

# Synthese und Anwendung von *exo*-Methylen- $\gamma$ -butyrolactonen als potenzielle zytotoxische, carriergebundene Agenzien.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

an der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg



**Vorgelegt von**

*Sabrina Fürst*

Aus München

**Regensburg 2017**

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Oliver Reiser

Promotionsgesuch eingereicht am: 24.03.2017

Promotionskolloquium am: 09.05.2017

Prüfungsausschuss:

Vorsitz: Prof. Dr. Arno Pfitzner

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Reiser

2. Gutachter: PD Dr. Sabine Amslinger

3. Prüfer: Prof. Dr. Jörg Heilmann

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Oliver Reiser in der Zeit von September 2012 bis August 2016 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Oliver Reiser möchte ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die anregenden Diskussionen und seine Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit danken.

„Man sieht nur mit dem Herzen gut.  
Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.“

**Antoine de Saint-Exupéry**

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1. Die Merkmale einer Zelle</b>	<b>1</b>
<b>2. Die eukaryotische menschliche Zelle</b>	<b>2</b>
2.1. Die Zellmembran	2
2.2. Wie Substanzen die Zellmembran überwinden können	5
2.3. Das Endomembransystem-Überblick	7
2.4. Der Golgi-Apparat	8
2.5. Endosomen	9
2.6. Lysosomen	9
2.7. Endozytose	10
<b>3. Krebs</b>	<b>14</b>
3.1. Eigenschaften von Krebszellen	14
3.2. Krebstherapie	15
<b>4. Zellpenetrierende Peptide</b>	<b>16</b>
4.1. Entdeckung und Untersuchung der CPP	16
4.2. Aufnahmemechanismen der CPP	18
4.3. Adressierung von Zellen	19
4.4. CPP's als Carrier für Medikamente	20
<b>5. <math>\alpha</math>-Methylen-<math>\gamma</math>-butyrolactone (aMgBL)</b>	<b>23</b>
5.1. Arglabin	23
5.2. Wege zur Einführung der <i>exo</i> -Methylengruppe	25
<b>6. Aminierte aMgBL und ihre Verwendung als prodrugs</b>	<b>27</b>
<b>B. Hauptteil</b>	<b>29</b>
<b>1. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2. Synthese der <i>exo</i>-Methylen-modelllactone</b>	<b>30</b>
<b>3. Das Verhalten aminierter aMgBL in wässrigem Medium</b>	<b>33</b>
3.1. Dargestellte aminierte Modelllactone	34

3.2. Durchführung der kinetischen Studien	34
<b>4. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten</b>	<b>38</b>
<b>5. Einflussfaktoren auf die Eliminierungsart- und Geschwindigkeit der funktionalisierten Lactone</b>	<b>41</b>
5.1. Effekt von MeOD im Puffer	41
5.2. Effekt einer Substitution an der Position 5	43
5.3. Vergleich von sekundärem und tertiärem Amin	49
5.4. aMgBL und ihre Umsetzung mit Thiolen	50
<b>6. Lysinderivate der aMgBL und ihr Eliminierungsverhalten</b>	<b>51</b>
6.1. Kupplung der Lactone an die Aminosäure Lysin	51
6.2. Effekt des pH	55
6.3. Variierung des Substitutionsmusters am Stickstoff	57
<b>7. Festphasenpeptidsynthese</b>	<b>60</b>
<b>8. Cytotoxizität der aminierten Lactone</b>	<b>63</b>
8.1. Durchführung der Zytotoxizitätsstudien	63
8.2. Vergleich der Cytotoxizitäten der aminierten Lactone	64
<b>9. Arglabin als Beispiel eines aMgBL</b>	<b>69</b>
9.1. Semisynthese von Arglabin	69
9.2. Arglabin als aMgBL und seine Bindung an Cbz-Lys-OH	70
<b>10. Bindung des Modellsystems 42b an ein Peptid</b>	<b>71</b>
<b>11. Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>C. Experimenteller Teil</b>	<b>77</b>
1. Allgemeines	77
2. Darstellung der Verbindungen und Reaktionen	78
<b>D. Spektrenanhang</b>	<b>97</b>
<b>E. Danksagung</b>	<b>120</b>
<b>F. Lebenslauf</b>	<b>121</b>
<b>G. Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
aMgBL	$\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolacton
Antp	Antennapedia-Protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-butyloxycarbonyl
Box	Bis-oxazolin
CPP	cell penetrating peptides
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCM	Dichlormethan
Dde	N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl]
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
EE	Essigsäureethylester
ER	endoplasmatisches Retikulum
Et	ethyl
Equiv	Äquivalente
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
h	Stunden
HBTU	3-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-3 <i>H</i> -benzotriazol-1-oxid hexafluorphosphat
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
IR	Infrarotspektroskopie
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LiHMDS	Lithium-bis(trimethylsilyl)amid

MALDI	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung
Me	methyl
MeCN	Acetonitril
Min	Minute
MS	Massenspektroskopie
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid)
NMR	kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NPY	Neuropeptid Y
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Petrolether
pNPY	Schweine-NPY
pTsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
rt	Raumtemperatur
SPPS	solid phase peptide synthesis
TAT	transactivator of transcription
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
TOF	Time of flight
TSP	Natriumtrimethylsilylpropionat

Die verwendeten Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur.

# A. Einleitung

## 1. Die Merkmale einer Zelle

Zellen sind die kleinste lebens- und vermehrungsfähige Einheit, bei der sich die Grundfunktionen des Lebens nachweisen lassen.

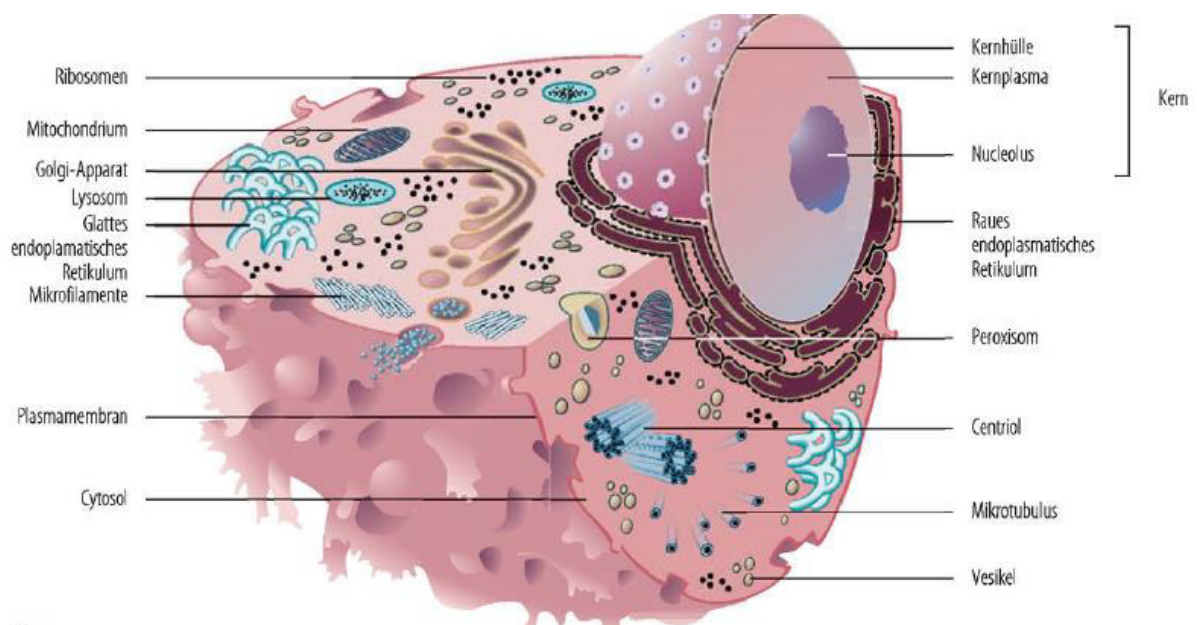
Diese Grundfunktionen des Lebens sind ein hoher Organisationsgrad, Energieaustausch und Stoffwechsel, Informationsaustausch mit der Umgebung, Wachstum, Fortpflanzung und Evolution <sup>[1]</sup>.

Zellen sind von einer Doppelmembran umgeben, die die Zelle nach außen begrenzt. Alle lebensfähigen Zellen besitzen ein Genom, welches aus DNA besteht. Sie sind in der Lage, Stoffwechsel zu betreiben, welcher der Energiegewinnung, sowie dem Aufbau der von der Zelle benötigten Biomoleküle dient. Zellen können mit Hilfe von Rezeptoren chemische und physikalische Signale wahrnehmen und verarbeiten, sie haben eine begrenzte Lebensdauer und können im Normalfall nach einer bestimmten festgelegten Zeit entweder durch Apoptose absterben oder durch Zellteilung in Tochterzellen übergehen <sup>[1]</sup>

Zellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die Prokaryoten, welche keinen Zellkern besitzen und die Eukaryoten, bei welchen ein solcher vorhanden ist. Zellen von Tieren, Pflanzen und Pilzen gehören zu den eukaryotischen Zellen <sup>[2]</sup>. Bei den Eukaryotischen Zellen wird im Folgenden nur auf die tierische Zelle eingegangen.

## 2. Die eukaryotische menschliche Zelle

Wie bereits erwähnt, besitzt die eukaryotische und damit auch die menschliche Zelle einen Zellkern, in dem sich die Erbinformation, die DNA, befindet. Der Zellkern ist, ebenso wie die ganze Zelle, von einer Doppelmembran umgeben. Des Weiteren enthält die Zelle zahlreiche Organellen, die verschiedene Funktionen für die Aufrechterhaltung des Lebens der Zelle und letztlich für den ganzen Organismus innehaben.



**Abbildung 1:** Die eukaryotische tierische Zelle; © reprinted with permission of <sup>[3]</sup>

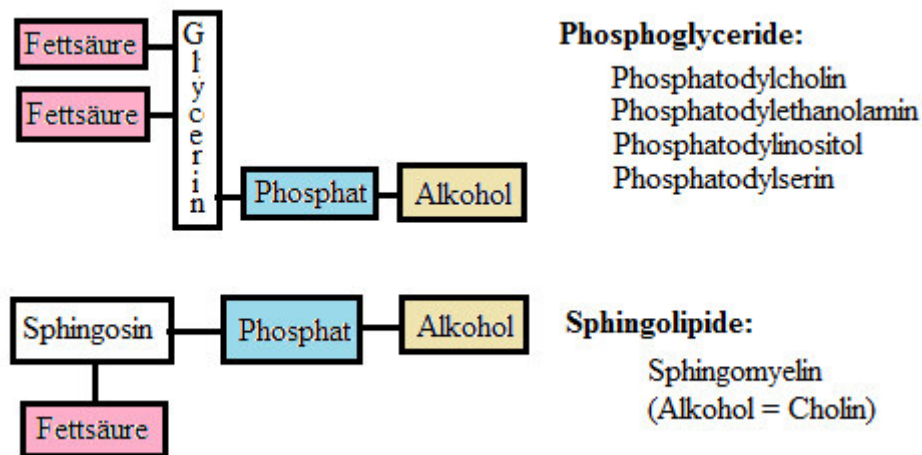
### 2.1. Die Zellmembran

Die Zellmembran hüllt die Zelle ein. Sie besteht aus amphiphilen Molekülen, welche aus einem hydrophoben Schwanz und einer hydrophilen Kopfgruppe bestehen. Dieser Aufbau führt zu einer Selbstorganisation, im Zuge derer sich hydrophile Anteile in Richtung des sie umgebenden wässrigen Milieus ausrichten, während die hydrophoben Schwänze sich im Inneren einer Doppelschicht aus parallel ausgerichteten Molekülen zusammenlagern. Die Triebkraft der Zusammenlagerung ist die erhöhte Entropie des Wassers bei der Wechselwirkung mit den hydrophilen Köpfen (Wasserstoffbrückenbindungen), im Gegensatz zur Wechselwirkung mit den hydrophoben Schwänzen. <sup>[4]</sup>

## A. Einleitung

Diese amphiphilen Eigenschaften weist die Gruppe der Lipide auf. Die Hauptbestandteile der Doppelschicht sind Phospholipide, oft so genannte Phosphoglyceride (Lecithine wie z.B. Phosphatidylcholine und Kephaline wie Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine sowie auch Phosphatidylinositole <sup>[5]</sup>). Diese bestehen aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänzen, wobei der hydrophile Kopf durch eine Phosphatgruppe, an die ein Alkohol gebunden ist, gebildet wird. Sie unterscheiden sich in ihrer Kopfgruppe (Abbildung 2), sowie der Art der Kohlenwasserstoffketten.

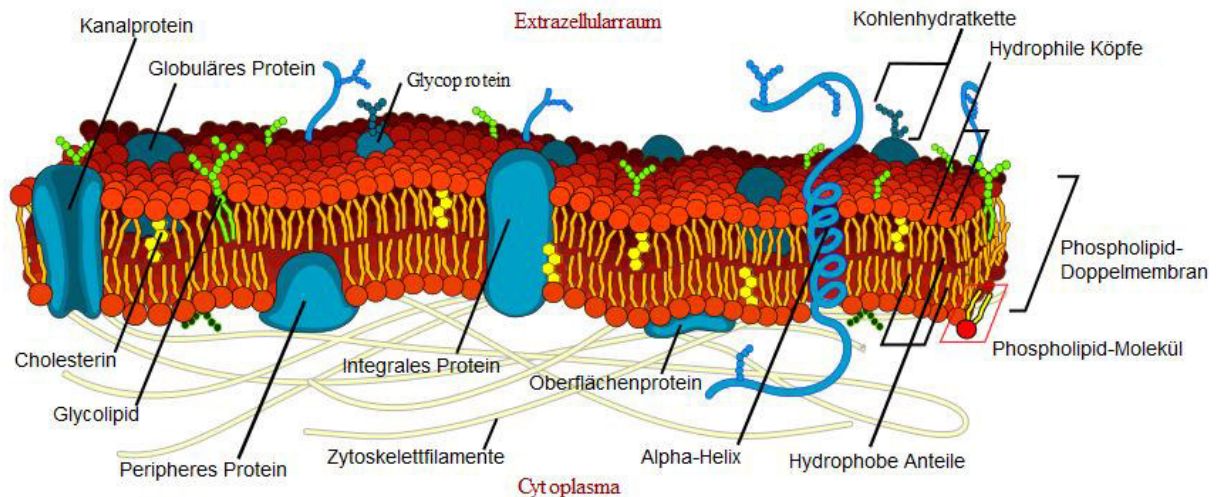
Sphingolipide bestehen aus Sphingosin, an welches eine Fettsäure gebunden ist, und einem hydrophilen Kopf aus ebenfalls einem Phosphat und einem Alkohol. Ist der Alkohol Cholin, so handelt es sich um Sphingomyelin (Abbildung 2). <sup>[6]</sup>



**Abbildung 2:** Phospholipide und Sphingolipide

Eine Membran verhält sich wie eine zweidimensionale Flüssigkeit <sup>[7]</sup>. Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell ist die Doppellipidschicht eine zweidimensionale Lösung gerichteter Lipide und globulärer Proteine. So können die Lipide lateral weitgehend ungestört diffundieren oder rotieren. Der so genannte Flip-Flop, ein Wechsel auf die andere Seite der Doppelmembran, ist allerdings viel seltener, da dabei die hydrophile Kopfgruppe des Lipids das hydrophobe Innere der Membran durchqueren muss. Dies führt zu einer Asymmetrie der Membran, d.h. die Zusammensetzung auf der Innenseite ist anders als die auf der Außenseite der Zelle (siehe Abbildung 3). <sup>[8]</sup>

## A. Einleitung



**Abbildung 3:** die Plasmamembran <sup>[9]</sup>

Die Fluidität der Zellmembran kann vergrößert werden, indem Moleküle eingelagert werden, welche die zwischenmolekularen Wechselwirkungen der Lipide verringern. Dazu gehört zum einen das Einsetzen von Lipiden mit ungesättigten Fettsäureketten, welche durch ihren Knick, ausgelöst durch die cis-Doppelbindung, zu einer schlechteren Zusammenlagerung der Fettsäureketten führen. Zum anderen erhöht auch der Einbau von Cholesterol in die Membran die Fluidität dadurch, indem das Cholesterol die Ordnung der Fettsäureketten stört. <sup>[1]</sup>

Doppelmembranen lagern sich zu Bläschen oder anderen komplexen Netzwerken zusammen, da sie nicht einfach irgendwo aufhören können, weil dies entropisch unvorteilhaft wäre. Außerdem sind sie leicht verformbar und können sich selbst organisieren. <sup>[10]</sup>

In die Membran eingelagert sind zahlreiche Proteine, oft Glycoproteine, d.h. Proteine, welche mit Zuckerresten funktionalisiert sind. Auch Lipide können auf diese Weise funktionalisiert sein, wodurch sich so genannte Glycolipide bilden. Die Kohlehydrate der Plasmamembran sind alle zum Extrazellulärraum hin ausgerichtet, wobei die aus der Membran herausragenden Zuckerketten eine wichtige Rolle sowohl bei der Wechselwirkung der Zelle mit dem sie umgebenden Medium, als auch bei der Verteilung der Membranproteine auf die verschiedenen Zellkompartimente spielen. So bestimmen die Zuckerketten der Glycolipide der roten Blutkörperchen die Blutgruppe des Organismus. <sup>[11]</sup>

Die Membranproteine, welche in die Membran eingelagert sind, können wie folgt eingeteilt werden: Integrale Proteine durchziehen die Lipiddoppelschicht von einer Seite auf die andere und ragen daher auf beiden Seiten der Membran aus dieser heraus. Sie weisen einen hydrophoben Teil auf, der in die Membran eingelagert ist, und zwei hydrophile Enden,

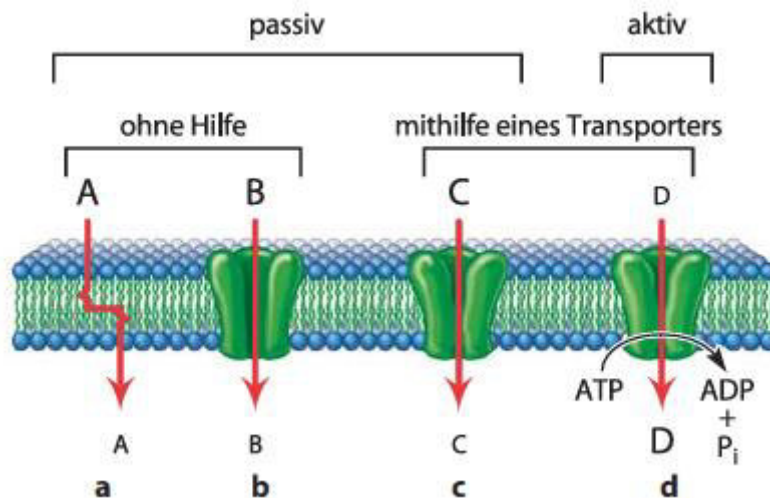
## A. Einleitung

welche zur Umgebung oder dem Cytosol hin orientiert sind. Periphere Proteine sind nur durch nichtkovalente Bindungen mit der Membran verbunden und ragen vollständig aus dieser heraus. Lipidverankerte Proteine sind an Lipide der Membran gebunden und ragen auch aus dieser heraus. <sup>[12]</sup>

Die Funktionen der Plasmamembran sind die Kompartimentierung zur Schaffung verschiedener Reaktionsräume, des Weiteren dient sie als Ort und Gerüst für chemische Reaktionen. Sie bildet ein semipermeables Hindernis, ist aber in der Lage, bestimmte Moleküle mit Hilfe eingelagerter Proteine durch sich selbst hindurch zu schleusen. Durch die Einlagerung von Rezeptoren spielt sie eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf äußere Reize und ermöglicht die Wechselwirkung der Zelle oder des Kompartiments mit dem sie umgebenden Medium. <sup>[13]</sup>

### 2.2. Wie Substanzen die Zellmembran überwinden können

Zellmembranen verhindern den unkontrollierten Ausstrom von Molekülen aus der Zelle. Andererseits müssen sie es ermöglichen, dass Stoffe mit der Umgebung ausgetauscht werden. Dies kann entweder durch passive Diffusion oder durch aktiven Transport erreicht werden (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Transportwege durch die Zellmembran. (a) = einfache Diffusion, (b) = Diffusion durch einen wässrigen Kanal. (c) = mit Hilfe eines Membranproteincarriers. (d) = aktiver Transport. © reprinted with permission of <sup>[14]</sup>

## A. Einleitung

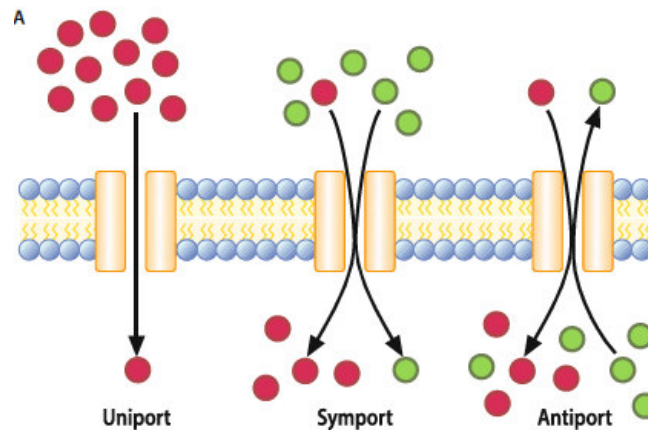
Die **passive Diffusion** (Abbildung 4) geschieht spontan, ohne den Verbrauch von Energie, da sie einen Konzentrationsgradienten ausgleicht, was gleichzeitig die Triebkraft dieser Bewegung darstellt. Eine weitere Möglichkeit, einen Konzentrationsgradienten auszugleichen, besteht in der erleichterten Diffusion durch einen wässrigen, von Proteinen ausgekleideten Kanal, oder durch einen Proteintransporter. Diese Art der Diffusion ist nötig, wenn das Molekül die Membran nicht selbst durchdringen kann, weil es z.B. zu polar ist. Dieser Kanal verhindert durch nach innen ausgerichtete polare Aminosäurereste den Kontakt des polaren Teilchens mit dem hydrophoben Inneren der Zellmembran und ermöglicht so den Transport auf die andere Seite der Membran. <sup>[15]</sup>

Ionen beispielsweise können die Zellmembran praktisch nicht durchdringen, sie benötigen so genannte Ionenkanäle, welche den Durchtritt ermöglichen. Die Triebkraft des Durchdringens ist hier auch wieder der Ausgleich eines Gradienten. Die Ionenkanäle, bei welchen es sich um Transmembranproteine handelt, können spannungsgesteuert oder ligandengesteuert sein. Spannungsgesteuert bedeutet, dass diese sich in Abhängigkeit des Membranpotenzials öffnen und schließen, während ligandengesteuert bedeutet, dass die Bindung eines Liganden eine Konformationsänderung des Rezeptors bewirkt. Dadurch wird die Öffnung oder Schließung einer Pore ausgelöst, durch die wiederum Ionen einströmen können oder nicht. <sup>[16]</sup>

Der **aktive Transport** (siehe Abbildung 4) geschieht im Gegensatz dazu entgegen eines Konzentrationsgradienten. Er ist endergonisch und muss mit einem exergonischen Prozess gekoppelt werden, beispielsweise der Spaltung von ATP <sup>[17]</sup>, oder den Abbau eines Ladungs- oder anderen Konzentrationsgradienten. Diese Carrier sind in der Membran verankert und binden das Substrat auf einer Seite. Dadurch ausgelöst erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch das Substrat auf der anderen Membranseite wieder entlassen wird <sup>[17]</sup>. Beim primär aktiven Transport wird die nötige Energie direkt durch ATP-Spaltung gewonnen, ein Beispiel dafür ist die Natrium-Kalium-Pumpe, die unter Verbrauch von ATP Natriumionen nach außen und Kaliumionen nach innen transportiert. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials <sup>[18]</sup>. Beim sekundär-aktiven Transport erfolgt der Transport entlang eines Konzentrationsgradienten, der zuvor durch Verbrauch von Energie aufgebaut wurde. Dabei wird dieser Konzentrationsgradient dazu benutzt, das zu transportierende Molekül entgegen seines Konzentrationsgradienten zu transportieren.

## A. Einleitung

Bei einem Symport werden zwei verschiedene Moleküle in dieselbe Richtung transportiert, bei einem Antiport in die entgegengesetzte Richtung und bei einem Uniport wird nur ein Molekül in eine Richtung transportiert (Abbildung 5).<sup>[19]</sup>



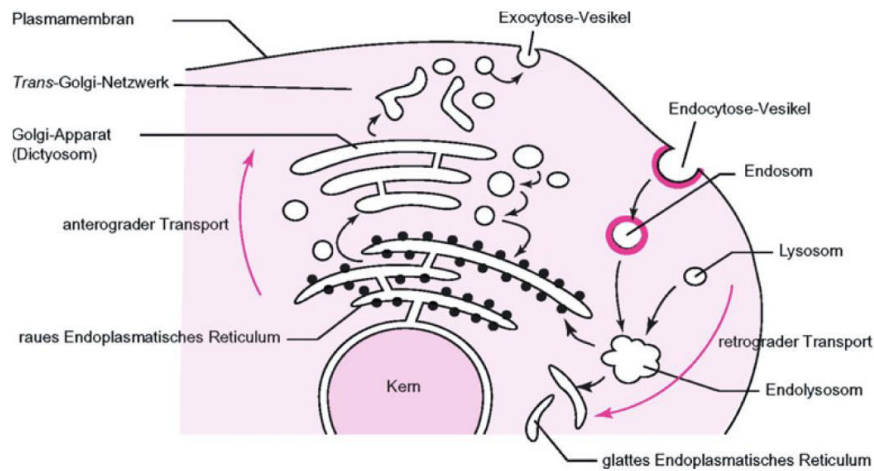
**Abbildung 5:** Uniport, Symport und Antiport zur Durchquerung der Zellmembran durch aktiven Transport. © reprinted with permission of <sup>[19]</sup>

Ein weiterer Transportweg in die Zelle stellt die so genannte **Endozytose** dar. Auf diese wird später eingegangen.

### 2.3. Das Endomembransystem -Überblick

Die Organellen des Endomembransystems (Abbildung 6, Seite 8) werden gebildet durch das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat, Endosomen und Lysosomen. Sie formen ein zusammenhängendes Netzwerk, durch das Substanzen in der Zelle transportiert werden können. Dies geschieht meist durch die Bildung von Transportvesikeln, die, durch das Cytoskelett geführt, zu ihrem Bestimmungsort wandern und dort mit der Zielmembran verschmelzen. Dabei geben sie ihren Inhalt in das Zielkompartiment ab. <sup>[20]</sup>

## A. Einleitung



**Abbildung 6:** Organellen des Endomembransystems © reprinted with permission of <sup>[21]</sup>

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) besteht aus einem weitverzweigten Membransystem, zahlreichen sogenannten Zisternen und Tubuli, und bildet unter anderem auch die Kernmembran. Man unterscheidet zwischen rauem und glatten ER. Das raue ER bindet zahlreiche Ribosomen, während das glatte ER keine Ribosomen enthält. Ribosomen sind zuständig für die Synthese von Proteinen, somit stellt das raue ER den Hauptsyntheseort von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen dar und führt zur Bildung neuer Membran. Das glatte ER hingegen ist Ort der Synthese von Phospholipiden sowie der Modifizierung von Fettsäuren und spielt eine Rolle bei der Bildung von Steroiden. Weiterhin hat das glatte ER eine wichtige Funktion beim Kohlenhydratstoffwechsel, der Entgiftung der Zelle und der Speicherung von Calcium. <sup>[22]</sup>

Im rauhen ER an der cytosolischen Seite neu gebildete Proteine werden mit Hilfe eines Membrankanals ins ER-Lumen überführt, dort gefaltet und modifiziert. Ist das Zielkompartiment dieser neu gebildeten Proteine der Golgi-Apparat, so knospen Vesikel vom ER ab, welche diese Proteine zu diesem transportieren und mit dessen Membranen fusionieren. <sup>[22]</sup>

### 2.4. Der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat besteht ebenfalls aus einer Reihe membranumhüllter Bereiche, welche in einem Stapel angeordnet sind und eine Polarisierung aufweisen. Diese Polarisierung wird ausgedrückt als cis-Seite, medialer Bereich und trans-Seite. Vesikel, welche vom ER kommen, verschmelzen mit der cis-Seite und werden dann über den medialen Bereich zum

## A. Einleitung

trans-Bereich weitergeleitet. Dort werden die Substanzen in Vesikel verpackt und fusionieren mit der Plasmamembran oder den so genannten Endosomen oder Lysosomen. Der Golgi-Apparat hat die Aufgabe der Prozessierung von Sekret- und Membranproteinen, er spielt eine Rolle bei der Bildung und Speicherung sekretorischer Vesikel, der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen sowie der Bildung primärer Lysosomen. Im trans-Bereich angekommene Proteine werden dann nach Destinationsort sortiert. <sup>[22]</sup>

### 2.5. Endosomen

Endosomen <sup>[23]</sup> sind membranumhüllte Vesikel, welche im Zuge der rezeptorvermittelten Endozytose entstehen. Diese beginnt mit der Abschnürung von Plasmamembran an der Zelloberfläche. Die entstehenden Vesikel verschmelzen mit so genannten frühen Endosomen. Hier werden aufgenommene Membranproteine, wie Rezeptoren oder Transporter, entweder weiter zu Lysosomen oder zurück zur Plasmamembran transportiert. Frühe Endosomen reifen zu späten Endosomen. Im Zuge dieser Reifung transportieren Protonenpumpen aktiv Protonen in das Lumen der Endosomen, was zu einer Ansäuerung des Innenraums führt. Späte Endosomen fusionieren mit Lysosomen, der entstandene Komplex wird als sekundäres Lysosom oder Endolysosom bezeichnet. Im Inneren der späten Endosomen bilden sich so genannte *multivesicular bodies* <sup>[23b]</sup>. Während des Prozesses der Reifung schnüren sich an der äußeren Membran zum Lumen hin Vesikel ab. Dadurch füllt sich das Endosom mit kleinen Vesikeln, die keinen Kontakt mehr zur äußeren Membran haben, welche aber die vormals in der Endosomenmembran gebundenen Membranproteine beherbergen. Die so von der Endosomenmembran entfernten Proteine werden dann ins Lysosom geleitet und dort verdaut. <sup>[22]</sup>

### 2.6. Lysosomen

Bei Lysosomen handelt es sich um von Membran umgebene, rundliche Organellen, welche gefüllt sind mit zahlreichen Enzymen zum Abbau von Proteinen. Das Innere des Lysosoms weist einen pH-Wert von ca. 4-5 auf. Die enthaltenen Enzyme können Biomakromoleküle in ihre Bestandteile zerlegen und auch aufgenommene Mikroorganismen verdauen. So genannte primäre Lysosomen enthalten zahlreiche Hydrolasen, welche vom Golgi-Apparat stammen. Oben genannte Endosomen können auch mit frühen Lysosomen verschmelzen, dabei bilden sich so genannte sekundäre Lysosomen. <sup>[24]</sup>

## A. Einleitung

Die Makromoleküle, welche ins Lysosom gelangen, stammen entweder aus Endozytose oder Phagozytose durch Aufnahme aus dem die Zelle umgebenden Medium, oder durch sogenannte Autophagie, worunter man die Aufnahme zelleigener Substanzen mit Hilfe sich bildender Vesikel versteht. <sup>[25]</sup>

### 2.7. Endozytose

Die Endozytose ist aufgeteilt in Phagozytose und Pinozytose (Abbildung 7). Bei Säugetieren wird der Begriff Phagozytose meist auf die Aufnahme größerer Partikel durch frei in Körperflüssigkeiten bewegliche spezialisierte Zellen, die sogenannten Phagozyten, bezogen. Als Makropinozytose (auch *Pinozytose*) bezeichnet man die Aufnahme von Flüssigkeiten und darin gelösten Substanzen aus dem Umgebungsmedium einer Zelle in ihr Inneres.

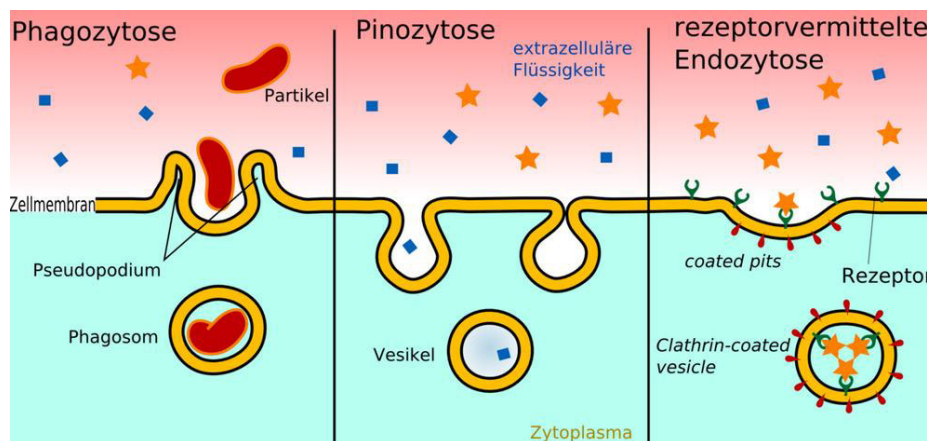


Abbildung 7: Formen der Endozytose <sup>[26]</sup>

Es gibt verschiedene Arten von Endozytose (Phagozytose; Pinozytose, darunter Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolae-vermittelte Endozytose). Zur Clathrin-vermittelten Endozytose gehört die rezeptorvermittelte Endozytose, bei der der Ligand an Plasmamembranrezeptoren gebunden wird. <sup>[27]</sup>

Bei der **Phagozytose** werden größere Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt, die Partikel aus der Umgebung enthalten (z.B. Zelltrümmer, Pathogene). Der Transport erfolgt entlang des Aktin-Zytoskeletts <sup>[28]</sup>. Die Phagozytose spielt eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion, da die Zellen dadurch Pathogene aufnehmen und verdauen. Des Weiteren werden durch Phagozytose Zelltrümmer, die durch absterbende Zellen entstehen, abgebaut <sup>[29]</sup>. Die meisten Phagozytose-betreibenden Zellen sind Phagozyten (z.B. Zellen der Immunabwehr wie Makrophagen oder dendritische Zellen). Die phagozytierten

## A. Einleitung

Mikroorganismen werden in Vesikel eingeschlossen, die dann mit den Lysosomen verschmelzen und verdaut werden <sup>[30]</sup>.

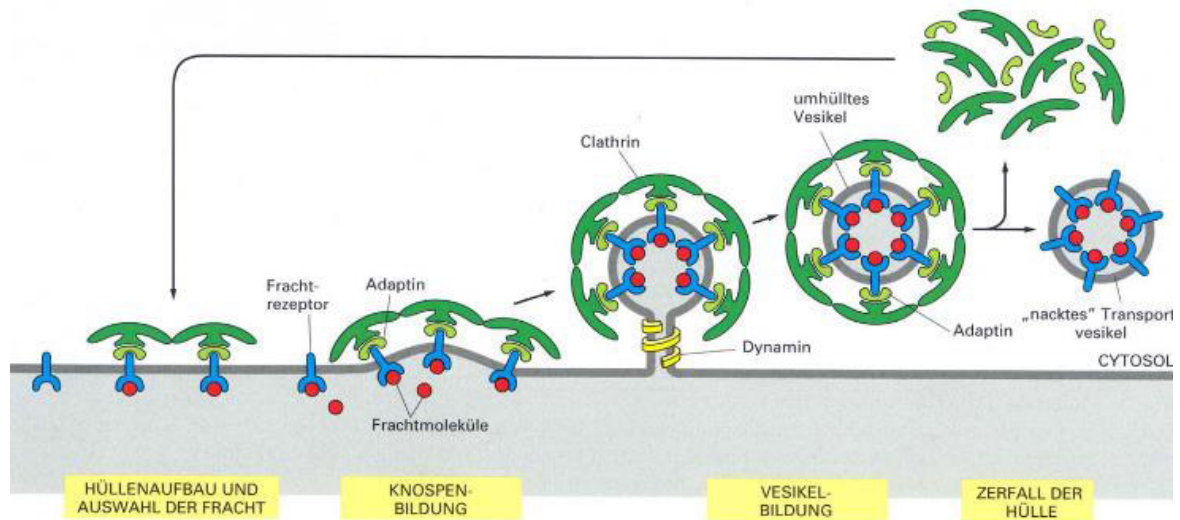
Bei der **Pinozytose** handelt es sich um die Aufnahme von Flüssigkeit und darin gelöster Substanzen aus der Umgebung einer Zelle in ihr Inneres. Die Flüssigkeit wird unspezifisch und ohne Beteiligung von Rezeptoren für den Inhalt aufgenommen. Die Vesikel verschmelzen anschließend mit Endosomen und Lysosomen, der Transport erfolgt entlang des Aktin-Zytoskeletts. <sup>[31]</sup> Zur Pinozytose gehört die Caveolae- und Clathrin-vermittelte Endozytose.

**Caveolae** sind cholesterinreiche Mikrodomänen, die als Einbuchtungen in der Plasmamembran zu erkennen sind. Das Membranprotein Caveolin stabilisiert dabei diese Einbuchtungen. Die Caveolae schnüren sich mit Hilfe von Dynamin von der Plasmamembran ab und ermöglichen so die Aufnahme von Substanzen von außerhalb der Zelle. <sup>[32]</sup> Sie werden zu den sogenannten „lipid rafts“, zu Deutsch Lipidflößen, gerechnet.

**Clathrin** ist ein Protein, das an der Einstülpung von Zellmembranen und der Bildung von Vesikeln beteiligt ist. Es befindet sich in den *Clathrin-coated pits* (*clathrinbeschichtete Vertiefungen*) der Zellmembran und ist an der rezeptorabhängigen Endozytose beteiligt, worauf im Folgenden noch genauer eingegangen wird. <sup>[33]</sup>

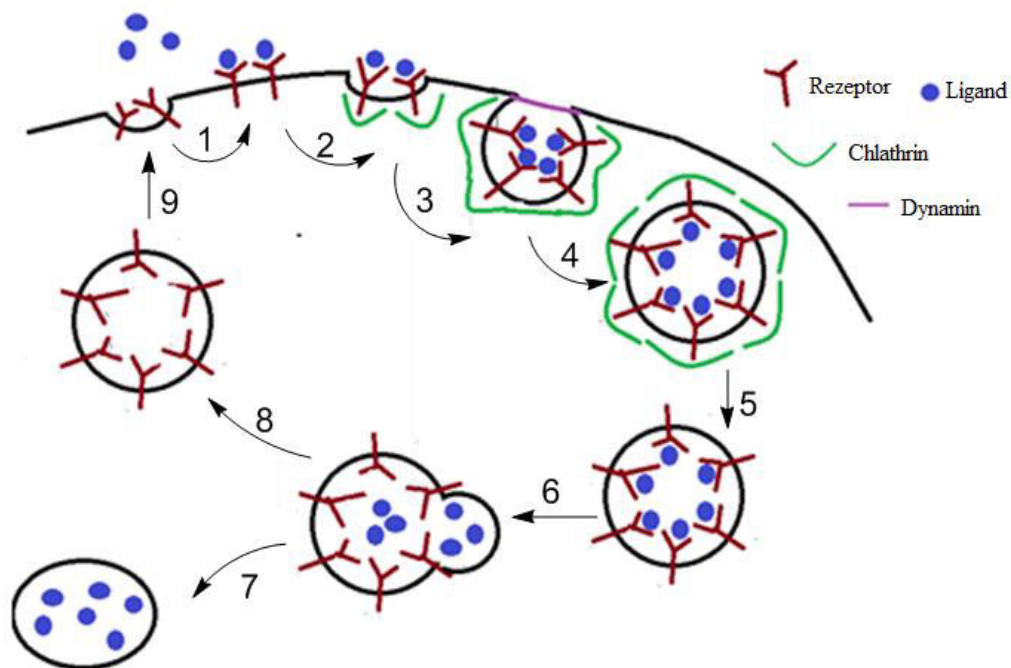
An den pits sammeln sich Frachtrezeptoren, welche meist Transmembranglykoproteine sind. Die **rezeptorvermittelte Endozytose** <sup>[34]</sup> (Abbildung 7, 8, 9) beginnt mit der Einstülpung eines coated pit. Adapterproteine verbinden die Clathrinhülle mit der Membran, zum anderen fangen diese Adaptorproteine verschiedene Transmembranproteine ein, die so genannten Frachtrezeptoren, die an lösliche Frachtmoleküle binden. Diese Frachtmoleküle werden im Zuge der rezeptorvermittelten Endozytose in die Zelle aufgenommen, wobei es für jede Substanz, die über auf diese Weise inkorporiert wird, einen spezifischen Rezeptor gibt. Bindet ein Ligand an seinen Rezeptor, induziert diese Bindung vermutlich eine Konformationsänderung im Rezeptor, was dazu führt, dass eine spezifische Aminosäure-Sequenz in der intrazellulären Domäne exponiert wird. Diese Sequenz bindet Adaptorproteine, wodurch der Rezeptor in sogenannte coated pits in der Plasmembran sortiert wird. Hier werden mithilfe des Mantelproteins Clathrin endozytotische Vesikel gebildet <sup>[35]</sup>. Nach Abschnürung von der Membran durch das Protein Dynamin verlieren die Vesikel ihre Clathrinhülle und werden weiter prozessiert. <sup>[36]</sup>

## A. Einleitung



**Abbildung 8:** Bildung der Chlathrinhülle, © reprinted with permission of <sup>[37]</sup>

Im Folgenden sei der Ablauf der rezeptormediierten Endozytose dargestellt <sup>[38]</sup> (Abbildung 9):



**Abbildung 9:** Endozytose frei nach <sup>[39]</sup> // 1) Rezeptoren binden den Liganden / 2) clathrinbeschichtete Vertiefungen formen sich / 3) Einbuchtungen werden gebildet. / 4) Dynamin schnürt den Vesikel ab / 5) Die Clathrinhülle wird abgestoßen / 6) Vesikel verschmelzen mit Endosomen, Rezeptoren trennen sich von den Liganden / 7) Lysosomen bilden sich / 8, 9) Rezeptoren werden recyclet.

Zunächst bindet der zu internalisierende Ligand an seinen Transmembranrezeptor, dieses Addukt sammelt sich in einem coated pit <sup>[40]</sup>. Ein Vesikel wird, wie oben beschrieben,

## A. Einleitung

abgeschnürt, gefolgt mit dem Verlust des Clathrins und der Fusion des Vesikels mit frühen Endosomen. Im Endosom trennen sich Ligand und Rezeptor, die Rezeptoren werden oft zurück zur Zellmembran transportiert und recyclet, oder enzymatisch abgebaut. Die Liganden werden weiter prozessiert und gelangen beispielsweise in Lysosomen, die sich durch einen erniedrigten pH-Wert auszeichnen. Handelt es sich bei den Liganden um Proteine, so werden diese innerhalb der Lysosomen enzymatisch abgebaut. <sup>[41]</sup>

Die Endozytose besteht aus drei Schritten. Ersterer ist die Wechselwirkung mit der Zellmembran, zweiterer die Aufnahme in die Zelle und der dritte Schritt ist die Freisetzung aus den Endosomen, auch „endosomal escape“ genannt, damit die Fracht sich nicht in den Lysosomen akkumuliert. Diese Flucht aus den Endosomen kann beispielsweise durch Porenbildung erfolgen <sup>[42]</sup>. Hygroskopische Puffereffekte können weiterhin nach der Endozytose zu einem Anschwellen des Endosoms und Rissen in der Endosomenmembran führen, die es dem therapeutisch wirksamen Agenz ermöglichen, das Endosom zu verlassen <sup>[42]</sup>. Dieser Prozess wird „proton sponge“ genannt und basiert auf dem erhöhten osmotischen Druck <sup>[43]</sup>.

Es zeigt sich, dass verschiedene diskutierte Aufnahmemechanismen in die Zelle existieren. Welche Wege tatsächlich stattfinden, um Material in die Zelle aufzunehmen, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## 3. Krebs

### 3.1. Eigenschaften von Krebszellen <sup>[44]</sup>

Krebszellen entstehen aus gesunden Zellen durch Mutation von Genen und stammen von einer einzelnen, mutierten, Zelle ab. Gene, die an der Entstehung von Krebs beteiligt sind, lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Tumorsuppressorgene und Oncogene. Erstere codieren Proteine, welche das Zellwachstum bremsen.

Handelt es sich bei den mutierten Genen um solche, welche die Zellteilung oder das Zellwachstum betreffen, so kommt es leicht zur Entstehung von Krebs. Diese Gene werden als Protoonkogene bezeichnet, da sie potenziell Krebs auslösen können. Wenn sie mutieren, werden sie Onkogene genannt. Sie sind genetisch dominant.

Verlieren Tumorsuppressorgene ihre Wirkung, so kann Krebs entstehen. Sie sind genetisch rezessiv.

Eine wichtige Eigenschaft von Krebszellen ist ihr unkontrolliertes Zellwachstum. Die Zellen reagieren nicht auf Inhibitionssignale und/oder benötigen keine Wachstumsfaktoren, was sie von gesunden Zellen unterscheidet. Krebszellen sind, im Gegensatz zu normalen Zellen, unsterblich und teilen sich unbegrenzt. Sie sind nicht zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, fähig. <sup>[45]</sup>

Die Tumorentstehung ist ein Mehrstufenprozess, in dessen Folge sich genetische Mutationen ansammeln, welche schließlich zur Tumorentstehung führen. In diesem Prozess wird die Zelle zunehmend weniger empfänglich für die regulativen Mechanismen.

Ein Tumorsuppressorgen, p53, codiert ein Protein, welches die Apoptose von Zellen, die DNA-Schäden aufweisen, einleitet, indem es den Zellzyklus unterbricht. Es ist das am häufigsten inaktivierte Tumorsuppressorgen in menschlichen Tumoren. <sup>[46]</sup>

Sogenannte Mutatorgene codieren Proteine des DNA-Reparaturapparates und können, wenn mutiert, zur Entstehung von Krebs beitragen, da dann die DNA-Schäden, welche nicht repariert werden können, bestehen bleiben. <sup>[47]</sup>

### 3.2. Krebstherapie

Wenn möglich, wird der Krebs chirurgisch entfernt.

Zur medikamentösen Therapie von Krebs werden so genannte Cytostatika eingesetzt. Sie hemmen die Zellteilung und bremsen so das Wachstum der Krebszellen. Dies geschieht durch Hemmung der DNA-Synthese durch Kettenabbruch während der Replikation oder durch Hemmung der Purinbiosynthese. Weiterhin ist die Schädigung der DNA, der Einsatz von Topoisomerasehemmern oder die Inhibition des Auf- und Abbaus des Tubulussystems der Mitosespindel während der Zellteilung möglich. <sup>[48]</sup>

Diese Medikamente hemmen alle sich schnell teilenden Zellen, was die Toxizität gegenüber anderen Zellen erklärt. Auch können Krebszellen manchmal im Körper verbleiben, ohne sich zu teilen, diese werden dann durch die Therapie nicht zerstört. Da sich Krebszellen aber meist schneller teilen als gesunde Zellen, werden überwiegend diese sich schnell teilenden Zellen geschädigt und die gesunden Zellen bleiben erhalten.

Bei der passiven Immuntherapie verabreicht man dem Patienten Antikörper, die Proteine, die eine Rolle bei der Tumorpheriferation spielen, erkennen und binden. Bei der aktiven Immuntherapie wird versucht, die körpereigene Abwehr zu stärken. <sup>[49]</sup>

Die therapeutische Breite ist bei der Chemotherapie sehr gering. Deshalb ist eine hohe Dosierung der Medikamente meist ausgeschlossen.

Strahlentherapie <sup>[50]</sup> führt zur Bildung freier Radikale im bestrahlten Gewebe, welche die DNA der Tumorzelle schädigen und die Apoptose auslösen. Tumorzellen haben in der Regel eine schlechtere Reparaturfähigkeit für DNA-Schäden als normale Zellen, so dass bei der Bestrahlung vornehmlich die erkrankten Zellen absterben.

## 4. Zellpenetrierende Peptide

Zellmembranen zeigen oft eine limitierte Permeabilität für Krebsmedikamente. Deshalb müssen hohe Dosen verabreicht werden, um den gewünschten Effekt zu erzielen, was bedeutet, dass auch gesunde Zellen geschädigt werden. Deshalb ist es wichtig, einen Mechanismus zu entwickeln, um Medikamente selektiv in die Krebszelle einzuschleusen. Eine mögliche Methode ist die Bindung des Medikamentmoleküls an einen Carrier, wobei hierfür beispielsweise Peptide<sup>[51]</sup> eingesetzt werden können.

In der großen Familie der Peptide und Proteine gibt es solche, denen es möglich ist, durch die Zellmembran von Zellen zu gelangen und so in diese einzudringen. Diese Peptide nennt man zell-penetrierende Peptide, auf Englisch cell penetrating peptides, CPP. Generell sind dies Peptide mit bis zu 30 Aminosäuren<sup>[52]</sup>. Die zwei allgemeinen Merkmale aller CPP sind eine positive Ladung oder ein amphiphiler Charakter<sup>[52]</sup>. Polykationische CPP tragen bei physiologischem pH eine positive Nettoladung<sup>[53]</sup>. Diese Ladungen wechselwirken mit der extrazellulären Matrix, welche negativ geladen ist und aus Kohlehydratverbindungen wie Glucosaminglycanen und negativ geladenen Lipiden besteht<sup>[52]</sup>. Unpolare Aminosäuren im CPP wechselwirken mit den Lipiden der Zellmembran, die Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix bewirkt eine Umorientierung des Aktin-Netzwerkes und Auslösung der Endozytose<sup>[54]</sup>.

CPPs stellen eine sehr heterogene Gruppe an Proteinen dar und werden je nach Eigenschaften eingeteilt. So können sie polykationisch (Tat, penetratin) und amphiphatisch (Transportan) sein<sup>[52]</sup>, wobei amphiphatische CPP abwechselnd polare und unpolare Aminosäuren aufweisen. Des Weiteren können sie als natürlich vorkommend oder künstlich erzeugt klassifiziert werden.

### 4.1. Entdeckung und Untersuchung der CPP

Im Jahre 1988 entdeckten zwei Arbeitsgruppen<sup>[55]</sup>, dass der Transkriptionsfaktor (TAT) des HI-Virus 1 von Zellen aus dem sie umgebenden Medium aufgenommen werden kann. Wenig später (1991) wurde festgestellt, dass das so genannte Antennapedia-Protein (kurz Antp) der Taufliede *Drosophila* in Zellen eindringen kann. Daraus entwickelte sich wenig später das

## A. Einleitung

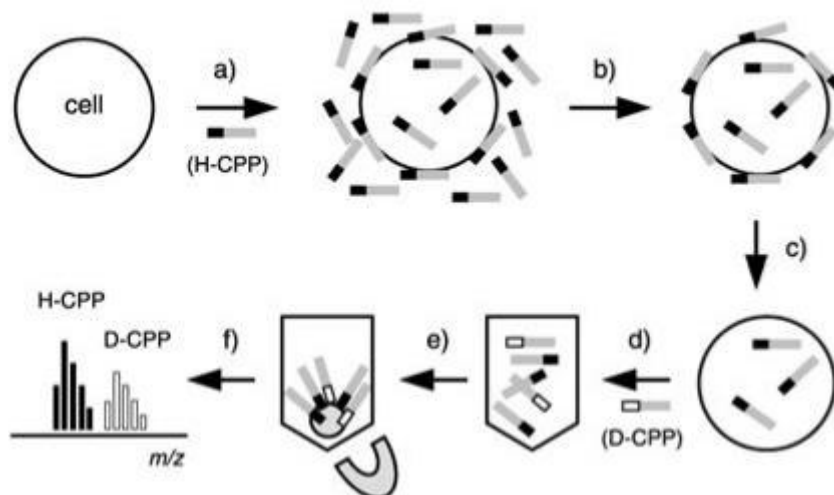
CPP Penetratin, welches aus der dritten alpha-Helix der Antp-Homöodomäne besteht und ebenfalls in Zellen eindringen kann. [56]

CPP können viele verschiedene Cargoes in die Zelle transportieren. Darunter sind Nanopartikel [57], Nucleinsäuren [58], siRNA [59], Oligomere, Plasmide [60], Proteine [61], Kontrastmittel wie Quantendots [62], Liposome [63] oder kleine Moleküle.

Um die Internalisierung zu untersuchen, werden die CPP meist entweder mit fluoreszierenden Cargoes beladen, oder aber der biologische Effekt der Fracht wird untersucht.

Die Beladung der CPP mit Fluorophoren erlaubt durch Messung der Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Menge an CPP in der Zelle. Konfokal-Mikroskopie erlaubt die Bestimmung der Verteilung der CPP in der Zelle. [64] Nachteile des Linkings an Fluorophore sind die Unmöglichkeit der Bestimmung, ob das Fluorophor noch an das CPP gebunden ist, sowie die veränderten Eigenschaften des CPP.

Des Weiteren kann mit Hilfe von MALDI-TOF MS bestimmt werden, wie viel CPP sich in der Zelle befindet (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Bestimmung des CPP-Gehalts in der Zelle mittels MALDI-TOF-MS, ©  
reprinted with permission of [65]

Dazu wird die Zelle mit biotinyliertem, nicht radioaktiv markiertem CPP behandelt (a). Dann werden die Zellen gewaschen (b) und mit Hilfe von Trypsin die membranengebundenen CPP entfernt (c). Als interner Standard werden dann deuterierte biotinylierte CPP zugegeben und die Zellen lysiert (d). Biotinylierte CPP werden dann mit Hilfe von Streptavidin-beladenen magnetischen Partikeln eingefangen, (e) gewaschen und mittels MALDI-TOF-MS untersucht.

## A. Einleitung

Das Verhältnis der peaks des H-CPP und des deuterierten D-CPP erlaubt Rückschlüsse auf die Menge an ursprünglichem H-CPP. [66]

### 4.2. Aufnahmemechanismen der CPP

Zunächst wurde angenommen, dass die Aufnahme der CPP durch direkte Translokation durch die Zellmembran geschieht, was damit begründet wurde, dass bei Aufnahmestudien bei 4 °C keine Inhibition der Aufnahme stattfindet. Somit handelt es sich um einen energieunabhängigen Prozess und direkte Translokation wurde angenommen. [67]

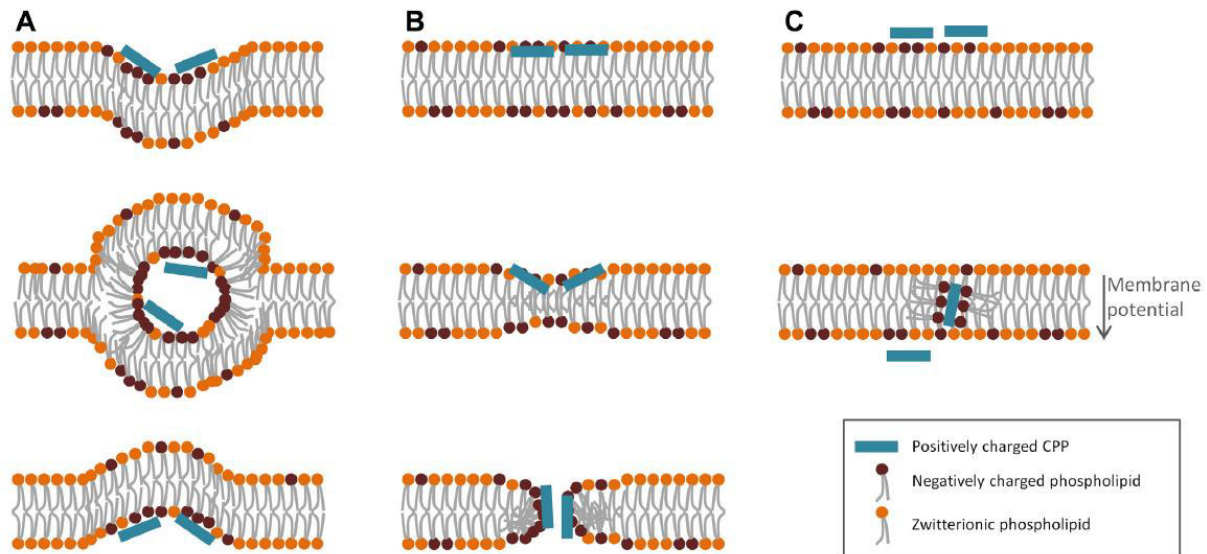
Für die Aufnahme durch **direkte Penetration** wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen [68]:

Bei der Aufnahme durch invertierte Mizellen (Schema A, Abbildung 11) wechselwirken die positiven Ladungen des CPP zunächst auch mit der extrazellulären Matrix. Die hydrophoben Anteile des CPP interagieren dann mit dem Inneren der Membran unter Ausbildung einer invertierten Mizelle, bei der die negativen Gruppen in Richtung des CPP zeigen und die aliphatischen Anteile nach außen orientiert sind. Dadurch verbleibt das Peptid in einer hydrophilen Umgebung und wird dann auf der anderen Seite der Membran entlassen. Diese Art der Aufnahme wurde 1996 für Penetratin angenommen [69].

Adaptive Translokation (Schema C, Abbildung 11): Diese beschreibt das Vermögen Guanidinium-reicher CPP-Cargo-Komplexe, durch Wechselwirkung dieser positiv geladenen CPP mit negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembran, die Membran zu durchdringen. Dabei bilden die negativ geladenen Lipidkopfgruppen mit den positiv geladenem CPP ein Ionenpaar und dieses maskiert durch die nach außen stehenden hydrophoben Schwänze die Polarität der Kopfgruppe, was es dem Komplex ermöglicht, die Membran zu durchwandern. [70]

Penetration durch Porenbildung: (Schema B, Abbildung 11). Hierbei lagern sich argininreiche CPP mit den polaren Kopfgruppen der Lipide zusammen und es bildet sich eine kurzlebige Pore, durch die das CPP hindurchwandern kann.

## A. Einleitung



**Abbildung 11:** A = invertierte Mizelle // B = Porenbildung // C = Adaptive Translokation, © reprinted with permission of <sup>[71]</sup>

2003 wurde festgestellt, dass die Verwendung fixierter Zellen die Aufnahme durch die Zellmembran auslöst und es wurde eine Beteiligung der Endozytose angenommen. <sup>[72]</sup>

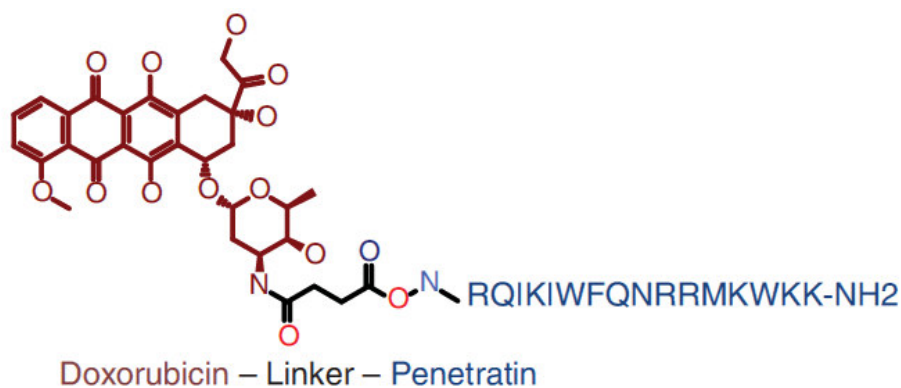
### 4.3. Adressierung von Zellen

Damit ein Medikament durch diese Membran hindurchdringen kann, muss es entweder sehr lipophil oder sehr klein sein <sup>[73]</sup>, was die Zahl möglicher Medikamente einschränkt. Bindet man nun ein beliebiges Medikament an ein CPP, so kann dieses von den Zellen aufgenommen werden. Dabei besteht zunächst einmal keine Zell-Spezifität, das Aggregat aus CPP und Droge kann alle Zellwände durchdringen. Wird das CPP aber von der Zelle mit Hilfe von Rezeptoren aufgenommen, die an der Oberfläche der Zellen exprimiert werden, so kann das Konjugat spezifisch in solche Zellen eindringen, welche einen Rezeptor exprimieren, der von anderen Zellen nicht exprimiert wird, wenn das CPP einen Liganden für diese Rezeptoren darstellt.

#### 4.4. CPP's als Carrier für Medikamente

Verabreicht man einem Patienten, z.B. einem Krebspatienten, ein Medikament intravenös, so gelangt dieses in der Regel nicht ausschließlich in die Krebszellen, sondern verteilt sich im ganzen Körper. Dies führt dazu, dass hohe Dosen an Medikament nötig sind, um in den Zielzellen eine genügend hohe Konzentration des Wirkstoffs zu etablieren, was schlussendlich zu Nebenwirkungen führt. Durch Bindung des Medikaments an einen Carrier, der ausschließlich von Krebszellen aufgenommen wird, kann die Droge selektiv zu den Zielzellen gebracht werden, ohne dass oben genannte Probleme auftreten. Die Dosismenge kann reduziert werden und Nebenwirkungen werden verringert.

So konnte das Zytostatikum Doxorubicin an das CPP Penetratin gebunden werden (Abbildung 12) und dessen Wirksamkeit gegen Hirntumoren verbessert werden <sup>[74]</sup>, indem die Bindung an das CPP die Durchlässigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglicht <sup>[75]</sup>.



**Abbildung 12:** Kovalente Bindung von Doxorubicin an das CPP Penetratin, © reprinted with permission of <sup>[76]</sup>

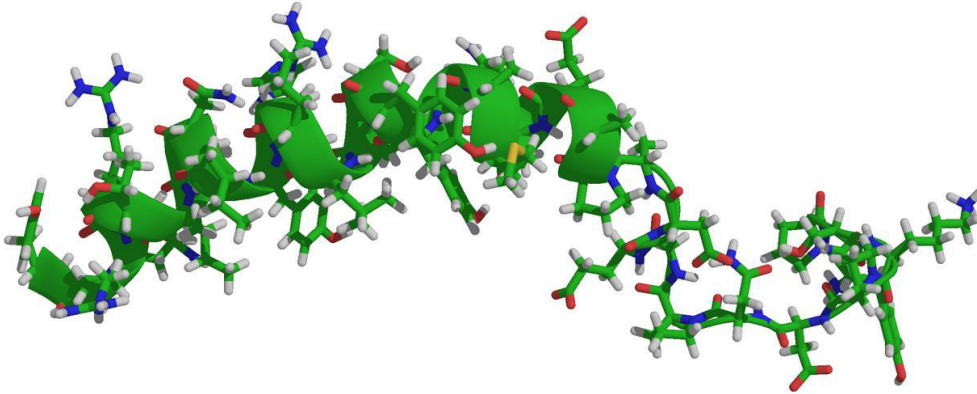
Werden Rezeptoren zu bestimmten Liganden ausschließlich auf der Krebszelle exprimiert und sind diese auf gesunden Zellen nicht vorhanden, so kann die Zelle dadurch spezifisch angesteuert werden, dass man das Medikament an diese Liganden bindet. Dies führt dazu, dass der so genannte Carrier das Medikament ausschließlich in die Krebszellen einschleust, wo dann das Carrierpeptid abgebaut und seine Fracht freigesetzt wird. <sup>[77]</sup>

Die Fracht des CPP kann entweder kovalent mit diesem verknüpft werden, oder aber durch nicht-kovalente Kräfte an dieses komplexiert werden. <sup>[78]</sup>

Ein Beispiel dafür ist die Familie des NPY (Abbildung 13) und seiner Liganden. <sup>[79]</sup>

## A. Einleitung

Neuropeptid Y besteht aus 36 Aminosäuren und wirkt als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und im Gehirn.



**Abbildung 13:** NPY <sup>[80]</sup>

NPY hat als Ligand verschiedene Rezeptoren (Y1, Y2, Y4, Y5). Der Y1-Rezeptor wird in einer Reihe von Krebszellen überexprimiert, während er in gesunden Zellen fast nicht exprimiert wird <sup>[81]</sup>. Liganden zu diesem Rezeptor können nun dazu verwendet werden, ein an den Liganden gebundenes Molekül selektiv in die Krebszelle einzuschleusen. Liganden, die selektiv auf Y1 wirken, sind z.B. [Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]pNPY <sup>[82]</sup>.

Die Droge ist reversibel an das Carrierpeptid gebunden. Wird es von der Zelle aufgenommen, z.B. durch rezeptorvermittelte Endozytose, so wird ein großer Teil des verabreichten Konjugats in die Endosomen bzw. Lysosomen aufgenommen. Innerhalb der Zelle wird es dann langsam freigesetzt und das Medikament ist nun möglicherweise lipophil genug, um die endosomale oder lysosomale Membran zu durchqueren.

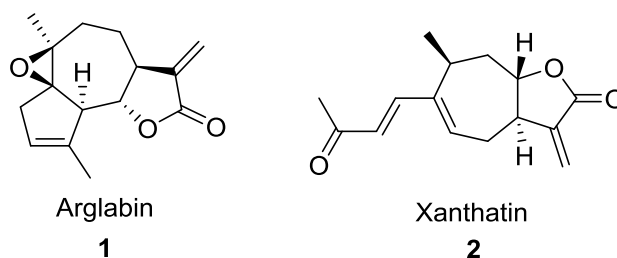
Der Mechanismus der Aufnahme der CPP-Cargo-Konjugate in die Zelle wird noch kontrovers diskutiert. Mögliche Aufnahmewege wären wie schon erwähnt eine direkte Translokation durch die Zellmembran, oder aber eine Aufnahme durch Vesikel, respektive Endozytose <sup>[83]</sup>. Das Schicksal der aufgenommenen, an das Peptid gebundenen Fracht hängt davon ab, ob sie es schafft, die Vesikelmembran zu überwinden, bevor diese zum Zweck des Recyclings zurück zur Zellmembran transportiert oder bevor die Fracht zu den Lysosomen weitertransferiert wird <sup>[83]</sup>. Die Art der Aufnahme scheint abhängig zu sein von der Art der an das CPP gebundenen Fracht und vom Zelltyp, in den dieses eindringen soll <sup>[83]</sup>.

## A. Einleitung

Die Bindung an das Carrierpeptid kann über verschiedene Gruppen erfolgen. So kann eine Disulfidbrücke <sup>[84]</sup> verwendet werden, ebenso eine Peptidbindung, wobei beide in der Zelle gespalten werden können. Des Weiteren können Bindungen verwendet werden, welche sich in Wasser spontan wieder spalten. Es gibt zahlreiche Medikamente, die in Zellen transportiert werden sollen. Dazu gehören auch die  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolactone. Diese zeichnen sich durch eine an das Lacton konjugierte *exo*-Doppelbindung aus, welche an Amine und andere Nucleophile binden kann.

## 5. $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolactone

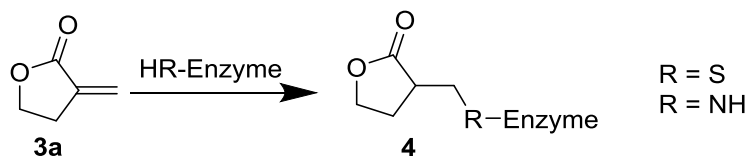
Die *exo*-Methylengruppe in  $\alpha$ -Stellung zu einer Carbonylgruppe in einem  $\gamma$ -Lactonring ist ein Strukturbaustein, der in vielen biologisch aktiven Naturstoffen vorkommt <sup>[85]</sup>. So seien beispielsweise Arglabin **1** (Krebsmedikament <sup>[86]</sup>) und Xanthatin **2** (Cytostatikum, Antibiotikum <sup>[87]</sup>) zu nennen.



**Schema 1:**  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolactone

Es sind viele Wirkungen <sup>[88]</sup> der aMgBL bekannt, beispielsweise wirken einige anticancerogen, antimykotisch, antibiotisch oder entzündungshemmend.

Die biologische Aktivität der *exo*-Methylen-Gruppe <sup>[89]</sup> entspringt der Reaktion mit Amino- oder Cystein-Seitengruppen, beispielsweise von Proteinen (**Schema 2**). Es kommt zu einer Michael-Addition der nucleophilen Gruppen an die Doppelbindung.



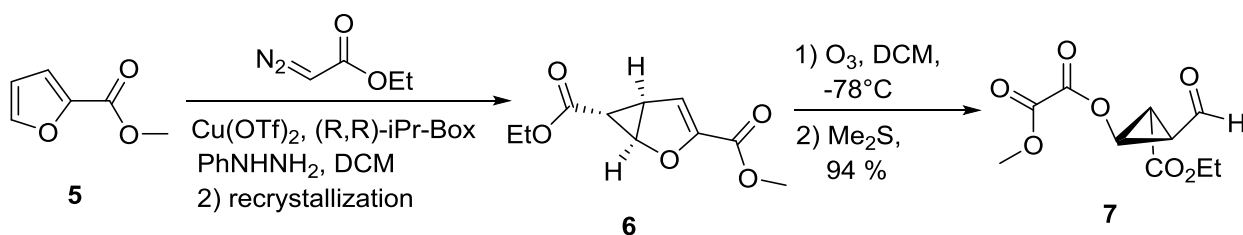
**Schema 2:** Reaktivität der aMgBL

### 5.1. Arglabin

Arglabin **1** ist ein Sesquiterpenlacton und mit seiner *exo*-Methylen-lactongruppe eine biologisch aktive Verbindung. Es inhibiert die Farnesyltransferase <sup>[90]</sup> und wirkt als Zytostatikum. Die Farnesyl-Transferase katalysiert den Transfer von Farnesyl-Resten (wie Farnesyl-Diphosphat (FDP)) an Proteine (wie das G-Protein Ras (rat sarcoma)), welches durch Farnesylierung aktiviert wird und eine wichtige Rolle in der Fortsetzung des Zellzyklus spielt. Durch Verhinderung der Ras –Farnesylierung wird eine Blockade des Signalübertragungsweges erreicht, was das Zellwachstum stoppt <sup>[91]</sup>.

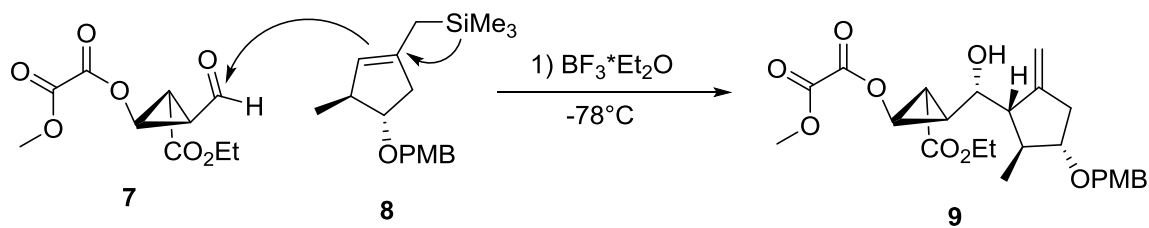
## A. Einleitung

Reiser <sup>[92]</sup> et al berichteten eine Synthese von Arglabin:

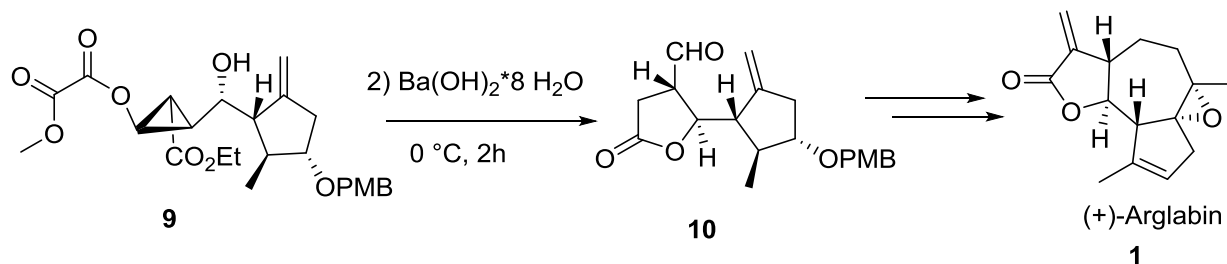


**Schema 3:** Cyclopropanierung und Ozonolyse von **5**

Zunächst erfolgte eine stereoselektive Cyclopropanierung des 2-Furansäuremethylesters **5** mit Ethyldiazoethylester in Gegenwart von Kupfertriflat, Phenylhydrazin und (R,R)-iPr-Box als Ligand. Nach Umkristallisation wurde das Cyclopropanierungsprodukt **6** enantiomerenrein erhalten. Daraufhin erfolgte Ozonolyse der verbleibenden Doppelbindung des Furans und reduktive Aufarbeitung mit Dimethylsulfid zum Aldehyd **7** in 94 % Ausbeute. (Schema 3)



**Schema 4:** Addition eines Allylsilans an den Aldehyd von **7**



**Schema 5:** Umlagerung von **9** auf dem Weg zu Arglabin

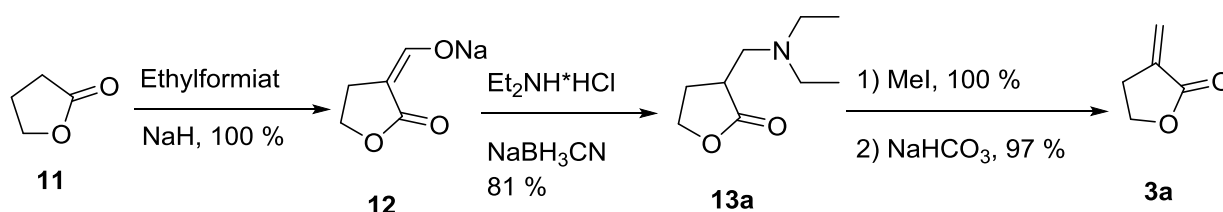
Der erhaltene Aldehyd wurde dann mit einem Allylsilan **8** in Gegenwart von  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  umgesetzt (Schema 4). Dabei addierte das Allylsilan Felkin Anh selektiv an den Aldehyd, und es wurde anschließend durch Umlagerung im Basischen das Lacton **10** zu 62 % erhalten (Schema 5). Dieses diente als Precursor für die weitere Synthese, die dann schlussendlich zum Arglabin **1** führte.

## 5.2. Wege zur Einführung der *exo*-Methylengruppe <sup>[93]</sup>

Es gibt verschiedene Wege, eine *exo*-Methylengruppe in ein Molekül einzuführen. So kann diese entweder direkt an das Butyrolacton angebracht werden, oder schon in dem Molekül vorhanden sein und der Ringschluss zum Lacton als zweite Reaktion stattfinden.

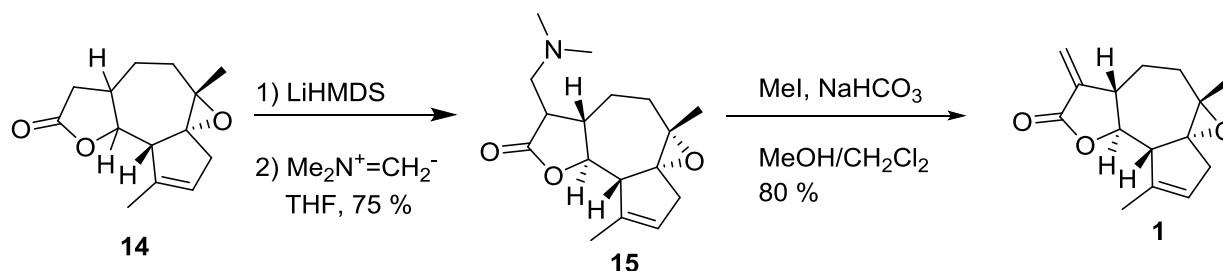
Hoffmann *et al.* beschrieben verschiedene Wege, um die *exo*-Methylengruppe direkt in Moleküle einzuführen <sup>[94]</sup>.

Hutchinson <sup>[95]</sup> (Schema 6) verwendete NaH, um  $\gamma$ -Butyrolacton **11** zu deprotonieren, welches dann mit Ethylformiat reagierte und das Natriumsalz **12** bildete. Reduktive Aminierung mit Diethylamin-Hydrochlorid und Natriumcyanoborhydrid gab das Amin **13a**. Quarternisierung mit MeI und darauffolgende Eliminierung mittels NaHCO<sub>3</sub> ergab das  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolacton **3a**.



**Schema 6:** Synthese von **3a** nach Hutchinson

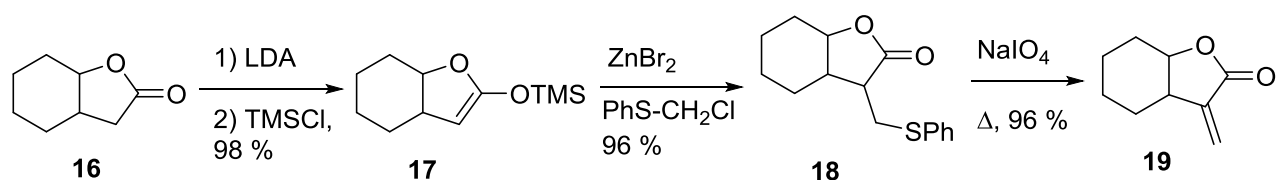
In der Synthese von Arglabin <sup>[96]</sup> (Schema 7) wurde Eschenmoser-Salz verwendet um die  $\alpha$ -Methylengruppe einzuführen. LiHMDS deprotonierte das Butyrolacton **14**, Addition des Eschenmoser Salzes führte die Aminomethylengruppe ein. Quarternisierung mittels MeI und Eliminierung mit NaHCO<sub>3</sub> ergab Arglabin **1**.



**Schema 7:** Synthese von Arglabin **1** nach Reiser

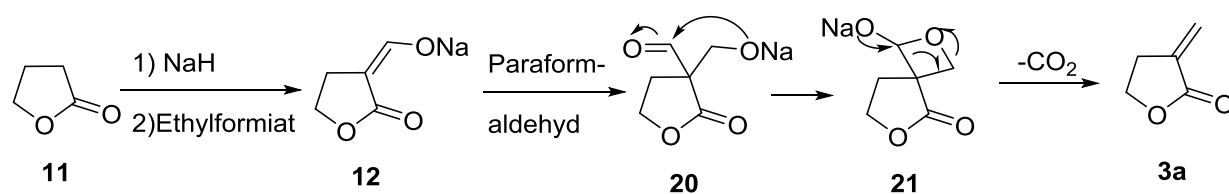
Paterson *et al.* <sup>[97]</sup> (Schema 8) synthetisierten das *exo*-Methylen-lacton **19** ausgehend von Butyrolacton **16**, welches mit LDA enolisiert und anschließend mittels TMSCl mesyliert wurde. Thioalkylierung von **17** ergab **18**, welches nach Oxidation zum Sulfoxid und Sulfoxidpyrolyse **19** ergab.

## A. Einleitung



**Schema 8:** Synthese von **19** via Sulfoxidpyrolyse

In dieser Arbeit wurde ein vierter Ansatz <sup>[98]</sup> gewählt (Schema 9), um die *exo*-Methylengruppe einzuführen.  $\gamma$ -Butyrolacton **11** wurde mittels NaH enolisiert und mit Ethylformiat umgesetzt. Das entstandene Natriumsalz **12** wurde mit Paraformaldehyd umgesetzt, welches schließlich nach Ringschluss und CO<sub>2</sub>-Eliminierung das *exo*-Methylenlacton **3a** ergab.

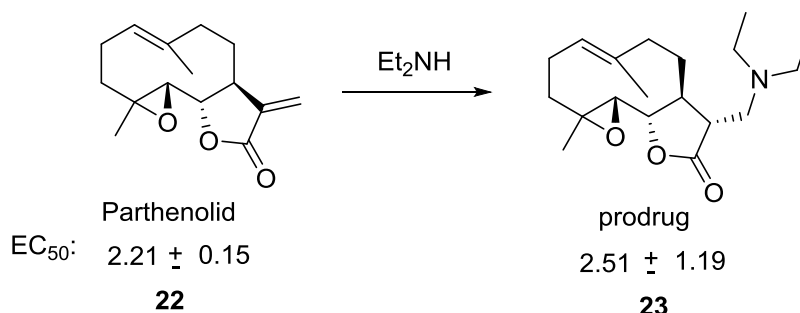


**Schema 9:** Synthese von **3a** nach Murray et al

Der andere Weg der Synthese des aMgBL beginnt mit einem Precursor, welcher schon die Doppelbindung enthält, und der unter Ringschluss das Lacton bildet. Dieser Weg wurde ebenso wie der obige in dieser Arbeit verfolgt und wird nachfolgend genauer beleuchtet.

## 6. Aminierte aMgBL und ihre Verwendung als prodrugs

Die *exo*-Methylengruppe in  $\alpha$ -Stellung zu einem Lacton stellt eine relativ reaktive Gruppierung dar. Um einerseits diese Funktionalität zu schützen, und auch um die pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern, wurden diese in einer Prodrug-Strategie mit Aminen in die korrespondierenden Michael-Addukte überführt. Colby <sup>[99]</sup> et al verwendeten eine solche Strategie und merkten an, dass die Überführung in Amine die Wasserlöslichkeit der Verbindungen erhöht und die pharmakologischen Eigenschaften verbessert, gleichzeitig die entstehenden Verbindungen aber ähnliche biologische Aktivität aufweisen. So verglich die Gruppe die Eigenschaften von Parthenolid (**22**) (siehe Schema 10) und diversen Amino-Prodrugs (z.B. **23**) und fand heraus, dass diese ähnliche Cytotoxizitäten aufwiesen.



**Schema 10:** Parthenolid **22** und sein Diethylamino-prodrug **23**

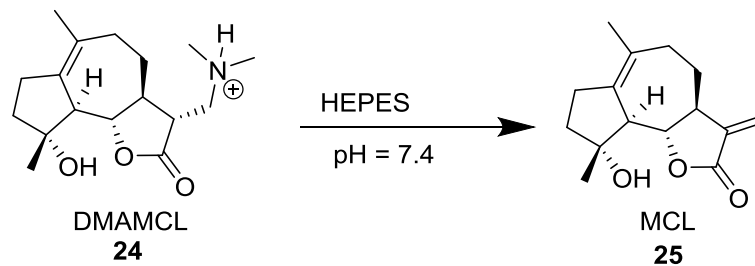
Das *exo*-Methylen-lacton **22** weist eine mittlere effektive Konzentration auf, die fast identisch der des aminierten Prodrugs **23** ist, gleichzeitig wird aber die Reaktivität der *exo*-Methylengruppe geschützt, so dass keine unerwünschten Additionen an diese stattfinden können. Dass beide Verbindungen ähnliche Aktivitäten aufweisen spricht dafür, dass die aminierte Verbindung im Körper wieder in die *exo*-Methylenverbindung umgewandelt wird, welche dann für den biologischen Effekt verantwortlich ist.

Ramachandran <sup>[100]</sup> et al beobachteten, dass aminierte aMgBL anti-Krebs- Eigenschaften aufweisen, die vergleichbar mit denen von Wirkstoffen mit *exo*-Methylen-Gruppe sind. Ihre biologische Aktivität wird der Rückbildung der *exo*-Methylengruppe im Körper durch N-Oxidierung gefolgt von einer Cope-Eliminierung zugeschrieben.

Verschiedene andere Gruppen stellten ebenfalls eine krebshemmende Wirkung aminierte aMgBL fest <sup>[101]</sup>.

## A. Einleitung

Zhang <sup>[102]</sup> und Mitarbeiter beobachteten die Eliminierung des Amins in wässrigem Medium, was zu einer erneuten Bildung der *exo*-Methylengruppe führt (Schema 11).



**Schema 11:** Eliminierung von **24** in Wasser zu **25** laut Zhang et al.

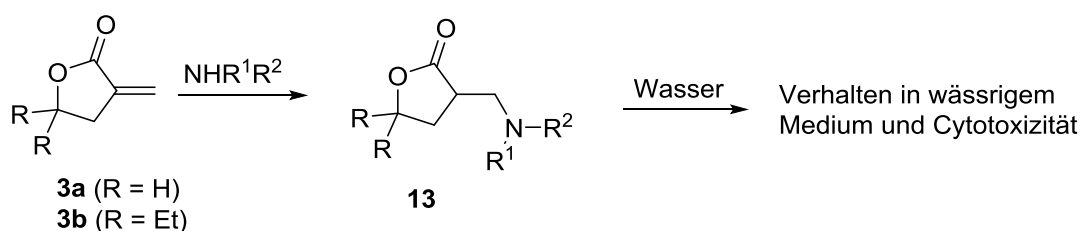
Durch vorhergehend genannte Arbeiten wird der Vorteil der Verwendung von aminierten aMgBL gegenüber den nackten Lactonen deutlich. Durch die Aminierung wird die aktive *exo*-Methylen-Gruppe maskiert, so dass die Chance besteht, dass Angriffe an diese auf dieser Stufe der Maskierung verhindert werden. Erst später, nach der Abspaltung des Amins, kann dann ein Nucleophil angreifen und die biologische Wirkung eintreten.

## B. Hauptteil

### 1. Zielsetzung der Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Eigenschaften aminierter  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolactone in wässrigem Medium. Dieses Verhalten soll ihre Eignung als Prodrugs prüfen und dazu wurden Rückschlüsse auf das Eliminierungsverhalten in Form einer Retro-Michael-Addition in Wasser und die Abhängigkeit dieser vom Substitutionsmuster am Stickstoff des gebundenen Amins und der Substitution am Lacton gezogen.

Zunächst wurden einige einfache *exo*-Methylen-lactone (**3a**, **3b**) als Modellverbindungen synthetisiert. Deren Umsetzung mit Aminen ergab die entsprechenden Michael-Addukte (**13**), welche auf ihre Eliminierungsgeschwindigkeit in protischen Medien hin untersucht wurden. Des Weiteren sollte die pH-Abhängigkeit der Eliminierung bestimmt werden.

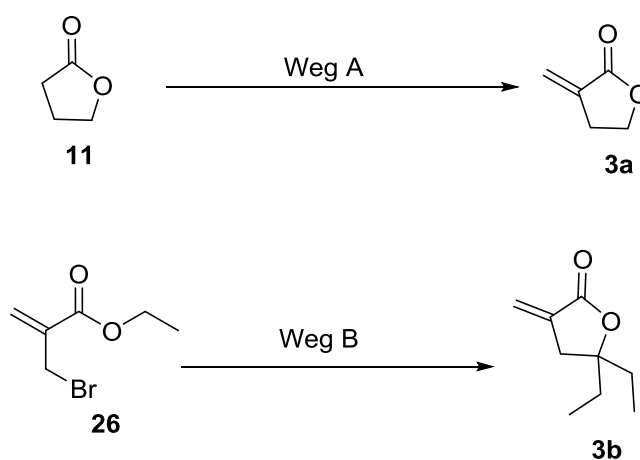


**Schema 12:** geplante Aminierung der  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolactone

Nach der Anbindung geeigneter Modellsysteme von *exo*-Methylen-lactonen an die Hauptkette Cbz-geschützten Lysins, sollte die Anbringung dieses Addukts mit Hilfe der freien Säuregruppe des Lysins an den N-Terminus eines Carrierpeptids sowohl im Modell, als auch an ein reales Peptid erfolgen.

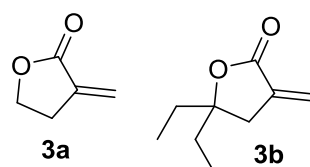
## 2. Synthese der *exo*-Methylen-Modelllactone

Als Modellsubstanzen für Lactone, welche an der  $\alpha$ -Position eine *exo*-Methylengruppe tragen, wurden Verbindung **3a** und **3b** (Abbildung 13) ausgewählt. Diese repräsentieren neben zwei verschiedenen Lactonen auch zwei verschiedene Herangehensweisen an die Synthese von  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -Butyrolactonen. So wird Verbindung **3a** durch Einführung einer *exo*-Methylengruppe an ein bestehendes Lacton hergestellt (Weg A, Abbildung 13), während Verbindung **3b** von einem Precursor ausgeht, der schon die Doppelbindung in  $\alpha$ -Position zum Lacton enthält und der dann so modifiziert wird, dass sich im letzten Schritt unter Ringschluss das Lacton bildet (Weg B).



**Abbildung 13:** Weg A: direkte Einbringung der *exo*-Methylen-Gruppe an ein vorhandenes Lacton; Weg B: Ringschluss als letzter Schritt.

Der Vorteil von Weg B besteht darin, dass der Ringschluss als letzter Schritt stattfindet. Dies verhindert mögliche Ringöffnungen in frühen Schritten der Synthese durch Nucleophile wie Wasser.

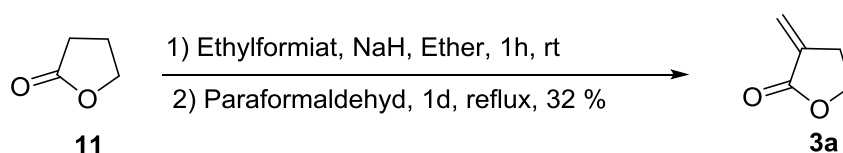


**Schema 14:** untersuchte *exo*-Methylen-lactone

## B. Hauptteil

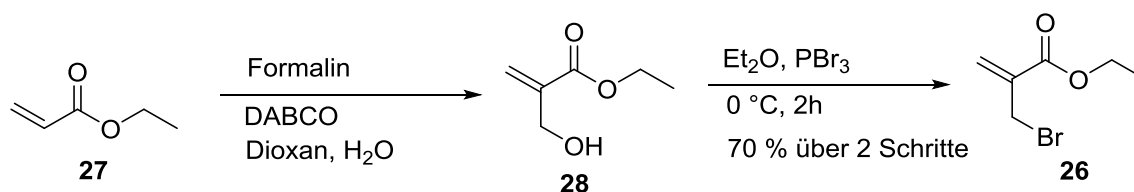
Die beiden Modellsubstanzen **3a** und **3b** unterscheiden sich in ihrem Substitutionsmuster an der Position 5 im Lactonring. Verbindung **3a** ist das einfachste aller  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolactone (aMgBL), weshalb es untersucht wurde, während Verbindung **3b** durch seine Ethylgruppen biologischen aMgBL ähnlicher ist, da diese auch meist an der Position 5 im Ring substituiert sind. Somit kann der Einfluss einer Substitution am Lactonring zusätzlich zum Verhalten des *exo*-Methylen-lactones selbst in Wasser untersucht werden.

Verbindung **3a** wurde ausgehend von  $\gamma$ -Butyrolacton **11** nach einer Prozedur von Murray und Reid synthetisiert <sup>[103]</sup> (Schema 15). Diese Synthese kann verwendet werden, um die *exo*-Methylengruppe in  $\alpha$ -Stellung an beliebige Butyrolactone anzubinden und eignet sich daher gut als letzter Schritt einer Umsetzung, welche zunächst das Butyrolacton synthetisiert.



**Schema 15:** Synthese von **3a** nach Murray und Reid

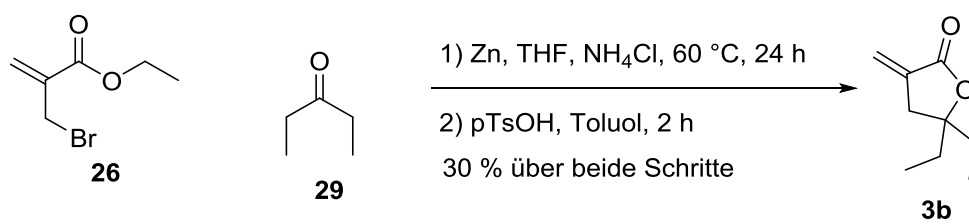
Zur Synthese von Verbindung **3b** wurde Ethylacrylat **27** in einer Baylis-Hillmann-Reaktion mit Formalin in Gegenwart von DABCO umgesetzt und der erhaltene Alkohol **28** anschließend mittels PBr<sub>3</sub> zu **26** bromiert <sup>[104]</sup> (Schema 16).



**Schema 16:** Herstellung des Precursors für die Synthese von **3b**

Nach der Umsetzung der erhaltenen Brom-Verbindung **26** mit Zink in eine metallorganische Zwischenstufe erfolgte dessen Reaktion mit einer Carbonylverbindung, in diesem Fall mit Diethylketon (**29**) (Schema 17). Ringschluss mittels katalytischen Mengen pTsOH in Toluol ergab das entsprechend substituierte aMgBL **3b**, welches an der Position 5 zwei Ethylgruppen aufweist. Dieser Syntheseweg ist gut geeignet, um Substituenten in der Position 5 am Ring einzuführen, da nur das verwendete Keton bzw. Aldehyd variiert werden muss.

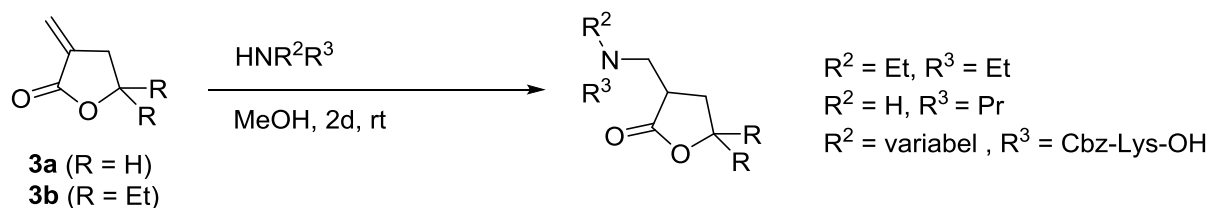
B. Hauptteil



**Schema 17:** Synthese von **3b** <sup>[104]</sup>

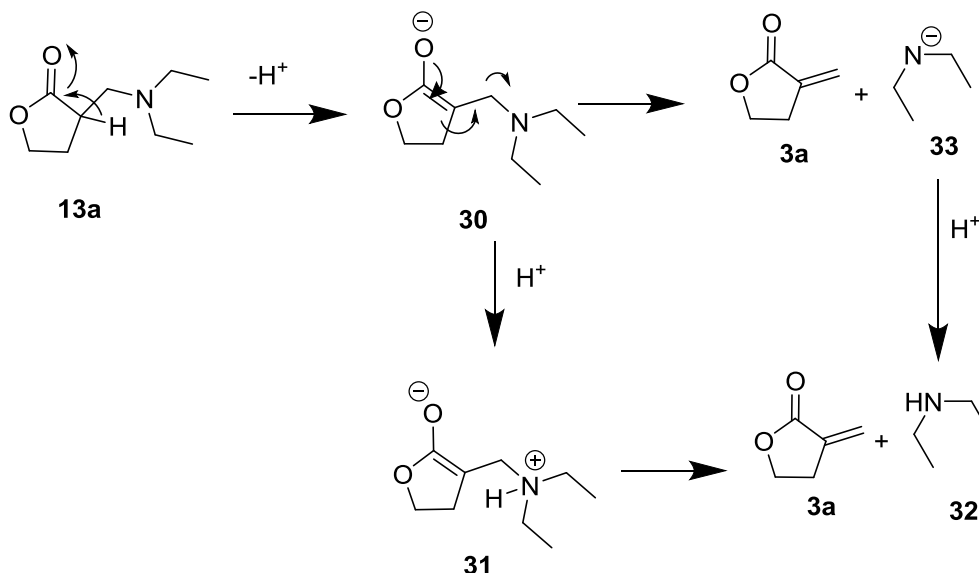
### 3. Das Verhalten aminierter $\alpha$ MgBL in wässrigem Medium

Die Synthese der aminierten  $\alpha$ MgBL, welche durch Michael-Addition an die *exo*-Methylengruppe entstehen, erfolgte ausgehend von den *exo*-Methylen-lactonen **3a** und **3b** durch Umsetzung mit den entsprechenden Aminen in Methanol. Als Amine dienten Diethylamin, Propylamin sowie die Aminogruppe in der Seitenkette von an der Hauptkette geschütztem Lysin (Cbz-Lys-OH).



**Schema 18:** Aminierung der *exo*-Methylen- $\gamma$ -butyrolactone

Der Mechanismus der bei Kontakt mit Wasser stattfindenden Retro-Michael-Addition des Amins **13a** ist in Schema 19 dargestellt. Es handelt sich wahrscheinlich um eine E1cb-Eliminierung aufgrund der schlechten Abgangsgruppe (**33**) und der möglichen Stabilisierung eines Carbanions (**30**) als Enolat.



**Schema 19 :** möglicher Mechanismus der Eliminierung zur *exo*-Methylen-Doppelbindung

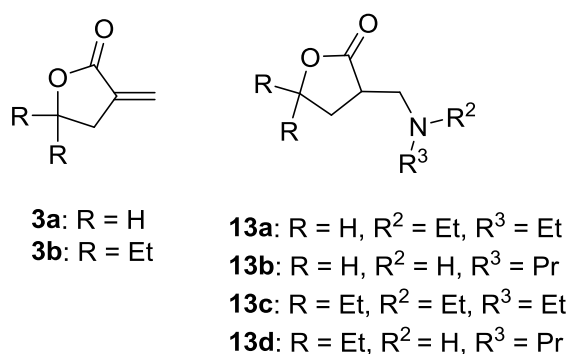
Im ersten Schritt wird das  $\alpha$ -H abgespalten, es entsteht das genannte Enolat **30**. Nun kann entweder direkt das deprotonierte Amin **33** unter Rückbildung der Doppelbindung am Lacton abgespalten werden, oder aber die Aminogruppe in Verbindung **30** wird erst zu **31** protoniert

## B. Hauptteil

und dann als bessere Abgangsgruppe **32** abgespalten. Die Rolle des Wassers besteht bei dieser Reaktion aus der Aufnahme und Abgabe von Protonen, um die Reaktion zu ermöglichen.

### 3.1. Dargestellte aminierte Modellactone

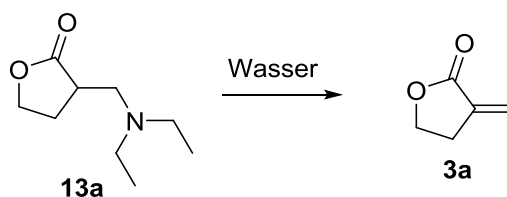
Ausgehend von Verbindungen **3a** und **3b** erfolgte die Untersuchung sowohl sekundärer (**13b**, **13d**), als auch tertiärer (**13a**, **13c**) aminierter Lacton-Derivate.



**Schema 20:** Bibliothek an aminierten Lactonen – Teil 1

### 3.2. Durchführung der kinetischen Studien

Schema 21 zeigt die Eliminierung der aminierten aMgbL (z.B. **13a**) in Wasser zurück zu den *exo*-Methylen- $\gamma$ -butyrolactonen (z.B. **3a**).



**Schema 21:** Eliminierung von aminierten aMgbL in Wasser

Die hergestellten Aminderivate **13** ( $c = 50$  mM) wurden einem deuterierten Phosphatpuffer ( $D_2O$ , 0.375 M, pH = 7.4, 20 % MeOD) ausgesetzt und der Reaktionsfortschritt mittels NMR untersucht, wobei die hierbei wichtigen Parameter die Menge an gebildetem *exo*-Methylenlacton, sowie die Menge an verbrauchtem Edukt waren. Die Menge an *exo*-Methylenprotonen korrespondiert mit der Menge an freigesetztem *exo*-Methylenlacton.

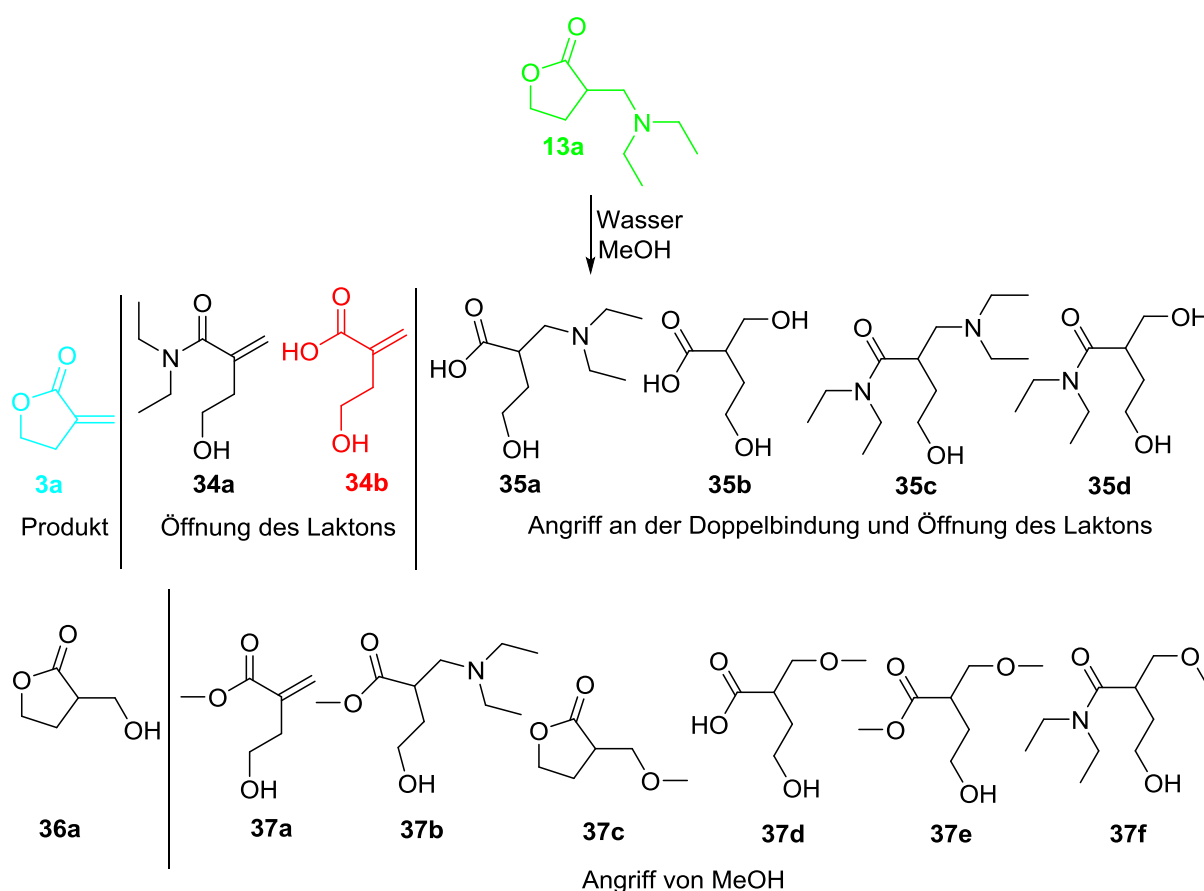
## B. Hauptteil

Aufgrund der im Verlauf der Arbeit festgestellten schlechten Löslichkeit einiger Verbindungen im Puffergemisch wurde letzterem 20 % Methanol-d4 zugesetzt.

Im Folgenden erfolgte die Untersuchung des Eliminierungsverhaltens der Michael-Addukte in einer Retro-Michael-Addition unter verschiedenen Bedingungen. Parameter waren hierbei der Gehalt an Methanol in der Lösung, die Substitution an der Position 5 im Ring, das Substitutionsmuster des Amins und der pH-Wert des Puffers.

Wurde das aminierte aMgBL (Verbindung **13a**) Wasser mit 20 % MeOH-Gehalt ausgesetzt, so ergab sich neben dem gewünschten Eliminierungsprodukt auch das ringgeöffnete Produkt. Für die Ringöffnung kommen Wasser, Methanol oder Amin in Frage. Dieses System wurde in Bezug auf die entstehenden Produkte und Nebenprodukte exemplarisch näher beleuchtet.

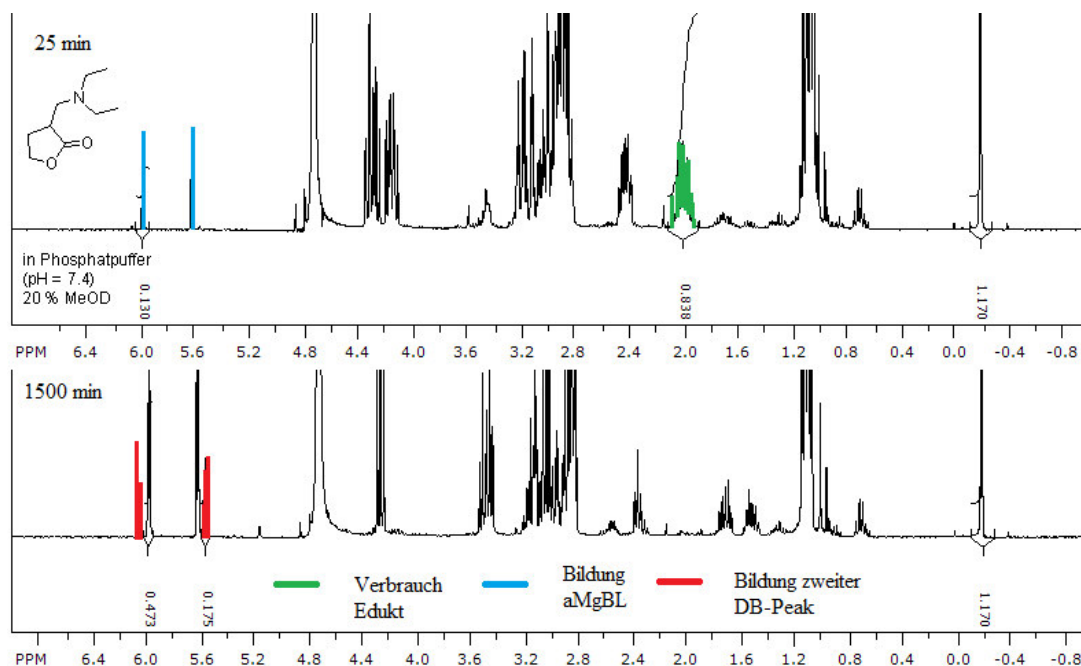
Die möglichen Beiprodukte gehen aus dem Amin-Lacton durch Eliminierung oder/und Angriff von Wasser, Methanol oder Amin (hier Diethylamin) am Carbonyl des Lactons und/oder der gebildeten Doppelbindung hervor (Schema 22).



**Schema 22:** Auswahl möglicher Reaktionsprodukte der Eliminierung von **13a** in Wasser mit 20 % MeOH

## B. Hauptteil

Das folgende Beispiel (Schema 23) zeigt die Auswertung der NMR-Spektren. Als interner Standard wurde TSP (Natriumtrimethylsilylpropionat) verwendet, um die Kalibrierung einer Serie zu ermöglichen. Der in den Kinetiken angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

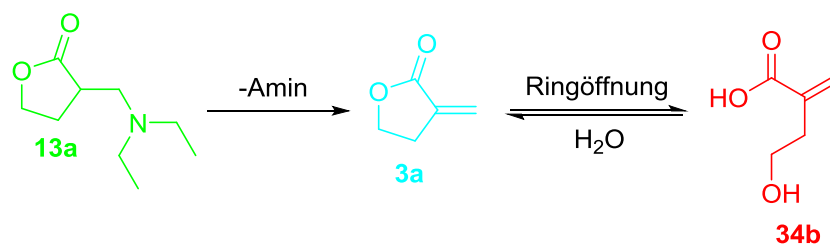


**Schema 23:** Beispiel der NMR-Auswertung der Eliminierungen von **13a** (Zuordnung der Peaks zu den verschiedenen Verbindungen siehe Text und Schema 24)

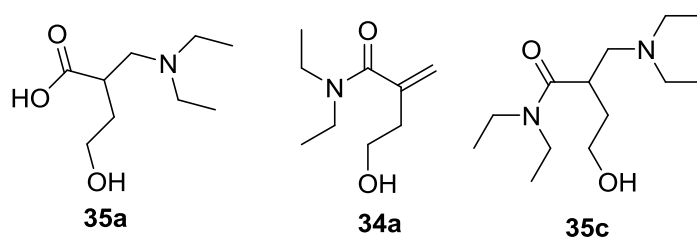
Bei dem grünen NMR-Peak in Schema 23 handelt es sich um NMR-Signale von Verbindung **13a** und bei Verfolgung dieses Peaks wird die Abnahme der Menge dieser Verbindung ermittelt. Der blaue Peak verfolgt die Bildung von Verbindung **3a** (Schema 24) und der rote Peak entspricht *exo*-Methylen-protonen aus Verbindung **34b**.

Schema 24 zeigt die Wege der Bildung der verschiedenen entstandenen Reaktionsprodukte.

## B. Hauptteil



weitere identifizierte Reaktionsprodukte:



**Schema 24:** denkbare Reaktionswege zur Bildung der identifizierten Reaktionsprodukte einer Kinetik ausgehend von **13a** in Phosphatpuffer pH = 7.4 und 20 % MeOD.

Die Differenz zu 100% der Summe der relativen Fläche unter den Peaks im NMR-Spektrum erlaubt Rückschlüsse auf die Verbindungen, die keine Doppelbindung enthalten und die kein Edukt sind. Dabei handelt es sich unter anderem um die Produkte **35a**, **34a**, **35c** (Schema 24), welche durch Ringöffnung und/oder Eliminierung aus dem Edukt **13a** oder **3a** hervorgehen. Folglich verlaufen Ringöffnung und Eliminierung simultan. Die Anwesenheit weiterer Produkte ist möglich.

Weiterhin wurde **13a** in wässrigem Puffer ohne den Zusatz von Methanol umgesetzt, wobei hier in nicht geringer Menge eine Doppelbindung bei 5.2 ppm entstand. Diese Doppelbindung kann wahrscheinlich Verbindung **34a** zugewiesen werden, da alle anderen möglichen Verbindungen mit Doppelbindung ausgeschlossen werden konnten. Die entstehende Verbindung kann kein Produkt einer Reaktion mit Methanol sein und Verbindung **34b** ist auch ausgeschlossen, da sie ein anderes NMR-Muster aufweist. Dieser Peak von **34a** ist auch im besprochenen NMR in geringer Menge (ca. 5%) zu sehen (siehe Schema 23).

Säuregruppen und Aminogruppen in einer Reaktionsmischung führen zu einer Säure-Base-Reaktion und zerstören damit die Nucleophilie des angreifendenamins. Dies erklärt die Irreversibilität der Abspaltung desamins unter Bildung der *exo*-Methylen-doppelbindung in wässriger Lösung bei neutralem pH im gepufferten System.

## 4. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten <sup>[105]</sup>

Es gibt verschiedene Arten von Eliminierungsreaktionen. So gibt es Reaktionen erster Ordnung. Hier zu nennen sind die E1 und die E1<sub>cb</sub>. Dabei steht das cb für conjugated base und bei beiden Reaktionen hängt die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration nur einer Spezies in der Reaktionsmischung ab. Betrachtet werden muss bei der kinetischen Untersuchung von Reaktionen jeweils der langsamste Reaktionsschritt, da dieser geschwindigkeitsbestimmend für die Reaktion ist. Die 3 genannten Grenzfälle der Eliminierungen stellen ein kontinuierliches Spektrum an Verlaufsformen dar.

Bei Reaktionen erster Ordnung gibt es zwei Verlaufsformen. Die wahre Reaktion erster Ordnung hat folgendes Geschwindigkeitsgesetz:

$$RG = k * [A]$$

Hier liegt eine Reaktion  $A \rightarrow B$  vor und k stellt die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion dar.

Des Weiteren gibt es die Reaktion pseudo-erster Ordnung, für die folgendes Geschwindigkeitsgesetz gilt:

$$RG = k * [A] * [B]$$

Hier erfolgt eine Reaktion  $A + B \rightarrow C$ . Wenn nun allerdings die Konzentration eines der Reaktionsteilnehmer (z.B. B) viel größer ist als die Konzentration des anderen (z. B. A), so kann die Konzentration des Überschuss-Reaktionsteilnehmers als konstant angesehen werden und sie wird Teil der Konstante. Trifft dies zu, so ergibt sich wieder ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung mit

$$RG = k * [A]$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit für beide Fälle ist die zeitliche Änderung der Konzentration mit der Zeit. Daraus folgt:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k * [A]$$

Wenn man nun die Differenzialgleichung löst, so ergibt sich:

## B. Hauptteil

$$\int_{[A]_0}^{[A]_1} \frac{d[A]}{[A]} = -k * \int_0^t dt$$

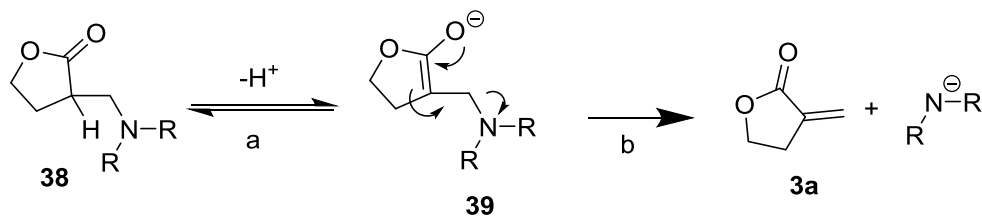
Daraus folgt als Lösung das bekannte Zeitgesetz erster Ordnung:

$$[A] = [A]_0 * e^{-kt}$$

Anders geschrieben folgt:

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt$$

Liegt ein Datensatz aus der Konzentration von [A] gegen die Zeit vor, so ergibt sich nach dem Logarithmieren von [A]/[A<sub>0</sub>] und der Auftragung des Logarithmus gegen die Zeit eine Gerade mit der Steigung -k.

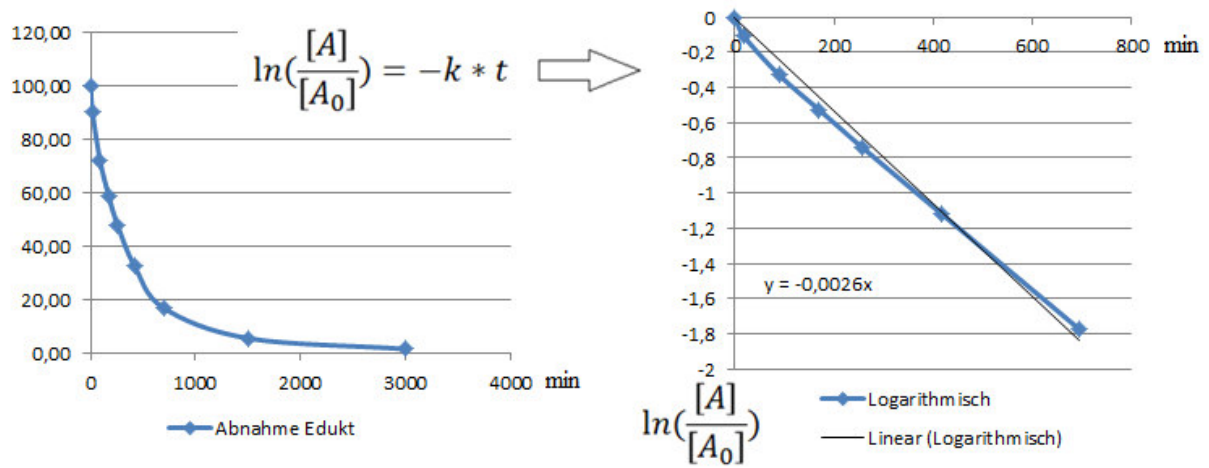


**Schema 26:** Mechanismus der Eliminierung zu **3a**

Die E1<sub>cb</sub>-Reaktion, welche für das untersuchte Reaktionssystem, wie in Schema 26 gezeigt, angenommen wurde, ist erster Ordnung bezüglich des Eduktes. Zunächst wird reversibel das Kohlenstoffatom (Schritt a, Schema 26) in Nachbarschaft zur Abgangsgruppe deprotoniert. Hierbei entsteht ein resonanzstabilisiertes Enolat **39**. Im nun folgenden, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Schritt b), wird die Abgangsgruppe abgespalten, was zur Ausbildung der Doppelbindung führt.

Bei Logarithmierung der y-Achse, d.h. der Menge an aMgBL ([A]/[A<sub>0</sub>]), wird eine Gerade erhalten, deren Steigung gleich der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion ist (Reaktion erster Ordnung).

## B. Hauptteil



**Schema 27:** Bestimmung der Reaktionskonstante der Eliminierung für die Abnahme des Edukts von Verbindung **13c**



## B. Hauptteil

	<b>Geschwindigkeit Edukt- verbrauch (13c)</b>	<b>Geschwindigkeit Produktbildung (3b)</b>
<b>Mit MeOD</b>	0.0026 ± 0.0003 /min	0.0024 ± 0.0003 /min
<b>Ohne MeOD</b>	0.0019 ± 0.0002 /min	Nicht erster Ordnung

**Tabelle 1:** Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von **13c** mit und ohne MeOD im Puffer

Bei Betrachtung der Kurven für die Reaktion in Gegenwart von Methanol fällt auf, dass mit Beginn der Reaktion das Edukt **13c** kontinuierlich verbraucht wird (0.0026 /min), während kontinuierlich und mit ähnlicher Geschwindigkeit (0.0024 /min) Produkt **3b** gebildet wird. Bei dieser Produktbildung in Gegenwart von Methanol handelt es sich um eine Reaktion, die von einem definierten Edukt praktisch vollständig zu einem definierten Produkt von statten geht.

Die Bildung des Produkts **3b** findet in Abwesenheit von Methanol auch kontinuierlich und mit ähnlicher Geschwindigkeit statt, allerdings stoppt die Bildung des Produkts bei 50 % Umsatz und die Menge an gebildetem aMgBl **3b** bleibt in weiterem Verlauf konstant. Gleichzeitig bildet sich die schon erwähnte, weitere Doppelbindung aus Verbindung **40a** (aus der Ringöffnung von **3a**), deren Wert ebenfalls kontinuierlich ansteigt, wenn auch in kleinerem Umfang, und sich dann bei 20 % einpendelt. Wenn nun die Reaktion der Ringöffnung von **3b** stetig weiter voranschreiten würde, so müsste die Menge an **40a** stetig steigen, gleichzeitig müsste aber auch die Menge des gebildeten ringgeschlossenen Produkts **3b** langsam anfangen zu sinken, da es verbraucht werden würde, was in der Kinetik aber nicht zu sehen ist. Die Bildung der beschriebenen Plateaus ist nur dann möglich, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen **3b** und **40a** einstellt.

Die Menge an Produkten im System, die zu 100 % der verschiedenen Verbindungen fehlt, ergibt sich aus Reaktionsprodukten ohne Doppelbindung. Es kann nicht exakt geschlossen werden, ob es sich bei diesen Verbindungen um solche handelt, welche durch Angriff von Wasser oder von Diethylamin am Lacton entstanden ist. Verbindungen **40b** belaufen sich auf rund 27 % nach 3000 min und werden analog des Ringöffnungsproduktes **40a** kontinuierlich gebildet.

Bei Betrachtung der Geschwindigkeit des Eduktverbrauchs fällt auf, dass diese Geschwindigkeit bei Anwesenheit von Methanol-d4 mit 0.0026 /min nur um den Faktor 1.4 schneller ist als der Wert in Abwesenheit von MeOD, wo die Geschwindigkeit 0.0019 /min beträgt.

## B. Hauptteil

Größere Unterschiede ergeben sich bei den Geschwindigkeiten der Produktbildung. Mit MeOD beträgt die Geschwindigkeit der Bildung von **3b** 0.0024 /min, ohne Methanol ist sie langsamer. Der Unterschied in der Produktbildungsgeschwindigkeit der Bildung von **3b** liegt daran, dass in Abwesenheit von Methanol andere Reaktionen auftreten, welche die Bildung der Doppelbindung des Produkts **3b** verlangsamt, einerseits durch Ringöffnung (Verbindung **40a**), als auch durch die Bildung der anderen Nebenprodukte. Der Eduktverbrauch, welcher auch bei den Nebenreaktionen stattfindet, ist schneller als die Produktbildung. Eine Geschwindigkeitskonstante durch die oben genannte Methode konnte für die Produktbildung in Abwesenheit von Methanol nicht bestimmt werden, da es sich durch die vielen Nebenreaktionen nicht um eine Reaktion erster Ordnung handelt. Dies zeigt sich darin, dass die Kurve, welche durch die Logarithmierungsmethode, wie oben beschrieben, dargestellt wurde, keine Gerade ergab.

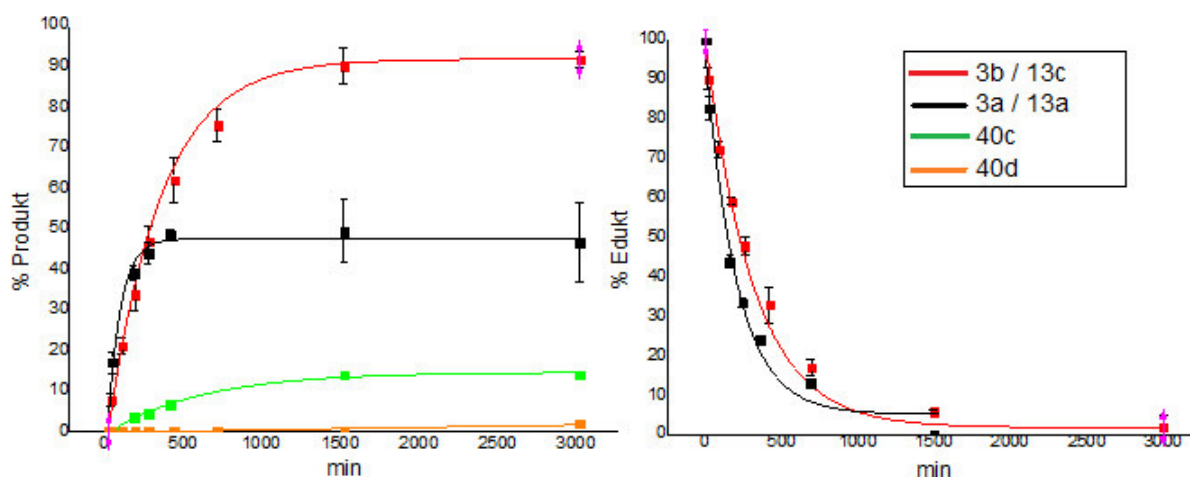
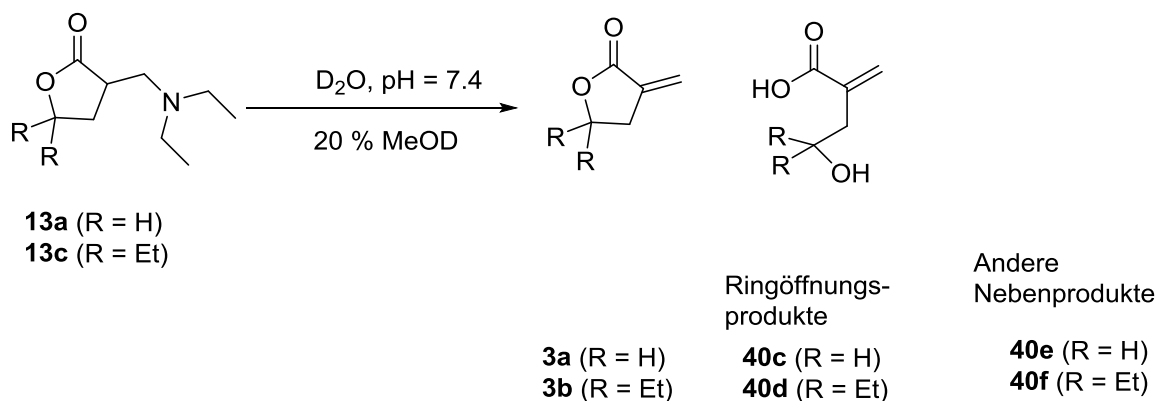
Betrachtet man die Reaktionsgeschwindigkeiten des Eduktverbrauchs und der Produktbildung für die Reaktion in Gegenwart von Methanol, so zeigt sich, dass diese im Rahmen der Fehlergrenzen identisch sind (0.0026 bzw. 0.0024 /min), so dass Nebenreaktionen nicht stattfinden.

Somit hat das Methanol den Effekt, dass es mögliche Nebenreaktionen unterdrückt, wodurch die Untersuchung dieses Systems erleichtert wird.

### **5.2. Effekt einer Substitution an der Position 5**

Verbindungen **13a** und **13c** wurden verglichen, wobei **13a** an der Position 5 zwei Protonen und **13c** an dieser Stelle zwei Ethylgruppen trägt. Dieses System wurde in Bezug auf die in wässrigem Medium (Phosphatpuffer, 20 % MeOD) entstehenden Produkte exemplarisch eingehender beleuchtet (siehe auch Kapitel 3.2).

## B. Hauptteil



**Schema 29:** Effekt des Substitutionsmusters auf die Eliminierung. (links: Zunahme der Reaktionsprodukte ; rechts: Abnahme des Edukts.)

	Geschwindigkeit Eduktverbrauch (13a, 13c)	Geschwindigkeit Produktbildung 3a/3b
<b>13a</b>	0.0042 ± 0.0001 /min	Nicht erster Ordnung
<b>13c</b>	0.0026 ± 0.0002 /min	0.0024 ± 0.0003 /min

**Tabelle 2:** Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von **13a/13c**

Das nichtsubstituierte Lacton **13a** ist in seinem Eduktverbrauch mit 0.0042 /min schneller als **13c** mit 0.0026 /min, was vermutlich an der geringeren sterischen Hinderung aufgrund der fehlenden Substitution an der Position 5 im Ring liegt.

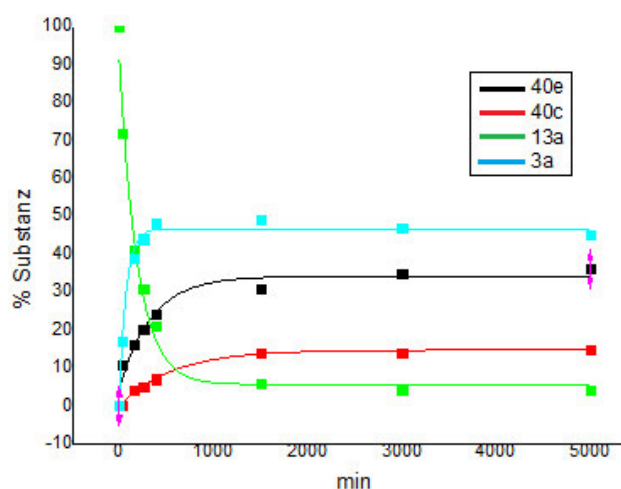
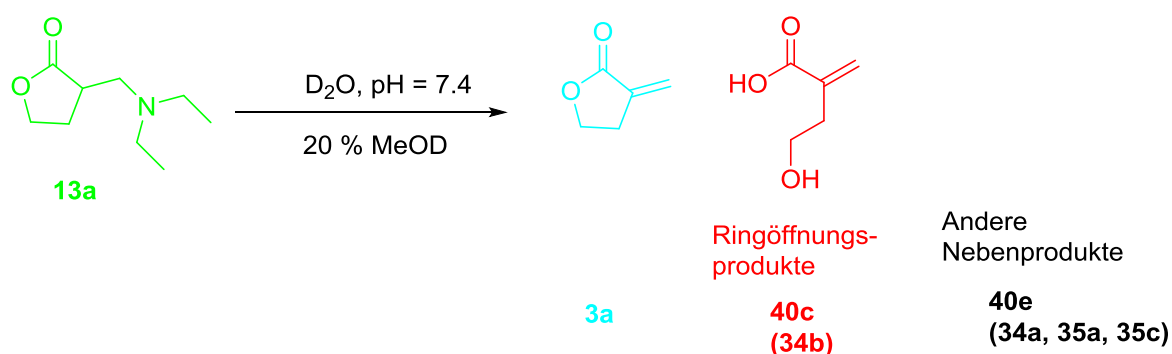
Die Bildung des *exo*-Methylen-lactons (**3a** oder **3b**) ist bei der ethylierten Verbindung **13c** mit 0.0024 /min ähnlich schnell wie bei **13a** (siehe Schema 29). Allerdings bildet sich bei **13c** fast vollständig das erwartete Produkt, analog dem Einfluss des Methanols. Es handelt sich hier um die gleiche Kinetik, welche ohne Nebenreaktionen und fast vollständig nach ca. einem Tag zum Produkt **3b** führt.

## B. Hauptteil

Fehlt diese Substitution an der Position 5 allerdings, so stoppt im unsubstituierten Edukt **13a** die Produktbildung, ähnlich wie im Fall der Abwesenheit des Methanols bei 50 %, während sich auch analog die zweite Doppelbindung mit 15 % nach 2 Tagen bildet. Diese Doppelbindung kann Verbindung **40c** zugeschrieben werden, wobei hier ein sterischer Effekt das unterschiedliche Verhalten auszulösen scheint. Bei der Bildung von **3a** aus **13a** handelt es sich aufgrund der entstehenden Nebenprodukte nicht um eine Reaktion erster Ordnung, weshalb eine Geschwindigkeitskonstante, wie oben erfolgt, nicht bestimmt werden konnte. Aber in Schema 29 links zeigt sich qualitativ, dass beide Produktbildungen fast gleich schnell vorstättgehen.

Es bilden sich noch weitere Produkte (ca. 35 % nach 2 Tagen), welche entweder aus einer Ringöffnung mit Hilfe von Wasser oder Diethylamin des Edukts **13a** entstehen können. Die Anwesenheit weiterer Reaktionsprodukte ist möglich und diese werden in der Kurve von **40e** zusammen dargestellt (Schema 30).

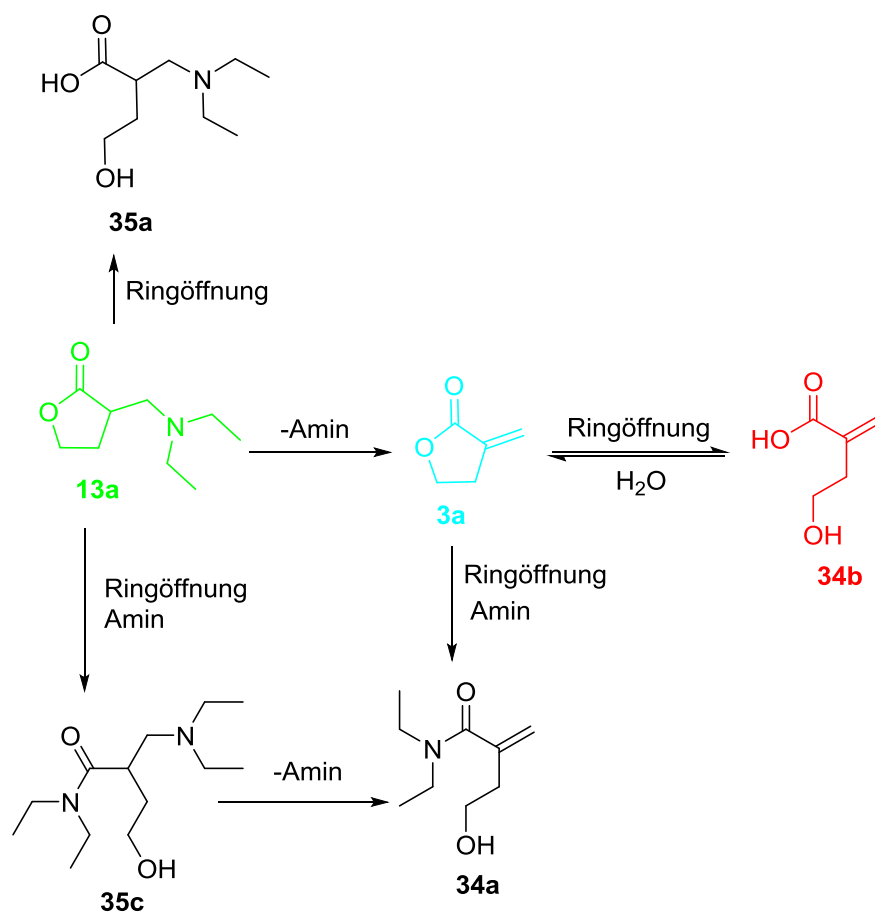
Das Verhalten des Systems der Umwandlung von **13a** zu **3a** (ohne Vorhandensein der Ethylgruppe) wurde in Schema 30 nochmals eingehender dargestellt.



**Schema 30:** Verlauf der Edukt- und Produktverteilung der Reaktion ausgehend von **13a**

## B. Hauptteil

Ist die Position 5 substituiert (wie bei **13c**), so ist der Angriff des Wassers weniger günstig, Ringöffnung und Nebenreaktionen unterbleiben. Da die Zugabe von Methanol, wie im vorigen Kapitel erläutert, auch andere Nebenreaktionen unterdrückt, findet im System Methanol-diethyl keine Nebenreaktion statt. Hingegen im System Methanol-unsubstituiert kann das Methanol, da am Lacton durch die fehlenden Ethylgruppen weniger sterische Hinderung vorhanden ist, die Nebenreaktionen nicht unterdrücken. Die bessere Erreichbarkeit durch das Wasser führt zu den oben schon erwähnten Reaktionen wie z.B. Ringöffnung.



**Schema 31:** angenommenes Reaktionssystem für die Eliminierung von **13a** in methanolischer Pufferlösung.

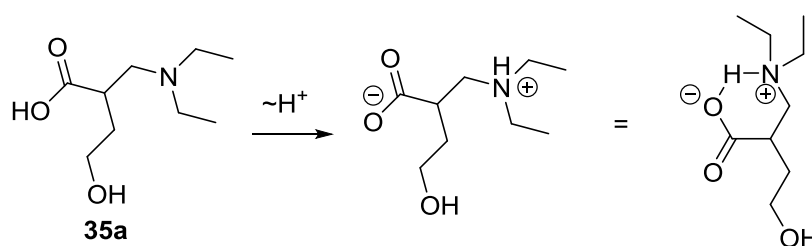
Es wird von einer irreversiblen Amin-Eliminierung unter Bildung der *exo*-Methylen-doppelbindung ausgegangen (von **13a** zu **3a**). Aufgrund des neutralen pH-Wertes liegt das freigesetzte Amin weitgehend protoniert vor, es weist keine Nucleophilie mehr auf und kann deshalb nicht wieder an der Doppelbindung angreifen. Des Weiteren ist die Aminkonzentration sehr gering.

## B. Hauptteil

Die Ringöffnung zwischen **3a** und **34b** ist reversibel, es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Lacton und Säure ein, was sich auch in der Kinetik (Schema 30) zeigt. So bildet sich durch irreversible Retro-Michael-Addition die Verbindung **3a**, welche im Gleichgewicht mit **34b** steht. Folglich nimmt das Edukt **13a** kontinuierlich ab, während **3a** zunimmt. Da **3a** im Gleichgewicht mit **34b** steht, bilden sich in der Kinetik Plateaus, was die Annahme der Einstellung eines Gleichgewichtes untermauert.

Verbindung **34a** bildet sich sehr langsam, nach 1500 min sind in der Kinetik von **13a**, d.h. ohne Funktionalisierung an der Position 5, nur 5 % vorhanden. Dies zeigt, dass die Ringöffnung zum Amid sehr langsam vonstattengeht. Diese Reaktion ist irreversibel, da das gebildete Amid gegenüber einem angreifenden Nucleophil aufgrund seiner schlechten Abgangsgruppe nur sehr wenig reaktiv ist. Wäre die Reaktion schnell, so würde sich **34a** anhäufen, was aber im betrachteten Zeitfenster nicht nachzuweisen ist.

Es wird davon ausgegangen, dass das hauptsächliche weitere Nebenprodukt Verbindung **35a** ist, dessen Bildung auch beobachtet wurde. In der Kinetik (Schema 30) zeigt sich, dass sich für die weiteren Reaktionsprodukte ebenfalls ein Plateau bilden. Es handelt sich aber nicht um eine weitere Reaktion im Gleichgewicht mit **3a** und **34b**, da **35a** sich aus **13a** durch Ringöffnung bildet. Somit muss es sich um eine Parallelreaktion zur Bildung von **3a** handeln. Diese muss irreversibel sein, da sich, wenn sie reversibel wäre, das Gleichgewicht schlussendlich zu **3a** und **34b** verschieben würde, da die Bildung von **3a** aus **13a** irreversibel ist. Der Grund warum Ringöffnung zu **34b** reversibel, die Ringöffnung zu **35a** aber irreversibel ist, könnte sein, dass es sich bei Verbindung **35a** um eine Aminosäure handelt. Diese liegt beim vorhandenen neutralen pH als Zwitterion vor.



**Schema 32:** Zwitterionische Struktur und Salzbrücke der Verbindung **35a**

Dieses Zwitterion ist eine  $\beta$ -Aminosäure und kann statt der offenen Struktur einen 6-Ring bilden. Dieser weist eine innermolekulare Salzbrücke (bzw. Wasserstoffbrücke) zwischen der deprotonierten Säure und dem protonierten Amin auf und es wird vermutet, dass die Stabilisierung durch die Salzbrücke dafür sorgt, dass das Molekül **35a** im Gleichgewicht nicht

## B. Hauptteil

mehr für die Rückreaktion und die Eliminierung des Amins zur Verfügung steht. Somit handelt es sich bei der Umsetzung von **13a** zu **35a** um eine konkurrierende Parallelreaktion, was durch das Plateau in der Kinetik untermauert wird.

Zur Bildung von **3a** aus **13a** (dem Eduktverbrauch) kann trotz der konkurrierenden Nebenreaktion eine Reaktionskonstante bestimmt werden, diese beinhaltet nun aber die Geschwindigkeitskonstanten beider Parallelreaktionen und ist deshalb mit 0.0042 /min relativ groß.

Als mögliche Angriffsteilchen für die Ringöffnung, welche Verbindung **40c** ergibt, kommen Methanol, Wasser und Amin in Frage. Methanol scheint nicht für den Angriff verantwortlich zu sein, da es auch in dessen Abwesenheit zur Bildung des Ringöffnungsproduktes kommt. Werden Verbindungen **3a** und **3b** einem methanolischen Phosphatpuffer ausgesetzt, analog zur Durchführung der Kinetiken mit den aminierten Derivaten, so bleibt die ethylierte Verbindung **3b** stabil, während sich in der Kinetik der unsubstituierten Verbindung **3a** langsam ein zweiter Peak entwickelt, welcher auf Ringöffnung zurückführbar ist und Verbindung **40c** entspricht. Somit muss der Angriff höchstwahrscheinlich durch das Wasser erfolgen, da die Ringöffnung in allen drei Systemen stattfindet, wobei in einem das Methanol und im anderen das Amin fehlt. Das Amin ist zwar nucleophiler als das Wasser, allerdings ist seine Konzentration sehr klein. Der Angriff des Amins unter Bildung des ringgeöffneten Amids ist im Spektrum zu sehen, die zugehörige Verbindung **34a** entsteht nach 1500 min zu ca. 5 %.

Die Ethylgruppen haben einen abschirmenden Effekt auf den Lactonring. Dieser sterische Effekt zeigt sich sowohl in der oben besprochenen Kinetik, als auch im Verhalten der *exo*-Methylen-lactone in methanolischer Pufferlösung. Somit sei gezeigt, dass die Ethylgruppen sowohl Ringöffnung, als auch andere Nebenreaktionen unterdrücken, was sie in Hinblick auf die Verwendung als Derivat für die spätere Anbindung an ein Peptid weit besser geeignet erscheinen lässt.

Der +I-Effekt, den die Ethylgruppen auf die alkoholische Gruppe (den Sauerstoff im Ring) des Lactons ausüben, führt zu einer verstärkten Elektronendichte am Sauerstoff im Vergleich zum unsubstituierten Lacton. Dadurch wird die negative Ladung am Sauerstoff, welche entsteht, wenn durch einen Angriff am Lacton der Ring geöffnet wird, stärker, was das ganze System energetisch ungünstiger macht und damit die Ringöffnung verhindert. Auch dadurch, dass der Angriff am geöffneten Ring durch den ehemaligen Lacton-Sauerstoff durch seine

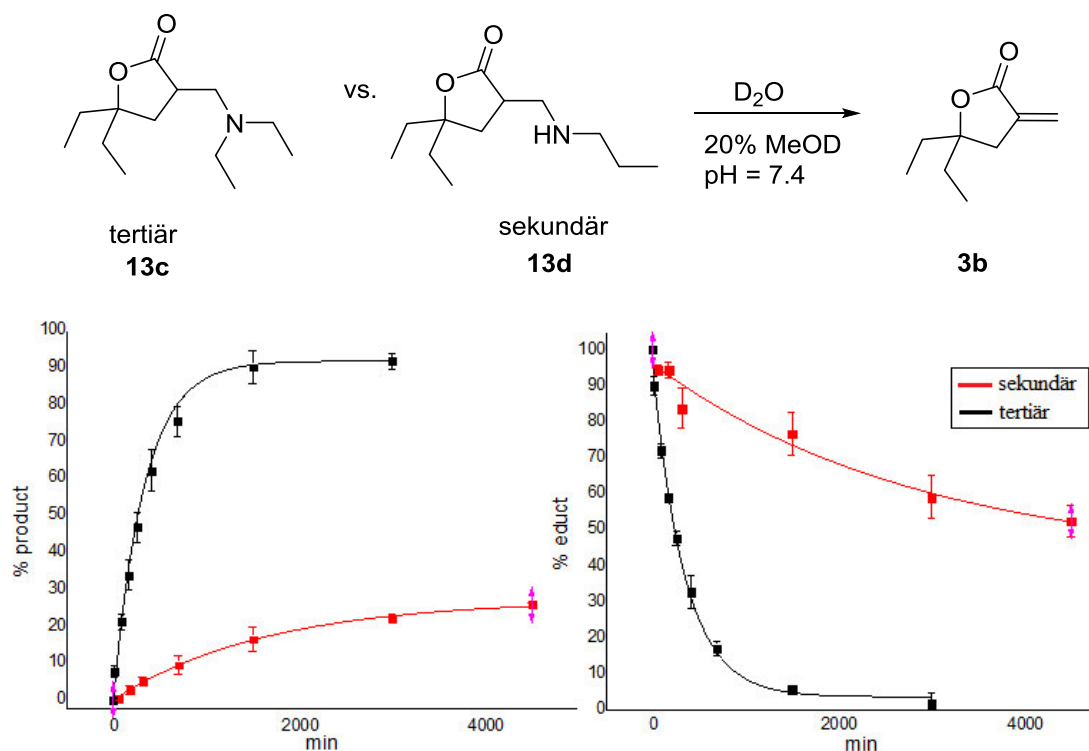
## B. Hauptteil

höhere Nucleophilie erleichtert wird, wird die Ringöffnung verhindert. Somit stehen sterische und elektronische Gründe gegen die Ringöffnung von Verbindung **13c**.

Die Eliminierung und Ringöffnung im Falle des nicht funktionalisierten Lactones **3a** ergeben ein recht komplexes Verhalten des Systems. Es werden viele verschiedene Produkte gebildet, was zu dem Schluss führt, dass **3a** nur bedingt für den Einsatz in biologischen Systemen und als Modellsubstanz für Medikamente mit *exo*-Methylen-lactoneinheiten geeignet ist. Aufgrund dessen wurde im Folgenden das diethylierte Lacton **3b** verwendet.

Das einfachste System zur Bindung eines Medikaments an das Peptid, wie oben ausgeführt, wäre die direkte Bindung an die Seitenkette eines Lysins. Dies führt zu einem sekundären Amin, im Gegensatz zur Bindung an ein sekundäres Amin, welche zu einem tertiären Amin führt.

### 5.3. Vergleich von sekundärem und tertiärem Amin



**Schema 33:** Vergleich von sekundärem und tertiärem Amin (links: Zunahme der Reaktionsprodukte **3b** ; rechts: Abnahme des Edukts **13c/13d**)

Wie in Schema 33 zu sehen, eliminiert das sekundäre Amin **13d** deutlich langsamer als das tertiäre Amin **13c**. Dies ist sowohl für den Verbrauch des Eduktes (**13c**, **13d**), als auch die

## B. Hauptteil

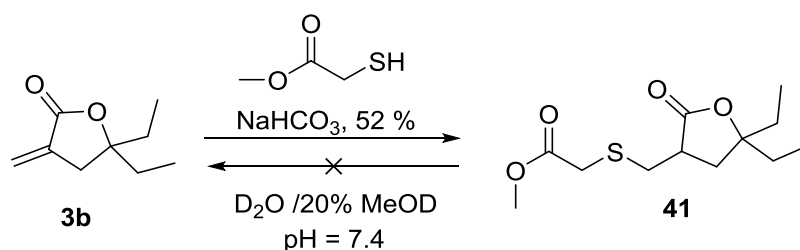
Bildung des Produktes (**3b**) der Fall (Bedingungen: Phosphatpuffer, 0.375 M, pH = 7.4, 20 % MeOD).

Bei Betrachtung der Kinetik des sekundären Amins **13d** zeigt sich, dass sowohl der Eduktverbrauch, als auch die Produktbildung kontinuierlich vorstättengehen, allerdings auch nach 3 Tagen noch nicht vollständig sind, weshalb die Kinetik nach 5000 min abgebrochen wurde.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass für eine schnelle Eliminierung im Körper die Bindung an eine Lysin-Seitenkette nicht ausreicht <sup>[91b]</sup>, sondern dass das Addukt in ein tertiäres Amin umgesetzt werden muss.

### 5.4. aMgBL und ihre Umsetzung mit Thiolen

Eine andere Möglichkeit zur Maskierung der Doppelbindung bzw. der Bindung an ein Peptid besteht in der Funktionalisierung des aMgBL mit Schwefel-Nucleophilen. Das Addukt **41** wurde analog der Amine bezüglich seines Verhaltens in wässriger Pufferlösung NMR-spektrometrisch untersucht, doch es zeigte keine Eliminierung bei pH = 7.4 und pH = 5.0, es wurde kein aMgBL freigesetzt.



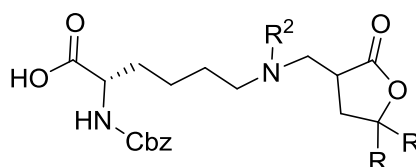
**Schema 34:** Thiolierung von **3b** und Irreversibilität der Reaktion

Aufgrund der Irreversibilität der Reaktionen sind Thiole nicht als Abgangsgruppen einsetzbar und stellen somit keine Alternative zu tertiären Aminen dar.

## 6. Lysinderivate der aMgbL und ihr Eliminierungsverhalten

### 6.1. Kupplung der Lactone an die Aminosäure Lysin

Die *exo*-Methylen- $\gamma$ -butyrolactone können an das Amin der freien Seitenkette eines an der Hauptkette Cbz-geschützten Lysins (**43**) gebunden werden, um sie schlussendlich an ein Peptid zu koppeln. In Schema 35 sind die hergestellten Lactonaddukte dargestellt.



**42a:** R = Et, R<sup>2</sup> = H

**42b:** R = Et, R<sup>2</sup> = Me

**42c:** R = Et, R<sup>2</sup> = Bz

**42d:** R = Et, R<sup>2</sup> = Boc

**42e:** R = Et, R<sup>2</sup> = Ac

**42f:** R = Et, R<sup>2</sup> = O-CO-Ph

**42g:** R = H, R<sup>2</sup> = H

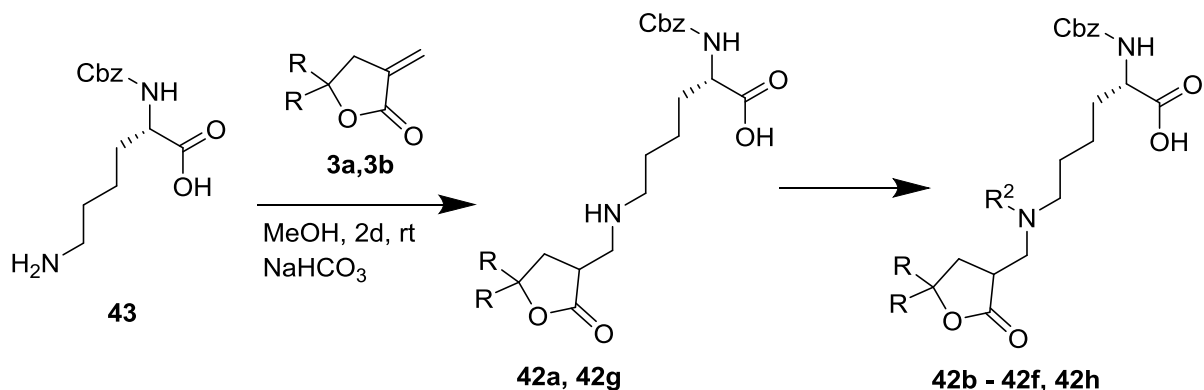
**42h:** R = H, R<sup>2</sup> = Boc

**Schema 35:** Bibliothek an aminierten Lactonen – Teil 2

Als Edukte für die Darstellung der Lysinderivate dienten **3a** und **3b**, sowie Cbz-Lys-OH (**43**). So erfolgte die Umsetzung von *exo*-Methylenlacton **3** mit dem an der Hauptkette Cbz-geschützten Lysin **43** in MeOH und in Anwesenheit von NaHCO<sub>3</sub> als Base.

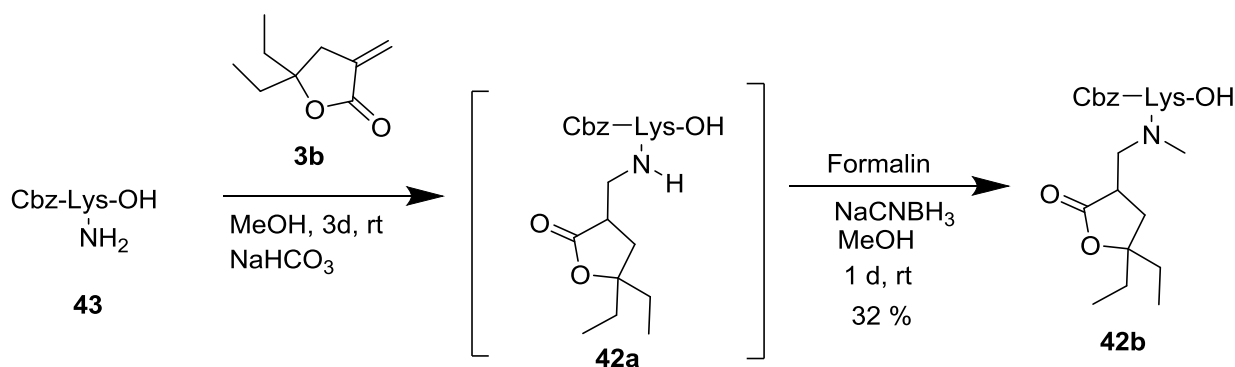
Das entstandene sekundäre Amin (**42a** und **42g**) wurde im darauffolgenden Schritt weiter zu den verschiedenen tertiären Derivaten **42** umgesetzt (Schema 36).

## B. Hauptteil



**Schema 36:** allgemeine Synthese von Verbindungen **42**

Die methylierte Verbindung **42b** (Schema 37) wurde aus **42a** durch reduktive Aminierung mit Formalin und Natriumcyanoborhydrid erhalten. Die Reaktion wurde als one-pot Reaktion durchgeführt. Zunächst wurde aus dem geschützten Lysin **43** mittels Verbindung **3b** und der Base NaHCO<sub>3</sub> in einer Michael-Addition mit MeOH als Lösungsmittel das Addukt **42a** hergestellt. Zu dieser Mischung wurden für eine reduktive Aminierung das Formalin und Natriumcyanoborhydrid gegeben und 1 Tag weiter gerührt. Aufgearbeitet wurde durch direkte Säulenchromatografie der erhaltenen Mischung. Die geringe Ausbeute von 32 % über beide Schritte rührt wahrscheinlich von der Verwendung des Formalins her, welches Wasser enthält. Da die Verbindung aber in Wasser über längere Zeit nicht stabil ist, kann es zur langsamen Abspaltung des *exo*-Methylen-lactones **3b** kommen. Des Weiteren können Verluste bei der Aufarbeitung mittels Säulenchromatografie auftreten.

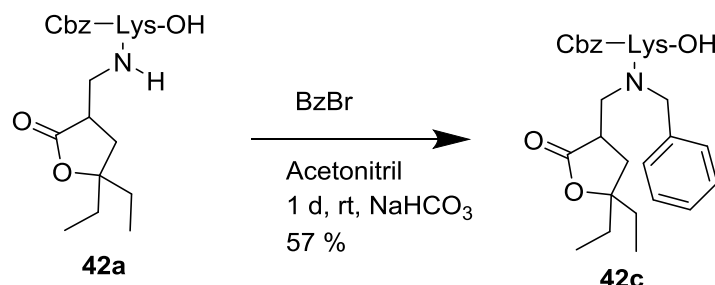


**Schema 37:** Synthese von **42b**

Die benzylierte Verbindung **42c** (Schema 38) entstand durch Umsetzung des sekundären Amins **42a** mit Benzylbromid. Hier wurde auf eine S<sub>N</sub>-Reaktion mit Benzylbromid zurückgegriffen, wobei die verwendete Base Natriumhydrogencarbonat zum Abfangen der

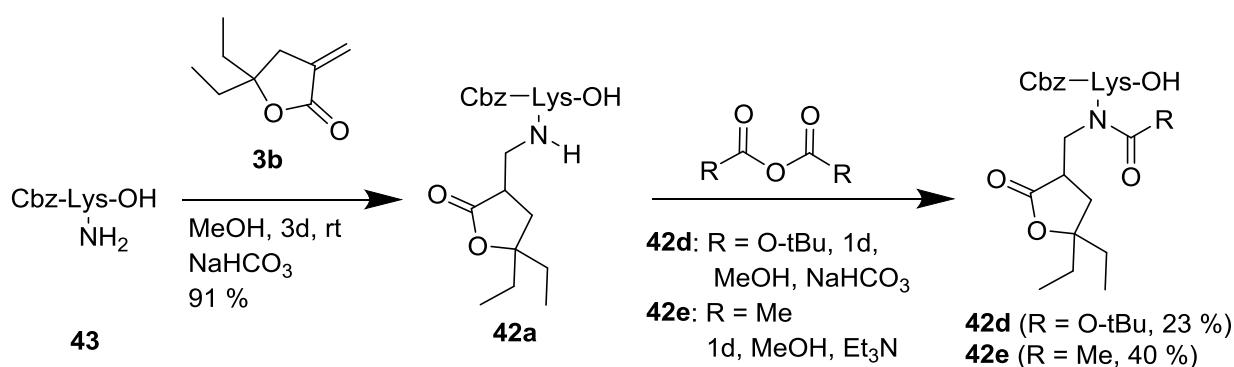
## B. Hauptteil

gebildeten Säure HBr diene. In dieser Reaktion wurde, wie in Schema 38 gezeigt, zunächst Verbindung **42a**, wie in Schema 34 dargestellt, hergestellt. Dieses sekundäre Amin wurde isoliert und darauffolgend mit Benzylbromid und Natriumhydrogencarbonat in MeCN umgesetzt.



**Schema 38:** Synthese von **42c**

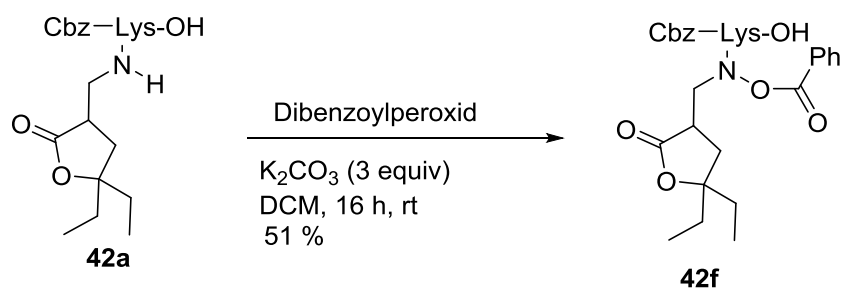
Die Boc-geschützte Verbindung **42d** (Schema 39) wurde durch Umsetzung von **42a** mit Boc-Anhydrid hergestellt, die Reaktion wurde analog der Reaktion für die Herstellung von **42b** als one-pot-Reaktion durchgeführt. Auch hier wurde zunächst **42a** gebildet und zu der erhaltenen Reaktionsmischung Boc-Anhydrid gegeben und 1 Tag gerührt. Direkte Aufreinigung mittels Säulenchromatografie ergab dann das Produkt. Für die Herstellung von **42e** wurde Verbindung **42a** hergestellt und isoliert. Daraufhin wurde **42a** in Methanol mit Triethylamin und Ac<sub>2</sub>O zu **42e** umgesetzt.



**Schema 39:** Synthese von **42d** und **42e**

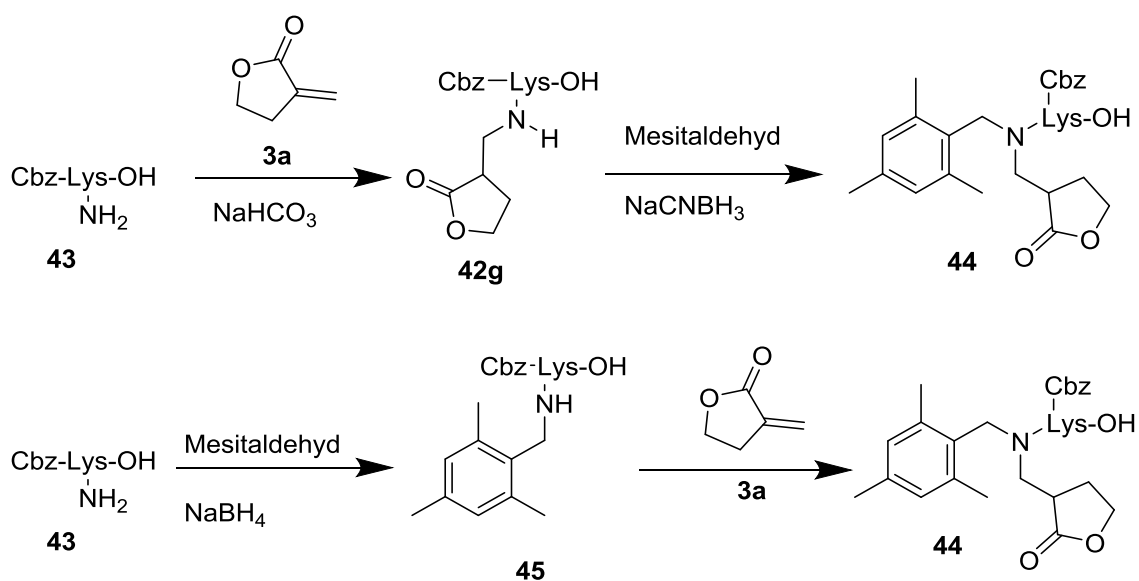
Verbindung **42f** (Schema 40) wurde mit Hilfe von Dibenzoylperoxid dargestellt <sup>[106]</sup>. Dazu wurde zunächst **42a** hergestellt und dieses dann zu **42f** umgesetzt.

## B. Hauptteil



**Schema 40:** Synthese von **42f**

Es wurde versucht, Derivate mit sterisch anspruchsvolleren Resten am Amin-Stickstoff herzustellen, aber der größere sterische Anspruch der einzuführenden Reste verhinderte die Addition durch reduktive Aminierung mit Benzophenon sowie Mesitaldehyd. Bei einer Reaktionsdurchführung analog der Herstellung von Verbindung **42b** konnte eine Mischung an gekuppeltem Produkt und nicht gekuppeltem Edukt erhalten werden, welche aber chromatografisch sehr schwer zu trennen war (Schema 41).



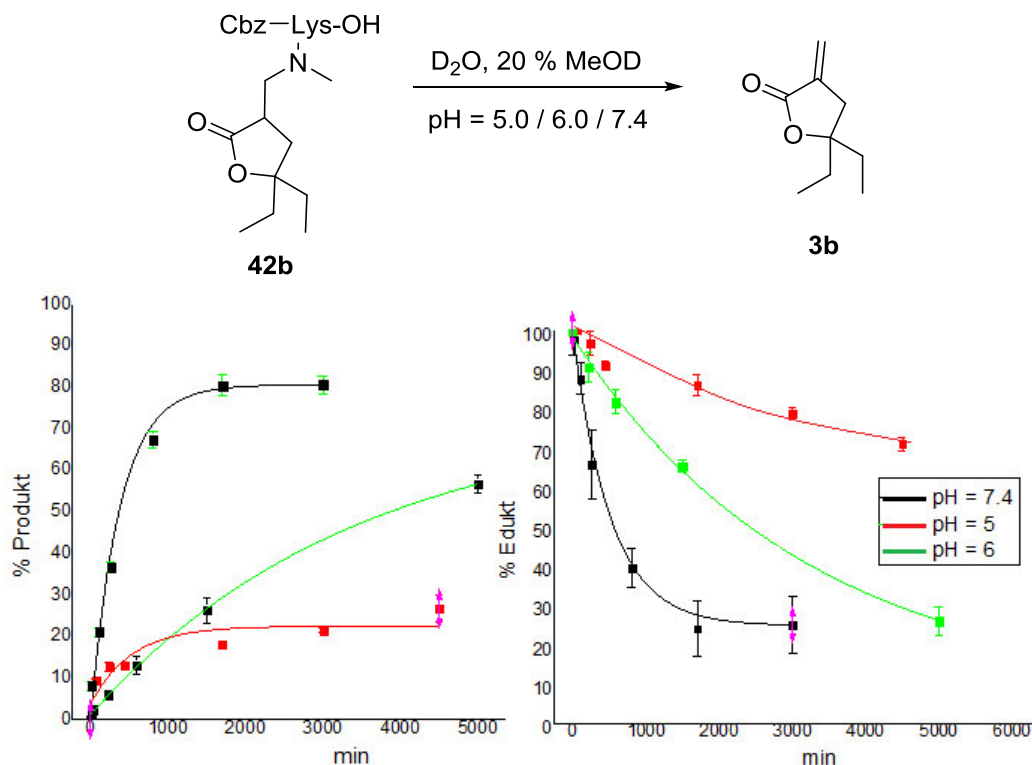
**Schema 41:** versuchte Synthesen von **44**

## 6.2. Effekt des pH

Des Weiteren wurde der Effekt des pH-Wertes auf die Eliminierungsgeschwindigkeit der Michael-Addukte untersucht. Da, wie schon erwähnt, im Zuge der rezeptorvermittelten Endocytose der pH-Wert innerhalb der Endosomen und Lysosomen auf ca. 5 absinkt, ist die Abhängigkeit der Eliminierung vom pH-Wert ein wichtiger Faktor, der berücksichtigt werden muss.

Die *exo*-Methylen-lactone können an ein Cbz-geschütztes Lysin angebracht werden. Das Lysin erlaubt die Anbindung an ein Carrierpeptid via seiner freien Säuregruppe. Wird das Carrierpeptid wässrigem Milieu ausgesetzt, so wandelt sich das Lacton-aMgBL-addukt wieder in einer Retro-Michael-Addition in das *exo*-Methylen-lacton um und dieses kann z.B. in der Zelle seine Wirkung entfalten.

Die Eliminierungsgeschwindigkeit unter Rückbildung der *exo*-Methylen-gruppe ist abhängig vom pH-Wert der Pufferlösung. Als Modelllacton wurde Verbindung **42b** untersucht. Bei pH 7.4 läuft die Eliminierung am schnellsten ab, je saurer der pH jedoch wird, desto mehr sinkt auch die Eliminierungsgeschwindigkeit, sowohl in Bezug auf den Verbrauch des Eduktes **42b** (Schema 42, rechts), als auch der Bildung des aMgBL **3b** (Schema 42, links).



**Schema 42:** Effekt des pH auf die Eliminierung von **42b** zu **3b** (links: Zunahme der Reaktionsprodukte ; rechts: Abnahme des Edukts.)

## B. Hauptteil

pH	Geschwindigkeit Eduktverbrauch (42b)	Geschwindigkeit Produktbildung (3b)
7.4	0.0015 ± 0.0004 /min	0.0014 ± 0.0001 /min
6.0	0.00027 ± 0.00003 /min	0.00017 ± 0.00001 /min
5.0	0.00009 /min	0.00006 /min

**Tabelle 3:** Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von **42b** bei verschiedenen pH-Werten

Die Abhängigkeit vom pH-Wert ist auch in den Geschwindigkeitskonstanten deutlich zu sehen. Zunächst soll der Verbrauch an Edukt **42b** betrachtet werden. Es zeigt sich, dass dieser bei pH 7.4 mit 0.0015 /min am schnellsten abläuft. Um den Faktor 5.6 kleiner ist er bei pH = 6.0 mit 0.00027 /min, bei pH = 5.0 ist die Eliminierung mit 0.00009 /min nochmal um den Faktor 3 langsamer. Es zeigt sich somit, dass der Verbrauch an Edukt deutlich vom pH-Wert abhängt. Je saurer das Medium, desto langsamer ist der Eduktverbrauch, was vermutlich am Reaktionsmechanismus liegt. Die Eliminierung wird eingeleitet durch die Deprotonierung des  $\alpha$ -C-Atoms. Beträgt der pH-Wert des Mediums nun z.B. 5, so wird diese Deprotonierung verlangsamt, und mit ihr die Eliminierung. Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Daniel Svensson <sup>[107]</sup>.

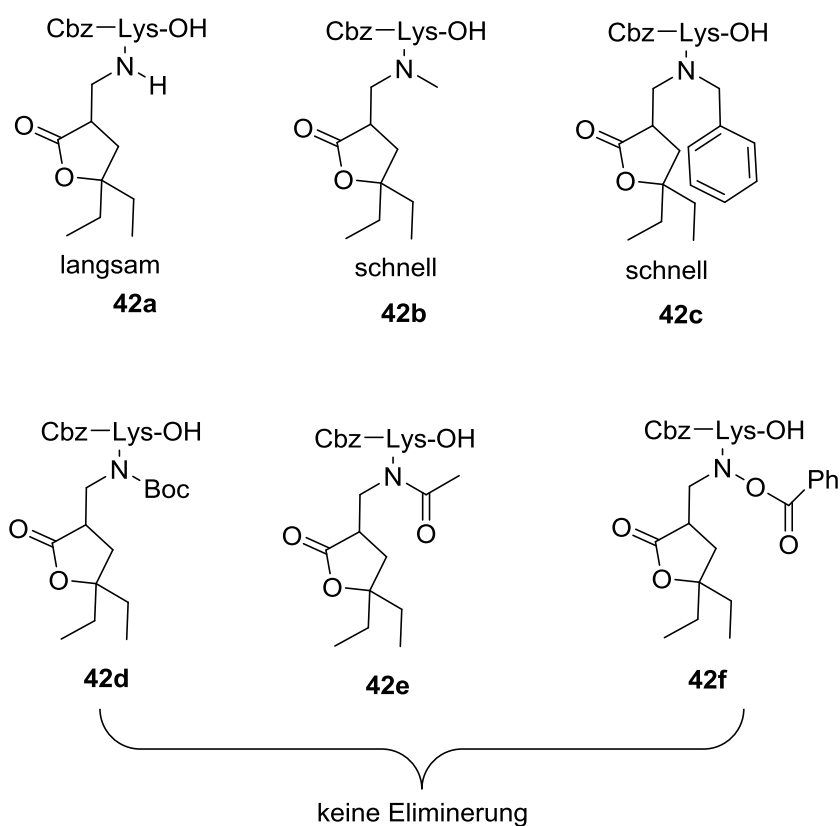
Wird die Bildung des Produkts **3b** betrachtet, so zeigt sich derselbe Trend. Die *exo*-Methylen-doppelbindung bildet sich bei pH = 7.4 mit 0.0014 /min am schnellsten, bei pH = 6 ist sie mit 0.00017 /min um den Faktor 8.2 langsamer. Die Eliminierung bei pH = 5.0 scheint erst relativ schnell zu starten, wird dann aber deutlich langsamer als bei höheren pH –Werten. Eine aussagekräftige Geschwindigkeitskonstante, wie oben durch die Trendlinie der Kinetik erfolgt, konnte nicht bestimmt werden, da diese aus der anfänglichen Geschwindigkeit ermittelt wird. Stattdessen wurde der Gesamtverbrauch an Edukt oder Bildung von Produkt im betrachteten Zeitraum von 4500 min betrachtet und die Konstante durch Teilen beider Werte erhalten.

Es zeigt sich auch, dass Eduktverbrauch und Produktbildung bei allen drei pH-Werten fast gleich schnell verlaufen. Somit findet eine fast vollständige Umwandlung von Edukt **42b** in Produkt **3b** statt. Bei pH = 7.4 sind beide Werte mit 0.0014 /min und 0.0015 /min praktisch gleich schnell, lediglich bei pH = 6.0 sind sie mit 0.00027 /min für den Eduktverbrauch und 0.00017 /min für die Produktbildung um den Faktor 1.6 unterschiedlich.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Eliminierung so schnell wie möglich sein soll, bevor der pH in den Lysosomen zu weit absinkt.

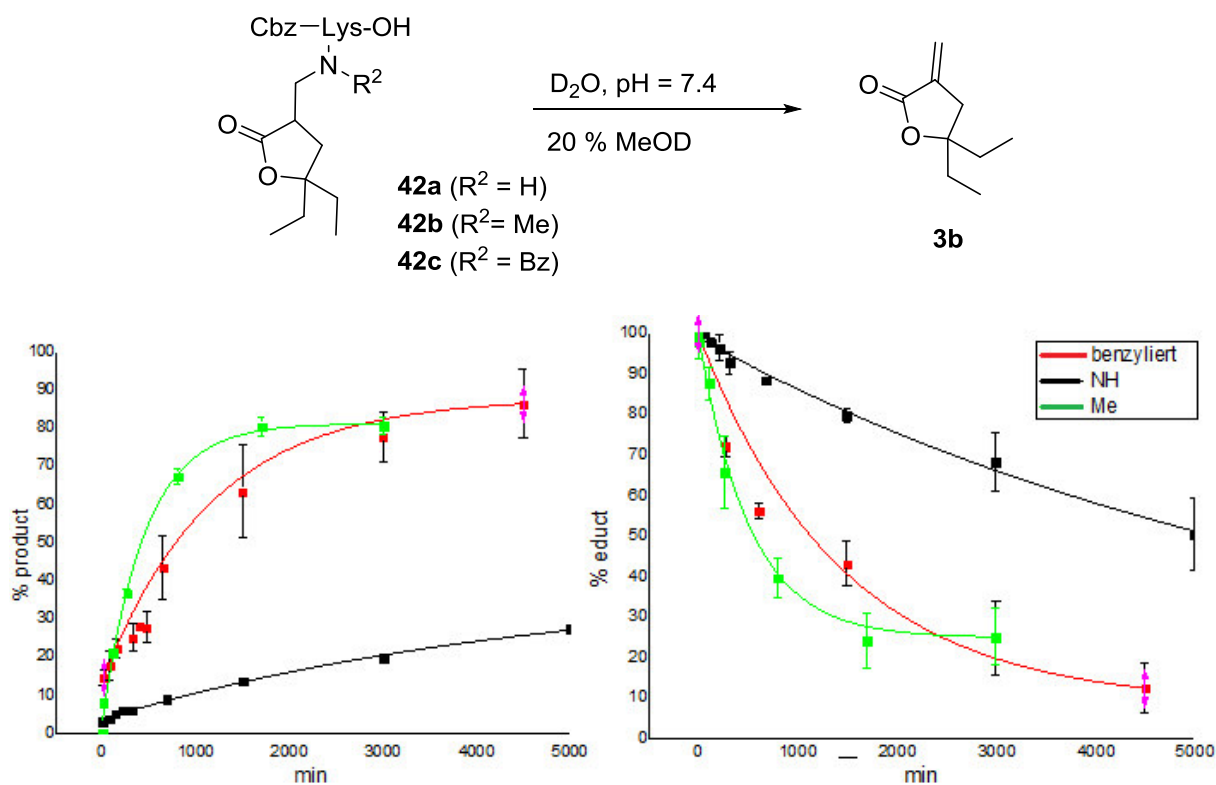
### 6.3. Variierung des Substitutionsmusters am Stickstoff

Es wurden verschiedene Substitutionsmuster am Stickstoff der Lysin-Seitenkette realisiert, welche sich in der Geschwindigkeit der Eliminierung bei Kontakt mit Wasser unterscheiden. Trägt der Amin-Stickstoff neben dem Lacton ein H (**42a**), so eliminiert er im Vergleich zu den anderen untersuchten Verbindungen langsam, methylierte (**42b**) und benzylierte (**42c**) Verbindung eliminieren schneller, während Boc (**42d**) / Acetat (**42e**) und N-O-tragende Verbindung (**42f**) nicht eliminieren.



**Schema 43:** relative Eliminierungsgeschwindigkeit in Wasser

## B. Hauptteil



**Schema 44:** Effekt des Substitutionsmusters am Stickstoff (links: Zunahme der Reaktionsprodukte (**3b**); rechts: Abnahme des Edukts (**42a-42c**)).

	Geschwindigkeit Eduktverbrauch ( <b>42a-42c</b> )	Geschwindigkeit Produktbildung ( <b>3b</b> )
<b>Me (42b)</b>	$0.0015 \pm 0.0004$ /min	$0.0014 \pm 0.0001$ /min
<b>Bz (42c)</b>	$0.0010 \pm 0.0001$ /min	$0.0005 \pm 0.0001$ /min
<b>H (42a)</b>	$0.00011$ /min	$0.00007$ /min

**Tabelle 4:** Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion **42a-42c**

Die Eliminierungsgeschwindigkeit zum Verbrauch von **42a-42c** variiert mit verschiedenem Substituierungsmuster am Lysin, wobei das methylierte Amin **42b** am schnellsten eliminiert. Die Eliminierungsgeschwindigkeit des Eduktes von **42b** beträgt mit  $0.0015$  /min eine um den Faktor 1.5 höhere Rate als Verbindung **42c**. Die Eliminierung des sekundären Amins **42a** ist mit  $0.00011$  /min nochmal um den Faktor 9.1 mal kleiner als die des benzylierten **42c**.

Wird die Bildung des Produktes **3b** betrachtet, so sind die Verhältnisse ähnlich. Das methylierte Amin **42b** eliminiert mit  $0.0014$  /min um den Faktor 2.8 schneller als das

## B. Hauptteil

benzylierte Derivat **42c** mit 0.0005 /min, während die unsubstituierte Substanz **42a** nochmal um den Faktor 7.1 langsamer eliminiert als die benzylierte Verbindung **42c**.

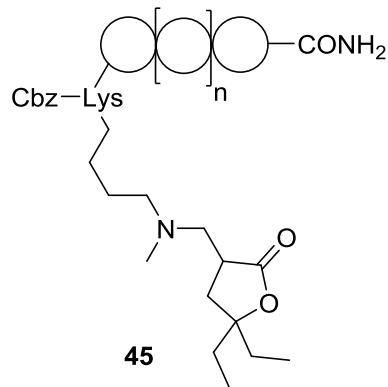
Im Falle des methylierten Lysins **42b** sind nach 2000 min 80 % Edukt verbraucht und 80 % Produkt gebildet, folglich finden keine Nebenreaktionen statt. Das mit einem Wasserstoff substituierte Lysin **42a** eliminiert viel langsamer, sowohl in Bezug auf den Verbrauch an Edukt **42a**, als auch die Bildung an Produkt **3b**, bildet aber ebenfalls fast keine Nebenprodukte. Die benzylierte Verbindung **37c** eliminiert, auch aufgrund ihrer schlechteren Löslichkeit in Wasser, etwas langsamer als die methylierte Substanz **37b**. Sie erreicht aber nach 2 Tagen die gleiche Menge an gebildetem Produkt bzw. verbrauchtem Edukt. Das benzylierte Derivat **42c** ist allerdings, aufgrund seiner langsameren Eliminierung und schlechteren Wasserlöslichkeit, schlechter zu verwenden als das methylierte Derivat **42b**.

Elektronenziehende Gruppen machen die Eliminierung einfacher. Boc-geschütztes (**42d**) oder acetyliertes (**42e**) Lysin eliminiert nicht, da es sich um ein Amid statt einem Amin handelt. Die elektronenreichste Verbindung, bei der der Sauerstoff direkt an den Stickstoff gebunden ist (**42f**), ist so elektronenreich, dass Deprotonierung, die der erste Schritt der Retro-Michael-Addition ist, verhindert wird, und die ganze Eliminierung unmöglich macht.

Dies zeigt, dass die methylierte Verbindung (**42b**) für die Eliminierung am besten geeignet ist, v.a. da es im Gegensatz beispielsweise zum benzylierten Derivat **42c** auch eine ausreichende Wasserlöslichkeit zeigt.

## 7. Festphasenpeptidsynthese

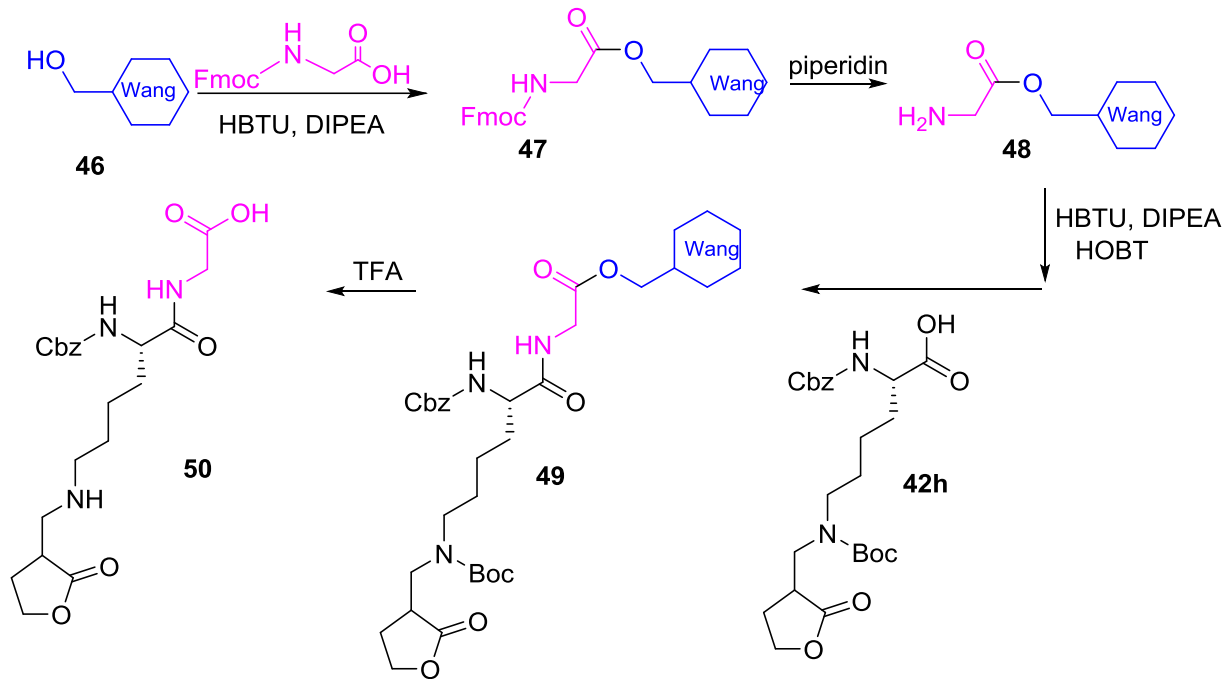
Ziel dieser Studie war, das beladene Lysin an den N-Terminus der Aminosäurekette eines Carrierpeptids zu binden (siehe Schema 45):



**Schema 45:** angestrebte Kupplung von **42b** an den N-Terminus eines CPP's (die Kreise entsprechen den Aminosäuren des Carrierpeptids)

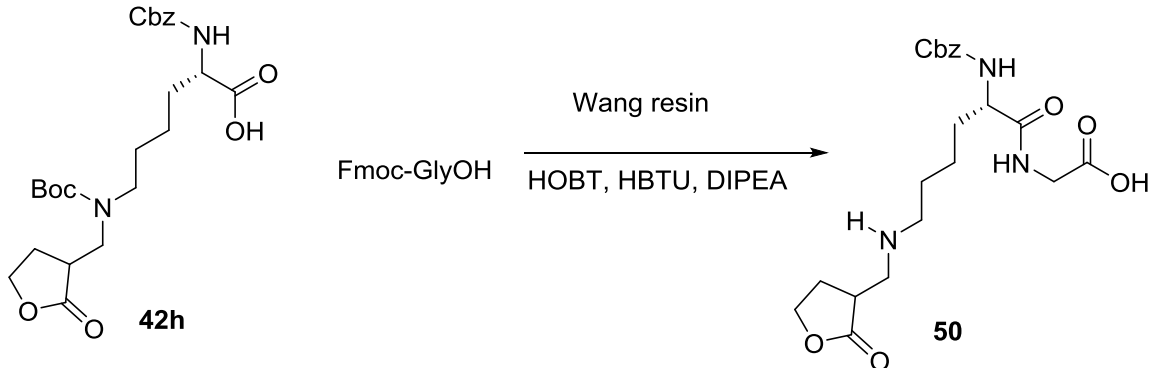
Um dies zu imitieren, erfolgte die Anbindung eines Wang-Harzes (**46**) via Fmoc-Strategie an ein Fmoc-Gly-OH (siehe Schema 46). Das beladene Harz **47** wurde mittels Piperidin entschützt (ergibt **48**) und an ein Boc-geschütztes Cbz-Lys-aMgBL-Addukt (**42h**) gebunden. Nach der Abspaltung vom Harz mittels TFA wurde ein sekundäres Amin (**50**) erhalten, welches an den „N-Terminus“ eines Peptids gebunden war. Nach Abspaltung vom Harz trug der C-Terminus eine Säuregruppe (Verbindung **50**), auch die Boc-Gruppe war abgespalten. Schema 46 zeigt die Vorgehensweise am Beispiel der Wang-Harz-Reaktion.<sup>[116]</sup>

## B. Hauptteil



**Schema 46:** Bindung von **42h** an Glycin mittels SPPS im Detail

Schema 47 fasst diese SPPS-Kupplung zusammen:



Kupplung: HOBT, HBTU, Aminosäure, DIPEA

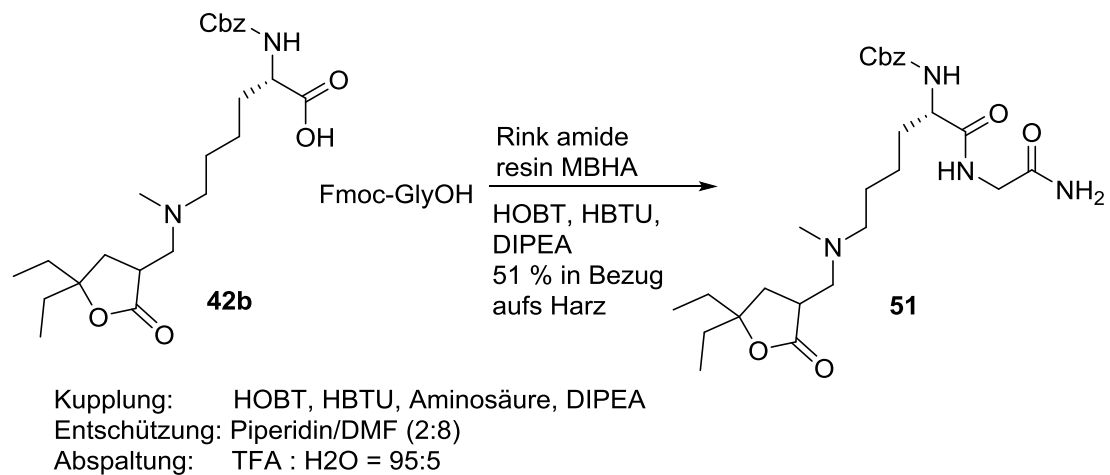
Entschützung: Piperidin/DMF (2:8)

Abspaltung: TFA : H<sub>2</sub>O = 95:5

**Schema 47:** SPPS mit **42h** an Glycin mit Wang-Harz

Viele CPP sind am C-Terminus aminiert. Um dies zu simulieren wurde die methylierte Lysin-Verbindung **42b** auf gleiche Weise gekuppelt, wobei diesmal aber ein Rink-Harz verwendet wurde, was nach Abspaltung vom Harz ein Amid (**51**) am C-Terminus ergab.

## B. Hauptteil



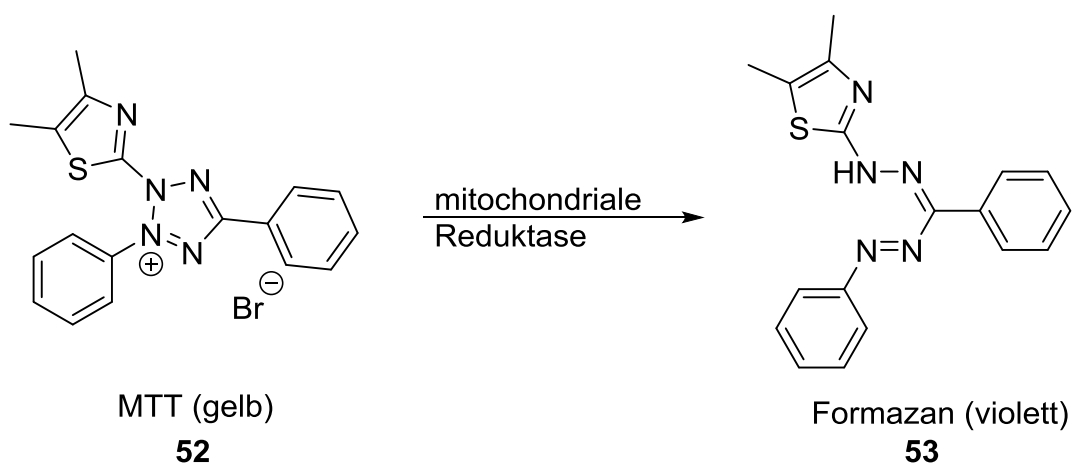
**Schema 48:** SPPS mit Rink-Harz

Die Ausbeute betrug, nach Säulen-Chromatografie, 51 % in Bezug auf das verwendete Harz. Im Falle eines echten Peptids müsste eine HPLC statt der Säulenchromatografie durchgeführt werden, um das Peptid zu säubern. Es zeigte sich, dass sowohl die nicht substituierte Lysin-Addukt-Seitenkette gekuppelt werden konnte, indem das Boc-geschützte Edukt **42h** verwendet wurde (Schema 47), als auch die methylierte, wenn die methylierte Verbindung **42b** (Schema 48) verwendet wurde.

## 8. Cytotoxizität der aminierten Lactone

### 8.1. Durchführung der Zytotoxizitätsstudien

Die Zytotoxizität wurde *in vitro* gemessen. Als Zellen wurden RAW264.7 Makrophagen verwendet. Sie wurden in RPMI-Medium gezüchtet, welches 10 % (v/v) Hitze-deaktiviertes Kalb-Serum und 2mM Glutamin enthielt. Die Makrophagen wurden bei 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft kultiviert und die Zytotoxizität per MTT-Assay bestimmt. Dieser Assay eignet sich zur Bestimmung der metabolischen Aktivität. Es wird die metabolische Funktion der Mitochondrien gemessen, da diese in der Lage sind, den gelben Farbstoff MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) (**52**) in einen violetten Farbstoff Formazan (**53**) mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen umzuwandeln <sup>[108]</sup>.



**Schema 49:** Farbreaktion des MTT Assays

Bei einer Inkubationszeit von 24 h wurden  $5 \times 10^3$  Zellen pro Well ausgesät, bei 48 h Inkubationszeit waren es  $2.5 \times 10^3$ /well.

Die zu messenden Proben wurden als 1 M Lösungen in DMSO hergestellt und bei -20 °C gelagert. Test-Konzentrationen wurden frisch durch Verdünnen der Stammlösungen im Medium hergestellt, wobei die Endkonzentration an DMSO  $\leq 0.1\%$  war.

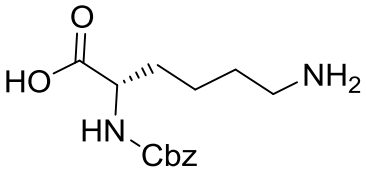
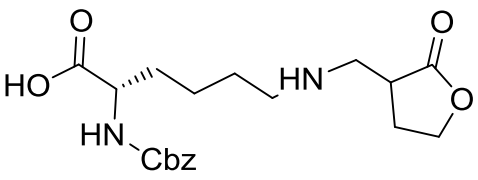
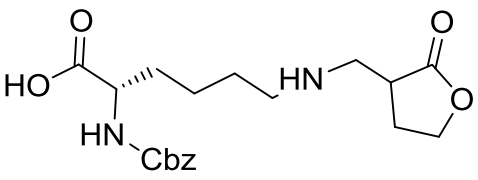
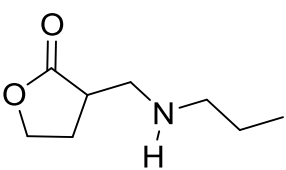
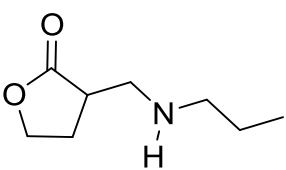
Die Zellen wurden auf 96-Well-Platten mit der gewünschten Menge aufgebracht und für 24 h inkubiert. Die zu messenden Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und für 20 h (24 h Inkubationszeit) bzw. 44 h (48 h Inkubationszeit) inkubiert. Das Gesamtvolumen des Assays betrug 100  $\mu$ L. 10  $\mu$ l einer Lösung von 4 mg/ml MTT in PBS wurde zu jedem Well hinzugegeben. Nach 4 h wurde das Kulturmedium entfernt und 100  $\mu$ L

## B. Hauptteil

einer 10 % SDS-Lösung in Wasser wurde zu jedem Well hinzugegeben, um das Formazan, welches nicht wasserlöslich ist, zu lösen. Die Absorbanz wurde bei 560 nm in einem Spektrometer (Multiskan Spectrum, Thermo) nach 24 h Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur gemessen. Jeder Test wurde dreifach durchgeführt und alle Experimente mehrfach durchgeführt. IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit Hilfe der Software ED50plus v1.0, (M.H. Vargas, Mexico) bestimmt und die Messungen dankenswerterweise am Arbeitskreis von PD Dr. Sabine Amslinger, Universität Regensburg, durchgeführt (Dr. Hannelore Rücker, Dita Fritsch, Dr. Nafisah Al-Rifai).

### 8.2. Vergleich der Zytotoxizitäten der aminierten Lactone

Der Trend, dass sekundäre Amine langsamer eliminieren als tertiäre, der bei den Kinetiken beobachtet wurde, ist im Einklang mit den Zytotoxizitätsstudien, welche für einige Verbindungen durchgeführt wurden. (der Fehler entspricht der Standardabweichung)

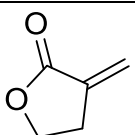
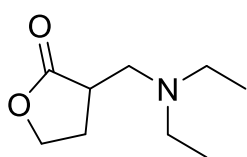
Verbindungsnummer	Struktur	Inkubationszeit [h]	IC <sub>50</sub> [μM]
Cbz-Lys-OH		48	> 1000
42g		24	> 1000
42g		48	> 1000
13b		24	> 1000
13b		48	267 ± 54

**Tabelle 5:** Zytotoxizitäten sekundärer Aminolactone bei verschiedenen Inkubationszeiten

Bei 24 h Inkubationszeit zeigten sekundäre Amine (**13b**, **42g**) mit aMgBL IC<sub>50</sub>-Werte von > 1000 μM, was bedeutet dass sie nicht zytotoxisch sind. Bei längerer Inkubationszeit von 48 h blieb das Lysin-Derivat **42g** nicht zytotoxisch, während das Propylamin-Addukt **13b** schwache Zytotoxizität zeigte. Der Unterschied zwischen **42g** und **13b** könnte an der

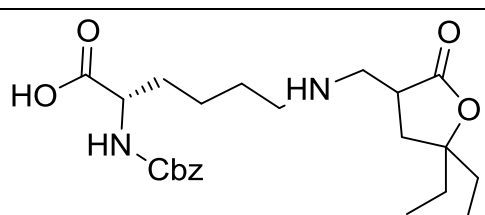
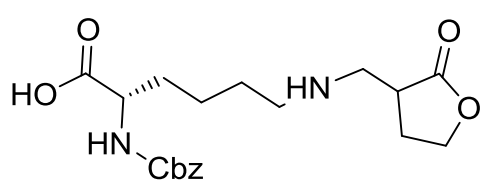
## B. Hauptteil

kleineren und lipophileren Natur des Propylamin-Addukts verglichen mit dem Lysin-Addukt, liegen. Die schwache Zytotoxizität nach längerer Inkubationszeit könnte das Ergebnis einer in situ Methylierung sein, z.B. durch Methylierungsagenzien wie S-Adenosyl-methionin, was ein aktives tertiäres Amin ergeben würde.

Verbindungsnummer	Struktur	Inkubationszeit [h]	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]
<b>3a</b>		24	$236 \pm 14$
<b>13a</b>		24	$315 \pm 22$

**Tabelle 6:** Cytotoxizitäten nicht 5-substituierter Lactone und Aminlactone

Das Stamm-aMgBL **3a** zeigt eine Zytotoxizität von  $236 \pm 14 \mu\text{M}$ , während das Aminoaddukt **13a** etwas weniger zytotoxisch ist ( $315 \pm 22 \mu\text{M}$ ). Die Freisetzung des aktiven aMgBL aus **13a** nimmt etwas Zeit in Anspruch, während **3a** gleich aktiv ist, wodurch dessen Aktivität etwas erhöht ist.

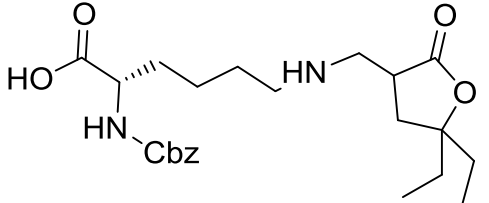
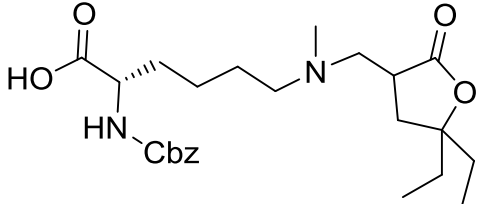
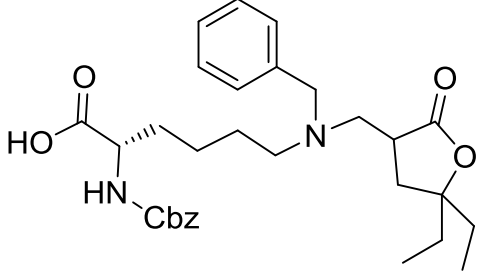
Verbindungsnummer	Struktur	Inkubationszeit [h]	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]
<b>42a</b>		24	$516 \pm 122$
<b>42g</b>		24	> 1000

**Tabelle 7:** Cytotoxizitäten sekundärer Lysin-derivate mit und ohne Funktionalisierung an der 5-Position des Lactons.

Die am Stickstoff nicht substituierte Verbindung (**42a**) (Tabelle 7) zeigt schwache Zytotoxizität, was mit seiner langsamen Eliminierung und schwacher Lipophilie erklärt

## B. Hauptteil

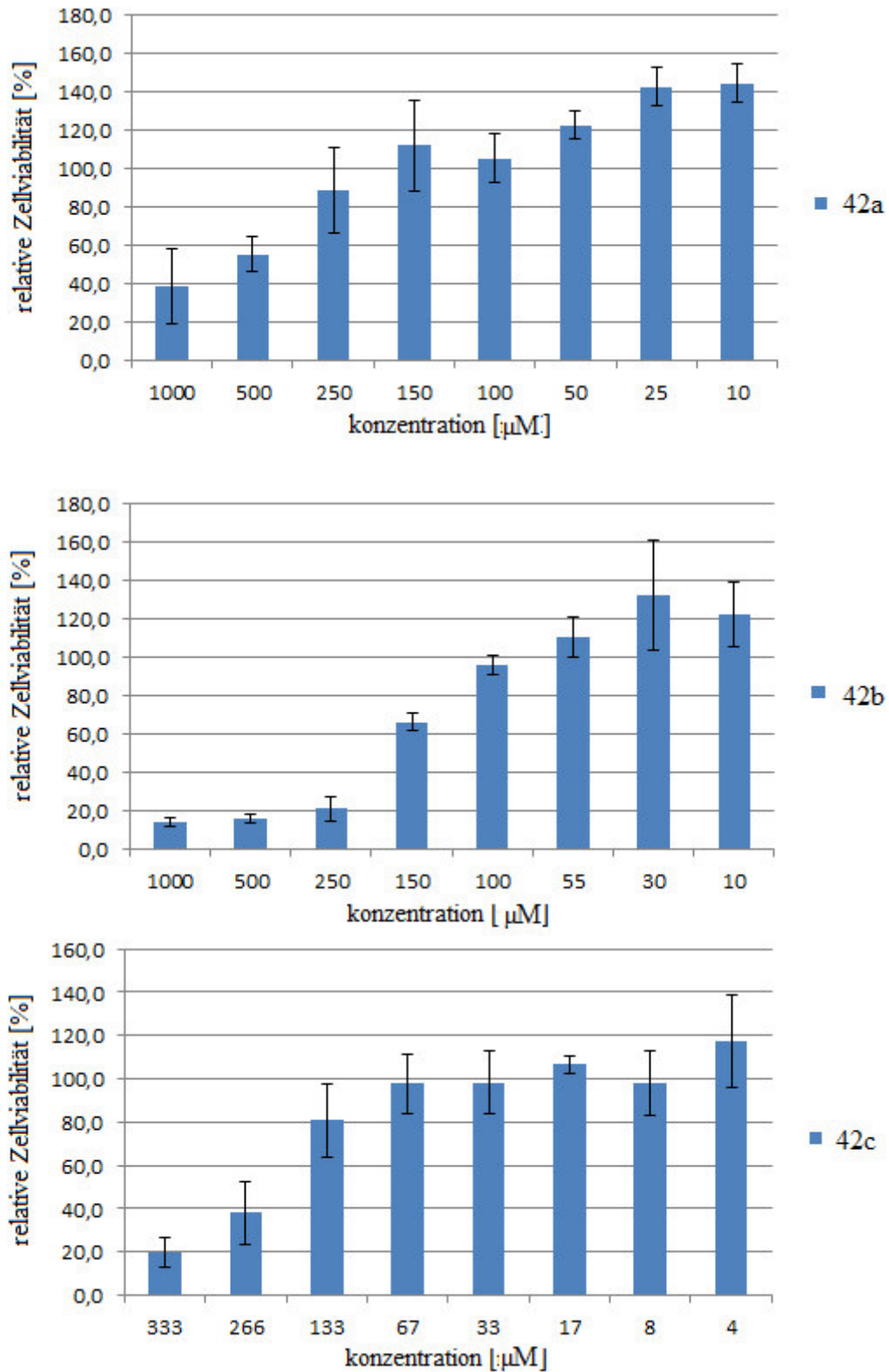
werden kann. Im Gegensatz zu Verbindung **42g** zeigt es sehr schwache Zytotoxizität da es langsam eliminiert, während **42g** überhaupt nicht eliminiert und eine Zytotoxizität von  $> 1000 \mu\text{M}$  zeigt.

Verbindungsnummer	Struktur	Inkubationszeit [h]	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]
<b>42a</b>		24	$516 \pm 122$
<b>42b</b>		24	$340 \pm 74$
<b>42c</b>		24	$195 \pm 54$

**Tabelle 8:** Cytotoxizitäten der am Stickstoff verschieden substituierten Lysin-Lacton-Addukte

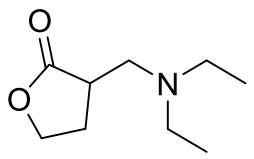
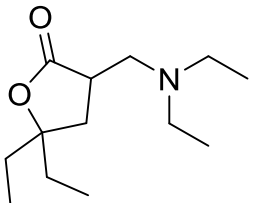
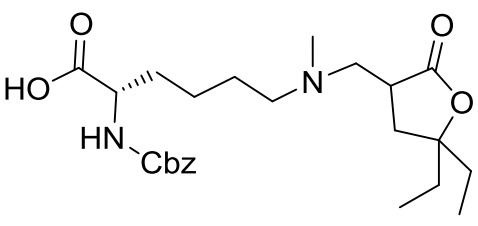
Die methylierten (**42b**) und benzylierten (**42c**) Verbindungen sind zytotoxischer, wobei die benzylierte Verbindung aktiver ist. Dies kann der besseren Durchlässigkeit durch die Zellmembranen aufgrund der höheren Lipophilie zugeschrieben werden, sichtbar auch an seiner schlechteren Wasserlöslichkeit.

## B. Hauptteil



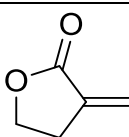
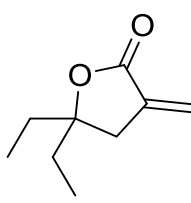
**Schema 50:** Bestimmungskurven der Cytotoxizität von 42a-42c

B. Hauptteil

Verbindungsnummer	Struktur	Inkubationszeit [h]	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]
<b>13a</b>		24	315 $\pm$ 22
<b>13c</b>		24	310 $\pm$ 123
<b>42b</b>		24	340 $\pm$ 74

**Tabelle 9:** Cytotoxizitäten diethylierter tertiärer Aminolactone

Die tertiären Amine (**13a**, **13c**, **42b**) in Tabelle 9 zeigen alle ungefähr die gleiche Zytotoxizität von ca. 320  $\mu\text{M}$ .

Verbindungsnummer	Struktur	Inkubationszeit [h]	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]
<b>3a</b>		24	236 $\pm$ 14
<b>3b</b>		24	75 $\pm$ 34

**Tabelle 10:** Cytotoxizitäten der *exo*-Methylen-lactone

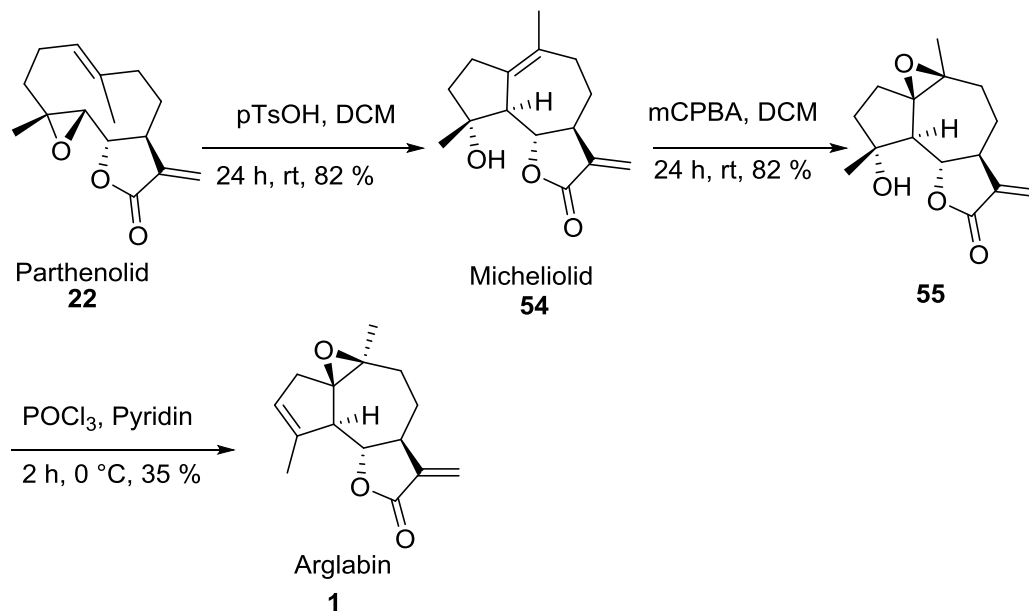
Die Verbindung **3a** zeigt mit 236  $\mu\text{M}$  eine Cytotoxizität im mittleren Bereich. Verbindung **3b** hingegen ist stärker zytotoxisch. Dies lässt sich mit einer höheren Lipophilie aufgrund der niedrigeren Polarität durch die Ethylgruppen erklären. Somit wird diese Verbindung leichter von den Zellen aufgenommen und ist dadurch zytotoxischer.

## 9. Arglabin als Beispiel eines aMgBL

### 9.1. Semisyntese von Arglabin

Um die gewonnenen Erkenntnisse im realen System zu untersuchen, wurde als aMgBL Arglabin **1** gewählt, welches hergestellt und dann an eine Lysinseitenkette gebunden werden sollte.

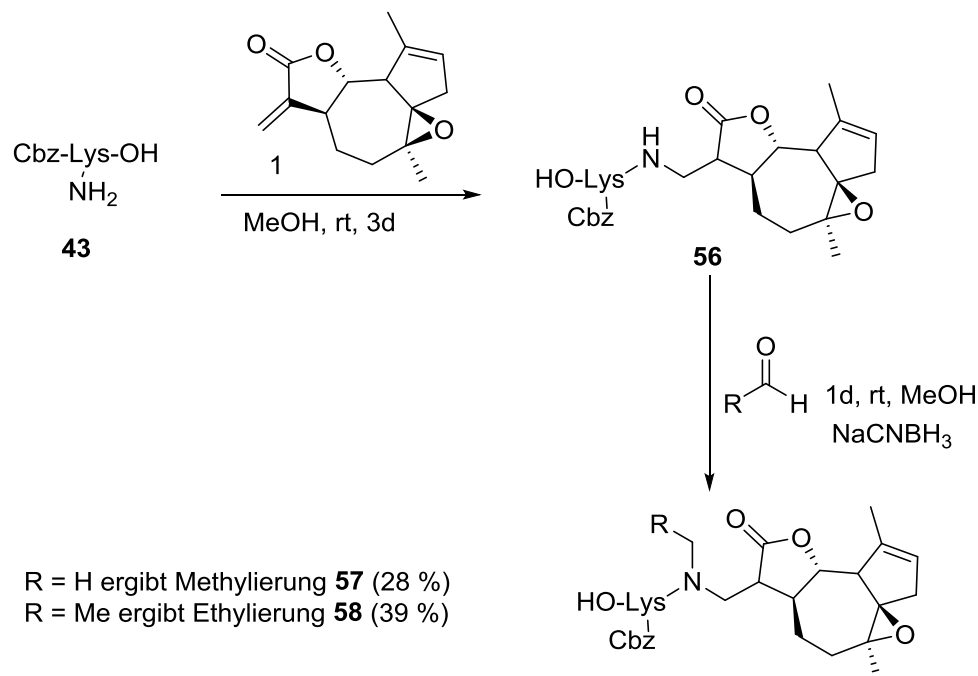
Die Synthese des Arglabins **1** erfolgte nach einer Semisyntese von Chen <sup>[109]</sup> et al. ausgehend von Parthenolid **22**, welches mittels Toluolsulfonsäure in Micheliolid **54** umgelagert wurde. Epoxidierung der Doppelbindung im Ring mit mCPBA und Eliminierung der alkoholischen Gruppe mittels POCl<sub>3</sub> und Pyridin ergab Arglabin **1** mit 24 % Ausbeute über alle drei Schritte.



**Schema 51:** Synthese von Arglabin nach Chen et al

## 9.2. Arglabin als aMgBL und seine Bindung an Cbz-Lys-OH (43)

Das erhaltene Arglabin **1** wurde an die Seitenkette des geschützten Lysins gebunden und dieses Addukt durch reduktive Aminierung in ein tertiäres Amin (**57** oder **58**) überführt.



**Schema 52:** Kupplung von Arglabin **1** an Cbz-Lys-OH (**43**) und Überführung in ein tertiäres Amin (**57, 58**)

Bei der Methylierung des Amins **56** wurde Formalinlösung eingesetzt. Diese enthält erhebliche Mengen an Wasser, welches die Eliminierung des Lactons auslösen könnte. Wurde dagegen ethyliert, so war die Verwendung von wasserfreiem Acetaldehyd möglich. Tatsächlich sind die Ausbeute und die Reinheit im Falle der Ethylierung (39 %) größer als bei der Methylierung (28%). Im Falle der einfachen aMgBL ist die Verwendung von Formalin kein Problem, da diese in großen Mengen verfügbar sind, wird aber das teurere Arglabin verwendet, so ist die Ethylierung vorzuziehen.

## 10. Bindung des Modellsystems 42b an ein Peptid

Der Precursor **42b** wurde von Dennis Worm aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beck-Sickinger von der Universität Leipzig an ein modifiziertes Neuropeptid Y gekuppelt. Dieses hat die Struktur [F7,P34]-NPY<sup>[110]</sup>, d.h. das ursprüngliche NPY wurde so modifiziert, dass an siebter Stelle ein Phenylalanin und an Position 34 ein Prolin in der Aminosäureseitenkette vorhanden ist.

pNPY:                    YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRQRY

[F7,P34]-NPY:        YPSKPD**F**PGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITR**P**RY

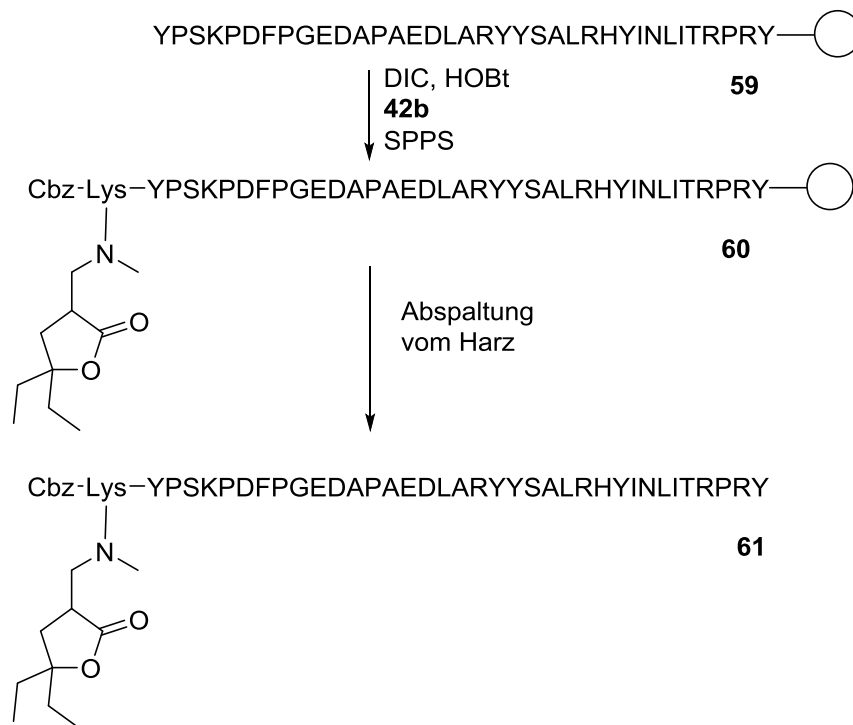
**Schema 53:** natives NPY und das verwendete Derivat [F7,P34]-NPY

Dieses Peptid ist ein selektiver Ligand für den Y1-Rezeptor<sup>[110]</sup>, der in Brustkrebstumoren überexprimiert wird<sup>[110]</sup>. Die Bindung des Peptids an den Rezeptor führt zur Aktivierung des Rezeptors und nachfolgend wird der aktivierte Rezeptor "abgeschaltet", indem der Peptid-Rezeptor-Komplex in die Zelle durch Internalisierung aufgenommen wird<sup>[111]</sup>. Durch diesen Vorgang wird die an das Peptid gebundene Fracht selektiv in Krebszellen aufgenommen.

Der Precursor wurde auf zwei verschiedene Weisen an das Peptid gebunden. Dazu wurde Festphasenpeptidsynthese mittels Fmoc-Strategie verwendet, unter Bindung an ein Rink-Amid-Harz.

Erstens wurde es direkt an den N-Terminus der Aminosäuresequenz gebunden, andererseits mittels seiner Säuregruppe an die Seitenkette des an vierter Stelle zu findenden Lysins (Einbuchstabencode K). Für die erste Variante wurde **42b** mit seiner Säuregruppe in einer Standard-Peptidkupplung mittels DIC (Diisopropylcarbodiimid) und HOBt über Nacht an den N-Terminus des verwendeten [F7,P34]-NPY gebunden .

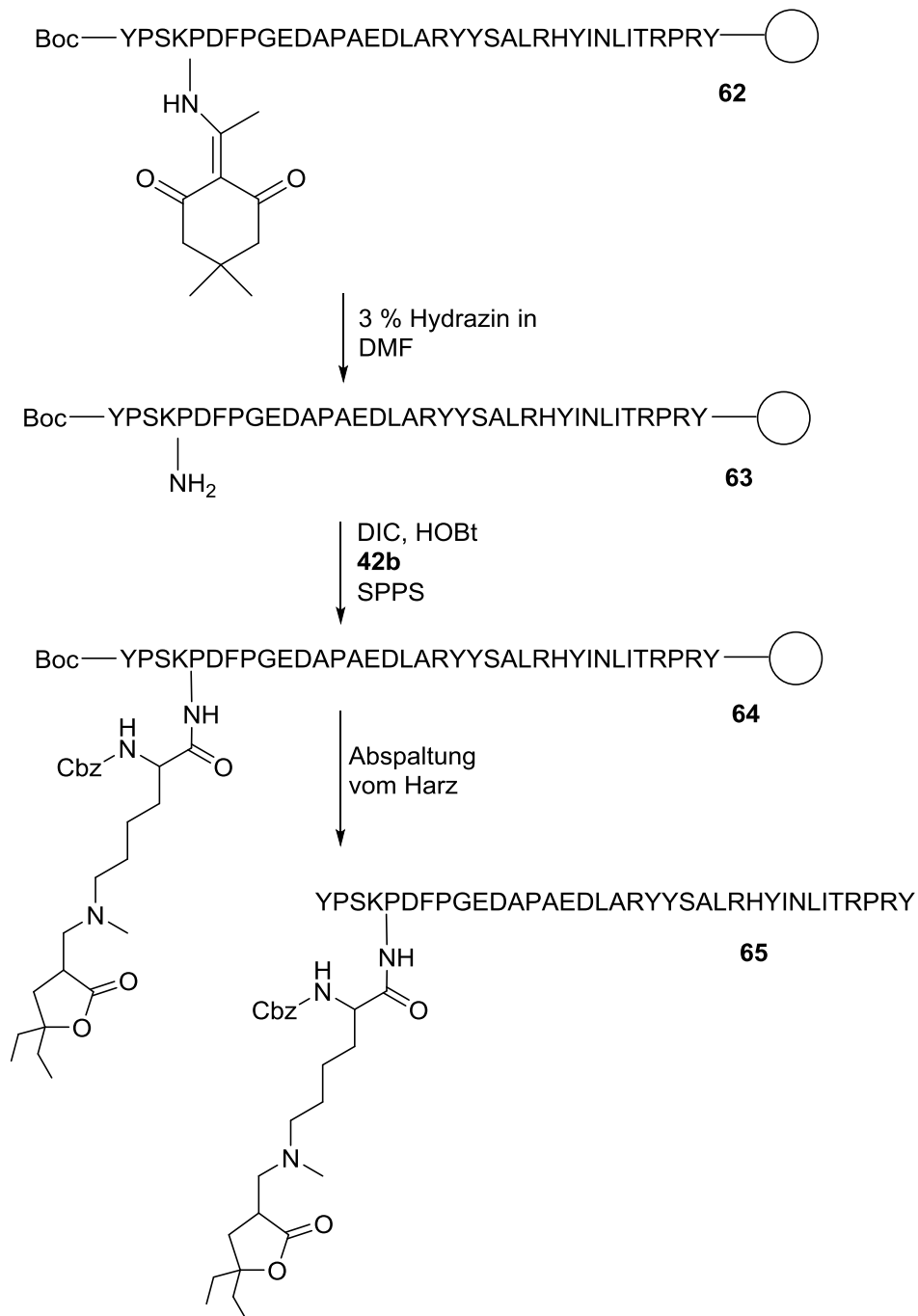
## B. Hauptteil



**Schema 54:** Anbindung von **42b** an den N-Terminus des Peptids [F7,P34]-NPY

Für die zweite Variante trug das Peptid an seinem N-Terminus eine Boc-Gruppe und an der Seitenkette des vierten Lysins eine Dde-Schutzgruppe. Diese wurde orthogonal abgespalten und die nun entstehende Lysin-Seitenkette mit **42b** funktionalisiert.

## B. Hauptteil

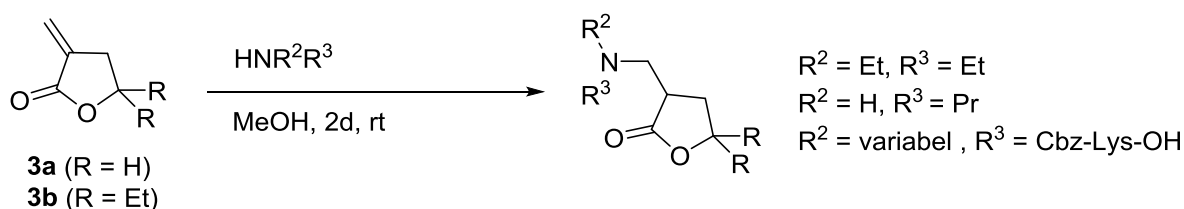


**Schema 55:** Variante 2, Bindung von **42b** an das Lysin-4 des [F7,P34]-NPY mittels SPPS

Beide Funktionalisierungen konnten erfolgreich durchgeführt werden. Die Bestimmung der Cytotoxizität und Aufnahme in die Zelle wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beck-Sickinger von Dennis Worm durchgeführt und steht noch aus.

## 11. Zusammenfassung

Verschiedene Amin-substituierte  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -Butyrolactone wurden synthetisiert. Als Amine dienten sowohl einfache Amine (Diethylamin, Propylamin), als auch die Seitenkette eines an der Hauptkette geschützten Lysins.



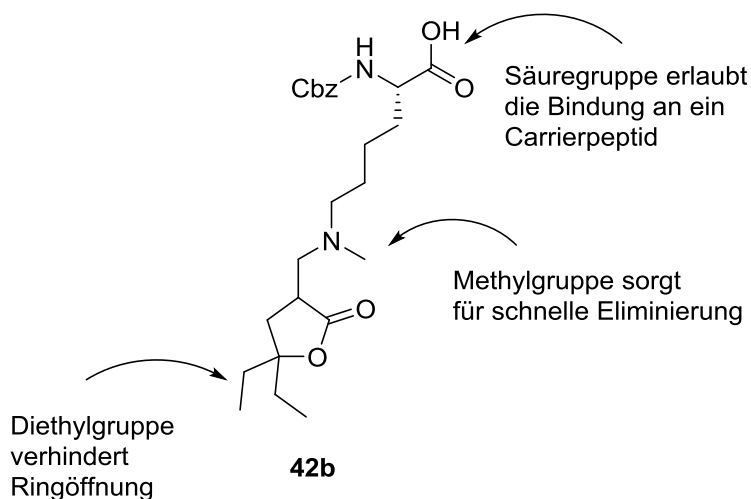
**Schema 56:** Darstellung der aminierten Lactone

Ihr Eliminierungsverhalten in einer Retro-Michael-Addition unter verschiedenen Bedingungen in wässrigem Medium wurde untersucht. So stellte sich die Substitution an der Position 5 des Lactonrings als notwendig heraus, um Nebenreaktionen im Zuge der Eliminierung, wie eine Ringöffnung, zu verhindern.

Des Weiteren war ein tertiäres Amin nötig, um eine schnelle bzw. überhaupt eine Retro-Michael-Addition in wässriger Pufferlösung zu erreichen. Auch fand diese Reaktion in neutralem Medium (pH = 7.4) schneller statt, als bei saurem pH (6.0 und 5.0).

Wurde das *exo*-Methylen-Lacton an die Lysinseitenkette gebunden, so stellte sich **42b** als das geeignetste System heraus, um das Konjugat an ein Carrierpeptid zu binden, da es eine freie Säuregruppe für die Anbindung an das Peptid enthält, ein tertiäres Amin für eine schnelle Retro-Michael-Addition besitzt und ein an der Position 5 substituiertes Lacton trägt, welches so gut wie keine Nebenreaktionen eingeht.

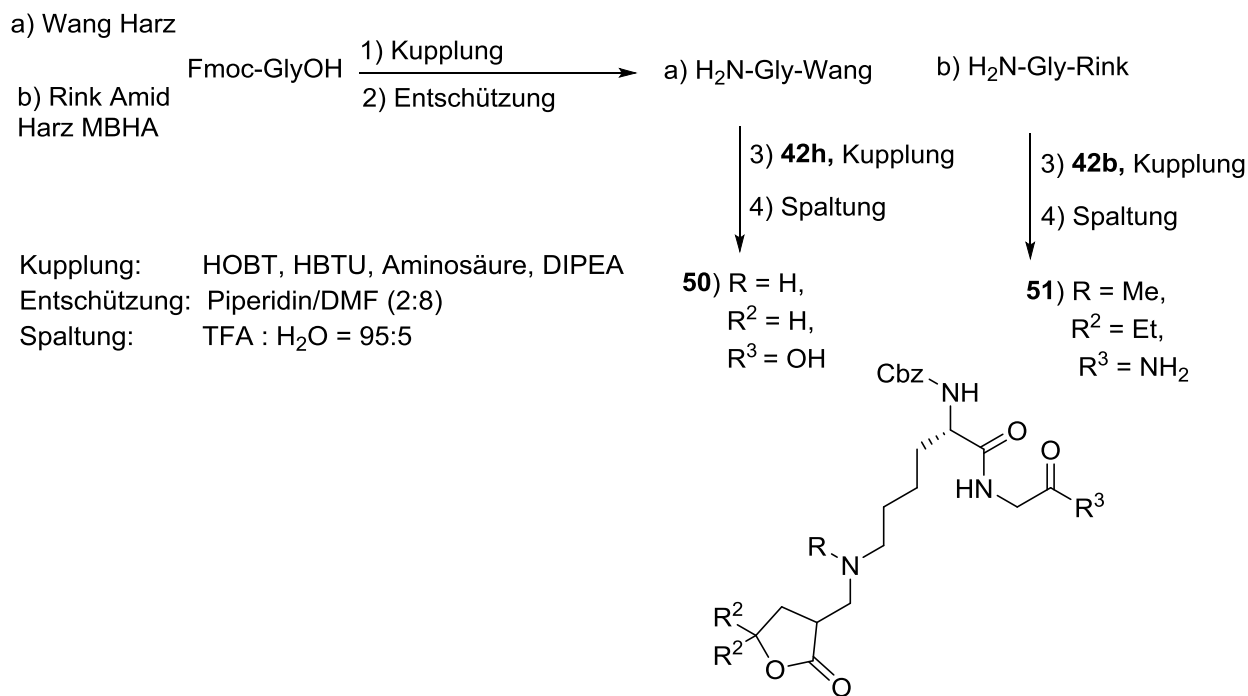
## B. Hauptteil



**Schema 57:** Überblick über die Eigenschaften des am besten geeigneten Systems **42b** für die Anbindung an ein Carrierpeptid.

Des Weiteren wurde die Cytotoxizität der verwendeten Amin-Addukte mit denen der nackten Lactone verglichen und die Eignung von Verbindung **42b** als Prodrug und Kandidat für die Anbindung an ein CPP bestätigt.

Die exemplarische Anbindung dieses in einer SPPS an ein Glycin als letztem Schritt der Beladung eines CPP mit dem Addukt **42b** an den N-Terminus wurde durchgeführt.



**Schema 58:** Überblick über die Bindung an ein Fmoc-Glycin mittels SPPS

## B. Hauptteil

Schließlich wurde die Anbindung von **42b** an den N-Terminus des Peptids [F7,P34]-NPY in Leipzig durchgeführt. Des Weiteren wurde es mit seiner Säuregruppe an die Lysinseitenkette an Stelle 4 desselben Peptids gebunden.

## C. Experimenteller Teil

### 1 Allgemeines

**Säulenchromatografie:** Kieselgel Geduran 60 wurde als stationäre Phase verwendet

**Dünnschichtchromatografie:** Kieselgel 60 F254 auf Aluminiumplatten von Merck Co. Ltd. (Dicke: 0.2 mm) wurde verwendet. Angefärbt wurde mit Kaliumpermanganat oder Ninhydrin.

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H-NMR wurde gemessen auf Bruker Avance 300 (300 MHz). Die chemische Verschiebung wurde in ppm angegeben mit Lösungsmitteln CDCl<sub>3</sub> (7.26 ppm), D<sub>2</sub>O (4.80 ppm), MeOD (3.49, 1.09 ppm) und kalibriert auf Tetramethylsilan (0.00 ppm) als internem Standard. Die Kopplungskonstanten J wurden angegeben in Hz. Die folgenden Abkürzungen repräsentieren folgende Spin-Spin-Pattern: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett von Dublett.

**<sup>13</sup>C-NMR:** wurde gemessen auf Bruker Avance 300 (75.5 MHz) gemessen. Die chemische Verschiebung wurde kalibriert auf CDCl<sub>3</sub> (77.16 ppm), MeOD (50.41 ppm) und tetramethylsilan (0.00 ppm) als internem Standard.

**IR-Spektroskopie:** wurde ausgeführt auf einem Biorad Excalibur FTS 3000 Spektrometer und einem Agilent Cary 630 FTIR.

**Massenspektren:** Massenspektren wurden aufgenommen auf einem Varian MAT 311 A, Finnigan MAT 95 und Finnigan TSQ 7000.

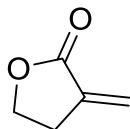
Lösungsmittel: Petrolether, DCM und Ethylacetat wurden einmal destilliert. Wenn nicht anders angegeben, wurden keine getrockneten Lösungsmittel verwendet. Absolute Lösungsmittel wurden dem MB-SPS Lösungsmittelautomaten entnommen.

**Die folgenden Verbindungen wurden nach publizierten Vorschriften dargestellt:**

3-methylendihydrofuran-2(3H)-on (**3a**)<sup>[112]</sup>; ethyl 2-(bromomethyl)acrylat(**26**)<sup>[113]</sup>; 5,5-diethyl-3-methylendihydrofuran-2(3H)-on (**3b**)<sup>[114]</sup>, Micheliolid (**54**)<sup>[115]</sup>, (1R,3aR,4aS,6aS,9aS)-1-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-methyleneoctahydro-1H-oxireno[2',3':8,8a]azuleno[4,5-b]furan-8(4aH)-on (**55**)<sup>[115]</sup>, Arglabin (**1**)<sup>[115]</sup>

## 2. Darstellung der Verbindungen und Reaktionen

### 3-methylendihydrofuran-2(3H)-on (3a):



NaH (1.75 g, 43.75 mmol, 0.88 equiv) wurde mit 50 ml Diethylether in einem Rundkolben gemischt. Dann wurden Ethylformiat (3.20 ml, 39.80 mmol, 0.80 equiv) und  $\gamma$ -Butyrolacton (3.80 ml, 50.00 mmol, 1 equiv) langsam zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.1 ml MeOH gestartet. Es wurde eine Stunde lang bei 23 °C gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der erhaltene Feststoff mit Diethylether gewaschen. 6.70 g eines weißen Feststoffes wurden erhalten. Der Feststoff wurde mit 70 ml THF gemischt und Paraformaldehyd (3.20 g, 106.70 mmol) wurde zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht refluxiert. Dann wurden 5 ml einer 1 M HCl und 15 ml Wasser zugegeben und die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck das Lösungsmittel abgezogen. Erhalten wurde ein farbloses Öl (3.25 g, 66 %).

$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.88 (m, 2H, 2.7 Hz, 7.46 Hz), 4.30 (t, 2H, 7.40 Hz), 5.61 (t, 1H, 2.54 Hz), 6.18 (t, 1H, 2.80 Hz).

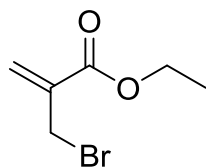
$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 27.2, 65.3, 122.1, 133.6, 170.6

HRMS: (ESI-MS): m/z berechnet [ $\text{MH}^+$ ]: 99.0441, gefunden: 99.0445

IR (pur)  $\nu_{\text{max}}$  = 1756, 1262, 1111, 1022, 942, 812, 623  $\text{cm}^{-1}$

## C. Experimenteller Teil

### ethyl 2-(bromomethyl)acrylat (**26**):

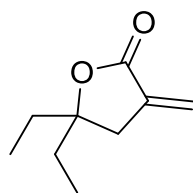


Eine Mischung aus Ethylacrylat (6.50 ml, 60.00 mmol, 1 equiv), 35 % Formalin (5.60 g , 60.00 mmol, 1 equiv), DABCO (3.40 g, 30.00 mmol, 0.5 equiv) , Wasser (15 ml) and Dioxan (15 ml) wurde für 24 h bei 23 °C gerührt. Wasser (10 ml) wurde zugegeben und mit Diethylether extrahiert. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und abrotiert. Von dem erhalten farblosen Öl (9.30 g) wurden 3.10 g (23.85 mmol) mit 25 ml Diethylether gemischt, auf 0 °C gekühlt und langsam PBr<sub>3</sub> (0.95 ml, 10.00 mmol) zugegeben. Es wurde für 2 h bei 23 °C gerührt, auf 0 °C gekühlt und 10 ml kaltes Wasser zugegeben. Es wurde mit Diethylether extrahiert, mit brine gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und bei reduziertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene gelbe Öl (2.73 g, 14.22 mmol, 70 %) wurde in den nachfolgenden Schritten ohne weitere Reinigung verwendet.

<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.3 (s, 1H), 5.9 (s, 1H), 4.22 (m, 4H), 1.28 (t, 3H, 7.1 Hz).

<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.2, 29.2, 61.2, 128.9, 137.7, 164.9

### 5,5-diethyl-3-methylendihydrofuran-2(3H)-on (**3b**):



Ethyl 2-(bromomethyl)acrylate (**26**) (2.00 g, 10.00 mmol), Diethylketon (**29**) (0.90 g, 10.40 mmol) und Zinkpulver (0.81 mg, 12.40 mmol) wurden in 10 ml THF und 20 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gemischt. Es wurde über Nacht bei 60 °C gerührt. Wasser wurde zugegeben und mit Diethylether extrahiert. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Toluol (10 ml) wurde zugegeben, zusammen mit 10 mg pTsOH und über Nacht gerührt. 15 ml Wasser wurden zugegeben, mit Diethylether extrahiert, getrocknet und abrotiert. Nach Säulenchromatografie (10 % EE in PE) wurden 464 mg (3.01 mmol, 30 %) eines farblosen Öls erhalten.

### C. Experimenteller Teil

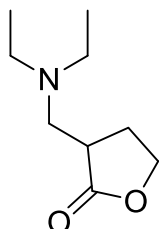
$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.90$  (t, 7.7 Hz, 6H), 1.68 (q, 7.7 Hz, 4H), 2.72 (t, 2.9 Hz, 2H), 5.58 (t, 2.5 Hz, 1H) 6.19 (t, 2.6 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.7$  (+), 31.6 (-), 36.2 (-), 86.5 (quart), 121.9 (-), 136.3 (quart), 170.1 (quart)

**HRMS:** (APCI-MS)  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2$ ,  $[\text{MH}^+]$ : 155.1067, gefunden 155.1071

**IR (pur)**  $\nu_{\text{max}} = 2974, 1757, 1721, 1462, 1275, 1171, 1094, 1028, 945, 813, 627 \text{ cm}^{-1}$

### 3-((diethylamino)methyl)dihydrofuran-2(3H)-on (13a):



$\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolacton (**3a**) (1.06 g, 10.80 mmol) wurde in 3 ml Methanol mit Diethylamin (0.70 g, 9.45 mmol) gemischt. Es wurde über Nacht gerührt und das Lösungsmittel abrotiert. Säulenchromatografie (EtOAc pur) ergab 0.79 g (4.62 mmol, 43 %) Produkt.

$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.95$  (t, 7.1 Hz, 6H), 2.12 (m, 1H), 2.32-2.75 (m, 7H), 2.88 (dd, 12.9 Hz, 4.0 Hz, 1H), 4.14-4.39 (m, 2H).

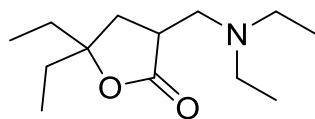
$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 11.7$  (+), 28.2 (-), 38.6 (+), 47.0 (-), 53.3 (-), 67.0 (-), 179.2 (quart)

**HRMS:** (APCI-MS)  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2$   $[\text{MH}^+]$ : 172.1332, gefunden 172.1332

**IR (pur)**  $\nu_{\text{max}} = 2968, 2929, 2815, 1763, 1462, 1372, 1298, 1179, 1156, 1022, 966 \text{ cm}^{-1}$

### C. Experimenteller Teil

#### 3-((diethylamino)methyl)-5,5-diethyldihydrofuran-2(3H)-on (13c):



Diethyl-aMgBL (**3b**) (0.49 g, 3.20 mmol) wurde mit Diethylamin (0.23 mg, 3.20 mmol) in 5 ml Methanol gemischt. Es wurde über Nacht bei RT gerührt. 20 mg NaHCO<sub>3</sub> wurden zugegeben und nach Säulenchromatografie (PE : EE = 6:4) wurden 400 mg (1.76 mmol, 55 %) Produkt als farbloses Öl erhalten.

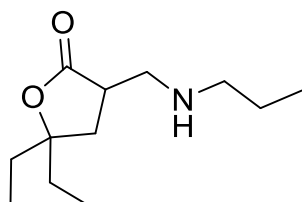
<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.91 (t, 7.8 Hz, 6H), 1.00 (t, 8.5 Hz, 6H), 1.68 (m, 4H), 1.87 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.40-2.65 (m, 5H), 2.79-2.96 (m, 2H),

<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.7 (+), 11.8 (+), 30.8 (-), 31.5 (-), 36.1 (-), 39.7 (+), 46.8 (-), 54.4 (-), 87.6 (quart), 178.5 (quart)

**HRMS:** (APCI-MS) m/z berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub> [MH<sup>+</sup>]: 228.1958, gefunden 228.1960

**IR:** ν<sub>max</sub> = 2969, 2929, 1761, 1262, 1377, 1207, 1168, 1117, 953 cm<sup>-1</sup>

#### 5,5-diethyl-3-((propylamino)methyl)dihydrofuran-2(3H)-on (13d):



Diethyl-aMgBL (**3b**) (0.21 g, 1.34 mmol) wurde in 2 ml MeOH mit Propylamin (0.08 g, 1.36 mmol) gemischt und für 2 Tage gerührt. Säulenchromatografie (EE pur) ergab 0.11 g Produkt als farbloses Öl (0.52 mmol, 40 %).

<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.88 (m, 9H), , 1.46 (q, 7.5 Hz, 2H) , 1.65 (m, 5H) , 1.81 (m, 1H) , 2.16 (m, 1H) , 2.54 (dt, 7.4 Hz, 1.2 Hz, 2H) , 2.76 (m, 1H), 2.87 (m, 2H)

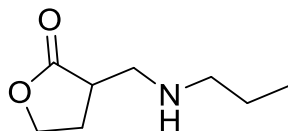
<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.8 (+), 11.7 (+), 23.1 (-), 30.7 (-), 31.4 (-), 34.7 (-), 41.1 (+), 50.2 (-), 51.7 (-), 87.6 (quart), 178.3 (quart)

**HRMS:** (APCI-MS) m/z berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub> [MH<sup>+</sup>]: 214.1802, gefunden 214.1804

### C. Experimenteller Teil

**IR:**  $\nu_{\max} = 2968, 2932, 2880, 1756, 1462, 1215, 1168, 1120, 951 \text{ cm}^{-1}$

#### **3-((propylamino)methyl)dihydrofuran-2(3H)-on (13b):**



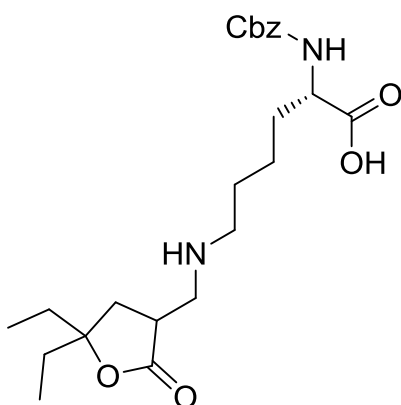
aMgBL (**3a**) (0.50 g, 5.10 mmol, 1 equiv) und Propylamin (0.36 g, 1.2 equiv) wurden in Ethanol oder Methanol über Nacht bei RT gerührt. Säulenchromatografie (20 % MeOH in DCM) ergab 0.30 g Produkt (1.91 mmol, 37 %).

$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.85$  (t, 7.2 Hz, 3H), 1.44 (q, 4.2 Hz, 2H), 1.86 (s, NH, 1H), 2.08 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.52 (t, 7.3 Hz, 2H), 2.64-2.89 (m, 3H), 4.24 (dt, 8.8 Hz, 3.0 Hz, 2H)

$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 11.7$  (+), 23.0 (-), 26.9 (-), 39.6 (+), 49.5 (-), 51.8 (-), 66.9 (-), 178.9 (quart)

**HRMS:** (CI-MS) m/z berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$  [ $\text{MH}^+$ ]: 158.11587, gefunden 158.11621

#### **N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysin (42a):**



Z-Lys-OH **43** (0.10 g, 0.36 mmol), diethyliertes aMgBL (**3b**) (0.084 mg, 0.54 mmol) und  $\text{NaHCO}_3$  (0.092 g, 1.09 mmol) wurden in 3 ml MeOH gemischt und 2 Tage bei 23 °C gerührt. Säulenchromatografie (EtOH : DCM = 1:2/EtOH pur) der Reaktionsmischung ergab 142 mg (0.32 mmol, 91 %) farbloses klebriges Öl.

### C. Experimenteller Teil

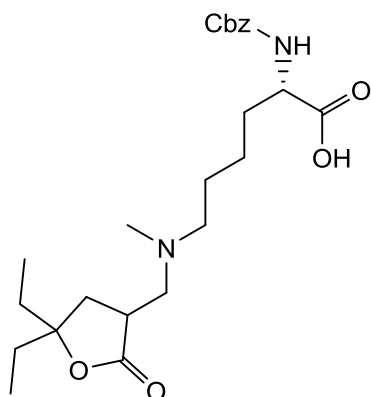
$^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  = 0.91 (t, 7.3 Hz, 6H) , 1.23-1.96 (m, 11H) , 2.31 (m, 1H) , 2.51-3.09 (m, 5H) , 4.02 (t, 6.0 Hz, 1H) , 5.06 (s, 2H) 7.35 (m, 5H)

$^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  = 8.3 (+), 24.4 (-), 29.5 (-), 31.1 (-), 32.2 (-), 34.2 (-), 33.9 (-), 36.3 (-), 41.1 (+), 50.9 (-), 57.5 (+), 67.4 (-), 89.9 (quart), 128.9 (+), 129.0 (+), 129.6 (+), 138.4 (quart), 158.2 (quart), 179.7 (quart), 179.8 (quart)

**HRMS:** (ESI-MS) m/z berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [MH<sup>+</sup>]: 435.249, gefunden 435.2492

**IR:**  $\nu_{\text{max}}$  = 3300, 2940, 1756, 1693, 1572, 1454, 1428, 1217, 1115, 1059, 1028, 734, 697 cm<sup>-1</sup>

#### **N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-N6-methyl-L-lysin (42b):**



Z-Lys-OH **43** (92 mg, 0.33 mmol) wurde in 3 ml MeOH mit diethyl- $\alpha$ MgBL (**3b**) (64 mg, 0.42 mmol) und NaHCO<sub>3</sub> (83 mg, 0.99 mmol) gemischt. Es wurde für 72 h gerührt. Dann wurden Formalin (37 %, 150 mg, 1.85 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (83 mg, 1.3 mmol) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Säulenchromatografie (EtOH : DCM = 1:2/1:1/EtOH pur) der Reaktionsmischung ergab 47 mg (0.1 mmol, 32 %) eines klebrigen Öls.

$^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  = 0.92 (t, 7.6 Hz, 6H) , 1.24 - 1.98 (m, 11H) , 2.23 (s, 3H) , 2.26 -2.61 (m, 4H) , 2.79 (m, 1H) , 2.99 (m, 1H) , 4.02 (t, 5.9 Hz, 1H) , 5.08 (s, 2H), 7.33 (m, 5H).

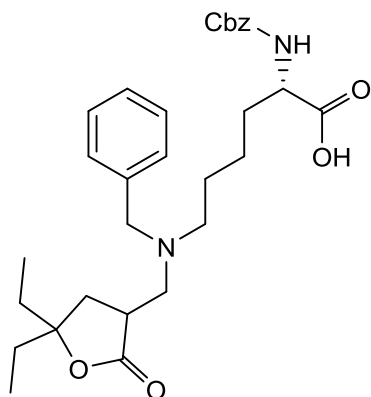
$^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  = 8.2 (+), 24.7 (-), 27.7 (-), 31.1 (-), 32.5 (-), 34.1 (-), 37.4 (-), 40.5 (+), 42.6 (+), 57.6 (+), 58.9 (-), 59.9 (-), 67.4 (-), 89.6 (quart), 128.8 (+), 129.0 (+), 129.5 (+), 138.5 (quart), 158.2 (quart), 179.8 (quart), 180.4 (quart)

**HRMS:** (ESI-MS) m/z berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [MH<sup>+</sup>]: 449.2646, gefunden 449.2647

### C. Experimenteller Teil

**IR:**  $\nu_{\max}$  = 2973, 2900, 2796, 1756, 1701, 1595, 1459, 1407, 1342, 1264, 1214, 1118, 952, 732, 698  $\text{cm}^{-1}$

**N6-benzyl-N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysin (42c):**



**42a** (180 mg, 0.41 mmol) wurde mit Benzylbromid (71 mg, 50  $\mu\text{L}$ , 0.41 mmol) und  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (114 mg, 0.82 mmol) in 4 ml Acetonitril gemischt. Es wurde für 18 h bei 22  $^\circ\text{C}$  gerührt. Säulenchromatografie (DCM:EtOH = 2:1) ergab 123 mg (0.23 mmol, 57 %) Produkt als klebriges Öl.

$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\delta$  = 0.81 (m, 6H), 1.22-1.88 (m, 11H), 2.12 (m, 1H), 2.24-2.61 (m, 3H), 2.88 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 4.04 (t, 6.4 Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 7.30 (m, 10H).

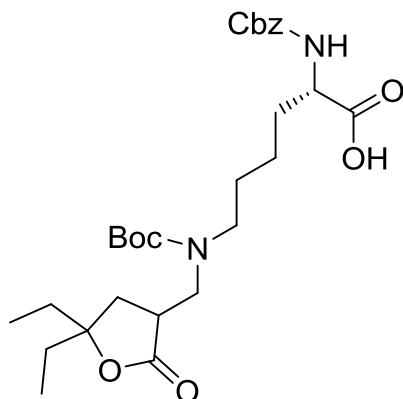
$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\delta$  = 8.3 (+), 24.8 (-), 27.9 (-), 31.5 (-), 32.3 (-), 33.9 (-), 36.7 (-), 41.1 (+), 55.3 (-), 56.3 (-), 57.4 (+), 59.8 (-), 67.5 (-), 89.8 (quart), 128.2 (+), 128.9 (+), 129.1 (+), 129.4 (+), 129.6 (+), 130.3 (+), 138.2 (quart), 140.6 (quart), 158.5 (quart), 180.6 (quart), 181.1 (quart).

**HRMS:** (ESI-MS)  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$  [ $\text{MH}^-$ ]: 523.2814, gefunden 523.2819

**IR:**  $\nu_{\max}$  = 2944, 1757, 1700, 1579, 1455, 1421, 1265, 1227, 1059, 956, 732, 698  $\text{cm}^{-1}$

### C. Experimenteller Teil

#### **N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(tert-butoxycarbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine (42d):**



Z-Lys-OH (**43**) (111 mg, 0.40 mmol) wurde in 3 ml MeOH mit diethyl-aMgBL (**3b**) (123 mg, 0.80 mmol) und NaHCO<sub>3</sub> (100 mg, 1.19 mmol) gemischt. Es wurde für 72 h bei 23 °C gerührt. Dann wurde Boc<sub>2</sub>O (130 mg, 0.60 mmol) und nochmal 67 mg (0.80 mmol) NaHCO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung noch einmal für 1 Tag gerührt. Säulenchromatografie (DCM:EtOH = 2:1/ 16 cm lang) ergab 50 mg Produkt (0.094 mmol, 23 %).

<sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ = 7.33 (m, 5H), 5.06 (m, 2H), 4.06 (t, 1H), 3.24-2.82 (m, 4H), 2.16 (m, 1H), 2.00-1.47 (m, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.38-1.06 (m, 3H), 0.91 (t, 7.8 Hz, 6H).

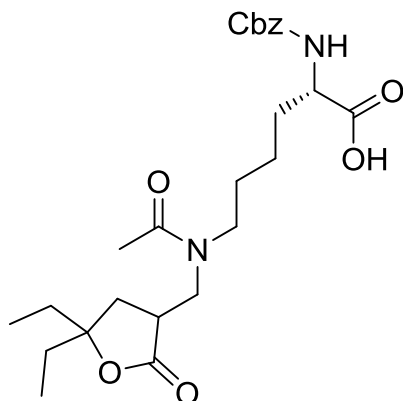
<sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ = 8.3 (+), 24.3 (-), 28.8 (+), 29.5 (-), 30.7 (-), 31.4 (-), 32.3 (-), 32.4 (-), 34.2 (-), 41.3 (+), 41.3 (-), 57.9 (+), 67.4 (-), 79.8 (quart), 81.5 (quart), 89.6 (quart), 128.9 (+), 129.0 (+), 129.5 (+), 138.5 (quart), 158.3 (quart), 179.7 (quart), 179.8 (quart)

**HRMS:** (ESI-MS) m/z berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [MH]: 533.2868, gefunden 533.2879

**IR:** ν<sub>max</sub> = 3327, 3000, 2936, 1756, 1687, 1582, 1526, 1457, 1417, 1365, 1259, 1155, 1028, 949 cm<sup>-1</sup>

### C. Experimenteller Teil

#### **N6-acetyl-N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine (42e):**



Z-Lys-OH (**43**) (170 mg, 0.60 mmol) wurde in 3 ml MeOH mit diethyl- $\alpha$ MgBL (**3b**) (142 mg, 0.92 mmol) und  $\text{NaHCO}_3$  (150 mg, 1.78 mmol) gemischt und 24 h bei 22 °C gerührt. Säulenchromatografie (DCM : ETOH = 2:1 / EtOH pur) ergab 181 mg Zwischenprodukt. Dieses wurde mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  (76 mg, 0.75 mmol) und Triethylamin (100 mg, 0.99 mmol) in MeOH behandelt. Es wurde über 16 h bei 27 °C gerührt und gesäult (DCM : ETOH = 2:1) und 114 mg (0.24 mmol, 40%) Produkt erhalten.

$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\delta$  = 7.31 (m, 5H), 5.07 (s, 2H), 4.05 (m, 1H), 3.62 (m, 4H), 3.17 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.94-1.61 (m, 10H), 1.40-1.14 (m, 2H), 0.91 (m, 6H).

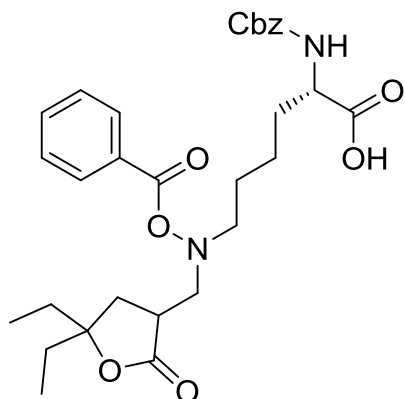
$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\delta$  = 8.2 (+), 21.5 (+), 23.7 (+), 23.9 (-), 31.1 (-), 31.7 (-), 32.2 (-), 35.9 (-), 41.0 (+), 47.2 (-), 50.4 (-), 67.5 (-), 69.6 (-), 89.6 (quart), 128.9 (+), 129.0 (+), 129.5(+), 138.4 (quart), 158.2 (quart), 173.9 (quart), 179.6 (quart), 180.2 (quart)

**HRMS:** (ESI-MS)  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7$  [ $\text{MH}^+$ ]: 477.2595, gefunden 477.2599

**IR:**  $\nu_{\text{max}}$  = 3327, 2970, 2940, 1759, 1710, 1599, 1420, 1360, 1218, 1058, 950, 738, 700  $\text{cm}^{-1}$

### C. Experimenteller Teil

#### **N6-(benzyloxy)-N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysin (42f):**



Z-Lys(diethyl-aMgBL)-OH (**42a**) (285 mg, 0.66 mmol) wurde gemischt mit Dibenzoylperoxid (211 mg, 75 %, 0.66 mmol) und  $K_2CO_3$  (271 mg, 1.96 mmol) wurden in 4 ml DCM gemischt. Es wurde für 16 h bei 23 °C gerührt. Säulenchromatografie (DCM : EtOH = 2:1 , EtOH pur) ergab 188 mg (0.34 mmol, 51 % ) Produkt als farbloses Öl.

$^1H$  (**300 MHz, MeOD-d4**):  $\delta$  = 7.99 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.51-7.18 (m, 7H), 5.04 (s, 2H), 4.06 (m, 1H), 3.41 (m 1H), 3.25-2.81 (m, 4H), 2.31-1.96 (m, 2H), 1.91-1.23 (m, 10H), 0.82 (t, 7.5 Hz, 6H).

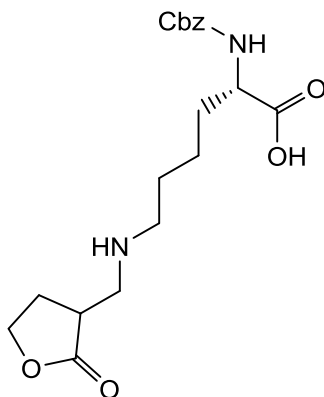
$^{13}C$  (**75 MHz, MeOD-d4**):  $\delta$  = 8.13 (+), 24.5 (-), 27.7 (-), 30.9 (-), 32.2 (-), 33.5 (-), 36.8 (-), 41.3 (+), 57.0 (+), 59.4 (-), 61.0 (-), 67.6 (-), 89.8 (quart), 128.9 (+), 129.5 (+), 129.9 (+), 130.0 (quart), 130.6 (+), 130.7 (quart), 133.2 (+), 134.8 (+), 138.3 (quart), 158.6 (quart), 167.3 (quart), 179.5 (quart)

**HRMS:** (ESI-MS)  $m/z$  berechnet für  $C_{30}H_{38}N_2O_8$  [ $MH^+$ ]: 555.2701, gefunden 555.2708

**IR:**  $\nu_{max}$  = 3309, 2970, 2937, 1736, 1699, 1580, 1449, 1408, 1241, 1058, 708  $cm^{-1}$

### C. Experimenteller Teil

#### N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysin (**42g**):



Z-Lys-OH (**43**) (200 mg, 0.71 mmol) wurde gemischt mit aMgbL (**3a**) (120 mg, 1.22 mmol) in 3 ml MeOH und für 2 Tage gerührt. Säulenchromatografie (DCM : EtOH = 1:1/EtOH pur) ergab 166 mg (0.38 mmol, 54 %) Produkt, welches einige Verunreinigungen enthielt, wie z. B. Ringöffnungsprodukt.

$^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  = 7.33 (m, 5H), 5.06 (s, 2H), 4.31 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 3.16-2.79 (m, 4H), 2.58-2.00 (m, 1H), 1.88-1.29 (m, 8H).

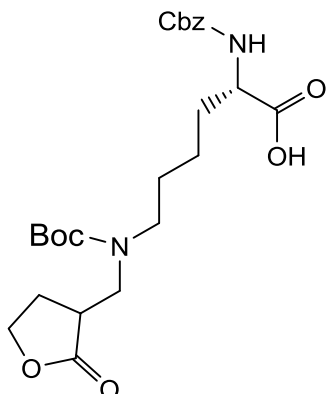
$^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  = 24.1, 27.4, 33.4, 33.9, 38.6, 41.4, 57.3, 60.1, 67.7, 68.6, 128.8, 129.1, 129.7, 138.6, 158.0, 175.1, 179.1

**HRMS:** (ESI-MS)  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$  [MH $^+$ ]: 379.1864, gefunden 379.1871

**IR:**  $\nu_{\text{max}}$  = 3327, 2940, 1763, 1699, 1591, 1405, 1358, 1120, 976, 777, 749, 698  $\text{cm}^{-1}$

### C. Experimenteller Teil

#### N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(tert-butoxycarbonyl)-N6-((2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysin (**42h**):



Zu Cbz-Lys(aMgBL)-OH (**42g**) (1 equiv, 170 mg, 0.45 mmol) in 5 ml EtOH wurde Bocanhydrid (112 mg, 0.51 mmol) gegeben. Es wurde 10 min gerührt, gefolgt von Addition von NaHCO<sub>3</sub> (72 mg, 0.86 mmol). Dann wurde über 72 h bei 23 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und Säulenchromatografie ergab 146 mg (0.30 mmol, 68 %) an Produkt.

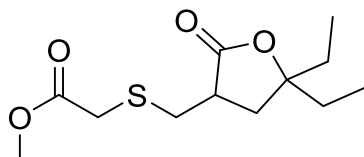
<sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ = 7.31 (m, 5H), 5.06 (m, 2H, 12.4 Hz), 4.28 (m, 2H), 4.06 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.26-2.73 (m, 3H), 2.12-1.48 (m, 5H), 1.42 (s, 9H), 1.36-1.09 (m, 3H).

<sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ = 24.2, 28.8, 28.7, 30.8, 33.6, 40.4, 52.5, 57.1, 60.7, 67.6, 68.4, 79.8, 81.4, 129.0, 129.1, 129.6, 138.4, 158.5, 176.7, 180.3

**HRMS:** (ESI-MS) m/z berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [MH]<sup>+</sup>: 477.2242, gefunden 477.2256

**IR:** ν<sub>max</sub> = 3000, 2600, 1682, 1584, 1417, 1365, 1161, 976 cm<sup>-1</sup>

#### methyl 2-(((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)thio)acetat (**41**):



Diethyl-αMgBL (**3b**) (205 mg, 1.33 mmol) wurde in 3 ml THF mit Methyl 2-mercaptoacetat (142 mg, 1.33 mmol) und NaHCO<sub>3</sub> (340 mg, 4 mmol) gemischt. Es wurde über Nacht gerührt

### C. Experimenteller Teil

und direkte Säulenchromatografie (PE : EE = 9:1 / 8:2) ergab 173 mg (0.69 mmol, 52 %) farbloses Öl.

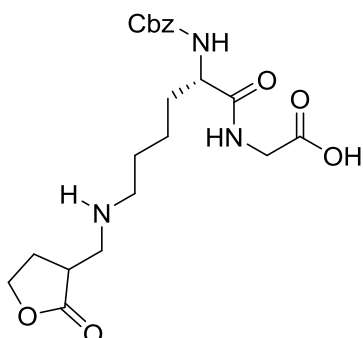
$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.67 (s, 3H), 3.24 (s, 2H), 3.14-2.89 (m, 2H), 2.72 (dd, 8.6 Hz, 13.2 Hz, 1H), 2.23 (dd, 9.2 Hz, 12.9 Hz, 1H), 1.83 (dd, 11.4 Hz, 13.2 Hz, 1H), 1.74-1.52 (m, 4H), 0.87 (t, 7.7 Hz, 6H).

$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.7 (+), 30.8 (-), 33.8 (-), 33.8 (-), 34.2 (-), 36.0 (-), 40.7 (+), 52.4 (+), 88.1 (quart), 170.6 (quart), 176.9 (quart)

**HRMS:** (CI-MS) m/z berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{S}$  [ $\text{MH}^+$ ]: 261.11551, gefunden 261.11525

**IR:**  $\nu_{\text{max}}$  = 2974, 2944, 1729, 1461, 1282, 1215, 1166, 1118, 946  $\text{cm}^{-1}$

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysylglycin** (50)  
[116].



$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\delta$  = 7.32 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.36 (t, t, 8.6 Hz, 6.2 Hz, 1H,1H), 4.16 (t, 6.5 HZ, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.26-2.82 (m, 5H), 2.52 (m, 1H), 2.19-1.41 (m, 7H).

$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\delta$  = 23.6, 26.5, 28.2, 32.7, 38.0, 41.8, 49.2, 56.1, 67.9, 68.5, 128.9, 129.1, 129.5, 138.1, 158.5, 161.7, 166.9, 172.7, 178.7

**HRMS:** (ESI-MS) m/z berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$  [ $\text{MH}^+$ ]: 436.2078, gefunden 436.2085

**IR:**  $\nu_{\text{max}}$  = 2943, 1658, 1422, 1362,1177, 1132, 1021, 973, 721  $\text{cm}^{-1}$

100 mg (0.1 mmol) Wang Harz (1.0 – 1.2 mmol/g) wurden 1 h in DMF in einer mit Fritte ausgestatteten Spritze vorgequollen. Fmoc-Gly-OH (297 g/mol) (5 equiv) (148 mg) wurde mit HBTU (379 g/mol) (4.9 equiv)(186 mg) in 1 ml DMF gemischt und DIPEA (129 g/mol)(10 equiv)(128 mg) zugegeben. Es wurde 2 min gewartet und die erhaltene Lösung wurde zum

### C. Experimenteller Teil

Harz gegeben und anschließend für 3 h geschüttelt. Die Lösung wurde abgelassen und das Harz mit DMF (4x 1 ml) und DCM (4x 1 ml) gewaschen.

Um die OH-Gruppen des Harzes zu blockieren, wurde das in DCM gequollene Harz mit einer Lösung aus DCM (1 ml), pyridine (82  $\mu$ L) und  $\text{Ac}_2\text{O}$  (46  $\mu$ L) versetzt. Es wurde 30 min geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde abgelassen und das Harz mit DCM (2x 1 ml) und DMF (4x 1ml) gewaschen.

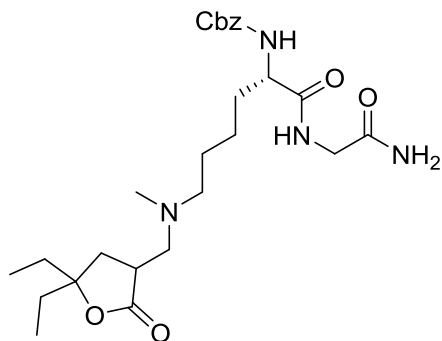
Zur Entschützung (Entfernung der Fmoc-Gruppe) wurde das in DCM gequollene Harz mit einer Lösung aus Piperidin/DMF (2/8, 2 ml) für 5 min versetzt und anschließend das Lösungsmittel abgelassen. Das Harz wurde mit DMF (4x 1 ml) und DCM (4x 1 ml) gewaschen und erneut für 5 min mit Piperidin/DMF (2/8, 2 ml) versetzt. Das Lösungsmittel wurde erneut abgelassen und das Harz mit DMF (4x 1 ml), DCM (4x 1 ml) gewaschen.

Zur Kupplung mit **42h** wurde 1ml DMF mit **42h** (44 mg), HOBT (135 g/mol) (68 mg), HBTU (379 g/mol)(186 mg) und DIPEA (129 g/mol)(130 mg) versetzt. Diese Mischung wurde zu dem in DMF vorgequollenen Harz gegeben. Es wurde 2 h geschüttelt, filtriert und das Harz mit DMF (4x 1ml) und DCM (4x 1 ml) gewaschen.

Für die Abspaltung vom Harz wurde eine Mischung aus TFA/Wasser (95/5, 1.5 ml) zum Harz gegeben und für 2 h geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde abgelassen und das Harz erneut 2h mit TFA/Wasser (95/5, 1.5 ml) gewaschen. Beide Fraktionen an TFA-Mischung wurden vereinigt und am Hochvakuum das TFA abgezogen. Die erhaltene Substanz wurde dann mit  $\text{CDCl}_3$  gewaschen.

### C. Experimenteller Teil

#### benzyl((2S)-1-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-6-(((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)(methyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)carbammat (51):



$^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  = 7.35 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.05 (t, 7 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.20-2.47 (m, 5H), 2.40 (s, 3H), 2.32 (m, 1H), 1.98-1.09 (m, 11H), 0.91 (t, 7.3 Hz, 6H).

$^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  = 8.0 (+), 24.5 (-), 26.7 (-), 30.9 (-), 32.1 (-), 32.4(-), 37.3 (-), 39.9 (+), 42.3 (+), 43.3 (-), 57.1 (+), 58.3 (-), 59.4 (-), 67.8 (-), 90.1 (quart), 129.0 (+), 129.2 (+), 129.6 (+), 138.1 (quart), 159.2 (quart), 174.4 (quart), 175.2 (quart), 179.7 (quart)

**HRMS:** (ESI-MS)  $m/z$  berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [MH<sup>+</sup>]: 505.3021, gefunden 505.3025

**IR:**  $\nu_{\text{max}}$  = 3309, 2944, 1669, 1528, 1423, 1203, 1129, 1028 cm<sup>-1</sup>

Zur Entschützung des Rink Harzes (Entfernung der Fmoc-Gruppe) wurden 268 mg Harz (0,56 mmol/g) (150 mmol) 1 h in DCM vorgequollen. Dazu wurde eine Lösung aus Piperidin/DMF (2:8, 3 ml) für 10 min dazugeben. Das Lösungsmittel wurde abgelassen und das Harz mit DMF (4x) gewaschen. Erneut wurde zum Harz Piperidin/DMF (2:8, 3 ml) für 10 min zugegeben und das Lösungsmittel abgelassen. Das Harz wurde mit DMF (4x) und DCM (4x) gewaschen.

Zur Kupplung mit Fmoc-Gly-OH wurden 2 ml DMF vorgelegt und 222 mg Fmoc-Gly-OH, HOBT (102 mg), HBTU (279 mg) und DIPEA (192 mg) zugegeben. Es wurde 2 min gewartet und die erhaltene Mischung zum Harz gegeben. Es wurde 3h geschüttelt, das Lösungsmittel abgelassen und das Harz mit DMF (4x) und DCM (4x) gewaschen.

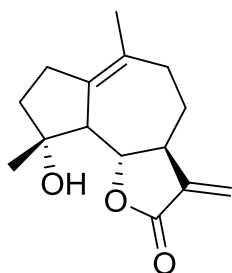
Zur Entschützung (Entfernung der Fmoc-Gruppe) wurde das in DCM gequollene Harz mit einer Lösung aus Piperidin/DMF (2:8, 3 ml) für 10 min versetzt. Das LM wurde abgelassen und das Harz mit DMF (4x) gewaschen. Erneut wurde Piperidin/DMF (2:8, 3 ml) für 10 min zugegeben, LM abgelassen und das Harz mit DMF (4x) und DCM (4x) gewaschen.

### C. Experimenteller Teil

Zur Kupplung mit Verbindung **42b** wurden 2 ml DMF vorgelegt und **42b** (216 mg), HOBT (102 mg), HBTU (279 mg) und DIPEA (192 mg) zugegeben. Nach 2 min wurde die erhaltene Mischung zum Harz gegeben und über Nacht geschüttelt. Das LM wurde abgelassen und das Harz mit DMF (4x) und DCM (4x) gewaschen.

Zur Abspaltung vom Harz wurde TFA/Wasser (95:5, 2 ml) zum Harz gegeben und für 2 h geschüttelt. Das Resin wurde mit TFA/Wasser (95:5, 2 ml) gewaschen und die beiden TFA-Fractionen vereinigt. Das LM wurde an der Kühlfalle im Hochvakuum abgezogen. Ether wurde zugegeben und abdekantiert. Der verbliebene Rest wurde getrocknet und 91 mg Rohprodukt erhalten. Dieses wurde gesäult (DCM:EtOH = 2:1/EtOH pur) und 39 mg (51% in Bezug auf das Harz) an Produkt erhalten.

#### Micheliolid (**54**)



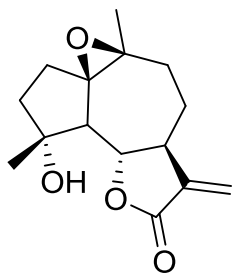
Parthenolid (**22**) (300 mg, 1.21 mmol) wurden in DCM gelöst und p-Toluolsulfonsäure (15 mg) zugegeben. Es wurde über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde DCM zugegeben und die organische Phase mit NaHCO<sub>3</sub>-sat gewaschen. Es wurde mit brine gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und abrotiert. Erhalten wurden 246 mg brauner Feststoff (0.99 mmol, 82 %)

<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.19 (d, 3.4 Hz, 1H), 5.49 (d, 3.4 Hz, 1H), 3.81 (t, 9.6 Hz, 1H), 2.70 (d, 10.4 Hz, 1H), 2.65-2.62 (m, 2H), 2.40-2.34 (m, 1H), 2.07-2.26 (m, 4H), 1.73-1.86 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.36-1.28 (m, 4H).

<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 22.7 (+), 23.9 (+), 25.8 (-), 30.1 (-), 34.9 - 38.3 (-), 49.6 (+), 58.7 (+), 80.3 (quart), 84.5 (+), 119.6 (-), 130.9 (quart), 131.8 (quart), 138.8 (quart), 169.8 (quart)

### C. Experimenteller Teil

#### **(1R,3aR,4aS,6aS,9aS)-1-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-methyleneoctahydro-1H-oxireno[2',3':8,8a]azuleno[4,5-b]furan-8(4aH)-on (55):**

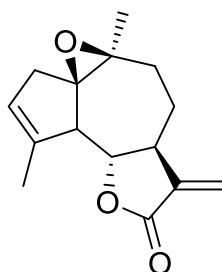


Micheliolid (**54**) (300 mg, 1.21 mmol) wurde in 5 ml DCM gelöst. Dann wurde mCPBA (75%) (122.3 mg, 0.53 mmol) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde DCM zugegeben und mit gesättigter Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt. Es wurde mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und mit brine gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und abrotiert. Erhalten wurden 261 mg (0.99 mmol, 82 %) eines Öls.

<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.14 (d, 3.2 Hz, 1H), 5.44 (d, 3.2 Hz, 1H), 4.01 (t, 10.4 Hz, 1H), 2.71 (br. s, 1H), 2.39-2.08 (m, 4H), 2.02-1.70 (m, 4H), 1.68-1.51 (m, 1H), 1.50-1.40 (s, 3H), 1.40-1.29 (m, 1H), 1.29-1.15 (m, 3H).

<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 21.9 (+), 23.2 (-), 23.3 (-), 29.5 (+), 33.4 (+), 37.4 (+), 49.4 (-), 55.5 (-), 62.5 (quart), 69.9 (quart), 79.8 (quart), 81.9 (-), 119.6 (+), 138.2 (quart), 169.8 (quart)

#### **Arglabin (1):**



231 mg **55** ( 0.88 mmol) wurden in Pyridin (7 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurde POCl<sub>3</sub> (205 µL, 344 mg, 2.25 mmol) zugegeben und 2 h bei 0 °C gerührt. Ether wurde zugegeben und mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und brine gewaschen. Es wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet

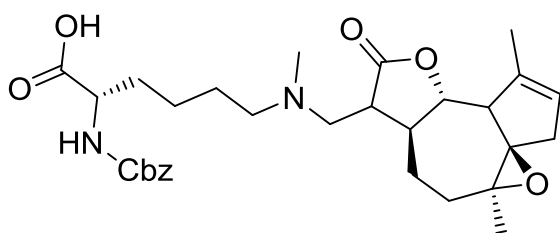
### C. Experimenteller Teil

und abrotiert. Säulenchromatografie (20 % Et<sub>2</sub>O in PE) ergab 75 mg (0.30 mmol, 35 %) Produkt.

<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.10 (d, 3.2 Hz, 1H), 5.53 (s, 1H), 5.38 (d, 3.2 Hz, 1H), 3.96 (t, 10.4 Hz, 1H), 2.91 (d, 1H), 2.74 (d, 1H), 2.28-2.05 (m, 3H), 2.05-1.97 (m, 1H), 1.97-1.88 (s, 3H), 1.88-1.76 (m, 1H), 1.54-1.40 (m, 1H), 1.31 (s, 3H).

<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.6 (quart), 140.7 (quart), 139.2 (quart), 125.0 (+), 118.4 (-), 83.0 (+), 72.6 (quart), 62.8 (quart), 52.9 (+), 51.2 (+), 39.8 (-), 33.6 (-), 22.9 (+), 21.6 (-), 18.4 (+)

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(((3aR,4aS,6aS,9aS)-1,4a-dimethyl-8-oxo-4a,5,6,6a,7,8,9a,9b-octahydro-3H-oxireno[2',3':8,8a]azuleno[4,5-b]furan-7-yl)methyl)-N6-methyl-L-lysin (57):**



Arglabin (1) (65 mg, 0.26 mmol) wurde in 3 ml MeOH mit Z-Lys-OH (43) (74 mg, 0.26 mmol) und NaHCO<sub>3</sub> (67 mg, 0.80 mmol) versetzt und alles zusammen bei RT über 2 Tage gerührt. Dann wurden Formalin (37 %, 160 mg) und NaCNBH<sub>3</sub> (70 mg, 1.11 mmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Säulenchromatografie (DCM/EtOH = 2:1/ EtOH pur) ergab 40 mg Produkt (0.07 mmol, 28 %).

<sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD): δ = 7.31 (m, 5H), 5.53 (m, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.97 (m, 2H), 2.93-2.22 (m, 7H), 2.15 (s, 3H), 2.09-0.94 (m, 18H)

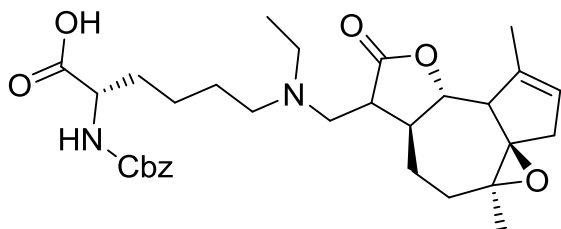
<sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD): δ = 18.7 (+), 23.0 (+), 23.9 (-), 24.8 (-), 28.1 (-), 34.2 (-), 34.3 (-), 40.6 (-), 43.2 (+), 45.5 (+), 53.6 (+), 56.9 (-), 57.9 (+), 59.2 (-), 64.4 (quart), 67.4 (-), 74.3 (quart), 84.1 (+), 126.0 (+), 128.8 (+), 128.9 (+), 129.0 (+), 129.6 (+), 138.8 (quart), 141.8 (quart), 158.2 (quart), 179.8 (quart), 180.4 (quart)

**HRMS:** (ESI-MS) m/z berechnet [MH<sup>+</sup>]: 541.291 , gefunden 541.2908

**IR:** ν<sub>max</sub> = 3336, 2929, 2855, 1770, 1699, 1587, 1453, 1405, 1256, 1222, 998 cm<sup>-1</sup>

## C. Experimenteller Teil

### N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(((3aR,4aS,6aS,9aS)-1,4a-dimethyl-8-oxo-4a,5,6,6a,7,8,9a,9b-octahydro-3H-oxireno[2',3':8,8a]azuleno[4,5-b]furan-7-yl)methyl)-N6-ethyl-L-lysine (58):



Arglabin (**1**) (69 mg, 0.28 mmol) wurde in 3 ml MeOH mit Z-Lys-OH (**43**) (79 mg, 0.28 mmol) und NaHCO<sub>3</sub> (80 mg, 0.95 mmol) versetzt und alles zusammen bei RT über 2 Tage gerührt. Dann wurden Acetaldehyd (50 mg, 1.13 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (60 mg, 0.95 mmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Säulenchromatografie (DCM/EtOH = 2:1/ EtOH pur) ergab 62 mg (0.11 mmol, 39 %) Produkt.

<sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD): δ = 7.33 (m, 5H), 5.56 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.09-3.87 (m, 2H), 2.99-2.70 (m, 3H), 2.68-2.21 (m, 6H), 2.13-1.23 (m, 18H), 1.07-0.87 (m, 3H)

<sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD): δ = 11.68 (+), 18.63 (+), 22.9 (+), 24.1 (-), 24.8 (-), 27.7 (-), 34.3 (-), 34.4 (-), 40.5 (-), 45.7 (+), 48.7 (-), 49.9 (+), 53.5 (+), 53.6 (-), 54.8 (-), 57.7 (+), 64.5 (quart), 67.4 (-), 74.3 (quart), 84.3 (+), 125.9 (+), 128.7 (+), 128.8 (+), 129.5 (+), 138.5 (quart), 141.9 (quart), 158.3 (quart), 179.8 (quart), 180.5 (quart)

HRMS: (ESI-MS) m/z berechnet [MH<sup>+</sup>]: 555.3073 , gefunden 555.3065

IR: ν<sub>max</sub> = 3339, 2929, 2858, 2482, 1766, 1699, 1587, 1401, 1359, 1252, 1118, 1170, 998 cm<sup>-1</sup>

D. Spektrenanhang

## **D. Spektrenanhang**

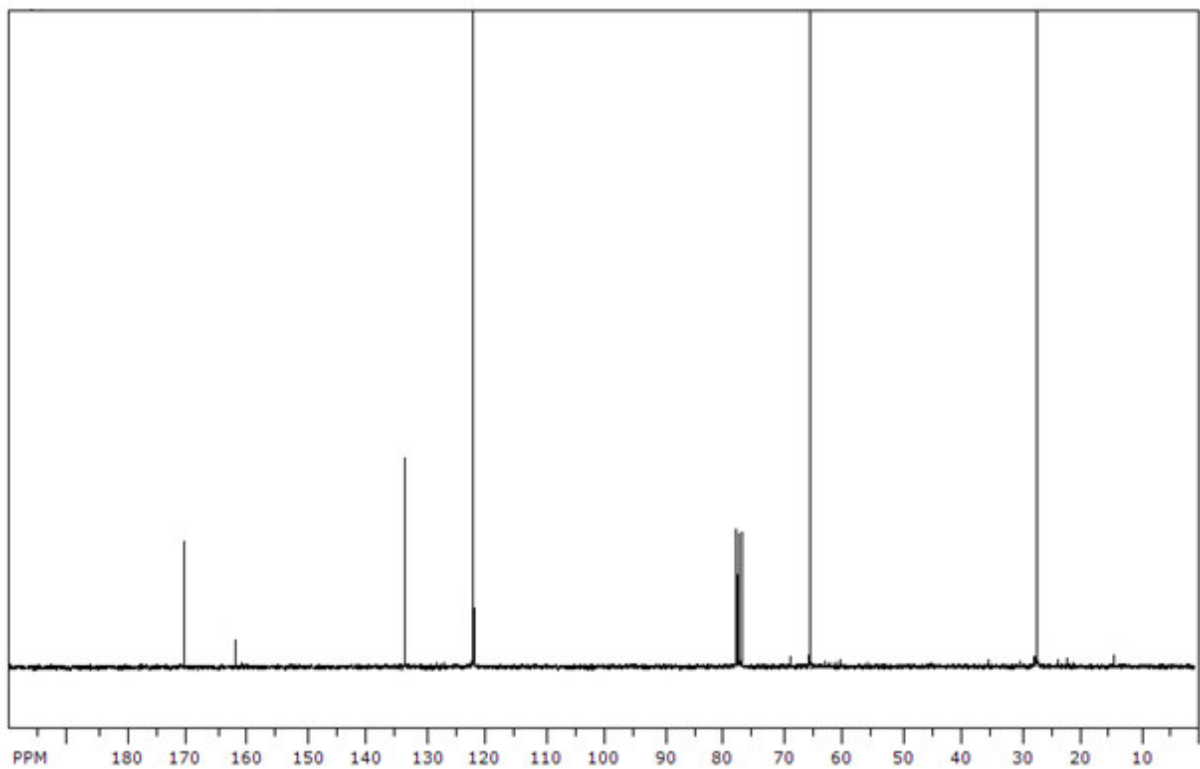
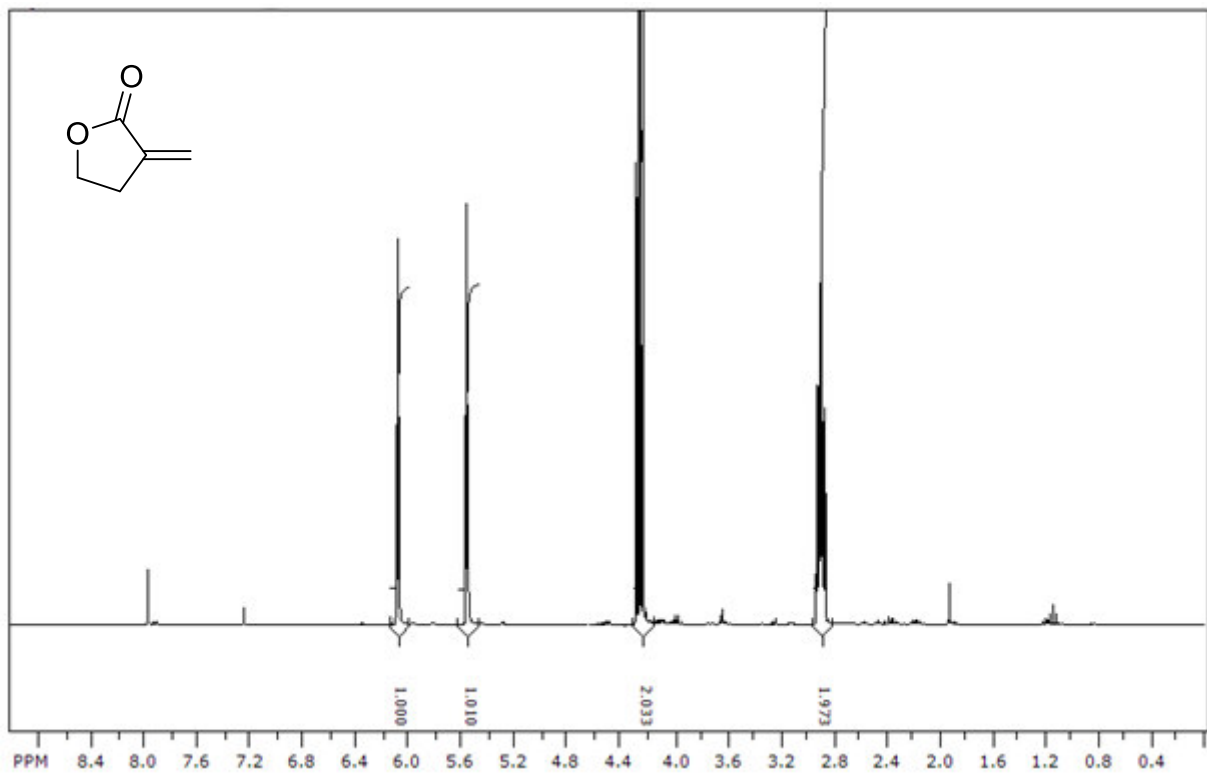
Oben:  $^1\text{H}$ -Spektren

Unten:  $^{13}\text{C}$ -Spektren

Lösungsmittel:  $\text{CDCl}_3$  oder MeOD

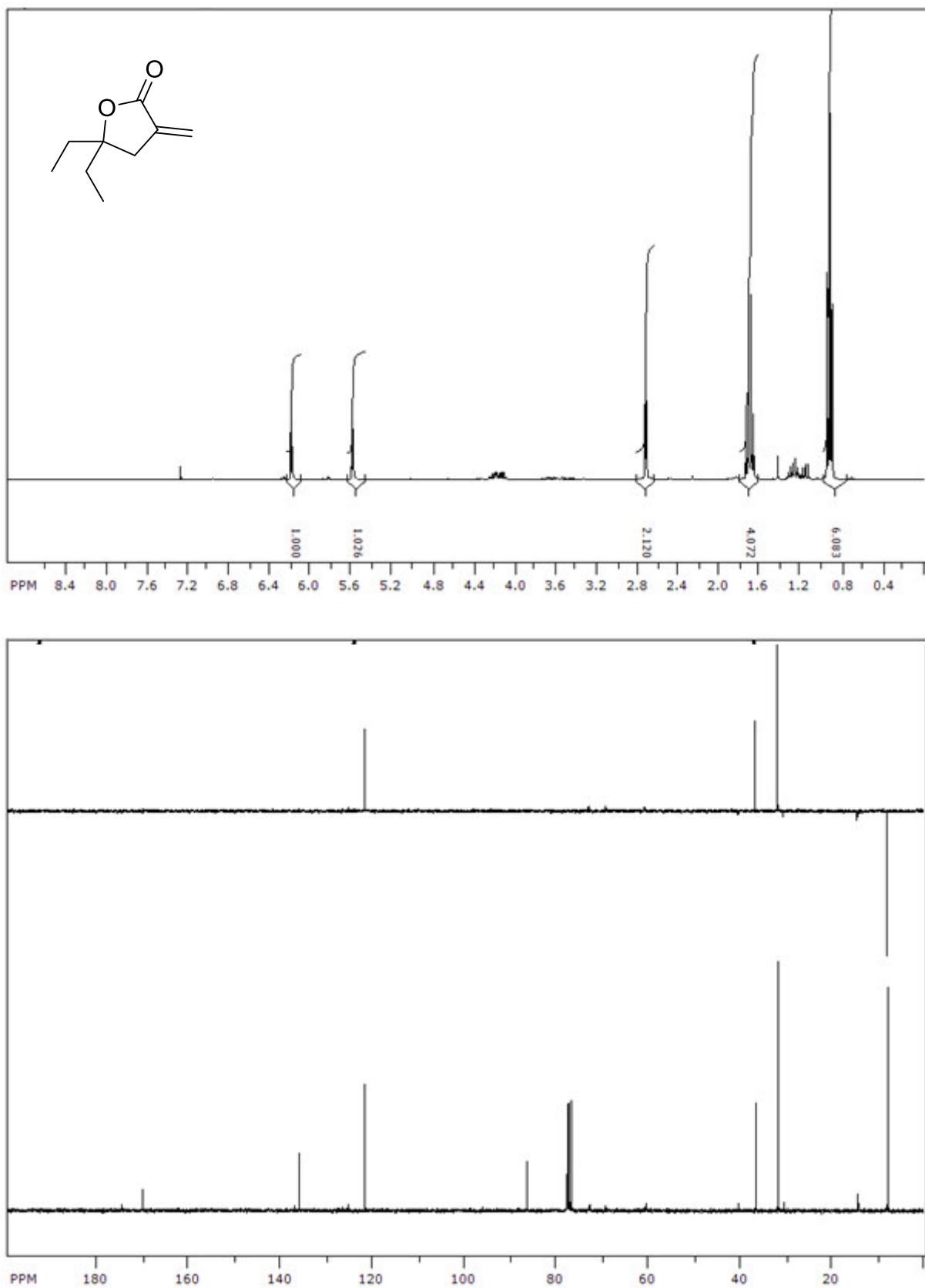
D. Spektrenanhang

**3-methylen-dihydrofuran-2(3H)-on (3a): CDCl<sub>3</sub>**



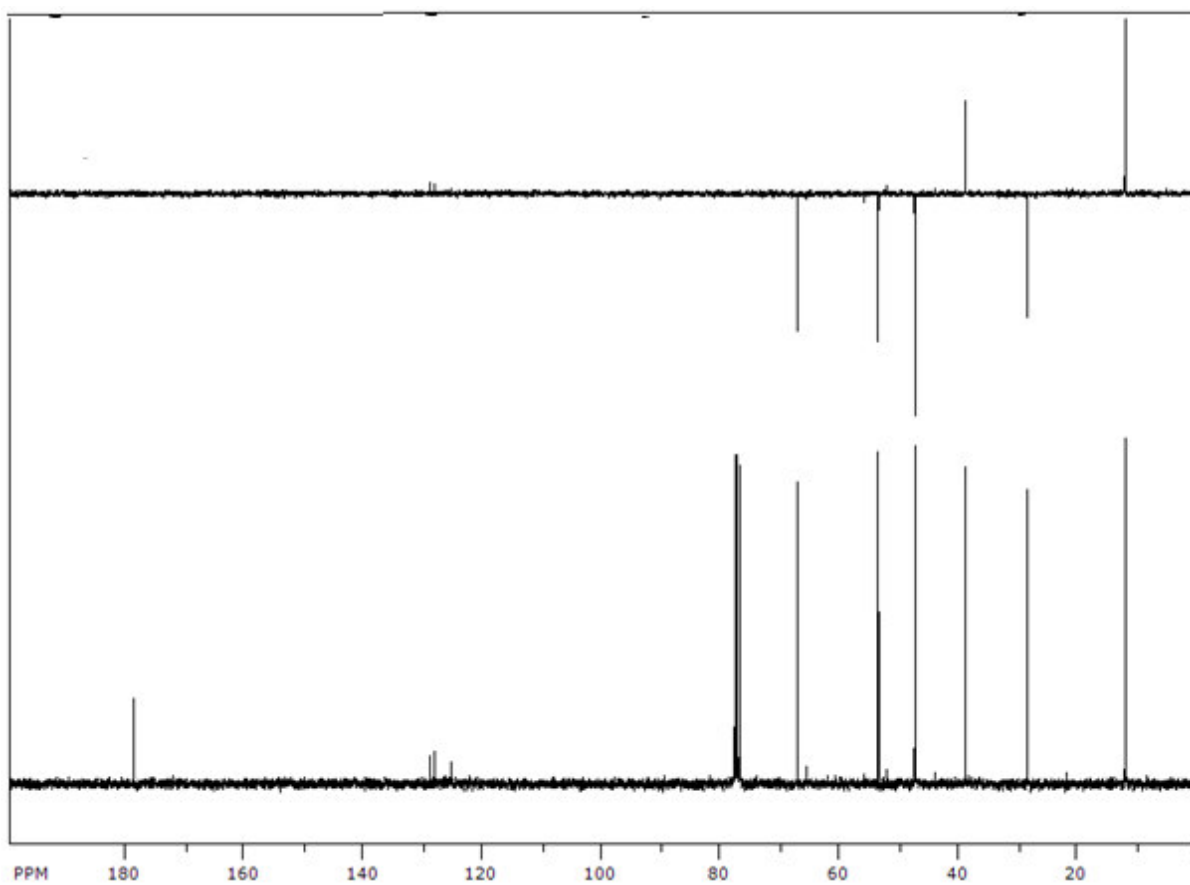
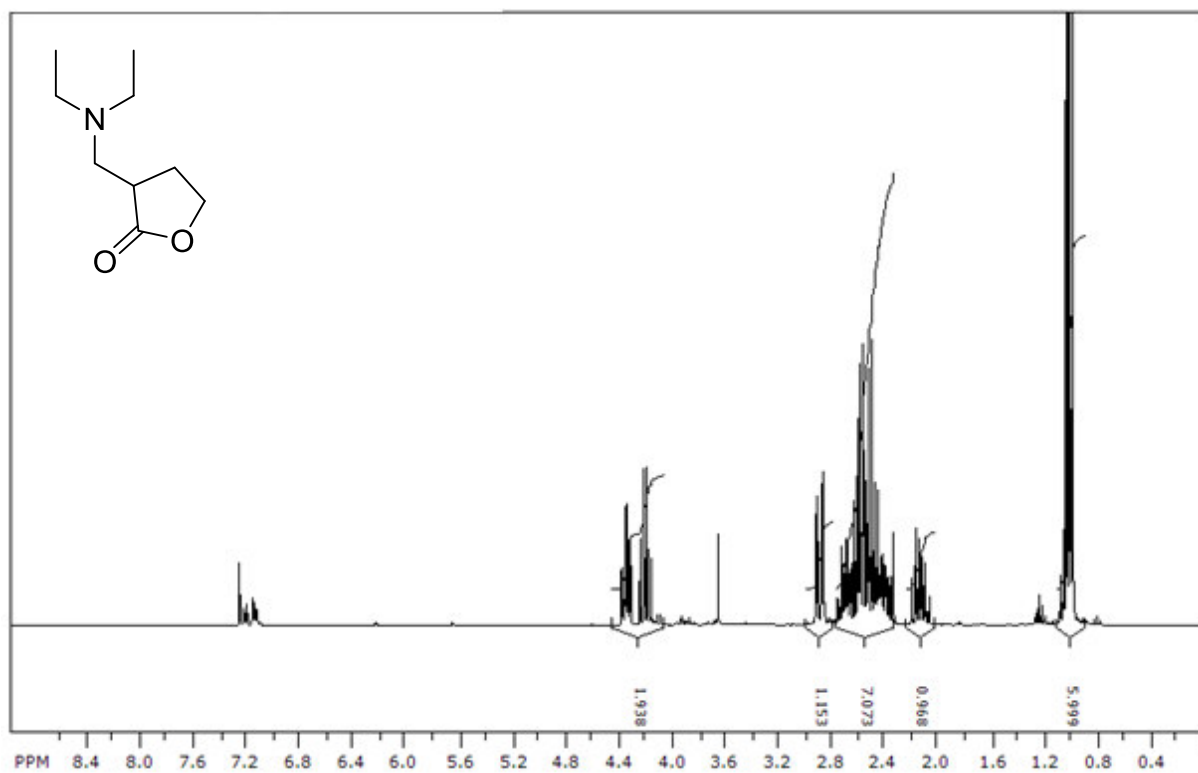
D. Spektrenanhang

**5,5-diethyl-3-methylen-dihydrofuran-2(3H)-on (3b): CDCl<sub>3</sub>**



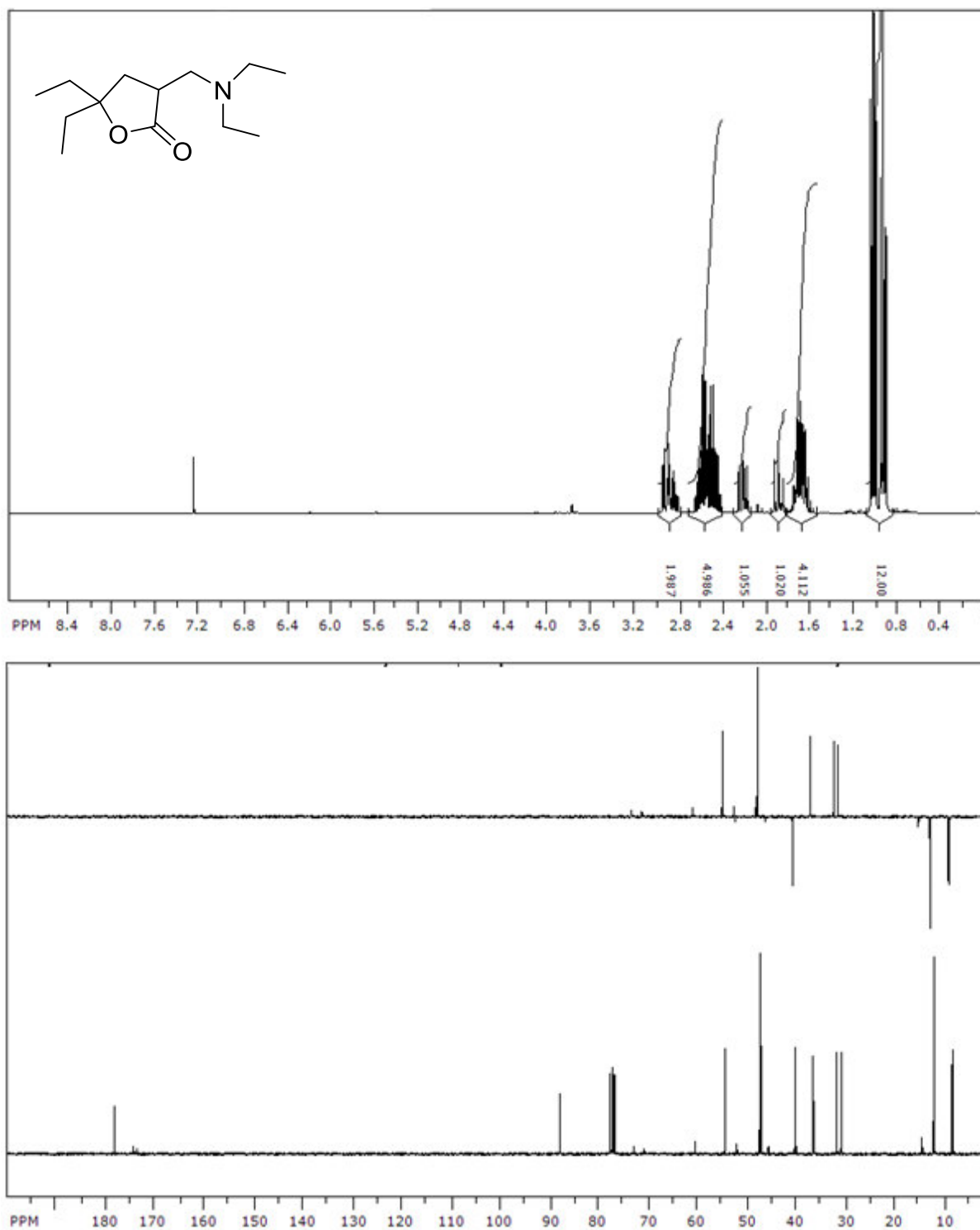
D. Spektrenanhang

3-((diethylamino)methyl)dihydrofuran-2(3H)-on (13a): CDCl<sub>3</sub>



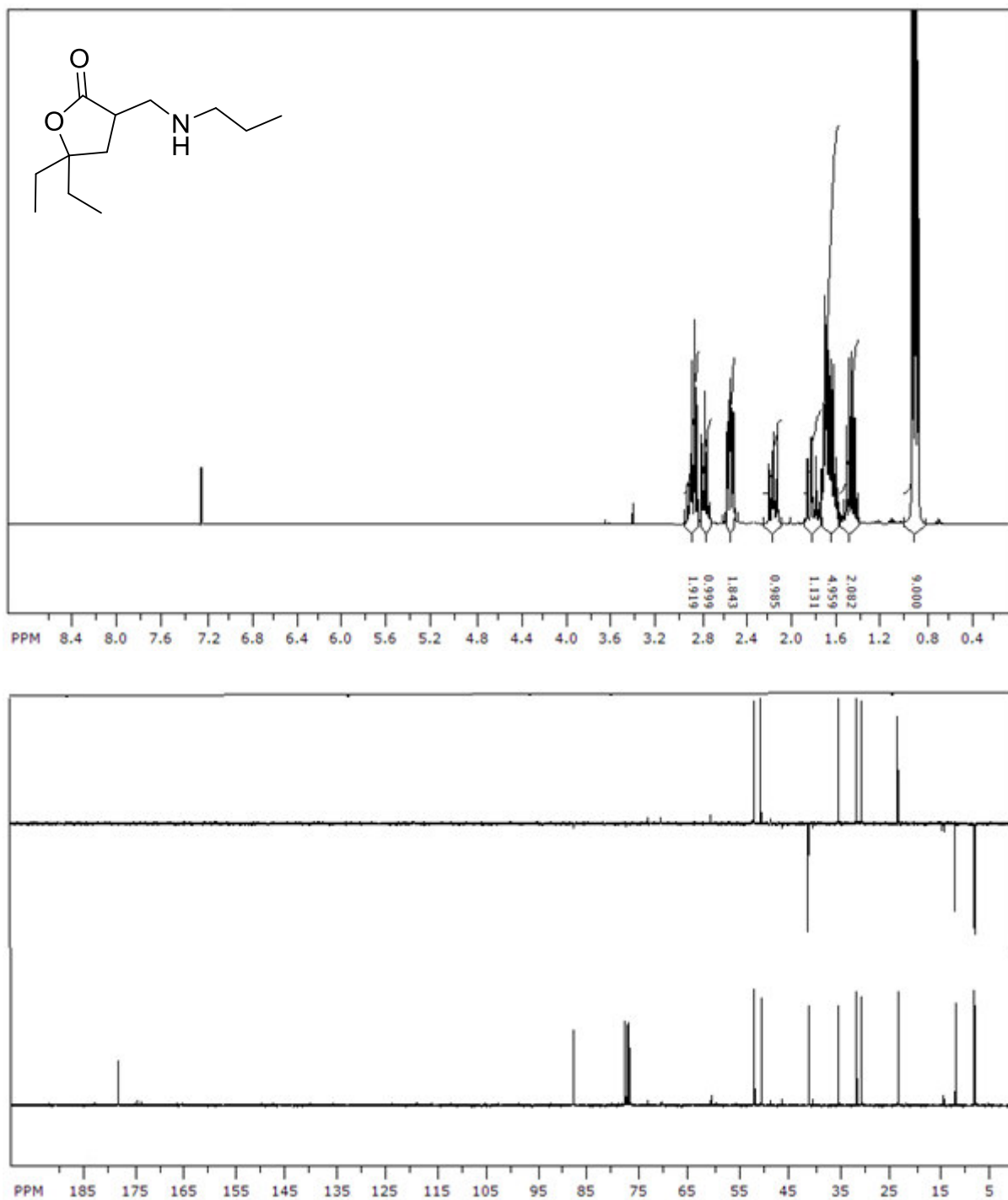
D. Spektrenanhang

3-((diethylamino)methyl)-5,5-diethyldihydrofuran-2(3H)-on (13c): CDCl<sub>3</sub>



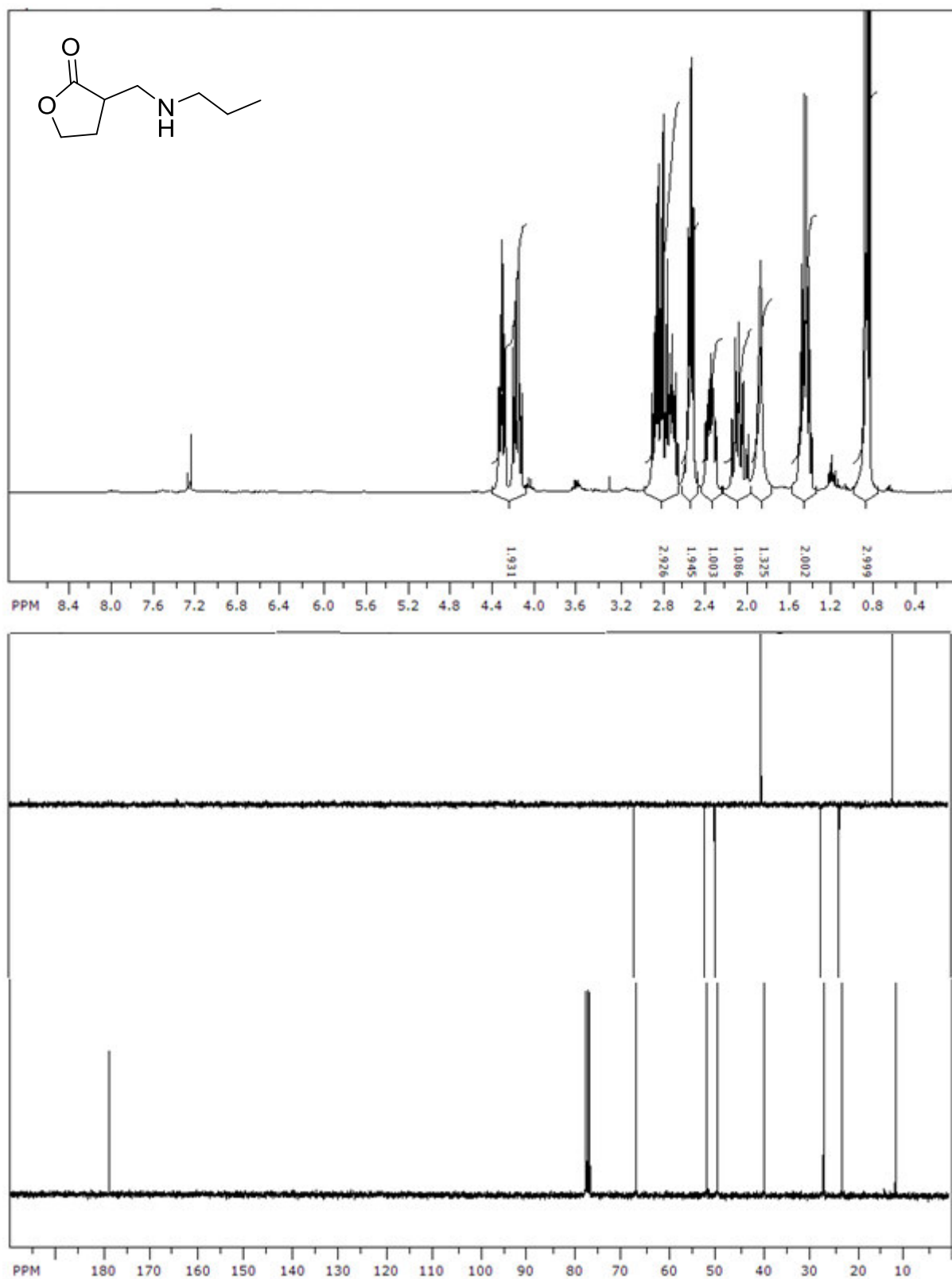
D. Spektrenanhang

**5,5-diethyl-3-((propylamino)methyl)dihydrofuran-2(3H)-on (13d): CDCl<sub>3</sub>**



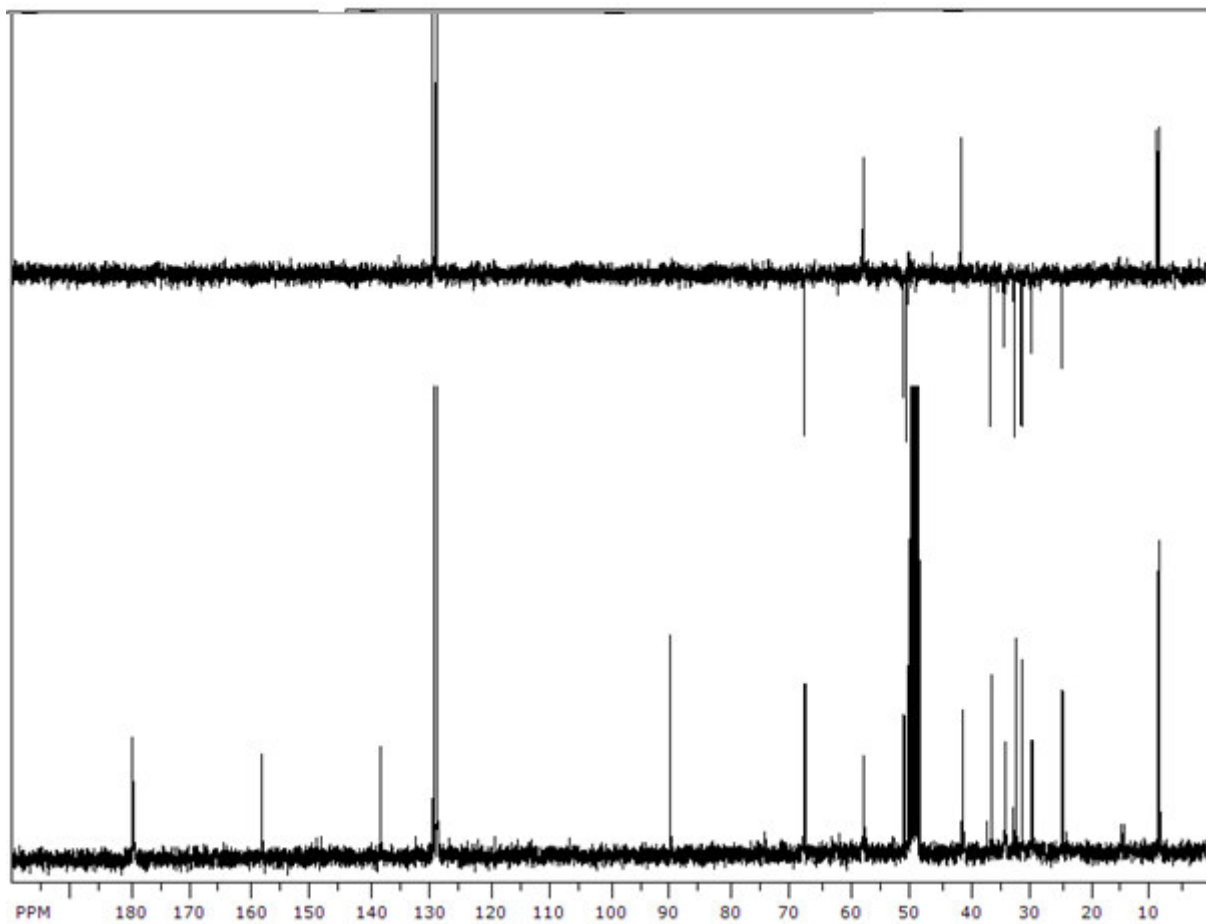
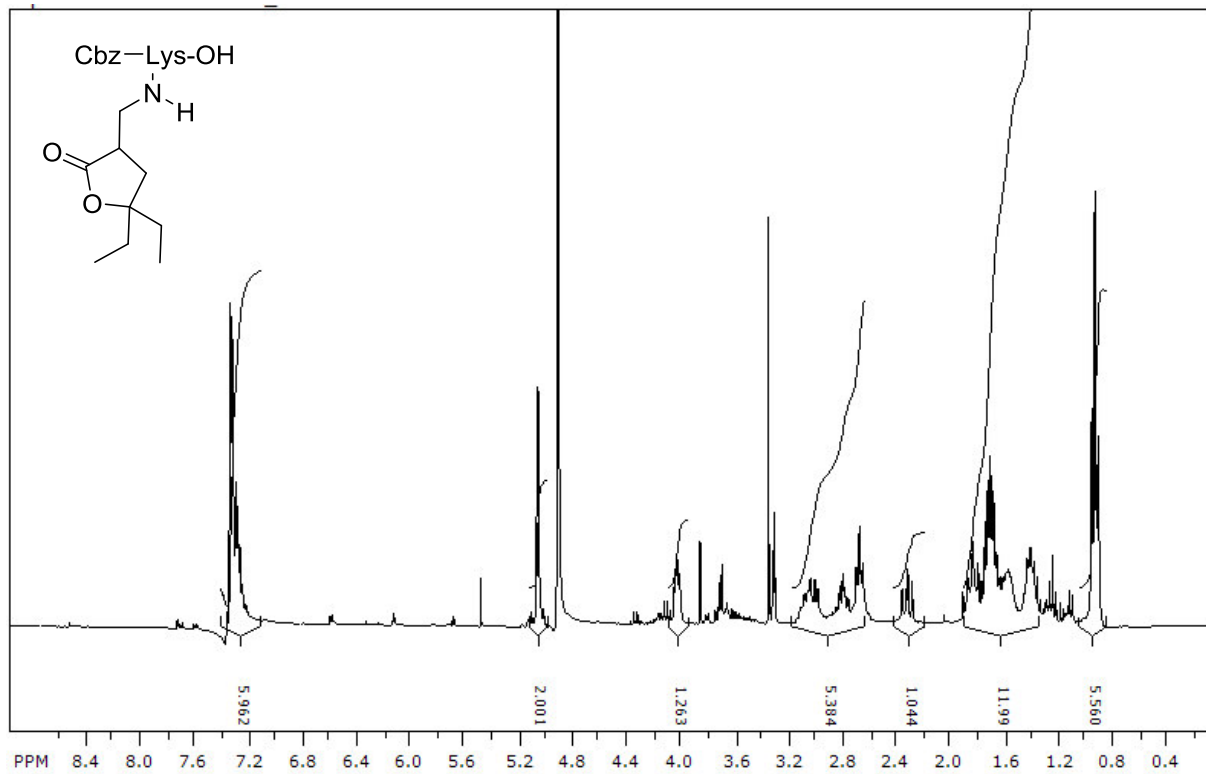
D. Spektrenanhang

3-((propylamino)methyl)dihydrofuran-2(3H)-on (13b): CDCl<sub>3</sub>



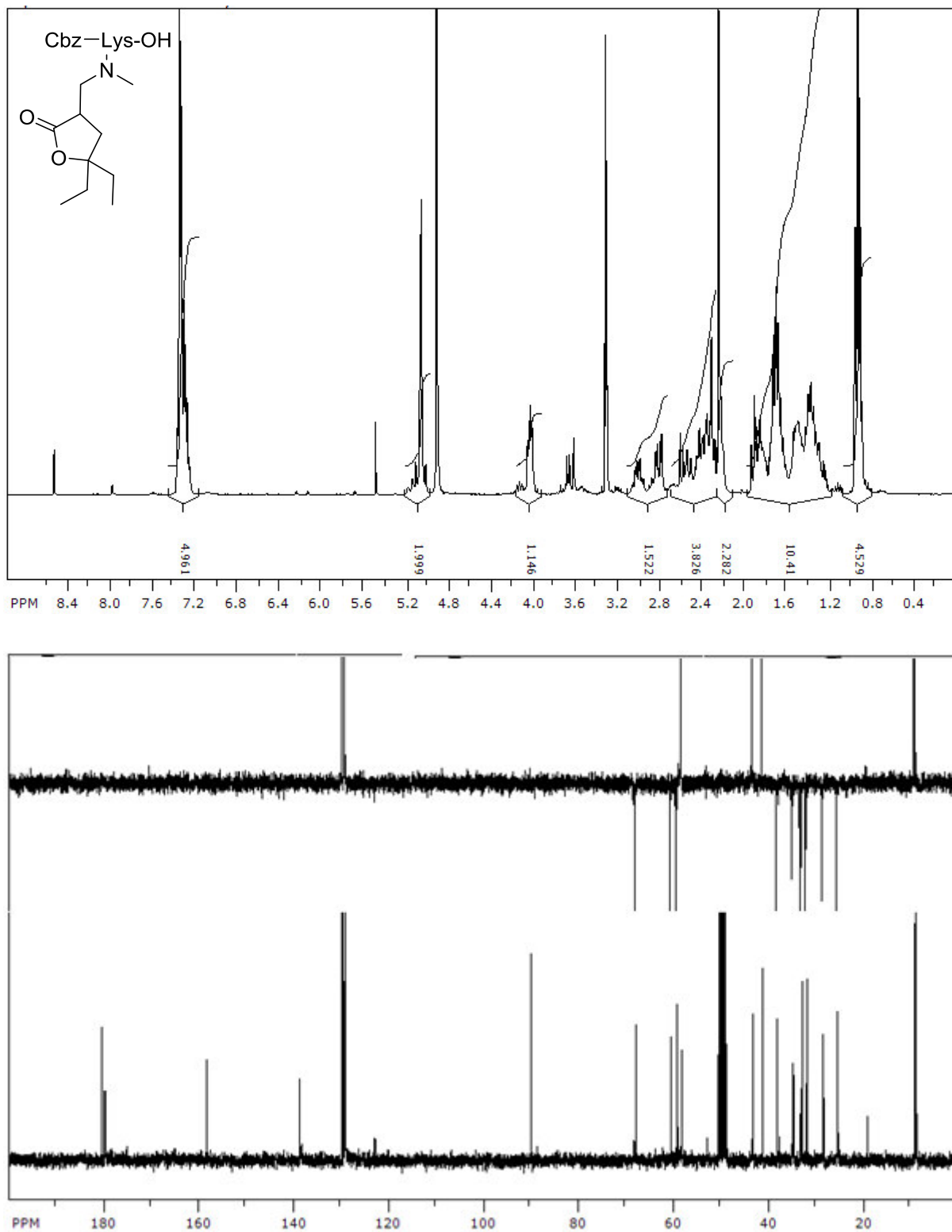
D. Spektrenanhang

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine  
(42a): MeOD**



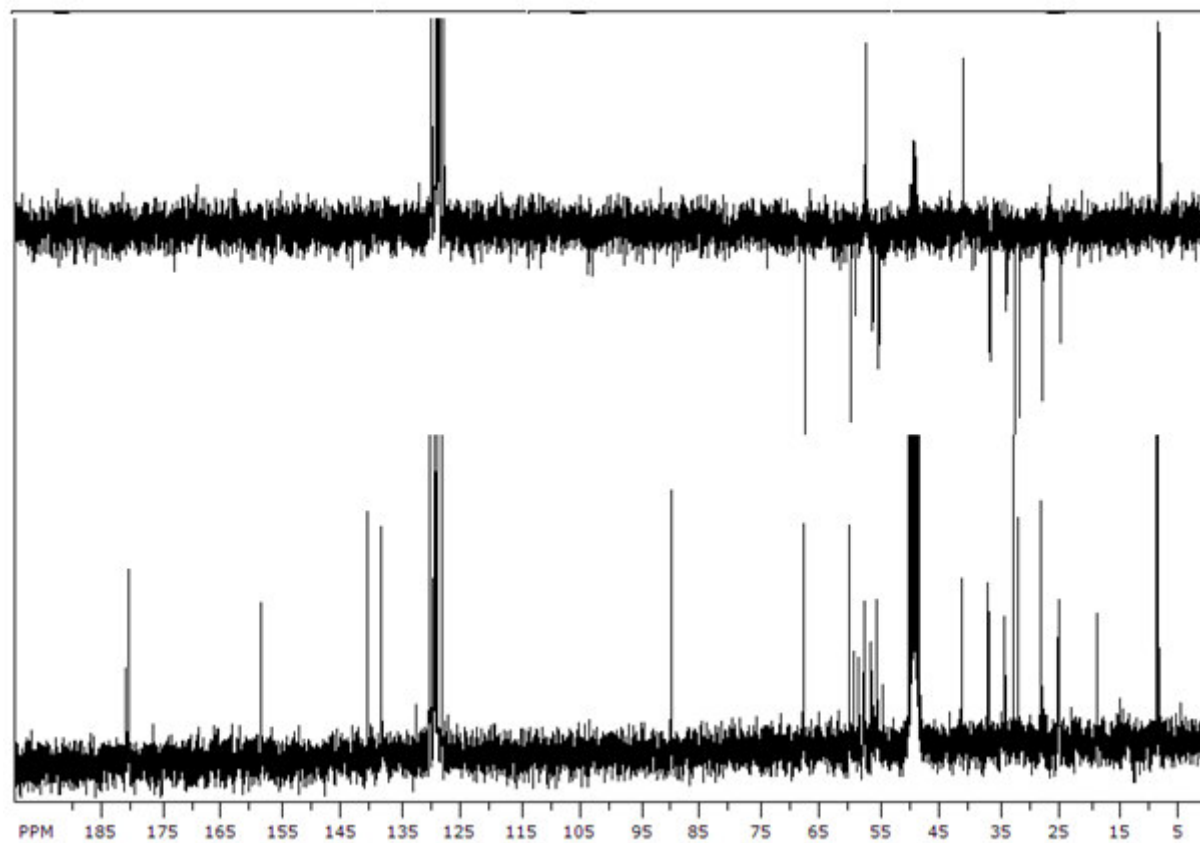
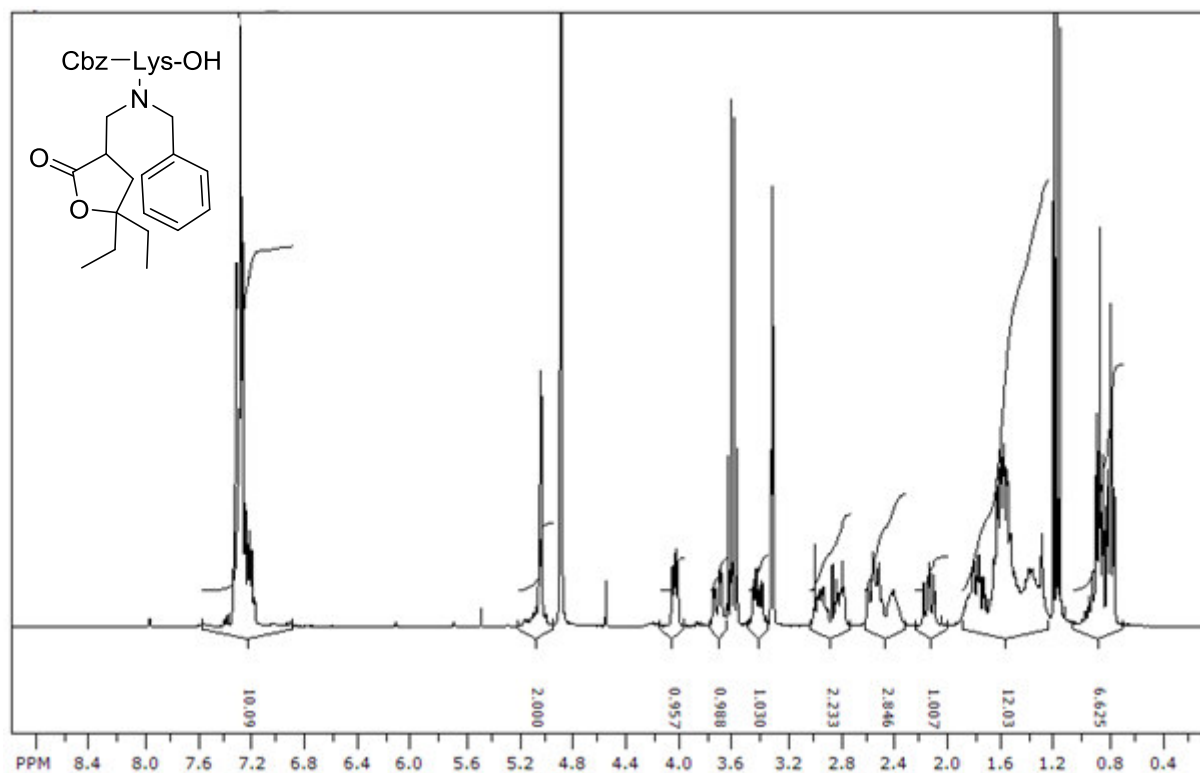
D. Spektrenanhang

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-N6-methyl-L-lysine (42b): MeOD**



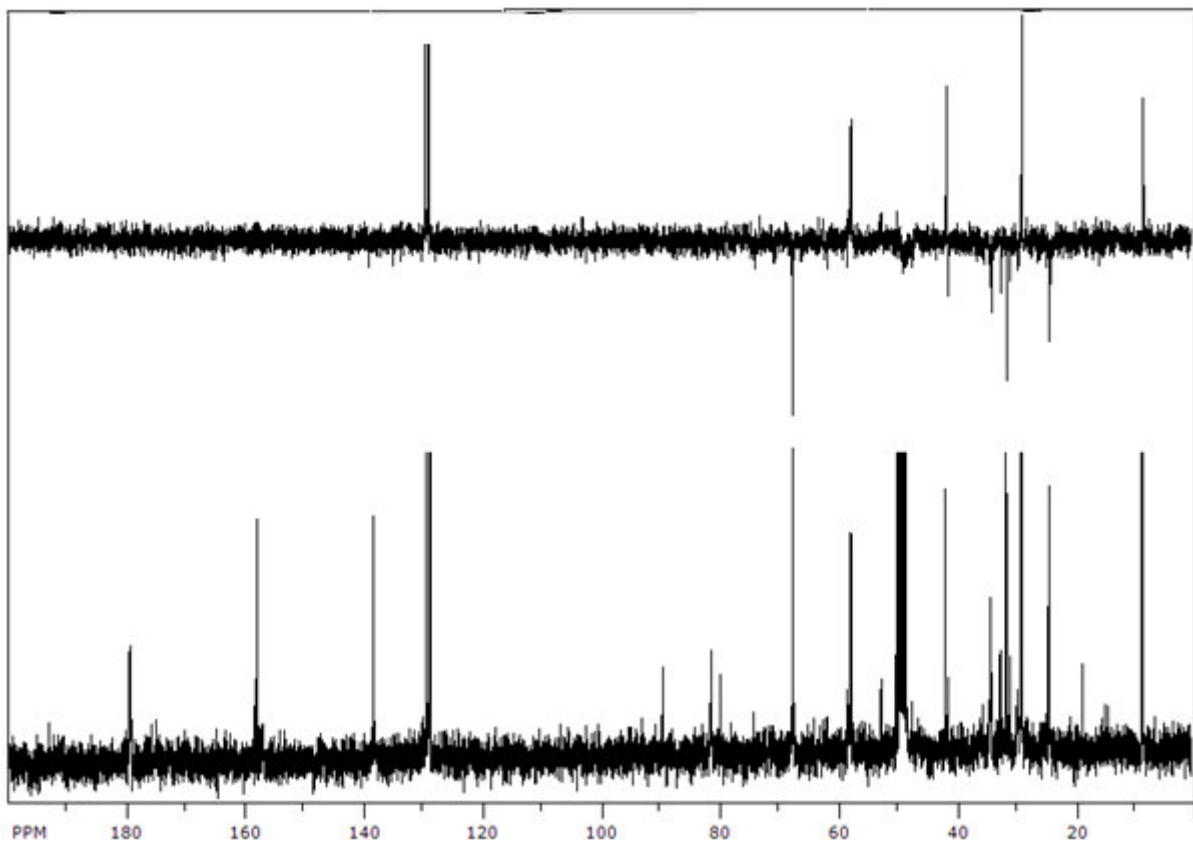
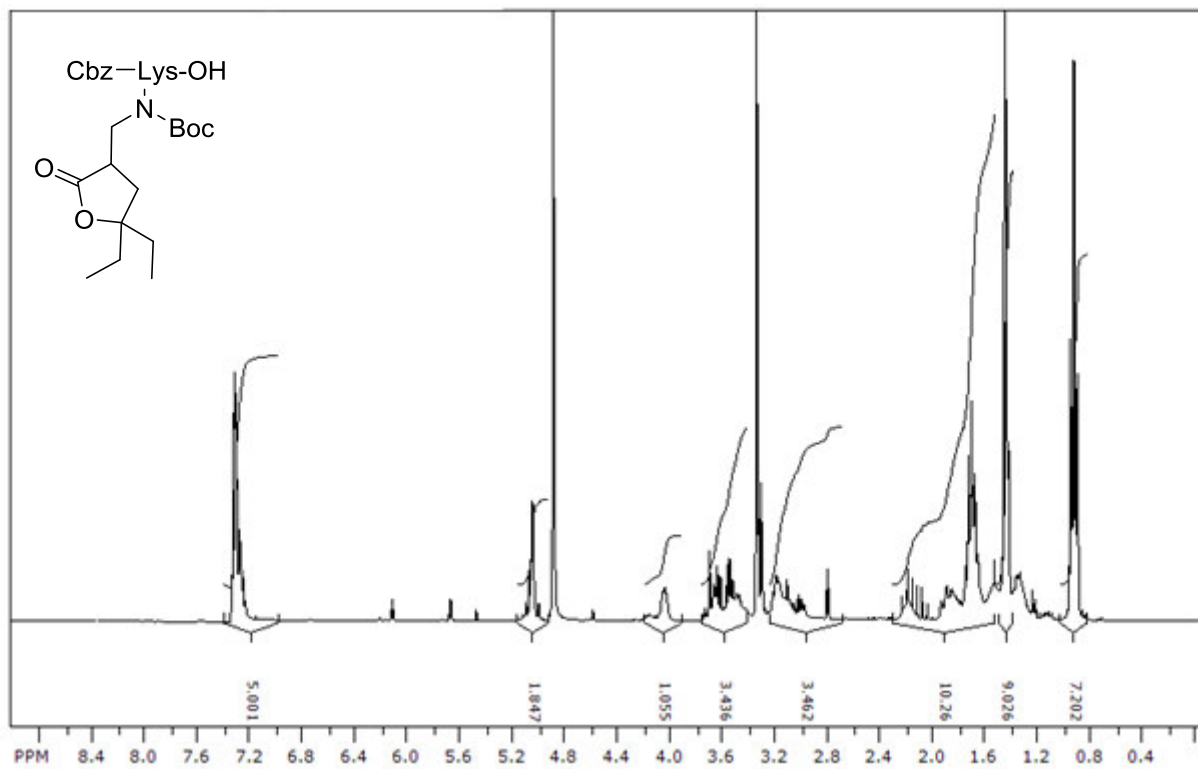
## D. Spektrenanhang

### N6-benzyl-N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine (42c): MeOD



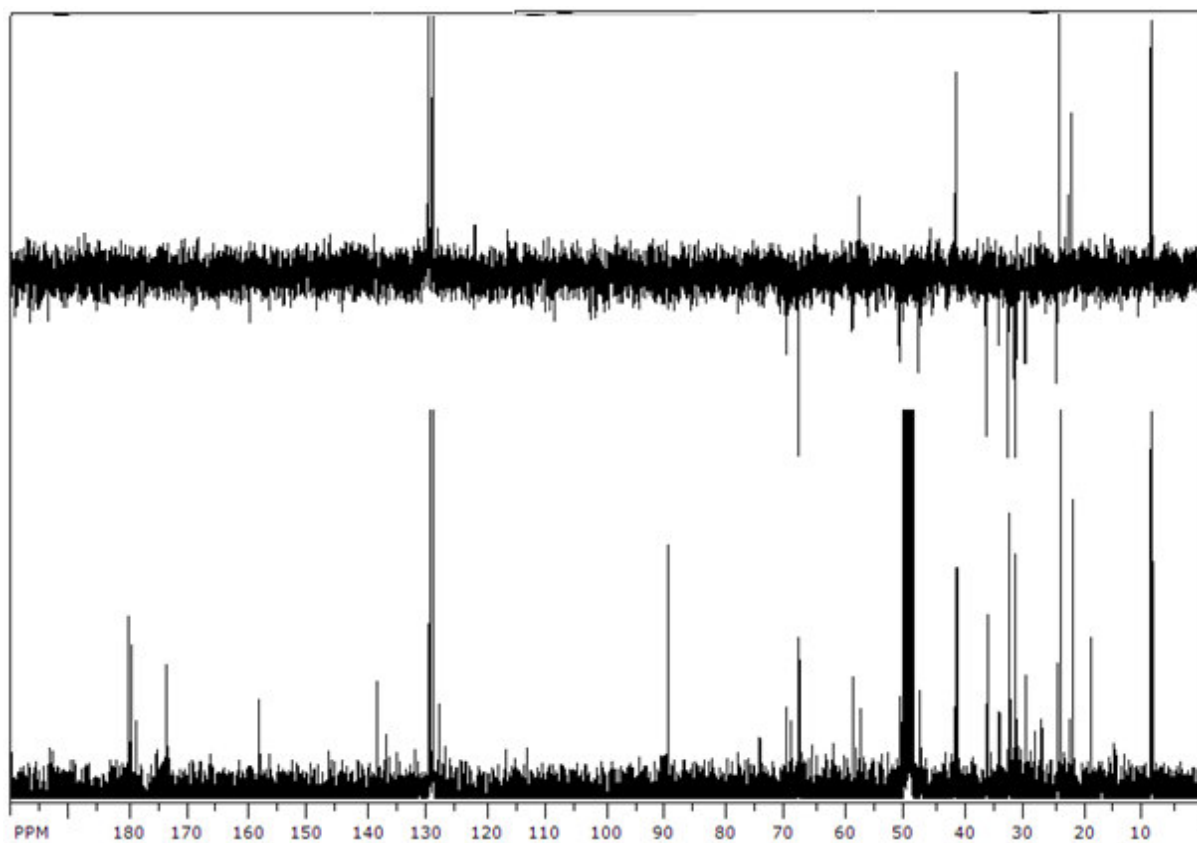
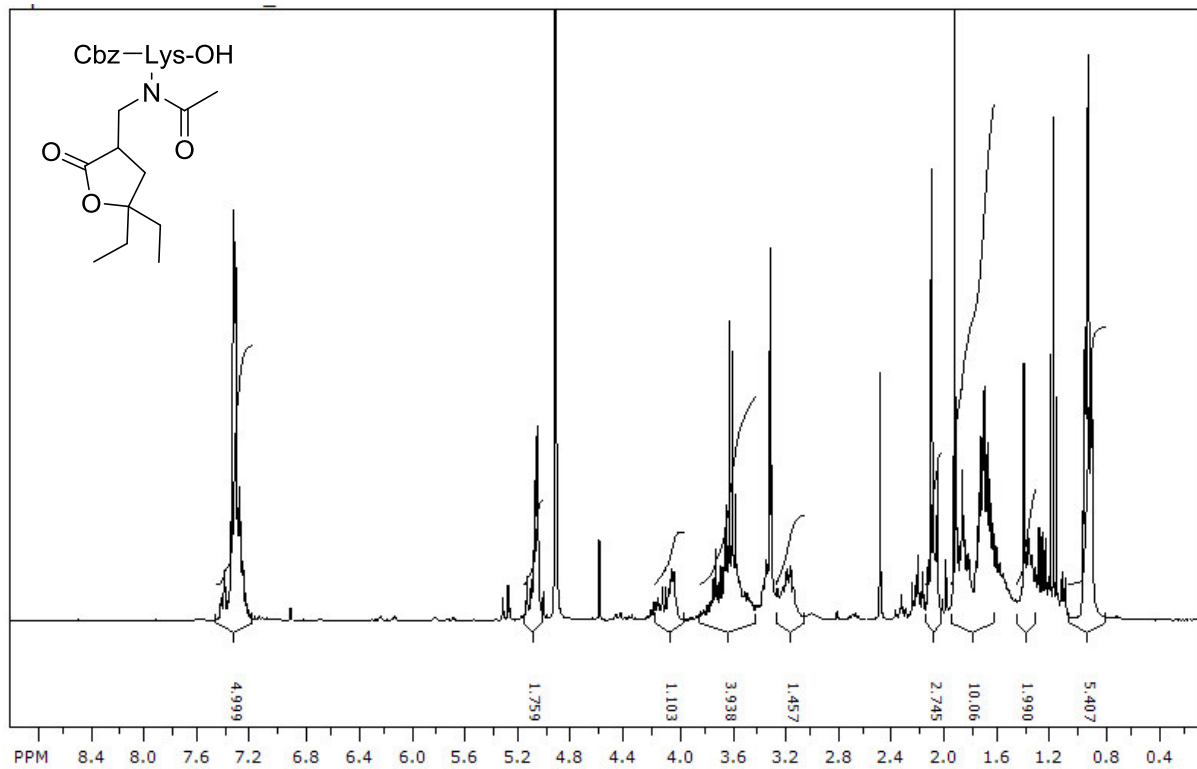
## D. Spektrenanhang

### N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(tert-butoxycarbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysin (42d): MeOD



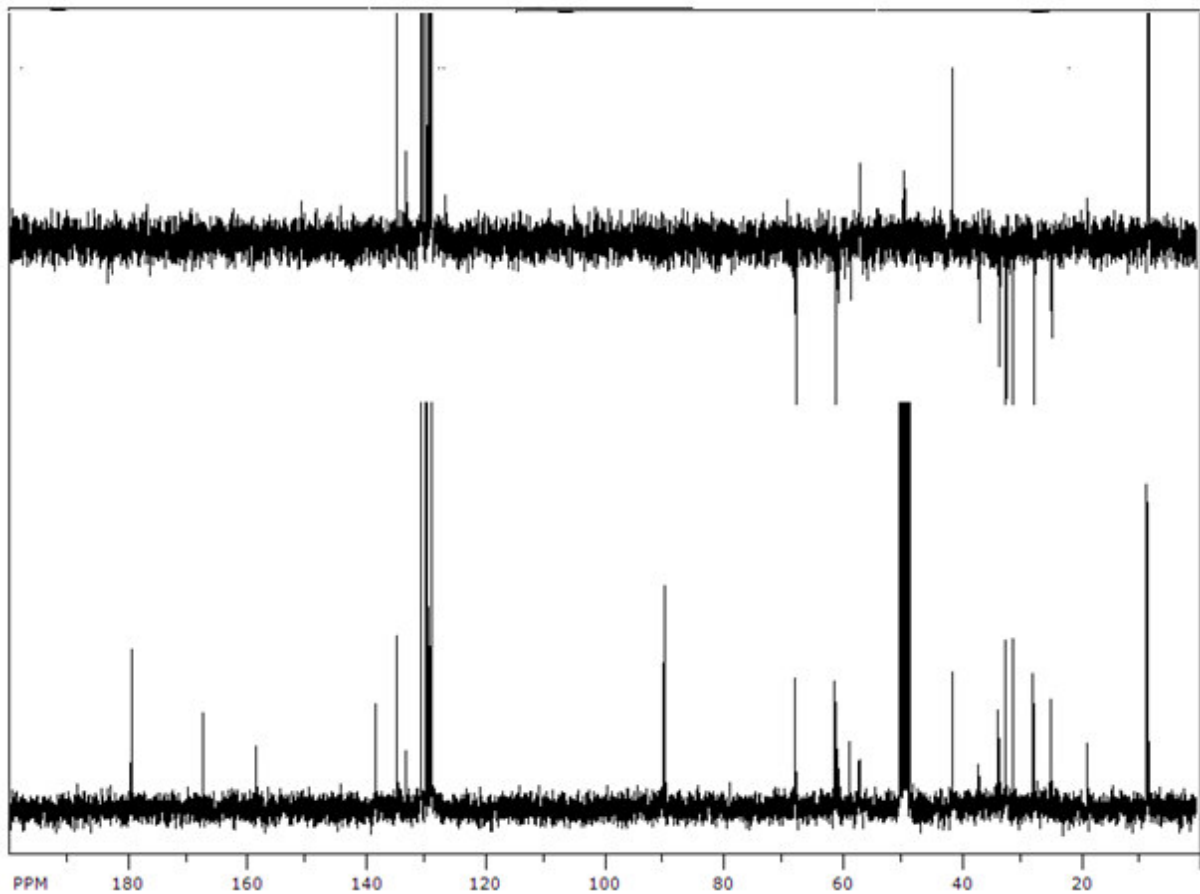
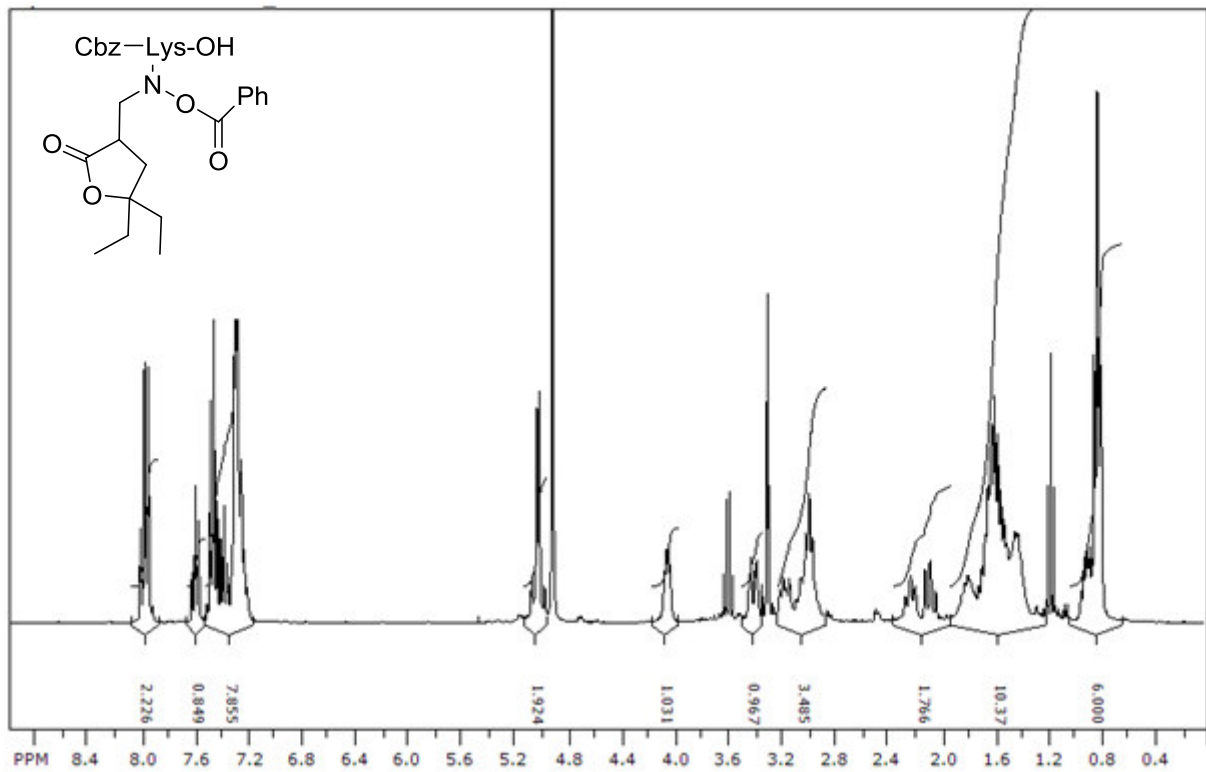
## D. Spektrenanhang

### N6-acetyl-N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine (42e): MeOD



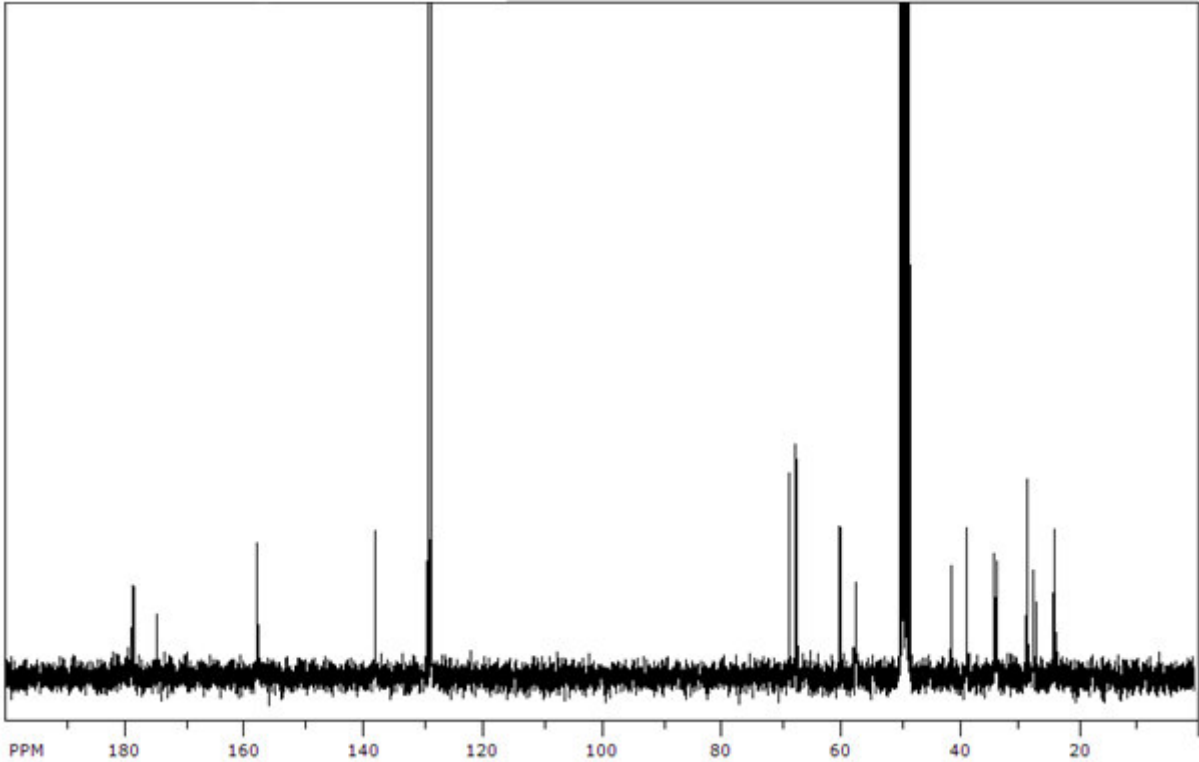
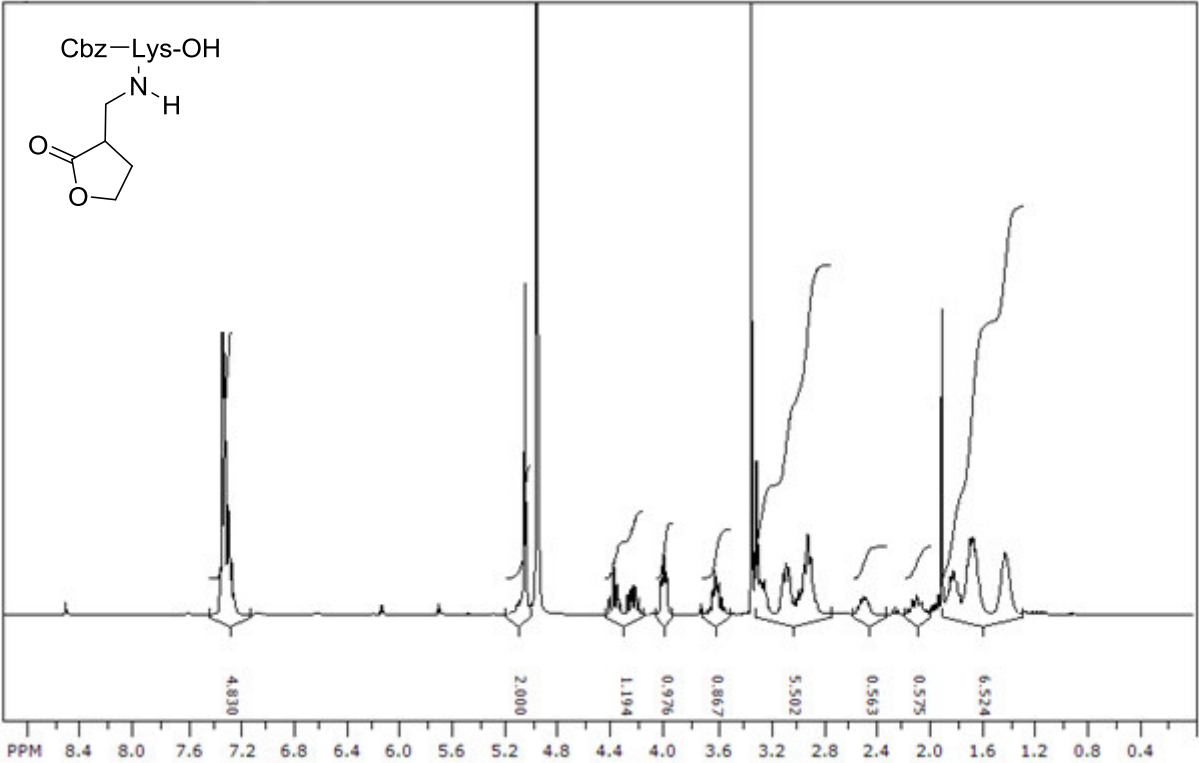
D. Spektrenanhang

**N6-(benzyloxy)-N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine (42f): MeOD**



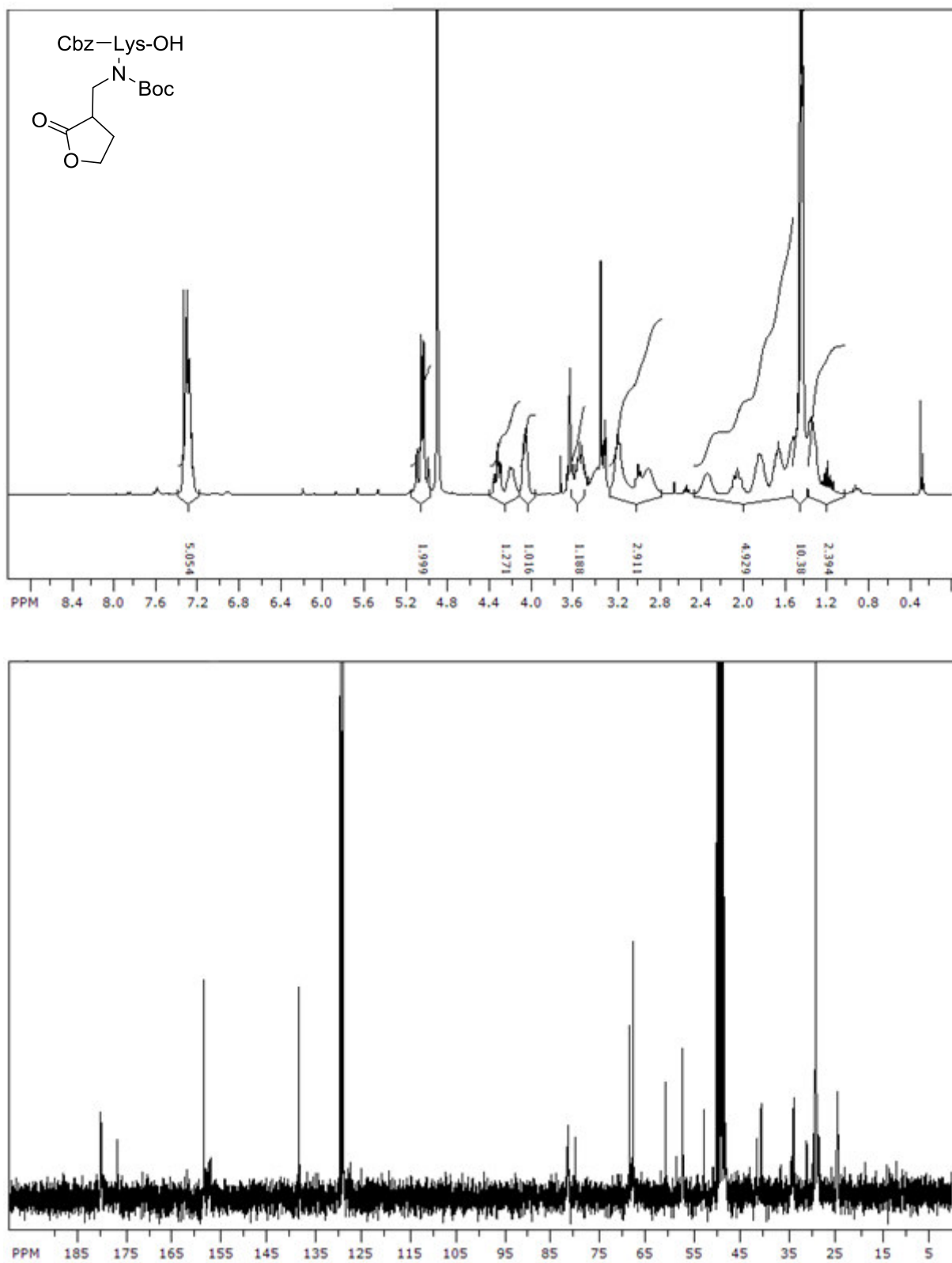
D. Spektrenanhang

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine (42g): MeOD**



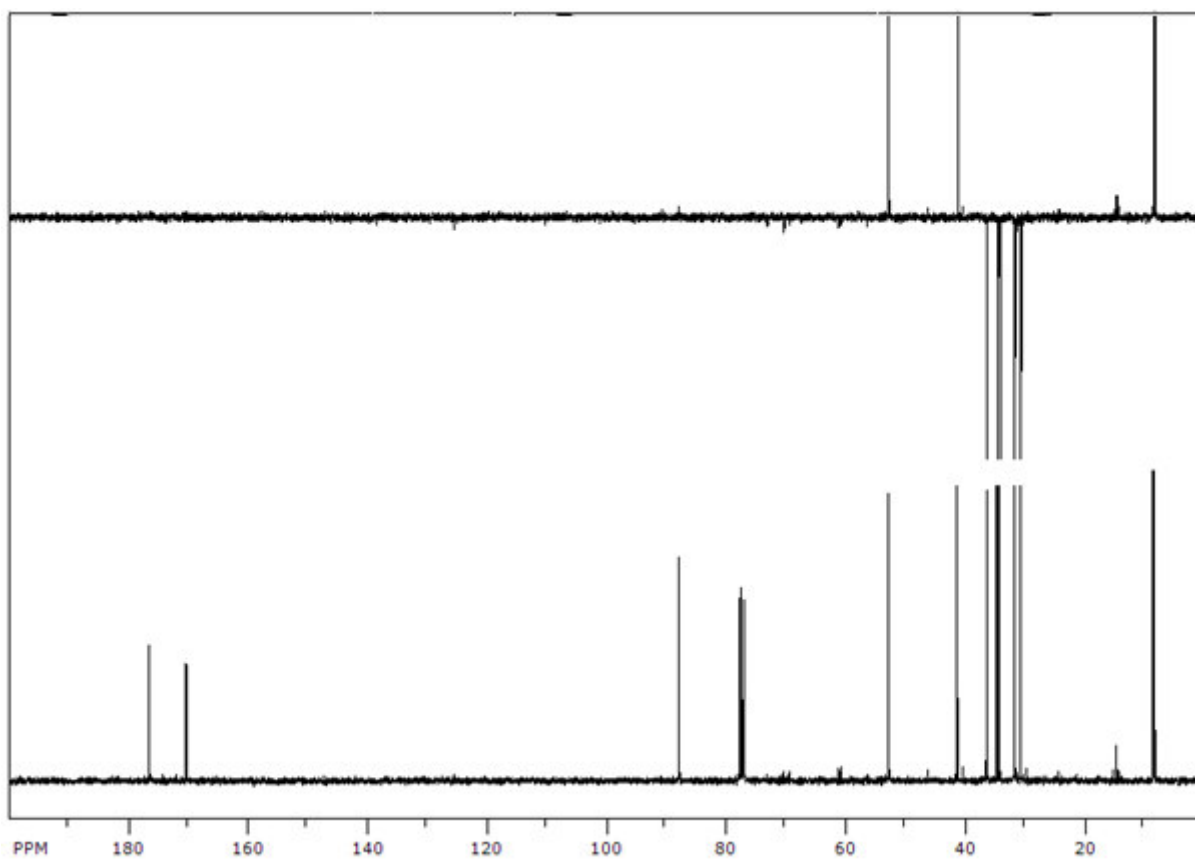
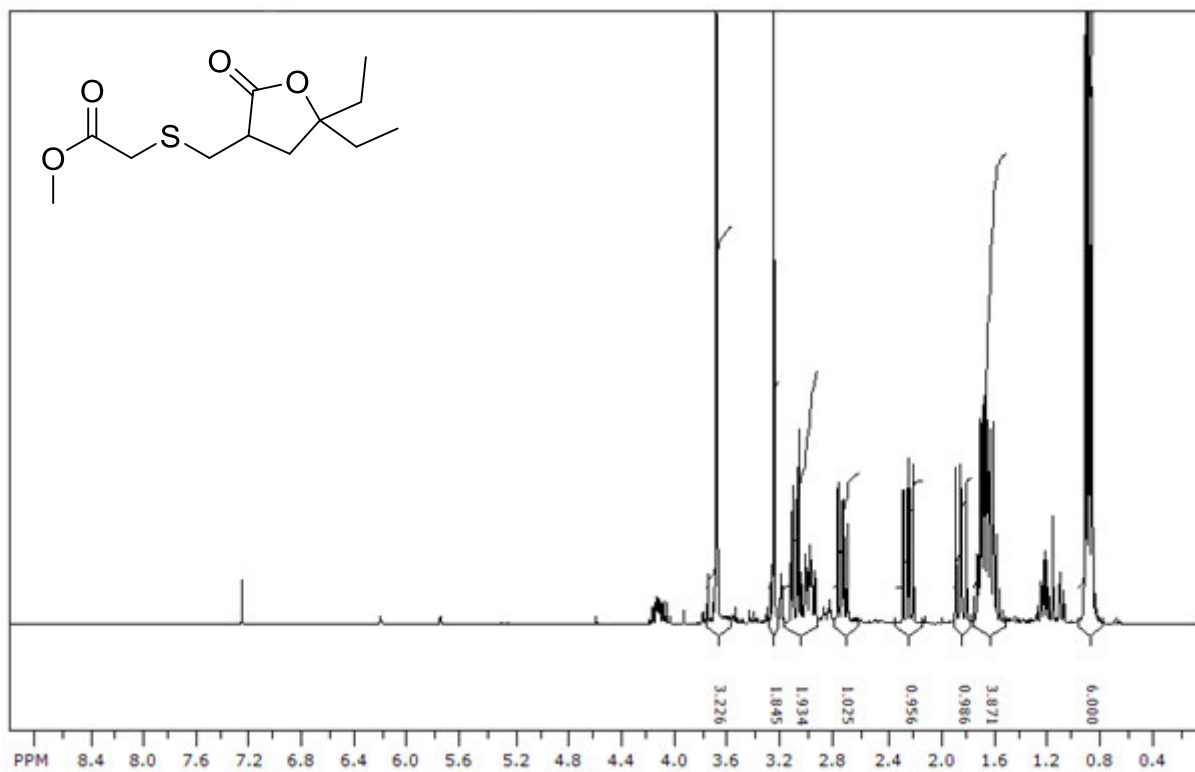
## D. Spektrenanhang

### N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(tert-butoxycarbonyl)-N6-((2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysine (42h): MeOD



D. Spektrenanhang

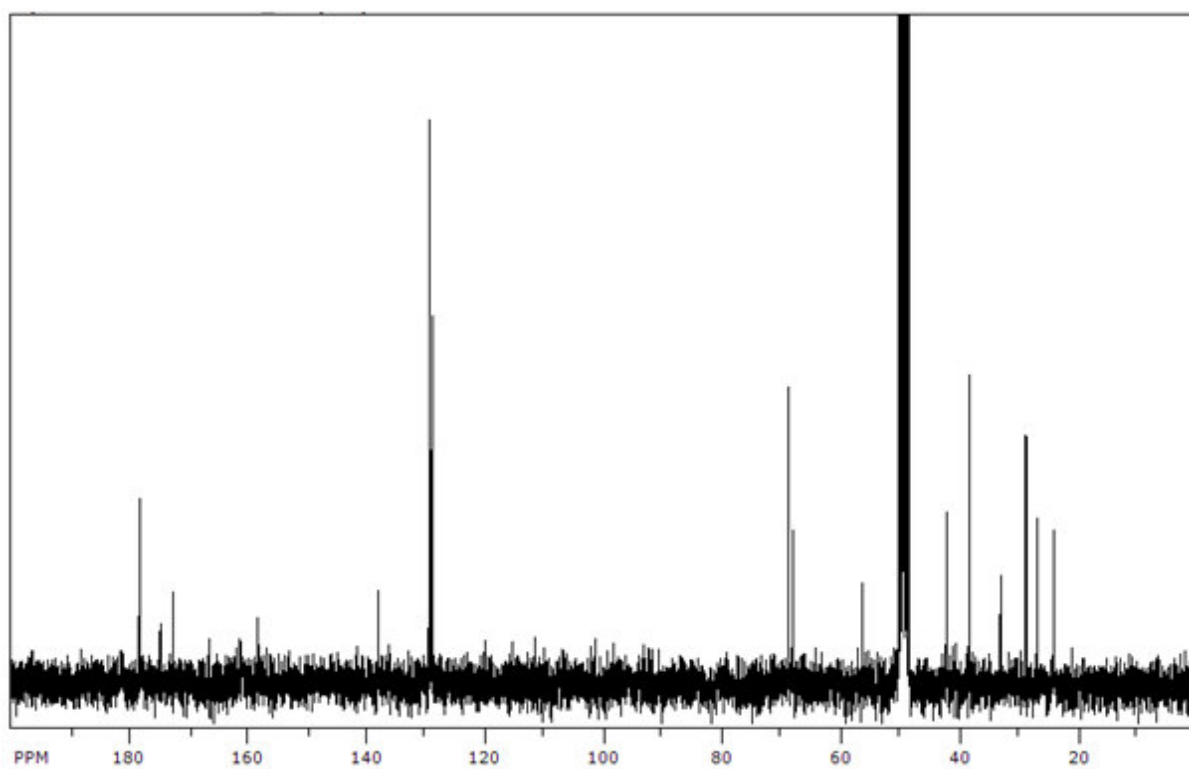
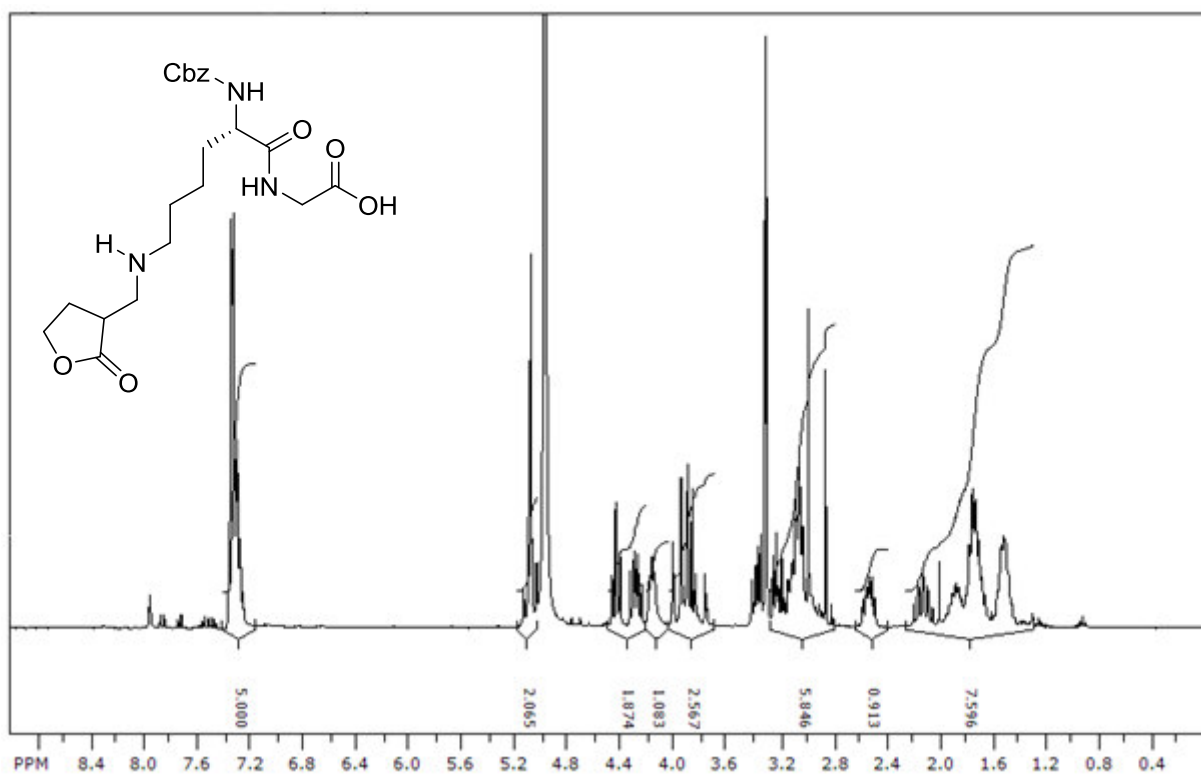
**methyl 2-(((5,5-diethyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)thio)acetat (41): CDCl<sub>3</sub>**



D. Spektrenanhang

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-((2-oxotetrahydrofuran-3-yl)methyl)-L-lysylglycin (50)**

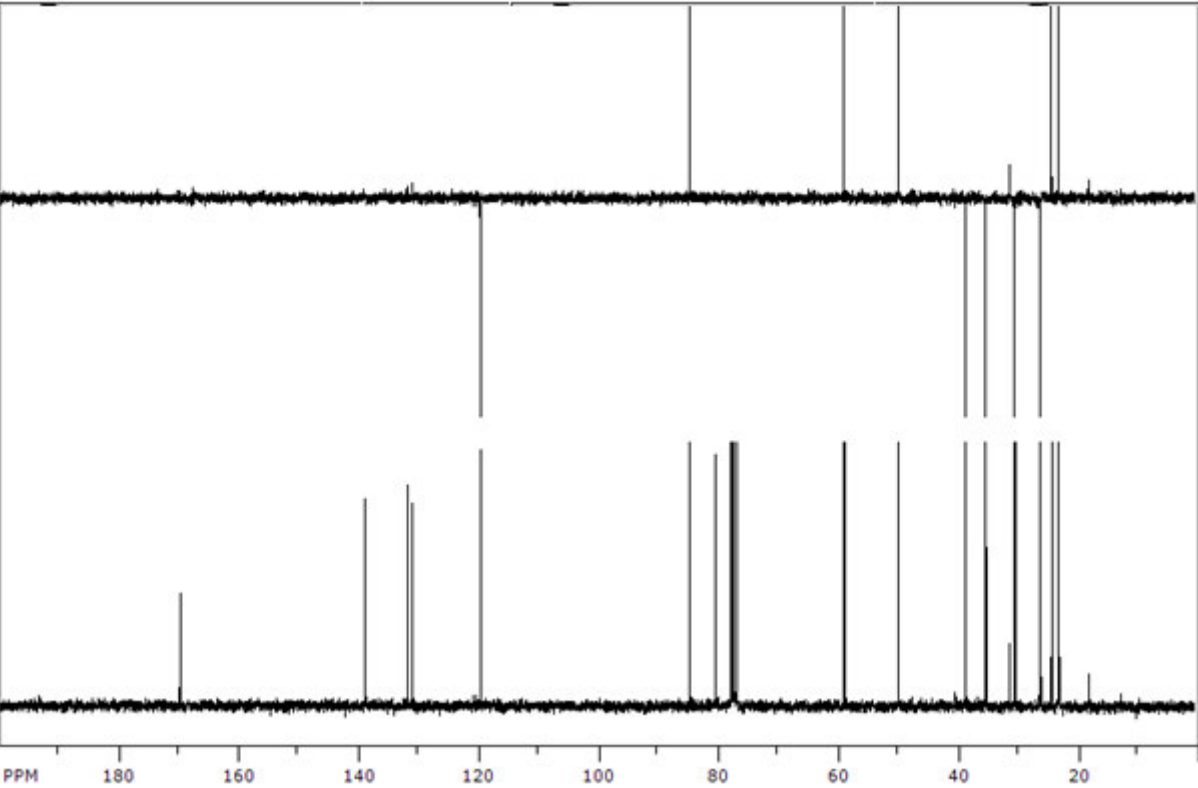
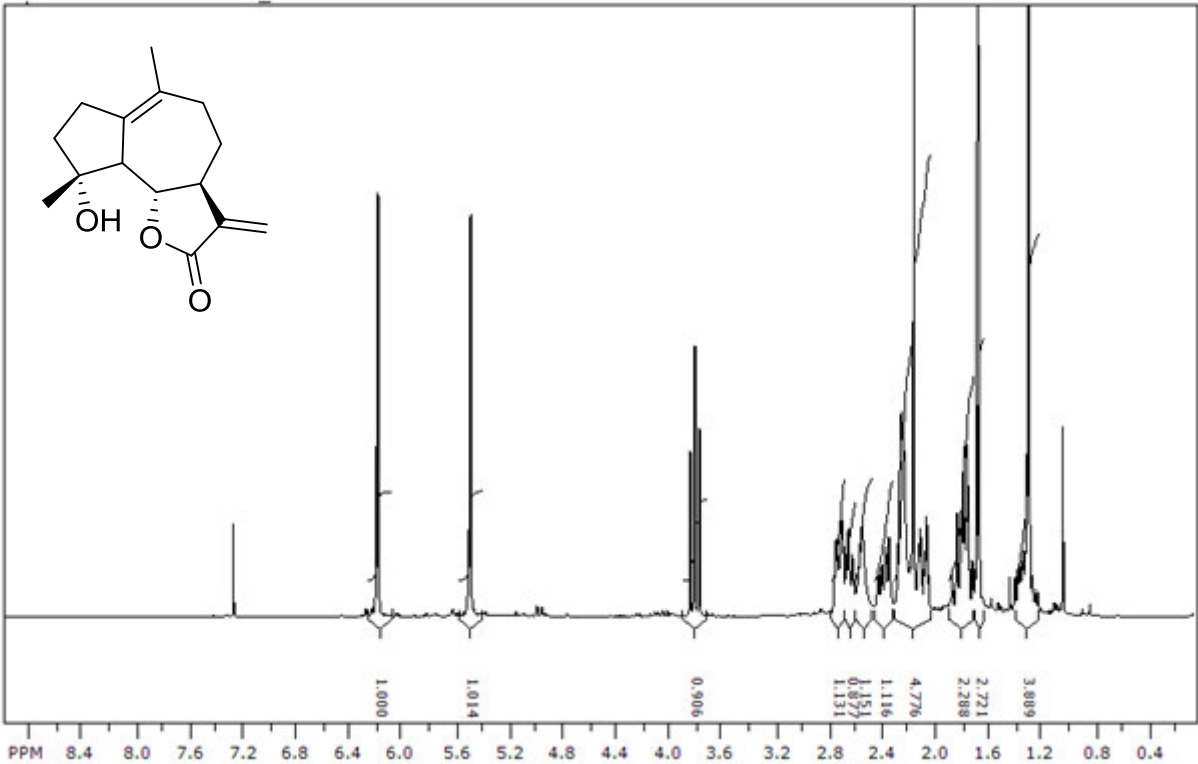
[116]: MeOD





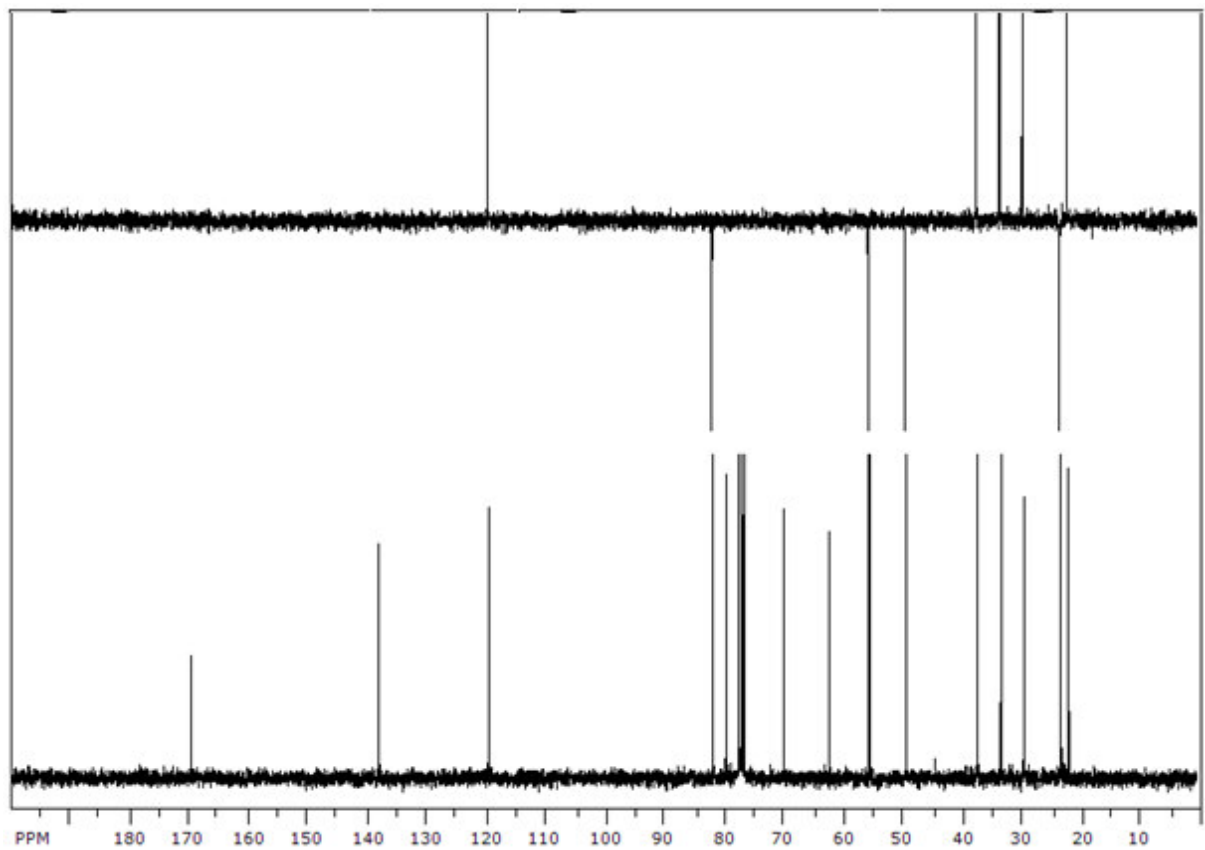
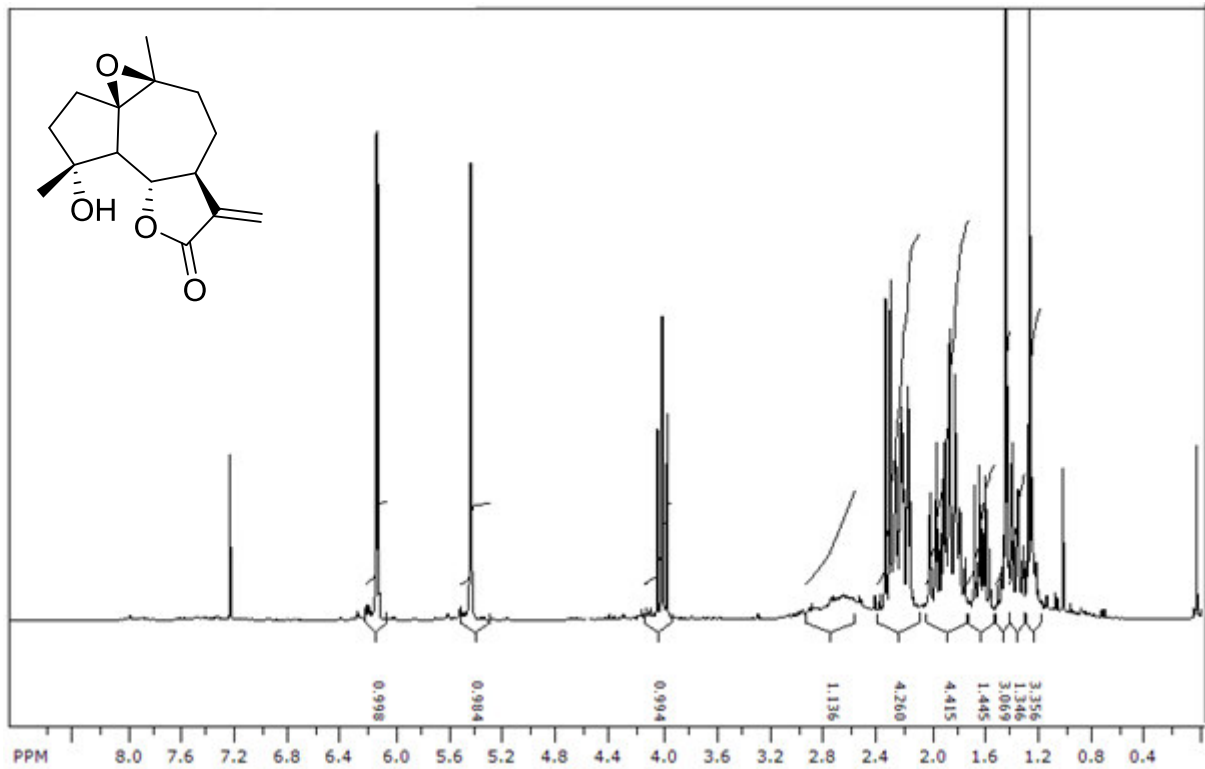
D. Spektrenanhang

Micheliolid (54): CDCl<sub>3</sub>



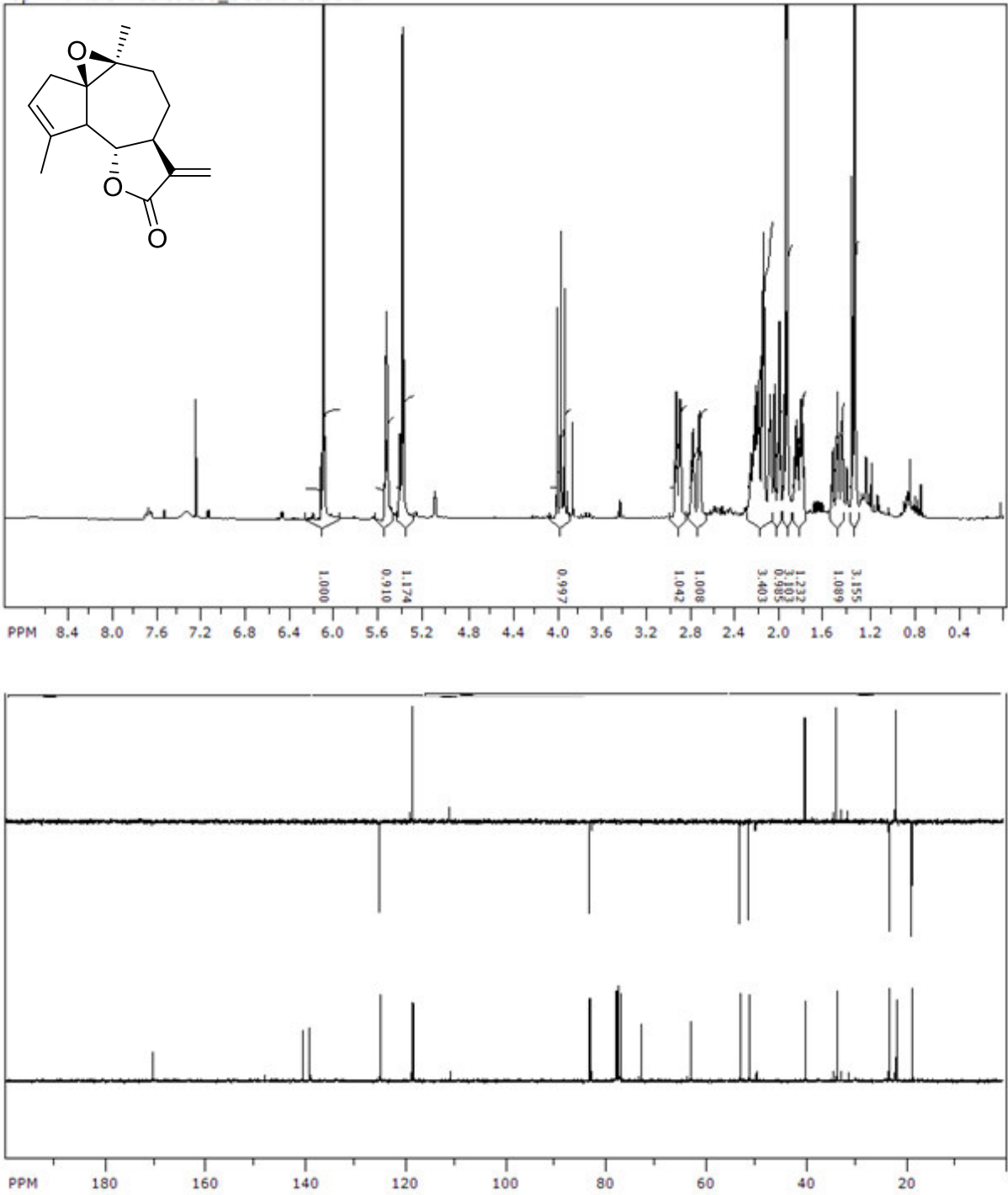
D. Spektrenanhang

**(1R,3aR,4aS,6aS,9aS)-1-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-methyleneoctahydro-1H-oxireno[2',3':8,8a]azuleno[4,5-b]furan-8(4aH)-on (55): CDCl<sub>3</sub>**



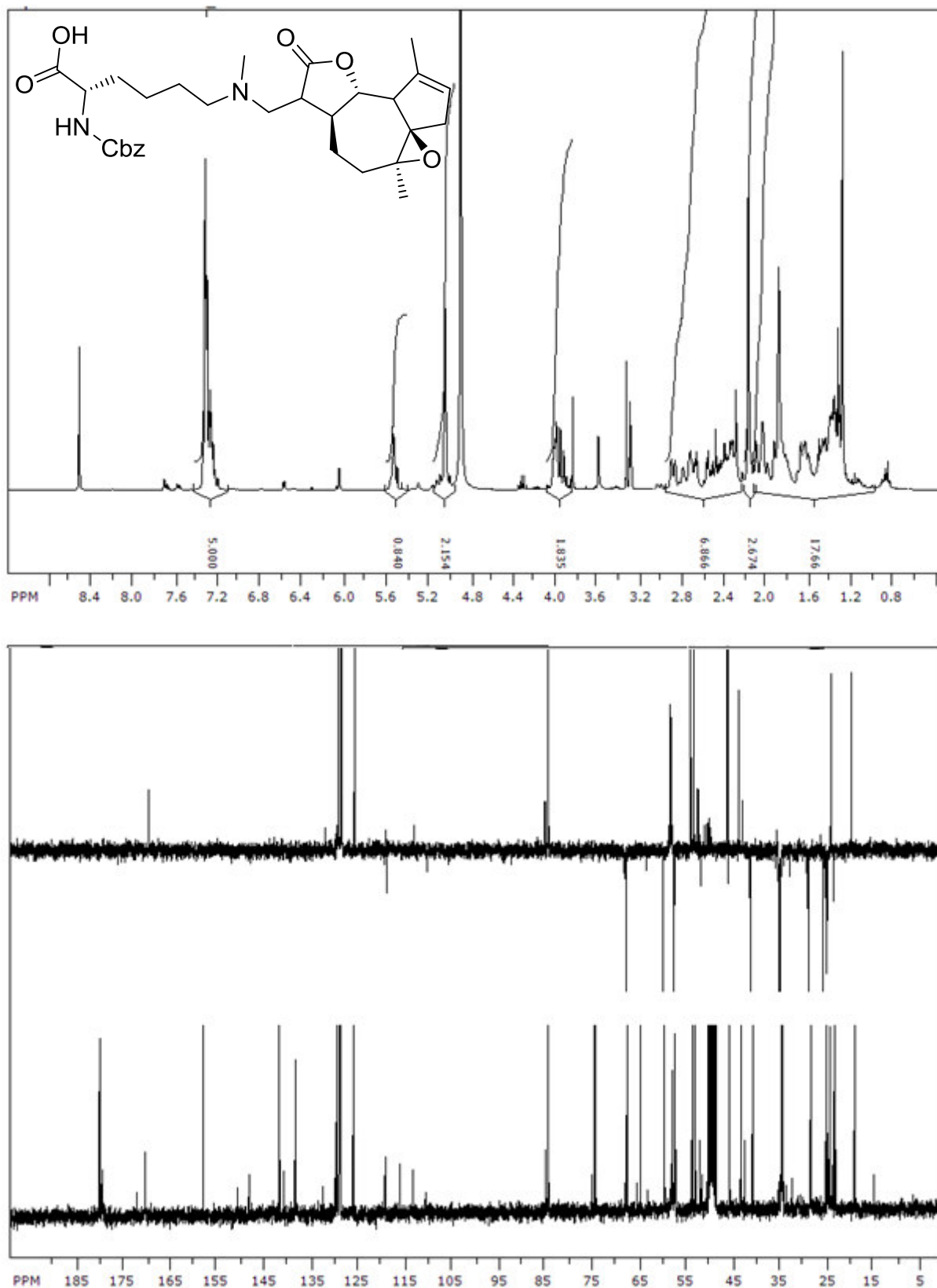
D. Spektrenanhang

Arglabin (1): CDCl<sub>3</sub>



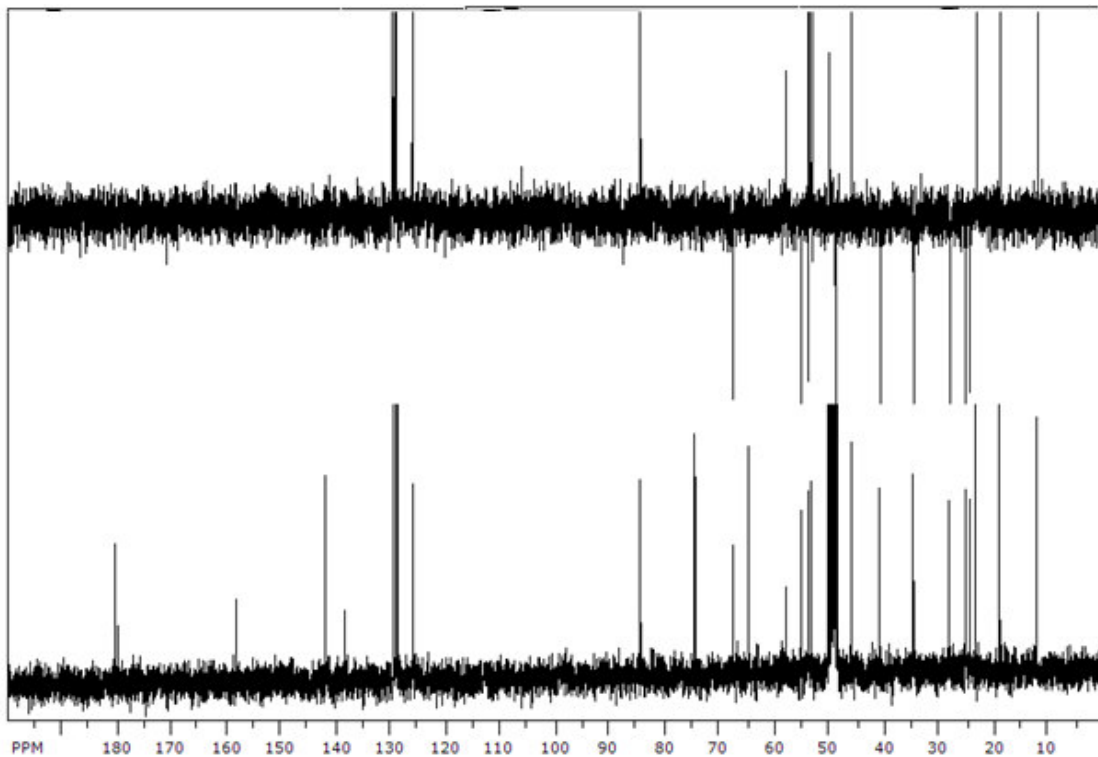
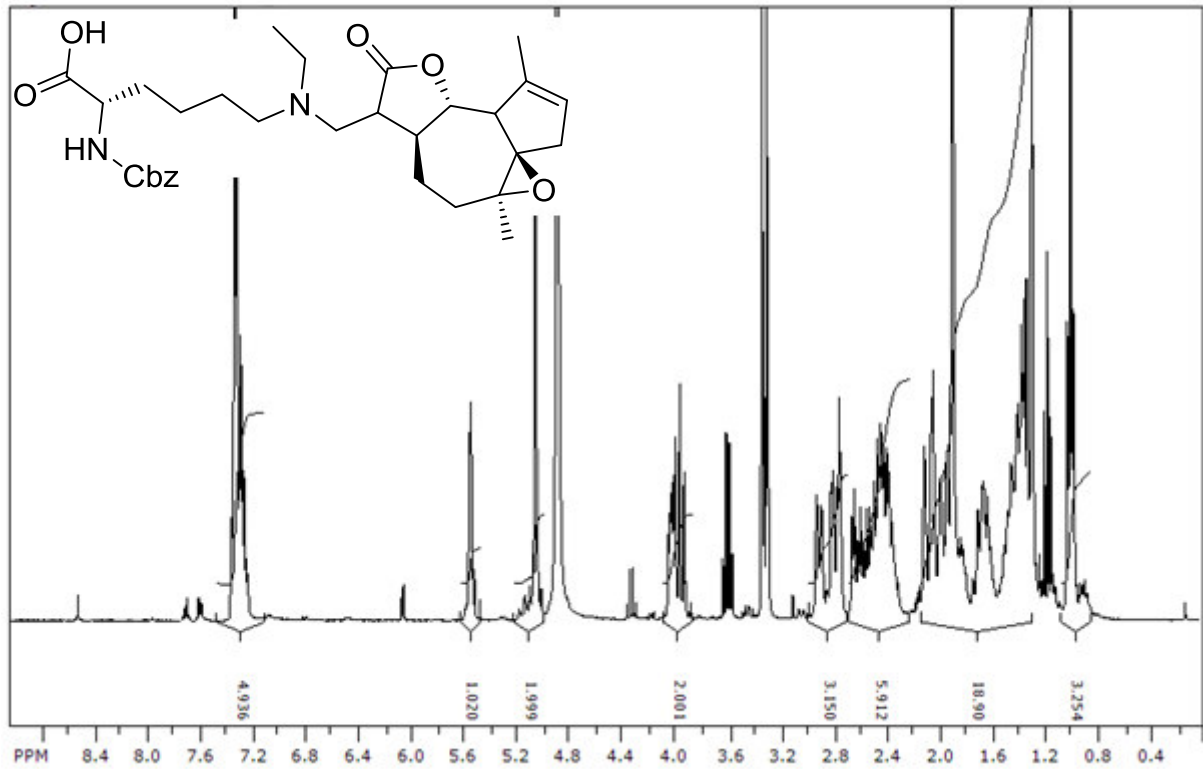
D. Spektrenanhang

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(((3aR,4aS,6aS,9aS)-1,4a-dimethyl-8-oxo-4a,5,6,6a,7,8,9a,9b-octahydro-3H-oxireno[2',3':8,8a]azuleno[4,5-b]furan-7-yl)methyl)-N6-methyl-L-lysine (57): MeOD**



D. Spektrenanhang

**N2-((benzyloxy)carbonyl)-N6-(((3aR,4aS,6aS,9aS)-1,4a-dimethyl-8-oxo-4a,5,6,6a,7,8,9a,9b-octahydro-3H-oxireno[2',3':8,8a]azuleno[4,5-b]furan-7-yl)methyl)-N6-ethyl-L-lysine (58): MeOD**



## **E. Danksagung**

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Oliver Reiser für die stetige Hilfe und gute Betreuung.

Weiterhin gilt mein Dank meinen ehemaligen Laborkollegen Santosh, Myungmo, Sharif und allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich bei der zentralen Analytik für ihr stets offenes Ohr und ihre großartige Arbeit.

Herzlichen Dank an Dr. Ute Friedrich für die langjährige Freundschaft.

Großen Dank auch an meine Familie für die stete Unterstützung.

Herzlichen Dank an Dennis Worm vom AK Prof. Dr. Beck-Sickinger der Universität Leipzig für die Kupplung an Peptide.

Weiterhin möchte ich mich bei PD. Dr. Sabine Amslinger für die biologische Testung an ihrem Arbeitskreis (durch Dr. Hannelore Rücker, Dr. Nafisah al-Rifai und Dita Fritsch) bedanken.

## F. Lebenslauf

### Sabrina Fürst

#### Persönliche Angaben:

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 12.03.1987

Geburtsort: München

#### Ausbildung:

1993 - 1995 Volksschule Rottenburg a. d. Laaber

1995 - 1997 Grundschule Birkenallee, Uetersen (Schleswig Holstein)

1997 - 1999 Ludwig-Meyn-Gymnasium, Uetersen

1999 - 2002 Deutsche Schule Brüssel (Gymnasium)

2002 – 2006 Gymnasium Neutraubling

*Allgemeine Hochschulreife*

2006 – 2009 Bachelorstudium in Regensburg

10/2009 *Bachelorabschluss Chemie*

2009-2012 Masterstudium in Regensburg

10/2012 *Masterabschluss Chemie*

*“Investigations of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones and their corresponding Michael-amines” bei Prof. Dr. Oliver Reiser*

2012 - 2017 Promotion in Regensburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Reiser

F. Lebenslauf

**Doktorvater:**

**Prof. Dr. Oliver Reiser**

Institut für organische Chemie

Universität Regensburg

Universitätsstr. 31

D-93053 Regensburg

+49 941 943 3146

[oliver.reiser@chemie.uni-regensburg.de](mailto:oliver.reiser@chemie.uni-regensburg.de)

## G. Literaturverzeichnis

- [1] O. Fritsche, *Biologie für Einsteiger*, Zweite Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2015**
- [2] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**
- [3] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 10, © with permission from publisher
- [4] O. Fritsche, *Biologie für Einsteiger*, Zweite Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2015**
- [5] <https://de.wikipedia.org/wiki/Zellmembran>, [6.2.17]
- [6] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 163
- [7] J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2014**, S. 365
- [8] J. Bai, R. E. Pagano, *Biochemistry*, **1997**, 36, 8840
- [9] <https://de.wikipedia.org/wiki/Zellmembran>, [6.2.17]
- [10] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 164
- [11] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 166
- [12] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 167
- [13] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**
- [14] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 190, © with permission from publisher

## G. Literaturverzeichnis

- [15] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 191
- [16] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 194
- [17] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2014**
- [18] [http://flexikon.doccheck.com/de/Aktiver\\_Transport](http://flexikon.doccheck.com/de/Aktiver_Transport) [6.2.17]
- [19] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2014**, S. 153, © with permission from publisher
- [20] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 354
- [21] D. Richard, P. Chevalet, N. Giraud, F. Pradere, T. Soubaya; *Biologie im Überblick*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **2013**, Seite 50, © with permission from publisher
- [22] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2014**, S. 164
- [23] a) J. Huotari, A. Helenius, *EMBO J.* **2011**, 30, 3481  
b) R. Piper and D. Katzmann, *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2007**, 23, 519
- [24] P. Christen, R. Jaussi, R. Benoit, *Biochemie und Molekularbiologie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2016**, S. 234
- [25] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2014**, S. 165
- [26] <https://de.wikipedia.org/wiki/Endozytose> [6.2.17]
- [27] I. M. Kaplan, J. S. Wadia, S.F. Dowdy, *J. Control. Rel.* **2005**, 102, 247
- [28] S. A. Freeman, S. Grinstein, *Immunological reviews.* **2014**, 262, 193
- [29] S. Arandjelovic, K. S. Ravichandran, *Nature immunology.* **2015**, 16, 907

## G. Literaturverzeichnis

- [30] <https://de.wikipedia.org/wiki/Phagocytose> [6.2.17]
- [31] <https://de.wikipedia.org/wiki/Makropinozytose>[6.2.17]
- [32] <http://flexikon.doccheck.com/de/Caveola> [6.2.17]
- [33] C. Merrifield, M. Feldman, L. Wan, W. Almers, *Nature Cell Biology*, **2002**, 4, 691
- [34] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**
- [35] [http://flexikon.doccheck.com/de/Rezeptorvermittelte\\_Endozytose](http://flexikon.doccheck.com/de/Rezeptorvermittelte_Endozytose) [6.2.17]
- [36] C. Merrifield, M. Feldman, L. Wan, W. Almers, *Nature Cell Biology*, **2002**, 4, 691
- [37] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, Keith R. P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, **2011**, S. 850, © with permission from publisher
- [38] B. R. Peterson, Endocytosis: Receptor-Mediated. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. **2008**, 1–13.
- [39] a) G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 402  
b) <http://cc.scu.edu.cn/G2S/Template/View.aspx?courseType=1&courseId=17&toMenuId=113300&menuType=1&action=view&type=&name=&linkpageID=113471>
- [40] J. Goldstein, R. W. Anderson, M. Brown, *Nature*, **1979**, 279, 679;
- [41] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 402
- [42] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma; *Journal of Controlled Release*, **2011**, 151, 220
- [43] D. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, *ACS Nano*, **2014**, 8 1972
- [44] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, Kapitel 16
- [45] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 832
- [46] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2014**, S. 645
- [47] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2014**, S. 646

## G. Literaturverzeichnis

- [48] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, *Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2014**, S. 658
- [49] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, 1. Deutsche Auflage, Springer Verlag, Hollywood, **2005**, S. 855f
- [50] <http://www.netdoktor.de/therapien/strahlentherapie/> [2.3.17]
- [51] Siehe beispielsweise: S. Reissmann, *Journal of Peptide Science*. **2014**, 20, 760
- [52] S. Pujals, J. Fernández-Carneado, C. López-Iglesias, M. Kogan, E. Giralt, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **2006**, 1758, 264
- [53] M. Zorko, U. Langel; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 529
- [54] D. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, *ACS Nano*, **2014**, 8 1972
- [55] a) A. Frankel, C. Pabo, *Cell*, **1988**, 55, 1189.  
b) M. Green, P. Loewenstein, *Cell*, **1988**, 55, 1179
- [56] <http://www.spektrum.de/magazin/molekulare-tueroeffner/1171173> (13.10.16)
- [57] B. Gupta, T.S Levchenko, V.P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 637
- [58] M. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, . *Nucleic Acids Research*, **1997**, 25, 2730
- [59] B.R. Meade, S.F. Dowdy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 530
- [60] Z. Liu, M. Li, D. Cui, J. Fei, *J. Controlled Release*, **2005**, 102, 699
- [61] a) M. Mäe, Ü. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2006**, 6, 509  
b) T. Lehto, K. Kurrikoff, Ü. Langel, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2012**, 9, 823
- [62] B. Liu, Y. Huang, H. Chiang, H. Lee, *J Nanosci Nanotechnol*. **2010**, 10, 7897
- [63] B. Gupta, T.S. Levchenko, V.P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 637
- [64] G. Rajarao, N. Nekhotiaeva, L. Good, *FEMS Microbiol Lett*. **2002**, 215, 267
- [65] F. Burlina, S. Sagan, G. Bolbach, G. Chassaing, *Angew Chem Int Ed*, **2005**, 44, 4244,  
© with permission from publisher
- [66] F. Burlina, S. Sagan, G. Bolbach, G. Chassaing, *Angew Chem Int Ed*, **2005**, 44, 4244
- [67] a) E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *The Journal of biological chemistry*, **1997**, 272, 16010  
b) D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269 10444
- [68] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Letters*, **2013**, 587, 1693
- [69] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *The Journal of Biological Chemistry*, **1996**, 271, 18188
- [70] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Letters*, **2013**, 587, 1693

## G. Literaturverzeichnis

- [71] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Letters*, **2013**, 587, 1693, © with permission from Publisher
- [72] a) J Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. Gait, L. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 585.  
b) P. Guterstam, F. Madani, H. Hirose, T. Takeuchi, S. Futaki, S. Andaloussi, A. Gräslund, U. Langel.; *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **2009**, 1788, 2509
- [73] A. Finkelstein, *J Gen Physiol.* **1976** , 68, 127
- [74] C. Rousselle, P. Clair, JM. Lefauconnier, M. Kaczorek, JM. Scherrmann, Tamsamani; *J, Mol Pharmacol.* **2000**; 57, 679
- [75] J. Regberg, A. Srimanee, Ü. Langel, *Pharmaceuticals* , **2012**, 5, 991
- [76] K. Kurrikoff, J. Suhorut, ü. Langel, Cell-Penetrating Peptides in Cancer Targeting, *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy* (eds F. Kratz, P. Senter and H. Steinhagen), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2011**. © with permission from publisher
- [77] a) J. Reubi, M. Gugger, B. Waser, J. Schaer., *Cancer Res.* , **2001**, 61, 4636  
b) JC. Reubi. *Endocr. Rev.*, **2003**; 24, 389  
c) S. M. Okarvi,. *Cancer Treat. Rev.*, **2008**; 34, 13  
d) D. Böhme, A. Beck-Sickinger, *J. Pept. Sci.*, **2015**; 21, 186
- [78] F. Heitz, MC. Morris, G. Divita, *Br J Pharmacol.* **2009**, 157, 195
- [79] J. Reubi, M. Gugger, B. Waser, J. Schaer. *CANCER RESEARCH*, **2001**, 61, 4636
- [80] [https://de.wikipedia.org/wiki/Neuropeptid\\_Y](https://de.wikipedia.org/wiki/Neuropeptid_Y) [6.2.17]
- [81] a) D. Chatenet, R. Cescato, B. Waser, J. Erchegyi, J. E Rivier and J. Reubi. ,*EJNMMI Research* **2011**, 1, 21  
b) J. Li, Y. Tian, A. Wu, *Regen Biomater.* **2015**; 2, 215  
c) IU. Khan, A. Beck-Sickinger, *Anticancer Agents Med Chem.* **2008**; 8, 186  
d) H. Amlal, S. Faroqui, A. Balasubramaniam, S. Sheriff, *Cancer Res* **2006**; 66, 3706  
e) C. Morgat, A. K. Mishra, R. Varshney, M. Allard, P. Fernandez and E. Hindié, *J Nucl Med*, **2014**, 55, 1650  
f) C. Walther, K. Mörl, A: Beck-Sickinger, *J. Pept. Sci.* **2011**, 17, 233
- [82] a) R. M. Söll, M. C. Dinger, I. Lundell I, D. Larhammer, A. G. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2828

## G. Literaturverzeichnis

- b) D. Böhme, J. Krieghoff, A. Beck-Sickinger, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 3409
- c) S. Hofmann, S. Maschauer, T. Kuwert, A. Beck-Sickinger, O. Prante. *Mol. Pharmaceutics.* **2015**, 12, 1121
- [83] K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 2242
- [84] LR Jones, EA Goun, R Shinde, JB Rothbard, CH Contag, PA Wender. *J Am Chem Soc.* **2006**, 128, 6526
- [85] a) P. Grieco, *Synthesis* **1975**; 1975(2), 67
- b) R. Kitson, A. Millemaggi, and R. Taylor, **2009**, *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 9426
- c) R. Chhor, B. Nosse, S. Sörgel, C. Böhm, M. Seitz, O. Reiser, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 260
- d) R. Bandichhor, B. Nosse, O. Reiser, *Top Curr Chem*, **2005**, 243, 43
- e) R. B. Gammill, C. A. Wilson, T. A. Bryson, *Synthetic Communications*, **1975**, 5, 245
- [86] S. Kalindini., Won B. Jeong, A. Schall, R. Bandichhor, B. Nosse and O. Reiser. *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2007**, 46, 6361
- [87] A. Bergmann, O. Reiser. *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 7613
- [88] R. R. A. Kitson, A. Millemaggi, R. J. K. Taylor, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9590
- [89] a) A. Natarajan et al, *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 5121
- b) P. Zwicker, N. Schuktze, S. Niehs, K. Mething, M. Wurstner, D. Albrecht, J. Bernhardt, G. Wachlin, M. Lalk, U. Lindequist, B. Haertel, *Proteomics*, **2016**, 16, 2997
- c) Y. Wu, D. Wang, Y. Gao, J. Feng, X. Zhang, *Molecules*, **2016**, 21, 130
- d) F. Jun-Tao, W. De-Long, W. Yong-Ling, Y. He, Z. Xing, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23, 4393
- e) H. M. R. Hoffmann, J. Rabe, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, 24, 94
- [90] R. Csuk, A. Heinold, B. Siewert, S. Schwarz, A. Barthel, R. Kluge, D. Ströhl, *Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences.* **2012**, 345, 215
- [91] a) N. Appels,; J. Beijinen,; J. Schellens,; *The Oncologist*, **2005**, 10, 565
- b) Martin Schanderl, Doktorarbeit, Synthese, Umlagerung und biologische Evaluierung von Guaianoliden, Regensburg, **2011**
- [92] S. Kalindini, Won B. Jeong, A. Schall, R. Bandichhor, B. Nosse and O. Reiser. *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2007**, 46, 6361
- [93] Sabrina Fürst, *Investigations of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones and their corresponding*

## G. Literaturverzeichnis

- Michael-amines*, Masterarbeit, Regensburg, **2012**
- [94] H. Hoffmann, J. Rabe, *Angew Chem Int Ed Engl*, **1985**, 24, 94
- [95] C. Hutchinson; *J Org Chem*, **1974**, 39, 1854
- [96] S. Kalidindi,; W. Jeong,; A. Schall,; R. Bandichhor,; B. Nosse,; O. Reiser,; *Angew Chem* **2007**, 119, 6478
- [97] I. Paterson, I. Fleming, *Tetrahedron letters*, **1979**, 20, 993
- [98] A. Murray, R. Reid, *Synthesis*, **1985**, 35
- [99] J. R. Woods, H. Mo, A. A. Bieberich, T. Alavanja, D. A. Colby, *Med.Chem.Comm.*, **2013**, 4 ,27
- [100] P. V. Ramachandran, D. R. Nicponski, H. N.G. Nair, M. A. H., P. D. Gagare, C. M. Schmidt, M. T. Yip-Schneider; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23 6911
- [101] a) S. Nasim, P. Crooks, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , **2008**, 18, 3870  
b) S. Neelakantan, S. Nasim, M. Guzman, C. Jordan, P. Crooks, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 4346  
c) D. Hwang, Y. Wu, C. Chang, T. Lien, W. Chen, U. Tan, L. Hsu, H. Hsieh, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, 83
- [102] Q. Zhang, Y. Lu, Y. Ding, J. Zhai, Q. Ji, W. Ma, M. Yang, H. Fan, J. Long, Z. Tong, Y. Shi, Y. Jia, B. Han, W. Zhang, C. Qiu, X. Ma, Q. Li, Q. Shi, H. Zhang, D. Li, J. Zhang, J. Lin, L. Li, Y. Gao, Y. Chen. *J Med Chem*, **2012**, 55, 8757
- [103] A. Murray, R. Reid, *Synthesis*, **1985**, 35
- [104] a) T. Kippo, T. Fukuyama, and I. Ryu, *Org Lett*, **2011**, 13, 3864  
b) H. Mattes, C. Benezra; *Tetrahedron Letters*, **1985**, 26, 5697.
- [105] a) P. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, vierte Auflage, **2006**, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 875ff  
b) Gerd Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, dritte Auflage, **1987**, Wiley VCH-Verlag, Weinheim, S. 153
- [106] a) S. Zhu, S. Buchwald, *Journal of the American Chemical Society*, **2014**, 136, 15913  
b) S. Yotphan, D. Beukeaw, V. Reutraku, *Tetrahedron*, **2013**, 69, 6627
- [107] David Svensson, master thesis, **2012**
- [108] <https://de.wikipedia.org/wiki/MTT-Test> [6.2.17]
- [109] J. Zhai, D. Li, J. Long, H. Zhang, J. Lin, C. Qiu, Q. Zhang, Y. Chen, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 7103

## G. Literaturverzeichnis

- [110] R. M. Söll, M. C. Dinger, I. Lundell, D. Larhammer, A. G. Beck-Sickinger,, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2828
- [111] M. Körner, J. Reubi, *Peptides*, **2007**, 28, 419
- [112] Murray, A.; Reid, R.; *Synthesis*, **1985**, 35
- [113] a) T. Kippo, T. Fukuyama, and I. Ryu, *Org Lett*, **2011**, 13, 3864  
b) A. Kendhale, R. Gonnade, P. R. Rajamohanan, G. J. Sanjayan. *Chem Commun.* **2006**, 2756  
c) Y. Guo, G. Shao, L. Li, W, Wu, R. Li, J. Li, J. Song, L. Qui, M. Prashad, F. Kwong *Adv Syn Catal*, **2010**, 352, 1539
- [114] H. Mattes, C. Benezra, *Tetrahedron Letters* , **1985**, 26, 5697
- [115] J. Zhai, D. Li, J. Long, H. Zhang, J. Lin, C. Qiu, Q. Zhang, Y. Chen, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 7103
- [116] Combinatorial chemistry and solid phase synthesis – seminar and laboratory course –  
B. König, University Regensburg

Erklärung

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg den

Sabrina Fürst