

Synthese lipidierter Peptidstrukturen viraler und zellulärer Proteine

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
Frank Eisele
aus Karlsruhe

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2000

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann am Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe und am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund in der Zeit vom Oktober 1996 bis Mai 2000 angefertigt.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	2
2.1. Lipidmodifizierung viraler und zellulärer Proteine	2
2.1.1. Palmitoylierung viraler Hüllproteine	2
2.1.2. <i>Rho</i> -Seitenweg der <i>Ras</i> -Signaltransduktionskaskade	4
2.2. Synthese lipidmodifizierter Peptidkonjugate	7
2.2.1. Anknüpfung der Palmitoyl- und Isoprenyl-Reste bei der Synthese lipidierter Peptide	8
2.2.2. Enzymatische Schutzgruppentechniken	10
2.2.3. Synthese seitenkettenmodifizierter Peptide an der festen Phase	13
2.3. Biologische Studien mit lipidmodifizierten Peptiden	16
2.3.1. Biophysikalische Messungen	17
2.3.2. Zellbiologische Untersuchungen	19
2.3.3. Biologische Untersuchungen mit Protein-Peptid-Konjugaten	20
3. Ziel der Arbeit	22
4. Spezieller Teil	25
4.1. Chemoenzymatische Synthese der fluoreszenzmarkierten C-terminalen zweifach palmitoylierten Heptapeptidsequenz des Influenza-A-Hämagglutinins	25
4.1.1. Enzymatische Abspaltung der PAOB-Ester-Schutzgruppe an Modelldipeptiden	25
4.1.2. Plan zur Synthese des fluoreszenzmarkierten Hämagglutinin-Heptapeptids	28
4.1.3. Darstellung des C-terminalen palmitoylierten Tetrapeptidbausteins	30
4.1.4. Fluoreszenzmarkierung des C-terminalen palmitoylierten Tetrapeptids	35
4.1.5. Darstellung des N-terminalen palmitoylierten Tripeptids	35
4.1.6. Enzymatische Entschützung zum C-terminal freien palmitoylierten Dipeptid und alternative Darstellung dieses Synthesebausteins	39
4.1.7. Kupplung zum doppelt palmitoylierten Hexapeptid und abschließende Schritte zum fluoreszenzmarkierten Heptapeptid	42
4.2. Biophysikalische Experimente mit den chemoenzymatisch dargestellten fluoreszenzmarkierten Lipopeptiden	45
4.2.1. Austausch zwischen der Vesikel-Innen- und –Außenseite (Flip-Flop-Kinetik)	45

4.2.2.	Intervesikeltransfer des palmitoylierten Tetrapeptids	47
4.2.3.	Intervesikeltransfer des zweifach palmitoylierten Heptapeptids	49
4.3.	Synthese der fluoreszenzmarkierten C-terminalen geranylgeranylierten Heptapeptidsequenz des <i>RhoA</i>-Proteins	51
4.3.1.	Plan zur Synthese des geranylgeranylierten Heptapeptids	51
4.3.2.	Darstellung des C-terminalen geranylgeranylierten Tripeptids	52
4.3.3.	Darstellung des N-terminalen Tetrapeptids	55
4.3.4.	Kupplung zum geranylgeranylierten Heptapeptid und Versuch der Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers	57
4.3.5.	Darstellung des N-terminalen fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids	59
4.3.6.	Abschließende Schritte zum fluoreszenzmarkierten Heptapeptid	60
4.4.	Festphasensynthese von <i>Ras</i>-Peptiden mit dem Arylhydrazid-Linker	62
4.4.1.	Synthese-Konzept zur Darstellung isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide an fester Phase	62
4.4.2.	Anknüpfung eines Farnesyl-Restes an festphasengebundenem Cystein mit anschließender Spaltung des Arylhydrazid-Linkers	63
4.4.3.	Versuche zur Synthese der farnesylierten und carboxymethylierten C-terminalen K- <i>Ras</i> -Undecapeptids	67
4.4.4.	Festphasensynthese des farnesylierten C-terminalen K- <i>Ras</i> -Tripeptids nach veränderter Strategie	70
5.	Zusammenfassung und Ausblick	73
6.	Experimenteller Teil	80
6.1.	Meßgeräte und Hilfsmittel	80
6.2.	Versuche zu Kapitel 4.1.	82
6.2.1.	Versuche zu Kapitel 4.1.1.	82
6.2.2.	Versuche zu Kapitel 4.1.3.	87
6.2.3.	Versuche zu Kapitel 4.1.4.	97
6.2.4.	Versuche zu Kapitel 4.1.5.	100
6.2.5.	Versuche zu Kapitel 4.1.6.	107
6.2.6.	Versuche zu Kapitel 4.1.7.	113
6.3.	Versuche zu Kapitel 4.2.	120
6.3.1.	Versuche zu Kapitel 4.2.1.	121
6.3.2.	Versuche zu Kapitel 4.2.2.	121
6.3.3.	Versuche zu Kapitel 4.2.3.	122
6.4.	Versuche zu Kapitel 4.3.	122
6.4.1.	Versuche zu Kapitel 4.3.2.	122
6.4.2.	Versuche zu Kapitel 4.3.3.	130
6.4.3.	Versuche zu Kapitel 4.3.4.	140
6.4.4.	Versuche zu Kapitel 4.3.5.	142

6.4.5. Versuche zu Kapitel 4.3.6.	147
6.5. Versuche zu Kapitel 4.4.	149
6.5.1. Versuche zu Kapitel 4.4.2.	149
6.5.2. Versuche zu Kapitel 4.4.3.	154
6.5.3. Versuche zu Kapitel 4.4.4.	157
7. Literaturverzeichnis	161
8. Abkürzungsverzeichnis	167

1. Einleitung

Mit der Struktur und Wirkungsweise von Proteinen beschäftigen sich verschiedene naturwissenschaftliche Forschungsrichtungen. So können viele in der medizinischen Forschung untersuchte Krankheiten auf biologische Prozesse zurückgeführt werden, deren Schlüsselkomponenten Proteine sind.^[1] Diese liegen oftmals kovalent verknüpft mit anderen Naturstoffbausteinen wie Kohlenhydraten, Phosphatgruppen, Nukleotiden oder Lipiden vor.^[2] Die Organische Chemie kann zunehmend Peptidsynthesen längerer Sequenzen biologisch relevanter Proteine realisieren und etabliert darüberhinaus ständig neue Methoden für den Aufbau von Glyco-, Phospho-, Nukleo- und Lipopeptiden. Diese kurzkettigen Fragmente erweisen sich ihrerseits immer häufiger als wichtige Hilfsmittel zur Aufklärung biologischer Zusammenhänge. In den letzten Jahren führten diese Synergieeffekte beispielsweise zu einem detaillierteren Verständnis der Signaltransduktion in eukaryontischen Zellen.^[3, 4] Das Forschungsinteresse richtete sich vor allem auf die *Ras*-Kaskade, deren Störungen für etwa 30 % aller bekannten Krebsarten verantwortlich sind. Ein Ziel der Naturwissenschaften ist es deshalb, bekannte Krankheitsbilder möglichst lückenlos bis auf die molekulare Ebene hinab aufzuklären, um gezielte Therapiemaßnahmen zu ermöglichen.

Weiterführende Untersuchungen, die sich für den Einsatz synthetisch dargestellter Peptide in molekularbiologischen Studien anbieten, könnten sich auch auf einem anderen Gebiet der aktuellen biologischen und medizinischen Forschung ergeben. Von besonderem Interesse wären zusätzliche Informationen über die grundlegenden Schritte bestimmter Virusinfektionen, in denen modifizierte Proteine ebenfalls entscheidend mitwirken. Weiterhin existieren innerhalb der *Ras*-Signaltransduktionskaskade zahlreiche Seitenwege zum Zellkern. Über die Aufgabe der beteiligten Proteine und ihrer Modifizierungen ist jedoch bisher sehr wenig bekannt, so daß sich auch an dieser Stelle synthetisch dargestellte Peptide bewähren könnten.

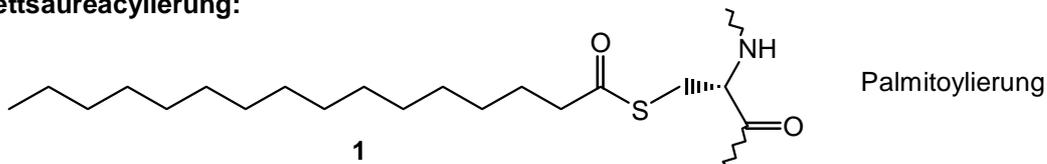
Die angesprochenen viralen und zellulären Prozesse beinhalten Proteine, die durch die kovalente Anknüpfung von Lipiden modifiziert sind. Bei der Untersuchung dieser Abläufe besteht die Aufgabe der organisch-chemischen Synthese darin, den Zugang zu kurzkettigen Peptiden zu erschließen, die relevante Lipidierungen tragen. Allerdings stießen bei der Darstellung dieser Substanzklasse in der Vergangenheit klassisch-chemische Syntheseverfahren des öfteren an ihre Grenzen. Deshalb war zum Aufbau von Lipopeptiden zumeist die gleichzeitige Entwicklung neuer chemoenzymatischer Methoden notwendig.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Lipidmodifizierung viraler und zellulärer Proteine

Die posttranslationale Modifizierung von Thiofunktionen des Cysteins durch die kovalente Verknüpfung mit Lipiden wird sowohl bei viralen als auch bei zellulären Proteinen beobachtet und hat entscheidenden Einfluß auf deren biologische Funktion (Abb. 1).^[5]

Fettsäureacylierung:



Isoprenylierung:

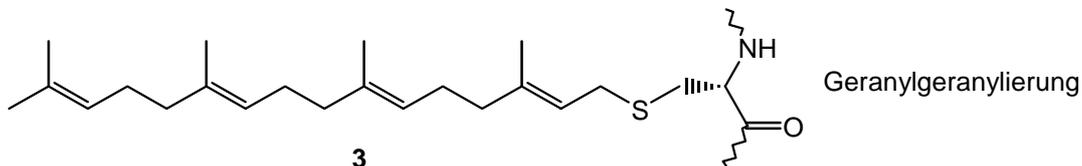
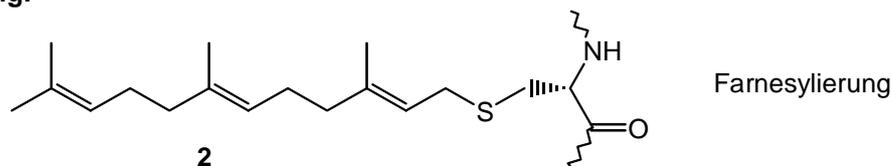


Abb. 1: Lipidmodifizierungen der Thiofunktion des Cysteins

Weit verbreitet ist die Acylierung durch Palmitinsäure (C_{16}) unter Ausbildung eines Thioesters. Die in Zellen eukaryontischer Lebewesen vorkommenden Lipopeptide sind häufig mit Farnesyl (C_{15}) oder Geranylgeranyl (C_{20}) isoprenyliert, die mit der Seitenkettenfunktionalität des Cysteins einen Thioether bilden.

2.1.1. Palmitoylierung viraler Hüllproteine

In die Lipid-Doppelschicht komplexer Viren sind Glycoproteine eingelagert, die zusätzlich Palmitoyl-Reste an den Thiol-Funktionen von Cysteinen nahe der Grenze zwischen Trans-

membran-Bereich und Cytoplasma-Tail tragen.^[6] Der bekannteste Vertreter dieser posttranslational modifizierten Proteine ist das Hämagglutinin des Influenza-A-Virus (Abb. 2).^[7-9]

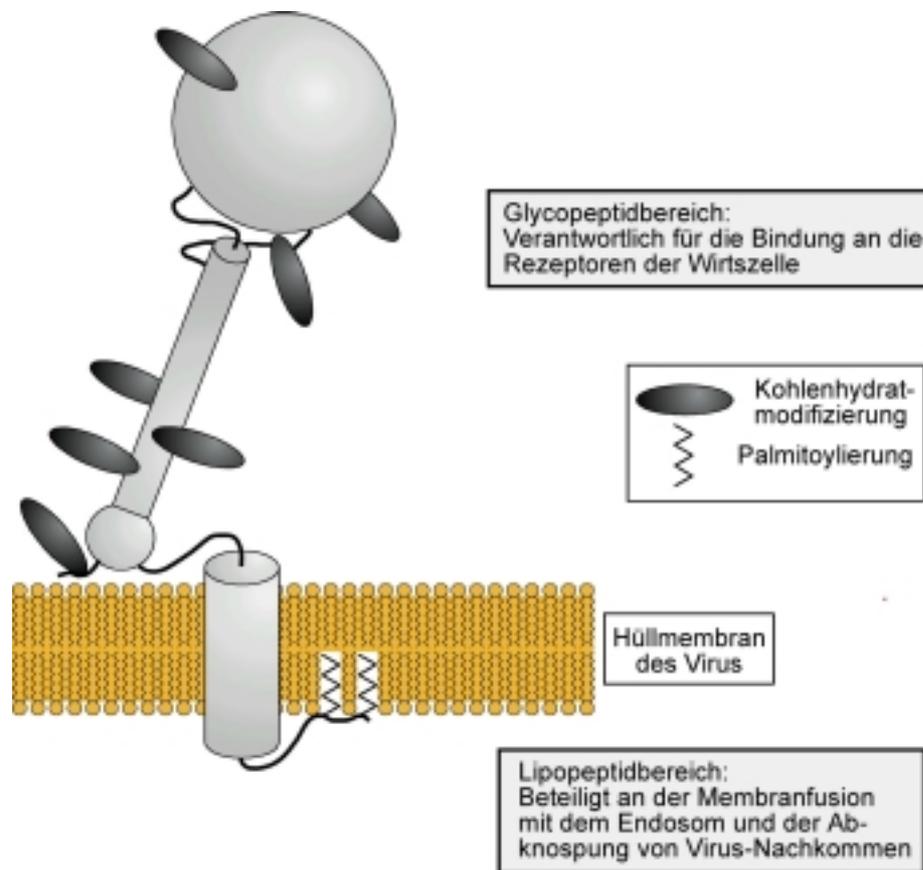


Abb. 2: Schematische Darstellung eines membrangebundenen Hämagglutinin-Monomers

Die außerhalb der Viren-Membran liegenden glycosylierten Anteile leiten durch die selektive Bindung an die Sialinsäure-Rezeptoren der Wirtszelle die Infektion ein.^[10, 11]

Die reversibel als Thioester gebundenen Palmitinsäure-Reste sind ebenfalls an entscheidenden Schritten des äußerst komplexen Prozesses einer Virus-Infektion beteiligt. Beispielsweise sind die Palmitoylierungen nach dem Eintritt des Virus in die Zelle zur Initiierung und Kontrolle von Membran-Fusionen zwischen Virus-Hülle und Endosom notwendig. Darüberhinaus ermöglichen sie die Wechselwirkungen der Zellmembran mit dem freien Capsid bei der Abknospung von Virus-Nachkommen.^[12-14] Da aber die exakte Rolle der Palmitoylierungen bei diesen Prozessen nach wie vor nicht ermittelt ist, sind weiterführende Studien erforderlich. Ebenso besteht Klärungsbedarf bezüglich ihres Beitrags zur Membranaffinität des gesamten Proteins.

Auch zum Ablauf der Fettsäure-Anknüpfung während der Biosynthese der viralen Glycoproteine ist wenig bekannt. Die zum palmitoylierten Cystein benachbarten Aminosäure-Untereinheiten zeigen bei verschiedenen viralen Proteinen keine speziellen Sequenzen, die als „Signal“ für die Acylierung durch eine Palmitoyl-Transferase dienen könnten.^[15] Zudem ist der genaue Ort der Acylierung zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat nicht exakt aufgeklärt. Es konnte lediglich bewiesen werden, daß die Fettsäure-Anbindung nach dem Austritt aus dem ER erfolgt.^[16] Aus diesem Grund wären auch zu diesen Fragestellungen weitere Untersuchungen auf molekularer Ebene nötig.

2.1.2. *Rho*-Seitenweg der *Ras*-Signaltransduktionskaskade

Zelluläre Proteine mit den eingangs beschriebenen Lipidmodifizierungen treten zum Beispiel in der Familie der *Ras*-Proteine auf. Diese bildet allerdings lediglich eine Subfamilie der *Ras*-Superfamilie, zu der aufgrund von Homologien in den Aminosäure-Sequenzen auch die *Rab*- und die *Rho*-Familie zählen.^[17]

Während ihrer Biosynthese enthalten diese Proteine nach der Translation eine C-terminale CAAX-Sequenz, wobei C für Cystein, A für eine aliphatische Aminosäure und X für Serin, Methionin oder Leucin steht. Anschließend wird durch die jeweilige Isoprenyl-Transferase entweder das C₁₅-Isoprenoid Farnesyl oder das C₂₀-Isoprenoid Geranylgeranyl als Thioether angebunden. Danach erfolgt die endoproteolytische Abspaltung des AAX-Motivs und die Methylierung der Carboxylgruppe des modifizierten Cysteins.^[18-20]

Einige dieser Proteine wie *N-Ras* oder *H-Ras* sind zusätzlich durch Thioester-Bildung an Cystein-Seitenketten palmitoyliert.^[21, 22] Demgegenüber stehen beispielsweise *K-Ras* oder *RhoA*, die neben der Isoprenylierung keine Fettsäure-Acylierung, sondern eine Polylysindomäne in sequenzieller Nähe ihres C-Terminus besitzen.^[17, 23]

Die beschriebenen Guanosin-Nukleotid-bindenden Proteine (G Proteine) der *Ras*-Familie sind Elemente einer komplexen Signaltransduktionskaskade, die die Zellteilung und die Zelldifferenzierung steuert. Durch GDP/GTP-Austausch aktiviertes *Ras* tritt mit seinen Effektorproteinen in Wechselwirkung, wodurch über *Raf* und mehrere Kinasen das Signal bis zum Zellkern weitergeleitet wird (Abb. 3). Findet anschließend keine Desaktivierung von *Ras* statt, kann dies zur Transformation der Zelle führen.^[24]

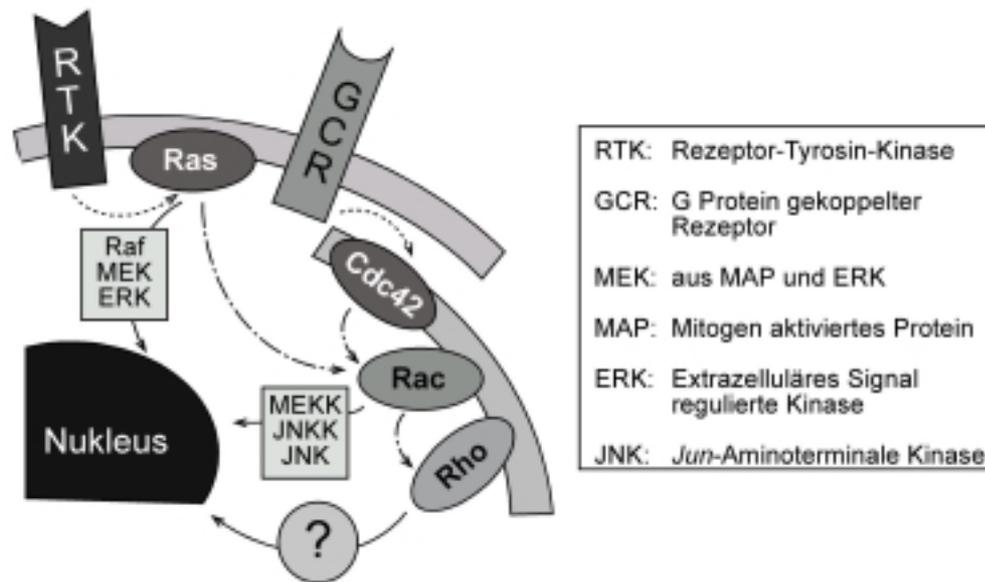


Abb. 3: Ras-Signaltransduktionskaskade mit Seitenwegen zum Zellkern

Neben dem beschriebenen *Raf*/MAP-Kinase-Weg kann die Weiterleitung von Signalen zum Zellkern auch auf Seitenwegen erfolgen. An ihnen sind *Rac*-, *Rho*- und *Cdc42*-Proteine beteiligt, die alle Mitglieder der *Rho*-Familie sind (Abb. 3).^[25] Darüberhinaus fungieren diese Proteine als Schlüsselkomponenten bei der Organisation des Actin-Cytoskeletts.^[26]

Da für die Transformation einer Zelle auch *Rho* dauerhaft aktiviert vorliegen muß,^[27, 28] ist auch dieser Seitenweg für die Erforschung der molekularen Grundlagen Ras-induzierter Malignome von großem Interesse.

Der Funktion der *Rho*-Proteine als molekulare „Schalter“ liegt ebenfalls der Wechsel zwischen einem inaktivierten GDP-bindenden und einem aktivierten GTP-bindenden Zustand zugrunde. In der aktivierten Form ist die Wechselwirkung von *Rho* mit seinen zahlreichen Effektoren möglich. Findet keine Rückführung in die inaktive Form statt, resultiert eine dauerhafte Beeinflussung der Gen-Transkription, die letztendlich die Transformation der Zelle zur Folge haben kann. Die Aufklärung des genauen Mechanismus der Aktivierung und Desaktivierung von *Rho*-Proteinen ist deshalb Gegenstand der aktuellen Forschung.^[29]

Beim Aktivierungsschritt ermöglichen Guanosin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) den Austausch von GDP durch GTP, während bei der Desaktivierung GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Hydrolyse des GTP katalysieren. Beide Prozesse werden von *Rho*-Guanosin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (*Rho*GDI) negativ reguliert. Zudem besitzen *Rho*GDI die Fähigkeit, GDP-bindende *Rho*-Proteine aus zellulären Membranen zu extrahieren.

ren (Abb. 4). Bei dieser Stabilisierung der inaktiven Form spielen Wechselwirkungen mit der Isoprenyl-Modifizierung von *Rho* eine entscheidende Rolle. [30-32]

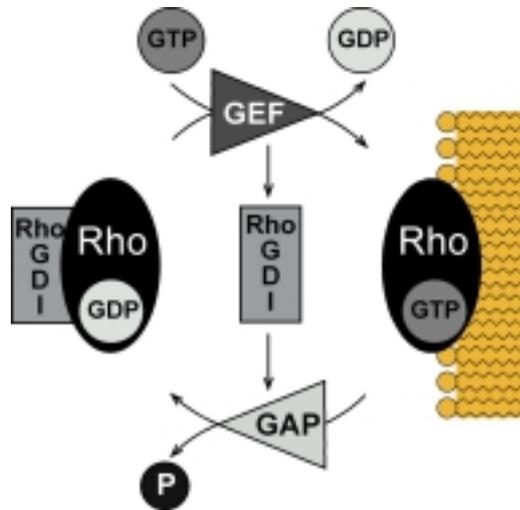


Abb. 4: Einfluß von *RhoGDI* auf die Aktivierung und Desaktivierung von *Rho*

Zum genaueren Verständnis dieses Prozesses sind nicht nur die Wechselwirkung von *RhoGDI* mit der Isoprenylierung von *Rho*, sondern auch mit benachbarten Aminosäureseitenkettenfunktionalitäten interessant. In weiteren Untersuchungen des *RhoGDI*-Einflusses gilt es deshalb den Effekt beider Bindungsstellen zu berücksichtigen.

Doch nicht nur bezüglich der Aktivierung und Desaktivierung von *Rho* gibt es diesen Seitenweg der *Ras*-Kaskade betreffend noch viele offene Fragen.

Es ist bekannt, daß *Rho* einige Enzyme reguliert, die am Phospholipid-Metabolismus beteiligt sind. Dabei handelt es sich um die Phosphoinositid-5-Kinase (PI5K), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Phospholipase D (PLD). Ihre Aufgabe bei der Wachstumskontrolle ist aber nach wie vor unklar. Die Wechselwirkung von *Rho* mit weiteren Effektoren wie der Protein-Kinase N (PKN) und der Serin/Threonin-*Rho*-bindenden-Kinase (ROK) und deren Rolle für die Zell-Proliferation ist ebenfalls noch nicht geklärt.[33, 34] Ausgehend von *Rho* wird zudem ein weiterer Übertragungsweg zum Zellkern mit einem noch unbekanntem MAP-Kinase-Modul, sowie eine synergistische Wirkung mit *Raf* bzw. anderen Elementen des MAP-Kinase-Wegs vermutet. Die Erkenntnisse über diesen Seitenweg der *Ras*-Signaltransduktionskaskade sind folglich noch nicht weit genug fortgeschritten, um gezielt einer Transformation der Zelle entgegenzuwirken.

2.2. Synthese lipidmodifizierter Peptidkonjugate

Da die Verwendung seitenkettenmodifizierter Peptide bereits bei der biologischen Erforschung zellulärer Prozesse wie der Signaltransduktion wichtige neue Erkenntnisse lieferte,^[3, 4] könnten sich synthetisch-chemisch dargestellte Lipopeptide auch als wichtige Hilfsmittel zur Untersuchung der im vorigen Kapitel beschriebenen Problemstellungen erweisen.

Kurzkettige Peptide, die die Palmitoylierungsstellen viraler Hüllproteine enthalten, wären geeignet, um die Membranbindungseigenschaften des Proteins und den Ablauf einzelner Teilschritte der Virusinfektion direkt mit den vorhandenen Fettsäure-Acylierungen zu korrelieren. Ebenso könnte der Einsatz isoprenylierter Peptide, die der C-terminalen Sequenz von *Rho*-Proteinen entsprechen, weiterführende Aussagen über die Wechselwirkungen mit *RhoGDI* und anderen Effektoren liefern.

Diese lipidierten Peptide sind allerdings nicht nur geeignete Werkzeuge zur Untersuchung biologischer oder medizinischer Fragestellungen. Wegen der Labilität dieser Substrate stellt ihre Synthese zudem für die Organische Chemie eine Herausforderung dar. Im Basischen kann eine β -Eliminierung am palmitoylierten Cystein initiiert oder der Thioester direkt hydrolysiert werden. Im Sauren besteht die Gefahr der Addition an die Doppelbindungen der Isoprenylkette (Abb. 5).

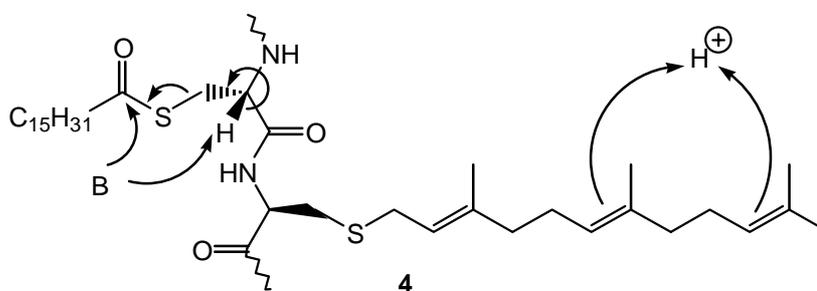
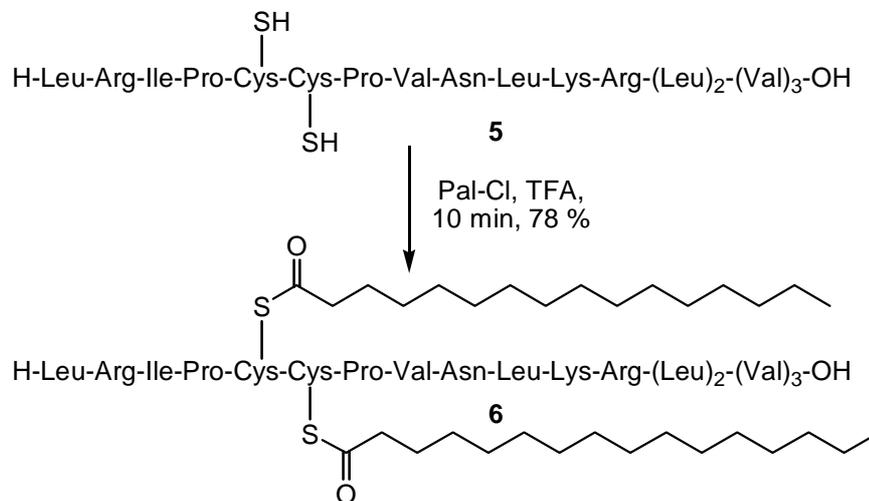


Abb. 5: Säuren- und Basenlabilität von Lipopeptiden (4)

Aus diesem Grund ging die Synthese lipidierten und anderer seitenkettenmodifizierter Peptide zumeist mit der Entwicklung neuer, unter milden Bedingungen entfernbare enzymlabiler Schutzgruppen einher. Im Gegensatz dazu blieben bezüglich der Darstellung von Lipopeptiden Innovationen auf dem Gebiet der Festphasensynthese eher die Ausnahme, so daß sich gerade hier ein weites Feld für die Etablierung neuer Methoden eröffnet.

2.2.1. Anknüpfung der Palmitoyl- und Isoprenyl-Reste bei der Synthese lipidierter Peptide

Bei der Synthese von Lipopeptiden sind für die Einführung von Palmitoylierungen an Thiolseitenkettenfunktionen des Cysteins zwei grundlegend verschiedene Strategien denkbar. Es ist zum einen möglich, eine *S*-Acylierung am vollständig aufgebauten Peptidrückgrat durchzuführen. Zum anderen kann die Fettsäure aber auch schon auf der Dipeptidstufe angeknüpft werden, um danach die Peptidsynthese mit dem bereits palmitoylierten Baustein fortzusetzen. Die erstgenannte Vorgehensweise verlangt die selektive *S*-Entschützung des Peptides, da ansonsten Nebenreaktionen an anderen Seitenkettenfunktionalitäten die Folge wären.^[35] Die Nachteile dieser Methode liegen deshalb in der erforderlichen komplizierten Schutzgruppenstrategie begründet. Ein Vorteil wäre die einfache Darstellung von verschiedenen modifizierten Analoga am einmal synthetisierten Peptidrückgrat. In jüngster Zeit ist allerdings die Anknüpfung von Palmitoyl-Resten am ungeschützten Peptid (**5**) beschrieben worden.^[36] Durch Trifluoressigsäure als Lösungsmittel wird die Nebenreaktion der *N*-Acylierung freier Aminofunktionen zurückgedrängt (Schema 1).



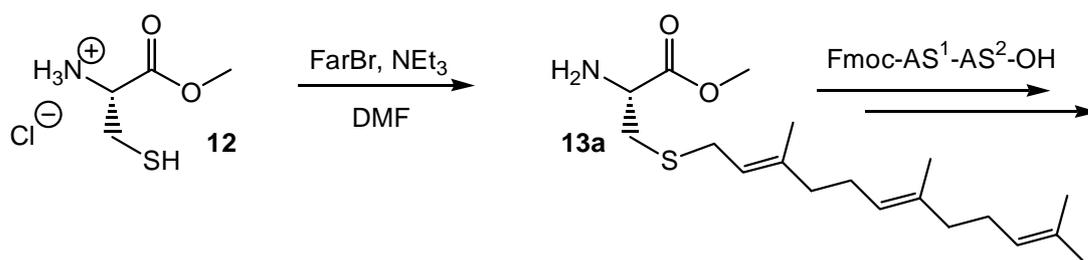
Schema 1: Finale Palmitoylierung am ungeschützten Peptid (**5**)

Dieses Verfahren erfordert jedoch einen großen Überschuss an Palmitoylchlorid. Zudem muß die Reaktionszeit exakt eingehalten werden, da sich ansonsten doch die *N*-acylierten Nebenprodukte bilden.

Bei einer Reihe von Synthesen hat sich hingegen die Methode bewährt, palmitoylierte Dipeptidbausteine (**9**) weiter zum Zielmolekül zu koppeln.^[37, 38] Hierbei müssen zwar auch oft spezielle Schutzgruppenstrategien verwendet werden (siehe Kap. 2.2.2.), doch kann insbesondere

funktionen sind Nebenreaktionen unvermeidlich. So wurde zum Beispiel bei der Synthese des *K-Ras*-C-Terminus (**11**)^[43] während des Farnesylierungsschrittes, eine teilweise *N*-Prenylierung der Lysin-Seitenketten beobachtet (Schema 3).^[44]

Andererseits besteht die Möglichkeit, Isoprenylmodifizierungen am Cystein vor Beginn der Peptidknüpfungen anzubinden.^[45] Dazu ist es im Gegensatz zu den finalen Prenylierungen nicht notwendig, einen Überschuß an Farnesylbromid zu verwenden. Beim Einsatz äquimolarer Mengen verläuft die Thioether-Bildung auch bei freier Aminfunktion selektiv (Schema 4).



Schema 4: Anknüpfung der Farnesylierung an Cystein-methylester (**12**)

Die auf diesem Wege dargestellte modifizierte Aminosäure (**13a**) kann beispielsweise mit der Fmoc-Strategie verlängert werden, ohne den Farnesyl-Rest zu beeinträchtigen.

Allerdings sind häufig auch die weiteren Umsetzungen mit den palmitoylierten oder farnesylierten Bausteinen eine Herausforderung an die Schutzgruppenstrategie. In vielen Fällen wurde aber durch die Etablierung enzymatischer Deblockierungsverfahren eine Lösung gefunden.

2.2.2. Enzymatische Schutzgruppentechniken

Der Einsatz klassisch-chemisch abspaltbarer Schutzgruppen ist bei der Synthese lipidierter Peptidkonjugate aufgrund der angesprochenen Labilitäten der Substrate bezüglich saurem oder basischem Medium starken Beschränkungen unterworfen.

Die Synthese dieser Lipopeptide erfordert deshalb besondere Sorgfalt bei der Wahl der Schutzgruppenstrategie. Es ist zumeist notwendig, klassisch-chemisch abspaltbare mit enzymlabilen Schutzgruppen zu kombinieren, die den Vorteil milder Abspaltungsbedingungen mit hoher Selektivität bei breiter Substrattoleranz verbinden.^[46] Dadurch stehen auch bei labilen Verbindungen mehr Möglichkeiten der selektiven Deblockierung zur Verfügung, so

daß Orthogonalitätsprobleme, die bei ausschließlicher Verwendung klassisch-chemisch entfernbarer Schutzgruppen resultieren, vermieden werden.

Diese Vorzüge führten im Verlauf der letzten Jahre zur Etablierung einer Reihe enzymlabiler Schutzgruppen. Beispiele für die Blockierung des C-Terminus sind die Heptylester^[47] und die Cholinester^[48, 49] sowie die Amid-Schutzgruppe^[50] (Abb. 6).

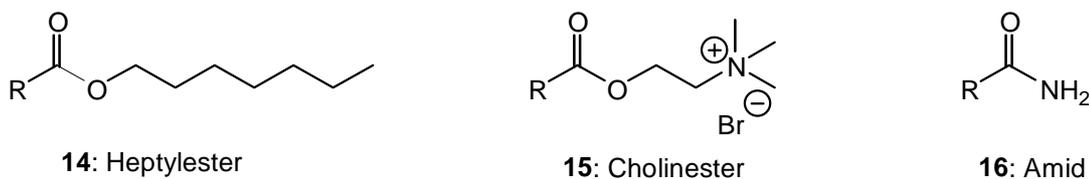


Abb. 6: Enzymlabile Carboxyl-Schutzgruppen

Die enzymatische Heptylesterhydrolyse läßt sich mit Lipasen (z.B. aus *Aspergillus niger*) durchführen. Sie eignet sich zur Darstellung von Phosphopeptiden,^[51] aber aufgrund der verwendeten Biokatalysatoren nicht für die Synthese von Lipopeptiden. Zudem ist die Freisetzung der Carboxylfunktion nicht völlig unabhängig vom sterischen Anspruch der C-terminalen Aminosäure des Substrates.

Die löslichkeitsvermittelnde Cholinester-Schutzgruppe ist durch das Enzym Butyrylcholinesterase spaltbar. Ihre Leistungsfähigkeit zeigte sich bei zahlreichen Synthesen seitenkettenmodifizierter Peptide. Neben der Darstellung eines Glycophosphopeptids^[52] und von Nucleopeptiden^[53] bewährte sie sich auch beim Aufbau von Lipopeptiden.^[38, 54] Dabei wurde in keinem Fall eine Beeinträchtigung des enzymatischen Entschützungs-schrittes durch den sterischen Anspruch der C-terminalen Aminosäure beobachtet. Ein Nachteil dieser Carboxyl-Blockierung ist allerdings der stark hygroskopische und polare Charakter der Cholinester-geschützten Substanzen, der ihre Aufarbeitung in erheblichem Maße erschwert.

Als Amid geschützte Peptide können mit der Peptidamidase freigesetzt werden. Es ergeben sich allerdings Probleme bei der Entschützung von Peptiden mit C-terminalem Prolin. Wegen dessen cyclischer Struktur sind diese Verbindungen keine Substrate für das verwendete Enzym, wodurch eine Deblockierung ausgeschlossen ist.

Auch zur Blockierung von Aminofunktionen existieren enzymlabile Schutzgruppen. Beispiele für Urethan-Schutzgruppen sind die *para*-Acetoxybenzyloxycarbonyl-(AcOZ-) (**17a**) und die *para*-Phenylacetoxybenzyloxycarbonyl-(PhAcOZ-) Schutzgruppe (**17b**). (Abb. 7) Erstere läßt sich mit der Acetylerase aus Orangen oder durch Lipasen (z.B. aus *Mucor miehei*), letztere durch den Einsatz der Penicillin-G-Acylase entfernen. Die Leistungsfähigkeit der AcOZ-Gruppe belegte die Darstellung des C-terminalen Lipohexapeptids des menschlichen N-Ras-

Proteins.^[37, 55] Die PhAcOZ-Gruppe bewährte sich bei der Synthese eines Phosphodiglycohexapeptids der RNA-Polymerase II.^[56, 57]

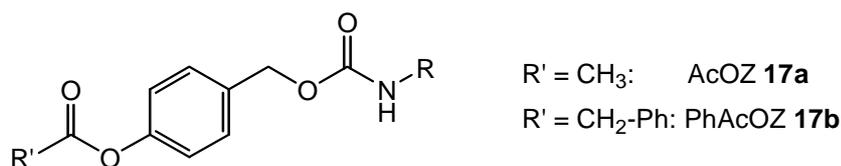


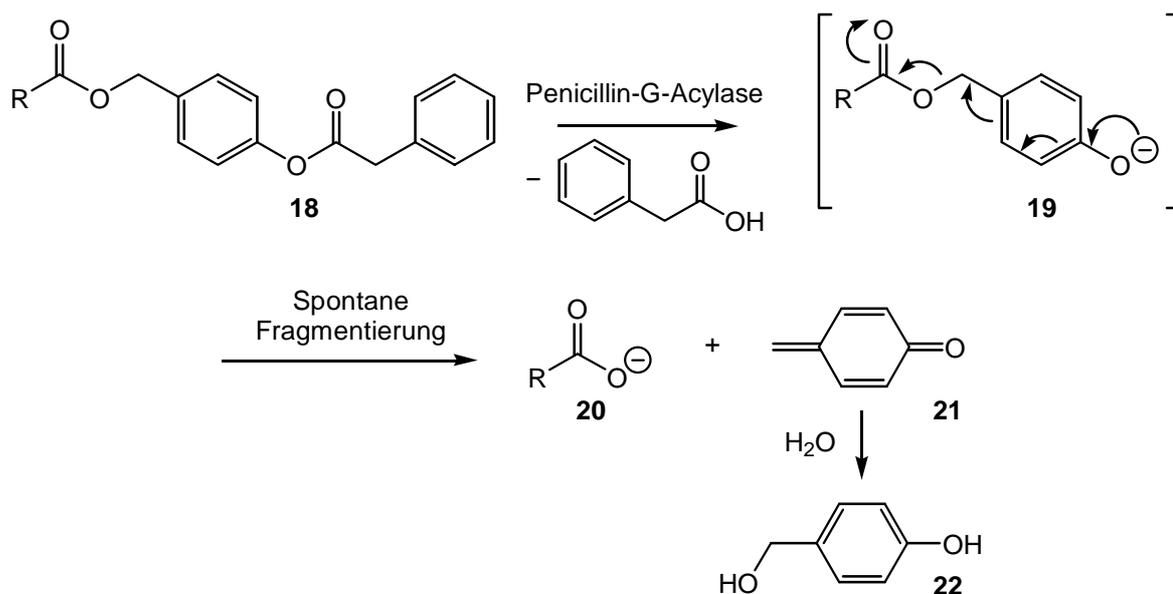
Abb. 7: Die AcOZ- (**17a**) und die PhAcOZ (**17b**)-Urethanschutzgruppe

Beiden Schutzgruppen liegt die gleiche Abspaltungsstrategie zugrunde. Eine vom jeweiligen Enzym erkennbare Gruppe (Acetyl oder Phenylacetyl) ist durch eine Spacergruppe von der Anbindungsstelle am N-Terminus des Peptids getrennt. Nach erfolgter enzymatischer Hydrolyse fragmentiert dieser Spacer spontan, wodurch unter Abspaltung von Kohlendioxid das Amin freigesetzt wird. Dieses Prinzip wurde ursprünglich für die Entschützung der AcOZ-Gruppe mit Basen wie zum Beispiel flüssigem Ammoniak eingeführt.^[58] Diese recht drastischen Bedingungen können durch die Verwendung von Enzymen vermieden werden, so daß der Deblockierungsschritt bei nahezu neutralem pH-Wert abläuft.

Mit dem Ziel eine enzymlabile Carboxyl-Schutzgruppe zu entwickeln, die sich für die Synthese lipidierter Peptide eignet, wurde der Abspaltungsmechanismus der PhAcOZ-Blockierung aufgegriffen. Übertragen auf den C-Terminus resultierte die *para*-Phenylacetoxymethyl-ester (PAOB-Ester)-Schutzgruppe, die sich unter milden Bedingungen (pH = 7, Raumtemperatur) mit Penicillin-G-Acylase entfernen läßt.^[59]

Grundlegende Voraussetzung für die einstufige Freisetzung der Carboxylfunktion (**20**) ist die spontane Fragmentierung des Oxybenzylesters (**19**) (Schema 5). Im Gegensatz zum Zerfall der Oxybenzylurethane bei der bekannten AcOZ- oder PhAcOZ-Entschützung tritt hier keine Steigerung der Triebkraft durch die Abspaltung von CO₂ auf. Diese unmittelbare Eliminierung der Spacergruppe unter milden Bedingungen ist somit eine wichtige Erkenntnis, die mit der Entwicklung der PAOB-Ester-Schutzgruppe einhergeht (Schema 5).

Das sich bildende Chinomethid (**21**) wird effektiv durch Wasser abgefangen, so daß der Zusatz nukleophiler Abfangreagenzien vermieden werden kann. Im Gegensatz zu den Cholinestern treten bei der Aufarbeitung PAOB-Ester-geschützter Substanzen keine Probleme auf. Die Wirksamkeit des Spacerkonzepts, das eine vom sterischen Anspruch der C-terminalen Aminosäure unabhängige Abspaltung garantieren soll, deutete sich bereits bei der Entschützung einiger Modelldipeptide an. Diese Vorzüge bestätigten das Vorhaben, die enzymlabilen PAOB-Ester in der Synthese von Lipopeptiden einzusetzen.

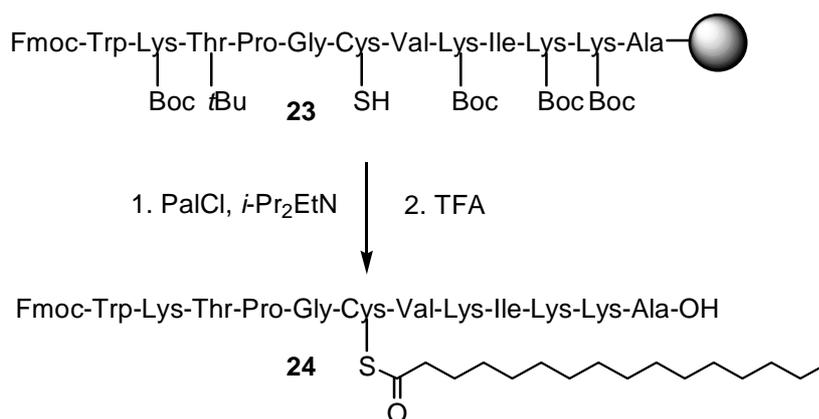


Schema 5: Abspaltungsprinzip der PAOB-Ester-Schutzgruppe

2.2.3. Synthese seitenkettenmodifizierter Peptide an der festen Phase

Die Synthese von Peptiden am polymeren Träger wurde in den sechziger Jahren von R.B. Merrifield eingeführt^[60] und hat sich in den darauffolgenden Jahrzehnten als Standardmethode für den Aufbau peptidischer Strukturen bewährt.^[61] Dabei waren vor allem die leichte Abtrennung der Reagenzien von den am Harz fixierten Zwischenprodukten und die Automatisierung der Entschützungs- und Kupplungsverfahren Grundlagen für ihren Durchbruch. Dies führte in den vergangenen Jahren auch zur Darstellung seitenkettenmodifizierter Peptide an der festen Phase. So konnten Synthesen von Glyco-^[62-68] und von Phosphopeptiden^[69-72] am polymeren Träger realisiert werden.

Im Gegensatz dazu ist die Darstellung lipidiertter Peptide an fester Phase noch kaum genutzt worden. Der lineare Aufbau palmitoylierter Peptide durch Anknüpfung von bereits *S*-acyliertem Cystein wäre wegen des *S*-*N*-Acyl-Shifts nach der *N*-terminalen Entschützung auch nicht praktikabel. Bekannt ist bisher lediglich die Einführung eines Palmitoyl-Restes in einem finalen Acylierungsschritt.^[73, 74] Nach der Bildung des Thioesters kann das lipidmodifizierte Peptid (**24**) mit Trifluoressigsäure in zufriedenstellender Ausbeute und hoher Reinheit vom polymeren Träger freigesetzt werden (Schema 6).



Schema 6: Anknüpfung eines Palmitoyl-Restes an fester Phase

Trotzdem existiert bezüglich der Festphasenpalmitoylierung erhebliches Entwicklungspotential, da beispielsweise für mehrfach acylierte Peptide noch keine polymergestützten Synthesen durchgeführt wurden.

Für die Anknüpfung von Isoprenyl-Resten an fester Phase gibt es bisher noch kein Beispiel. Bei Synthesen farnesylierter Peptide, die sich eines polymeren Trägers bedienen, wurde zwar das Peptidrückgrat an der festen Phase aufgebaut, das Isoprenoid aber immer erst nach der Abspaltung vom Harz angeknüpft. Die Etablierung einer Methode zur Einführung der Isoprenylmodifizierungen an polymergebundenen Peptiden würde deshalb die Vorzüge der Festphasensynthese erstmals für die Darstellung dieser Substanzklasse nutzen.

Bei der Synthese lipidiert Peptide am polymeren Träger müßte neben der Schutzgruppenstrategie auch die zur Anbindung an das Harz benutzte Ankergruppe auf alle vorliegenden Labilitäten abgestimmt werden. Gerade für die Darstellung von Peptiden sind eine Vielzahl von Linkern bekannt, die die C-terminale Anknüpfung von Aminosäuren erlauben und die sich unter verschiedensten Bedingungen spalten lassen.^[75]

In vielen Fällen werden säurelabile Linker für die Peptidsynthese eingesetzt. Durch den Aufbau immer labilerer Substrate auch an der festen Phase führte die Entwicklung hin zu Ankergruppen, von denen sich schon im sehr verdünnten sauren Milieu die Zielmoleküle ablösen lassen. Während für die Spaltung des Hydroxymethylpolystyrol-Linkers (25) (Merrifield-Linker) Fluorwasserstoff^[76] oder Mischungen von Bromwasserstoffsäure und Trifluoressigsäure^[77] benötigt werden, ermöglicht beispielsweise der Sasrin-Linker (26) schon mit 1-3 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid die Freisetzung der Produkte (Abb. 8).^[78]

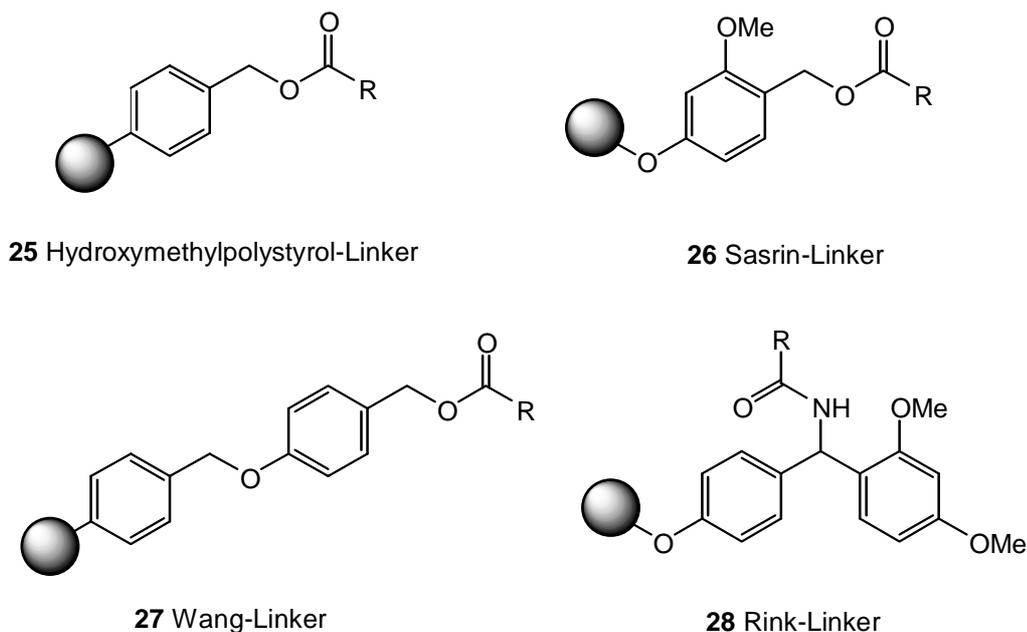
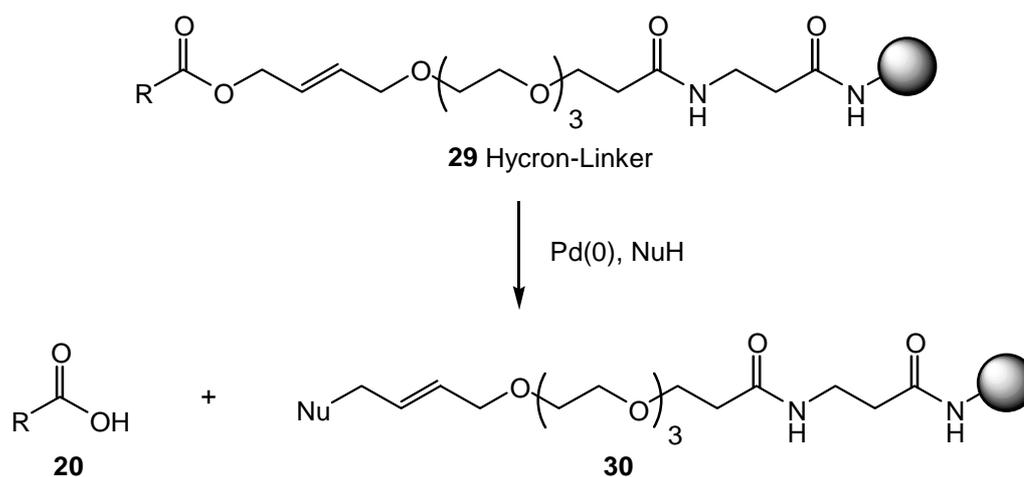


Abb. 8: Säurelabile Ankergruppen für die Festphasenpeptidsynthese

Da aber zumeist eine gewisse Säurestabilität der Ankergruppe erforderlich ist, werden der Wang-Linker (**27**)^[79] und der Rink-Linker (**28**)^[80] häufig in Peptidsynthesen eingesetzt. Beim erstgenannten gelingt die Spaltung mit 50 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid, beim zweitgenannten sind 20 % ausreichend. Beide zeigten auch in Synthesen seitenkettenmodifizierter Peptide ihre Leistungsfähigkeit. Der Wang-Linker bewährte sich beim Aufbau von Phosphopeptiden^[69], mit dem Rink-Linker wurden Glycopeptide dargestellt.^[63-68]

Säurelabile Ankergruppen würden sich prinzipiell auch für die Festphasensynthese lipidierter Peptide eignen. Bei isoprenylierten Zielmolekülen könnten allerdings Linker, deren Spaltung hohe Säurekonzentrationen erfordern, nicht verwendet werden.

Eine Linkergruppierung, die unter extrem milden Bedingungen die Freisetzung der angebundenen Produkte erlaubt und die zusätzlich orthogonal stabil zu gebräuchlichen Schutzgruppen wie Boc oder Fmoc ist, wurde mit der Entwicklung des Hycron-Linkers (**29**) geschaffen. Diese vom Allylester abgeleitete Ankergruppe kann mittels Palladium-katalysiertem Allyltransfer gespalten werden (Schema 7).^[62]



Schema 7: Spaltungsprinzip des Hycron-Linkers (29)

Der Hycron-Linker bewährte sich bei der Festphasensynthese von Glycopeptiden. Wegen der milden Abspaltungsbedingungen vom Harz ist sein Einsatz auch für den Aufbau anderer seitenkettenmodifizierter Peptide denkbar. Unter anderem könnte die Darstellung von Lipopeptiden ermöglicht werden, da die palladiumkatalysierte Freisetzung der Produkte weder die säurelabile Isoprenylierung noch die basenlabile Fettsäureacylierung am Cystein beeinträchtigen sollte.

Alle bisher diskutierten Linkersysteme liefern die synthetisierten Peptide lediglich mit ihrer freien Carboxylfunktion. Besonders für eine Festphasensynthese carboxymethylierter Lipopeptide wäre es von entscheidendem Vorteil, eine Ankergruppe zu benutzen, mit der durch den Abspaltungsschritt direkt der Methylester am Produkt eingeführt wird. Bei Etablierung einer Methode für die Isoprenylierung an der festen Phase könnten dadurch lipidierte Peptide, die C-terminalen Sequenzen von *Ras*-Proteinen entsprechen, vollständig am polymeren Träger aufgebaut werden, ohne daß ein nachgeschalteter Reaktionsschritt in Lösung benötigt würde.

2.3. Biologische Studien mit lipidmodifizierten Peptiden

Durch synthetisch-chemische Methoden zugängliche lipidierte Peptide konnten bereits in zahlreichen biologischen Studien neue Aufschlüsse über die Rolle und Funktionsweise der Seitenkettenmodifizierungen von Lipoproteinen liefern. Dabei standen Untersuchungen zur *Ras*-Signaltransduktionskaskade im Mittelpunkt des Interesses.

2.3.1. Biophysikalische Messungen

In biophysikalischen Experimenten gelang die Bestimmung des Einflusses der Lipidmodifizierungen und der Aminosäuresequenz auf die Membranbindungseigenschaften der verwendeten Lipopeptide.^[81]

Als Modellmembranen wurden bei diesen Untersuchungen synthetische Lipidvesikel aus Phosphatidylcholin (**31a**) und Phosphatidylethanolamin (**31b**) benutzt. Die lipidierten Peptidkonjugate mußten mit einem Fluoreszenzmarker versehen vorliegen, um ihre Detektion innerhalb des Testsystems zu gewährleisten. Dafür erwies sich beispielsweise die Bimanylgruppe (**32**) als vorteilhaft, da sie durch ihre kompakte Struktur nur wenig Einfluß auf die Membrangängigkeit des Lipopeptids ausübt (Abb. 9).

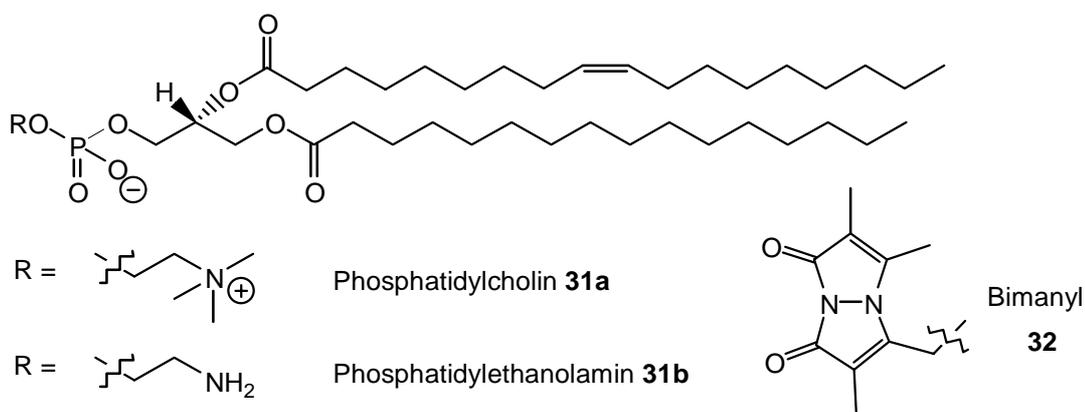


Abb. 9: Struktur der Vesikel-Lipide (**31**) und des Fluoreszenzmarkers Bimanyl (**32**)

Da die Fluoreszenz der Bimanylgruppe in der hydrophoben Umgebung der Vesikel wesentlich höher ist als im umgebenden wäßrigen Medium, war es möglich, bei Zugabe weiterer Vesikel eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Es zeigte sich, daß eine einzelne Lipidmodifizierung ausreicht, um die markierten Peptide in der Modellmembran zu binden. Über den Austausch der einfach lipidierten Substrate zwischen den Vesikeln konnte mit dieser Versuchsanordnung aber noch keine Aussage getroffen werden.

Deshalb wurden in einem veränderten Testsystem Vesikel eingesetzt, die neben dem fluoreszenzmarkierten Peptidkonjugat auch den dazugehörenden Fluoreszenzquencher beinhalten.^[82] Durch die Zugabe unbeladener Akzeptorvesikel konnte bei einfach lipidierten Peptiden ein rascher Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 10).

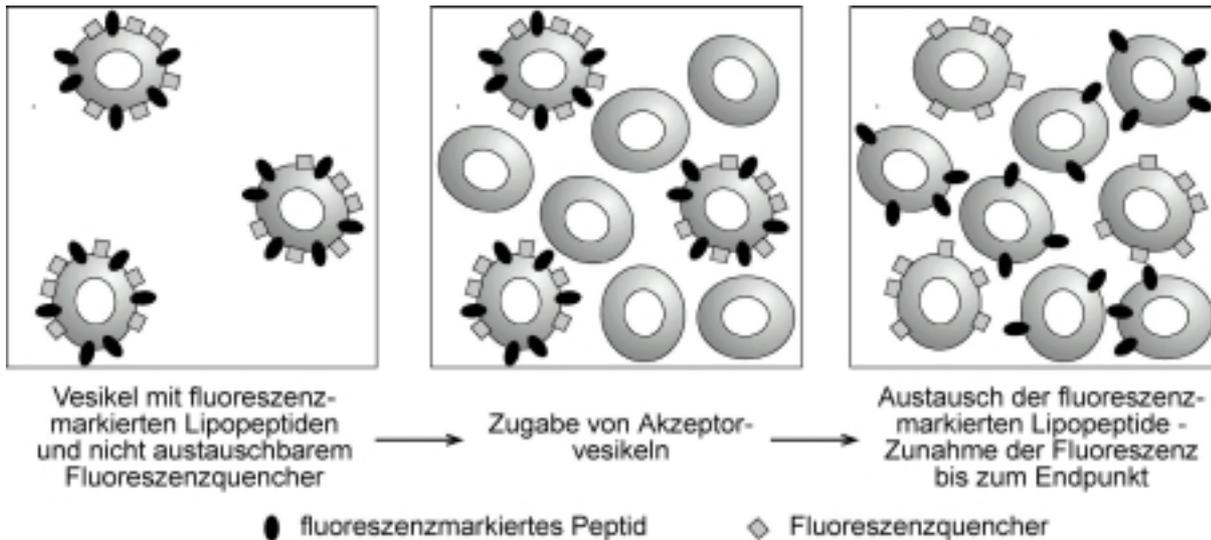


Abb. 10: Prinzip der Vesikelaustauschexperimente zur Bestimmung kinetischer Parameter

Dadurch wurde gezeigt, daß eine einzige Lipidierung die Hydrophobizität der Peptide nicht in dem Maße erhöht, daß eine dauerhafte Membraninsertion resultiert. Die gemessenen Halbwertszeiten für den Austausch lagen lediglich in der Größenordnung von Sekunden. Wurden hingegen doppelt lipidmodifizierte Peptide eingesetzt, wuchs dieser kinetische Parameter drastisch an und befand sich in der Größenordnung mehrerer Stunden oder sogar Tage. Daraus ließ sich eine stabile Membraninsertion der zweifach modifizierten Verbindungen ableiten.^[83]

Unter den eingesetzten Lipopeptiden entsprachen viele C-terminalen Sequenzen von *Ras*-Proteinen mit einer Farnesylierung und einer Palmitoylierung. Die für die kurzkettigen Konjugate erhaltenen Ergebnisse wurden deshalb auf das Membranbindungsverhalten dieser Protein-Familie übertragen. Zusammen mit den biophysikalischen Daten lipidmodifizierter Makromoleküle^[84] konnte damit ein Modell für die Bindungseigenschaften von Lipoproteinen entwickelt werden.^[85]

Dieses besagt, daß die Anknüpfung eines Lipidrestes (im Falle der *Ras*-Proteine des Farnesyl-Restes) zwar die Membrangängigkeit ermöglicht aber noch nicht für eine feste Lokalisierung ausreicht, so daß eine Diffusion zwischen verschiedenen Membranen in der Zelle nach wie vor stattfinden kann. Erst nach der Einführung der zweiten Lipidmodifizierung (im Falle der *Ras*-Proteine der Fettsäure-Acylierung) bleibt das Protein stabil in der Membran verankert.

Eine rasche Desorption könnte dann nur noch durch die Spaltung des Thioesters und der damit verbundenen Ablösung des Palmitoyl-Restes erreicht werden.

Neben der Entwicklung dieses Modells können durch biophysikalische Experimente auch Aussagen über den Einfluß verschiedener Lipidreste auf die Membranaffinität getroffen werden. Es zeigt sich, daß ein Geranylgeranyl-Rest eine wesentlich stärkere Membranbindung verursacht als der Farnesyl-Rest. Gleiches gilt für den Palmitoyl-Rest im Vergleich zu seinem C₁₄-Analogon, dem Myristoyl-Rest. Darüber hinaus erhöht die C-terminale Carboxymethylierung die Membrangängigkeit der Peptide in erheblichem Maße.

Durch biophysikalische Messungen mit kurzkettigen lipidierten Peptiden der C-Termini von *Ras*-Proteinen wurden somit wichtige Informationen über die Membranbindungseigenschaften des gesamten Proteins gewonnen.

2.3.2. Zellbiologische Untersuchungen

Die Unterschiede zwischen einfach und doppelt lipidierten Peptiden wurden auch anhand von Mikroinjektionsstudien untersucht. Zu diesem Zweck wurden das farnesylierte Pentapeptid sowie das palmitoylierte und farnesylierte Heptapeptid des N-*Ras*-Proteins mit dem Fluoreszenzmarker *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaprinsäure (NBDac-OH) verknüpft und in NIH-3T3-Fibroblasten-Zellen injiziert.^[86] Mittels konfokaler Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie ließ sich feststellen, daß sich nur das doppelt lipidierte Heptapeptid in die Plasma-Membran dieser Zellen einlagert.

In weiterführenden Experimenten konnten *in vivo*-Palmitoylierungen an synthetisch dargestellten Peptiden durchgeführt werden.^[83] ^[86] Das NBD-markierte C-terminale Heptapeptid des N-*Ras*-Proteins wurde zu diesem Zweck unpalmitoyliert mit freier Thiolfunktion am entsprechenden Cystein dargestellt. Nach seiner Einführung in Fibroblasten-Zellen wurde es am freien Cystein *S*-palmitoyliert, wodurch sich eine höhere Fluoreszenzintensität an der Zellmembran ergab. Für einen Kontrollversuch diente ein ebenfalls synthetisch-chemisch aufgebautes Analogon, das statt des Cysteins ein Serin mit freier Hydroxyfunktion enthielt. In diesem Fall konnte keine *in vivo*-Palmitoylierung des Heptapeptids und dadurch auch keine Fluoreszenzanreicherung in Membrannähe beobachtet werden.

Diese zellbiologischen Studien belegen das zuvor dargelegte Modell. Eine Lipidierung (bei N-*Ras* die Farnesylierung) reicht zwar aus, um Peptide und Proteine an der Membran anzulagern, ihre Verankerung erfordert aber die zusätzliche Anknüpfung des Palmitoyl-Restes. Da

Diese *in vitro*-Kupplungsmethode eröffnet den Zugang zu Protein-Peptid-Konjugaten in zufriedenstellender Ausbeute im Milligrammbereich. Ebenso ist es durch die Miteinbeziehung chemischer Methoden möglich, auch unnatürliche Lipid-Reste einzuführen.

Der Nachteil, mit dem MIC-Linker ein zusätzliches Strukturelement im Peptidrückgrat eingebracht zu haben, machte sich allerdings bei den anschließenden mikrobiologischen Untersuchungen der Protein-Peptid-Konjugate (**34**) nicht bemerkbar. Sie zeigten sowohl eine hohe Membranaffinität als auch die Fähigkeit *Raf*-Proteine zu erkennen und an sie zu binden. Darüberhinaus konnte in Mikroinjektionsstudien mit den Konjugaten die gleiche Zellantwort gefunden werden, die auch das natürliche Protein erzeugt. Durch die Verschmelzung von synthetischen Methoden der organischen Chemie und von Methoden der Molekularbiologie wurde damit ein Verfahren entwickelt, das neuartige Proteinkonstrukte, die das gesamte Lipidierungsmuster in natürlicher oder modifizierter Form enthalten, in ausreichend großer Menge zur Verfügung stellt.

3. Ziel der Arbeit

Von den Ergebnissen bei der Erforschung von Signaltransduktionskaskaden inspiriert, war im Rahmen dieser Arbeit die Synthese von lipidierten Peptiden geplant, die beim Einsatz in biophysikalischen und biologischen Experimenten neue Einblicke in die Membranbindung viraler Hüllproteine, aber auch weitergehende Erkenntnisse bezüglich der *Ras*-Kaskade und deren Seitenwegen liefern sollten. Die Darstellung dieser seitenkettenmodifizierten Peptide sollte zudem der Entwicklung neuer organisch-chemischer Methoden auf dem Gebiet der enzymlabilen Schutzgruppen und der Festphasensynthese dienen.

Erstes Ziel dieser Arbeit sollte der Aufbau der doppelt palmitoylierten C-terminalen Heptapeptidsequenz des Influenza-A-Virus sein (Abb. 11).

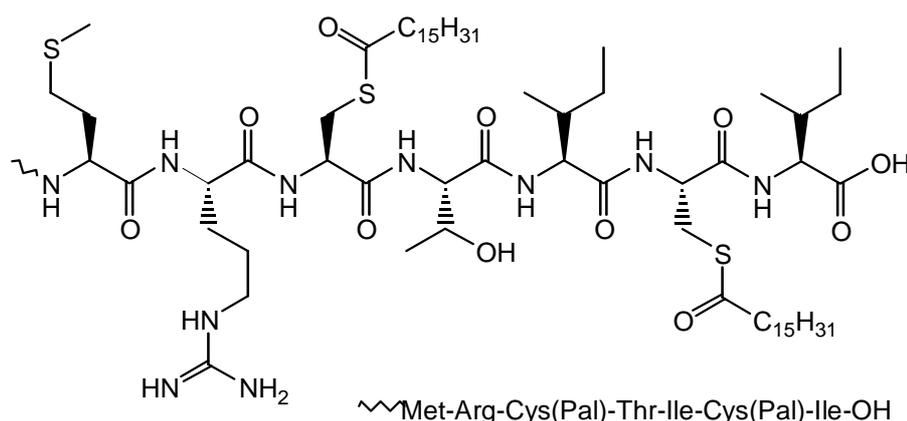


Abb. 11: C-terminale Heptapeptidsequenz des Influenza-A-Virus-Hämagglutinins

Wegen der Fettsäureacylierung der Cysteine liegen labile Thioesterfunktionen im Zielmolekül vor. Es ist deshalb erforderlich, enzymatisch unter milden Bedingungen entfernbare Schutzgruppen zu verwenden, um auftretende Orthogonalitätsprobleme ohne Beeinträchtigung der Modifizierungen zu lösen. Aus diesem Grund sollte bei der Synthese die mittels Penicillin-G-Acylase abspaltbare *para*-Phenylacetoxycarbonyl (PAOB-Ester)-Gruppe zum Einsatz gelangen. Zuerst mußten aber noch Deblockierungsstudien an Modelldipeptiden abgeschlossen werden, um dann die volle Leistungsfähigkeit dieser Schutzgruppentechnik bei der Darstellung des Lipoheptapeptids demonstrieren zu können.

Dieses doppelt palmitoylierte Peptid sollte an seinem N-Terminus mit einem Fluoreszenzmarker versehen werden, um es in biophysikalischen Vesikelaustausch-Experimenten zu ver-

folgen. Dabei sollte der Beitrag der Fettsäure-Reste zur Membranaffinität des Hämagglutinin-C-Terminus untersucht werden.

Für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit war die Synthese des C-terminalen geranylgeranylerten und carboxymethylierten Heptapeptids des *RhoA*-Proteins geplant (Abb. 12).

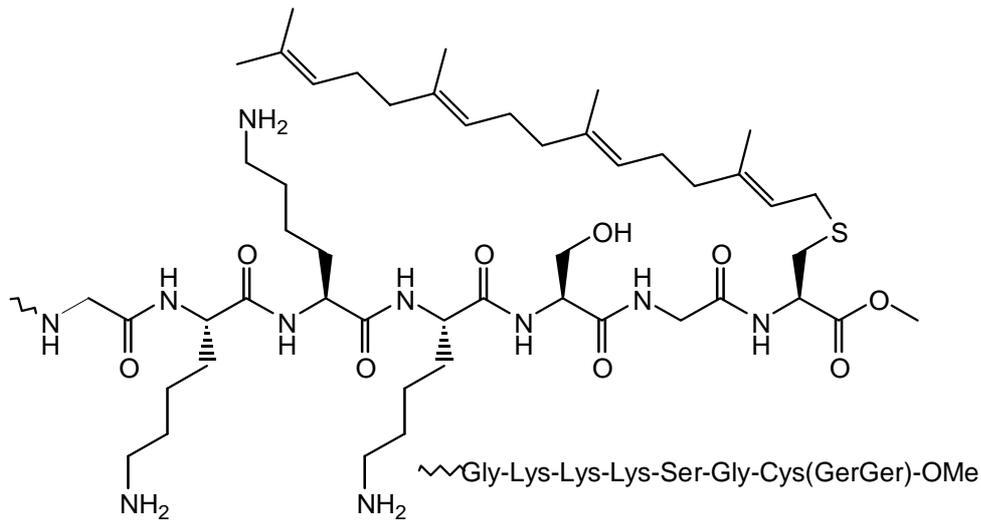


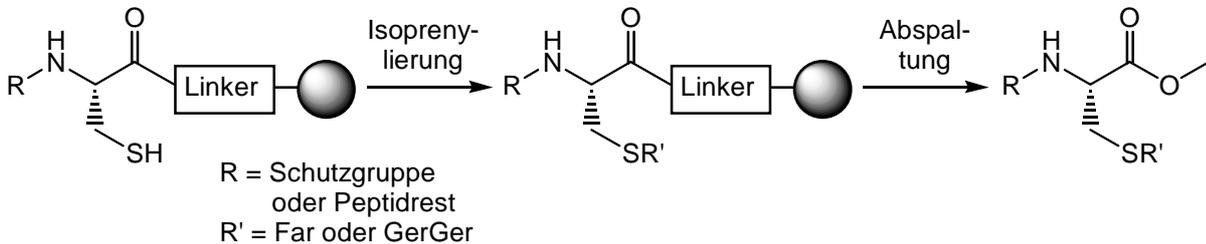
Abb. 12: C-terminale Sequenz des *RhoA*-Proteins

An den N-Terminus des synthetisierten Heptapeptids sollte ein Fluoreszenzmarker angeknüpft werden, um in biologischen Tests seine Wechselwirkung mit Effektorproteinen von *RhoA* zu untersuchen. Ferner war geplant, den Einfluß sowohl der Isoprenylmodifizierung als auch der Lysin-Domäne bei der Wechselwirkung dieses Proteins mit *RhoGDI* zu bestimmen. Zu diesem Zweck sollte eine Cokristallisation mit *RhoGDI* durchgeführt werden. Dadurch könnten weiterführende Erkenntnisse über dessen Einfluß beim Aktivierungsprozeß von *Rho*, der eine zentrale Stufe dieses Seitenweges der *Ras*-Kaskade darstellt, gewonnen werden.

Beide bisher vorgestellten Projekte sollten durch eine Peptidsynthese in Lösung realisiert werden. Für die Darstellung lipidierter Peptide an der festen Phase existieren hingegen noch kaum Methoden. Im Besonderen ist für die Anknüpfung von Isoprenoiden an polymergebundenem Cystein noch kein Verfahren bekannt. Zusätzlich ist die Synthese C-terminaler Sequenzen von Proteinen der *Ras*-Familie durch den C-terminalen Methyl ester erschwert, da die meisten gebräuchlichen Linker die Zielpeptide nach deren Freisetzung mit freier Carboxylfunktion liefern.

Deshalb war im dritten Abschnitt dieser Arbeit die Entwicklung einer grundlegenden Strategie für die Synthese isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide am polymeren Träger

geplant. Dabei galt es zum einen eine Methode zur Isoprenylierung an fester Phase zu etablieren. Zum anderen sollte ein Linkersystem gefunden werden, mit dem es möglich ist, den C-terminalen Methylester im Abspaltungsschritt einzuführen (Schema 9).



Schema 9: Prinzip einer Festphasensynthese isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide

Dieses neuentwickelte Verfahren sollte dann in der Festphasensynthese des C-terminalen K-Ras-Undecapeptids Anwendung finden (Abb. 13).

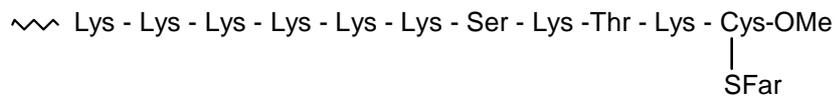


Abb. 13: C-terminale Undecapeptidsequenz des K-Ras-Proteins

Mit diesem Peptid hätte man ein nützliches Werkzeug für die Klärung der Membranbindungseigenschaften von K-Ras zur Hand. Dabei gilt der Rolle des Isoprenyl-Restes und der ausgedehnten Lysin-Domäne besonderes Interesse.

4. Spezieller Teil

4.1. Chemoenzymatische Synthese der fluoreszenzmarkierten C-terminalen zweifach palmitoylierten Heptapeptidsequenz des Influenza-A-Hämagglutinins

4.1.1. Enzymatische Abspaltung der PAOB-Ester-Schutzgruppe an Modelldipeptiden

Im Rahmen vorangegangener Arbeiten wurde anhand von drei Modelldipeptiden die Abspaltung der C-terminalen *para*-Phenylacetoxybenzyl-(PAOB-)Ester untersucht.^[59]

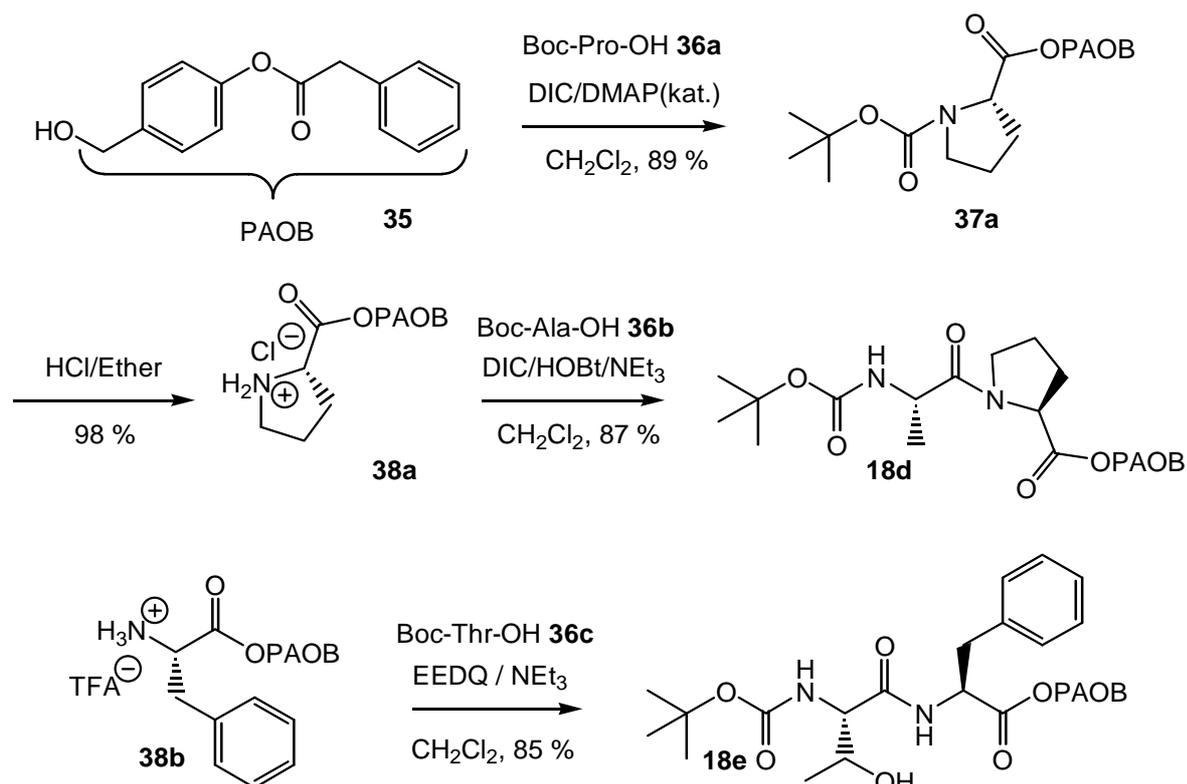
Bei der Darstellung der Substrate Aloc-Val-Ala-OPAOb (**18a**), Boc-Ser-Ile-OPAOb (**18b**) und Aloc-Val-Phe-OPAOb (**18c**) zeigte sich die leichte Einführbarkeit der Schutzgruppe mittels Steglich-Veresterung^[88, 89] sowie ihre Stabilität bezüglich gängigen Verfahren der Peptidknüpfung wie der Carbodiimid/HOBt-Methode^[90, 91] und der Mischanhydrid-Methode mit EEDQ.^[92] Die enzymatischen Deblockierungen mit Penicillin-G-Acylase bei milden Bedingungen (pH = 7, Raumtemperatur) konnten die erfolgreiche Anwendung des Schutzgruppenkonzepts aus biokatalysierter Esterhydrolyse und anschließender spontaner Fragmentierung der Spacer-Gruppe am C-Terminus demonstrieren.

Diese Spacer-Gruppe garantierte bei den Dipeptiden (**18a**) und (**18b**) eine vom sterischen Anspruch der C-terminalen Aminosäure unabhängige Abspaltung mit hoher Ausbeute. Das für diese Abspaltungen verwendete Reaktionsmedium (0.05 M Phosphatpuffer mit 10 % Methanol) schied allerdings für die Umsetzung von Edukt (**18c**) wegen Löslichkeitsproblemen aus. Gemische mit Aceton oder DMF als Cosolvens ermöglichten jedoch die Deblockierung der Carboxylfunktion des Phenylalanins, wenn auch mit wesentlich geringerer Ausbeute als im Falle der beiden anderen Modellpeptide.

Aus diesem Grund war bisher keine genauere Aussage über den Einfluß des sterischen Anspruchs der C-terminalen Aminosäure auf die Abspaltungsrate des PAOB-Esters möglich, da für die niedrige Ausbeute beim Substrat (**18c**) sowohl das voluminöse Phenylalanin als auch die Löslichkeitseigenschaften des gesamten Moleküls verantwortlich sein konnten.

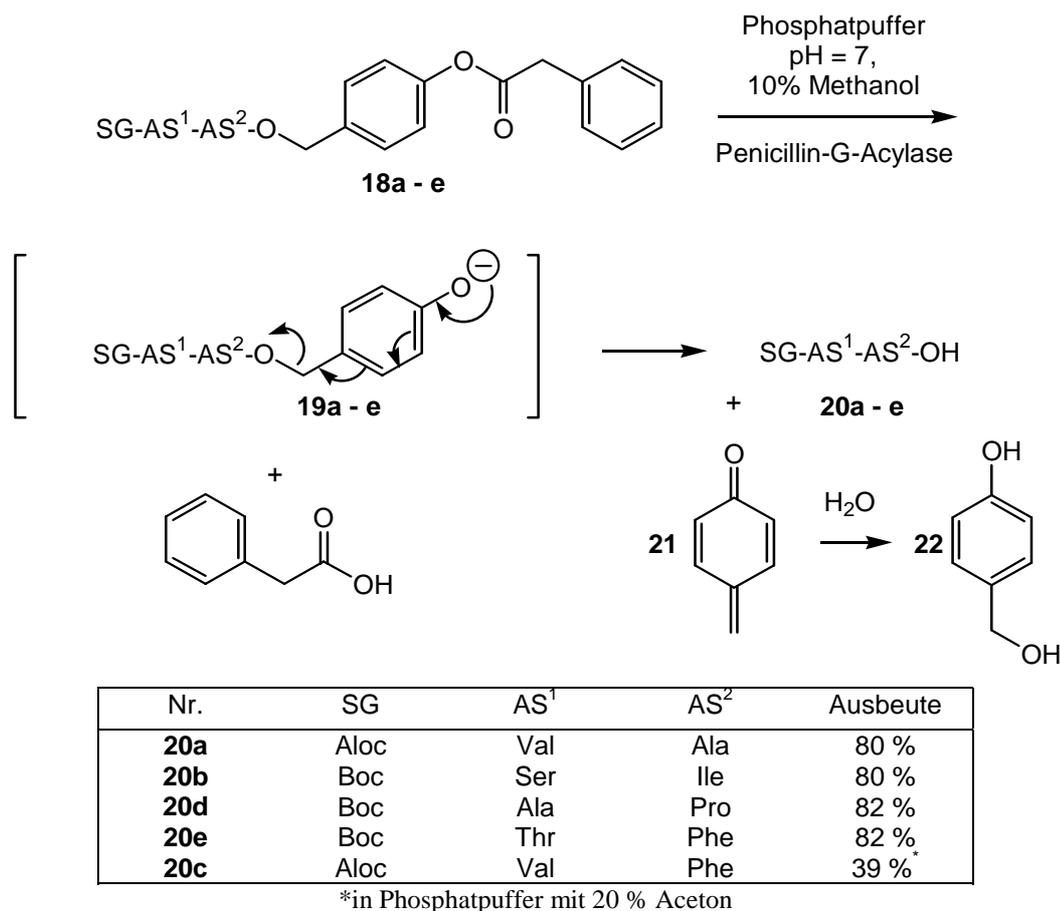
Um Löslichkeitsprobleme auszuschließen, wurde ein weiteres Modelldipeptid (**18e**) dargestellt, das neben L-Phenylalanin das polare L-Threonin als N-terminale Aminosäure enthielt. Dieses war in hoher Ausbeute durch eine Peptidknüpfung mit EEDQ aus Boc-Thr-OH (**36c**)

und H-Phe-OPAOB-hydrotrifluoracetat (**38b**) zugänglich (Schema 10). Darüberhinaus sollte geklärt werden, ob die enzymatische Methode auch die *N*-alkylierte Aminosäure L-Prolin am C-Terminus toleriert. Zur Einführung der enzymlabilen Schutzgruppe wurde deshalb Boc-Pro-OH (**36a**) nach Steglich mit dem PAOB-Alkohol (**35**) verestert, die N-terminale Blockierung acidolytisch entfernt, und durch Kupplung mit Boc-Ala-OH (**35b**) das gewünschte Dipeptid (**18d**) in hoher Ausbeute erhalten (Schema 10).



Schema 10: Darstellung zweier weiterer Modelldipeptide (**18d**) und (**18e**)

Die anschließenden PAOB-Ester-Abspaltungen lieferten bei Raumtemperatur mit immobilisierter Penicillin-G-Acylase in Phosphatpuffer (pH = 7) mit 10 % Methanol bei beiden Beispielen (**18d**) und (**18e**) hohe Ausbeuten der C-terminal freien Dipeptide (**20d**) und (**20e**). Damit ist mit den Ergebnissen aus vorangehenden Untersuchungen bewiesen, daß die Struktur der C-terminalen Aminosäure die Effektivität des enzymatischen Entschützungs-schritts nicht nennenswert beeinflußt (Schema 11).



Schema 11: Zusammenfassung aller PAOB-Ester-Entschützungsstudien an Dipeptiden

Dies bietet einen Vorteil gegenüber anderen enzymlabilen Carboxylschutzgruppen, bei denen die Abspaltung nicht unabhängig vom sterischen Anspruch des Edukts verläuft. So ist zum Beispiel die enzymvermittelte Deblockierung von Peptiden mit C-terminalem Prolin bei Verwendung der Amid-Schutzgruppe^[50] nicht möglich, da die benötigte Peptidamidase diese Substrate nicht akzeptiert. Die mittels verschiedener Lipasen abspaltbaren Heptyl-ester^[47, 51] sind ebenfalls nicht von C-terminalem Prolin entfernbare und verursachen Probleme bei der Entschützung β -verzweigter Aminosäuren am C-Terminus.

Weitere Vorzüge der PAOB-Ester ergeben sich durch die verwendete Penicillin-G-Acylase. Das Enzym spaltet selektiv Phenyllessigsäureester und -amide und katalysiert keine Nebenreaktionen wie beispielsweise die Hydrolyse von Peptidbindungen.^[93] Da die Penicillin-G-Acylase industriell zur semisynthetischen Darstellung von Penicillinen genutzt wird, ist sie in großer Menge preiswert verfügbar.^[94] Darüberhinaus bietet das auf dem Oxiran-Acrylharz Eupergit C immobilisierte Enzym den Vorteil einer einfachen Handhabung bei hoher Beständigkeit gegenüber Cosolventien.^[95]

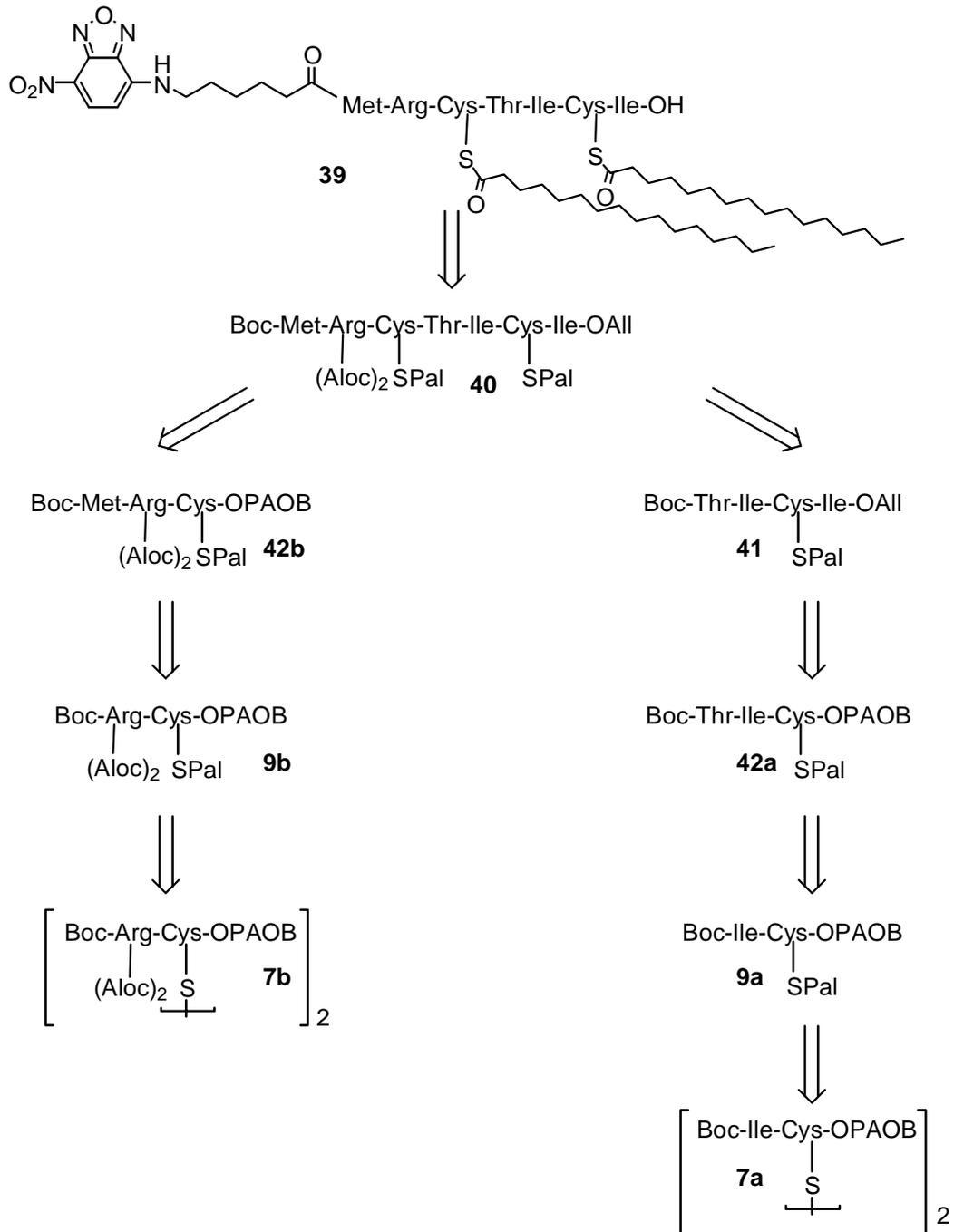
Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, daß der Cosolvensanteil nicht so weit erhöht werden kann, daß auch unpolare Verbindungen wie das Dipeptid (**18c**) effektiv entschützt werden. Gerade dieser Aspekt ist allerdings für die angestrebte Etablierung der PAOB-Ester-Schutzgruppe in der Synthese von Lipopeptiden entscheidend, da diese seitenkettenmodifizierten Peptidstrukturen ebenfalls einen unpolaren, hydrophoben Charakter besitzen.

4.1.2. Plan zur Synthese des fluoreszenzmarkierten Hämagglutinin-Heptapeptids

Neben dem Aufbau der fluoreszenzmarkierten zweifach palmitoylierten C-terminalen Heptapeptidsequenz des Hämagglutinins soll die Synthese die volle Leistungsfähigkeit der PAOB-Ester-Schutzgruppe aufzeigen. Aufgrund der in Kapitel 2.2. besprochenen Labilitäten der durch Fettsäure-Acylierung an Cystein modifizierten Peptidstrukturen muß der Wahl der geeigneten Schutzgruppen besondere Aufmerksamkeit gelten. Wie im vorangehenden Kapitel gezeigt, kann der PAOB-Ester bei neutralen Bedingungen und Raumtemperatur enzymatisch entfernt werden und wurde deshalb zur Blockierung von Carboxylfunktionen bei der Synthese dieses labilen Lipopeptids gewählt.

Die Syntheseplanung sieht vor, das doppelt lipidmodifizierte Heptapeptid (**40**) durch Kuppelung eines C-terminal freien einfach palmitoylierten Tripeptids mit einem N-terminal freien einfach palmitoylierten Tetrapeptid darzustellen. Danach soll die Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) und die Deblockierung sowohl des C-Terminus als auch der Guanidino-Seitenkettenfunktionalität erfolgen. Das für die Synthese gewählte chemoenzymatische Schutzgruppenkonzept ist dem Schema auf der folgenden Seite zu entnehmen (Schema 12).

Die Darstellung des N-terminalen Tripeptids (**42b**) ist durch die Verlängerung des palmitoylierten Dipeptids (**9b**) geplant. In gleicher Weise soll das Tripeptid (**42a**) aus dem Dipeptid (**9a**) synthetisiert werden. Durch C-terminale Verlängerung des lipidmodifizierten Tripeptids (**42a**) wäre dann das Tetrapeptid (**41**) zugänglich. Mit dieser Strategie ist es möglich, die Palmitoyl-Modifizierungen an Dipeptiden mit C-terminalem Cystein einzuführen.^[37] Dadurch wird eine direkte N-terminale Verlängerung am bereits palmitoylierten Cystein vermieden und die Nebenreaktion der *S-N*-Acylwanderung^[39] ausgeschlossen. Die eingesetzten Dipeptide mit freier Thiol-Funktion sollen aus ihren dimeren Cystin-Derivaten durch Spaltung der Disulfidbrücke zugänglich gemacht werden.



Schema 12: Synthesepfad des zweifach palmitoylierten Heptapeptids (**39**)

Die enzymatischen Entschützungen mit Penicillin-G-Acylase sind an den beiden palmitoylierten Tripeptiden (**42a**) und (**42b**) geplant. Besonders beim Tripeptid (**42b**) ist der Einsatz von enzymlabilen Schutzgruppen notwendig, da bei ausschließlicher Verwendung von klassisch-chemischen Verfahren ein Orthogonalitätsproblem auftreten würde. Beim basenlabilen Substrat (**42b**) wird die Option einer Deblockierung im Säuren für den Schutz des N-Terminus eingesetzt. Es ist deshalb sinnvoll, die übergangsmetallkatalysiert entfernbare Aloc-Gruppe für die Seitenkettenfunktion sowie den enzymatisch abspaltbaren PAOB-Ester am C-

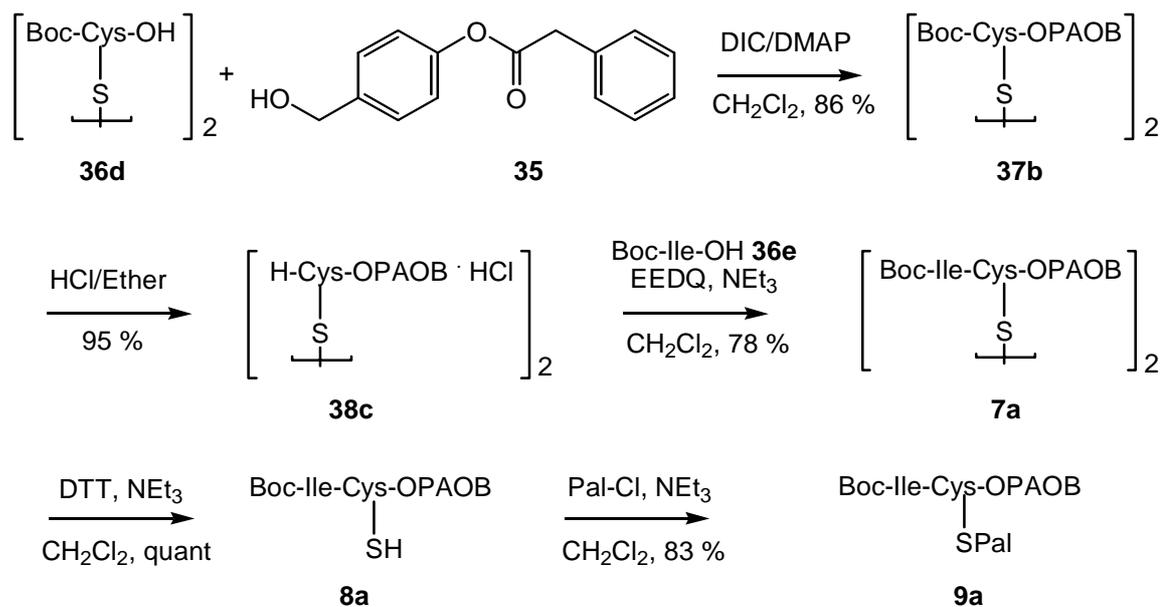
Terminus zu verwenden. Anhand der Verbindung (**42b**) könnte gezeigt werden, daß das enzymatische Verfahren wegen seiner milden Reaktionsbedingungen und der Selektivität des eingesetzten Biokatalysators das Schutzgruppenspektrum für die Synthese labiler Verbindungen erweitert und letztendlich den Aufbau der geplanten Zielstruktur erst ermöglicht.

4.1.3. Darstellung des C-terminalen palmitoylierten Tetrapeptidbausteins

Aus den im vorigen Kapitel erläuterten Gründen ist die Einführung des Palmitoylrestes auf der Dipeptidstufe mit C-terminalem Cystein am sinnvollsten. Durch die Lage der Fettsäure-Acylierung im Tetrapeptid Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll (**41**) erschien damit sein Aufbau durch Blockkondensation zweier Dipeptidfragmente nicht praktikabel. Deshalb mußte zunächst das modifizierte Dipeptid Boc-Ile-Cys(Pal)-OPAOb (**9a**) dargestellt und anschließend in beide Richtungen verlängert werden.

Zu Beginn der Synthese wurde Boc-geschütztes L-Cystin (**36d**) mit zwei Äquivalenten *para*-Phenylacetoxybenzylalkohol (PAOB-Alkohol) (**35**) mittels DIC/DMAP in hoher Ausbeute verestert. Die nachfolgende acidolytische Boc-Abspaltung mit Chlorwasserstoff in Diethylether lieferte in fast quantitativer Ausbeute die kupplungsfähige C-terminal PAOB-Ester-geschützte Aminosäure (**38c**). Diese konnte mit zwei Äquivalenten Boc-geschütztem L-Isoleucin (**36e**) durch die Mischanhydrid-Methode mit EEDQ zum disulfidverbrückten Dipeptid (**7a**) umgesetzt werden. Dabei galt es wie bei allen Peptidknüpfungen in Anwesenheit des PAOB-Esters, die C-terminal freie Komponente vorzuaktivieren, um erst dann die PAOB-Ester-geschützte N-terminal freie Komponente zur Reaktionsmischung zu geben. Nur auf diesem Wege waren hohe Kupplungsausbeuten möglich. Nach Reduktion der Disulfidbrücke mit Dithiothreitol (DTT) war das Dipeptid (**8a**) an seiner freien Thiolfunktion durch Palmitoylchlorid in hoher Ausbeute acylierbar (Schema 13).

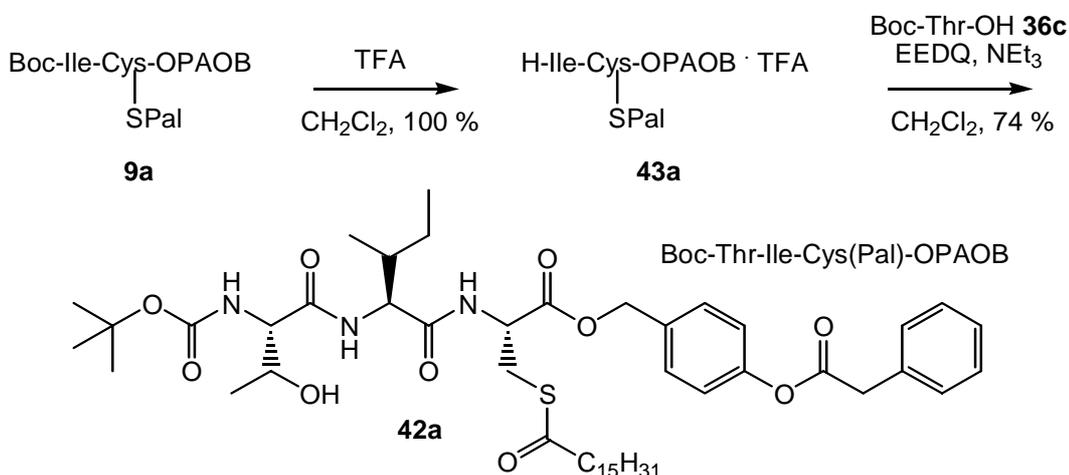
Bei der Einführung des Palmitoylthioesters am C-terminal PAOB-Ester-geschützten Dipeptid (**8a**) zeigte sich die Stabilität der enzymlabilen Schutzgruppe gegenüber den Bedingungen dieses für die Synthese lipidierter Peptide entscheidenden Schrittes. Weder während der Reduktion der Disulfidbrücke, noch in Gegenwart der freien Thiolfunktion wurde der PAOB-Ester beeinträchtigt.



Schema 13: Synthese des Dipeptids Boc-Ile-Cys(Pal)-OPAOb (**9a**)

Zur Darstellung des Tripeptids, das als Substrat für die enzymatische Deblockierung dienen sollte, mußte vom palmitoylierten Dipeptid (**9a**) zunächst die Boc-Schutzgruppe entfernt werden. Die Orthogonalität der Boc-Gruppe zu den PAOB-Estern konnte bereits bei den in Kapitel 4.1.1. beschriebenen Modellstudien belegt werden. Im Gegensatz zu den Boc-Abspaltungen bei nicht-lipidmodifizierten Verbindungen, lieferte im hier diskutierten Fall die Acidolyse mit Trifluoressigsäure die besseren Ergebnisse. Da es sich bei den anfallenden Hydrotrifluoracetaten anders als bei den entsprechenden Hydrochloriden um farblose Feststoffe handelt, die ohne weitere Aufreinigungsschritte in analytisch reiner Form entstehen, ist diese Methode im Falle lipidierter Substanzen der Abspaltung in HCl/Ether eindeutig vorzuziehen.

Mit EEDQ als Kupplungsreagenz wurde danach durch Reaktion mit Boc-geschütztem L-Threonin (**36c**) das Tripeptid (**42a**) in zufriedenstellender Ausbeute dargestellt (Schema 14).



Schema 14: N-terminale Verlängerung zum Tripeptid Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-OPAOb (**42a**)

Die C-terminale Anknüpfung einer weiteren Aminosäure verlangte zunächst die PAOB-Ester-Spaltung am palmitoylierten Tripeptid (**42a**). Für diesen zentralen Schritt der chemoenzymatischen Synthese wurde auf Erfahrungen zurückgegriffen, die die Penicillin-G-Acylase-vermittelten Entschützungen der Modelldipeptide mit sich brachten (siehe Kap. 4.1.1.), und Phosphatpuffer (pH = 7) mit 10 % Methanol als Reaktionsmedium gewählt. Allerdings konnte in diesem Lösungsmittelgemisch bei einer Reaktionsdauer von 24 h kein Umsatz des lipidmodifizierten Substrates beobachtet werden, so daß das Edukt durch Extraktion mit Essigester vollständig wiedergewonnen wurde. Auch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C hatte keinen Effekt.

Mit der immobilisierten Penicillin-G-Acylase zeigte die DC-Kontrolle auch bei Verwendung anderer mit Wasser mischbarer organischer Lösungsmittel keine Spaltung des PAOB-Esters. Der Einsatz von Cross-Linked-Enzyme-Crystals (CLECs) der Penicillin-G-Acylase lieferte in diesen Mischungen ebenso keine enzymatische Hydrolyse wie in mit Spuren von Wasser versetzten Solventien wie Essigester und Toluol. Offenbar kann die PAOB-Ester-Entschätzung am lipidierten Peptid (**42a**) nicht durch die Zugabe von Cosolventien ermöglicht werden, da die Löslichkeit des Substrates für eine enzymatische Umsetzung nicht ausreicht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Erfolglose PAOB-Entschätzungen an Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-OPAOb (**42a**)

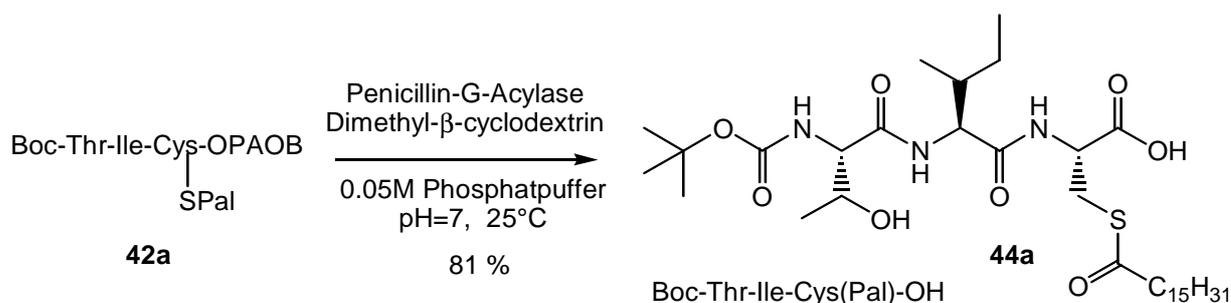
Penicillin-G-Acylase als	Cosolvens in 0.05 M Phosphatpuffer (pH = 7)	%-Anteil des Cosolvens	Reaktionstemperatur (°C)
immobilisiertes Enzym	Methanol	10, 20	25, 37
	Tetrahydrofuran	10	25
	Dimethylformamid	10	25
	Dioxan	10, 20	25
	Aceton	10, 20	25
CLEC	Methanol	10, 20	25, 37
	Tetrahydrofuran	10	25
	Dimethylformamid	10	25
	Aceton	20	25
	Essigester	99	25
	Toluol	99	25

Eine weitere Möglichkeit unpolare Verbindungen im wässrigen Medium zu lösen, ist die Verwendung von Löslichkeitsvermittlern. Bei der Etablierung zahlreicher enzymatischer Verfahren in unserer Arbeitsgruppe erwiesen sich Cyclodextrine als wirksame löslichkeitsvermittelnde Substanzen.^[38, 54, 96] Cyclodextrine sind Oligomere aus cyclisch $\alpha(1\rightarrow4)$ verknüpften Glucoseeinheiten. Die wichtigsten Vertreter besitzen sechs, sieben und acht Monomereinheiten und werden α -, β - und γ -Cyclodextrin genannt. Aufgrund ihrer Struktur haben diese Oligosaccharide eine hydrophobe Innenseite, während die Außenseite hydrophilen Charakter aufweist. Deshalb sind sie in der Lage hydrophobe Verbindungen in ihrem Innern aufzunehmen. Durch das hydrophile Äußere sind die so gebildeten Komplexe in Wasser löslich. Die Löslichkeitseigenschaften der Cyclodextrine können durch Derivatisierungen variiert werden. Gebräuchliche Derivate sind beispielsweise das Dimethyl- β -cyclodextrin oder das Hydroxypropyl- β -cyclodextrin.^[97]

Mit α -Cyclodextrinen, die sich aufgrund ihrer Ringgröße eigentlich für die Komplexierung von Alkylketten eignen sollten, konnte das palmitoylierte Tripeptid allerdings nicht in Lösung gebracht werden. Vermutlich ist die Alkylkette des Palmitinsäurerestes zu lang und in sich verdrillt, um vom α -Cyclodextrin aufgenommen zu werden.

Im Gegensatz dazu war bei Zusatz von 30 Äquivalenten Dimethyl- β -cyclodextrin nach Behandlung mit Ultraschall eine nur schwach getrübe Lösung des lipidmodifizierten Tripeptids (**42a**) im Phosphatpuffer herstellbar. Diese Form der Cyclodextrine, die fähig ist, Phenylreste zu komplexieren, kann sich wahrscheinlich nicht nur um den voluminösen Alkylrest, sondern auch um die Phenylreste der PAOB-Gruppe lagern und ermöglicht dadurch die Löslichkeit des Lipopeptids.

Mit der erhaltenen Lösung war nach Zugabe von immobilisierter Penicillin-G-Acylase die Abspaltung der PAOB-Ester-Schutzgruppe in hoher Ausbeute möglich und damit das kuppungsfähige C-terminal freie Tripeptid Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-OH (**44a**) zugänglich (Schema 15).

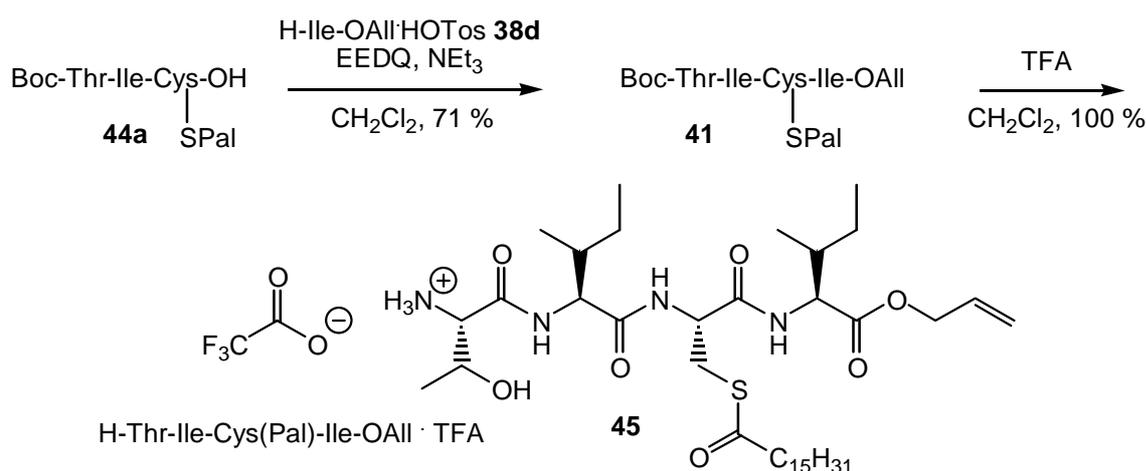


Schema 15: Enzymatische Entschützung des palmitoylierten Tripeptids (**42a**)

Bei einer Reaktionsdauer von 24 h bewirkte der Phosphatpuffer (pH = 7) keine Hydrolyse des Thioesters. Ein entscheidender Vorteil dieses Verfahrens ist in der einfachen Aufarbeitung nach der Reaktion zu sehen. Das immobilisierte Enzym kann durch Filtration problemlos entfernt werden. Durch die Zugabe von Benzyltriethylammoniumbromid wird das Produkt (**44a**) aus den Cyclodextrinen verdrängt, dann mit Diethylether aus der wäßrigen Phase extrahiert und damit effektiv vom Löslichkeitsvermittler abgetrennt.

Mit dieser enzymatischen Schutzgruppenabspaltung ist die grundsätzliche Eignung der PA-OB-Ester für die Blockierung der Carboxylfunktion von lipidierten Peptiden bewiesen. Durch ihre Entfernbare unter extrem milden Bedingungen ist ihr Einsatz auch bei dieser vor allem bezüglich Basen und Nucleophilen sehr empfindlichen Verbindungsklasse möglich. Ein chemisch interessanter Nebenaspekt der enzymatischen Transformation ist die selektive Spaltung des Phenylesters im Beisein des ansonsten gegenüber Nucleophilen wesentlich instabileren Thioesters.

Das auf chemoenzymatischem Wege dargestellte C-terminal freie Lipotripeptid Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-OH (**44a**) wurde durch Umsetzung mit L-Isoleucin-allylester-hydrotosylat (**38d**) unter Verwendung von EEDQ in zufriedenstellender Ausbeute zum palmitoylierten Tetrapeptid (**41**) verlängert. Der kupplungsfähige Tetrapeptidbaustein (**45**) konnte im Anschluß durch Entfernung der N-terminalen Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure erhalten werden (Schema 16).



Schema 16: C-terminale Verlängerung und N-terminale Entschützung zum kupplungsfähigen palmitoylierten Tetrapeptid (**45**)

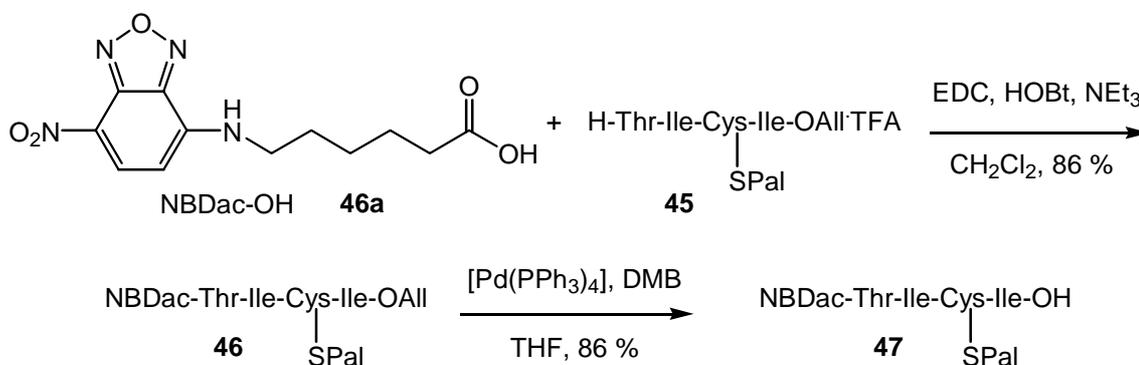
Durch die Kombination klassisch-chemischer und enzymatischer Schutzgruppentechniken gelang die Darstellung des palmitoylierten C-terminalen Tetrapeptids des Influenza-A-

Hämagglutinins in hoher Gesamtausbeute. Dabei wurde gleichzeitig der PAOB-Ester als neuartige, unter milden Bedingungen entfernbare Carboxylschutzgruppe für die Synthese von Lipopeptiden etabliert.

4.1.4. Fluoreszenzmarkierung des C-terminalen palmitoylierten Tetrapeptids

Das einfach palmitoylierte Tetrapeptid (**45**) ist zum einen eine wichtige Zwischenstufe bei der Synthese des doppelt lipidierten Heptapeptids. Zum anderen entspricht es aber auch der C-terminalen Tetrapeptidsequenz des Influenza-A-Hämagglutinins und sollte ebenfalls in biophysikalischen Messungen eingesetzt werden, um einen Vergleich der Vesikelaustauschenschaften zwischen einfach und zweifach modifiziertem Peptidkonjugat zu ermöglichen.

Deshalb wurde bereits diese Teilsequenz der eigentlichen Zielstruktur mit einem Fluoreszenzmarker versehen. Die Anknüpfung erfolgte durch Umsetzung von *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaprinsäure (NBDac-OH) (**46a**) mit dem N-terminal freien Tetrapeptid (**45**) nach der Carbodiimid/HOBt-Methode. Das NBD-markierte Produkt (**46**) bildete sich in hoher Ausbeute und konnte anschließend durch palladiumkatalysierte Allylübertragung auf Dimethylbarbitursäure^[98] C-terminal entschützt werden (Schema 17).



Schema 17: Darstellung des fluoreszenzmarkierten palmitoylierten Tetrapeptids (**47**)

4.1.5 Darstellung des N-terminalen palmitoylierten Tripeptids

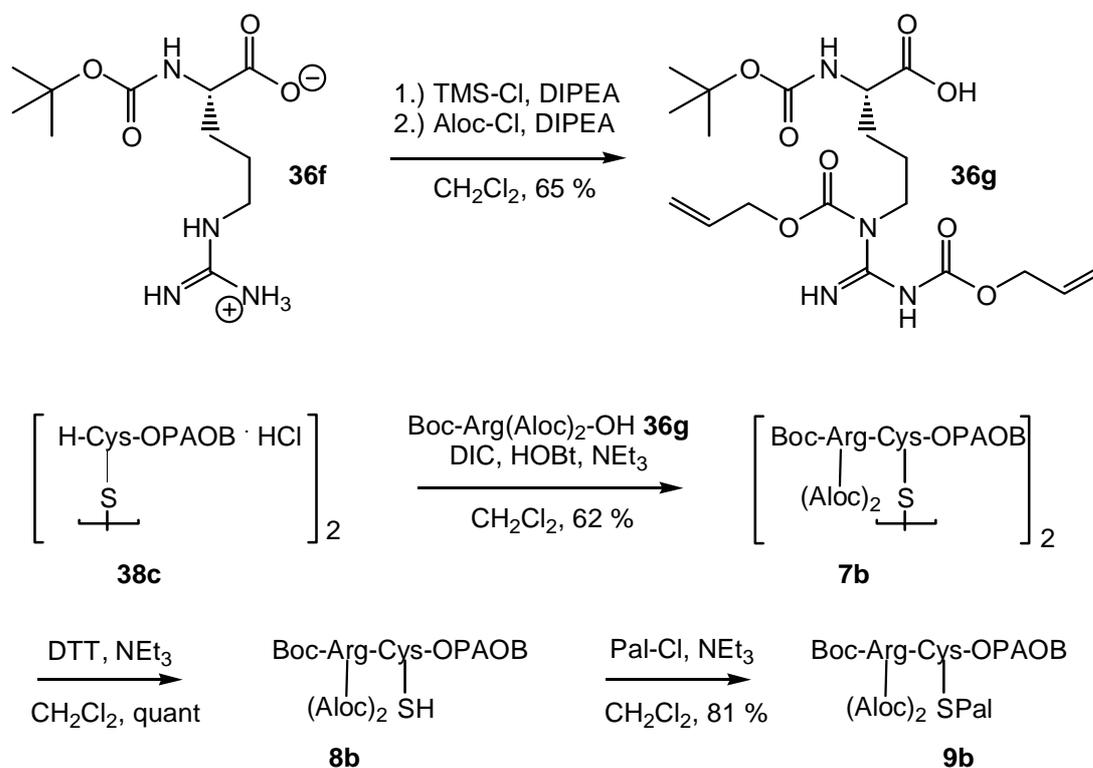
Die Synthese des C-terminal freien palmitoylierten Tripeptidbausteins beinhaltet aufgrund der Guanidino-Seitenkettenfunktionalität des Arginins ein komplizierteres Schutzgruppenproblem als die Darstellung des Tetrapeptids (**45**). Allerdings könnte gerade deshalb der Einsatz des

PAOB-Esters mit der damit verbundenen Erweiterung der orthogonalen Entschützungsoptionen den Aufbau dieser Zwischenstufe erst ermöglichen.

Die Guanidino-Funktion des Arginins liegt aufgrund ihrer hohen Basizität bei den üblicherweise in der Peptidchemie verwendeten Reaktionsbedingungen zumeist protoniert vor. Dadurch wird ihre Nukleophilie wirksam unterdrückt und störende Nebenreaktionen ausgeschlossen. Protonierte Arginin-Derivate besitzen allerdings unvorteilhafte Löslichkeitseigenschaften und sind schwierig aufzureinigen, weshalb in der Mehrzahl der Peptidsynthesen Arginin mit geschützter Seitenkettenfunktion eingesetzt wird. Aus diesem Grund wurden eine Vielzahl von Schutzgruppen für die Guanidinofunktion entwickelt, die zumeist mit Trifluoressigsäure abspaltbar sind.^[99] Daneben gibt es aber auch die Möglichkeit, die Arginin-Seitenkettenfunktion durch die doppelte Anknüpfung der Benzyloxycarbonyl-^[100] oder der Allyloxycarbonyl-Schutzgruppe^[101] in N^δ - und N^ω -Position zu blockieren.

Für die Darstellung des palmitoylierten Tripeptids wurde der Allyloxycarbonyl-(Aloc-)Schutz für die Guanidino-Gruppe verwendet, um im letzten Syntheseschritt, der auch die Freisetzung der Seitenkettenfunktionalität beinhaltet, möglichst milde Bedingungen zu garantieren.

Die beiden Aloc-Schutzgruppen waren einer Vorschrift für die Blockierung mit Benzyloxycarbonyl folgend^[100] mit Trimethylsilylchlorid und DIPEA an Boc-geschütztem L-Arginin (**36f**) einführbar. Das N^α -Boc- und N^G -Di-Aloc-geschützte L-Arginin (**36g**) ergab sich in ähnlich hoher Ausbeute wie in der Literatur für Benzyloxycarbonyl beschrieben (Schema 18).



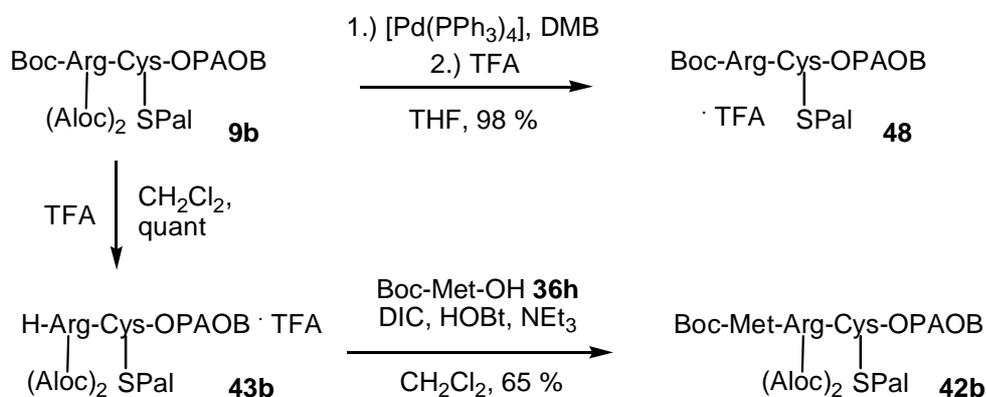
Schema 18: Darstellung des palmitoylierten Dipeptids (**9b**)

Analog zum Aufbau des Tetrapeptidbausteins in Kapitel 4.1.3. folgte die Peptidknüpfung mit C-terminal PAOB-Ester-geschütztem Cystin (**38c**). Bei diesem Kupplungsschritt wurden allerdings bei Verwendung der Carbodiimid/HOBt-Methode wesentlich höhere Ausbeuten erzielt als mit EEDQ. Der anschließenden Reduktion der Disulfidbrücke folgte auch hier in hoher Ausbeute die Acylierung mit der Fettsäure (Schema 18).

Da die zweifache Aloc-Blockierung der Guanidino-Funktion in der Peptidchemie relativ selten eingesetzt wird, ist bisher nur ihre palladiumkatalysierte Abspaltung in Anwesenheit von Stannanen bekannt.^[101] Um zu klären, ob die von H. Kunz und Mitarbeitern etablierte Entschützungsverfahren mit Dimethylbarbitursäure als Allylfänger^[102] auch auf die Freisetzung der Guanidino-Funktion übertragbar ist, wurden bereits vom palmitoylierten Dipeptid (**9b**) die beiden Aloc-Schutzgruppen entfernt.

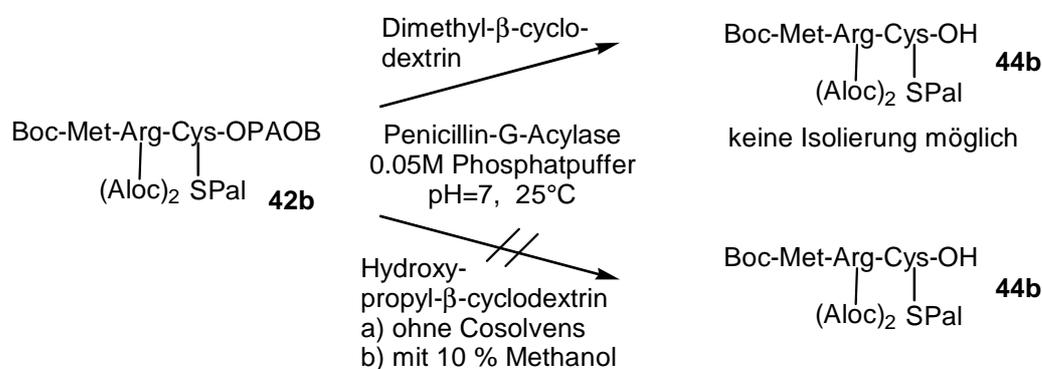
Nach der Abspaltung wurde sofort eine äquimolare Menge Trifluoressigsäure zur Reaktionsmischung gegeben, um das Dipeptid (**48**) mit einem definierten Gegenion zu erhalten. Der nahezu quantitative Verlauf der übergangsmetallkatalysierten Reaktion zeigte die Anwendbarkeit dieses Verfahrens für die Deblockierung der Arginin-Seitenkette (Schema 19). Diese Entschützungsstudie belegte zudem, daß die beiden Aloc-Gruppen von der Arginin-Seitenkettenfunktionalität entfernbar sind, ohne den PAOB-Ester oder den labilen Thioester zu beeinträchtigen.

Der eigentlichen Syntheseplanung folgend wurde mit der Abspaltung der N-terminalen Boc-Gruppe vom Dipeptid (**9b**) und der Anknüpfung von Boc-geschütztem L-Methionin (**36h**) fortgefahren. Das vollständig blockierte, palmitoylierte Tripeptid (**42b**) konnte auf diesem Weg in zufriedenstellender Ausbeute erhalten werden (Schema 19).



Schema 19: Abspaltungsstudie an der Guanidino-Funktion und weitere Synthese zum palmitoylierten und vollständig geschützten Tripeptid (**42b**)

Das Tripeptid (**42b**) war das zweite lipidmodifizierte Substrat, anhand dessen die enzymatische PAOB-Ester-Entschützung untersucht werden sollte. Die Verbindung (**42b**) konnte nach dem in Kapitel 4.1.3 etablierten Verfahren im Beisein von 30 Äquivalenten Dimethyl- β -cyclodextrin in 0.05 M Phosphatpuffer gelöst werden. Nach Zugabe immobilisierter Penicillin-G-Acylase war nach einer Reaktionsdauer von 24 h mittels DC-Kontrolle kein Edukt mehr detektierbar. Aufgrund der Löslichkeitseigenschaften des Produkts (**44b**) gelang seine Extraktion mit Diethylether aus der wäßrigen Phase bei pH = 2 allerdings nicht. Mit Essigester hingegen wurde vor allem das im großen Überschuß eingesetzte Cyclodextrin extrahiert. Deswegen vollständige Abtrennung vom gewünschten palmitoylierten C-terminal freien Tripeptid (**44b**) durch Flash-Chromatographie an Kieselgel war jedoch nicht realisierbar (Schema 20).



Schema 20: Enzymatische Entschützungsversuche am Tripeptid (**42b**)

Um eine extractive Aufreinigung zu ermöglichen, wurde in einem weiteren Versuch statt des Dimethyl-Derivats Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Löslichkeitsvermittler eingesetzt. Dieses besitzt den Vorteil, auch bei Extraktionen mit Essigester in der wäßrigen Phase zu verbleiben. Mit diesem β -Cyclodextrin-Derivat konnte allerdings keine Lösung des Edukts im Phosphatpuffer erzeugt werden. Auch bei zusätzlicher Verwendung von 10 Vol.-% Methanol als Cosolvens ergab sich lediglich eine Suspension. Dadurch war nach Zugabe des Enzyms kein Umsatz des PAOB-Ester geschützten Lipopeptids (**42b**) in der DC-Kontrolle nachweisbar (Schema 20).

Diese Abspaltungsversuche zeigen einige der wesentlichen Schwierigkeiten bei der Etablierung eines neuartigen enzymatischen Verfahrens auf. Auch bei breiter Substrattoleranz des Enzyms ergeben sich Beschränkungen bezüglich der einsetzbaren Edukte, da diese in einem Medium mit hohem Wasseranteil gelöst werden müssen. Zudem können Probleme auftreten, das entstehende Produkt effektiv und in reiner Form aus der Reaktionsmischung zu entfernen. Es ist deshalb nicht immer möglich, die für die enzymatische Transformation des einen Sub-

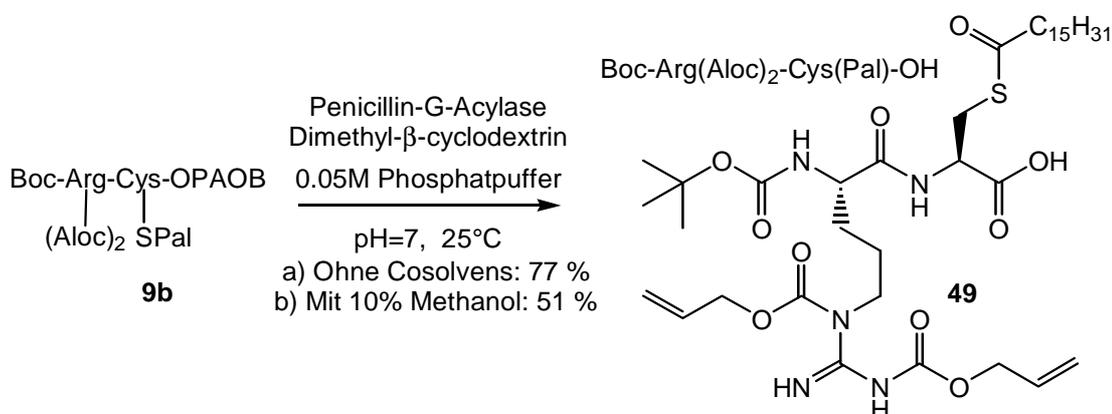
strates entwickelten Bedingungen auf ein anderes zu übertragen, so daß neuerliche Optimierungen die Folge sind.

Bei der hier diskutierten chemoenzymatischen Darstellung der C-terminalen Hämagglutinin-Heptapeptidsequenz erschien eine Änderung der Synthesestrategie der einfachere Weg zum Zielmolekül zu sein.

4.1.6. Enzymatische Entschützung zum C-terminal freien palmitoylierten Dipeptid und alternative Darstellung dieses Synthesebausteins

Die veränderte Planung sah vor, bereits das lipidmodifizierte Dipeptid Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OPAOb (**9b**) C-terminal zu entschützen. Dieser Synthesebaustein sollte danach mit dem in Kapitel 4.1.3. dargestellten kupplungsfähigen Tetrapeptid H-Thr-Ile Cys(Pal)-Ile-OAll (**45**) zum doppelt palmitoylierten Hexapeptid umgesetzt werden und anschließend die N-terminale Anknüpfung des L-Methionins und des Fluoreszenzmarkers erfolgen.

Die enzymatische Deblockierung des palmitoylierten PAOB-Ester-geschützten Dipeptids (**9b**) war mit Dimethyl-β-cyclodextrin als Löslichkeitsvermittler in hoher Ausbeute möglich, da die Extraktion des C-terminal freien Produkts (**49**) aus der wäßrigen Phase mit Diethylether problemlos gelang. In einem zweiten Versuch wurden der Reaktionsmischung noch zusätzlich 10 Vol.-% Methanol beigelegt. Allerdings resultierte in diesem Fall eine deutlich geringere Ausbeute. Die Gründe dafür sind vermutlich in der veränderten Aufnahmefähigkeit der Cyclodextrine im nicht vollständig wäßrigen Medium zu suchen (Schema 21).

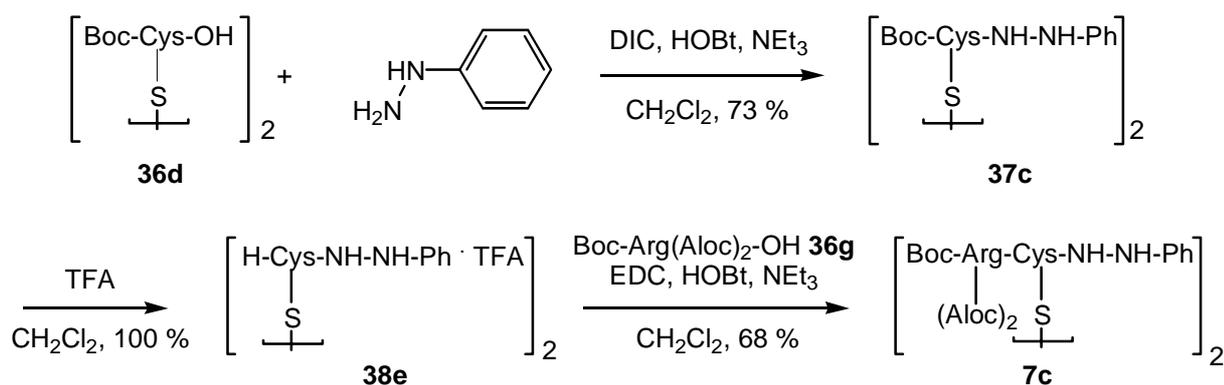


Schema 21: Enzymatische PAOB-Ester-Spaltung am Dipeptid (**9b**)

Durch die Etablierung der PAOB-Ester-Deblockierung am Dipeptid (**9b**) ist mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.5. die Orthogonalität aller drei Schutzgruppen bewiesen und die Anwendbarkeit des aus klassisch-chemischen, metallorganischen und enzymatischen Methoden aufgebauten Schutzgruppenkonzepts bestätigt. Die Kombination dieser verschiedenen Verfahren ermöglichte die Darstellung des kupplungsfähigen palmitoylierten Synthesebausteins (**49**), der für die Verlängerung des N-terminal freien Tetrapeptids H-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll (**45**) benötigt wird.

Ergänzend zum Aufbau des Dipeptids Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OH (**49**) unter Verwendung des PAOB-Esters wurde noch eine alternative Strategie mit der C-terminalen Phenylhydrazid-Schutzgruppe erprobt. Diese kann unter oxidativen Bedingungen sowohl enzymatisch mit der Tyrosinase als auch mit chemischen Oxidationsmitteln wie zum Beispiel Kupfer(II)-Ionen entfernt werden.^[103, 104] Die erfolgreiche Anwendung der Phenylhydrazide in der Synthese lipidierter Peptide war bisher aber noch nicht möglich.^[105]

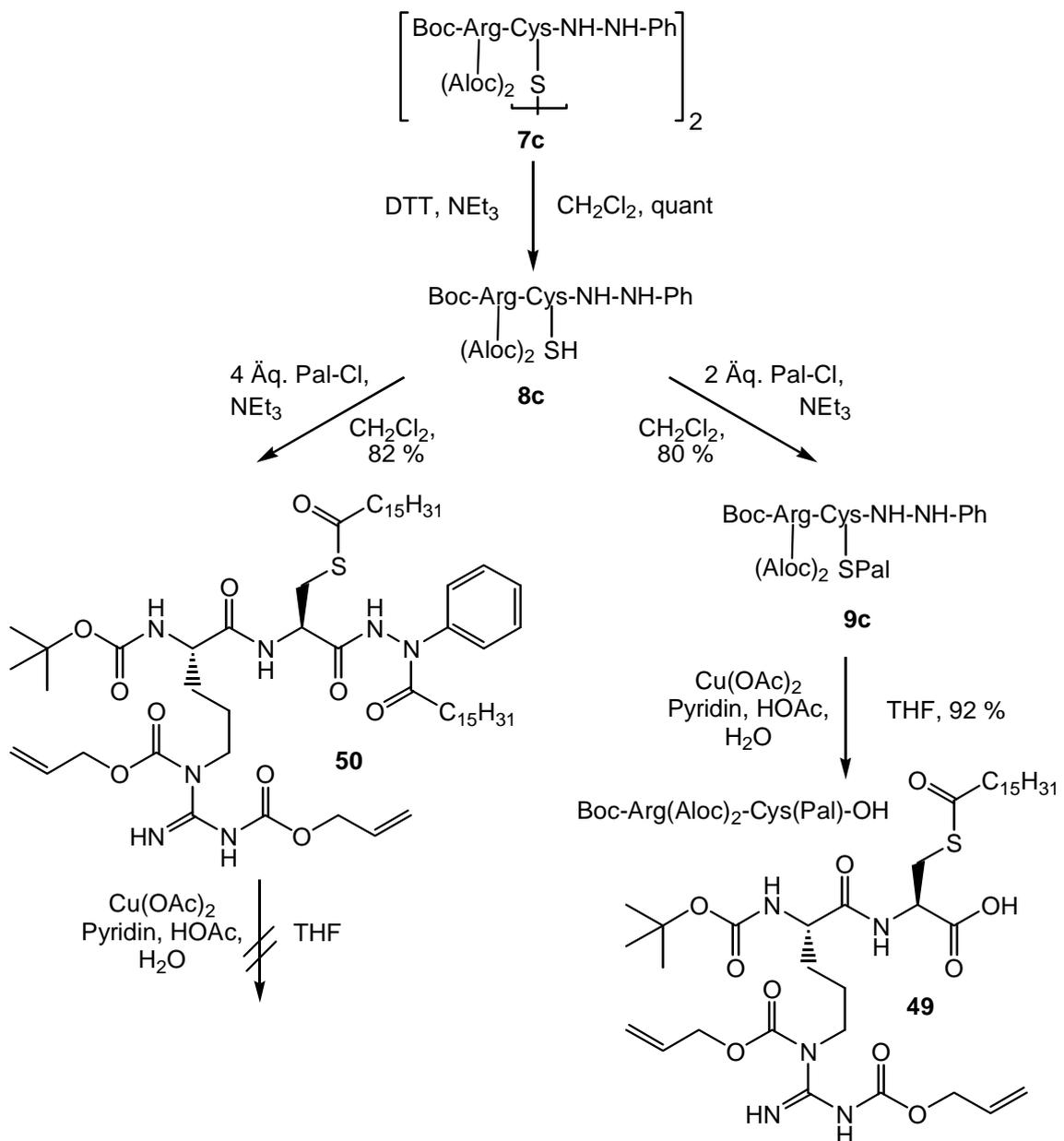
Die Einführung der Phenylhydrazid-Schutzgruppe war nach bekannter Vorschrift mit der Carbodiimid/HOBt-Methode auch an Boc-geschütztem L-Cystin (**36d**) möglich, da das Reduktionspotential des eingesetzten Phenylhydrazins nicht ausreicht, um die Disulfidbrücke zu spalten. Durch die acidolytische Entfernung der Boc-Gruppe wurde das Phenylhydrazid nicht beeinträchtigt. Das erhaltene C-terminal geschützte L-Cystin (**38e**) konnte mit zwei Äquivalenten Boc-Arg(Aloc)₂-OH (**36g**) in hoher Ausbeute zum disulfidverbrückten Dipeptiddimer (**7c**) gekuppelt werden (Schema 22).



Schema 22: Einführung des Phenylhydrazids und Kupplung zum Cystin-Derivat (**7c**)

Die anschließende Anknüpfung des Palmitoyl-Restes verlief allerdings nicht so problemlos wie bei der entsprechenden PAOB-Ester-geschützten Verbindung (**8b**). Nach der Reduktion

der Disulfidbrücke mußte das Palmitoylchlorid exakt in äquimolarer Menge zugegeben werden. Bei Verwendung eines Überschusses fand zusätzlich die Acylierung eines Phenylhydrazid-Stickstoffs statt. Diese doppelt Fettsäure-modifizierte Verbindung (**50**) konnte nicht mehr C-terminal freigesetzt werden, da das zusätzlich acylierte Phenylhydrazid jegliche Oxidationsempfindlichkeit verliert. Die ausschließlich *S*-palmitoylierte Verbindung (**9c**) wurde hingegen in hoher Ausbeute durch Kupfer(II)-Ionen C-terminal deblockiert und bildete in Anwesenheit von Wasser als Nukleophil die freie Carbonsäure. Bei diesem Entschützungsprozess ist auf ein schwach saures Milieu zu achten, da ansonsten das zur Komplexbildung des Kupfers eingesetzte Pyridin den basenlabilen Thioester zerstören könnte (Schema 23).

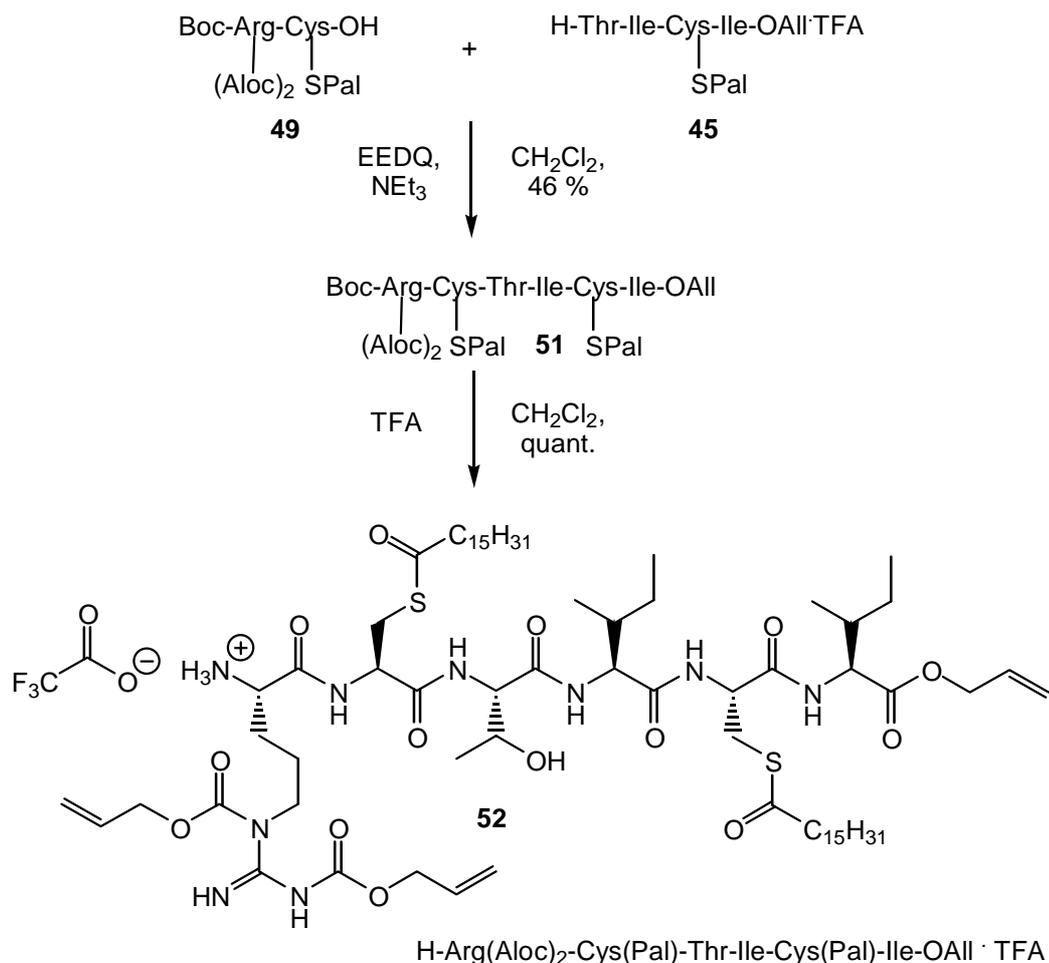


Schema 23: Einführung des Palmitoyl-Restes im Beisein der Phenylhydrazid-Gruppe

Das palmitoylierte C-terminal freie Dipeptid Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OH (**49**) ist demnach auch mit der Phenylhydrazid-Schutzgruppe in hoher Gesamtausbeute darstellbar. Damit konnte gleichzeitig auch diese Carboxyl-Blockierung für die Synthese lipidierter Peptide etabliert werden. Die auftretenden Probleme bei der Einführung der Palmitoylierung lassen sich durch eine genaue Dosierung des Fettsäurechlorids ausschalten. Da der oxidative Entschützungsprozess im organischen Lösungsmittel möglich ist, können nach dieser Variante größere Mengen an Substrat umgesetzt werden als bei der PAOB-Ester-Spaltung, die starken Reglementierungen aufgrund der nur mäßigen Löslichkeit des Edukts im Puffer/Cyclodextrin-Gemisch unterliegt. Andererseits sind die schwach sauren Entschützungsbedingungen beim Phenylhydrazid weniger mild als bei der enzymatischen Entfernung des PAOB-Esters. Beim vorliegenden Beispiel trat dadurch aber keine Beeinträchtigung des Zielmoleküls auf. Mildere Bedingungen wären sicherlich durch die Tyrosinase-vermittelte Oxidation des Phenylhydrazids möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings bezüglich dieser enzymatischen Entschützungs-methode keine Versuche durchgeführt.

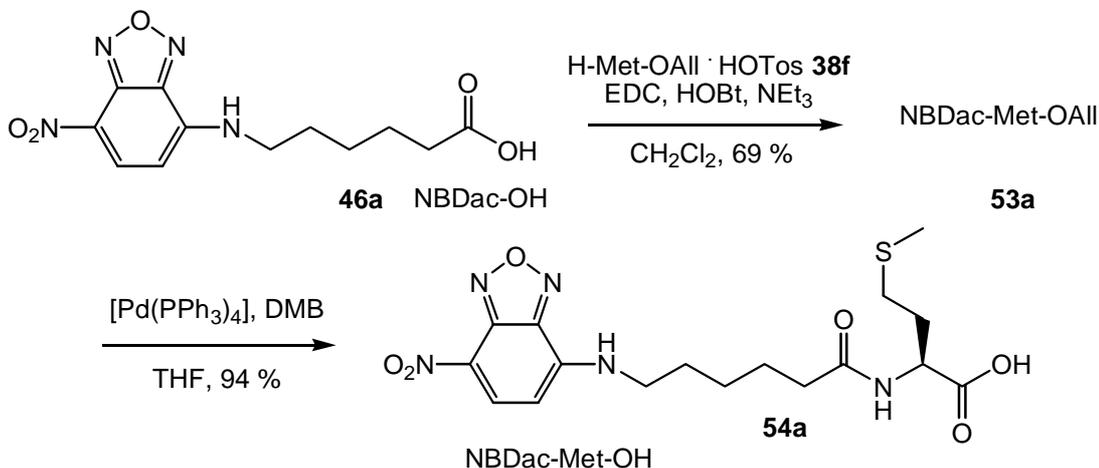
4.1.7. Kupplung zum doppelt palmitoylierten Hexapeptid und abschließende Schritte zum fluoreszenzmarkierten Heptapeptid

Das N-terminal freie Tetrapeptid H-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll (**45**) wurde mit dem C-terminal freien Dipeptid Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OH (**49**) zum doppelt palmitoylierten Hexapeptid (**51**) gekuppelt. Jedoch konnte weder mit EEDQ noch mit EDC/HOBt als Kupplungsreagenzien eine Ausbeute über 46 % erhalten werden. Eine entscheidende unerwünschte Nebenreaktion war der Angriff der freien Aminofunktion des Tetrapeptids auf den Thioester des Dipeptids, so daß bezogen auf das Edukt (**45**) in einer Ausbeute von 20 % das N-acylierte Tetrapeptid Pal-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll gebildet wurde. Das N-terminal entschützte Hexapeptid (**52**) entstand nach der Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure in quantitativer Ausbeute (Schema 24).



Schema 24: Darstellung des kupplungsfähigen Hexapeptidbausteins (**52**)

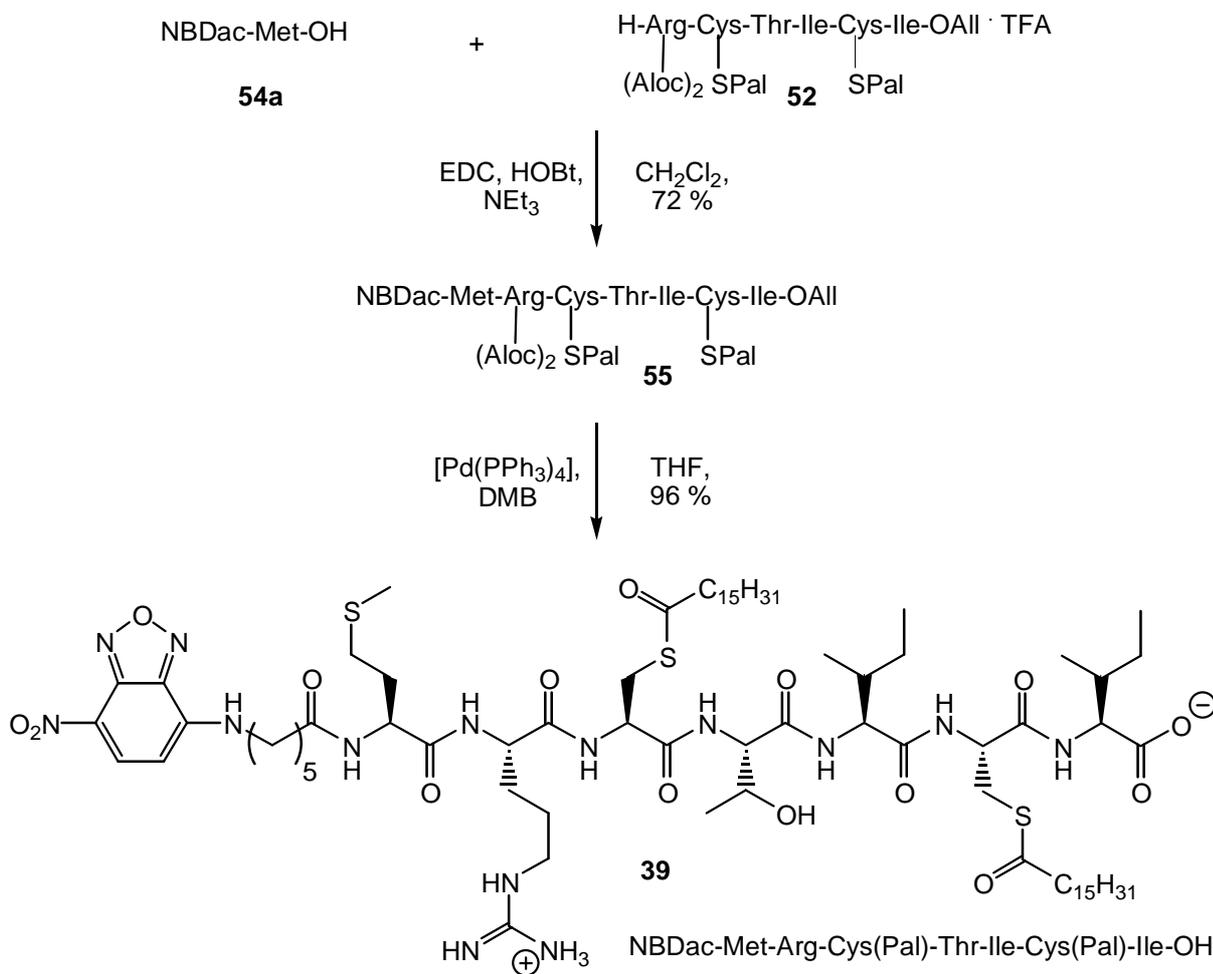
Um in den letzten Stufen der Synthese eine höhere Konvergenz zu erreichen, wurden die noch fehlende N-terminale Aminosäure und der Fluoreszenzmarker nicht nacheinander linear angeknüpft. Stattdessen erfolgte zunächst die Kupplung der NBD-aminocapronsäure (**46a**) mit L-Methionin-allylester (**38f**).



Schema 25: Darstellung des fluoreszenzmarkierten L-Methionin (**54a**)

Die anschließende palladiumkatalysierte Deblockierung lieferte die freie Carboxylfunktion des markierten L-Methionins. Beide Umsetzungen waren in zufriedenstellender Ausbeute durchführbar (Schema 25).

Mit dem Aminosäure-Baustein (**54a**) war in nur einem Kupplungsschritt unter Verwendung der Carbodiimid/HOBt-Methode das fluoreszenzmarkierte Heptapeptid (**55**) aus dem N-terminal freien Hexapeptid (**52**) darstellbar. Die Anknüpfung erfolgte mit zufriedenstellender Ausbeute. Den Abschluß der Synthese bildete die Abspaltung der allylischen Schutzgruppen vom C-Terminus und der Seitenkettenfunktion in einem Schritt. Wie bereits in Kapitel 4.1.5. anhand eines Vorversuchs gezeigt, beeinträchtigt auch hier die Entschützung der Guanidino-Funktion durch palladiumkatalysierten Allyltransfer auf Dimethylbarbitursäure die labilen Thioesterfunktionen nicht (Schema 26).



Schema 26: Abschließende Schritte zum NBD-markierten zweifach palmitoylierten Heptapeptid (**39**)

Dadurch ist die Synthese des fluoreszenzmarkierten zweifach palmitoylierten Heptapeptids (**39**), das der C-terminalen Sequenz des Hämagglutinins des Influenza-A-Virus entspricht, erfolgreich abgeschlossen. Zusätzlich konnte durch diese Lipopeptid-Synthese die volle Leistungsfähigkeit der enzymatisch mit Penicillin-G-Acylase entfernbaren PAOB-Ester-Carboxylschutzgruppe gezeigt werden.

Diese Zielverbindung stand nun zusammen mit dem in Kapitel 4.1.4. dargestellten einfach palmitoylierten Tetrapeptid (**47**) für den Einsatz in biophysikalischen Experimenten zur Verfügung. Mit diesen beiden fluoreszenzmarkierten Lipopeptiden sind zwei nützliche Werkzeuge vorhanden, um in biophysikalischen Untersuchungen weitere Einblicke in das Membranbindungsverhalten dieses viralen Hüllproteins zu gewinnen.

4.2. Biophysikalische Experimente mit den chemoenzymatisch dargestellten fluoreszenzmarkierten Lipopeptiden

Im vorliegenden Testsystem wurden synthetische Lipid-Vesikel aus 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC) (**31a**) (siehe Abb. 9) als Modellmembranen verwendet. Ähnlich den Messungen mit Lipopeptidsequenzen des *Ras*-C-Terminus (siehe Kapitel 2.3.1.) war auch für diese beiden Peptidkonjugate der Vergleich der kinetischen Parameter des Intervesikel-Austauschs geplant. Dabei war von Interesse, inwieweit die zweite Palmitoylierung die Membrangängigkeit steigert und ob diese doppelte Fettsäure-Acylierung für eine stabile Verankerung ausreicht. Die Messungen erfolgten bei 20°C in einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7. Die fluoreszenzspektroskopische Detektion der Lipopeptide wurde während aller Versuche bei 535 nm, der Emissionswellenlänge des NBD, durchgeführt.

4.2.1. Austausch zwischen der Vesikel-Innen- und -Außenseite (Flip-Flop-Kinetik)

Die fluoreszenzmarkierten Peptide können in die Lipiddoppelschicht der Vesikel an deren Außenseite oder an deren Innenseite eingelagert sein. Zwischen diesen beiden Oberflächen findet ein ständiger Austausch der lipidierten Peptide statt. Dieser Trans-Doppelschicht- oder Flip-Flop-Austausch muß bei der Bestimmung kinetischer Parameter des Intervesikeltransfers berücksichtigt werden. Es ist nämlich nur den Lipopeptiden an der Außenseite möglich, direkt auf die Akzeptorvesikel überzugehen. Die im Innern gebundenen Peptide können erst nach Durchquerung der Doppelschicht mittels Flip-Flop transferiert werden.^[106, 107] Deshalb ist es

notwendig, vor den eigentlichen Messungen zum Intervesikeltransfer, die Geschwindigkeit des Trans-Doppelschicht-Austausches zu ermitteln.

Dieser Prozeß kann durch die Verwendung von Natriumdithionit verfolgt werden, das selektiv die Nitrogruppe des NBD-Markers zur Aminofunktion reduziert und dadurch dessen Fluoreszenz löscht.^[108, 109]

Direkt nach der Zugabe des Dithionits zu den beladenen Vesikeln war bei beiden Proben ein steiler Abfall der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Dies war auf die sofortige Reduktion der NBD-Gruppen von Lipopeptiden auf der Außenseite zurückzuführen. Die verbleibende Fluoreszenz wurde wesentlich langsamer gelöscht, da die Peptide im Innern erst durch die Doppelschicht diffundieren mußten, um reduziert zu werden. Aus diesem Absinken ließ sich deshalb die Geschwindigkeit des Flip-Flop-Austausches ablesen (Abb. 14).

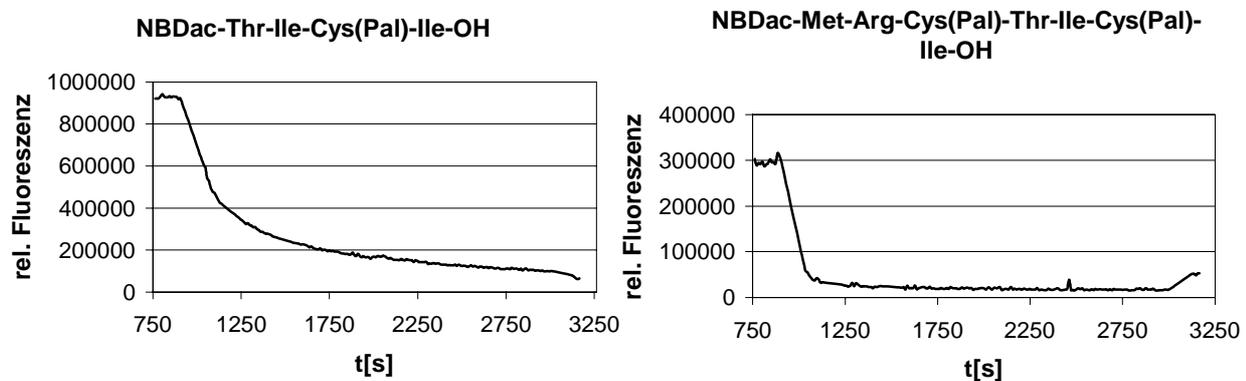


Abb. 14: Fluoreszenzverläufe beim palmitoylierten Tetrapeptid (**47**) und doppelt palmitoylierten Heptapeptid (**39**) nach Natriumdithionit-Zugabe

Im Falle des palmitoylierten Tetrapeptids (**47**) wurden etwa 40 % der Gesamtfluoreszenz sofort gelöscht. Die Verteilung des Lipopeptids zwischen der Innen- und Außenseite der Vesikel beträgt also ungefähr 60 : 40. Noch drastischer war dieser Effekt beim doppelt palmitoylierten Heptapeptid (**39**). Nach Zugabe des Natriumdithionits fiel die Fluoreszenz binnen Sekunden auf 20 % des Anfangswertes. Es ist deshalb von einer stark asymmetrischen Verteilung auszugehen, bei der sich 80 % des lipidierten Peptides auf dem Vesikeläußeren befinden.

Bei einer Kinetik erster Ordnung sollte der Bereich der langsamen Fluoreszenzabnahme durch eine einfache Exponentialfunktion angepaßt werden können. Um die Geschwindigkeitskonstante zu bestimmen, war es allerdings notwendig, einen Linearanteil einzurechnen. Der beobachtete Prozess scheint demnach komplexer zu sein als bisher angenommen.

Für den Flip-Flop-Austausch des Tetrapeptids (**47**) ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante von 0.0035/s, was einer Halbwertszeit von 3.30 Minuten entspricht. Diese Werte lagen

somit in der gleichen Größenordnung wie die für den Trans-Vesikel-Austausch monofarnesylierter und carboxymethylierter Peptide beschrieben.^[83] Die Ermittlung dieser Parameter für das zweifach palmitoylierte Heptapeptid (**39**) gestaltete sich etwas schwieriger, da wegen des sehr starken Abfalls zu Beginn, die Amplitude der langsamen Fluoreszenzlöschung recht klein war. Die Geschwindigkeitskonstante betrug hier 0.0004/s, woraus eine Halbwertszeit von circa 29 Minuten resultiert.

4.2.2. Intervesikeltransfer des palmitoylierten Tetrapeptids

Um die Kinetik des Intervesikelaustauschs zu untersuchen, war es notwendig, die Modellmembranen neben dem NBD-markierten Tetrapeptid (**47**) auch mit dem nichtaustauschbaren Fluoreszenzquencher *N*-(Lissamin-rhodamin-sulfonyl)phosphatidylethanolamin (**56**)^[110] zu beladen (Abb. 15).

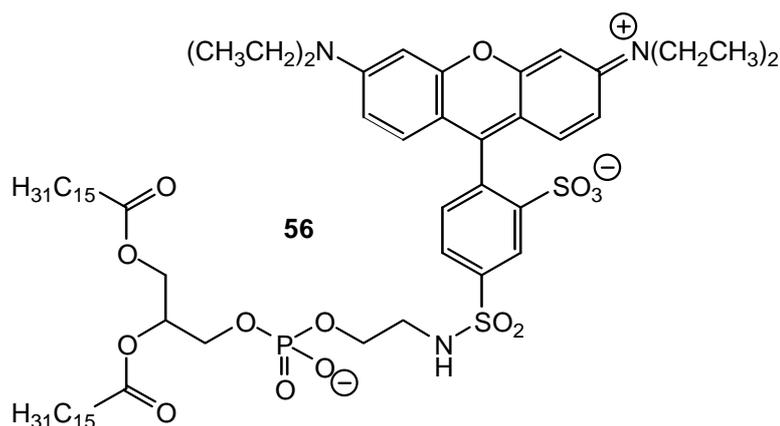


Abb. 15: Struktur des verwendeten Fluoreszenzquenchers

Dieser löscht durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer die Fluoreszenz der NBD-Gruppe. Sitzen sowohl Quencher als auch markierte Substanz im selben Vesikel, ist bei der Emissionswellenlänge des NBD kein Signal detektierbar. Erst beim Transfer des Peptids auf unbeladene Akzeptorvesikel ist ein Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm sichtbar.

Nachdem die Akzeptorvesikel zugegeben wurden, konnte deshalb eine exponentiell anwachsende Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 16).

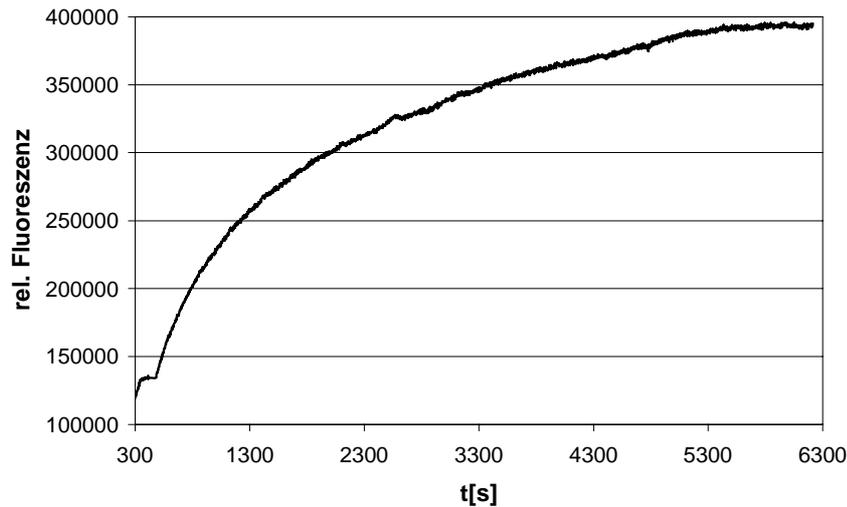


Abb. 16: Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität beim Intervesikeltransfer des palmitoylierten Tetrapeptids (**47**) (achtfacher Akzeptorvesikelüberschuß)

Da sich dieser Prozeß aus dem direkten Übergang von der Außenseite und dem Transfer der Peptide an der Innenseite, die zuerst durch Flip-Flop diffundieren müssen, zusammensetzt, war der Austausch nicht durch eine einfache exponentielle Kurvenanpassung zu beschreiben. Die Geschwindigkeitskonstante k_{diss} konnte aber mit einer exponentiellen Funktion bestimmt werden, in die die kinetischen Parameter des Flip-Flops als Linearanteil eingerechnet wurden. Eine doppelt exponentielle Anpassung ergab vergleichbare k_{diss} -Werte. Die kinetischen Daten für die Messungen mit verschiedenen Überschüssen an Akzeptorvesikeln sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten für den Intervesikelaustausch des Tetrapeptids (**47**)

Überschuß an POPC-Akzeptorvesikeln	Geschwindigkeitskonstante k_{diss} [1/s]	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [min]
4fach	$6.0 \cdot 10^{-4}$	19.3
8fach	$1.3 \cdot 10^{-3}$	8.9
12fach	$1.4 \cdot 10^{-3}$	8.3

Die Ergebnisse zeigen, daß das einfach palmitoylierte Peptid mit Halbwertszeiten von wenigen Minuten zwischen den Vesikeln austauscht, wenn ein genügend großer Überschuß an

Akzeptorvesikeln vorliegt, um den Einfluß des Rücktransfers auf die quencherbladenen Vesikel zu minimieren. Eine einzelne Palmitoylierung kann demnach noch keine stabile Membraninsertion herbeiführen.

Die bei 20°C gemessenen Geschwindigkeitskonstanten befinden sich innerhalb der gleichen Größenordnung wie die in früheren Experimenten für monofarnesylierte Peptide bei 15°C ermittelten,^[83] liegen aber um den Faktor vier niedriger. Dies liegt im größeren hydrophoben Effekt der unpolaren Palmitoyl-Kette begründet, der einen im Vergleich zum Farnesyl-Rest langsameren Austausch bewirkt.

4.2.3. Intervesikeltransfer des zweifach palmitoylierten Heptapeptids

In einer weiteren Meßreihe wurden Vesikel eingesetzt, die neben dem Fluoreszenzquencher auch das doppelt palmitoylierte Heptapeptid (**39**) des Hämagglutinin-C-Terminus enthielten. Durch Vergleich mit den kinetischen Daten des einfach lipidierten Tetrapeptids (**47**) sollte ermittelt werden, inwieweit die zweite Modifizierung die Stabilität der Membranbindung beeinflusst.

Der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten für das Heptapeptid und das Tetrapeptid wurden bei 20°C sechzehn Stunden beobachtet (Abb. 17).

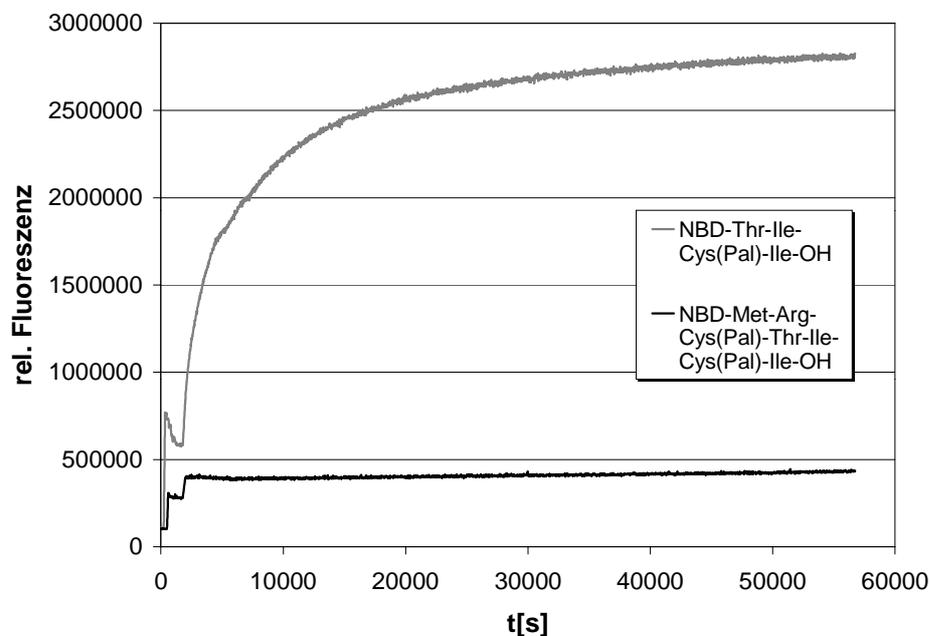


Abb. 17: Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität beim Intervesikeltransfer des palmitoylierten Tetrapeptids (**47**) und des doppelt palmitoylierten Heptapeptids (**39**)

Bei dieser Langzeitmessung ergab sich für den Austausch des Tetrapeptids (**47**) mit achtfachem Akzeptorvesikelüberschuß im Vergleich zum vorherigen Versuch ein kleinerer k_{diss} -Wert von $1.9 \cdot 10^{-4}/\text{s}$, wenn der gesamte Kurvenverlauf angepaßt wurde. Die Analyse der ersten 6000 s lieferte einen vergleichbaren Wert für k_{diss} , so daß dieses Ergebnis innerhalb des kürzeren Zeitbereichs reproduziert werden konnte. Die Abweichung bei der Auswertung der gesamten Austauschdauer zeigt, daß der zusammengesetzte Prozeß aus dem vorgelagerten Gleichgewicht des Flip-Flop-Austauschs und des anschließenden Transfers auf die unbeladenen Vesikel zu komplex ist, um ihn selbst mit doppeltexponentiellen Anpassungen zu erfassen. Da viele in der Vergangenheit durchgeführte biophysikalische Messungen zum Intervesikeltransfer nur über recht kurze Zeiträume verfolgt wurden,^[83] trat dieses Problem bisher noch kaum in Erscheinung.

Beim doppelt lipidmodifizierten Heptapeptid (**39**) war kein nennenswerter Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtbar. Dadurch konnte bewiesen werden, daß zumindest bei 20°C kein Transfer auf die Akzeptorvesikel erfolgt. Die zweifache Anbindung des Palmitoyl-Restes sorgt demnach für eine feste Verankerung dieses Peptids in den quencherbeladenen Vesikeln. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, die in früheren Studien für doppelt lipidmodifizierte *Ras*-Proteinfragmente ermittelt wurden.

Für den C-Terminus des Influenza-A-Hämagglutinins läßt sich daraus schließen, daß er durch die zweite Fettsäure-Acylierung stabil an die Hüllmembran des Virus gebunden wird, solange keiner der Thioester hydrolysiert wird. Mit nur einer Lipidierung ist nach wie vor ein Wechsel zwischen verschiedenen Membranen möglich.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sind Untersuchungen denkbar, die weitere noch unklare Aspekte der Virus-Infektion und der posttranslationalen Lipidierung des Proteins betreffen. Da die Palmitoylierungen an Membranfusionen beim Eintritt des Virus in die Zelle beteiligt sind, könnte die Verankerung des C-Terminus in der Membran entscheidenden Einfluß auf diese Prozesse besitzen. Auch für die Biosynthese des Lipoproteins sind diese Bindungseigenschaften von Interesse. Da die Anknüpfung nur eines Palmitoyl-Restes immer noch die Diffusion zwischen verschiedenen Membranen zuläßt, der zweite aber eine stabile Insertion nach sich zieht, wären Rückschlüsse auf den Ort der biosynthetischen Einführung der Lipidierungen möglich. Um diese Vermutungen zu stützen, sind allerdings weiterführende virale Assays notwendig, in denen sich auch die synthetisch dargestellten lipidierten Peptide der C-terminalen Sequenz des Hämagglutinins als nützliche Werkzeuge erweisen könnten.

4.3. Synthese der fluoreszenzmarkierten C-terminalen geranylgeranylierten Heptapeptidsequenz des *RhoA*-Proteins

4.3.1. Plan zur Synthese des geranylgeranylierten Heptapeptids

Da das Zielmolekül der Synthese in einer Cokristallisationsstudie Aufschlüsse über die Wechselwirkungen der Geranylgeranylmodifizierung und der Lysin-Domäne des *RhoA*-Proteins mit *RhoGDI* liefern soll, besitzt es sowohl eine modifizierte Cystein-Seitenkette als auch die drei freien Aminofunktionalitäten der Lysine. Deren Nukleophilie schließt eine Einführung des Isoprenyl-Restes am bereits vollständig aufgebauten und seitenkettenentschützten Peptid aus, da die Konkurrenzreaktion der *N*-Prenylierung (siehe Kapitel 2.2.1.) in erheblichem Maße stattfinden könnte. Die selektive Einführung des Geranylgeranyl-Restes müßte deshalb bei geschützten Lysin-Aminogruppen aber freier Cystein-Thiofunktion erfolgen, was eine erheblich kompliziertere Schutzgruppenstrategie erfordern würde. Aus diesem Grund erschien es sinnvoller, bereits das Cystein-Monomer zu geranylgeranylieren und den isoprenylierten Baustein für die Kupplungen einzusetzen.

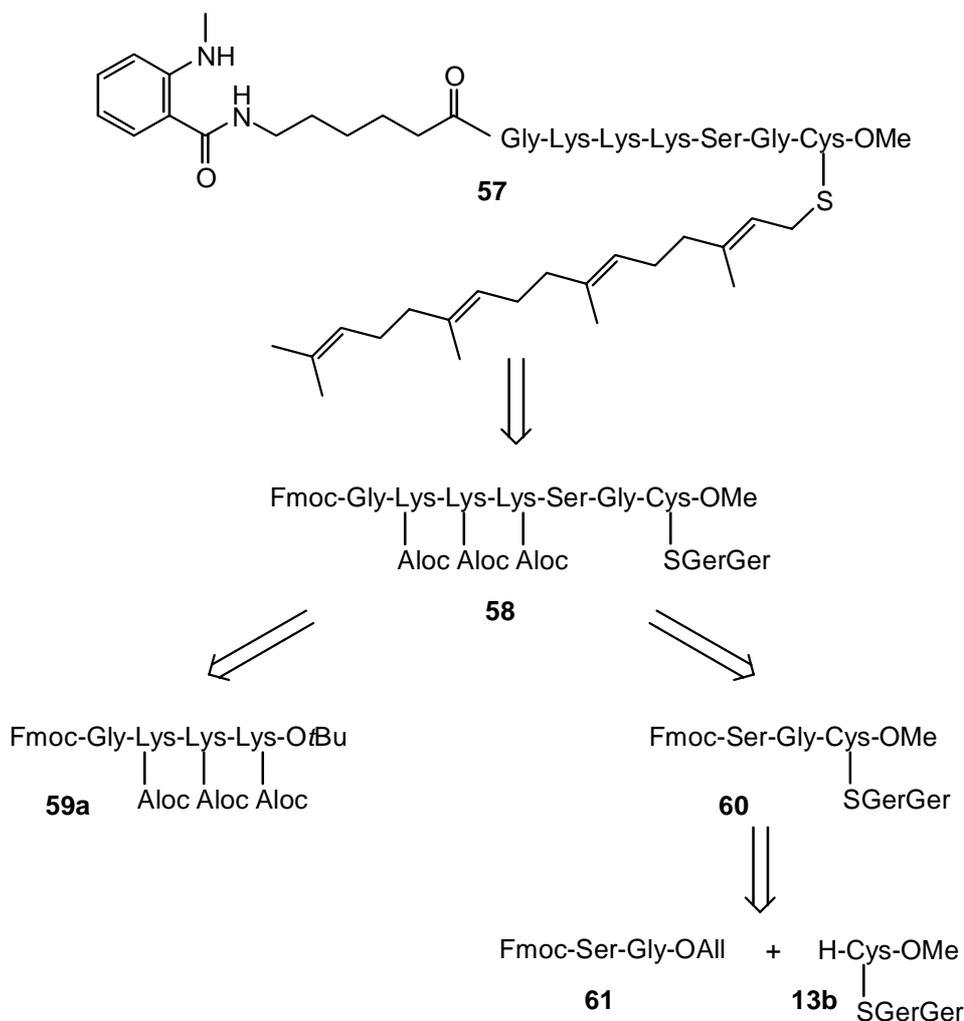
Der Plan zur Synthese des *RhoA*-Heptapeptids gliedert sich in die Synthese des C-terminalen geranylgeranylierten Tripeptidbausteins, des N-terminalen Tetrapeptidbausteins und deren Kondensation mit anschließender Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers *N*-Methylantranilsäure (Schema 27).

Die Darstellung des lipidmodifizierten Tripeptids (**60**) soll durch Kupplung des C-terminal entschützten Dipeptids mit dem erwähnten, schon auf der Stufe des Monomers geranylgeranylierten Cysteinbausteins (**13b**) erfolgen. Diese Strategie ist notwendig, da bei einer linearen Synthese die N-terminale Entschätzung zum Dipeptidmethylester eine Diketopiperazinbildung nach sich ziehen könnte. Bei der Wahl der N-terminalen Schutzgruppe muß die Säureempfindlichkeit des Isoprenoids berücksichtigt werden. Deshalb findet an dieser Stelle die basisch abspaltbare Fmoc-Gruppe Verwendung.

Für das Tetrapeptid (**59a**) ist ausgehend von H-Lys(Aloc)-*Ot*Bu eine lineare Synthese geplant. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sowohl dessen N-terminale Schutzgruppe als auch die Blockierungen der Lysin-Seitenketten erst nach der Verknüpfung mit dem modifizierten Tripeptid und damit im Beisein des Geranylgeranyl-Restes entfernt werden. Eine acidolytische Deblockierung scheidet darum an diesen Stellen aus. Mit der Fmoc- und der Aloc-Gruppe

stehen allerdings zwei orthogonale Schutzgruppen zur Verfügung, deren Abspaltungsbedingungen den Isoprenyl-Rest nicht beeinflussen.

Diese Betrachtungen zeigen, daß sich die Schutzgruppenproblematik aufgrund der gewählten Strategie allein durch etablierte Schutzfunktionen lösen lassen müßte.

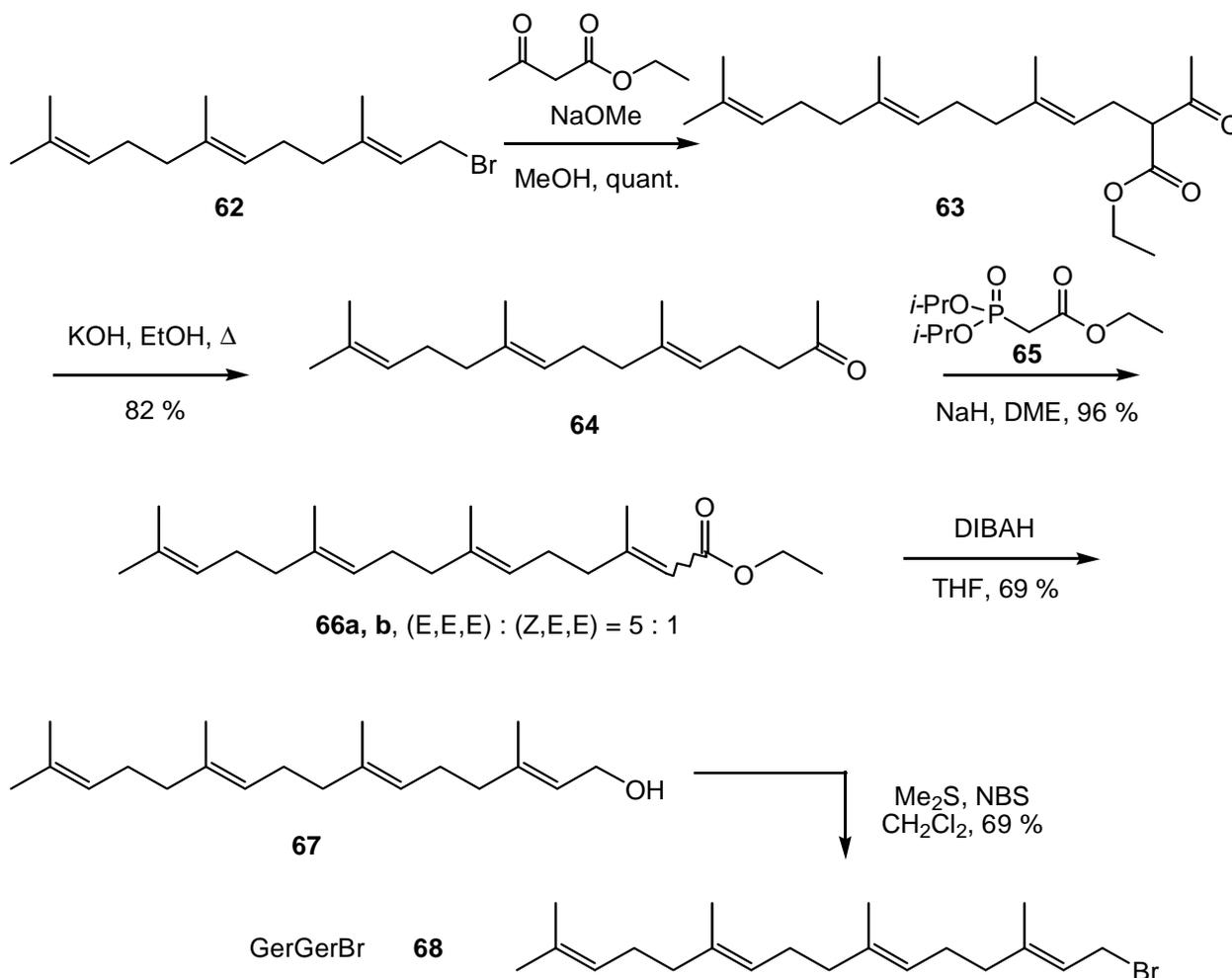


Schema 27: Plan zur Synthese des fluoreszenzmarkierten geranylgeranylierten *RhoA*-heptapeptids (57)

4.3.2. Darstellung des C-terminalen geranylgeranylierten Tripeptids

Vor der eigentlichen Peptidsynthese mußte all-*trans*-Geranylgeraniol (67) dargestellt werden. Für den stereoselektiven Aufbau dieses C₂₀-Isoprens sind eine Vielzahl von Methoden literaturbekannt.^[111-115] Die geringste Anzahl an Reaktionsschritten beinhaltet die Synthese ausge-

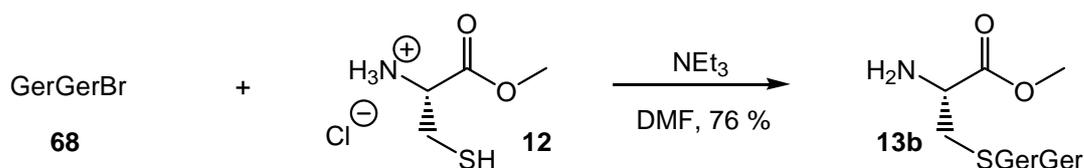
hend von kommerziell erhältlichem all-*trans*-Farnesylbromid (**62**).^[116] Da sich diese darüberhinaus nur wohletablierter Verfahren bedient, schien sie die praktikabelste zu sein. Durch nukleophilen Angriff am all-*trans*-Farnesylbromid (**62**) nach der Acetessigestermethode wurde im ersten Schritt das Kohlenstoffgrundgerüst erweitert. Die anschließende Verseifung des Esters und die Decarboxylierung der resultierenden Carbonsäure ermöglichten die Darstellung des all-*trans*-Farnesylacetons (**64**) in hoher Ausbeute.^[117] Die Einführung der vierten Doppelbindung erfolgte durch eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit Diisopropylethylphosphonoacetat (**65**). Zwar verlief diese Umsetzung mit hoher Ausbeute, der in der Literatur angegebene Isomerenüberschuß (15 : 1) konnte aber bei weitem nicht erreicht werden. Für die letzte Synthesestufe wurde die Literaturvorschrift leicht variiert und Di-*iso*-butylaluminiumhydrid (DIBAH) statt einer Lithiumaluminiumhydrid/Aluminiumhydrid-Mischung zur Reduktion des Esters (**66**) verwendet.^[118] Die Reaktion selbst verlief zwar mit quantitativem Umsatz, durch Probleme bei der säulenchromatographischen Trennung des all-*trans*- vom *cis,trans,trans*-Isomer wurde aber die Ausbeute erniedrigt (Schema 28).



Schema 28: Darstellung von all-*trans*-Geranylgeraniol (**67**) mit anschließender Bromierung

Im Anschluß an die Darstellung des Geranylgeraniols mußte der Alkohol in das entsprechende Bromid überführt werden, um ihn für den nukleophilen Angriff der Thiofunktion des Cysteins zu aktivieren. Dies gelang am besten mittels *N*-Bromsuccinimid in Anwesenheit von Dimethylsulfid.^[119] Mit dieser sehr milden Methode wurde keine Beeinträchtigung der säurelabilen Doppelbindungen des Isoprens beobachtet, so daß das Geranylgeranyl bromid (**68**) in hoher Ausbeute entstand (Schema 28).

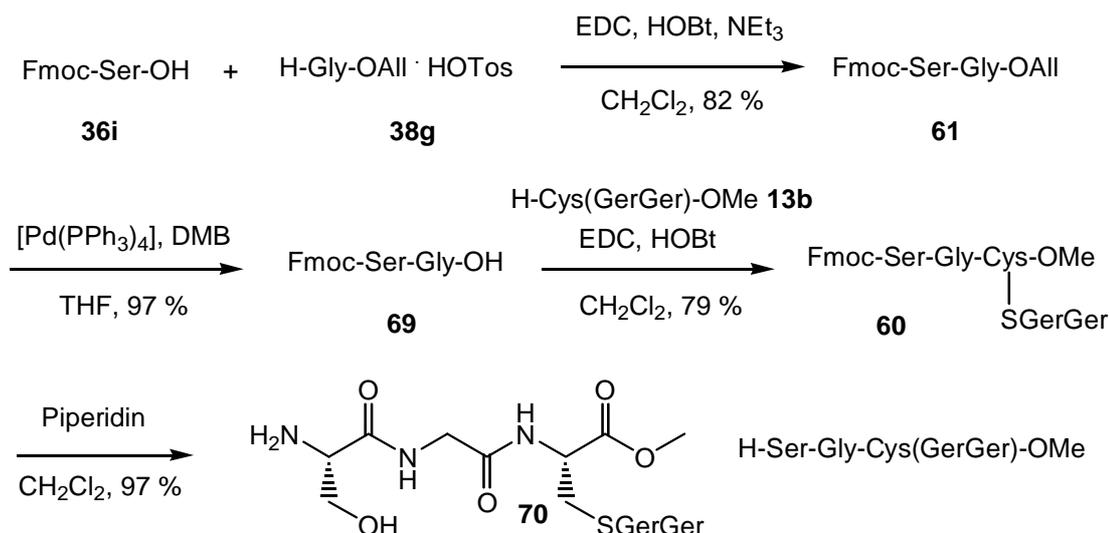
Zur Einführung der Seitenkettenmodifizierung wurde das dargestellte Geranylgeranyl bromid (**68**) unter Verwendung von Triethylamin als Base mit käuflichem L-Cystein-methylesterhydrochlorid (**12**) umgesetzt.^[120] Die Alkylierung erfolgte bei einem leichten Überschuß des Cystein-Derivats trotz des freien Amins selektiv am nukleophileren Schwefelatom, so daß der kupplungsfähige isoprenylierte Cystein-Baustein (**13b**) in hoher Ausbeute zugänglich war (Schema 29).



Schema 29: Darstellung des geranylgeranylierten L-Cystein-methylesters (**13b**)

Auf dem hier beschrittenen Weg ist bereits am Cystein-Monomer sowohl die Lipidmodifizierung der Seitenkette als auch die C-terminale Carboxymethylierung eingeführt. Durch diese Vorgehensweise werden präparativ aufwendigere Isoprenylierungsverfahren mit $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ ^[42] oder flüssigem Ammoniak^[41] vermieden, die für Thioether-Bildungen an längeren Peptidketten verwendet werden müssen.

Aus dem geranylgeranylierten L-Cystein-methylester (**13b**) war im Anschluß durch eine Carbodiimid/HOBt-Kupplung mit dem C-terminal freien Dipeptid Fmoc-Ser-Gly-OH (**69**) das gewünschte seitenkettenmodifizierte Tripeptid in hoher Ausbeute darstellbar. Das angeknüpfte Dipeptid konnte zuvor aus Fmoc-Ser-Gly-OAll (**61**) durch palladiumkatalysierte Spaltung des Allylestere mit Dimethylbarbitursäure als Allylfänger gewonnen werden. Nachdem sich die Fmoc-Entschützung am N-Terminus des geranylgeranylierten Tripeptidmethylesters (**60**) nahezu quantitativ durchführen ließ, ergab sich der kupplungsfähige Tripeptidbaustein (**70**) (Schema 30).



Schema 30: Darstellung des N-terminal freien geranylgeranylierten Tripeptids (**70**)

4.3.3. Darstellung des N-terminalen Tetrapeptids

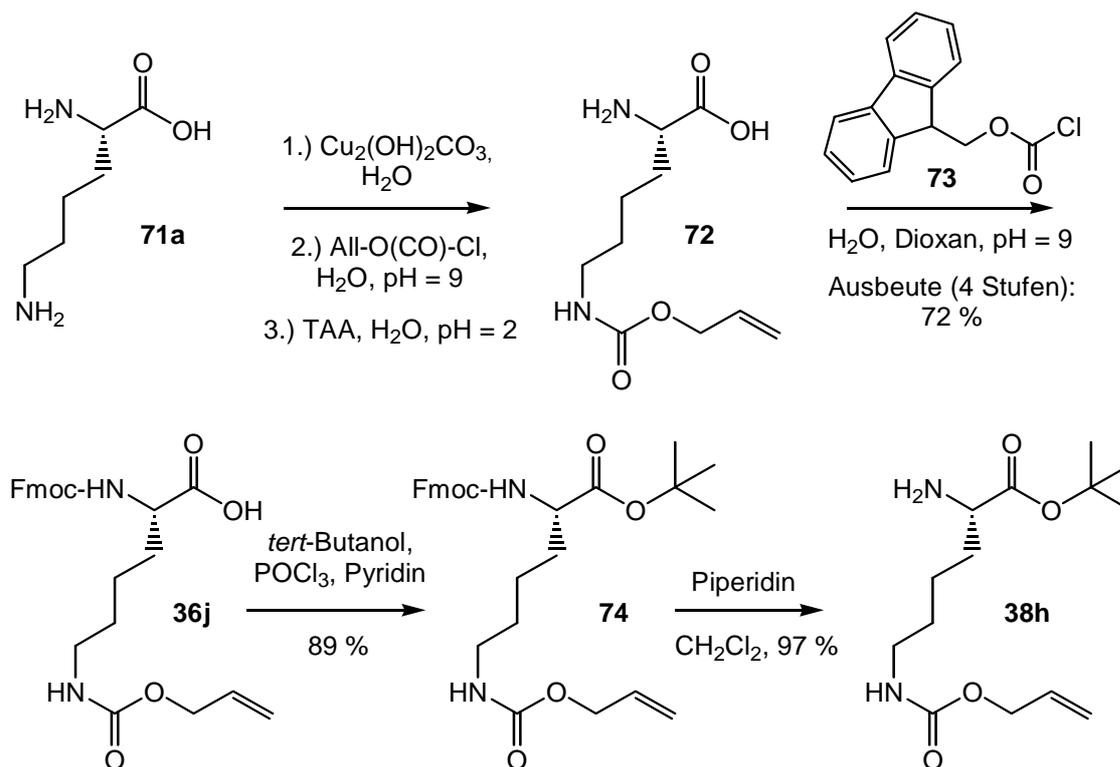
Die lineare Synthese dieses Tetrapeptids, das die Lysin-Domäne der gewünschten Zielstruktur enthält, begann mit der Darstellung des C-terminalen Aminosäureesters, der anschließend in N-terminaler Richtung verlängert wurde.

Die Einführung des *tert*-Butylesters sollte am besten möglich sein, wenn an der eingesetzten Aminosäure außer der zu schützenden Carboxylfunktion alle anderen Funktionalitäten blockiert sind, da auf diesem Wege Löslichkeitsprobleme des Edukts ausgeschlossen werden.

Im Falle des hier eingesetzten L-Lysins (**71a**) waren deshalb zuerst die beiden Aminofunktionalitäten zu schützen. Aufgrund des geringen Reaktivitätsunterschieds der *N*^α- und der *N*^ε-Aminofunktion ist deren selektive Blockierung mit zwei verschiedenen, orthogonal zueinander abspaltbaren Schutzgruppen erschwert. Ein speziell für diese Problemstellung entwickeltes Verfahren bedient sich Kupfer(II)-Ionen, an die das Lysin (**71a**) mit seiner *N*^α-Aminogruppe und seiner Carboxylfunktion koordiniert.^[121] Der sich bildende Kupferkomplex kann selektiv an der freien *N*^ε-Funktionalität geschützt werden. Nach Freisetzung des einfach blockierten Lysins (**72**) durch Fällung des Kupfers als Sulfid oder dessen Komplexierung mit EDTA^[122] ist dann das freie *N*^α-Amin zugänglich und kann mit der zweiten Schutzgruppe versehen werden.

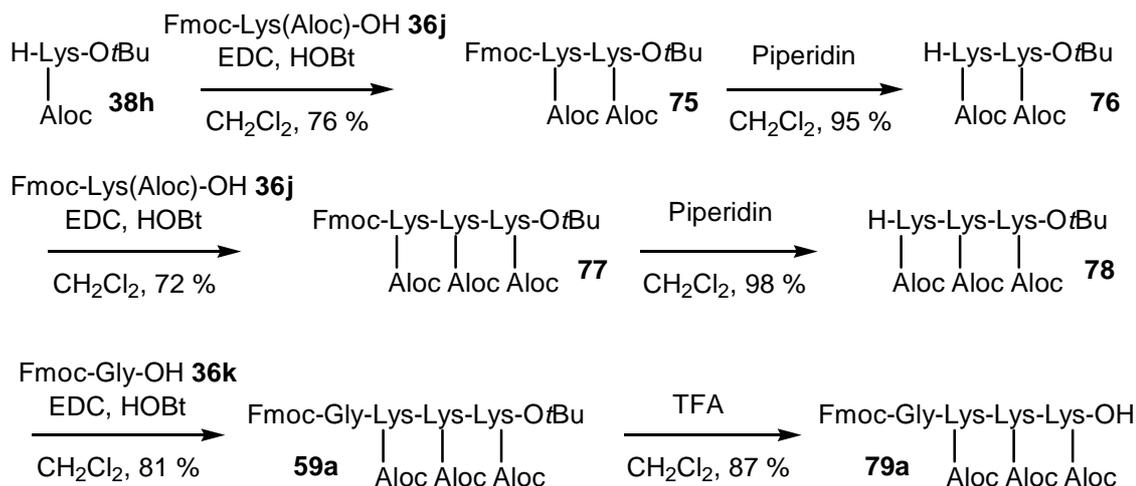
Dieser Methode folgend, war es möglich die Lysin-Seitenkette mit Aloc und die *N*^α-Funktionalität mit Fmoc selektiv in hoher Ausbeute zu schützen (Schema 31).

Das erhaltene Fmoc-Lys(Aloc)-OH (**36j**) wurde durch Phosphorylchlorid im Beisein von Pyridin aktiviert und mit *tert*-Butanol zum vollständig blockierten L-Lysin (**74**) umgesetzt. Bei dieser Reaktion mußte unterhalb von 0°C gearbeitet werden, um eine Epimerisierung des Lysins an seinem α -Kohlenstoffatom zu vermeiden. Nach Abspaltung der N^α -Fmoc-Gruppe ergab sich der (N^ϵ -Allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester (**38h**), der als Ausgangssubstanz für die lineare Tetrapeptidsynthese diente (Schema 31).



Schema 31: Darstellung des kupplungsfähigen C-terminalen Lysin-Bausteins (**38h**)

Der Aufbau des Tetrapeptids erfolgte durch abwechselnde Peptidknüpfung mit der Carbodiiimid/HOBt-Methode und Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin. Die jeweiligen Kupplungsschritte verliefen in hohen Ausbeuten von über 70 %, die Entfernung der Fmoc-Gruppen war immer annähernd quantitativ möglich. Die entstehenden Zwischenstufen mit freier Aminfunktion (**76**) und (**78**) waren problemlos säulenchromatographisch aufzureinigen. Dadurch konnte das Tetrapeptid Fmoc-Gly-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-*Ot*Bu (**59a**) synthetisiert und danach durch Freisetzung des C-Terminus mit Trifluoressigsäure in die kupplungsfähige Form (**79a**) überführt werden (Schema 32).

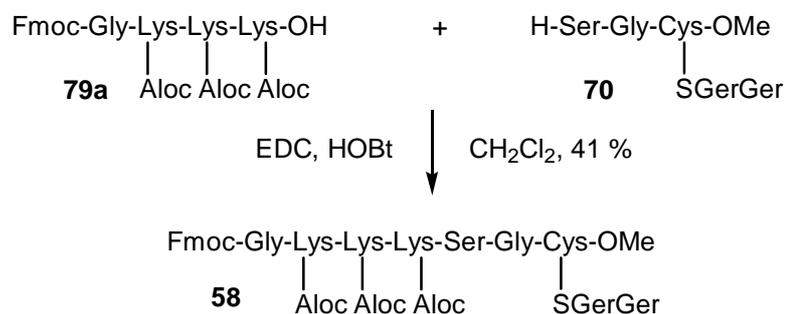


Schema 32: Darstellung des N-terminalen Tetrapeptids (**79a**)

Zusammen mit dem in Kapitel 4.3.2 dargestellten N-terminal freien geranylgeranyierte Tripeptid (**70**) lagen somit beide Fragmente vor, um das gewünschte Heptapeptid darzustellen.

4.3.4. Kupplung zum geranylgeranyierte Heptapeptid und Versuch der Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers

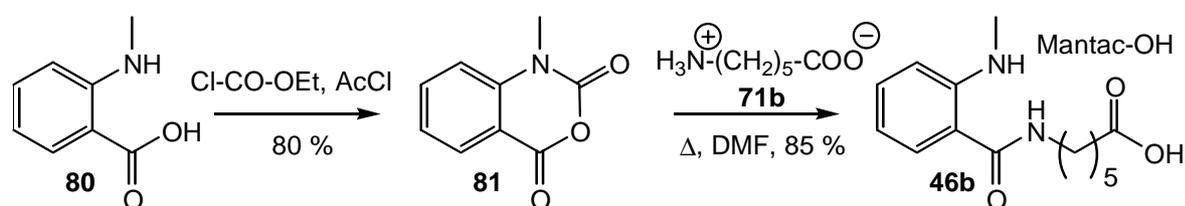
Eine Fragmentkondensation der beiden Peptide Fmoc-Gly-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-OH (**79a**) und H-Ser-Gly-Cys(GerGer)-OMe (**70**) mit der Carbodiimid/HOBt-Methode ergab den geranylgeranyierte Heptapeptidmethylester (**58**) (Schema 33).



Schema 33: Knüpfung zum geranylgeranyierte Heptapeptidmethylester (**58**)

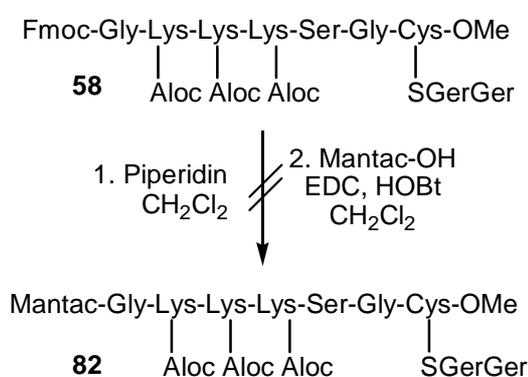
Der Kupplungsschritt verlief nur mit mäßiger Ausbeute. Allerdings stand dies im Einklang mit einer Reihe anderer Erfahrungswerte, die bei der Knüpfung von Peptiden mit N-terminal

freiem Serin und ungeschützter Hydroxylfunktion gesammelt wurden.^[123, 124] Es wurde jedoch keine Nebenreaktion dieser Seitenkettenfunktionalität mit der aktivierten Carboxylfunktion beobachtet. Grundlegendes Problem war vielmehr der äußerst geringe Umsatz der beiden Edukte, von denen jeweils ungefähr 40 % der eingesetzten Mengen reisoliert werden konnten. Zur Markierung des Heptapeptids wurde *N*-Methylantranilsäure (**80**) gewählt. Diese Gruppe bot sich wegen ihrer kompakten Struktur und ihrer recht hohen Stabilität an. Ihre Carboxylfunktion wurde zunächst durch Überführung in das *N*-Methylisatosäure-anhydrid (**81**) aktiviert.^[125] Dessen Umsetzung mit Aminocaprinsäure (**71b**) ermöglichte bei einer Reaktions-temperatur von 100°C die Anbindung des Spacers (Schema 34). Wegen dieser doch recht drastischen Bedingungen wurde auf eine direkte Anknüpfung der *N*-Methylantranilsäure an die N-terminale Aminofunktion des Peptids verzichtet.



Schema 34: Einführung des Aminocaprinsäure-Spacers an *N*-Methylantranilsäure (**80**)

Die N-terminale Deblockierung des Heptapeptids (**58**) durch Fmoc-Abspaltung mit Piperidin verlief zwar laut DC-Kontrolle mit quantitativem Umsatz, doch konnte das stark polare, entschützte Heptapeptid nicht durch Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt werden. Das Rohprodukt war hingegen nicht geeignet, um in einer Kupplungsreaktion mit der fluoreszierenden Verbindung (**46b**) das markierte Heptapeptid (**82**) zu liefern (Schema 35).



Schema 35: Versuch der Anknüpfung des Markers am Heptapeptid

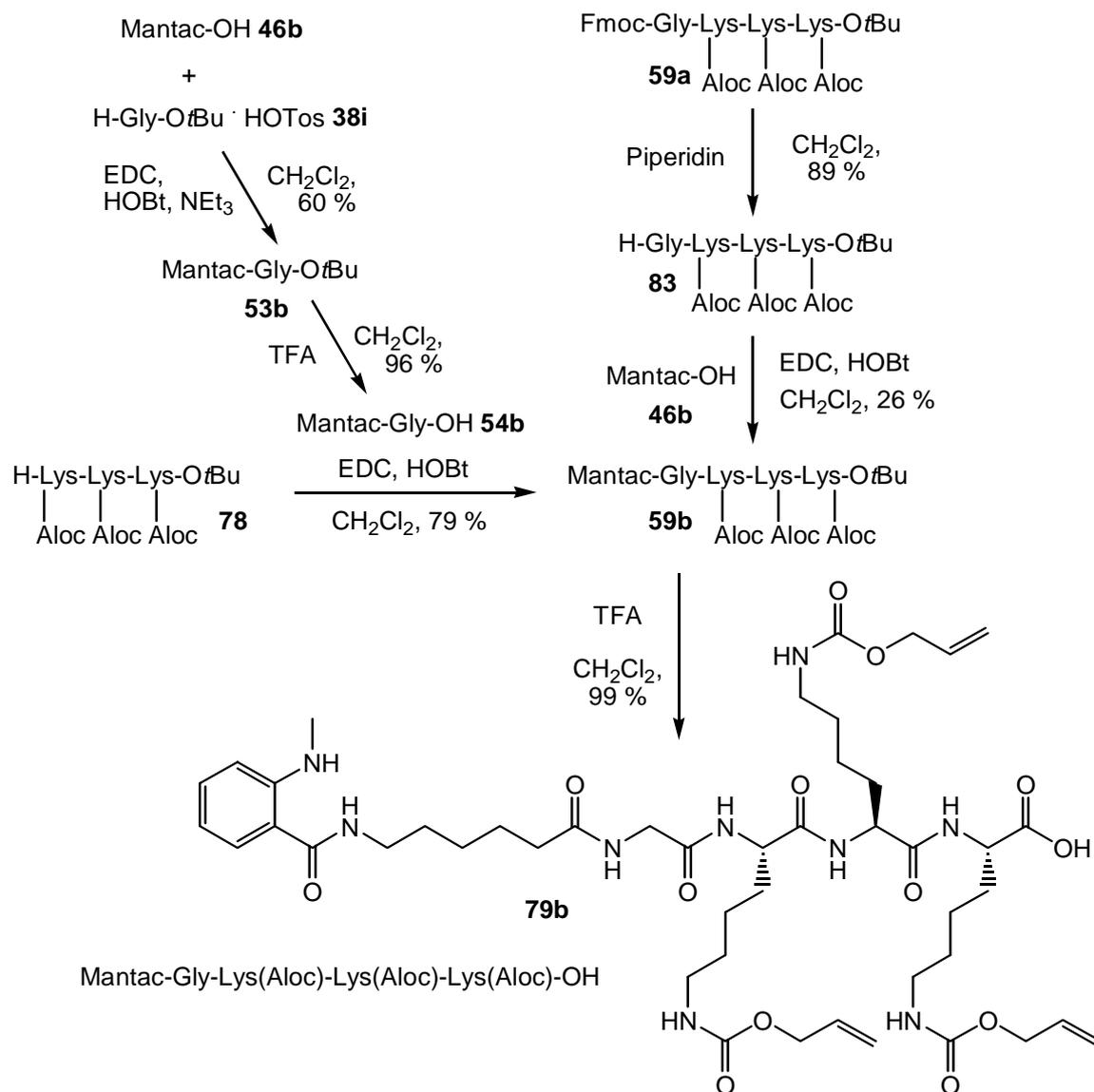
Die Probleme bei der Aufreinigung des N-terminal freien Heptapeptidmethylesters verhin-
derten demnach die Darstellung der Zielverbindung auf dem anfangs geplanten Syntheseweg.
Durch eine veränderte Strategie, die die Einführung der fluoreszierenden Gruppe zu einem
früheren Zeitpunkt vorsieht, sollte diese Schwierigkeit umgangen werden.

4.3.5. Darstellung des N-terminalen fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids

Der variierte Synthesepfad beinhaltet die Darstellung der bereits fluoreszenzmarkierten N-
terminalen Tetrapeptidsequenz des Zielmoleküls. Die Kupplung dieser Zwischenstufe mit
dem geranylgeranylierten Tripeptid (**70**) würde dann direkt das Mantac-modifizierte Hepta-
peptid (**82**) liefern, von dem im Anschluß nur noch die Seitenkettenschutzgruppen entfernt
werden müßten.

Der markierte Tetrapeptidbaustein konnte auf zwei verschiedenen Wegen dargestellt werden.
Zum einen wurde die lineare Synthese des Tetrapeptids Fmoc-Gly-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-
Lys(Aloc)-OtBu (**59a**) um eine Fmoc-Abspaltung und die Anknüpfung von Mantac-OH (**46b**)
erweitert. Zum anderen wurde nach einer konvergenteren Strategie, das N-terminal freie Tri-
peptid H-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-OtBu (**78**) mit Mantac-markiertem Glycin (**54b**)
gekuppelt. Durch die Stabilität der Mant-Gruppe bezüglich sauren Bedingungen bereitete die
anschließende *tert*-Butylester-Spaltung keine Probleme und verlief nahezu quantitativ (Sche-
ma 36).

Die Variante über die Anbindung des fluoreszenzmarkierten Glycins (**54b**) erwies sich als
weitaus erfolgreicher, da sie in wesentlich höherer Gesamtausbeute zum C-terminal freien
Tetrapeptid (**79b**) führte. Dafür waren Aufreinigungsprobleme bei der alternativen Synthese-
route verantwortlich. Das N-terminal freie Tetrapeptid (**83**) war aufgrund seiner Polarität
durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Triethylamin-versetztem Laufmittelgemisch
nicht vollständig von Piperidin- und Triethylamin-hydrosalz zu befreien. Die anschließende
Reaktion mit dieser noch verunreinigten Aminokomponente lieferte deshalb eine sehr niedri-
ge Ausbeute an *N*-Methylantranilsäure-markiertem Tetrapeptid (**59b**).



Schema 36: Synthese des kupplungsfähigen fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids (**79b**)

4.3.6. Abschließende Schritte zum fluoreszenzmarkierten Heptapeptid

Es standen nun beide Synthesebausteine für die Blockkondensation zum fluoreszenzmarkierten geranylgeranylierten Heptapeptidmethylester (**82**) zur Verfügung. Um die Löslichkeit der Edukte zu verbessern, wurde die Kupplung statt in Methylenchlorid in einem Gemisch von Chloroform und Trifluorethanol im Verhältnis 3 : 1 durchgeführt. Durch diese Maßnahme lag die Ausbeute mit 52 % deutlich höher als bei der vergleichbaren Kondensation zum Fmoc-geschützten Heptapeptid in Kapitel 4.3.4.. Die abschließende Entschützung der drei Lysin-Seitenkettenfunktionalitäten war in einer Stufe durch palladiumkatalysierte Allylabsplattung in Anwesenheit einer äquimolaren Menge Phenylsilan^[126] oder einem Überschuß Morpholin^[127]

nausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 konnte das Aufarbeitungsproblem allerdings gelöst werden. Somit war das fluoreszenzmarkierte Produkt (**57**), das der lipidmodifizierten C-terminalen Heptapeptidsequenz des *RhoA*-Proteins entspricht, trotz seiner amphiphilen Eigenschaften zugänglich.

Die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von A. Wittinghofer am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund geplante Cokristallisation dieses fluoreszenzmarkierten Heptapeptids mit *RhoGDI* scheiterte allerdings gerade wegen der bereits oben erwähnten Polaritätsverhältnisse im Molekül. Die einzelnen geranylgeranylierten Peptide (**57**) lagerten sich in Lösung bevorzugt untereinander zu micellenartigen Strukturen zusammen, so daß keine Wechselwirkung mit dem *RhoGDI* zu beobachten war. Die Strategie, die Bindungsverhältnisse des *RhoGDI* durch Einbringung eines kurzkettigen Peptidfragments direkt mit den C-terminalen Seitenkettenfunktionalitäten und -modifizierungen des *RhoA*-Proteins zu korrelieren, war demnach nicht erfolgreich. Dies lag im störenden Einfluß der Eigenschaften begründet, die das synthetisch dargestellte Konjugat (**57**) in seiner Gesamtheit zeigt. Die Untersuchung der Wechselwirkung einzelner Strukturelemente wie der Lysin-Domäne oder dem Geranylgeranylrest wurde dadurch verhindert.

4.4. Festphasensynthese von *Ras*-Peptiden mit dem Arylhydrazid-Linker

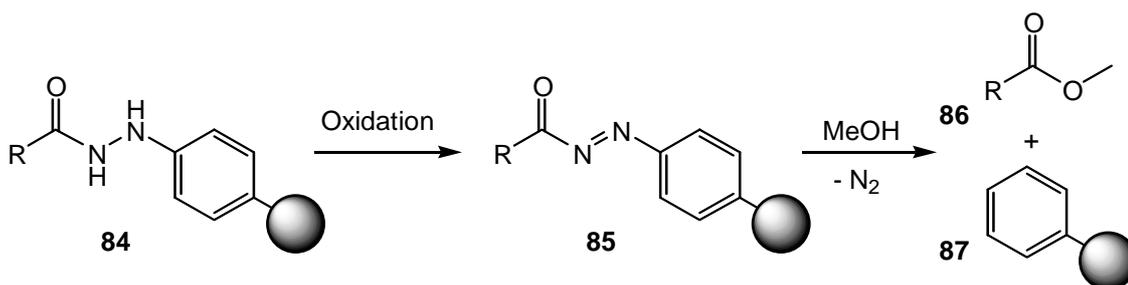
4.4.1. Synthese-Konzept zur Darstellung isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide an fester Phase

Im Gegensatz zu den zahlreichen Beispielen für die Synthese von Lipopeptiden in Lösung fand die Darstellung dieser seitenkettenmodifizierten Peptidklasse an der festen Phase nur wenig Beachtung (siehe Kapitel 2.2.3.). Speziell die Einführung einer Isoprenyl-Modifizierung am Cystein wurde bisher nur in Lösung durchgeführt. Die Anbindung eines Farnesyl- oder Geranylgeranylrestes an die Thiolfunktion eines polymergebundenen Cysteins wäre somit eine völlig neue Methode, die die Darstellung lipidierter Peptide erheblich erleichtern und beschleunigen könnte.

Im Falle von Peptiden, die Teilstrukturen der *Ras*-Proteine entsprechen, ist neben der Anknüpfung von Isoprenoiden am C-terminalen Cystein auch die Methylierung seiner Carboxylfunktion zu beachten. Die meisten gebräuchlichen Linker liefern am peptidischen Produkt

nach seiner Freisetzung vom Harz allerdings die freie Carbonsäure (siehe Kapitel 2.2.3.). Bei Verwendung dieser Ankergruppen wäre ein nachgeschalteter Schritt in Lösung unvermeidbar. Die Einführung von Isoprenyl-Resten am polymeren Träger muß deshalb im Beisein eines Linkers möglich sein, der nach der Synthese die Freisetzung des C-terminalen Methylesters erlaubt.

Um carboxymethylierte Lipopeptide vom Polymer abzulösen, wurde der Arylhydrazidlinker^[128] für die geplante Synthese von *Ras*-Peptiden gewählt (Schema 38).



Schema 38: Prinzip der Spaltung des Arylhydrazid-Linkers zur Darstellung carboxymethylierter Peptide

Dessen Spaltung beinhaltet nach dem Oxidationsschritt zum Aryldiazon (**85**) den Angriff eines Nucleophils. Neben Wasser und Aminen ist in einer Reihe von Synthesen nicht-modifizierter Peptide auch Methanol als Abfangreagenz verwendet worden.^[129] Dadurch konnte im Abspaltungsschritt der Methylester (**86**) erzeugt werden. Die Darstellung carboxymethylierter Lipopeptidkonjugate an fester Phase wäre die Anwendung eines in jüngster Zeit entwickelten Abspaltprinzips auf ein konkretes synthetisches Problem, dessen Beseitigung darüberhinaus zu einer für biologische Untersuchungen interessanten Substanzklasse führen würde.

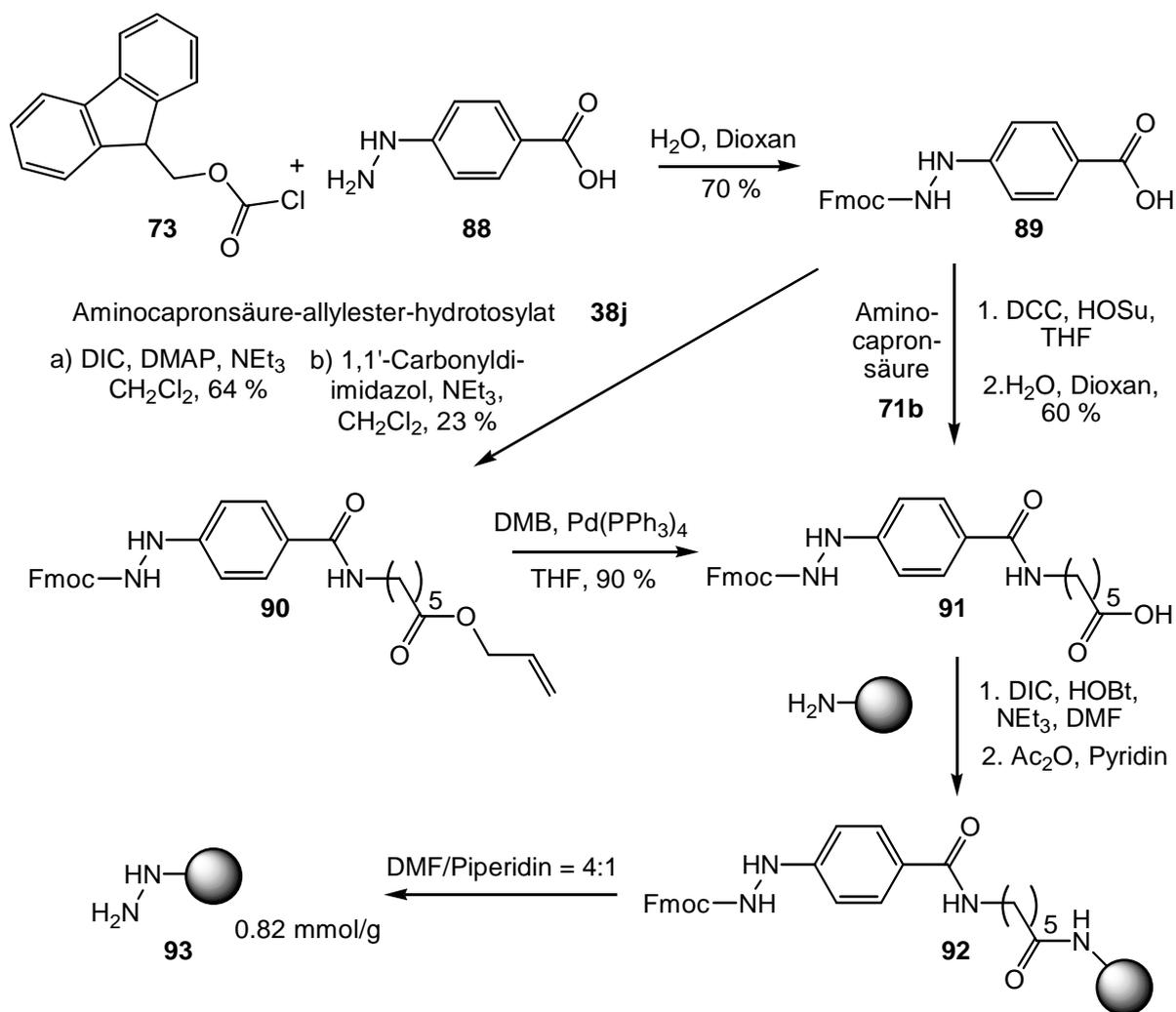
4.4.2. Anknüpfung eines Farnesyl-Restes an festphasengebundenen Cystein mit anschließender Spaltung des Arylhydrazid-Linkers

Vor der Untersuchung der angesprochenen Fragestellungen mußte der Linker am Polymer eingeführt werden. Dazu wurde aminomethyliertes Polystyrolharz durch leichte Abwandlung der Literaturvorschrift^[129] Hydrazin-funktionalisiert.

Mit Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid (**73**) konnte *para*-Hydrazinobenzoesäure (**88**) geschützt werden. Das entstehende Benzoesäure-Derivat (**89**) entspricht einem Fmoc-

geschützten vinylogenen Semicarbazid. Durch dessen geringe Elektrophilie ist die Bildung von Amiden an seiner Carboxylfunktion erschwert. Von einer direkten Anknüpfung der Fmoc-geschützten *para*-Hydrazinobenzoesäure (**89**) am aminomethylierten Polystyrol wurde deshalb abgesehen.

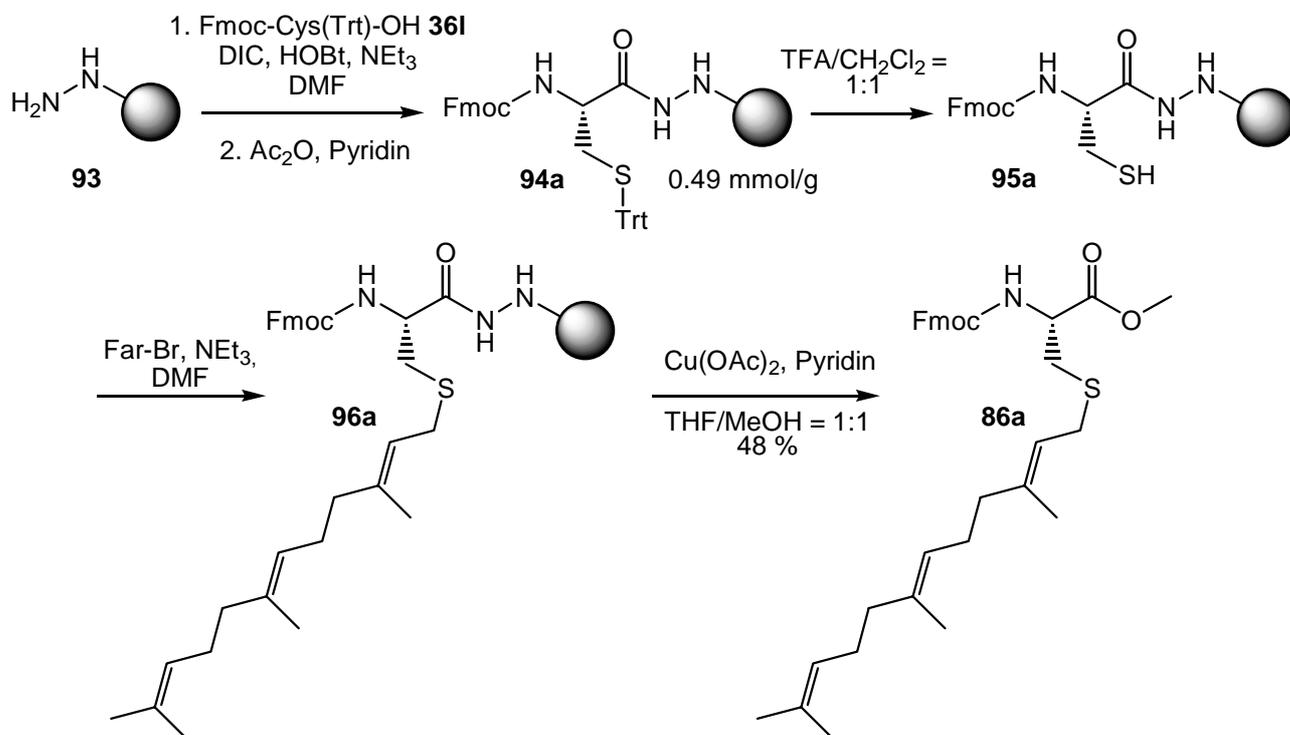
Eine dazwischengeschaltete Spacergruppe mußte auch zunächst an diese unreaktive Säurefunktion gebunden werden. Die Anknüpfung von Aminocaprinsäure in Form ihres Allylesters (**38j**) war mit DIC/DMAP in zufriedenstellender Ausbeute möglich, während die Umsetzung mit 1,1-Carbonylimidazol nur eine niedrige Ausbeute lieferte. Die anschließende Allylesterentschützung ergab das freie Carboxyl-Derivat (**91**). In nur einer Stufe war Verbindung (**91**) durch die Hydroxysuccinimid-Methode darstellbar. Da ein Reaktionsschritt eingespart wurde, erwies sich dieser Weg als praktikabler (Schema 39).



Schema 39: Darstellung der Linkergruppe und Anknüpfung an aminomethyliertes Harz

Die dargestellte Verbindung (**91**) besitzt eine wesentlich reaktivere Carboxylfunktion als die Fmoc-geschützte *para*-Hydrazinbenzoesäure (**89**) und konnte deshalb mit der Carbodiimid/HOBt-Methode an das aminomethylierte Polystyrol gebunden werden. Durch einen anschließenden Capping-Schritt mit Acetanhydrid in Pyridin wurden nicht umgesetzte Aminofunktionalitäten blockiert, um bei den nachfolgenden Stufen unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erhielt man das gewünschte Hydrazin-funktionalisierte Harz (**93**) (Schema 39). Mit dieser Deblockierung konnte gleichzeitig über UV-spektroskopische Bestimmung der Belegungsgrad des Harzes ermittelt werden.^[130]

Die eigentlichen Untersuchungen zur Einführung der Farnesylmodifizierung an fester Phase begannen mit der Anknüpfung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**361**) an das Hydrazin-funktionalisierte Polystyrol (**93**). Anschließend wurde mit Acetanhydrid/Pyridin ein Capping-Schritt durchgeführt. Durch Behandlung des Harzes mit Trifluoressigsäure im Beisein von Triethylsilan^[131] konnte die Thiol-Seitenkettenfunktion des Cysteins freigesetzt werden, um sie dann durch Zugabe von Farnesylbromid und Triethylamin zu alkylieren. Die anschließende Spaltung des Hydrazid-Linkers mit Kupfer(II)-Ionen im Beisein von Methanol als Nukleophil lieferte den gewünschten farnesylierten Fmoc-geschützten L-Cystein-methylester (**86a**) (Schema 40).



Schema 40: Anknüpfung der Farnesylierung mit Einführung des Methylesters

Die erzielte Ausbeute an farnesyliertem Produkt (**86a**) betrug allerdings nur knapp 50 %, bezogen auf die Belegungsbestimmung nach Anknüpfung der *S*-Trityl geschützten Aminosäure. Als eine mögliche Ursache für diesen Befund wurde die *N*-Acylierung des Linkers während des Capping-Schrittes in Betracht gezogen. Diese Vermutung lag wegen der Beobachtungen bei der Anbindung des Palmitoyl-Restes in Lösung im Beisein der Phenylhydrazid-Schutzgruppe nahe (siehe Kapitel 4.1.6.). Das *N*-acylierte Arylhydrazid könnte nicht mehr oxidiert werden, wodurch der gesamte Spaltungsmechanismus des Linkers hinfällig wäre. Deshalb wurde die gesamte Reaktionssequenz wiederholt und dabei der Capping-Schritt ausgespart. Da das Produkt aber in diesem Fall ebenfalls mit einer Ausbeute unter 50 % entstand, scheint dies nicht der Grund für die niedrige Abspaltungsrate zu sein. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen, die sich einer Doppellinkerstrategie bedienen.^[132] Demnach führt das Capping mit Acetanhydrid erst bei mehrmaliger Anwendung und längeren Reaktionszeiten zu einer merklichen *N*-Acylierung des Linkers.

Eine weitere unerwünschte Modifizierung des Arylhydrazids könnte durch den Angriff des Farnesylbromids während der Isoprenylierungsreaktion entstehen. Als Kontrollversuch hierzu wurde Boc-L-cystein-phenylhydrazid in Lösung farnesyliert. Auch mit einem Überschuß an Farnesylbromid zeigte sich eine selektive *S*-Alkylierung. Dies geht konform mit kürzlich durchgeführten Doppellinkerexperimenten an der festen Phase.^[133] Bezüglich der tatsächlichen Ursachen für die mäßige Ausbeute herrscht deshalb weiterhin Unklarheit.

Trotz dieser weiterhin offenen Fragen ist mit den oben beschriebenen Umsetzungen erstmals die Einführung eines Isoprenylrestes an festphasengebundenem Cystein gelungen. Ebenso war die Darstellung des gewünschten Methylesters durch eine Kupfer(II)-vermittelte oxidative Abspaltung vom polymeren Träger möglich. Eine Oxidation des im Produkt vorliegenden Thioethers konnte nicht beobachtet werden. Darüberhinaus blieben auch die Doppelbindungen des Farnesylrestes unversehrt.

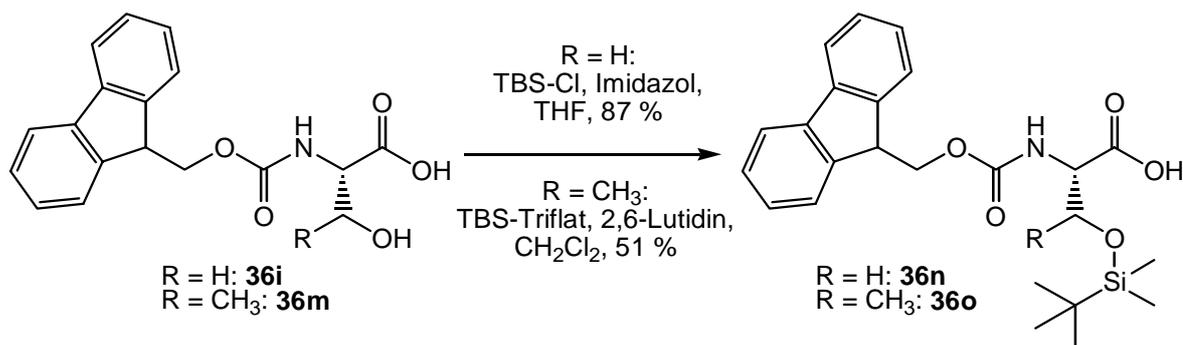
Die gesamte Reaktionssequenz wurde mit käuflichem Hydrazin-funktionalisiertem Polystyrol wiederholt. Es ergaben sich die gleichen Resultate. Das durch Anbindung von Fmoc-hydrazinobenzoyl-aminocaprinsäure modifizierte Polymer fand in den folgenden Umsetzungen keine Verwendung mehr.

Damit sind zumindest die Grundlagen für die Festphasensynthese isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide unter Verwendung des Arylhydrazid-Linkers geschaffen. Durch den Aufbau der C-terminalen Undecapeptidsequenz des *K-Ras*-Proteins sollte die Leistungsfähigkeit dieser neuen Methode getestet werden.

4.4.3. Versuche zur Synthese des farnesylierten und carboxymethylierten C-terminalen K-Ras-Undecapeptids

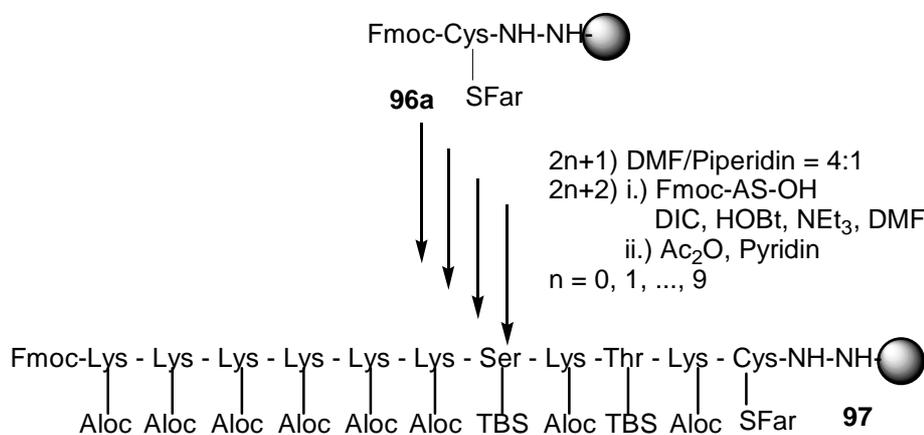
Die Synthese dieses Undecapeptids sollte ausgehend vom bereits farnesylierten polymergebundenen Cystein (**96a**) durch abwechselnde Fmoc-Deblockierung und Peptidknüpfung erfolgen. An seinem N-Terminus war die Anbindung des NBD-Fluoreszenzmarkers geplant. Durch die vorliegende Sequenz Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe war die Blockierung aller Seitenkettenfunktionalitäten der verwendeten Aminosäuren notwendig. Diese mußten nach Beendigung der Synthese ohne Beeinträchtigung des säurelabilen Farnesylrestes und des Fluoreszenzmarkers entfernbare Schutzgruppen entfernt werden. Deshalb wurde Fmoc-Lys(Aloc)-OH (**36j**) für die Verlängerung des Peptidrückgrates verwendet. Da für die beiden Aminosäuren mit einer Hydroxylseitenkettenfunktion keine palladiumkatalysiert entfernbare Schutzgruppe existiert, kam bei beiden die mittels Fluorid-Ionen entfernbare *tert*-Butyldimethylsilyl(TBS)-Blockierung zum Einsatz.^[134] Mit dieser Schutzgruppenstrategie sollte das Peptid aufgebaut werden und nach Freisetzung der Seitenkettenfunktionalitäten als Methyl ester von der festen Phase abgelöst werden. Mit dem NBD-markierten Undecapeptid wären dann Untersuchungen zur Membranbindung von K-Ras unter besonderer Berücksichtigung seines Farnesylrestes und seiner Lysin-Domäne durchführbar.

Vor Beginn der Peptidsynthese an fester Phase mußten das Fmoc-geschützte Serin (**36i**) und Threonin (**36m**) mit der TBS-Gruppe versehen werden. Bei der primären Hydroxylfunktion des Serins war dies problemlos mit TBS-Chlorid in hoher Ausbeute möglich. Im Falle der sekundären Alkoholfunktion des Threonins führte die gleiche Methode nur zu einem unvollständigen Umsatz des Edukts. Bei Verwendung von TBS-Triflat verlief die Reaktion besser, so daß das *N*- und *O*-geschützte Threonin (**36o**) in zufriedenstellender Ausbeute erhalten werden konnte (Schema 41).



Schema 41: TBS-Seitenkettenschutz am Serin und Threonin

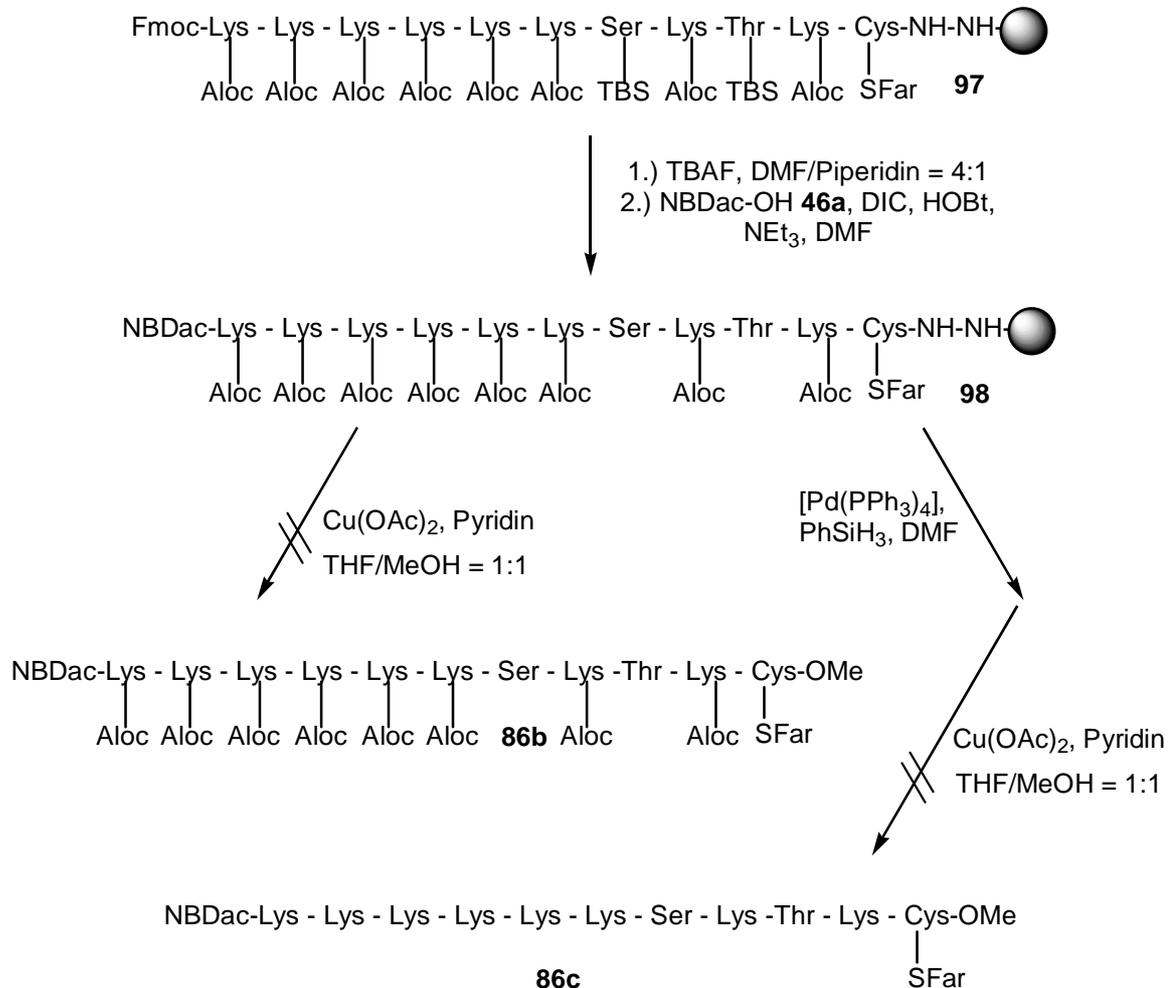
Damit waren alle kupplungsfähigen Bausteine für den linearen Aufbau des Undecapeptids verfügbar. Das bereits am polymeren Träger angebundene farnesylierte Cystein (**96a**) konnte in zehn Fmoc-Entschützungsschritten, an die sich jeweils eine doppelt durchgeführte Peptidknüpfung mit der entsprechenden Aminosäure nach der Carbodiimid/HOBt-Methode anschloß, zum vollständig geschützten farnesylierten Undecapeptid (**97**) verlängert werden. Jeder Peptidknüpfung folgte ein Capping-Schritt mit Acetanhydrid in Pyridin, um nicht umgesetzte Aminofunktionen zu blockieren. Die Bestimmung der Kupplungsausbeuten war immer nach der nächsten Fmoc-Abspaltung UV-spektroskopisch möglich. Alle auf diesem Wege ermittelten Ausbeuten lagen über 80 %, so daß das Peptidrückgrat trotz der vielen schwierig anzuknüpfenden Lysine^[44] in zufriedenstellender Gesamtausbeute aufgebaut werden konnte (Schema 42).



Schema 42: Festphasensynthese des farnesylierten Undecapeptids (**97**)

Da keine Daten über die Stabilität der fluoreszierenden NBD-Gruppierung unter den Bedingungen der TBS-Entschützung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) vorlagen, wurde die Deblockierung der Seitenketten des Serins und Threonins vor der Anknüpfung des Markers durchgeführt. Wegen der Basizität des Abspaltungsreagenzes war es allerdings nicht möglich, die Silylschutzgruppen zu entfernen, ohne das N-terminale Fmoc zu beeinträchtigen. Da aber die Freisetzung des N-Terminus im nächsten Schritt erfolgen sollte, wurde der Lösung von TBAF in DMF Piperidin zugesetzt, um die gleichzeitige Abspaltung der Fmoc-Gruppe zu gewährleisten. Die UV-spektroskopische Bestimmung bestätigte die erfolgreiche Deblockierung der Aminofunktion. Für den Nachweis der Freisetzung der Hydroxylfunktionen stand allerdings keine Detektionsmethode zur Verfügung. An das erhaltene N-terminal freie Undecapeptid konnte mit der Carbodiimid/HOBt-Methode der Fluoreszenzmarker in Form von NBDac-OH (**46a**) geknüpft werden.

Mit dem polymergebundenen fluoreszenzmarkierten Undecapeptid (**98**) wurde einerseits die sofortige Freisetzung von der festen Phase erprobt, andererseits war die Entschützung der Aminofunktionalitäten der Lysine am polymeren Träger geplant, um erst danach das Produkt vom Harz abzuspalten (Schema 43).



Schema 43: Abschließende Stufen der Festphasensynthese

Mit der ersten Strategie sollte die grundsätzliche Möglichkeit einer Abspaltung des fluoreszenzmarkierten Undecapeptids (**86b**) überprüft werden. Die zweite Variante hat den Vorteil, daß die Entfernung der acht Aloc-Gruppen noch an der festen Phase erfolgt, wodurch die Linkerspaltung direkt das entschützte Produkt (**86c**) liefern würde.

Bei beiden Abspaltungsschritten erfolgte die Abtrennung der Kupferionen durch Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20. In beiden Fällen war allerdings kein fluoreszierendes Produkt detektierbar.

Da die Ergebnisse der UV-spektroskopischen Belegungsbestimmungen zeigen, daß der Aufbau des Peptidrückgrats erfolgreich war, scheinen die Probleme in erster Linie im Abspal-

tungsschritt zu liegen. Während schon bei der Synthese von Fmoc-Cys(Far)-OMe (**86a**) in Kapitel 4.4.2. die Ausbeute niedrig lag, scheint die oxidative Linkerspaltung bei sehr voluminösen angebundenen Molekülen überhaupt nicht mehr möglich zu sein. Eine Ursache könnte der Platzbedarf der Kupferionen sein, die durch die angebundene Peptidkette von ihrer Angriffsstelle an der Arylhydrazid-Gruppe abgeschirmt werden.

Als Grund für das Scheitern der Linkerspaltung wäre aber auch die große Anzahl von Capping-Schritten denkbar. Mit jeder angeknüpften Aminosäure würde die *N*-Acylierung am Arylhydrazid zunehmen, bis der Linker größtenteils in nicht mehr oxidierbarer Form vorliegt.

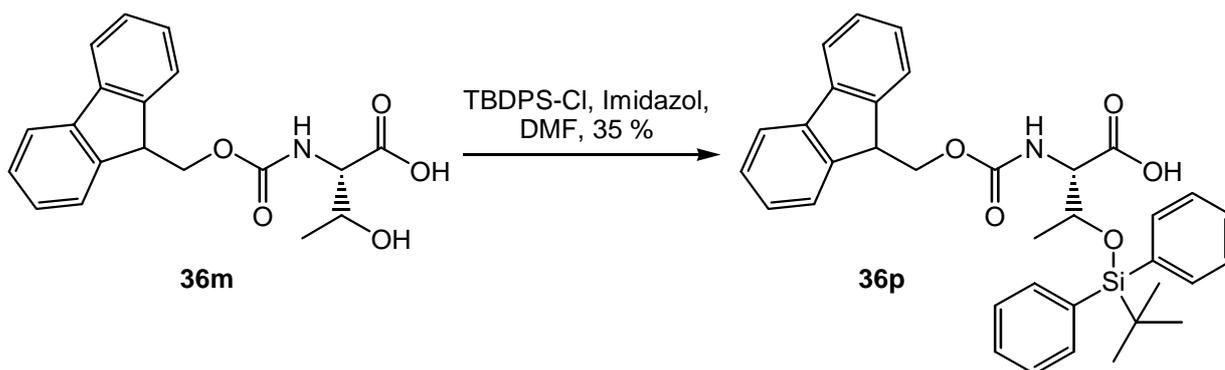
Wahrscheinlich ist ein Zusammenwirken aller genannten Einflüsse dafür verantwortlich, daß das C-terminale Undecapeptid des *K-Ras* nicht vom polymeren Träger entfernt werden konnte.

4.4.4. Festphasensynthese des farnesylierten C-terminalen *K-Ras*-Tripeptids nach veränderter Strategie

Bei der bisher angewandten Synthese-Strategie erfolgte die Einführung des Farnesylrestes auf der Stufe einer einzigen polymergebundenen Aminosäure. Erst im Anschluß begann die eigentliche Peptidsynthese.

Eine wesentlich interessantere Strategie wäre die Anknüpfung des Isoprenoids am bereits vollständig dargestellten Peptidrückgrat. Dadurch könnte ohne einen neuerlichen Aufbau der gesamten Sequenz die Seitenkettenmodifizierung des Cysteins variiert werden. An der einmal synthetisierten Peptidkette wären Analoga zugänglich, die entweder den Hexadecyl-, den Geranyl-, den Geranylgeranyl-Rest oder die freie Thiolfunktion beinhalten. Mit diesen verschiedenen modifizierten Peptiden könnten dann in biologischen Assays die Membranbindungseigenschaften des natürlich vorkommenden farnesylierten Peptides mit denen der nicht-natürlichen Analoga verglichen werden.

Die veränderte Strategie setzt die selektive Freisetzung der Thiolfunktion des Cysteins voraus. Da bei den Bedingungen der acidolytischen Entfernung des Trityls ebenfalls die TBS-Schutzgruppe beeinträchtigt würde,^[135] mußte für die Blockierung der Hydroxyaminosäuren die stabilere *tert*-Butyldiphenylsilyl-(TBDPS-)Gruppe gewählt werden. Diese war mittels ihres Silylchlorids an Fmoc geschütztem Threonin (**36m**) einführbar (Schema 44).

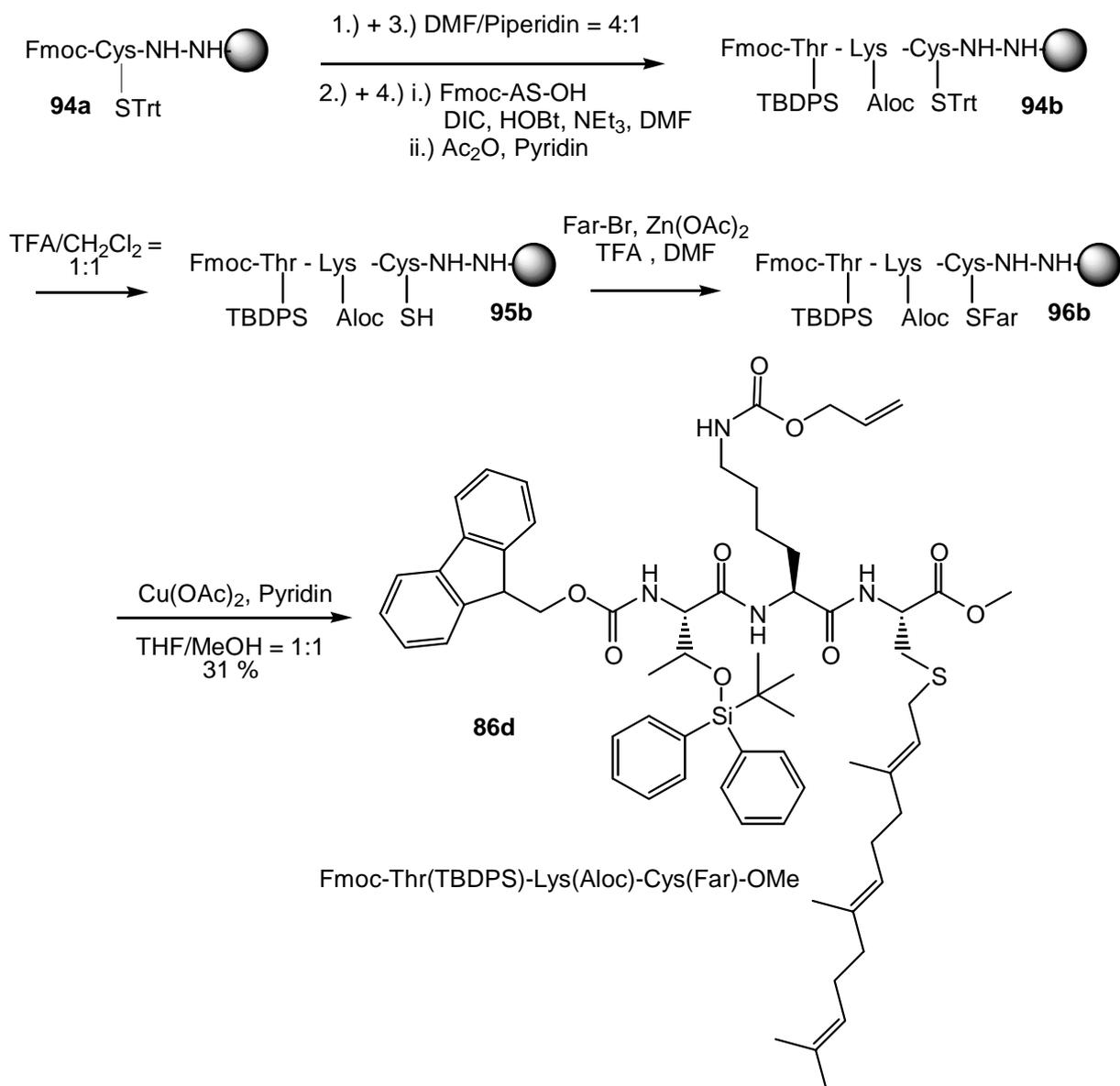


Schema 44: TBDPS-Seitenkettenschützung an Fmoc-Threonin (**36m**)

Zur Etablierung der alternativen Synthese-Variante wurde die Einführung des Farnesylrestes an der C-terminalen *K-Ras*-Tripeptidsequenz untersucht. Diese konnte ausgehend von polymergebundenem Trityl-geschütztem Cystein (**94a**) durch abwechselnde Fmoc-Entschützung und Peptidknüpfung aufgebaut werden. Nach Deblockierung der Thiolfunktion sollte der Farnesylierungsschritt erfolgen (Schema 45).

Die Anbindung des Farnesyl-Restes am Tripeptid war nach dem zuvor verwendeten Verfahren mit Triethylamin als Hilfsbase nicht möglich. Dies zeigte die darauffolgende oxidative Spaltung des Linkers, nach der das gewünschte Produkt (**86d**) nicht isoliert werden konnte. Als erfolgreich erwies sich hingegen die Isoprenylierungsmethode mit stark verdünnter Trifluoressigsäure und Zinkacetat als Lewis-Säure. Analog zu den vorhergehenden Abspaltungen vom Harz ergab sich das Produkt (**86d**) jedoch auch hier nur in niedriger Ausbeute.

Die Ursache für diesen Befund scheint allerdings nicht ein unzureichend ablaufender Farnesylierungsschritt zu sein. Die Freisetzung des *S*-Trityl geschützten Tripeptids war auch nur mit leicht höherer Ausbeute von 35 % möglich.



Schema 45: Farnesylierungsstudie am festphasenverknüpften Tripeptid (**95b**)

Die hier vorgestellte Synthese beweist, daß die Anknüpfung der Farnesylmodifizierung nicht nur an einer einzelnen polymergebundenen Aminosäure, sondern auch an einer polymergebundenen Peptidkette möglich ist. Dies könnte neue Perspektiven für die Synthese isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide an fester Phase eröffnen. Die volle Leistungsfähigkeit der Methode, die Einführung des Farnesylrestes am vollständigen Undecapeptid, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr demonstriert werden. Weitere Untersuchungen zur Festphasensynthese lipidmodifizierter Peptide am Arylhydrazidlinker sollten jedoch zunächst am Problem der niedrigen Abspaltungsraten vom Harz ansetzen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

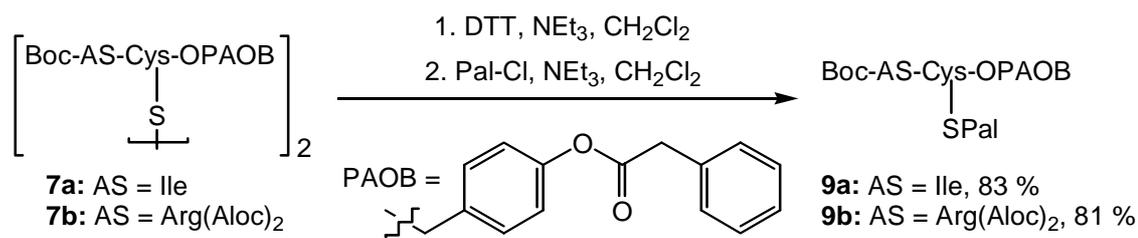
Zur detaillierteren Untersuchung von Teilprozessen einer Virus-Infektion und der Signaltransduktion in eukaryontischen Zellen sollten im Rahmen dieser Arbeit kurzkettige Peptidkonjugate dargestellt werden, die die Lipidmodifizierungen der beteiligten Proteine enthalten.

Zum einen war die chemoenzymatische Synthese der mit einem Fluoreszenzmarker versehenen C-terminalen zweifach palmitoylierten Heptapeptidsequenz des Hämagglutinins des Influenza-A-Virus geplant. Zum anderen sollte der fluoreszenzmarkierte C-terminale geranylgeranylierte Heptapeptidmethylester des in einem Seitenweg der *Ras*-Signaltransduktionskaskade auftretenden *RhoA*-Proteins dargestellt werden. Beide Ziele konnten erreicht werden.

Bei der angestrebten Entwicklung einer Methode zur Festphasensynthese isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide wurden die grundlegenden Schritte der Anknüpfung der Seitenkettenmodifizierung am polymeren Träger und der Abspaltung vom Harz erfolgreich etabliert. Der Aufbau der biologisch relevanten Undecapeptidsequenz des *K-Ras*-Proteins nach diesem Verfahren gelang allerdings nicht.

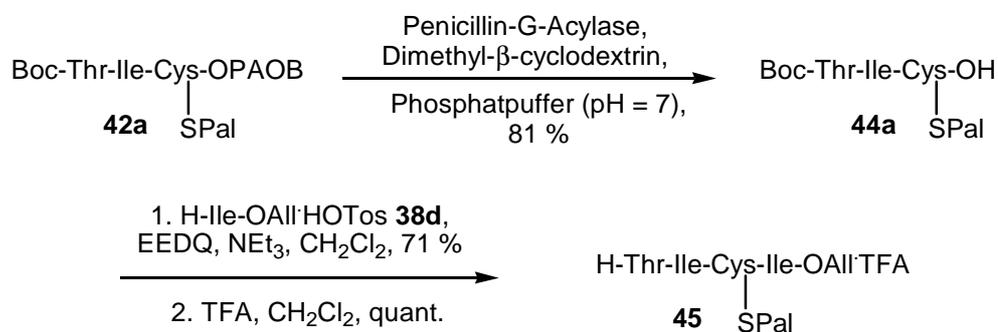
Bei der Synthese des doppelt palmitoylierten Heptapeptids des Hämagglutinin-C-Terminus konnten auftretende Orthogonalitätsprobleme bei der Entschützung labiler Zwischenstufen durch die Verwendung des mittels Penicillin-G-Acylase unter mildesten Bedingungen entfernbaren *para*-Phenylacetoxybenzylesters (PAOB-Esters) gelöst werden. Die Bestätigung des Abspaltungsprinzips dieser enzymlabilen Schutzgruppe erfolgte vor Beginn der Lipopeptidsynthese. Auf früheren Ergebnissen aufbauend,^[59] war die enzymatische Freisetzung der Carboxylfunktion von Modelldipeptiden unabhängig vom sterischen Anspruch ihrer C-terminalen Aminosäure möglich.

Die Palmitoylierungen des viralen Lipopeptids wurden an zwei Dipeptiden mit C-terminalem Cystein angeknüpft.^[37, 38] Auch im Beisein der PAOB-Ester war diese Anbindung der Seitenkettenmodifikationen in hohen Ausbeuten durchführbar (Schema 46).



Schema 46: Darstellung der PAOB-Ester geschützten Lipodipeptide (**9a**) und (**9b**)

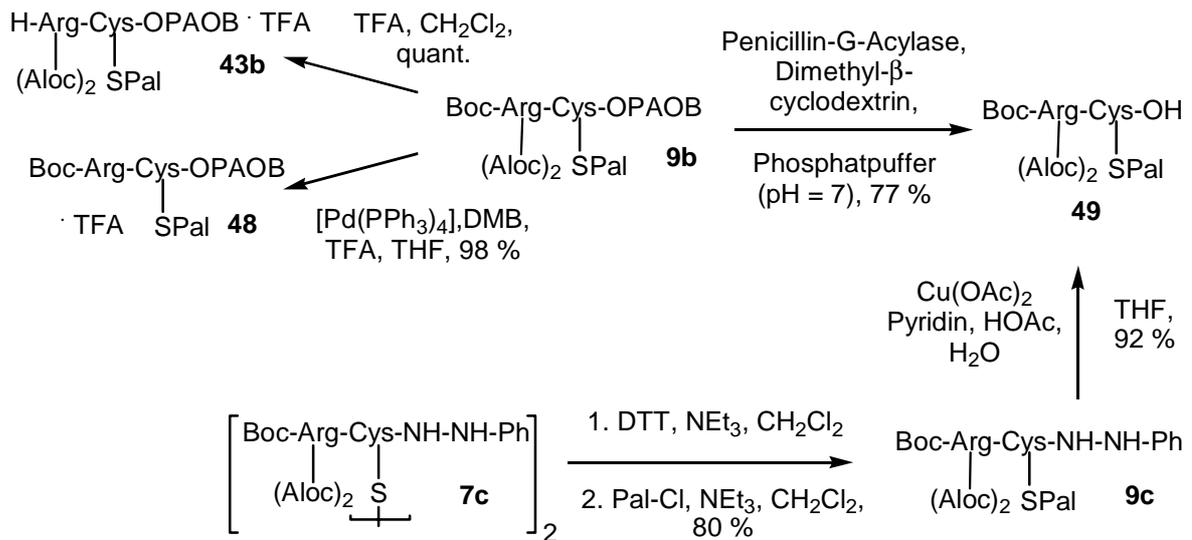
Das palmitoylierte Dipeptid (**9a**) konnte anschließend N-terminal mittels EEDQ zum Tripeptid (**42a**) verlängert werden und diente als erstes Substrat für die Abspaltung der PAOB-Ester-Schutzgruppe an Lipopeptiden. Die auftretenden Löslichkeitsprobleme im wässrigen Reaktionsmedium ließen sich durch die Verwendung von Dimethyl- β -cyclodextrin beheben. Durch den erfolgreichen Deblockierungsschritt wurde die Eignung dieser enzymlabilen Carboxyl-Schutzgruppe für die Synthese labiler Lipopeptide demonstriert (Schema 47). Aufgrund der milden Entschützungsbedingungen fand keine Beeinträchtigung des Thioesters statt. Es folgte die C-terminale Verlängerung des Tripeptids (**44a**) und nach einem weiteren Deblockierungsschritt war der kupplungsfähige Tetrapeptidbaustein (**45**) zugänglich (Schema 47).



Schema 47: Chemoenzymatische Darstellung des kupplungsfähigen Tetrapeptids (**45**)

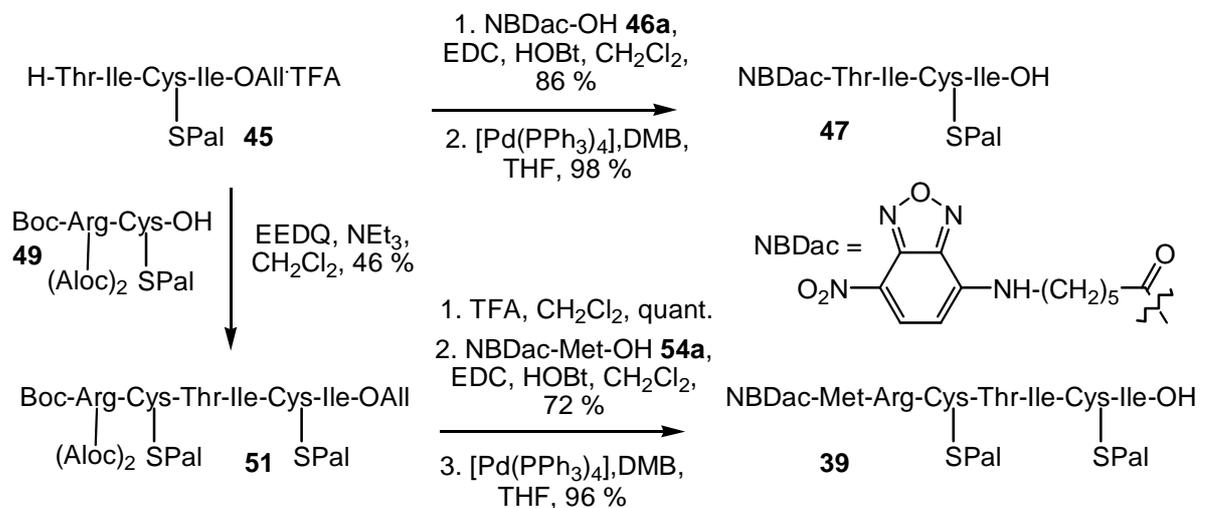
Das palmitoylierte Dipeptid (**9b**) stellte nicht nur eine entscheidende Zwischenstufe der Synthese dar, sondern auch eine Verbindung, an der das gewählte Schutzgruppenkonzept aus acidolytischer Deblockierung des N-Terminus, Übergangsmetallkatalysierter Entschützung der Guanidino-Seitenkettenfunktionalität und enzymatischer Freisetzung des C-Terminus überprüft werden konnte. Die Anwendbarkeit dieser Strategie wurde durch die selektive Entfernung jeder einzelnen Blockierung bestätigt (Schema 48).

Diese Erweiterung der selektiven Entschützbarkeit eröffnete den Zugang zum labilen Dipeptidbaustein (**49**). Obwohl für dessen Darstellung die ausschließliche Verwendung gebräuchlicher Schutzgruppentechniken ausschied, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein zweiter Weg zum kupplungsfähigen palmitoylierten Dipeptid (**49**) erschlossen werden. Dieser bediente sich der oxidativ entfernbaren Phenylhydrazid-Schutzgruppe,^[103] die ebenfalls unter Erhalt aller anderen Schutzgruppen und des Thioesters abgespalten werden konnte (Schema 48).



Schema 48: Chemoenzymatische Darstellung des Dipeptidbausteins (**49**), Überprüfung des Schutzgruppenkonzepts und alternativer Syntheseweg

Das C-terminal entschützte Dipeptid (**49**) wurde anschließend mit dem N-terminal freien Tetrapeptid (**45**) zum Hexapeptid (**51**) verknüpft. Nach der Deblockierung des N-Terminus erfolgte die Verlängerung zum fluoreszenzmarkierten Heptapeptid durch Reaktion mit *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionin (**54a**) nach der Carbodiiimid/HOBt-Methode. Zusätzlich wurde das monopalmitoylierte C-terminale Tetrapeptid (**45**) mit einer NBD-Markierung versehen (Schema 49). Damit war gewährleistet, daß beide lipidierten Peptidkonjugate bei biophysikalischen Tests mit Fluoreszenztechniken beobachtet werden konnten.



Schema 49: Darstellung der NBD-markierten Lipopeptide (**47**) und (**39**)

Der finale Entschützungsprozess zur Abspaltung der Schutzgruppen an der Guanidinfunktion und am C-Terminus erfolgte durch palladiumkatalysierte Allylübertragung auf Dimethylbarbitursäure.^[102] Dadurch war das vollständig entschützte fluoreszenzmarkierte Lipopeptid (**39**) zugänglich, das der C-terminalen Sequenz des Hämagglutinin des Influenza-A-Virus entspricht. Gleichzeitig konnte durch diese chemoenzymatische Synthese die volle Leistungsfähigkeit der mittels Penicillin-G-Acylase entfernbaren PAOB-Ester-Schutzgruppe gezeigt werden. Deren Verwendung als C-terminale Blockierung ist somit in Zukunft auch bei Synthesen anderer labiler Peptidkonjugate denkbar.

In biophysikalischen Experimenten wurden mit Phosphatidylcholin-Vesikeln als Modellmembranen sowohl der Intervesikel- als auch der Transdoppelschicht-Austausch der beiden fluoreszenzmarkierten Lipopeptide (**47**) und (**39**) bestimmt.^[81, 82] Unter Verwendung eines Fluoreszenzquencher konnte gezeigt werden, daß das einfach lipidierte Tetrapeptid (**47**) mit Halbwertszeiten von wenigen Minuten auf unbeladene Akzeptorvesikel übergeht, während das zweifach lipidierte Heptapeptid (**39**) in den quencherbeladenen Vesikeln verbleibt (Abb. 18).

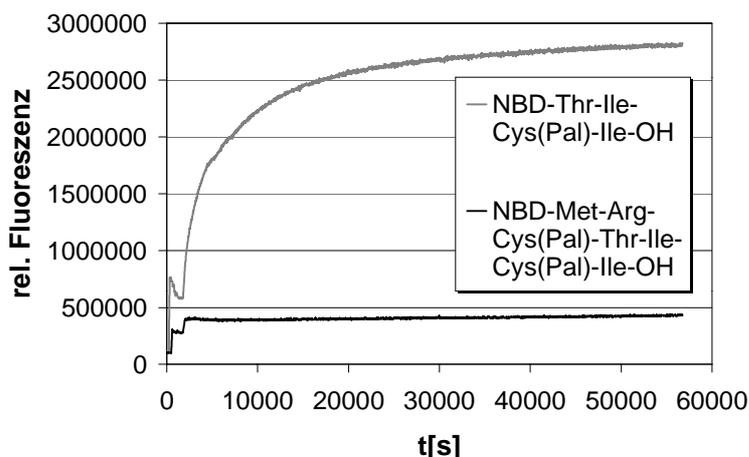
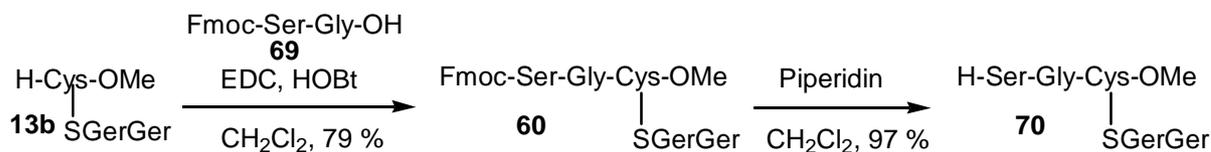


Abb. 18: Intervesikeltransfer der lipidierten Peptide (**47**) und (**39**)

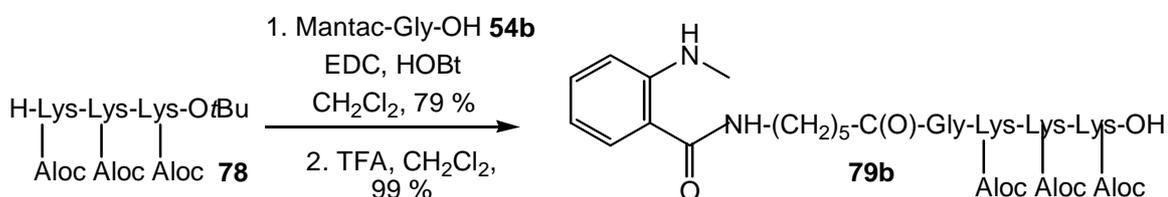
Die Anknüpfung zweier Palmitinsäure-Reste bewirkt demnach eine stabile Insertion des Hämagglutinin-C-Terminus in die Membranen des Virus oder der Wirtszelle. Ausgehend von diesen Ergebnissen sind weitere Untersuchungen zur Membranbindungsaffinität des viralen Hüllproteins denkbar. Zudem könnten sich die dargestellten palmitoylierten Peptidkonjugate auch in weiterführenden viralen Assays bewähren, um die Rolle der Fettsäure-Acylierungen bei zentralen Teilschritten der Virus-Infektion zu klären.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Synthese des geranylgeranylierten Heptapeptids der C-terminalen Sequenz des *RhoA*-Proteins, das an einem Seitenweg der *Ras*-Kaskade beteiligt ist. Dieses enthält neben der Isoprenylmodifizierung auch die Lysin-Domäne des Proteins. Der zentrale Schritt beim Aufbau des Zielmoleküls war die Kupplung des N-terminal freien isoprenylmodifizierten Tripeptids (**70**) mit dem fluoreszenzmarkierten C-terminal deblockierten Tetrapeptid (**79b**). Die Strategie, den Mant-Marker in den einen Kupplungsbaustein einzuführen, ermöglichte erst die komplette Darstellung dieser Verbindung, da seine Anknüpfung am bereits vollständig aufgebauten Peptidrückgrat nicht gelang. Die Darstellung des Tripeptids (**60**) erfolgte mit der Carbodiimid/HOBt-Methode durch Kupplung des Dipeptids Fmoc-Ser-Gly-OH (**69**) mit dem isoprenylmodifizierten L-Cysteinmethylester (**13b**). Die anschließende N-terminale Deblockierung lieferte den kuppelungsfähigen Tripeptidbaustein (**70**) (Schema 50).



Schema 50: Darstellung des C-terminalen Tripeptidmethylesters (**70**)

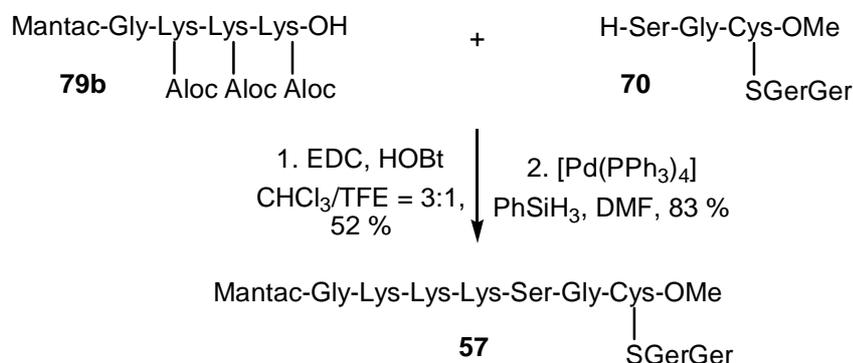
Das N-terminale fluoreszenzmarkierte Tetrapeptid (**79b**) wurde linear nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung der Carbodiimid/HOBt-Methode aufgebaut. Zum Schutz der *N*^ε-Aminofunktionen der Lysine diente die Allyloxycarbonyl(Aloc)-Schutzgruppe. Im letzten Kupplungsschritt erfolgte die Anknüpfung des fluoreszenzmarkierten Glycins (**54b**). Da die abschließende *tert*-Butylesterspaltung den Mant-Marker nicht beeinträchtigte, war auf diesem Wege das kuppelungsfähige Tetrapeptid (**79b**) darstellbar (Schema 51).



Schema 51: Darstellung des fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids (**79b**)

Das Tetrapeptid (**79b**) wurde mit dem geranylgeranylierten Tripeptidmethylester (**70**) zum fluoreszenzmarkierten Heptapeptid geknüpft. Die Pd(0)-katalysierte Abspaltung aller drei Aloc-Schutzgruppen an den Lysin-Seitenketten gelang mit Phenylsilan als Allylfänger^[126]

ohne den Isoprenylrest zu beeinflussen und lieferte das Zielmolekül, den Mant-markierten geranylgeranylierten C-terminalen Heptapeptidmethylester (**57**) des *RhoA*-Proteins (Schema 52).

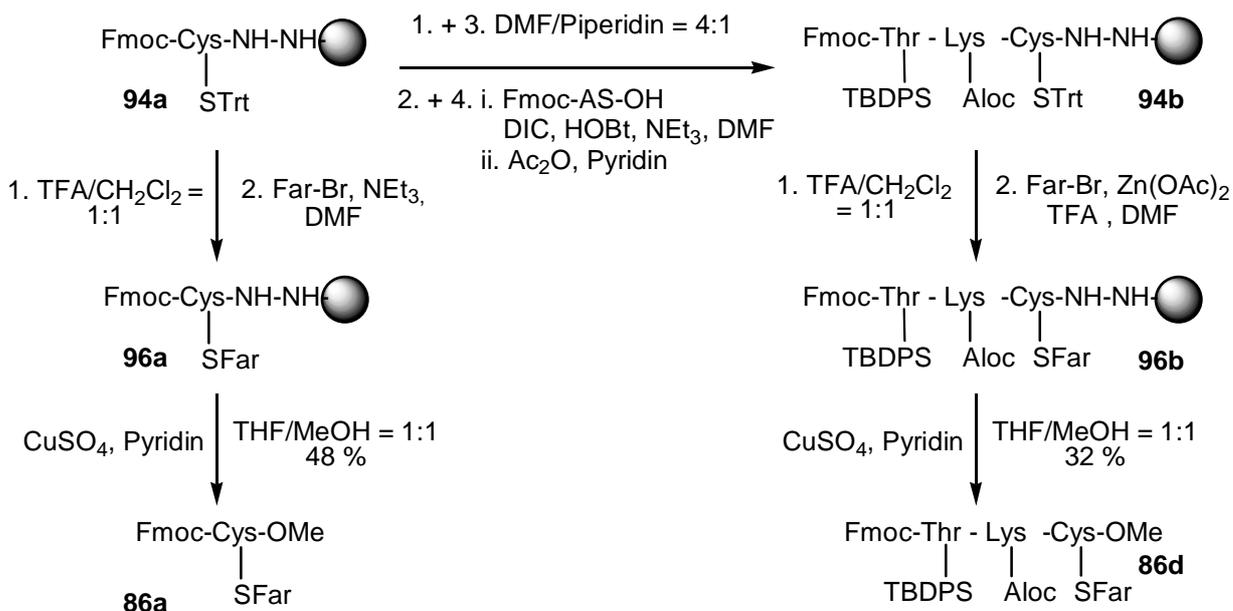


Schema 52: Finale Schritte zum geranylgeranylierten Heptapeptid (**57**)

Im dritten Projekt der Arbeit konnten entscheidende Grundoperationen für die Festphasensynthese isoprenylierter und carboxymethylierter Peptide durchgeführt werden. Um bei der Abspaltung vom polymeren Träger direkt den Methylester zu erhalten, wurde für die Anknüpfung an das Harz der Arylhydrazidlinker^[128, 129] gewählt.

Nach der Anbindung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein als Arylhydrazid konnte nach acidolytischer Freisetzung der Thiofunktion erstmals die Anknüpfung eines Isoprenyl-Restes an fester Phase realisiert werden. Die anschließende Ablösung vom polymeren Träger mit Kupfer(II)-acetat in Anwesenheit von Methanol als Nukleophil lieferte das gewünschte farnesylierte und carboxymethylierte L-Cystein (**86a**) in zufriedenstellender Ausbeute.

Mit dieser Methode konnte ebenfalls das C-terminale Tripeptid des *K-Ras*-Proteins an fester Phase synthetisiert werden. Nach den Kupplungsschritten mußte lediglich eine andere Farnesylierungsmethode gewählt werden, um das Isoprenoid an der Thiofunktion einzuführen. Die oxidative Arylhydrazidspaltung ermöglichte die Freisetzung des farnesylierten Tripeptidmethylesters (**86d**) (Schema 53).



Schema 53: Einführung der Farnesylierung an fester Phase und Abspaltung zum Methylester

Diese Ergebnisse belegen, daß zum einen die Anbindung der Isoprenylierung im Beisein des Arylhydrazidlinkers durchführbar ist, zum anderen aber auch die Freisetzung der Produkte vom Harz ohne Beeinträchtigung des Thioethers oder der Doppelbindungen des Farnesylys gelingt. Allerdings zeigte sich schon beim Übergang von der Abspaltung einer Aminosäure zu einem Tripeptid eine sinkende Ausbeute, so daß die Ablösung des C-terminalen Undecapeptids des *K-Ras*-Proteins nicht möglich war, obwohl die UV-spektroskopischen Kontrollen nach den Fmoc-Entschützungen den vollständigen Aufbau des Rückgrats bewiesen.

6. Experimenteller Teil

6.1. Meßgeräte und Hilfsmittel

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit folgenden Geräten gemessen:

250 MHz (^1H)	Bruker AC-250
400 MHz (^1H) und 100.6 MHz (^{13}C)	Bruker AM-400
500 MHz (^1H) und 125.7 MHz (^{13}C)	Bruker DRX-500.

Die chemischen Verschiebungen δ beziehen sich auf Tetramethylsilan als internen Standard und sind in parts per million (ppm) angegeben. Die verwendeten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische sind bei den jeweiligen Spektren vermerkt. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, dt = Dublett von Triplets, ddt = Dublett von Dubletts von Triplets, tt = Triplett von Triplets, q = Quartett, dq = Dublett von Quartetts, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal.

Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktmeßapparatur 530 der Firma Büchi bestimmt und sind unkorrigiert.

Spezifische Drehwerte $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 gemessen. Sie beziehen sich auf die Natrium-D-Linie bei einer Wellenlänge von 589 nm. Lösungsmittel und Konzentrationen c (in g/100 ml) sind an den entsprechenden Stellen vermerkt.

EI- und FAB-Massenspektren wurden mit einem Gerät Mat MS 90 der Firma Finnigan aufgenommen. FAB-Massenspektren wurden in einer 3-Nitrobenzylalkohol (3-NBA)-Matrix bestimmt. Angegeben sind die m/z -Werte.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einer Voyager BioSpectrometry Workstation der Firma PerSeptive Biosystems aufgenommen. Als Matrix wurde 2,5-Hydroxybenzoesäure (DHB) verwendet.

Elementaranalysen wurden in einem Verbrennungsautomaten der Firma Heraeus gemessen.

Die UV/VIS-Spektren wurden mit einem Lambda 2 UV/VIS-Spektrometer der Firma Perkin-Elmer aufgenommen.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten (Kieselgel 60_{F254}) der Firmen Merck und Macherey&Nagel verwendet.

Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 und 366 nm und zur Anfärbung die folgenden Reagenzien verwendet:

- a) 2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat, 6 ml konz. H₂SO₄ und 94 ml Wasser
- b) 300 mg Ninhydrin, 3 ml Eisessig, 997 ml Ethanol.

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten mit Flash-Kieselgel der Firma Baker (Korngröße 40-64 µm) in geschlossenen Säulen bei einem Überdruck von 0.2-1.0 bar.

Zur Größenausschlußchromatographie wurde Sephadex LH 20 der Firma Pharmacia verwendet.

Penicillin G Acylase (E.C. 3.5.1.11) wurde immobilisiert auf Eupergit C verwendet und von Boehringer Mannheim bezogen. Die Cross-Linked-Enzyme-Crystals (CLECs) dieses Enzyms wurden von der Firma Altus bezogen.

Alle eingesetzten L-Aminosäuren wurden von der Degussa AG gespendet. Geschützte L-Aminosäuren wurden von der Firma Senn Chemicals bezogen.

Für die Festphasensynthese wurden Aminomethylfunktionalisiertes und Hydrazinfunktionalisiertes Polystyrol der Firma Novabiochem verwendet.

Die übrigen Chemikalien wurden je nach Verfügbarkeit von den Firmen Acros Chimica, Fluka, Aldrich, Riedel de Haen und Molecular Probes bezogen.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach Standardverfahren getrocknet.^[137]

6.2. Versuche zu Kapitel 4.1.

6.2.1. Versuche zu Kapitel 4.1.1.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolin-*para*-phenylacetoxybenzylester

(Boc-Pro-OPAOb) (37a)

Eine Lösung von 0.444 g (2.07 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolin (**36a**), 0.500 g (2.07 mmol) *para*-Phenylacetoxybenzylalkohol (**35**), 0.003 g (0.02 mmol) DMAP und 0.31 ml (2.07 mmol) DIC in 50 ml Methylenchlorid wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wird die Reaktionsmischung mit je 30 ml 1 M Salzsäure und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 3:1(v/v)).

farbloses Öl

Ausbeute:	0.781 g (1.84 mmol, 89 %)
R _F -Wert:	0.41 (Hexan/Essigester = 3:1(v/v))
[α] _D ²⁰ :	- 21.4° (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 7.40-7.31 (m, 7H, C₆H₅, OCCHCH, Aromat), 7.06 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H, OCCH, Aromat), 5.20 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, CH_{2a}-O), 5.08 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, CH_{2b}-O), 4.24 (dd, ³J₁ = 7.8 Hz, ³J₂ = 5.3 Hz, 1H, α-CH, Pro), 3.88 (s, 2H, CH₂-COO), 3.61-3.38 (m, 2H, δ-CH₂, Pro), 2.30-2.13 (m, 1H, β-CH_{2a}, Pro), 2.02-1.81 (m, 3H, β-CH_{2b}, γ-CH₂, Pro), 1.43 (s, 9H, *tert*-Butyl).

EI-MS (m/z):	ber.: 439.1995
(C ₂₅ H ₂₉ NO ₆)	gef.: 439.2021

L-Prolin-*para*-phenylacetoxybenzylester-hydrochlorid

(H-Pro-OPAOb·HCl) (38a)

Eine Lösung von 0.530 g (1.20 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-prolin-*para*-phenylacetoxybenzylester (**37a**) in 10 ml abs. Diethylether wird unter Eiskühlung mit 30 ml

einer gesättigten Lösung von Chlorwasserstoff in Diethylether versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt, der Rückstand dreimal mit jeweils 10 ml Diethylether digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 131°C

Ausbeute: 0.532 g (1.17 mmol, 98 %)

$[\alpha]_D^{20}$: -28.2° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 7.44 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, OCCHCH₂, Aromat), 7.38-7.27 (m, 5H, C₆H₅, Aromat), 7.09 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, OCCH₂, Aromat), 5.29 (d, ²J = 12.1 Hz, 1H, CH_{2a}-O), 5.26 (d, ²J = 12.1 Hz, 1H, CH_{2b}-O), 4.45 (dd, ³J₁ = 8.8 Hz, ³J₂ = 7.1 Hz, 1H, α-CH, Pro), 3.89 (s, 2H, CH₂-COO), 3.41-3.32 (m, 2H, δ-CH₂, Pro), 2.45-2.38 (m, 1H, β-CH_{2a}, Pro), 2.14-2.01 (m, 3H, β-CH_{2b}, γ-CH₂, Pro).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

δ = 171.77, 169.88 (2 C=O, Ester), 152.59 (C_q-O, Aromat), 135.08, 134.03 (2 C_q, Aromat), 131.02, 130.43, 129.68, 128.32, 122.95 (CH, Aromat), 68.71 (CH₂-O), 60.74 (α-CH, Pro), 47.14 (δ-CH₂, Pro), 41.84 (CH₂-COO), 29.27 (β-CH₂, Pro), 24.45 (γ-CH₂, Pro).

FAB-MS (m/z): ber.: 340.1549 [M-Cl]⁺

(C₂₀H₂₁NO₄HCl) gef.: 340.1576 (in 3-NBA)

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin-*para*-phenylacetoxybenzylester (Boc-Ala-Pro-OPAOb) (18d)**

Zu einer Lösung von 0.063 g (0.33 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-alanin (**36b**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung zunächst 0.063 g (0.40 mmol) HOBt und 0.06 ml (0.33 mmol) DIC sowie anschließend 0.125 g (0.33 mmol) L-Prolin-*para*-phenylacetoxybenzylester-hydrochlorid (**38a**) und 50 µl (0.33 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, danach mit je 10 ml 1 M Salzsäure und Wasser gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:1(v/v)) gereinigt.

farbloses Öl

Ausbeute: 0.148 g (0.29 mmol, 87 %)
R_F-Wert: 0.59 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))
[α]_D²⁰: - 56.8° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 7.39-7.30 (m, 7H, C₆H₅, OCCHCH₂, Aromat), 7.06 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, OCCH₂, Aromat), 5.38 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, NH, Urethan), 5.19 (d, ²J = 13.8 Hz, 1H, CH_{2a}-O), 5.07 (d, ²J = 13.8 Hz, 1H, CH_{2b}-O), 4.59 (dd, ³J₁ = 8.5 Hz, ³J₂ = 6.9 Hz, 1H, α-CH, Pro), 4.52-4.40 (m, 1H, α-CH, Ala), 3.84 (s, 2H, CH₂-COO), 3.75-3.68 (m, 1H, δ-CH_{2a}, Pro), 3.62-3.53 (m, 1H, δ-CH_{2b}, Pro), 2.27-2.16 (m, 1H, β-CH_{2a}, Pro), 2.04-1.91 (m, 3H, β-CH_{2b}, γ-CH₂, Pro), 1.43 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.79 (d, ³J = 7.3 Hz, 3H, β-CH₃, Ala).

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin**

(Boc-Ala-Pro-OH) (20d)

In ein Gemisch von 90 ml 0.05 M Phosphatpuffer (pH = 7) und 10 ml Methanol werden 0.135 g (0.26 mmol) *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin-*para*-phenylacetoxybenzylester (**18d**) gegeben. Danach werden 500 u immobilisierte Penicillin-G-Acylase zugegeben und die Suspension 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das polymergebundene Enzym wird anschließend durch Filtration entfernt und die wässrige Phase dreimal mit je 20 ml Methylenchlorid gewaschen. Dann wird mit 1 M Salzsäure auf pH = 2 angesäuert und fünfmal mit je 30 ml Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Hexan/Essigester gereinigt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 154°C

Ausbeute: 0.061 g (0.21 mmol, 81 %)
R_F-Wert: 0.11 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))
[α]_D²⁰: - 95.0° (c = 1.0, CH₃OH)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD):

$\delta = 4.48\text{-}4.45$ (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Pro), 4.37 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Ala), 3.80-3.76 (m, 1H, $\delta\text{-CH}_{2a}$, Pro), 3.67-3.62 (m, 1H, $\delta\text{-CH}_{2b}$, Pro), 2.29-2.23 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Pro), 2.07-1.99 (m, 3H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, $\gamma\text{-CH}_2$, Pro), 1.43 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.29 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_3$, Ala).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD):

$\delta = 175.31$ (C=O, Carbonsäure), 174.04 (C=O, Amid), 157.61 (C=O, Urethan), 80.50 (C_q , *tert*-Butyl), 60.31 ($\alpha\text{-CH}$, Pro), 48.49 ($\alpha\text{-CH}$, Ala), 48.01 ($\delta\text{-CH}_2$, Pro), 30.02 ($\beta\text{-CH}_2$, Pro), 28.71 (CH_3 , *tert*-Butyl), 25.82 ($\gamma\text{-CH}_2$, Pro), 17.12 ($\beta\text{-CH}_3$, Ala).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 51.31	H 7.95	N 9.20
($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\cdot\text{H}_2\text{O}$)	gef.:	C 51.51	H 7.84	N 9.05

EI-MS (m/z):	ber.:	286.1529
	gef.:	286.1517

***N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-phenylalanin-*para*-phenylacetoxybenzylester (Boc-Thr-Phe-OPAOb) (18e)**

Zu einer Lösung von 0.100 g (0.46 mmol) *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonin (**36c**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung zunächst 0.113 g (0.46 mmol) EEDQ sowie anschließend 0.230 g (0.46 mmol) L-Phenylalanin-*para*-phenylacetoxybenzylesterhydrotrifluoracetat (**38b**) und 64 μl (0.46 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, danach mit je 10 ml 1 M Salzsäure und Wasser gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 141°C

Ausbeute: 0.230 g (0.39 mmol, 85 %)

R_f -Wert: 0.43 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 61.3° (c = 1.0, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ = 7.40-7.30 (m, 7H, C_6H_5 , PAOB, CCH , Phe, Aromat), 7.26 (d, 3J = 7.6 Hz, 2H, OCCHCH , Aromat), 7.06-7.03 (m, 5H, OCCH , PAOB, Phe, Aromat), 5.42 (d, 3J = 7.7 Hz, 1H, NH, Urethan), 5.12 (d, 2J = 12.2 Hz, 1H, $\text{CH}_{2a}\text{-O}$), 5.07 (d, 2J = 12.2 Hz, 1H, $\text{CH}_{2b}\text{-O}$), 4.61-4.59 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Phe), 4.28-4.26 (m, 1H, $\beta\text{-CH}$, Thr), 4.06 (d, 3J = 7.2 Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Thr), 3.86 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COO}$), 3.12 (dd, 2J = 13.8 Hz, 3J = 5.9 Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Phe), 3.03 (dd, 2J = 13.8 Hz, 3J = 6.7 Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, Phe), 1.43 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.12 (d, 3J = 6.4 Hz, 3H, $\gamma\text{-CH}_3$, Thr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3):

δ = 171.00, 169.83 (3 C=O, Ester, Amid), 156.24 (C=O, Urethan), 150.85 ($\text{C}_q\text{-O}$, Aromat), 135.55, 133.31, 132.67 (3 C_q , Aromat), 129.79, 129.29, 129.23, 128.76, 128.61, 127.42, 127.17, 121.68 (CH, Aromat), 80.29 (C_q , *tert*-Butyl), 66.88 ($\beta\text{-CH}$, Thr), 66.60 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 58.09 ($\alpha\text{-CH}$, Phe), 53.34 ($\alpha\text{-CH}$, Thr), 41.40 ($\text{CH}_2\text{-COO}$), 37.84 ($\beta\text{-CH}_2$, Phe), 28.28 (CH_3 , *tert*-Butyl), 18.07 ($\gamma\text{-CH}_3$, Thr).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 67.10	H 6.48	N 4.74
($\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$)	gef.:	C 66.72	H 6.47	N 4.63

FAB-MS (m/z):	ber.:	591.2706 $[\text{M}+\text{H}]^+$
	gef.:	591.2732 (in 3-NBA)

***N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-phenylalanin (Boc-Thr-Phe-OH) (20e)**

In ein Gemisch von 90 ml 0.05 M Phosphatpuffer (pH = 7) und 10 ml Methanol werden 0.100 g (0.17 mmol) *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-phenylalanin-*para*-phenylacetoxybenzylester (**18e**) gegeben. Danach werden 500 u immobilisierte Penicillin-G-Acylase zugegeben und die Suspension 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das polymergebundene Enzym wird anschließend durch Filtration entfernt und die wäßrige Phase dreimal mit je 20 ml Methylenchlorid gewaschen. Dann wird mit 1 M Salzsäure auf pH = 2 angesäuert und fünfmal mit je 30 ml Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Das Produkt ergibt sich nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigester = 1:2(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure).

farbloses Öl

Ausbeute: 0.051 g (0.14 mmol, 82 %)
 R_f-Wert: 0.52 (Hexan/Essigester = 1:2(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure)
 [α]_D²⁰: + 10.0° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 7.26-7.17 (m, 5H, Phe, Aromat), 4.68-4.66 (m, 1H, α-CH, Phe), 4.08-4.06 (m, 1H, β-CH, Thr), 4.00-3.98 (m, 1H, α-CH, Thr), 3.18 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 5.3 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Phe), 3.04 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, β-CH_{2b}, Phe), 1.43 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.13 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, γ-CH₃, Thr).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

δ = 174.49 (C=O, Carbonsäure), 172.88 (C=O, Amid), 157.83 (C=O, Urethan), 138.10 (C_q, Aromat), 129.89, 129.37, 127.73, (CH, Aromat), 80.81 (C_q, *tert*-Butyl), 68.47 (β-CH, Thr), 61.21 (α-CH, Phe), 55.10 (α-CH, Thr), 38.43 (β-CH₂, Phe), 28.67 (CH₃, *tert*-Butyl), 19.87 (γ-CH₃, Thr).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 56.25	H 7.34	N 7.29
(C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₆ ·H ₂ O)	gef.:	C 56.77	H 7.35	N 7.07

FAB-MS (m/z):	ber.:	367.1869 [M+H] ⁺
	gef.:	367.1894 (in 3-NBA)

6.2.2. Versuche zu Kapitel 4.1.3.

Bis(*N-tert*-Butyloxycarbonyl)-L-cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester)

(Boc-Cys-OPAOB)₂ (37b)

Eine Lösung von 3.082 g (6.99 mmol) Bis(*N-tert*-Butyloxycarbonyl)-L-cystin (**36d**), 3.390 g (13.98 mmol) *para*-Phenylacetoxybenzylalkohol (**35**), 0.005 g (0.04 mmol) DMAP und 2.17 ml (13.98 mmol) DIC in 100 ml Methylenchlorid wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit je 50 ml 1 M Salzsäure und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)).

farbloser Feststoff, Schmp.: 78°C

Ausbeute: 5.299 g (6.00 mmol, 86 %)

R_F-Wert: 0.43 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

[α]_D²⁰: + 42.6° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 7.40-7.30 (m, 10H, C₆H₅, Aromat), 7.35 (d, ³J = 8.4 Hz, 4H, OCCHCH₂, Aromat), 7.05 (d, ³J = 8.4 Hz, 4H, OCCH₂, Aromat), 5.42 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H, NH, Urethan), 5.14 (s, 4H, CH₂-O), 4.61-4.59 (m, 2H, α-CH), 3.86 (s, 4H, CH₂-COO), 3.10 (d, ³J = 5.0 Hz, 4H, β-CH₂), 1.44 (s, 18H, *tert*-Butyl).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ = 170.44, 169.81 (2 C=O, Ester), 154.96 (C=O, Urethan), 150.69 (C_q-O, Aromat), 133.21, 132.63 (2 C_q, Aromat), 129.63, 129.22, 128.68, 127.33, 121.61 (CH, Aromat), 80.21 (C_q, *tert*-Butyl), 66.72 (CH₂-O), 52.85 (α-CH), 41.28 (CH₂-COO), 40.91 (β-CH₂), 28.23 (CH₃, *tert*-Butyl).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 62.15	H 5.90	N 3.15
(C ₄₆ H ₅₂ N ₂ O ₁₂ S ₂)	gef.:	C 62.09	H 5.99	N 3.21

FAB-MS (m/z):	ber.:	888.3
	gef.:	887.8 (in 3-NBA)

L-Cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester)-bishydrochlorid (H-Cys-OPAOB·HCl)₂ (38c)

Eine Lösung von 4.501 g (5.20 mmol) Bis(*N-tert*-Butyloxycarbonyl)-L-cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester) (**37b**) in 20 ml abs. Diethylether wird unter Eiskühlung mit 100 ml einer gesättigten Lösung von Chlorwasserstoff in Diethylether versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt, der Rückstand dreimal mit jeweils 20 ml Diethylether digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 140°C

Ausbeute: 3.759 g (4.94 mmol, 95 %)

$[\alpha]_D^{20}$: - 10.8° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 7.43 (d, ³J = 8.6 Hz, 4H, OCCHCH, Aromat), 7.37-7.28 (m, 10H, C₆H₅, Aromat), 7.06 (d, ³J = 8.6 Hz, 4H, OCCH, Aromat), 5.28 (d, ²J = 12.1 Hz, 2H, CH_{2a}-O), 5.21 (d, ²J = 12.1 Hz, 2H, CH_{2b}-O), 4.40 (dd, ³J₁ = 6.1 Hz, ³J₂ = 5.5 Hz, 2H, α-CH), 3.89 (s, 4H, CH₂-COO), 3.31-3.19 (m, 4H, β-CH₂).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

δ = 171.99, 168.76 (2 C=O, Ester), 152.56 (C_q-O, Aromat), 135.02, 133.80 (2 C_q, Aromat), 131.39, 130.44, 129.69, 128.32, 122.99 (CH, Aromat), 68.78 (CH₂-O), 52.81 (α-CH), 41.81 (CH₂-COO), 37.52 (β-CH₂).

FAB-MS (m/z): ber.: 689.1991 [M-2HCl+H]⁺

(C₃₆H₃₆N₂O₈S₂·2HCl) gef.: 689.2004 (in 3-NBA)

**Bis(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-isoleucyl)-L-cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester)
(Boc-Ile-Cys-OPAOb)₂ (7a)**

Zu einer Lösung von 1.117 g (4.83 mmol) *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-isoleucin (**36e**) in 75 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung zunächst 1.194 g (4.83 mmol) EEDQ sowie anschließend 1.840 g (2.42 mmol) L-Cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester)-bishydrochlorid (**38c**) und 0.67 ml (4.83 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit je 50 ml 1 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 139°C

Ausbeute: 2.111 g (1.89 mmol, 78 %)

R_f-Wert: 0.34 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: + 25.8° (c = 1.0, CHCl₃)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 7.51$ (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, NH, Amid), 7.36-7.28 (m, 10H, C_6H_5 , Aromat), 7.31 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 4H, OCCHCH , Aromat), 7.03 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 4H, OCCH , Aromat), 5.40 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H, NH, Urethan), 5.14 (d, $^2J = 12.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_{2a}\text{-O}$), 5.08 (d, $^2J = 12.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_{2b}\text{-O}$), 4.91-4.87 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}$, Cys), 4.15-4.11 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}$, Ile), 3.84 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-COO}$), 3.06-2.96 (m, 4H, $\beta\text{-CH}_2$, Cys), 1.91-1.79 (m, 2H, $\beta\text{-CH}$, Ile), 1.59-1.52 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_{2a}$, Ile), 1.39 (s, 18H, *tert*-Butyl), 1.19-1.09 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_{2b}$, Ile), 0.92 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 6H, $\gamma\text{-CH}_3$, Ile), 0.85 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 6H, $\delta\text{-CH}_3$, Ile).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

$\delta = 172.27$ (C=O, Amid), 169.79 (2 C=O, Ester), 156.43 (C=O, Urethan), 150.72 ($\text{C}_q\text{-O}$, Aromat), 133.24, 132.64 (2 C_q , Aromat), 129.59, 129.23, 128.69, 127.34, 121.61 (CH, Aromat), 79.69 (C_q , *tert*-Butyl), 66.70 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 58.80 ($\alpha\text{-CH}$, Cys), 52.42 ($\alpha\text{-CH}$, Ile), 41.31 ($\text{CH}_2\text{-COO}$), 39.27 ($\beta\text{-CH}_2$, Cys), 37.07 ($\beta\text{-CH}$, Ile), 28.27 (CH_3 , *tert*-Butyl), 24.74 ($\gamma\text{-CH}_2$, Ile), 15.26, 10.97 (2 CH_3 , Ile).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 62.46	H 6.69	N 5.02
($\text{C}_{58}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}_2$)	gef.:	C 62.77	H 6.50	N 4.68

FAB-MS (m/z):	ber.:	1137.5 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$
	gef.:	1136.9 (in 3-NBA)

***N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-isooleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxybenzylester (Boc-Ile-Cys(Pal)-OPAOb) (9a)**

Zu einer Lösung von 0.858 g (0.77 mmol) Bis(*N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-isooleucyl)-L-cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester) (**7a**) in 50 ml Methylenchlorid werden unter Argon-Atmosphäre 0.474 g (3.08 mmol) DTT und 0.21 ml (1.54 mmol) Triethylamin gegeben und die Mischung 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird dreimal mit je 30 ml 1 M Salzsäure gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet.

Die Lösung wird anschließend unter Eiskühlung mit 0.21 ml (1.54 mmol) Triethylamin und 0.845 g (3.08 mmol) Palmitoylchlorid versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 4:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 59°C

Ausbeute: 1.017 g (1.28 mmol, 83 %)

R_f-Wert: 0.42 (Hexan/Essigester = 4:1(v/v))

[α]_D²⁰: - 0.7° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 7.38-7.30 (m, 7H, C₆H₅, OCCHCH, Aromat), 7.06 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, OCCH, Aromat), 6.72 (d, ³J = 6.5 Hz, 1H, NH, Amid), 5.11 (s, 2H, CH₂-O), 5.05 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH, Urethan), 4.79-4.74 (m, 1H, α-CH, Cys), 3.99-3.96 (m, 1H, α-CH, Ile), 3.86 (s, 2H, CH₂-COO), 3.37 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 6.1 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 3.32 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 4.6 Hz, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.52 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, α-CH₂, Pal), 1.93-1.81 (m, 1H, β-CH, Ile), 1.68-1.57 (m, 3H, γ-CH_{2a}, Ile, β-CH₂, Pal), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.25 (s, 24H, CH₂, Pal), 1.17-1.08 (m, 1H, γ-CH_{2b}, Ile), 0.91-0.86 (m, 9H, CH₃, Ile, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ = 199.37 (C=O, Thioester), 171.45 (C=O, Amid), 169.82, 169.59 (2 C=O, Ester), 155.56 (C=O, Urethan), 150.80 (C_q-O, Aromat), 133.28, 132.63 (2 C_q, Aromat), 129.73, 129.28, 128.74, 127.40, 121.68 (CH, Aromat), 79.83 (C_q, *tert*-Butyl), 66.97 (CH₂-O), 59.06 (α-CH, Cys), 52.41 (α-CH, Ile), 43.96 (CH₂-COO), 41.38 (β-CH₂, Cys), 37.40 (β-CH, Ile), 31.93 (α-CH₂, Pal), 30.33, 29.69, 29.43, 29.37, 29.22, 28.92, 25.52, 24.72 (CH₂, Pal), 28.31 (CH₃, *tert*-Butyl), 22.70 (γ-CH₂, Ile), 15.35, 14.15, 11.58 (3 CH₃, Ile, Pal).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 67.81	H 8.60	N 3.51
(C ₄₅ H ₆₇ N ₂ O ₈ S)	gef.:	C 67.81	H 8.55	N 3.70

EI-MS (m/z):	ber.:	796.470
	gef.:	796.475

L-Isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxybenzylester-hydrotrifluoracetat (H-Ile-Cys(Pal)-OPAOb·TFA) (43a)

Eine Lösung von 0.250 g (0.31 mmol) *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxybenzylester (**9a**) in 30 ml Methylenchlorid wird unter Eiskühlung mit 0.72 ml (9.41 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck durch zweimaliges Codestillieren mit je 40 ml Toluol entfernt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 92°C

Ausbeute: 0.255 g (0.31 mmol, 100 %)

R_F-Wert: 0.06 (Hexan/Essigester = 4:1(v/v))

[α]_D²⁰: - 2.7° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD):

δ = 7.41 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, OCCHCH, Aromat), 7.38-7.26 (m, 5H, C₆H₅, Aromat), 7.06 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, OCCH, Aromat), 5.17 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, CH_{2a}-O), 5.13 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, CH_{2b}-O), 4.68 (dd, ³J₁ = 7.2 Hz, ³J₂ = 5.6 Hz, 1H, α-CH, Cys), 3.88 (s, 2H, CH₂-COO), 3.72 (d, ³J = 5.2 Hz, 1H, α-CH, Ile), 3.44 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 3.25 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 7.2 Hz, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.53 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, α-CH₂, Pal), 1.91-1.83 (m, 1H, β-CH, Ile), 1.62-1.58 (m, 2H, β-CH₂, Pal), 1.55-1.47 (m, 1H, γ-CH_{2a}, Ile), 1.27 (s, 24H, CH₂, Pal), 1.21-1.11 (m, 1H, γ-CH_{2b}, Ile), 0.96 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, γ-CH₃, Ile), 0.92-0.87 (m, 6H, δ-CH₃, Ile, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD):

δ = 199.85 (C=O, Thioester), 171.64 (C=O, Amid), 170.68, 169.44 (2 C=O, Ester), 152.32 (C_q-O, Aromat), 135.04, 134.45 (2 C_q, Aromat), 130.87, 130.40, 129.66, 128.28, 122.78 (CH, Aromat), 67.84 (CH₂-O), 58.77 (α-CH, Cys), 53.78 (α-CH, Ile), 44.67 (CH₂-COO), 41.85 (β-CH₂, Cys), 38.07 (β-CH, Ile), 33.05 (α-CH₂, Pal), 30.75, 30.52, 30.46, 30.34, 30.22, 29.92, 26.53, 26.06, 25.27 (CH₂, Pal), 23.72 (γ-CH₂, Ile), 14.94, 14.50, 11.77 (3 CH₃, Ile, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 697.4250 [M-CF₃COO]⁺

(C₄₀H₆₀N₂O₆S·C₂F₃O₂) gef.: 697.4270 (in 3-NBA)

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxymethyl-ester (Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-OPAOB) (42a)**

Zu einer Lösung von 0.047 g (0.22 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-threonin (**36c**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung zunächst 0.053 g (0.22 mmol) EEDQ sowie anschließend 0.174 g (0.22 mmol) L-Isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxymethyl-ester-hydrotrifluoracetat (**43a**) und 31 μl (0.22 mmol) Triethylamin gegeben. Die Re-

aktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 94°C

Ausbeute: 0.146 g (0.16 mmol, 74 %)

R_f-Wert: 0.19 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

[α]_D²⁰: -27.4° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.38-7.30 (m, 7H, C₆H₅, OCCH₂, Aromat), 7.06 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, OCCH₂, Aromat), 6.95 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, NH, Amid), 6.93 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, NH, Amid), 5.51 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, NH, Urethan), 5.11 (s, 2H, CH₂-O), 4.76-4.72 (m, 1H, α-CH, Cys), 4.31-4.28 (m, 2H, α-CH, Thr, β-CH, Thr), 4.10 (d, ³J = 6.6 Hz, 1H, α-CH, Ile), 3.85 (s, 2H, CH₂-COO), 3.55 (br, 1H, OH, Thr), 3.32 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, β-CH₂, Cys), 2.53 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, α-CH₂, Pal), 1.98-1.91 (m, 1H, β-CH, Ile), 1.63-1.58 (m, 2H, β-CH₂, Pal), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.31-1.19 (m, 1H, γ-CH_{2a}, Ile), 1.25 (s, 24H, CH₂, Pal), 1.17 (d, ³J = 6.4 Hz, 3H, γ-CH₃, Thr), 1.14-1.08 (m, 1H, γ-CH_{2b}, Ile), 0.90-0.86 (m, 9H, CH₃, Ile, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

δ = 199.75 (C=O, Thioester), 171.78, 170.83 (2 C=O, Amid), 169.81, 169.62 (2 C=O, Ester), 156.40 (C=O, Urethan), 150.86 (C_q-O, Aromat), 133.30, 132.62 (2 C_q, Aromat), 129.70, 129.29, 128.76, 127.41, 121.70 (CH, Aromat), 80.32 (C_q, *tert*-Butyl), 67.01 (CH₂-O), 66.74 (β-CH, Thr), 57.98 (α-CH, Cys), 57.65 (α-CH, Thr), 52.70 (α-CH, Ile), 44.00 (CH₂-COO), 41.40 (β-CH₂, Cys), 36.71 (β-CH, Ile), 31.93 (α-CH₂, Pal), 30.18, 29.69, 29.65, 29.61, 29.44, 29.36, 29.24, 28.96, 25.56 24.52 (CH₂, Pal), 28.31 (CH₃, *tert*-Butyl), 22.70 (γ-CH₂, Ile), 18.23 (γ-CH₃, Thr), 15.42, 14.13, 11.43 (3 CH₃, Ile, Pal).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 65.52	H 8.41	N 4.67
(C ₄₉ H ₇₅ N ₃ O ₁₀ S)	gef.:	C 65.82	H 8.74	N 4.20

FAB-MS (m/z):	ber.:	898.5251 [M+H] ⁺
	gef.:	898.5217 (in 3-NBA)

N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-isooleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein*(Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-OH) (44a)**

In einer Lösung von 2.226 g (1.67 mmol) Dimethyl- β -cyclodextrin in 100 ml 0.05 M Phosphatpuffer (pH = 7) werden 0.050 g (0.06 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-isooleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxybenzylester (**42a**) mittels Ultraschall 3 h behandelt, bis ein nur noch schwach getrübes Gemisch entsteht. Danach werden 500 u immobilisierte Penicillin-G-Acylase zugegeben und die Suspension 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das polymeregebundene Enzym wird anschließend durch Filtration entfernt, die wäßrige Phase mit 1 M Salzsäure auf pH = 2 angesäuert, mit 0.909 g (3.34 mmol) Benzyltriethylammoniumbromid versetzt und fünfmal mit je 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende Rückstand wird dreimal mit je 5 ml Hexan digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 128°C

Ausbeute: 0.031 g (0.05 mmol, 81 %)

R_F-Wert: 0.03 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: - 13.1° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.38 (d, ³J = 6.8 Hz, 1H, NH, Amid), 7.30 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, NH, Amid), 5.66 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH, Urethan), 4.66-4.62 (m, 1H, α -CH, Cys), 4.35 (dd, ³J₁ = 8.7 Hz, ³J₂ = 7.6 Hz, 1H, α -CH, Thr), 4.31-4.27 (m, 1H, β -CH, Thr), 4.18 (d, ³J = 6.2 Hz, 1H, α -CH, Ile), 3.48 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 3.30 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 2.57 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, α -CH₂, Pal), 1.98-1.94 (m, 1H, β -CH, Ile), 1.67-1.61 (m, 2H, β -CH₂, Pal), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.31-1.27 (m, 1H, γ -CH_{2a}, Ile), 1.25 (s, 24H, CH₂, Pal), 1.17 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, γ -CH₃, Thr), 1.15-1.09 (m, 1H, γ -CH_{2b}, Ile), 0.92 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, γ -CH₃, Ile), 0.90-0.87 (m, 6H, δ -CH₃, Ile, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

δ = 200.27 (C=O, Thioester), 171.91, 171.76 (2 C=O, Amid), 156.45 (C=O, Urethan), 80.55 (C_q, *tert*-Butyl), 66.14 (β -CH, Thr), 58.08 (α -CH, Cys), 57.96 (α -CH, Thr), 53.06 (α -CH, Ile), 44.05 (β -CH₂, Cys), 36.67 (β -CH, Ile), 31.93 (α -CH₂, Pal), 29.84, 29.70, 29.66, 29.63,

29.47, 29.36, 29.27, 29.02, 25.58, 24.52 (CH₂, Pal), 28.31 (CH₃, *tert*-Butyl), 22.69 (γ -CH₂, Ile), 18.29 (γ -CH₃, Thr), 15.40, 14.12, 11.30 (3 CH₃, Ile, Pal).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 60.59	H 9.42	N 6.23
(C ₃₄ H ₆₃ N ₃ O ₈ S)	gef.:	C 60.44	H 9.10	N 6.13
FAB-MS (m/z):	ber.:	696.4234 [M+Na] ⁺		
	gef.:	696.4227 (in 3-NBA)		

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allyl-ester (Boc-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll) (41)**

Zu einer Lösung von 0.080 g (0.12 mmol) *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein (**44a**) und 0.042 g (0.12 mmol) L-Isoleucin-allylester-hydrotosylat (**38d**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 20 μ l (0.14 mmol) Triethylamin und 0.035 g (0.14 mmol) EEDQ gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend bei vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan/Aceton = 7:1(v/v)) gereinigt.

farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute:	0.070 g (0.08 mmol, 71 %)
R _F -Wert:	0.13 (Hexan/Aceton = 7:1(v/v))
[α] _D ²⁰ :	- 39.9° (c = 1.0, CH ₃ OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 5.96 (ddt, ³J_{trans} = 17.2 Hz, ³J_{cis} = 10.4 Hz, ³J_{vic} = 5.7 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.36 (d, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, CH=CH_{2a}), 5.24 (d, ³J_{cis} = 10.4 Hz, 1H, CH=CH_{2b}), 4.65 (dd, ²J = 13.2 Hz, ³J = 5.8 Hz, 1H, CH_{2a}-O), 4.62 (dd, ²J = 13.2 Hz, ³J = 5.7 Hz, 1H, CH_{2b}-O), 4.56 (dd, ³J₁ = 8.4 Hz, ³J₂ = 5.6 Hz, 1H, α -CH, Cys), 4.38 (d, ³J = 6.0 Hz, 1H, α -CH, Ile₁), 4.26 (d, ³J = 6.7 Hz, 1H, α -CH, Ile₂), 4.16-4.13 (m, 1H, β -CH, Thr), 4.08 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, α -CH, Thr), 3.33 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 3.13 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 8.4 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 2.56 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, α -CH₂, Pal), 1.95-1.88 (m, 1H, β -CH, Ile₁), 1.88-1.81 (m, 1H, β -CH, Ile₂), 1.65-1.61 (m, 2H, β -CH₂, Pal), 1.58-1.42 (m, 2H, 2 γ -CH_{2a}, Ile), 1.46 (s, 9H, *tert*-

Butyl), 1.28 (s, 24H, CH₂, Pal), 1.26-1.15 (m, 2H, 2 γ -CH_{2b}, Ile), 1.18 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, γ -CH₃, Thr), 0.93-0.88 (m, 15H, CH₃, Ile, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

$\delta = 200.22$ (C=O, Thioester), 173.27, 172.12, 171.92 (3 C=O, Amid), 171.78 (C=O, Ester), 157.96 (C=O, Urethan), 133.25 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 118.97 ($\text{C}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 80.79 (C_q, *tert*-Butyl), 68.48 (β -CH, Thr), 66.63 (CH₂-O), 61.05 (α -CH, Cys), 59.23 (α -CH, Ile), 58.34 (α -CH, Ile), 53.97 (α -CH, Thr), 44.74 (β -CH₂, Cys), 38.32, 38.20 (2 β -CH, Ile), 33.02 (α -CH₂, Pal), 31.09, 30.71, 30.67, 30.50, 30.42, 30.35, 29.97, 26.53, 26.23 (CH₂, Pal), 28.71 (CH₃, *tert*-Butyl), 25.73, 23.69 (2 γ -CH₂, Ile), 20.01 (γ -CH₃, Thr), 15.95, 14.46, 11.75, 11.69 (5 CH₃, Ile, Pal).

EI-MS (m/z): ber.: 826.5490

(C₄₃H₇₈N₄O₉S) gef.: 826.5487

L-Threonyl-L-isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester-hydrotrifluoracetat (H-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll-TFA) (45)

Eine Lösung von 0.044 g (0.05 mmol) *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester (**41**) in 0.50 ml Methylenchlorid wird unter Eiskühlung mit 0.12 ml (1.60 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck durch zweimaliges Codestillieren mit je 10 ml Toluol entfernt.

farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 0.045 g (0.05 mmol, 100 %)

R_F-Wert: 0.06 (Hexan/Aceton = 7:1(v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: - 32.7° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

$\delta = 5.96$ (ddt, $^3J_{\text{trans}} = 17.1$ Hz, $^3J_{\text{cis}} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{vic}} = 5.9$ Hz, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 5.36 (d, $^3J_{\text{trans}} = 17.1$ Hz, 1H, CH= $\underline{\text{C}}\text{H}_{2a}$), 5.25 (d, $^3J_{\text{cis}} = 10.6$ Hz, 1H, CH= $\underline{\text{C}}\text{H}_{2b}$), 4.65 (dd, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{2a}$ -O), 4.63 (dd, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{2b}$ -O), 4.57 (dd, $^3J_1 = 7.9$ Hz, $^3J_2 = 6.2$ Hz, 1H, α -CH, Cys), 4.39 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, α -CH, Ile₁), 4.29 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, α -CH, Ile₂), 4.07-4.04 (m, 1H, β -CH, Thr), 3.75 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, α -CH, Thr), 3.30 (dd, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 3.14 (dd, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, β -CH_{2b},

Cys), 2.57 (t, $^3J = 8.0$ Hz, 2H, α -CH₂, Pal), 1.93-1.87 (m, 1H, β -CH, Ile₁), 1.87-1.80 (m, 1H, β -CH, Ile₂), 1.65-1.63 (m, 2H, β -CH₂, Pal), 1.59-1.42 (m, 2H, 2 γ -CH_{2a}, Ile), 1.31 (d, $^3J = 3.8$ Hz, 3H, γ -CH₃, Thr), 1.29 (s, 24H, CH₂, Pal), 1.27-1.14 (m, 2H, 2 γ -CH_{2b}, Ile), 0.95-0.89 (m, 15H, CH₃, Ile, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

$\delta = 200.23$ (C=O, Thioester), 172.77, 172.16, 171.68 (3 C=O, Amid), 168.44 (C=O, Ester), 133.19 (CH=CH₂), 119.03 (CH=CH₂), 67.56 (β -CH, Thr), 66.66 (CH₂-O), 59.88 (α -CH, Cys), 59.35 (α -CH, Ile), 58.28 (α -CH, Ile), 53.81 (α -CH, Thr), 44.73 (β -CH₂, Cys), 38.35, 38.12 (2 β -CH, Ile), 33.00 (α -CH₂, Pal), 31.14, 30.70, 30.65, 30.49, 30.40, 30.34, 29.95, 26.53, 26.19 (CH₂, Pal), 25.76, 23.67 (2 γ -CH₂, Ile), 20.19 (γ -CH₃, Thr), 15.96, 15.84, 14.44, 11.70, 11.52 (5 CH₃, Ile, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 728.5122 [M-CF₃COO]⁺
(C₃₈H₇₁N₄O₇S·C₂F₃O₂) gef.: 728.5154 (in 3-NBA)

6.2.3. Versuche zu Kapitel 4.1.4.

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester (NBDac-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll) (46)**

Zu einer Lösung von 0.010 g (0.04 mmol) *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaprinsäure (**46a**) und 0.030 g (0.04 mmol) L-Threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester-hydrotrifluoracetat (**45**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.007 g (0.04 mmol) HOBt, 5 μ l (0.04 mmol) Triethylamin und 0.007 g (0.04 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend bei vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Chloroform/Methanol = 50:1(v/v)) gereinigt.

brauner Feststoff, Schmp.: 144°C
Ausbeute: 0.031 g (0.03 mmol, 86 %)
R_f-Wert: 0.80 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v))
[α]_D²⁰: - 91.6° (c = 1.0, CHCl₃)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

δ = 8.48 (d, $^3J = 8.4$ Hz, CH, NBD), 7.29 (br, 1H, NH, Amid), 7.17 (d, $^3J = 7.1$, 2H, NH, Amid), 6.86 (br, 1H, NH, Amid), 6.65 (br, 1H, NH, Amid), 6.17 (d, $^3J = 8.4$ Hz, CH, NBD), 5.94-5.85 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.33 (d, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_{2a}$), 5.25 (d, $^3J_{\text{cis}} = 10.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_{2b}$), 4.67-4.58 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O}$, $\alpha\text{-CH}$, Cys, $\alpha\text{-CH}$, Ile₁), 4.55-4.52 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Thr), 4.36-4.30 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}$, Ile₂, $\beta\text{-CH}$, Thr), 3.52-3.49 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 3.31-3.24 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$, Cys), 2.56 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$, Pal), 2.38-2.34 (m, 2H, $\epsilon\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 1.99-1.95 (m, 1H, $\beta\text{-CH}$, Ile₁), 1.91-1.88 (m, 1H, $\beta\text{-CH}$, Ile₂), 1.86-1.82 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 1.80-1.74 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 1.63-1.60 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$, Pal), 1.55-1.51 (m, 2H, 2 $\gamma\text{-CH}_{2a}$, Ile), 1.43-1.41 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 1.24 (s, 24H, CH_2 , Pal), 1.16 (d, $^3J = 4.9$ Hz, 3H, $\gamma\text{-CH}_3$, Thr), 1.12-1.07 (m, 2H, 2 $\gamma\text{-CH}_{2b}$, Ile), 0.91-0.86 (m, 15H, CH_3 , Ile, CH_3 , Pal).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3):

δ = 201.39 (C=O, Thioester), 171.32, 171.06, 169.50 (5 C=O, Amide, Ester), 144.33, 144.01 (4 C_q, NBD), 136.51 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 131.57 (2 CH, NBD), 118.97 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 66.98 ($\beta\text{-CH}$, Thr), 65.90 ($\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 58.49 ($\alpha\text{-CH}$, Cys), 56.86 ($\alpha\text{-CH}$, Ile), 53.83 ($\alpha\text{-CH}$, Ile), 53.43 ($\alpha\text{-CH}$, Thr), 44.07 ($\alpha\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 43.64 ($\beta\text{-CH}_2$, Cys), 37.73, 36.71 (2 $\beta\text{-CH}$, Ile), 35.83 ($\alpha\text{-CH}_2$, Pal), 31.94 ($\epsilon\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 30.60, 29.71, 29.46, 29.37, 29.27, 29.03, 27.90, 26.32, 26.19, 25.60, 25.09, 24.81, 24.64, 22.70 (CH_2 , Pal, $\beta\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, Aminocaproyl, $\gamma\text{-CH}_2$, Ile), 18.46 ($\gamma\text{-CH}_3$, Thr), 15.63, 15.50, 14.14, 11.58 (5 CH_3 , Ile, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 1003.590 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 ($\text{C}_{50}\text{H}_{82}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}$) gef.: 1003.586 (in 3-NBA)

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin (NBDac-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH) (47)**

Unter Argon werden bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 0.031 g (0.03 mmol) *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester (**46**) in 10 ml abs. THF 0.002 g (0.02 mmol) Dimethylbarbitursäure sowie 0.001 g (0.9 μmol) Tetrakis-(triphenylphosphan)-palladium(0) gegeben. Nach 15 min Rühren wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand dreimal in je 2 ml Diethylether digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

brauner Feststoff, Schmp.: 162°C
Ausbeute: 0.025 g (0.03 mmol, 86 %)
R_f-Wert: 0.44 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v))
[α]_D²⁰: - 12.7° (c = 1.0, CHCl₃/CH₃OH = 1:1(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1(v/v)):

δ = 8.52 (d, ³J = 8.6 Hz, CH, NBD), 6.30 (d, ³J = 8.7 Hz, CH, NBD), 4.59-4.56 (m, 1H, α-CH, Cys), 4.45 (d, ³J = 3.9 Hz, 1H, α-CH, Thr), 4.41-4.38 (m, 1H, α-CH, Ile₁), 4.30-4.27 (m, 1H, α-CH, Ile₂), 4.21 (dq, ³J₁ = 3.9 Hz, ³J₂ = 6.4 Hz, 1H, β-CH, Thr), 3.57-3.50 (m, 2H, α-CH₂, Aminocaproyl), 3.35 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 5.4 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 3.16 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.57 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, α-CH₂, Pal), 2.36 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 1.92-1.88 (m, 2H, 2 β-CH, Ile), 1.86-1.80 (m, 2H, β-CH₂, Aminocaproyl), 1.77-1.71 (m, 2H, δ-CH₂, Aminocaproyl), 1.65-1.61 (m, 2H, β-CH₂, Pal), 1.55-1.48 (m, 4H, 2 γ-CH_{2a}, Ile, γ-CH₂, Aminocaproyl), 1.27 (s, 24H, CH₂, Pal), 1.22-1.14 (m, 2H, 2 γ-CH_{2b}, Ile), 1.18 (d, ³J = 6.4 Hz, 3H, γ-CH₃, Thr), 0.95-0.87 (m, 15H, CH₃, Ile, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1(v/v)):

δ = 200.61 (C=O, Thioester), 175.37 (C=O, Carbonsäure), 173.69, 172.76, 171.90, 170.86 (4 C=O, Amide), 146.06, 145.17, 144.89 (4 C_q, NBD), 132.53, 129.46 (2 CH, NBD), 67.78 (β-CH, Thr), 58.85, 58.70, 57.61, 53.62 (α-CH), 44.46 (α-CH₂, Aminocaproyl), 44.19 (β-CH₂, Cys), 37.97, 37.55 (2 β-CH, Ile), 36.25 (α-CH₂, Pal), 32.50 (ε-CH₂, Aminocaproyl), 30.74, 30.23, 30.20, 30.18, 30.00, 29.91, 29.84, 29.54, 28.47, 27.03, 26.10, 25.80, 25.62, 25.20, 23.21 (CH₂, Pal, β-CH₂, δ-CH₂, γ-CH₂, Aminocaproyl, γ-CH₂, Ile), 19.47 (γ-CH₃, Thr), 15.77, 15.74, 14.28, 11.78, 11.60 (5 CH₃, Ile, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 963.5589 [M+H]⁺
(C₄₇H₇₈N₈O₁₁S) gef.: 963.5562 (in 3-NBA)

6.2.4. Versuche zu Kapitel 4.1.5.

N^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginin

(Boc-Arg(Aloc)₂-OH) (36g)^[100, 101]

Zu einer Suspension von 0.690 g (2.10 mmol) *N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-arginin (**36f**) in 5 ml Methylenchlorid werden unter Argon-Atmosphäre 1.13 ml (8.40 mmol) DIPEA und 0.80 ml (6.30 mmol) Trimethylsilylchlorid getropft und die Mischung 90 min unter Rückfluß erhitzt. Anschließend werden unter Eiskühlung zunächst 0.80 ml (6.30 mmol) DIPEA und dann 0.51 ml (4.83 mmol) Chlorameisensäureallylester zugegeben. Die Lösung wird noch 20 min bei 0°C und danach 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Die Mischung wird mit 20 ml Wasser verdünnt, mit 1 M Salzsäure auf pH = 2 angesäuert, dreimal mit je 30 ml Methylenchlorid extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die anschließende Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch (Hexan/Essigester = 2:1(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure).

farbloses Öl

Ausbeute: 0.650 g (1.37 mmol, 65 %)

R_F-Wert: 0.16 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 11.18 (br, 1H COOH), 9.35 (br, 1H, NH, Guanidino), 8.86 (br, 1H, NH, Guanidino), 6.01-5.80 (m, 2H, CH=CH₂), 5.42 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, NH, Urethan), 5.36-5.14 (m, 4H, CH=CH₂) 4.67 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.55 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.21-4.13 (m, 1H, α-CH, Arg), 3.98-3.94 (m, 2H, δ-CH₂, Arg), 1.84-1.81 (m, 1H, β-CH_{2a}, Arg), 1.72-1.60 (m, 3H, β-CH_{2b}, γ-CH₂, Arg), 1.39 (s, 9H, *tert*-Butyl).

Bis(*N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl)-L-cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester) (Boc-Arg(Aloc)₂-Cys-OPAOb)₂ (7b)

Zu einer Lösung von 0.535 g (1.21 mmol) *N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginin (**36g**) in 50 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung zunächst 0.196 g (1.45 mmol) HOBt und 0.19 ml (1.21 mmol) DIC sowie anschließend 0.460 g (0.61 mmol) L-Cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester)-bishydrochlorid (**38c**) und 0.17 ml

(1.21 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit je 40 ml 1 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:1(v/v)) gereinigt.

farbloses Öl

Ausbeute: 0.581 g (0.75 mmol, 62 %)
 R_f-Wert: 0.44 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))
 [α]_D²⁰: + 7.7° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 9.40 (br, 2H, NH, Guanidino), 9.24 (br, 2H, NH, Guanidino), 7.42 (d, ³J = 6.7 Hz, 2H, NH, Amid), 7.36-7.28 (m, 10H, C₆H₅, Aromat), 7.31 (d, ³J = 8.4 Hz, 4H, OCCHCH₂, Aromat), 7.03 (d, ³J = 8.4 Hz, 4H, OCCH₂, Aromat), 6.00-5.87 (m, 4H, CH=CH₂), 5.80 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H, NH, Urethan), 5.35-5.16 (m, 8H, CH=CH₂), 5.12 (d, ²J = 12.4 Hz, 2H, CH_{2a}-O, Benzyl), 5.08 (d, ²J = 12.4 Hz, 2H, CH_{2b}-O, Benzyl), 4.81-4.76 (m, 2H, α-CH, Cys), 4.67 (d, ³J = 5.7 Hz, 4H, CH₂-O, Allyl), 4.64-4.52 (m, 4H, CH₂-O, Allyl), 4.32-4.30 (m, 2H, α-CH, Arg), 4.04-3.86 (m, 4H, δ-CH₂, Arg), 3.84 (s, 4H, CH₂-COO), 3.05-3.00 (m, 4H, β-CH₂, Cys), 1.81-1.79 (m, 2H, β-CH_{2a}, Arg), 1.72-1.65 (m, 6H, β-CH_{2b}, γ-CH₂, Arg), 1.41 (s, 18H, *tert*-Butyl).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ = 172.21, 169.76 (3 C=O, 2 Ester, Amid), 163.47 (C_q, Guanidino), 160.56, 155.68, 155.60 (3 C=O, Urethan), 150.69 (C_q-O, Aromat), 133.23, 132.99 (2 C_q, Aromat), 132.61, 131.01 (2 CH=CH₂), 129.51, 129.22, 128.67, 128.46, 127.32, 121.61 (CH, Aromat), 119.43, 117.70 (2 CH=CH₂), 79.69 (C_q, *tert*-Butyl), 67.65, 66.73, 66.07 (CH₂-O, 2 Allyl, 1 Benzyl), 53.70 (α-CH, Cys), 51.89 (α-CH, Arg), 44.05 (CH₂-COO), 41.28 (δ-CH₂, Arg), 39.66 (β-CH₂, Cys), 28.93 (β-CH₂, Arg), 28.28 (CH₃, *tert*-Butyl), 24.60 (γ-CH₂, Arg).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 57.80	H 6.03	N 9.11
(C ₇₄ H ₉₂ N ₁₀ O ₂₂ S ₂)	gef.:	C 57.86	H 6.04	N 8.79

FAB-MS (m/z):	ber.:	1538.7 [M+H] ⁺
	gef.:	1538.4 (in 3-NBA)

***N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxybenzylester (Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OPAOb) (9b)**

Zu einer Lösung von 0.273 g (0.18 mmol) Bis(*N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl)-L-cystin-bis(*para*-phenylacetoxybenzylester) (**7b**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Argon-Atmosphäre 0.109 g (0.71 mmol) DTT und 48 μl (0.36 mmol) Triethylamin gegeben und die Mischung 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird dreimal mit je 20 ml 1 M Salzsäure gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet.

Die Lösung wird anschließend unter Eiskühlung mit 48 μl (0.36 mmol) Triethylamin und 0.244 g (0.89 mmol) Palmitoylchlorid versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 44°C

Ausbeute: 0.294 g (0.30 mmol, 81 %)

R_F-Wert: 0.43 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

[α]_D²⁰: + 8.3° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 9.44 (br, 1H, NH, Guanidino), 9.26 (br, 1H, NH, Guanidino), 7.38-7.26 (m, 7H, C₆H₅, OCCHCH₂, Aromat), 7.10 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, NH, Amid), 7.05 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, OCCH₂, Aromat), 6.02-5.89 (m, 2H, CH=CH₂), 5.59 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, NH, Urethan), 5.37-5.18 (m, 4H, CH=CH₂), 5.11 (d, ²J = 12.7 Hz, 1H, CH_{2a}-O, Benzyl), 5.09 (d, ²J = 12.7 Hz, 1H, CH_{2b}-O, Benzyl), 4.72-4.70 (m, 1H, α-CH, Cys), 4.63 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.64-4.55 (m, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.24-4.21 (m, 1H, α-CH, Arg), 4.04-4.00 (m, 1H, δ-CH_{2a}, Arg), 3.90-3.87 (m, 1H, δ-CH_{2b}, Arg), 3.85 (s, 2H, CH₂-COO), 3.38 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 5.0 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 3.30 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 6.4 Hz, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.49 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, α-CH₂, Pal), 1.80-1.78 (m, 1H, β-CH_{2a}, Arg), 1.71-1.67 (m, 3H, β-CH_{2b}, γ-CH₂, Arg), 1.61-1.58 (m, 2H, β-CH₂, Pal), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.25 (s, 24H, CH₂, Pal), 0.88 (t, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

δ = 198.61 (C=O, Thioester), 171.92 (C=O, Amid), 169.78, 169.54 (2 C=O, Ester), 163.54 (C_q, Guanidino), 160.70, 155.68, 155.53 (3 C=O, Urethan), 150.78 (C_q-O, Aromat), 133.31, 133.06 (2 C_q, Aromat), 132.74, 131.02 (2 CH=CH₂), 129.60, 129.28, 128.74, 127.39, 121.64

(CH, Aromat), 119.62, 117.83 (2 CH=CH), 79.81 (C_q, *tert*-Butyl), 67.77, 66.85, 66.18 (CH₂-O, 2 Allyl, 1 Benzyl), 53.87 (α -CH, Cys), 52.20 (α -CH, Arg), 44.10 (CH₂-COO), 43.96 (δ -CH₂, Arg), 41.38 (β -CH₂, Cys), 31.92 (α -CH₂, Pal), 30.31, 29.69, 29.65, 29.60, 29.44, 29.35, 29.23, 28.75, 25.48, 22.69 (CH₂, Pal), 28.94 (β -CH₂, Arg), 28.34 (CH₃, *tert*-Butyl), 24.60 (γ -CH₂, Arg), 14.13 (CH₃, Pal).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 63.13	H 7.69	N 6.94
(C ₅₃ H ₇₇ N ₅ O ₁₂ S)	gef.:	C 63.05	H 7.92	N 6.58

FAB-MS (m/z):	ber.:	1008.536 [M+H] ⁺
	gef.:	1008.535 (in 3-NBA)

***N* ^{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxymethyl-ester-hydrotrifluoracetat (Boc-Arg-Cys(Pal)-O⁺PAOB⁻TFA) (48)**

Unter Argon werden bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 0.052 g (0.05 mmol) *N* ^{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N* ^{δ,ω} -diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxymethyl-ester (**9b**) in 10 ml abs. THF 0.016 g (0.10 mmol) Dimethylbarbitursäure sowie 0.001 g (0.9 μ mol) Tetrakis-(triphenylphosphan)-palladium(0) gegeben. Nach 25 min Rühren werden der Reaktionsmischung 5 μ l (0.06 mmol) Trifluoressigsäure hinzugefügt, weitere 5 min gerührt, das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand dreimal in je 2 ml Diethylether digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 98°C

Ausbeute: 0.049 g (0.05 mmol, 98 %)

R_f-Wert: 0.04 (Hexan/Essigester = 1:3(v/v))

[α]_D²⁰: -16.5° (c = 1.0, CHCl₃/CH₃OH = 1:1(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

δ = 7.37-7.30 (m, 7H, C₆H₅, OCCHCH, Aromat), 7.05 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, OCCHCH, Aromat), 5.13 (s, 2H, CH₂-O, Benzyl), 4.67 (dd, ³J₁ = 6.7 Hz, ³J₂ = 5.3 Hz, 1H, α -CH, Cys), 4.08-4.04 (m, 1H, α -CH, Arg), 3.87 (s, 2H, CH₂-COO), 3.42 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 3.26 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 6.8 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 3.18-3.07 (m, 2H, δ -CH₂, Arg), 2.52 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, α -CH₂, Pal), 1.76-1.72 (m, 1H, β -CH_{2a}, Arg), 1.65-1.56 (m, 5H, β -

CH_{2b}, γ-CH₂, Arg, β-CH₂, Pal), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.25 (s, 24H, CH₂, Pal), 0.88 (t, ³J = 6.8 Hz, 3H, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

δ = 199.31 (C=O, Thioester), 172.89 (C=O, Amid), 170.63, 169.93 (2 C=O, Ester), 163.03 (C_q, Guanidino), 157.25 (C=O, Urethan), 150.91 (C_q-O, Aromat), 133.38, 132.99 (2 C_q, Aromat), 129.73, 129.42, 128.91, 127.59, 121.81 (CH, Aromat), 80.49 (C_q, *tert*-Butyl), 67.07 (CH₂-O, Benzyl), 53.65 (α-CH, Cys), 52.49 (α-CH, Arg), 44.09 (CH₂-COO), 41.44 (β-CH₂, Cys), 40.72 (δ-CH₂, Arg), 32.05 (α-CH₂, Pal), 30.07, 29.81, 29.77, 29.72, 29.56, 29.47, 29.35, 29.12, 25.69, 25.63, 22.80 (CH₂, Pal), 29.05 (β-CH₂, Arg), 28.34 (CH₃, *tert*-Butyl), 24.73 (γ-CH₂, Arg), 14.15 (CH₃, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 840.4945 [M-CF₃COO]⁺
(C₄₅H₇₀N₅O₈S·C₂F₃O₂) gef.: 840.4968 (in 3-NBA)

(*N*^{δ,ω}-Diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxybenzylester-hydrotrifluoracetat (H-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OPAObTFA) (43b)

Eine Lösung von 0.272 g (0.27 mmol) *N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxybenzylester (**9b**) in 3 ml Methylenchlorid wird unter Eiskühlung mit 0.62 ml (8.11 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck durch zweimaliges Codestillieren mit je 10 ml Toluol entfernt.

farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 0.288 g (0.27 mmol, quant.)
R_F-Wert: 0.03 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))
[α]_D²⁰: -13.7° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 7.40 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, OCCHCH₂, Aromat), 7.37-7.28 (m, 5H, C₆H₅, Aromat), 7.06 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, OCCH₂, Aromat), 5.98-5.94 (m, 2H, CH=CH₂), 5.37-5.20 (m, 4H, CH=CH₂), 5.16 (d, ²J = 12.7 Hz, 1H, CH_{2a}-O, Benzyl), 5.11 (d, ²J = 12.7 Hz, 1H, CH_{2b}-O, Benzyl), 4.71 (dt, ³J = 5.6 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.67 (dd, ³J₁ = 7.3 Hz, ³J₂ = 5.4 Hz, 1H, α-CH, Cys), 4.60-4.58 (m, 2H, CH₂-O, Allyl), 3.98-3.95 (m, 1H, α-CH, Arg), 3.88 (s, 2H, CH₂-

COO), 3.87-3.84 (m, 2H, δ -CH₂, Arg), 3.45 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 3.24 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 2.53 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 2H, α -CH₂, Pal), 1.90-1.82 (m, 1H, β -CH_{2a}, Arg), 1.81-1.73 (m, 3H, β -CH_{2b}, γ -CH₂, Arg), 1.62-1.57 (m, 2H, β -CH₂, Pal), 1.27 (s, 24H, CH₂, Pal), 0.89 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

$\delta = 199.58$ (C=O, Thioester), 171.55 (C=O, Amid), 170.62, 170.08 (2 C=O, Ester), 163.06 (C_q, Guanidino), 161.28, 156.08, (2 C=O, Urethan), 152.19 (C_q-O, Aromat), 134.93, 134.38 (2 C_q, Aromat), 134.01, 132.53 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 130.83, 130.62, 130.33, 129.60, 128.22, 122.73 (CH, Aromat), 119.75, 118.47 (2 $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 69.09, 67.77, 67.29 (CH₂-O, 2 Allyl, 1 Benzyl), 53.70 (α -CH, Cys), 53.42 (α -CH, Arg), 45.03 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COO}$), 44.62 (δ -CH₂, Arg), 41.80 (β -CH₂, Cys), 32.96 (α -CH₂, Pal), 30.67, 30.66, 30.60, 30.44, 30.37, 30.26, 30.15, 29.85, 26.43, 25.95, 23.63 (CH₂, Pal), 28.92 (β -CH₂, Arg), 24.47 (γ -CH₂, Arg), 14.44 (CH₃, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 909.4922 [M-CF₃COO]⁺
(C₄₈H₇₀N₅O₁₀S₂C₂F₃O₂) gef.: 909.4897 (in 3-NBA)

***N* ^{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-L-methionyl-(*N* ^{δ,ω} -diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxymethyl ester (Boc-Met-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OPAOb) (42b)**

Zu einer Lösung von 0.055 g (0.22 mmol) *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-methionin (**36h**) in 25 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung zunächst 0.035 g (0.27 mmol) HOBt und 33 μ l (0.22 mmol) DIC sowie anschließend 0.225 g (0.22 mmol) (*N* ^{δ,ω} -Diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxymethyl ester-hydrotrifluoracetat (**43b**) und 30 μ l (0.22 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)) gereinigt.

farblos wachstypischer Feststoff

Ausbeute: 0.163 g (0.14 mmol, 65 %)
R_f-Wert: 0.19 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))
[α]_D²⁰: - 13.9° (c = 1.0, CHCl₃)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ = 9.47 (br, 1H, NH, Guanidino), 9.29 (br, 1H, NH, Guanidino), 7.39-7.32 (m, 7H, C_6H_5 , OCCHCH , Aromat), 7.31 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, NH, Amid), 7.17 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, NH, Amid), 7.05 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, OCCH , Aromat), 6.02-5.89 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.37-5.19 (m, 4H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.11 (d, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2a}\text{-O}$, Benzyl), 5.08 (d, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2b}\text{-O}$, Benzyl), 4.69 (d, $^3J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 4.68-4.64 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Cys), 4.62-4.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 4.53-4.50 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Arg), 4.27-4.25 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Met), 3.99-3.95 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$, Arg), 3.86 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COO}$), 3.37 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Cys), 3.29 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, Cys), 2.54 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$, Met), 2.51 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$, Pal), 2.12-2.05 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Met), 2.09 (s, 3H, SCH_3), 1.94-1.87 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, Met), 1.84-1.81 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Arg), 1.73-1.66 (m, 3H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, $\gamma\text{-CH}_2$, Arg), 1.61-1.55 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$, Pal), 1.42 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.25 (s, 24H, CH_2 , Pal), 0.88 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 , Pal).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3):

δ = 198.73 (C=O, Thioester), 171.58, 171.13 (2 C=O, Amid), 169.81, 169.45 (2 C=O, Ester), 163.46 (C_q , Guanidino), 160.91, 155.67 (3 C=O, Urethan), 150.79 ($\text{C}_q\text{-O}$, Aromat), 133.30, 132.72 (2 C_q , Aromat), 133.03, 131.00 (2 $\text{CH}=\text{CH}_2$), 129.65, 129.29, 128.75, 127.40, 121.65 (CH , Aromat), 119.63, 118.03 (2 $\text{CH}=\text{CH}_2$), 80.05 (C_q , *tert*-Butyl), 67.82, 66.89, 66.22 ($\text{CH}_2\text{-O}$, 2 Allyl, 1 Benzyl), 53.52 ($\alpha\text{-CH}$, Cys), 52.67 ($\alpha\text{-CH}$, Arg), 52.36 ($\alpha\text{-CH}$, Met), 44.05, 44.00 ($\text{CH}_2\text{-COO}$, $\delta\text{-CH}_2$, Arg), 41.39 ($\beta\text{-CH}_2$, Cys), 31.92, 31.73 ($\alpha\text{-CH}_2$, Pal, $\gamma\text{-CH}_2$, Met), 30.17 ($\beta\text{-CH}_2$, Met), 29.69, 29.66, 29.62, 29.45, 29.36, 29.25, 28.50, 25.50, 22.69 (CH_2 , Pal), 28.96 ($\beta\text{-CH}_2$, Arg), 28.28 (CH_3 , *tert*-Butyl), 24.55 ($\gamma\text{-CH}_2$, Arg), 15.32 (SCH_3 , Met), 14.13 (CH_3 , Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 1139.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$
($\text{C}_{58}\text{H}_{86}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S}_2$) gef.: 1139.5 (in 3-NBA)

6.2.5. Versuche zu Kapitel 4.1.6.

N^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein (Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OH) (49)

In einer Lösung von 200 mg (150 μmol) Dimethyl-β-cyclodextrin in 2 ml 0.05 M Phosphatpuffer (pH = 7) werden 5 mg (5 μmol) *N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-*para*-phenylacetoxycarbonyl-ester (**9b**) mittels Ultraschall 90 min behandelt, bis ein nur noch schwach getrübbtes Gemisch entsteht. Danach werden 50 u immobilisierte Penicillin-G-Acylase zugegeben und die Suspension 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das polymergebundene Enzym wird anschließend durch Filtration entfernt, die wäßrige Phase mit 1 M Salzsäure auf pH = 2 angesäuert, mit 81 mg (300 μmol) Benzyltriethylammoniumbromid versetzt und fünfmal mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende Rückstand wird dreimal mit je 1 ml Hexan digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 83°C

Ausbeute: 3 mg (4 μmol, 77 %)

R_f-Wert: 0.10 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 9.35 (br, 1H, NH, Guanidino), 9.33 (br, 1H, NH, Guanidino), 6.02-5.92 (m, 2H, CH=CH₂), 5.62 (br, 1H, NH, Urethan), 5.39-5.21 (m, 4H, CH=CH₂), 4.72 (d, ³J = 5.0 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.65-4.59 (m, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.52-4.42 (m, 1H, α-CH, Cys), 4.28-4.18 (m, 1H, α-CH, Arg), 4.02-3.87 (m, 1H, δ-CH₂, Arg), 3.42-3.36 (m, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 3.31-3.27 (m, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.53 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, α-CH₂, Pal), 1.86-1.82 (m, 1H, β-CH_{2a}, Arg), 1.79-1.72 (m, 1H, β-CH_{2b}, Arg), 1.67-1.61 (m, 4H, β-CH₂, Pal, γ-CH₂, Arg), 1.43 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.25 (s, 24H, CH₂, Pal), 0.88 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

δ = 200.09 (C=O, Thioester), 172.50 (2 C=O, Carbonsäure, Amid), 163.50 (C_q, Guanidino), 160.57, 155.71 (3 C=O, Urethan), 132.99, 131.08 (2 CH=CH₂), 119.60, 118.02 (2 CH=CH₂), 80.07 (C_q, *tert*-Butyl), 66.30, 66.12 (2 CH₂-O, Allyl), 53.99 (α-CH, Cys), 50.60 (α-CH, Arg), 44.34 (δ-CH₂, Arg), 44.04 (β-CH₂, Cys), 31.93 (α-CH₂, Pal), 29.72, 29.67, 29.53, 29.37,

29.32, 29.08, 24.56, 22.70 (CH₂, Pal), 28.92 (β-CH₂, Arg), 28.37 (CH₃, *tert*-Butyl), 25.57 (γ-CH₂, Arg), 14.13 (CH₃, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 784.4530 [M+H]⁺
(C₃₈H₆₅N₅O₁₀S) gef.: 784.4556 (in 3-NBA)

**Bis(*N-tert*-Butyloxycarbonyl)-L-cystin-bis(phenylhydrazid)
(Boc-Cys-NH-NH-Ph)₂ (37c)**

Eine Lösung von 0.204 g (0.46 mmol) Bis(*N-tert*-Butyloxycarbonyl)-L-cystin (**36d**), 0.09 ml (0.92 mmol) Phenylhydrazid, 0.173 g (1.10 mmol) HOBt und 0.14 ml (0.92 mmol) DIC in 50 ml Methylenchlorid wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wird die Reaktionsmischung mit je 20 ml 0.5 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)).

rötlicher Feststoff, Schmp.: 72°C

Ausbeute: 0.208 g (0.34 mmol, 73 %)

R_F-Wert: 0.56 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

[α]_D²⁰: -43.2° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD):

δ = 7.19-7.10 (m, 4H, Aromat), 6.86-6.72 (m, 6H, Aromat), 4.59-4.49 (m, 2H, α-CH, Cys), 3.20 (dd, ²J = 13.4 Hz, ³J = 6.2 Hz, 2H, β-CH_{2a}, Cys), 2.99 (dd, ²J = 13.4 Hz, ³J = 8.9 Hz, 2H, β-CH_{2b}, Cys), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl).

FAB-MS (m/z): ber.: 621.2563 [M+H]⁺
(C₂₈H₄₀N₆O₆S₂) gef.: 621.2542 (in 3-NBA)

L-Cystin-bis(phenylhydrazid)-bis(hydrotrifluoracetat)**(H-Cys-NH-NH-Ph-TFA)₂ (38e)**

Eine Lösung von 0.200 g (0.32 mmol) Bis(*N-tert*-Butyloxycarbonyl)-L-cystin-bis(phenylhydrazid) (**37c**) in 6.70 ml Methylenchlorid wird unter Eiskühlung mit 0.75 ml (9.68 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck durch zweimaliges Codestillieren mit je 10 ml Toluol entfernt.

orangeroter Feststoff, Schmp.: 84°C

Ausbeute: 0.208 g (0.32 mmol, quant.)

R_f-Wert: 0.12 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

[α]_D²⁰: - 117.5° (c = 1, CH₃OH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD):

δ = 7.32-7.15 (m, 4H, Aromat), 6.96-6.81 (m, 6H, Aromat), 4.39 (dd, ³J₁ = 7.6 Hz, ³J₂ = 5.5 Hz, 2H, α-CH, Cys), 3.47 (dd, ²J = 14.7 Hz, ³J = 5.5 Hz, 2H, β-CH_{2a}, Cys), 3.20 (dd, ²J = 14.7 Hz, ³J = 7.7 Hz, 2H, β-CH_{2b}, Cys).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD):

δ = 169.00 (C=O, Phenylhydrazid), 162.93, 162.59 (CF₃-C=O, ²J_{CF} = 34.8 Hz), 149.13 (C_q, Aromat), 130.55, 130.01, 121.55, 114.38, 113.94 (5 CH, Aromat), 51.93 (α-CH, Cys), 39.69 (β-CH₂, Cys).

FAB-MS (m/z): ber.: 421.1480 [M-2CF₃COOH+H]⁺

(C₁₈H₂₆N₆O₂S₂·2C₂O₂F₃) gef.: 421.1468 (in 3-NBA)

Bis(*N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl)-L-cystin-bis(phenylhydrazid) (Boc-Arg(Aloc)₂-Cys-NH-NH-Ph)₂ (7c)

Zu einer Lösung von 0.279 g (0.64 mmol) *N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginin (**36g**) in 40 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung zunächst 0.119 g (0.77 mmol) HOBt und 0.121 g (0.64 mmol) EDC sowie anschließend 0.200 g (0.32 mmol) L-Cystin-bis(phenylhydrazid)-bishydrotrifluoracetat (**38e**) und 88 μl (0.64 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit je 40 ml 1 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und

gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:2(v/v)) gereinigt.

gelblicher Feststoff, Schmp.: 116°C

Ausbeute: 0.276 g (0.22 mmol, 68 %)

R_F-Wert: 0.70 (Hexan/Essigester = 1:2(v/v))

[α]_D²⁰: + 4.2° (c = 1, CH₃OH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD):

δ = 7.17-7.13 (m, 4H, Aromat), 6.82-7.76 (m, 6H, Aromat), 6.01-5.94 (m, 4H, CH=CH₂), 5.39-5.17 (m, 8H, CH=CH₂), 4.73-4.72 (m, 2H, α-CH, Cys), 4.69 (d, ³J = 5.4 Hz, 4H, CH₂-O, Allyl), 4.58 (d, ³J = 4.5 Hz, 4H, CH₂-O, Allyl), 4.11-4.03 (m, 2H, α-CH, Arg), 3.98-3.90 (m, 4H, δ-CH₂, Arg), 3.26 (dd, ²J = 13.4 Hz, ³J = 5.1 Hz, 2H, β-CH_{2a}, Cys), 3.11 (dd, ²J = 13.4 Hz, ³J = 8.3 Hz, 2H, β-CH_{2b}, Cys), 1.73-1.69 (m, 4H, β-CH₂, Arg), 1.45-1.40 (m, 4H, γ-CH₂, Arg), 1.40 (s, 18H, *tert*-Butyl).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ = 175.12 (C=O, Phenylhydrazid), 172.01 (C=O, Amid), 164.71 (C_q, Guanidino), 161.87, 158.13, 156.74 (3 C=O, Urethan), 149.51 (C_q, Aromat), 134.52, 132.83 (2 CH=CH₂), 130.27, 129.93, 128.67, 121.15, 114.30, 114.05 (5 CH, Aromat), 119.61, 117.95 (2 CH=CH₂), 80.94 (C_q, *tert*-Butyl), 68.86, 67.28 (2 CH₂-O, Allyl), 56.20 (α-CH, Cys), 52.88 (α-CH, Arg), 45.57 (δ-CH₂, Arg), 41.01 (β-CH₂, Cys), 29.98 (β-CH₂, Arg), 28.77 (CH₃, *tert*-Butyl), 26.23 (γ-CH₂, Arg).

Elementaranalyse (%): ber.: C 51.52 H 6.49 N 15.02

(C₅₆H₈₀N₁₄O₁₆S₂·2 H₂O) gef.: C 51.79 H 6.32 N 14.65

FAB-MS (m/z): ber.: 1269.5 [M+H]⁺

gef.: 1269.7 (in 3-NBA)

***N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-phenylhydrazid (Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-NH-NH-Ph) (9c)**

Zu einer Lösung von 0.150 g (0.12 mmol) Bis(*N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl)-L-cystin-bis(phenylhydrazid) (**7c**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Argon-Atmosphäre 0.074 g (0.48 mmol) DTT und 33 μ l (0.24 mmol) Triethylamin gegeben und die Mischung 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird dreimal mit je 20 ml 1 M Salzsäure gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wird anschließend unter Eiskühlung mit 33 μ l (0.24 mmol) Triethylamin und 0.056 g (0.24 mmol) Palmitoylchlorid versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 77°C

Ausbeute: 0.166 g (0.19 mmol, 80 %)

R_f-Wert: 0.17 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

[α]_D²⁰: + 9.2° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 9.43 (br, 1H, NH, Guanidino), 9.25 (br, 1H, NH, Guanidino), 8.83 (br, 1H, NH, Phenylhydrazid), 7.30 (d, ³J = 6.3 Hz, 1H, NH, Amid), 7.18 (dd, ³J₁ = 8.0 Hz, ³J₂ = 7.5 Hz, 2H, Aromat), 6.85 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H, Aromat), 6.80 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, Aromat), 6.10 (br, 1H, NH, Phenylhydrazid), 6.03-5.89 (m, 2H, CH=CH₂), 5.60 (br, 1H, NH, Urethan), 5.38-5.20 (m, 4H, CH=CH₂), 4.70 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.60 (d, ³J = 4.3 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.59-4.57 (m, 1H, α -CH, Cys), 4.13-4.11 (m, 1H, α -CH, Arg), 4.02-4.00 (m, 1H, δ -CH_{2a}, Arg), 3.92-3.89 (m, 1H, δ -CH_{2b}, Arg), 3.38 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 4.5 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 3.29 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 8.1 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 2.55 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, α -CH₂, Pal), 1.81-1.79 (m, 1H, β -CH_{2a}, Arg), 1.73-1.69 (m, 3H, β -CH_{2b}, γ -CH₂, Arg), 1.65-1.62 (m, 2H, β -CH₂, Pal), 1.40 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.24 (s, 24H, CH₂, Pal), 0.87 (t, ³J = 6.7 Hz, 3H, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ = 200.68 (C=O, Thioester), 172.73 (C=O, Phenylhydrazid), 169.53 (C=O, Amid), 162.73 (C_q, Guanidino), 160.52, 156.22, 155.51 (3 C=O, Urethan), 147.75 (C_q, Aromat), 133.09, 132.80 (2 CH=CH₂), 130.86, 129.02, 120.98, 113.69, 113.07 (5 CH, Aromat), 119.86, 118.18 (2 CH=CH₂), 80.61 (C_q, *tert*-Butyl), 67.96, 66.31 (2 CH₂-O, Allyl), 55.01 (α -CH, Cys), 53.07

(α -CH, Arg), 44.10 (δ -CH₂, Arg), 44.04 (β -CH₂, Cys), 31.90 (α -CH₂, Pal), 30.00, 29.67, 29.64, 29.43, 29.33, 29.23, 28.15, 25.60, 25.49, 22.67 (CH₂, Pal), 28.99 (β -CH₂, Arg), 28.28 (CH₃, *tert*-Butyl), 24.75 (γ -CH₂, Arg), 14.11 (CH₃, Pal).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 59.24	H 8.25	N 10.99
(C ₄₄ H ₇₁ N ₇ O ₉ S·H ₂ O)	gef.:	C 59.47	H 8.02	N 10.61

FAB-MS (m/z):	ber.:	874.5112 [M+H] ⁺
	gef.:	874.5092 (in 3-NBA)

***N* ^{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N* ^{δ,ω} -diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein
(Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-OH) (49)**

Eine Lösung von 0.065 g (0.08 mmol) *N* ^{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N* ^{δ,ω} -diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein-phenylhydrazid (**9c**) in 20 ml abs. THF wird mit Sauerstoff gesättigt und nacheinander mit 0.14 ml Wasser, 0.14 ml Essigsäure, 40 μ l Pyridin sowie 0.042 g (0.08 mmol) Kupfer(II)-acetat versetzt. Anschließend wird unter ständigem Sauerstoffstrom das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 100 ml 1 M Salzsäure und 50 ml Diethylether zugegeben, die wäßrige Phase noch zweimal mit je 25 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 25 ml Wasser gewaschen. Die etherische Lösung wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel durch Codestillation mit 30 ml Toluol bei vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester/Methanol = 4:4:1(v/v/v)).

farbloser Feststoff, Schmp.: 83°C

Ausbeute: 0.058 g (0.08 mmol, 92 %)

R_F-Wert: 0.60 (Hexan/Essigester/Methanol = 2:2:1(v/v/v))

[α]_D²⁰: + 11.7° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

δ = 6.02-5.94 (m, 2H, CH=CH₂), 5.40-5.22 (m, 4H, CH=CH₂), 4.74 (dt, ³J = 5.8 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.64 (dd, ³J₁ = 7.2 Hz, ³J₂ = 4.6 Hz, 1H, α -CH, Cys), 4.62 (dt, ³J = 4.5 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.12-4.08 (m, 1H, α -CH, Arg), 4.01-3.96 (m, 1H, δ -

CH_{2a}, Arg), 3.93-3.89 (m, 1H, δ-CH_{2b}, Arg), 3.49 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 3.24 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 7.2 Hz, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.55 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, α-CH₂, Pal), 1.80-1.75 (m, 1H, β-CH_{2a}, Arg), 1.72-1.68 (m, 1H, β-CH_{2b}, Arg), 1.66-1.60 (m, 4H, β-CH₂, Pal, γ-CH₂, Arg), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.26 (s, 24H, CH₂, Pal), 0.88 (t, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

δ = 199.10 (C=O, Thioester), 172.72 (C=O, Carbonsäure), 171.36 (C=O, Amid), 163.38 (C_q, Guanidino), 160.53, 156.09, 155.60 (3 C=O, Urethan), 132.80, 130.99 (2 CH=CH₂), 119.53, 117.74 (2 CH=CH₂), 79.91 (C_q, *tert*-Butyl), 67.85, 66.28 (2 CH₂-O, Allyl), 54.28 (α-CH, Cys), 51.89 (α-CH, Arg), 44.42 (δ-CH₂, Arg), 43.90 (β-CH₂, Cys), 31.84 (α-CH₂, Pal), 30.21, 30.13, 29.59, 29.56, 29.51, 29.34, 29.26, 29.15, 29.02, 28.13, 25.46, 23.76, 22.58 (CH₂, Pal), 28.88 (β-CH₂, Arg), 28.13 (CH₃, *tert*-Butyl), 24.82 (γ-CH₂, Arg), 13.88 (CH₃, Pal).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 58.22	H 8.36	N 8.93
(C ₃₈ H ₆₅ N ₅ O ₁₀ S)	gef.:	C 58.09	H 8.43	N 8.72

6.2.6. Versuche zu Kapitel 4.1.7.

N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionin-allylester (NBDac-Met-OAll) (53a)

Zu einer Lösung von 0.020 g (0.08 mmol) *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronsäure (**46a**) und 0.029 g (0.08 mmol) L-Methionin-allylester-hydrotosylat (**38f**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.014 g (0.09 mmol) HOBt, 10 µl (0.08 mmol) Triethylamin und 0.014 g (0.08 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend bei vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Chloroform/Methanol = 50:1(v/v)) gereinigt.

orangefarbenes Öl

Ausbeute:	0.026 g (0.06 mmol, 69 %)
R _f -Wert:	0.74 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v))
[α] _D ²⁰ :	+ 16.3° (c = 1.0, CHCl ₃)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ = 8.48 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1H, NBD), 6.68 (br, 1H, NH, Amin), 6.27 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, NH, Amid), 6.17 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1H, NBD), 5.95-5.87 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.35 (d, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_{2a}$), 5.27 (d, $^3J_{\text{cis}} = 10.3$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_{2b}$), 4.79-4.75 (m, 1H, α -CH, Met), 4.66 (d, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 3.55-3.51 (m, 2H, α - CH_2 , Aminocaproyl), 2.61-2.55 (m, 2H, γ - CH_2 , Met), 2.31 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 2H, ϵ - CH_2 , Aminocaproyl), 2.23-2.17 (m, 1H, β - CH_{2a} , Met), 2.09-1.99 (m, 1H, β - CH_{2b} , Met), 2.05 (s, 3H, SCH_3 , Met), 1.87-1.82 (m, 2H, β - CH_2 , Aminocaproyl), 1.80-1.73 (m, 2H, δ - CH_2 , Aminocaproyl), 1.57-1.51 (m, 2H, γ - CH_2 , Aminocaproyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3):

δ = 172.56, 171.83 (2 C=O, Amid, Ester), 144.28, 144.07, 143.95, 123.68 (4 C_q , NBD), 136.58, 98.57 (2 CH, NBD), 131.33 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 119.16 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 66.27 ($\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 51.64 (α -CH, Met), 43.68 (α - CH_2 , Aminocaproyl), 35.87 (γ - CH_2 , Met), 31.50 (ϵ - CH_2 , Aminocaproyl), 29.68 (β - CH_2 , Met), 27.91 (β - CH_2 , Aminocaproyl), 26.22 (δ - CH_2 , Aminocaproyl), 24.54 (γ - CH_2 , Aminocaproyl), 15.46 (SCH_3 , Met).

EI-MS (m/z):	ber.: 465.2
($\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$)	gef.: 465.2

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionin
(NBDac-Met-OH) (54a)**

Unter Argon werden bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 0.026 g (0.06 mmol) *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionin-allylester (**53a**) in 10 ml abs. THF 0.005 g (0.03 mmol) Dimethylbarbitursäure sowie 0.001 g (0.9 μmol) Tetrakis-(triphenylphosphan)-palladium(0) gegeben. Nach 15 min Rühren wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand dreimal in je 2 ml Diethylether digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

orangefarbenes Öl

Ausbeute:	0.024 g (0.06 mmol, 94 %)
R_f -Wert:	0.39 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v))
$[\alpha]_D^{20}$:	+ 10.3° (c = 1.0, DMF)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 1:1(\text{v/v})$):

$\delta = 8.51$ (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, NBD), 6.26 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, NBD), 4.33 (dd, $^3J_1 = 7.3$ Hz, $^3J_2 = 5.2$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Met), $3.55\text{-}3.49$ (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), $2.51\text{-}2.49$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$, Met), 2.29 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, $\epsilon\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), $2.15\text{-}2.09$ (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Met), 2.07 (s, 3H, SCH_3 , Met), $2.06\text{-}1.92$ (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, Met), $1.84\text{-}1.78$ (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), $1.74\text{-}1.68$ (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), $1.52\text{-}1.48$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$, Aminocaproyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 1:1(\text{v/v})$):

$\delta = 180.34$ (C=O, Carbonsäure), 174.12 (C=O, Amid), 145.23 , 144.34 , 127.80 (4 C_q , NBD), 136.89 (2 CH, NBD), 54.62 ($\alpha\text{-CH}$, Met), 48.34 ($\alpha\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 36.25 ($\gamma\text{-CH}_2$, Met), 32.67 ($\epsilon\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 30.59 ($\beta\text{-CH}_2$, Met), 26.73 ($\beta\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 25.44 ($\delta\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 23.63 ($\gamma\text{-CH}_2$, Aminocaproyl), 17.94 (SCH_3 , Met).

FAB-MS (m/z):	ber.: 426.1466 [M+H] ⁺
($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$)	gef.: 426.1437 (in 3-NBA)

***N* ^{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N* ^{δ,ω} -diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester
(Boc-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll) (51)**

Zu einer Lösung von 0.030 g (38 μmol) *N* ^{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-(*N* ^{δ,ω} -diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cystein (**49**) und 0.032 g (38 μmol) L-Threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester-hydrotrifluoracetat (**45**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 5 μl (38 μmol) Triethylamin und 0.012 g (46 μmol) EEDQ gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend bei vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 (Chloroform/Methanol = 1:1(v/v)) gereinigt.

farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute:	0.026 g (17 μmol , 46 %)
R_f -Werte:	0.31 (Chloroform/Methanol = 10:1(v/v)) 0.18 (Hexan/Aceton = 3:1(v/v))
$[\alpha]_D^{20}$:	- 33.4° (c = 1.0, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ = 9.46 (br, 2H, NH, Guanidino), 7.56 (br, 1H, NH, Amid), 7.37 (br, 1H, NH, Amid), 7.24 (br, 1H, NH, Amid), 7.09 (d, 3J = 8.3 Hz, 1H, NH, Amid), 6.99 (d, 3J = 6.2 Hz, 1H, NH, Amid), 6.02-5.87 (m, 3H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.40 (br, 1H, NH, Urethan), 5.37-5.23 (m, 6H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.73 (d, 3J = 5.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 4.66-4.57 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 4.52-4.49 (m, 2H, 2 $\alpha\text{-CH}$, Cys), 4.33-4.26 (m, 3H, $\beta\text{-CH}$, Thr, 2 $\alpha\text{-CH}$), 4.08-4.02 (m, 2H, 2 $\alpha\text{-CH}$), 3.97-3.93 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$, Arg), 3.40 (dd, 2J = 14.3 Hz, 3J = 4.9 Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Cys₁), 3.33 (dd, 2J = 14.4 Hz, 3J = 4.3 Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, Cys₁), 3.30-3.22 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$, Cys₂), 2.59-2.53 (m, 4H, 2 $\alpha\text{-CH}_2$, Pal), 2.06-2.02 (m, 1H, $\beta\text{-CH}$, Ile₁), 1.92-1.89 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$, Arg), 1.88-1.85 (m, 1H, $\beta\text{-CH}$, Ile₂), 1.75-1.70 (m, 3H, $\beta\text{-CH}_{2b}$, $\gamma\text{-CH}_2$ Arg), 1.68-1.48 (m, 6H, 2 $\beta\text{-CH}_2$, Pal, 2 $\gamma\text{-CH}_{2a}$, Ile), 1.46 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.44 (d, 3J = 4.8 Hz, 3H, $\gamma\text{-CH}_3$, Thr), 1.31-1.14 (m, 2H, 2 $\gamma\text{-CH}_{2b}$, Ile), 1.25 (s, 48H, CH_2 , Pal), 0.94-0.75 (m, 18H, 4 CH_3 , Ile, 2 CH_3 , Pal).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3):

δ = 200.07 (2 C=O, Thioester), 173.15, 171.55, 170.98, 170.84, 170.39, 169.70 (C=O, 5 Amid, 1 Ester), 156.24, 155.51 (3 C=O, Urethan), 132.90, 131.80, 130.78 (3 $\text{CH}=\text{CH}_2$), 118.61 (3 $\text{CH}=\text{CH}_2$), 80.81 (C_q , *tert*-Butyl), 68.02, 65.62 (3 $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 66.75 ($\beta\text{-CH}$, Thr), 59.27, 58.91, 56.93, 55.64, 55.14, 53.51 (6 $\alpha\text{-CH}$), 50.81 ($\delta\text{-CH}_2$, Arg), 44.02 (2 $\beta\text{-CH}_2$, Cys), 37.54, 36.07 (2 $\beta\text{-CH}$, Ile), 31.91 (2 $\alpha\text{-CH}_2$, Pal), 30.32, 29.95, 29.69, 29.65, 29.46, 29.35, 29.29, 29.24, 29.03, 28.62, 25.64, 25.54, 25.10, 24.92, 24.68, 22.68 (CH_2 , Pal, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, Arg, $\gamma\text{-CH}_2$, Ile), 28.33 (CH_3 , *tert*-Butyl), 19.62 ($\gamma\text{-CH}_3$, Thr), 15.62, 15.46, 14.11, 11.67, 11.59 (6 CH_3 , Ile, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 1492.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 ($\text{C}_{76}\text{H}_{133}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{S}_2$) gef.: 1492.5 (in 3-NBA)

**($N^{\delta,\omega}$ -Diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester-hydrotrifluoracetat
 (H-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll-TFA) (52)**

Eine Lösung von 0.020 g (13 μmol) N^α -*tert*-Butyloxycarbonyl-($N^{\delta,\omega}$ -diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester (**51**) in 0.12 ml Methylenchlorid wird unter Eiskühlung mit 54 μl (0.67 mmol) Tri-

fluoressigsäure versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck durch zweimaliges Codestillieren mit je 10 ml Toluol entfernt.

farblos wachstiger Feststoff

Ausbeute: 0.020 g (13 μ mol, quant.)
R_f-Wert: 0.12 (Chloroform/Methanol = 10:1(v/v))
[α]_D²⁰: - 14.3° (c = 0.5, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

δ = 6.00-5.89 (m, 3H, CH=CH₂), 5.41-5.23 (m, 6H, CH=CH₂), 4.75 (dt, ³J = 5.9 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.65-4.59 (m, 4H, 2 CH₂-O, Allyl), 4.56-4.54 (m, 1H, α -CH), 4.48-4.44 (m, 2H, β -CH, Thr, α -CH), 4.35 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, α -CH), 4.26 (d, ³J = 6.3 Hz, 1H, α -CH), 4.22-4.20 (m, 1H, α -CH), 4.16-4.12 (m, 1H, α -CH), 3.56-3.48 (m, 2H, δ -CH₂, Arg), 3.45-3.40 (m, 1H, β -CH_{2a}, Cys₁), 3.32 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 5.4 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys₁), 3.21 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 7.7 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys₂), 3.14 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 8.4 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys₂), 2.56 (t, ³J = 7.6 Hz, 4H, 2 α -CH₂, Pal), 2.05-1.98 (m, 1H, β -CH, Ile₁), 1.93-1.75 (m, 5H, β -CH, Ile₂, β -CH₂, γ -CH₂, Arg), 1.64-1.62 (m, 4H, 2 β -CH₂, Pal), 1.51-1.42 (m, 2H, 2 γ -CH_{2a}, Ile), 1.32-1.19 (m, 2H, 2 γ -CH_{2b}, Ile), 1.26 (s, 48H, CH₂, Pal), 1.15 (d, ³J = 5.6 Hz, 3H, γ -CH₃, Thr), 0.93-0.87 (m, 18H, 4 CH₃, Ile, 2 CH₃, Pal).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

δ = 200.34, 199.85 (2 C=O, Thioester), 172.06, 171.29, 170.60, 170.35, 170.21, 169.64 (6 C=O, 5 Amid, 1 Ester), 162.89 (C_q, Guanidino), 160.62, 155.38 (2 C=O, Urethan), 132.74, 131.76, 130.99 (3 CH=CH₂), 120.05, 119.00, 118.56 (3 CH=CH₂), 68.52, 66.57, 66.00 (3 CH₂-O, Allyl), 67.23 (β -CH, Thr), 58.62, 58.47, 57.17, 54.26, 53.13, 52.57 (6 α -CH), 44.16 (δ -CH₂, Arg), 43.64 (2 β -CH₂, Cys), 37.61, 36.83 (2 β -CH, Ile), 32.08 (2 α -CH₂, Pal), 30.36, 29.84, 29.80, 29.77, 29.60, 29.51, 29.43, 29.15, 27.10, 25.69, 25.63, 25.24, 24.79, 23.54 (CH₂, Pal, β -CH₂, γ -CH₂, Arg, γ -CH₂, Ile), 22.83 (γ -CH₃, Thr), 18.85, 17.30, 17.11, 15.56, 15.51, 14.16, 11.54, 11.41 (6 CH₃, Ile, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 1393.9 [M-CF₃COO]⁺
(C₇₁H₁₂₆N₉O₁₄S₂C₂F₃O₂) gef.: 1393.7 (in 3-NBA)

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester (NBDac-Met-Arg(Aloc)₂-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OAll) (55)**

Zu einer Lösung von 2 mg (4.6 μmol) *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionin (**54a**) und 7 mg (4.6 μmol) (*N*^{δ,ω}-Diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester-hydrotrifluoracetat (**52**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 3 mg (5.0 μmol) HOBt, 1 μl (7 μmol) Triethylamin und 3 mg (4.6 μmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend bei vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 (Chloroform/Methanol = 1:1(v/v)) gereinigt.

gelber Feststoff

Ausbeute:	6 mg (3.3 μmol, 72 %)
R _F -Werte:	0.80 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v)) 0.86 (Essigester/Methanol = 1:1(v/v))
[α] _D ²⁰ :	- 8.0° (c = 0.2, CHCl ₃ /CH ₃ OH = 1:1(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

δ = 8.52 (d, ³J = 5.2 Hz, 1H, CH, NBD), 6.28 (d, ³J = 5.3 Hz, 1H, CH, NBD), 6.02-5.90 (m, 3H, CH=CH₂), 5.48-5.27 (m, 6H, CH=CH₂), 4.85-4.74 (m, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.69-4.61 (m, 4H, 2 CH₂-O, Allyl), 4.48-4.42 (m, 2H, 2 α-CH, Cys), 4.34-4.29 (m, 2H, 2 α-CH), 4.27-4.19 (m, 3H, β-CH, Thr, 2 α-CH), 4.11-4.05 (m, 1H, α-CH), 3.98-3.90 (m, 2H, δ-CH₂, Arg), 3.64-3.59 (m, 1H, β-CH_{2a}, Cys₁), 3.56-3.47 (m, 3H, α-CH₂, Aminocaproyl, β-CH_{2b}, Cys₁), 3.33-3.28 (m, 1H, β-CH_{2a}, Cys₂), 3.22-3.16 (m, 1H, β-CH_{2b}, Cys₂), 2.93-2.84 (m, 2H, γ-CH₂, Met), 2.60-2.53 (m, 4H, 2 α-CH₂, Pal), 2.34-2.29 (m, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 2.09 (s, 3H, SCH₃, Met), 2.08-2.01 (m, 2H, β-CH₂, Met), 2.01-1.90 (m, 3H, 2 β-CH, Ile, β-CH_{2a}, Arg), 1.86-1.80 (m, 3H, β-CH_{2b}, γ-CH₂ Arg), 1.72-1.60 (m, 10H, 2 β-CH₂, Pal, 2 γ-CH_{2a}, Ile, β-CH₂, δ-CH₂, Aminocaproyl), 1.54-1.48 (m, 2H, γ-CH₂, Aminocaproyl), 1.44 (d, ³J = 5.0 Hz, 3H, γ-CH₃, Thr), 1.26 (s, 48H, CH₂, Pal), 1.19-1.10 (m, 2H, 2 γ-CH_{2b}, Ile), 1.00-0.81 (m, 18H, 4 CH₃, Ile, 2 CH₃, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 1842.1 [M+H]⁺
 (C₉₁H₁₅₁N₁₄O₁₉S₃) gef.: 1842.0 (in 3-NBA)

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionyl-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin (NBDac-Met-Arg-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH) (39)**

Unter Argon werden bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 6 mg (3.3 μmol) *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-methionyl-(*N*^{δ,ω}-diallyloxycarbonyl)-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin-allylester (**55**) in 10 ml abs. THF 1.5 mg (6.6 μmol) Dimethylbarbitursäure sowie 0.2 mg (0.2 μmol) Tetrakis-(triphenylphosphan)-palladium(0) gegeben. Nach 30 min Rühren wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand durch Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 (Chloroform/Methanol = 1:1(v/v)) gereinigt.

gelber Feststoff

Ausbeute: 5 mg (3.2 μmol, 96 %)
 R_F-Wert: 0.10 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v))
 [α]_D²⁰: - 22.5° (c = 0.2, CHCl₃/CH₃OH = 1:1(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1(v/v)):

δ = 8.55-8.51 (m, 1H, CH, NBD), 6.40-6.37 (m, 1H, CH, NBD), 4.41-4.36 (m, 3H, 3 α-CH), 4.34-4.31 (m, 1H, α-CH), 4.28-4.21 (m, 3H, 2 α-CH, β-CH, Thr), 4.18-4.12 (m, 1H, α-CH), 3.70-3.63 (m, 2H, δ-CH₂, Arg), 3.47-3.41 (m, 2H, α-CH₂, Aminocaproyl), 3.31-3.11 (m, 4H, 2 β-CH₂, Cys), 2.93-2.88 (m, 2H, γ-CH₂, Met), 2.62-2.55 (m, 4H, 2 α-CH₂, Pal), 2.38-2.30 (m, 3H, ε-CH₂, Aminocaproyl, β-CH_{2a}, Met), 2.09-2.03 (m, 1H, β-CH_{2b}, Met), 2.06 (s, 3H, SCH₃, Met), 1.95-1.88 (m, 3H, 2 β-CH, Ile, β-CH_{2a}, Arg), 1.75-1.62 (m, 11H, β-CH₂, δ-CH₂, Aminocaproyl, β-CH_{2b}, γ-CH₂, Arg, 2 β-CH₂, Pal), 1.55-1.47 (m, 4H, 2 γ-CH_{2a}, Ile, γ-CH₂, Aminocaproyl), 1.27 (s, 48H, CH₂, Pal), 1.21 (d, ³J = 6.0 Hz, 3H, γ-CH₃, Thr), 1.17-1.12 (m, 2H, 2 γ-CH_{2b}, Ile), 0.96-0.88 (m, 18H, CH₃, Ile, CH₃, Pal).

FAB-MS (m/z): ber.: 1589.9 [M+H]⁺
 (C₇₇H₁₃₂N₁₄O₁₅S₃) gef.: 1589.7 (in 3-NBA)

6.3. Versuche zu Kapitel 4.2.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der beladenen Vesikel^[138]

Zu 7.5 μl einer 20 mM Lösung von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (**31a**) in Methanol werden die unten aufgeführten Stammlösungen und 150 μl Pufferlösung (10 mM (*N*-2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure, 150 mM Kaliumchlorid, 8 mM Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid; pH = 7) gegeben, bei -196°C eingefroren, wieder aufgetaut und dieser Vorgang dreimal wiederholt. Danach wird das Gemisch 20mal durch Polycarbonatfilter mit 0.1 μm Porengröße extrudiert und die verbleibenden organischen Lösungsmittelreste im Vakuum entfernt.

Nach dieser Vorschrift wurden generiert:

Fluoreszenzquencher- und Lipopeptid-beladene Vesikel:

Zugegebene Stammlösungen:

- a) 15 μl einer 100 μM Lösung von NBDac-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (**47**) in Chloroform/Methanol = 1:4(v/v) und 15 μl einer 200 μM Lösung von *N*-(Lissamin-rhodamin-sulfonyl)phosphatidylethanolamin (**56**) in Methanol
- b) 15 μl einer 100 μM Lösung von NBDac-Met-Arg-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (**39**) in Chloroform/Methanol = 1:4(v/v) und 15 μl einer 200 μM Lösung von *N*-(Lissamin-rhodamin-sulfonyl)phosphatidylethanolamin (**56**) in Methanol

Lipopeptid-beladene Vesikel:

Zugegebene Stammlösungen:

- a) 15 μl einer 100 μM Lösung von NBDac-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (**47**) in Chloroform/Methanol = 1:4(v/v)
- b) 15 μl einer 100 μM Lösung von NBDac-Met-Arg-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (**39**) in Chloroform/Methanol = 1:4(v/v)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Akzeptorvesikel

Zu 30 μl einer 20 mM Lösung von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (**31a**) in Methanol werden 150 μl Pufferlösung (10 mM (*N*-2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure, 150 mM Kaliumchlorid, 8 mM Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid; pH = 7) gegeben, bei -196°C eingefroren, wieder aufgetaut und dieser Vorgang dreimal wiederholt. Danach wird das Gemisch 20mal durch Polycarbonatfilter mit 0.1 μm Porengröße extrudiert und die verbleibenden organischen Lösungsmittelreste im Vakuum entfernt.

6.3.1. Versuche zu Kapitel 4.2.1.

In 1200 μl Pufferlösung (pH = 7) werden bei 20°C 6.1 μl der Vesikelmischung (beladen mit NBDac-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (**47**) oder NBDac-Met-Arg-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (**39**)) gegeben und nach 15 min mit 12 μl einer 1 M Lösung von Natriumdithionit in Puffer (pH = 7) versetzt. Durch Zugabe von 60 μl 20 %iger Triton X 100-Lösung wird die Messung nach 50 min beendet. Während des gesamten Experiments wird die Fluoreszenzintensität bei 535 nm gemessen.

6.3.2. Versuche zu Kapitel 4.2.2.

In 1200 μl Pufferlösung (pH = 7) werden bei 20°C 6.1 μl der Vesikelmischung (beladen mit NBDac-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (**47**)) und dem Fluoreszenzquencher (**56**)) gegeben und zu den angegebenen Zeiten mit der jeweiligen Menge an Akzeptorvesikelmischung versetzt. Während aller Experimente wird die Fluoreszenzintensität bei 535 nm detektiert und die Messungen nach 100 min beendet.

Nach dieser Vorschrift wurden folgende Experimente durchgeführt:

Zugabezeitpunkt	Zugegebene Menge	Akzeptorvesikel- endkonzentration	Akzeptorvesikel- überschuß	Geschwindig- keitskonstante
12' 54"	6 μl	20 μM	4fach	$6.0 \cdot 10^{-4}$ 1/s
16' 21"	12 μl	40 μM	8fach	$1.3 \cdot 10^{-3}$ 1/s
18' 51"	18 μl	60 μM	12fach	$1.4 \cdot 10^{-3}$ 1/s

6.3.3. Versuche zu Kapitel 4.2.3.

In 1200 μl Pufferlösung ($\text{pH} = 7$) werden zu den angegebenen Zeiten bei 20°C 6.1 μl der Lipopeptid- und Fluoreszenzquencher-beladenen Vesikelmischung gegeben und nach 29 min und 25 s mit 12 μl (40 μM Endkonzentration, achtfacher Überschuß) Akzeptorvesikelmischung versetzt. Während beider Experimente wird die Fluoreszenzintensität bei 535 nm detektiert und die Messungen nach 16 h beendet.

Nach dieser Vorschrift wurden folgende Experimente durchgeführt:

Zugabezeitpunkt	Beladung der Vesikel	k_{diss} [1/s]
3' 41''	NBDac-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (47) + Fluoreszenzquencher (56)	$1.9 \cdot 10^{-4}$
7' 55''	NBDac-Met-Arg-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH (39) + Fluoreszenzquencher (56)	kein Austausch

6.4. Versuche zu Kapitel 4.3.

6.4.1. Versuche zu Kapitel 4.3.2.

2-Farnesyl-acetessigsäure-ethylester (**63**)^[117]

In 34 ml abs. Methanol werden unter Argonatmosphäre 4.67 g (35.9 mmol) Acetessigsäureethylester und 1.38 g (25.6 mmol) Natriummethanolat gelöst, unter Eiskühlung 3.00 g (10.5 mmol) Farnesylbromid (**62**) zugegeben und die Mischung 2 h bei 0°C und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 30 ml 1 M Salzsäure beendet, die wäßrige Phase dreimal mit je 30 ml Hexan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen dreimal mit je 30 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt direkt für die weiteren Umsetzungen verwendet.

gelbliche Flüssigkeit

Ausbeute: 3.264 g (10.5 mmol, quant.)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

$\delta = 5.06\text{-}5.02$ (m, 3H, 3 C=CH), 4.18 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.43 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, O=C-CH-C=O), 2.55 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH-(C=O)}_2$), 2.22 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=O}$), 2.13-1.90 (m, 8H, 4 CH_2), 1.67 (s, 3H, CH_3), 1.63 (s, 3H, CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 1.26 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$).

***trans, trans*-Farnesylaceton (64)**^[117]

Eine Lösung von 3.264 g (10.52 mmol) 2-Farnesyl-acetessigsäure-ethylester (**63**) und 1.756 g (31.30 mmol) Kaliumhydroxid in 15 ml Ethanol wird 4 h unter Rückfluß erhitzt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 50 ml Wasser verdünnt. Die wäßrige Phase wird dreimal mit je 30 ml Hexan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen je zweimal mit jeweils 25 ml 1 M Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Hexan/Essigester = 70:1(v/v)).

farblose Flüssigkeit

Ausbeute: 2.255 g (8.61 mmol, 82 %)

R_f -Wert: 0.25 (Hexan/Essigester = 70:1(v/v))

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

$\delta = 5.08$ (t, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, 3 C=CH), 2.45 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 2.26 (dt, $^3J_1 = 7.4$ Hz, $^3J_2 = 6.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$), 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=O}$), 2.08-1.90 (m, 8H, 4 CH_2), 1.67 (s, 3H, CH_3), 1.61 (s, 3H, CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3).

(E, E, E)-3, 7, 11, 15-Tetramethyl-hexadeca-2, 6, 10, 14-tetraensäure-ethylester (66a)^[116]

Zu einer Dispersion von 0.389 g (16.20 mmol) Natriumhydrid in 19 ml 1,2-Dimethoxyethan wird eine Lösung von 3.051 g (12.10 mmol) Diisopropylethylphosphonoacetat (**65**) in 14 ml 1,2-Dimethoxyethan getropft und die Mischung 75 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 2.097 g (8.00 mmol) *trans, trans*-Farnesylaceton (**64**) in 19 ml 1,2-Dimethoxyethan zugegeben und das Gemisch 16.5 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen, mit 23 ml gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und die wäßrige Phase dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Pha-

sen werden dreimal mit je 100 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 90:1(v/v)).

farblose Flüssigkeit

Ausbeute: 2.550 g (7.68 mmol, 96 %), (E; E, E,) : (Z, E, E) = 5:1

R_F-Wert: 0.34 (Hexan/Essigester = 90:1(v/v)), (Z, E, E)-Isomer

0.30 (Hexan/Essigester = 90:1(v/v)), (E, E, E)-Isomer

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 5.65 (br, 1H, C=CH-C=O), 5.10-5.06 (m, 3H, 3 C=CH), 4.15 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-O), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.13-1.92 (m, 12H, 6 CH₂), 1.67 (s, 3H, CH₃), 1.62 (s, 3H, CH₃), 1.58 (s, 6H, 2 CH₃), 1.27 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H, CH₃-CH₂-O).

***trans, trans, trans*-Geranylgeraniol (67)^[118]**

Eine Mischung im Verhältnis 5:1 von 2.543 g (7.60 mmol) (E, E, E)-3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadeca-2, 6, 10, 14-tetraensäure-ethylester (**66a**) und (Z, E, E)-3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadeca-2, 6, 10, 14-tetraensäure-ethylester (**66b**) wird in abs. THF gelöst und auf -20°C gekühlt. Anschließend werden 22.90 ml einer 1 M Lösung von DIBAH in Hexan zugetropft, die Mischung 1 h gerührt und dann die Reaktion durch Zugabe von 4 ml Isopropanol beendet. Nach Zugabe von 4 ml Wasser und Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Hexan/Essigester = 16:1(v/v)) und dabei in das (E, E, E)-, das (Z, E, E)-Isomer und eine Mischfraktion getrennt.

farblose Flüssigkeit

Ausbeute (all-*trans*-Isomer): 1.534 g (5.29 mmol, 69 %)

R_F-Wert: 0.19 (Hexan/Essigester = 16:1(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 5.41 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, C=CH-CH₂-OH), 5.11-5.08 (m, 3H, 3 C=CH), 4.14 (d, ³J = 6.9 Hz, 2H, CH₂-OH), 2.14-1.96 (m, 12H, 6 CH₂), 1.68 (s, 6H, 2 CH₃), 1.60 (s, 9H, 3 CH₃).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3):

$\delta = 139.68, 135.37, 134.96, 131.25$ (4 C_q), 124.41, 124.20, 123.82, 123.40 (4 CH), 59.35 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 39.73, 39.71, 39.58, 26.78, 26.64, 26.35 (6 CH_2), 25.70, 17.69, 16.28, 16.02 (5 CH_3).

***trans, trans, trans*-Geranylgeranyl bromid (68)**^[119]

Zu einer Lösung von 0.145 g (0.50 mmol) *trans, trans, trans*-Geranylgeraniol (**67**) in 5 ml abs. Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 66 μl (0.90 mmol) Dimethylsulfid und 0.134 g (0.75 mmol) NBS in 2 ml Methylenchlorid getropft und die Mischung 3 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von 5 ml Wasser wird die organische Phase auf 20 ml verdünnt, mit je 10 ml 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels kann das Rohprodukt für die weitere Umsetzung verwendet werden.

gelbliche Flüssigkeit

Ausbeute: 0.172 g (0.35 mmol, 69 %)

R_f -Wert: 0.79 (Hexan/Methylenchlorid = 2:1(v/v))

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3):

$\delta = 5.55$ (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, $\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2\text{-Br}$), 5.12-5.05 (m, 3H, 3 $\text{C}=\text{CH}$), 4.03 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Br}$), 2.10-1.94 (m, 12H, 6 CH_2), 1.73 (s, 3H, CH_3), 1.68 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 9H, 3 CH_3).

(*S*-Geranylgeranyl)-L-cystein-methylester^[120]

(H-Cys(GerGer)-OMe) (13b)

Zu einer Lösung von 0.072 g (0.42 mmol) L-Cystein-methylester-hydrochlorid (**12**) in 5 ml DMF werden 0.12 ml (0.84 mmol) Triethylamin und 0.172 g (0.35 mmol) *trans, trans, trans*-Geranylgeranyl bromid (**68**) gegeben. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen und bei $\text{pH} = 11$ fünfmal mit je 20 ml Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, bei vermindertem Druck eingengt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:1(v/v)) gereinigt.

farblose Flüssigkeit

Ausbeute: 0.108 g (0.27 mmol, 76 %)

R_F-Wert: 0.27 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 5.24 (t, ³J = 7.1 Hz, 1H, C=CH-CH₂-S), 5.12-5.07 (m, 3H, 3 C=CH), 3.75 (s, 3H, CH₃-O) 3.64 (dd, ³J₁ = 8.6 Hz, ³J₂ = 5.7 Hz, 1H, α-CH, Cys), 3.22 (dd, ²J = 12.8 Hz, ³J = 7.1 Hz, 1H, α-CH_{2a}, GerGer), 3.16 (dd, ²J = 12.8 Hz, ³J = 7.1 Hz, 1H, α-CH_{2b}, GerGer), 2.89 (dd, ²J = 13.5 Hz, ³J = 5.7 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 2.68 (dd, ²J = 13.5 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, α-CH_{2b}, Cys), 2.13-1.94 (m, 12H, 6 CH₂), 1.78 (br, 2H, NH₂), 1.68 (s, 6H, 2 CH₃), 1.59 (s, 9H, 3 CH₃).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-seryl-glycin-allylester**

(Fmoc-Ser-Gly-OAll) (61)^[139]

Zu einer Lösung von 0.500 g (1.41 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serin (**36i**) und 0.380 g (1.41 mmol) Glycin-allylester-hydrotosylat (**38g**) in 50 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.210 g (1.69 mmol) HOBt, 0.19 ml (1.41 mmol) Triethylamin und 0.250 g (1.41 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit je 30 ml 1 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:3(v/v)).

farbloser Feststoff

Ausbeute: 0.511 g (1.16 mmol, 82 %)

R_F-Wert: 0.46 (Hexan/Essigester = 1:3(v/v))

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 7.75 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.57 (d, ³J = 7.1 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.43-7.25 (m, 4H, 4 CH, Aromat), 6.98 (br, 1H, NH, Amid), 5.97-5.81 (m, 2H, CH, Allyl, NH, Urethan), 5.36-5.24 (m, 2H, CH=CH₂), 4.62 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.44 (d, ³J = 6.8 Hz, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.32-4.27 (m, 1H, α-CH, Ser), 4.21 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, CH,

Fmoc), 4.06 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, α -CH₂, Gly), 3.72-3.62 (m, 2H, β -CH₂, Ser), 3.11 (br, 1H, OH, Ser).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-seryl-glycin**

(Fmoc-Ser-Gly-OH) (69)

Unter Argon werden bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 0.335 g (0.79 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-seryl-glycin-allylester (**61**) in 30 ml abs. THF 0.074 g (0.47 mmol) Dimethylbarbitursäure sowie 0.004 g (3.4 μ mol) Tetrakis-(triphenylphosphan)-palladium(0) gegeben. Nach 30 min Rühren wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand dreimal in je 10 ml Diethylether digeriert und das Produkt durch Filtration von der flüssigen Phase getrennt.

farbloser Feststoff, Schmp.: 142°C

Ausbeute: 0.294 g (0.77 mmol, 97 %)

R_f-Wert: 0.28 (Hexan/Essigester = 1:3(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure)

$[\alpha]_D^{20}$: - 1.9° (c = 1.0, CHCl₃/MeOH = 1:1)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

$\delta = 7.76$ (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.62 (br, 2H, 2 CH, Aromat), 7.42-7.30 (m, 4H, 4 CH, Aromat), 4.42 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.37-4.30 (m, 2H, α -CH₂, Gly), 4.29-4.25 (m, 1H, α -CH, Ser), 4.22 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, CH, Fmoc), 3.90 (dd, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 4.2$ Hz, 1H, β -CH_{2a}, Ser), 3.73 (dd, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, β -CH_{2b}, Ser).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 5:1(v/v)):

$\delta = 172.04$ (C=O, Carbonsäure), 171.94 (C=O, Amid), 157.09 (C=O, Urethan), 144.06, 144.01, 141.59 (4 C_q, Aromat), 128.03, 127.38, 125.29, 120.22 (4 CH, Aromat), 67.43 (CH₂-O, Fmoc), 62.71 (α -CH₂, Gly), 56.75 (α -CH, Ser), 47.38 (CH, Fmoc), 41.40 (β -CH₂, Ser).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 62.49	H 5.24	N 7.29
(C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₆)	gef.:	C 62.14	H 5.32	N 7.13

EI-MS (m/z):	ber.:	384.1321
	gef.:	384.1313

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-seryl-glycyl-*(S)*-geranylgeranyl-*L*-cystein-methylester
(Fmoc-Ser-Gly-Cys(GerGer)-OMe) (60)**

Zu einer Lösung von 0.103 g (0.27 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-seryl-glycin (**69**) und 0.108 g (0.27 mmol) *(S)*-Geranylgeranyl-*L*-cystein-methylester (**13b**) in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.051 g (0.32 mmol) HOBt, 38 μ l (0.27 mmol) Triethylamin und 0.052 g (0.27 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit je 15 ml Wasser, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:3(v/v)).

farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute:	0.164 g (0.21 mmol, 79 %)
R _F -Wert:	0.23 (Hexan/Essigester = 1:3(v/v))
[α] _D ²⁰ :	+ 11.1° (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 7.76 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.59 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.40 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.31 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.19-7.17 (m, 2H, 2 NH, Amid), 5.97 (d, ³J = 6.5 Hz, 1H, NH, Urethan), 5.18 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, C=CH, GerGer), 5.11-5.08 (m, 3H, 3 C=CH, GerGer), 4.80-4.76 (m, 1H, α -CH, Cys), 4.44 (d, ³J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.32-4.27 (m, 1H, α -CH, Ser), 4.20 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, CH, Fmoc), 4.13-4.10 (m, 2H, α -CH_{2a}, Gly, OH, Ser), 3.98-3.94 (m, 1H, α -CH_{2b}, Gly), 3.77-3.69 (m, 1H, β -CH_{2a}, Ser), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.65-3.60 (m, 1H, β -CH_{2b}, Ser), 3.19 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 8.2 Hz, 1H, α -CH_{2a}, GerGer), 3.09 (dd, ²J = 13.1 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, α -CH_{2b}, GerGer), 2.92 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 4.1 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 2.82 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 6.2 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 2.08-1.96 (m, 12H, 6 CH₂, GerGer), 1.68 (s, 3H, CH₃, GerGer), 1.65 (s, 3H, CH₃, GerGer), 1.60 (s, 9H, 3 CH₃, GerGer).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃):

δ = 171.69, 171.51 (2 C=O, Amid), 168.90 (C=O, Ester), 156.39 (C=O, Urethan), 143.63, 141.30 (4 C_q, Aromat), 140.26, 135.44, 134.97, 131.26 (4 C_q, GerGer), 127.78, 127.10, 125.06, 120.02 (4 CH, Aromat), 124.37, 124.16, 123.68, 119.33 (4 CH, GerGer), 67.25 (CH₂-O, Fmoc), 63.00 (α -CH₂, Gly), 56.22 (α -CH, Cys), 52.78 (CH₃-O), 51.88 (α -CH, Ser), 47.09

(CH, Fmoc), 43.17 (β -CH₂, Ser), 39.71 (α -CH₂, GerGer), 33.02 (β -CH₂, Cys), 29.86, 29.70, 26.75, 26.64, 26.49 (6 CH₂, GerGer), 25.71, 17.70, 16.14, 16.04 (5 CH₃, GerGer).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 68.28	H 7.68	N 5.43
(C ₄₄ H ₅₉ N ₃ O ₇ S)	gef.:	C 67.96	H 8.04	N 4.98

FAB-MS (m/z):	ber.:	774.4151 [M+H] ⁺
	gef.:	774.4113 (in 3-NBA)

L-Seryl-glycyl-(S-geranylgeranyl)-L-cystein-methylester (H-Ser-Gly-Cys(GerGer)-OMe) (70)

Eine Lösung von 0.164 g (0.21 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-seryl-glycyl-(*S*-geranylgeranyl)-L-cystein-methylester (**60**) in 20 ml Methylenchlorid wird mit 0.62 ml (6.30 mmol) Piperidin versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel zweimal mit je 50 ml Toluol codestilliert, die Nebenprodukte säulenchromatographisch entfernt (Chloroform/Methanol = 50:1(v/v)) und anschließend das Produkt eluiert (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin).

gelbliches Öl

Ausbeute:	0.112 g (0.20 mmol, 97 %)
R _f -Wert:	0.77 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin)
[α] _D ²⁰ :	+ 8.7° (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 5.21 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H, C=CH, GerGer), 5.13-5.07 (m, 3H, 3 C=CH, GerGer), 4.64-4.61 (m, 1H, α -CH, Cys), 4.01-3.88 (m, 3H, α -CH, Ser, α -CH₂, Gly), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.54-3.50 (m, 1H, β -CH_{2a}, Ser), 3.48-3.40 (m, 1H, β -CH_{2b}, Ser), 3.25-3.21 (m, 1H, α -CH_{2a}, GerGer), 3.16-3.13 (m, α -CH_{2b}, GerGer), 2.94 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 2.73 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 8.2 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 2.15-1.91 (m, 12H, 6 CH₂, GerGer), 1.69 (s, 3H, CH₃, GerGer), 1.67 (s, 3H, CH₃, GerGer), 1.61 (s, 3H, CH₃, GerGer), 1.60 (s, 6H, 2 CH₃, GerGer).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CD_3OD):

δ = 172.48, 170.98 (2 C=O, Amid), 168.78 (C=O, Ester), 140.70, 136.24, 135.87, 132.03 (4 C_q , GerGer), 125.43, 125.10, 121.32, (4 CH, GerGer), 61.61 (α - CH_2 , Gly), 56.24 (α -CH, Cys), 53.58 (α -CH, Ser), 52.92 (CH_3 -O), 45.70 (β - CH_2 , Ser), 42.96 (α - CH_2 , GerGer), 40.80 (β - CH_2 , Cys), 33.36, 30.71, 30.22, 27.79, 27.56, 27.40 (6 CH_2 , GerGer), 25.93, 17.80, 16.27, 16.18 (5 CH_3 , GerGer).

FAB-MS (m/z): ber.: 552.3471 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 ($\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$) gef.: 552.3499 (in 3-NBA)

6.4.2. Versuche zu Kapitel 4.3.3.

N^α -Fluorenylmethoxycarbonyl-(N^ϵ -allyloxycarbonyl)-L-lysin

(Fmoc-Lys(Aloc)-OH) (36j)^[121]

Eine Lösung von 11.339 g (52 mmol) basischem Kupfer(II)-carbonat in 150 ml Wasser wird mit 7.400 g (50 mmol) L-Lysin-monohydrat (**71a**) versetzt und die Suspension 30 min unter Rückfluß erhitzt. Verbleibende Feststoffanteile werden abgetrennt und zum Filtrat unter Eiskühlung 7.48 ml (73 mmol) Chlorameisensäure-allylester bei pH = 9 gegeben. Die Lösung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und der entstandene blaue Niederschlag abfiltriert.

Dieser wird anschließend in 200 ml Wasser gelöst, 1.875 g (25 mmol) Thioacetamid zugegeben, 30 min unter Rückfluß erhitzt, mit 16 M Salzsäure auf pH = 2 angesäuert, weitere 10 min erhitzt und dann das ausgefallene Kupfer(II)-sulfid abgetrennt.

Das Filtrat wird mit 90 ml Dioxan versetzt, unter Eiskühlung 14.217 g (55 mmol) Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (**73**) zugegeben, der pH-Wert auf 10 eingestellt und die Reaktionsmischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird auf 500 ml Wasser gegossen, dreimal mit je 100 ml Diethylether gewaschen, die wäßrige Phase auf pH = 2 angesäuert und dreimal mit je 100 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der verbleibende Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (Hexan/Essigester = 1:1(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure).

farbloser Feststoff

Ausbeute: 16.272 g (36 mmol, 72 %)

R_f-Wert: 0.47 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD):

δ = 7.77 (d, ³J = 7.1 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.60 (d, ³J = 6.9 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.40-7.26 (m, 4H, 4 CH, Aromat), 5.98-5.82 (m, 1H, CH, Allyl), 5.30-5.13 (m, 2H, CH=CH₂), 4.49 (d, ³J = 5.2 Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.33 (d, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.28-4.12 (m, 2H, α-CH, Lys, CH, Fmoc), 3.10 (d, ³J = 6.5 Hz, 2H, ε-CH₂, Lys), 1.87-1.77 (m, 1H, β-CH_{2a}, Lys), 1.77-1.67 (m, 1H, β-CH_{2b}, Lys), 1.51-1.27 (m, 4H, γ-CH₂, δ-CH₂, Lys).

**N^α-Fluorenylmethoxycarbonyl-(N^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester
(Fmoc-Lys(Aloc)-OtBu) (74)**

Zu einer Mischung von 0.430 g (0.95 mmol) N^α-Fluorenylmethoxycarbonyl- (N^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysin (**36j**), 1.760 g (23.78 mmol) *tert*-Butanol und 0.95 ml (11.79 mmol) Pyridin werden bei -5°C 0.10 ml (1.05 mmol) Phosphorylchlorid getropft und die Lösung 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend werden je 20 ml Wasser und Essigester zugegeben und die abgetrennte organische Phase mit je 10 ml 0.5 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Essigester = 2:1(v/v)).

gelbes Öl

Ausbeute: 0.430 g (0.85 mmol, 89 %)

R_f-Wert: 0.48 (Hexan/Essigester = 2:1(v/v))

[α]_D²⁰: + 7.5° (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.74 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.59 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.38 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.30 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 5.99-5.84 (m, 1H, CH, Allyl), 5.51 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, α-NH, Urethan), 5.27-5.15 (m, 2H, CH=CH₂), 4.93 (br, 1H, ε-NH, Urethan), 4.60-4.53 (m, 2H, CH₂-O, Allyl), 4.37 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.27-4.25 (m, 1H, α-CH, Lys), 4.21 (t, ³J = 7.1 Hz, 1H, CH, Fmoc), 3.17-3.16 (m, 2H, ε-CH₂, Lys), 1.85-1.79 (m, 1H, β-CH_{2a}, Lys), 1.67-1.65 (m, 1H, β-CH_{2b}, Lys), 1.55-1.34 (m, 4H, γ-CH₂, δ-CH₂, Lys), 1.46 (s, 9H, *tert*-Butyl).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3):

δ = 171.63 (C=O, Ester), 156.33, 155.98 (2 C=O, Urethan), 143.92, 143.78, 141.26 (4 C_q , Aromat), 132.97 (CH, Allyl), 127.66, 127.03, 125.10, 119.94 (4 CH, Aromat), 117.51 (CH=CH₂, Allyl), 82.09 (C_q , *tert*-Butyl), 66.90 (CH₂-O, Allyl), 65.38 (CH₂-O, Fmoc), 54.08 (α -CH, Lys), 47.16 (CH, Fmoc), 40.56 (ϵ -CH₂, Lys), 32.35 (β -CH₂, Lys), 29.37 (δ -CH₂, Lys), 27.98 (CH₃, *tert*-Butyl), 22.17 (γ -CH₂, Lys).

EI-MS (m/z): ber.: 508.2573

($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$) gef.: 508.2598

(*N* ^{ϵ} -Allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester

(H-Lys(Aloc)-OtBu) (38h)

Eine Lösung von 0.430 g (0.85 mmol) *N* ^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester (**74**) in 30 ml Methylenchlorid wird mit 2.51 ml (25.50 mmol) Piperidin versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel zweimal mit je 60 ml Toluol codestilliert, die Nebenprodukte säulenchromatographisch entfernt (Hexan/Essigester/Methanol = 6:2:1(v/v/v)) und anschließend das Produkt eluiert (Essigester/Methanol = 4:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin).

gelbliches Öl

Ausbeute: 0.236 g (0.82 mmol, 97 %)

R_f -Wert: 0.71 (Essigester/Methanol = 4:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin)

$[\alpha]_D^{20}$: + 6.5° (c = 1.0, CHCl_3)

^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD):

δ = 5.95-5.87 (m, 1H, CH, Allyl), 5.28 (d, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, 1H, CH=CH_{2a}), 5.16 (d, $^3J_{\text{cis}} = 10.4$ Hz, 1H, CH=CH_{2b}), 4.50 (d, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, CH₂-O, Allyl), 3.31-3.28 (m, 1H, α -CH, Lys), 3.10 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, ϵ -CH₂, Lys), 1.71-1.64 (m, 1H, β -CH_{2a}, Lys), 1.60-1.56 (m, 1H, β -CH_{2b}, Lys), 1.53-1.44 (m, 2H, δ -CH₂, Lys), 1.47 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.43-1.34 (m, 2H, γ -CH₂, Lys).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CD_3OD):

$\delta = 171.82$ (C=O, Ester), 158.59 (C=O, Urethan), 134.44 (CH, Allyl), 117.31 (CH=CH₂, Allyl), 82.10 (C_q, *tert*-Butyl), 66.09 (CH₂-O, Allyl), 55.44 (α -CH, Lys), 41.37 (ϵ -CH₂, Lys), 35.36 (β -CH₂, Lys), 30.57 (δ -CH₂, Lys), 28.27 (CH₃, *tert*-Butyl), 23.55 (γ -CH₂, Lys).

EI-MS (m/z): ber.: 286.1892

(C₁₄H₂₆N₂O₄) gef.: 286.1878

***N* $^{\alpha}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N* $^{\epsilon}$ -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* $^{\epsilon}$ -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-*tert*-butylester (Fmoc-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-OtBu) (75)**

Zu einer Lösung von 0.371 g (0.82 mmol) *N* $^{\alpha}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N* $^{\epsilon}$ -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* $^{\epsilon}$ -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-*tert*-butylester (**36j**) und 0.236 g (0.82 mmol) (*N* $^{\epsilon}$ -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-*tert*-butylester (**38h**) in 50 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.154 g (0.98 mmol) HOBt und 0.158 g (0.82 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit je 30 ml 1 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:2(v/v)).

farbloser Feststoff, Schmp.: 110°C

Ausbeute: 0.450 g (0.62 mmol, 76 %)

R_f-Wert: 0.65 (Hexan/Essigester = 1:2(v/v))

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 5.9° (c = 1.0, CHCl₃)

^1H -NMR (500 MHz, CDCl₃):

$\delta = 7.75$ (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.58 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.39 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.29 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 6.81 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, NH, Amid), 5.90-5.82 (m, 2H, 2 CH, Allyl), 5.78 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, α -NH, Urethan), 5.25 (d, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, 2H, 2 CH=CH_{2a}), 5.15 (d, $^3J_{\text{cis}} = 10.5$ Hz, 2H, 2 CH=CH_{2b}), 5.05 (br, 2H, 2 ϵ -NH, Urethan), 4.51 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 4H, 2 CH₂-O, Allyl), 4.41-4.32 (m, 3H, CH₂-O, Fmoc, α -CH, Lys), 4.25-4.22 (m, 1H, α -CH, Lys), 4.20 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, CH, Fmoc), 3.18-3.08 (m, 4H, 2 ϵ -CH₂, Lys), 1.86-1.79 (m, 2H, 2 β -CH_{2a}, Lys), 1.72-1.67 (m, 2H, 2 β -CH_{2b}, Lys), 1.52-1.32 (m, 8H, 2 γ -CH₂, 2 δ -CH₂, Lys), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3):

δ = 171.65 (C=O, Ester), 171.24 (C=O, Amid), 156.58, 156.50, 156.30 (3 C=O, Urethan), 143.85, 143.75, 141.27 (4 C_q , Aromat), 133.04, 132.96 (2 CH, Allyl), 127.72, 127.09, 125.10, 119.99 (4 CH, Aromat), 117.55 (2 $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$, Allyl), 82.17 (C_q , *tert*-Butyl), 67.13 (2 $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 65.45 ($\text{CH}_2\text{-O}$, Fmoc), 54.58, 52.68 (2 $\alpha\text{-CH}$, Lys), 47.10 (CH, Fmoc), 40.29, 40.18 (2 $\epsilon\text{-CH}_2$, Lys), 32.24, 31.44 (2 $\beta\text{-CH}_2$, Lys), 29.31 (2 $\delta\text{-CH}_2$, Lys), 27.99 (CH_3 , *tert*-Butyl), 22.06 (2 $\gamma\text{-CH}_2$, Lys).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 64.98	H 7.27	N 7.77
($\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_9$)	gef.:	C 64.95	H 7.26	N 7.59

FAB-MS (m/z):	ber.:	721.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$
	gef.:	721.4 (in 3-NBA)

(*N* $^\epsilon$ -Allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* $^\epsilon$ -allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester

(H-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-OtBu) (76)

Eine Lösung von 0.265 g (0.37 mmol) *N* $^\alpha$ -Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N* $^\epsilon$ -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* $^\epsilon$ -allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester (**75**) in 20 ml Methylenchlorid wird mit 1.14 ml (11.10 mmol) Piperidin versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel zweimal mit je 50 ml Toluol codestilliert, die Nebenprodukte säulenchromatographisch entfernt (Hexan/Essigester/Methanol = 6:2:1(v/v/v)) und anschließend das Produkt eluiert (Essigester/Methanol = 3:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin).

gelbliches Öl

Ausbeute:	0.175 g (0.35 mmol, 95 %)
R_f -Wert:	0.61 (Essigester/Methanol = 3:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin)
$[\alpha]_D^{20}$:	- 4.0° (c = 1.0, CHCl_3)

^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD):

δ = 5.95-5.88 (m, 2H, 2 CH, Allyl), 5.28 (d, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, 2H, 2 $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_{2a}$), 5.16 (d, $^3J_{\text{cis}} = 10.5$ Hz, 2H, 2 $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_{2b}$), 4.50 (d, $^3J = 4.9$ Hz, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{-O}$, Allyl), 4.28-4.25 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Lys), 3.38-3.36 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Lys), 3.12-3.09 (m, 4H, 2 $\epsilon\text{-CH}_2$, Lys), 1.85-1.78 (m, 2H,

2 β -CH_{2a}, Lys), 1.74-1.65 (m, 2H, 2 β -CH_{2b}, Lys), 1.60-1.50 (m, 4H, 2 δ -CH₂, Lys), 1.46 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.44-1.40 (m, 4H, 2 γ -CH₂, Lys).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

δ = 176.94 (C=O, Amid), 172.71 (C=O, Ester), 158.66, 158.62 (2 C=O, Urethan), 134.47 (2 CH, Allyl), 117.36 (2 CH=CH₂, Allyl), 82.75 (C_q, *tert*-Butyl), 66.15 (2 CH₂-O, Allyl), 55.50, 54.17 (2 α -CH, Lys), 41.40, 41.31 (2 ϵ -CH₂, Lys), 35.76, 32.22 (2 β -CH₂, Lys), 30.58, 30.37 (2 δ -CH₂, Lys), 28.27 (CH₃, *tert*-Butyl), 23.88, 23.59 (2 γ -CH₂, Lys).

EI-MS (m/z): ber.: 498.3053

(C₂₄H₄₂N₄O₇) gef.: 498.3030

***N* ^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-*tert*-butylester
(Fmoc-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-OtBu) (77)**

Zu einer Lösung von 0.309 g (0.68 mmol) *N* ^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-*tert*-butylester (76) in 30 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.129 g (0.82 mmol) HOBt und 0.132 g (0.68 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit je 20 ml 1 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:2(v/v)).

farbloser Feststoff, Schmp.: 140°C

Ausbeute: 0.457 g (0.49 mmol, 72 %)

R_F-Wert: 0.39 (Hexan/Essigester = 1:2(v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: - 9.3° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.75 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.58 (d, ³J = 6.9 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.39 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.29 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.13 (br, 1H, NH, Amid), 6.88 (br, 1H, NH, Amid), 5.92-5.80 (m, 4H, 3 CH, Allyl, α -NH, Urethan), 5.74 (br,

1H, ϵ -NH, Urethan), 5.62 (br, 1H, ϵ -NH, Urethan), 5.43 (br, 1H, ϵ -NH, Urethan), 5.26 (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.5$ Hz, 3H, 3 CH=CH_{2a}), 5.16 (d, $^3J_{\text{cis}} = 9.0$ Hz, 3H, 3 CH=CH_{2b}), 4.58-4.49 (m, 6H, 3 CH₂-O, Allyl), 4.45-4.41 (m, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.36-4.33 (m, 2H, 2 α -CH, Lys), 4.28-4.26 (m, 1H, α -CH, Lys), 4.20 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, CH, Fmoc), 3.20-3.09 (m, 6H, 3 ϵ -CH₂, Lys), 1.84-1.77 (m, 3H, 3 β -CH_{2a}, Lys), 1.72-1.66 (m, 3H, 3 β -CH_{2b}, Lys), 1.49-1.39 (m, 12H, 3 γ -CH₂, 3 δ -CH₂, Lys), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

$\delta = 171.30, 171.23$ (3 C=O, Ester, Amide), 156.68, 156.59, 156.36 (4 C=O, Urethan), 143.75, 141.26 (4 C_q, Aromat), 133.06 (3 CH, Allyl), 127.74, 127.09, 125.08, 119.99 (4 CH, Aromat), 117.62, 117.54 (3 CH=CH₂, Allyl), 82.12 (C_q, *tert*-Butyl), 67.06, 65.66, 64.43 (3 CH₂-O, Allyl), 65.48 (CH₂-O, Fmoc), 54.56, 53.64, 52.55 (3 α -CH, Lys), 47.10 (CH, Fmoc), 40.25, 40.17, 39.99 (3 ϵ -CH₂, Lys), 32.22, 31.63, 31.09 (3 β -CH₂, Lys), 29.69, 29.25 (3 δ -CH₂, Lys), 27.99 (CH₃, *tert*-Butyl), 22.24, 22.13, 22.02 (3 γ -CH₂, Lys).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 63.07	H 7.35	N 9.01
(C ₄₉ H ₆₈ N ₆ O ₁₂)	gef.:	C 62.88	H 7.34	N 8.94

FAB-MS (m/z):	ber.:	933.5 [M+H] ⁺
	gef.:	933.6 (in 3-NBA)

(*N* ^{ϵ} -Allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-*tert*-butylester (H-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-OtBu) (78)

Eine Lösung von 0.321 g (0.34 mmol) *N* ^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N* ^{ϵ} -allyloxycarbonyl)-L-lysyl-*tert*-butylester (**77**) in 30 ml Methylenchlorid wird mit 1.01 ml (10.31 mmol) Piperidin versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel zweimal mit je 60 ml Toluol codestilliert, die Nebenprodukte säulenchromatographisch entfernt (Hexan/Essigester/Methanol = 6:2:1(v/v/v)) und anschließend das Produkt eluiert (Essigester/Methanol = 4:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin).

gelbliches Öl

Ausbeute: 0.237 g (0.33 mmol, 98 %)

R_F-Wert: 0.64 (Essigester/Methanol = 4:1(v/v) + 3 Vol.-% Triethylamin)

farbloser Feststoff, Schmp.: 142°C

Ausbeute: 0.163 g (0.17 mmol, 87 %)

R_f-Wert: 0.40 (Hexan/Essigester = 1:10(v/v) + 3 Vol.-% Essigsäure)

[α]_D²⁰: - 11.9° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 7.78 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.65 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.38 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.30 (td, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 5.94-5.86 (m, 3H, 3 CH, Allyl), 5.28 (dt, ³J_{trans} = 17.2 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 3H, 3 CH=CH_{2a}), 5.14 (d, ³J_{cis} = 10.4 Hz, 3H, 3 CH=CH_{2b}), 4.51-4.47 (m, 6H, 3 CH₂-O, Allyl), 4.36-4.33 (m, 5H, CH₂-O, Fmoc, 3 α-CH, Lys), 4.22 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, CH, Fmoc), 3.85-3.78 (m, 2H, α-CH₂, Gly), 3.11-3.04 (m, 6H, 3 ε-CH₂, Lys), 1.86-1.82 (m, 3H, 3 β-CH_{2a}, Lys), 1.70-1.66 (m, 3H, 3 β-CH_{2b}, Lys), 1.49-1.44 (m, 6H, 3 δ-CH₂, Lys), 1.41-1.37 (m, 6H, 3 γ-CH₂, Lys).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

δ = 175.16 (C=O, Carbonsäure), 174.10, 172.28 (3 C=O, Amide), 159.11, 158.73 (4 C=O, Urethan), 145.24, 142.59 (4 C_q, Aromat), 134.55 (3 CH, Allyl), 128.80, 128.19, 126.23, 120.94 (4 CH, Aromat), 117.43 (3 CH=CH₂, Allyl), 68.28 (3 CH₂-O, Allyl), 66.25 (CH₂-O, Fmoc), 54.70, 54.59, 53.55 (3 α-CH, Lys), 48.34 (CH, Fmoc), 44.98 (α-CH₂, Gly), 42.13, 41.52, 41.41 (3 ε-CH₂, Lys), 32.54, 32.44, 32.23 (3 β-CH₂, Lys), 30.42, 30.37, 28.32 (3 δ-CH₂, Lys), 23.98 (3 γ-CH₂, Lys).

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 60.44	H 6.80	N 10.50
(C ₄₇ H ₆₃ N ₇ O ₁₃)	gef.:	C 59.91	H 6.85	N 10.30

FAB-MS (m/z):	ber.:	934.4562 [M+H] ⁺
	gef.:	934.4528 (in 3-NBA)

6.4.3. Versuche zu Kapitel 4.3.4.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-glycyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-*L*-seryl-glycyl-(*S*-geranylgeranyl)-*L*-cystein-methylester**

(Fmoc-Gly-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Ser-Gly-Cys(GerGer)-OMe) (58)

Zu einer Lösung von 0.064 g (69 μmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-glycyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysylin (**79a**) und 0.042 g (69 μmol) *L*-seryl-glycyl-(*S*-geranylgeranyl)-*L*-cystein-methylester (**70**) in 10 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.015 g (82 μmol) HOBt und 0.015 g (69 μmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 (Chloroform/Methanol = 1:1(v/v)) aufgereinigt.

farbloses Öl

Ausbeute:	0.041 g (28 μmol, 41 %)
R _F -Wert:	0.61 (Chloroform/Methanol = 9:1(v/v))
[α] _D ²⁰ :	-23.5° (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 6:1(v/v)):

δ = 7.79 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.67 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.39 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 7.31 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, 2 CH, Aromat), 6.01-5.82 (m, 3H, 3 CH, Allyl), 5.32-5.17 (m, 7H, 3 CH=CH₂, Allyl, C=CH, GerGer), 5.12-5.06 (m, 3H, 3 C=CH, GerGer), 4.67-4.59 (m, 1H, α-CH, Cys), 4.52-4.46 (m, 6H, 3 CH₂-O, Allyl), 4.41-4.19 (m, 7H, CH₂-O, Fmoc, 3 α-CH, Lys, α-CH, Ser, CH, Fmoc), 3.97-3.90 (m, 2H, α-CH₂, Gly), 3.87-3.76 (m, 4H, α-CH₂, Gly, β-CH₂, Ser), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.26-3.18 (m, 1H, α-CH_{2a}, GerGer), 3.13-3.02 (m, 7H, 3 ε-CH₂, Lys, α-CH_{2b}, GerGer), 2.97-2.85 (m, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 2.78-2.66 (m, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.10-1.96 (m, 12H, 6 CH₂, GerGer), 1.87-1.72 (m, 6H, 3 β-CH₂, Lys), 1.68 (s, 6H, 2 CH₃, GerGer), 1.60 (s, 9H, 3 CH₃, GerGer), 1.53-1.42 (m, 12H, 3 δ-CH₂, 3 γ-CH₂, Lys).

MALDI-MS (m/z): ber.: 1489.8 [M+Na]⁺

(C₇₆H₁₁₀N₁₀O₁₇S) gef.: 1490.4 (in DHB-Matrix)

***N*-Methyl-isatosäure-anhydrid (81)**^[125]

Eine Mischung von 2.000 g (13.25 mmol) *N*-Methylantranilsäure (**80**) und 4.13 ml (39.75 mmol) Chlorameisensäure-ethylester wird 2 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend werden 1.04 ml (14.58 mmol) Acetylchlorid zugegeben, das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und die flüssigen Reagenzien mittels Destillation entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert.

brauner Feststoff

Ausbeute: 1.812 g (10.60 mmol, 80 %)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 8.15 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, Aromat), 7.79 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, Aromat), 7.32 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, Aromat), 7.21 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, Aromat), 3.59 (s, 3H, CH₃).

***N*-Methyl-anthranyl-aminocaprinsäure**

(Mantac-OH) (46b)^[125]

Eine Lösung von 0.500 g (2.92 mmol) *N*-Methyl-isatosäure-anhydrid (**81**) und 0.375 g (2.92 mmol) Aminocaprinsäure (**71b**) in 30 ml DMF wird 2 h auf 100°C erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Essigester = 1:1(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure).

farbloser Feststoff

Ausbeute: 0.655 g (2.48 mmol, 85 %)

R_f-Werte: 0.63 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure)

0.46 (Chloroform/Methanol = 5:1(v/v))

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 9.18 (br, 1H, COOH), 7.31 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Aromat), 6.65 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, Aromat), 6.56 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, Aromat), 6.32 (br, 1H, NH), 3.37 (dd, ³J₁ = 6.7 Hz, ³J₂ = 6.3 Hz, 2H, α-CH₂, Aminocaproyl), 2.83 (s, 3H, CH₃), 2.35 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 1.72-1.54 (m, 4H, β-CH₂, δ-CH₂, Aminocaproyl), 1.46-1.34 (m, 2H, γ-CH₂, Aminocaproyl).

N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycin-*tert*-butylester*(Mantac-Gly-O*t*Bu) (53b)**

Zu einer Lösung von 0.150 g (0.57 mmol) *N*-Methyl-anthranyl-aminocapronsäure (**46b**) und 0.172 g (0.57 mmol) Glycin-*tert*-butylester-hydrotosylat (**38i**) in 30 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 0.107 g (0.68 mmol) HOBt, 79 μ l (0.57 mmol) Triethylamin und 0.109 g (0.57 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit je 10 ml 0.5 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:2(v/v)).

gelbes Öl

Ausbeute: 0.129 g (0.34 mmol, 60 %)

R_f-Wert: 0.40 (Hexan/Essigester = 1:2(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.40 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, Aromat), 7.33 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 1H, Aromat), 6.77 (d, ³*J* = 7.1 Hz, 1H, Aromat), 6.66 (t, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, Aromat), 6.44 (br, 1H, NH, Amid), 6.04 (br, 1H, NH, Amid), 3.91 (d, ³*J* = 5.1 Hz, 2H, α -CH₂, Gly), 3.40 (dt, ³*J*₁ = 6.9 Hz, ³*J*₂ = 6.0 Hz, 2H, α -CH₂, Aminocaproyl), 2.87 (s, 3H, CH₃, Mant), 2.25 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 2H, ϵ -CH₂, Aminocaproyl), 1.70 (tt, ³*J*₁ = 7.6 Hz, ³*J*₂ = 7.4 Hz, 2H, β -CH₂, Aminocaproyl), 1.62 (tt, ³*J*₁ = 7.3 Hz, ³*J*₂ = 7.1 Hz, 2H, δ -CH₂, Aminocaproyl), 1.46 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.45-1.39 (m, 2H, γ -CH₂, Aminocaproyl).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

δ = 172.87, 169.60, 169.26 (3 C=O, 2 Amid, 1 Ester), 149.25 (2 C_q, Aromat), 132.75, 127.29, 116.27, 112.40 (4 CH, Aromat), 82.28 (C_q, *tert*-Butyl), 41.99 (α -CH₂, Gly), 39.31 (α -CH₂, Aminocaproyl), 36.00 (ϵ -CH₂, Aminocaproyl), 30.45 (CH₃, Mant), 29.08 (β -CH₂, Aminocaproyl), 28.05 (CH₃, *tert*-Butyl), 26.32 (δ -CH₂, Aminocaproyl), 24.80 (γ -CH₂, Aminocaproyl).

EI-MS (m/z): ber.: 377.2314

(C₂₀H₃₁N₃O₄) gef.: 377.2309

N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycin*(Mantac-Gly-OH) (54b)**

Eine Lösung von 0.110 g (0.29 mmol) *N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycin-*tert*-butylester (**53b**) in 1.20 ml Methylenchlorid wird unter Eiskühlung mit 1.20 ml (14.50 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und 45 min bei 0°C sowie 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck durch zweimaliges Codestillieren mit je 10 ml Toluol entfernt.

gelbes Öl

Ausbeute: 0.089 g (0.28 mmol, 96 %)

R_F-Wert: 0.10 (Hexan/Essigester = 1:2(v/v)).

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 7.71-7.65 (m, 1H, Aromat), 7.56-7.49 (m, 1H, Aromat), 7.15-7.06 (m, 2H, Aromat), 3.92 (d, ²J = 8.3 Hz, 1H, α-CH_{2a}, Gly), 3.88 (d, ²J = 8.3 Hz, 1H, α-CH_{2b}, Gly), 3.44-3.28 (m, 2H, α-CH₂, Aminocaproyl), 2.93 (s, 3H, CH₃, Mant), 2.29 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 1.73-1.66 (m, 4H, β-CH₂, δ-CH₂, Aminocaproyl), 1.49-1.44 (m, 2H, γ-CH₂, Aminocaproyl).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

δ = 176.61 (C=O, Carbonsäure), 171.84, 168.08 (2 C=O, Amid), 159.09, 155.07 (2 C_q, Aromat), 134.52, 131.16, 129.93, 125.29 (4 CH, Aromat), 41.79 (α-CH₂, Gly), 40.76 (α-CH₂, Aminocaproyl), 38.45 (CH₃, Mant), 36.46 (ε-CH₂, Aminocaproyl), 29.80 (β-CH₂, Aminocaproyl), 27.36 (δ-CH₂, Aminocaproyl), 26.32 (γ-CH₂, Aminocaproyl).

EI-MS (m/z): ber.: 321.1689

(C₁₆H₂₃N₃O₄) gef.: 321.1682

N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester*(Mantac-Gly-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-OtBu) (59b)**

Zu einer Lösung von 0.027 g (0.08 mmol) *N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycin (**54b**) und 0.060 g (0.08 mmol) (*N*^ε-Allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-Allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester (**78**) in 25 ml Methylenchlorid werden unter Eis-

kühlung 0.016 g (0.10 mmol) HOBt und 0.016 g (0.08 mmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Chloroform/Methanol = 100:1(v/v) → 25:1(v/v)).

farbloses Öl

Ausbeute: 0.065 g (0.06 mmol, 79 %)
R_f-Wert: 0.51 (Chloroform/Methanol = 12:1(v/v))
[α]_D²⁰: - 12.1° (c = 1.0, CH₃OH)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

δ = 7.43 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, Aromat), 7.29 (td, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, Aromat), 6.67 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, Aromat), 6.59 (td, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, Aromat), 5.95-5.88 (m, 3H, 3 CH, Allyl), 5.28 (d, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 3H, 3 CH=CH_{2a}), 5.17 (d, ³J_{cis} = 10.4 Hz, 3H, 3 CH=CH_{2b}), 4.52-4.48 (m, 6H, 3 CH₂-O, Allyl), 4.35-4.32 (m, 2H, 2 α-CH, Lys), 4.26-4.23 (m, 1H, α-CH, Lys), 3.89-3.85 (m, 2H, α-CH₂, Gly), 3.34-3.30 (m, 2H, α-CH₂, Aminocaproyl), 3.12-3.09 (m, 6H, 3 ε-CH₂, Lys), 2.83 (s, 3H, CH₃, Mant), 2.29 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 1.83-1.78 (m, 3H, 3 β-CH_{2a}, Lys), 1.73-1.59 (m, 7H, β-CH₂, δ-CH₂, Aminocaproyl, 3 β-CH_{2b}, Lys), 1.51-1.46 (m, 6H, 3 δ-CH₂, Lys), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.44-1.39 (m, 8H, γ-CH₂, Aminocaproyl, 3 γ-CH₂, Lys).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD):

δ = 176.62, 174.08, 173.99, 172.67, 172.15, 171.74 (6 C=O, Ester, Amide), 158.68 (3 C=O, Urethan), 151.39 (2 C_q, Aromat), 134.54 (3 CH, Allyl), 133.55, 129.12, 127.18, 126.47 (4 CH, Aromat), 117.50, 117.44 (3 CH=CH₂, Allyl), 82.77 (C_q, *tert*-Butyl), 66.24 (3 CH₂-O, Allyl), 54.63, 54.53, 54.37 (3 α-CH, Lys), 41.47 (α-CH₂, Gly), 41.40 (3 ε-CH₂, Lys), 40.39 (α-CH₂, Aminocaproyl), 36.67 (ε-CH₂, Aminocaproyl), 32.63, 32.55, 32.18 (3 β-CH₂, Lys), 30.41, 30.36 (3 δ-CH₂, Lys), 30.23 (β-CH₂, Aminocaproyl), 29.95 (CH₃, Mant), 28.33 (CH₃, *tert*-Butyl), 27.63 (δ-CH₂, Aminocaproyl), 26.42 (γ-CH₂, Aminocaproyl), 24.05, 23.93, 23.84 (3 γ-CH₂, Lys).

FAB-MS (m/z): ber.: 1014.587 [M+H]⁺
(C₅₀H₇₉N₉O₁₃) gef.: 1014.585 (in 3-NBA)

FAB-MS (m/z): ber.: 958.5250 [M+H]⁺
 (C₄₆H₇₁N₉O₁₃) gef.: 958.5234 (in 3-NBA)

6.4.5. Versuche zu Kapitel 4.3.6.

***N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-L-seryl-glycyl-(*S*-geranylgeranyl)-L-cystein-methylester**

(Mantac-Gly-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Ser-Gly-Cys(GerGer)-OMe) (82)

Zu einer Lösung von 0.033 g (33 μmol) *N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-L-lysyl (**79b**) und 0.020 g (33 μmol) L-Seryl-glycyl-(*S*-geranylgeranyl)-L-cystein-methylester (**70**) in 10 ml Chloroform/Trifluorethanol = 3:1(v/v) werden unter Eiskühlung 0.007 g (40 μmol) HOBt und 0.007 g (33 μmol) EDC gegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 (Chloroform/Methanol = 1:1(v/v)) aufgereinigt.

farbloses Öl

Ausbeute: 0.031 g (21 μmol, 52 %)
 R_f-Wert: 0.46 (Chloroform/Methanol = 12:1(v/v))
 [α]_D²⁰: - 28.6° (c = 0.2, DMF)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1(v/v)):

δ = 7.56 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, Aromat), 7.31 (t, ³J = 8.3 Hz, 1H, Aromat), 6.71-6.62 (m, 2H, Aromat), 6.00-5.83 (m, 3H, 3 CH, Allyl), 5.32-5.18 (m, 7H, 3 CH=CH₂, Allyl, C=CH, GerGer), 5.14-5.06 (m, 3H, 3 C=CH, GerGer), 4.67-4.59 (m, 1H, α-CH, Cys), 4.59-4.50 (m, 6H, 3 CH₂-O, Allyl), 4.37-4.30 (m, 1H, α-CH, Ser), 4.25-4.14 (m, 3H, 3 α-CH, Lys), 4.04-3.97 (m, 4H, α-CH₂, Gly, β-CH₂, Ser), 3.93-3.88 (m, 2H, α-CH₂, Gly), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.38-3.22 (m, 3H, α-CH₂, Aminocaproyl, α-CH_{2a}, GerGer), 3.19-3.05 (m, 7H, 3 ε-CH₂, Lys, α-CH_{2b}, GerGer), 2.92 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 7.2 Hz, 1H, β-CH_{2a}, Cys), 2.86 (s, 3H, NH-CH₃), 2.75 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 9.1 Hz, 1H, β-CH_{2b}, Cys), 2.34-2.23 (m, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 2.12-1.93 (m, 12H, 6 CH₂, GerGer), 1.89-1.73 (m, 6H, 3 β-CH₂, Lys), 1.69-1.65 (m,

8H, 2 CH₃, GerGer, β-CH₂, Aminocaproyl), 1.61 (s, 9H, 3 CH₃, GerGer), 1.57-1.36 (m, 16H, δ-CH₂, γ-CH₂, Aminocaproyl, 3 δ-CH₂, 3 γ-CH₂, Lys).

MALDI-MS (m/z): ber.: 1513.8 [M+Na]⁺
 (C₇₅H₁₁₈N₁₂O₁₇S) gef.: 1515.1 (in DHB-Matrix)

***N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-(*S*-geranylgeranyl)-L-cystein-methylester
 (Mantac-Gly-Lys-Lys-Lys-Ser-Gly-Cys(GerGer)-OMe) (57)**

Unter Argon werden bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 15 mg (10 μmol) *N*-Methyl-anthranyl-aminocaproyl-glycyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-L-seryl-glycyl-(*S*-geranylgeranyl)-L-cystein-methylester (**82**) in 5 ml abs. DMF 5 μl (35 μmol) Phenylsilan sowie 0.5 mg (0.4 μmol) Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium(0) gegeben. Nach 2 h Rühren wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand durch Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 (Chloroform/Methanol = 1:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff

Ausbeute: 0.010 g (8 μmol, 83 %)
 R_F-Wert: 0.00 (Methanol)
 [α]_D²⁰: - 38.3° (c = 0.1, CHCl₃/CH₃OH = 1:1(v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1(v/v)):

δ = 7.56-7.49 (m, 2H, Aromat), 6.70-6.58 (m, 2H, Aromat), 5.23-5.18 (m, 1H, C=CH, GerGer), 5.15-5.07 (m, 3H, 3 C=CH, GerGer), 4.55-4.50 (m, 1H, α-CH, Cys), 4.37-4.26 (m, 4H, α-CH, Ser, 3 α-CH, Lys), 4.00-3.92 (m, 4H, α-CH₂, Gly, β-CH₂, Ser), 3.89-3.82 (m, 2H, α-CH₂, Gly), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.69-3.60 (m, 6H, 3 ε-CH₂, Lys), 3.43-3.38 (m, 2H, α-CH₂, Aminocaproyl), 3.26-3.19 (m, 1H, α-CH_{2a}, GerGer), 3.16-3.08 (m, 1H, α-CH_{2b}, GerGer), 3.00-2.91 (m, 2H, β-CH₂, Cys), 2.37-2.28 (m, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 2.21 (s, 3H, NH-CH₃), 2.16-1.96 (m, 12H, 6 CH₂, GerGer), 1.92-1.73 (m, 6H, 3 β-CH₂, Lys), 1.70-1.66 (m, 8H, 2 CH₃, GerGer, β-CH₂, Aminocaproyl), 1.61 (s, 9H, 3 CH₃, GerGer), 1.57-1.38 (m, 16H, δ-CH₂, γ-CH₂, Aminocaproyl, 3 δ-CH₂, 3 γ-CH₂, Lys).

MALDI-MS (m/z): ber.: 1240.7
(C₆₃H₁₀₆N₁₂O₁₁S) gef.: 1240.8 (in DHB-Matrix)

6.5. Versuche zu Kapitel 4.4.

Allgemeine Vorschrift der Belegungsbestimmung durch UV-spektroskopische Detektion der Fmoc-Abspaltungsrate^[130]

In einer Mischung von 2 ml DMF/Piperidin = 4:1(v/v) wird das mit einem N-terminal Fmoc-geschützten Peptid (bzw. einer N-terminal Fmoc-geschützten Aminosäure) beladene Hydrazin-funktionalisierte Polystyrolharz 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die flüssige Phase abgetrennt und das Harz zunächst mit 2 ml DMF/Piperidin = 4:1(v/v) und danach mit 1 ml DMF/Piperidin = 4:1(v/v) gewaschen. Durch Messung der UV-Absorption bei 191 nm wird nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration an *N*-(Fluorenylmethyl)-piperidin in den vereinigten flüssigen Phasen bestimmt. Bei vorgegebener Flüssigkeitsmenge folgt daraus die Stoffmenge des Abspaltprodukts der Schutzgruppe, die in Verhältnis zur Masse des verwendeten Harzes gesetzt wird. Unter der Annahme einer quantitativen Fmoc-Abspaltung ergibt sich der Belegungsgrad des Harzes.

6.5.1. Versuche zu Kapitel 4.4.2.

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*para*-hydrazinobenzoesäure) (**89**)^[129]

Zu einer Lösung von 1.000 g (6.60 mmol) *para*-Hydrazinobenzoesäure (**88**) in 40 ml 1 M NaHCO₃-Lösung und 20 ml Dioxan werden bei 0°C 2.040 g (7.92 mmol) Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (**73**) in 20 ml Dioxan gegeben. Der pH-Wert wird mit festem NaHCO₃ auf 9 eingestellt und die Mischung 16 h gerührt. Die schwach alkalische Lösung wird dreimal mit je 30 ml Diethylether gewaschen, die wässrige Phase durch Zugabe von 16 M Salzsäure auf pH = 1 eingestellt und dreimal mit je 30 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt aus Hexan/Essigester umkristallisiert.

brauner Feststoff

Ausbeute: 1.728 g (4.62 mmol, 70 %)

R_F-Wert: 0.74 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD):

δ = 7.86-7.79 (m, 4H, Aromat, Fmoc, CH₂CCOOH), 7.69 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, Aromat, Fmoc), 7.42 (t, ³J = 8.3 Hz, 2H, Aromat, Fmoc), 7.31 (t, ³J = 8.3 Hz, 2H, Aromat, Fmoc), 6.68 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, Aromat, CHCNH), 4.52 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.22 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H, CH, Fmoc).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*para*-hydrazinobenzoyl-aminocaprönsäure (91)**

Zu einer Lösung von 0.200 g (0.53 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*para*-hydrazinobenzoesäure) (**89**) in 30 ml THF werden unter Eiskühlung 0.062 g (0.53 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid und 0.110 g (0.53 mmol) DCC gegeben und die Lösung 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der ausgefallene Harnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Hydroxysuccinimidester wird in 20 ml Dioxan gelöst und zu einer Mischung von 0.070 g (0.53 mmol) Aminocaprönsäure(**71b**) und 0.021 g (0.53 mmol) Natriumcarbonat in 50 ml Wasser gegeben. Die Lösung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt, das Dioxan bei vermindertem Druck weitestgehend entfernt und die wäßrige Phase dreimal mit je 20 ml Diethylether gewaschen. Nach Ansäuern auf pH = 2 wird dreimal mit je 50 ml Essigester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt.

bräunliches Öl

Ausbeute: 0.155 g (0.32 mmol, 60 %)

R_F-Wert: 0.25 (Hexan/Essigester = 1:3(v/v) + 2 Vol.-% Essigsäure)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD):

δ = 7.82 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, Aromat, Fmoc), 7.71-7.64 (m, 4H, Aromat, Fmoc, CH₂CO), 7.44-7.28 (m, 4H, Aromat, Fmoc), 6.70 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, Aromat, CHCNH), 4.52 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-O, Fmoc), 4.29-4.22 (m, 1H, CH, Fmoc), 3.49-3.40 (m, 2H, α-CH₂, Aminocaproyl), 2.32 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, ε-CH₂, Aminocaproyl), 1.70-1.60 (m, 4H, β-CH₂, δ-CH₂, Aminocaproyl), 1.47-1.38 (m, 2H, γ-CH₂, Aminocaproyl).

Hydrazinfunktionalisierung des aminomethylierten Polystyrolharzes

Zu einer Lösung von 100 mg (0.21 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*para*-hydrazinobenzoyl-aminocaprinsäure (**91**) in 2 ml DMF werden 32 μ l (0.21 mmol) DIC und 39 mg (0.21 mmol) HOBt gegeben, die Mischung 10 min geschüttelt und mit 29 μ l (0.21 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend werden in dieser Lösung 142 mg aminomethylfunktionalisiertes Polystyrolharz suspendiert (Belegung: 1.44 mmol/g) und das Gemisch 18 h geschüttelt. Die flüssige Phase wird entfernt und das verbleibende Harz fünfmal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum wird das Polymer zweimal in einer Mischung von 2 ml Pyridin/Acetanhydrid = 4:1(v/v) jeweils 30 min geschüttelt und fünfmal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen. Danach wird das Harz in 2 ml DMF/Piperidin = 4:1(v/v) 30 min geschüttelt. Anschließend wird nochmals fünfmal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

Polymermenge nach Anknüpfung: 175 mg
Belegung (UV-Bestimmung): 0.82 mmol/g
Ausbeute: 144 μ mol (69 %)

Anknüpfung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**36l**) an hydrazinfunktionalisierte Harze (**93**)

Zu einer Lösung von 3 Äq. *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**36l**) in 2 ml DMF werden 3 Äq. DIC und 3.6 Äq. HOBt gegeben, die Mischung 10 min geschüttelt und mit 1.2 Äq. Triethylamin versetzt. Anschließend wird in dieser Lösung hydrazinfunktionalisiertes Polystyrolharz (**93**) (1 Äq. bzgl. der Funktionalisierung) suspendiert und das Gemisch 18 h geschüttelt. Die flüssige Phase wird entfernt und das verbleibende Harz fünfmal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen. Danach wird das Harz im Vakuum getrocknet und die gesamte Anknüpfungssequenz wiederholt.

Abschließend wird das Polymer zweimal in einer Mischung von 2 ml Pyridin/Acetanhydrid = 10:1(v/v) jeweils 10 min geschüttelt und fünfmal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen.

Auf diesem Wege wurden umgesetzt:

20 mg des dargestellten hydrazinfunktionalisierten Harzes (0.82 mmol/g) mit 28 mg (49 μmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**36l**), 8 μl (49 μmol) DIC, 9 mg (59 μmol) HOBt und 3 μl (20 μmol) Triethylamin

Polymermenge nach Anknüpfung: 27 mg
Belegung (UV-Bestimmung): 0.49 mmol/g
Ausbeute: 14 μmol (81 %)

100 mg käufliches hydrazinfunktionalisierten Harz (0.67 mmol/g) mit 118 mg (201 μmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**36l**), 31 μl (201 μmol) DIC, 38 mg (241 μmol) HOBt und 11 μl (80 μmol) Triethylamin

Polymermenge nach Anknüpfung: 131 mg
Belegung (UV-Bestimmung): 0.42 mmol/g
Ausbeute: 55 μmol (82 %)

Freisetzung der Thiolfunktion an polymergebundenem *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (94a**)**

In einer Lösung von 80 μl (550 μmol) Triethylsilan in 2 ml Methylenchlorid/Trifluoressigsäure = 1:1(v/v) werden 131 mg (0.42 mmol/g) polymergebundenes *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**94a**) 30 min geschüttelt. Die flüssige Phase wird entfernt, das Harz fünfmal mit je 2 ml DMF sowie dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen und das Polymer im Vakuum getrocknet.

Polymermenge nach Abspaltung: 118 mg

Farnesylierung an polymergebundenem *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-cystein (95a**)**

Unter Argon werden in einer Lösung von 40 μl (165 μmol) Farnesylobromid (**62**) und 20 μl (165 μmol) Triethylamin in 2 ml DMF 125 mg *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-cystein-

beladenes Polystyrolharz (**95a**) suspendiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 3 h geschüttelt, die flüssige Phase entfernt, das verbleibende Polymer fünfmal mit je 2 ml DMF sowie dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

Polymermenge nach Anknüpfung: 130 mg

Abspaltung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-farnesyl)-*L*-cystein-methylester (86a**)**

In einer Lösung von 5 mg (28 mmol) Kupfer(II)-acetat und 23 μ l (550 μ mol) Pyridin in 2 ml THF/Methanol = 1:1(v/v) werden 130 mg polymergebundenem *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-farnesyl)-*L*-cystein (**96a**) unter ständigem Sauerstoffstrom 3 h geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert, dreimal mit je 3 ml THF/Methanol = 1:1(v/v) gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 4:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff

Ausbeute: 15 mg (26 μ mol, 48 % bzgl. UV-Bestimmung an (**94a**))

R_f-Wert: 0.35 (Hexan/Essigester = 4:1(v/v))

[α]_D²⁰: - 48.3° (c = 0.5, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.56 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Aromat), 7.62-7.60 (m, 2H, Aromat), 7.40 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Aromat), 7.32 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Aromat), 5.59 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH, Urethan), 5.21 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, C=CH-CH₂-S, Far), 5.10-5.07 (m, 2H, 2 C=CH, Far), 4.62-4.58 (m, 1H, α -CH, Cys), 4.42 (dd, ²J = 10.6 Hz, ³J = 7.0 Hz, 1H, CH_{2a}-O, Fmoc), 4.38 (dd, ²J = 10.6 Hz, ³J = 7.0 Hz, 1H, CH_{2b}-O, Fmoc), 4.24 (t, ³J = 7.0 Hz, 1H, CH, Fmoc), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.21 (dd, ²J = 13.0 Hz, ³J = 8.2 Hz, 1H, α -CH_{2a}, Far), 3.16 (dd, ²J = 13.0 Hz, ³J = 7.5 Hz, 1H, α -CH_{2b}, Far), 2.96 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 4.8 Hz, 1H, β -CH_{2a}, Cys), 2.89 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 5.9 Hz, 1H, β -CH_{2b}, Cys), 2.12-1.95 (m, 8H, CH₂, Far), 1.68 (s, 3H, CH₃, Far), 1.66 (s, 3H, CH₃, Far), 1.59 (s, 6H, CH₃, Far).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

δ = 171.43 (C=O, Ester), 155.79 (C=O, Urethan), 143.87, 143.76, 141.33 (4 C_q, Aromat), 140.16, 135.43, 131.35 (3 C_q, Far), 127.75, 127.11, 125.15, 120.02 (4 CH, Aromat), 124.34, 123.74, 119.59 (3 CH, Far), 67.27 (CH₂-O, Fmoc), 53.67 (α -CH, Cys), 52.67 (OCH₃), 47.14

(CH, Fmoc), 39.72 (α -CH₂, Far), 39.65 (β -CH₂, Cys), 33.60, 30.09, 26.75, 26.44 (4 CH₂, Far), 25.73, 17.72, 16.15, 16.05 (4 CH₃, Far).

FAB-MS (m/z): ber.: 561.2930 [M+H]⁺
(C₃₄H₄₃NO₄S) gef.: 561.2961 (in 3-NBA)

6.5.2. Versuche zu Kapitel 4.4.3.

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-L-serin (**36n**)^[134]

Zu einer Lösung von 0.460 g (1.25 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serin (**36i**) und 0.947 g (12.50 mmol) Imidazol in 10 ml abs. THF werden 1.31 ml einer 80 %igen Lösung von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in Hexan gegeben. Die Mischung wird 2 h gerührt, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und durch Zugabe von 1 M Salzsäure ein pH-Wert von 2 eingestellt. Anschließend wird die wäßrige Phase dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Hexan/Essigester = 3:1(v/v)).

farbloser Feststoff

Ausbeute: 0.587 g (1.22 mmol, 87 %)
R_F-Wert: 0.25 (Hexan/Essigester = 3:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 7.75 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Aromat), 7.60 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Aromat), 7.40 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Aromat), 7.30 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Aromat), 5.60 (d, ³J = 6.8 Hz, 1H, NH, Urethan), 4.50-4.44 (m, 1H, α -CH, Ser), 4.40 (d, ³J = 6.7 Hz, 2H, CH₂, Fmoc), 4.25 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H, CH, Fmoc), 4.18-4.11 (m, 1H, β -CH_{2a}, Ser), 3.88-3.82 (m, 1H, β -CH_{2b}, Ser), 0.90 (s, 9H, *tert*-Butyl, TBDMS), 0.08 (s, 6H, CH₃, TBDMS).

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-L-threonin (**36o**)

Eine Lösung von 1.000 g (3.10 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-threonin-monohydrat (**36m**) in 20 ml Methylenchlorid wird mit 0.200 g 4 A Molsieb versetzt und bei 0°C 1.60 ml

(13.60 mmol) 2,6-Lutidin sowie 1.70 ml (7.40 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyl-triflat zugegeben. Die Mischung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend je dreimal mit je 15 ml verdünnter Salzsäure (pH = 3) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Hexan/Essigester/Methanol = 6:2:1(v/v/v)).

farbloser Feststoff

Ausbeute: 0.720 g (1.58 mmol, 51 %)

R_f-Wert: 0.54 (Hexan/Essigester/Methanol = 6:2:1(v/v/v))

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 7.70 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Aromat), 7.52 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Aromat), 7.34 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, Aromat), 7.24 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, Aromat), 5.66 (br, 1H, NH, Urethan), 4.44-4.39 (m, 3H, α-CH, Thr, CH₂, Fmoc), 4.24 (t, ³J = 7.0 Hz, 1H, CH, Fmoc), 4.20-4.17 (m, 1H, β-CH, Thr), 1.16 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, CH₃, Thr), 0.83 (s, 9H, *tert*-Butyl, TBDMS), 0.07 (s, 6H, CH₃, TBDMS).

Festphasensynthese des farnesylierten K-Ras-Undecapeptides am Arylhydrazid-Linker

Ausgehend von 90 mg (38 μmol) polymergebundenem *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-farnesyl)-L-cystein (**96a**) wurde die C-terminale Undecapeptidsequenz des K-Ras-Proteins durch abwechselnde Fmoc-Entschützung und Peptidknüpfung aufgebaut.

Allgemeine Vorschrift zur Peptidknüpfung:

Zu einer Lösung von 3 Äq. *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-aminosäure (**36j**, **n**, **o**) in 2 ml DMF werden 3 Äq. DIC und 3.6 Äq. HOBt gegeben, die Mischung 10 min geschüttelt und mit 1.2 Äq. Triethylamin versetzt. Anschließend wird in dieser Lösung das N-terminal entschützte Polymer (1 Äq. bzgl. der vorangegangenen Fmoc-Entschützung) suspendiert und das Gemisch 3 h geschüttelt. Die flüssige Phase wird entfernt und das verbleibende Harz fünfmal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen. Danach wird das Harz im Vakuum getrocknet und die gesamte Anknüpfungssequenz wiederholt.

Abschließend wird das Polymer zweimal in einer Mischung von 2 ml Pyridin/Acetanhydrid = 10:1(v/v) jeweils 10 min geschüttelt und fünfmal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen.

Eingesetzte Aminosäure(n)	Polymermenge nach der Anknüpfung	UV-Bestimmung	Ausbeute	Erhaltenes festphasengebundenes Peptid
Fmoc-Lys(Aloc)-OH	96 mg	0.35 mmol/g	33 μ mol (88 %)	Fmoc-Lys(Aloc)-Cys(Far)-NHNH-Pol
Fmoc-Thr(TBS)-OH	101 mg	0.32 mmol/g	28 μ mol (84 %)	Fmoc-Thr(TBS)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-NHNH-Pol
Fmoc-Lys(Aloc)-OH Fmoc-Ser(TBS)-OH	110 mg	0.24 mmol/g	26 μ mol (93 %)	Fmoc-Ser(TBS)-Lys(Aloc)-Thr(TBS)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-NHNH-Pol
Fmoc-Lys(Aloc)-OH	115 mg	0.22 mmol/g	25 μ mol (96 %)	Fmoc-Lys(Aloc)-Ser(TBS)-Lys(Aloc)-Thr(TBS)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-NHNH-Pol
2x Fmoc-Lys(Aloc)-OH	123 mg	0.18 mmol/g	22 μ mol (86 %)	Fmoc-(Lys(Aloc)) ₃ -Ser(TBS)-Lys(Aloc)-Thr(TBS)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-NHNH-Pol
2x Fmoc-Lys(Aloc)-OH	130 mg	0.15 mmol/g	19 μ mol (88 %)	Fmoc-(Lys(Aloc)) ₅ -Ser(TBS)-Lys(Aloc)-Thr(TBS)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-NHNH-Pol
Fmoc-Lys(Aloc)-OH	133 mg	-	-	Fmoc-(Lys(Aloc)) ₆ -Ser(TBS)-Lys(Aloc)-Thr(TBS)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-NHNH-Pol

Abspaltung der *tert*-Butyldimethylsilyl-Seitenkettenschutzgruppen und der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe

In einer Mischung von 2 ml DMF/Piperidin = 4:1(v/v) werden 30 mg (95 μ mol) TBAF gelöst und 133 mg des polymergebundenen Undecapeptids (**97**) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die flüssige Phase abgetrennt und das Harz zunächst mit 2 ml

DMF/Piperidin = 4:1(v/v) und danach mit 1 ml DMF/Piperidin = 4:1(v/v) gewaschen. Der gesamte Vorgang wird wiederholt und das Polymer im Vakuum getrocknet.

Polymermenge nach Abspaltung: 126 mg
Belegung (UV-Bestimmung): 0.14 mmol/g
Ausbeute: 18 μ mol (95 %)

Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaprinsäure (46a)

Der allgemeinen Vorschrift für die Peptidkupplung nach der Carboddiimid-Methode folgend werden 16 mg (54 μ mol) *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaprinsäure (**46a**) an das N-terminal freie polymergebundene Undecapeptid geknüpft.

Polymermenge nach Anknüpfung: 130 mg

Abspaltung der Aloc-Seitenkettenschutzgruppen

In einer Lösung von 30 μ l (288 μ mol) Phenylsilan und 7 mg (7 μ mol) Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium(0) in 2 ml DMF werden 130 mg des polymergebundenen fluoreszenzmarkierten Undecapeptids (**98**) suspendiert und 1 h geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 1 h geschüttelt, die flüssige Phase entfernt, das verbleibende Polymer fünfmal mit je 2 ml DMF sowie dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

Polymermenge nach Abspaltung: 120 mg

6.5.3. Versuche zu Kapitel 4.4.4.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-L-threonin (**36p**)^[135]**

Zu einer Lösung von 0.500 g (1.39 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-threonin-monohydrat (**36m**) und 0.947 g (12.50 mmol) Imidazol in 5 ml DMF werden 1.78 ml (6.95 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid gegeben. Die Mischung wird 18 h gerührt, das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt und durch Zugabe von 1 M Salzsäure ein pH-Wert von 2 eingestellt. Anschließend wird die wäßrige Phase dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Hexan/Essigester/Methanol = 6:2:1(v/v/v)).

farbloser Feststoff

Ausbeute: 0.282 g (0.49 mmol, 35 %)

R_F-Wert: 0.30 (Hexan/Essigester/Methanol = 6:2:1(v/v/v))

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 7.73 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Aromat), 7.69-7.60 (m, 6H, Aromat), 7.45-7.28 (m, 10H, Aromat), 5.63 (br, 1H, NH, Urethan), 4.51-4.40 (m, 3H, α-CH, Thr, CH₂, Fmoc), 4.37-4.30 (m, 1H, β-CH, Thr), 4.24 (t, ³J = 7.0 Hz, 1H, CH, Fmoc), 2.05 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, CH₃, Thr), 1.02 (s, 9H, *tert*-Butyl, TBDMS).

Synthese des polymergebundenen Tripeptids Fmoc-Thr(TBS)-Lys(Aloc)-Cys(Trt)-NHNH-Pol (**94b**)

Der allgemeinen Vorschrift für die Peptidknüpfung nach der Carbodiiimid-Methode folgend werden 130 mg (55 μmol) polymergebundenes *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**94a**) durch abwechselnde Fmoc-Entschützung und Kupplung zum polymergebundenen *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-L-threonyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-L-lysyl-(*S*-trityl)-L-cystein (**94b**) verlängert.

Polymermenge nach Anknüpfung: 152 mg

Belegung (UV-Bestimmung): 0.26 mmol/g

Ausbeute: 40 μmol (73 %)

Freisetzung der Thiofunktion am polymergebundenen Tripeptid

In einer Lösung von 29 μl (200 μmol) Triethylsilan in 2 ml Methylenchlorid/Trifluoressigsäure = 1:1(v/v) werden 76 mg (20 μmol) polymergebundenes Tripeptid (**94b**) 30 min geschüttelt. Die flüssige Phase wird entfernt, das Harz fünfmal mit je 2 ml DMF

sowie dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen und das Polymer im Vakuum getrocknet.

Polymermenge nach Abspaltung: 71 mg

Farnesylierung am polymergebundenen Tripeptid

Unter Argon werden in einer Lösung von 17 μl (57 μmol) Farnesylbromid (**62**) und 12 mg (57 μmol) Zinkacetat in 3 ml DMF und 1 ml 0.025 %iger wäßriger Trifluoressigsäure 71 mg (20 μmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-*L*-threonyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-*L*-cystein-beladenes Polystyrolharz (**95b**) suspendiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 3 h geschüttelt, die flüssige Phase entfernt, das verbleibende Polymer fünfmal mit je 2 ml DMF sowie dreimal mit je 2 ml Methylenchlorid gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

Polymermenge nach Anknüpfung: 75 mg

Abspaltung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-*L*-threonyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*S*-farnesyl)-*L*-cystein-methylester (**86d**)

In einer Lösung von 2 mg (10 mmol) Kupfer(II)-acetat und 9 μl (200 μmol) Pyridin in 2 ml THF/Methanol = 1:1(v/v) werden 75 mg polymergebundenen *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-*L*-threonyl-(*N*^ε-allyloxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*S*-farnesyl)-*L*-cystein (**96b**) unter ständigem Sauerstoffstrom 3 h geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert, dreimal mit je 3 ml THF/Methanol = 1:1(v/v) gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester = 1:1(v/v)) gereinigt.

farbloser Feststoff

Ausbeute: 7 mg (6 μmol , 31 % bzgl. UV-Bestimmung an (**94b**))

R_f-Wert: 0.75 (Hexan/Essigester = 1:1(v/v))

[α]_D²⁰: -52.0° (c = 0.2, CHCl₃)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

$\delta = 7.71$ (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Aromat), 7.62 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 4H, Aromat), 7.58 - 7.52 (m, 2H, Aromat), 7.42 - 7.32 (m, 8H, Aromat), 7.21 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, Aromat), 7.06 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, NH, Amid), 6.74 (d, $^3J = 5.1$ Hz, 1H, NH, Amid), 5.96 - 5.81 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, Allyl), 5.62 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, NH, Urethan), 5.29 - 5.04 (m, 5H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, Allyl, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}$, 2 $\text{C}=\text{CH}$, Far), 4.97 (br, 1H, NH, Urethan), 4.74 - 4.66 (m, 1H, α -CH, Cys), 4.54 - 4.51 (m, 4H, CH_2 -O, Allyl, α -CH, Lys, β -CH, Thr), 4.39 - 4.33 (m, 3H, CH_2 , Fmoc, α -CH, Thr), 4.21 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, CH, Fmoc), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.20 - 3.00 (m, 4H, α - CH_2 , Far, ϵ - CH_2 , Lys), 2.92 - 2.78 (m, 2H, β - CH_2 , Cys), 2.10 - 1.92 (m, 8H, CH_2 , Far), 1.80 - 1.70 (m, 2H, β - CH_2 , Lys), 1.68 (s, 3H, CH_3 , Far), 1.65 (s, 3H, CH_3 , Far), 1.60 (s, 6H, CH_3 , Far), 1.49 - 1.40 (m, 4H, δ - CH_2 , γ - CH_2 , Lys), 1.15 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3H, γ - CH_3 , Thr), 1.07 (s, 9H, *tert*-Butyl).

MALDI-MS (m/z): ber.: 1136.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1152.7 $[\text{M}+\text{K}]^+$
($\text{C}_{64}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_9\text{SiS}$) gef.: 1138.9, 1154.6 (in DHB-Matrix)

7. Literatur

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, VCH, Weinheim **1997**.
- [2] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim **1994**.
- [3] K. Hinterding, D. Alonso-Diaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 716-780; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 688-749.
- [4] F. Eisele, D. J. Owen, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 193-224.
- [5] R. J. A. Grand, *Biochem. J.* **1989**, *258*, 625-638.
- [6] M. F. G. Schmidt, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *988*, 411-426.
- [7] I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1981**, *289*, 366-373.
- [8] D. C. Wiley, J. J. Skehel, *Ann. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 365-394.
- [9] P. A. Mir-Bullough, F. M. Hughson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1994**, *371*, 37-43.
- [10] W. Keil, R. Geyer, J. Dabrowski, U. Dabrowski, H. Niemann, S. Stirm, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2711-2720.
- [11] S. Y. Mir-Shekar, D. A. Ashford, D. J. Harvey, R. A. Dwek, I. T. Schulze, *J. Biol. Chem* **1997**, *272*, 4027-4036.
- [12] B. Lambrecht, M. F. G. Schmidt, *FEBS Lett.* **1986**, *202*, 127-132.
- [13] E. Ponimaskin, M. F. G. Schmidt, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 565-568.
- [14] M. Veit, H. Reverey, M. F. G. Schmidt, *Biochem. J.* **1996**, *318*, 163-172.
- [15] M. Veit, B. Nürnberg, K. Spicher, C. Harteneck, E. Ponimaskin, G. Schulz, M. F. G. Schmidt, *FEBS Lett.* **1994**, *339*, 160-164.
- [16] S. Bonatti, G. Migliaccio, K. Simons, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 12590-12595.
- [17] A. Valencia, P. Chardin, A. Wittinghofer, C. Sander, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4637-4648.
- [18] M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1484*, 93-106.
- [19] R. R. Rando, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1300*, 5-16.
- [20] S. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 355-386.
- [21] G. Milligan, M. Parenti, A. I. Magee, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 181-186.
- [22] D. A. Towler, J. I. Gordon, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 69-99.
- [23] J. H. Jackson, J. Li, J. E. Buss, C. J. Der, C. G. Cochrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12730-12734.

- [24] D. Stokoe, S. G. McDonald, K. Cadwallader, M. Symons, J. F. Hancock, *Science* **1994**, *264*, 1463-1467.
- [25] M. Symons, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 178-181.
- [26] A. Hall, *Science* **1998**, *279*, 509-514.
- [27] R. G. Qiu, J. Chen, D. Kirn, F. McCormick, M. Symons, *Nature* **1995**, *374*, 457-459.
- [28] R. G. Qiu, J. Chen, F. McCormick, M. Symons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 11781-11785.
- [29] D. J. G. Mackay, A. Hall, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20685-20688.
- [30] M. S. Mondal, Z. Wang, A. M. Seeds, R. R. Rando, *Biochemistry* **2000**, *39*, 406-412.
- [31] N. H. Keep, M. Barnes, I. Barsukov, R. Badii, L.-Y. Lian, A. W. Segal, P. C. E. Moody, G. C. K. Roberts, *Structure* **1997**, *5*, 623-633.
- [32] Y. Q. Gosser, T. K. Nomanbhoy, B. Aghazadeh, D. Manor, C. Combs, R. A. Cerione, M. K. Rosen, *Nature* **1997**, *387*, 814-819.
- [33] G. Watanabe, Y. Saito, P. Madaule, T. Ishizaki, K. Fujisawa, N. Morii, H. Mukai, Y. Ono, A. Kakizuka, S. Narumiya, *Science* **1996**, *271*, 645-648.
- [34] M. Amano, H. Mukai, Y. Ono, K. Chihara, T. Matsui, Y. Hamajima, K. Okawa, A. Iwamatsu, K. Kaibuchi, *Science* **1996**, *271*, 648-650.
- [35] S. Quesnel, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13340-13348.
- [36] E. Yousefi-Salakdeh, J. Johansson, R. Strömberg, *Biochem. J.* **1999**, *343*, 557-562.
- [37] E. Nägele, M. Schelhaas, N. Kuder, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6889-6902.
- [38] M. Schelhaas, E. Nägele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1239-1252.
- [39] R. G. Hiskey, T. Mizoguchi, T. Inui, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1192-1195.
- [40] F. R. Naider, J. M. Becker, *Biopoly.* **1997**, *43*, 3-14.
- [41] M. J. Brown, P. D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3176-3177.
- [42] C.-B. Xue, J. M. Becker, F. Naider, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 1435-1438.
- [43] F. Ghomashchi, X. Zhang, L. Liu, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11910-11918.
- [44] M. H. Gelb, persönliche Mitteilung.
- [45] P. Stöber, M. Schelhaas, E. Nägele, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 75-83.
- [46] H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 911-937.
- [47] P. Braun, H. Waldmann, W. Vogt, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 165-170.

- [48] M. Schelhaas, S. Glomsda, M. Hänsler, H. D. Jakubke, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 82-85; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 106-109.
- [49] H. Kunz, M. Buchholz, *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 2145-2157.
- [50] D. Steinke, M.-R. Kula, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1204-1206; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *29*, 1139-1140.
- [51] D. Sebastian, A. Heuser, S. Schulze, H. Waldmann, *Synthesis* **1997**, 1098-1108.
- [52] J. Sander, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1337-1339; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 1250-1252.
- [53] S. Flohr, V. Jungmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 669-681.
- [54] A. Cotté, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 922-936.
- [55] H. Waldmann, E. Nägele, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2425-2428; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2259-2262.
- [56] T. Pohl, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6702-6710.
- [57] T. Pohl, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1829-1832; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1720-1723.
- [58] G. Le Corre, E. Guibé-Jampel, M. Wakselman, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3105-3112.
- [59] F. Eisele, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe **1996**.
- [60] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [61] E. Atherton, R. C. Sheppard, *Solid phase peptide synthesis*, IRL Press, Oxford **1989**.
- [62] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [63] M. Christiansen, M. Meldal, H. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1453-1460.
- [64] A. M. Jansson, K. J. Jensen, M. Meldal, J. Lomako, W. M. Lomako, C. E. Olsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1996**, 1001-1006.
- [65] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 3077-3080.
- [66] M. Meldal, F.-I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. C. Palcic, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1849-1850.
- [67] M. K. Christensen, M. Meldal, K. Bock, H. Cordes, S. Mouritsen, H. Elsner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 1299-1310.
- [68] H. Franzyk, M. K. Christensen, R. M. Jorgensen, M. Meldal, H. Cordes, S. Mouritsen, K. Bock, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 21-40.
- [69] G. Shapiro, D. Büchler, C. Dalvit, P. Frey, M. del Carmen Fernandez, B. Gomez-Lor, E. Pombo-Villar, U. Stauss, R. Swoboda, C. Warichel, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 147-156.
- [70] T. Wakamiya, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, *Chem. Lett.* **1994**, 1099-1102.

- [71] T. Wakamiya, T. Nishida, R. Togashi, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 465-468.
- [72] T. Wakamiya, R. Togashi, T. Nishida, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, S. Aimoto, K. Y. Kumagaye, K. Nakajima, K. Nagata, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 135-145.
- [73] M. Joseph, R. Nagaraj, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1025-1028.
- [74] M. Joseph, R. Nagaraj, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19439-19445.
- [75] I. W. James, *Tetrahedron* **1997**, *55*, 4855-4946.
- [76] J. Lenard, A. B. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 181-182.
- [77] R. B. Merrifield, *Biochemistry* **1964**, *3*, 1385-1390.
- [78] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 4005-4008.
- [79] S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [80] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 3787-3790.
- [81] J. R. Silvius, F. l'Heureux, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3014-3022.
- [82] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813-3822.
- [83] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102-13109.
- [84] J. R. Silvius, M. J. Zuckermann, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3153-3161.
- [85] H. Schroeder, R. Leventis, S. Shahinian, P. A. Walton, J. R. Silvius, *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 647-660.
- [86] H. Waldmann, M. Schelhaas, E. Nägele, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Schroeder, J. R. Silvius, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2334-2337; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2238-2241.
- [87] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223-226.
- [88] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 552-553.
- [89] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 602-615; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 569-582.
- [90] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [91] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2145-2147.
- [92] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1651-1652.
- [93] T. A. Savidge, M. Cole, *Methods Enzymol.* **1975**, *43*, 705-721.
- [94] T. A. Savidge, in *Biotechnology of Industrial Antibiotics* (Hrsg.: E. J. Vandamme), Marcel Dekker, New York **1984**.

- [95] H. Waldmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1175-1180.
- [96] K. Kuhn, Dissertation, Universität Karlsruhe **1999**.
- [97] G. Wenz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 851-870; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 803-822.
- [98] S. Friedrich-Bochnitschek, H. Waldmann, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 751-756.
- [99] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 2287-2290.
- [100] M. Jetten, A. M. Peters, J. W. F. M. v. Nispen, H. C. J. Ottenheijm, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 6025-6028.
- [101] A. Loffet, H. X. Zhang, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *42*, 346-351.
- [102] H. Kunz, J. Maerz, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1424-1425; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1375-1377.
- [103] R. B. Kelly, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 453-456.
- [104] G. H. Müller, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 3549-3552.
- [105] G. Müller, Dissertation, Universität Karlsruhe **1998**.
- [106] R. Homan, H. J. Pownall, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *938*, 155-163.
- [107] W. C. Wimley, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1296-1303.
- [108] J. C. McIntyre, R. G. Sleight, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11819-11827.
- [109] C. Balch, R. Morris, E. Brooks, R. G. Sleight, *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *70*, 205-212.
- [110] J. W. Nichols, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1720-1726.
- [111] L. J. Altman, L. Ash, S. Marson, *Synthesis* **1974**, 129-131.
- [112] R. M. Coates, D. A. Ley, P. L. Cavender, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4915-4922.
- [113] B. M. Trost, L. Weber, P. Strege, T. J. Fullerton, T. J. Dietsche, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3426-3435.
- [114] S. Bouzbouz, B. Kirschleger, *Synlett* **1994**, 763-764.
- [115] E. J. Corey, W.-C. Shieh, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 6435-6438.
- [116] S. Klinge, M. Demuth, *Synlett* **1993**, 783-784.
- [117] E. E. v. Tamelen, R. G. Nadeau, *Bioorg. Chem.* **1982**, *11*, 197-218.
- [118] K. Eis, H.-G. Schmalz, *Synthesis* **1996**, 202-206.
- [119] E. J. Corey, C. U. Kim, M. Takeda, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 4339-4342.
- [120] M. Schelhaas, Dissertation, Universität Karlsruhe **1997**.
- [121] A. Crivici, G. Lajoie, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 49-53.
- [122] R. Ledger, F. H. C. Stewart, *Aust. J. Chem.* **1965**, *18*, 933-935.
- [123] A. Gum, persönliche Mitteilung.
- [124] M. Thutewohl, persönliche Mitteilung.

- [125] H. B. Cottam, H. Shih, L. R. Tehrani, D. B. Wasson, D. A. Carson, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2-9.
- [126] M. Dessolin, M.-G. Guillerez, N. Thieriet, F. Guibé, A. Loffet, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 5741-5744.
- [127] J.-P. Genêt, E. Blart, M. Savignac, S. Lemeune, S. Lemaire-Audoire, J.-M. Bernard, *Synlett* **1993**, 680-682.
- [128] A. N. Semenov, K. Y. Gordeev, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 303-304.
- [129] C. R. Millington, R. Quarrell, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 7201-7204.
- [130] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C.-D. Chang, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1979**, *13*, 35-42.
- [131] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 2739-2742.
- [132] F. Stieber, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [133] B. Ludolph, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [134] P. M. Fischer, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 7605-7608.
- [135] J. S. Davies, C. L. Higginbotham, E. J. Tremeer, C. Brown, R. C. Treadgold, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 3043-3048.
- [136] G. R. Hoffman, N. Nassar, R. A. Cerione, *Cell* **2000**, *100*, 345-356.
- [137] D. D. Perrin, W. L. F. Armstrong, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford **1988**.
- [138] R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. M. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. Hu, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297-303.
- [139] S. Rio, J.-M. Beau, J.-C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **1991**, *219*, 71-90.

8. Abkürzungsverzeichnis

3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
abs.	absolut
AcOZ	Acetyloxybenzyloxycarbonyl
All	Allyl
Aloc	<i>N</i> -Allyloxycarbonyl
Äq.	Äquivalente
ber.	berechnet
Boc	<i>N-tert</i> -Butyloxycarbonyl
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIBAH	Di- <i>iso</i> -butylaluminiumhydrid
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMB	<i>N,N</i> -Dimethylbarbitursäure
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.C.	Enzyme Classification
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
EI-MS	Electron Impact-Massenspektrometrie
Essigester	Essigsäureethylester
FAB-MS	Fast Atom Bombardment-Massenspektrometrie
Far	Farnesyl
Fmoc	<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	Gefunden
GerGer	Geranylgeranyl
h	Stunde
HD	Hexadecyl
HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
konz.	konzentriert
M	Molarität
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie
Mant	<i>N</i> -Methylanthranyl
min	Minuten
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
Pal	Palmitoyl
PAOB	Phenylacetoxybenzyl
PhAcOZ	Phenylacetoxybenzyloxycarbonyl
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin
TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
quant.	quantitativ
R _f	Retentionsfaktor
SG	Schutzgruppe
Schmp.	Schmelzpunkt
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS oder TBS	<i>tert</i> -Butyl-dimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyl-diphenylsilyl
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
u	Units (Ein Unit ist die Menge Enzym, die ein μmol des natürlichen Substrats bei optimaler Temperatur und optimalem pH in einer Minute umsetzt.)
UV	Ultraviolett
v	Volumen
verd.	verdünnt

Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Waldmann für die interessante Themenstellung und für die Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Patrick Deck, Ines Heinemann, Norman Kuder, Rainer Machauer, Amos Mattes und Petra Stahl bedanke ich mich für die kompetente Durchsicht des Manuskripts. Mein besonderer Dank gilt Florian Münstermann und Oliver Seitz für nützliche Anregungen bezüglich der Experimente am polymeren Träger.

Ich danke der analytischen Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität Karlsruhe. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Röttele für seine stete Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. J. Kuhlmann vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund bedanke ich mich für die Unterstützung bei den biophysikalischen Experimenten.

Mein besonderer Dank gilt den Vertiefungspraktikanten Sebastian Dörr, Veit Wascholowski und Michael Fokkens für ihre engagierte Mitarbeit.

Der Hermann-Schlosser-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen.

Lebenslauf

Name: Frank Eisele
Geboren: am 20. Juni 1970 in Karlsruhe
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1976 – 07/1980 Besuch der Grundschule in Grötzingen
08/1980 – 04/1989 Besuch des Ludwig Marum Gymnasiums in Pfinztal-Berghausen
25.04.1989 Abitur (Note: 1.4)

Zivildienst:

03/1991 – 05/1992 Zivildienst in den Hagsfelder Behinderten-Werkstätten

Studium:

10/1989 – 08/1996 Studium der Chemie an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe
16.04.1993 Vordiplom (Note: sehr gut)
02/1996 – 08/1996 Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann:
„*para*-Phenylacetoxybenzyl-(PAOB-)ester als enzymatisch abspaltbare
Carboxylschutzgruppe in der Peptidsynthese“
28.08.1996 Diplom (Note: sehr gut)

Promotion:

10/1996 – 09/2000 Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an der
Universität Fridericiana zu Karlsruhe und der Universität Dortmund:
„Synthese lipidierter Peptidstrukturen viraler und zellulärer Proteine“
25.09.2000 Promotion zum Dr. rer. nat. (Note: sehr gut)

Dortmund, im September 2000