

Synthese und biologische Evaluierung von Stevastelinanaloga

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
Michael Manger
aus Sinzheim

- 1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht**

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.03

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. H. Waldmann am Institut für Organische Chemie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe in der Zeit von Januar 2000 bis April 2000 und am Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Zeit von Mai 2000 bis Juni 2003 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Allgemeiner Teil	5
2.1 Protein-Tyrosin-Phosphatasen	5
2.2 Katalysemechanismus der Protein-Tyrosin-Phosphatasen	6
2.3 Dual spezifische Phosphatasen	7
2.3.1 VHR	7
2.3.1.1 Struktur	7
2.3.1.2 VHR in der MAP-Kinase-Kaskade	8
2.3.2 Cdc25	10
2.4 Klassische Protein-Tyrosin-Phosphatasen	11
2.4.1 PTP1B	11
2.4.1.1 Struktur	11
2.4.1.2 PTP1B im Insulinsignalweg	11
2.4.2 <i>MtPTPA</i>	13
2.4.3 CD45	13
2.5 Inhibitoren dual spezifischer Phosphatasen insbesondere von VHR	14
2.6 Totalsynthese von Stevastelin C3	21
3. Ziel der Arbeit	23
4. Spezieller Teil	25
4.1 Grundlegende Betrachtungen	25
4.2 Darstellung der Bausteine in Lösung	26
4.2.1 Synthese der natürlichen Stearinsäure	43
4.2.2 Synthese der weiteren Säurebausteine	32
4.2.3 Synthese der natürlichen Peptidsequenz der Stevasteline	33
4.3 Darstellung offenkettiger Stevastelinderivate	34
4.3.1 Synthese in Lösung	34
4.3.2 Synthese an fester Phase	36
4.3.3 Harz und Linker	36
4.3.4 Synthese der Derivate	37
4.4 Durchführung der biologischen Assays: Teil I	41
4.4.1 <i>In vitro</i> Inhibitions-Assay	41
4.4.2 <i>In vitro</i> Inhibition und Strukturwirkungsbeziehung	43

4.5 Darstellung zyklischer Verbindungen	46
4.5.1 Zyklisierungsstudien	46
4.5.2 Synthesestrategie zur Darstellung zyklischer Stevastelinanaloga via Makrolaktamisierung	49
4.5.3 Synthese der zyklischen Stevastelinanaloga	51
4.6 Durchführung der biologischen Assays: Teil II	63
4.6.1 <i>In vitro</i> Inhibition und Strukturwirkungsbeziehung	63
4.7 Durchführung der biologischen Assays: Teil 3	65
4.7.1 <i>In vivo</i> Assay	65
4.7.2 Ergebnisse der <i>in vivo</i> Tests	66
5. Zusammenfassung	70
6. Ausblick	78
7. Experimenteller Teil	81
7.1 Allgemeines, Messgeräte und Hilfsmittel	81
7.2 Versuche zu Kapitel 4.2	84
7.2.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1	84
7.2.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2	92
7.2.3 Versuche zu Kapitel 4.2.3	93
7.3 Versuche zu Kapitel 4.3	98
7.3.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1	98
7.3.2 Versuche zu Kapitel 4.3.4	100
7.4 Versuche zu Kapitel 4.5	111
7.4.1 Versuche zu Kapitel 4.5.3	111
7.5 Versuche zu Kapitel 4.4, 4.6 und 4.7	134
8. Literatur	138

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

abs.	absolut
Ac	Acetyl
Äq	Äquivalent
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -Butyldicarboxylat
BOPCl	<i>N,N</i> -Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphorodiamidylchlorid
Cdc	Cell-division-cycle
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC	<i>N</i> -1-(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EI	electron impact (Elektroneneinfang)
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FAB	Fast Atom Bombardment
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
gem.	gemessen
h	Stunde
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)dimethylaminomethylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HOAt	Hydroxyazabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
Hz	Hertz
Lsg.	Lösung
M	molar

MAPK	mitogen aktivierte Protein-Kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	3-(4-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrum
<i>Mt</i> PTPA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein-Tyrosin-Phosphatase A
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazoliumbromid)
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
PBS	phosphate buffered saline
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PP1	Phospho-Protein-Phosphatase 1
PP2B	Protein-Phosphatase 2B
ppm	parts per million
PTPs	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
PyAOP	7-Aza-benzotriazol-1-yloxy-trispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-trispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
Smp	Schmelzpunkt
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tsFT210	temperature sensitive FT210
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

Seit vielen Jahrhunderten weiß man um den Nutzen einer Vielzahl von natürlichen Substanzen und Extrakten für die Heilung oder Schmerzlinderung bei Krankheiten. Schon im neunten Jahrhundert wurde in Persien Campher als Heilmittel eingesetzt. Die Germanen und Kelten nutzten Extrakte der Mistel, die eine ganze Reihe an Substanzen, wie die Flavonoide oder Visotoxin, enthalten. Allerdings wusste man nichts über die Wirkmechanismen der jeweiligen „Therapeutika“, oder über die Veränderungen bzw. der Fehlfunktionen im Organismus bei Krankheiten.

Um diese Vorgänge zu verstehen ist es notwendig die komplexen Abläufe auf molekularer Ebene im lebenden System zu erforschen. Aber schon in einer einfachen Bakterienzelle finden mehr als tausend verschiedene biochemische Reaktionen statt, die nebeneinander, hintereinandergeschaltet oder vernetzt ablaufen und deshalb einer ständigen Kontrolle und Regulation bedürfen.^[1] In Vielzellern sind diese Vorgänge noch weitaus komplexer. Die Zellen müssen nicht nur die intrazellulären Reaktionen aufeinander abstimmen, sie müssen auch ständig mit der Umwelt kommunizieren. Die interzelluläre Nachrichtenübermittlung umfasst in der Regel eine mehrfache Umwandlung eines Primärsignals und bedient sich sowohl elektrischer als auch chemischer Vorgänge. In der Zielzelle wird das Signal empfangen, in intrazellulären Signalketten weiterverarbeitet und letztlich in eine biochemische Antwort umgesetzt, die sich in Änderung von Enzymaktivitäten oder der Genexpression äußern kann. Wohl einer der wichtigsten Regelmechanismen der Signaltransduktion läuft über das Zusammenspiel von Protein-Serin/Threonin- bzw. Tyrosinkinase und deren Gegenspielern den Protein-Phosphatasen. Die Signalweiterleitung wird dabei durch Phosphorylierung (Kinasen) und Dephosphorylierung (Phosphatasen) von Proteinen geregelt.^[2]

Zahlreiche Krankheiten des Menschen, wie z. B. Krebs, sind mit Störungen solcher zellulärer Regulationsprozesse sowie der Signalverarbeitung verbunden.^[3] Entsprechend besteht ein großes wissenschaftliches Interesse daran, die Grundlagen der zellulären Signalverarbeitung zu verstehen und gezielt durch hochselektive Inhibitoren bzw. Aktivatoren in diese einzugreifen.

Einen großen Pool solcher Inhibitoren/Aktivatoren liefert uns die Natur selbst. Naturstoffe sind bereits durch die Evolution vorselektierte Substanzen die mit den entsprechenden Protein-Kinasen bzw. Phosphatasen interagieren können.^[4] Allerdings eignen sich diese selbst meist nur bedingt für therapeutische Zwecke. Einerseits ist die Bioverfügbarkeit oft zu

1. Einleitung

gering oder sie besitzen unerwünschte Begleiteigenschaften, wie z. B. hohe Toxizität. Ziel der modernen Wirkstoffforschung ist es daher ausgehend von solchen Leitstrukturen durch gezielte Optimierung einen Zugang zu potentiellen Therapeutika zu schaffen. Die Entwicklung hoch potenter Medikamente ist nur durch intensive interdisziplinäre Forschung zu erreichen.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Ein fundamentaler Mechanismus der Zellen, biologische Prozesse zu kontrollieren, verläuft über Protein-Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Es wird angenommen, dass ein Drittel der zellulären Proteine phosphoryliert vorliegt.^[5] Protein-Phosphatasen werden nach ihrer Substratspezifität in zwei Hauptklassen eingeteilt: Die Protein-Serin/Threonin- (Protein Ser/Thr Phosphatasen) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs). Erstere hydrolysieren Phosphorylgruppen an Serin/Threonin-Resten, während PTPs die Phosphorylgruppe an Tyrosinresten spaltet. Lange Zeit fand jedoch die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung nur sehr wenig Beachtung, da hauptsächlich Protein-Phosphorylierung in eukaryontischen Zellen an Serin- oder Threoninresten beobachtet wird und nur ein sehr geringer Anteil zwischen 0.01-0.05 % bei Tyrosinresten.^[6] Erst in den 80er Jahren stieg das Interesse der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung als man herausfand, dass gerade dieser Vorgang bei der Regulation einer ganzen Reihe an Zellfunktionen, wie Zellzyklus, Proliferation und Differenzierung, Metabolismus, neuronale Entwicklung, Zell-Zell-Interaktion, Zellmigration, Immunantwort, sowie Gen-Transkription eine fundamentale Rolle spielt.^[7]

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der katalytischen Domänen von PTPs mit den katalytischen Einheiten der Protein-Ser/Thr-Phosphatasen ergab keinerlei Ähnlichkeit in der Sequenz, im Gegensatz zur Situation bei Protein-Kinasen, bei denen tyrosinspezifische- und serin-threoninspezifische-Kinasen eine hohe Sequenzidentität zeigen.^[8] Strukturell, aber auch im mechanistischen Ablauf, sind die Protein-Kinasen untereinander ähnlich. Obwohl Ser/Thr-Phosphatasen und PTPs die gleichen Reaktionen katalysieren - die Hydrolyse eines Phosphorsäuremonoesters - werden komplett verschiedene Strategien benutzt. Während bei Ser/Thr-Phosphatasen durch zwei Metallionen im katalytischen Zentrum zunächst der Phosphorsäuremonoester gebunden wird und anschließend ein überbrückendes, vermutlich deprotoniertes Wassermolekül den Phosphorsäuremonoester direkt angreift,^[9] verläuft die katalytische Spaltung des Phosphorsäuremonoesters bei den PTPs über ein kovalentes Phosphocystein-Intermediat (Kapitel 2.1).^[10] Obwohl viele PTPs aus mehr als 400 Aminosäuren aufgebaut sind, umfasst die katalytische Domäne im Regelfall einen Bereich um 250 Aminosäuren. Das katalytische Zentrum zeigt auch als einziges Strukturelement aller bekannten PTPs vom Bakterium bis zum Menschen eine hochkonservierte Sequenz.^[11] Das

einzigartige Merkmal, das alle PTPs definiert ist die Sequenz (H/V)C(X)₅R(S/T) im aktiven Zentrum.

Traditionell werden die PTPs in rezeptorähnliche und intrazelluläre Phosphatasen eingeteilt. Rezeptorähnliche PTPs wie beispielsweise CD45 besitzen im allgemeinen eine extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Region und eine oder sogar zwei zytoplasmatische PTP Domänen.^[12] Die Gesamtstruktur ähnelt sehr stark der Struktur von Transmembranrezeptoren. Ihre Funktion ist jedoch nur sehr unvollständig verstanden. Die intrazellulären Phosphatasen, denen auch PTP1B angehört,^[13] besitzen eine einzige katalytische Domäne und eine Reihe weiterer Strukturelemente, welche wahrscheinlich regulierende Funktionen besitzen. Das Protein-Tyrosin-Phosphatase-Motiv findet man weiterhin in zwei weiteren Phosphatasen, die VH1-ähnlichen dual spezifischen Phosphatasen (DSPs) und die niedermolekularen Phosphatasen.^[14] Beide Klassen sind ebenso in der Lage Phosphotyrosine zu hydrolysieren, zeigen jedoch eine geringe Identität der Aminosäuresequenz gegenüber den klassischen PTPs. Einzig und allein die konservierte relative Anordnung des Cysteins und des Arginins ist bei allen drei Klassen im aktiven Zentrum mit der bereits erwähnten Sequenz identisch.

2.2 Katalysemechanismus der Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Zunächst findet ein nukleophiler Angriff des hochkonservierten Cysteins **1** auf das elektrophile Phosphoratom unter Bildung eines Phosphorylcystein-Intermediats (**2**) statt (Abbildung 1). Der Asparaginsäurerest **3** katalysiert unter Abgabe des Protons den nukleophilen Angriff und gleichzeitig stabilisieren der Argininrest **4** und das positive Dipolende einer benachbarten α -Helix das geladene Phosphat durch elektrostatische Wechselwirkung. Im zweiten Schritt fungiert das Wassermolekül als Nukleophil, das nunmehr von dem zuvor gebildeten Carboxylanion **5** deprotoniert wird.

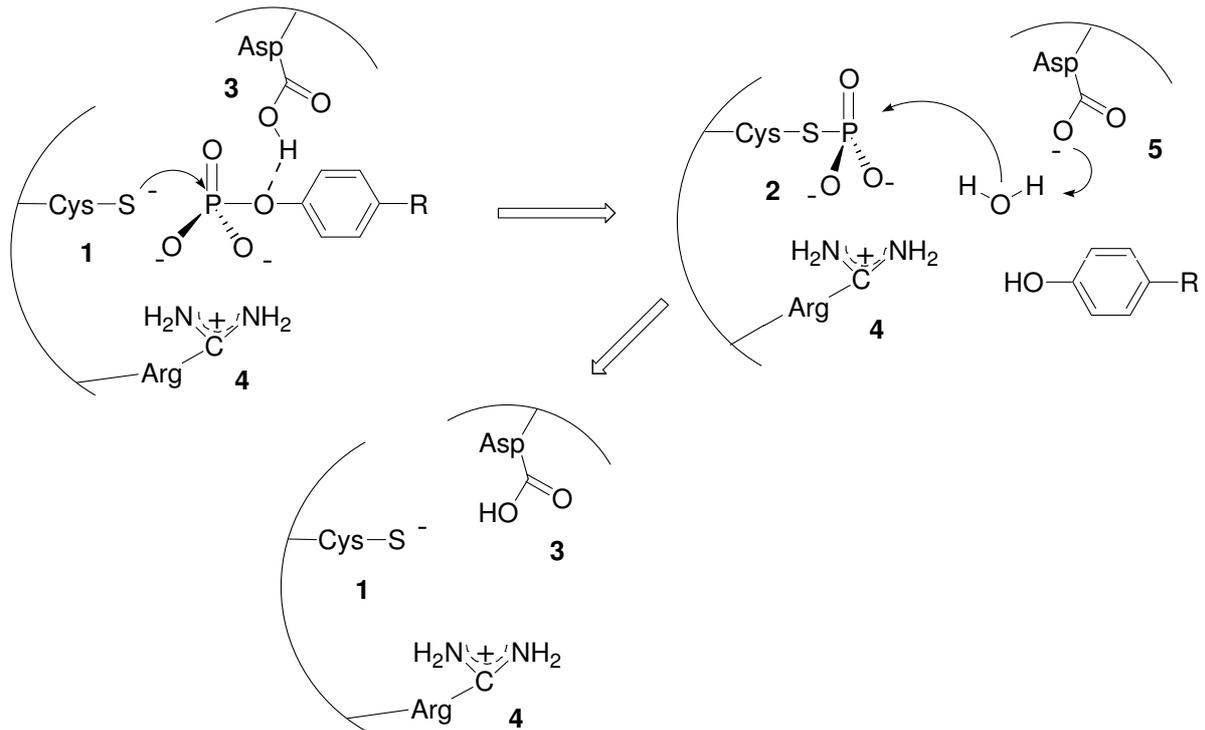


Abbildung 1: Katalysemechanismus der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

2.3 Dual spezifische Phosphatasen

2.3.1 VHR

2.3.1.1 Struktur

Die menschliche Phosphatase VHR (*Vaccinia virus H1-related*) gehört zur Klasse der dual spezifischen Protein-Tyrosin-Phosphatasen (DS-PTPs) und stellt zugleich mit nur 21 kDa eine der kleinsten bekannten Phosphatasen dar (Abbildung 2).^[15] Sie ist eng verwandt mit der ersten je identifizierten dual spezifischen Phosphatase VH1 die im *Vaccinia Virus* exprimiert wurde.^[14] VH1 spielt bei der viralen Transkription und Infektion eine wesentliche Rolle.^[16]

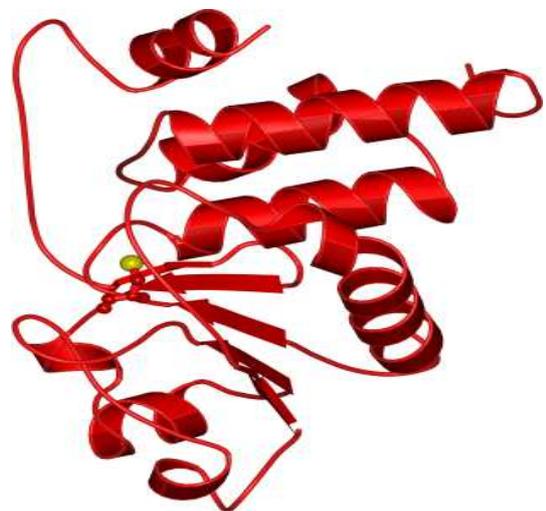


Abbildung 2: VHR

Beide Phosphatasen (VH1 und VHR) sind in der Lage, sowohl Phospho-Tyrosine, als auch Phospho-Serine/Threonine zu hydrolysieren. Man weiß aber bis heute nur sehr wenig über den katalytischen Mechanismus. Die als Monomer vorliegende Protein-Phosphatase VHR umfasst insgesamt 185 Aminosäuren, wobei Cystein¹²⁴ im aktiven Zentrum sowohl für Tyrosin - als auch für die Serin/Threonin-Aktivität notwendig ist.^[17] Dabei verläuft der Hydrolysemechanismus - wie schon in Kapitel 2.2 geschildert - über ein Thiol-Phosphat-Intermediat. Es ist anzumerken, dass die Phosphatase-Aktivität rekombinanter VHR, bei Phospho-Tyrosin-Substraten um ein Vielfaches höher ist als bei Serin/Threonin-Substraten. Kinetische Studien zeigten des weiteren, dass die Hydrolyse von Phospho-Threoninen gegenüber den Serinen schneller abläuft.^[18]

2.3.1.2 VHR in der MAP-Kinase-Kaskade (intrazelluläre Signalübertragung)

Schlüsselemente der intrazellulären Signalübertragung, die vom Ras-Protein oder anderen Mitgliedern der Ras-Superfamilie ausgeht, sind zytoplasmatische Proteinkinasen, die in Säugetieren aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen (zellteilungsfördernd) wirkende Liganden als mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) oder extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet werden.^[19] Zunächst werden extrazelluläre Signale über Rezeptor-Tyrosinkinasen registriert und an das Ras-Protein weitergegeben. Ras-GTP aktiviert Proteinkinasen die zur Gruppe der sogenannten MAPKKK (MAPK-Kinasen-Kinasen) gehören. Diese Kinasen sind Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen. Ein Vertreter dieser Gruppe, zum Beispiel die Raf-1-Kinase, phosphoryliert nun die nachgeschaltete MAPK-Kinase an zwei Serin-Resten, die durch drei andere Aminosäuren getrennt sind (Abbildung 3). Diese MAPKKs stellen eine besondere Klasse von Proteinkinasen dar, da sie eine zweifache Spezifität bezüglich der Natur der Akzeptoraminosäuren in der Phosphorylierungsstelle des Proteinsubstrats besitzen. Sie aktivieren die nachgeschalteten MAP-Kinasen über Phosphorylierung an einem Tyrosin- und einem Threonin-Rest. Diese Kinasen, auch als dual spezifische Proteinkinasen bezeichnet, unterscheiden sich damit deutlich von den anderen Proteinkinasen.

Die MAPK/ERK-Proteine stehen am unteren Ende der Signalübertragung der MAPK-Wege. Ihnen wird eine bedeutende Funktion für die Diversifizierung in den Signaltransduktionswegen zugeschrieben (Abbildung 3). Es gibt verschiedene MAP-Kinase Subtypen mit unterschiedlicher Substratspezifität. Die Substrate sind äußerst vielfältig und

umfassen häufig Transkriptionsfaktoren, durch deren Phosphorylierung es zur Aktivierung der Genexpression kommen kann.

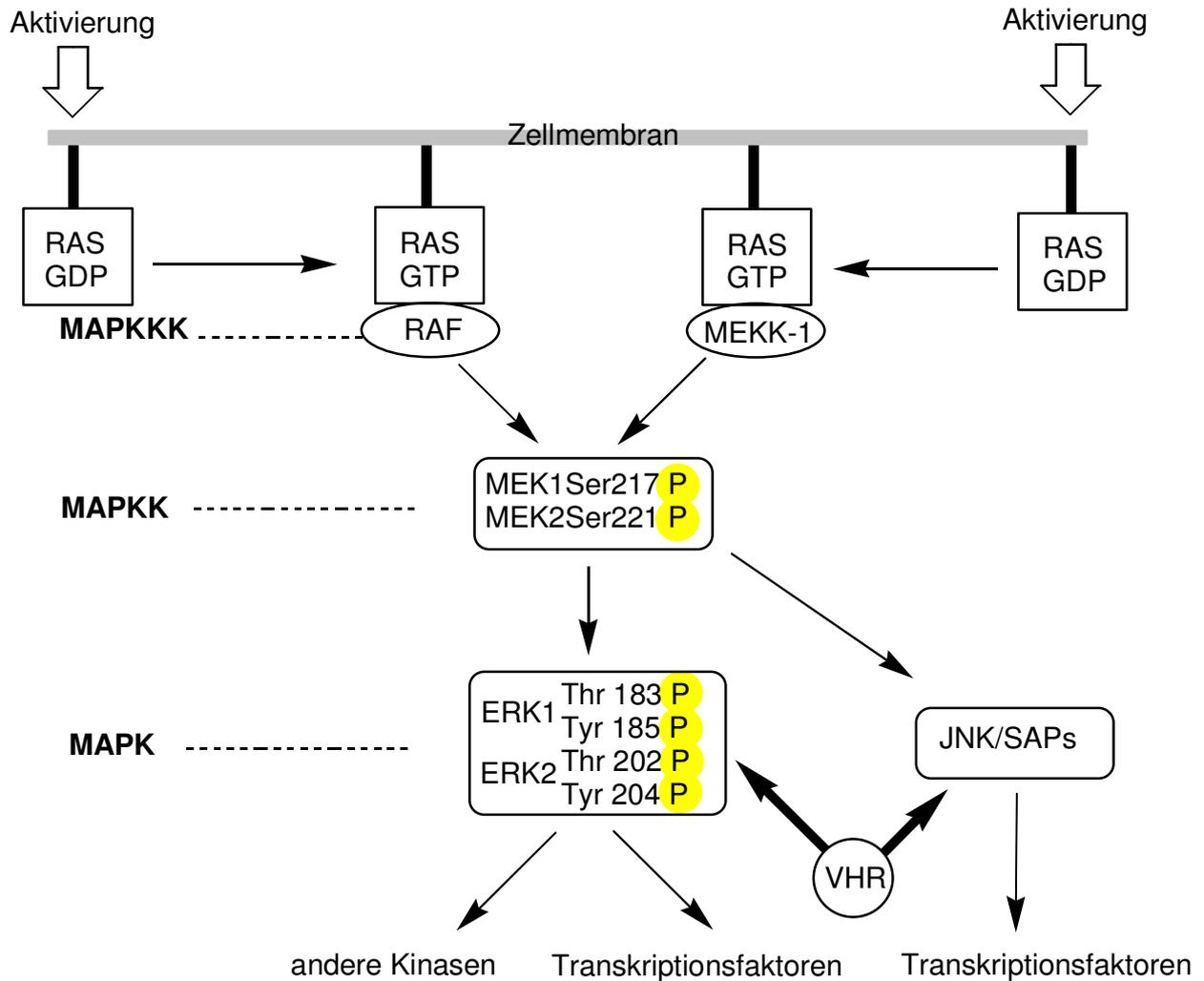


Abbildung 3: MAP-Kinase-Weg.

Anfangs ging man davon aus, dass VHR nur die beiden zur Klasse der MAPKs gehörenden extrazellulär regulierte Kinasen ERK1 und ERK2 dephosphoryliert und damit inaktiviert.^[20] Darauf folgende Untersuchungen belegten jedoch darüber hinaus, dass auch der JNK-Signalweg durch Dephosphorylierung der beiden Kinasen JNK1 und JNK2 heruntergeregelt wird (Abbildung 3).^[21, 22] Somit greift VHR an verschiedenen Positionen in den Signaltransduktionsweg der mitogen aktivierten Kinasen ein.

2.3.2 Cdc25

Die Klasse der Protein-Phosphatasen Cdc25 (Cell-division-cycle) wurde erstmals aus Hefe als 25stes Protein isoliert.^[23] Die drei menschlichen homologen (Cdc25A, Cdc25B und Cdc25C) sind strukturell in zwei Hauptdomänen geteilt: die Carboxyl-terminale Domäne, welche unter den drei Isoformen eine hohe Homologie aufweist und in der sich auch das katalytische Zentrum befindet, sowie die Amino-terminale Domäne die in ihrer Ausdehnung variiert.^[24, 25] Die Phosphatasen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus durch Dephosphorylierung inhibitorischer Phosphorylierungsstellen sogenannter Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdks), die hauptsächlich für das Voranschreiten des Zyklus zuständig sind (Abbildung 4).^[26] Die katalytische Einheit der Cdks ist allerdings erst im Komplex mit weiteren regulatorischen Untereinheiten den Cyclinen aktiv.^[27] Beispielsweise aktiviert die Phosphatase Cdc25a den Cdk2-Cyclin-Komplex durch Hydrolyse je eines Phospho-Threonin- und Phospho-Tyrosinrestes und reguliert somit den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus (Abbildung 4)^[28].

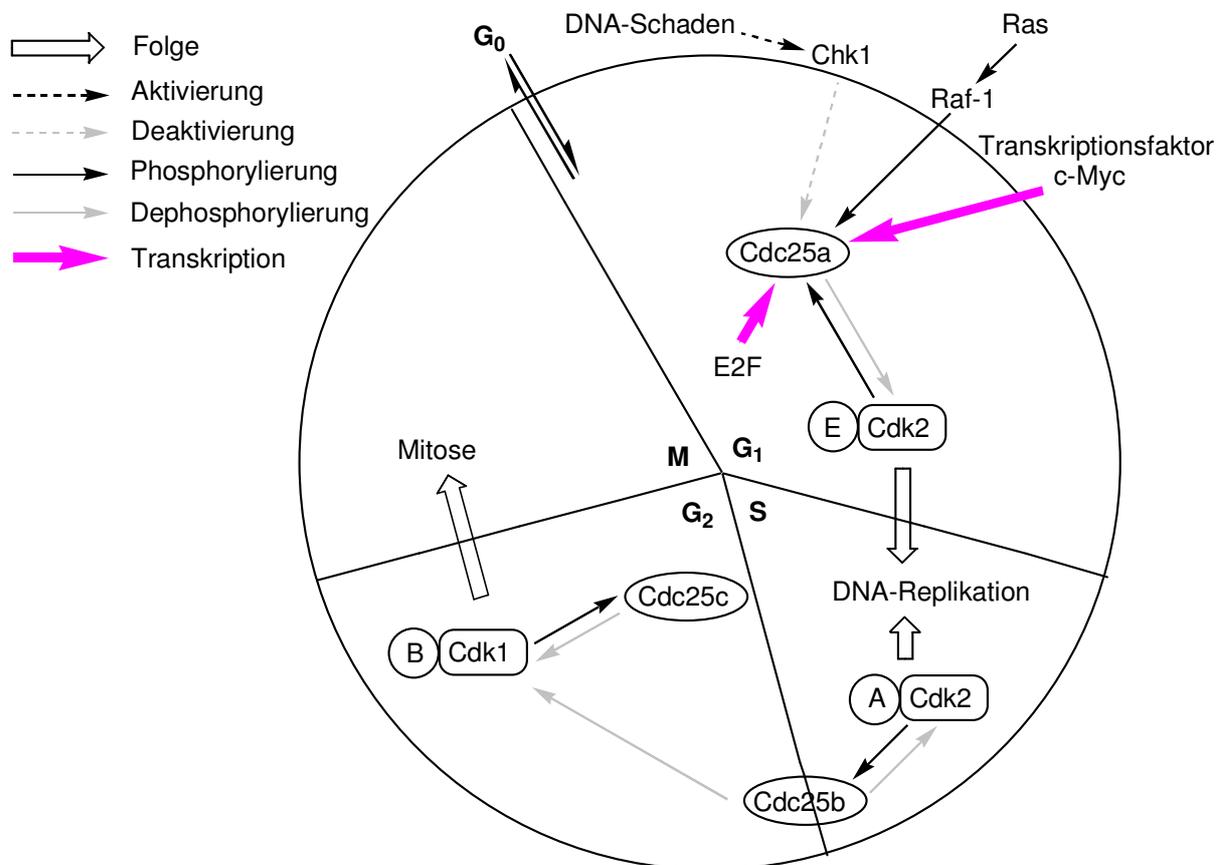


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Regulation des Zellzyklus.

Die Proteine der Cdc25 Familie (Cdc25A, Cdc25B) stehen allerdings unter Verdacht ein hohes onkogenes Potential zu besitzen.^[29, 30] So konnte bei verschiedenen menschlichen Krebsarten, wie beispielsweise in Nackenkarzinomen oder bei Brustkrebs, eine verstärkte Exprimierung von Cdc25A und Cdc25B nachgewiesen werden.^[31, 32]

2.4 Klassische Protein-Tyrosin-Phosphatasen

2.4.1 PTP1B

2.4.1.1 Struktur

Das natürliche Protein war die erste PTP, die aus menschlichem Gewebe der Plazenta isoliert worden ist und besteht aus insgesamt 435 Aminosäuren, von denen die Aminosäuren 30-278 die katalytische Domäne bilden.^[33] Das aktive Zentrum besitzt das allgemeine strukturelle Motiv der PTPs mit dem Nukleophil Cys²¹⁵. Die Grundstruktur des aktiven Zentrums ist durch einen rigiden Loop aus 8 Aminosäuren (His-Cys-Ser-Ala-Gly-Ile-Arg) aufgebaut.^[34, 35] Im Vergleich zu den dual spezifischen Phosphatasen, ist die katalytische Tasche der PTP1B mit 8-9 Å tiefer. Die ist einer der Gründe für die unterschiedliche Substratspezifität.^[36] Die Ausdehnung von Serin/Threonin-Resten sind nicht groß genug, um das Cystein²¹⁵ (Nukleophil) zu erreichen.

Die biologische Funktion von PTP1B wurde bereits intensiv erforscht, da man erkannte, dass die Phosphatase im direkten Zusammenhang mit Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) und Fettleibigkeit steht. Der Anstieg von Fettleibigkeit und T2DM wurde anfangs hauptsächlich bei Erwachsenen, einhergehend mit dem heutigen Lebensstil (vor allem Bewegungsmangel und einseitige Ernährung) beobachtet, tritt jedoch heute auch zunehmend schon im Kindesalter auf.^[37, 38] Die Insulinresistenz steht in direkter Verbindung zu Fettsucht und T2DM.^[39]

2.4.1.2 PTP1B im Insulin-Signalweg

Die metabolische Insulin-Signal-Kaskade wird über die Aktivierung des Insulinrezeptors (IR), durch Autophosphorylierung des Tyrosinrestes der Insulin-Rezeptor-Kinase (IRK),

2. Allgemeiner Teil

ausgelöst.^[40] Dies führt über die Rekrutierung des Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) Proteins und anschließender Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zur Bindung der p85 Untereinheit sowie der Aktivierung der katalytischen p110 Untereinheit. PI3K induziert nun im Folgenden weitere Kinasen, wie z. B. die Phosphatidylinositol abhängige Kinase 1 (PDK1) und die Protein-Kinase B (PKB) (Abbildung 5). Dadurch kommt es zur Freisetzung des Glucose-Transporters 4 (Glut4), zur Aufnahme von Glucose in den Muskel und Inaktivierung der Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3).^[41, 42] Die Aktivierung des Insulin-Rezeptors kann auch durch das c-Cbl assoziierte Protein (CAP) und die MAPK erfolgen. Dieser Prozess wird über die endoplasmatisch gebundene oder im Zytosol vorliegende PTP1B durch Dephosphorylierung der Insulinrezeptoren an der Membran negativ reguliert. Weitere Mechanismen, wie die Komplexbildung mit Wachstumsfaktor gebundenem Protein 2 (GRB2), kann die IRK-Aktivität herabsetzen und somit den Prozess ebenfalls deaktivieren. Eine ganze Reihe weiterer Protein-Phosphatasen sind bei der Modulation der Insulin-Signal-Kaskade involviert,^[43] allerdings deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass PTP1B der Hauptregulator der Insulinrezeptoraktivität ist.

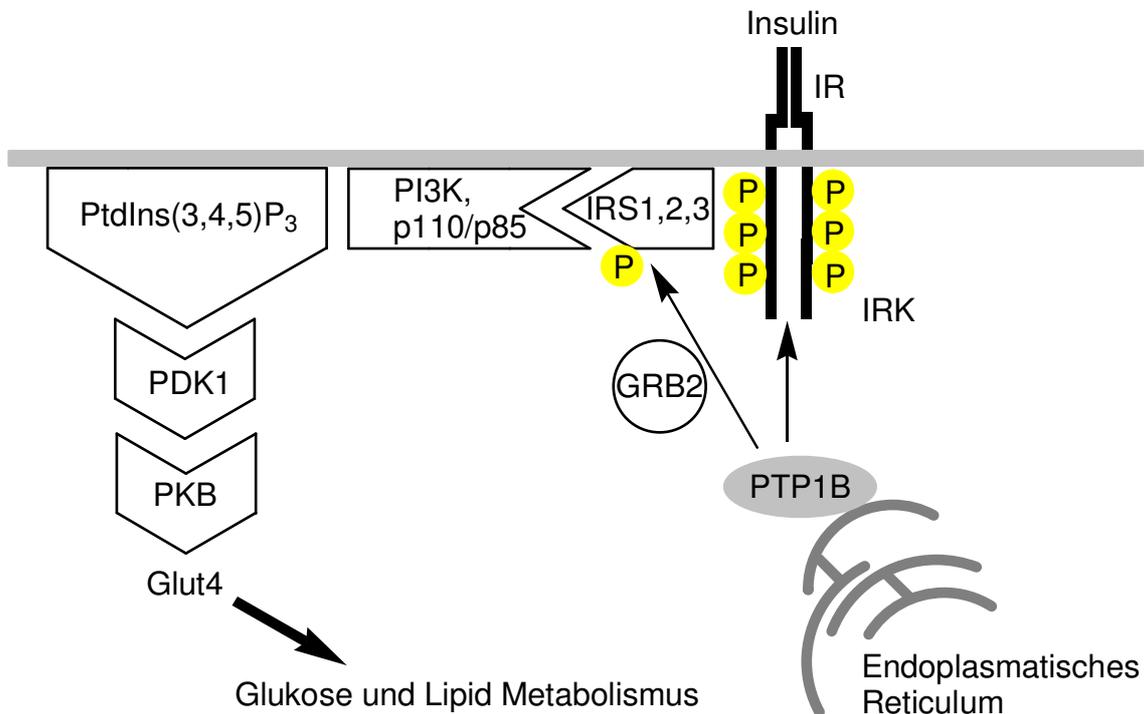


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Insulin-Signal-Kaskade.

2.4.2 *Mt*PTPA

Lange Zeit vermutete man, dass Protein-Tyrosin-Phosphatasen nur in Eukaryonten vorkommen. In den letzten Jahren wurde jedoch entdeckt, dass PTPs auch in verschiedenen Bakterienstämmen auftreten.^[44] Besonders interessant hierbei, Phosphatasen aus pathogenen Mikroorganismen, wie den Tuberkulose-Bakterien. Es wird angenommen, dass diese Enzyme eine wichtige Rolle bei der Störung der phospho-tyrosin-vermittelten Signalleitung des körpereigenen Abwehrsystems des Wirts spielen. Weltweit sterben jährlich immer noch drei Millionen Menschen an dieser gefährlichen Infektionserkrankung.^[44] Die aus dem *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv isolierte PTPA besitzt eine Masse von 17.5 kDa und gehört zu den niedermolekularen Phosphatasen. Wie alle Tyrosin-Phosphatasen zeigt auch *Mt*PTPA, mit Cystein (Cys¹¹), die hochkonservierte Sequenz des katalytischen Zentrums. Durch Modifikation der Aminosäure Cys¹¹ (Substitution Cys¹¹ gegen Ser), verliert das Enzym seine Aktivität. Durch Natrium-orthovanadat wird ebenfalls die enzymatische Aktivität des Proteins inhibiert. Die biologischen Mechanismen und Funktionen der PTPA sind noch weitgehend unbekannt. Die höchste Konzentration des Proteins konnte im Zytosol nachgewiesen werden. Untersuchungen deuten darauf hin, dass *Mt*PTPA insbesondere bei der intrazellulären Infektion von Makrophagen exprimiert wird.

2.4.3 CD45

Als weiterer Stellvertreter der großen Familie der PTPs soll hier noch das Protein CD45 aufgrund seiner interessanten biologischen Eigenschaften Erwähnung finden.

Die Transmembran-Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 wird in allen Zellen des hämopoetischen Systems exprimiert und ist eine der am meisten vertretenen Glycoproteine an der Oberfläche von Lymphzellen.^[45] Es ist bekannt, dass CD45 als positiver Regulator der Signaltransduktion in T und B Zellen agiert. Infolgedessen konnte man bei Mäusen mit fehlerhafter Expression des Proteins CD45 eine Beeinträchtigung der T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung, aber auch eine anormale B-Zell-Aktivierung beobachten.^[46] Man konnte beweisen, dass in T-Lymphozyten mit CD45-Defizienz die Protein-Tyrosin-Kinase p56^{lck} hyperphosphoryliert vorliegt und die TCR-vermittelten Signalvorgänge geändert sind. Durch spezifische Hemmung der Phosphataseaktivität könnte man einen neuen Zugang zu Behandlungsmöglichkeiten verschiedener Autoimmunerkrankungen schaffen.^[47]

2.5 Inhibitoren dual spezifischer Phosphatasen insbesondere von VHR

Bis Mitte der 90er Jahre war der PTP-Inhibitor Natriumorthovanadat die einzige bekannte Verbindung die dual spezifische Phosphatasen inhibiert. Erst in den letzten Jahren identifizierte man aufgrund intensiver Forschung auf diesem Gebiet verschiedene Naturstoffe und deren Derivate, sowie synthetische Moleküle, die in der Lage sind, mehr oder weniger selektiv Cdc25 bzw. VHR zu inhibieren.

So wurde beispielsweise der aus *Streptomyces sp.* 88-682 isolierte Naturstoff Hexadecanoyl-5-hydroxymethyltetronsäure (RK-682, **6**) bei Screenings als potenter nicht-kompetitiver Inhibitor der DSP VHR mit einem IC_{50} -Wert von $2.0 \mu\text{M}$ identifiziert (Abbildung 6).^[48] Gleichzeitig hemmt der Naturstoff den Zellzyklus von Säugetieren am G_1 Checkpoint. Die inhibitorische Wirkung beruht auf der Bildung einer kovalenten Tetronsäure-Enzym-Modifikation, die durch eine 1,4-Michael-Addition gebildet wird. Durch Synthese einer kleineren Bibliothek verschiedener Analoga wurden weitere Verbindungen mit verbesserten IC_{50} -Werten identifiziert.^[49] Man fand heraus, dass die Stereochemie am C-5 Substituenten unerheblich für die Aktivität ist. Das synthetisierte Derivat **7** mit einer Phenyl-propenoyl-Seitenkette an C-3 zeigte allerdings keinerlei Inhibition, während Verbindung **8** mit einer langen ungesättigten Kohlenstoffkette zumindest Cdc25A und Cdc25B mit einem IC_{50} von $34 \mu\text{M}$ inhibiert. Dies ließ vermuten, dass der C-3 Substituent für die Enzymerkennung essentiell sein muss. Durch Acylierung von RK-682 (**6**) konnten die potentesten Analoga **9-12** erhalten werden. Verbindung **12** zeigte zusätzlich zu der starken Inhibition eine um den Faktor 30 höhere Selektivität bzgl. Cdc25B gegenüber VHR.^[50]

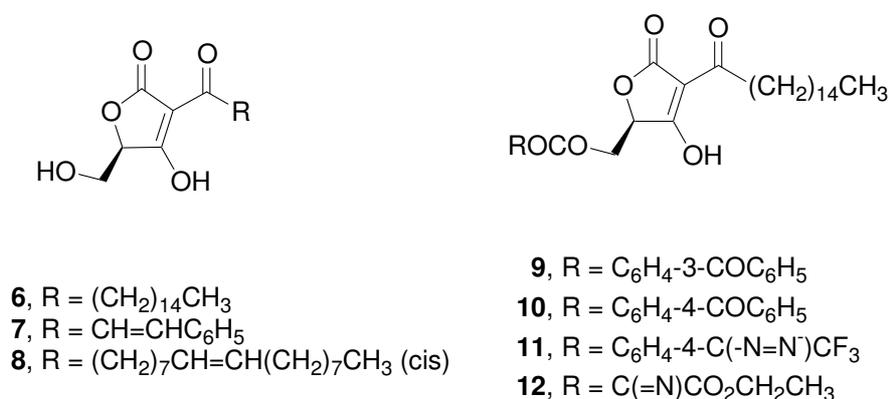


Abbildung 6: Hexadecanoyl-5-hydroxymethyltetronsäure (RK-682, **6**) und Analoga.

2. Allgemeiner Teil

Sulfircin (**13**) - ein bicyklisches, sulfatiertes Sesquiterpenoid - wurde aus einem Tiefseeschwamm der Gattung *Ircinia* isoliert und konnte als PTP1B-Inhibitor identifiziert werden (Abbildung 7).^[51] Des weiteren zeigte der marine Naturstoff auch Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich gegen die beiden DSPs Cdc25A und VHR.^[52] Durch die Synthese einer Reihe analoger Verbindungen sollte zum einen die Bedeutung des Grundgerüsts, des Alkylfurylrestes und zum anderen die des Sulfatrestes hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität analysiert werden. Die Länge der aliphatischen Kette spielt dabei offensichtlich eine bedeutende Rolle. Derivate mit der längsten Seitenkette waren equipotente oder sogar stärkere Inhibitoren als der Naturstoff **13** selbst. Die Sulfatgruppe erwies sich als äußerst wichtig für die Aktivität, wobei die Stereochemie dieser Gruppe keine signifikante Rolle spielt. Analogon **14**, bei dem die Sulfatgruppe gegen eine Malonatgruppe ersetzt wurde, zeigte vergleichbare IC_{50} -Werte wie Sulfircin (**13**). Die C-12 Methylgruppe oder die Substitution des Furylrestes gegen einen Phenylring im Molekül, hatten keinen Einfluss auf die Aktivität. Allerdings muss das Sesquiterpenoidgrundgerüst selbst entscheidend zur Bindung an die Phosphatasen beitragen. Als man das Grundgerüst gegen ein Benzimidazol (**15**), Benzothiazol- (**16**) oder ein Naphtylringssystem (**17**) ersetzte, konnte keinerlei Aktivität mehr gemessen werden (Abbildung 7).^[52]

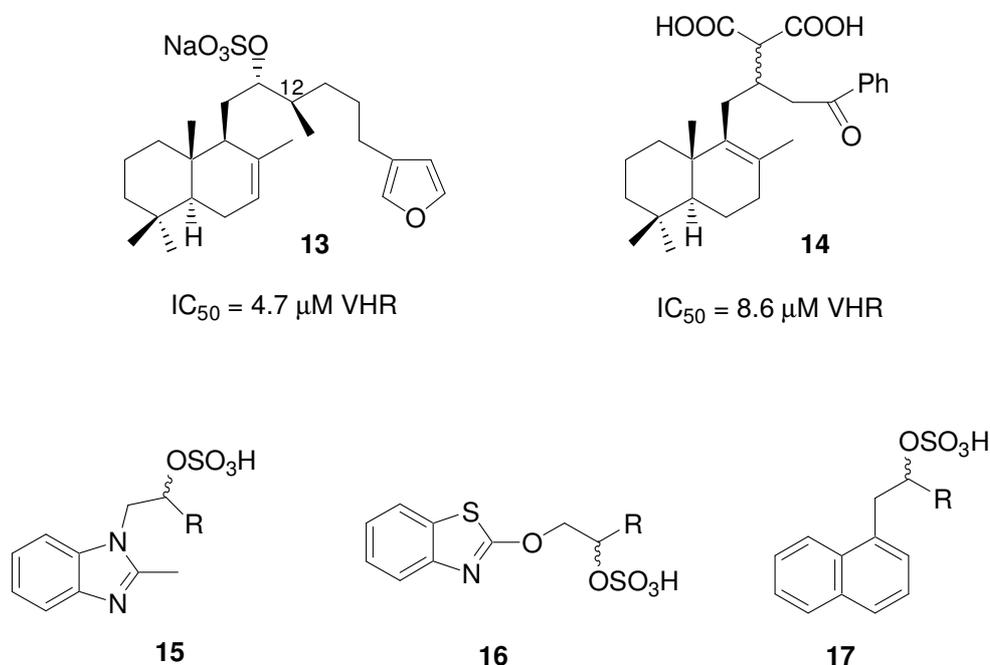


Abbildung 7: Sulfircin (**13**) und verschiedene Analoga.

2. Allgemeiner Teil

Der Nutzen von Sulfat- oder auch Phosphatsurrogaten bei der Synthese potentiell aktiver Substanzen ist schon lange bekannt und bereits im vorstehend geschilderten Beispiel des Sulfireinderivates **14** eindrucksvoll demonstriert worden. Durch das Mimetikum wird der für die Aktivität essentielle Substituent nachgeahmt und gleichzeitig die Stabilität der Substanz oder der einzelnen Gruppe gegenüber verschiedenen Einflüssen (z.B. gegen Enzyme) erhöht. So sind auch eine Reihe synthetischer Dipeptid-Mimetika bekannt, die Phosphatsurrogate im Molekül aufweisen und Cdc25A sowie VHR inhibieren.^[53] Die Phosphatsurrogate binden direkt im aktiven Zentrum des Enzyms und verankern das Molekül, während die verbleibenden Strukturelemente, wie das Grundgerüst und die verschiedenen Seitenketten, mit der Bindungstasche interagieren können. So nutzte man etablierte Phosphatmimetika in einer Vier-Komponenten Ugi-Reaktion, wobei die Surrogate am *N*-Terminus oder auch im Zentrum der Peptidkomponente positioniert wurden, um so eine möglichst hohe Variabilität zu erzeugen (Abbildung 8). Insgesamt umfasste die synthetisierte Substanzbibliothek 4320 Derivate, von denen sich insgesamt neun Vertreter als gute Inhibitoren mit IC₅₀-Werten von 0.7-35 µM gegen Cdc25A und 5.0-87 µM gegenüber VHR erwiesen.^[53] Die potentesten Inhibitoren (**18-22**) sind in Abbildung 8 dargestellt.

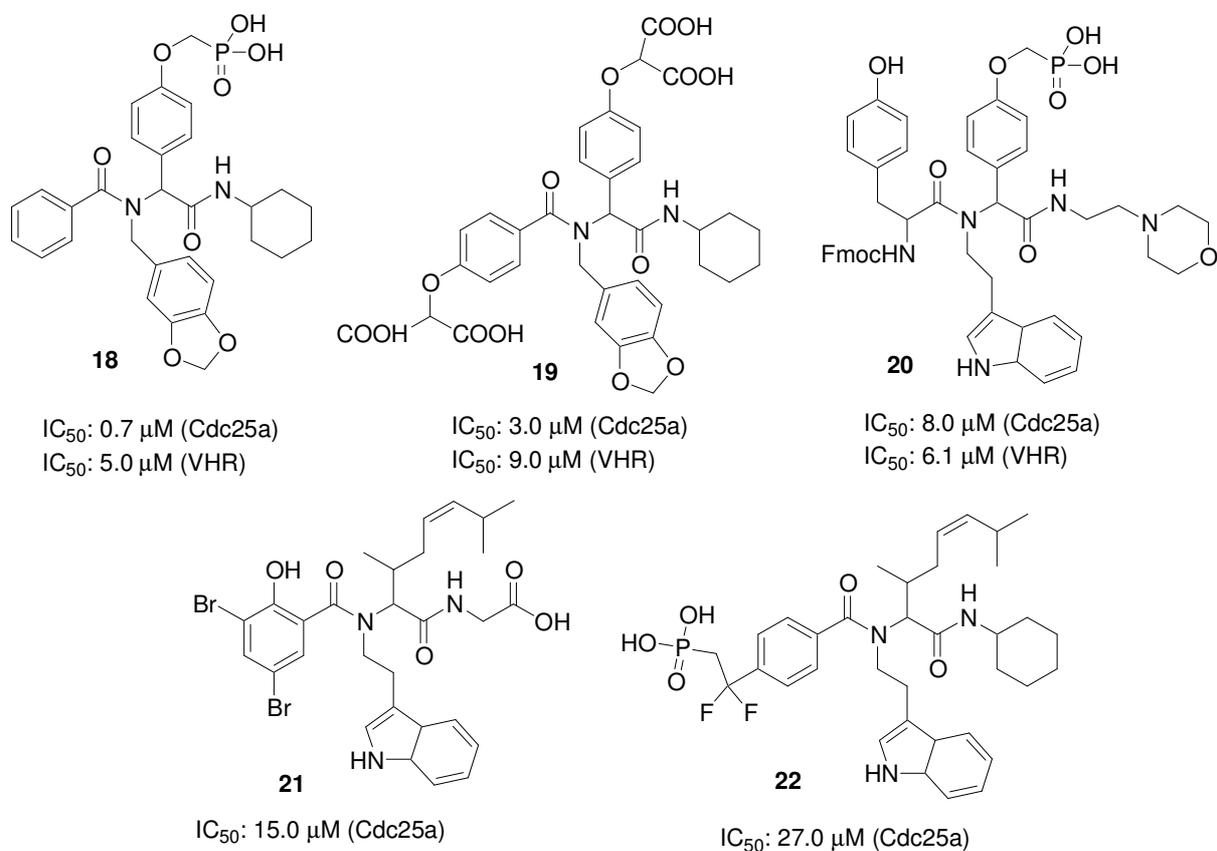


Abbildung 8: Synthetische Inhibitoren der Phosphatasen Cdc25a und VHR.

2. Allgemeiner Teil

Obwohl die Naturstoffklasse der Avenaciolide^[54] bereits in den 60er Jahren isoliert wurde und als Target für zahlreiche biologische Untersuchungen diente,^[55, 56] entdeckte man erst kürzlich, das auch das Stereoisomer 4-Isoavenaciolid (**23**) des mikrobiologischen Metaboliten dual spezifische Phosphatasen im einstelligen mikromolaren Bereich inhibiert (Abbildung 9). In mechanistischen Studien konnte wie bereits bei der erwähnten Hexadecanoyl-5-hydroxymethyltetronsäure (RK-682, **6**) (Abbildung 6) ebenfalls eine kovalente Bindungsknüpfung durch eine 1,4-Michael-Addition des Inhibitors an die VHR festgestellt werden. Es zeigte sich, dass 4-Isoavenaciolid (**23**) im katalytischen Zentrum an Cys¹²⁴ bindet, aber auch ein zweites Molekül kovalent mit einem weiteren Cysteinrest reagiert.^[57] Dabei wird das Cys¹⁷¹ an der Oberfläche des Proteins (α 6-Helix) gegenüber zwei weiteren Cysteinresten der Phosphatase (Cys²² oder Cys³⁰) bevorzugt. Offensichtlich spielt die zum Cys¹⁷¹ benachbarte hydrophobe Tasche eine wichtige Rolle. Diese Beobachtung ist auch mit anderen Untersuchungen konsistent, bei denen 4-Isoavenaciolid-Derivate mit einer kurzen Alkylkette an der 4-Position geringere Aktivitäten aufwiesen.

Weiterhin inhibiert 4-Isoavenaciolid (**23**) eine Reihe weiterer Phosphatasen, wie PTP1B, CD45 und LAR,^[58] aber nicht die beiden Ser/Thr-Phosphatasen PP1 und PP2A.^[59]

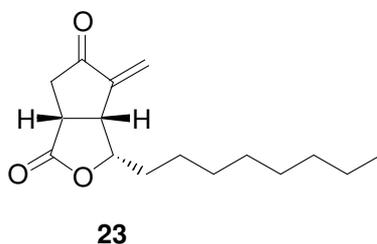
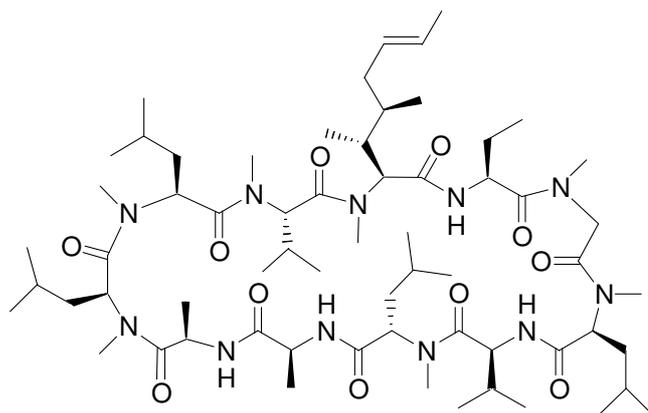


Abbildung 9: 4-Isoavenaciolid (**23**)

Immer wieder finden sich bei Phosphatase-Screenings auch Zyklopeptide oder strukturverwandte Makrolide, die als starke Inhibitoren fungieren.^[60] Einer der prominentesten Vertreter dieser Klasse ist wohl Cyclosporin A (**24**), ein zyklisches wasserunlösliches Peptid. Der aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isolierte Naturstoff inhibiert die Ser/Thr-Phosphatase PP2B (Phosphoprotein-Phosphatase 2B) im niedrigen nanomolaren Bereich (Abbildung 10).^[61] Das ursprünglich auf fungizide Wirkung getestete Zyklopeptid avancierte aber aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung zum Mittel erster Wahl in der Transplantationsimmunologie.^[62]



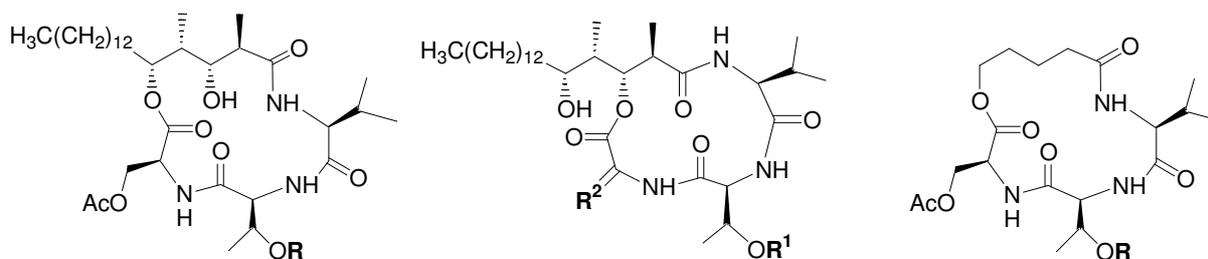
24

Abbildung 10: Cyclosporin A (24)

Ebenso besitzen die der Naturstofffamilie der Stevasteline angehörenden Makrozyklen eine Reihe biologisch hochinteressanter Eigenschaften, aber vor allem erwiesen sich einige Vertreter als potente und selektive Inhibitoren der DSP VHR.^[63]

Natürliche Stevasteline, die aus dem mikrobiologischen Metaboliten *Penicillium* sp. NK374186 isoliert wurden, sind aus den Aminosäuren Valin, Serin und Threonin sowie aus einer 3,5-Dihydroxy-2,4-dimethylstearinsäure-Einheit aufgebaut (Abbildung 11).^[64, 65]

Um den Struktur-Wirkmechanismus der Stevasteline aufzudecken, wurden zusätzlich zu den isolierten Substanzen weitere Derivate synthetisiert.



	R	R ₁	R ₂	R
25 B:	H	SO ₃ H	CH ₂ OCOCH ₃	34 H
26 A:	SO ₃ H	H	CH ₂ OCOCH ₃	35 SO ₃ H
27 P:	PO ₃ H	H	CH ₂ OH	
28 H:	COCH ₃	SO ₃ H	CH ₂	
		H	CH ₂	

Abbildung 11: Strukturen der Stevasteline.

2. Allgemeiner Teil

Die Stevasteline A (**26**), B (**25**), A3 (**29**), B3 (**30**), C3 (**31**), D3 (**32**) und E3 (**33**) konnten durch Fermentation von *Penicillium* sp. NK374186 gewonnen werden.^[66, 67] Stevastelin P (**27**) und H (**28**) wurden durch Phosphorylierung beziehungsweise Acylierung von Stevastelin B (**25**) dargestellt. Die Stevasteline **34** und **35** wurden in einer kurzen Synthesesequenz generiert.

Gegenüber den Ser/Thr-Phosphatasen PP1 und PP2A wurde keine Inhibition festgestellt. Nur ein Vertreter der Stevastelin-Familie konnte als schwacher Inhibitor der PTP CD45 identifiziert werden (Tabelle 1). Insbesondere zeichneten sich Derivate mit Sulfatgruppen bzw. Phosphatsubstituenten gegenüber VHR als potente Inhibitoren aus. Bei den synthetisierten Derivaten Stevastelin **34** und **35** konnte trotz der Phosphatgruppe am Threoninrest keinerlei Aktivität beobachtet werden, da offensichtlich die hydrophobe Alkylkette eine essentielle Rolle für die Inhibition des Proteins spielt (Tabelle 1).

Gruppe	Stevastelin	Aktivität [IC ₅₀ (µM)]		
		VHR	CD45	PP1/PP2A
Typ-A	A (26)	2.7	>1000	>1000
Potente	A3 (29)	3.6	>1000	>1000
Inhibitoren	D3 (32)	1.7	>1000	>1000
	P (27)	4.0	160	>1000
Typ-B	B (25)	19.8	>1000	>1000
Schwache	B3 (30)	13.7	>1000	>1000
Inhibitoren	C3 (31)	16.0	>1000	>1000
	E3 (33)	13.6	>1000	>1000
	H (28)	24.0	>1000	>1000
Inaktive	(34)	>1000	>1000	>1000
Inhibitoren	(35)	>1000	>1000	>1000

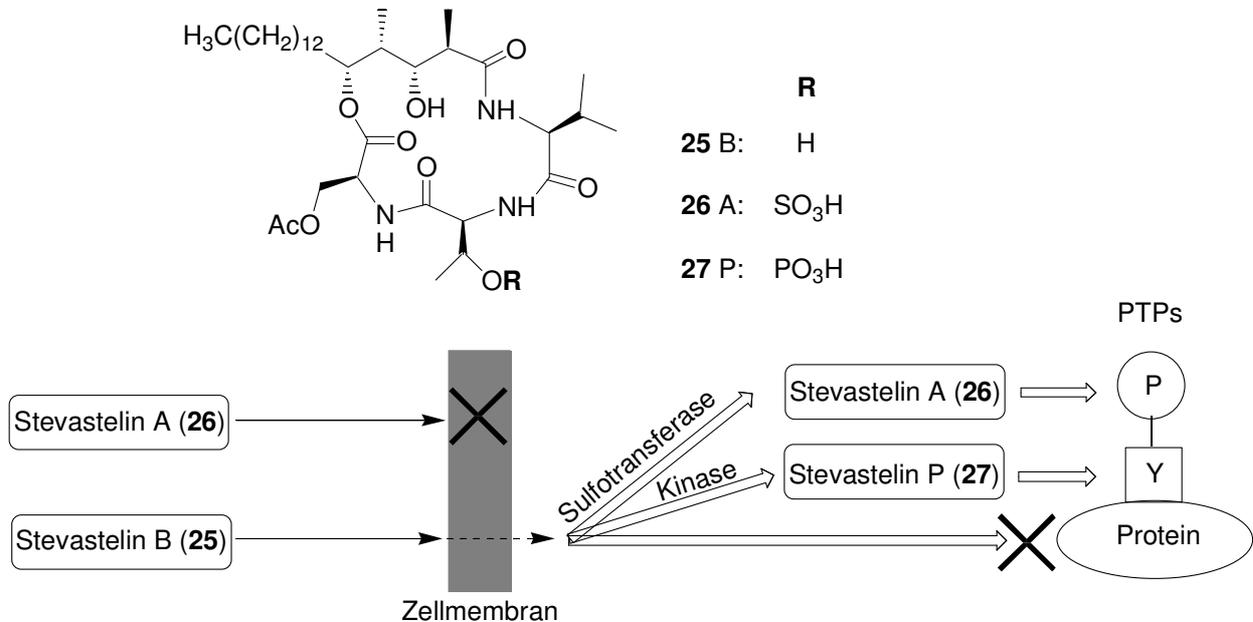
Tabelle 1 : Aktivität der Stevasteline gegen verschiedene Phosphatasen.

Außer der Phosphataseaktivität wurde auch die Gen-Expression in Jurkat Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass der B-Typ der Stevasteline [B (**25**), B3 (**30**), C3 (**31**) und E3 (**33**)] die

2. Allgemeiner Teil

Gen-Expression stärker inhibiert als der A-Typ [A (**26**), A3 (**29**) und D3 (**32**)]. Strukturell unterscheiden sich diese beiden Typen im wesentlichen durch den Rest R^1 der Threonineinheit. Ein Vergleich der beiden generierten Verbindungen Stevastelin P (**27**) und H (**28**) bezüglich der Aktivität ergab, dass die Phosphorylierung des Threoninrestes die Membranpermeabilität beeinträchtigt und es dadurch zum Verlust der Aktivität *in vivo* kommt.

In einem weiteren Experiment wurde die hemmende Wirkung der Stevasteline am Zellzyklus einer tsFT210 Zelle untersucht.^[63, 68] Hierbei konnten die zuvor gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden. Stevastelin A (**26**) hemmt VHR *in vitro*, jedoch nicht den Zellzyklus der tsFT210 Zelle, aufgrund der geringen Membranpermeabilität. Im Gegensatz dazu hat Stevastelin B (**25**) *in vitro* zwar eine geringere Aktivität als Stevastelin A (**26**), allerdings wurde der Zellzyklus inhibiert. Aufgrund dieser Beobachtung vermutete man, dass Stevastelin B (**25**) nach Inkorporation in die Targetzelle zunächst durch Enzyme phosphoryliert beziehungsweise sulfatiert wird und eine Überführung in Stevastelin P (**27**) oder A (**26**) stattfindet (Abbildung 12). Diese Annahme ist auch mit dem beobachteten Aktivitätsverlust von Stevastelin H (**28**) gegenüber Stevastelin B (**25**) konsistent, da durch die Acylierung der Hydroxyfunktion des Threoninrestes die Überführung durch Zellenzyme in Stevastelin A oder P *in situ* beeinträchtigt ist.



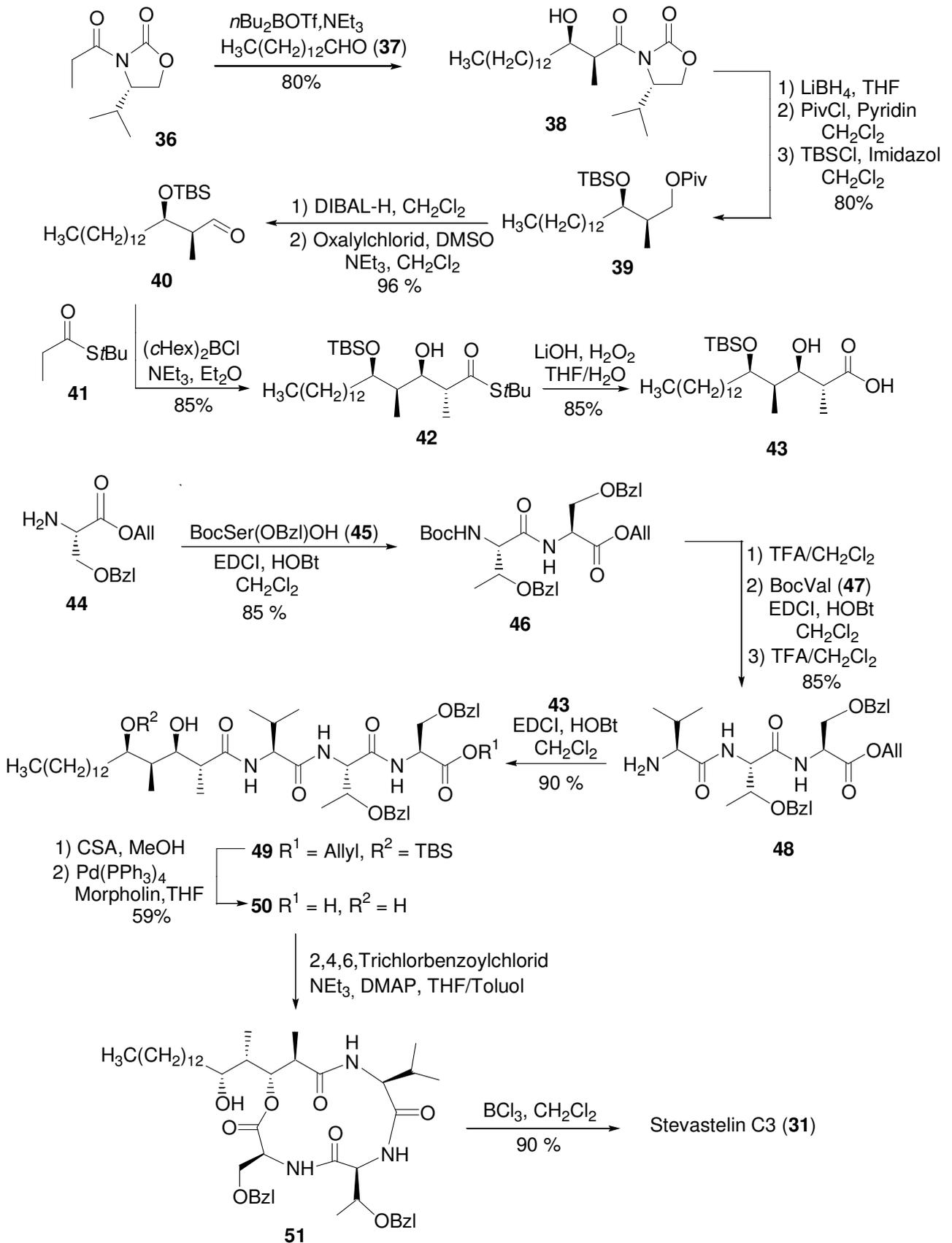
2.6 Totalsynthese von Stevastelin C3 (31)

Das Interesse an der Naturstoffklasse der Stevasteline zeigt sich nicht zuletzt auch an der Anzahl publizierter Totalsynthesen, die in den vergangenen Monaten erschienen sind.^[69, 70, 71] Im folgenden Kapitel soll die von Sarabia *et al.* publizierte Totalsynthese kurz skizziert werden.^[70]

Ausgehend von Myristinaldehyd (**37**), der aus kommerziell erhältlichem Myristinalkohol durch Oxidation erhalten wurde, konnte durch asymmetrische Aldolreaktion nach Evans das *syn*-Aldolprodukt **38** generiert werden.^[72] Die reduktive Abspaltung des Auxiliars mittels Lithiumborhydrid, sowie die selektive Schützung der primären und anschließend der sekundären Hydroxygruppe lieferte Verbindung **39** (Schema 1). In den nun folgenden Schritten wurde die primäre Hydroxyfunktion mit DIBAL-H in Dichlormethan wiederum freigesetzt und durch Oxidation in den TBS-geschützten Aldehyd **40** überführt. Die weitere Umsetzung von **40**, mit dem zuvor aus *tert*-Butylthiopropionat (**41**) dargestellten Bor-enolat,^[73] lieferte den Thioester **42** als einziges Diastereomer. Durch Behandlung des Esters **42** mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Lithiumhydroxyd konnte schließlich die freie Säure **43** erhalten werden.

Die Synthese der Peptidsequenz erfolgte in Lösung.^[74] Zunächst wurde das Dipeptid **46** ausgehend von den beiden geschützten Aminosäuren **44** und **45** unter Standardbedingungen gekuppelt. Nach Spaltung der Boc-Schutzgruppe, Anknüpfung der Aminosäure **47** und erneute Freisetzung des *N*-Terminus, konnte das Tripeptid **48** erhalten werden. Die anschließende Kupplung der Fragmente **43** und **48** mittels EDCI/HOBt lieferte das Amid **49**. Der Zyklisierungsvorläufer **50** konnte daraufhin durch saure Hydrolyse der TBS-Gruppe sowie palladiumvermittelter Spaltung des Allylesters zugänglich gemacht werden.^[75] Interessanterweise wurde in der folgenden Makrolaktonisierung nach Yamaguchi^[76] nur der 13-gliedrige Makrozyklus **51** gebildet. Nach Abspaltung der benzylichen Schutzgruppen mittels Bortrichlorid konnte Stevastelin C3 (**31**) in 19 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 12 % erhalten werden (Schema 1).

2. Allgemeiner Teil

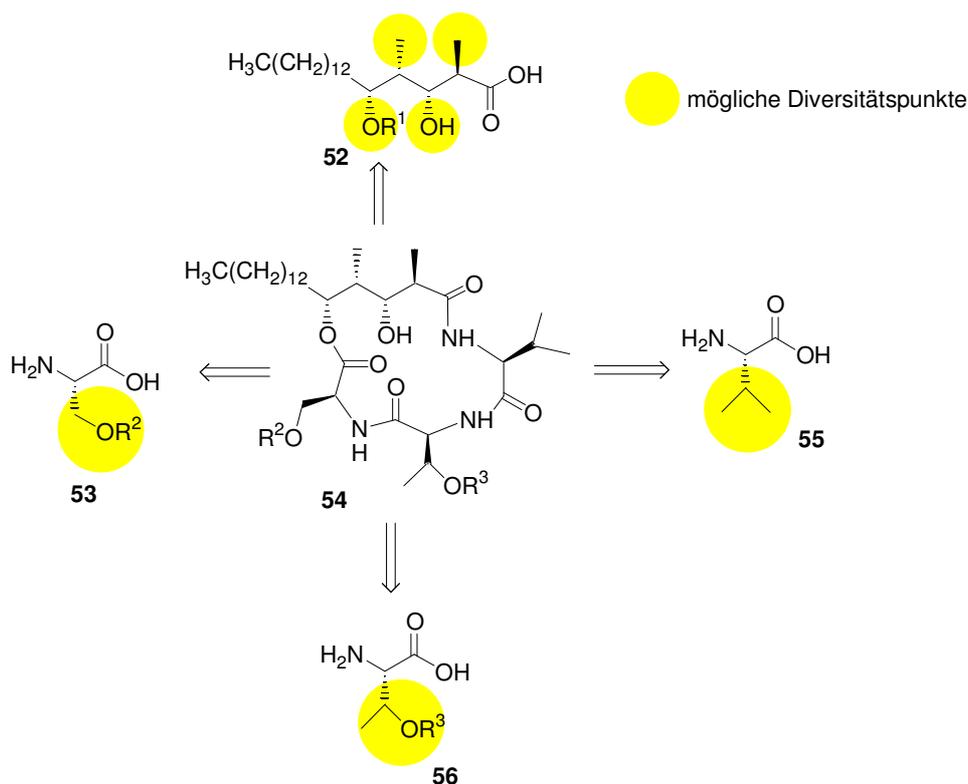


Schema 1: Totalsynthese von Stevastelin C3 (31) nach Sarabia *et al.*^[70]

3. Ziel der Arbeit

Die enorme Bedeutung von Protein-Kinasen und insbesondere von Protein-Phosphatasen bei der Signalverarbeitung und Signalweiterleitung im menschlichen Organismus wurde bereits in Kap. 2 ausführlich diskutiert. Die Aufklärung der biologischen Funktionen dieser Proteine auf molekularer Ebene und die therapeutische Regulierung dieser Prozesse durch selektive Aktivatoren bzw. Inhibitoren, ist eines der Hauptziele der Forschung.

In dieser Hinsicht könnten Analoga der Naturstofffamilie der Stevasteline, wovon einige Naturstoffe bereits als sehr potente Inhibitoren der dual spezifischen Phosphatase VHR identifiziert worden sind, sich als äußerst wertvoll erweisen. Durch den modularen Aufbau aus drei Aminosäuren und der lipophilen Fettsäure **52** bietet die Familie der Stevasteline, mit einer Reihe möglicher Diversitätspunkte, beste Voraussetzungen für eine Wirkstoffoptimierung (Schema 2). Eine der wichtigsten Ziele hierbei ist die Klärung der Frage, welchen Einfluss besitzen die einzelnen strukturellen Parameter für die Aktivität.



Schema 2: Modularer Aufbau der Stevasteline und mögliche Diversitätspunkte.

3. Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch Variation verschiedener Strukturparameter Stevastelinanaloga als potentielle Phosphataseinhibitoren dargestellt werden und deren Einfluss auf die Aktivität untersucht werden. Folgende Fragestellungen standen dabei im Vordergrund:

- Welche Rolle spielt die rigide Ringstruktur?
- Welchen Einfluss hat die Peptidsequenz auf die Aktivität?
- Hat die Stereochemie des Fettsäurefragmentes einen Einfluss auf die Aktivität?
- Werden alle Stereozentren benötigt?

Um gleichzeitig die Bedeutung der zyklischen Struktur und den Einfluss der Peptidsequenz zu klären, sollten zunächst azyklische Derivate generiert werden, deren Zugang mittels wohletablierten Reaktionen durch Knüpfung der einzelnen Amid- bzw. Esterbindungen sowohl in Lösung und auch am polymeren Träger effizient durchführbar ist. Zum direkten Vergleich mit den offenkettigen Vertretern bzw. den Naturstoffen war weiterhin geplant, verschiedene zyklische Derivate mit Variation der Stereozentren des Fettsäurefragmentes zu generieren. So sollte die Frage nach dem Einfluss der Stereochemie des Ketids geklärt werden. Auf Basis der dargestellten Substanzbibliothek sollten umfangreiche biologische Untersuchungen durchgeführt werden. So sollten zunächst die dargestellten Verbindungen in einem *in vitro* Assay gegen die dual spezifische Phosphatase VHR getestet werden. Die daraus gewonnenen Wirkungsbeziehungen sollten nützliche Erkenntnisse für die Leitstrukturoptimierung geben. Hinsichtlich der Selektivität war geplant auch eine Reihe weiterer Phosphatasen, wie verschiedene Protein-Tyrosin- oder auch Serin-Threonin-Phosphatasen zu untersuchen. Um abschließend die Wirkung auch *in vivo* zu untersuchen, sollte ein Zelltest mit Krebszellen durchgeführt werden. Dadurch könnten weitere Erkenntnisse über die Zytotoxizität und Membranpermeabilität der verschiedenen Verbindungen erhalten werden.

4. Spezieller Teil

4.1 Grundlegende Betrachtungen

Der erste Schritt bei der Planung umfasste die Variationsbreite der Derivate sowie die Festlegung der einzelnen Bausteine.

Wie geplant war, sollten verschiedene strukturelle Parameter variiert werden und der Einfluss beispielsweise der Peptidsequenz auf die Aktivität untersucht werden. Dies ist durch Variation der einzelnen Aminosäuren sowie deren Seitenketten zu erreichen. Hierfür steht bereits ein großer natürlicher Pool an unterschiedlichen Aminosäurebausteinen zur Verfügung. Außer den Aminosäuren Serin, Valin und Threonin die bereits in der Naturstoffklasse der Stevasteline vorkommen, sollten auch eine Reihe weiterer Aminosäuren als kombinatorische Bausteine verwendet werden. Vergleicht man verschiedene Phosphataseinhibitoren (siehe Kap. 2.5) so stellt man fest, dass immer wieder aromatische Struktureinheiten in den aktiven Verbindung vorkommen die durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Phosphatasen interagieren können.^[77] Aufgrund dieser Beobachtung sollten weiterhin aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin als Bausteine dienen. Insbesondere Tyrosin erscheint überaus vielversprechend, da funktionalisierte Arylsubstituenten häufig als Strukturelemente potenter Inhibitoren vorkommen.^[78] Aber auch Phosphatsurrogate wie Phosphonate, Sulfate oder Carboxylate finden sich oft als Strukturuntereinheiten wieder. So erwiesen sich die in Abbildung 13 dargestellten Peptide **57** und **58**, die Aminosäuren mit Carboxylgruppen in ihrer Sequenz enthalten, als potente Inhibitoren der PTP1B. So wurde zusätzlich auch Asparaginsäure als Baustein für die Bibliothek ausgesucht.

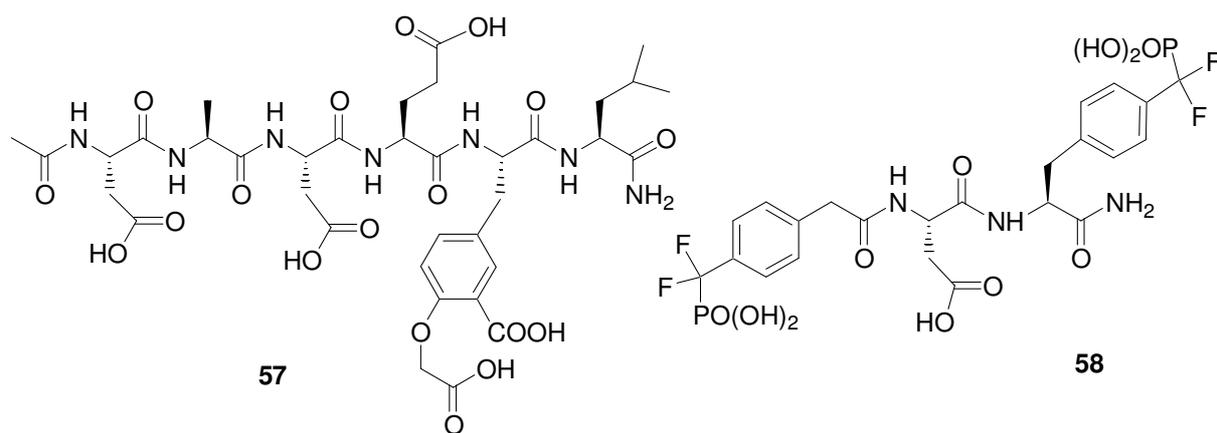


Abbildung 13: Peptidische Inhibitoren mit Säurefunktionen.

Aus ersten SAR-Studien (Structure-Activity-Relationship) war bekannt, dass das Vorhandensein des aliphatischen Restes des Fettsäurefragmentes essentiell ist für die Aktivität.^[63] So sollte als erster Säurebaustein die natürliche Stearinsäure **43** generiert werden. Um den Einfluss der stereogenen Substituenten des im Naturstoff vorkommenden Säurefragmentes näher zu untersuchen, war weiterhin geplant, verschiedene Vertreter mit nur 2 Stereozentren bzw. Säuren ohne Substituenten als Bausteine zu verwenden.

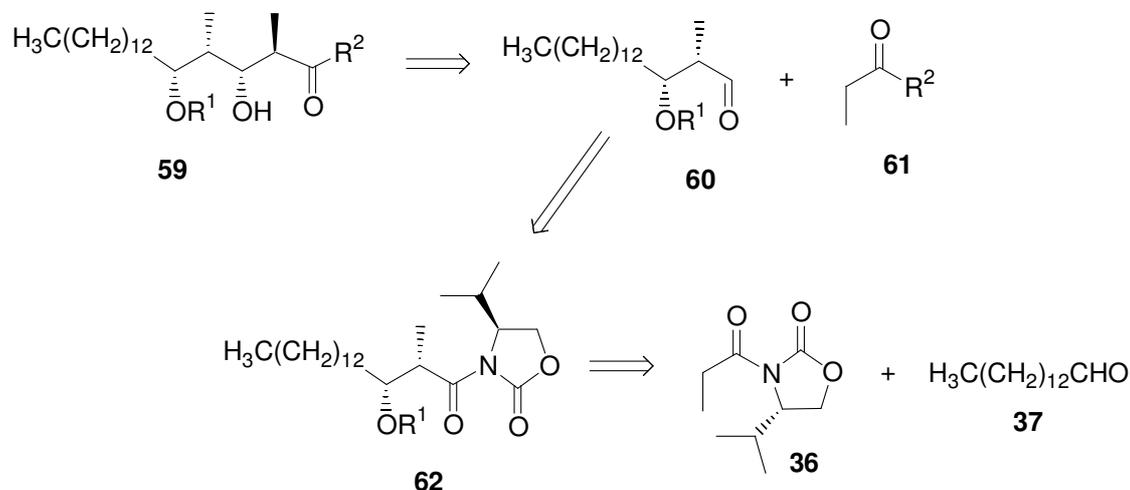
4.2 Darstellung der Bausteine in Lösung

4.2.1 Synthese der natürlichen Stearinsäure **43**

Struktureinheiten mit vier aufeinanderfolgenden Stereozentren und 1,3-funktionalisiertem Abstand der Hydroxygruppen sind schon seit langer Zeit bekannt und in verschiedenen Synthesen mittels asymmetrischen Aldolreaktionen erfolgreich dargestellt worden.^[79] Diese Technik wurde auch von Sarabia *et al.* bei der Darstellung der Säure **43** in der in Kap. 2.6 gezeigten Totalsynthese angewandt.^[70] So führt die retrosynthetische Betrachtung des Stearinsäurederivates **59** zunächst zu einer asymmetrischen *anti*-Aldolreaktion ausgehend von dem Propionsäurederivat **61** und dem Aldehyd **60** (Schema 3). Für diese Reaktionssequenz stehen eine Reihe verschiedener Aldolreaktionen zur Verfügung.^[80, 81] Der Aldehyd (**60**) ist seinerseits in drei Stufen aus dem Oxazolidinonderivat **62** durch Schützung der Hydroxygruppe, reduktive Abspaltung des Auxiliars und anschließende Swern-Oxidation

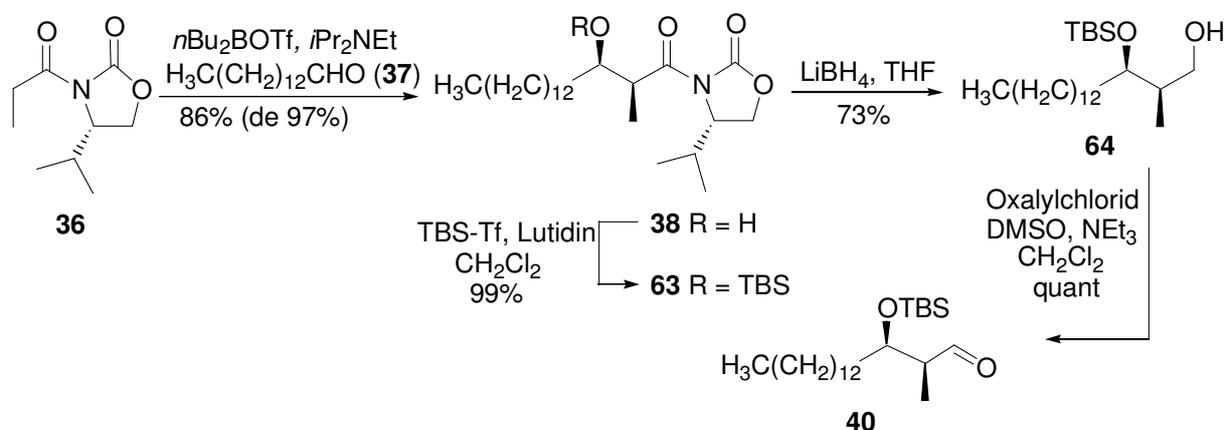
4. Spezieller Teil

darstellbar.^[82, 83, 84] Verbindung **62** kann durch eine wohletablierte weitere asymmetrische Aldolreaktion nach Evans^[85] aus **36** und Myristinaldehyd (**37**) generiert werden (Schema 3).



Schema 3: Retrosynthetische Betrachtung des Stearinsäurederivates **59**.

Die bereits aus der eigenen Diplomarbeit bekannten Schritte bis zum geschützten Aldehyd **40** sollen hier nur kurz Erwähnung finden (Schema 4).^[86] Ausgehend von Myristinaldehyd (**37**) wurde zunächst das *syn*-Aldolprodukt (**38**) mit hohen Ausbeuten und Selektivitäten synthetisiert.^[85] Die anschließende Schützung des Alkohols mit TBS-Triflat und Lutidin als Base gelang glatt in nahezu quantitativem Umsatz.^[82] Nach reduktiver Abspaltung des Evans-Auxiliars mittels Lithiumborhydrid und anschließender Swern-Oxidation konnte der Aldehyd **40** zugänglich gemacht werden (Schema 4).^[83, 84]



Schema 4: Synthese des Aldehyds **40**.

4. Spezieller Teil

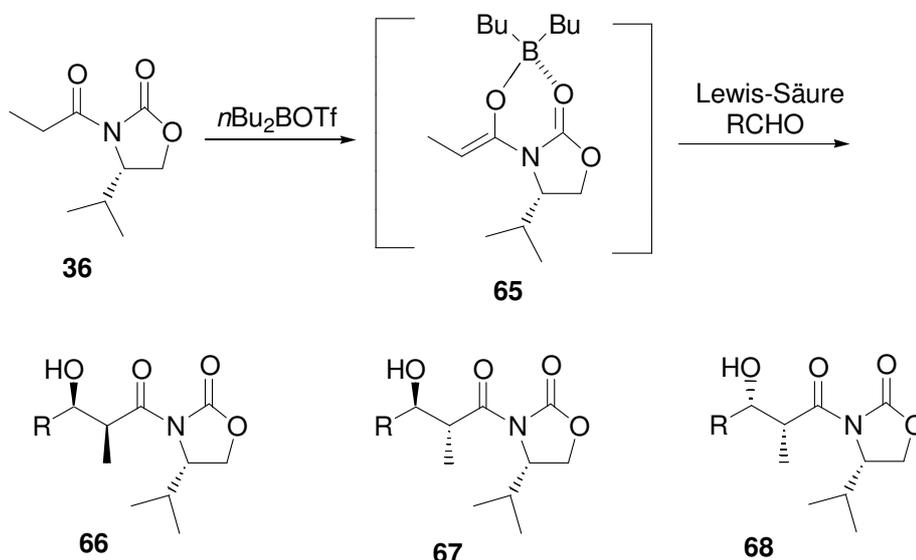
Im Folgenden sollte nun der Aldehyd **40**, der lediglich begrenzt lagerstabil ist, in einer weiteren asymmetrischen *anti*-Aldolreaktion direkt nach der Herstellung umgesetzt werden.

Hierfür wurde zunächst ebenfalls auf Evans-Aldolchemie zurückgegriffen.^[80]

Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen ist es möglich, ausgehend von dem bereits verwendeten Oxazolidinon **36**, das gewünschte Aldolprodukt **67** zu erhalten.

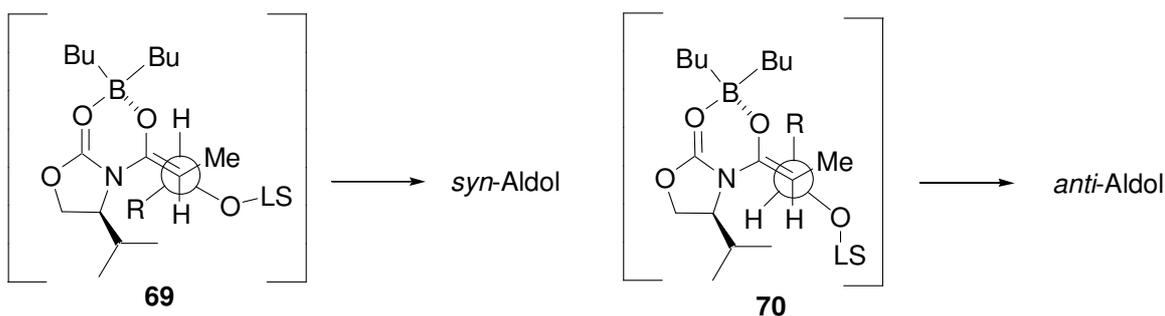
Wie in Schema 5 gezeigt, reagiert das (*S*)-Imid **36** in literaturbekannter Weise im ersten Schritt mit Di-*n*-butylbortriflat zu dem Enolat **65**.^[80] Je nach Reaktionsbedingungen, Art und Menge der Lewis-Säure erhält man so vorzugsweise eine der drei dargestellten Konfigurationen, wobei die *anti*-Anordnung über einen offen Übergangszustand verläuft.^[80]

Der Einsatz von Diethylaluminiumchlorid führt hauptsächlich zum *anti*-Aldolprodukt, dagegen führt beispielsweise Titan-tetrachlorid bevorzugt zur *syn*-Konfiguration.



Schema 5: Mögliche Aldolprodukte in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen

Es wird angenommen, dass vor allem der sterische Anspruch der Lewis-Säuren für die bevorzugte Konfiguration verantwortlich ist. Im Fall einer kleinen Säure wie Titan-tetrachlorid ist der Übergangszustand **69** bevorzugt, da die *gauche*-Abstoßung minimiert wird. Ist jedoch die Lewis-Säure sterisch anspruchsvoll, wird der Übergangszustand **70** durchlaufen, da die Wechselwirkung zwischen der Methylgruppe und der Lewis-Säure geringer ist (Schema 6).



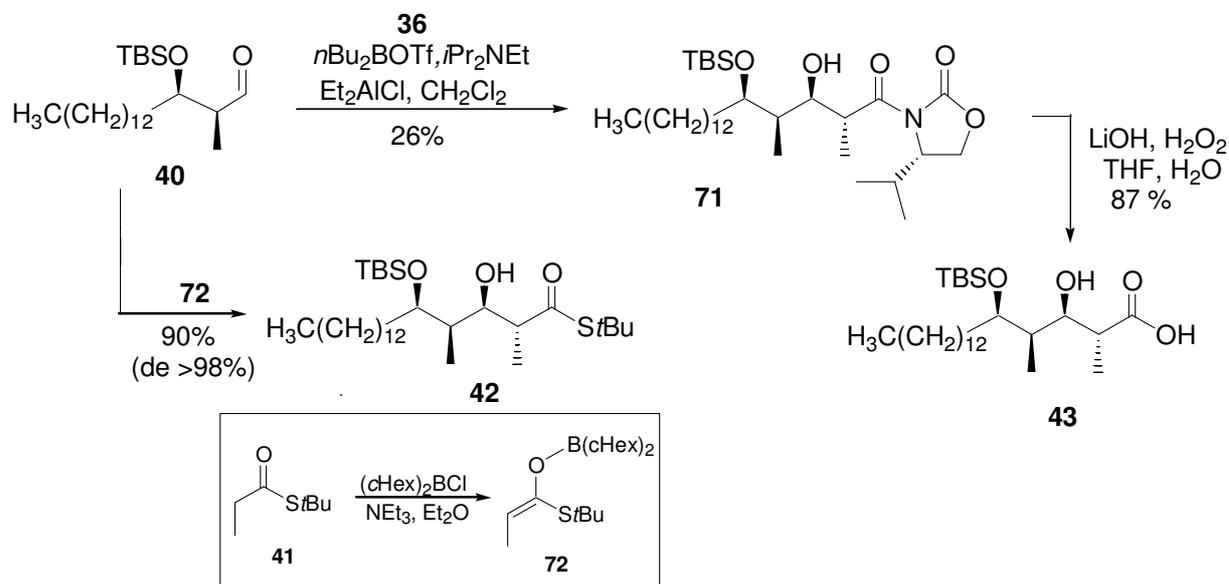
Schema 6: Übergangszustände.

Die nach Literatur^[80] durchgeführte Aldol-Reaktion bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ führte jedoch nur zu einem geringen Umsatz mit moderater Selektivität. Da eine Erhöhung der Temperatur zwar die Ausbeute erhöhen würde, aber im allgemeinen die Selektivität gleichzeitig verschlechtern, wurde zunächst die Reaktionszeit bei gleichbleibend tiefer Temperatur verlängert. Allerdings konnte auch so die Ausbeute des Produktes **71** nur gering gesteigert werden. Auch nach weiterer Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte lediglich, nach Abtrennung eines weiteren Diastereomers (Diastereomerenverhältnis: 17:3) mittels Säulenchromatographie, eine Ausbeute von 26% erreicht werden (Schema 7). Die Überführung in die freie Säure **43** gelang glatt mit 87% Ausbeute (Beleg der absoluten Konfiguration s. Seite 32 Schema 10).

Aufgrund der geringen Ausbeute wurde eine weitere *anti*-Aldolreaktion zur Darstellung der Hydroxysäure **43** durchgeführt. Bekanntermaßen führt die Umsetzung von *E*-Enolboronaten mit Aldehyden vorzugsweise zu *anti*-Aldolprodukten.^[87] Die erforderlichen *E*-Enolboronate werden vorzugsweise durch Verwendung von Chlorodicyclohexylboran und Triethylamin als Base in unpolaren Lösungsmitteln, wie Pentan oder Ether, in relativ verdünnten Lösungen erhalten.^[87] So konnten bereits I. Paterson *et al.* bei der Synthese von Ebelacton A diese Methode ausgehend von Dicyclohexylboronaten aus Thioestern erfolgreich durchführen.^[81] Daher wurde zunächst das *E*-Enolat **72** des *tert*-Butylpropionsäurethioesters **41** nach einem Protokoll von Brown^[87] dargestellt und im Anschluss mit dem zuvor generierten Aldehyd **40** umgesetzt. Hierbei sollte die in unmittelbarer Nachbarschaft liegende, sterisch anspruchsvolle TBS-Gruppe des Aldehyds **40** den für die korrekte absolute Konfiguration notwendigen Rückseitenangriff des Enolats induzieren. Die anfänglich in getrocknetem Pentan durchgeführte Reaktion lieferte jedoch nur Spuren des gewünschten Produktes. Nach Wechsel des Lösungsmittels zu Diethylether und Optimierung der Reaktionsbedingungen mit

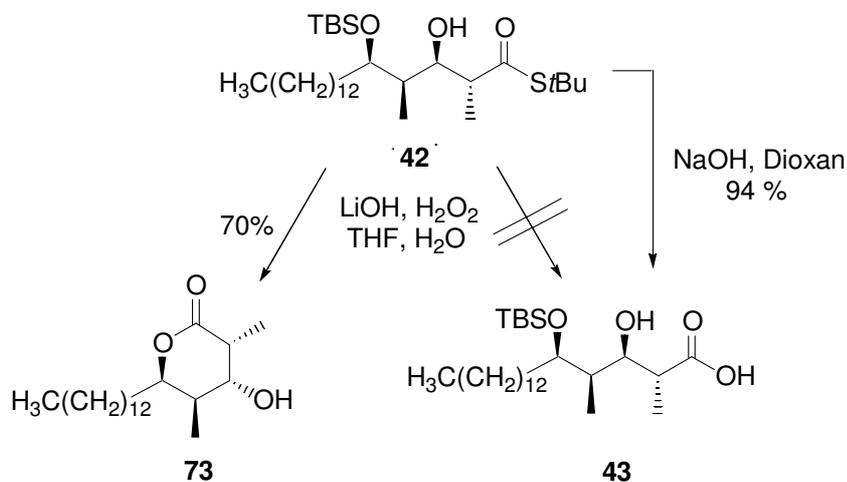
4. Spezieller Teil

verlängerter Reaktionszeit und langsamem Auftauen von $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnte der Thioester **42** in hohen Ausbeuten und exzellenter Selektivität erhalten werden (Schema 7).



Schema 7: Asymmetrische Aldolreaktionen.

Um die Synthese der Säure **43** abzuschließen sollte im Folgenden, wie bereits zuvor bei Verbindung **71** durchgeführt, der Thioester **42** mittels Lithiumhydroperoxid gespalten werden (Schema 8).^[88] In diesem Fall führte die Reaktion nicht zum gewünschten Produkt **43**, sondern zum Laktone **73** das als Hauptprodukt identifiziert werden konnte. Allerdings konnte in einem weiteren Versuch Fragment **43** durch Hydrolyse mit wässriger Natronlauge in hohen Ausbeuten erhalten werden (Schema 8).^[89]



Schema 8: Spaltung des Thioesters.

Das Laktone **73** konnte zur Charakterisierung der Stereochemie des Aldolproduktes **42** und damit der Stearinsäure **43** herangezogen werden. Mittels zweidimensionaler NOE-NMR-Spektroskopie konnte die räumliche Orientierung der einzelnen Gruppen zugeordnet werden. In Abbildung 14 ist Verbindung **73** nochmals in dreidimensionaler Form dargestellt. Die aus dem Spektrum erhaltenen Signale verschiedener Protonen belegten eindeutig die erwartete Konfiguration.

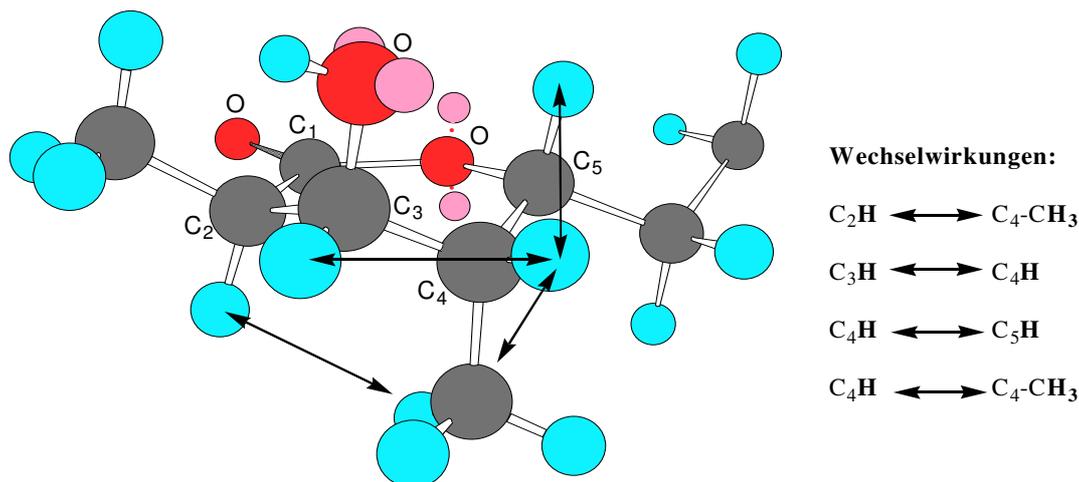
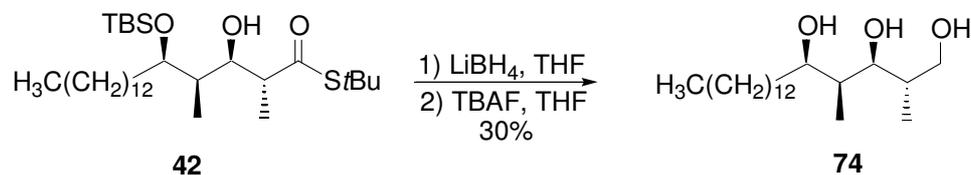


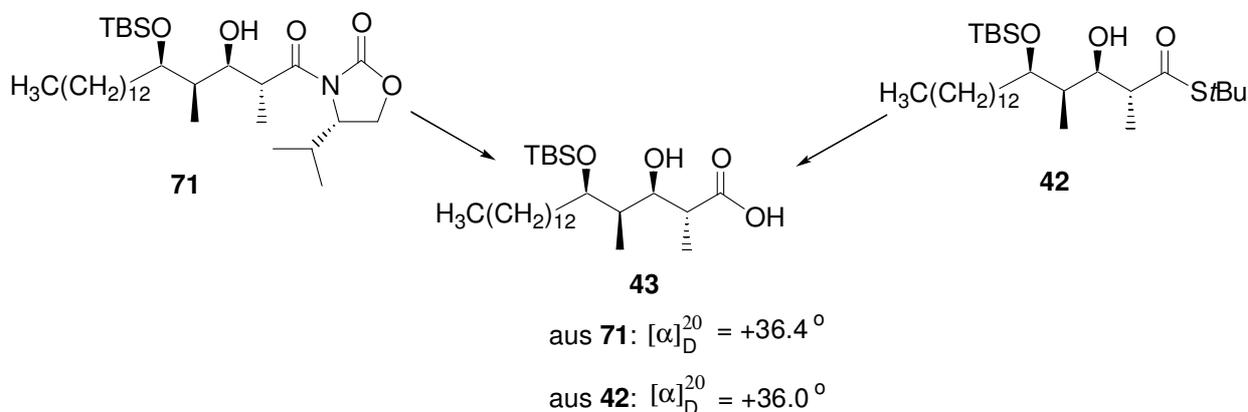
Abbildung 14: Dreidimensionale Darstellung des Laktone **73**.

Durch Überführung des Thioesters **42** in das literaturbekannte Triol^[65] **74** - durch Reduktion mittels Lithiumborhydrid und anschließender Spaltung des Silylethers - konnte ebenfalls die richtige absolute Konfiguration bewiesen werden (Schema 9).



Schema 9: Darstellung des literaturbekannten (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2,4-Dimethyl-octadecan-1,3,5-triol (**74**)

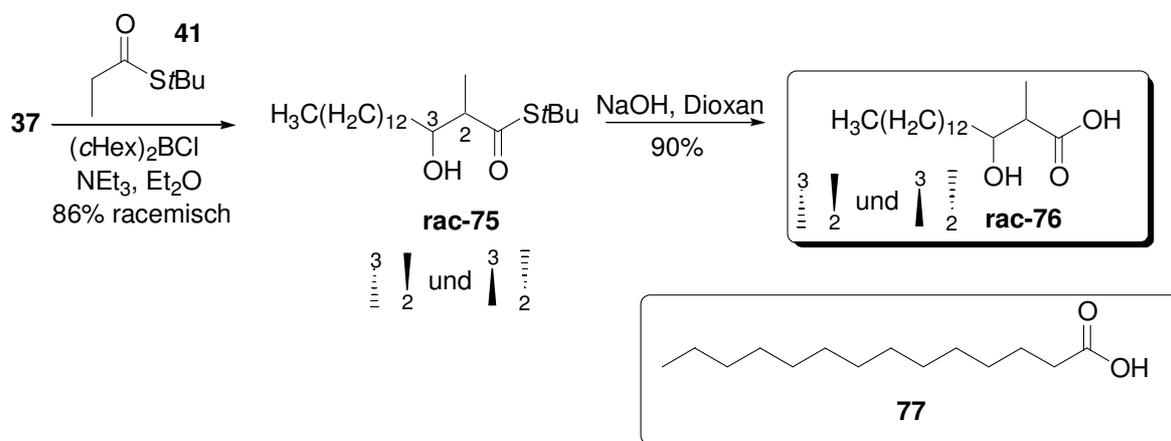
Des weiteren bestätigte ein Vergleich der Drehwerte, der aus **71** bzw. des Thioester **42** generierten Säure **43**, die absolute Stereochemie des Oxazolidinons **71**.



Schema 10: Bestätigung der absoluten Konfiguration des Oxazolidinons **71**.

4.2.2 Synthese der weiteren Säurebausteine

Um eine Fettsäure mit zwei Stereozentren zu synthetisieren, wurde wiederum ausgehend von Tetradecanal (**37**) die bereits bei der Darstellung von Verbindung **43** erfolgreich durchgeführte *anti*-Aldolreaktion für die Synthese des (3)-Hydroxy-(2)-methylhexadecansäure-*S-tert*-butylthioester (**75**) benutzt.^[81] Das racemisches Gemisch **75** wurde durch Hydrolyse mittels wässriger Natriumhydroxydlösung in die Säure **76** überführt und konnte mit einer Ausbeute von 77% über 2 Stufen isoliert werden (Schema 11).



Schema 11: Weitere Säurebausteine.

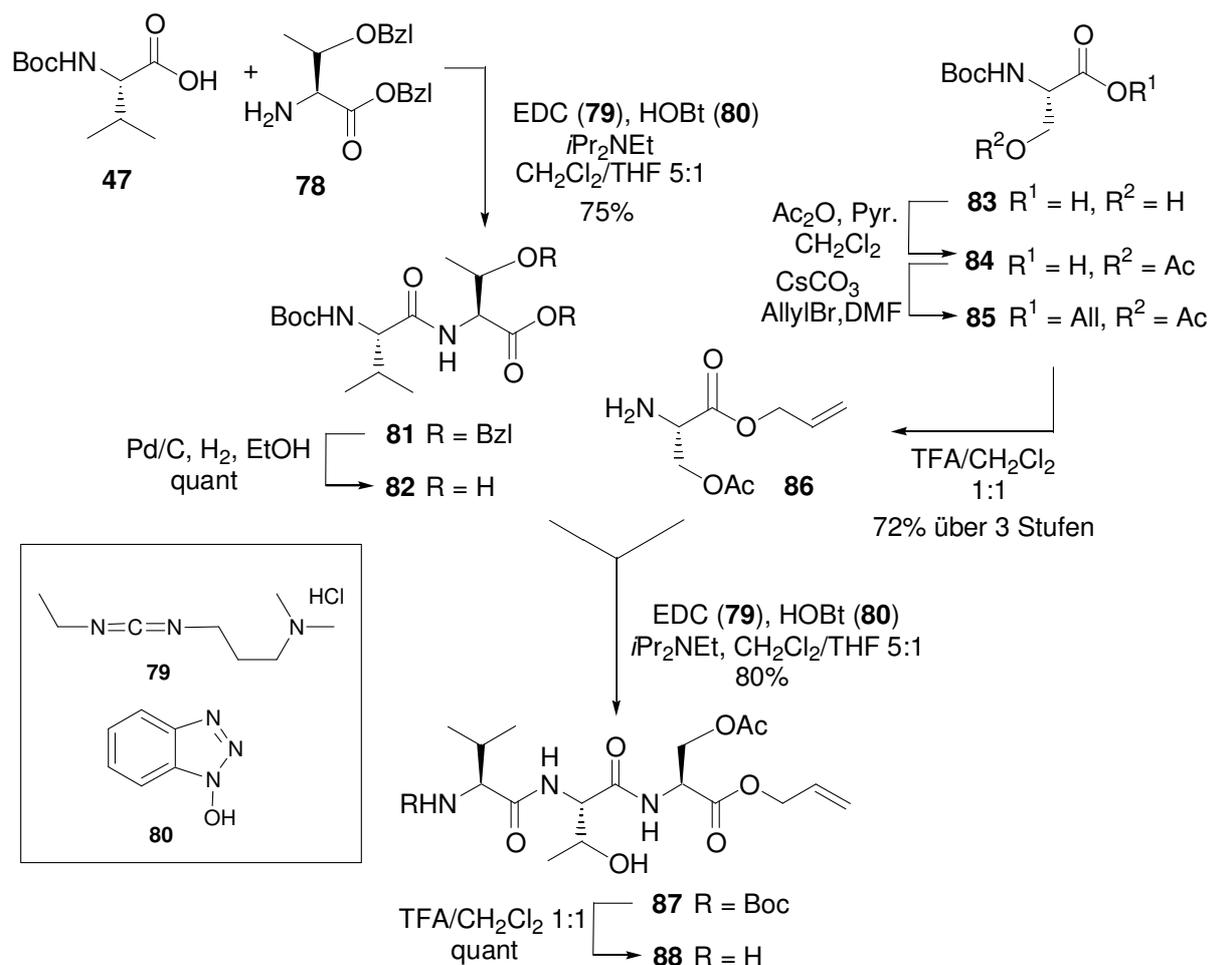
Die Trennung der Isomere sollte nach Kupplung mit einer Peptidsequenz mittels HPLC durchgeführt werden. Die daraus generierten Diastereomeren könnten im direkten Vergleich untereinander, aber auch mit anderen Derivaten mit weiteren Säurebausteinen Aufschluss über den Einfluss der Stereozentren am Säurefragment auf die Aktivität geben.

Die kommerziell erhältliche Myristinsäure (**77**) wurde schließlich als letzter Baustein ohne Substituenten verwendet (Schema 11).

4.2.3 Synthese der natürlichen Peptidsequenz der Stevasteline

Die aus den Aminosäuren Serin, Valin und Threonin bestehende Peptidsequenz der Stevasteline wurde zunächst in Lösung dargestellt. Durch Kupplung der beiden geschützten Aminosäuren **47** und **78** mittels Carbodiimid Methode wurde das Dipeptid **81** zugänglich gemacht (Schema 12).^[90] Die anschließende Spaltung der benzyllischen Gruppen lieferte das C-terminal entschutzte Dipeptid **82**,^[91] das im weiteren unter Standardbedingungen [EDC (**79**)/HOBt (**80**)]^[92] mit dem Serinderivat **86** gekuppelt werden konnte. Dieses wurde zuvor in einer dreistufigen Synthesesequenz ausgehend von Boc-geschütztem L-Serin **83** dargestellt. Die Acylierung der Seitenkette verlief glatt mit einer Ausbeute von 97%, so dass das erhaltene Produkt ohne weitere Aufreinigung für die weitere Umsetzung zur Verfügung stand.^[93] Die cäsiumcarbonatvermittelte Veresterung sowie die saure Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe lieferten das Derivat **86**.^[94]

Nach Verknüpfung beider Fragmente **82** und **86** und Spaltung der Boc-Gruppe konnte schließlich das Tripeptid **88** in 7 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 43% dargestellt werden (Schema 12).^[95]



Schema 12: Synthese des natürlichen Peptidfragmentes **88**.

4.3 Darstellung offenkettiger Stevastelinderivate

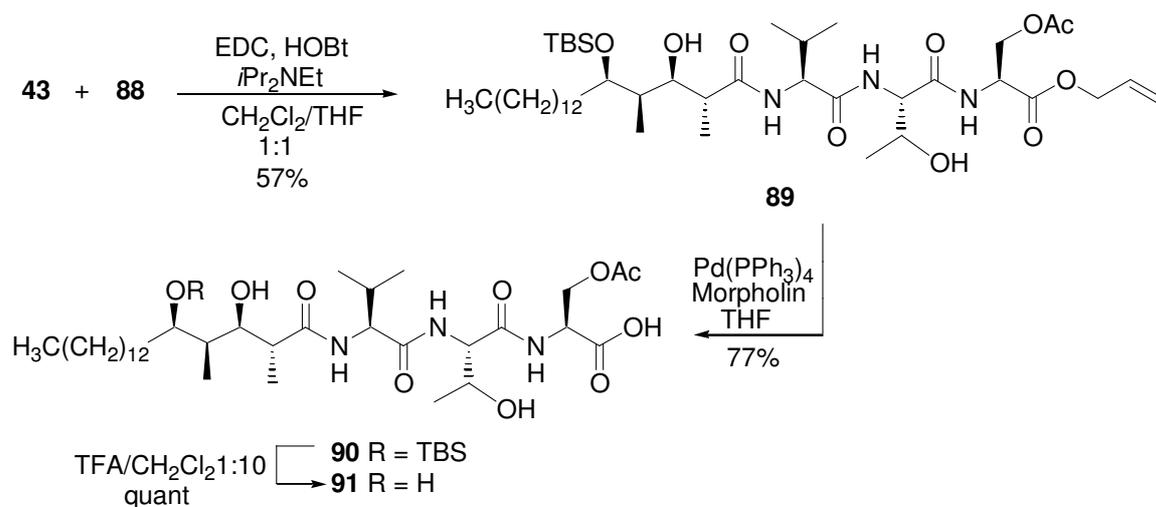
4.3.1 Synthese in Lösung

Das erste synthetische Stevastelinderivat wurde komplett in Lösung dargestellt. Die zuvor synthetisierte Säure **43** und das Tripeptid **88** wurden wiederum mittels EDC (**79**)/HOBT (**80**) durch Überführung in den Aktivester gekuppelt. Unter palladiumvermittelter Spaltung des Allylestere **89**, mit Morpholin als Säurefänger, konnte so der TBS-geschützte Vorläufer **90** generiert werden.^[94] Die anschließende Entschützung der sekundären Hydroxyfunktion zum Stevastelinderivat **91** bereitete zunächst einige Probleme. Für die Spaltung von Silylethern stehen eine Reihe verschiedener Reagenzien und Methoden zur Verfügung.^[96] Das wohl am häufigsten eingesetzte Reagenz hierfür ist Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) dessen

4. Spezieller Teil

Reaktivität normalerweise ausreichend hoch ist, um TBS-Gruppen abzuspalten.^[97] Doch im vorliegenden Fall war der Umsatz auch nach 12 Stunden Reaktionszeit nicht vollständig. Zudem trat nach einigen Stunden Reaktionszeit eine Nebenreaktion auf, deren Produkt allerdings nicht identifiziert werden konnte.

Weitere Versuche zielten darauf ab, die Gruppe durch saure Hydrolyse zu entfernen. So wurde im Folgenden das Derivat **90** zunächst in einer sehr milden Reaktion mit einer 1%igen Lösung aus HCl in Methanol umgesetzt.^[98] Aber auch unter diesen Bedingungen verlief die Reaktion sehr langsam. Durch Einsatz von HF-Lösung (51% in Wasser) konnte zwar die Umsetzung der Reaktion beschleunigt werden, so dass nach 2 Stunden kein Edukt mehr vorhanden war, jedoch trat auch hier wie im ersten Versuch Zersetzung ein.^[99] Schließlich konnte durch Verwendung einer 10%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan eine quantitative Spaltung des Silylethers **90** bereits nach 30 min erreicht werden.^[100] Die einfache Aufarbeitung der Reaktion durch mehrmalige Ko-evaporation mit Toluol lieferte das Produkt in quantitativer Ausbeute (Schema 13).



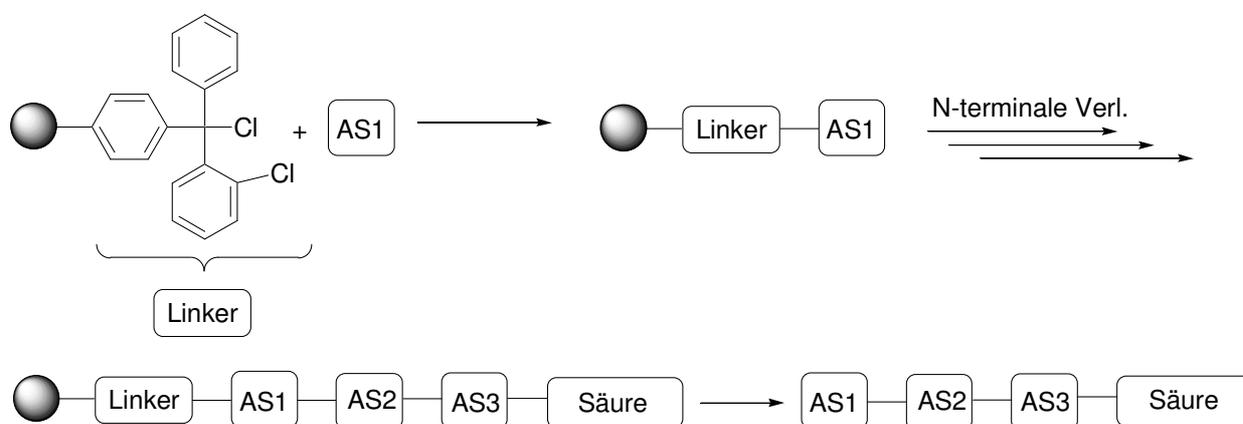
Schema 13: Fragmentkupplung und Entschützung.

4.3.2 Synthese an fester Phase

Um einen möglichst schnellen und effektiven Zugang zu einer Reihe weiterer offenkettiger Derivate zu erhalten sollte im weiteren eine festphasenunterstützte Synthese entwickelt werden.^[101]

4.3.3 Harz und Linker

Ein wichtiger Punkt bei der Planung der Festphasensynthese ist die Wahl des Harzes bzw. des Linkers.^[102] Von den chemischen Eigenschaften dieser Gruppierung hängen alle weiteren Reaktionsschritte ab. Hierfür steht eine ganze Palette unterschiedlicher Linkersysteme je nach Syntheseproblem zur Verfügung.^[103] Für die folgende Synthese wurde ein Polystyrolharz mit Chlortrityllinker gewählt.^[103] Der Aufbau peptidischer Strukturen, kann so effizient nach Beladung des Harzes mit dem ersten Baustein durch *N*-terminale Kupplung Fmoc-geschützter Aminosäuren aufgebaut werden. Nach Anknüpfung des letzten Bausteines kann dann das Molekül unter milden, sauren Bedingungen abgespalten werden (Schema 14).

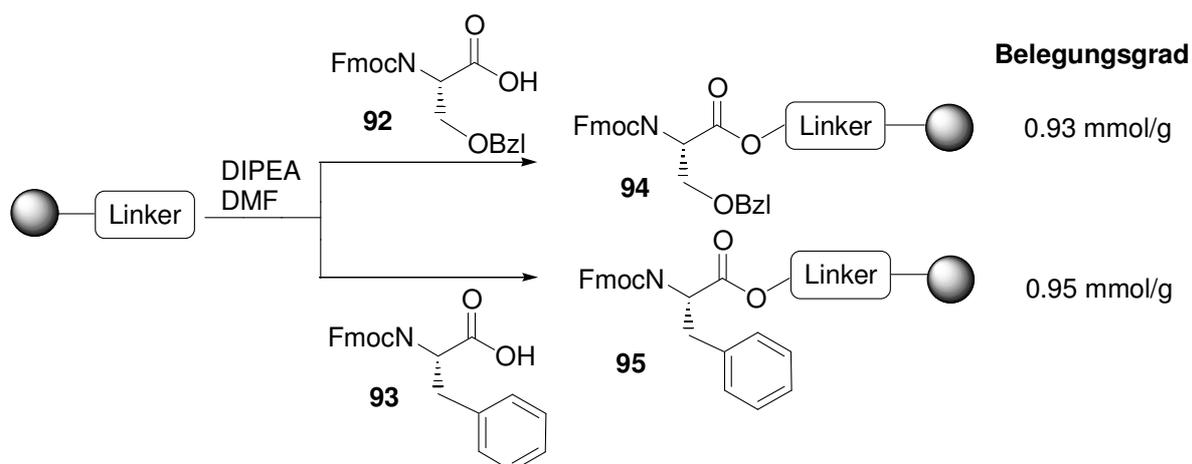


Schema 14: Schematische Darstellung der Festphasensynthese.

4.3.4 Synthese der Derivate

Die Beladung des Chlortritylharzes mit den beiden Aminosäuren Fmoc-*O*-benzyl-L-Serin (**92**) sowie Fmoc-L-Phenylalanin (**93**) verlief mit DIPEA als Base problemlos (Schema 15). Anschließend folgte die Blockierung nicht umgesetzter Funktionalitäten am Harz durch Veretherung mit einem Gemisch aus Hünig-Base und Methanol. Der Belegungsgrad wurde dann durch UV-spektroskopische Analyse ermittelt.^[104] Dabei wird eine genau definierte Menge des Harzes mit einer Lösung aus Piperidin/DMF versetzt. Man entnimmt ein wohldefiniertes Volumen und bestimmt die Absorption des in Lösung vorliegenden Fluorenylderivates bei 301 nm. Die Konzentration und damit der Belegungsgrad lassen sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnen.

So konnte für das mit Serin beladene Harz **94** ein Belegungsgrad von 0.93 mmol/g ermittelt werden, was einer prozentualen Umsetzung von 58% entspricht. Im Fall des Phenylalanin beladenen Harzes **95** konnte ein vergleichbarer Wert mit 0.95 mmol/g (59%) erhalten werden.

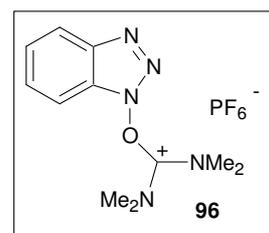
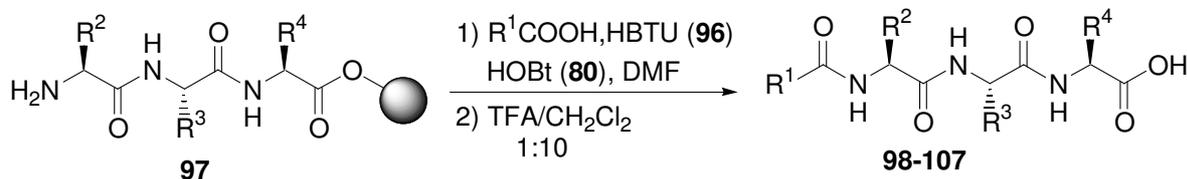


Schema 15: Beladung des Harzes.

Die Tripeptide wurden im Folgenden alternierend durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen und Kupplung einer weiteren Fmoc-geschützten Aminosäure an das Harz aufgebaut. Als Kupplungsreagenzien dienten hierbei HBTU (**96**)/HOBt (**80**) die in der Festphasen-Peptidchemie vielfach Anwendung finden.^[105] Die anschließende Kupplung der Säuren **43**, **76** und **77** an die polymergebundenen Tripeptide wurde ebenfalls mit HBTU (**96**)/HOBt (**80**) durchgeführt. Da die Verbindungen **43** und **76** über mehrere Stufen synthetisiert werden mussten, wurde für die Kupplung nur ein Überschuss von 2 Äquivalenten statt 5 Äquivalenten gewählt, wodurch die meist geringere Ausbeuten im Vergleich zu den Derivaten mit der kommerziell erhältlichen Myristinsäure (**77**) herrühren. Im letzten Schritt konnten die

4. Spezieller Teil

polymergebundenen Substanzen durch Behandlung mit einer Lösung von 10%igen Trifluoressigsäure in Methylenchlorid unter milden Bedingungen vom Harz abgespalten werden (Schema 16).



Schema 16: Kupplung der Fettsäuren und Abspaltung vom Harz.

Nach Kupplung der Säure **76**, die als racemisches Gemisch vorlag und Abspaltung vom Harz konnten die entstandenen Diastereomere **106** und **107** mittels HPLC voneinander getrennt werden. Alle an der festen Phase synthetisierten Derivate und die erzielte Gesamtausbeute sind in Abbildung 15 dargestellt.

4. Spezieller Teil

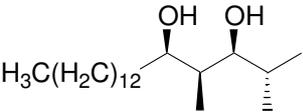
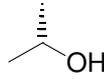
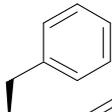
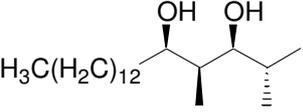
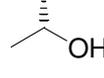
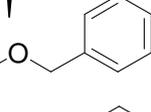
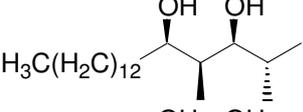
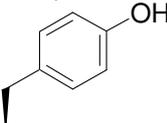
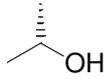
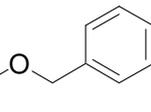
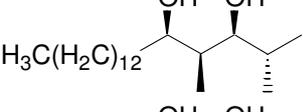
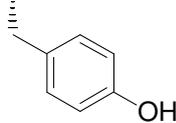
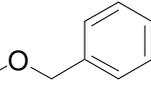
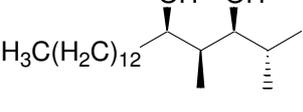
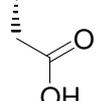
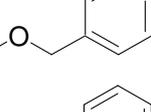
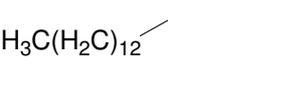
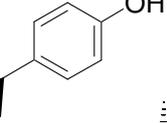
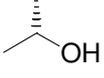
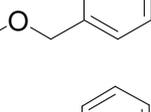
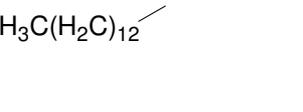
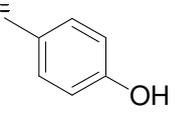
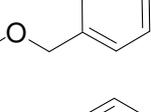
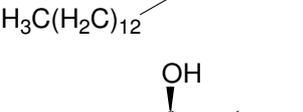
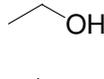
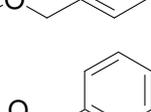
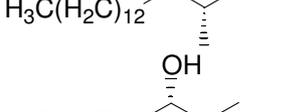
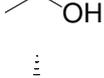
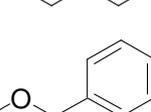
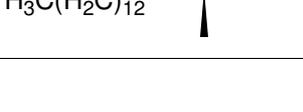
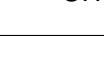
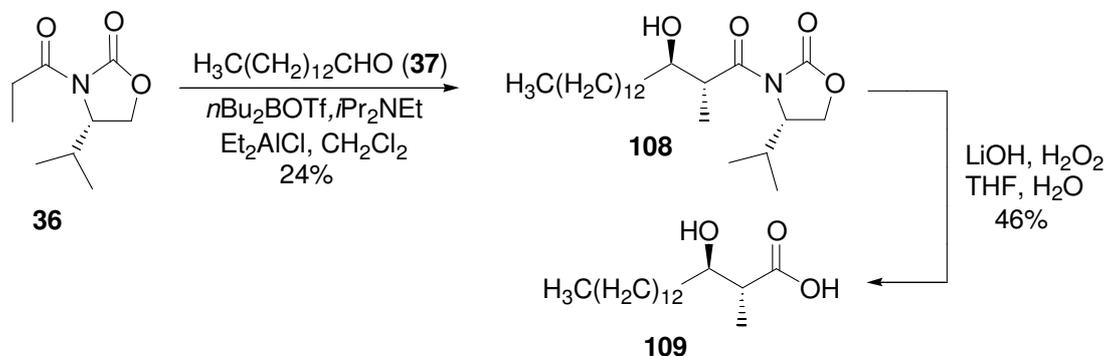
Derivat	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Gesamt- ausbeute [%]
98					38
99					39
100					14
101					24
102					26
103					75
104					58
105					72
106					32
107					32

Abbildung 15: Durch Festphasensynthese dargestellte azyklische Stevastelinanaloga.

Zur eindeutigen Charakterisierung der Konfiguration der beiden Verbindungen **106** und **107** sollte im Folgenden eines der Enantiomere der Säure **76** stereoselektiv dargestellt werden (Schema 17). Wiederum ausgehend von Myristinaldehyd (**37**) und (4*S*)-3-Propionyl-4-isopropyl-1,3-oxazolidinon (**36**) wurde zunächst das *anti*-Aldolprodukt **108** mittels Di-*n*-butylbortriflat und Diethylaluminiumchlorid als weitere Lewis-Säure generiert. Wie bereits in Kap. 4.2.1 beschrieben, verlief die stereoselektive *anti*-Aldolreaktion mit geringer Ausbeute und moderater Selektivität. Die erhaltenen Diastereomere konnten mittels

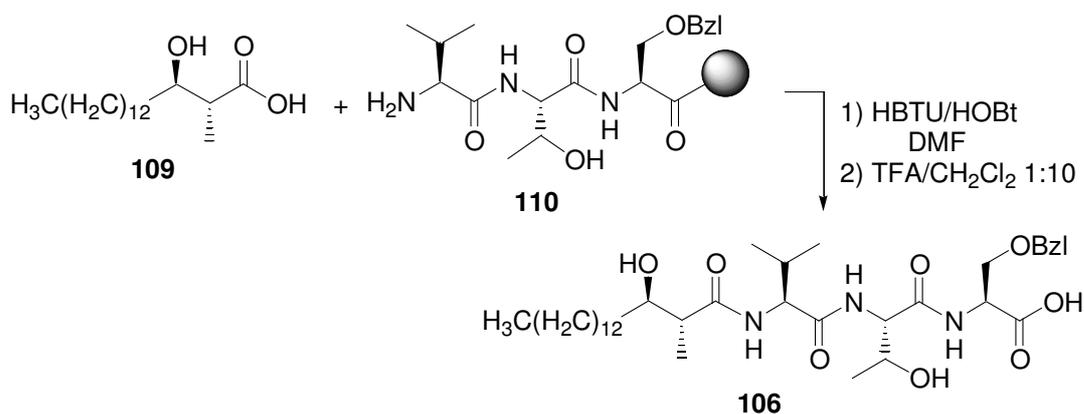
4. Spezieller Teil

Säulenchromatographie voneinander getrennt werden (Diastereomerenverhältnis: 13:4). Die anschließende Spaltung des Oxazolidinonderivates **108** wurde unter Standardbedingungen mit Lithiumhydroxid und Wasserstoffperoxid durchgeführt (Schema 17).



Schema 17: Stereoselektive Synthese von (2*R*,3*R*)-(3)-Hydroxy-(2)-methyl-hexadecansäure (**109**).

Die Säure **109** wurde, wie oben beschrieben, an das polymergebundene Tripeptid **110** angeknüpft und das Produkt vom Harz abgespalten. (Schema 18). Durch Vergleich der analytischen Daten, wie Drehwert, und Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen konnten die Derivate **106** und **107** eindeutig charakterisiert werden.



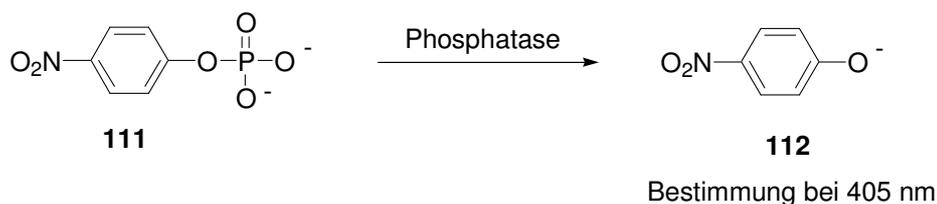
Schema 18: Stereoselektive Synthese des Analogon **106**.

4.4 Durchführung der biologischen Assays: Teil I

Zunächst wurden die azyklischen Derivate **91**, **98-107** in einem *in vitro* Inhibitions-Assay gegen VHR, weiterhin aber auch gegen die dual spezifische Phosphatase Cdc25A und verschiedene Protein-Tyrosin- und Serin-Threonin-Phosphatasen getestet.

4.4.1 *In vitro* Inhibitions-Assay

Für die Durchführung der Tests wurde das nichtnatürliche Substrat *para*-Nitrophenylphosphat **111** verwendet.* Durch enzymatische Hydrolyse des Phosphorsäureesters bildet sich das gelbe *para*-Nitrophenolat **112**, welches bei 405 nm im UV-Vis-Spektrometer detektiert werden kann (Schema 19). Die Absorption des *para*-Nitrophenolats **112** ist dabei direkt proportional zur Konzentration und somit ein Maß für die enzymatische Aktivität.



Schema 19: Enzymatische Hydrolyse des Substrats *para*-Nitrophenylphosphat **111**.

Im ersten Schritt erfolgte das Screening der Derivate gegen die verschiedenen Phosphatasen mit einer Konzentration von 100 μM . Im zweiten Schritt wurden dann die IC_{50} -Werte der Verbindungen ermittelt, die zuvor als aktiv (Abfall der Absorption um mindestens 50% gegenüber der Referenzprobe ohne Inhibitor) identifiziert werden konnten.

Um eine hohe Messgenauigkeit der IC_{50} -Werte zu erhalten, wurde ein Verfahren benutzt bei dem zunächst der zeitliche Verlauf der Reaktion über einen Zeitraum von 80 Minuten verfolgt werden konnte. Alle 60 Sekunden wurde dabei ein Datenpunkt erfasst. Die daraus resultierenden Kurven sind in Abbildung 16 dargestellt. Jede Funktion stellt den kinetischen Verlauf der Hydrolyse des Substrats durch das Enzym bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration dar.

*Im Fall von CD45 wurde das Peptid pp60^{c-src} als Substrat verwendet.

4. Spezieller Teil

Da vielfach zu Beginn der Messung in den ersten 15 Minuten starke Schwankungen der Messpunkte auftraten, wurde erst nach Stabilisierung der Kurven die Steigung ermittelt.

Die Steigungen sind direkt proportional zur freien Konzentration an *para*-Nitrophenolat **112** und wurden in einem weiteren Diagramm gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen, woraus dann direkt der IC_{50} -Wert der Verbindung ermittelt werden konnte (Abbildung 17). Die für diese Methode zur Bestimmung und Auswertung benutzten Programme wurden freundlicherweise von Priv. Doz. Dr. Heino Prinz zur Verfügung gestellt.

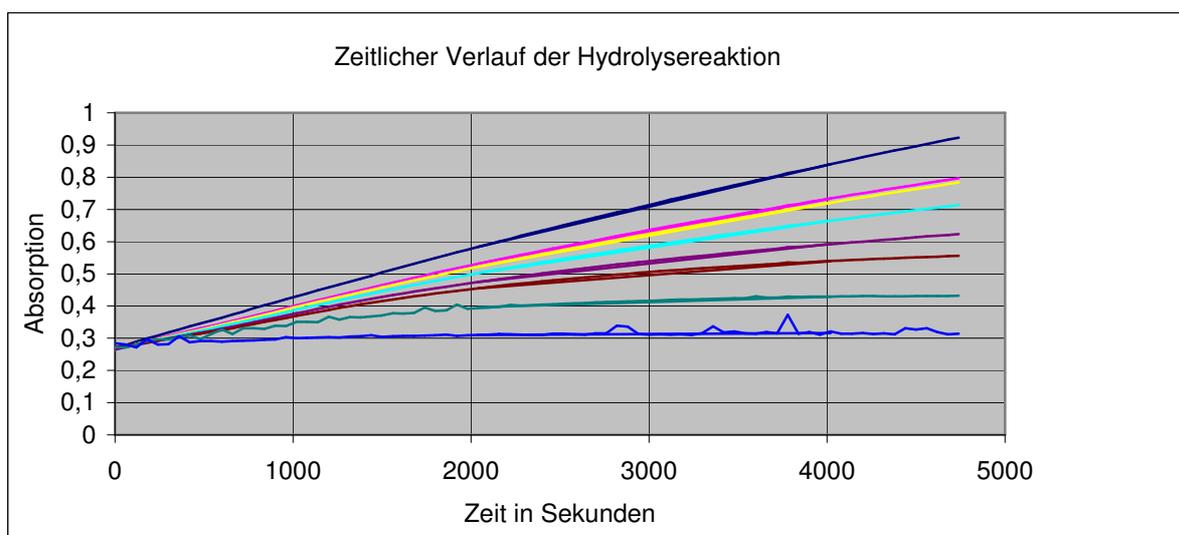


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Hydrolysereaktion

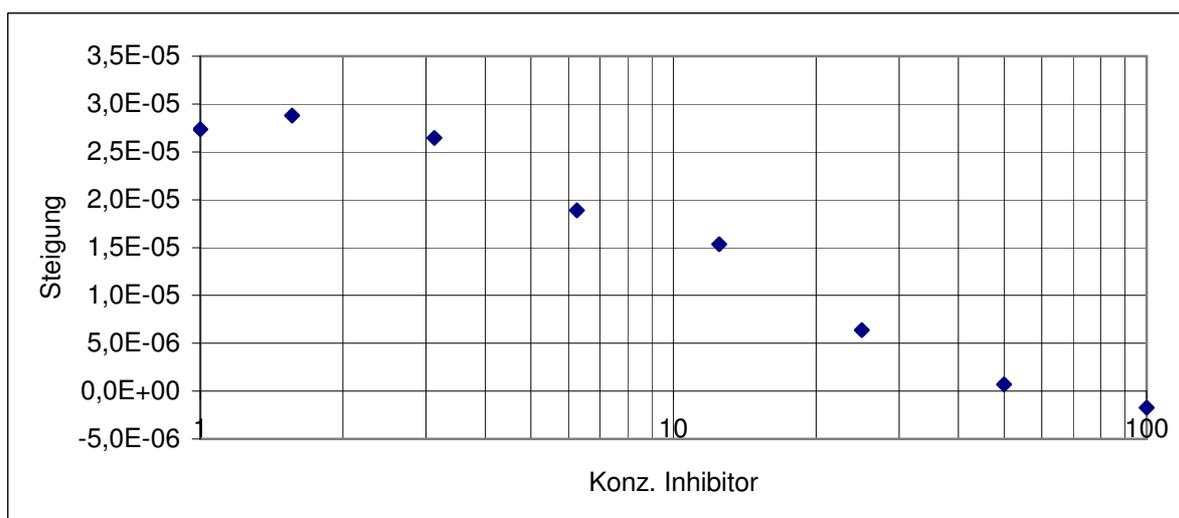


Abbildung 17: Auftragung der Steigungen gegen die Inhibitorkonzentration

Um sichere und genaue Werte zu erhalten werden normalerweise Mehrfachmessungen vorgenommen. Diese werden im allgemeinen aus Zeit- und Kostengründen gleichzeitig parallel auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt und daraus der Mittelwert der Messungen bestimmt. Die Abweichung der einzelnen Messwerte ist hierbei in der Regel gering. Weitaus realistischere Werte und Abweichungen ergeben sich, wenn die Messungen auf verschiedenen Platten zu verschiedenen Zeiten aufgenommen werden. Im allgemeinen sind die Abweichungen der einzelnen Messungen hier etwas höher (größerer statistischer Fehler). In der Regel wurde in der vorliegenden Arbeit die zweite Variante gewählt, wodurch auch die zum Teil höheren Abweichungen der Einzelwerte begründet sind.

4.4.2 *In vitro* Inhibition und Strukturwirkungsbeziehung

Die offenkettigen Derivate **91** sowie **98-107** wurden zunächst als potentielle Inhibitoren der dual spezifischen Phosphatase VHR getestet. Dabei zeigten alle Vertreter mit IC_{50} -Werten zwischen 1.9 und 18.5 μ M inhibitorische Aktivität und bewegen sich damit in der gleichen Größenordnung, wie die Naturstoffe selbst. Offensichtlich spielt die Stereochemie der Substituenten der Fettsäure keine wesentliche Rolle, wie ein Vergleich der beiden diastereomeren Derivate **106** und **107** aber auch Verbindung **105** zeigt (Tabelle 2). Dies konnte auch bei weiteren Untersuchungen mit der DSP Cdc25A sowie den beiden PTPs PTP1B und *Mt*PTPA festgestellt werden. Vermutlich hat die Länge der Kette einen größeren Einfluss auf die Aktivität, da Analogon **99** mit der natürlichen Säure aber ansonsten identischen Peptidsequenz eine um den Faktor 3 bis 6-fach geringere Aktivität zeigt, als die Derivate **105-107** im Fall der DSP VHR (Tabelle 2). Es konnte belegt werden, dass aromatische Gruppen oder Aminosäuren die Aktivität erhöhen, wie ein Vergleich des Derivats **91**, welches an der Serinseitenkette acyliert vorliegt, und Verbindung **98** mit Phenylalanin in der Sequenz zeigt. Besonders Derivate mit Tyrosin in der Peptideinheit, wie zum Beispiel Analogon **100** oder **101** wurden als potente Inhibitoren identifiziert. Von allen synthetisierten Derivaten zeigte Verbindung **101** die stärkste Inhibition. Im Fall der Phosphatase PTP1B konnte sogar ein Wert kleiner 1 μ M gemessen werden. Solche peptidischen Tyrosinderivate findet man auch in modifizierte Form, häufig als Carbomethoxybenzoesäuren, bei einer Reihe literaturbekannter Verbindungen wieder, die ebenfalls als exzellente Inhibitoren der PTP1B identifiziert wurden.^[36, 106] In Abbildung 18 sind einige aktuelle Beispiele dargestellt. Wie auch die beiden Derivate **100** und **101**,

4. Spezieller Teil

enthalten die Peptide weitere hydrophobe aromatische Substituenten und terminal polare Gruppen (Carboxyl- bzw. Amidfunktion). Allerdings zeigen solche stark polaren Verbindungen, wie Derivat **115**, im allgemeinen eine geringe Aktivität *in vivo*, aufgrund geringer Membranpermeabilität.

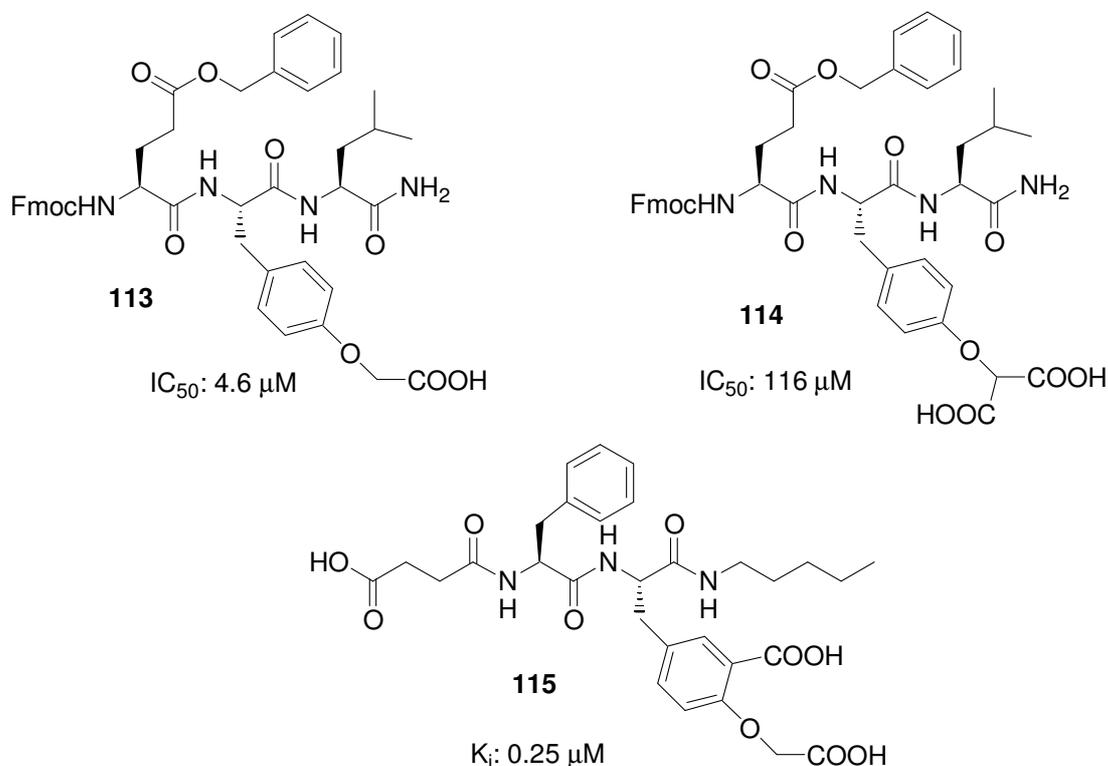


Abbildung 18: Literaturbekannte Tyrosinpeptide als PTP1B-Inhibitoren.

Ein Vertreter (**102**) wurde entdeckt, der mit Asparaginsäure im Molekül hemmende Wirkung gegen die Tyrosin-Phosphatase CD45 zeigt. Vermutlich wirkt hier der Carboxylrest, wie auch Phosphonate oder Sulfate, als Phosphatmimetika, denn auch bei den natürlich vorkommenden Stevastelinen konnte nur Stevastelin P (**27**), das phosphoryliert vorliegt, als schwacher Inhibitor identifiziert werden.^[63] Mit PP1 wurde auch eine Serin/Threonin-Phosphatase untersucht. Dabei zeigte keine der dargestellten Verbindungen einen Effekt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Derivate innerhalb der Klasse der PTPs spezifisch wirken.

4. Spezieller Teil

Derivat	IC ₅₀ [μM]					
	VHR	Cdc25A	PTP1B	MtPTPA	CD45	PP1
91	18.5±2.1	31.9±32.6	2.3±0.4	>100	>100	>100
98	6.4±0.5	13.9±16.5	2.0±1.1	35.1±2.0	>100	>100
99	14.8±4.5	15.0±15.9	2.6±1.7	17.0±3.7	>100	>100
100	6.8±3.1	6.3±6.6	1.4±0.3	5.3±0.1	>100	>100
101	1.9±0.8	3.9±0.7	0.65±0.35	1.6±0.3	>100	>100
102	7.1±1.1	5.9±4.8	1.6±0.6	10.7±0.3	4.5±2.0	>100
103	12.2±6.8	7.9±7.4	3.9±3.3	10.7±1.9	>100	>100
104	3.3±2.7	11.2±13.2	1.1±0.4	2.4±0.6	>100	>100
105	5.1±0.6	14.7±18.2	2.0±0.8	16.6±8.6	>100	>100
106	3.8±1.2	11.3±3.8	2.2±1.0	10.0±1.1	>100	>100
107	2.3±0.6	11.6±8.8	1.0±0.8	11.9±1.6	>100	>100

Tabelle 2: Phosphataseaktivität der offenkettigen Derivate.

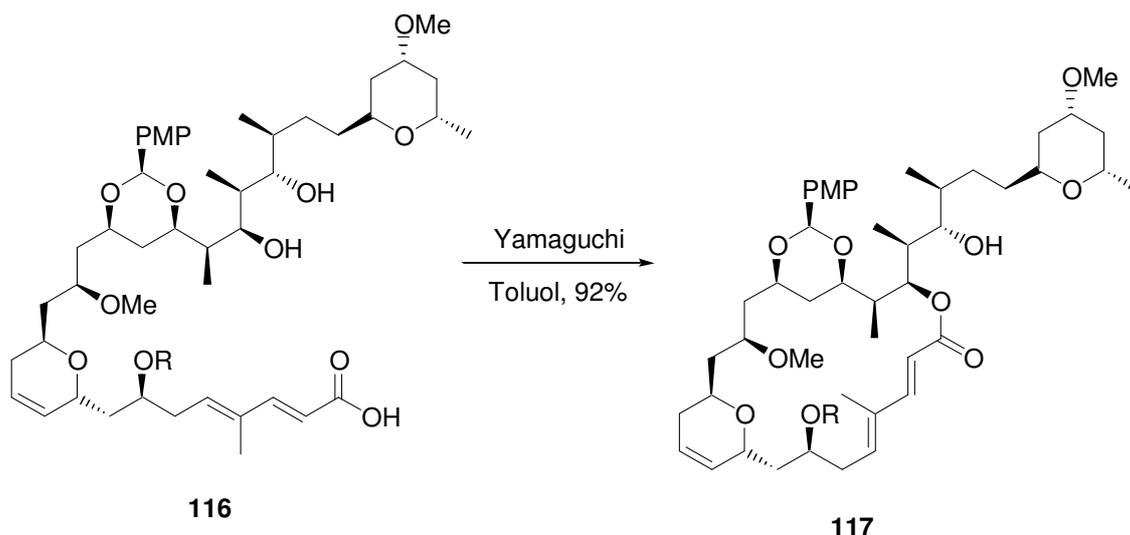
Die Ergebnisse der *in vitro* Inhibitions-Assays belegen, dass die zyklische Struktur der Naturstoffe für inhibitorische Aktivität nicht notwendig ist. Allerdings könnte das rigide Ringsystem der natürlichen Stevasteline im Gegensatz zu den flexiblen offenkettigen Derivaten bezüglich der Selektivität eine Rolle spielen. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden im Folgenden wie geplant analoge zyklische Derivate generiert.

4.5 Darstellung zyklischer Verbindungen

Zunächst sollten ausgewählte, offenkettige Derivate mittels Makrolakonisierung in zyklische Analoga überführt werden. Zur Etablierung der Reaktion bot sich insbesondere das in Lösung synthetisierte Derivat **91** an, da durch Zyklisierung des Derivates gleichzeitig ein Zugang zu einem der Naturstoffe möglich ist. Des weiteren lagen die Substanz **91** sowie auch der TBS-geschützte Vorläufer **90** in ausreichender Menge vor.

4.5.1 Zyklisierungsstudien

Prinzipiell stehen bei den vorliegenden Verbindungen **90** sowie **91** insgesamt 2 bzw. 3 mögliche Positionen für einen Ringschluss über eine Laktonisierung zur Verfügung von denen jedoch nur eine im Fall von Derivat **90** und zwei bei Analogon **91** zu einem der gewünschten Produkte führt. In der Literatur sind einige Beispiele bekannt, in denen die Regioselektivität des Ringschlusses durch Wahl der Reaktionsbedingungen beeinflusst wurde.^[107, 108] So konnte bei der Synthese des Vorläufers (**117**) von Hemiswinholid A mit einer Regioselektivität von 82:18 der 24 gliedrige Ring mittels Makrolaktonisierung geschlossen werden (Schema 20).^[107]



Schema 20: Regioselektiver Ringschluss.

Die Aktivierung der Carboxylfunktion ist, wie auch im vorliegenden Beispiel bei der Yamaguchi Reaktion, eines der gebräuchlichsten Verfahren zur Makrolaktonisierung. Insbesondere stehen hierfür mehrere speziell für diesen Zweck optimierte Reagenzsysteme mit verschiedenen Aktivierungsprinzipien zur Verfügung.^[109] Trotz der Vielzahl an wirksamen Reagenzien zur Makrolaktonisierung kann keine Vorhersage gemacht werden, welches Verfahren im konkreten Fall zum Erfolg führt. So wurde zunächst, wie bei der Synthese von **117**, Verbindung **90** nach Yamaguchi mit 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (**118**), Hünig-Base und Dimethylaminopyridin (**119**) unter Hochverdünnungsbedingungen (10^{-3} M) in Toluol/Tetrahydrofuran 10:1 umgesetzt.^[107] Allerdings konnte auch nach 24 h kein Produkt detektiert werden. Die zuvor bei Raumtemperatur durchgeführte Reaktion wurde im Folgenden unter Rückfluss durchgeführt. Diese Reaktionsbedingungen führten jedoch zur vollständigen Zersetzung des Startmaterials. Da möglicherweise die in unmittelbarer Nachbarschaft liegende sterisch anspruchsvolle Silyl-Schutzgruppe die Hydroxyfunktion des Säurefragments so stark abschirmt, dass ein Ringsschluss an dieser Position nicht möglich ist, wurde für die weiteren Umsetzungen die TBS-entschützte Verbindung **91** verwendet. Aber auch hier führten die Zyklisierungsversuche nach Variation der Reaktionszeit, Temperatur, Reagenzmenge oder dem Einsatz verschiedener Stickstoffbasen zu keinem Zyklisierungsprodukt. Um sicherzustellen, dass die Aktivierung der Säurefunktion zu dem gemischten Anhydrid stattfand, wurde in einem weiteren Versuch nach Zugabe der Aktivierungsreagenzien Butylamin zugesetzt, um so das gebildete Anhydrid abzufangen. Nach Abbruch der Reaktion konnte das generierte Amid eindeutig identifiziert werden. Eine Reihe weiterer Verfahren, wie die Carbodiimidmethode [DIC (**120**), DMAP (**119**), DMAP*HCl (**121**)] nach Keck, EDC (**79**)/4-PP (**122**) oder Aktivierung mit Boc₂O (**123**), führten nicht zum Ziel.^[110, 111, 112] Auch die Verwendung der vielfach bei Naturstoffsynthesen eingesetzten Kupplungsreagenzien 2-Chlor-*N*-methylpyridiniumiodid (**124**) oder *N,N*-Bis(2-Oxo-3-oxazolidinyl)phosphorodiamidylchlorid (BOP-Cl) (**125**), zeigte nicht den gewünschten Erfolg.^[113, 114, 115] Alle durchgeführten Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

4. Spezieller Teil

Versuch	Verbindung	Reagenzien	Lsm.	Temp.
1	90	2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (118) (<i>i</i> Pr) ₂ NEt, DMAP (119)	Toluol/THF 10:1	reflux.
1	90	2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (118) (<i>i</i> Pr) ₂ NEt, DMAP (119)	Toluol/THF 10:1	RT
2	91	2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (118) NEt ₃ , DMAP (119)	Toluol/THF 10:1	RT
3	91	2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (118) NEt ₃ , DMAP (119)	Toluol/THF 10:1	75 °C
4	91	DIC (120), DMAP (119), DMAP*HCl (118b)	CH ₂ Cl ₂	RT
5	91	EDC (79), 4-PP (122)	CH ₂ Cl ₂	RT
6	91	Boc ₂ O (123), NEt ₃ , DMAP (119)	Toluol/THF 10:1	RT
7	91	2-Chlor- <i>N</i> -methylpyridiniumiodid (124), NEt ₃	CH ₃ CN	60 °C
8	91	BOP-Cl (125), NEt ₃	CH ₂ Cl ₂	RT

Alle Reaktionen wurden unter Hochverdünnungsbedingungen 10⁻³ M durchgeführt

Tabelle 3: Makrolaktonisierungsversuche.

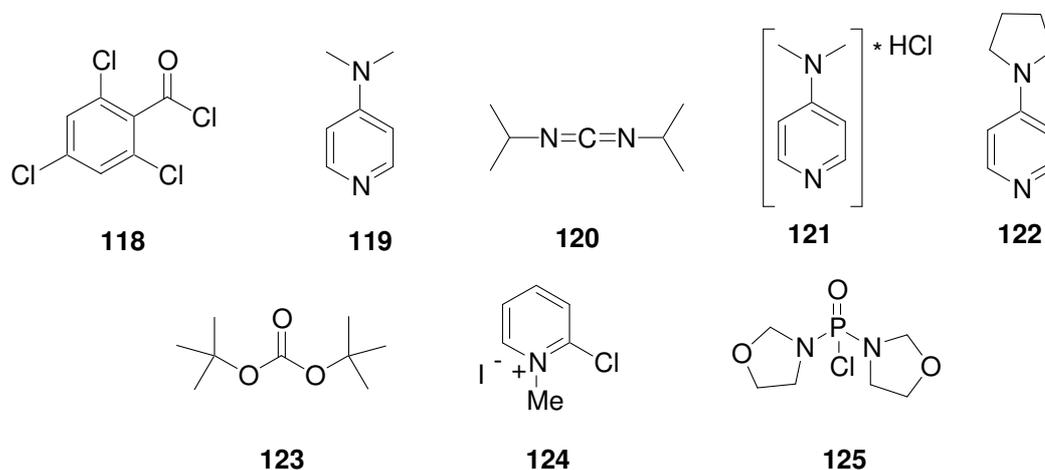


Abbildung 19: Verwendete Aktivierungsreagenzien

Vielfach wurde bei den Reaktionen vor allem unter harscheren Reaktionsbedingungen (höhere Temperaturen) Zersetzung des Eduktes festgestellt. Das Scheitern der Zyklisierungsversuche könnte auf die geringe Reaktivität der sekundären Hydroxyfunktionen zurückzuführen zu sein, was auch bei weiteren Reaktionen in Kapitel 4.5.3 belegt werden

konnte. Andererseits könnten auch konformelle Aspekte den Reaktionsverlauf negativ beeinflussen, sodass ein Ringschluss nur sehr schwierig zu bewerkstelligen ist. Sehr wahrscheinlich erfolgte die Zersetzung des Startmaterials sehr viel schneller als die Zyklisierung zum Makrolakton.

4.5.2 Synthesestrategie zur Darstellung zyklischer Stevastelinanaloga via Makrolaktamisierung

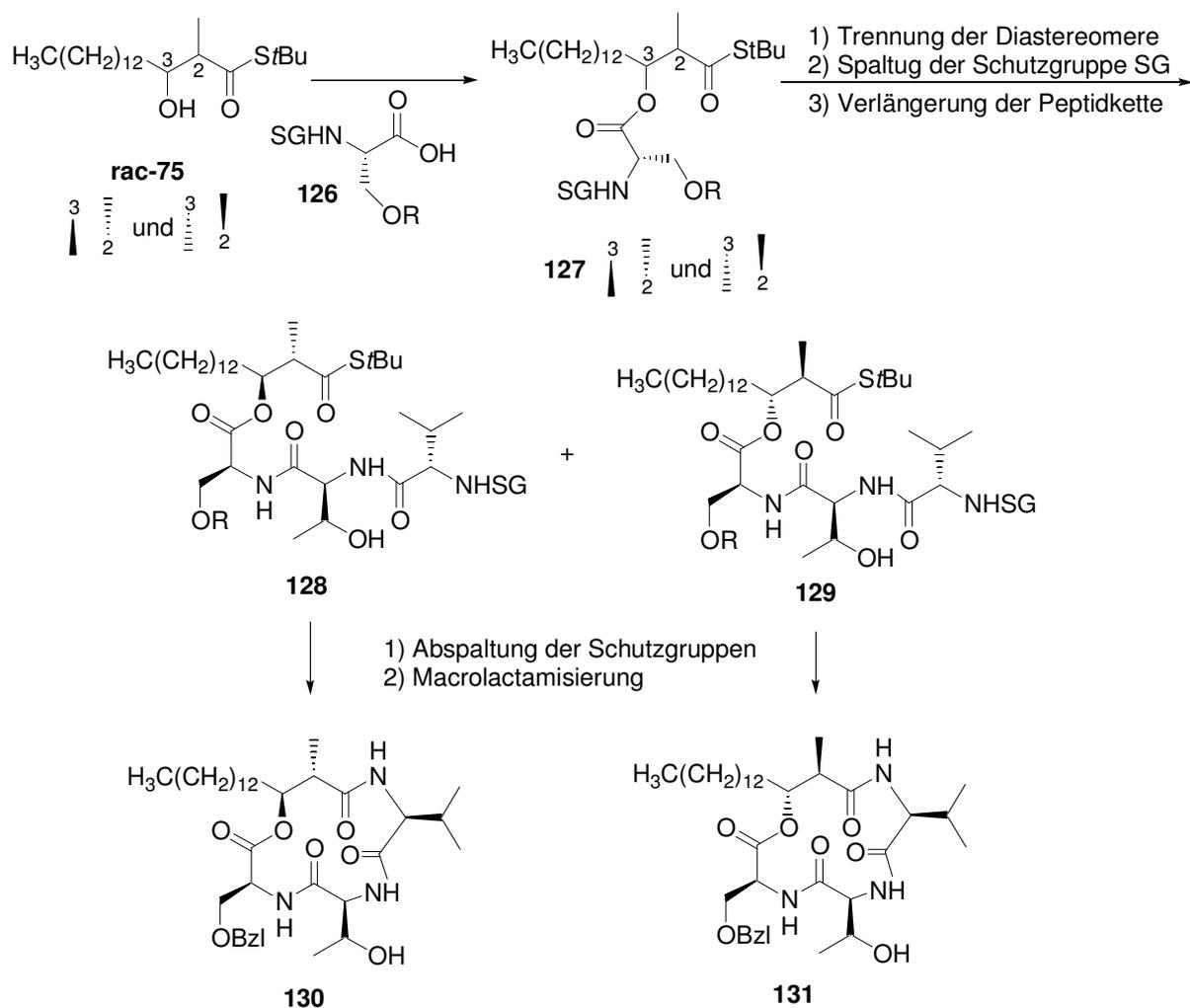
Da die angestrebte Makrolaktonisierung zur Darstellung zyklischer Derivate nicht zum gewünschten Erfolg führte, sollte im weiteren eine neue Synthesestrategie zur Darstellung zyklischer Stevastelinanaloga entwickelt werden.

Die Derivate sollten einfach und effizient zugänglich sein. Durch Verwendung unterschiedlicher diastereomerer Fettsäuren bei der Synthese, sollten Stevastelinderivate zugänglich gemacht werden, mit denen eindeutige Aussagen über den Einfluss der stereogenen Zentren auf die inhibitorische Aktivität des Fettsäurefragmentes im zyklischen Molekül gemacht werden können. Es war geplant, bereits synthetisierte Bausteine, wie zum Beispiel Säurefragmente, Aminosäuren oder Peptidsequenzen bei der Syntheseplanung mit einzuarbeiten. Aufgrund der gescheiterten Makrolaktonisierungsversuche sollte der Ringschluss durch Makrolaktamisierung erreicht werden.^[116]

Als Startpunkt für die Synthese bot sich der bereits synthetisierte racemische β -Hydroxythioester **75** an. Die stereoselektive Synthese der β -Hydroxyderivate, mittels Evans-*anti*-Aldol, erwies sich bereits (Kap. 4.3.4, Schema 17), aufgrund niedriger Ausbeute (24%) und Selektivität (Isomerenverhältnis 13:4), als nicht praktikabel.

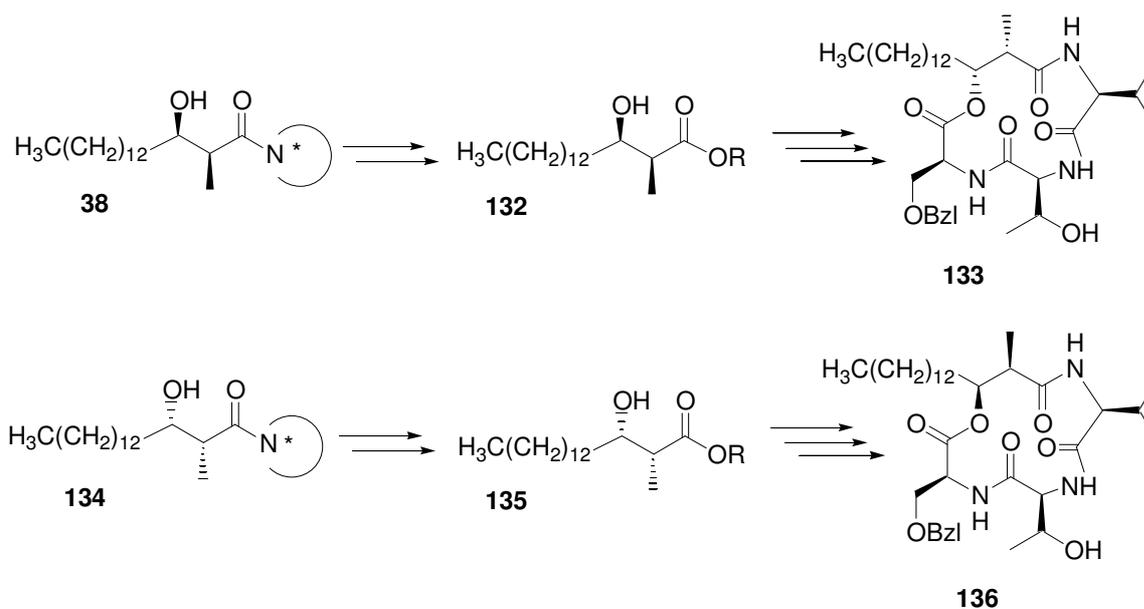
Nach Kupplung einer Aminosäure (**126**) an den Ester **75** sollte das dadurch erhaltene Diastereomergemisch **127** durch Chromatographie voneinander trennbar sein. Durch Verlängerung der Peptidsequenz, Spaltung der Schutzgruppen und anschließender Makrolaktamisierung wären damit gleich zwei Stevastelinderivate (**130** und **131**) effizient zugänglich (Schema 21).

4. Spezieller Teil



Schema 21: Synthesestrategie.

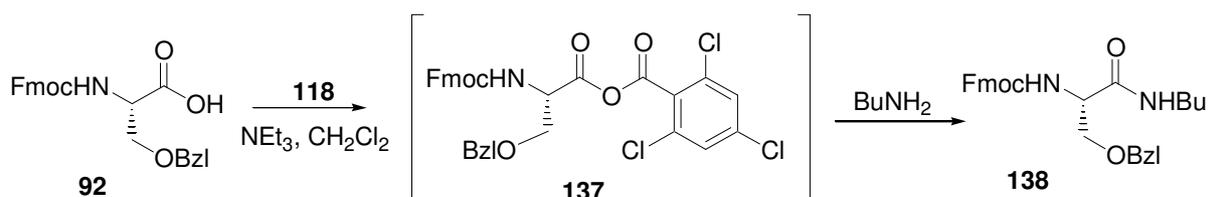
Durch etablierte *syn*-Aldolchemie, wie bereits zur Darstellung der Stearinsäure **43** durchgeführt, anschließende Abspaltung des Auxiliars und erneute Schützung, bietet sich ebenfalls ein effizienter Zugang zu zwei weiteren isomeren Säurebausteinen (**132** und **135**), die nach oben beschriebener Strategie zu den Zielverbindungen **133/136** umgesetzt werden können (Schema 22).



Schema 22: Synthese weiterer Säurebausteine und daraus folgende Zielmoleküle.

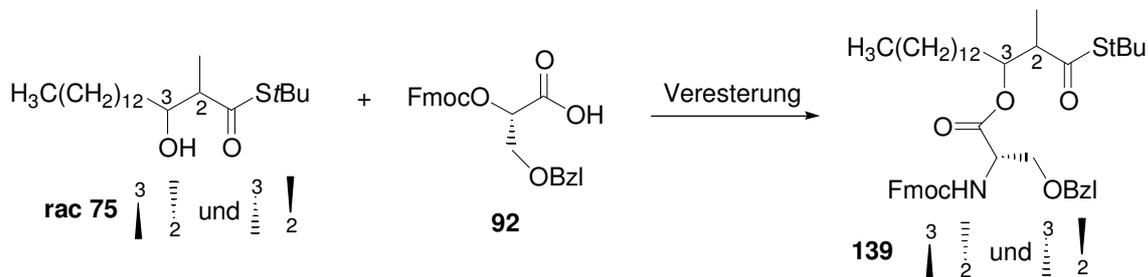
4.5.3 Synthese zyklischer Stevastelinanaloga

Im ersten Schritt der Synthese sollte der Thioester **75** mit Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**92**) zum Serinester **139** umgesetzt werden. Hiefür wurden zunächst die Kupplungsreagenzien DIC (**120**)/HOBt (**80**) zur Aktivierung der Säurekomponente **92** eingesetzt. Allerdings konnte auch nach 24 Stunden Reaktionszeit keinerlei Umsetzung festgestellt werden. Da diese Kombination zur Aktivierung offensichtlich nicht ausreichte um die beiden Komponenten **76** und **92** zu verknüpfen, sollten im Folgenden stark aktivierende Kupplungsreagenzien die bereits bei der Laktonisierung Anwendung fanden benutzt werden. Der Einsatz von 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (**118**) führte zwar zur Bildung des Produktes, allerdings waren die Ausbeuten sehr gering. Um sicherzustellen, dass auch hier nicht die Aktivierung der Acylkomponente der Grund der geringen Umsetzung war, wurden nach Aktivierung der Säure **92** einige Mikroliter der Reaktionslösung entnommen und mit Butylamin versetzt. Das gebildete Amin **138** belegte eindeutig die Bildung des reaktiven gemischten Anhydrids **137** (Schema 23).



Schema 23: Nachweis des reaktiven Anhydrids **137** durch Abfangen mit Butylamin.

Offensichtlich musste somit die geringe Reaktivität der Hydroxyfunktion für die problematische Umsetzung verantwortlich sein. In einem weiteren Versuch wurde die Veresterung der beiden Fragmente unter Steglich-Bedingungen mittels Diisopropylcarbodiimid (**120**) und Dimethylaminopyridin (**119**) in Dichlormethan durchgeführt.^[117] Hier konnte bereits im ersten Versuch ein Umsatz von nahezu 50% erreicht werden. Nach weiterer Optimierung konnte das Produkt **139** als Diastereomergemisch in hohen Ausbeuten (82%) isoliert werden. Es war allerdings nicht möglich, wie zunächst geplant, auf dieser Stufe die beiden synthetisierten Isomere mittels Chromatographie voneinander zu trennen (Schema 24).



Versuch	Reagenzien	Ausbeute
1	EDC, HOBT, (iPr) ₂ NEt, CH ₂ Cl ₂	-
2	2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid NEt ₃ , DMAP, THF/Toluol 10:1	>10 %
3	DIC, DMAP, CH ₂ Cl ₂	82 %

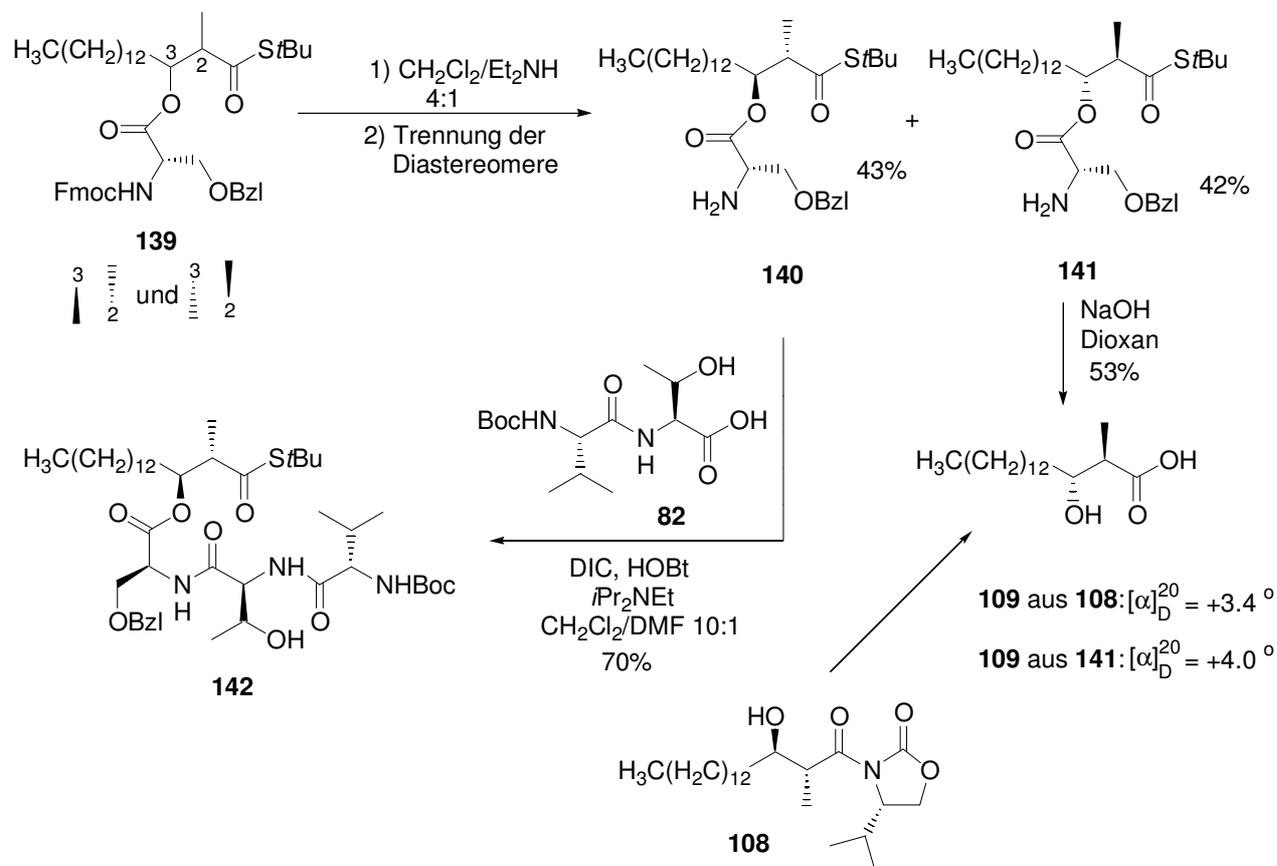
Schema 24: Veresterung der beiden Fragmente **75** und **92**.

Um die Peptidsequenz aufzubauen, musste zuvor die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten werden. Während die Schutzgruppe bei der Festphasensynthese unter basischen Bedingungen, mittels einer 20%igen Lösung von Piperidin in Dimethylformamid gespalten wurde (siehe

4. Spezieller Teil

oben),^[118] sollte in Lösung Dichlormethan statt Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet werden. Nach Spaltung der Fmoc-Gruppe war es nun auch möglich, die beiden Diastereomere voneinander zu trennen und mit einer Gesamtausbeute von 71 % zu isolieren. In einer zweiten Variante wurde Diethylamin als Base verwendet. Nach dreimaliger Koevaporation mit Toluol konnte hier eine Gesamtausbeute von über 80 % erreicht werden (Schema 25). Zur eindeutigen Charakterisierung der Isomere bezüglich der Stereozentren des Fettsäurefragments wurden einige Milligramm eines Diastereomeres (**141**) zur 3-Hydroxy-2-methyl-hexadecansäure (**109**) hydrolisiert. Durch anschließenden Vergleich des Drehwertes mit dem der bereits bekannten (3*R*,2*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecansäure (**109**), konnte die generierte Säure und damit Verbindung **140** und **141** eindeutig charakterisiert werden (Schema 25).

Im Folgenden wurde eines der beiden Diastereomere (**140**) weiter umgesetzt, um die Synthese voranzutreiben und zu etablieren. Die unter Standardbedingungen durchgeführte Kupplung des Dipeptids **82** mittels Diisopropylcarbodiimid (**120**) und Hydroxybenzotriazol (**80**) lieferte das Derivat **142** in 70% Ausbeute (Schema 25).

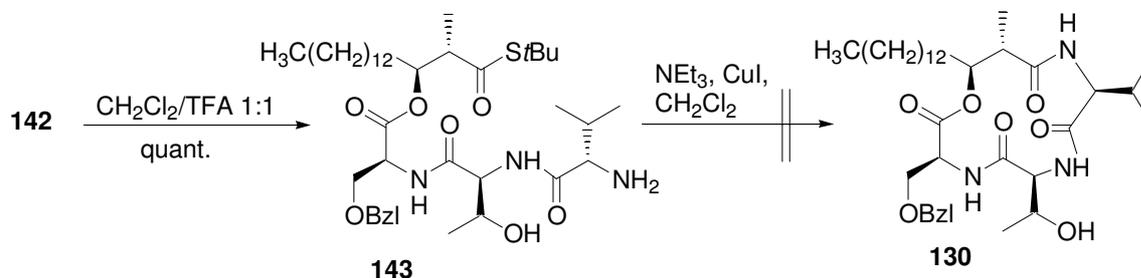


Schema 25: Spaltung der Schutzgruppe und Kupplung des Dipeptids **82**.

4. Spezieller Teil

In der Literatur sind einige Synthesen beschrieben, bei denen Thioester direkt als reaktive Derivate zur Amidknüpfung eingesetzt worden sind.^[119, 120] So konnten beispielsweise unter Kupfer(I)-vermittelter Reaktion zwei Peptidfragmente in nur 30 Minuten mit 85% Ausbeute gekuppelt werden.^[120]

Gleichermaßen könnte es damit auch möglich sein, den Thioester **142** nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe direkt zur Zyklisierung zum Makrozyklus **130** einzusetzen. So wurde zunächst die Schutzgruppe unter sauren Bedingungen mittels Trifluoressigsäure abgespalten und das entschützte Derivat **143** entsprechend der Literatur Kupfer(I)-vermittelt umgesetzt.^[120] Allerdings konnte auch nach 24 Stunden keinerlei Umsetzung beobachtet werden, so dass das Edukt **143** nahezu quantitativ zurückgewonnen werden konnte (Schema 26).

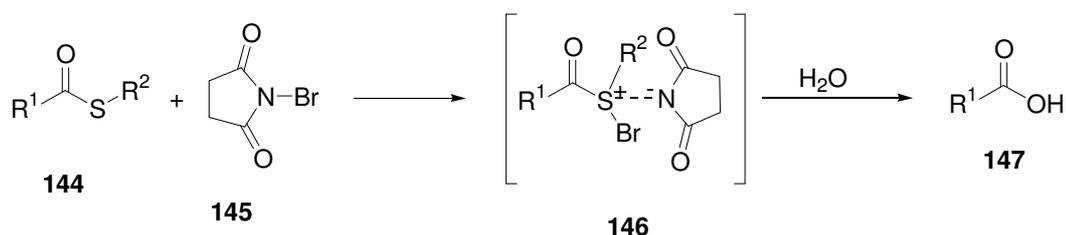


Schema 26: Kupfer(I)-vermittelter Makrolaktamisierungsversuch.

Da diese Methode wahrscheinlich aufgrund zu geringer Reaktivität des Thioesters **143** nicht zum gewünschten Produkt führte, sollte im Folgenden das Derivat **142** am C- und N-Terminus entschützt werden, um dann mittels wohletablierter Makrolaktamisierungsmethoden in das Zielprodukt **130** überführt zu werden. Für die Spaltung von Thioestern stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung.^[121, 122] Im vorliegenden Fall sollte die Spaltung zur freien Säure ohne Beeinträchtigung der Ester- bzw. Amidbindungen durchgeführt werden. Bei der wohl am häufigsten eingesetzten Methode zur Spaltung von Thioestern verwendet man Quecksilber- oder Silbersalze.^[121] Im Hinblick auf die nachfolgenden biologischen Tests wurde aber aufgrund der hohen Toxizität dieser Salze auf eine andere Methode zurückgegriffen. Hierbei verwendet man *N*-Bromsuccinimid (NBS, **145**) mit Wasser als Nucleophil.^[123] Die Hydrolyse verläuft dabei über ein Bromosulfoniumsuccinimid-Intermediat **146**, welches bei Raumtemperatur für einige Stunden stabil ist. Das in der Reaktionslösung vorhandene Wasser fängt das Intermediat **146** ab und reagiert damit letztlich zur Säure **147** ab. Natürlich können auch Alkohole oder Amine als Nucleophil

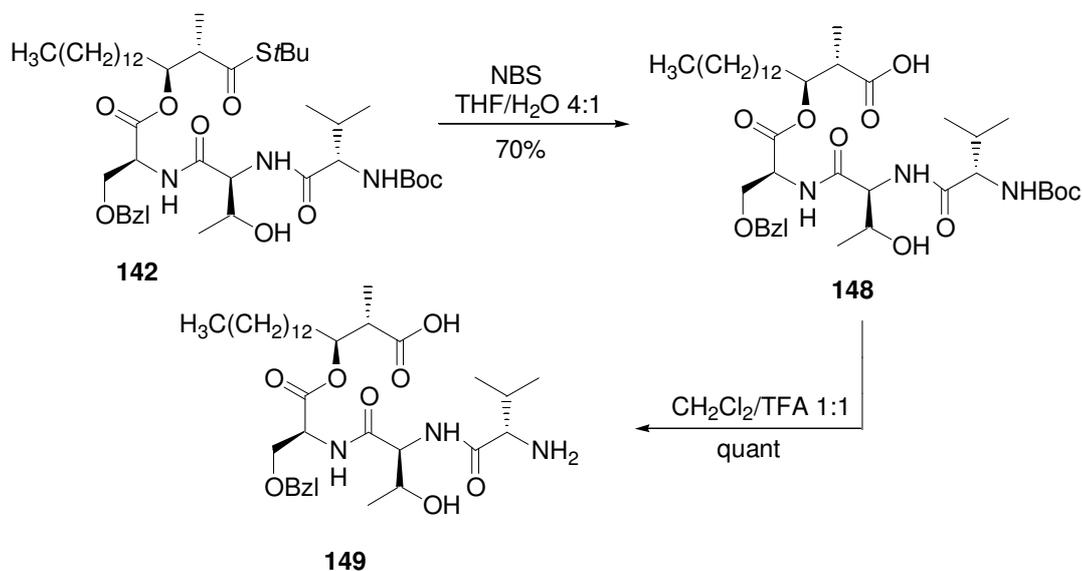
4. Spezieller Teil

verwendet werden, so dass diese Methode auch zur Veresterung bzw. Amidknüpfung genutzt werden kann (Schema 27).



Schema 27: Spaltung von Thioestern **144** mit NBS (**145**).

Mit diesem Verfahren wurde zunächst die geschützte Verbindung **142** in hohen Ausbeuten und selektiv in die freie Säure **148** überführt. Die anschließende Spaltung der Boc-Schutzgruppe am *N*-Terminus lieferte schließlich den Zyklisierungsvorläufer **149** mit quantitativem Umsatz (Schema 28).



Schema 28: *C*- und *N*-terminale Entschützung der Verbindung **142**.

Wie auch für die bereits beschriebene Makrolaktonisierung steht für die Makrolaktamisierung eine große Zahl verschiedener Methoden zur Verfügung. So finden auch hier Reagenzien wie 2-Chlor-*N*-methylpyridiniumiodid (**124**) oder BOP-Cl (**125**) Anwendung.^[124, 125]

4. Spezieller Teil

Weiterhin werden Aktivestermethoden benutzt, die beispielsweise über *N*-Hydroxysuccinimidester **150**, *para*-Nitrophenylester **151** oder Pentafluorophenylester **152** verlaufen (Abbildung 20).^[126, 127, 128]

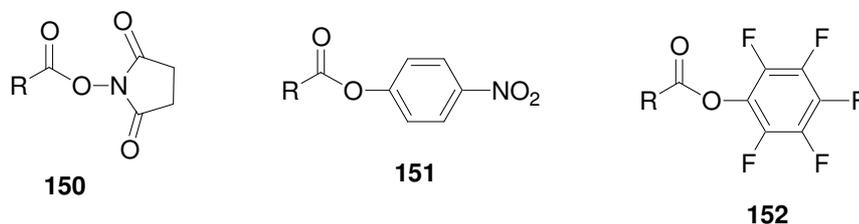


Abbildung 20: Verschiedene Aktivester.

Zunächst wurden aber Reagenzien untersucht, die sich bei der Zyklisierung von Zyklopeptiden bewährt hatten. Zur Vermeidung intermolekularer Reaktionen wurden generell alle Reaktionen unter Hochverdünnungsbedingungen durchgeführt d.h. Konzentration von ca. 1 mmol/l. Weiterhin wurde das Edukt über mehrere Stunden langsam zugetropft. Allerdings konnte die Bildung von Dimeren oder Trimeren nie ganz unterdrückt werden. Als erste Reagenzien wurden Benzotriazol-1-yloxytrispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) (**153**) und Diisopropylethylamin als Base verwendet.^[129] Die in Methylenchlorid und bei Raumtemperatur durchgeführte Reaktion lieferte das gewünschte Produkt nach Aufreinigung mittels HPLC mit maximal 11 % Ausbeute. Häufig findet vor allem bei schwierigen und anspruchsvollen Kupplungen auch das bei Raumtemperatur etwas instabilere PyAOP (7-Aza-benzotriazol-1-yloxytrispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (**154**)) Anwendung, welches einen OAt-Aktivester **155** bildet (Abbildung 21).^[130] Zusätzlich kann durch Zugabe von HOAt (1-Hydroxyazabenzotriazol) (**156**) die Bildung des Esters **155** noch beschleunigt werden. Hierbei konnte nun bei gleicher Durchführung wie zuvor die Ausbeute des Ringschlusses auf 16% gesteigert werden (Tabelle 4).

Erst die Verwendung des bereits vielfach bei der Festphasensynthese der azyklischen Analoga benutzten HBTU (**96**) in Kombination mit Hünig-Base konnte die Ausbeute noch weiter steigern. Die in einem Gemisch von Methylenchlorid und Dimethylformamid (10:1) durchgeführte Laktamisierung lieferte schließlich das Zielprodukt nach Optimierung mit 42% Ausbeute. Auch die bereits bei der Laktonisierung durchgeführte Reaktion nach Mukaijama mit 2-Chlor-*N*-methylpyridiniumiodid (**124**) als Reagenz konnte die Ausbeute nicht verbessern. Sämtliche Zyklisierungsreaktionen sind in Tabelle 4 nochmals zusammengefasst.

4. Spezieller Teil

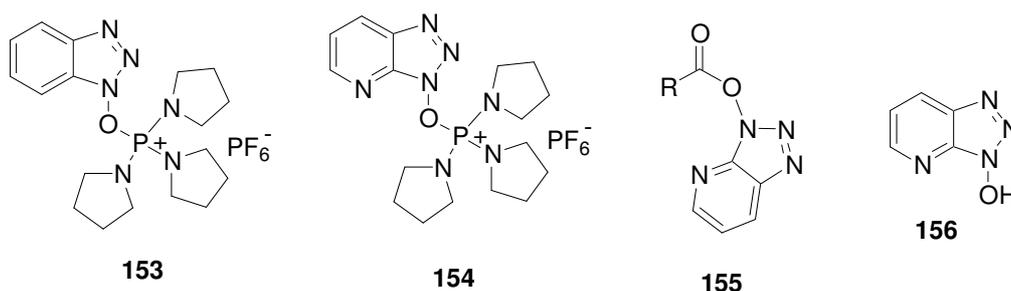
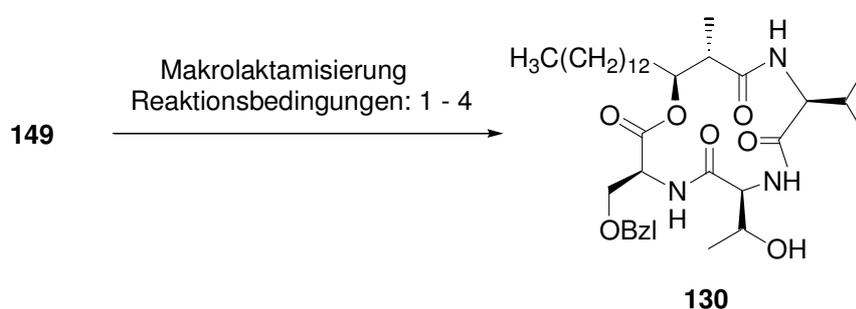


Abbildung 21: Kupplungsreagenzien und Aktivester.



Reaktion	Reagenzien und Bedingungen	Ausbeute
1	PyBOP (153), (<i>i</i> Pr) ₂ NEt, CH ₂ Cl ₂ , RT, Zugabe über 3 h	11%
2	PyAOP (154), HOAt (156), (<i>i</i> Pr) ₂ NEt, CH ₂ Cl ₂ , RT, Zugabe über 3 h	16%
3	HBTU (96), (<i>i</i> Pr) ₂ NEt, CH ₂ Cl ₂ /DMF 10:1, RT, Zugabe über 3 h	42%
4	2-Chlormethylpyridiniumchlorid (124), NEt ₃ , CH ₂ Cl ₂ , RT, Zugabe über 3 h	12%

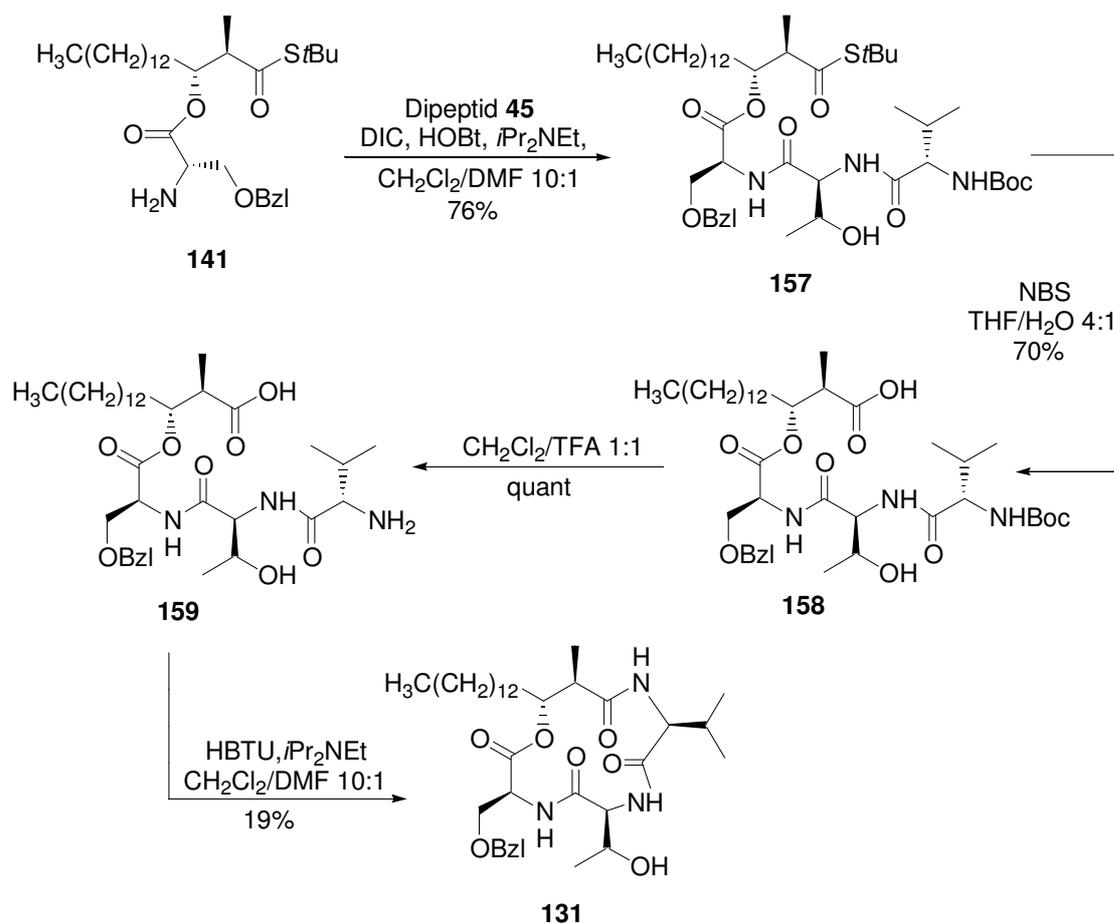
Alle Reaktionen wurden unter Hochverdünnungsbedingungen 10⁻³ M durchgeführt

Tabelle 4: Ergebnisse der Makrolaktamisierungsreaktionen.

Generell konnte bei allen Methoden zusätzlich ein weiteres Diastereomer in geringen Mengen isoliert werden. Allerdings konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob das Isomer durch die Laktamisierungsreaktionen oder vielleicht schon zuvor, beispielsweise bei der Anknüpfung der ersten Aminosäure unter Steglich-Bedingungen (Schema 24), entstanden ist. Zumindest ist die Gefahr der Racemisierung bei Veresterungen mittels Dimethylaminopyridin (**119**) bekannt.^[131]

4. Spezieller Teil

Im weiteren sollte nun das zweite Diastereomer (**141**) umgesetzt werden. Hierbei wurde zunächst das Dipeptid **82** unter Standardbedingungen gekuppelt. Anschließend erfolgte die Spaltung des Thioesters **157** zur freien Säure **158** sowie die saure Hydrolyse zur Deblocierung des *N*-Terminus der Verbindung **158**. Der Ringschluss wurde dann mit der Reagenzkombination HBTU **96**/Hünig-Base durchgeführt (Schema 29).

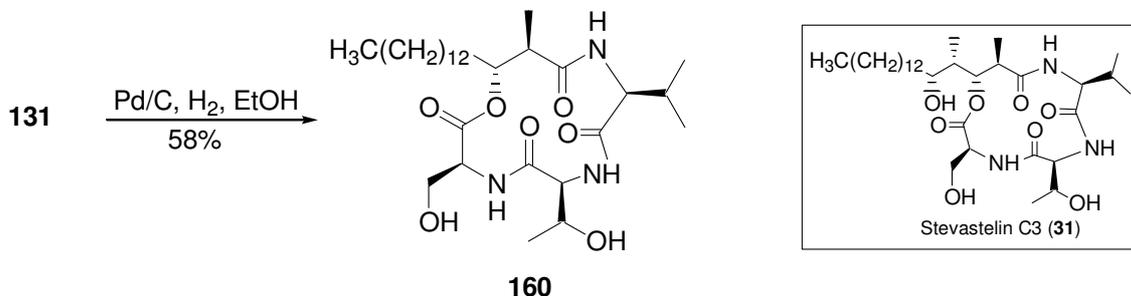


Schema 29: Synthese des zweiten Diastereomers **131**.

Um ein direktes Analogon zu dem Naturstoff Stevastelin C3^[63] **31** zu erhalten, wurde in diesem Fall der Benzylether der Threoninseitenkette zur freien Hydroxyfunktion gespalten. Dies sollte, bei der Darstellung des Dipeptids **82** beschrieben (Schema 10), durch Hydrogenolyse mit Palladium auf Kohle und Wasserstoff unter Normaldruck durchgeführt werden. Im Fall des Dipeptid **82**, konnte der Ester und der Benzylether gleichzeitig innerhalb von 90 Minuten mit quantitativen Umsatz gespalten werden, so dass das Produkt ohne Aufreinigung in hoher Reinheit erhalten wurde. Die Spaltung des Benzylethers von Verbindung **131** verlief jedoch sehr viel langsamer, so dass auch nach 24 Stunden nur ein

4. Spezieller Teil

geringer Anteil umgesetzt war. Da auch nach 7 Tagen kein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte, wurde die Reaktion abgebrochen und das gewünschte Produkt (**160**) nach HPLC mit einer Ausbeute von 58% isoliert (Schema 30).

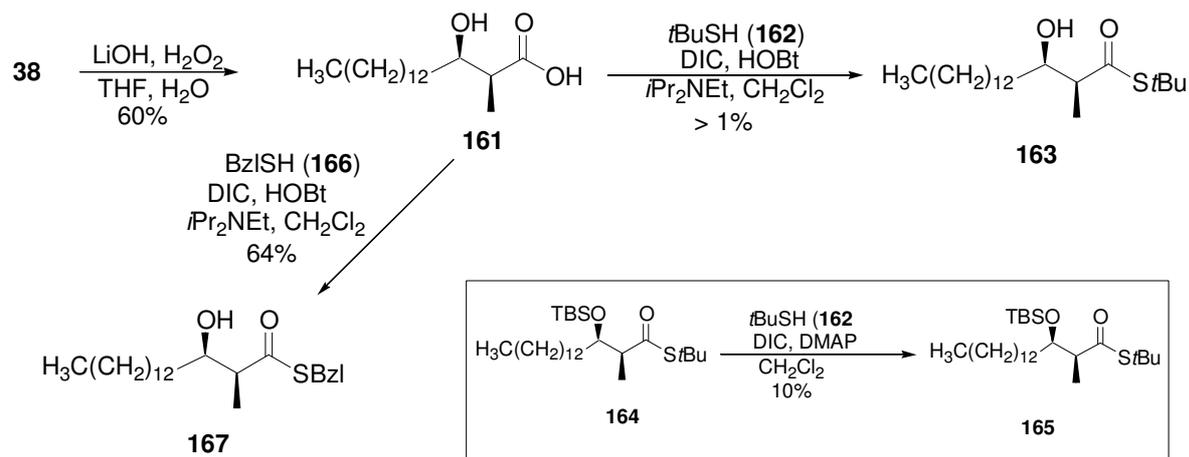


Schema 30: Darstellung des Analogon **160**.

Für die Synthese der weiteren isomeren Stevastelinanaloga mussten zunächst die beiden Säurederivate **132** und **135** (Schema 22) dargestellt werden. Hierbei wurde das bereits für die Darstellung der natürlichen Säure **43** synthetisierte Oxazolidinon **38** direkt eingesetzt. Die Abspaltung des chiralen Auxiliars auf dieser Stufe und die erneute Schützung der Carboxylgruppe waren notwendig, da nach bewährter und etablierter Synthesestrategie im weiteren Verlauf die Veresterung und der Aufbau der Peptidsequenz durchgeführt werden sollten. Danach wäre die Spaltung des Auxiliars nicht mehr selektiv oder nur sehr schwierig zu bewerkstelligen gewesen. Die Spaltung erfolgte mittels Lithiumhydroxid und Wasserstoffperoxid in einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Wasser (3:1) (Schema 31). Für die anschließende Schützung der Carboxylgruppe sind in der Literatur eine große Anzahl verschiedener Möglichkeiten bekannt.^[96] Im Regelfall überführt man die Säure in verschieden substituierte Methyl-, Ethyl-, Benzyl- oder Silylester sowie verschiedene Amide oder Hydrazide. Da aber im Zielmolekül auch Ester- bzw. mehrere Amidbindungen vorliegen, sollte die Abspaltung der Schutzgruppe sehr selektiv durchführbar sein. Da sich bereits der *tert*-Butylthioester, der durch die *anti*-Aldolreaktion zugänglich gemacht wurde, auch als Schutzgruppe bewährt hatte, dessen Spaltung hochselektiv in hohen Ausbeuten mit *N*-Bromsuccinimid (**145**) bewerkstelligt werden konnte, sollte im Folgenden die Säure **161** nun als *tert*-Butylthioester blockiert werden. So wurde Verbindung **161** direkt mit *tert*-Butylmercaptan **162** durch Aktivierung mittels Diisopropylcarbodiimid (**120**) und Hydroxybenzotriazol (**80**) umgesetzt (Schema 31). Allerdings konnte auch nach 24 Stunden Reaktionszeit kaum eine Umsetzung zum Thioester **163** festgestellt werden. Der Grund dafür

4. Spezieller Teil

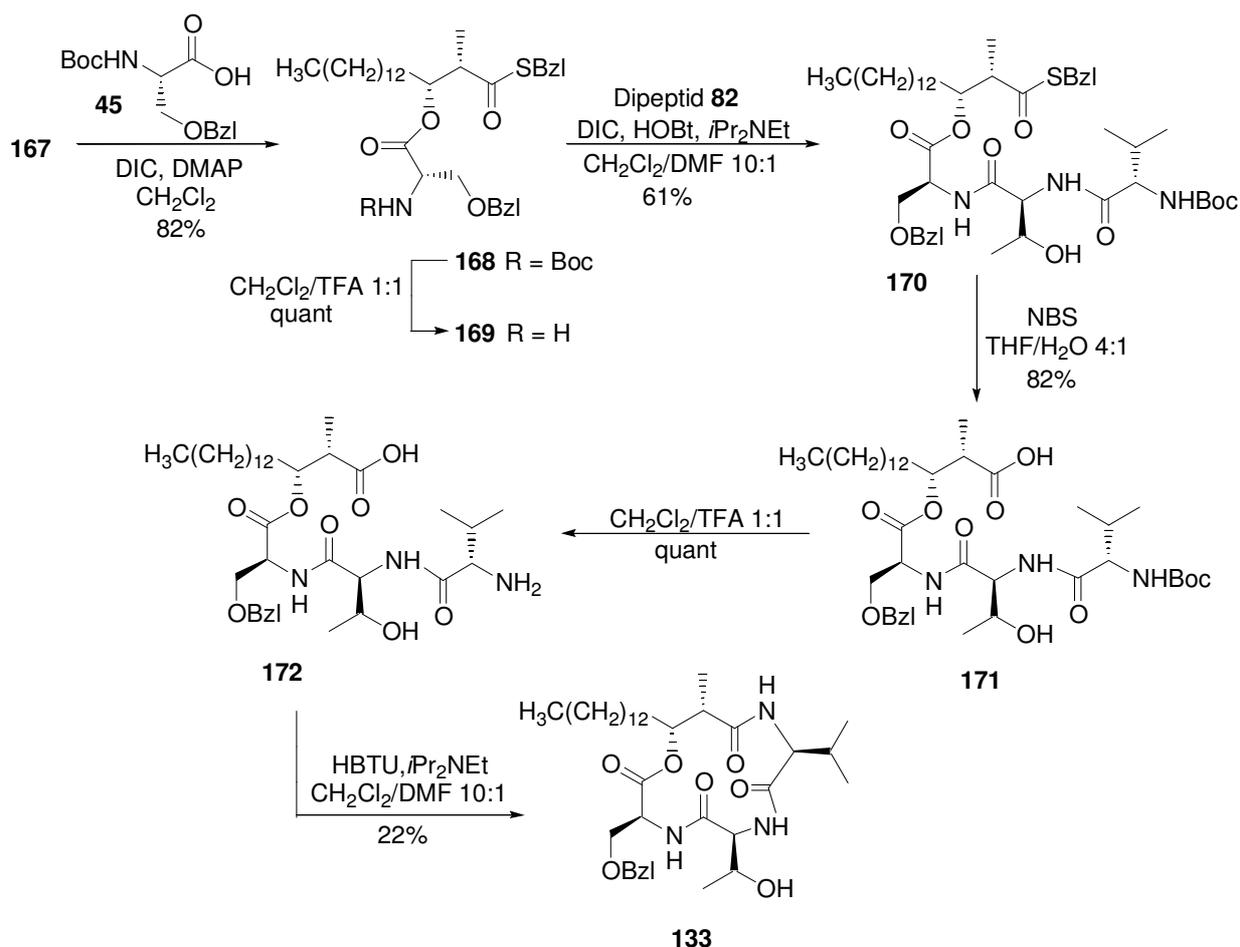
könnte im sterischen Anspruch der *tert*-Butylgruppe liegen. In einer Testreaktion mit der TBS-geschützten Säure **164** konnte gezeigt werden, dass auch stärkere Aktivierungsreagenzien die Ausbeute nur gering verbessern (Schema 31). Ein weiterer Versuch - allerdings mit dem sterisch wenig anspruchsvollen Benzylmercaptan **166** - lieferte den Benzylthioester **167** mit 64% Ausbeute. So konnte die Einführung im Fall des zweiten *syn*-Diastereomers **179** im späteren Verlauf auf über 80% gesteigert werden (Schema 33).



Schema 31: Einführung der Thioschutzgruppe.

Da bekanntermaßen Benzylthioester im Vergleich zu *tert*-Butylthioestern sehr viel basenlabiler sind, musste die Schutzgruppenstrategie im weiteren Verlauf modifiziert werden. Das für die weitere Veresterung eingesetzte Fmoc-geschützte Serin (**92**) wurde gegen Boc-*O*-Benzyl-L-Serin (**45**) ersetzt, so dass die Schutzgruppe nach Kupplung der Aminosäure **45** nunmehr unter sauren Bedingungen in quantitativer Umsetzung entfernt werden konnte (Schema 31). Die Verlängerung der Peptidsequenz wurde, wie beschrieben, unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Spaltung des Thiobenzylester **171** mittels *N*-Bromsuccinimid (**145**) zur Säure **170** gelang selektiv in über 80% Ausbeute. Die anschließende erneute Abspaltung der Boc-Schutzgruppe sowie die Zyklisierung lieferten schließlich das dritte diastereomere zyklische Analogon **133** (Schema 32).

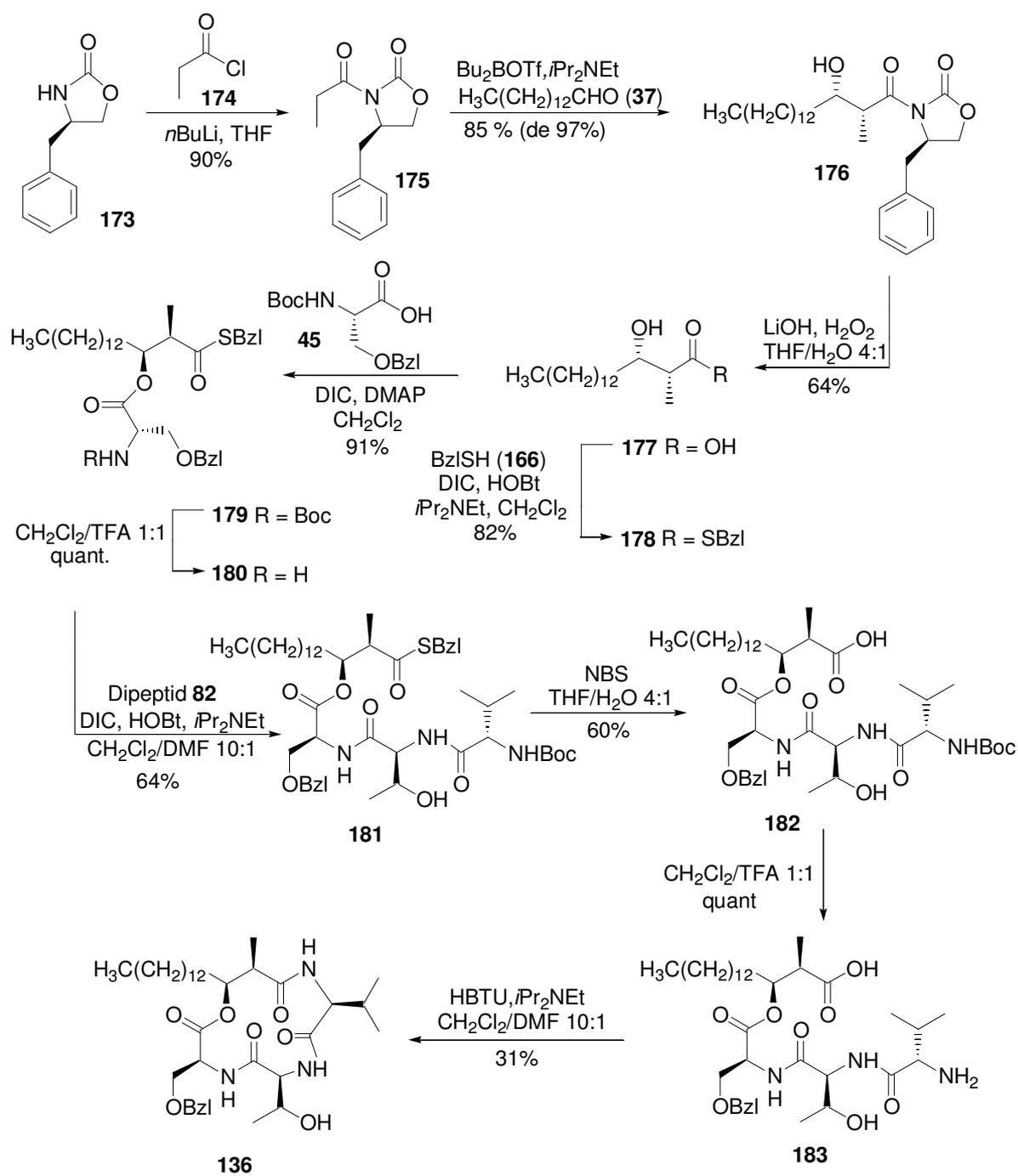
4. Spezieller Teil



Schema 32: Synthese des zyklischen Stevastelinanalogon **133**.

Für die Synthese des vierten diastereomeren Makrozyklus **136** musste das notwendige Säurefragment ausgehend von Myristinaldehyd (**37**) synthetisiert werden. Hierzu wurde zunächst das (*R*)-Oxazolidinon **173** mit Propionylchlorid (**174**) zum propionylierten Evans-Auxiliar **175** umgesetzt (Schema 33).^[85] Die folgende *syn*-Aldolreaktion lieferte das Oxazolidinonderivat **174**, welches nun nach bekannter Methode in die freie β -Hydroxysäure **177** überführt und wie zuvor zum Thiobenzylester **178** mit 84% Ausbeute umgesetzt wurde (Schema 33). Nach wohletablierter Strategie konnte dann die erste Aminosäure **45** angeknüpft und nach Abspaltung der Schutzgruppe um das Dipeptid **82** verlängert werden. Die Freisetzung des *C*- sowie des *N*-Terminus zum Zyklisierungsvorläufer **183** gelang glatt. Abschließend wurde das Analogon **136** nach Laktamisierung mit einer Gesamtausbeute von 5% nach Aufreinigung mittels HPLC über 10 Stufen ausgehend von Aldehyd **37** isoliert (Schema 33).

4. Spezieller Teil



Schema 33: Synthese des zyklischen Stevastelinanalogon **136**.

4.6 Durchführung der biologischen Assays: Teil II

Wie zuvor die azyklischen Derivate **91**, **98-107** wurden auch die zyklischen Vertreter in einem *in vitro* Inhibitions-Assay gegen die verschiedenen Protein-Phosphatasen getestet.

4.6.1 *In vitro* Inhibition und Strukturwirkungsbeziehung

Zunächst wurden die Analoga **130** und **131**, **133** und **136** sowie **160** gegen die dual spezifische Phosphatase VHR getestet. Wiederum zeigten alle Vertreter inhibitorische Aktivität, wobei die IC₅₀-Werte mit 6.5 bis 56 µM durchschnittlich um den Faktor 3 höher lagen, als die der offenkettigen Derivate, die sich im Bereich von 1.9 bis 18.5 µM bewegten. Schon hier deutet sich an, dass nun die Stereochemie des Säurefragments einen höheren Einfluss ausübt, als zuvor bei den azyklischen Derivaten. So liegen in dieser Reihe die beiden Derivate **130** und **131** mit *anti*-Anordnung der Methyl- und Hydroxygruppe im mittleren Bereich der Inhibitionswerte. Verbindung **133** mit *syn*-Anordnung (*2S,3R*) liegt um den Faktor 2 bis 3 tiefer und Derivat **136** (*2R,3S*) wiederum mit 56 µM um den Faktor 9 höher als **136** (Tabelle 5).

Der Einfluss der Stereozentren konnte im weiteren Verlauf der biologischen Untersuchungen weiterer Phosphatasen noch deutlicher belegt werden. So zeigten die beiden Analoga **130** und **131** keine weitere Aktivität gegen die noch getesteten Protein-Phosphatasen, im Gegensatz zu den drei anderen Vertretern. Sie erwiesen sich somit als hochselektive Inhibitoren der dual spezifischen Phosphatase VHR. Verbindung **160**, die durch Spaltung des Benzylethers der Threoninseitenkette als direktes Analogon zum Naturstoff Stevastelin C3 (**31**) aus **131** generiert wurde, zeigte zusätzlich und zwar als einziger Vertreter der zyklischen Verbindungen Inhibition gegen die zweite getestete dual spezifische Phosphatase Cdc25A. Somit führte die Entfernung der Benzylgruppe und Freisetzung des Alkohols am Threonin zum Verlust von Selektivität. Die beiden Analoga mit *syn*-Anordnung der Substituenten des Ketids erwiesen sich weiterhin als Inhibitoren der beiden Tyrosin-Phosphatasen PTP1B und *Mt*PTPA. Wiederum zeigte sich auch hier das Derivat **133** als um den Faktor 9 potenterer Inhibitor im Vergleich zu **136**. Dies bestätigt die obige Aussage (Tabelle 5).

Keine der Verbindungen erwies sich als Inhibitor der Phosphatase CD45. Gleichermäßen wurde die Serin-Threonin-Phosphatase PP1 nicht inhibiert. Damit zeichneten sich auch die

4. Spezieller Teil

drei zyklischen Depsipeptide **133**, **136** und **160** als in der Klasse der Tyrosinphosphatasen selektive Inhibitoren aus.

IC_{50} [μ M]						
Derivat	VHR	Cdc25A	PTP1B	MtPTPA	CD45	PP1
130	25.0±5.1	>100	>100	>100	>100	>100
131	12.2±0.6	>100	>100	>100	>100	>100
133	6.5±1.2	>100	11.3±2.9	8.8±5.9	>100	>100
136	56.0±13.3	>100	90.3±2.7	75.5±6.6	>100	>100
160	35.7±7.7	15.5±3.9	>100	>100	>100	>100

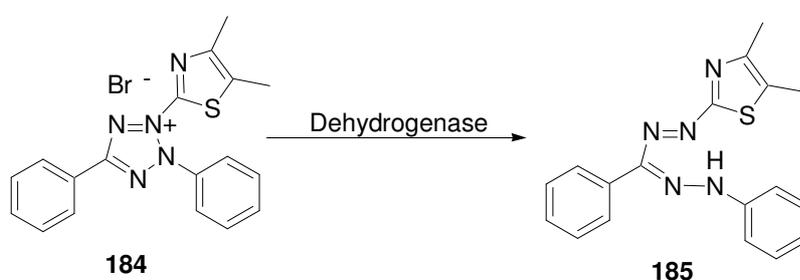
Tabelle 5: Inhibition der Phosphataseaktivität der zyklischen Stevastelinanaloge.

4.7 Durchführung der biologischen Assays: Teil III

Abschließend sollten alle synthetisierten Analoga in einem Zell-Assay auf ihre Aktivität *in vivo* getestet werden. Damit sollte die Membrangängigkeit und der Effekt der Inhibitoren auf Tumorzellen geprüft werden. Der Zytotoxizitätstest wurde mit der Zelllinie SW480,^[132] die aus einem primären Adenocarcinom des Dickdarmes stammt, in Zusammenarbeit mit Dr. Oliver Müller am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt.

4.7.1 *In vivo* Assay

Lebende Zellen nehmen das schwach gelbe Tetrazolium-Salz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) (**184**) auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen wasserunlöslichen Farbstoff (**185**) um (Schema 34).^[133] Für die photometrische Messung werden die alkohollöslichen Farbstoffkristalle durch Isopropanol aufgelöst. Da der im Medium PBS (phosphat buffered saline) vorhandene pH-Indikator Phenolrot die Messung beeinflussen würde, wird er mit Hilfe von wässriger Salzsäure gelb gefärbt, wodurch pH-Unterschiede aufgehoben werden und die Messung am wenigsten gestört wird.



Schema 34: Umsetzung des Farbstoffes MTT (**185**) durch lebenden Zellen.

Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Zahl und der metabolischen Aktivität der Zellen. Der Test kann zur quantitativen Zellzahlbestimmung oder als Zytotoxizitätstest eingesetzt werden, da alle Zellen gleich aktiv sind und nur lebende Zellen ein Signal abgeben. Generell wurden die Derivate in Dimethylsulfoxid gelöst, so dass zunächst der Einfluss des DMSOs auf die Zellen überprüft werden musste. Natürlich sollte der Gehalt an organischem Lösungsmittel so gering wie möglich gehalten werden, um das Wachstum der Krebszellen

dadurch nicht negativ zu beeinflussen. Allerdings war aus vorangegangenen Löslichkeitsstudien bekannt, dass der Gehalt an DMSO ein Minimum von 1 % nicht unterschreiten sollte, da sonst einige Verbindungen im Medium wieder präzipitieren würden. So wurden die Zellen mit einer 1%igen und 2%igen DMSO-Lösung versetzt, und wie im späteren Test auch, 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von 2% des organischen Lösungsmittels eine Hemmung der Vitalität der Krebszellen zur Folge hat. Glücklicherweise konnte bei der 1%igen Lösung kein Einfluss festgestellt werden.

Die in einer Mikrotiterplatte mit einer Dichte von 10^4 Zellen pro 100 μl Medium ausgepflanzten Krebszellen, wurden zur Bestimmung der IC_{50} -Werte mit jeweils 100 μl der verschiedenen Inhibitorlösungen von 0 bis 100 μM versetzt. Diese wurden zuvor in einer zweiten Mikrotiterplatte auf die jeweils notwendige Konzentration mit Medium verdünnt und anschließend zu den Zellen gegeben.

4.7.2 Ergebnisse der *in vivo* Tests

Die zuvor im *in vitro* Inhibitions-Assay der Protein-Phosphatase Cdc25A als potente Inhibitoren (teilweise im einstelligen mikromolaren Bereich) identifizierten offenkettigen Derivate **91** sowie **98-107**, zeigten im Zellassay keine oder nur schwache Hemmung des Wachstums der Krebszellen. In dieser Reihe konnte einzig die Verbindung **101** als moderater Inhibitor identifiziert werden. Mit einem IC_{50} -Wert von 69.0 μM lag dieser nun um ein Vielfaches über dem zuvor im *in vitro* Inhibitions-Assay bestimmten Wert, der unter 4 μM lag (Tabelle 6). Diese Ergebnisse deuten auf eine schlechte Membranpermeabilität hin. Vor allem der stark polare Charakter der Peptidsequenzen, mit freier Säurefunktion am C-Terminus der azyklischen Analoga ist sehr wahrscheinlich ausschlaggebend für die geringe Membrandurchlässigkeit. So zeichnet sich auch beispielsweise Stevastelin A (**26**) mit einer stark polaren Sulfonsäure-Einheit an der Threoninseitenkette zwar als potenter Inhibitor *in vitro* aus, zeigte jedoch *in vivo* keine Aktivität. Daher sollte durch Maskierung der polaren Säurefunktionen der Derivate (durch Veresterung oder Laktamisierung), wie im Fall der zyklischen Analoga **130**, **131**, **133** und **136** sowie **160**, eine deutlich bessere Membrandurchlässigkeit erzeugt werden. So zeigte zum Beispiel das zyklische Stevastelinanalogon **160**, mit einem IC_{50} -Wert unter 20 μM , starke Inhibition des Wachstums der Krebszellen, wobei dieser Wert nur geringfügig über dem des zuvor im Phosphatase-

4. Spezieller Teil

Inhibitions-Assays für Cdc25A bestimmten IC_{50} -Wertes lag. Dies lässt daher auf eine ausreichende Membranpermeabilität des zyklischen Analogons schließen. Ab einer Konzentration von 50 μM wurden nach 24 Stunden Inkubationszeit keine lebenden Zellen mehr gefunden.

Einen unerwarteten Verlauf zeigten dagegen die weiteren zyklischen Derivate **130**, **131** sowie **133** und **136** in dieser Reihe. Abbildung 22 und 23 zeigen die verschiedenen ermittelten Kurven mit dem charakteristischen Verlauf der Inhibition der vier Derivate am Beispiel von Verbindung **133** sowie der Verbindung **160**.

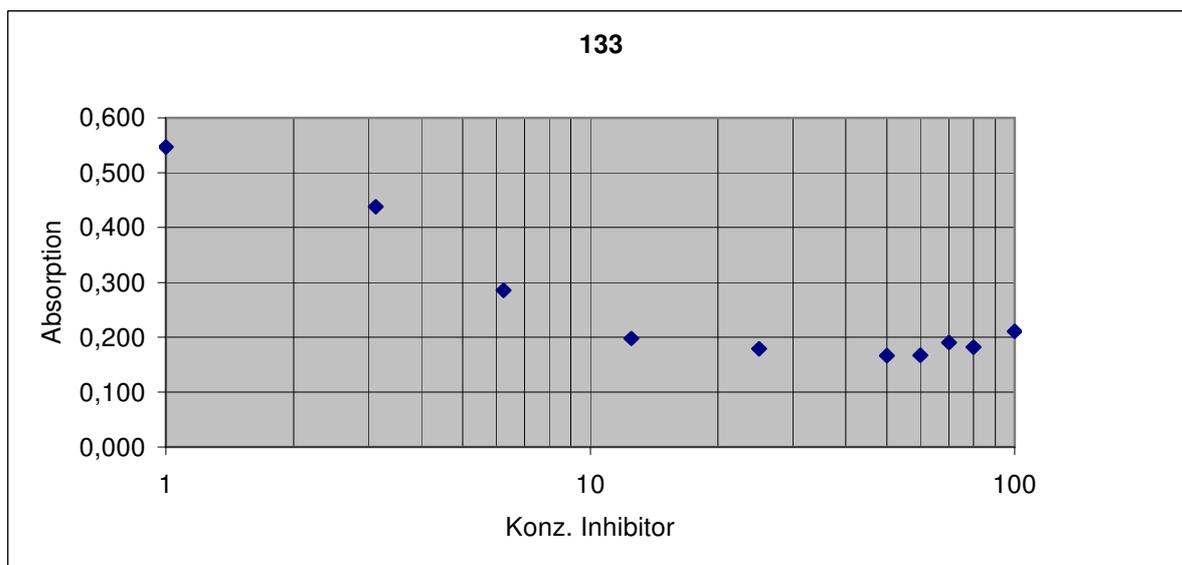


Abbildung 22: Verlauf der Kurve im Fall der Verbindung **133**.

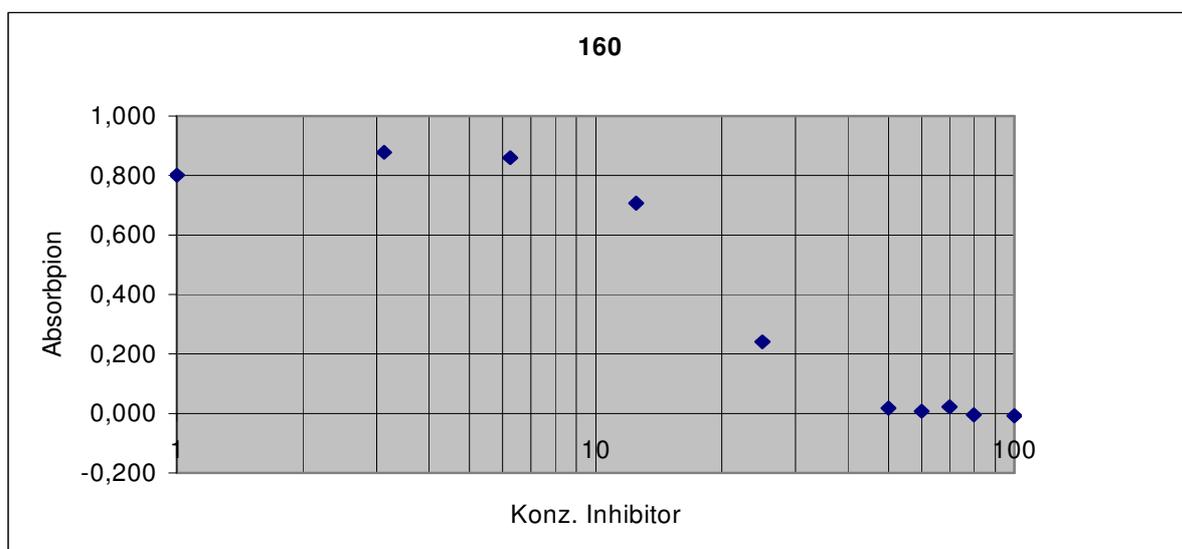


Abbildung 23: Verlauf der Kurve im Fall der Verbindung **160**.

4. Spezieller Teil

Die Derivate zeichneten sich durch einen frühen Wirkungseintritt mit starker Hemmung des Wachstums der Krebszellen, bis zu einem Konzentrationsbereich von 10-20 μM , aus. Allerdings erfolgte bei höheren Inhibitorkonzentrationen kein weiterer Abfall der Vitalität der Zellen. Da die Verbindungen **130**, **131** sowie **133** und **136** zuvor im *in vitro* Assay keinen Einfluss auf die Phosphatase Cdc25A zeigten, beruht die Hemmung des Zellwachstums sehr wahrscheinlich nicht auf der Inhibition der Protein-Phosphatase. Vermutlich ist die Hemmung der Krebszellen auf zusätzliche wachstumshemmende Faktoren der Analoga zurückzuführen. Allerdings konnte dies nicht bewiesen werden. Die Ergebnisse des Zelltests sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

SW480									
Derivat	91	98	99	100	101	102	103	104	105
IC ₅₀ [μM]	>100	>100	>100	>100	69.0 \pm 2.8	>100	>100	>100	>100
Derivat	106	107	130	131	133	136	160		
IC ₅₀ [μM]	>100	>100	14.6 \pm 5.6	11.0 \pm 0.4	9.9 \pm 0.8	15.8 \pm 3.6	19.2 \pm 1.1		

Tabelle 6: Zytotoxizitätsassay mit SW480 Dickdarmkrebszellen.

Fazit:

Mit Hilfe der durchgeführten biologischen Tests, konnten die verschiedenen strukturellen Parameter der Stevasteline geklärt und das Potential der synthetisierten Analoga als Phosphataseinhibitoren belegt werden. Einige Vertreter zeichnen sich durch starke Inhibition im einstelligen mikromolaren Bereich, im Fall der Phosphatase PTP1B sogar unter 1 μM , aus. Weiterhin erwiesen sich zwei Analoga als potente, besonders aber als hochselektive Inhibitoren der dual spezifischen Phosphatase VHR. Im abschließenden Zell-Assay mit SW480 Dickdarmkrebszellen konnten zwei Derivate als zytotoxisch identifiziert werden. Des weiteren zeigten vier Substanzen eine zytostatische Wirkung.

Die wichtigsten Ergebnisse der Phosphatase- und des Zelltests:

- Die zyklische Struktur der Stevasteline ist nicht ausschlaggebend für die Inhibition von VHR. Auch azyklische Vertreter erwiesen sich als Inhibitoren der Phosphatase.
- Allerdings erfolgt beim Übergang zu offenkettigen Derivaten Selektivitätsverlust. Dennoch werden vermutlich Serin-Threonin-Phosphatasen nicht inhibiert, wie im Fall der Phosphatase PP1 belegt werden konnte.
- Die Anzahl der Stereozentren sowie die Stereochemie des Fettsäurefragments der azyklischen Verbindungen spielt keine bzw. nur eine geringe Rolle. Wichtiger erscheint hierbei die Länge der Fettsäurekette.
- Aromatische Gruppen in der Peptidsequenz beeinflussen die Inhibition positiv. Insbesondere Analoga mit Tyrosin erwiesen sich als potente Inhibitoren.
- Nur ein Vertreter mit Asparaginsäure in der Sequenz inhibierte die PTP CD45.
- *In vivo* zeigten die azyklischen Vertreter keine bzw. nur schwache Aktivität. Ausschlaggebend hierfür ist die geringe Membranpermeabilität.
- Bei den zyklischen Verbindungen spielt die Stereochemie des Fettsäurefragmentes eine wichtige Rolle, bzgl. Aktivität aber auch Selektivität.
- Weiterhin konnte eine ausreichende Membrangängigkeit nachgewiesen werden. Eine Verbindung erwies sich als zytotoxisch. Vier Verbindungen zeigten eine zytostatische Wirkung.

5. Zusammenfassung

Seit Protein-Kinasen und -Phosphatasen als wichtige Regulatoren des Zellzyklus bzw. der mitogenen Signaltransduktion identifiziert werden konnten, deren Fehlfunktionen zu schweren Erkrankungen führen können, rückten diese ins Rampenlicht der Forschung. So sind beispielsweise Phosphatasen beim Auftreten von Krebs, Autoimmunerkrankungen, Infektionen oder Diabetes direkt involviert.

Die Naturstoffe aus der Familie der Stevasteline, die aus dem mikrobiologischen Metaboliten *Penicillium* sp. NK37486 isoliert wurden, konnten als potente Inhibitoren der dual spezifischen Phosphatase VHR identifiziert werden. Die einzelnen Vertreter unterscheiden sich hauptsächlich durch die Ringgröße und die Substituenten der Seitenkette des Threonins (Abbildung 24).

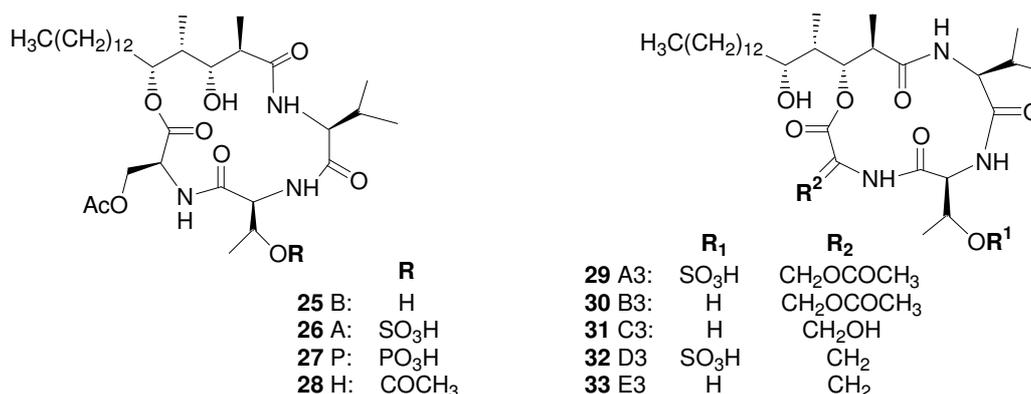


Abbildung 24: Strukturen der Stevasteline.

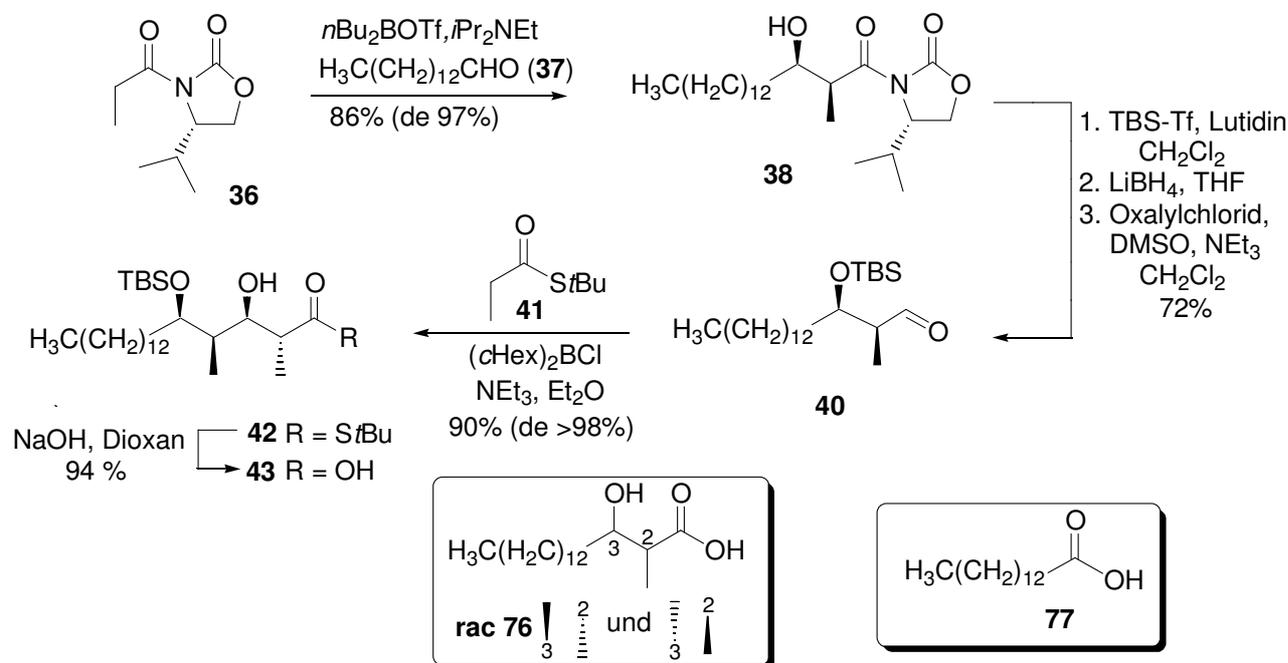
Die Naturstoffklasse der Stevasteline stellt nicht zuletzt aufgrund der vielfältigen Variationsmöglichkeiten einen exzellenten Startpunkt für die Synthese einer Substanzbibliothek dar. Eine der wichtigsten Aufgaben ist die Klärung der strukturellen Parameter für die inhibitorische Aktivität.

Ziel dieser Arbeit war daher, durch Variation verschiedener Strukturparameter Stevastelinanaloga zu synthetisieren und deren Einfluss auf die Aktivität zu untersuchen. Mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Assays sollten die potentiellen Phosphatase-Inhibitoren evaluiert werden.

Um möglichst effizient verschiedene Parameter zu variieren und daraufhin den Einfluss bezüglich der Phosphataseaktivität zu klären, wurden zunächst azyklische Derivate generiert. Startpunkt war die Synthese verschiedener Fettsäuren. Als erster Baustein wurde die

5. Zusammenfassung

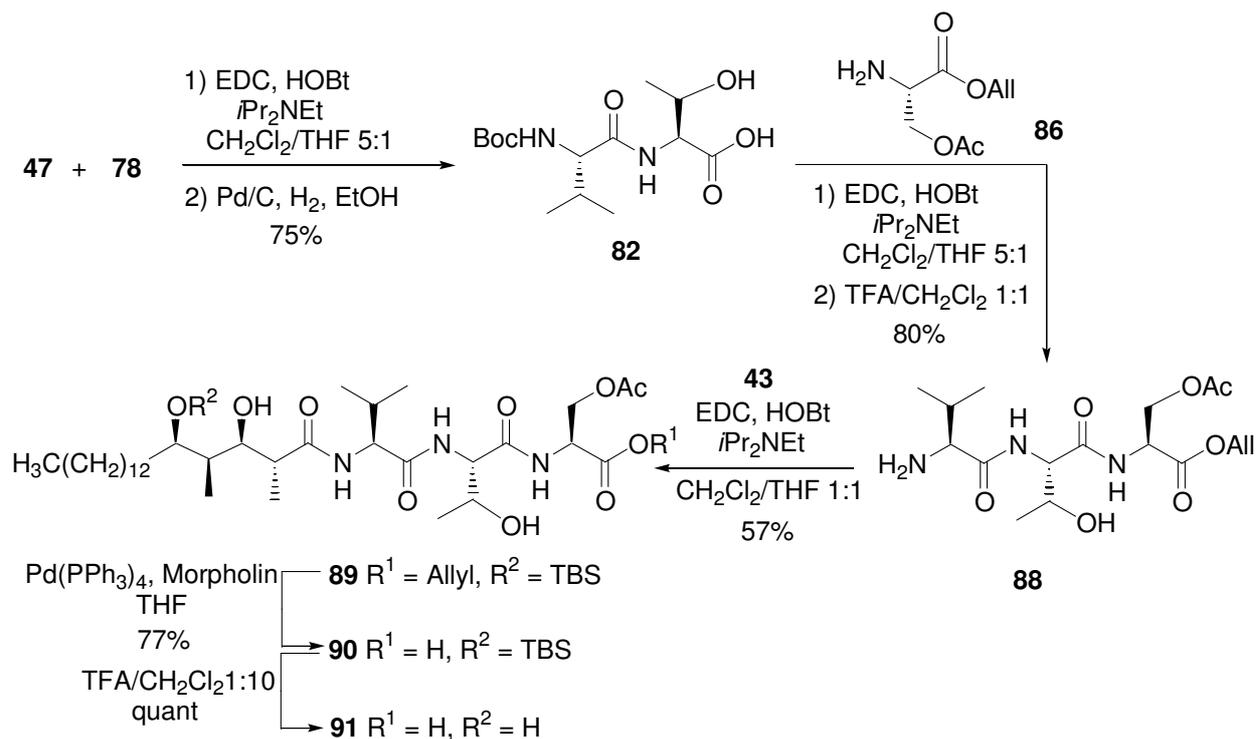
natürliche Fettsäure **43** zugänglich gemacht. Ausgehend von Myristinaldehyd (**37**) konnte über Evans-*syn*-Aldolchemie das erste Fragment (**38**) erhalten werden. Die anschließende Schützung des Alkohols **38** mit TBS-Tf und Lutidin, reduktive Spaltung des Oxazolidinon-Auxiliars mittels LiBH_4 und schließlich die Oxidation nach Swern lieferte den Aldehyd **40**. Um die Synthese der natürlichen 3,5-Dihydroxy-2,4-dimethylstearinsäure **43** abzuschließen, wurde der Aldehyd **40** in einer *anti*-Aldolreaktion nach Optimierung mit hoher Ausbeute und exzellenter Selektivität umgesetzt und nach basischer Spaltung in die Säure **43** überführt. Als weitere Bausteine wurden die ebenfalls mittels *anti*-Aldolreaktion als racemisches Produkt erhaltene Säure **76** sowie die kommerziell erhältliche Myristinsäure (**77**) verwendet (Schema 35).



Schema 35: Synthese der Fettsäurebausteine.

Die Darstellung der einzelnen Peptidsequenzen wurde dann weitgehend an fester Phase, aber auch, wie im Fall von Verbindung **91**, in Lösung durchgeführt.

Dabei wurden zunächst die beiden geschützten Aminosäuren Boc-Valin (**78**) und *O*-Benzyl-Threoninbenzylester (**78**) mittels EDC (**79**)/HOBt (**80**) gekuppelt. Die benzylichen Schutzgruppen wurden abgespalten und mit dem acylierten Serinallylester **86**, der in 3 Stufen zugänglich war, umgesetzt. Durch Spaltung der Boc-Schutzgruppe wurde das Peptidfragment **88** synthetisiert, das nun im weiteren mit der zuvor dargestellten Säure **43** gekuppelt wurde. Die palladiumvermittelte Spaltung des Allylester **89** und anschließende Umsetzung mit Trifluoressigsäure lieferte das offenkettige Stevastelin-Derivat **91** (Schema 36).



Schema 36: Darstellung des offenkettigen Stevastelinderivats **91**.

Die festphasengestützte Synthese der Analoga **98-107** (Tabelle 7) wurde mittels Fmoc-Strategie an Chlortritylharz unter Verwendung von HBTU (**96**)/HOBT (**80**) als Kupplungsreagenzien durchgeführt.

S ¹ -AS ¹ -AS ² -AS ³				
Derivat	S ¹	AS ¹	AS ²	AS ³
98	72	Val	Thr	Phe
99	72	Val	Thr	Ser(OBzl)
100	72	Tyr	Thr	Ser(OBzl)
101	72	Val	Tyr	Ser(OBzl)
102	72	Val	Asp	Ser(OBzl)
103	77	Tyr	Thr	Ser(OBzl)
104	77	Thr	Tyr	Ser(OBzl)
105	77	Val	Thr	Ser(OBzl)
106	76^a	Val	Thr	Ser(OBzl)
107	76^b	Val	Thr	Ser(OBzl)

$\begin{matrix} \mathbf{a} & \begin{matrix} \uparrow 2 \\ \vdots \\ \downarrow 3 \end{matrix} \\ \mathbf{b} & \begin{matrix} \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ \downarrow 2 \\ \downarrow 3 \end{matrix} \end{matrix}$

Tabelle 7: Festphasensynthese der Derivate **98-107**.

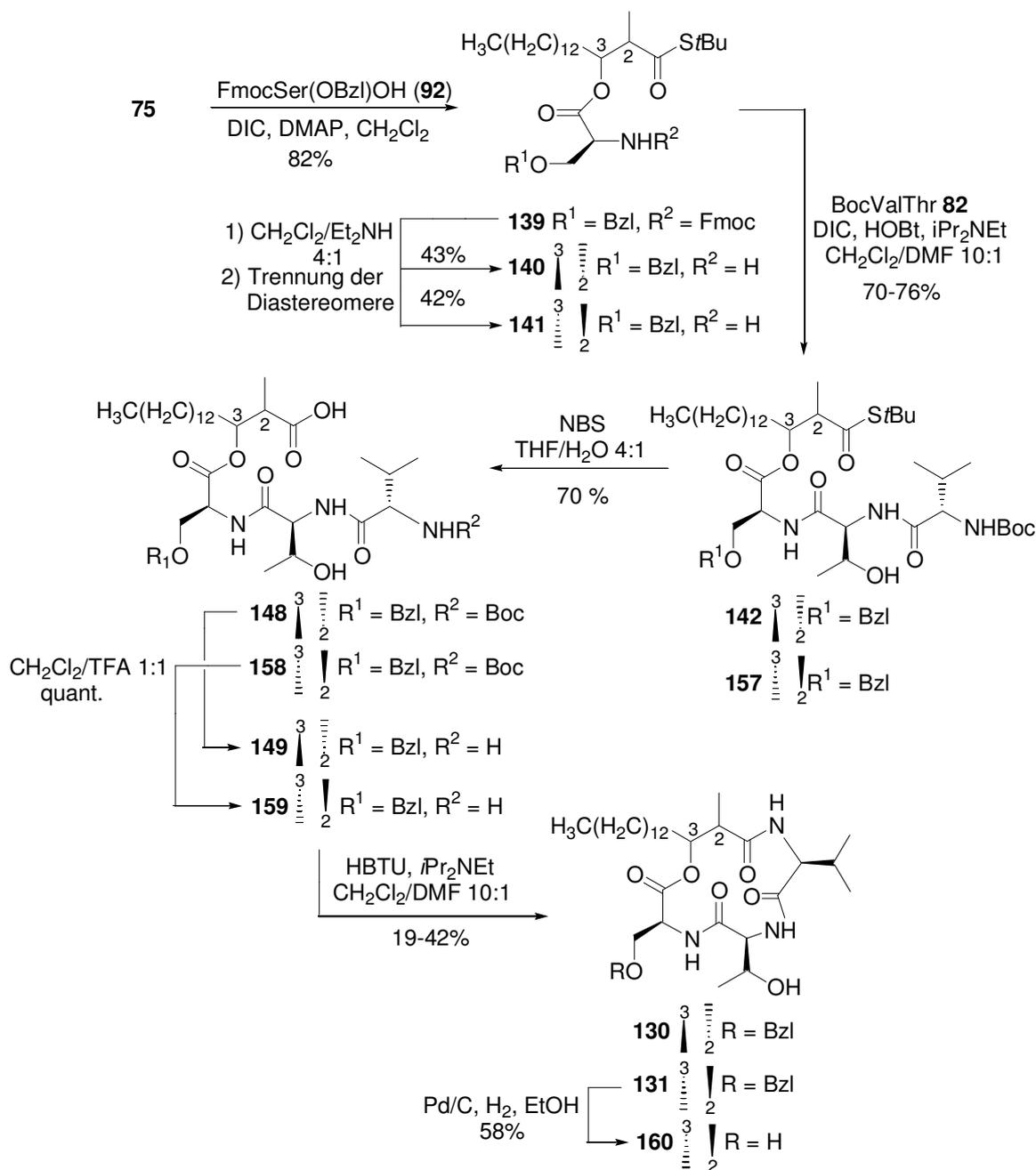
Zunächst erfolgte die Darstellung der einzelnen Tripeptide, die anschließend mit den verschiedenen Fettsäuren **43**, **76** und **77** gekuppelt wurden. Nach saurer Abspaltung und Aufreinigung über HPLC konnten die Derivate **98-107** in Ausbeuten zwischen 14% und 75% erhalten werden (Tabelle 7).

Die offenkettigen Derivate **91** und **98-107** wurden gegen die dual spezifische Phosphatase VHR in einem Inhibitions-Assay untersucht. Dabei zeigten alle Vertreter mit IC₅₀-Werten zwischen 1.9 und 18.5 µM inhibitorische Aktivität. Offensichtlich spielt die Stereochemie der Substituenten der Fettsäure keine wesentliche Rolle, wie ein Vergleich der Derivate **105-107** zeigt (Seite 76, Tabelle 8). Auch bei weiteren Untersuchungen mit einer Reihe verschiedener Phosphatasen, wie Cdc25A sowie den Protein-Tyrosin-Phosphatasen *Mt*PTPA und PTP1B, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Derivate mit Tyrosin in der Sequenz, insbesondere Analogon **101**, zeigten gegen die beiden PTPs *Mt*PTPA und PTP1B starke Inhibition mit IC₅₀-Werten bis unter 1 µM (Tabelle 8). Nur ein Vertreter (**102**), mit Asparaginsäure in der Peptideinheit, wurde als Inhibitor der Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 identifiziert.

Mit PP1 wurde auch eine Serin/Threonin-Phosphatase untersucht. Dabei konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass die Derivate zumindest für die Klasse der PTPs spezifisch wirken.

Für weitere Studien sollten eine Reihe zyklischer Derivate synthetisiert werden. Es war geplant, diese durch Makrolaktonisierung ausgehend von ausgewählten offenkettigen Verbindungen zu generieren. Da dies jedoch nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt.

Um auch im Ringsystem den Einfluss der Stereozentren der Fettsäure zu klären, wurde durch Variation der Stereochemie der Säureinheit eine Reihe verschiedener diastereomerer Stevastelinanaloge synthetisiert. Ausgehend von dem racemischen Thioester **75** konnten nach Kupplung der geschützten Aminosäure **92** unter Steglich-Bedingungen und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe die beiden Diastereomere **140** und **141** mittels Säulenchromatographie voneinander getrennt werden (Schema 37). Anschließend wurde jeweils das Dipeptid **82** unter Verwendung von DIC (**120**)/HOBt (**80**) angeknüpft und die Schutzgruppen zu den Zyklisierungsvorläufern **149** und **159** abgespalten. Die Makrolaktamisierung mit HBTU (**96**) und Hünig-Base lieferte schließlich die gewünschten Produkte **130** und **131**. Durch Hydrierung der Benzylgruppe von Verbindung **130** konnte ein nahezu identisches Analogon (**160**) zu Stevastelin C3 (**31**) synthetisiert werden (Schema 37).



Schema 37: Synthese der zyklischen Stevastelinanaloga **130**, **131** und **160**.

Durch stereoselektive Synthese der beiden Fettsäuren (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (**161**) und (2*R*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (**177**) sowie Überführung in die jeweiligen Thioester **167** und **178** konnten die beiden Stevastelinanaloga **133** und **136**, nach beschriebener Strategie, zugänglich gemacht werden (Schema 38).

5. Zusammenfassung

offenkettigen Derivaten, eine wichtige Rolle spielt. So konnten mit den Analoga **130** und **131** hochselektive Inhibitoren der DSP VHR identifiziert werden (Tabelle 8). Interessanterweise zeigte Verbindung **160**, die durch Abspaltung der Benzylgruppe aus Analogon **131** generiert wurde, nun auch inhibitorische Aktivität gegen die DSP Cdc25A.

Abschließend wurde ein Zytotoxizitätstest an Tumorzellen der Zelllinie SW480 durchgeführt, um die Aktivität *in vivo* zu testen. Damit sollte die Membranpermeabilität und der Effekt der Inhibitoren auf Tumorzellen geprüft werden. Die azyklischen Derivate **91**, **98-107** zeigten keine bzw. Analogon **101** nur eine schwache Hemmung des Zellwachstums der Tumorzellen. Dieser Verlust der Aktivität *in vivo* ist höchstwahrscheinlich auf eine schlechte Membrangängigkeit der Derivate zurückzuführen. Im Gegensatz dazu inhibierte der zyklische Vertreter **160** das Zellwachstum der Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 19.2 µM, wobei dieser Wert nur geringfügig über dem des zuvor im Phosphatase-Inhibitions-Assays für Cdc25A bestimmten IC₅₀-Wertes lag (Tabelle 8). Dies lässt auf eine ausreichende Membranpermeabilität der Substanz schließen.

Derivat	IC ₅₀ [µM]						
	VHR	Cdc25A	PTP1B	MtPTPA	CD45	PP1	SW480
91	18.5±2.1	31.9±32.6	2.3±0.4	>100	>100	>100	>100
98	6.4±0.5	13.9±16.5	2.0±1.1	35.1±2.0	>100	>100	>100
99	14.8±4.5	15.0±15.9	2.6±1.7	17.0±3.7	>100	>100	>100
100	6.8±3.1	6.3±6.6	1.4±0.3	5.3±0.1	>100	>100	>100
101	1.9±0.8	3.9±0.7	0.65±0.3	1.6±0.3	>100	>100	69.0±2.8
102	7.1±1.1	5.9±4.8	1.6±0.6	10.7±0.3	4.5±2.0	>100	>100
103	12.2±6.8	7.9±7.4	3.9±3.3	10.7±1.9	>100	>100	>100
104	3.3±2.7	11.2±13.2	1.1±0.4	2.4±0.6	>100	>100	>100
105	5.1±0.6	14.7±18.2	2.0±0.8	16.6±8.6	>100	>100	>100
106	3.8±1.2	11.3±3.8	2.2±1.0	10.0±0.8	>100	>100	>100
107	2.3±0.6	11.6±8.8	1.0±0.8	11.9±1.6	>100	>100	>100
130	25.0±5.1	>100	>100	>100	>100	>100	14.6±5.6
131	12.2±0.6	>100	>100	>100	>100	>100	11.0±0.4
160	35.7±7.7	15.5±3.9	>100	>100	>100	>100	19.2±1.1
133	6.5±1.2	>100	11.3±2.9	8.8±5.9	>100	>100	9.9±0.8
136	56.0±13.3	>100	90.3±2.7	75.5±6.6	>100	>100	15.8±3.6

Tabelle 8: Phosphataseaktivität und Zytotoxizität.

Einen erstaunlichen Verlauf der Inhibitionskurven zeigten die weiteren zyklischen Analoga **130**, **131**, **133** und **136**. Die Derivate zeichneten sich durch einen frühen Wirkungseintritt mit

5. Zusammenfassung

starker Hemmung des Wachstums der Krebszellen, bis zu einem Konzentrationsbereich von 10-20 μM , aus. Allerdings erfolgte bei höheren Inhibitorkonzentrationen kein weiterer Abfall der Vitalität der Zellen.

6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass sich die Klasse der Stevasteline als interessanter Ausgangspunkt zur Synthese neuer potenter Phosphataseinhibitoren eignet. Basierend auf den Ergebnissen könnten weitere fokussierte Substanzbibliotheken hergestellt werden. Insbesondere die Darstellung zyklischer Derivate erscheint aufgrund der vorliegenden Resultate als sehr vielversprechend. Mittels kombinatorischer festphasengestützter Synthese wäre ein schneller und effizienter Zugang zu einer Vielzahl von Verbindungen möglich.

Wie bereits bei den dargestellten offenkettigen Derivaten sollten die einzelnen Aminosäuren variiert werden. Außer dem großen Pool an natürlichen Bausteinen die kommerziell erhältlich sind, könnten auch unnatürliche D-Aminosäuren benutzt werden. Aber auch die Verwendung von Phenylphosphatmimetika, wie **190** oder Difluorsulfon säuregruppen, wie in **191**, sollten Beachtung finden. Als weitere Fettsäurebausteine wären sicherlich auch die beiden monosubstituierten Säuren **192** und **193** von Interesse (Abbildung 25).

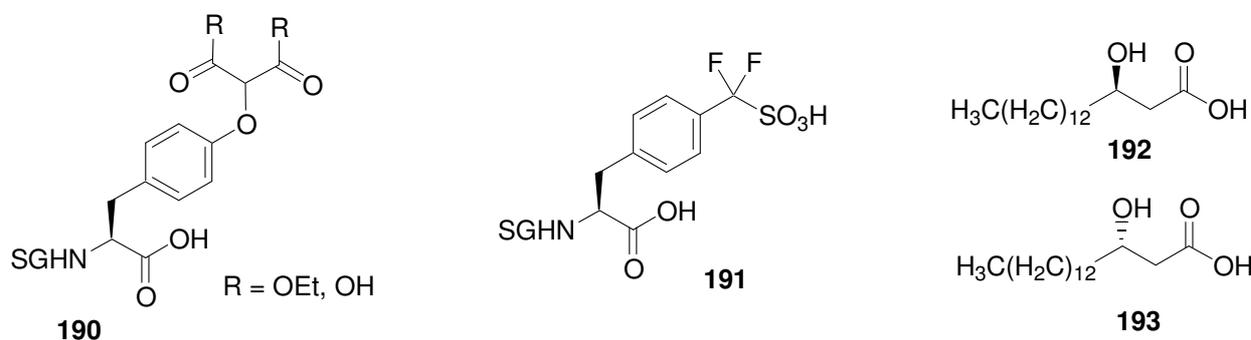
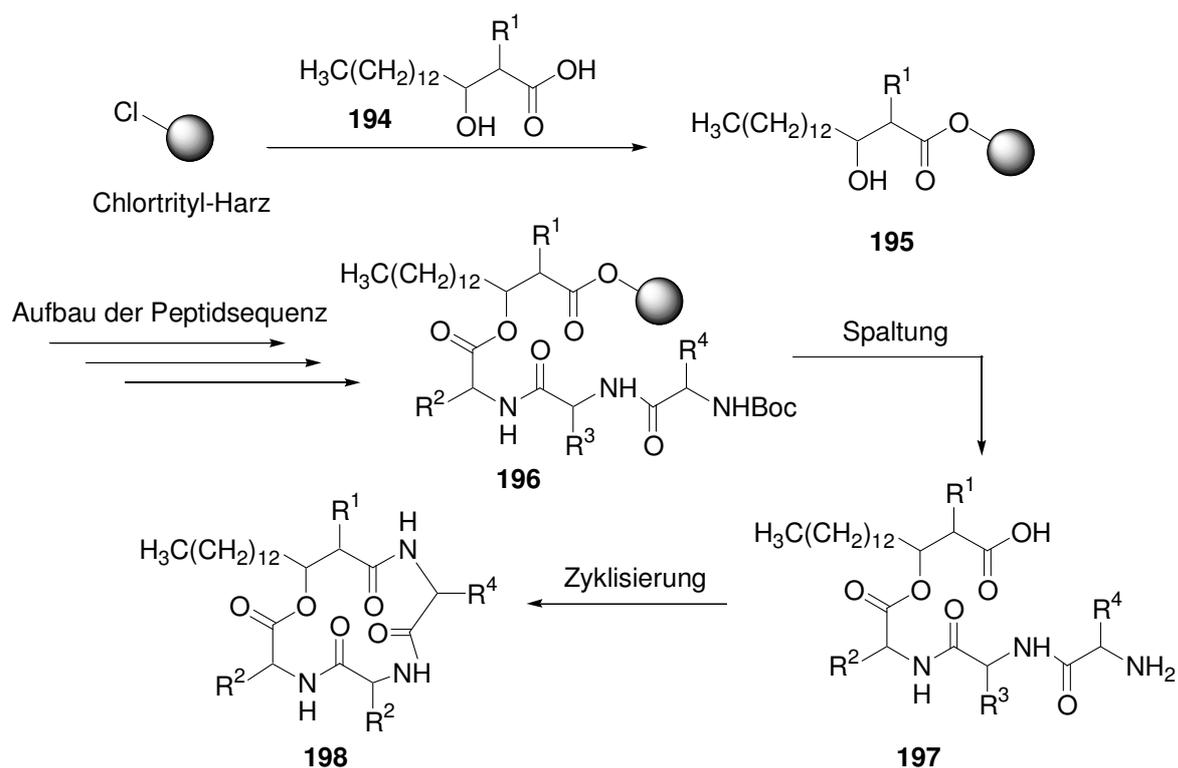


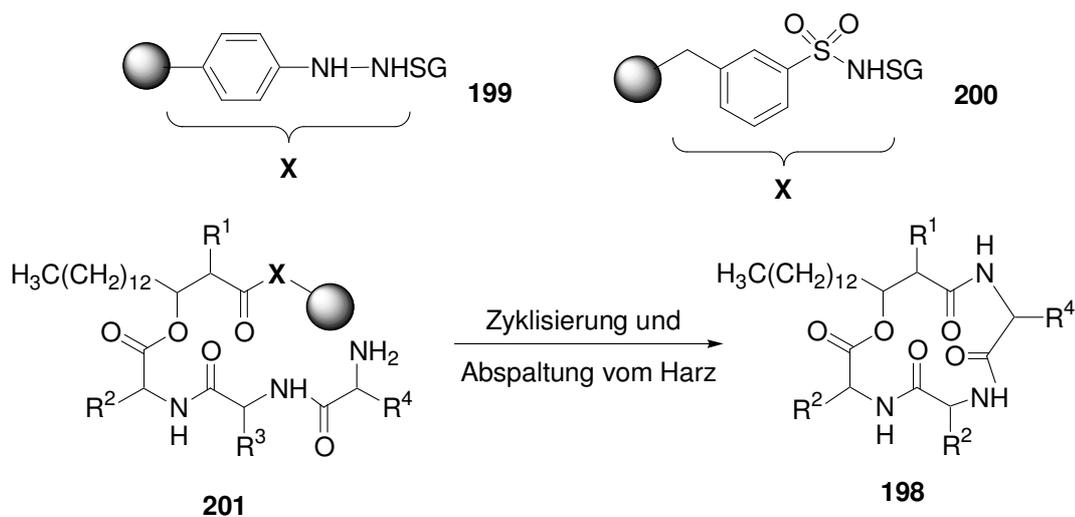
Abbildung 25: Interessante Synthesebausteine für zukünftige Arbeiten.

Die in der Arbeit erfolgreich etablierte Synthese zur Darstellung zyklischer Derivate in Lösung sollte auf einfachem Wege direkt an die feste Phase übertragbar sein. Die in Lösung dargestellten Fettsäurefragmente **194** könnten über die Carboxylgruppe an das Harz gebunden werden. Der Aufbau der Peptidsequenz erfolgt durch Veresterung der ersten Aminosäure über die Hydroxyfunktion der polymergebundenen Fettsäure **195**. Gleichzeitig könnte die Freisetzung der N-terminalen Schutzgruppe des Peptids **196** und die Spaltung vom Harz bewerkstelligt werden. Im letzten Schritt würde dann das synthetisierte Derivat **197** zum gewünschten Produkt **198** zyklisiert werden (Schema 39).



Schema 39: Festphasensynthese der Analoga mit anschließender Zyklisierung in Lösung.

Eleganter wäre die Durchführung der Zyklisierung direkt am Harz unter gleichzeitiger Abspaltung. Hierfür könnte der Hydrazidlinker (**199**) aber auch der Kenner-Linker (**200**) Verwendung finden (Schema 40).^[134, 135]



Schema 40: Gleichzeitige Zyklisierung und Abspaltung von fester Phase.

6. Ausblick

Weiterhin sollte der Inhibitionsmechanismus näher untersucht werden. Aufzuklären wäre, in wie weit die Inhibitoren kompetitiv binden, oder ob die Inhibition aufgrund anderer Mechanismen erfolgt.^[136]

7. Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines, Messgeräte und Hilfsmittel

Für die Aufnahme von **NMR-Spektren** standen folgende Geräte zur Verfügung:

- Bruker AC-250 250 MHz $^1\text{H-NMR}$
- Bruker AM-400 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ und 100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$
- Bruker DRX-500 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ und 125.8 MHz $^{13}\text{C-NMR}$
- Varian Mercury 400 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ und 100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$

Die in ppm angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) als internen Standard. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, pt = pseudo Triplett, q = Quartett, quint. = Quintett, pquint. = pseudo Quintett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Ihre Abweichung beträgt ± 0.5 Hz.

Die **GC-MS**-Untersuchungen wurden mit einem Gaschromatographen 5890 Serie II der Firma Hewlett Packard mit einer Kapillarsäule Optima 1, 0.2 μm , 25 m x 0.2 mm ID der Firma Macherey-Nagel und einem Massendetektor 5972 Serie von Hewlett Packard durchgeführt.

Die 70 eV-Elektronenionisations- (EI) und Fast Atom Bombardment (FAB) **Massenspektren** wurden mit einem Finnigan MAT MS 90 Spektrometer gemessen.

Für die **Dünnschichtchromatographie (DC)** wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck verwendet. Zur Detektion wurden UV-Licht und folgende Anfärbereagenzien verwendet:

- Reagenz A 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-Sulfat, 6 ml konzentrierte Schwefelsäure und 94 ml Wasser
- Reagenz B 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure und 997 ml abs. Ethanol
- Reagenz C 0.5%ige Lösung von Kaliumpermanganat in Wasser

■ Reagenz D Iod-Dampf

Für die präparative **Säulenchromatographie** wurde Kieselgel der Korngröße 30 x 60 µm der Firma J. T. Baker verwendet. Die verwendeten Laufmittel sind jeweils angegeben.

Zum Abmessen und Zugeben kleiner Volumina wurden Variopipetten der Firma Eppendorf (0.5 - 1000 µl), sowie Mikroliterspritzen der Firma Hamilton verwendet.

Die spezifischen **Drehwerte** $[\alpha]_D^{20}$ wurden auf einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 ermittelt und sind auf das Licht der Natrium-D-Linie bezogen. Die Konzentration c in g/100 ml und das verwendete Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Die **Schmelzpunkte** wurden mit einem Büchi 530 gemessen.

Für die **analytische HPLC** wurde folgendes System verwendet:

HP Modell Hewlett Packard Serie 1100; Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 1ml/min; Säule:

CC 125/4 Nucleosil 120-5 C4 von Macherey&Nagel; Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 1 ml/min; Laufmittelgradient: (CH₃CN/H₂O/HCOOH) (10/90/0.1) 0-1 min, auf (90/10/0.1) 8.30-9.30 min, auf (100/0/0.1) 10 min.

Für die **MS**-gekoppelte, analytische **HPLC** wurde folgendes System verwendet:

HP Modell Hewlett Packard Serie 1100/Finnigan MAT LCQ; Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 1 ml/min; Säulen:

a) CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4 von Macherey&Nagel; Laufmittelgradient: (CH₃CN/H₂O/HCOOH) (20/80/0.1) 0 min, auf (50/50/0.1) 20 min, auf (90/10/0.1) 30 min, auf (100/0/0.1) 40 min;

b) CC 125/4 Nucleosil 120-5 C4 von Macherey&Nagel; Laufmittelgradient: (CH₃CN/H₂O/HCOOH) (10/90/0.1) 0-1 min, auf (100/0/0.1) 10 min.

7. Experimenteller Teil

Für die **präparative HPLC** folgendes System verwendet:

Varian Pro Star Workstation; Säule: VP 250/21 Nucleosil 120-5 C4 von Macherey&Nagel; Detektion 210 nm; Flussraten und Laufmittelgradienten sind jeweils angegeben.

Für die **Absorptionsmessungen** wurden folgende Systeme verwendet:

Labsystems iEMS Reader MF und DYNATECH MR 5000 plate reader.

Das verwendete Tritylharz wurde von den Firmen Novabiochem und Advanced ChemTech bezogen. Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma-Aldrich und Acros bezogen. Die getesteten Phosphatasen (VHR, PTP1B, CD45, PP1) wurden von BIOMOL Research Laboratories Inc., Plymouth bezogen.

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert.

Alle Reaktionen, mit Ausnahme solcher, an denen Wasser beteiligt war, wurden in absoluten Lösungsmitteln unter Argon als Schutzgas durchgeführt. Die entsprechenden Lösungsmittel wurden nach Standardvorschriften getrocknet.

7.2 Versuche zu Kapitel 4.2

7.2.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1

Darstellung von (4*S*)-3-[(2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylhexadecanoyl]-4-isopropyl-1,3-oxazolidinon (**38**)

Zu einer Lösung von 1.0 g (5.4 mmol) (4*S*)-3-Propionyl-4-isopropyl-1,3-oxazolidinon (**36**) in 10 ml CH₂Cl₂ werden bei -78 °C innerhalb von 15 min 5.9 ml (5.9 mmol, 1 M Lösung) Di-*n*-butylbortriflat und 1.10 ml (6.50 mmol, 0.84 g) DIPEA zugegeben. Es wird zunächst 20 min bei -78 °C und dann eine Stunde bei 0 °C gerührt. Danach kühlt man wieder auf -78 °C, gibt langsam 1.26 g (5.90 mmol) Tetradecanal (**37**) zu, rührt 15 min bei -78 °C und 30 min bei 0 °C. Darauf gibt man langsam 5.4 ml Phosphatpuffer (pH = 7), 9 ml MeOH, 5.7 ml eines 1:1 Gemisches aus MeOH und H₂O₂ (30 %) zu. Anschließend rührt man eine Stunde bei 0 °C und versetzt dann mit 9 ml Wasser. Nachdem man die beiden Phasen getrennt hat, extrahiert man die wässrige Phase dreimal mit je 10 ml CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 10 ml 5%iger NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 1.86 g, 86% , (de = 97%)

R_f-Wert: 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v).

[α]_D²⁰: + 43.6 ° (c = 0.70, Chloroform)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.82 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.83 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.87 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.18-1.28 (m, 25 H), 1.31-1.50 (m, 2 H), 2.25-2.40 (m, 1 H), 3.71 (dd, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 1 H), 3.85-3.90 (m, 1 H), 4.15-4.27 (m, 2 H), 4.40-4.45 (m, 1 H).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): δ = 8.5, 14.1, 17.9, 18.0, 22.7, 26.0, 29.6 (3 C), 29.7 (6 C), 31.9, 33.8, 42.0, 58.3, 63.4, 74.8, 153.6, 177.9.

MS (70 eV), *m/z* (%): 397 (0.3), 380 (1.8), 382 (0.6), 250 (2.2), 214 (18.9), 185 (100), 130 (32), 85 (11.9), 57.1 (7.8).

HRMS (EI): ber. für C₂₃H₄₃NO₄: 397.3192, gem. 397.3186.

Darstellung von (4S)-3-[(2S,3R)-3-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-2-methylhexadecanoyl]-4-isopropyl-1,3-oxazolidinon (63)

Zu einer Lösung von 1.60 g (4.02 mmol) des Alkohols **38** in 35 ml CH₂Cl₂ werden bei 0 °C 0.56 g (5.23 mmol) 2,6-Lutidin und 1.28 g (4.83 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluormethansulfonat zugegeben. Die Reaktionslösung wird 1.5 h gerührt, bevor man 15 ml einer gesättigten NaHCO₃-Lösung zugibt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und zweimal mit je 20 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 0.5 M wässriger NaHSO₄ gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 2.14 g, 99%

R_f-Wert: 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v).

[α]_D²⁰: + 44.5 ° (c = 0.75, Chloroform)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.00 (s, 3 H), 0.02 (s, 3 H), 0.86-0.93 (m, 18 H), 0.98 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.16-1.28 (m, 22 H), 1.30-1.49 (m, 2 H), 2.31-2.41 (m, 1 H), 3.74-3.79 (m, 1 H), 3.91-3.94 (m, 1 H), 4.19-4.30 (m, 2 H), 4.41-4.49 (m, 1 H).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): δ = -4.8, -4.1, 12.3, 14.1, 18.0, 18.1, 22.7, 25.7, 25.9, 26.9, 29.4, 29.6 (4 C), 29.7 (5 C), 29.9, 31.9, 35.7, 42.7, 58.2, 63.2, 72.7, 153.7, 175.4.

MS (70 eV), *m/z* (%): 511 (0.03), 456 (8.2), 455 (32.3), 454 (100), 328 (5.0), 327 (16.2), 325 (10), 299 (2.0), 251 (6.0), 243 (6.8), 242 (42.7), 199 (4.9), 75 (6.2), 73 (10.8).

HRMS (EI): ber. für C₂₉H₅₇NO₄Si: 511.4061, gem. 511.4056.

Darstellung von (2R,3R)-3-(tert-Butyl-dimethylsilyloxy)-2-methyl-hexadecan-1-ol (64)

Zu einer Lösung von 1.0 g (1.95 mmol) des (4S)-3-[(2S,3R)-3-(tert-Butyl-dimethylsilyloxy)-2-methyl-hexadecanoyl]-4-isopropyl-oxazolidinon (**63**) in 30 ml THF gibt man bei 0 °C 3.96 ml (7.92 mmol) Lithiumborhydrid (2 M Lösung in Hexan). Man rührt die Reaktionsmischung 3 Stunden bei Raumtemperatur und tropft anschließend bei 0 °C 5 ml gesättigte Ammoniumchloridlösung zu. Die wässrige Phase wird viermal mit je 3 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 8:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 0.55 g, 73%

 R_f -Wert: 0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v) $[\alpha]_D^{20}$: +2.8 ° (c = 0.5, Chloroform) $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.00 (s, 3 H), 0.02 (s, 3 H), 0.73 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 0.79-0.86 (m, 12 H), 1.22-1.28 (m, 22 H), 1.31-1.44 (m, 2 H), 1.90-2.0 (m, 1 H), 3.44-3.50 (m, 1H), 3.58-3.70 (m, 2 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CDCl_3): δ = -4.7, -4.4, 12.0, 14.1, 18.0, 22.7, 25.9 (3 C), 26.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7 (4 C), 29.8, 31.9, 32.3, 39.5, 66.1, 76.0.

MS (70 eV), m/z (%): 329 (7.6), 305 (11.7), 304 (25.1), 303 (100), 263 (11.6), 261 (5.1), 257 (6.6), 205 (12.3), 189 (10.7), 173 (14.85), 147 (39.2) 131 (6.1) 120 (5.0), 75 (15.1), 73 (58.9), 57 (14.7).

HRMS (EI): ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{41}\text{O}_2\text{Si}$: 329.2896, gem. 329.2875.**Darstellung von (2*S*,3*R*)-3-(*tert*-Butyl-dimethylsilyloxy)-2-methyl-hexadecanal (65).**

Zu einer Lösung von 0.13 ml (1.53 mmol) Oxalylchlorid in 20 ml CH_2Cl_2 gibt man bei -78 °C innerhalb von 10 min 0.22 ml (3.10 mmol) DMSO. Nach 5 min wird eine Lösung von 200 mg (0.52 mmol) des Alkohols (**64**) in 5 ml CH_2Cl_2 langsam zugetropft. Man rührt 30 min bei -78 °C, gibt dann 1.10 ml (7.70 mmol) Triethylamin zu und lässt die Reaktionsmischung anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur rühren. Man gibt 10 ml Wasser zu, trennt die Phasen und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 . Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und danach über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird direkt weiter umgesetzt.

Gelbliches Öl

Ausbeute: 0.2 g, quantitativ

 R_f -Wert: 0.58 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v) $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.00 (s, 3 H), 0.04 (s, 3 H), 0.85-0.88 (m, 12 H), 1.04 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.23-1.30 (m, 22 H), 1.40-1.52 (m, 2 H), 2.39-2.46 (m, 1 H), 4.08 (dt, J_1 = 3.7 Hz, J_2 = 6.7 Hz, 1 H), 9.75 (s, 1 H) $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CDCl_3): δ = -4.7, -4.2, 10.5, 14.1, 18.0, 22.7, 25.8 (3 C), 26.9, 29.6 (2 C), 29.7 (4 C), 29.8, 29.9, 31.9, 34.6, 51.2, 72.1, 205.5.

Darstellung von (4S)-(2R,3R,4S,5R)-5-(tert-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-octadecanoyl-4-isopropyl-oxazolidinon (71)

Zu einer Lösung von 72 mg (0.39 mmol) des Oxazolidinons **36** in 0.35 ml CH₂Cl₂ gibt man bei 0 °C 79 µl (59 mg, 0.46 mmol) DIPEA und 0.46 ml (1 M Lösung, 0.46 mmol) Di-*n*-butylbortriflat. Nachdem die Lösung für 2 h bei 0 °C gerührt wurde, kühlt man auf -78 °C ab. In einem separaten Kolben gibt man zu einer Lösung aus 0.52 ml (1 M Lösung, 0.52 mmol) Diethylaluminiumchlorid in 0.35 ml CH₂Cl₂ bei -78 °C 100 mg (0.26 mmol) des Aldehyds **65** in 0.5 ml CH₂Cl₂ zu. Nach 5 min tropft man das zuvor generierte Boron-Enolat zu und spült mit 0.5 ml CH₂Cl₂ nach. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, wobei man die Lösung auf -20 °C auftauen lässt. Nachdem nochmals 2 h bei 0 °C gerührt wurde, gibt man eine Lösung aus 8 ml MeOH/30%iger H₂O₂-Lösung (5:1) zu und rührt eine weitere Stunde. Anschließend werden 10 ml H₂O zugegeben und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 10 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je dreimal mit 10 ml gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung extrahiert, sowie über MgSO₄ getrocknet. Schließlich wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gewünschte Stearinsäurederivat **71** konnte nach Abtrennung eines weiteren Diastereomers mittels Chromatographie an Kieselgel als isomerenreines Produkt erhalten werden (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 → 5:1 v/v).

Verhältnis der beiden Diastereomere: 17:3.

Farbloses Öl

Ausbeute: 39 mg, 26%

R_f-Wert: 0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.04 (s, 3 H), 0.05 (s, 3H), 0.84-0.91 (m, 18 H), 0.93 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.22-1.27 (m, 22 H), 1.46-1.54 (m, 2 H), 1.67-1.75 (m, 1 H), 2.34-2.43 (m, 1 H), 3.72-3.78 (m, 1 H), 3.82 (dd, *J*₁ = 2.5 Hz, *J*₂ = 8.6 Hz, 1 H), 4.07-4.14 (m, 1 H), 4.16-4.26 (m, 2 H), 4.41-4.45 (m, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ = -4.6, -3.8, 6.8, 14.1, 14.4, 14.7, 18.0, 22.7, 25.1, 25.9, 28.4, 29.3, 29.6 (3 C), 29.7 (3 C), 29.9 (2 C), 31.9, 34.6, 37.8, 40.4, 58.9, 63.2, 76.3, 77.3, 154.3, 177.3.

Darstellung von Propionsäure-*tert*-butylthioester (41)

Zu einer Lösung von 3.51 ml (5.0 g, 50 mmol) *tert*-Butylmercaptan in 100 ml Et₂O gibt man bei 0 °C 15.43 ml (11.21 g, 110 mmol) Triethylamin und 6.78 ml (7.18 g, 70 mmol) Propionylchlorid zu. Nachdem die Reaktionsmischung 48 h bei RT gerührt wurde, werden 50 ml H₂O zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 30 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mittels Destillation gereinigt (p = 20 mbar, T = 45-50 °C).

Gelbliches Öl

Ausbeute: 5.01 g, 49%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H), 1.44 (s, 9 H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 9.5, 29.8 (3 C), 37.8, 47.6, 201.2.

GC-MS: Temperaturgradient: 50 °C (0-1.42 min) auf 300 °C (8.30 min): t_R: 3.65 min/[M]: 146.

Darstellung von (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(*tert*-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-octadecansäure-*S-tert*-butylthioester (42)

Zu einer Lösung von 5.84 ml (1 M in Hexan, 5.84 mmol) Chlor-dicyclohexylboran in 7 ml Et₂O gibt man bei 0 °C 4.58 ml Triethylamin (32.9 mmol) und 5.96 g (40.8 mmol) Propionsäure-*tert*-butylthioester (**41**). Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C für 2 h gerührt, dann auf -78 °C abgekühlt und anschließend eine Lösung des Aldehyds **40** (0.68 g, 1.79 mmol) in 7 ml Et₂O zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, wobei man die Lösung auf -20 °C auftauen lässt. Nachdem die gelbe Reaktionslösung nochmals 3 h bei 0 °C gerührt wurde, gibt man 100 ml Phosphat-Puffer (pH = 7) zu und extrahiert dreimal mit je 50 ml Et₂O. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Öl wird in 40 ml MeOH/Puffer-Gemisch (5:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von 20 ml 30%iger H₂O₂-Lösung wird die Suspension 1 h bei 0 °C gerührt. Nun gibt man 20 ml H₂O zu und extrahiert dreimal mit je 80 ml CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und NaCl-

7. Experimenteller Teil

Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 0.85 g, 90% (de >98%)

R_f-Wert: 0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -18.6 ° (c = 0.52, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.04 (s, 3 H), 0.05 (s, 3 H), 0.84-0.89 (m, 15 H), 1.13 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.22-1.29 (m, 22 H), 1.43-1.47 (m, 1 H), 1.55-1.65 (m, 1 H), 2.70 (pquint, J = 7.0 Hz, 1 H), 3.76-3.82 (m, 2 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = -4.5, -3.8, 7.0, 14.1, 15.5, 18.1, 22.7, 25.4, 25.9 (3 C), 29.3, 29.6 (3 C), 29.7 (6 C), 29.8, 31.9, 34.7, 38.2, 48.1, 51.5, 75.9, 76.2, 204.9.

HRMS (FAB): ber. für C₃₀H₆₃O₃SSi: 531.4189, gem. 531.4238.

Darstellung von (2R,3R,4S,5R)-5-(tert-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-dimethyloctadecansäure (43) aus (4S)-(2R,3R,4S,5R)-5-(tert-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-octadecanoyl-4-isopropyl-oxazolidinon (71)

Zu einer Lösung von 39 mg (68 μmol) des Oxazolidinons **71** in 1.4 ml THF/H₂O (4:1) werden bei 0 °C 46 μl (0.41 mmol) einer 30%igen H₂O₂-Lösung und 5.7 mg (0.14 mmol) LiOH·H₂O zugegeben. Man rührt 1.5 h bei 0 °C und gibt dann 5 ml 1.5 N Na₂SO₃-Lösung zu. Nachdem man die Reaktionslösung mit 1 N HCl auf pH = 1-2 eingestellt hat, extrahiert man die wässrige Phase dreimal mit je 5 ml CH₂Cl₂. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 → 1:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 27 mg, 87%

R_f-Wert: 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: +36.4 ° (c = 0.24, Chloroform)

Weitere analytische Daten siehe unten!

Darstellung von (2R,3R,4S,5R)-5-(tert-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-dimethyloctadecansäure (43) aus (2R,3R,4S,5R)-5-(tert-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-octadecansäure-S-tert-butylthioester (42)

Zu einer Lösung des Thioester **42** (0.50 g, 0.94 mmol) in 5 ml Dioxan gibt man bei RT 1 N NaOH-Lösung (1.88 ml, 1.88 mmol) und rührt über Nacht. Die Reaktionsmischung wird in 50 ml H₂O gegeben, mit wässriger HCl-Lösung ein pH-Wert von 2 eingestellt und dreimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 → 1:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 0.41 g, 94%

R_f-Wert: 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

[α]_D²⁰: +36.0 ° (c = 0.25, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.08 (s, 3H), 0.09 (s, 3 H), 0.84-0.90 (m, 15 H), 1.16 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.21-1.28 (m, 22 H), 1.43-1.60 (m, 2 H), 1.69-1.76 (m, 1 H), 2.55-2.63 (m, 1 H), 3.85 (dd, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 8.2 Hz, 1 H), 3.86-3.91 (m, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = -4.5, -3.5, 5.0, 13.8, 14.1, 18.0, 22.7, 25.4, 25.8 (3 C), 29.3, 29.5 (2 C), 29.6 (4 C), 29.7, 31.9, 34.7, 36.5, 42.7, 77.3, 78.1, 177.8.

HRMS (FAB): ber. für C₂₆H₅₅O₄Si: 459.3791, gem. 459.3863.

Darstellung von (3R,4R,5S,6R)-4-Hydroxy-3,5-dimethyl-6-tridecyl-tetrahydro-pyranon (73)

Zu einer Lösung von 583 mg (1.09 mmol) des Thioesters **42** in 25 ml THF/H₂O (4:1) werden bei 0 °C 0.74 ml (6.58 mmol) einer 30%igen H₂O₂-Lösung und 92 mg (2.19 mmol) LiOH·H₂O zugegeben. Man rührt 3 h bei 0 °C und gibt dann 20 ml 1.5 N Na₂SO₃-Lösung zu. Nachdem man die Reaktionslösung mit 1 N HCl auf pH = 1-2 eingestellt hat, extrahiert man die wässrige Phase viermal mit je 20 ml Et₂O. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen dreimal mit je 15 ml Pufferlösung pH = 7 gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 248 mg, 70%

R_f-Wert: 0.27 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: +43.0 ° (c = 0.40, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.96 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 1.21-1.27 (m, 22 H), 1.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 1.66-1.85 (m, 2 H), 1.98-2.05 (m, 1 H), 2.62 (dd, *J*₁ = 3.7 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 1 H), 3.90 (pt, *J* = 3.7 Hz, 1 H), 4.70-4.76 (m, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 10.1, 12.1, 14.1, 22.6, 25.4, 29.3, 29.5 (4 C), 29.6 (3 C), 31.9, 32.0, 36.5, 36.9, 72.8, 78.3, 174.1.

HRMS (EI): ber. für C₂₀H₃₈O₃Na: 349.2719, gem. 349.2721.

Darstellung von (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2,4-Dimethyl-octadecan-1,3,5-triol (74)

Zu einer Lösung von 0.1 g (0.19 mmol) des Thioester **42** in 3.5 ml THF gibt man bei 0 °C 0.75 ml (1.5 mmol) einer 2 M Lithiumborhydridlösung. Man rührt die Reaktionsmischung 48 h bei Raumtemperatur und tropft anschließend bei 0 °C 2 ml gesättigte Ammoniumchlorid-lösung zu. Die wässrige Phase wird viermal mit je 3 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird wiederum in 5 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 178 mg (0.56 mmol) TBAF wird die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt und anschließend 5 ml H₂O zugegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 5 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit dreimal mit je 5 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Der Rückstand wird nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck chromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 18.7 mg, 30%

R_f-Wert: 0.18 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: +14.1 ° (c = 0.25, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.72 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 0.92 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 1.20-1.30 (m, 22 H), 1.35-1.43 (m, 2 H), 1.51-1.61 (m, 1 H), 2.82-2.92 (m, 1 H), 2.95 (bs, 1 H), 3.37 (bs, 1 H), 3.59-3.68 (m, 2 H), 3.72 (dd, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1 H), 3.80-3.85 (m, 1 H), 4.42 (bs, 1 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.1, 13.2, 14.1, 22.7, 25.6, 26.0, 29.3$ (2 C), 29.6 (3 C), 29.7 (2 C), $31.9, 35.5, 37.3, 37.8, 69.1, 77.7, 83.5$.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[64]

7.2.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2

Darstellung von racemischem (3)-Hydroxy-(2)-methyl-hexadecansäure-*S*-*tert*-butylthioester (75)

Zu einer Lösung von 23.25 ml (1 M in Hexan, 23.25 mmol) Chlor-dicyclohexylboran in 24 ml Et_2O gibt man bei 0 °C 18.0 ml Triethylamin (129.6 mmol) und 19.5 g Propionsäure-*tert*-butyl-thioester (**41**) (134.0 mmol). Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C für 2 h gerührt, dann auf -78 °C abgekühlt und anschließend eine Lösung des Aldehyds **37** (1.46 g, 7.06 mmol) in 24 ml Et_2O zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, wobei man die Lösung auf -20 °C auftauen lässt. Nachdem die gelbe Reaktionslösung nochmals 3 h bei 0 °C gerührt wurde, gibt man 200 ml Phosphat-Puffer (pH = 7) zu und extrahiert dreimal mit je 100 ml Et_2O . Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Öl wird in 160 ml MeOH/Puffer-Gemisch (5:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach vorsichtiger Zugabe von 80 ml 30%iger H_2O_2 -Lösung wird die Suspension 1 h bei 0 °C gerührt. Nun gibt man 80 ml H_2O zu und extrahiert dreimal mit je 100 ml CH_2Cl_2 . Die vereinigten organischen Phasen werden je dreimal mit 50 ml gesättigter NaCO_3 -Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1 v/v).

Gelbliches Öl

Ausbeute: 2.17 g, 86 % (Racemat)

R_f -Wert: 0.34 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.85$ (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H), 1.18 (d, $J = 7.0$, 3 H), 1.20 - 1.31 (m, 22 H), 1.43 (s, 9 H), 1.62 - 1.71 (m, 1 H), 1.76 - 1.83 (m, 1 H), 2.57 - 2.64 (m, 1 H), 3.59 - 3.65 (m, 1 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.2, 15.5, 22.8, 25.7, 29.5, 29.6, 29.7$ (3 C), 29.8 (6 C), $32.0, 35.2, 48.4, 53.6, 74.1, 204.9$.

HRMS (FAB): ber. für $C_{21}H_{43}O_2S$: 359.2985, gem. 359.2985.

Darstellung von (3)-Hydroxy-(2)-methyl-hexadecansäure (76) aus racemischem (3)-Hydroxy-(2)-methyl-hexadecansäure-*S-tert*-butylthioester (75)

Zu einer Lösung des Thioester **75** (100 mg, 0.28 mmol) in 2 ml Dioxan gibt man bei RT 1 N NaOH-Lösung (0.56 ml, 0.56 mmol) und rührt über Nacht. Die Reaktionsmischung wird in 10 ml H_2O gegeben, mit wässriger HCl-Lösung ein pH-Wert von 2 eingestellt und dreimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 \rightarrow CH_2Cl_2 10:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 72 mg, 90%

R_f -Wert: 0.30 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

Smp: 45-47 °C

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.86 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.20-1.38 (m, 25 H), 1.42-1.51 (m, 2 H), 2.55 (pq, J = 7.0 Hz, 1 H), 3.64-3.71 (m, 1 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 14.4, 22.8, 25.6, 29.5, 29.7 (3 C), 29.8, 29.9 (2 C), 32.0, 34.7, 45.2, 58.7, 73.3, 180.7.

HRMS (FAB): ber. für $C_{17}H_{33}O_3$: 285.2428, gem. 285.2428.

7.2.3 Versuche zu Kapitel 4.2.3

Darstellung von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-valyl-*O*-benzyl-L-threonin-benzylester (81)

Zu einer Lösung von 0.73 g (3.34 mmol) *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-valin (**47**) in 10 ml CH_2Cl_2 gibt man 1.00 g (3.34 mmol) des zuvor mit einem Äquivalent Triethylamin versetzten *O*-Benzyl-L-threonin-benzylesteroxalats (**78**). Danach werden 0.61 ml (0.50 g, 4.00 mmol) DIC und 0.68 g (5.00 mmol) HOBt zugegeben. Zunächst rührt man die Reaktionsmischung eine Stunde bei 0 °C und anschließend 15 Stunden bei Raumtemperatur. Nachdem man den entstandenen Niederschlag abgetrennt hat, wird das Gemisch mit je 3 ml H_2O , gesättigter Na_2CO_3 und 1 N Zitronensäure gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$

getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 1.07 g, 64%

Smp: 96 °C

R_f-Wert: 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -27.7 ° (c = 0.5, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.90 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 0.94 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 1.19 (d, *J* = 6.3 Hz, 3 H), 1.41 (s, 9 H), 2.04-2.13 (m, 1 H), 3.91-4.00 (m, 1 H), 4.16 (dq, *J*₁ = 2.2 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz, 1 H), 4.27 (d, *J* = 11.7 Hz, 1 H), 4.48 (d, *J* = 11.7 Hz, 1 H), 4.67 (dd, *J*₁ = 2.2 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1 H), 5.04-5.12 (m, 2 H), 6.41 (bd, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 7.22-7.31 (m, 10 H).

Darstellung von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-valyl-L-threonin (82)

Zu einer Suspension von 100 mg des Palladiumkatalysators auf Kohle (10 % Pd) in 50 ml Ethanol gibt man bei 0 °C das Dipeptid **81** (1.54 g, 3.09 mmol), das zuvor in 20 ml Ethanol gelöst wurde, zu. Man rührt 1.5 h unter H₂-Atmosphäre und filtriert anschließend das Reaktionsgemisch über Celite ab. Zuletzt wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 0.98 g, quantitativ

Smp: 160-162 °C

R_f-Wert: 0.28-0.52 (CH₂Cl₂/MeOH 4:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -11.6 ° (c = 0.30, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 1.02 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.23 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.49 (s, 9 H), 2.07-2.17 (m, 1 H), 3.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 4.32-4.38 (m, 1 H), 4.47 (d, *J* = 2.9 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 17.8, 19.0, 19.4, 28.1 (3 C), 30.8, 57.3, 60.0, 67.9, 80.1, 156.3, 172.5, 172.6.

HRMS (FAB): ber. für C₁₄H₂₆N₂O₆Na: 341.1691, gem. 341.1665.

Darstellung von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*O*-acetyl-L-serin (84)

Zu einer Lösung von 5.00 g (24.36 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-serin (**83**) in 50 ml CH₂Cl₂ gibt man bei 0 °C 4.60 ml (4.97 g, 48.72 mmol) Essigsäureanhydrid und 5.95 ml (5.78 g, 73.08 mmol) Pyridin. Die Lösung wird über Nacht bei RT gerührt und dann dreimal mit je 30 ml 1 N HCl-Lösung gewaschen. Anschließend extrahiert man die organische Phase viermal mit je 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung. Die wässrige Phase wird angesäuert (pH = 2) und viermal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Gelbliches Öl

Ausbeute: 5.82 g, 97%

R_f-Wert: 0.14 (Ethylacetat/MeOH 3:1)

[α]_D²⁰: +2.8 ° (c = 0.87, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.49 (s, 9 H), 2.08 (s, 3 H), 4.35 (dd, *J*₁ = 4.8 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1 H), 4.42-4.57 (m, 2 H), 4.90 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 20.7, 27.8 (3 C), 52.8, 64.4, 80.4, 155.4, 173.4, 176.5.

HRMS (FAB): ber. für C₁₀H₁₇O₆NNa: 270.0956 gem. 270.0962.

Darstellung von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*O*-acetyl-L-serin-allylester (85)

Zu einer Lösung von 1.0 g (4.06 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*O*-acetyl-L-serin (**84**) in 15 ml DMF werden unter Rühren bei RT 1.32 g (4.06 mmol) Cäsiumcarbonat zugegeben. Nach 15 min gibt man 0.70 ml (0.98 g, 8.12 mmol) Allylbromid zu und rührt die Reaktionsmischung nochmals 1 h. Die anorganischen Salze werden abfiltriert und das DMF unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in 20 ml Et₂O aufgenommen und dreimal mit je 10 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 0.86 g, 74%

R_f-Wert: 0.47 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1)

$[\alpha]_D^{20}$: +15.1 ° (c = 0.80, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.44 (s, 9 H), 2.03 (s, 3 H), 4.31 (dd, J_1 = 3.5 Hz, J_2 = 11.1 Hz, 1 H), 4.44 (dd, J_1 = 3.9 Hz, J_2 = 11.3 Hz, 1 H), 4.55-4.61 (m, 1 H), 4.62-4.67 (m, 2 H), 5.21-5.35 (m, 2 H), 5.82-5.93 (m, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 20.6, 28.2 (3 C), 52.9, 64.3, 66.3, 80.3, 118.9, 131.3, 155.1, 169.5, 170.4.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{N}$: 288.1449 gem. 288.1476.

Darstellung von *O*-Acetyl-L-serin-allylester (**86**)

Zu einer Lösung von 150 mg (0.52 mmol) der Boc-geschützten Aminosäure **85** in 5 ml CH_2Cl_2 tropft man 5 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 5 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 h im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Farbloses Öl

Ausbeute: 156 mg, quantitativ

R_f -Wert: 0.02-0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1)

$[\alpha]_D^{20}$: +7.3 ° (c = 0.66, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 2.06 (s, 3 H), 4.49-4.54 (m, 1 H), 4.55-4.60 (m, 2 H), 4.79-4.84 (m, 2 H), 5.40-5.48 (m, 2 H), 5.94-6.09 (m, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 20.2, 52.6, 61.2, 67.7, 120.1, 130.3, 166.5, 170.7.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4\text{N}$: 188.0925 gem. 188.0862.

Darstellung von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-acetyl-L-serin-allylester (**87**)

Zu einer Lösung von 158 mg (0.50 mmol) des Dipeptids **82**, 150 mg (0.50 mmol) der Aminosäure **86** und 92 mg (0.60 mmol) HOBt in 25 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ (5:1) gibt man bei 0 °C 0.11 ml (81 mg, 0.62 mmol) DIPEA, sowie 115 mg (0.60 mmol) EDC zu. Nachdem die Lösung über Nacht bei RT gerührt hat, extrahiert man die Reaktionsmischung je dreimal mit 10 ml gesättigter NaHCO_3 -, 0.5 N HCl- und gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase

wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 191 mg, 80%

R_f-Wert: 0.48 (Ethylacetat)

$[\alpha]_D^{20}$: -19.0° (c = 0.60, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.98 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.25 (d, J = 6.5 Hz, 3 H), 1.49 (s, 9 H), 2.07 (s, 3 H), 2.09-2.17 (m, 1 H), 3.94-3.99 (m, 1 H), 4.16-4.23 (m, 1 H), 4.39-4.49 (m, 2 H), 4.67-4.67 (m, 2 H), 4.81-4.86 (m, 1 H), 5.26-5.30 (m, 1 H), 5.35-5.42 (m, 2 H), 5.93-6.04 (m, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 18.9, 20.3, 21.0 (2 C), 29.1 (3 C), 32.0, 53.5, 60.1, 62.3, 64.8, 67.6, 68.8, 81.1, 114.0, 119.3, 133.5, 170.6, 172.6, 172.7, 175.1.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_9$: 488.2608, gem. 488.2601.

Darstellung von L-valyl-L-threonyl-O-acetyl-L-serin-allylester (88)

Zu einer Lösung von 0.64 g (1.31 mmol) des Boc-geschützten Tripeptids **87** in 5 ml CH_2Cl_2 tropft man 5 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 5 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 h im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Gelbliches Öl

Ausbeute: 657 mg, quantitativ

R_f-Wert: 0.45-0.62 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1)

$[\alpha]_D^{20}$: $+6.5^\circ$ (c = 0.49, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.07 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.11 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.31 (d, J = 6.5 Hz, 3 H), 2.07 (s, 3 H), 2.23-2.30 (m, 1 H), 3.79-3.85 (m, 1 H), 4.11-4.17 (m, 1 H), 4.40-4.48 (m, 1 H), 4.50 (d, J = 5.3 Hz, 1 H), 4.68-4.72 (m, 2 H), 4.82-4.86 (m, 1 H), 5.25-5.31 (m, 1 H), 5.35-5.42 (m, 2 H), 5.94-6.04 (m, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 18.8, 20.1, 21.0 (2 C), 32.1, 53.4, 60.1, 60.9, 62.3, 64.8, 68.8, 114.0, 119.3, 170.6, 172.6, 172.7, 175.1.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_7$: 388.2086, gem. 388.2106.

7.3 Versuche zu Kapitel 4.3

7.3.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1

Darstellung von (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(*tert*-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-dimethyloctadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-acetyl-L-serin-allylester (**89**)

Zu einer Lösung von 183 mg (0.39 mmol) der Säure **43**, 195 mg (0.39 mmol) des Tripeptids **88** und 73 mg (0.48 mmol) HOBt in 20 ml CH₂Cl₂/THF (1:1) gibt man bei 0 °C 85 µl (64 mg, 0.49 mmol) DIPEA sowie 92 mg (0.48 mmol) EDC zu. Nachdem die Lösung über Nacht bei RT gerührt hat, extrahiert man die Reaktionsmischung je dreimal mit 10 ml gesättigter NaHCO₃-, 0.5 N HCl- und gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 183 mg, 57%

R_f-Wert: 0.12 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

[α]_D²⁰: -26.1 ° (c = 0.30, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.07 (s, 3 H), 0.09 (s, 3 H), 0.84-0.88 (m, 15 H), 0.92 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 0.97 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H), 1.06 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.14 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.22-1.27 (m, 22 H), 1.40-1.59 (m, 2 H), 1.66-1.72 (m, 1 H), 2.04 (s, 3 H), 2.20-2.30 (m, 1 H), 2.40-2.49 (m, 1 H), 3.75 (dd, *J*₁ = 2.1 Hz, *J*₂ = 8.2 Hz, 1 H), 3.82-3.87 (m, 1 H), 4.26-4.33 (m, 1 H), 4.35-4.46 (m, 4 H), 4.62-4.66 (m, 2 H), 4.75-4.82 (m, 1 H), 5.22-5.26 (m, 1 H), 5.28-5.35 (m, 1 H), 5.82-5.93 (m, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = -4.6, -3.5, 5.1, 13.8, 14.1, 17.6, 18.0, 18.3, 19.4, 20.7, 22.7, 25.5, 25.8 (3 C), 29.3, 29.5, 29.6 (4 C), 29.7 (2 C), 30.1, 31.9, 34.8, 36.6, 44.3, 52.0, 57.2, 59.1, 63.4, 66.5, 66.6, 77.1, 78.0, 119.1, 131.3, 168.7, 170.8 (2 C), 172.4, 176.4.

HRMS (FAB): ber. für C₄₃H₈₂N₃O₁₀Si: 828.5771, gem. 828.5783.

Darstellung von (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(*tert*-Butyl-dimethylsilyloxy)-3-hydroxy-2,4-dimethyloctadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-acetyl-L-serin (**90**)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.12 mmol) des Allylesters **89** und 0.11 ml (105 mg, 1.2 mmol) Morpholin in 3.8 ml sauerstofffreiem THF gibt man bei RT 14 mg (12 µmol) Tetrakis-

(triphenylphosphin)-palladium(0). Nachdem die Reaktionsmischung 1 h bei RT gerührt wurde, werden 30 ml Ethylacetat zugegeben und mit gesättigter NaCl-Lösung, die mit KHSO_4 auf pH = 3 eingestellt wird, gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5:1 \rightarrow 4:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 75 mg, 79%

R_f -Wert: 0.36 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -17.5° ($c = 0.40$, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.01$ (s, 3 H), 0.03 (s, 3 H), 0.79-0.85 (m, 15 H), 0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 0.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.04 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H), 1.17-1.25 (m, 22 H), 1.40-1.50 (m, 2 H), 1.59-1.65 (m, 1 H), 1.93 (s, 3 H), 2.11-2.20 (m, 1 H), 2.50-2.56 (m, 1 H), 3.69 (dd, $J_1 = 2.9$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1 H), 3.72-3.78 (m, 1 H), 4.15 (d, $J = 6.5$ Hz, 1 H), 4.21-4.33 (m, 3 H), 4.40-4.45 (m, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = -4.4$, -3.4 , 5.0, 14.3 (2 C), 17.5, 18.1, 18.3, 19.5, 21.0, 22.8, 25.6, 26.0 (3 C), 29.5 (2 C), 29.6 (4 C), 29.8 (2 C), 30.1, 32.0, 34.9, 36.4, 44.1, 51.9, 57.2, 59.4, 63.5, 66.8, 77.2, 78.0, 168.7, 170.8 (2 C), 173.4, 177.4.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{NaSi}$: 810.5278, gem. 810.5234.

Darstellung von (2R,3R,4S,5R)-3,5-dihydroxy-2,4-dimethyl-octadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-O-acetyl-L-serin (91)

Zu einer Lösung von 35 mg (44 μmol) der Verbindung **90** in 4 ml CH_2Cl_2 tropft man 0.4 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 20 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 4 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Farbloses Öl

Ausbeute: 36 mg, quantitativ

R_f -Wert: 0.14 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1)

$[\alpha]_D^{20}$: -4.6° ($c = 0.26$, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 0.94 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 0.98-1.00 (m, 6 H), 1.12 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.18 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H), 1.26-1.34 (m, 22 H), 1.44-1.49 (m, 2 H), 1.58-1.64 (m, 1 H), 2.00 (s, 3 H), 2.11-2.18 (m, 1 H), 2.68 (pquint, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 3.66-3.72 (m, 1 H), 3.81 (dd, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz, 1 H), 4.17-4.24 (m, 2 H), 4.32-4.49 (m, 2 H), 4.32-4.99 (m, 3 H), 4.65-4.69 (m, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.7, 13.9, 14.3, 18.9, 19.0, 20.4, 22.6, 25.3, 25.6, 29.2$ (2 C), 29.4 (2 C), 29.6 (4 C), 31.8, 35.1, 36.9, 37.6, 43.9, 52.4, 58.4, 60.2, 63.5, 66.9, 76.1, 78.0, 171.2, 171.5, 172.2, 173.2, 177.7.

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_{R} : 25.5 min/ $[\text{M}-1]^-$: 672.5.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{Na}$: 696.4410, gem. 696.4413.

7.3.2 Versuche zu Kapitel 4.3.4

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Anknüpfung (Beladung) von *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäuren an die Festphase (AAV 1)

Zu einer Lösung von 5 Äquivalenten *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäuren in DMF werden 10 Äquivalente DIPEA zugegeben und für einige Minuten geschüttelt. Anschließend gibt man dieses Gemisch zu in 2 ml DMF gequollenem Chlortrityl-Harz (1.30 g, Beladung: 1.60 mmol/g) und schüttelt für 3 Stunden. Das Polymer wird abfiltriert, dreimal mit je 5 ml DMF, CH_2Cl_2 sowie Ethylacetat/MeOH (1:1 v/v) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum *Capping* der nicht umgesetzten Funktionalitäten am Chlortrityl-Harz (AAV 2)

Zur Blockade der verbleibenden nicht umgesetzten Funktionalitäten wird das Harz mit einer Lösung von 4 ml DIPEA/MeOH (1:1 v/v) in 10 ml CH_2Cl_2 für 30 min geschüttelt. Das Polymer wird abfiltriert, dreimal mit je 5 ml DMF, CH_2Cl_2 sowie Ethylacetat/MeOH (1:1 v/v) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Belegungsgrades mittels UV-Spektroskopie (AAV 3)

Eine definierte Menge Harz zwischen 5 und 10 mg wird mit 10 ml einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und für 30 min geschüttelt. Man entnimmt 3 ml und bestimmt UV-spektroskopisch die Absorption bei 301 nm. Die Konzentration und damit der Belegungsgrad lassen sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Spaltung der *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe an der Festphase (AAV 4)

Das Harz wird zweimal mit je 5 ml einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und für 30 min geschüttelt. Das Polymer wird abfiltriert, dreimal mit je 5 ml DMF und CH₂Cl₂ gewaschen, sowie im Hochvakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur *N*-terminalen Anknüpfung von *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäuren an die Festphase (AAV 5)

Zu einer Lösung von 5 Äquivalenten der *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäuren, 7 Äquivalenten HOBt und 4.5 Äquivalenten HBTU in DMF werden 10 Äquivalente DIPEA zugegeben und für einige Minuten geschüttelt. Anschließend gibt man dieses Gemisch zu in 1 ml DMF gequollenem Polymer und schüttelt für 1 Stunde. Das Polymer wird abfiltriert, dreimal mit je 5 ml DMF und CH₂Cl₂ gewaschen, sowie im Hochvakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zu *N*-terminalen Anknüpfung der Fettsäuren an die Festphase (AAV 6)

Zu einer Lösung von 2 bzw. 5 Äquivalenten der Fettsäure, 2.8 bzw. 7 Äquivalenten HOBt und 1.8 bzw. 4.5 Äquivalenten HBTU in 0.5 bzw. 1 ml DMF werden 4 bzw. 10 Äquivalenten DIPEA zugegeben und für einige Minuten geschüttelt. Anschließend gibt man dieses Gemisch zu gequollenem Polymer und schüttelt für 3-4 Stunden. Das Polymer wird abfiltriert, dreimal mit je 5 ml DMF und CH₂Cl₂ gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Derivate von der Festphase (AAV 7)

Nach Quellen des Harzes in 2 ml CH₂Cl₂ für 5 min wird das Lösungsmittel entfernt und mit 2 ml TFA/CH₂Cl₂ (10:1 v/v) Lösung versetzt. Nach Schütteln für 15 min wird die Lösung abgesaugt und der Vorgang nochmals wiederholt. Das Polymer wird abfiltriert und fünfmal mit je 2 ml CH₂Cl₂ gewaschen. Die Lösung wird dreimal mit je 2 ml Toluol koevaporiert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Sofern nicht anders angegeben erfolgt die Reinigung mittels präparativer HPLC (Flussrate: 15 ml/min, CH₃CN/H₂O/TFA: 10/90/0.1 (0 min), auf 30/70/0.1 (10 min), auf 40/70/0.1 (20-30 min), auf 60/40/0.1 (40 min), auf 100/0/0.1 (41 min)).

Darstellung von polymergebundenem Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-Benzyl-L-Serin (94)

Gemäß AAV 1 werden 4.34 g (10.4 mol) Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-benzyl-L-Serin (**92**), 3.56 ml (2.68 g, 20.8 mmol) DIPEA und 1.30 g Chlortritylharz in 20 ml DMF umgesetzt. Das anschließende *Capping* wird nach AAV 2 durchgeführt. Die Bestimmung der Beladung gemäß AVV 3 ergab einen Wert von 0.93 mmol/g.

Darstellung von polymergebundenem Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Phenylalanin (95)

Gemäß AAV 1 werden 4.03 g (10.4 mol) Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Phenylalanin (**93**), 3.56 ml (2.68 g, 20.8 mmol) DIPEA und 1.30 g Chlortritylharz in 20 ml DMF umgesetzt. Das anschließende *Capping* wird nach AAV 2 durchgeführt. Die Bestimmung der Beladung gemäß AVV 3 ergab einen Wert von 0.95 mmol/g.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,5-Dihydroxy-2,4-dimethyl-octadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-L-phenylalanin (98)

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-L-Phenylalanin (**95**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 µmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Threonin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Valin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N*-terminal entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Fettsäure **43** (0.056 mmol) erfolgt gemäß AAV 5 und anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **98**.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 14 mg, 74%

$[\alpha]_D^{20}$: +21.3 ° (c = 0.15, MeOH)

Smp: 170-173 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.88-0.98 (m, 12 H), 1.08 (d, J = 7.0, 3 H), 1.14 (d, J = 6.3, 3 H), 1.28-1.40 (m, 22 H), 1.41-1.55 (m, 2 H), 1.58-1.66 (m, 1 H), 2.01-2.08 (m, 1 H), 2.63 (pquint, J = 7.2 Hz, 1 H), 3.04 (dd, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 13.9 Hz, 1 H), 3.18 (dd, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 13.7 Hz, 1 H), 3.66-3.72 (m, 1 H), 3.80 (dd, J_1 = 3.5 Hz, J_2 = 8.0 Hz, 1 H), 4.05-4.15 (m, 1 H), 4.16-4.21 (m, 1 H), 4.32-4.35 (m, 1 H), 4.66-4.71 (m, 1 H), 7.18-7.29 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 27.0 min/ $[\text{M}-1]^+$: 690.7.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_3\text{O}_8$: 690.4693, gem. 690.4705.

(2R,3R,4S,5R)-3,5-Dihydroxy-2,4-dimethyl-octadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (99)

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 μmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Threonin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Valin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N*-terminal entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Fettsäure **43** (0.056 mmol) gemäß AAV 5 und die anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **99**.

Farbloses Öl

Ausbeute: 15 mg, 74%

$[\alpha]_D^{20}$: -3.8 ° (c = 0.60, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.87-0.98 (m, 12 H), 1.08 (d, 3 H, J = 6.8 Hz), 1.19 (d, 3 H, J = 6.3 Hz), 1.22-1.36 (m, 22 H), 1.44-1.52 (m, 2 H), 1.58-1.62 (m, 1 H), 2.06-2.14 (m, 1 H), 2.60-2.69 (m, 1 H), 3.66-3.76 (m, 2 H), 3.78-3.85 (m, 1 H), 3.87-3.94 (m, 1 H), 4.13-4.22 (m, 1 H), 4.24 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 4.44-4.59 (m, 1 H), 4.61-4.68 (m, 1 H), 7.23-7.31 (m, 5 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 5.0, 14.1, 14.7, 18.4, 19.1, 22.6, 25.4, 26.1, 29.3, 29.5 (3 C), 29.6 (2 C), 29.7, 30.8, 31.9, 35.0, 36.5, 36.9, 44.0, 50.4, 52.8, 59.0, 67.8, 69.2, 73.2, 78.4, 127.5, 127.6 (2 C), 127.7, 127.8, 128.4, 137.3, 170.5, 172.5, 174.2, 176.8.

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 27.2 min/ [M-1]⁻: 720.6.

HRMS (FAB): ber. für C₃₉H₆₈N₃O₉: 722.4956, gem. 722.4955.

(2R,3R,4S,5R)-3,5-Dihydroxy-2,4-dimethyl-octadecanoyl-L-tyrosyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (100)

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 μmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Threonin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Tyrosin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N*-terminal entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Fettsäure **43** (0.056 mmol) gemäß AAV 5 und die anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **100**.

Farbloses Öl

Ausbeute: 6 mg, 27%

$[\alpha]_D^{20}$: +3.1 ° (c = 0.13, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.94 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.07 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.22 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.26 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 1.31-1.39 (m, 22 H), 1.46-1.52 (m, 2 H), 1.57-1.64 (m, 1 H), 2.56 (pquint, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 2.98 (dd, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 14.1 Hz, 1 H), 3.14 (dd, *J*₁ = 5.3 Hz, *J*₂ = 13.9 Hz, 1 H), 3.66-3.71 (m, 1 H), 3.74-3.83 (m, 2 H), 3.95 (dd, *J*₁ = 4.5 Hz, *J*₂ = 9.6 Hz, 2 H), 4.15-4.23 (m, 1 H), 4.46 (d, *J* = 4.1 Hz, 1 H), 4.51-4.69 (m, 4 H), 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.26-7.39 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 26.7 min/ [M-1]⁻: 684.8.

HRMS (FAB): ber. für C₄₃H₆₆N₃O₁₀: 785.4826, gem. 785.4802.

(2R,3R,4S,5R)-3,5-Dihydroxy-2,4-dimethyl-octadecanoyl-L-valyl-L-tyrosyl-O-benzyl-L-serin (101)

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 μmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Tyrosin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Valin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N*-terminal entschützte Tripeptid am

Harz. Die Anknüpfung der Fettsäure **43** (0.056 mmol) gemäß AAV 5 und die anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **101**.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 10 mg, 46%

$[\alpha]_D^{20}$: -1.4° (c = 0.29, MeOH)

Smp: 144-145 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.88-1.00 (m, 9 H), 1.08 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.28 (d, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.30-1.41 (m, 22 H), 1.45-1.58 (m, 2 H), 1.60-1.68 (m, 1 H), 1.98-2.08 (m, 1 H), 2.60 (pquint, J = 7.2 Hz, 1 H), 2.87 (dd, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 14.0 Hz, 1 H), 3.08 (dd, J_1 = 5.1 Hz, J_2 = 14.1 Hz, 1 H), 3.70-3.79 (m, 2 H), 3.82 (dd, J_1 = 3.3 Hz, J_2 = 7.6 Hz, 1 H), 3.87-3.94 (m, 1 H), 4.15-4.21 (m, 1 H), 4.52-4.66 (m, 3 H), 4.69-4.79 (m, 1 H), 6.70 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.10 (d, J = 8.4 Hz, 2 H) 7.26-7.38 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 27.6 min/ $[\text{M}-1]^-$: 782.7.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_9$: 783.5034, gem. 783.5172.

(2R,3R,4S,5R)-3,5-Dihydroxy-2,4-dimethyl-octadecanoyl-L-valyl-L-asparagyl-O-benzyl-L-serin (102)

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 μmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Asparaginsäure (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Valin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N*-terminal entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Fettsäure **43** (0.056 mmol) gemäß AAV 5 und die anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **102**.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 10 mg, 49%

$[\alpha]_D^{20}$: -2.9° (c = 0.17, MeOH)

Smp: 122-124 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.94 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 0.96-1.10 (m, 9 H), 1.13 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.28-1.39 (m, 22 H), 1.46-1.55 (m, 2 H), 1.62-1.69 (m, 1 H), 2.07-2.16 (m, 1

7. Experimenteller Teil

H), 2.65 (pquint, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 2.80 (dd, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, 1 H), 2.90 (dd, $J_1 = 6.1$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, 1 H), 3.69-3.76 (m, 1 H), 3.78 (dd, $J_1 = 3.7$ Hz, $J_2 = 9.8$ Hz, 1 H), 3.94 (dd, $J_1 = 4.3$ Hz, $J_2 = 9.8$ Hz, 1 H), 4.23 (d, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 4.58-4.65 (m, 3 H), 4.84-4.93 (m, 1 H), 7.27-7.40 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 27.0 min/ [M-1]⁻: 734.5.

HRMS (FAB): ber. für C₄₄H₆₉N₃O₉: 735.4670, gem. 735.4638.

Tetradecanoyl-L-tyrosyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (103)

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 µmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Threonin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Tyrosin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N*-terminal entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Tetradecansäure (**77**) (0.14 mmol) gemäß AAV 5 und die anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **103**.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 14 mg, 75%

$[\alpha]_D^{20}$: +18.2 ° (c = 0.11, MeOH)

Smp: 99-101 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.94 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.18 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H), 1.27-1.40 (m, 20 H), 1.48-1.56 (m, 2 H), 2.13 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 2.82 (dd, $J_1 = 9.8$ Hz, $J_2 = 14.1$ Hz, 1 H), 3.13 (dd, $J_1 = 5.0$ Hz, $J_2 = 14.3$ Hz, 1 H), 3.80 (dd, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, 1 H), 3.97 (dd, $J_1 = 4.3$ Hz, $J_2 = 9.8$ Hz, 1 H), 4.19-4.25 (m, 1 H), 4.46 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H), 4.54-4.64 (m, 2 H), 4.65-4.70 (m, 2 H), 6.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.27-7.39 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 26.0 min/ [M-1]⁻: 668.6.

HRMS (FAB): ber. für C₃₇H₅₄N₃O₈: 668.3910, gem. 668.3911.

Tetradecanoyl-L-valyl-L-tyrosyl-O-benzyl-L-serin (104)

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 µmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Tyrosin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene

Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Valin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N-terminal* entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Tetradecansäure (**77**) (0.14 mmol) gemäß AAV 5 und die anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **104**.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 11 mg, 58%

$[\alpha]_D^{20}$: -12.0° (c = 0.04, MeOH)

Smp: 157-161 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.88 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 0.94 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 0.96 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.29-1.39 (m, 20 H), 1.57-1.66 (m, 2 H), 1.96-2.05 (m, 1 H), 2.25 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 2.86 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 14.1 Hz, 1 H), 3.11 (dd, J_1 = 5.1 Hz, J_2 = 14.1 Hz, 1 H), 3.75 (dd, J_1 = 3.5 Hz, J_2 = 9.6 Hz, 1 H), 3.91 (dd, J_1 = 4.7 Hz, J_2 = 9.8 Hz, 1 H), 4.15-4.20 (m, 1 H), 4.51-4.60 (m, 2 H), 4.63-4.67 (m, 1 H), 4.70-4.76 (m, 1 H), 6.70 (d, J = 8.6 Hz, 2 H), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.29-7.39 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 27.4 min/ $[\text{M}-1]^-$: 666.4.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_7$: 666.4118, gem. 666.4182.

Tetradecanoyl-L-valyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (105).

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 μmol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Threonin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Valin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N-terminal* entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Tetradecansäure (**77**) (0.14 mmol) gemäß AAV 5 und die anschließende Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert das gewünschte Produkt **105**.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 12 mg, 71%

$[\alpha]_D^{20}$: -4.2° (c = 0.59, MeOH)

Smp: 184-185 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.93 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 0.98 (d, J = 6.8 Hz, 6 H), 1.23 (d, J = 6.3 Hz, 3 H), 1.28-1.40 (m, 20 H), 1.60-1.69 (m, 2 H), 2.08-2.18 (m, 1 H), 2.30 (t, J = 7.2 Hz, 2 H), 3.78 (dd, J_1 = 3.3 Hz, J_2 = 9.5 Hz, 1 H), 3.95 (dd, J_1 = 4.3 Hz, J_2 = 9.8 Hz, 1 H),

7. Experimenteller Teil

4.20-4.28 (m, 2 H), 4.49 (d, $J = 3.8$ Hz, 1 H), 4.52-4.62 (m, 2 H), 4.64-4.69 (m, 1 H), 7.27-7.38 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: a); t_R : 27.1 min/ $[M-1]^-$: 604.4.

HRMS (FAB): ber. für $C_{33}H_{55}N_3O_7$: 604.3961, gem. 604.3994.

(2R,3R)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (106) **und (2S,3S)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (107)**

Gemäß AAV 4 wird polymergebundenes Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (30 mg, 0.95 mmol/g, 28 μ mol) mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF behandelt. Anschließend liefert die Anknüpfung von Fmoc-L-Threonin (0.14 mmol) gemäß AAV 5 das polymergebundene Dipeptid. Durch nochmalige Durchführung der Arbeitszyklen AAV 4, AAV 5 mit Fmoc-L-Valin (0.14 mmol) und wiederum AAV 4 erhält man das *N*-terminal entschützte Tripeptid am Harz. Die Anknüpfung der Fettsäure **76** (0.056 mmol) gemäß AAV 5 und anschließende die Abspaltung vom Polymer nach AAV 7 liefert die gewünschten Produkte **106** und **107**.

(*R,R*)-Diastereomer **106**: Weißer Feststoff

Ausbeute: 6 mg, 32%

$[\alpha]_D^{20}$: -10.6° ($c = 0.17$, MeOH)

Smp: 183-185 $^\circ$ C

1 H-NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.85$ (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 0.90 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.14 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H), 1.19 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.21-1.31 (m, 22 H), 1.34-1.50 (m, 2 H), 2.10-2.20 (m, 1 H), 2.32-2.39 (m, 1 H), 3.52-3.54 (m, 1 H), 3.71 (dd, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1 H), 3.91 (dd, $J_1 = 3.7$ Hz, $J_2 = 9.8$ Hz, 1 H), 4.20-4.28 (m, 2 H), 4.41-4.49 (m, 1 H), 4.46-4.55 (m, 2 H), 4.64-4.69 (m, 1 H), 7.23-7.33 (m, 5 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: b); t_R : 10.0 min/ $[M+1]^+$: 664.3.

HRMS (FAB): ber. für $C_{36}H_{61}N_3O_8Na$: 686.4359, gem. 686.4372.

(*S,S*)-Diastereomer **107**: Weißer Feststoff

Ausbeute: 6 mg, 32 %

$[\alpha]_D^{20}$: $+2.8^\circ$ ($c = 0.13$, MeOH)

Smp: 170-172 $^\circ$ C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.83 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 0.90 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 0.96 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.04 (d, J = 6.9 Hz, 3 H), 1.11 (d, J = 6.5 Hz, 3 H), 1.17-1.30 (m, 22 H), 1.38-1.52 (m, 2 H), 2.12-2.40 (m, 2 H), 3.50-3.56 (m, 1 H), 3.79 (dd, J_1 = 3.5 Hz, J_2 = 10.0 Hz, 1 H), 3.87 (dd, J_1 = 5.9 Hz, J_2 = 10.2 Hz, 1 H), 4.20-4.31 (m, 2 H), 4.35-4.40 (m, 1 H), 4.46-4.55 (m, 2 H), 4.60-4.66 (m, 1 H), 6.82 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 7.20-7.32 (m, 5 H), 7.57 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.72 (d, J = 8.4 Hz, 1 H).

HPLC/MS: Säule/Gradient: b); t_{R} : 10.4 min/ $[\text{M}+1]^+$: 664.3.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$: 686.4359, gem. 686.4343.

(2R,3R)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecanoyl-L-valyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (106) aus 109 (stereoselektiv)

Gemäß oben geschilderter Arbeitsvorschrift wurde das Derivat **106** stereoselektiv ausgehend von polymergebundenem Fmoc-*O*-Benzyl-L-Serin (**94**) (60 mg, 0.95 mmol/g, 56 μmol) durch Anknüpfung von Fmoc-L-Threonin (0.28 mmol), Fmoc-L-Valin (0.28 mmol) und der Hydroxysäure **109** (0.11 mmol) erhalten.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 28 mg, 75%

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -11.2° (c = 0.5, MeOH)

Smp: 182-183 $^\circ\text{C}$

Weitere analytische Daten siehe oben.

Darstellung von (4S)-(2R,3R)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecanoyl-4-isopropyl-oxazolidinon (108)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.54 mmol) des Oxazolidinons **36** in 1.0 ml CH_2Cl_2 gibt man bei 0 $^\circ\text{C}$ 0.11 ml (84 mg, 0.64 mmol) DIPEA und 0.64 ml (1 M Lösung, 0.64 mmol) Di-*n*-butylbortriflat. Nachdem die Lösung für 2 h bei 0 $^\circ\text{C}$ gerührt wurde, kühlt man auf -78°C ab. In einem separaten Kolben gibt man zu einer Lösung aus 1.08 ml (1 M Lösung, 1.08 mmol) Diethylaluminiumchlorid in 1.0 ml CH_2Cl_2 bei -78°C 115 mg (0.54 mmol) Tetradecanal (**37**) in 1.0 ml CH_2Cl_2 zu. Nach 5 min tropft man das zuvor generierte Boron-Enolat zu und spült mit 1.0 ml CH_2Cl_2 nach. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, wobei man die Lösung auf -20°C auftauen lässt. Nachdem nochmals 2 h bei 0 $^\circ\text{C}$ gerührt wurde, gibt man eine Lösung aus 10 ml MeOH/30%ige H_2O_2 -Lösung (5:1) zu und rührt eine weitere Stunde.

7. Experimenteller Teil

Anschließend werden 10 ml H₂O zugegeben und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 20 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je dreimal mit 20 ml gesättigter NaHCO₃-, NaCl-Lösung extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das gewünschte Produkt **108** konnte nach Abtrennung eines weiteren Diastereomers (*syn*) mittels Chromatographie an Kieselgel als isomerenreines Produkt erhalten werden (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 → 5:1 v/v).

Verhältnis der Diastereomere: 13:4.

Farbloses Öl

Ausbeute: 52 mg, 24%

R_f-Wert: 0.12 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v)

[α]_D²⁰: +37.9 ° (c = 1.0, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.82-0.90 (m, 9 H), 1.14 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.19-1.32 (m, 22 H), 1.39-1.55 (m, 2 H), 2.30-2.41 (m, 1 H), 2.50 (bs, 1 H), 3.59-3.65 (m, 1 H), 3.88 (pq, *J* = 6.9 Hz, 1 H), 4.15-4.26 (m, 2 H), 4.37-4.45 (m, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.2, 14.5, 14.7, 18.0, 22.8, 25.5, 28.4, 29.2, 29.4, 29.6 (2 C), 29.7 (4 C), 32.0, 35.2, 43.0, 58.7, 63.2, 74.7, 153.9, 176.5.

HRMS (FAB): ber. für C₂₃H₄₅NO₄:398.3272 gem. 398.3289.

Darstellung von (2*R*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecansäure (109) aus (4*S*)-(2*R*, 3*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecanoyl-4-isopropyl-oxazolidinon (108)

Zu einer Lösung von 113 mg (0.28 mmol) des Oxazolidinons **108** in 5 ml THF/H₂O (4:1) werden bei 0 °C 0.19 ml (1.68 mmol) einer 30%igen H₂O₂-Lösung und 24 mg (0.56 mmol) LiOH·H₂O zugegeben. Man rührt 3 h bei 0 °C und gibt dann 10 ml 1.5 N Na₂SO₃-Lösung zu. Nachdem man die Reaktionslösung mit 1 N HCl auf pH = 1-2 eingestellt hat, extrahiert man die wässrige Phase dreimal mit je 10 ml CH₂Cl₂. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 → CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 37 mg, 46%

R_f-Wert: 0.30 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: + 3.3 ° (c = 0.58, Chloroform)

Smp: 46-47 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.86 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.20-1.38 (m, 25 H), 1.42-1.51 (m, 2 H), 2.55 (pq, J = 7.0 Hz, 1 H), 3.64-3.71 (m, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 14.3, 14.4, 22.8, 25.6, 29.5, 29.7 (3 C), 29.8, 29.9 (2 C), 32.0, 34.7, 45.2, 58.7, 73.3, 180.7.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{Na}$: 309.2406, gem. 309.2390.

7.4 Versuche zu Kapitel 4.5

7.4.1 Versuche zu Kapitel 4.5.3

Darstellung von 2-Methyl-3-oxo-(fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-benzyl-L-seryl)-hexadecansäure-*S*-*tert*-butylthioester (Diastereomerengemisch) (139)

Zu einer Lösung von 1.16 g (2.79 mmol) Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-benzyl-L-Serin (**94**) und 1.0 g (2.79 mmol) des Thioesters (**75**) in 40 ml CH_2Cl_2 gibt man bei 0 °C 0.48 ml (0.38 g, 3.07 mmol) DIC und 34 mg (0.28 mmol) DMAP zu. Nachdem über Nacht bei RT gerührt wurde, werden 100 ml Et_2O zugegeben und jeweils dreimal mit je 20 ml 1 N HCl-, gesättigter NaHCO_3 - und NaCl -Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1 → 10 :1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 1.73 g, 82% (Diastereomerengemisch)

R_f -Wert: 0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.88 (t_a , J_a = 7.0 Hz, 3 H), 0.89 (t_b , J_b = 7.2 Hz, 3 H) 1.09 (d_a , J_a = 7.2 Hz, 3 H), 1.13 (d_b , J_b = 7.0 Hz, 3 H), 1.16-1.34 (m, 22 H), 1.43 (s_a , 9 H), 1.45 (s_b , 9 H), 1.55-1.63 (m, 2 H), 2.83-2.91 (m, 1 H), 3.75 (dd, J_1 = 3.1 Hz, J_2 = 9.4 Hz, 1 H), 3.92-3.98 (m, 1 H), 4.21-4.27 (m, 1 H), 4.30-4.41 (m, 1 H), 4.49-4.53 (m, 3 H), 5.15-5.22 (m, 1 H), 5.70 (bd, J = 8.4 Hz, 1 H), 5.73 (bd, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.26-7.36 (m, 7 H), 7.38-7.44 (m, 2 H), 7.59-7.65 (m, 2 H), 7.76 (d, J = 7.4 Hz, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 12.8, 14.2, 22.8, 25.3, 29.4, 29.5, 29.7 (2 C), 29.8 (6 C), 30.6, 30.9, 32.0, 47.2, 48.2, 51.7, 54.6, 67.2, 70.1, 73.3, 76.3, 119.8, 125.0, 126.9, 127.3,

127.5 (2 C), 127.6 (2 C), 127.7 (2 C), 128.2, 128.3, 128.8, 137.3, 141.1 (2 C), 143.6, 143.8, 155.7, 170.8, 200.6.

HRMS (FAB): ber. für C₄₆H₆₄O₆NS: 758.4456, gem. 758.4441.

Darstellung von (2*S*,3*S*)-2-Methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-*L*-seryl)-hexadecansäure-*S*-*tert*-butylthioester (140) und (2*R*,3*R*)-2-Methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-*L*-seryl)-hexadecansäure-*S*-*tert*-butylthioester (141)

Zu einer Lösung des Esters (**139**) in 35 ml CH₂Cl₂ gibt man bei RT tropfenweise 8.75 ml Diethylamin zu. Nachdem man 3.5 h gerührt hat wird dreimal mit je 30 ml Toluol koevaporiert und anschließend das Lösungsmittel vollständig unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 → 2:1 v/v).

(*S,S*)-Diastereomer **140**: Gelbliches Öl

Ausbeute: 519 mg, 42.5%

R_f-Wert: 0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

[α]_D²⁰: +19.2 ° (c = 0.13, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.19-1.32 (m, 22 H), 1.44 (s, 9 H), 1.50-1.63 (m, 2 H), 2.85 (pquint, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 3.64-3.67 (m, 1 H), 3.72-3.76 (m, 2 H), 4.50-4.55 (m, 2 H), 5.11-5.17 (m, 1 H), 7.22-7.35 (m, 5 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 13.3, 14.2, 22.8, 25.0, 29.4, 29.5 (2 C), 29.6, 29.7 (3 C), 29.8 (4 C), 30.9, 32.0, 48.1, 51.6, 55.1, 72.0, 73.3, 75.5, 127.5 (3 C), 128.2 (2 C), 137.6, 172.5, 200.6.

HRMS (FAB): ber. für C₃₁H₅₄O₄NS: 536.3775, gem. 536.3766.

(*R,R*)-Diastereomer **141**: Gelbliches Öl

Ausbeute: 510 mg, 41.7%

R_f-Wert: 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

[α]_D²⁰: -18.2 ° (c = 1.29, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.11 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.16-1.32 (m, 22 H), 1.43 (s, 9 H), 1.47-1.65 (m, 2 H), 2.83 (pquint, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.58-3.62 (m, 1 H), 3.72 (dd, *J*₁ = 3.5 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz, 1 H), 3.77 (dd, *J*₁ = 4.7 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz, 1 H), 4.50-4.55 (m, 2 H), 5.11-5.17 (m, 1 H), 7.22-7.34 (m, 5 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.5, 14.2, 22.8, 25.0, 29.4, 29.5$ (2 C), 29.7 (4 C), 29.8 (4 C), $31.0, 31.9, 48.1, 51.8, 54.9, 71.8, 73.3, 75.6, 127.4, 127.5, 128.2$ (3 C), $137.6, 172.5, 200.8$.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{NS}$: 536.3775, gem. 536.3782.

Darstellung von (2R,3R)-3-Hydroxy-2-methyl-hexadecansäure (109) aus (2R,3R)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl)-hexadecansäure-S-tert-butylthioester (141)

Zu einer Lösung von 50 mg (93 μmol) des Esters **141** in 1.5 ml Dioxan gibt man bei RT 1 N NaOH-Lösung (186 μl , 186 μmol) und rührt über Nacht. Die Reaktionsmischung wird in 10 ml H_2O gegeben, mit wässriger HCl-Lösung ein pH-Wert von 2 eingestellt und dreimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 \rightarrow $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 14 mg, 53%

R_f -Wert: 0.30 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

Smp: 45-47 $^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20}$: +4.0 $^\circ$ (c = 0.70, Chloroform)

Die spektroskopischen Daten (siehe Kap. 7.3.2 Seite 109; **109** aus **108**) stimmen überein.

Darstellung von (2S,3S)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-tert-butyloxy-carbonyl-L-valin)-hexadecansäure-S-tert-butylthioester (142)

Zu einer Lösung von 308 mg (0.97 mmol) des Dipeptids (**82**), 519 mg (0.97 mmol) des Thioesters **140** und 178 mg (1.16 mmol) HOBt in 35 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (10:1) gibt man bei 0 $^\circ\text{C}$ 0.21 ml (156 mg, 1.21 mmol) DIPEA, sowie 0.18 ml (147 mg, 1.16 mmol) DIC zu. Nachdem die Lösung über Nacht bei RT gerührt hat, extrahiert man die Reaktionsmischung je dreimal mit 15 ml gesättigter NaHCO_3 -, 0.5 N HCl- und gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v).

Gelbes Öl

Ausbeute: 570 mg, 70%

R_f-Wert: 0.42 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -10.0 ° (c = 0.55, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 0.91 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 1.05 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.19-1.30 (m, 22 H), 1.42 (s, 9 H), 1.43 (s, 9 H), 1.51-1.60 (m, 2 H), 2.05-2.17 (m, 1 H), 2.78-2.86 (m, 1 H), 3.65 (dd, *J*₁ = 3.3 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1 H), 3.91 (dd, *J*₁ = 3.7 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1 H), 3.92-3.99 (m, 1 H), 4.34 (dq, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 6.5 Hz, 1 H), 4.45 (dd, *J*₁ = 2.5 Hz, *J*₂ = 7.8 Hz, 1 H), 4.47-4.51 (m, 2 H), 4.67-4.72 (m, 1 H), 5.01 (bd, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.10-5.15 (m, 1 H), 6.80 (bd, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.18 (bd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.24-7.35 (m, 5 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 12.8, 14.2, 17.8, 18.0, 19.3, 22.7, 25.2, 28.3 (3 C), 29.4 (5 C), 29.7 (3 C), 29.8 (3 C), 30.6, 31.0, 32.0, 48.1, 51.4, 52.8, 57.0, 59.9, 66.8, 69.5, 73.2, 76.2, 79.7, 127.3, 127.5, 127.6, 128.2 (2 C), 137.1, 155.6, 169.0, 170.0, 172.1, 200.3.

HRMS (FAB): ber. für C₄₅H₇₈O₉N₃S: 836.5461, gem. 836.5474.

Darstellung von (2*S*,3*S*)-2-Methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-L-seryl-L-threonyl-*tert*-butyloxy-carbonyl-L-valin)-hexadecansäure (148)

Zu einer Lösung von 10 mg (12 μmol) des Thioesters **142** in 0.1 ml THF/H₂O (4:1) gibt man bei RT 3 mg (17 μmol) *N*-Bromsuccinimid. Nach 3 h werden nochmals 3 mg (17 μmol) *N*-Bromsuccinimid zugegeben und für weitere 5 h bei RT gerührt. Anschließend gibt man 2 ml 0.2 M Na₂S₂O₃-Lösung zu und extrahiert viermal mit je 3 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 3 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v → CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 6.5 mg, 70%

R_f-Wert: 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -11.9 ° (c = 0.43, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.84-0.96 (m, 9 H), 1.11 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.16-1.32 (m, 25 H), 1.42 (s, 9 H), 1.49-1.68 (m, 2 H), 2.04-2.16 (m, 1 H), 2.62-2.71 (m, 1 H), 3.59 (m, 1

7. Experimenteller Teil

H), 3.90 (dd, $J_1 = 2.9$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz, 1 H), 4.02-4.12 (m, 1 H), 4.26-4.37 (m, 1 H), 4.48-4.51 (m, 2 H), 4.52-4.59 (m, 1 H), 4.65-4.73 (m, 1 H), 5.06-5.16 (m, 1H), 5.35 (bd, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.21-7.32 (m, 5 H), 7.39 (bs, 1H), 9.55 (bs, 1H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.4, 14.2, 17.9, 18.3, 19.3, 22.7, 25.4, 28.3$ (3 C), 29.4 (5 C), 29.7 (3 C), 30.9, 31.6, 31.9, 43.2, 52.9, 57.2, 59.9, 67.0, 69.5, 73.1, 75.9, 79.7, 127.5 (3 C), 128.2 (2 C), 137.1, 155.7, 169.2, 170.3, 172.6, 178.6.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{41}\text{H}_{69}\text{O}_{10}\text{N}_3\text{Na}$: 786.4883, gem. 786.4892.

Darstellung von (2S,3S)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-L-valin)-hexadecansäure (149)

Zu einer Lösung von 335 mg (0.44 mmol) der Säure **148** in 8 ml CH_2Cl_2 tropft man 8 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 8 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Farbloses Öl

Ausbeute: 342 mg, quantitativ

$[\alpha]_D^{20}$: -5.5° ($c = 0.28$, Chloroform)

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.93$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.06 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.28-1.39 (m, 28 H), 1.61-1.69 (m, 2 H), 2.20-2.29 (m, 1 H), 2.74-2.82 (m, 1 H), 3.76 (dd, $J_1 = 3.5$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1 H), 3.88 (d, $J = 5.7$ Hz, 1 H), 3.96 (dd, $J_1 = 4.1$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1 H), 4.18-4.24 (m, 1 H), 4.53-4.61 (m, 3 H), 4.70-4.75 (m, 1 H), 5.19-5.25 (m, 1H), 7.25-7.38 (m, 5 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.5, 14.1, 17.8, 18.1, 18.9, 22.7, 24.6, 29.3$ (2 C), 29.5 (4 C), 29.6, 29.7, 30.2, 31.2, 31.9, 43.2, 49.2, 53.6, 58.8, 68.1, 69.3, 73.2, 76.7, 127.4 (2 C), 127.6, 128.1 (2 C), 136.9, 161.4, 169.1, 170.0, 179.3.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_8\text{N}_3$: 664.4539, gem. 664.4558.

Darstellung von Zyklo-(2S,3S)-2-methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-L-valyl)-hexadecansäureamid (130)

Methode 1

Zu einer Lösung von 27 mg (52 μ mol) PyBOP und 18 μ l (13.3 mg, 0.10 mmol) DIEPA in 20 ml CH₂Cl₂/DMF (20:1) gibt man bei RT über 3 h tropfenweise eine Lösung aus 20 mg (26 μ mol) der Säure **149** in 2 ml CH₂Cl₂ zu. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate: 25 ml/min, CH₃CN/H₂O/TFA: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 1.9 mg, 11%

Analytische Daten siehe unten!

Methode 2

Zu einer Lösung von 26.8 mg (52 μ mol) PyAOP, 3.5 mg (52 μ mol) HOAt und 18 μ l (13.3 mg, 0.1 mmol) DIEPA in 20 ml CH₂Cl₂/DMF (20:1) gibt man bei RT über 3 h tropfenweise eine Lösung aus 20 mg (26 μ mol) der Säure **149** in 2 ml CH₂Cl₂ zu. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate: 25 ml/min, CH₃CN/H₂O/TFA: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 2.7 mg, 16%.

Analytische Daten siehe unten!

Methode 3

Zu einer Lösung von 39 mg (0.10 mmol) HBTU und 18 μ l (13.3 mg, 0.10 mmol) DIEPA in 40 ml CH₂Cl₂/DMF (20:1) gibt man bei RT über 3 h tropfenweise eine Lösung aus 40 mg (52 μ mol) der Säure **149** und 18 μ l (13.3 mg, 0.10 mmol) DIPEA in 4 ml CH₂Cl₂ zu. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate:

25 ml/min, CH₃CN/H₂O/TFA: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 14.2 mg, 42%

Analytische Daten siehe unten!

Method 4

Zu einer Lösung von 7.8 mg (31 µmol) 2-Chloro-*N*-methyl-pyridiniumiodid und 6.7 µl (4.9 mg, 48.3 mmol) Triethylamin in 20 ml CH₂Cl₂/DMF (20:1) gibt man bei RT über 3 h tropfenweise eine Lösung aus 20 mg (26 µmol) der Säure **149** und 11.2 µl (3.1 mg, 80 µmol) Triethylamin in 2 ml CH₂Cl₂ zu. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, extrahiert man dreimal mit je 5 ml H₂O, trocknet die organische Phase über MgSO₄ und entfernt das Lösungsmittel unter vermindertem Druck. Der Rückstand wird mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate: 25 ml/min, CH₃CN/H₂O/TFA: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 2 mg, 12%

R_f-Wert: 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1)

HPLC: t_R: 7.1 min

[α]_D²⁰: -47.8 ° (c = 0.12, Chloroform)

Smp: 171-174 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/10 % CDCl₃): δ = 0.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.10 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H), 1.20 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.21-1.40 (m, 25 H), 1.56-1.65 (m, 1 H), 1.91-1.99 (m, 1 H), 2.00-2.09 (m, 1 H), 2.77-2.87 (m, 1 H), 3.72 (dd, *J*₁ = 5.5 Hz, *J*₂ = 9.6 Hz, 1 H), 3.85 (dd, *J*₁ = 3.9 Hz, *J*₂ = 9.6 Hz, 1 H), 3.94-3.99 (m, 1 H), 4.28-4.34 (m, 2 H), 4.54-4.62 (m, 3 H), 4.95-5.01 (m, 1 H), 7.28-7.38 (m, 5 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.3, 15.4, 19.4, 20.2, 20.4, 22.8, 24.1, 29.5 (2 C), 29.8 (2 C), 29.9 (4 C), 30.2, 31.2, 32.0, 44.1, 53.7, 61.3, 63.8, 65.8, 69.5, 73.2, 76.1, 127.3, 127.5 (2 C), 128.2 (2 C), 137.2, 168.0, 171.0, 174.2, 175.8.

HRMS (FAB): ber. für C₃₆H₅₉O₇N₃Na: 668.4253, gem. 668.4296.

Darstellung von (2R,3R)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-tert-butyloxy-carbonyl-L-valin)-hexadecansäure-S-tert-butylthioester (157)

Zu einer Lösung von 282 mg (0.88 mmol) des Dipeptids **82**, 475 mg (0.88 mmol) des Thioesters **141** und 163 mg (1.06 mmol) HOBt in 28 ml CH₂Cl₂/DMF (10:1) gibt man bei 0 °C 0.19 ml (143 mg, 1.10 mmol) DIPEA sowie 0.17 ml (134 mg, 1.06 mmol) DIC zu. Nachdem die Lösung über Nacht bei RT gerührt hat, extrahiert man die Reaktionsmischung je dreimal mit 15 ml gesättigter NaHCO₃-, 0.5 N HCl- und gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 559 mg, 76%

R_f-Wert: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v)

[α]_D²⁰: -25.0 ° (c = 1.24, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.82-0.89 (m, 9 H), 1.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.12-1.28 (m, 25 H), 1.38 (s, 9 H), 1.39 (s, 9 H), 1.45-1.58 (m, 2 H), 2.00-2.12 (m, 1 H), 2.82 (pquint, *J* = 6.8 Hz, 1 H), 3.61 (dd, *J*₁ = 3.3 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1 H), 3.89 (dd, *J*₁ = 3.1 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1 H), 4.02-4.09 (m, 1 H), 4.21-4.28 (m, 1 H), 4.42-4.46 (m, 2 H), 4.55 (dd, *J*₁ = 2.9 Hz, *J*₂ = 7.8 Hz, 1 H), 4.69-4.74 (m, 1 H), 5.08-5.16 (m, 1 H), 5.46 (bd, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.18-7.29 (m, 6 H), 7.56 (bd, *J* = 8.0 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 12.8, 14.1, 17.9 (2 C), 19.3, 22.7, 24.8, 28.3 (3 C), 29.4, 29.5 (2 C), 29.6 (5 C), 29.7 (3 C), 30.6, 31.0, 31.9, 48.0, 51.4, 52.6, 57.1, 59.7, 66.9, 69.57, 73.2, 76.2, 79.5, 127.2, 127.3, 127.4, 128.2 (2 C), 137.1, 155.6, 168.8, 169.8, 172.1, 200.4.

HRMS (FAB): ber. für C₄₅H₇₇O₉N₃SNa: 858.5281, gem. 858.5259.

Darstellung von (2R,3R)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-tert-butyloxy-carbonyl-L-valin)-hexadecansäure (158)

Zu einer Lösung von 559 mg (0.66 mmol) des Thioesters **157** in 5.5 ml THF/H₂O (4:1) gibt man bei RT 178 mg (1.0 mmol) *N*-Bromsuccinimid. Nach 3 h werden nochmals 178 mg (1.0 mmol) *N*-Bromsuccinimid zugegeben und für weitere 5 h bei RT gerührt. Anschließend gibt man 20 ml 0.2 M Na₂S₂O₃-Lösung zu und extrahiert viermal mit je 20 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 20 ml gesättigter NaCl-Lösung

gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v → CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 353 mg, 70%

R_f-Wert: 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v)

[α]_D²⁰: -17.7 ° (c = 0.13, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.82-0.91 (m, 9 H), 1.09-1.28 (m, 28 H), 1.39 (s, 9 H), 1.45-1.65 (m, 2 H), 1.98-2.08 (m, 1 H), 2.68 (pquint, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 3.60 (dd, *J*₁ = 3.33 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1 H), 3.84 (dd, *J*₁ = 3.1 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1 H), 4.04-4.12 (m, 1 H), 4.22-4.28 (m, 1 H), 4.40-4.44 (m, 2 H), 4.59-4.70 (m, 2 H), 5.09-5.17 (m, 1 H), 5.67 (bd, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.18-7.29 (m, 5 H), 7.68 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 13.4, 14.1, 17.9, 18.2, 19.3, 22.6, 24.8, 28.3 (3 C), 29.3, 29.5 (5 C), 29.6 (2 C), 31.0, 31.2, 31.9, 43.6, 52.8, 57.1, 59.8, 67.2, 69.2, 73.1, 76.4, 79.5, 127.2, 127.4 (2 C), 128.1 (2 C), 137.0, 155.7, 168.9, 170.5, 172.7, 178.7.

HRMS (FAB): ber. für C₄₁H₆₉O₁₀N₃Na: 786.4883, gem. 786.4864.

Darstellung von (2*R*,3*R*)-2-Methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-valin)-hexadecansäure (159)

Zu einer Lösung von 353 mg (0.46 mmol) der Säure **158** in 8 ml CH₂Cl₂ tropft man 8 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 8 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Gelbliches Öl

Ausbeute: 358 mg, quantitativ

[α]_D²⁰: -4.7 ° (c = 1.63, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.95-1.04 (m, 6 H), 1.15-1.39 (m, 28 H), 1.48-1.60 (m, 1 H), 1.61-1.74 (m, 1 H), 2.16-2.29 (m, 1 H), 2.65-2.77 (m, 1 H), 3.65-3.75 (m, 1 H), 3.91-3.98 (m, 1 H), 4.10-4.21 (m, 2 H), 4.45-4.54 (m, 2 H), 4.57-4.63 (m, 1 H), 4.66-4.80 (m, 1 H), 5.11-5.22 (m, 1 H), 7.23-7.37 (m, 6 H), 7.84-8.10 (bs, 3 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.0, 14.2, 17.3, 18.1, 18.5, 22.8, 24.4, 29.4$ (2 C), 29.5 (5 C), $29.7, 30.4, 31.4, 32.0, 43.4, 53.2$ (2 C), $58.9, 68.3, 68.8, 73.4, 76.7, 127.4$ (2 C), $127.7, 128.0, 128.2, 136.9, 161.4, 169.0, 170.4, 178.9$.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_8\text{N}_3$: 664.4539, gem. 664.4540.

Darstellung von Zyklo-(2*R*,3*R*)-2-methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-L-seryl-L-threonyl-L-valyl)-hexadecansäureamid (131)

Zu einer Lösung von 39 mg (0.10 mmol) HBTU und 18 μl (13.3 mg, 0.1 mmol) DIEPA in 40 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (20:1) gibt man bei RT über 3 h tropfenweise eine Lösung aus 40 mg (52 μmol) der Säure **159** und 18 μl (13.3 mg, 0.1 mmol) DIPEA in 4 ml CH_2Cl_2 zu. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate: 25 ml/min, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 6.3 mg, 19%.

R_f -Wert: 0.53 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1)

HPLC: t_R : 7.2 min

$[\alpha]_D^{20}$: -65.1° ($c = 0.41$, Chloroform)

Smp: 149-151 $^\circ\text{C}$

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.90$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H), 1.07 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H), 1.18 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.20 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H), 1.26-1.40 (m, 22 H), 1.60-1.74 (m, 1 H), 1.75-1.85 (m, 1 H), 2.00-2.10 (m, 1 H), 2.71-2.78 (m, 1 H), 3.88 (dd, $J_1 = 3.1$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz, 1 H), 3.96-4.02 (m, 1 H), 4.20-4.25 (m, 1 H), 4.38-4.47 (m, 1 H), 4.53-4.62 (m, 3 H), 4.65-4.71 (m, 1 H), 4.91-5.02 (m, 1 H), 7.29-7.42 (m, 5 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.3, 15.7, 18.8, 19.7, 20.5, 22.8, 24.8, 27.9, 29.5$ (2 C), 29.8 (6 C), $32.0, 32.5, 43.0, 53.8, 63.6, 66.0, 68.5, 69.7, 73.4, 77.2, 127.7, 127.9$ (2 C), $128.0, 128.3, 137.2, 168.7, 170.1, 172.7, 173.1$.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_7\text{N}_3\text{Na}$: 668.4253, gem. 668.4296.

Darstellung von Zyklo-(2*R*,3*R*)-2-methyl-3-oxy-(L-seryl-L-threonyl-L-valyl)-hexadecansäureamid (160)

Zu einer Suspension von 2 mg des Palladiumkatalysators auf Kohle (10 % Pd) in 1 ml MeOH gibt man bei 0 °C das Derivat **131** (6 mg, 9.3 µmol), das zuvor in 0.5 ml MeOH gelöst wurde, zu. Man rührt 7 Tage unter H₂-Atmosphäre und filtriert anschließend das Reaktionsgemisch über Celite ab. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate: 25 ml/min, CH₃CN/H₂O/TFA: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 3 mg, 58%

R_f-Wert: 0.27 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1)

HPLC: t_R: 6.3 min

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.84 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.96 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.04 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.18-1.30 (m, 28 H), 1.46-1.60 (m, 1 H), 1.72-1.84 (m, 1 H), 2.04-2.18 (m, 1 H), 2.70-2.78 (m, 1 H), 3.72-3.79 (m, 1 H), 3.84-3.92 (m, 1 H), 3.98-4.03 (m, 1 H), 4.36-4.46 (m, 2 H), 4.50-4.59 (m, 1 H), 4.79-4.84 (m, 1H).

HRMS (FAB): ber. für C₂₉H₅₃O₇N₃Na: 578.3784, gem. 578.3766.

Darstellung von (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (161)

Zu einer Lösung von 0.5 g (1.26 mmol) des Oxazolidinons **38** in 8 ml THF/H₂O (4:1) werden bei 0 °C 0.57 ml (5.03 mmol) einer 30%igen H₂O₂-Lösung und 105 mg (2.52 mmol) LiOH·H₂O zugegeben. Man rührt 1.5 h bei 0 °C und gibt dann 10 ml 1.5 N Na₂SO₃-Lösung zu. Nachdem man die Reaktionslösung mit 1 N HCl auf pH = 1-2 eingestellt hat, extrahiert man die wässrige Phase dreimal mit je 10 ml CH₂Cl₂. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 20:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 215 mg, 60%

R_f-Wert: 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1 v/v)

[α]_D²⁰: +7.6 ° (c = 1.48, Chloroform)

Smp: 69 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.85 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.17 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.20-1.34 (m, 22 H), 1.39-1.53 (m, 2 H), 2.51-2.59 (m, 1 H), 3.91-3.99 (m, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 10.5, 14.2, 22.8, 25.9, 29.6, 29.7 (5 C), 29.8 (2 C), 32.0, 33.7, 44.2, 71.8, 181.1.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{O}_3$: 285.2428, gem. 285.2404.

Darstellung von (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure-*S*-benzylthioester (167)

Zu einer Lösung von 378 mg (1.32 mmol) der Säure **161** und 243 mg (1.58 mmol) HOBt in 20 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (10:1) gibt man bei 0 °C 282 μl (213 mg, 1.65 mmol) DIPEA sowie 245 μl (200 mg, 1.58 mmol) DIC zu. Nach 10 min werden 156 μl (164 mg, 1.32 mmol) Benzylmercaptan (**166**) zugegeben und dann über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird je dreimal mit 10 ml 0.5 N HCl-, gesättigter NaHCO_3 -, und NaCl-Lösung extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 333 mg, 64%

R_f -Wert: 0.35 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: +15.2 ° (c = 1.25, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.86 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.18 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.20-1.28 (m, 22 H), 1.30-1.49 (m, 2 H), 2.66 (dq, J_1 = 3.7 Hz, J_2 = 7.0 Hz, 1 H), 3.84-3.89 (m, 1 H), 4.08 (s, 2 H), 7.16-7.28 (m, 5 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 11.5, 14.2, 22.8, 25.7, 29.5, 29.6, 29.7 (6 C), 32.0, 33.2, 34.2, 52.9, 72.0, 127.2 (2 C), 128.5 (2 C), 128.6, 137.1, 202.9.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{O}_2\text{S}$: 393.2839, gem. 393.2855.

Darstellung von (2*S*,3*R*)-2-Methyl-3-oxy-(*tert*-butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-*L*-seryl)-hexadecansäure-*S*-benzylthioester (168)

Zu einer Lösung von 353 mg (1.19 mmol) *tert*-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-*L*-Serin (**45**) und 469 mg (1.19 mmol) des Thioesters (**167**) in 16 ml CH_2Cl_2 gibt man bei 0 °C 0.20 ml (0.17 g,

1.31 mmol) DIC und 15 mg (0.12 mmol) DMAP zu. Nachdem über Nacht bei RT gerührt wurde, werden 50 ml Et₂O zugegeben und jeweils dreimal mit je 20 ml 1 N HCl-, gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10 :1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 0.67 g, 82%

R_f-Wert: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: +8.3 ° (c = 1.18, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.25-1.35 (m, 22 H), 1.45 (s, 9 H), 1.50-1.68 (m, 2 H), 2.82-2.92 (m, 1 H), 3.68 (dd, *J*₁ = 3.1 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1 H), 3.88 (dd, *J*₁ = 2.9 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1 H), 4.10 (s, 2 H), 4.40-4.47 (m, 1 H), 4.48-4.53 (m, 2 H), 5.17-5.23 (m, 1 H), 5.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.20-7.35 (m, 10 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 13.8, 14.3, 22.8, 25.2, 28.4 (3 C), 29.4 (2 C), 29.5, 29.7 (6 C), 32.0, 33.2, 51.7, 54.2, 70.2, 73.3, 75.8, 79.8, 127.1 (2 C), 127.4 (2 C), 127.6 (2 C), 128.2, 128.4 (2 C), 128.6, 137.2, 137.3, 155.1, 169.8, 199.5.

HRMS (FAB): ber. für C₃₉H₅₉O₆NSNa: 692.3963, gem. 692.3981.

Darstellung von (2*S*,3*R*)-2-Methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-*L*-seryl)-hexadecansäure-*S*-benzylthioester (169)

Zu einer Lösung von 649 mg (0.96 mmol) des Benzylthioesters (**168**) in 10 ml CH₂Cl₂ tropft man 10 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 10 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Farbloses Öl

Ausbeute: 657 mg, quantitativ

$[\alpha]_D^{20}$: +7.1 ° (c = 1.15, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.17-1.36 (m, 22 H), 1.48-1.61 (m, 2 H), 2.80-2.90 (m, 1 H), 3.86-3.94 (m, 1 H), 4.07 (m, 1 H), 4.18-4.24 (m, 1H), 4.46 (d, *J* = 11.7 Hz, 1 H), 4.58 (d, *J* = 11.9 Hz, 1 H), 5.19-5.26 (m, 1 H), 7.14-7.33 (m, 10 H), 8.67 (bs, 2 H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.2, 14.3, 22.8, 25.3, 29.4, 29.5, 29.7$ (2 C), 29.8 (4 C), 31.7, 32.0, 33.3, 51.1, 53.4, 66.6, 73.6, 77.7, 127.2 (2 C), 127.7 (2 C), 128.0, 128.3 (2 C), 128.5, 128.6, 128.9, 136.2, 137.0, 166.6, 199.4.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{NS}$: 570.3619, gem. 570.3587.

Darstellung von (2*S*,3*R*)-2-Methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-L-seryl-L-threonyl-*tert*-butyloxy-carbonyl-L-valin)-hexadecansäure-*S*-benzylthioester (170)

Zu einer Lösung von 314 mg (0.99 mmol) des Dipeptids **82**, 674 mg (0.99 mmol) des Thioesters **169** und 181 mg (1.18 mmol) HOBt in 30 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (10:1) gibt man bei 0 °C 0.21 ml (159 mg, 1.23 mmol) DIPEA sowie 0.18 ml (149 mg, 1.18 mmol) DIC zu. Nachdem die Lösung über Nacht bei RT gerührt hat, extrahiert man die Reaktionsmischung je dreimal mit 15 ml gesättigter NaHCO_3 -, 0.5 N HCl- und gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 529 mg, 61%

R_f -Wert: 0.11 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -8.9° ($c = 1.42$, Chloroform)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.83\text{-}0.96$ (m, 9 H), 1.11-1.30 (m, 28 H), 1.41 (s, 9 H), 1.48-1.57 (m, 2 H), 2.02-2.17 (m, 1 H), 2.82-2.90 (m, 1 H), 3.62 (dd, $J_1 = 3.1$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz, 1 H), 3.87 (dd, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz, 1 H), 4.05-4.12 (m, 3 H), 4.24-4.31 (m, 1 H), 4.42-4.48 (m, 2 H), 4.57 (dd, $J_1 = 3.1$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1 H), 4.60-4.76 (m, 1 H), 5.15-5.21 (m, 1 H), 5.43 (bd, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.18-7.32 (m, 11 H), 7.57 (bd, $J = 8.0$ Hz, 1H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.8, 14.2, 17.9$ (2 C), 19.3, 22.7, 25.2, 28.3 (3 C), 29.3, 29.4 (3 C), 29.6 (5 C), 31.0, 31.9, 33.1, 51.6, 52.8, 57.1, 59.8, 66.8, 69.4, 73.2, 76.1, 79.6, 127.0, 127.3 (2 C), 127.5 (2 C), 128.1, 128.3 (2 C), 128.5 (2 C), 137.0, 137.1, 155.6, 169.0, 170.0, 172.1, 199.3.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{O}_9\text{N}_3\text{SNa}$: 892.5124, gem. 892.5128.

Darstellung von (2S,3R)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-tert-butyloxy-carbonyl-L-valin)-hexadecansäure (171)

Zu einer Lösung von 202 mg (0.23 mmol) des Thioesters **170** in 2 ml THF/H₂O (4:1) gibt man bei RT 62 mg (0.35 mmol) *N*-Bromsuccinimid. Nach 3 h werden nochmals 62 mg (0.35 mmol) *N*-Bromsuccinimid zugegeben und für weitere 5 h bei RT gerührt. Anschließend gibt man 10 ml 0.2 M Na₂S₂O₃-Lösung zu und extrahiert viermal mit je 10 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v → CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 146 mg, 82%

R_f-Wert: 0.31 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v)

[α]_D²⁰: -9.4 ° (c = 1.43, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.83-0.96 (m, 9 H), 1.11-1.30 (m, 28 H), 1.39 (s, 9 H), 1.48-1.65 (m, 2 H), 2.00-2.12 (m, 1 H), 2.60-2.69 (m, 1 H), 3.58-3.65 (m, 1 H), 3.84 (dd, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz, 1 H), 4.06-4.12 (m, 1 H), 4.24-4.29 (m, 1 H), 4.40-4.48 (m, 2 H), 4.56-4.62 (m, 1 H), 4.63-4.68 (m, 1 H), 5.22-5.28 (m, 1 H), 5.55 (bd, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.19-7.32 (m, 5 H), 7.56-7.68 (m, 2 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 11.2, 14.1, 17.8, 18.1, 19.3, 22.7, 25.4, 28.3 (3 C), 29.3, 29.4, 29.5 (4 C), 29.6 (2 C), 31.0, 31.6, 31.9, 42.6, 52.8, 57.1, 60.3, 67.1, 69.0, 73.2, 75.6, 79.6, 127.3, 127.5 (2 C), 128.1 (2 C), 137.0, 155.7, 169.1, 170.5, 172.7, 177.5.

HRMS (FAB): ber. für C₄₁H₆₉O₁₀N₃Na: 786.4883, gem. 786.4871.

Darstellung von (2S,3R)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-L-valin)-hexadecansäure (172)

Zu einer Lösung von 145 mg (0.19 mmol) der Säure **171** in 4 ml CH₂Cl₂ tropft man 4 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 4 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Farbloses Öl

Ausbeute: 148 mg, quantitativ

$[\alpha]_D^{20}$: +11.1 ° (c = 1.10, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.92 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.03 (pt, J = 7.2 Hz, 6 H), 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.16-1.38 (m, 25 H), 1.51-1.62 (m, 2 H), 2.15-2.24 (m, 1 H), 2.60-2.70 (m, 1 H), 3.72 (dd, J_1 = 3.3 Hz, J_2 = 9.6 Hz, 1 H), 3.82 (d, J = 5.9 Hz, 1 H), 3.92 (dd, J_1 = 3.7 Hz, J_2 = 9.6 Hz, 1 H), 4.12-4.19 (m, 1 H), 4.48-4.55 (m, 3 H), 4.67-4.72 (m, 1 H), 5.17-5.22 (m, 1 H), 7.22-7.33 (m, 5 H), 8.33 (d, J = 8.0 Hz, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 9.61, 14.2, 17.6, 18.1, 18.5, 22.7, 25.5, 29.4 (2 C), 29.5 (5 C), 29.7 (2 C), 30.2, 32.0, 42.0, 53.1, 53.0, 58.9, 68.3, 68.5, 73.3, 75.6, 127.4 (2 C), 127.6, 128.2 (2 C), 136.9, 161.3, 168.9, 170.3, 179.0.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_8\text{N}_3$: 664.4539, gem. 664.4544.

Darstellung von Zylo-(2*S*,3*R*)-2-methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-valyl)-hexadecansäureamid (133)

Zu einer Lösung von 39 mg (0.10 mmol) HBTU und 18 μl (13.3 mg, 0.1 mmol) DIEPA in 40 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (20:1) gibt man bei RT über 3 h tropfenweise eine Lösung aus 40 mg (52 μmol) der Säure **172** und 18 μl (13.3 mg, 0.1 mmol) DIPEA in 4 ml CH_2Cl_2 zu. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate: 25 ml/min, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 7.5 mg, 22%.

R_f -Wert: 0.50 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1 v/v)

HPLC: t_R : 7.5 min

$[\alpha]_D^{20}$: -37.8 ° (c = 0.25, Chloroform)

Smp: 218-221 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 3 H), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.03 (d, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.20 (d, J = 6.3 Hz, 3 H), 1.25-1.46 (m, 22 H), 1.56-1.65 (m, 1 H), 1.69-1.80 (m, 1 H), 1.91-2.00 (m, 1 H), 2.57 (dq, J_1 = 4.7 Hz, J_2 = 7.0 Hz, 1 H), 3.81 (dd, J_1 = 3.3 Hz, J_2 = 9.8 Hz, 1 H), 4.02 (dd, J_1 = 3.3 Hz, J_2 = 9.6 Hz, 1 H), 4.11 (d,

$J = 3.9, 1 \text{ H}), 4.14-4.19 \text{ (m, 1 H)}, 4.37-4.42 \text{ (m, 1 H)}, 4.52-4.56 \text{ (m, 2 H)}, 4.72-4.74 \text{ (m, 1 H)}, 5.00-5.05 \text{ (m, 1 H)}, 7.25-7.39 \text{ (m, 5 H)}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.0, 14.3, 18.6, 19.5, 20.6, 22.8, 26.3, 28.3, 29.5, 29.7, 29.8$ (6 C), $30.4, 32.0, 42.5, 53.4, 60.2, 63.4, 66.0, 70.1, 73.9, 77.2, 127.4, 127.6$ (2 C), $128.2, 128.4, 137.3, 167.7, 170.9, 173.4, 173.9$.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_7\text{N}_3\text{Na}$: 668.4253, gem. 668.4282.

Darstellung von (4R)-3-Propionyl-4-benzyl-1,3-oxazolidinon (175)

Zu einer Lösung von 1.00 g (5.60 mmol) (4R)-4-Benzyl-2-oxazolidinon (**174**) in 15 ml THF gibt man bei -78°C innerhalb von 15 min 3.9 ml (6.20 mmol, 1.6 M Lösung) *n*-Butyllithium. Die Lösung wird 30 min bei -78°C gerührt und anschließend mit 0.55 ml Propionylchlorid (**178**) versetzt. Nach 3 h Rühren bei 0°C werden 10 ml einer 1 M K_2CO_3 -Lösung zugegeben. Danach engt man die Lösung auf ein Volumen von ca. 10 ml ein. Das Konzentrat wird viermal mit je 5 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dann dreimal mit je 5 ml gesättigter K_2CO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Essigester 5:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 1.19 g, 90%

R_f -Wert: 0.19 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -103° ($c = 1.00$, Ethanol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.19$ (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 3 H), 2.76 (dd, $J_1 = 9.8 \text{ Hz}$, $J_2 = 13.5 \text{ Hz}$, 1 H), 2.86-3.03 (m, 2 H), 3.30 (dd, $J_1 = 3.3 \text{ Hz}$, $J_2 = 13.5 \text{ Hz}$, 1 H), 4.13-4.20 (m, 2 H), 4.63-4.69 (m, 1 H), 7.19-7.33 (m, 5 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.4, 29.2, 37.9, 55.1, 66.2, 127.1$ (2 C), 128.8 (2 C), $129.2, 135.1, 153.2, 173.7$.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[137]

Darstellung von (4R)-3-[(2R,3S)-3-Hydroxy-2-methylhexadecanoyl]-4-benzyl-1,3-oxazolidinon (176)

Zu einer Lösung von 1.18 g (5.06 mmol) (4R)-3-Propionyl-4-benzyl-1,3-oxazolidin-2-on (**175**) in 10 ml CH_2Cl_2 werden bei -78°C innerhalb von 15 min. 5.56 ml (5.56 mmol, 1 M

Lösung) Di-*n*-butylbortriflat und 0.85 ml (0.61 g, 6.07 mmol,) Triethylamin zugegeben. Es wird zunächst 20 min. bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und dann 1 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Danach kühlt man wieder auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, gibt langsam 1.18 g (5.56 mmol) Tetradecanal (**37**) zu, rührt 15 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 30 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Darauf gibt man langsam 5 ml Phosphatpuffer (pH = 7), 8 ml Methanol, 5 ml eines 1:1 Gemisches aus Methanol und Wasserstoffperoxid (30 %) zu. Anschließend rührt man 1 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und versetzt dann mit 8 ml Wasser. Nachdem man die beiden Phasen getrennt hat, extrahiert man die wässrige Phase viermal mit je 10 ml CH_2Cl_2 . Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 10 ml 5%iger NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO_4 wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Essigester 5:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 1.91 g, 85% , (de = 97%)

R_f -Wert: 0.21 (Cyclohexan/Essigester 5:1 v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -42.3 ° (c = 1.30, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.20-1.34 (m, 25 H), 1.46-1.60 (m, 2 H), 2.79 (dd, J_1 = 9.6 Hz, J_2 = 13.3 Hz, 1 H), 3.25 (dd, J_1 = 2.9 Hz, J_2 = 13.5 Hz, 1 H), 3.73-3.79 (m, 1 H), 3.92-3.96 (m, 1 H), 4.16-4.25 (m, 2 H), 4.62-4.76 (m, 1 H), 7.19-7.33 (m, 5 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 10.5, 14.2, 22.8, 26.1, 29.4 (2 C), 29.7 (6 C), 32.0, 33.9, 37.9, 42.1, 55.1, 66.2, 71.5, 127.3 (2 C), 128.8 (2 C), 129.3, 134.9, 152.8, 177.3.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{N}$: 446.3272 gem. 446.3272.

Darstellung von (2*R*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (**177**)

Zu einer Lösung von 1.0 g (2.24 mmol) des Oxazolidinons **176** in 13 ml THF/ H_2O (4:1) werden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 0.92 ml (8.97 mmol) einer 30%igen H_2O_2 -Lösung und 188 mg (4.49 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Man rührt 1.5 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und gibt dann 20 ml 1.5 N Na_2SO_3 -Lösung zu. Nachdem man die Reaktionslösung mit 1 N HCl auf pH = 1-2 eingestellt hat, extrahiert man die wässrige Phase dreimal mit je 20 ml CH_2Cl_2 . Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1 v/v).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 409 mg, 64%

R_f-Wert: 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1 v/v)

[α]_D²⁰: -8.1 ° (c = 1.20, Chloroform)

Smp: 70-72 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.85 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.18 (d, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.22-1.33 (m, 22 H), 1.38-1.51 (m, 2 H), 2.50 (dq, J_1 = 3.2 Hz, J_2 = 7.2 Hz, 1 H), 3.91-3.95 (m, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 10.4, 14.2, 22.8, 26.1, 29.5, 29.6, 29.7 (4 C), 29.8 (2 C), 32.0, 33.7, 44.2, 71.8, 181.1.

HRMS (FAB): ber. für C₁₇H₃₄O₃Na: 309.2408, gem. 309.2408.

Darstellung von (2*R*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure-*S*-benzylthioester (178)

Zu einer Lösung von 400 mg (1.40 mmol) der Säure **177** und 257 mg (1.67 mmol) HOBt in 20 ml CH₂Cl₂/DMF (10:1) gibt man bei 0 °C 299 μ l (226 mg, 1.65 mmol) DIPEA sowie 260 μ l (211 mg, 1.67 mmol) DIC zu. Nach 10 min werden 165 μ l (173 mg, 1.40 mmol) Benzylmercaptan (**166**) zugegeben und dann über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird je dreimal mit 10 ml 0.5 N HCl-, gesättigter NaHCO₃-, und NaCl-Lösung extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 460 mg, 84%

R_f-Wert: 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v)

[α]_D²⁰: -17.0 ° (c = 1.13, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.22 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.24-1.32 (m, 22 H), 1.39-1.51 (m, 2 H), 2.69 (dq, J_1 = 3.7 Hz, J_2 = 7.0 Hz, 1 H), 3.89-3.93 (m, 1 H), 4.12 (s, 2 H), 7.21-7.32 (m, 5 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 11.5, 14.3, 22.8, 26.0, 29.5, 29.6, 29.7 (4 C), 29.8 (2 C), 32.0, 33.2, 34.2, 52.9, 72.0, 127.2 (2 C), 128.5 (2 C), 128.6, 137.1, 202.9.

HRMS (FAB): ber. für C₂₄H₄₁O₂S : 393.2839, gem. 393.2832.

Darstellung von (2R,3S)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-tert-butyloxycarbonyl-L-seryl)-hexadecansäure-S-benzylthioester (179)

Zu einer Lösung von 346 mg (1.17 mmol) *tert*-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-L-Serin (**45**) und 460 mg (1.17 mmol) des Thioesters **178** in 16 ml CH₂Cl₂ gibt man bei 0 °C 0.20 ml (0.16 g, 1.29 mmol) DIC und 14 mg (117 µmol) DMAP zu. Nachdem über Nacht bei RT gerührt wurde, werden 50 ml Et₂O zugegeben und jeweils dreimal mit je 20 ml 1 N HCl-, gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10 :1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 0.71 g, 91%

R_f-Wert: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 v/v)

[α]_D²⁰: -9.9 ° (c = 1.05, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.20-1.32 (m, 22 H), 1.44 (s, 9 H), 1.50-1.59 (m, 2 H), 2.80-2.88 (m, 1 H), 3.68 (dd, *J*₁ = 3.3 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1 H), 3.89 (dd, *J*₁ = 3.3 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1 H), 4.07 (s, 2 H), 4.40-4.53 (m, 3 H), 5.18-5.22 (m, 1 H), 5.37 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.21-7.33 (m, 10 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 13.8, 14.3, 22.8, 25.2, 28.4 (3 C), 29.4 (2 C), 29.5, 29.7 (6 C), 32.0, 33.2, 51.9, 54.1, 70.1, 73.2, 75.9, 79.8, 127.1, 127.4 (2 C), 127.6 (2 C), 128.2 (2 C), 128.5 (2 C), 128.6, 137.1, 137.3, 155.2, 169.8, 199.4.

HRMS (FAB): ber. für C₃₉H₅₉O₆NSNa: 692.3963, gem. 692.3935.

Darstellung von (2R,3S)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl)-hexadecansäure-S-benzylthioester (180)

Zu einer Lösung von 713 mg (1.06 mmol) des Benzylthioesters **179** in 10 ml CH₂Cl₂ tropft man 10 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 10 ml Toluol ko-evaporiert. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Farbloses Öl

Ausbeute: 725 mg, quantitativ

$[\alpha]_D^{20}$: -7.6° ($c = 0.92$, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.18-1.34 (m, 22 H), 1.48-1.62 (m, 2 H), 2.78-2.87 (m, 1 H), 3.87-3.94 (m, 2 H), 4.04 (s, 1 H), 4.17-4.22 (m, 1 H), 4.45-4.55 (m, 2 H), 5.20-5.28 (m, 1 H), 7.15-7.32 (m, 10 H), 8.70 (bs, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.0, 14.3, 22.8, 25.3, 29.4, 29.5, 29.7$ (2 C), 29.8 (4 C), 31.7, 32.0, 33.3, 51.1, 53.4, 66.6, 73.6, 77.8, 127.3 (2 C), 127.9 (2 C), 128.0, 128.4 (2 C), 128.5, 128.6, 128.9, 136.2, 136.9, 166.5, 199.2.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{NS}$: 570.3619, gem. 570.3640.

Darstellung von (2R,3S)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-tert-butylloxy-carbonyl-L-valin)-hexadecansäure-S-benzylthioester (181)

Zu einer Lösung von 330 mg (1.04 mmol) des Dipeptids **82**, 709 mg (1.04 mmol) des Thioesters **180** und 190 mg (1.24 mmol) HOBt in 30 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (10:1) gibt man bei 0°C 0.22 ml (168 mg, 1.29 mmol) DIPEA, sowie 0.19 ml (157 mg, 1.24 mmol) DIC zu. Nachdem die Lösung über Nacht bei RT gerührt hat, extrahiert man die Reaktionsmischung je dreimal mit 15 ml gesättigter NaHCO_3 -, 0.5 N HCl- und gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 558 mg, 64%

R_f -Wert: 0.11 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -26.8° ($c = 1.74$, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.84$ -0.96 (m, 9 H), 1.14-1.34 (m, 28 H), 1.41 (s, 9 H), 1.49-1.59 (m, 2 H), 2.05-2.14 (m, 1 H), 2.79-2.86 (m, 1 H), 3.62 (dd, $J_1 = 3.5$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1 H), 3.87 (dd, $J_1 = 3.5$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz, 1 H), 3.98-4.07 (m, 3 H), 4.32 (dq, $J_1 = 3.1$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz, 1 H), 4.44-4.51 (m, 3 H), 4.67-4.72 (m, 1 H), 5.12-5.21 (m, 2 H), 6.99 (bd, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 7.20-7.31 (m, 10 H), 7.37 (bd, $J = 8.2$ Hz, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.4, 14.2, 17.8, 18.0, 19.3, 22.8, 25.3, 28.4$ (3 C), 29.3, 29.4 (3 C), 29.7 (5 C), 31.0, 32.0, 33.2, 51.6, 52.8, 57.0, 59.9, 66.8, 69.3, 73.2, 76.2, 79.9,

127.1, 127.5 (2 C), 127.6 (2 C), 128.2, 128.4 (2 C), 128.6 (2 C), 137.0, 137.1, 155.6, 169.0, 170.2, 172.1, 199.3.

HRMS (FAB): ber. für $C_{48}H_{75}O_9N_3SNa$: 892.5124, gem. 892.5137.

Darstellung von (2*R*,3*S*)-2-Methyl-3-oxy-(*O*-benzyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*tert*-butyloxy-carbonyl-*L*-valin)-hexadecansäure (182)

Zu einer Lösung von 488 mg (0.56 mmol) des Thioesters **181** in 5 ml THF/H₂O (4:1) gibt man bei RT 150 mg (0.84 mmol) *N*-Bromsuccinimid. Nach 3 h werden nochmals 150 mg (0.84 mmol) *N*-Bromsuccinimid zugegeben und für weitere 5 h bei RT gerührt. Anschließend gibt man 20 ml 0.2 M Na₂S₂O₃-Lösung zu und extrahiert viermal mit je 20 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v → CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v).

Farbloses Öl

Ausbeute: 256 mg, 60%

R_f-Wert: 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1 v/v)

$[\alpha]_D^{20}$: -21.9 ° (c = 1.65, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.82-0.94 (m, 9 H), 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 1.13 (d, *J* = 6.3 Hz, 1 H), 1.17-1.30 (m, 22 H), 1.37 (s, 9 H), 1.48-1.65 (m, 2 H), 2.00-2.13 (m, 1 H), 2.55-2.68 (m, 1 H), 3.64 (dd, *J*₁ = 3.3 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1 H), 4.06-4.12 3.85 (dd, *J*₁ = 3.7 Hz, *J*₂ = 9.6 Hz, 1 H), 4.01-4.08 (m, 1 H), 4.21-4.29 (m, 1 H), 4.41-4.49 (m, 2 H), 4.52-4.58 (m, 1 H), 4.66-4.72 (m, 1 H), 5.19-5.24 (m, 1 H), 5.48 (bd, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 7.20-7.30 (m, 5 H), 7.45 (bd, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.56 (bd, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 9.72 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 11.4, 14.1, 17.8, 18.3, 19.3, 22.7, 25.4, 28.3 (3 C), 29.3, 29.5 (5 C), 29.6 (2 C), 31.0, 31.6, 31.9, 42.5, 52.9, 57.2, 59.9, 67.1, 69.4, 73.1, 75.9, 79.7, 127.5 (2 C), 128.1 (3 C), 137.1, 155.7, 169.2, 170.3, 172.7, 178.6.

HRMS (FAB): ber. für $C_{41}H_{69}O_{10}N_3Na$: 786.4883, gem. 786.4885.

Darstellung von (2R,3S)-2-Methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-L-valin)-hexadecansäure (183)

Zu einer Lösung von 256 mg (0.34 mmol) der Säure **182** in 7 ml CH₂Cl₂ tropft man 7 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 30 min bei RT. Anschließend wird dreimal mit je 7 ml Toluol koevaporiert. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Farbloses Öl

Ausbeute: 265 mg, quantitativ

$[\alpha]_D^{20}$: -1.1 ° (c = 1.93, Chloroform)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.94 (t, J = 6.9 Hz, 3 H), 1.07 (pt, J = 7.0 Hz, 6 H), 1.18 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.24-1.42 (m, 25 H), 1.59-1.70 (m, 2 H), 2.15-2.24 (m, 1 H), 2.64-2.73 (m, 1 H), 3.77 (dd, J₁ = 3.7 Hz, J₂ = 9.6 Hz, 1 H), 3.86 (d, J = 5.7 Hz, 1 H), 3.96 (dd, J₁ = 4.1 Hz, J₂ = 9.6 Hz, 1 H), 4.17-4.23 (m, 1 H), 4.53-4.60 (m, 2 H), 4.70-4.75 (m, 1 H), 5.21-5.27 (m, 1 H), 7.27-7.39 (m, 5 H), 8.35 (bd, J = 8.0 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 10.1, 14.2, 17.7, 18.1, 18.8, 22.7, 25.5, 29.4 (2 C), 29.5 (5 C), 29.7 (2 C), 30.3, 32.0, 42.1, 53.1, 53.0, 58.8, 68.2, 69.4, 73.2, 76.4, 127.6 (3 C), 128.2 (2 C), 136.9, 161.3, 168.8, 170.0, 179.1.

HRMS (FAB): ber. für C₃₆H₆₁O₈N₃Na: 686.4359, gem. 686.4341.

Darstellung von Zylo-(2R,3S)-2-methyl-3-oxy-(O-benzyl-L-seryl-L-threonyl-L-valyl)-hexadecansäureamid (136)

Zu einer Lösung von 39 mg (0.10 mmol) HBTU und 18 µl (13.3 mg, 0.1 mmol) DIEPA in 40 ml CH₂Cl₂/DMF (20:1) gibt man bei RT über 3 h tropfenweise eine Lösung aus 40 mg (52 µmol) der Säure **183** und 18 µl (13.3 mg, 0.1 mmol) DIPEA in 4 ml CH₂Cl₂ zu. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Flussrate: 25 ml/min, CH₃CN/H₂O/TFA: 20/80/0.1 (0-2 min), auf 35/65/0.1 (7-9 min), auf 70/30/0.1 (11-17 min), auf 100/0/0.1).

Weißer Feststoff

Ausbeute: 10.3 mg, 31%.

R_f-Wert: 0.47 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1)

HPLC: t_R : 7.3 min

$[\alpha]_D^{20}$: -45.6° ($c = 0.50$, Chloroform)

Smp: 159-160 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.00 (pt, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 1.19 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H), 1.22-1.36 (m, 25 H), 1.44-1.56 (m, 1 H), 1.85-1.95 (m, 1 H), 2.07-2.21 (m, 1 H), 2.73 (dq, $J_1 = 3.13$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 1 H), 3.64 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1 H), 3.73 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz, 1 H), 3.97-4.02 (m, 1 H), 4.19-4.12 (m, 1 H), 4.27 (dq, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, 1 H), 4.46-4.58 (m, 3 H), 5.14-5.19 (m, 1 H), 6.80 (bd, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 7.23-7.34 (m, 5 H), 7.87 (bd, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 7.93 (bd, $J = 8.6$ Hz, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.0, 14.3, 19.4, 20.5, 22.8, 25.3, 29.2, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8$ (6 C), 30.4, 32.0, 42.5, 54.1, 60.2, 63.4, 65.9, 69.3, 73.1, 77.2, 127.4, 127.6 (2 C), 128.2, 128.4, 137.1, 167.8, 170.9, 173.6, 173.9.

HRMS (FAB): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_7\text{N}_3\text{Na}$: 668.4253, gem. 668.4275.

7.5 Versuche zu den Kapiteln 4.4, 4.6 und 4.7

Die biologischen Tests wurden mit folgenden Verbindungen durchgeführt:

91, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 130, 131, 133, 136, 160.

Die einzelnen Derivate wurden in DMSO gelöst und Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mmol/l hergestellt.

Arbeitsvorschrift zur Durchführung der Enzym-Assays für die Phosphatasen VHR, MtPTPA und PTP1B

In einer Mikrotiterplatte werden 87 μl Puffer, 1 μl DTE einer 100 mM Lösung, 1 μl Enzymlösung (VHR: Enzymlösung 1:5 verdünnt, 0.1 μg , 0.1 mU; PTP1B: Enzymlösung 1:5 verdünnt, 0.1 μg , 1.3 mU; MtPTPA*: 23.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und je 1 μl der Testverbindung in DMSO unterschiedlicher Konzentration (Endkonzentration 0-100 μM) vorgelegt. Nach Inkubation von 30 min bei RT gibt man das Substrat, 10 μl einer 0.5 M pNPP-Lösung, zu. Anschließend wird 80 min (ein Messpunkt/min) im Mikrotiterplattenreader bei 405 nm die Absorption gemessen.

Puffer VHR: 25 mM MOPS, 5 mM EDTA, pH 6.5 mit NaOH-Lösung einstellen

Puffer PTP1B, MtPTPA: 25 mM HEPES-Na-Salz, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, pH 7.2

* Das Enzym wurde freundlicher Weise von der Firma Axxima zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse der *in vitro* Inhibitions-Assays sind in Tabelle 2 (Kap. 4.4.2) und Tabelle 5 (Kap. 4.6.1) dargestellt.

Arbeitsvorschrift zur Durchführung des Enzym-Assays für die Phosphatase Cdc25a

In einer Mikrotiterplatte werden 78 µl Puffer (50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.0 mit HCl-Lösung einstellen), 1 µl DTE einer 100 mM Lösung, 10 µl Enzymlösung (bakteriell exprimiert (ca. 10 U/ml), 0.1 U)* und je 1 µl der Testverbindung in DMSO unterschiedlicher Konzentration (Endkonzentration 0-100 µM) vorgelegt. Nach Inkubation von 30 min bei RT gibt man das Substrat, 10 µl einer 0.5 M pNPP-Lösung, zu. Anschließend wird 80 min (ein Messpunkt/min) im Mikrotiterplattenreader bei 405 nm die Absorption gemessen.

* Das Enzym wurde freundlicher Weise von Kerstin Reinecke zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse des *in vitro* Inhibitions-Assays sind in Tabelle 2 (Kap. 4.4.2) und Tabelle 5 (Kap. 4.6.1) dargestellt.

Arbeitsvorschrift zur Durchführung des Enzym-Assays für die Phosphatase CD45

Der Assay wird mit dem kommerziell erhältlichen BIOMOL GREEN™ CD 45 Tyrosine Phosphatase Assay Kit durchgeführt.

In einer Mikrotiterplatte werden 23 µl Puffer (KI-131-assay puffer: 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.05 % NP 40, pH 7.2), 5 µl Enzymlösung (Verdünnung mit Puffer 5:95, 15 U/µl) und je 4 µl der Testverbindung in H₂O/DMSO (10:1) unterschiedlicher Konzentration (Endkonzentration 0-100 µM) vorgelegt. Nach Inkubation von 20 min bei RT gibt man 8 µl des Substrates, pp60^{c-src} Peptid (1mM), zu. Nach 60 min Reaktionszeit bei RT gibt man 100 µl BIOMOL GREEN™ zu, lässt die Farbe 20 min entwickeln und misst die Absorption im Mikrotiterplattenreader bei 620 nm.

Die Ergebnisse des *in vitro* Inhibitions-Assays sind in Tabelle 2 (Kap. 4.4.2) und Tabelle 5 (Kap. 4.6.1) dargestellt.

Arbeitsvorschrift zur Durchführung des Enzym-Assays für die Phosphatase PP1

In einer Mikrotiterplatte werden 80 µl Enzym/PufferLösung (0.025 U, 40 mM TRIS, 20 mM KCl, 30 mM MgCl₂*6H₂O, 2 mM DTT, pH 8.1 mit HCl-Lösung einstellen), und je 10 µl der Testverbindung in H₂O/DMSO (10:1) unterschiedlicher Konzentration (Endkonzentration 0-100 µM) vorgelegt. Nach Inkubation von 10 min bei RT gibt man das Substrat, 10 µl einer 50 mM pNPP-Lösung zu und misst nach weiteren 15 min Reaktionszeit bei RT die Absorption im Mikrotiterplattenreader bei 405 nm.

Die Ergebnisse des *in vitro* Inhibitions-Assays sind in Tabelle 2 (Kap. 4.4.2) und Tabelle 5 (Kap. 4.6.1) dargestellt.

Arbeitsvorschrift zur Durchführung des Zytotoxizitätstests (MTT-Test)

In einer Mikrotiterplatte werden Dickdarmtumorzellen SW480 mit einer Dichte von 10⁴ Zellen/100 µl PBS mit 100 µl Puffer-Lösung (2 % DMSO), in der die Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen (Endkonzentration 0-100 µM) gelöst sind 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden je 20 µl MTT-Lösung (500 mg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in 100 ml PBS) zugegeben und die Zellen werden weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl 0.04 N HCl in Isopropanol werden die Zellen lysiert und die Lösungen mit der Mehrkanalpipette gut durchmischt. Die Mikrotiterplatte wird 1 h geschüttelt und danach am Mikrotiterplattenreader bei 570 nm gegen 630 nm als Referenz gemessen.

Zur Bereitstellung der Inhibitorlösungen unterschiedlicher Konzentration wurde auf einer separaten Mikrotiterplatte die Verdünnungsreihe der Substanzen aus der Stammlösung (10 mmol/l) erstellt (Abbildung 26).

Die Ergebnisse des Zell-Assays sind Tabelle 6 (Kap. 4.7.2) dargestellt.

7. Experimenteller Teil

	200 μ M	160 μ M	140 μ M	120 μ M	100 μ M	50 μ M	25 μ M
	1	2	3	4	5	6	7
A	5 μ l Inh.1 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.1 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.1 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.1 + 165 μ l Med.	125 μ l A1 + 125 μ l Med.	125 μ l A5 + 125 μ l Med.	125 μ l A6 + 125 μ l Med.
B	5 μ l Inh.1 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.1 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.1 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.1 + 165 μ l Med.	125 μ l B1 + 125 μ l Med.	125 μ l B5 + 125 μ l Med.	125 μ l B6 + 125 μ l Med.
C	5 μ l Inh.2 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.2 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.2 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.2 + 165 μ l Med.	125 μ l C1 + 125 μ l Med.	125 μ l C5 + 125 μ l Med.	125 μ l C6 + 125 μ l Med.
D	5 μ l Inh.2 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.2 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.2 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.2 + 165 μ l Med.	125 μ l D1 + 125 μ l Med.	125 μ l D5 + 125 μ l Med.	125 μ l D6 + 125 μ l Med.
E	5 μ l Inh.3 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.3 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.3 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.3 + 165 μ l Med.	125 μ l E1 + 125 μ l Med.	125 μ l E5 + 125 μ l Med.	125 μ l E6 + 125 μ l Med.
F	5 μ l Inh.3 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.3 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.3 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.3 + 165 μ l Med.	125 μ l F1 + 125 μ l Med.	125 μ l F5 + 125 μ l Med.	125 μ l F6 + 125 μ l Med.
G	5 μ l Inh.4 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.4 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.4 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.4 + 165 μ l Med.	125 μ l G1 + 125 μ l Med.	125 μ l G5 + 125 μ l Med.	125 μ l G6 + 125 μ l Med.
H	5 μ l Inh.4 + 245 μ l Med.	2 μ l Inh.4 + 123 μ l Med.	2 μ l Inh.4 + 141 μ l Med.	2 μ l Inh.4 + 165 μ l Med.	125 μ l H1 + 125 μ l Med.	125 μ l H5 + 125 μ l Med.	125 μ l H6 + 125 μ l Med.

12.5 μ M	6.25 μ M			
8	9	10	11	12
125 μ l A7 + 125 μ l Med.	125 μ l A8 + 125 μ l Med.			
125 μ l B7 + 125 μ l Med.	125 μ l B8 + 125 μ l Med.			
125 μ l C7 + 125 μ l Med.	125 μ l C8 + 125 μ l Med.			
125 μ l D7 + 125 μ l Med.	125 μ l D8 + 125 μ l Med.			
125 μ l E7 + 125 μ l Med.	125 μ l E8 + 125 μ l Med.			
125 μ l F7 + 125 μ l Med.	125 μ l F8 + 125 μ l Med.			
125 μ l G7 + 125 μ l Med.	125 μ l G8 + 125 μ l Med.			
125 μ l H7 + 125 μ l Med.	125 μ l H8 + 125 μ l Med.			

Abbildung 26: Erstellung der Verdünnungsreihe.

8. Literatur

- [1] G. Kraus, *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [2] Z. -Y. Zhang, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, 416-423.
- [3] T. Hunter, *Cell*, **2000**, 100, 113-127.
- [4] R. P. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angewandte Chem.*, **2002**, 114, 3002-3015.
- [5] Z. -Y. Zhang, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 33, 1, 1-52.
- [6] T. Hunter, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 1311-1315.
- [7] T. Hunter, *Cell*, **1995**, 80, 225-236.
- [8] S. H. Hanks, T. Hunter, *FASEB J.*, **1995**, 9, 576-596.
- [9] M. P. Egloff, P. T. W. Cohen, P. Reinemer, D. Barford, *S. Mol. Biol.*, **1995**, 254, 942-959.
- [10] Z. -Y. Zhang, *Curr. Top. Cell Reg.*, **1997**, 35, 21-68.
- [11] Y. Wang, J. E. Dixon, Z. -Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 1624-1627.
- [12] N. K. Tonks, K. A. Walsh, E. H. Fischer, H. Charbonneau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, 85, 7182-7186.
- [13] A. R. Schievella, C. A. Jost, R. L. Erikson, B. G. Nell, J. Chernoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 2735-2739.
- [14] S. Broyles, J. E. Dixon, K. L. Guan, *Nature*, **1991**, 350, 359-361.
- [15] J. M. Denu, G. Zhou, L. Wu, R. Zhao, J. Yuvaniyama, M. A. Saper, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 3796-3803.
- [16] B. Lemon, P. Traktman, K. Liu, *J. Virol.*, **1995**, 69, 7823-7834.
- [17] G. Zhou, J. M. Denu, L. Wu, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 28084-28090.
- [18] L. Wu, L. Chen., Z. -Y. Zhang, *Biochemistry*, **1995**, 34, 16088-16096.
- [19] A. Theodosiou, A. Ashworth, *Gen. Biol.*, **2002**, 3, 1-10.
- [20] J. L. Todd, K. G. Tanner, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 13271-13280.
- [21] A. Alonso, M. Saxena, S. Williams, T. Mustelin, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 4766-4771.
- [22] J. L. Todd, J. D. Rigas, L. A. Rafty, J. M. Denu, *Oncogene*, **2002**, 21, 2573-2583.
- [23] P. Fantes, *Nature*, **1979**, 279, 428-430.
- [24] G. Draetta, J. Eckstein, *Biochim. Biophys.*, **1997**, 1332, M53-M63

-
- [25] E. B. Gottlin, X. Xu, D. M. Epstein, S. P. Burke, J. W. Eckstein, D. P. Ballou, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 27445-27449.
- [26] D. O. Morgan, *Nature*, **1995**, 374, 131-134.
- [27] J. Gautier, M. J. Solomon, R. N. Booher, J. F. Bazan, M. W. Kirschner, *Cell*, **1991**, 64, 903-914.
- [28] I. Hoffmann, G. Draetta, E. Karsenti, *EMBO J.*, **1994**, 13, 4302-4310.
- [29] A. K. Lee, J. Eckstein, G. Draetta, J. Meckler, M. Loda, D. Beach, K. Galaktionov, *Science*, **1995**, 269, 1575-1577.
- [30] M. G. Cangi, B. Cukor, P. Soung, S. Signoretti, G. Moreira Jr., M. Ranashinge, B. Cady, M. Pagano, M. Loda, *J. Clin. Invest.*, **2000**, 106, 753-761.
- [31] D. Gasparotto, R. Maestro, S. Piccinin, T. Vukosavljevic, L. Barzan, S. Sulfaro, M. Boiocchi, *Cancer Res.*, **1997**, 57, 2366-2368.
- [32] X. Chen, D. Beach, K. Galaktionov, *Nature*, **1996**, 382, 511-517.
- [33] C. D. Diltz, E. H. Fischer, N. K. Tonks, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 6722-6730.
- [34] Z. Jia, D. Barford, A. J. Flint, N. K. Tonks, *Science*, **1995**, 268, 1754-1758.
- [35] D. Barford, A. J. Flint, N. K. Tonks, *Science*, **1994**, 263, 1397-1403.
- [36] T. O. Johnson, J. Ermolieff, M. R. Jirousek, *Nature Rev.*, **2002**, 1, 696-709.
- [37] R. Sinah, *N. Engl. J. Med.*, **2002**, 346, 802-810.
- [38] A. P. Rocchini, *N. Engl. J. Med.*, **2002**, 346, 854-855.
- [39] D. W. Dunstan, *J. Int. Med.*, **2002**, 25, 829-834.
- [40] A. R. Saltiel, J. E. Pessin, *Trends Cell Biol.*, **2002**, 12, 65-71.
- [41] N. J. Bryant, R. Govers, D. E. James, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2002**, 3, 267-277.
- [42] U. Smith, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **2002**, 26, 807-904.
- [43] A. Cheng, N. Dube, F. Gu, M. L. Tremblay, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269, 1050-1059.
- [44] A. Koul, A. Choidas, M. Treder, A. K. Tyagi, K. Drlica, Y. Singh, A. Ullrich, *J. Bact.*, **2000**, 182, 5425-5432.
- [45] I. S. Trowbridge, M. L. Thomas, *Annul. Rev. Immunol.*, **1994**, 12, 85-116.
- [46] M. Fortin, A-M. Steff J. Fellberg, I. Ding, B. Schraven, P. Johnson, P. Hugo, *J. Immunol.*, **2002**, 168, 6084-6089.
- [47] A. L. Lazarovits, S. Poppema, Z. Zhang, M. Khandaker, C. E. Le Feuvre, S. K. Singhai, B. M. Gracia, N. Ogasa, A. M. Jevnikar, M. H. White, *Nature*, **1996**, 380, 717-720.
- [48] T. Hamaguchi, T. Sudo, H. Osada, *FEBS Lett.*, **1995**, 372, 54-58.

-
- [49] M. Sodeoka, R. Sampe, T. Kagamizono, H. Osada, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 8775-8778.
- [50] M. Sodeoka, R. Sampe, S. Kojima, Y. Baba, T. Usui, K. Ueda, H. Osada, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2316-2322.
- [51] A. E. Wright, P. J. McCarthy, G. K. Schulte, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 3472-3474.
- [52] R. E. Cebula, J. L. Blanchard, M. D. Boisclair, K. Pal, N. J. Bockovich, *Bioorg. Chem. Med. Lett.*, **1997**, 7, 2015-2020.
- [53] G. Bergnes, C. L. Gilliam, M. D. Boisclair, J. L. Blanchard, K. V. Blake, D. M. Epstein, K. Pal, *Bioorg. Chem. Med. Lett.*, **1999**, 9, 2849-2854.
- [54] D. Brooks, B. K. Tidd, W. D. Turner, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 5385-5391.
- [55] J. M. Wimhurst, E. J. Harries, *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, 437, 51-61.
- [56] J. B. Hoek, R. M. Njogu, *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255, 8711-8718.
- [57] U. Kazunori, U. Takeo, H. Nakayama, M. Ueki, K. Takio, M. Ubukata, H. Osada, *FEBS Lett.*, **2002**, 525, 48-52.
- [58] A. Y. Tsai, M. Itoh, M. Streuli, T. Thai, H. Saito, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 10543-10543.
- [59] D. Barford, A. K. Das, M. P. Egloff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1998**, 27, 133-164.
- [60] M. N. Namikoshi, K. L. Rinehart, R. Sakai, R. R. Stotts, A. M. Dahlem, V. R. Beasley, W. W. Carmichael, W. R. Evans, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 866-872.
- [61] D. A. Fruman, C. B. Klee, B. E. Bierer, S. J. Burakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 3686-3690.
- [62] Peter, Hans-Hartmut, *Klinische Immunologie*, Urban & Schwarzenberg, München, **1996**.
- [63] T. Hamaguchi, A. Masuda, T. Morino, H. Osada, *Chem. Biol.*, **1997**, 4, 279-286.
- [64] T. Morino, K. Shimada, A. Masuda, N. Yamashita, M. Nishimoto, T. Nishikiori, S. Saito, *J. Antibiot.*, **1996**, 49, 564-568.
- [65] K. Shimada, T. Morino, A. Masuda, M. Sato, M. Kitagawa, S. Saito, *J. Antibiot.*, **1996**, 49, 569-574.
- [66] T. Morino, A. Masuda, M. Yamada, M. Nishimoto, T. Nishikiori, S. Saito, *J. Antibiot.*, **1994**, 47, 1341-1343.
- [67] T. Morino, K. Shimada, A. Masuda, M. Nishimoto, S. Saito, *J. Antibiot.*, **1996**, 49, 1049-1051.
- [68] H. Osada, C. B. Cui, R. Onose, F. Hanaoka, M. Yamada, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, 5, 193-203.

-
- [69] N. Kohyama, Y. Yamamoto, *Synlett*, **2001**, 5, 694-695.
- [70] S. Chammaa, F. J. Lopez-Herrera, F. Sarabia, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 2961-2965.
- [71] K. Kurosawa, T. Nagase, N. Chida, *Chem. Commun.*, **2002**, 12, 1280-1281.
- [72] D. A. Evans, *Aldrichim. Acta*, **1982**, 15, 318-327.
- [73] A. N. Hulme, I. Paterson, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 7513-7516.
- [74] J. Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford Chemistry Primer Series, 7, Oxford University Press: New York, **1992**.
- [75] H. Kogen, T. Kiho, M. Nakajama, Y. Furukawa, T. Kinoshita, M. Inukai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 10214-10215.
- [76] S. Ninkovic, F. Sarabia, D. Vourloumis, Y. He, H. Vallberg, M. R. V. Finlay, Z. J. Yang, K. C. Nicolaou, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7974-7991.
- [77] M. A. Lyon, A. P. Ducruet, P. Wimpf, J. L. Lazo, *Nature Rev.*, **2002**, 1, 961-976.
- [78] K. Shen, Y. Keng, L. Wu, X. Guo, D. S. Lawrence, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 47311-47319.
- [79] M. Born, G. Tamm, *Synthesis*, **1991**, 6, 435-438.
- [80] M. A. Walker, C. H. Heathcock, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 5747-5750.
- [81] A. N. Hulme, I. Paterson, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 3288-3300.
- [82] G. van Look, *Silylating Agents*, Fluka Chemie AG, **1988**.
- [83] K. Iseki, S. Oishi, Y. Kobayashi, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 71-84.
- [84] J. D. White, G. L. Bolton, A. P. Dantanarayana, C. M. Fox, R. N. Hiner, R. W. Jackson, K. Sakuma, U. S. Warriar, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1908-1939.
- [85] J. Bartroli, T. L. Shih, D. A. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 2127-2129.
- [86] M. Manger, *Diplomarbeit*, Karlsruhe **1999**.
- [87] R. K. Dhar, R. K. Bakshi, P. K. Pandiarajan, B. Singaram, H. C. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 3441-3442.
- [88] T. C. Britton, J. A. Ellman, D. A. Evans, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 6141-6144.
- [89] S. Yoshida, T. Ogiku, H. Ohmizu, T. Iwasaki, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1310-1316.
- [90] D. H. Rich, J. Singh: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.), Academic Press, **1979**.
- [91] R. P. Polniaszek, K. M. DeVries, D. E. Guinn, J. D. Mathre, D. A. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7613-7630.
- [92] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 788-798.
- [93] A. P. Kozikowski, D. Ma, P. Shum, V. Likic, P. K. Mishra, A. Basu, J. S. Lazo, R. G. Ball, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3957-3965.

-
- [94] G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P. E. Nieslen, *Angew. Chem.*, **1996**, 108, 2068-2070.
- [95] O. K. Richerd, S. Apparao, B. L. Krishna, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 3079-3085.
- [96] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme, **1994**.
- [97] A. Venkateswarlu, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6190-6191.
- [98] D. T. Hung, J. B. Nerenberg, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 11054-11080.
- [99] N. P. Howard, D. L. Rieger, D. A. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11446-11459.
- [100] H. Ishiwata, H. Sone, H. Kigoshi, K. Yamada, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 12853-12882.
- [101] F. Z. Dörwald: *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [102] I. W. James, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 4855-4946.
- [103] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 2091-2157.
- [104] H. Benz, *Synthesis*, **1994**, 337-358.
- [105] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 1927-1930.
- [106] K. Lee, Y. Gao, Z. Yao, J. Phan, L. Wu, J. Liang, D. S. Waugh, Z. Zhang, T. R. Burke Jr., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2577-2581.
- [107] C. Watson, K. Yeung, R. A. Ward, P. A. Wallace, I. Paterson, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 11955-11970.
- [108] D. H. B. Ripin, D. P. Halstead, K. R. Campos, D. A. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 6816-6826.
- [109] M. Bartra, F. Urpi, J. Vilarrasa: *Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products* (Hrsg. G. Lukas), Springer-Verlag Berlin Heidelberg **1993**, 2, 42-65.
- [110] E. P. Boden, G. E. Keck, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2394-2395.
- [111] M. K. Gurjar, B. R. Nallaganchu, A. Bhandari, R. Rao, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 7085-7088.
- [112] M. Nagarajan, V. Satish Kumar, B.V. Rao, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 12349-12360.
- [113] N. J. Anthony, A. Armstrong, M. G. Brasca, T. Clarke, D. Culshaw, C. Greck, P. Grice, A. B. Jones, B. Lygo, A. Madin, R. N. Sheppard, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, S. V. Ley, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 7161-7194.
- [114] D. H. Hua, B. Pan, S. P. Seitz, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6818-6820.
- [115] J. Diago-Meseguer, A. L. Palomo-Coll, J. R. Fernandez-Lizarbe, A. Zugaza-Bilbao, *Synthesis*, **1980**, 547-551.

-
- [116] Q. Meng, M. Hesse, *Topics Curr. Chem.*, **1991**, 161, 107-176.
- [117] S. Poenaru, J. R. Lamas, G. Folkers, J. A. Lopez de Castro, D. Seebach, D. Rognan, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2318-2331.
- [118] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1979**, 13, 35-42.
- [119] H. Kim, O. Choi, R. K. Olsen, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 4531-4536.
- [120] J. Poncet, M. Dufour, A. Pantaloni, B. Castro, P. Jouin, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 617-627.
- [121] S. J. Chung, S. Chung, H. S. Lee, E. Kim, K. S. Oh, H. S. Choi, K. S. Kim, Y. J. Kim, J. H. Hahn, D. H. Kim, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 6462-6471.
- [122] K. A. Scheidt, J. N. Johnston, M. C. Willis, D. A. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 4480-4491.
- [123] K. Takeda, T. Miura, M. Kobayashi, H. Minato, *Chem. Lett.*, **1977**, 1095-1098.
- [124] M. Nakatsuka, J. A. Ragan, T. Sammakia, D. B. Smith, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5583-5601.
- [125] M. Nakata, N. Akiyama, K. Kojiyama, H. Masuda, M. Kinoshita, K. Tatsuta, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 1585-1586.
- [126] Y. Endo, K. Suhdo, A. Itai, M. Hasegawa, S. Sakai, *Tetrahedron*, **1986**, 42, 5095-5098.
- [127] R. F. Nutt, K. Chen, M. M. Joullie, *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 1013-1021.
- [128] A. Lieberknecht, H. Griesser, J. Talbiersky, U. Schmid, *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 3261-3264.
- [129] J. Coste, D. Lenguyen B. Castro, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 205-208.
- [130] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 4853-4856.
- [131] E. Harthfritschy, D. Cantacuzene, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1997**, 50, 415-420.
- [132] J. C. Stinson, W. B. McCombs, C. E. McCoy, K. C. Mazur, N. D. Mabry, A. Leibovitz, *Cancer Res.*, **1976**, 36, 4562-4569.
- [133] D. Gelier, N. Thomasset, *J. Immunol. Methods*, **1986**, 94, 57-63.
- [134] A. N. Semenov, K. Y. Gordeev, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1995**, 45, 303-304.
- [135] J. R. McDermott, R. C. Sheppard, G. W. Kenner, *Chem. Commun.*, **1971**, 636-637.
- [136] H. Bisswanger, *Enzym Kinetik*, 2. Auflage, Weinheim, **1994**.
- [137] J. R. Gage, D. A. Evans, *Org. Synth.*, **1989**, 68, 77-91.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich für die interessante Themenstellung, die stete Unterstützung und die anregenden Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit.

Bei meinem Kooperationspartner Herrn Dr. Oliver Müller möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Laborkolleginnen Claudia Rosenbaum, Catherine Katzka und Maria Lumbierres sowie meinem Laborkollegen und Freund Michael Scheck danke ich herzlichst für die schöne Zeit nicht nur im Labor, sondern auch für die vielen geselligen Stunden.

Des weiteren gebührt mein Dank dem gesamten Arbeitskreis für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Tipps und Ideen, die diese Arbeit vorangetrieben haben.

Für die Durchsicht dieses Manuskripts gilt mein besonderer Dank Michele Leuenberger, Michael Scheck und Eleni Gourzoulidou.

Nicole Borgböhmer, Christiane Vornweg, Heike Rimpel und Anette Langerak danke ich für die engagierte Mitarbeit.

Bei den analytischen Abteilungen der Universitäten Karlsruhe und Dortmund, sowie dem Max-Planck-Institut möchte ich mich für die Durchführung der Massen- und NMR-Analysen bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Herrn Bernhard Griewel, Sandra Eichhorn und Christiane Vornweg für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium ermöglichten, sondern auch immer unterstützen. Meiner Freundin Sabine, die mich während der ganzen Zeit begleitet und auch immer wieder ermutigt hat.

Lebenslauf

Name: Michael Manger

Geburtsdatum: 23.08.1972

Geburtsort: Bühl

Familienstand: ledig

Schulbildung: 08.1979-07.1983 Grundschule in Sinzheim
08.1983-06.1989 Realschule in Sinzheim
08.1989-06.1992 Technisches Gymnasium in Bühl
Gesamtnote: gut

Zivildienst: 07.1992-09.1993 DRK

Studium: 10.1993-12.1999 Chemie, Universität Karlsruhe (TH)
06.1999 Diplomprüfung
06.1999-12.1999 Diplomarbeit: AK Prof. Dr. H. Waldmann
Untersuchungen zur Synthese von Stevastelin B
Gesamtabschlussnote: sehr gut

Promotion: 01.2000-04.2000 Universität Karlsruhe (TH):
AK Prof. Dr. H. Waldmann
Synthese und biolog. Evaluierung von
Stevastelinanaloga
05.2000-12.2003 Universität/Max-Planck-Institut für molekulare
Physiologie Dortmund
Gesamtabschlussnote: sehr gut

Industriepraktikum: 03.1998-04.1998 Boehringer Mannheim, Forschungsabteilung

Dortmund, im Dezember 2003