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_{2b}$), 4.8-4.7 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.3-3.9 (m, 4H, CHNH , $-\text{CHC}(\text{O})-$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.83 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.8$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a}\text{N}-$), 3.7-3.6 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}\text{N}-$), 3.15-3.20 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.9-3.0 (m, 2H, α - CH_2 Dodecyl), 2.66 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a}-$), 2.3-2.4 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}-$), 1.75-1.60 (m, 2H, β - CH_2 Dodecyl), 1.35-1.05 (m, 18H, $9 \times \text{CH}_2$ Dodecyl), 0.78 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, ω - CH_3 Dodecyl)

MS (ESI): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 591.3, gef. 591.5, ber. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 589.3, gef. 589.7

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 591.3216; gef.: 591.3246

$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ (590.78) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-alaninmethylester 176

$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-SO}_2\text{NH-5-7}(\text{C}_2\text{H}_4\text{-NH}_2)\text{-6-Ala-OMe}$

Kupplung der Aminkomponente: B

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 6.9 mg, 0.0092 mmol, 24 %

$[\alpha]_D^{20} = +185.6^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.32$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 11.49$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.12$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.96 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, arom. CH), 4.55-4.65 (m, 1H, α -CH Ala), 4.3-3.9 (m, 4H, CHNH , $-\text{CHC}(\text{O})-$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.8-3.6 (m_{verd} , 2H, $-\text{CH}_2\text{N}-$), 3.67 (s, 3H OMe Ala), 3.15-3.20 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.9-3.0 (m, 2H, α - CH_2 Dodecyl), 2.63 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a}-$), 2.3-2.4 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}-$), 1.75-1.60 (m, 2H, β - CH_2 Dodecyl), 1.43 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$ Ala), 1.38-1.05 (m, 18H, $9 \times \text{CH}_2$ Dodecyl), 0.77 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, ω - CH_3 Dodecyl)

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 636.3431; gef.: 636.3447

$\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ (635.81) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-phenylalaninmethylester 177

$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-SO}_2\text{NH-5-7}(\text{C}_2\text{H}_4\text{-NH}_2)\text{-6-Phe-OMe}$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 9.0 mg, 0.0109 mmol, 29 %

$[\alpha]_D^{20} = +127.3^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.45$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 12.50$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.07$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.79 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.27 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 7.06-7.16 (m, 5H, $5 \times$ arom. CH Phe), 4.86-4.80 (m, 1H, α -CH Phe), 4.3-3.9 (m_{verd} , 4H, CHNH , $-\text{CHC}(\text{O})-$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.77 (dd, $J = 12.6$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a}\text{N}-$), 3.65-3.50 (m, 4H, OMe Phe, $-\text{CH}_{2b}\text{N}-$), 3.1-3.2 (m, 3H, β - CH_{2a} Phe, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.01 (dd, $J = 13.9$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 1H, β - CH_{2b} Phe), 2.9-3.0 (m, 2H, α - CH_2 Dodecyl), 2.58 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a}-$), 2.3-2.4 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}-$), 1.75-1.60 (m, 2H, β - CH_2 Dodecyl), 1.38-1.05 (m, 18H, $9 \times \text{CH}_2$ Dodecyl), 0.72 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, ω - CH_3 Dodecyl)

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 712.3744; gef.: 712.3791
 $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ (635.81) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-farnesyl-cysteinmethylester 178

$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-SO}_2\text{NH-5-7}(\text{C}_2\text{H}_4\text{-NH}_2)\text{-6-Cys(Far)-OMe}$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 16

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 5.9 mg, 0.0060 mmol, 16 %

$[\alpha]_D^{20} = +127.7^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.37$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 15.48$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.3$ -8.2 (m, 1H, arom. CH), 8.1-8.0 (m, 1H, arom. CH), 7.4-7.3 (m, 1H, arom. CH), 5.18 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$ Far), 5.1-5.0 (m, 2H, $2 \times \text{C}=\text{CH}$ Far), 4.9-4.8 (m, 1H, α -CH Cys), 4.6-3.8 (m_{br} , 6H, CHNH , $-\text{CHC}(\text{O})-$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{N}-$), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.25-3.15 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.2-2.8 (m, 6H, α - CH_2 Dodecyl, CH_2 Far, β - CH_2 Cys), 2.75-2.65 (m_{verd} , 1H, $-\text{CH}_{2a}-$), 2.5-2.4 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}-$), 2.1-1.9 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$ Far), 1.8-1.7 (m, 2H, β - CH_2 Dodecyl), 1.7-1.5 (m, 12H, $4 \times \text{CH}_3$ Far), 1.4-1.15 (m, 18H, $9 \times \text{CH}_2$ Dodecyl), 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, ω - CH_3 Dodecyl)

MS (ESI): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 872.5, gef. 872.5 ; ber. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 870.2, gef. 870.7

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 873.5029; gef.: 872.5002

$\text{C}_{46}\text{H}_{73}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$ (872.23) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-geranyl-cysteinmethylester 179

$C_{12}H_{25}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-Cys(Ger)-OMe$

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 16

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 10.1 mg, 0.0110 mmol, 30 %

$[\alpha]_D^{20} = +146.8^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.61$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 14.03$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.3-8.2$ (m, 1H, arom. CH), 8.01 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 5.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, C=CH Ger), 5.01 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H C=CH Ger), 4.9-4.8 (m, 1H, α -CH Cys), 4.6-3.8 (m_{br} , 6H, CHNH, -CHC(O)-, $NCH_2CH_2NH_2$, - CH_2N -), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.25-2.80 (m_{verd} , 8H, $NCH_2CH_2NH_2$, α - CH_2 Dodecyl, CH_2 Ger, β - CH_2 Cys), 2.69 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, - CH_{2a} -), 2.5-2.4 (m, 1H, - CH_{2b} -), 2.10-1.95 (m, 4H, $2 \times CH_2$ Ger), 1.8-1.7 (m, 2H, β - CH_2 Dodecyl), 1.7-1.5 (m, 9H $3 \times CH_3$ Ger), 1.4-1.15 (m, 18H, $9 \times CH_2$ Dodecyl), 0.82 (t, $J = 6.8$ Hz, ω - CH_3 Dodecyl)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 804.4, gef. 804.9 ; ber. $[M-H]^-$ 802.4, gef. 802.9

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{41}H_{66}N_5O_7S_2$ $[M+H]^+$: ber.: 804.4403; gef.: 804.4419

$C_{41}H_{65}N_5O_7S_2$ (804.12) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-hexadecyl-cysteinmethylester 180

$C_{12}H_{25}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-Cys(HD)-OMe$

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 16

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 19.5 mg, 0.0194 mmol, 52 %

$[\alpha]_D^{20} = +140.2^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.48$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 17.37$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.3-8.2$ (1H, arom. CH), 8.00 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, arom. CH), 4.9-4.8 (m, 1H, α -CH Cys), 4.5-3.8 (m_{br} , 6H, CHNH, -CHC(O)-, $NCH_2CH_2NH_2$, - CH_2N -), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.15-3.20 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.05-2.90 (m, 4H, β - CH_2 Cys, α - CH_2 Dodecyl), 2.65 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, - CH_{2a} -), 2.50-2.45 (m, 2H, α - CH_2 Hexadecyl), 2.45-2.35 (m, 1H, - CH_{2b} -), 1.8-1.7 (m, 2H, β - CH_2 Dodecyl), 1.55-1.45 (m, 2H, β - CH_2 Hexadecyl), 1.38-1.05 (m, 44H, $13 \times CH_2$ Hexadecyl, $9 \times CH_2$ Dodecyl), 0.83-0.75 (m, 6H, ω - CH_3 Hexadecyl, ω - CH_3 Dodecyl)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 892.6, gef. 892.9 ; ber. $[M-H]^-$ 890.6, gef. 890.7

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{47}H_{81}N_5O_7S_2$ $[M+H]^+$: ber.: 892.5655; gef.: 891.5548

$C_{47}H_{81}N_5O_7S_2$ (892.31) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurepropylamid 181

$C_{12}H_{25}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-CONH-C_3H_7$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 5.8 mg, 0.0082 mmol, 22 %

$[\alpha]_D^{20} = +150.0^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.26$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 11.84$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.12$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.93 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.31 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 4.35-3.75 (m, 5H, $CHNH$, $-CHC(O)-$, $NCH_2CH_2NH_2$, $-CH_{2a}N-$), 3.64 (dd, $J = 12.9$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, $-CH_{2b}N-$), 3.15-3.20 (m, 4H, $NCH_2CH_2NH_2$, CH_2 Propyl), 2.9-3.0 (m, 2H, α - CH_2 Dodecyl), 2.61 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, $-CH_{2a}-$), 2.3-2.4 (m, 1H, $-CH_{2b}-$), 1.66-1.63 (m, 2H, β - CH_2 Dodecyl), 1.45-1.55 (m, 2H, CH_2 Propyl), 1.38-1.05 (m, 18H, $9 \times CH_2$ Dodecyl), 0.86 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, γ - CH_3 Propyl), 0.75 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, ω - CH_3 Dodecyl)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 592.3, gef. 592.7 ; ber. $[M-H]^-$ 590.2, gef. 590.9

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{30}H_{50}N_5O_5S$ $[M+H]^+$: ber.: 592.3532; gef.: 592.3517

$C_{30}H_{49}N_5O_5S$ (591.81) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurehexylamid 182

$C_{12}H_{25}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-CONH-C_6H_{13}$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 10.7 mg, 0.0132 mmol, 36 %

$[\alpha]_D^{20} = +145.3^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.54$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 12.67$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.10$ (s, 1H, arom. CH), 7.91 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, arom. CH), 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, arom. CH), 4.30-3.75 (m_{verd} , 5H, $CHNH$, $-CHC(O)-$, $NCH_2CH_2NH_2$, $-CH_{2a}N-$), 3.62 (s, $J = 12.5$ Hz, $-CH_{2b}N-$), 3.25-3.10 (m, 4H, $NCH_2CH_2NH_2$, CH_2 Hexyl), 2.9-3.0 (m, 2H, α - CH_2 Dodecyl), 2.60 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H,

-CH_{2a}-), 2.30-2.40 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.66-1.63 (m, 2H, β-CH₂ Dodecyl), 1.45-1.55 (m, 2H, CH₂ Hexyl), 1.38-1.05 (m, 26H, 9 × CH₂ Dodecyl, 4 × CH₂ Hexyl), 0.8-0.7 (m, 6H, ω-CH₃ Dodecyl, ω-CH₃ Hexyl)

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₃H₅₆N₅O₅S [M+H]⁺: ber.: 634.4002.; gef.: 634.4027

C₃₃H₅₅N₅O₅S (633.89) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(dodecan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurebenzylamid 183

C₁₂H₂₅-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-CONH-CH₂C₆H₅

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 9.0 mg, 0.0119 mmol, 32 %

$[\alpha]_D^{20} = +164.1^\circ$ (CHCl₃, c = 0.46)

HPLC (HPLC4): R_t = 12.16 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.16 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.98 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.4-7.1 (m, 6H, arom. CH), 4.55-4.45 (m, 2H, -CH₂-Ph), 4.20-3.95 (m, 4H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂), 3.80 (dd, J = 12.9 Hz, J = 6.1 Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.67 (dd, J = 12.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, -CH_{2b}N-), 3.15-3.20 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 2.9-3.0 (m, 2H, α-CH₂ Dodecyl), 2.63 (d, J = 14.1 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.3-2.4 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.75-1.65 (m, 2H, β-CH₂ Dodecyl), 1.40-1.05 (m, 18H, 9 × CH₂ Dodecyl), 0.78 (t, J = 6.9 Hz, 3H, ω-CH₃ Dodecyl)

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₄H₅₀N₅O₅S [M+H]⁺: ber.: 640.3532; gef.: 640.3523

C₃₄H₄₉N₅O₅S (639.85) · TFA

Dodecan-1-sulfonsäure [10-(2-amino-ethyl)-5,11-dioxo-7-(N'-phenyl-hydrazino-carbonyl)-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-yl]-amid 184

C₁₂H₂₅-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-CONH-NH-C₆H₅

Kupplung der Aminkomponente: B Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 7.2 mg, 0.0095 mmol, 25 %

$[\alpha]_D^{20} = +175.1^\circ$ (CHCl₃, c = 0.47)

HPLC (HPLC4): R_t = 11.78 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.24 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 8.01 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.38 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 7.12 (t, J = 8.0

$[\alpha]_D^{20} = +126.4^\circ$ (MeOH, $c = 0.53$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 10.80$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.16$ (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.92 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, arom. CH), 7.31 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 4.25-3.90 (m_{verd} , 8H, CHNH, -CHC(O)-, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $2 \times \text{CH}_2$ Morpholin), 3.85-3.70 (m, 5H, $-\text{CH}_{2a}\text{N}-$, $2 \times \text{CH}_2$ Morpholin), 3.59 (dd, $J = 12.6$ Hz, $J = 3.0$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2b}\text{N}-$), 3.40-3.30 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ Morpholin), 3.10-3.20 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.10-3.00 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ Morpholin), 2.9-3.0 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Dodecyl), 2.59 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a}-$), 2.4-2.3 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}-$), 2.00-1.90 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ Morpholin), 1.7-1.6 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Dodecyl), 1.35-1.05 (m, 18H, $9 \times \text{CH}_2$ Dodecyl), 0.73 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, $\omega\text{-CH}_3$ Dodecyl)

MS (ESI): ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 677.4, gef. 677.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 677.4060; gef.: 677.4038

$\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ (676.91) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure 187

$\text{C}_4\text{H}_9\text{-SO}_2\text{NH-5-7(C}_2\text{H}_4\text{-NH}_2\text{)-6-COOH}$

Kupplung der Aminkomponente: -

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P8

Ausbeute: 3.3 mg, 0.0060 mmol, 21 %

$[\alpha]_D^{20} = +180.6^\circ$ (MeOH, $c = 0.16$)

HPLC (HPLC5): $R_t = 13.42$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.41$ (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 8.10 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, arom. CH), 7.32 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 4.28-3.75 (m, 5H, CHNH, -CHC(O)-, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_{2a}\text{N}-$), 3.64 (dd, $J = 12.7$ Hz, $J = 2.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2b}\text{N}-$), 3.25-3.10 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.9-3.0 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Butyl), 2.62 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H, $-\text{CH}_{2a}-$), 2.3-2.4 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}-$), 1.75-1.62 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Butyl), 1.40-1.30 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$ Butyl), 0.85 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\delta\text{-CH}_3$ Butyl)

MS (ESI): ber.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 439.2, gef.: 439.2 ; ber.: $[\text{M}-\text{H}]^-$ 437.2, gef.: 437.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 439.1651; gef.: 439.1665

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ (438.50) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäureallylester 188

C₄H₉-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-COOAll

Kupplung der Aminkomponente: - Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P8 Ausbeute: 2.8 mg, 0.0047 mmol, 17 %

$[\alpha]_D^{20} = +149.3^\circ$ (MeOH, c = 0.14)

HPLC (HPLC5): R_t = 16.07 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.51 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 8.18 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 7.38 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 6.03-5.90 (m, 1H, -OCH₂CH=CH₂), 5.35 (d, J = 17.2 Hz, 1H, -OCH₂CH=CH_{2a}), 5.25 (d, J = 10.5 Hz, 1H, -OCH₂CH=CH_{2b}), 4.84-4.75 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.35-3.95 (m, 4H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂), 3.84 (d, J = 12.9 Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.77 (d, J = 12.8 Hz, 1H, -CH_{2b}N-), 3.3-3.1 (m_{verd}, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 3.04-2.93 (m, 2H, α-CH₂ Butyl), 2.70 (d, J = 14.3 Hz, -CH_{2a}-), 2.45-2.35 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.80-1.70 (m, 2H, β-CH₂ Butyl), 1.45-1.35 (m, 2H, γ-CH₂ Butyl), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H, δ-CH₃ Butyl)

MS (ESI): ber.: [M+H]⁺ 479.2, gef.: 479.2; ber.: [M-H]⁻ 477.2, gef.: 477.3

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₂₂H₃₁N₄O₆S [M+H]⁺: ber.: 479.1964; gef.: 479.1971

C₂₂H₃₀N₄O₆S (478.56) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-alaninmethylester 189

C₄H₉-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-Ala-OMe

Kupplung der Aminkomponente: B Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P8 Ausbeute: 4.8 mg, 0.0075 mmol, 25 %

$[\alpha]_D^{20} = +146.2^\circ$ (CHCl₃, c = 0.24)

HPLC (HPLC5): R_t = 14.22 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.98 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.35 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 4.70-4.65 (m, 1H, α-CH Ala), 4.33-4.02 (m, 4H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂), 3.85 (d, J = 13.1 Hz, J = 5.9, 1H, -CH_{2a}N-), 3.77-3.70 (m, 4H, -CH_{2b}N-, OMe), 3.35-3.23 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 3.08-3.00 (m, 2H, α-CH₂ Butyl), 2.71 (d, J = 14.3 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.45-2.35 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.80-1.70 (m, 2H, β-CH₂ Butyl), 1.50 (d, J = 14.3 Hz, 3H, -CH₃ Ala), 1.45-1.38 (m, 2H, γ-CH₂ Butyl), 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 3H, δ-CH₃ Butyl)

MS (ESI): ber.: $[M+H]^+$ 524.2, gef.: 524.3 ; ber.: $[M-H]^-$ 522.2, gef.: 522.4

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{23}H_{34}N_5O_7S$ $[M+H]^+$: ber.: 524.2179; gef.: 524.2167

$C_{23}H_{33}N_5O_7S$ (523.60) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-phenylalaninmethylester 190

$C_4H_9-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-Phe-OMe$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P8

Ausbeute: 8.0 g, 0.0112 mmol, 27 %

$[\alpha]_D^{20} = +160.2^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.46$)

HPLC (HPLC5): $R_t = 17.14$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.11$ (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, arom. CH), 7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, arom. CH), 7.30-7.08 (m, 6 H, arom. CH), 5.00-4.94 (m, 1H, α -CH Phe), 4.30-4.00 (m, 4H, $CHNH$, $-CHC(O)-$, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.83 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 1H, $-CH_{2a}N-$), 3.78-3.68 (m, 4H, $-CH_{2b}N-$, OMe) 3.38-3.20 (m, 3H, β - CH_{2a} Phe, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.11 (dd, $J = 13.9$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1H, β - CH_{2b} Phe), 3.05-2.97 (m, 2H, α - CH_2 Butyl), 2.69 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, $-CH_{2a}-$), 2.45-2.35 (m, 1H, $-CH_{2b}-$), 1.80-1.70 (m, 2H, β - CH_2 Butyl), 1.45-1.38 (m, 2H, γ - CH_2 Butyl), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, δ - CH_3 Butyl)

MS (ESI): ber.: $[M+H]^+$ 600.2, gef.: 600.5 ; ber.: $[M-H]^-$ 598.2, gef.: 598.3

MS (FAB, 3-NBA) für $C_{29}H_{38}N_5O_7S$ $[M+H]^+$: ber.: 600.2492; gef.: 600.2469

$C_{29}H_{37}N_5O_7S$ (599.70) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-farnesyl-cysteinmethylester 191

$C_4H_9-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-Cys(Far)-OMe$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 15

Aufreinigung: P7

Ausbeute: 10.6 mg, 0.0121 mmol, 35 %

$[\alpha]_D^{20} = +147.8^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.55$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 13.06$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.3-8.2$ (m, 1H, arom. CH), 8.05-8.0 (m, 1H, arom. CH), 7.40-7.35 (m, 1H, arom. CH), 5.13 (t, $J = 8.1$ Hz, $C=CH$ Far), 5.05-4.95 (m, 2H, $2 \times C=CH$ Far), 4.83-4.78 (m, 1H, α -CH Cys), 4.30-3.80 (m, 5H, $CHNH$, $-CHC(O)-$, $NCH_2CH_2NH_2$, $-CH_{2a}N-$), 3.75-3.65 (m, 4H, $-CH_{2b}N-$, OMe), 3.28-2.93 (m, 5H, β - CH_{2a} Cys,

NCH₂CH₂NH₂, α -CH₂ Butyl), 2.88-2.78 (m, 1H, β -CH_{2b} Cys), 2.65 (d, J = 14.1 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.45-2.33 (m, 1H, -CH_{2b}-), 2.06-1.82 (m, 8H, 4 \times CH₂ Far), 1.78-1.68 (m, 2H, β -CH₂ Butyl), 1.62-1.45 (m, 12H, 4 \times CH₃ Far), 1.44-1.32 (m, 2H, γ -CH₂ Butyl), 0.95-0.84 (m, 3H, δ -CH₃ Butyl)

MS (ESI): ber.: [M+H]⁺ 760.4, gef.: 760.4

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₈H₅₇N₅O₇S₂ [M+H]⁺: ber.: 760.3777; gef.: 760.3735

C₃₈H₅₇N₅O₇S₂ (760.02) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-geranyl-cysteinmethylester 192

C₄H₉-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-Cys(Ger)-OMe

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 15

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 9.1 mg, 0.0113 mmol, 32 %

$[\alpha]_D^{20} = +128.8^\circ$ (CHCl₃, c = 0.21)

HPLC (HPLC4): R_t = 11.23 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.25-8.19 (m, 1H, arom. CH), 7.98 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.3 Hz, 1H, arom. CH), 7.34 (d, J = 8.6 Hz, 1H, arom. CH), 7.10 (t, J = 7.1 Hz, 1H, C=CH Ger), 5.00-4.90 (m, 1H, C=CH Ger), 4.80-4.74 (m, 1H, α -CH Cys), 4.3-3.8 (m_{br}, 5H, CHNH, -CHC(O)-, NCH₂CH₂NH₂, -CH_{2a}N-), 3.68 (s, 4H, OMe, -CH_{2b}N-), 3.24-2.90 (m, 7H, NCH₂CH₂NH₂, α -CH₂ Butyl, CH₂ Ger, β -CH_{2a} Cys), 2.81 (dd, J = 13.9 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, β -CH_{2a} Cys), 2.63 (d, J = 14.3 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.4-2.3 (m, 1H, -CH_{2b}-), 2.00-1.88 (m, 4H, 2 \times CH₂ Ger), 1.72-1.43 (m, 10H 3 \times CH₃ Ger, β -CH₂ Butyl), 1.42-1.30 (m, 2H, γ -CH₂ Butyl), 0.90-0.80 (m, 3H, δ -CH₃ Butyl)

MS (ESI): ber.: [M+H]⁺ 760.4, gef.: 760.4

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₃H₄₉N₅O₇S₂ [M+H]⁺: ber.: 692.3151; gef.: 692.3181

C₃₃H₄₉N₅O₇S₂ (691.90) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-S-hexadecyl-cysteinmethylester 193

C₄H₉-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-Cys(HD)-OMe

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 15

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 16.1 mg, 0.0180 mmol, 43 %

$[\alpha]_D^{20} = +148.2^\circ$ (CHCl₃, c = 0.61)

HPLC (HPLC4): $R_t = 15.20$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.3\text{-}8.2$ (1H, arom. CH), 7.99 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.40-7.30 (m, 1H, arom. CH), 4.88-4.82 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ Cys), 4.30-3.80 (m, 5H, CHNH , -CHC(O)- , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{-CH}_{2a}\text{N-}$), 3.78-3.65 (m, 4H, $\text{-CH}_{2b}\text{N-}$, OMe), 3.30-3.20 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.08-2.90 (m, 4H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys, $\alpha\text{-CH}_2$ Butyl), 2.67 (m, $J = 14.9$ Hz, 1H, -CH_{2a-}), 2.50-2.44 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Hexadecyl), 2.44-2.35 (m, 1H, -CH_{2b-}), 1.75-1.65 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Butyl), 1.55-1.10 (m, 32H, $15 \times \text{CH}_2$ Hexadecyl, $\gamma\text{-CH}_2$ Butyl), 0.95-0.85 (m, 3H, $\delta\text{-CH}_3$ Butyl), 0.80 (t, $J = 6.9$ Hz, $\omega\text{-CH}_3$ Hexadecyl)

MS (ESI): ber.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 780.4, gef.: 780.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 780.4403; gef.: 780.4417

$\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$ (780.09) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurepropylamid 194

$\text{C}_4\text{H}_9\text{-SO}_2\text{NH-5-7(C}_2\text{H}_4\text{-NH}_2\text{)-6-CONH-C}_3\text{H}_7$

Kupplung der Aminkomponente: A

Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P8

Ausbeute: 5.4 mg, 0.0091 mmol, 24 %

$[\alpha]_D^{20} = +197.9^\circ$ (MeOH, $c = 0.29$)

HPLC (HPLC5): $R_t = 11.57$ min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 und 10% CD_3OD): $\delta = 8.15$ (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 8.00 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, arom. CH), 7.36 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 4.30-4.00 (m, 4H, CHNH , -CHC(O)- , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{-CH}_{2a}\text{N-}$), 3.86 (dd, $J = 12.9$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H, $\text{-CH}_{2a}\text{N-}$), 3.73 (dd, $J = 12.9$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1H, $\text{-CH}_{2b}\text{N-}$), 3.32-3.22 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, CH_2 Propyl), 3.05-2.95 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Butyl), 2.6 (m_{verd}, 1H, -CH_{2a-}), 2.42-2.32 (m, 1H, -CH_{2b-}), 1.80-1.70 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Butyl), 1.65-1.55 (m, 2H, CH_2 Propyl), 1.45-1.35 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$ Butyl), 0.98-0.88 (m, 6H, $\gamma\text{-CH}_3$ Propyl, $\delta\text{-CH}_3$ Butyl)

MS (ESI): ber.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 480.2, gef.: 480.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 480.2280; gef.: 480.2259

$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ (479.59) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(butan-1-sulfonylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure (3-dimethylamino-propyl)-amid 195

$C_4H_9-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-CONH-C_3H_6-NMe_2$

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P8 Ausbeute: 6.1 mg, 0.0096 mmol, 24 %

$[\alpha]_D^{20} = +219.5^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.20$)

HPLC (HPLC5): $R_t = 11.86$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): 8.22 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, arom. CH), 7.97 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, arom. CH), 4.25-3.74 (m_{verd} , 5H, $CHNH$, $-CHC(O)-$, $NCH_2CH_2NH_2$, $-CH_{2a}N-$), 3.66 (dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, $-CH_{2b}N-$), 3.48-3.32 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2NMe_2$), 3.28-3.10 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.09-3.00 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2NMe_2$), 3.00-2.93 (m, 2H, α - CH_2 Butyl), 2.74 (s, 6H, NMe_2), 2.62 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, $-CH_{2a-}$), 2.42-2.32 (m, 1H, $-CH_{2b-}$), 2.00-1.90 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2NMe_2$), 1.73-1.64 (m, 2H, β - CH_2 Butyl), 1.42-1.30 (m, 2H, γ - CH_2 Butyl), 0.86 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, δ - CH_3 Butyl)

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{24}H_{39}N_6O_5S$ $[M+H]^+$: ber.: 523.2702; gef.: 523.2727

$C_{24}H_{38}N_6O_5S$ (522.66) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(2-biphenyl-4-yl-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure 199

$C_{10}H_{11}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-COOH$

Kupplung der Aminkomponente: - Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 4.3 g, 0.0069 mmol, 23 %

$[\alpha]_D^{20} = +246.2^\circ$ (MeOH, $c = 0.23$)

HPLC (HPLC5): $R_t = 17.12$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.48$ (d, $J = 2.0$ Hz, arom. CH), 8.16 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, arom. CH), 7.6-7.2 (m, 10H, $10 \times$ CH arom), 4.5-4.4 (m, 1H, $-CHC(O)-$), 4.3-4.1 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.95-4.05 (m, 1H, $CHNH$), 3.85 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 6.4$ Hz, 1H, $-CH_{2a}N-$), 3.59 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $-CH_{2b}N-$), 3.49 (s, 2H, $-CH_2$ -biphenyl), 3.25-3.15 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 2.62 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H, $-CH_{2a-}$), 2.43-2.33 (m, 1H, $-CH_{2b-}$)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 513.2, gef. 513.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{29}H_{29}N_4O_5$ $[M+H]^+$: ber.: 513.2138; gef.: 513.2112

C₂₉H₂₈N₄O₅ (512.56) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(2-biphenyl-4-yl-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäureallylester 200

C₁₀H₁₁-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-COOAlI

Kupplung der Aminkomponente: - Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 9.0 mg, 0.0135 mmol, 41 %

$[\alpha]_D^{20} = +205.0^\circ$ (CHCl₃, c = 0.44)

HPLC (HPLC4): R_t = 9.23 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.46 (d, J = 2.2 Hz, arom. CH), 8.11 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.5-7.2 (m, 10H, 10 × CH arom), 5.85-5.95 (m, 1H, -OCH₂CH=CH₂), 5.31 (dd, J = 17.2 Hz, J = 1.4 Hz, 1H, -OCH₂CH=CH_{2a}), 5.21 (d, J = 10.4 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, -OCH₂CH=CH_{2b}), 4.8-4.7 (m, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.5-4.4 (m, 1H, -CHC(O)-), 4.2-4.1 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 3.95-3.85 (m, 1H, CHNH), 3.74 (dd, J = 13.0 Hz, J = 5.8 Hz, 1H, -CH_{2a}N-), 3.5-3.4 (m_{verd}, 1H, -CH_{2b}N-), 3.46 (s, 2H, -CH₂-biphenyl), 3.23-3.15 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 2.54 (d, J = 14.1 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.45-2.35 (m, 1H, -CH_{2b}-)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 553.2, gef. 553.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₂H₃₃N₄O₅ [M+H]⁺: ber.: 553.2451; gef.: 553.2480

C₃₂H₃₂N₄O₅ (552.62) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(2-biphenyl-4-yl-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl-alaninmethylester 201

C₁₀H₁₁-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-Ala-OMe

Kupplung der Aminkomponente: B Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 12.1 mg, 0.0170 mmol, 63 %

$[\alpha]_D^{20} = +196.2^\circ$ (CHCl₃, c = 0.53)

HPLC (HPLC4): R_t = 7.98 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.18 (d, J = 2.3 Hz, arom. CH), 7.94 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.3 Hz, 1H, arom. CH), 7.5-7.2 (m, 10H, 10 × CH arom), 4.62 (q, J = 7.2 Hz, 1H, α-CH Ala), 4.5-4.4 (m, 1H, -CHC(O)-), 4.2-4.1 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 3.9-3.6 (m, 6H, CHNH, -CH₂N-, OMe), 3.47 (s, 2H, -CH₂-biphenyl), 3.23-3.15 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 2.55 (d, J = 13.9 Hz, 1H, -CH_{2a}-), 2.45-2.35 (m, 1H, -CH_{2b}-), 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃ Ala)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 598.3, gef. 598.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{33}H_{36}N_5O_6$ $[M+H]^+$: ber.: 598.2665; gef.: 598.2674

$C_{33}H_{35}N_5O_6$ (597.66) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(2-biphenyl-4-yl-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl- S-farnesyl-cysteinmethylester 202

$C_{10}H_{11}-SO_2NH-5-7(C_2H_4-NH_2)-6-Cys(Far)-OMe$

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 16

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 8.0 mg, 0.0112 mmol, 41 %

$[\alpha]_D^{20} = +144.3^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.53$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 13.38$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.25-8.20$ (m, 1H, arom. CH), 8.02-7.87 (m, 1H, arom. CH), 7.60-7.20 (m, 10H, 10 × CH arom), 5.11 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, C=CH Far), 5.02-4.92 (m, 2H, 2 × C=CH Far), 4.83-4.76 (m, 1H, α -CH Cys), 4.47-4.41 (m, 1H, -CHC(O)-), 4.04-4.14 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.96-3.88 (m, 1H, CHNH), 3.75-3.57 (m, 5H, - CH_2N -, OMe), 3.46 (s, 2H, - CH_2 -biphenyl), 3.20-2.75 (m, 6H, $NCH_2CH_2NH_2$, CH_2 Far, β - CH_2 Cys), 2.54 (d, $J = 14.1$ Hz, - CH_{2a} -), 2.34-2.25 (m, 1H, - CH_{2b} -), 2.05-1.82 (m, 8H, 4 × CH_2 Far), 1.65-1.45 (m, 12H, 4 × CH_3 Far)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 834.4, gef. 834.3; ber. $[M-H]^-$ 832.4, gef. 832.5

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{48}H_{60}N_5O_6S$ $[M+H]^+$: ber.: 834.4265; gef.: 834.4265

$C_{48}H_{59}N_5O_6S$ (834.08) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(2-biphenyl-4-yl-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurehexylamid 203

$C_{10}H_{11}-SO_2NH-5-(C_2H_4-NH_2)-6-CONH-C_6H_{13}$

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 9.8 mg, 0.0137 mmol, 50 %

$[\alpha]_D^{20} = +197.3^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0.49$)

HPLC (HPLC4): $R_t = 9.86$ min

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ und 10% CD_3OD): $\delta = 8.23$ (d, $J = 2.2$ Hz, arom. CH), 8.10 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, arom. CH), 7.65-7.25 (m, 10H, 10 × CH arom), 4.6-4.5 (m, 1H, -CHC(O)-), 4.3-4.2 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 4.15-3.80 (m_{verd} , 2H, CHNH, - $CH_{2a}N$), 3.74 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, - $CH_{2b}N$ -), 3.57 (s, 2H, - CH_2 -biphenyl), 3.45-3.35 (m, 2H, α - CH_2 Hexyl), 3.35-3.2 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 2.66 (d, $J = 13.9$ Hz, - CH_{2a} -), 2.45-2.35 (m, 1H, - CH_{2b} -),

1.7-1.6 (m, β -CH₂, Hexyl), 1.4-0.125 (m, 6H, 3 × CH₂ Hexyl), 0.90 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃ Hexyl)

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₅H₄₂N₅O₄ [M+H]⁺: ber.: 596.3237; gef.: 596.3217

C₃₅H₄₁N₅O₄ (595.73) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(2-biphenyl-4-yl-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäurebenzylamid 204

C₁₀H₁₁-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-CONH-CH₂C₆H₅

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 11.9 mg, 0.0126 mmol, 43 %

$[\alpha]_D^{20} = +177.9^\circ$ (CHCl₃, c = 0.38)

HPLC (HPLC5): R_t = 18.77 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.19 (d, J = 2.3 Hz, arom. CH), 8.00 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.55-7.15 (m, 10H, 15 × CH arom), 4.55-4.50 (m, 2H, CH₂-phenyl), 4.5-4.4 (m, 1H, -CHC(O)-), 4.2-4.1 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 4.0-3.9 (m, 1H, CHNH), 3.75 (dd, J = 13.0 Hz, J = 3.61 Hz, 1H, -CH_{2a}N), 3.61 (dd, J = 12.8 Hz, J = 1.7 Hz, 1H, -CH_{2b}N-), 3.47 (s, 2H, -CH₂-biphenyl), 3.2-3.1 (m, 2H, NCH₂CH₂NH₂), 2.56 (d, J = 14.1 Hz, -CH_{2a}-), 2.35-2.25 (m, 1H, -CH_{2b}-)

MS (ESI): ber. [M+H]⁺ 602.3, gef. 602.7

HR-MS (FAB, 3-NBA) für C₃₅H₄₂N₅O₄ [M+H]⁺: ber.: 602.2767; gef.: 602.2740

C₃₆H₃₅N₅O₄ (601.69) · TFA

10-(2-Amino-ethyl)-2-(2-biphenyl-4-yl-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-carbonsäure (2-morpholin-4-yl-ethyl)-amid 205

C₁₀H₁₁-SO₂NH-5-7(C₂H₄-NH₂)-6-CONH-C₃H₆NC₄H₈O

Kupplung der Aminkomponente: A Abspaltung von der festen Phase: AAV 14

Aufreinigung: P7 Ausbeute: 12.7 mg, 0.0169 mmol, 60%

$[\alpha]_D^{20} = +146.9^\circ$ (MeOH, c = 0.69)

HPLC (HPLC5): R_t = 15.69 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 8.21 (d, J = 2.3 Hz, arom. CH), 7.96 (dd, J = 8.5 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, arom. CH), 7.50-7.2 (m, 10H, 15 × CH arom), 4.5-4.4 (m, 1H, -CHC(O)-), 4.2-3.8 (m_{verd}, 11H, CHNH, NCH₂CH₂NH₂, 4 × CH₂ Morpholin), 3.74 (dd, J =

13.0 Hz, $J = 5.8$ Hz, 1H, $-CH_{2a}N$), 3.62 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, $-CH_{2b}N-$), 3.47 (s, 2H, $-CH_2-$ biphenyl), 3.45-3.55 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2N$ Morpholin), 3.2-3.1 (m, 2H, $NCH_2CH_2NH_2$), 3.10-3.00 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2N$ Morpholin), 2.55 (d, $J = 13.7$ Hz, $-CH_{2a-}$), 2.35-2.25 (m, 1H, $-CH_{2b-}$), 2.00-1.90 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2N$ Morpholin)

MS (ESI): ber. $[M+H]^+$ 639.3, gef. 639.8

HR-MS (FAB, 3-NBA) für $C_{36}H_{43}N_6O_5$ $[M+H]^+$: ber.: 639.3295; gef.: 639.3317

$C_{36}H_{42}N_6O_6$ (638.76) · TFA

7 Literaturverzeichnis

- [1] A. Levitzky, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1-13.
- [2] J. Folch, M. Lees, *J. Biol. Chem.* **1951**, *191*, 833-841.
- [3] P. Stoffyn, J. Folch-Pi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1971**, *44*, 157-161.
- [4] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1-16.
- [5] J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 245-261.
- [6] a) W. Stoffel, H. Hillen, W. Schröder, R. Deutzmann, *Hoppe-Seyler'sZ. Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 1455-1466; b) W. D. Branton, C. G. Fields, V. L. VanDrisse, G. B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4885-4888.
- [7] a) R. B. Pepinsky, C. H. Zeng, D. Y. Wen, P. Rayhorn, D. P. Baker, K. P. Williams, S. A. Bixler, C. M. Ambrose, E. A. Garber, K. Miatkowski, F. R. Taylor, E. A. Wang, A. Galdes, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14037-14045; b) C. Kleuss, E. Krause, *EMBO* **2003**, *22*, 826-832.
- [8] A) F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 241-269. b) M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1484*, 93-106.
- [9] J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy, *Science* **1996**, *274*, 255-259.
- [10] S. Chatterjee, S. Mayor, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1969-1987.
- [11] J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 245-261.
- [12] a) A. I. Magee, L. Gutierrez, I. A. McKay, C. J. Marshall, A. Hall, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3353-3357; b) J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23594-23600.
- [13] C. A. Ellis, G. Clark, *Cellular Signalling* **2000**, *12*, 425-434.
- [14] R. C. Sears, J. R. Nevins, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11617-11620.
- [15] A. Welman, M. M. Burger, J. Hagmann, *Oncogene* **2000**, *19*, 4582-4591.
- [16] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, *39*, 4193-4214.
- [17] A. Erhardt, G. R. Erhardt, X. Guo, J. W. Schrader, *Exp. Hematol.* **2002**, *30*, 1089-1106.
- [18] a) J. Yan, S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, J. F. Hancock, *J. Biol. Chem.* **1998**, 24052-24056; b) J. Voice, R. Klemke, A. Le, J. Jackson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17164-17170.
- [19] Z. Luo, B. Diaz, M. S. Marshall, J. Avruch, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 46-53.
- [20] I. Rubio, U. Wittig, C. Meyer, R. Heinze, D. Kadereit, H. Waldmann, J. Downward, R. Wetzker, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 70-82.
- [21] a) P. McGeady, E. Porfiri, H. Gelb, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 145-150; b) E.

- Porfiri, T. Evans, P. Chardin, J. F. Hancock, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22672-22677.
- [22] M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 203-209.
- [23] a) R. C. Sears, J. R. Nevins, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11617-11620; b) T. Matozaki, H. Nakanishi, Y. Takai, *Cellular Signalling* **2000**, *12*, 515-524.
- [24] J. R. Silvius, *J. Membr. Biol.* **2002**, *190*, 83-92.
- [25] Y. Reiss, J. L. Goldstein, M. C. Seabra, P. J. Casey, M. S. Brown, *Cell* **1990**, *62*, 81-88.
- [26] a) V. L. Boyartchuk, M. N. Ashby, J. Rine, *Science* **1997**, *275*, 1796-1800; b) J. C. Otto, E. Kim, S. G. Young, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8379-8382.
- [27] a) Q. Dai, E. Choy, V. K. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, M. R. Philips, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15030-15034; b) E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, *98*, 69-80.
- [28] a) J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133-139; b) J. F. Hancock, K. Cadwallader, H. Paterson, C. J. Marshall, *EMBO J.* **1991**, *10*, 4033-4039.
- [29] a) S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813-3822; b) H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102-13109.
- [30] M.-O. Roy, R. Leventis, J. Silvius, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8298-8307.
- [31] J. F. Hancock, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 373-383.
- [32] T. G. Bivona, I. Pérez de Castro, I. M. Ahearn, T. M. Grana, V. K. Chiu, P. J. Lockyer, P. J. Cullen, A. Pellicer, A. D. Cox, M. R. Philips, *Nature* **2003**, *424*, 694-698.
- [33] M. E. Linder, R. J. Deschenes, *Biochemistry* **2003**, *42*, 4311-4320.
- [34] P. J. O'Brien, R. S. St. Jules, T. S. Reddy, N. G. Bazan, M. Zatz, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5210-5215.
- [35] S. Quesnel, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13340-13348.
- [36] M. Bharadwaj, O. A. Bizzozero, *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 1805-1815.
- [37] R. E. Gossett, A. A. Frolov, J. B. Roths, W. D. Behnke, A. B. Kier, F. Schroeder, *Lipids* **1996**, *31*, 895-918.
- [38] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23269-23276.
- [39] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3252a.
- [40] D. J. Bartels, D. A. Mitchell, X. Dong, R. J. Deschenes, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 6775-6787.

- [41] S. Lobo, W. K. Greentree, M. E. Linder, R. J. Deschenes, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41268-41273.
- [42] A. F. Roth, Y. Feng, L. Chen, N. G. Davis, *J. Cell. Biol.* **2002**, *159*, 23-28.
- [43] L. A. Camp, L. A. Verkruyse, S. J. Afendis, C. A. Slaughter, S. L. Hofmann, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23212-23219.
- [44] L. A. Verkruyse, S. L. Hofmann, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15831-15836.
- [45] A. A. Soyombo, S. L. Hofmann, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27456-27463.
- [46] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15830-15837.
- [47] H. Sugimoto, H. Hayashi, S. Yamashita, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7705-7711.
- [48] Y. Devedjev, Z. Dauter, S. R. Kuznetsov, T. L. Z. Jones, Z. S. Derewenda, *Structure* **2000**, *8*, 1137-1146.
- [49] M. Veit, N. Schmidt, *Virology* **2001**, *288*, 89-95.
- [50] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31740-31752.
- [51] P. Deck, Dissertation, Universität Dortmund **2002**.
- [52] M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [53] a) O. Seitz, I. Heinemann, A. Mattes, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2247-2277; b) D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 144-169; c) M. Völkert, M. Wagner, C. Peters, H. Waldmann, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1133-1145.
- [54] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223-226.
- [55] J. Kuhlmann, A. Tebbe, M. Völkert, M. Wagner, K. Uwai, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2546-2550.
- [56] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [57] a) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705-6710; b) K. Severinov, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16205-16209.
- [58] T. C. Evans, Jr., M.-Q. Xu, *Biopolymers* **1999**, *51*, 333-342.
- [59] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5648-5649.
- [60] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421-5428.
- [61] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4900-4908.
- [62] M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo (Ed.), *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E 22a*, Thieme, Stuttgart, **2002**.

- [63] W. C. Chan, P. D. White (Ed.) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach*, Oxford University Press, **2000**.
- [64] G. B. Fields (Ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 289, Academic Press, New York, **1997**.
- [65] a) L. Moroder, J. Lutz, H.-J. Musiol, N. L. Benoiton, M. Beyermann, M. Bienert, L. A. Carpino, W. D. Fuller, V. V. Yalamoori, J. Podlech, J. Coste, P. Henklein in: *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Thieme, Stuttgart, **2002**, Vol. E 22a, 425-580; b) F. Albericio, L. A. Carpino in *Methods in Enzymology*, Vol. 289, Academic Press, New York, **1997**, 104-126.
- [66] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
- [67] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- [68] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 2034-2040.
- [69] a) L. A. Carpino, A. El-Fahan, C. A. Minor, F. Albericio, *Chem. Commun.* **1994**, 201-203; b) L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2279-2282.
- [70] F. Albericio, L. A. Carpino in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **1997**, Vol. 289, 104-126.
- [71] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
- [72] J. Coste, D. Lenguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 205-208.
- [73] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4853-4856.
- [74] M. Bodanszky, J. Martinez, *Synthesis* **1981**, 333-356.
- [75] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2460-2465.
- [76] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4307-4312.
- [77] B. Henkel, L. Zhang, E. Bayer, *Liebigs Ann.* **1997**, 2161-2168.
- [78] a) P. Wipf, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta.* **1986**, 69, 1153-1162; b) H.-D. Jakubke, C. Klessen, E. Berger, K. Neubert, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1497-1500; c) D.S. Perlow, J. M. Erb, N. P. Gould, R. D. Tung, R. M. Freidinger, P. D. Williams, D. F. Veber, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4394-4400; d) V. V. Suresh Babu, H. N. Gopi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1049-1050.
- [79] N. Thieriet, F. Guibé, F. Albericio, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1815-1817.
- [80] H. Benz, *Synthesis* **1994**, 337-358.
- [81] P. Loyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron* **1993**, 49, 11065-11133.

- [82] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957-989.
- [83] L. Moroder in: *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Thieme, Stuttgart, **2002**, *Vol. E 22a*, 17-39.
- [84] a) R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154; b) R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 304-5.
- [85] a) W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946; b) F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [86] F. Z. Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [87] a) F. Albericio, E. Giralt in: *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Thieme, Stuttgart, **2002**, *Vol. E 22a*, 685-723; b) M. F. Songster, G. Barany in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **1997**, *Vol. 289*, 126-175.
- [88] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiou, P. Sotiriou, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [89] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37*, 513-520.
- [90] C. Chiva, M. Vilaseca, E. Giralt, F. Albericio, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 131-140.
- [91] a) H. B. Milne, J. E. Halver, D. S. Ho, M. S. Mason, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 637-639; b) H. B. Milne, C.-H. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 645-648.
- [92] H. B. Milne, W. Kildal, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 64-66.
- [93] H. B. Milne, J.C.F. Most, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 169-175.
- [94] H. B. Milne, J.E. Halver, D.S. Ho, M.S. Mason, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 637-639.
- [95] R. B. Kelly, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 453-456.
- [96] A. N. Semenov, I. V. Lomonosova, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 113-117.
- [97] a) M. Völkert, S. Koul, G. H. Müller, M. Lehnig, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6902-6910. b) G. Müller, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3549-3552.
- [98] T. Wieland, J. Lewalter, C. Birr, *Liebigs Ann. Chem.* **1970**, *740*, 31-47.
- [99] A. N. Semenov, K. Y. Gordeev, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 303-304.
- [100] C. R. Millington, R. Quarrell, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7201-7204.
- [101] C. Peters, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6053-6055.
- [102] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5677-5680.
- [103] a) M. Meldal in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **1997**, *Vol. 289*, 83-104; b) R. Haag, A. Hebel, J.-F. Stumbé in *Handbook of Combinatorial Chemistry*, Wiley-VCH Weinheim, **2002**, 24-58.

- [104] W. Rapp in: *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Thieme, Stuttgart, **2002**, Vol. E 22a, 672-684.
- [105] R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8951-8954.
- [106] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5463-5470, G. B. Fields, C. G. Fields, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4202-4207.
- [107] a) D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 333-360; b) D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 403-457; c) D. C. Sherrington, *Chem. Commun.* **1998**, 2275-2286; d) I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, 55, 4855-4946.
- [108] J. H. Adams, R. H. Cook, D. Hudson, V. Jammalamadaka, M. H. Lyttle, M. F. Songster, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3706-3716.
- [109] P. Stöber, M. Schelhaas, E. Nägele, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 75-83.
- [110] M. Koppitz, T. Spellig, R. Kahmann, H. Kessler, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, 48, 377-390.
- [111] D. Kadereit, P. Deck, I. Heinemann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 1184-1193.
- [112] M. Schelhaas, E. Nägele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1239-1252.
- [113] L. Maetínská, W. Neugebauer, J. Pérodin, M. Lefebvre, E. Escher, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3271-3279.
- [114] F. R. Naider, J. M. Becker, *Biopoly.* **1997**, 43, 3-14.
- [115] H. Xie, Y. Shao, J. M. Becker, F. Naider, R. A. Gibbs, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8552-8563
- [116] a) F. Ghomashchi, X. Zhang, L. Liu, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1995**, 34, 11910-11918; b) M. J. Brown, P. D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, D. C. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3176-3177; c) C. C. Yang, C. K. Marlowe, R. Kania, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3177-3178.
- [117] R. L. Edelstein, V. A. Weller, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 5298-5299.
- [118] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1023-1035, E. Nägele, M. Schelhaas, N. Kuder, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6889-6902.
- [119] E. K. Dolence, J. M. Dolence, C. D. Poulter, *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, 35-43.
- [120] a) P. Mayer-Fligge, J. Volz, U. Krüger, E. Sturm, W. Gernandt, K. P. Schäfer, M.

- Przybylski, *J. Peptide. Sci.* **1998**, *4*, 355-363; b) D. Denis, E. Trifilieff, *J. Peptide. Sci.* **2000**, *6*, 372-377; c) S. P. Creaser, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2444-2445; d) M. Joseph, R. Nagaraj, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19439-19445.
- [121] E. Yousefi-Salakdeh, J. Johansson, R. Strömberg, *Biochem. J.* **1999**, *343*, 557-562.
- [122] a) A. Cotté, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 922-936; b) F. Eisele, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 369-373; c) R. Machauer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2940-2956.
- [123] D. Kadereit, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 200-2003.
- [124] F. Ghomashchi, X. Zhang, L. Liu, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11910-11918.
- [125] R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7640-7648.
- [126] K. Kuhn, Dissertation, Universität Karlsruhe (TU), **1999**.
- [127] F. Eisele, Dissertation, Universität Dortmund, **2000**.
- [128] C. Rosenbaum, Dissertation, Universität Dortmund, **2003**.
- [129] F. Stieber, Dissertation, Universität Dortmund, **2002**.
- [130] M. Völkert, Dissertation, Universität Dortmund, **2003**.
- [131] T. Schmittberger, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 749-762.
- [132] S. Janosch, R. Winter, Universität Dortmund, unveröffentlichte Ergebnisse
- [133] M. Schelhaas, Dissertation, Universität Karlsruhe (TU), **1997**.
- [134] G. Kragol, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse
- [135] E. Addicks, R. Mazitschek, A. Giannis, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1078-1088.
- [136] D. Ma, H. Tian, G. Zou, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 120-125.
- [137] D. Seebach, E. Hungerbühler, R. Naef, P. Schnurrenberger, B. Weidmann, M. Züger, *Synthesis* **1982**, 128-141.
- [138] a) H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1983**, *22*, 62; b) H. Waldmann, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4172-4175.
- [139] a) P. Baumhof, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3672-3674; b) O. A. Mascaretti, R. L. E. Furlán, *Aldrichim. Acat* **1997**, *30*, 55-68.
- [140] D. Seebach, A. Thaler, D. Blaser, S. Y. Ko, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1102-1118.
- [141] A. J. Brouwer, S. J. E. Mulders, R. M. J. Liskamp, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1903-1915.
- [142] B. E. Blass, T. M. Burt, S. Liu, D. E. Portlock, E. M. Swing, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2063-2066.
- [143] C. E. Lee, E. K. Kick, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9735-9747.

- [144] C. Gennari, C. Longari, S. Ressel, B. Salom, U. Piarulli, S. Ceccarelli, A. Mielgo, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2437-2449.
- [145] P. J. Hajduk, M. Bures, J. Praestgaard, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2000**, 3443-3447.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann gilt mein Dank für die interessante Themenstellung, seine Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen sowie die stete Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem Fonds des Verbandes der chemischen Industrie danke ich für seine finanzielle Unterstützung in Form eines Kekulé-Stipendiums.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die vielen Tipps und Ideen und die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen. Mein besonderer Dank gilt meinen Labor- und Bürokollegen; es hat immer viel Spaß gemacht.

Für die Durchsicht des Manuskriptes danke ich Eleni Gourzoulidou, Marcus A. Koch, Lars Arve, Stefanie Schlummer und Daniel Gottlieb. Ebenso möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern Christian Grunwald, Sascha Janosch, Chiara Nicolini und Dirk Pendzialek für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Sasiskala *Sasi* Thavam danke ich für die Unterstützung bei dem Projekt „Daumendick“.

Bei Heike Rimpel, Walburga Hecker, Corinna Lechleitner, Sandra Eichhorn und Christiane Vornweg sowie bei den analytischen Abteilungen der Universität Dortmund und des Max-Planck-Instituts möchte ich mich für die Durchführung der Analysen bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, durch deren Unterstützung mein Studium erst ermöglicht wurde.

Lebenslauf

Name: Björn Ludolph
Geboren: am 11.03.1974 in Gronau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule Schöneck in Lüdenscheid
1984-1993 Zeppelin-Gymnasium in Lüdenscheid
6/93 Abitur, Note: 1.7

Zivildienst:

7/93-9/94 Zivildienst im Zentrallabor des Kreiskrankenhauses Lüdenscheid

Studium:

10/94-12/99 Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg
10/96 Diplomvorprüfung, Note: „sehr gut“ (1.1)
10/97-3/98 Forschungsarbeit am Imperial College, London, zum Thema
*Unsymmetrical Dithio- or diseleno carbamato-zinc or -cadmium
Compounds: Novel Single Source Precursors for II-IV Quantum Dots*
unter der Betreuung von Prof. Dr. Paul O'Brien
5/99-12/99 Diplomarbeit zum Thema *Mutagenitätsuntersuchungen an
alkylierten Dimethylaminoazobenzolen, 4-Aminostilbenen und 4-
(Phenylethynyl)anilinen* unter der Betreuung von Prof. Dr. Gernot
Boche
12/99 Diplom in Chemie an der Philipps-Universität Marburg,
Note: „sehr gut“ (1.1)

Promotion:

2/00-2/04 Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Herbert
Waldmann an der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut
für molekulare Physiologie, Dortmund, zum Thema:
Festphasensynthese lipidierter Peptide und Benzodiazepindione,
Gesamtnote: „ausgezeichnet“