

Synthese von Tubulysin-Derivaten, -Chimären
und -Konjugaten mit Targeting-Komponenten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II

Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Rainer Kufka, geb. Preusentanz

geb. am 21.10.1981 in Halle (Saale)

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2008 bis Juni 2013 am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale), in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie unter der Betreuung von Prof. Dr. Ludger A. Wessjohann angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ludger A. Wessjohann

2. Gutachter: Prof. Dr. Eelco Ruijter

Datum der Verteidigung: 8. November 2016

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 2 | Natürliches Tubulylin B und Diethyl-Tubulylin..... | 11 |
| 2.1 | Synthese von geschütztem Tubuvalin..... | 11 |
| 2.2 | Synthese von Tubutyrosin und Tubuphenylalanin | 13 |
| 2.3 | Synthese von Tubulylin B und Zuordnung der Tubutyrosin-Diastereomere . | 15 |
| 2.4 | Synthese von Diethyl-Tubulylin | 16 |
| 2.5 | Experimentelle Daten | 19 |
| 2.5.1 | <i>Allgemeine Angaben</i> | <i>19</i> |
| 2.5.2 | <i>Darstellung von 2-Acetylthiazol-4-carbonsäuremethylester (14)</i> | <i>21</i> |
| 2.5.3 | <i>Darstellung von Thiazol 15.....</i> | <i>21</i> |
| 2.5.4 | <i>Darstellung von Thiazol 16.....</i> | <i>22</i> |
| 2.5.5 | <i>Darstellung von N-Boc-Tubuvalinmethylester (17a).....</i> | <i>23</i> |
| 2.5.6 | <i>Darstellung von Tubuvalinmethylester-Hydrochlorid.....</i> | <i>24</i> |
| 2.5.7 | <i>Darstellung von (2S,3S)-2-Azido-3-methylvaleriansäure (60).....</i> | <i>24</i> |
| 2.5.8 | <i>Darstellung von (2S,3S)-2-Azido-3-methylvaleriansäurechlorid.....</i> | <i>25</i> |
| 2.5.9 | <i>Darstellung des als Azid und Methylester geschütztem Dipeptids 9</i> | <i>25</i> |
| 2.5.10 | <i>Darstellung der doppelt alkylierten Schlüsselintermediate 35 und 36... 26</i> | <i>26</i> |
| 2.5.11 | <i>Darstellung von N-Methyl-D-Pipecolinsäure (50).....</i> | <i>27</i> |
| 2.5.12 | <i>Darstellung von N-Methyl-D-Pipecolinsäurepentafluorphenylester (64)</i> <i>28</i> | |
| 2.5.13 | <i>Darstellung von N-Mep-Ile-N,O-Diethyl-Tuv-OEt (38).....</i> | <i>28</i> |
| 2.5.14 | <i>Darstellung von N-Mep-Ile-N,O-Diethyl-Tuv-OMe (37).....</i> | <i>29</i> |
| 2.5.15 | <i>Darstellung von N-Mep-Ile-N,O-Diethyl-Tuv-OH (39).....</i> | <i>29</i> |
| 2.5.16 | <i>Darstellung von N-Boc-L-Phenylalaninal (20).....</i> | <i>30</i> |
| 2.5.17 | <i>Darstellung des Esters 22</i> | <i>30</i> |
| 2.5.18 | <i>Darstellung von N-Boc-Tubuphenylalaninethylester und des C2-Epipers</i> <i>(Mischung von Diastereomeren 24)</i> | <i>31</i> |
| 2.5.19 | <i>Darstellung von N-Boc-Tubuphenylalanin und des C2-Epipers</i> <i>(Mischung von Diastereomeren 29)</i> | <i>32</i> |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5.20 | <i>Darstellung der Mentylester 30a und 30b sowie Trennung der Diastereomere</i> | 32 |
| 2.5.21 | <i>Darstellung von Tubuphenylalanin-Hydrochlorid (7)</i> | 34 |
| 2.5.22 | <i>Darstellung von Tubuphenylalaninmethylester-Hydrochlorid (31)</i> | 34 |
| 2.5.23 | <i>Darstellung von Diethyl-Tubulysin (34)</i> | 35 |
| 2.5.24 | <i>Darstellung von Aldehyd 21</i> | 36 |
| 2.5.25 | <i>Darstellung von Ethylester 23</i> | 36 |
| 2.5.26 | <i>Darstellung von N-Boc-Tubutyrosinethylester (26a) und dem C2-Epimer 26b</i> | 37 |
| 2.5.27 | <i>Darstellung von Tubutyrosin-Hydrochlorid (28a)</i> | 38 |
| 3 | Neue Synthesevarianten zur effektiven Produktion der Tubugis | 40 |
| 3.1 | Einleitung..... | 40 |
| 3.2 | Neue, effiziente Syntheserouten zur Darstellung von Tubugi 1 | 43 |
| 3.3 | Experimentelle Daten | 49 |
| 3.3.1 | <i>Allgemeine Angaben</i> | 49 |
| 3.3.2 | <i>Darstellung von N-Boc-Tubuvalin (56)</i> | 49 |
| 3.3.3 | <i>Darstellung von N-Boc-Tuv-Tup-OMe (57)</i> | 50 |
| 3.3.4 | <i>Darstellung von Tuv-Tup-OMe (55)</i> | 51 |
| 3.3.5 | <i>Darstellung von Azido-Ugi-Produkt 63</i> | 51 |
| 3.3.6 | <i>Darstellung von N-Fmoc-Ugi-Produkt 62</i> | 52 |
| 3.3.7 | <i>Darstellung von Peptoid 65</i> | 53 |
| 3.3.8 | <i>Darstellung von Tubugi 1 (41)</i> | 54 |
| 4 | Synthese von Tubugi-Chimären | 56 |
| 4.1 | Einleitung..... | 56 |
| 4.2 | Synthese einer Tubulysin-Dolastatin-Chimäre | 58 |
| 4.3 | Weiterentwicklung der Tubugi-Dolastatin-Chimäre | 61 |
| 4.4 | Ergebnisse und Fazit | 62 |
| 4.5 | Experimentelle Daten | 63 |
| 4.5.1 | <i>Allgemeine Angaben</i> | 63 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.5.2 | <i>Darstellung von N-Boc-Pro-Pro-OMe (73)</i> | 63 |
| 4.5.3 | <i>Darstellung von N-Cbz-Val-Pro-Pro-OMe (75)</i> | 64 |
| 4.5.4 | <i>Darstellung von N-Cbz-Val-Pro-Pro-Tup-OMe (77)</i> | 64 |
| 4.5.5 | <i>Darstellung von Ugi-Produkt 79</i> | 65 |
| 4.5.6 | <i>Darstellung von Peptoid 81</i> | 66 |
| 4.5.7 | <i>Darstellung von Tubugi-Dolastatin-Chimäre 70</i> | 67 |
| 4.5.8 | <i>Darstellung von N-Cbz-Val-Pro-Pro-Phe-OMe (83)</i> | 68 |
| 4.5.9 | <i>Darstellung von Ugi-Produkt 85</i> | 69 |
| 4.5.10 | <i>Darstellung von N-Methyl-Prolin (88)</i> | 70 |
| 4.5.11 | <i>Darstellung von N-Methyl-Prolin-pentafluorphenylester (89)</i> | 70 |
| 4.5.12 | <i>Darstellung von Peptoid 87</i> | 71 |
| 4.5.13 | <i>Darstellung von Tubugi-Dolastatin-Chimäre 82</i> | 72 |
| 5 | Synthese von Tubugi-Konjugaten | 73 |
| 5.1 | Einleitung..... | 73 |
| 5.2 | Nicht-spaltbare Konjugate | 76 |
| 5.3 | Spaltbare Konjugate..... | 81 |
| 5.3.1 | <i>Konzept</i> | 81 |
| 5.3.2 | <i>Synthese des aktivierten Tubugi-Derivats Tubugi-SSPy</i> | 84 |
| 5.3.3 | <i>Synthese des aktivierten Thiol-Linkers</i> | 85 |
| 5.3.4 | <i>Weitere Möglichkeiten durch das „Click-Tubugi“</i> | 88 |
| 5.3.5 | <i>Erstes spaltbares Tubugi-Konjugat mit Norspermidin als Targeting-Komponente</i> | 92 |
| 5.3.6 | <i>Erstes spaltbares Tubugi-Konjugat mit Cholsäure als Targeting-Komponente</i> | 95 |
| 5.3.7 | <i>Erstes spaltbares Tubugi-Konjugat mit Neuropeptid Y als Targeting-Komponente</i> | 99 |
| 5.3.8 | <i>Die biologische Aktivität der synthetisierten Konjugate und des Spaltprodukts Tubugi-SH</i> | 105 |
| 5.4 | Experimentelle Daten | 108 |
| 5.4.1 | <i>Allgemeine Angaben</i> | 108 |
| 5.4.2 | <i>Darstellung von Tubugi-Norspermidin-Konjugat 91 (TFA-Salz)</i> | 109 |
| 5.4.3 | <i>Darstellung von Rhodamin-Ugi-Produkt 99</i> | 110 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.4.4 | <i>Darstellung von Rhodamin-Peptoid 100 (TFA-Salz)</i> | 111 |
| 5.4.5 | <i>Darstellung von Tubugi-Rhodamin-Konjugat 92</i> | 111 |
| 5.4.6 | <i>Darstellung von S-(2-Pyridylthio)-cysteamin-Hydrochlorid (102)</i> | 112 |
| 5.4.7 | <i>Darstellung von Tubugi-SSPy 101</i> | 113 |
| 5.4.8 | <i>Darstellung von Disulfid 105</i> | 114 |
| 5.4.9 | <i>Darstellung von Disulfid 104</i> | 115 |
| 5.4.10 | <i>Darstellung von 2-(2-Azidoethoxy)ethanol (107)</i> | 115 |
| 5.4.11 | <i>Darstellung von 3-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)propin (108)</i> | 116 |
| 5.4.12 | <i>Darstellung von 3-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)propin (109)</i> | 116 |
| 5.4.13 | <i>Darstellung von Disulfid 110</i> | 117 |
| 5.4.14 | <i>Darstellung von Thiol 111</i> | 117 |
| 5.4.15 | <i>Darstellung von Click-Tubugi 112</i> | 118 |
| 5.4.16 | <i>Darstellung von 3-Azidopropanol (119)</i> | 119 |
| 5.4.17 | <i>Darstellung von p-Toluolsulfonsäure-(3-azidopropyl)ester (120)</i> | 119 |
| 5.4.18 | <i>Darstellung von N,N'-Di-Boc-1,3-Diaminopropan (122)</i> | 120 |
| 5.4.19 | <i>Darstellung von Azid 123</i> | 121 |
| 5.4.20 | <i>Darstellung von N,N'-Di-Boc-Norspermidin (117)</i> | 121 |
| 5.4.21 | <i>Darstellung von Disulfid 124</i> | 122 |
| 5.4.22 | <i>Darstellung von Thiol 125</i> | 122 |
| 5.4.23 | <i>Darstellung von Tubugi-N,N'-Di-Boc-Norspermidin-Konjugat 126</i> | 123 |
| 5.4.24 | <i>Darstellung von Tubugi-Norspermidin-Konjugat 113 (TFA-Salz)</i> | 124 |
| 5.4.25 | <i>Darstellung von Cholsäure-NHS-Ester 131</i> | 125 |
| 5.4.26 | <i>Darstellung von Cholsäure-Derivat 132</i> | 126 |
| 5.4.27 | <i>Darstellung von Disulfid 133</i> | 127 |
| 5.4.28 | <i>Darstellung von Thiol 134</i> | 127 |
| 5.4.29 | <i>Darstellung von Tubugi-Cholsäure-Konjugat 135</i> | 128 |
| 5.4.30 | <i>Darstellung von Tubugi-NPY-Konjugat 138</i> | 129 |
| 5.4.31 | <i>Darstellung von Tubugi-SH 139</i> | 130 |
| 6 | Zusammenfassung | 131 |
| 7 | Abstract | 132 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 133 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------|------------|
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 138 |
| 10 | Anhang..... | 142 |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | VI |
| | Danksagung | VII |

1 Einleitung

Entdeckung

Die Tubulysine wurden erstmals im Jahr 2000 von Höfle, Reichenbach und Mitarbeitern beschrieben.^[1] Im Rahmen des Forschungsprojekts „Biologie, Chemie und Genetik mikrobieller Wirkstoffe“ wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI, Braunschweig) zahlreiche Sekundärstoffe aus Mikroorganismen isoliert und hinsichtlich ihrer Struktur und Wirkung untersucht. Bis zur Auflösung des Forschungsbereichs „Naturstoffe“ im Jahr 2006 konnte eine beeindruckende Sammlung von Myxobakterien, bestehend aus etwa 8500 Stämmen, aufgebaut werden.^[2] Myxobakterien sind gramnegative, stäbchenförmige Organismen mit einer Länge von 4 bis 12 μm und einer Breite von circa 1 μm . Sie sind bevorzugt im Boden sowie auf verrottendem Pflanzenmaterial zu finden und ihre Sekundärmetaboliten zeigen oft antibakterielle und antimykotische Aktivität. Bei einem Screening auf biologisch aktive Substanzen am HZI konnten die Stämme *Archangium gephyra* Ar 315 und *Angiococcus disciformis* An d48 durch eine enorme zytotoxische Aktivität gegen L929-Mausfibroblasten auf sich aufmerksam machen. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die Testergebnisse einer neuen Substanzfamilie – den Tubulysinen – zuzuschreiben ist (s. Abbildung 1.1). Die Namensgebung fußt auf ihrer Fähigkeit das Tubulin-Zytoskelett abzubauen. *Ar. gephyra* produziert mit 2–4 mg L^{-1} hauptsächlich Tubulysin A (neben B, C, G, I; „A-Serie“); *An. disciformis* 0.5 mg L^{-1} der Tubulysine D, E, F und H („D-Serie“).^[3]

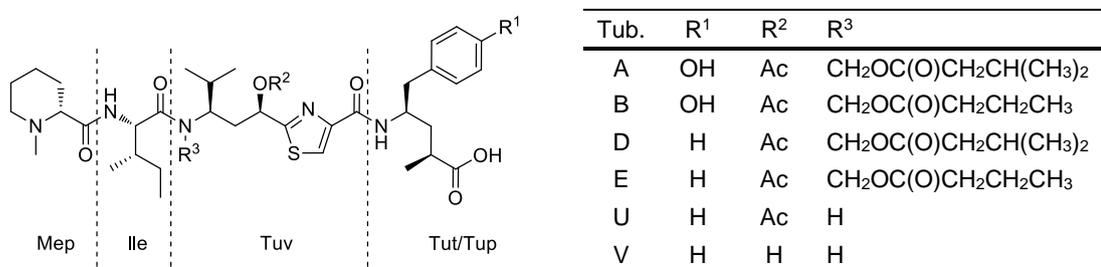


Abbildung 1.1 Ausgewählte Vertreter der Tubulysin-Familie. Die Tubulysine sind aus den folgenden Aminosäuren aufgebaut: Mep: *N*-Methylpipercolinsäure, Ile: *L*-Isoleucin, Tuv: Tubuvalin, Tut: Tubutyrosin (bspw. Tubulysine A und B), Tup: Tubuphenylalanin (bspw. Tubulysine D und E).

Die herausragende zytotoxische Aktivität dieser Verbindungsklasse und das daraus resultierende Potential zur Tumorbekämpfung führte im Folgenden zu enormem wissenschaftlichen Interesse (s. Abschnitt *Aktivität*, Seite 3).

Struktur

Myxobakterien produzieren oft Verbindungen mit Polyketid- und/oder Peptidstruktur, welche häufig aus ungewöhnlichen Aminosäuren aufgebaut sind. Die Strukturaufklärung der Tubulysine erfolgte mittels NMR-Spektroskopie, gestützt von Fütterungsversuchen mit postulierten, ^{13}C -angereicherten Tubulysin-Vorstufen.^[4] Die absolute Konfiguration der insgesamt sieben Stereozentren konnte durch Vergleich der Hydrolyse/Abbau-Produkte mit synthetischen Referenzen bestimmt werden. Letzte Unsicherheiten wurden im Jahr 2004 durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse von Tubulysin A beseitigt (s. Abbildung 1.2).^[3]

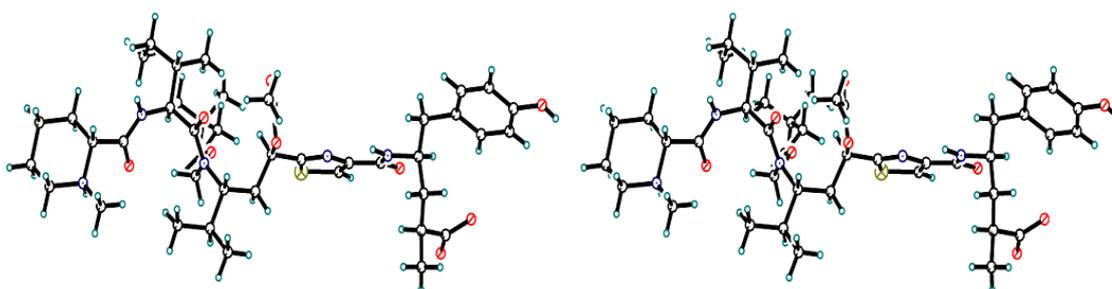


Abbildung 1.2 Röntgenkristallstruktur von Tubulysin A.^[3]

Strukturell sind die Tubulysine eng mit den Dolastatinen verwandt (s. Abschnitt 4.1): In beiden Fällen handelt es sich um lineare Peptide mit einer tertiären Aminofunktion am basischen *N*-Terminus, sterisch anspruchsvollen, lipophilen Seitenketten und einem aromatischen, sauren *C*-Terminus. Das Rückgrat der Tubulysine ist aus vier teils ungewöhnlichen Aminosäuren aufgebaut. Beginnend mit *N*-Methylpipecolinsäure (*N*-Mep) am *N*-Terminus, gefolgt von Isoleucin (Ile), der einzigen proteinogenen Aminosäure, und dem bis dato unbekanntem Tubuvalin (Tuv) mit einem Thiazolring und zwei stereogenen Zentren. Tubuvalin ist biosynthetisch von Valin abgeleitet und enthält Cystein als versteckte (fünfte) Aminosäure. Bei den Tubulysinen der „D-Serie“ bildet Tubuphenylalanin (Tup) den *C*-Terminus, bei der „A-Serie“ Tubutyrosin (Tut). Beides sind γ -Aminosäuren mit zwei stereogenen Zentren, abgeleitet von Phenylalanin bzw. Tyrosin. Bemerkenswert bei Vertretern der Tubulysin-Familie mit Buchstaben

vom Beginn des Alphabets (A- und D-Serie) ist die *N,O*-Acetalester-Seitenkette am „Tuv-Stickstoffatom“ (N14), welche lediglich zweimal zuvor in der Natur gefunden wurde: Als Methylether^[5] bzw. als *O*-Glykosid^[6]. Darüber hinaus liegt die Tuv-Hydroxyfunktion bei den zuvor genannten Tubulysinen acetyliert vor. Bei Vertretern mit Buchstaben vom Ende des Alphabets (bspw. Tubulysin V) fehlen beide oder zumindest eine dieser Funktionalitäten.^[7] Ob es sich bei diesen Tubulysinen um Intermediate oder hydrolytische Artefakte handelt, wird sich mit der weiteren Aufklärung der Biosynthese ergeben.^[3,8]

Aktivität

Bei den Tubulysinen handelt es sich um so genannte „Tubulin-Modifizierer“ wie auch Vinblastin, Paclitaxel (Taxol[®]) oder Epothilon. Die erstgenannten werden sehr erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt und auch das Epothilon-Analoga Ixabepilone (Ixempra[®]) findet Anwendung in der Kombinationschemotherapie.^[9] Die Tubulysine, mit Tubulysin D als potentestem Vertreter, übertreffen das zellwachstumshemmende Potential der genannten Wirkstoffe mit einem Faktor von 20 bis 1000 deutlich (s. Tabelle 1.1).^[3]

Tabelle 1.1 Aktivitäten verschiedener „Tubulin-Modifizierer“ gegen ausgewählte Zelllinien.^[4]

| Verbindung | Zelllinie, IC ₅₀ [ng/mL] | | | |
|---------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| | L929 ^a | K562 ^b | KB-3.1 ^c | KB-V1 ^d |
| Taxol | 80 | 10 | 10 | 150 |
| Vinblastin | 15 | 6 | 7 | 120 |
| Epothilon B | 0.7 | 0.3 | 0.6 | 0.3 |
| Dolastatin 10 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1.2 |
| Tubulysin D | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.08 |

^a Mausfibroblastenzelllinie (Bindegewebe)

^b Humane Leukämiezelllinie

^c Humane Gebärmutterhalskrebszelllinie

^d Multidrug-resistenter KB-Klon.

Am amerikanischen National Cancer Institut (NCI) wurde die proliferationshemmende Aktivität von Tubulysin A ausgiebig untersucht.^[10] Die GI₅₀- und TGI-Werte (total growth inhibition) sollten anhand von sechzig menschlichen Krebszelllinien bestimmt werden. Aufgrund der extremen Aktivität und dem dafür zu hoch eingestellten Konzentrationsbereich konnten die GI₅₀-Werte nur abgeschätzt werden. Der durchschnittliche GI₅₀-Wert gegen alle sechzig Zelllinien beträgt rund 12 nM. Die ermittelten TGI-Werte legen nahe, dass sich Tubulysin A durch besondere Wirksamkeit gegen Haut-, Blut- und Prostatakrebs auszeichnet. Weiterhin ist bemerkenswert, dass die Ergebnisse für MDR-Zelllinien^a im gleichen Bereich liegen wie die Daten für nicht-MDR-Zelllinien. In einem anschließenden Screening, in diesem Fall nur gegen drei Zelllinien (HL-60^b, HCT-116^c, HCT-15^d), inhibiert Tubulysin A das Zellwachstum schon bei subnanomolaren Konzentrationen und zeigt so höhere antiproliferative Aktivität als die verwendeten Referenzen Paclitaxel und Vinblastin. Auch ein Hohlfaserversuch an Mäusen lieferte beeindruckende Daten. Bei dieser Methode handelt es sich um einen *in vivo*-Schnelltest für Antitumorwirkstoffe. Hierzu werden den Mäusen Krebszellen in inerten Kunststoffhohlfasern (Polyvinylidenfluorid) intraperitoneal und subkutan implantiert. In den folgenden vier bis fünf Tagen werden die Tiere mit den zu testenden Substanzen behandelt, bevor die Hohlfasern wieder entfernt und *in vitro* untersucht werden. Tubulysin A wurde so auf seine Wirksamkeit gegen sechs Krebsarten (zwölf Zelllinien) untersucht: Das Zellwachstum wurde bei 33 % der getesteten Proben inhibiert. Damit zählt Tubulysin A zu den Top-5 % von bis dahin 3290 Substanzen, die in ähnlicher Weise am NCI getestet wurden.^[10]

Die Tubulysine A bis I unterscheiden sich in ihrer Aktivität gegen L929-Mausfibroblasten um bis zu Faktor 60. Allgemein korrelieren die Aktivitätswerte klar mit der Lipophilie der Verbindungen: Die „Tup-Tubulysine“ sind lipophiler und aktiver als die „Tut-Tubulysine“ mit phenolischer Hydroxyfunktion.^[3] Innerhalb der beiden Gruppen sind die Tubulysine A und D mit 3-Methylbutyryl-Funktionalität aktiver als Tub H und I mit einem Methylrest an dieser Position. Grundsätzlich verfügen die potentesten Tubulysine über eine acetylierte Tuv-Hydroxygruppe und die genannte *N,O*-Acetalesterfunktion. Durch das Fehlen von einer oder gar beiden

^a Multiple Drug Resistance

^b Humane Promyelozytenleukämiezelllinie

^c Humane Darmkrebszelllinie

^d Humane Darmkrebszelllinie

Funktionalitäten sind beispielsweise die Tubulysine V bis Z weniger aktiv, bewegen sich aber dennoch im Bereich der Epothilone oder Paclitaxel. Eine NMR-Analyse von Tubulin-gebundenem Tubulysin A legt nahe, dass sowohl der aromatische Ring am C-Terminus als auch die Thiazol-Gruppe im Tubuvalin essentiell für höchste Aktivität sind.^[11] Abbildung 1.3 veranschaulicht, dass grundsätzlich bereits geringfügige Änderungen an der natürlichen Struktur nicht zu vernachlässigende Aktivitätseinbußen mit sich bringen (steile quantitative Struktur-Wirkungsweise-Beziehung, QSAR). Vereinfachungen bzw. Anpassungen, die über das Abgebildete hinausgehen, beeinflussen die Aktivität deutlich negativ.^[12] Beispiele hierfür sind der Ersatz von Tubuphenylalanin gegen eine Ethylbenzyl-Gruppe^[13] oder ein Austausch des Thiazols gegen einen Benzolring^[14].

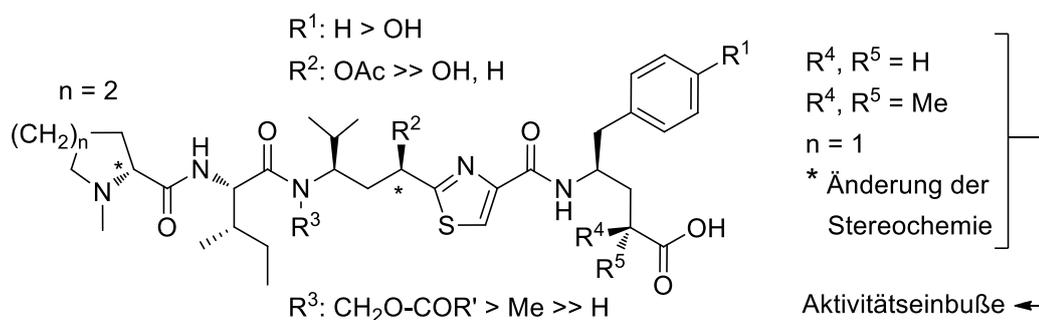


Abbildung 1.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Tubulysine. Das Zeichen „>“ bezieht sich auf die biologische Aktivität der jeweiligen Verbindungen. Generell sind die Tubulysine mit einem Tubuphenylalanin-Rest ($R^1 = H$) aktiver als die Tubutyrosin-Tubulysine ($R^1 = OH$). Bereits kleinere strukturelle Änderungen führen zu Aktivitätseinbußen. R^2 : Die acetylierte Tuv-Hydroxyfunktion ist wichtig für höchste Aktivität. Ein Verlust der Acetylfunktion oder der Hydroxyfunktion selbst führt zu einem Aktivitätsverlust. R^3 : Die aktivsten Tubulysine verfügen über eine *N,O*-Acetalesterfunktion am Tubuvalin-Stickstoffatom. Vertreter mit einer Methyl-Gruppe in dieser Position sind weniger aktiv, übertreffen jedoch noch das Potential von Verbindungen ohne Seitenkette ($R^3 = H$). R^4, R^5 : Entfällt die Methylgruppe der natürlichen Tubulysine oder wird eine zweite Methylgruppe eingeführt, sinkt die Aktivität. Ebenso wenn *N*-Mep ($n = 2$) durch einen 5-gliedrigen Ring ($n = 1$) ersetzt wird.

Wirkungsweise

Die Zytotoxizität der Tubulysine beruht auf ihrer Eigenschaft Tubulin zu binden und damit den Zellzyklus sich teilender Zellen nachhaltig zu stören. Bisher sind sechs von Myxobakterien produzierte Substanzfamilien bekannt, welche direkt auf das Zytoskelett eukaryotischer Zellen wirken. Ein Teil dieser Verbindungen (Chivosazol^[15], Chondramide^[16], Rhizopodin^[17]) interagiert mit den Aktinfilamenten, ein anderer Teil (Tubulysine^[1], Epothilone^[18], Disorazol^[19]) mit den Mikrotubuli.

Die Mikrotubuli sind essentielle Fasern des eukaryotischen Systems. Diese röhrenförmigen Proteinpolymere sind an wichtigen intrazellulären Prozessen, wie Signalübertragung oder Stofftransport, beteiligt. Darüber hinaus spielen sie eine wesentliche Rolle bei der Mitose, indem sie die duplizierten Chromosomenpaare zu den Spindelpolen transportieren.^[20] Ihr Aufbau aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren folgt einem Nukleations-Elongationsmechanismus. In der Nukleationsphase kommt es zur verhältnismäßig langsamen Bildung der Polymerisationskerne und in der Elongationsphase zur schnelleren, reversiblen und nicht-kovalenten Anlagerung weiterer Dimere. Die daraus resultierenden, bis zu einige Mikrometern langen, Hohlraumzylinder unterliegen, komplexen Polymerisationsdynamiken folgend, der permanenten Anlagerung und Abspaltung von Tubulindimeren (s. Abbildung 1.4).

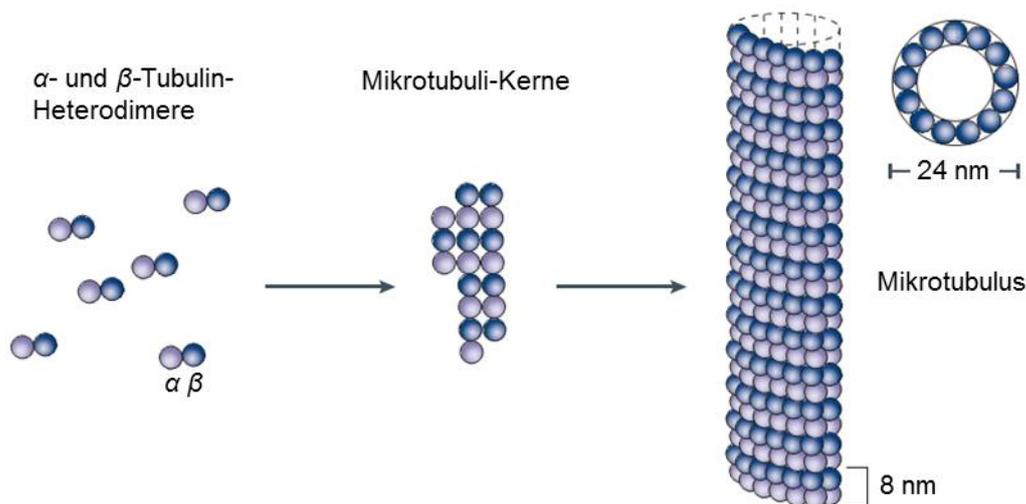


Abbildung 1.4 Aufbau der Mikrotubuli aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren, einem Nukleations-Elongationsmechanismus folgend.^[20]

So genannte Tubulin-Modifikatoren, wie die Tubulysine, greifen in dieses Polymerisationsgleichgewicht ein. Die Mitose kommt in der Meta-/Anaphase zum Erliegen und es folgt schließlich die Apoptose (s. Abbildung 1.5). Tubulin-Modifikatoren können in die folgenden zwei Gruppen unterteilt werden: Zum einen die Mikrotubuli-stabilisierenden Stoffe wie beispielsweise Paclitaxel (Taxol[®]), Docetaxel (Taxotere[®]) oder die Epothilone, zum anderen die Mikrotubuli-destabilisierenden Substanzen, wie die Vinca-Alkaloide (Vinblastin, Vinchristin, Vinflunin, etc.), Rhizoxin oder auch die Tubulysine. Die genannten Substanzen entfalten ihre Wirkung auf die Tubulin-Polymere über eine von drei möglichen Hauptbindungsstellen: Die Taxan-Domäne (u. a. Paclitaxel, Epothilone), die

Colchicin-Domäne (u. a. Colchicin) und die Vinca-Domäne (u. a. Vinca-Alkaloide, Dolastatine).^[20]

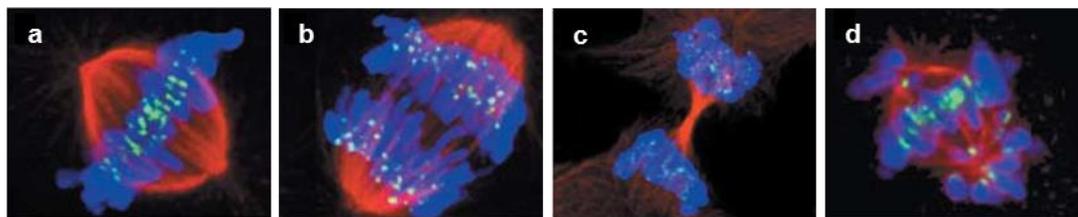


Abbildung 1.5 Mitose humaner Knochentumorzellen in Abwesenheit (a–c) und in Anwesenheit (d) eines Antimitotikums.^[20] Rot: Mikrotubuli, blau: Chromosomen. a) Beginn der Metaphase, die Chromosomen konzentrieren sich am Äquator; b) Anaphase, die duplizierten Chromosomen sind getrennt und bewegen sich in Richtung der Spindelpole; c) Telophase, die Chromosomen haben die Spindelpole erreicht und die Zelle teilt sich in zwei Tochterzellen; d) In Gegenwart des Tubulin-Modifizierers Vinflunin (50 nM) ist die Beweglichkeit der Chromosomen eingeschränkt, einige Chromosomen verbleiben an den Spindelpolen, die Mitose kommt beim Übergang von Meta- zu Anaphase zum Erliegen.

Die Tubulysine hemmen die Bindung von Vinblastin zu Tubulin. Auf Grundlage einer Reihe von Verdrängungsexperimenten konnten Khalil und Mitarbeiter zeigen, dass es sich hierbei (genau wie bei Dolastatin 10) um eine nichtkompetitive Hemmung handelt.^[21] Polyketide, wie das bereits genannte Rhizoxin oder Disorazol, zeigen im Gegensatz dazu eine kompetitive Hemmung der Bindung von Vinblastin zu Tubulin. Es wird daher davon ausgegangen, dass es in der Vinca-Domäne zwei Bindungsstellen gibt: Die Vinca-Stelle (Vinca-Alkaloide) und die Peptid-Stelle (Tubulysine und Dolastatin 10).

Mittels Versuchen an HUVEC-Zellen^a konnte darüber hinaus belegt werden, dass Tubulysin A antiangiogene Wirkung zeigt.^[10] Schnell wachsendes Tumorgewebe benötigt zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung ein sich zügig ausdehnendes Netz an Blutgefäßen. Antiangiogene Substanzen vermindern oder blockieren die Durchblutung des Tumors. So stagniert deren Wachstum oder das Tumorgewebe stirbt ab.

Synthese

Die biotechnologische Darstellung der Tubulysine mittels Fermentation liefert nur geringe Substanzmengen ($< 10 \text{ mg L}^{-1}$) und bringt mühsame chromatographische Reinigungsschritte mit sich. Um die Materialversorgung von weiterführenden (vorklinischen) Studien sicherzustellen, waren und sind daher synthetische

^a Human umbilical vein endothelial cells (Zellen der humanen Nabelschnurvene)

Produktionsansätze von enormer Bedeutung. Auch wenn die Darstellung der Tubulysine auf den ersten Blick wenig anspruchsvoll erscheint, fordert die Totalsynthese dieser Tetrapeptide einfallreiche Lösungsansätze, um verschiedene Herausforderungen zu meistern.

Im Folgenden sollen die wesentlichen Meilensteine auf dem Gebiet der Synthese natürlicher Tubulysine beleuchtet werden. Nach einer Vielzahl von Publikationen zur Darstellung einzelner Bausteine oder vereinfachter Analoga^[13,14,22–32] folgte im Jahr 2006 die erste stereoselektive Synthese von natürlichem Tubulysin U (und V) durch Wessjohann und Mitarbeiter.^[7,33] Einem einfachen, divergenten Syntheseansatz folgend (s. Abbildung 1.6) wird hier das Zielmolekül aus dem linken (*N*-Mep-Ile-*p*NP) und dem rechten Teil (*N*-Boc-Tuv-Tup-OMe) zusammengesetzt.

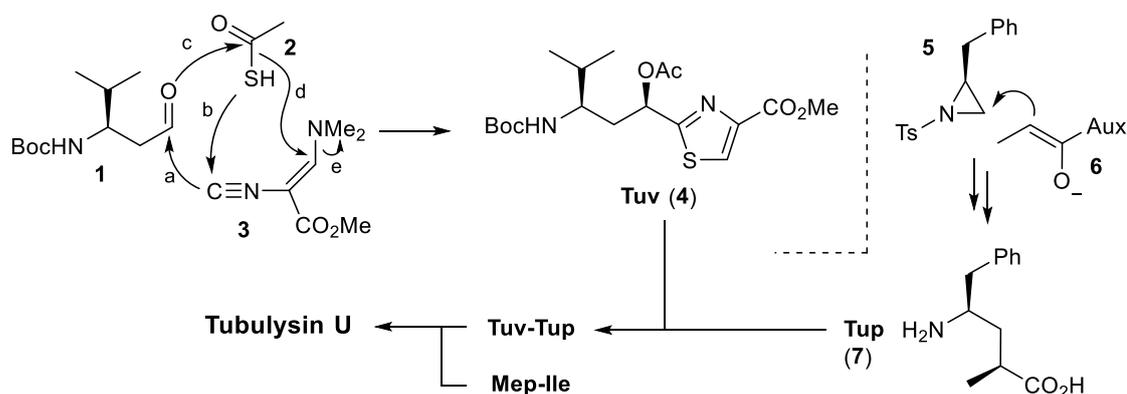


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Synthese von Tubulysin U nach Dömling *et al.*^[34] Geschütztes Tubuvalin (4) ist durch eine 3-Komponentenreaktion zugänglich. Tubuphenylalanin (7) wird unter Verwendung von Pseudoephedrin als chirales Auxiliar (Aux*) synthetisiert. Die Verknüpfung der Dipeptide Tuv-Tup und Mep-Ile liefert Tubulysin U.

Der linke Teil des Moleküls ist durch eine Kupplung von *N*-methylierter *D*-Pipicolinsäure mit *L*-Isoleucin-4-nitrophenylester zugänglich. Das zweifach geschützte Schlüsselintermediat *N*-Boc-Tuv-Tup-OMe wird unter Verwendung von 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-on (DEPBT) in DMF aus *N*-Boc-Tubuvalin und Tubuphenylalaninmethylester zusammengesetzt. Der Tubuvalin-Baustein wurde dazu elegant über eine 3-Komponentenreaktion (Passerini-Dömling-Variante) mit *N*-Boc-Homovalinal (1), Thioessigsäure (2) und beta-Dimethylamino-alpha-isocyano-acrylsäureester (3, Schöllkopf-Isonitril) aufgebaut.^[35] Die Umsetzung des Aziridins 5 mit dem Enolat 6 unter Einsatz eines chiralen Auxiliars (Aux*), gefolgt von einer Ozonolyse und Oxidation eröffnet einen Zugang zu Tubuphenylalanin (7). Eine Eintopfreaktion bestehend aus dem Entschützen der

Tuv-Tup-Stickstofffunktion, dem Kupplungsschritt und der (erneuten) Acetylierung liefert den Methylester von Tubulylin U und ein entsprechendes Epimer (1:1 Mischung durch Epimerisation am Isoleucin- α -Kohlenstoffatom) in einer ausgezeichneten Ausbeute von 83 %. Nach Trennung der Epimere bildet die selektive Methylesterspaltung mittels Schweineleberesterase den abschließenden Syntheseschritt.

Die erste Darstellung eines Vertreters der Tubulylin-Familie mit der ungewöhnlichen und schwer zu installierenden *N,O*-Acetalesterfunktion wurde von der Gruppe um Ellman beschrieben.^[36] Die innovative Synthesestrategie (s. Abbildung 1.7) eröffnete den Zugang zu Tubulylin D (**8**), dem aktivsten Vertreter der Substanzklasse. Ausgehend vom als Azid und Methylester geschützten zentralen Ile-Tuv-Fragment **9** gelang die Einführung der Seitenkette, in sterisch gedrängter Umgebung, unter Verwendung von KHMDS als Base.

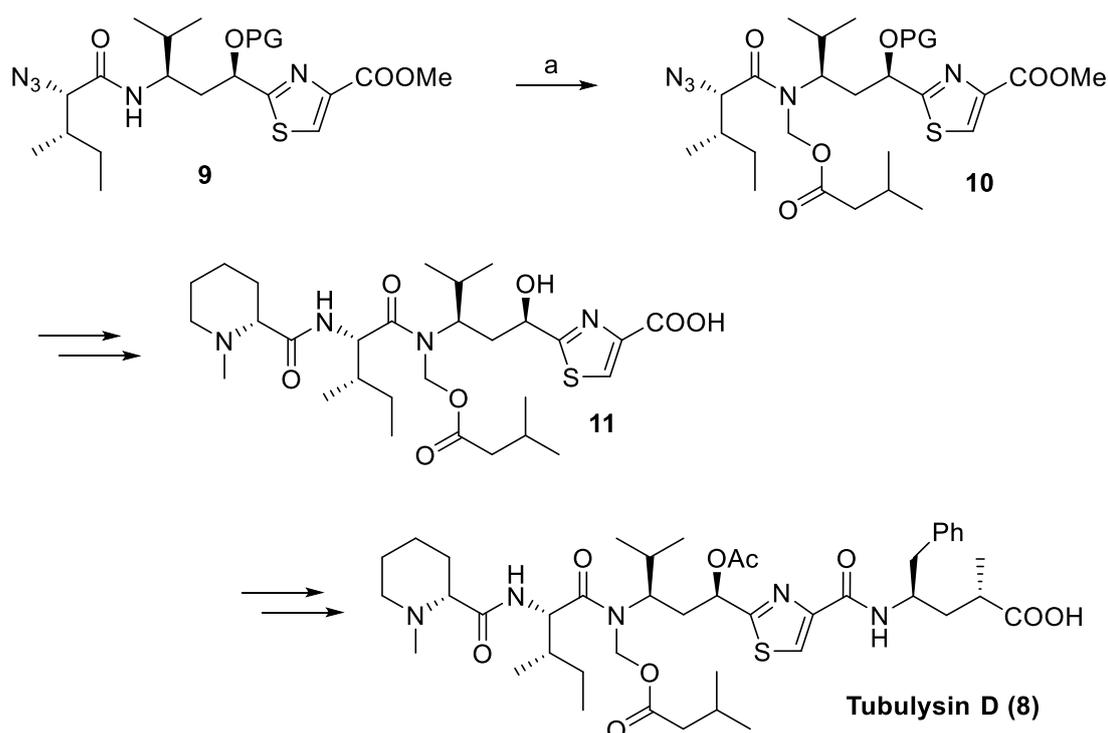


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der Synthese von Tubulylin D (**11**) ausgehend von geschütztem Ile-Tuv-Dipeptid (**9**) nach Ellman *et al.* mit Einführung der *N,O*-Acetalester-Seitenkette als Schlüsselschritt.^[36] a) KHMDS, $\text{ClCH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, THF, -45°C , 93 %.

Der weitere Aufbau des Zielmoleküls erfolgt hier durch die Palladium-katalysierte Reduktion des Azids unter Wasserstoffatmosphäre in Anwesenheit von, als Pentafluorphenylester, aktivierter *N*-Mep. Die Entschützung der Tuv-Säuregruppe in Gegenwart des labilen Rests am Tubuvalin-Stickstoffatom gelingt nach einer Vorschrift

von Nicolaou *et al.* mittels Me_3SnOH . Die resultierende Säuregruppe wird als Pentafluorphenylester aktiviert mit Tubuphenylalanin (**7**) gekuppelt. Die abschließende Acetylierung mit Essigsäureanhydrid/Pyridin liefert Tubulysin D (**8**) in einer Gesamtausbeute von 13 %.

Neben den natürlichen Tubulysinen und vereinfachten Analoga wurden bis dato auch einige Arbeiten zur Synthese von Tubulysin-Varianten mit Targeting-Komponenten veröffentlicht. Eine einleitende Abhandlung dazu folgt in Kapitel 5 der vorliegenden Arbeit.

2 Natürliches Tubulysin B und Diethyl-Tubulysin

Die Synthesen verschiedener natürlicher Tubulysine und einfacher Analoge sind in der Literatur beschrieben.^[13,14,22–32] In all diesen Verbindungen bilden Tubuphenylalanin (**7**) oder Derivate den C-Terminus. Bisher meisterten jedoch ausschließlich die Tubutyrosin-enthaltenen Tubulysine A und B den Sprung zu vorklinischen Studien.^[37–39] Erste vielversprechende Konjugate mit Targeting-Komponenten (s. Kapitel 5.1) wurden bisher ausschließlich aus den genannten Vertretern der Tut-Serie synthetisiert. Um diese Lücke zu schließen, sollte eine erste Totalsynthese von Tubulysin B (**33a**) entwickelt werden. Zunächst erfolgte die Produktion der einzelnen Bausteine, also den ungewöhnlichen Aminosäuren *N*-Methylpipercolinsäure (**50**), Tubuvalin (**17a**) und Tubutyrosin (**28**). Während die Methylierung von Pipercolinsäure via reduktiver Aminierung mittels Paraformaldehyd und Pd/C unter Wasserstoffatmosphäre trivial ist, wird im Folgenden auf die Synthese von Tubuvalin (**17a**), Tubutyrosin (**28a**) und Tubuphenylalanin (**7**) eingegangen.

2.1 Synthese von geschütztem Tubuvalin

Die Synthese von Tubuvalin (**17a**) mit zwei stereogenen Zentren und einem Thiazolring zählt zu den größeren Herausforderungen beim Aufbau natürlicher Tubulysine. Verschiedene Gruppen haben Ansätze zur Darstellung dieses Bausteins sowie vereinfachter Analoga publiziert.^[22,24–27,30,40–42] In der eigenen Gruppe wurden bisher zwei unterschiedliche Syntheserouten etabliert: Zum einen der sehr elegante Multikomponentenansatz von Dömling^[7], zum anderen die Synthese von Pando^[43], welche auf einer Modifizierung einer Route von Sani *et al.*^[25] aus dem Jahr 2007 fußt und den Zugang zum genannten Baustein im Grammmaßstab eröffnet. Pandos Tubuvalin-Synthese liefert als Ethylester geschütztes Material. Dieses ist jedoch nicht für die Tubulysin B-Darstellung (entsprechend der angestrebten Route) geeignet. Der anschließende, schrittweise Aufbau des Tubulysin-Gerüsts aus den einzelnen Bausteinen bildet die Rationale für diesen Umstand: Die Spaltung der betroffenen Esterfunktion, in Gegenwart der labilen Seitenkette soll nach einer Methode von Nicolaou *et al.* mittels Me₃SnOH erfolgen.^[44] Diese milde Variante erlaubt die Methylesterspaltung, während Ethylester unter diesen Bedingungen keine Reaktion

zeigen. Da sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte *N*-Boc-Tuv-OMe-Darstellung nur marginal von Pandos Ethylester-Variante unterscheidet, wird im Folgenden nur auf die wesentlichen Aspekte der Darstellung des Methylesters (s. Abbildung 2.1) bzw. die Unterschiede zur Ethylester-Synthese eingegangen.

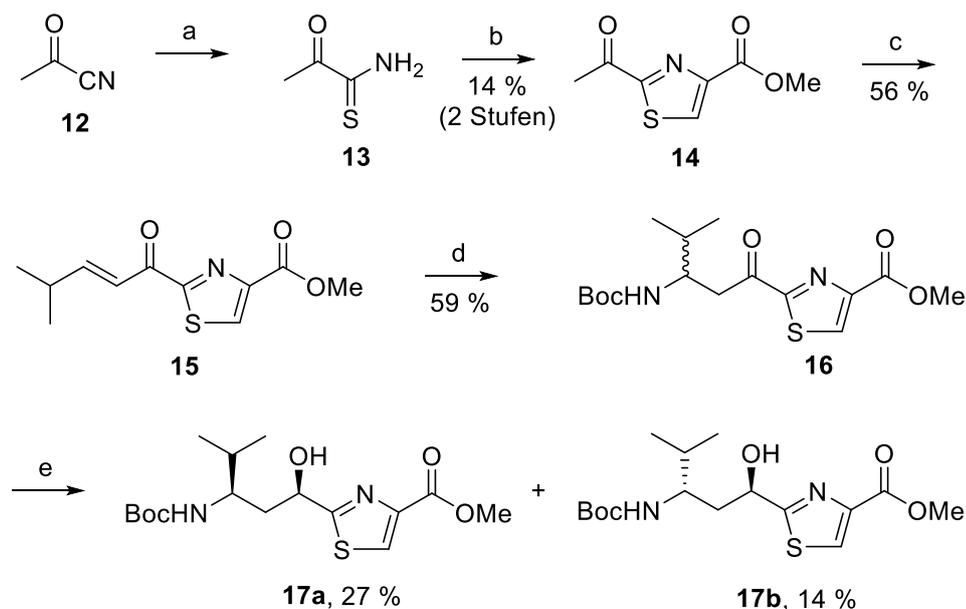


Abbildung 2.1 Synthese von geschütztem Deacetyl-Tubuvalin ausgehend von Pyruvoneitril (12) über 5 Stufen. a) H_2S , Et_3N , Et_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$; b) Brommethylpyruvat, MeOH , Reflux, 14 % (2 Stufen); c) 1. TiCl_4 , THF , $0\text{ }^\circ\text{C}$; 2. Et_3N , Isobutanal, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 56 %; d) $\text{Sn}(\text{OTf})_2$, *tert*-Butylcarbamate, ACN , 59 %; e) $(\text{CH}_3)_2\text{S}\cdot\text{BH}_3$, (*S*)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidin, THF , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 27 % 17a, 14 % 17b.

Die hier beschriebene lineare, 5-stufige Route ermöglicht die Produktion des als Methyl ester geschützten zentralen Bausteins aller Tubulysine und kann grob in zwei Abschnitte unterteilt werden: Zum Aufbau des Schlüsselintermediats **14** erfolgt zunächst die Addition von Schwefelwasserstoff an Pyruvoneitril (**12**) und im Anschluss eine Hantzsche-Thiazolsynthese. Im Gegensatz zur Ethylestersynthese findet hier Brommethylpyruvat anstelle von Bromethylpyruvat Verwendung. Weiterhin dient Methanol statt Ethanol als Lösungsmittel, da andernfalls durch partielle Umesterung eine Produktmischung mit unerwünschtem Ethylester resultiert. Die Ausbeute beträgt im vorliegenden Fall nur 14 % über zwei Stufen und bleibt damit noch hinter den schonmäßigen 36 % der Ethylester-Variante zurück. Optimierungsversuche hinsichtlich der einzelnen Reaktionszeiten und -temperaturen führten in keinem Fall zu einer Steigerung der Ausbeute. Alle weiteren Reaktionsschritte ausgehend vom Schlüsselintermediat **14** erfolgen in Anlehnung an die bereits erwähnten Vorschriften von Sani *et al.* aus dem

Jahr 2007. Hier bildet lediglich der Ersatz der Ethylesterfunktion durch den korrespondierenden Methylester einen Unterschied. Die weiteren Syntheseschritte sind eine TiCl_4 -katalysierte Aldolreaktion mit Isobutanal zum Intermediat **15** und eine Zinn(II)-triflat katalysierte Aza-Michael-Addition mit *tert*-Butylcarbammat zu Verbindung **16**. Die abschließende CBS-katalysierte Reduktion der Ketofunktion liefert, mittels Säulenchromatographie an Kieselgel leicht zu separierende, Diastereomere **17a** und **17b** in einer noch akzeptablen Ausbeute von zusammen 41 %.

2.2 Synthese von Tubutyrosin und Tubuphenylalanin

Der strukturellen Analogie zum Trotz liefert die Übertragung der in der eigenen Gruppe entwickelten Aziridin-Route^[7] zur Synthese von Tubuphenylalanin (**7**, s. Abbildung 1.6) im Fall von Tubutyrosin (**28**) nur mäßige Ergebnisse. Stattdessen wurde der in Abbildung 2.2 gezeigte Syntheseweg gewählt.

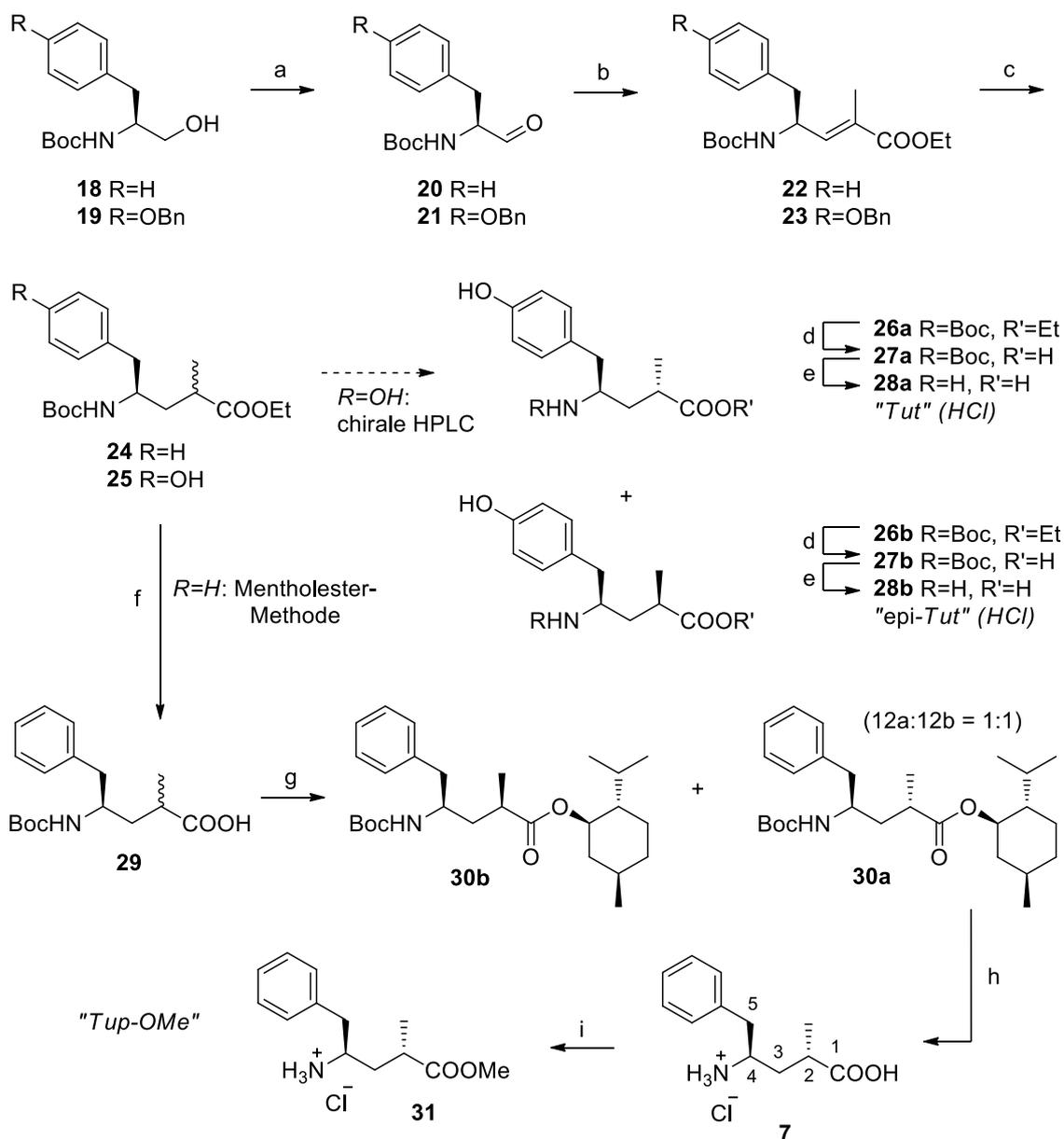


Abbildung 2.2 Synthese von geschütztem Tubuphenylalanin (**31**) und -tyrosin (**26**). a) NaBr, TEMPO, NaOCl, H₂O/Toluol/EtOAc, 0 °C → RT, quant. (**20**), 64 % (**21**); b) (1-Ethoxycarbonyl)ethylidene)triphenylphosphoran, DCM, 0 °C → RT, 81 % (**22**), 72 % (**23**); c) **24**: Pd(OH)₂/C (20 Gew%), H₂, MeOH; **25**: Pd/C (10 Gew%), H₂, MeOH, HPLC, 53 % (**26a**), 24 % (**26b**); d) LiOH·H₂O, THF/H₂O; e) aq. HCl; f) LiOH·H₂O, THF/H₂O, 95 %; g) (-)-Menthol, DCC, DMAP, DCM, 0 °C → RT, 30 % (**30a**), 33 % (**30b**); h) 6 M HCl, 140 °C, 2 h; i) 2,2-Dimethoxypropan, aq. HCl, 50 °C, 12 h, 92 % (2 Stufen).

Da Tubuphenylalanin-Methylester (**31**) für die Darstellung von Tubulyisin-Analoga (s. Abschnitt 2.4 und Kapitel 5) von Bedeutung ist und sich die Darstellung von Tup (**7**) und Tut (**28a**) im Kern gleicht, werden hier die Synthesen beider Bausteine zusammen beschrieben. Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Alkohol **18** bzw. **19** erfolgt nach TEMPO-Oxidation eine Wittig-Reaktion zum Schlüsselintermediat **22** bzw. **23**. Optimierungsversuche bei der Tubutyrosin-Synthese zeigten, dass für Reaktion (a) eine Oxidation nach Swern zur vollständigen Racemisierung am C4 führt. Die

Wittig-Produkte werden mittels Palladium-Katalysator unter Wasserstoffatmosphäre reduziert. Im Fall von Verbindung **22** (Tup-Synthese) erfolgt die Auftrennung der resultierenden Diastereomere **24** gemäß einer Vorschrift von Sani *et al.* über die korrespondierenden L-Mentholester **30a** und **30b**.^[25] Nach Spaltung des Mentholesters **30a** wird das resultierende Tubuphenylalanin (**7**) erneut als Methylester geschützt (Verbindung **31**).

Bei der Übergangsmetall-katalysierten Reduktion der Doppelbindung in Verbindung **23** (Tut-Synthese) wird zeitgleich die Benzylschutzgruppe abgespalten. Da die Mentholester-Variante in diesem Fall keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert, werden die Tubutyrosin-Diastereomere **25** mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Auf dieser Stufe war zunächst nicht klar, welche Fraktion das Produkt mit der gewünschten Konfiguration enthält. Anhand der NMR-spektroskopischen Daten war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich und es konnten keine für die Röntgenkristallstrukturanalyse geeigneten Kristalle gezüchtet werden.

2.3 Synthese von Tubulysin B und Zuordnung der Tubutyrosin-Diastereomere

Aus den voranstehend genannten Gründen (s. vorheriger Abschnitt) wurden die Diastereomere **28a** und **28b** mit Tripeptid **32** gekuppelt (s. Abbildung 2.3), um dann über einen Vergleich mit natürlichem Material^a die Zuordnung der Tut-Diastereomere zu ermöglichen. Da der Aufbau des Molekülgerüsts auf den einzelnen Bausteinen von Dr. O. Pando übernommen wurde und Dr. A. Porzel die Zuordnung mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt hat^[45], sollen in der vorliegenden Arbeit nur die wichtigsten Ergebnisse dazu zusammengefasst werden.

^a Bereitgestellt durch Firma *R&D Biopharmaceuticals*, Martinsried

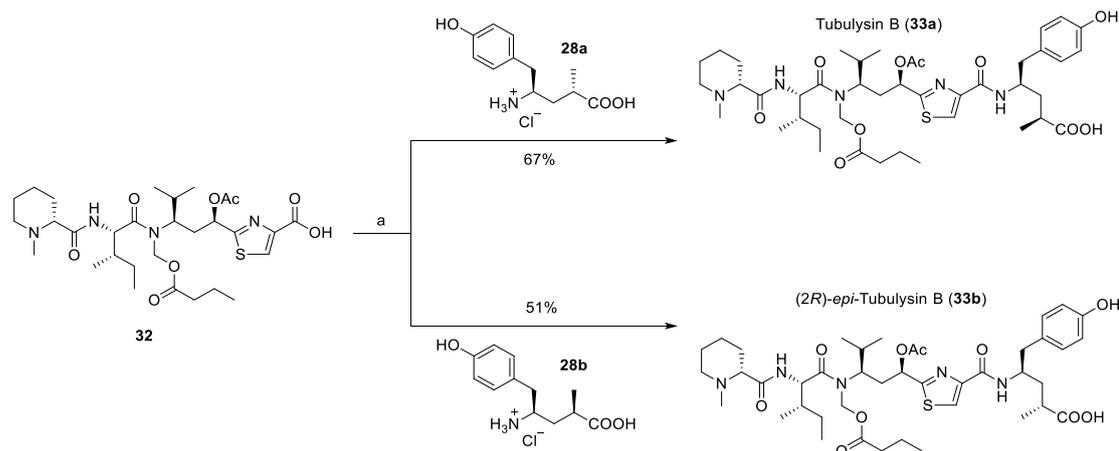


Abbildung 2.3 Synthese von Tubulyisin B (**33a**) und dem *2R*-Epimer **33b** durch Kupplung von Tubutyrosin (**28a**) bzw. dem Epimer **28b** mit dem Tripeptid **32**.^[45] a) PFP, DIC, DCM, 67 % (**33a**), 51 % (**33b**).

Ausgehend von den genannten Bausteinen und analog zur literaturbekannten Synthese-Route zur Darstellung von Tubulyisin D (**8**) gemäß Ellman *et al.*^[36] (s. Abbildung 1.7), wurde die erste Totalsynthese von Tubulyisin B (**33a**) durchgeführt. Abbildung 2.3 zeigt den letzten Peptidkupplungsschritt mit entschütztem Tut **28a** bzw. *epi*-Tut **28b**. Durch die vergleichende Auswertung der NMR-spektroskopischen Daten der beiden Endprodukte mit den Daten von natürlichem Tubulyisin B erfolgte die eindeutige Zuordnung der Diastereomere. Die beschriebene Tubutyrosin-Synthese liefert demnach einen Überschuss an natürlichem Tubutyrosin (Tut:*epi*-Tut = 2.5:1^[46]). Erwähnenswert ist an dieser Stelle weiterhin, dass sich Tubulyisin B (**33a**) und (*2R*)-*epi*-Tubulyisin B (**33b**) hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität gegen die beiden getesteten Zelllinien PC-3^a und HT-29^b nur marginal unterscheiden (alle IC₅₀-Werte liegen bei rund 1 nM^[45]). Die Konfiguration des betroffenen Stereozentrums hat somit nur wenig Einfluss auf die Aktivität der Verbindung.

2.4 Synthese von Diethyl-Tubulyisin

Dieser Abschnitt beschreibt die erste Synthese des einfachen Tubulyisin-Derivats „Diethyl-Tubulyisin“ (**34**). Durch strukturelle Vereinfachungen gegenüber den natürlichen Tubulyisinen ist dieses Derivat verhältnismäßig leicht zugänglich. Auch wenn durch die vorgenommenen Anpassungen an der Struktur eine Aktivitätseinbuße nicht ausgeschlossen werden kann, handelt es sich bei diesem Analogon – aufgrund

^a Humane Prostatakrebszelllinie

^b Humane Darmkrebszelllinie

einer massiven Reduzierung hinsichtlich des präparativen Aufwands – um ein vielversprechendes Zielmolekül. Abbildung 2.4 verdeutlicht die vorgenommenen strukturellen Anpassungen ausgehend von natürlichem Tubulylin B (**33a**): Konkret wurden bei der Synthesepaltung die blau markierten Teile des Moleküls „gestrichen“ (bzw. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}$ - gegen CH_3 - ersetzt).

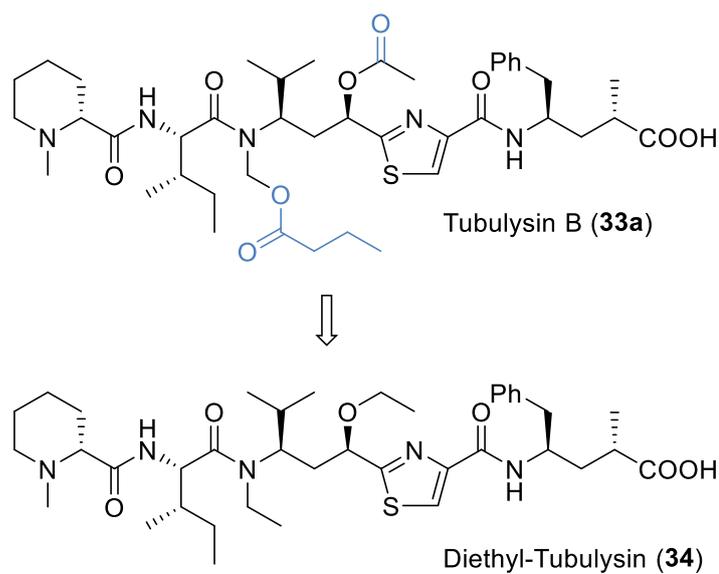


Abbildung 2.4 Strukturelle Vereinfachungen von Tubulylin B (33a) zum Diethyl-Derivat 34. Im Diethyl-Tubulylin (**34**) sind die *N,O*-Acetalesterfunktion und die Acetylgruppe (beides blau) durch Ethylgruppen ersetzt.

Es ist literaturbekannt, dass ein Verlust der Acetylfunktion am Tubuvalin einen negativen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität mit sich bringt (Aktivitätsverringering um ca. Faktor 3; je nach Zelllinie).^[13] Die Substitution der Acetylfunktion gegen eine Ethylgruppe wurde bisher nicht untersucht. Weiterhin hat die komplette Entfernung der *N,O*-Acetalester-Seitenkette einen enormen Aktivitätseinbruch zur Folge. Verbindungen mit einer simplen Methylgruppe in dieser Position bewegen sich hinsichtlich ihrer Zytotoxizitätswerte zwar ebenfalls nicht im Bereich der herausragendsten Vertreter der Tubulylin-Familie, zeigen jedoch, dass hier grundsätzlich auch deutlich simple Strukturen ein gewisses Potential besitzen (Aktivitätsverringering um ca. Faktor 2; je nach Zelllinie).^[13] Im hier vorgestellten Tubulylin-Diethylderivat **34** sind demnach alle für die zytotoxische Aktivität essentiellen Strukturmerkmale präsent, wenn auch teils in vereinfachter Form. Abbildung 2.5 zeigt deutlich wie unkompliziert sich der Aufbau des Diethylderivats **34** tatsächlich gestaltet.

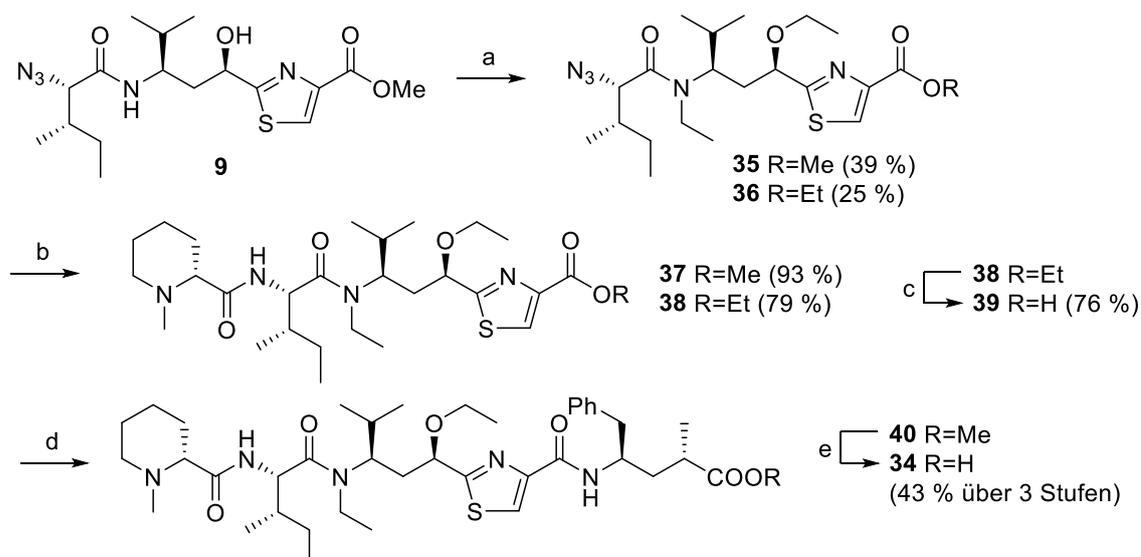


Abbildung 2.5 Synthese von Diethyl-Tubulylin **34** ausgehend vom geschützten Dipeptid **9** über **5** Stufen. a) NaH, EtI, DMF, 0 °C \rightarrow RT, 39 % (**35**), 25 % (**36**); b) *N*-Mep-OPFP, Pd/C (10 Gew%), H₂, EtOAc, 93 % (**37**), 79 % (**38**); c) LiOH·H₂O, THF/H₂O, 76 %, d) 1. PFP, DIC, DCM; 2. Tup-OMe·HCl (**31**), DIPEA, DMF; e) LiOH·H₂O, THF/H₂O, 43 % (3 Stufen).

Ausgehend vom geschützten Dipeptid **9** erfolgen nach der Alkylierung nur noch zwei Standard-Peptidkupplungsreaktionen. Die verwendete Schutzgruppenchemie beschränkt sich lediglich auf eine Azidreduktion sowie die Spaltung von Estergruppen, ebenfalls beides nach Standardprotokoll. Die doppelte Alkylierung des als Azid- und Methylester-geschützten Ile-Tuv-Bausteins **9** erfolgt unter Verwendung von Natriumhydrid als Brønsted-Base und sechs Äquivalenten Ethyliodid. Unter diesen Bedingungen kommt es teilweise zu einer Umesterung zum korrespondierenden Ethylester **36**. Beide Verbindungen (**35** und **36**) lassen sich mittels Säulenchromatographie trennen. Da das alkylierte *N*-Mep-Ile-Tuv-Tripeptid ohnehin einer Esterspaltung mittels Lithiumhydroxid unterzogen wird, könnte im Folgenden auch eine Methyl-/Ethylestermischung eingesetzt werden. Die Azidreduktion und die Peptidkupplung erfolgen in einer Eintopfreaktion. Hierzu wird das jeweilige Azid **35** bzw. **36**, eine katalytische Menge Palladium auf Aktivkohle sowie als Pentafluorphenylester aktiviertes *N*-Mep unter Wasserstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Die Ausbeute beträgt sehr gute 93 % (Methylester **37**) bzw. 79 % (Ethylester **38**). Die weiteren Synthesestufen bis zum finalen Produkt **34** wurden ausschließlich mit dem Ethylester **38** und ohne chromatographische Reinigung der Zwischenprodukte durchgeführt. Dies beinhaltet die Ethylesterspaltung mittels Lithiumhydroxid, die Aktivierung der resultierenden Säurefunktion durch Pentafluorphenol/DIC, die Peptidkupplung mit Tup-OMe und letztlich die Spaltung des

Methylesters ebenfalls unter Verwendung von Lithiumhydroxid. Die Aufreinigung des Reaktionsansatzes durch präparative RP-HPLC liefert die Zielverbindung **34** mit einer Ausbeute von 33 % über die aufgelisteten vier Stufen.

Das Diethyl-Tubulyisin **34** liegt bei ersten Tests mit verschiedene Krebszelllinien im Aktivitätsbereich von natürlichem Tubulyisin B (**33a**, s. Tabelle 2.1) und ist damit eines der bisher aktivsten bekannten artifiziellen Tubulyisin-Derivate (neben den Tubugis, s. nächstes Kapitel). Die hier vorliegende Kombination aus einfacher und schneller Synthese, den guten Ausbeuten und der enormen Aktivität ist bisher unerreicht. Somit stellt das Diethyl-Tubulyisin **34** einen hervorragenden Ausgangspunkt für weitere Modifikationen, wie beispielsweise eine Konjugation mit Targeting-Komponenten für einen Tumor-gerichteten Wirkstofftransport, dar.

Tabelle 2.1 Aktivität von Diethyl-Tubulyisin^a **34** und Tubulyisin B^b (**33a**) gegen verschiedene Krebszelllinien.

| Verbindung | Zelllinie; IC ₅₀ [nM] | | |
|------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|
| | HT-29 ^c | PC-3 ^d | Colo 320 ^e |
| Diethyl-Tubulyisin 34 | 0.11 ± 0.01 | 0.12 ± 0.01 | 0.31 ± 0.03 |
| Tubulyisin B (33a) | 0.5 | 0.3 | – |

2.5 Experimentelle Daten

2.5.1 Allgemeine Angaben

Chemikalien und Lösungsmittel

Alle verwendeten Chemikalien sind kommerziell erhältlich (*Sigma-Aldrich*, USA; *Acros Organics*, Belgien) und wurden ohne vorherige Reinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden von *Merck* (Deutschland) und *Acros Organics*

^a Durchgeführt im eigenen Arbeitskreis von G. Kaluderovic bzw. A. Ehrlich

^b Durchgeführt im eigenen Arbeitskreis von A. Denkert^[45]

^c Humane Darmkrebszelllinie

^d Humane Prostatakrebszelllinie

^e Humane Darmkrebszelllinie

bezogen. Tetrahydrofuran wurde vor Gebrauch über einer Na/K-Legierung destilliert. Absolutes Dichlormethan wurde durch Destillation über Calciumhydrid erhalten. Absolutes Methanol, DMF und Pyridin über Molsieb wurden ebenfalls von *Acros Organics* bezogen.

Reaktionen unter Luft-/Feuchtigkeitsausschluss

Diese Reaktionen wurden in absoluten Lösungsmitteln und in ausgeheizten Glasgeräten mit Mehrweghahnsystem durchgeführt. Trockener Stickstoff oder Argon dienten als Schutzgas.

Analytische Dünnschichtchromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde an mit Kieselgel beschichteter Aluminiumfolie (Kieselgel 60 F₂₅₄) der Firma *Merck* durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$; 366 nm) oder durch Anfärben mit Iod, Cer(IV)-Molybdätophosphorsäure bzw. Ninhydrin-Lösung.

Säulenchromatographie

Die Rohprodukte wurden an Kieselgel 60 der Firma *Merck* (230–400 mesh, 0.040–0.063 mm) als Flash-Chromatographie mit variablem Druckaufschlag gereinigt.

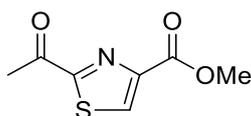
NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden auf Geräten der Firma *Varian* (Mercury 300, 400 bzw. 600) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der NMR-Spektren sind auf das Signal des internen Standards Tetramethylsilan (0.000 ppm für ¹H-NMR-Spektren in CDCl₃ und CD₃OD) bzw. auf die Lösungsmittelsignale (77.000 ppm für ¹³C-NMR-Spektren in CDCl₃; 49.000 ppm für ¹³C-NMR-Spektren in CD₃OD) referenziert. Die Kopplungskonstanten sind in der Einheit Hertz (Hz) angegeben.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden als Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) auf einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer der Firma *AB Sciex* (USA) aufgenommen. Hochauflösende ESI-Massenspektren (HRMS) wurden mit einem Apex III FTICR-Spektrometer (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) der Firma *Bruker Daltonics* (USA) gemessen.

2.5.2 Darstellung von 2-Acetylthiazol-4-carbonsäuremethylester (**14**)



Durch eine Lösung von Pyruvonnitril (25 mL, 0.35 mol) in trockenem Et₂O (300 mL) wird bei 0 °C für 30 Minuten Schwefelwasserstoff geleitet. Triethylamin (1 mL) wird zugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2x 50 mL) gewaschen, die Phasen werden getrennt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Die Mischung wird filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Eine Lösung des so erhaltenen Rückstands (35.5 g) und 3-Brombrenztraubensäuremethylester (68.5 g, 0.38 mol, 1.1 Äq.) in trockenem Methanol (45 mL) wird für 45 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 8:1 → 5:1) des Rückstands liefert das Thiazol **14** mit einer Ausbeute von 8.8 g (14 %) als gelben Feststoff.

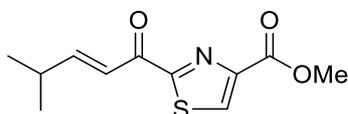
$R_f = 0.29$ (*n*-Hexan:EtOAc 4:1).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 8.45$ (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 2.79 ppm (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) $\delta = 191.51, 167.54, 161.28, 148.32, 133.58, 52.75, 26.09$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₇H₇NO₃S [M+Na]⁺ 208.0039, gef. 208.0035.

2.5.3 Darstellung von Thiazol **15**



Zu einer Lösung von Verbindung **14** (10.4 g, 52.2 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (200 mL) wird bei 0 °C und unter Stickstoffatmosphäre eine 1 M Lösung von Titan-tetrachlorid (115 mL, 115 mmol, 2.2 Äq.) in Toluol portionsweise zugegeben. Nach 40 Minuten wird der Reaktionsansatz auf -78 °C gekühlt und Triethylamin (16.1 mL, 114.7 mmol, 2.2 Äq.) wird zugegeben. Nach 10 Minuten wird Isobutanal (5.7 mL, 62.2 mmol, 1.2 Äq.) zugetropft und anschließend eine weitere Stunde gerührt. Das Kühlbad wird entfernt und nach einer Stunde wird der Reaktionsansatz durch

Zugabe einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung (100 mL) gequenchet. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x 100 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 5:1) des Rückstands liefert Verbindung **15** mit einer Ausbeute von 7.1 g (56 %) als gelbes Öl.

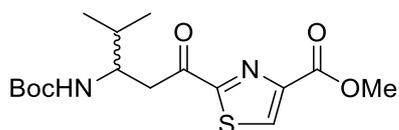
$R_f = 0.47$ (*n*-Hexan:EtOAc 4:1).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.49$ (s, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 2.77 – 2.54 (m, 1H), 1.16 ppm (d, $J=6.8$, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 181.35$, 168.61, 161.11, 158.52, 147.95, 133.36, 120.96, 52.42, 31.62, 21.02 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 262.0508, gef. 262.0506.

2.5.4 Darstellung von Thiazol 16



Zu einer Lösung von Verbindung **15** (7.0 g, 29.0 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem ACN (100 mL) werden unter Stickstoffatmosphäre Zinn(II)-triflat (2.5 g, 5.9 mmol, 0.2 Äq.) und *tert*-Butylcarbamat (4.1 g, 35.0 mmol, 1.2 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 5:1 \rightarrow 4:1) des Rückstands liefert Verbindung **16** mit einer Ausbeute von 6.1 g (59 %) als weißen Feststoff.

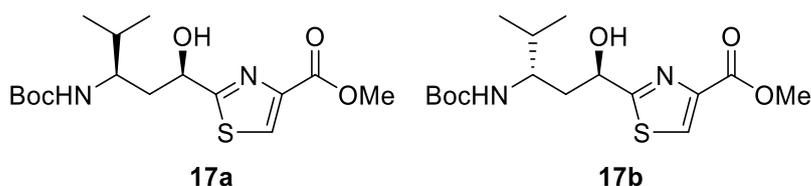
$R_f = 0.67$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:2).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.45$ (s, 1H), 4.80 (d, $J=9.5$, 1H), 4.10 – 3.89 (m, 4H), 3.47 – 3.14 (m, 2H), 2.01 – 1.80 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 0.98 (d, $J=1.3$, 3H), 0.96 ppm (d, $J=1.3$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 192.34$, 167.44, 161.23, 155.42, 148.15, 133.51, 79.11, 52.88, 52.65, 41.34, 32.09, 28.24, 19.33, 18.24 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 379.1298, gef. 379.1296.

2.5.5 Darstellung von *N*-Boc-Tubuvalinmethylester (**17a**)



Eine Lösung von Dimethylsulfid-Boran (1.9 mL, 20.2 mmol, 1.2 Äq.) und (*S*)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidin (1 M in Toluol, 3.4 mL, 3.4 mmol, 0.2 Äq.) in trockenem THF (40 mL) wird auf 0 °C gekühlt. Nach 10 Minuten wird eine Lösung von Thiazol **16** (6.0 g, 16.8 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (20 mL) zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten wird das Kühlbad entfernt und der Reaktionsansatz für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von Methanol (100 mL) wird die Reaktion gequencht und die Lösungsmittel werden unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 5:1 → 3:1) des Rückstands liefert die Verbindung **17a** mit einer Ausbeute von 1.6 g (27 %) und die Verbindung **17b** mit einer Ausbeute von 850 mg (14 %) als weiße Feststoffe.

17a:

$R_f = 0.59$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:2).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.12$ (s, 1H), 5.23 (br s, 1H), 4.99 (dd, $J=11.9, 2.2$, 1H), 4.55 (d, $J=9.9$, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.65 – 3.75 (m, 1H), 2.04 (dt, $J=13.9, 2.7$, 1H), 1.63 – 1.80 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 0.93 (d, $J=7.0$, 3H), 0.92 ppm (d, $J=7.0$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 176.4, 161.8, 157.8, 146.2, 127.4, 80.4, 69.0, 52.4, 52.3, 42.0, 32.2, 28.4, 19.4, 18.4$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 381.1455, gef. 381.1452.

17b:

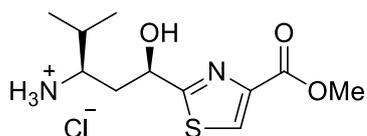
$R_f = 0.30$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:2).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.10$ (s, 1H), 5.11 (br s, 1H), 5.01 (br s, 1H), 4.57 (d, $J=9.2$, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.58 – 3.66 (m, 1H), 2.30 – 2.45 (m, 1H), 1.78 – 1.97 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.93 (d, $J=7.0$, 3H), 0.90 ppm (d, $J=7.0$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 176.35, 161.8, 156.8, 146.3, 127.5, 80.1, 71.3, 53.7, 52.4, 41.4, 32.6, 28.4, 19.2, 17.5$ ppm.

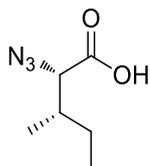
HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 381.1455, gef. 381.1453.

2.5.6 Darstellung von Tubuvalinmethylester-Hydrochlorid



Zu einer Lösung von Verbindung **17a** (700 mg, 1.9 mmol) in DCM (20 mL) wird bei 0 °C konzentrierte Salzsäure (37 %, 2 mL) gegeben. Nach 10 Minuten wird das Kühlbad entfernt und die Reaktionsmischung wird für weitere 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird unter vermindertem Druck getrocknet und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

2.5.7 Darstellung von (2*S*,3*S*)-2-Azido-3-methylvaleriansäure (**60**)^[47]



(1) Herstellung des Reagenz: Einer Lösung von Natriumazid (11.4 g, 175.7 mmol, 9.8 Äq.) in einer Mischung aus H₂O (30 mL) und DCM (50 mL) wird bei 0 °C Trifluormethansulfonsäureanhydrid (6.0 mL, 35.5 mmol, 2.0 Äq.) über einen Zeitraum von 10 Minuten tropfenweise zugesetzt. Nach einer Stunde wird das Kühlbad entfernt und der Reaktionsansatz wird für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase mit DCM (2x 20 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) gewaschen.

(2) Darstellung des Aminosäureazids: Die obige Lösung wird zu einer Mischung aus L-Isoleucin (2.34 g, 17.9 mmol, 1.0 Äq.), Natriumcarbonat (3.7 g, 26.8 mmol, 1.5 Äq.) und Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (45.0 mg, 179.0 µmol, 0.1 Äq.) in H₂O/MeOH (60 mL/120 mL) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und die organischen Lösungsmittel werden unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wird mit H₂O auf 200 mL verdünnt, mit konz. Salzsäure auf einen pH-Wert von 6 eingestellt und mit EtOAc (4x 80 mL) extrahiert. Die EtOAc-Extrakte werden verworfen. Die wässrige Phase wird durch konz. Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und erneut mit EtOAc (3x 80 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird

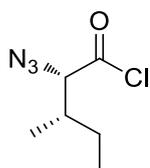
unter vermindertem Druck entfernt und das Azid wird mit einer Ausbeute von 2.37 g (84 %) als farbloses Öl erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 3.83 (d, $J=5.9$, 1H), 2.08 – 1.93 (m, 1H), 1.63 – 1.46 (m, 1H), 1.38 – 1.23 (m, 1H), 1.04 (d, $J=6.8$, 3H), 0.94 ppm (d, $J=7.4$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ = 176.13, 66.98, 37.14, 24.85, 15.89, 11.21 ppm.

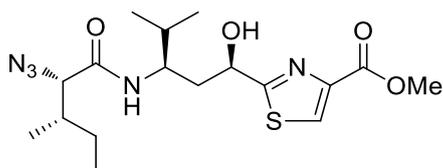
HRMS (ESI, neg) m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 156.0779, gef. 156.0773.

2.5.8 Darstellung von (2*S*,3*S*)-2-Azido-3-methylvaleriansäurechlorid^[36]



Zu einer Lösung von Azid **60** (655 mg, 5.0 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Hexan (1 mL) wird bei 0 °C Oxalylchlorid (2.2 mL, 25.0 mmol, 5.0 Äq.) gegeben. Trockenes DMF (0.4 mL, 5.0 mmol, 1.0 Äq) wird tropfenweise zugegeben und das Kühlbad wird entfernt. Die Reaktionsmischung wird für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und das Hexan wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Säurechlorid wird ohne weitere Reinigung oder Aufkonzentrierung im nächsten Schritt verwendet.

2.5.9 Darstellung des als Azid und Methylester geschütztem Dipeptids **9**^[36]



Eine Lösung von Tubuvalinmethylester (490 mg, 1.9 mmol, 1.0 Äq.) und DIPEA (1.7 mL, 9.5 mmol, 5.0 Äq.) in trockenem DCM (20 mL) wird bei 0 °C zu (2*S*,3*S*)-2-Azido-3-methylvaleriansäurechlorid (871 mg, 5.0 mmol, 2.6 Äq.) gegeben. Das Kühlbad wird entfernt und die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bei 0 °C mit H_2O (2 mL) gequenchet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 1:1) des Rückstands liefert die Verbindung **9** mit einer Ausbeute von 649 mg (86 %) als weißen Feststoff.

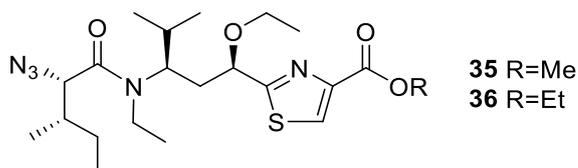
R_f = 0.42 (*n*-Hexan:EtOAc 1:1).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.15 (s, 1H), 6.53 (d, $J=9.3$, 1H), 5.33 – 5.22 (m, 1H), 4.94 – 4.84 (m, 1H), 4.03 (d, $J=3.6$, 1H), 4.01 – 3.96 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.28 – 2.11 (m, 2H), 1.91 – 1.75 (m, 2H), 1.48 – 1.25 (m, 2H), 1.19 – 0.84 ppm (m, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 176.11, 170.75, 161.94, 146.41, 127.64, 69.59, 68.71, 52.39, 51.54, 41.14, 38.56, 31.77, 24.08, 19.68, 18.25, 15.96, 11.66 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 420.1676, gef. 420.1667.

2.5.10 Darstellung der doppelt alkylierten Schlüsselintermediate **35** und **36**



Zu einer Lösung von Verbindung **9** (360 mg, 0.91 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (7 mL) wird bei 0 °C und unter Stickstoffatmosphäre Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 109 mg, 2.72 mmol, 3.0 Äq.) gegeben. Nach 10 Minuten wird Ethyliodid (434 μL , 5.43 mmol, 6.0 Äq.) zugegeben, das Kühlbad wird entfernt und die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird bei 0 °C durch Zugabe von gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung (1 mL) gequencht und mit EtOAc (3x 1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 4:1) des Rückstands liefert den Methyl ester **35** mit einer Ausbeute von 160 mg (39 %) und den Ethylester **36** mit einer Ausbeute von 105 mg (25 %) als weiße Feststoffe.

35:

R_f = 0.41 (*n*-Hexan:EtOAc 4:1).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.14 (s, 1H), 4.76 – 4.63 (m, 1H), 4.52 – 4.34 (m, 1H), 3.97 – 3.91 (m, 3H), 3.73 – 3.51 (m, 2H), 3.51 – 3.31 (m, 2H), 3.31 – 3.11 (m, 1H), 2.33 – 2.13 (m, 1H), 2.13 – 1.90 (m, 2H), 1.90 – 1.71 (m, 2H), 1.44 – 1.35 (m, 5H), 1.35 – 1.16 (m, 5H), 1.11 – 0.80 ppm (m, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ = 176.38, 169.91, 161.80, 146.86, 127.73, 76.91, 70.26, 66.83, 63.46, 61.46, 52.31, 38.31, 34.68, 30.68, 25.17, 20.40, 16.12, 15.41, 10.60 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{21}H_{35}N_5O_4S$ $[M+Na]^+$ 476.2302, gef. 476.2299.

36:

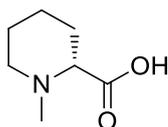
$R_f = 0.48$ (*n*-Hexan:EtOAc 4:1).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 8.12$ (s, 1H), 4.77 – 4.63 (m, 1H), 4.50 – 4.34 (m, 3H), 3.73 – 3.51 (m, 2H), 3.51 – 3.32 (m, 2H), 3.32 – 3.12 (m, 1H), 2.34 – 2.15 (m, 1H), 2.15 – 1.94 (m, 2H), 1.94 – 1.66 (m, 2H), 1.48 – 1.35 (m, 5H), 1.35 – 1.16 (m, 5H), 1.07 – 0.78 ppm (m, 12H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 176.26, 169.84, 161.24, 147.18, 127.32, 76.86, 75.75, 66.91, 63.37, 61.20, 38.26, 34.60, 30.58, 25.09, 20.32, 16.04, 15.35, 14.19, 10.52$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{22}H_{37}N_5O_4S$ $[M+Na]^+$ 490.2458, gef. 490.2454.

2.5.11 Darstellung von *N*-Methyl-D-Pipecolinsäure (50)^[36]



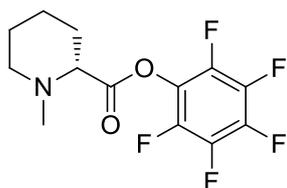
Zu einer Lösung von D-Pipecolinsäure (1.0 g, 7.74 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (9 mL) werden Paraformaldehyd (466 mg, 15.5 mmol, 2.0 Äq.) und Pd/C (10 % Pd, 200 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend werden erneut Paraformaldehyd (200 mg, 6.7 mmol, 0.9 Äq.) sowie Pd/C (10 % Pd, 50 mg) zugegeben und die Reaktionsmischung wird eine weitere Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Reaktionsansatz wird unter Verwendung von Celite filtriert und der Filterkuchen intensiv mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand unter vermindertem Druck getrocknet. Die Verbindung wird mit einer Ausbeute von 1.1 g (99 %) als weißer Feststoff erhalten.

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 3.49 - 3.32$ (m, 2H), 3.32 – 3.29 (m, 1H), 3.07 – 2.92 (m, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.29 – 2.17 (m, 1H), 1.93 – 1.67 (m, 4H), 1.63 – 1.47 ppm (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 173.49, 70.37, 55.27, 43.14, 29.52, 24.04, 22.66$ ppm.

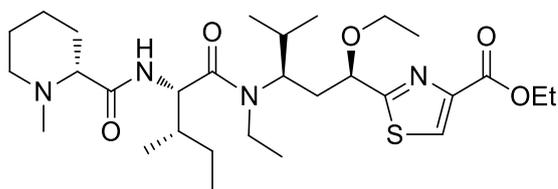
HRMS (ESI) m/z ber. für $C_7H_{13}NO_2$ $[M+H]^+$ 144.1019, gef. 144.1015.

2.5.12 Darstellung von *N*-Methyl-D-Pipecolinsäurepentafluorphenylester (**64**)^[36]



Zu einer Lösung von *N*-Methyl-D-Pipecolinsäure (**50**, 385 mg, 2.5 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem EtOAc (6 mL) werden Pentafluorphenol (515 mg, 2.8 mmol, 1.1 Äq.) und DCC (578 mg, 2.8 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und anschließend filtriert. Die Lösung wird ohne weitere Reinigung oder Aufkonzentrierung im nächsten Schritt verwendet.

2.5.13 Darstellung von *N*-Mep-Ile-*N*,*O*-Diethyl-Tuv-OEt (**38**)



Zu einer 0.4 M Lösung von *N*-Mep-OPFP **64** (1 mmol, 5.0 Äq.) in trockenem EtOAc (2.5 mL) werden Azid **36** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) und Pd/C (10 % Pd, 10 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird erneut Pd/C (10 % Pd, 10 mg) zugegeben und eine weitere Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Reaktionsansatz wird unter Verwendung eines Spritzenfilters filtriert und der Filter intensiv mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 30:1) des Rückstands liefert Verbindung **38** mit einer Ausbeute von 106 mg (93 %) als leicht gelbes Öl.

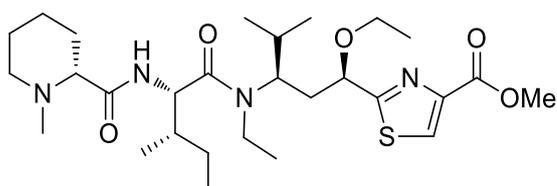
$R_f = 0.27$ (DCM:MeOH 30:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.12$ (s, 1H), 7.11 (d, $J=8.8$, 1H), 4.69 (dd, $J=18.0$, 9.0, 1H), 4.46 – 4.35 (m, 4H), 3.89 – 3.74 (m, 1H), 3.55 (q, $J=7.0$, 2H), 3.26 – 3.13 (m, 1H), 3.02 – 2.85 (m, 1H), 2.63 – 2.50 (m, 1H), 2.26 (s, 2H), 2.16 – 1.78 (m, 6H), 1.74 – 1.58 (m, 4H), 1.47 – 1.34 (m, 7H), 1.27 – 1.20 (m, 6H), 0.98 (dd, $J=9.3$, 6.7, 6H), 0.90 (t, $J=7.4$, 3H), 0.80 ppm (q, $J=6.6$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 176.32, 161.33, 147.20, 127.37, 77.19, 76.95, 69.48, 66.72, 61.29, 55.32, 53.51, 44.63, 38.36, 37.50, 30.69, 30.25, 24.86, 24.52, 23.11, 20.45, 19.98, 16.78, 16.51, 15.33, 14.26, 10.91$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 567.3575, gef. 567.3563.

2.5.14 Darstellung von *N*-Mep-Ile-*N,O*-Diethyl-Tuv-OMe (**37**)



Die Darstellung erfolgt analog zur Darstellung des Ethylesters **38** (s. Abschnitt 2.5.13). Verbindung **37** wird mit einer Ausbeute von 87 mg (79 %) als leicht gelbes Öl erhalten.

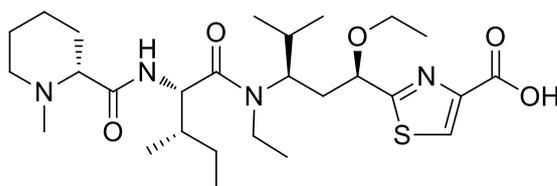
$R_f = 0.26$ (DCM:MeOH 30:1).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.15$ (s, 1H), 7.14 (d, $J=9.1$, 1H), 4.69 (dd, $J=15.6, 6.7$, 1H), 4.47 – 4.39 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (dd, $J=15.4, 7.4$, 1H), 3.57 – 3.52 (m, 2H), 3.25 – 3.16 (m, 1H), 2.97 – 2.90 (m, 1H), 2.62 – 2.54 (m, 1H), 2.27 (s, 2H), 2.08 – 1.80 (m, 6H), 1.71 – 1.57 (m, 4H), 1.45 – 1.39 (m, 3H), 1.26 – 1.22 (m, 4H), 0.98 (dd, $J=8.9, 6.7$, 6H), 0.92 – 0.86 (m, 6H), 0.82 – 0.78 ppm (m, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 173.64, 161.74, 146.71, 127.70, 76.84, 76.79, 69.40, 55.26, 53.47, 52.26, 44.55, 38.26, 37.40, 30.61, 30.18, 24.88, 24.78, 24.45, 23.04, 20.40, 19.91, 16.44, 15.27, 14.27, 10.85$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 553.3418, gef. 553.3405.

2.5.15 Darstellung von *N*-Mep-Ile-*N,O*-Diethyl-Tuv-OH (**39**)



Zu einer Lösung von Ethylester **38** (25 mg, 44 μmol , 1.0 Äq.) in THF/ H_2O (750 μL /250 μL) wird Lithiumhydroxid-Monohydrat (4.6 mg, 0.11 mmol, 2.5 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und die Lösungsmittel werden unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Wasser (2 mL)

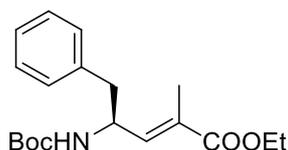
aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit EtOAc (9x 1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **39** wird mit einer Ausbeute von 18 mg (76 %) als weißer Feststoff erhalten. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt.

2.5.16 Darstellung von *N*-Boc-L-Phenylalaninal (**20**)



Zu einer Lösung von (*S*)-2-(Boc-amino)-3-phenylpropanol (10.0 g, 39.8 mmol, 1.0 Äq.) in einer Mischung von H₂O/Toluol/EtOAc (20 mL/110 mL/110 mL) werden bei 0 °C Natriumbromid (4.1 g, 39.8 mmol, 1.0 Äq.) und TEMPO (187 mg, 1.2 mmol, 0.03 Äq.) gegeben. Eine mit Natriumhydrogencarbonat gesättigte Natriumhypochlorit-Lösung (verfügbares Chlor 10 – 15 %, 40 mL) wird tropfenweise zugegeben. Nach 30 Minuten werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wird mit EtOAc (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit einer Lösung von Kaliumiodid (300 mg) in gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung (100 mL) gewaschen, dann mit einer Natriumthiosulfat-Lösung (100 mL) und schließlich mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (100 mL). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt.

2.5.17 Darstellung des Esters **22**



Zu einer Lösung von Verbindung **20** (9.9 g, 39.8 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (400 mL) wird bei 0 °C (1-Ethoxycarbonyl-ethylidene)triphenylphosphoran (17.3 g, 47.8 mmol, 1.2 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 3:1) des

Rückstands liefert Verbindung **22** mit einer Ausbeute von 10.8 g (81 %) als weißen Feststoff.

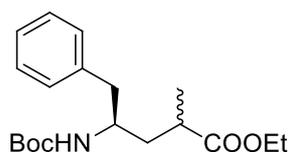
$R_f = 0.56$ (*n*-Hexan:EtOAc 4:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 7.78 - 7.08$ (m, 5H), 6.57 (d, $J=9.3$, 1H), 4.71 – 4.38 (m, 1H), 4.16 (q, $J=7.1$, 2H), 3.34 – 3.27 (m, 1H), 2.89 (dd, $J=13.2$, 7.1, 1H), 2.71 (dd, $J=13.3$, 7.6, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.27 ppm (t, $J=7.1$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 169.34$, 157.51, 142.12, 138.83, 130.57, 129.95, 129.30, 127.48, 80.18, 61.85, 51.95, 41.98, 28.70, 14.50, 12.69 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 356.1832, gef. 356.1829.

2.5.18 Darstellung von *N*-Boc-Tubuphenylalaninethylester und des C2-Epimers (Mischung von Diastereomeren **24**)



Zu einer Lösung von Verbindung **22** (10.5 g, 32.4 mmol) in MeOH (150 mL) wird $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (20 % $\text{Pd}(\text{OH})_2$, 1.0 g) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend unter Verwendung von Celite filtriert. Der Filterkuchen wird intensiv mit MeOH gewaschen und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Diastereomeren-Mischung **24** wird mit einer Gesamtausbeute von 9.7 g (97 %) als farbloses Öl erhalten. Die Produktmischung wird ohne Auftrennung im nächsten Schritt verwendet.

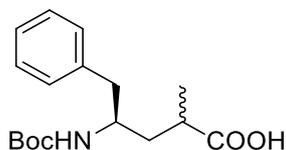
$R_f = 0.54$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 7.31 - 7.08$ (m, 5H), 4.17 – 4.01 (m, 2H), 3.81 – 3.67 (m, 1H), 3.35 – 3.24 (m, 1H), 2.80 – 2.38 (m, 3H), 1.96 – 1.66 (m, 1H), 1.59 – 1.29 (m, 9H), 1.29 – 0.98 ppm (m, 8H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 178.02$, 157.80, 139.96, 139.91, 130.44, 129.24, 129.20, 127.20, 127.16, 79.80, 79.69, 61.56, 61.47, 51.51, 49.28, 43.16, 39.35, 39.29, 38.19, 37.83, 28.79, 28.75, 28.44, 18.41, 17.15, 14.49 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 358.1989, gef. 358.1985.

2.5.19 Darstellung von *N*-Boc-Tubophenylalanin und des C2-Epimers (Mischung von Diastereomeren **29**)



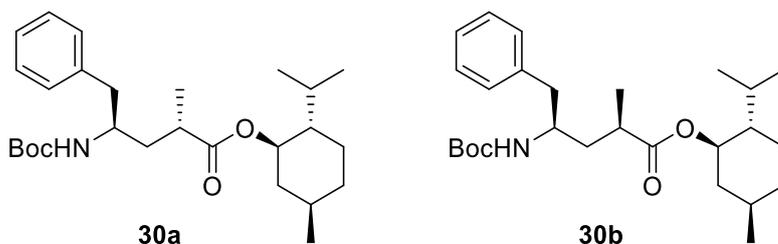
Zu einer Lösung der Diastereomeren-Mischung **24** (9.5 g, 28.3 mmol, 1.0 Äq.) in THF/H₂O (200 mL/80 mL) wird bei 0 °C Lithiumhydroxid-Monohydrat (11.9 g, 283.2 mmol, 10.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das organische Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wird mit 6 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 1 eingestellt und mit EtOAc (3x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Diastereomeren-Mischung **29** wird mit einer Gesamtausbeute von 8.3 g (95 %) als weißer Feststoff erhalten. Die Produktmischung wird ohne Auftrennung im nächsten Schritt verwendet.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7.31 – 7.09 (m, 5H), 3.88 – 3.72 (m, 1H), 3.33 – 3.26 (m, 1H), 2.79 – 2.63 (m, 2H), 2.62 – 2.40 (m, 1H), 1.90 – 1.75 (m, 1H), 1.62 – 1.03 ppm (m, 14H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 180.09, 157.90, 140.00, 139.91, 130.47, 130.44, 129.23, 129.16, 127.18, 127.12, 79.79, 79.72, 51.71, 51.31, 43.87, 43.17, 42.95, 39.49, 39.27, 37.72, 28.77, 28.74, 28.35, 18.56, 17.04 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₇H₂₅NO₄ [M+Na]⁺ 330.1676, gef. 330.1673.

2.5.20 Darstellung der Mentylester **30a** und **30b** sowie Trennung der Diastereomere^[25]



Zu einer Lösung der Diastereomeren-Mischung **29** (8.1 g, 26.4 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (260 mL) werden bei 0 °C (–)-Menthol (10.3 g, 65.9 mmol, 2.5 Äq.),

DCC (8.1 g, 39.5 mmol, 1.5 Äq.) und DMAP (318 mg, 2.6 mmol, 0.1 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und Et₂O (150 mL) wird zugegeben. Die Mischung wird filtriert und der Filterkuchen wird verworfen. Das Filtrat wird mit MeOH (100 mL) gequench und die Lösungsmittel werden unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 11:1) des Rückstands liefert Verbindung **30a** mit einer Ausbeute von 3.55 g (30 %) und Verbindung **30b** mit einer Ausbeute von 3.92 g (33 %) als weiße Feststoffe.

30a:

R_f = 0.43 (*n*-Hexane:EtOAc 5:1).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7.29 – 7.13 (m, 5H), 4.62 (td, *J*=10.8, 4.2, 1H), 3.83 – 3.63 (m, 1H), 2.79 – 2.61 (m, 2H), 2.60 – 2.49 (m, 1H), 1.99 – 1.76 (m, 3H), 1.76 – 1.62 (m, 2H), 1.52 – 1.20 (m, 13H), 1.18 – 1.03 (m, 4H), 1.01 – 0.81 (m, 8H), 0.80 – 0.70 ppm (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 177.66, 157.73, 139.87, 130.51, 129.22, 127.18, 75.37, 51.51, 48.40, 43.23, 41.98, 39.31, 37.97, 35.46, 32.73, 28.85, 28.56, 27.37, 24.38, 22.45, 21.14, 18.64, 16.48 ppm.

HRMS (ESI) *m/z* ber. für C₂₇H₄₃NO₄ [M+Na]⁺ 468.3084, gef. 468.3079.

30b:

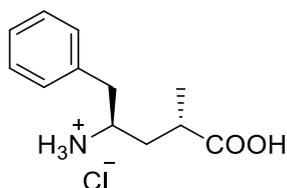
R_f = 0.49. (*n*-Hexane:EtOAc 5:1).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7.30 – 7.12 (m, 5H), 4.64 (td, *J*=10.8, 4.2, 1H), 3.86 – 3.70 (m, 1H), 2.81 – 2.65 (m, 2H), 2.56 – 2.41 (m, 1H), 1.98 – 1.61 (m, 6H), 1.54 – 1.23 (m, 12H), 1.17 – 0.81 (m, 12H), 0.80 – 0.71 ppm (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 177.88, 157.92, 139.91, 130.46, 129.24, 127.22, 79.81, 75.37, 51.01, 43.01, 41.88, 39.03, 38.20, 35.41, 32.69, 28.76, 28.48, 27.34, 24.37, 22.43, 21.15, 16.89, 16.50 ppm.

HRMS (ESI) *m/z* ber. für C₂₇H₄₃NO₄ [M+H]⁺ 446.3265, gef. 446.3261.

2.5.21 Darstellung von Tubophenylalanin-Hydrochlorid (**7**)^[25]



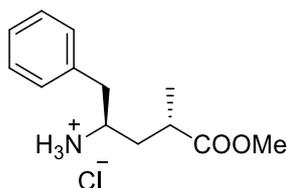
Eine Lösung von Verbindung **30a** (355 mg, 0.79 mmol) in 6 M Salzsäure (15 mL) wird für 2 Stunden bei 140 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur gekühlt und EtOAc (10 mL) wird zugegeben. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7.44 – 7.16 (m, 5H), 3.67 – 3.42 (m, 1H), 3.00 – 2.89 (m, 2H), 2.70 – 2.58 (m, 1H), 2.05 – 1.94 (m, 1H), 1.70 – 1.60 (m, 1H), 1.18 ppm (d, $J=7.1$, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 178.84, 136.81, 130.42, 130.06, 128.50, 52.49, 40.26, 37.20, 36.85, 17.88 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₂H₁₇NO₂ [M+H]⁺ 208.1332, gef. 208.1329.

2.5.22 Darstellung von Tubophenylalaninmethylester-Hydrochlorid (**31**)^[25]



Zu einer Lösung von Verbindung **7** (0.79 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem MeOH (3 mL) werden 2,2-Dimethoxypropan (390 μ L, 3.19 mmol, 4.0 Äq.) und konzentrierte Salzsäure (1.3 μ L, 7.9 μ mol, 0.01 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 12 Stunden bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **31** wird mit einer Ausbeute von 187 mg (92 % über zwei Stufen) als weißer Feststoff erhalten.

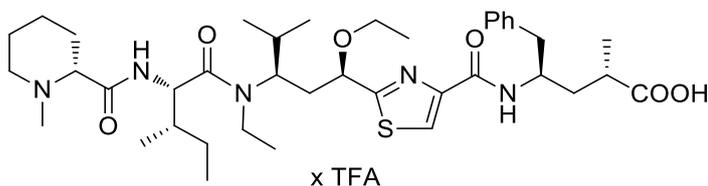
R_f = 0.28 (DCM:MeOH 10:1).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7.41 – 7.22 (m, 5H), 3.64 (s, 3H), 3.56 – 3.46 (m, 1H), 2.99 – 2.84 (m, 2H), 2.74 – 2.59 (m, 1H), 2.06 – 1.95 (m, 1H), 1.67 – 1.58 (m, 1H), 1.17 ppm (d, $J=7.1$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 177.16, 136.78, 130.41, 130.07, 128.54, 52.46, 40.28, 37.19, 36.94, 17.83 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 222.1489, gef. 222.1487.

2.5.23 Darstellung von Diethyl-Tubulylin (34)



Zu einer Lösung von Verbindung **39** (18 mg, 33 μmol , 1.0 Äq.) in trockenem DCM (0.5 mL) werden bei 0 °C Pentafluorphenol (12 mg, 66 μmol , 2.0 Äq.) und DIC (10.2 μL , 66 μmol , 2.0 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand in trockenem DMF (0.5 mL) aufgenommen. Zu dieser Lösung werden Tubuphenylalaninmethylester-Hydrochlorid **31** (17 mg, 66 μmol , 2.0 Äq.) und DIPEA (12.4 μL , 73 μmol , 2.2 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands in THF/ H_2O (200 μL /100 μL) wird Lithiumhydroxid-Monohydrat (3.5 mg, 83 μmol , 2.5 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in H_2O (2 mL) aufgenommen, mit TFA auf einen pH-Wert von 1 eingestellt und mit EtOAc (5x 1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufarbeitung des Rückstands mittels RP-HPLC (150 mm x 10 mm YMC ODS-A, (MeOH(A): H_2O (B)) + 0.1% TFA, grd. 2 % A > 25 min > 100 % A, 3 mL/min, 220 nm) liefert Verbindung **34** mit einer Ausbeute von 12 mg (43 % über drei Stufen) als weißen Feststoff.

t_{R} = 23.5 min.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.09 (s, 1H), 7.43 – 7.09 (m, 5H), 4.64 (d, $J=8.3$, 1H), 4.50 – 4.28 (m, 2H), 3.93 – 3.70 (m, 2H), 3.59 – 3.40 (m, 3H), 3.07 (s, 3H), 2.96 – 2.81 (m, 3H), 2.75 (s, 2H), 2.54 (s, 1H), 2.25 – 2.11 (m, 1H), 2.10 – 1.86 (m, 5H), 1.85 – 1.50 (m, 8H), 1.42 (t, $J=6.7$, 2H), 1.35 – 1.07 (m, 9H), 1.06 – 0.76 ppm (m, 12H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 179.76, 176.40, 169.09, 163.06, 150.85, 139.47, 130.49, 129.32, 127.43, 124.61, 78.22, 56.28, 50.63, 45.72, 43.04, 42.17, 39.26, 39.22, 38.00, 37.80, 31.86, 30.34, 25.32, 24.02, 23.77, 23.04, 20.85, 18.46, 16.65, 15.65, 11.18 ppm.

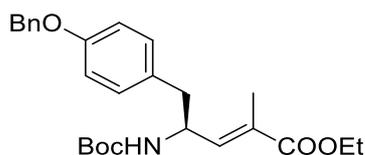
HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 728.4415, gef. 728.4388.

2.5.24 Darstellung von Aldehyd 21



Zu einer Lösung von Boc-L-Tyr(Bzl)-ol (657 mg, 1.84 mmol, 1.0 Äq.) in einer Mischung von H_2O /Toluol/EtOAc (2 mL/7 mL/7 mL) werden bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ Natriumbromid (189 mg, 1.84 mmol, 1.0 Äq.) und TEMPO (35 mg, 0.22 mmol, 0.03 Äq.) gegeben. Eine mit Natriumhydrogencarbonat gesättigte Natriumhypochlorit-Lösung (verfügbares Chlor 10 – 15 %) wird bis zum vollständigen Umsatz des Ausgangsmaterials tropfenweise zugegeben (dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung). Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird mit DCM (2x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit einer Lösung von Kaliumiodid (70 mg) in Salzsäure (10 %ig, 8 mL), mit einer Natriumthiosulfat-Lösung (10 %ig, 10 mL) und schließlich mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 %ig, 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **21** wird mit einer Ausbeute von 416 mg (64 %) als weißer Feststoff erhalten. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt.

2.5.25 Darstellung von Ethylester 23



Zu einer Lösung von Verbindung **21** (400 mg, 1.13 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (15 mL) wird bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ (1-Ethoxycarbonyl-ethylidene)triphenylphosphoran (489 g, 1.35 mmol, 1.2 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck

entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 4:1) des Rückstands liefert Verbindung **23** mit einer Ausbeute von 354 mg (72 %) als weißen Feststoff.

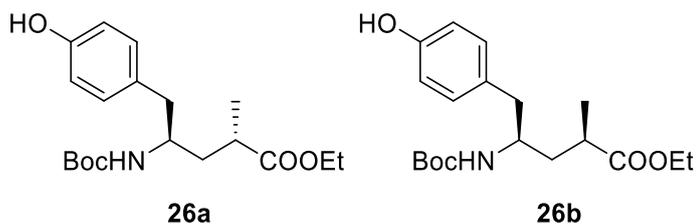
$R_f = 0.54$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.32 - 7.45$ (m, 5H), 7.10 (AA', 2H), 6.91 (BB', 2H), 6.52 (dd, $J=9.0, 1.4$, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.54 – 4.67 (br s, 2H), 4.16 – 4.21 (q, $J=7.0$, 2H), 2.84 – 2.89 (m, 1H), 2.70 – 2.75 (dd, $J=13.5, 6.6$, 1H), 1.72 (d, $J=1.4$, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.29 ppm (t, $J=7.0$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 167.6, 157.4, 154.8, 140.2, 136.8, 130.4, 128.8, 128.4, 127.8, 127.3, 114.7, 79.6, 70.0, 60.7, 50.1, 40.3, 28.4, 14.3, 12.7$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 462.2256, gef. 462.2241.

2.5.26 Darstellung von *N*-Boc-Tubutyrosinethylester (**26a**) und dem C2-Epimer **26b**



Zu einer Lösung von Verbindung **23** (300 mg, 0.68 mmol) in MeOH (20 mL) wird Pd/C (10 % Pd, 20 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend unter Verwendung von Celite filtriert. Der Filterkuchen wird intensiv mit MeOH gewaschen und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufarbeitung des Rückstands mittels RP-HPLC (MeOH:H₂O 60:40) liefert Verbindung **26a** mit einer Ausbeute von 126 mg (53 %) und Verbindung **26b** mit einer Ausbeute von 55 mg (24 %) als weiße Feststoffe.

26a:

$R_f = 0.42$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:2).

$t_R = 13.9$ min.

$[\alpha]_D^{23} = +13.4$ ($c = 1.1$; CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 6.99$ (AA', $J=8.0$, 2H), 6.73 (BB', $J=7.8$, 2H), 4.43 (d, $J=9.2$, 1H), 4.12 (q, $J=7.1$, 2H), 3.70 – 3.88 (m, 1H), 2.64 – 2.73 (m, 2H), 2.54 – 2.62

(m, 1H), 1.86 – 1.93 (m, 1H), 1.44 (m, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.24 (t, $J=7.1$, 3H), 1.13 ppm (d, $J=7.0$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 176.6, 155.4, 154.9, 130.4, 129.1, 115.3, 79.4, 60.6, 50.1, 40.8, 37.9, 36.4, 28.4, 17.6, 14.1$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 374.1944, gef. 374.1938.

26b:

$R_f = 0.42$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:2).

$t_R = 16.3$ min.

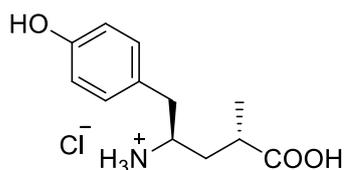
$[\alpha]_D^{23} = -8.4$ ($c = 1.1$; CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.0$ (AA', $J=8.0$, 2H), 6.74 (BB', $J=8.2$, 2H), 4.42 (d, $J=9.4$, 1H), 4.12 (q, $J=7.1$, 2H), 3.70 – 3.89 (m, 1H), 2.59 – 2.74 (m, 2H), 2.44 – 2.53 (m, 1H), 1.69 – 1.77 (m, 1H), 1.49 – 1.56 (m, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.25 (t, $J=7.1$, 3H), 1.12 ppm (d, $J=7.0$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 177.5, 155.7, 154.8, 130.4, 129.2, 115.3, 79.5, 60.6, 50.6, 41.6, 37.5, 37.1, 28.4, 17.2, 14.2$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 374.1944, gef. 374.1946.

2.5.27 Darstellung von Tubutyrosin-Hydrochlorid (28a)



Zu einer Lösung von Verbindung **26a** (11 mg, 31 μmol , 1.0 Äq.) in THF/ H_2O (600 μL /300 μL) wird bei 0 °C Lithiumhydroxid-Monohydrat (6.5 mg, 0.16 mmol, 5.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in H_2O (2 mL) aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 4 eingestellt und mit EtOAc (3x 1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands in EtOAc (1 mL) wird konzentrierte Salzsäure (100 μL) gegeben. Die Mischung wird für 2 Stunden gerührt und unter vermindertem Druck zur

Trockne eingengt. Der Rückstand wird in DCM (2 mL) gelöst und erneut zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Material wird ohne weitere Aufarbeitung zur Darstellung von Tubulysin B verwendet.

3 Neue Syntheseverfahren zur effektiven Produktion der Tubugis

3.1 Einleitung

Bei den Tubugis handelt es sich um synthetische Tubulysin-Analoga. Die Darstellung dieser neuen Familie von Verbindungen erfolgt unter Einsatz einer Multikomponentenreaktion (engl. multi component reaction, MCR) als Schlüsselschritt. Das Kofferwort „Tubugi“ ergibt sich aus einer Kreuzung des ursprünglichen Verbindungsnamens mit der Bezeichnung der verwendeten MCR, welche von dem deutsch-estnischen Chemiker Ivar Ugi zu Beginn der 1950er Jahre entwickelt wurde: Tubulysin + Ugi-MCR → Tubugi. Bei Multikomponentenreaktionen handelt es sich um direkte Umsetzungen von drei oder mehr Verbindungen. Diese Reaktionsführung besticht durch eine ausgezeichnete Atomökonomie und eröffnet oftmals einen schnellen und einfachen Zugang zu komplexen Strukturen aus kommerziell erhältlichen oder verhältnismäßig leicht zugänglichen Bausteinen. Darüber hinaus ermöglicht dieser konvergente Synthesansatz durch eine Variation der eingesetzten Komponenten (kombinatorische Chemie) den effizienten Aufbau umfangreicher Substanzbibliotheken, beispielsweise zur Untersuchung pharmakologisch interessanter Substanzen hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsweise-Beziehung. Bei der klassischen Ugi-Reaktion, einer Vierkomponentenreaktion (4CR), erfolgt die Umsetzung von einem Amin mit einer Oxokomponente (z. B. Aldehyd oder Keton), einer Carbonsäure und einem Isonitril (s. Abbildung 3.1). Zahlreiche Variationen dieser vielseitigen Reaktion sind bekannt: Beispielsweise kann die Carbonsäure durch Stickstoffwasserstoffsäure, Cyanat oder Wasser ersetzt werden. Anstelle der Aminokomponente können Hydrazine oder Hydroxylamine Verwendung finden.^[48]

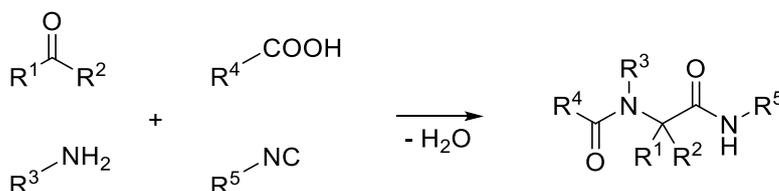


Abbildung 3.1 Die klassische Version der Ugi-4CR.

Eine Kondensation zwischen einem primärem Amin und Oxokomponente liefert ein Imin und Wasser (s. Abbildung 3.2; a). Es folgt die Protonierung des in dieser Gleichgewichtsreaktion entstandenen Imins durch die in Lösung dissoziierte Carbonsäure (b), woraufhin das nukleophile Isonitril am elektrophilen Iminkohlenstoff angreift. Das resultierende Nitriliumion wird vom nukleophilen Carboxylation attackiert und bildet so das primäre Ugi-Produkt als instabile Zwischenstufe (c). Die abschließende, irreversible Mumm-Typ-Umlagerung zum Endprodukt (d) stellt die maßgebliche Triebkraft der Ugi-4CR dar.^[49-51]

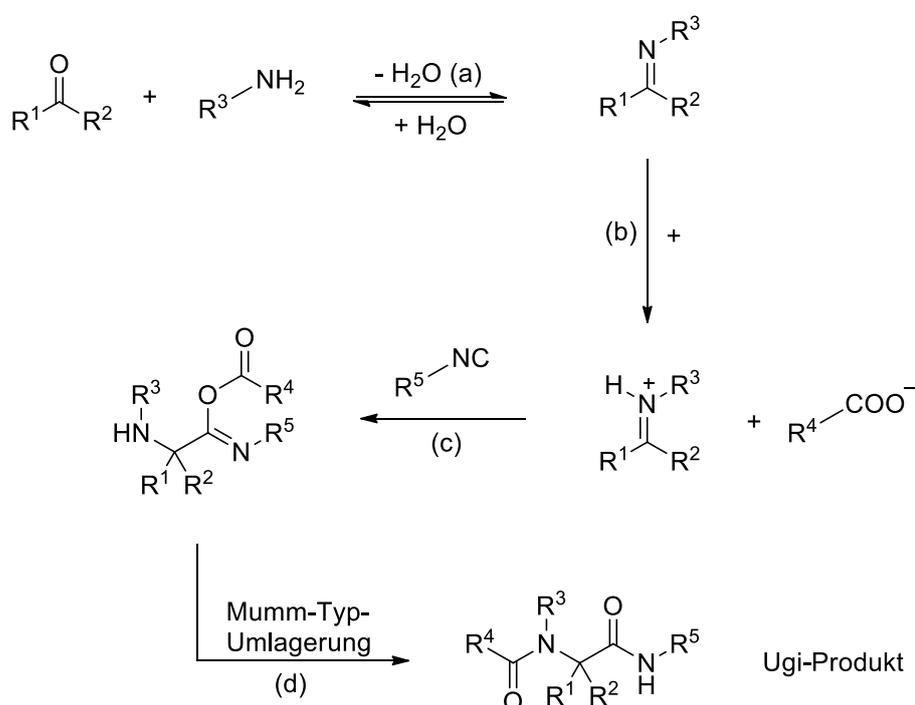


Abbildung 3.2 Mechanismus der Ugi-Reaktion.

Die Reaktion wird bevorzugt in protischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol, Trifluorethanol oder Wasser durchgeführt. Dies legt einen ionischen Übergangszustand nahe, jedoch ist der voranstehend dargelegte Reaktionsmechanismus nicht abschließend belegt und somit noch immer Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.^[52,53]

Die ersten Tubugis wurden im Jahr 2010 im eigenen Arbeitskreis synthetisiert.^[54] Eine Umsetzung der unter Abbildung 3.3 gezeigten Bausteine liefert in nur einem Syntheseschritt das *N*-Mep-Ile-Tuv-Tripeptid – inklusive einer leichten Modifikation der natürlichen Seitenkette.

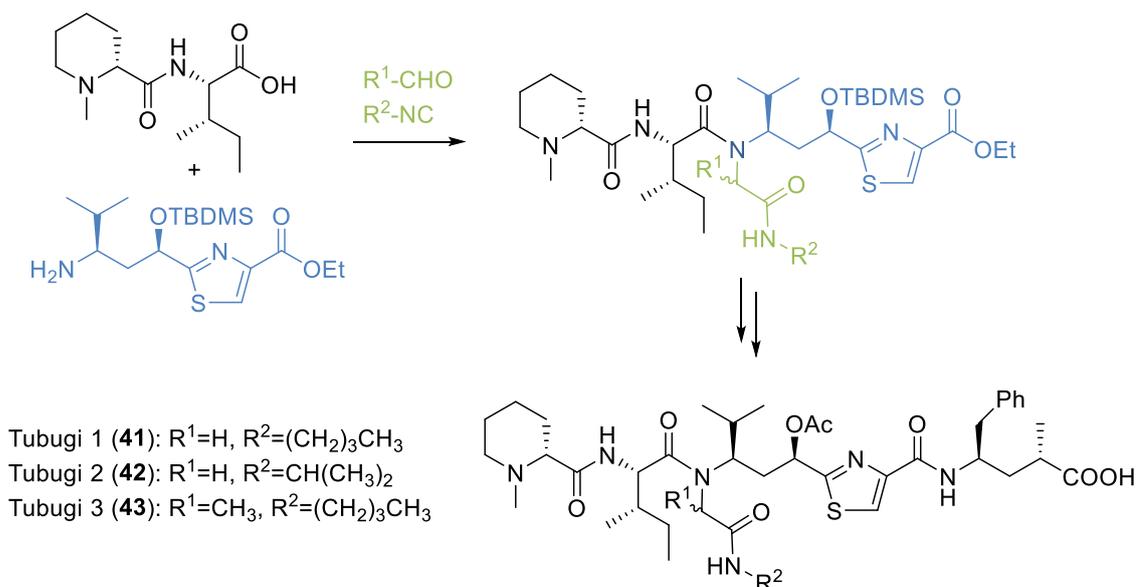


Abbildung 3.3 Erste beschriebene Tubugi-Synthesen (Tubugis 1 bis 3) von Pando *et al.* unter Verwendung einer Ugi-4CR als Schlüsselschritt.

Der größte Teil des Moleküllückgrats ist damit aufgebaut. Die artifizielle Seitenkette (grün dargestellt) ist insgesamt stabiler als der natürliche *N,O*-Acetalester, sodass die folgende Esterspaltung einem Standardprotokoll folgend, unter Verwendung von Lithiumhydroxid, durchgeführt werden kann. Die resultierende Säurefunktion wird als Pentafluorphenylester aktiviert, bevor eine Kupplung mit Tubuphenylalaninmethylester **31** erfolgt. Die Abspaltung der Esterschutzgruppe erfolgt auch hier mittels Lithiumhydroxid und eine abschließende Acetylierung liefert die entsprechenden Tubugis 1 bis 3 (**41–43**). Wie beschrieben haben Änderungen an der natürlichen Struktur im Fall der Tubulysine oftmals dramatische Aktivitätseinbußen zur Folge. Erste Zelltests (s. Tabelle 3.1) belegen jedoch, dass die Aktivitäten der genannten Tubugis im Bereich von Tubulysin A liegen.

Tabelle 3.1 Zytotoxische Aktivität der Tubugis gegen ausgewählte Zelllinien.^[54]

| Verbindung | Zelllinie, IC ₅₀ [nM] | |
|------------------------|----------------------------------|--------------------|
| | PC-3 ^a | HT-29 ^b |
| Tubugi 1 (41) | 0.23 | 0.14 ± 0.02 |
| Tubugi 2 (42) | 0.29 ± 0.04 | 0.34 ± 0.07 |
| Tubugi 3 (43) | 0.22 ± 0.01 | 0.56 ± 0.04 |
| Tubulysin A | 0.21 ± 0.05 | 0.32 ± 0.06 |

Die neu entwickelte Syntheseroute liefert somit Tubulysin-Analoga, die bei gleichbleibender Aktivität deutlich einfacher zugänglich sind als ihre natürlichen Vorbilder. Diese vielversprechenden Ergebnisse bilden den Grundstein für die, in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Optimierungen und Untersuchungen zum Forcieren eines möglichen Einsatzes dieser potenten Substanzfamilie in der Krebstherapie.

3.2 Neue, effiziente Syntheserouten zur Darstellung von Tubugi 1

Die oben beschriebene Synthesevariante liefert die Tubugis 1 bis 3 (**41–43**) in Mengen bis zu 6 mg. Für weiterführende Untersuchungen sind jedoch größere Mengen des Vertreters Tubugi 1 (**41**) notwendig. Darüber hinaus ist die zuvor beschriebene Syntheseroute, genauer die Ugi-Reaktion als Schlüsselschritt, mit verschiedenen Nachteilen behaftet und ist daraus resultierend kaum geeignet für nachfolgende Modifizierungen, wie beispielsweise weitere Umsetzungen zum Anknüpfen von Targeting-Komponenten (s. Kapitel 5). Unter Verwendung der Bausteine **44** bis **47** (s. Abbildung 3.4) zeigt sich die Multikomponentenreaktion nach Ugi außergewöhnlich problematisch. Neben dem gewünschten Zielmolekül **48** entsteht grundsätzlich auch doppelt carboxamidomethyliertes Tubuvalin **49**.

^a Humane Prostatakrebszelllinie

^b Humane Darmkrebszelllinie

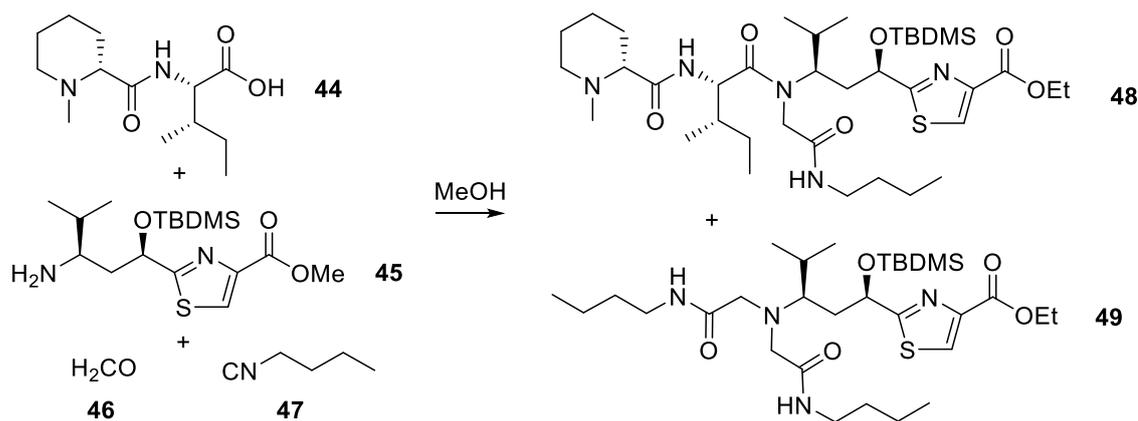


Abbildung 3.4 Die Ugi-Reaktion zum Aufbau des Tubugi 1-Gerüsts liefert neben der Zielverbindung **48** auch das doppelt alkylierte Produkt **49**. Die Ausbeuten sowie das Verhältnis zwischen den Verbindungen **48** und **49** schwanken stark.

Eine schrittweise Zugabe der einzelnen Reaktionspartner jeweils über mehrere Stunden und unter Verwendung einer Spritzenpumpe verschiebt die Umsetzung zugunsten des gewünschten Ugi-Produkts **48**. Abgesehen davon, dass durch diese Reaktionsführung eine grundsätzlich sehr einfache Umsetzung wie die Ugi-Reaktion stark verkompliziert wird, stellt sich beispielsweise die kontrollierte Dosierung von festem Paraformaldehyd in Methanol über eine Spritzenpumpe als verhältnismäßig schwierig dar. Darüber hinaus schwanken selbst unter genauester Einhaltung aller Reaktionsparameter die Ausbeuten der Zielverbindung deutlich. Die Ursache dafür ist bisher offen und auch der Mechanismus, welcher der Bildung des doppelt alkylierten Produkts **49** zugrunde liegt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (ein postulierter Mechanismus findet sich in der „supplementary information“ der entsprechenden Publikation von Pando *et. al.*^[54]). Abgesehen von den beschriebenen Problemen konnten Upscaling-Versuche zeigen, dass eine Erhöhung des Reaktionsansatzes zur bevorzugten Bildung des unerwünschten Produkts **49** führt. Auch zahlreiche Variationen der verschiedenen Reaktionsparameter, wie verwendetes Lösungsmittel, Zugabedauer der Reaktionspartner, Zeit für die Imin-Bildung vor Zusatz der weiteren Komponenten oder die Verwendung von Formalin anstelle von Paraformaldehyd, führten hier nicht zu einer Verbesserung. Schließlich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine von Grund auf neue Synthesestrategie zum Aufbau der Tubugis entwickelt. In Abbildung 3.5 ist der retrosynthetische Ansatz dazu verdeutlicht.

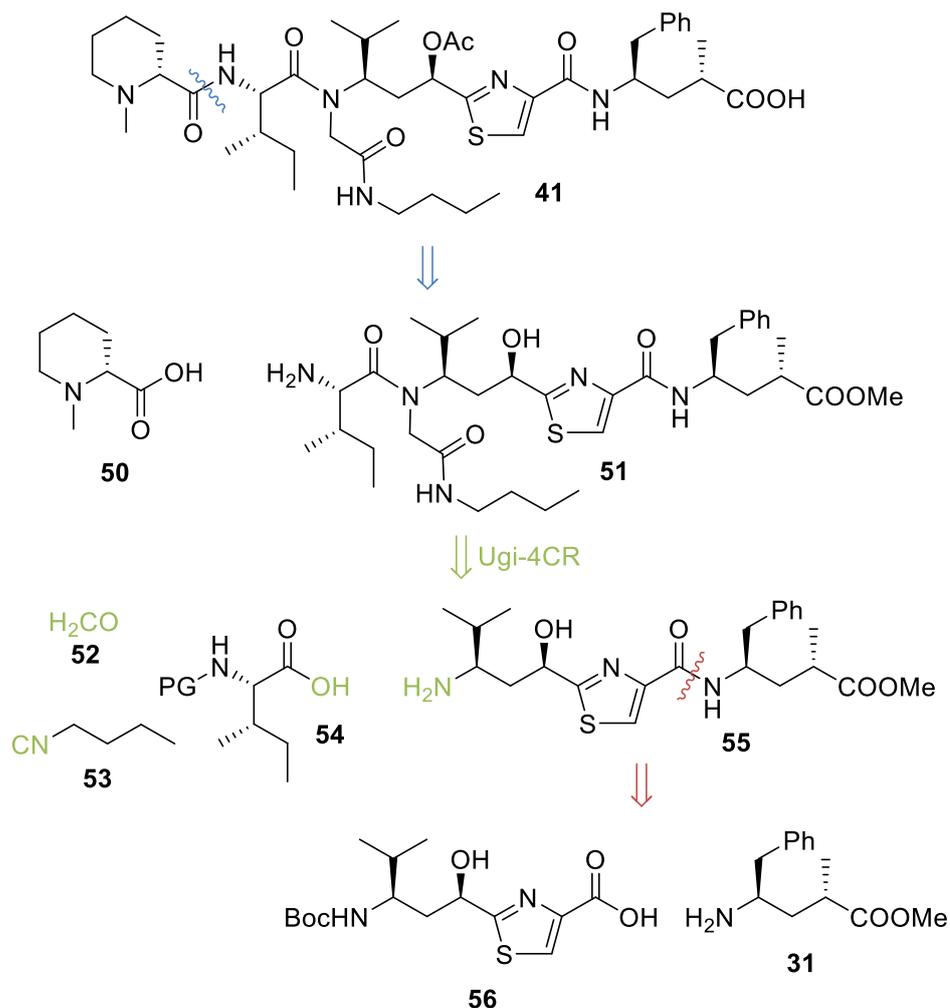


Abbildung 3.5 Neuer retrosynthetischer Ansatz für die Darstellung der Tubugis am Beispiel von Tubugi 1 (41).

Der erste Bindungsbruch erfolgt in diesem Fall entlang der Peptidbindung zwischen *N*-Mep und der Isoleucin-Einheit. Das resultierende Tripeptid **51** inklusive der gewünschten Seitenkette am Tubuvalin-Stickstoffatom ist über eine Ugi-4CR zugänglich. Neben Formaldehyd **52** und *n*-Butylisocyanid **53** ist auch *N*-geschütztes Isoleucin **54** kommerziell erhältlich. Das als Amin-Komponente fungierende Tuv-Tut-Dipeptid **55** ist literaturbekannt und aus den einzelnen Aminosäuren **31** und **56** erhältlich (s. Abbildung 3.6).^[7] Im Gegensatz zur zuerst beschriebenen Tubugi-Synthesevariante kann hier auf die TBDMS-Schätzung der Tubuvalin-Hydroxyfunktion verzichtet werden.

Während die Multikomponentenreaktion mit Boc-geschütztem Isoleucin **58** das unerwünschte doppelt-carboxamidomethylierte Tuv-Tup-Dipeptid (analog zur Variante aus dem Jahr 2010; s. Abbildung 3.4) als Hauptprodukt liefert, führen die anderen beiden Säurekomponenten nicht zur Bildung dieser Verbindung. Unter Verwendung des Azids **60** ergibt die Ugi-4CR die Zielverbindung **63** mit einer Ausbeute von 51 %. Im Fall der Umsetzung mit Fmoc-geschütztem Isoleucin **59** konnte kein sauberes Ugi-Produkt **62** isoliert werden. Dennoch wurde die weitere Umsetzung mit beiden Ansätzen weiterverfolgt. Dazu wurde das Azid **63** in Gegenwart von Pentafluorphenyl-aktivierter *N*-Methylpipercolinsäure **64** und einer katalytischen Menge von Palladium auf Aktivkohle reduziert. Das Hauptprodukt dieser Reaktion bildete nicht das gewünschte Kupplungsprodukt **65** sondern das aus einem intramolekularen Ringschluss resultierende 2,5-Diketopiperazin **66** (s. Abbildung 3.8).

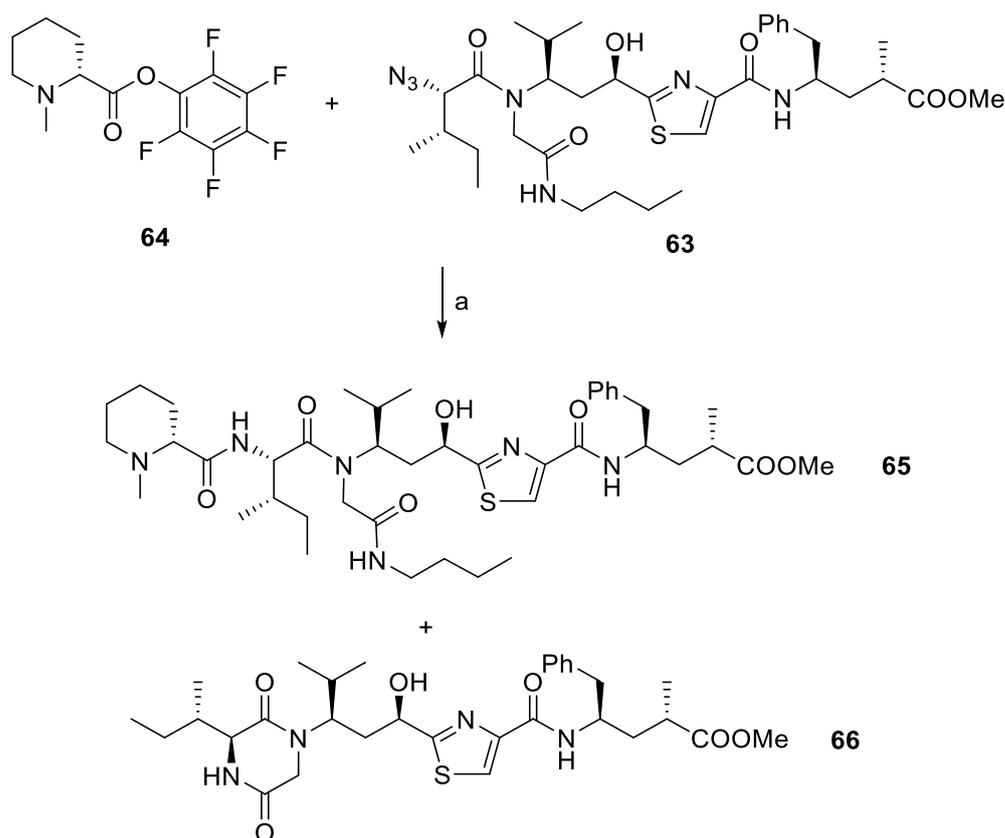


Abbildung 3.8 Produktmischung bei der Kupplung von aktivierter *N*-Mep **64** mit Verbindung **63** durch einen unerwünschten, intramolekularen Ringschluss. a) Pd/C (10 Gew%), H₂, 0.3 M *N*-Mep-OPFP (**64**) in EtOAc, 4 % (**65**), 58 % (**66**).

Die Palladium-katalysierte Diketopiperazin-Bildung vergleichbarer Systeme ist bereits literaturbekannt^[55–57] und kann wie folgt unterdrückt werden: Hierzu ist von der

Eintopfreaktion abzurücken und die Reduktion und die Kupplung sukzessive abzuhandeln (s Abbildung 3.9). Die Reduktion der Azidfunktion mittels Pd/C erfolgt in Gegenwart von gelöstem Chlorwasserstoff. Aus dem entstehenden Amin bildet sich somit direkt das korrespondierende HCl-Salz, welches vor der Zyklisierung schützt. Nachdem der Reaktionsansatz aufgearbeitet wurde, muss das gebildete Salz durch intensives Waschen mit NaHCO₃-Lösung in das freie Amin **67** überführt werden. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt, da der unerwünschte Ringschluss bereits bei einer Temperatur von ca. 40 °C auch in Abwesenheit eines Katalysators zügig abläuft. Der Rückstand wird daraufhin mit einer Lösung von aktivierter *N*-Methylpipercolinsäure **64** in Ethylacetat umgesetzt und liefert so das Peptid **65** in einer Ausbeute von 59 % über zwei Stufen.

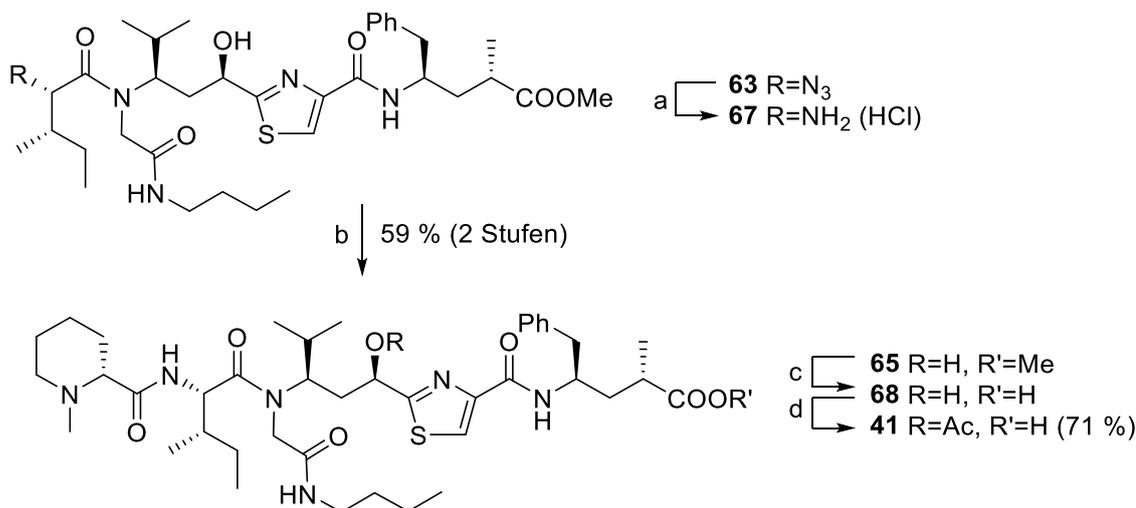


Abbildung 3.9 Reduktion der Azidfunktion in Gegenwart von HCl gefolgt von einer Kupplung mit aktivierter *N*-Mep, Esterspaltung und Acetylierung liefert die Zielverbindung Tubugi 1 (**41**). a) Pd(OH)₂/C (20 Gew%), H₂, 4 M HCl in Dioxan; b) *N*-Mep-OPFP (**64**), DIPEA, DMF, 59 % (2 Stufen) c) LiOH·H₂O, THF/H₂O, 0 °C → RT; d) Ac₂O, Py, 0 °C → RT, 71 % (2 Stufen).

Während die Reduktion des Azids **63** circa zwölf Stunden in Anspruch nimmt, ist die Fmoc-Schutzgruppe des alternativen Ugi-Produkts **62** unter Verwendung von Piperidin in DMF nach nur zwanzig Minuten vollständig gespalten. Genau wie bei der Azid-Variante erfolgen die Aufarbeitung der Reaktionsmischung sowie das Trocknen des Rückstands bei Raumtemperatur, bevor die Kupplung mit *N*-Methylpipercolinsäure in analoger Weise durchgeführt wird. Die letzten beiden Syntheseschritte (Methylesterspaltung und Acetylierung) unterscheiden sich nicht von der ersten Tubugi-Synthese aus dem Jahr 2010.

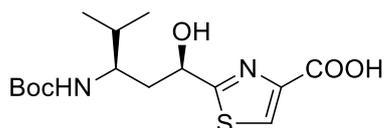
Im Vergleich zur ursprünglichen Tubugi-Synthesestrategie zeichnen sich die hier neu vorgestellten Varianten (Fmoc- und Azid-Route) bei vergleichbarer Gesamtausbeute durch eine deutlich vereinfachte praktische Durchführung aus. Darauf ist unter Umständen auch die bessere Reproduzierbarkeit der Ugi-4CR zurückzuführen. Die Durchführung des Schlüsselschritts ist auch mit deutlich größeren Materialmengen unproblematisch, da die Bildung eines doppelt alkylierten Produkts (analog zu Verbindung **49**, s. Abbildung 3.4) bei diesen Varianten grundsätzlich keine Rolle spielt. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die neue Synthesestrategie vor allem durch die gute Reproduzierbarkeit und die effiziente Produktion größerer Mengen Material eine deutliche Verbesserung darstellt. Erst die Anwendung dieser neuen Routen ermöglicht weiterführende Untersuchungen und Umsetzungen wie beispielsweise die in Kapitel 5 der vorliegenden Arbeit beschriebene Darstellung von Tubugi-Konjugaten mit Targeting-Komponenten.

3.3 Experimentelle Daten

3.3.1 Allgemeine Angaben

Siehe Abschnitt 2.5.1, Seite 19.

3.3.2 Darstellung von *N*-Boc-Tubuvalin (**56**)



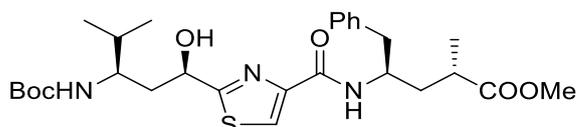
Zu einer Lösung von Ethylester **17a** (25 mg, 44 μ mol, 1.0 Äq.) in THF/H₂O (80 mL/40 mL) wird bei 0 °C Lithiumhydroxid-Monohydrat (3.3 g, 78.1 mmol, 10.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das organische Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der wässrige Rückstand wird mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und mit EtOAc (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **56** wird mit einer Ausbeute von 2.7 g (100 %) als weißer Feststoff erhalten. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.25 (s, 1H), 4.91 – 4.89 (m, 1H), 3.75 – 3.69 (m, 1H), 2.01 – 1.91 (m, 1H), 1.81 – 1.68 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.92 (d, $J=6.8$, 3H), 0.91 ppm (d, $J=6.8$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 180.70, 164.34, 158.82, 148.52, 128.61, 79.90, 69.85, 53.55, 41.34, 34.20, 28.81, 19.26, 18.51 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 367.1298, gef. 367.1298.

3.3.3 Darstellung von *N*-Boc-Tuv-Tup-OMe (**57**)^[25]



Zu einer Lösung von Verbindung **56** (2.1 g, 6.1 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (25 mL) werden bei 0 °C HOBt (0.6 M in DMF, 11.2 mL, 6.7 mmol, 1.1 Äq.), HATU (2.6 g, 6.7 mmol, 1.1 Äq.) und Triethylamin (1.7 mL, 12.2 mmol, 2.0 Äq.) gegeben. Über einen Zeitraum von 10 Minuten wird eine Lösung von Tup-OMe·HCl (**31**, 1.57 g, 6.1 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (24 mL) tropfenweise zugegeben. Nach 5 Minuten wird das Kühlbad entfernt und die Reaktionsmischung wird für 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird mit H_2O (60 mL) verdünnt und mit Et_2O (2x 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1 M Salzsäure (90 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (90 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2x 90 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **57** wird mit einer Ausbeute von 2.8 g (81 %) als weißer Feststoff erhalten. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt.

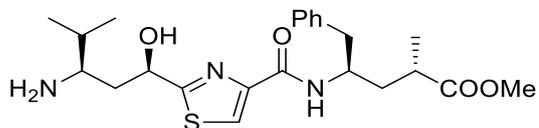
R_f = 0.42 (*n*-Hexan:EtOAc 4:6).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.01 (s, 1H), 7.29 – 7.16 (m, 5H), 7.09 (d, $J=9.4$, 1H), 5.20 (s, 1H), 4.88 (d, $J=9.7$, 1H), 4.59 (d, 1H), 4.47 – 4.33 (m, 1H), 3.79 – 3.68 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.97 – 2.85 (m, 2H), 2.65 – 2.53 (m, 1H), 2.07 – 1.90 (m, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.16 (d, $J=7.1$, 3H), 1.01 (d, $J=6.8$, 3H), 1.00 ppm (d, $J=7.1$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ = 176.60, 175.25, 160.75, 157.93, 149.68, 137.48, 129.63, 128.30, 126.44, 122.93, 80.53, 68.76, 52.26, 51.71, 48.15, 41.59, 41.07, 37.78, 36.47, 32.25, 28.32, 19.37, 18.35, 17.78 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{28}H_{41}N_3O_6S$ $[M+Na]^+$ 570.2608, gef. 570.2597.

3.3.4 Darstellung von Tuv-Tup-OMe (55)



Zu einer Lösung von Verbindung **57** (100 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (5 mL) wird Trifluoressigsäure (211 μ L, 2.7 mmol, 15.0 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, mit Toluol (6 mL) verdünnt und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in DCM (15 mL) aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5x 20 mL) sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2x 20 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit DCM (25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 30:1 \rightarrow 10:1) des Rückstands liefert Verbindung **55** mit einer Ausbeute von 69 mg (79 %) als farbloses Öl.

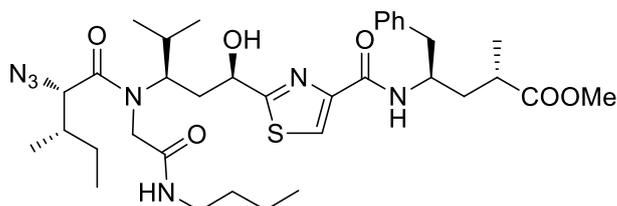
R_f = 0.22 (DCM:MeOH 8:1).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.99 (s, 1H), 7.27 – 7.18 (m, 5H), 7.10 (d, $J=9.2$, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.46 – 4.35 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 2.90 (d, $J=6.3$, 2H), 2.66 – 2.54 (m, 2H), 2.25 – 2.13 (m, 1H), 2.06 – 1.94 (m, 2H), 1.66 – 1.53 (m, 2H), 1.16 (d, $J=7.1$, 3H), 0.91 – 0.86 ppm (m, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 178.54, 176.60, 160.90, 150.31, 137.56, 129.45, 128.31, 126.45, 122.90, 71.76, 54.52, 51.71, 48.22, 41.16, 37.97, 36.70, 36.43, 34.55, 18.43, 17.74, 17.43 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{23}H_{33}N_3O_4S$ $[M+H]^+$ 448.2265, gef. 448.2258.

3.3.5 Darstellung von Azido-Ugi-Produkt 63



Zu einer Lösung von Verbindung **55** (67 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (1.5 mL) wird Paraformaldehyd (12 mg, 0.39 mmol, 2.5 Äq.) gegeben. Nach 2 Stunden werden (2*S*,3*S*)-2-Azido-3-methylvaleriansäure (**60**, 24 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) und *n*-Butylisocyanid (15.6 μ L, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 30:1) des Rückstands liefert Verbindung **63** mit einer Ausbeute von 54 mg (51 %) als farbloses Öl.

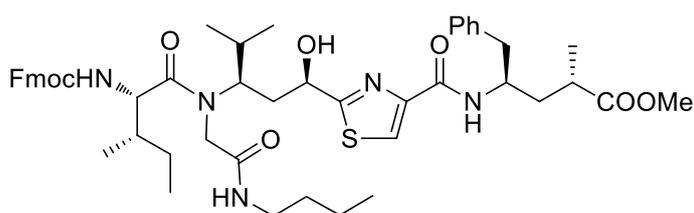
$R_f = 0.49$ (DCM:MeOH 15:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.98$ (s, 1H), 7.35 – 7.14 (m, 5H), 4.94 – 4.87 (m, 1H), 4.64 (d, $J=5.4$, 1H), 4.45 – 4.33 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 1H), 3.87 – 3.78 (m, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.23 – 3.16 (m, 3H), 3.02 – 2.83 (m, 3H), 2.67 – 2.56 (m, 2H), 2.29 – 2.19 (m, 1H), 2.05 – 1.94 (m, 2H), 1.80 – 1.56 (m, 3H), 1.67 – 1.25 (m, 5H), 1.16 (d, $J=7.3$, 3H), 1.07 – 0.81 ppm (m, 15H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 176.53, 174.59, 171.73, 169.11, 160.67, 149.78, 137.72, 129.35, 128.21, 126.32, 122.9, 68.21, 62.11, 61.55, 51.63, 48.57, 47.1, 41.26, 39.34, 38.39, 37.84, 36.64, 34.99, 31.14, 30.6, 24.79, 20.63, 20.14, 20.11, 17.76, 15.99, 13.54, 10.65$ ppm.

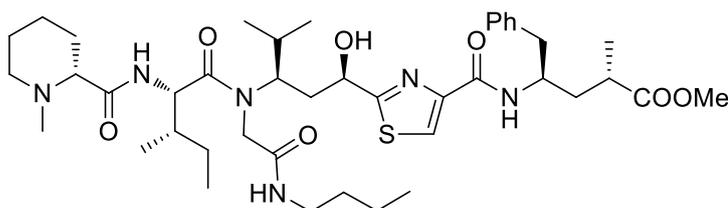
HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 722.3670, gef. 722.3669.

3.3.6 Darstellung von *N*-Fmoc-Ugi-Produkt **62**



Zu einer Lösung von Verbindung **55** (69 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (1.5 mL) wird Paraformaldehyd (12 mg, 0.39 mmol, 2.5 Äq.) gegeben. Nach 2 Stunden werden *N*-Fmoc-Isoleucin (53 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) und *n*-Butylisocyanid (15.6 μ L, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (DCM:MeOH 30:1). Fraktionen, die Material mit einem R_f -Wert zwischen 0.5 und 0.6 (DC: DCM:MeOH 15:1) enthalten, werden kombiniert und die Lösungsmittel werden unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

3.3.7 Darstellung von Peptoid **65**



Vorschrift A (ausgehend von Azido-Ugi-Produkt **63**)

Zu einer Lösung von Verbindung **63** (53 mg, 0.076 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (1 mL) werden Pd(OH)₂/C (20 % Pd(OH)₂, 10 mg) und 4 M Chlorwasserstoff in Dioxan (37.5 µL, 0.15 mmol, 2.0 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend unter Verwendung von Celite filtriert. Der Filterkuchen wird intensiv mit MeOH gewaschen und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der so erhaltene Rückstand wird zu einer Lösung von *N*-Mep-OPFP (**64**) und DIPEA (25.9 µL, 0.15 mmol, 2.0 Äq.) in trockenem DMF (1 mL) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 25:1) des Rückstands liefert Verbindung **65** mit einer Ausbeute von 36 mg (59 % über zwei Stufen) als hellgelben Feststoff.

Vorschrift B (ausgehend von *N*-Fmoc-Ugi-Produkt **62**)

Zu einer Lösung von Verbindung **62** in DMF (2 mL) wird Piperidin (0.5 mL) gegeben. Nach 20 Minuten wird der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wird zu einer Lösung von *N*-Mep-OPFP (**64**) in trockenem DMF (1 mL) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 25:1) des Rückstands liefert Verbindung **65** mit einer Ausbeute von 24 mg (20 % über drei Stufen) als hellgelben Feststoff.

R_f = 0.24 (DCM:MeOH 25:1).

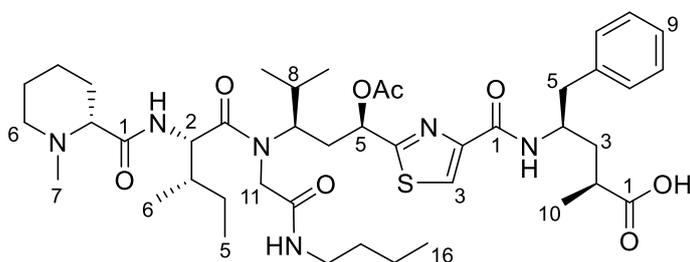
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 8.00 (s, 1H), 7.28 – 7.20 (m, 5H), 7.18 – 7.12 (m, 1H), 5.28 (dd, *J*=9.9, 2.5, 1H), 4.32 (d, *J*=10.6, 1H), 4.20 (d, *J*=7.5, 1H), 3.62 – 3.57 (m, 3H), 3.56 – 3.39 (m, 1H), 3.32 – 3.28 (m, 4H), 3.22 – 3.11 (m, 2H), 3.11 – 3.01 (m, 3H), 2.93 – 2.82 (m, 1H), 2.02 – 1.91 (m, 2H), 1.86 – 1.58 (m, 8H), 1.49 – 1.38 (m,

3H), 1.36 – 1.26 (m, 3H), 1.14 (d, $J=7.1$, 3H), 1.03 (d, $J=6.8$, 3H), 0.99 (d, $J=6.5$, 3H), 0.94 – 0.83 ppm (m, 16H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 179.34, 174.99, 174.64, 173.72, 173.45, 163.18, 150.71, 139.53, 130.42, 129.33, 127.38, 124.26, 69.98, 68.15, 59.69, 56.97, 55.97, 52.63, 52.2, 50.35, 44.02, 42.42, 40.23, 39.08, 38.96, 38.2, 37.81, 32.45, 32.38, 31.77, 26.12, 25.43, 23.38, 21.2, 21.14, 20.49, 18.37, 15.98, 14.11, 11.51 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 799.4786, gef. 799.4768.

3.3.8 Darstellung von Tubugi 1 (41)^[54]



Zu einer Lösung von Verbindung **65** (20 mg, 25 μmol , 1.0 Äq.) in THF/ H_2O (200 μL /100 μL) wird bei 0 °C Lithiumhydroxid-Monohydrat (5.8 mg, 125 μmol , 5.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in H_2O (500 μL) aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit EtOAc (5x 300 μL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands in trockenem Pyridin (200 μL) wird bei 0 °C Essigsäureanhydrid (15 μL , 160 μmol , 6.4 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0 °C gekühlt. Eine Mischung von Dioxan/ H_2O (150 μL /150 μL) wird zugegeben. Die Mischung wird über Nacht gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 10:1 \rightarrow 8:1) des Rückstands liefert Verbindung **41** mit einer Ausbeute von 15 mg (71 %) als weißen Feststoff.

R_f = 0.16 (DCM:MeOH 10:1).

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) D-Mep δ = 3.03 (br d, $J=7.4$ Hz, 1H, CH_a-6), 2.78 (br d, $J=10.9$ Hz, 1H, $\text{CH}-2$), 2.28 (s, 3H, CH_3-7), 2.26 (m, 1H, CH_b-6), 1.85 (m, 1H, CH_a-3), 1.80 (m, 1H, CH_a-4), 1.70 (m, 1H, CH_a-5), 1.61 (m, 1H, CH_b-5), 1.59 (m, 1H, CH_b-3),

1.36 (m, 1H, CH_b-4). L-Ile δ = 4.43 (d, $J=9.3$ Hz, 1H, CH-2), 2.0 (m, 1H, CH-3), 1.57 (m, 1H, CH_a-4), 1.14 (m, 1H, CH_b-4), 0.98 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, CH₃-6), 0.88 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH₃-5). Tuv δ = 8.05 (s, 1H, CH-3), 6.31 (dd, $J=11.5, 1.9$ Hz, 1H, CH-5), 4.75 (d, $J=17.7$ Hz, 1H, CH_a-11), 4.58 (br s, 1H, CH-7), 3.79 (d, $J=17.7$ Hz, 1H, CH_b-11), 3.24 (dt, $J=13.5, 7.0$ Hz, 1H, CH_a-13), 3.11 (dt, $J=13.5, 7.0$ Hz, 1H, CH_b-13), 2.33 (ddd, $J=15.1, 13.6, 11.5$ Hz, 1H, CH_a-6), 2.15 (s, 3H, CH₃CO), 1.92 (m, 1H, CH_b-6), 1.78 (m, 1H, CH-8), 1.42 (m, 2H, CH₂-14), 1.31 (m, 2H, CH₂-15), 1.07 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃-9), 0.86 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH₃-16), 0.78 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, CH₃-10). Tup δ = 7.22 (m, 2H, CH-8, CH-8'), 7.22 (m, 2H, CH-7, CH-7'), 7.15 (m, 1H, CH-9), 4.35 (m, 1H, CH-4), 2.91 (dd, $J=13.5, 7.3$ Hz, 1H, CH_a-5), 2.87 (dd, $J=13.5, 6.6$ Hz, 1H, CH_b-5), 2.53 (m, 1H, CH-2), 1.99 (m, 1H, CH_a-3), 1.64 (m, 1H, CH_b-3), 1.16 ppm (d, $J=7.7$ Hz, 3H, CH₃-10).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD) D-Mep δ = 174.1 (C-1), 70.0 (C-2), 56.6 (C-6), 44.4 (C-7), 31.4 (C-3), 25.8 (C-5), 24.0 (C-4). L-Ile δ = 175.6 (C-1), 55.2 (C-2), 37.5 (C-3), 25.6 (C-4), 16.4 (C-6), 10.8 (C-5). Tuv δ = 171.9 (CH₃CO), 171.0 (C-12), 171.7 (C-4), 163.0 (C-1), 150.6 (C-2), 125.2 (C-3), 71.2 (C-5), 46.6 (C-11), 57.7 (C-7), 40.5 (C-13), 36.3 (C-6), 32.6 (C-14), 31.2 (C-8), 20.9 (CH₃CO), 20.9 (C-9), 20.1 (C-10), 21.1 (C-15), 14.1 (C-16). Tup δ = 180.7 (C-1), 139.6 (C-6), 130.5 (C-7,7'), 129.3 (C-8,8'), 127.4 (C-9), 50.9 (C-4), 42.2 (C-5), 39.3 (C-3), 38.4 (C-2), 18.7 (C-10).

HRMS (ESI) m/z ber. für C₄₃H₆₆N₆O₈S [M+H]⁺ 841.4892, gef. 841.4879.

4 Synthese von Tubugi-Chimären

4.1 Einleitung

Aufgrund bestechender Gemeinsamkeiten mit den Tubulysinen fand die Substanzfamilie der Dolastatine bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit wiederholt Erwähnung. Die Dolastatine wurden Ende der 1980er Jahre von Pettit und Mitarbeitern an der Arizona State University (Tempe, USA) entdeckt.^[58] Produziert von marinen Cyanobakterien handelt es sich auch bei diesen Substanzen um teils hochaktive Tubulin-Modifizierer, wobei die Dolastatine 10 und 15 die aktivsten Vertreter dieser Substanzklasse darstellen. Eine erste Totalsynthese sowie die absolute Konfiguration von Dolastatin 15 (**69**) veröffentlichten Pettit *et al.* im Jahr 1991.^[59] Trotz überzeugender Aktivität bei *in vivo*-Versuchen kam es nicht zu klinischen Studien, da es sich um ein sehr komplexes, schlecht wasserlösliches Molekül handelt und die chemische Synthese nur geringe Ausbeuten liefert. Dolastatin 15 (**69**) diente jedoch als Leitstruktur für vielversprechende Analoga, wie beispielsweise Cemadotin^[60] oder Synthadotin^[61], die durch verbesserte Eigenschaften bereits den Sprung zu klinischen Studien der Phasen I und II meistern konnten.

In Abbildung 4.1 sind die strukturellen Gemeinsamkeiten beider Substanzklassen am Beispiel von Tubulysin B (**33a**) und Dolastatin 15 (**69**) dargestellt. In beiden Fällen handelt es sich um lineare Peptide von 16 bis 18 Å Länge und mit einer tertiären Aminofunktion als basischen *N*-Terminus. Es folgt jeweils eine Aminosäure mit sterisch anspruchsvoller, lipophiler Seitenkette gekoppelt an eine ungewöhnliche, *N*-alkylierte Aminosäure mit Ringfunktionalität. Den *C*-Terminus bildet jeweils eine aromatische Aminosäure.

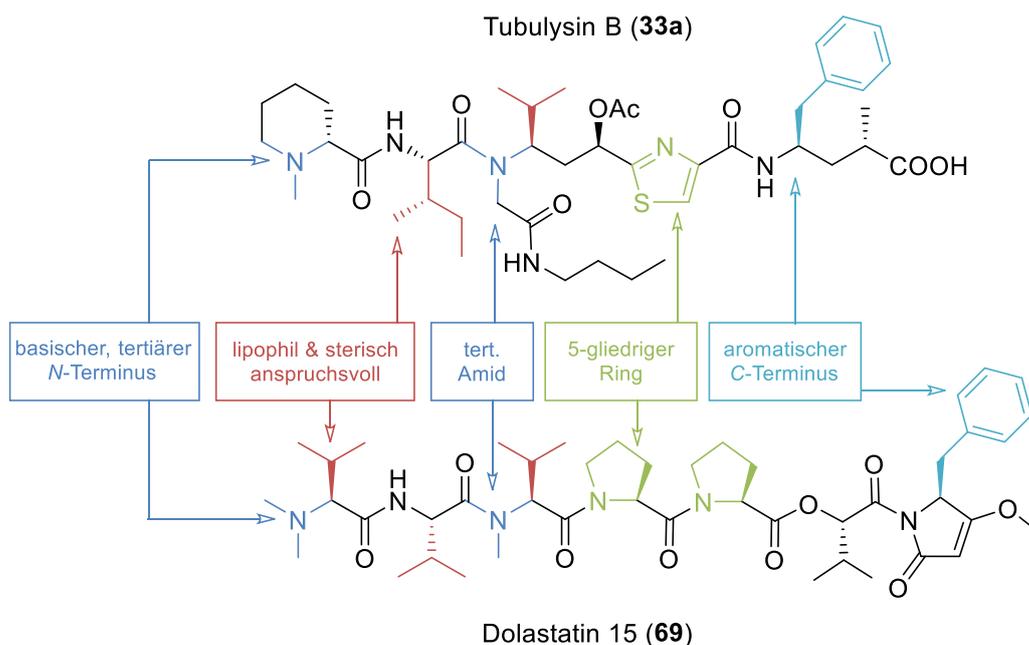


Abbildung 4.1 Strukturelle Gemeinsamkeiten von Tubulysin B (33a) und Dolastatin 15 (69).

Neben den voranstehend beschriebenen „äußeren“ Gemeinsamkeiten ist darüber hinaus besonders die gleichartige Wirkungsweise beider Substanzklassen auf eukaryotische Zellen hervorzuheben: Auch die Dolastatine binden an der Vinca-Domäne der Mikrotubuli und stören so das Polymerisationsgleichgewicht dieser Proteinfilamente. Analog zu den Tubulysinen führt dieser nachhaltige Eingriff in den Zellzyklus letztlich zur Apoptose der betroffenen Zellen.

Eine erste Chimäre, zusammengesetzt aus einem stark vereinfachten Tubulysin-Derivat und einem Dolastatin 10-Rest, wurde im Jahr 2012 von der Gruppe um Kazmaier veröffentlicht (ohne Aussage zur biologischen Aktivität der Substanz, s. Abbildung 4.2).^[32]

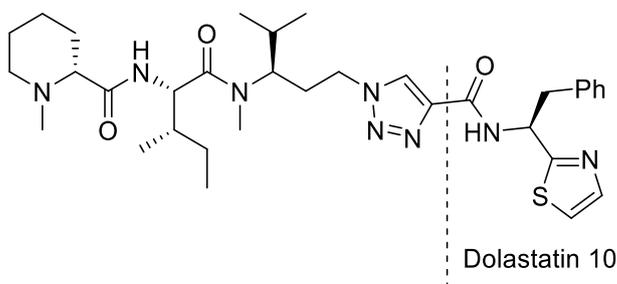


Abbildung 4.2 Eine erste chimärenhafte Verbindung von Kazmaier *et. al.* vereint Strukturmerkmale der Tubulysine mit einem Dolastatin 10-Rest.^[32]

4.2 Synthese einer Tubulysin-Dolastatin-Chimäre

Wie bereits dargelegt, ist die synthetische Darstellung der Tubulysine durch zahlreiche Schwierigkeiten gekennzeichnet. Einfallsreiche Lösungsansätze sind gefordert: Die elegante Substitution der natürlichen *N,O*-Acetalester-Seitenkette durch Anwendung einer Multikomponentenreaktion, sowie alle damit verbundenen Vorteile, wurden ausführlich in Abschnitt 3.1 diskutiert. Weiterhin stellt die Darstellung des Tubuvalin-Bausteins nach wie vor eine einschneidende Herausforderung dar. Genau wie die literaturbekannten Darstellungsvarianten liefert auch der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Zugang zu Tubuvalin-OMe (s. Abschnitt 2.1) kein vollends zufriedenstellendes Ergebnis (teils hochtoxische und vergleichsweise kostenintensive Ausgangsmaterialien in Kombination mit der geringen Gesamtausbeute). Daraus resultierend und auf Grundlage der oben beschriebenen strukturellen sowie funktionalen Gemeinsamkeiten der Tubulysine und der Dolastatine wurde der in Abbildung 4.3 dargestellte neuartige Ansatz entwickelt: Der Tubuvalin-Baustein sollte durch das leicht, und aus preiswerten Ausgangsmaterialien zugängliche, zentrale Val-Pro-Pro-Fragment von Dolastatin 15 (**69**) ersetzt werden. Abgesehen von dieser Modifikation bleiben bei dieser chimärenhaften Struktur alle weiteren Bestandteile der Tubugis unberührt.

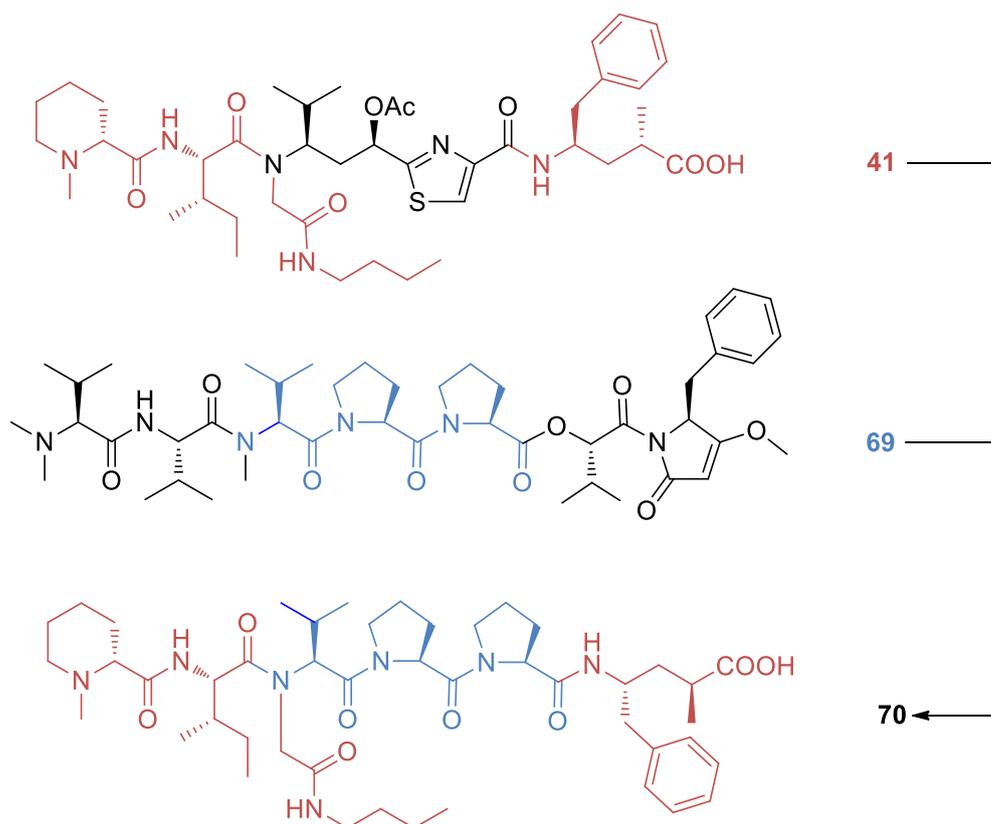


Abbildung 4.3 Auswahl verschiedener Strukturmerkmale von Tubugi 1 (41, rot) und Dolastatin 15 (69, blau) zum Aufbau der Chimäre 70.

Der Aufbau des zentralen Fragments **76** beginnt mit der Umsetzung des *N*-Boc-geschützten Prolins **71** mit Prolinmethylester **72** unter Verwendung von DCC und DMAP. Nach Abspaltung der Boc-Gruppe mittels TFA in DCM wird mit Cbz-geschützten L-Valin gekuppelt (s. Abbildung 4.4).

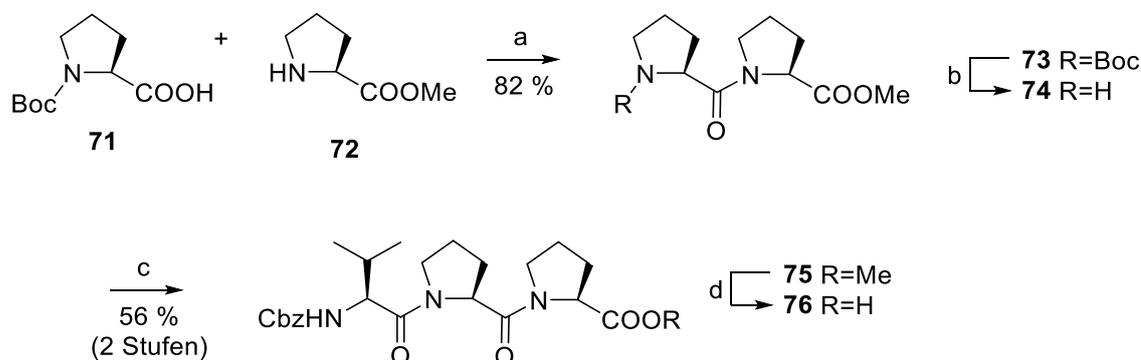


Abbildung 4.4 Synthese von *N*-Cbz-Val-Pro-Pro-OH **76** aus den einzelnen Aminosäuren nach Standard-Peptidkuppelungsbedingung. a) DCC, DMAP, TEA, DCM, 0 °C → RT, 82 %; b) TFA, DCM; c) TEA, *N*-Cbz-L-Val, DCC, DMAP, DCM, 0 °C → RT, 56 % (2 Stufen); d) LiOH·H₂O, THF/H₂O, 0 °C → RT.

Es folgt eine Abspaltung der Esterfunktionalität durch Lithiumhydroxid in THF/H₂O und die Reaktion mit Tubuphenylalaninmethylester **31**, DCC und HOBT (s. Abbildung 4.5). Anschließend wird die Cbz-Schutzgruppe durch eine katalytische Menge von Palladiumhydroxid auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre entfernt. Analog zur Synthese der Tubugis stellt auch beim Aufbau der Chimäre **70** eine Ugi-4CR den Schlüsselschritt dar. Dazu wird das Amin **76** mit *N*-Fmoc-L-Isoleucin als Säurekomponente sowie Paraformaldehyd und *n*-Butylisocyanid umgesetzt. Das gewünschte Ugi-Produkt **79** wird mit einer Ausbeute von 31 % über zwei Stufen erhalten. Es folgen die Fmoc-Spaltung durch Piperidin in DMF und die Umsetzung mit als Pentafluorphenylester-aktivierter *N*-Methylpipercolinsäure **64**. Die abschließende Methylesterspaltung unter Verwendung von Lithiumhydroxid in THF/H₂O liefert die gewünschte Tubugi-Dolastatin-Chimäre **70** mit einer Gesamtausbeute von lediglich 0.4 % über insgesamt zehn Stufen.

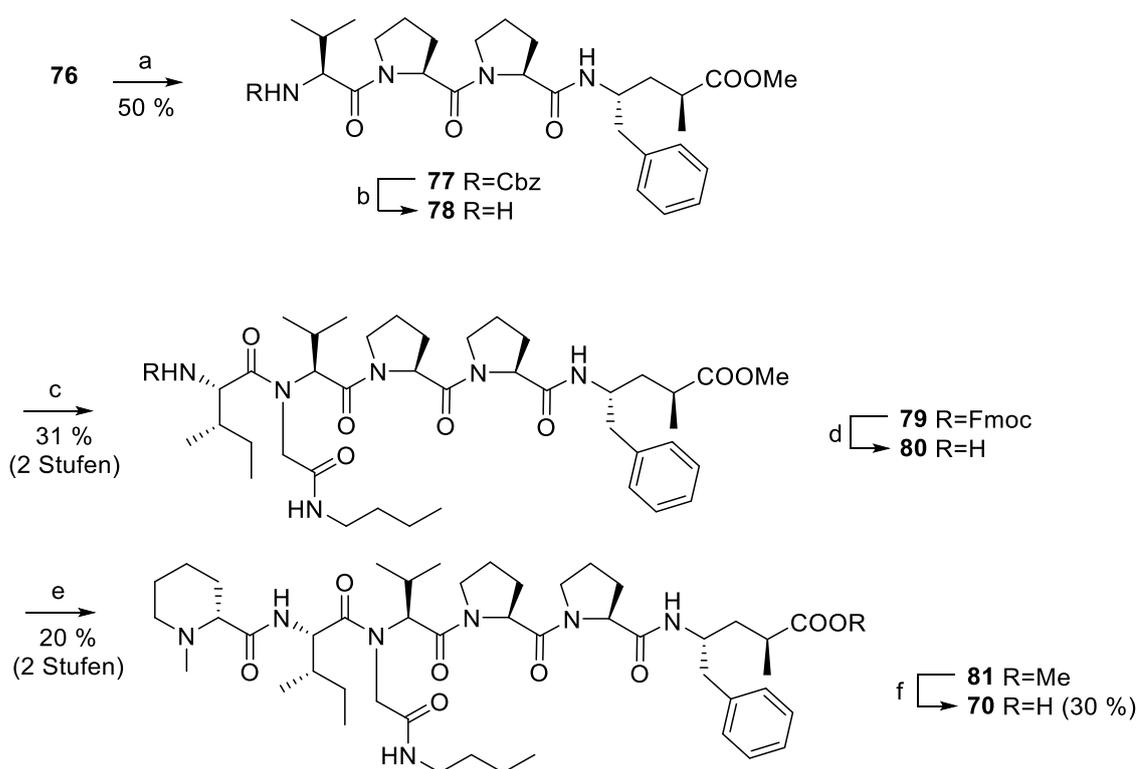


Abbildung 4.5 Synthese der Tubugi-Dolastatin-Chimäre **70** unter Verwendung einer Ugi-MCR zum Aufbau des Schlüsselintermediats **79**. a) Tup-OMe·HCl (**31**), DIPEA, DCC, HOBT, DCM, 0 °C → RT, 50 %; b) Pd(OH)₂/C (20 %), H₂, MeOH; c) CH₂O, *N*-Fmoc-L-Ile, *n*-Butylisocyanid, MeOH, 31 % (2 Stufen); d) Piperidin, DMF; e) *N*-Mep-OPFP (**64**), DMF, 20 % (2 Stufen); f) LiOH·H₂O, THF/H₂O, 30 %.

4.3 Weiterentwicklung der Tubugi-Dolastatin-Chimäre

Basierend auf der im vorigen Abschnitt eingeführten Tubugi-Dolastatin-Chimäre **70** sollte im Folgenden die unter Abbildung 4.6 dargestellte Verbindung **82** synthetisiert werden. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Chimäre („2. Generation“), wobei in diesem Fall auch die beiden terminalen Aminosäuren *N*-Methylpipercolinsäure und Tubuphenylalanin durch proteinogene Aminosäuren ersetzt sind.

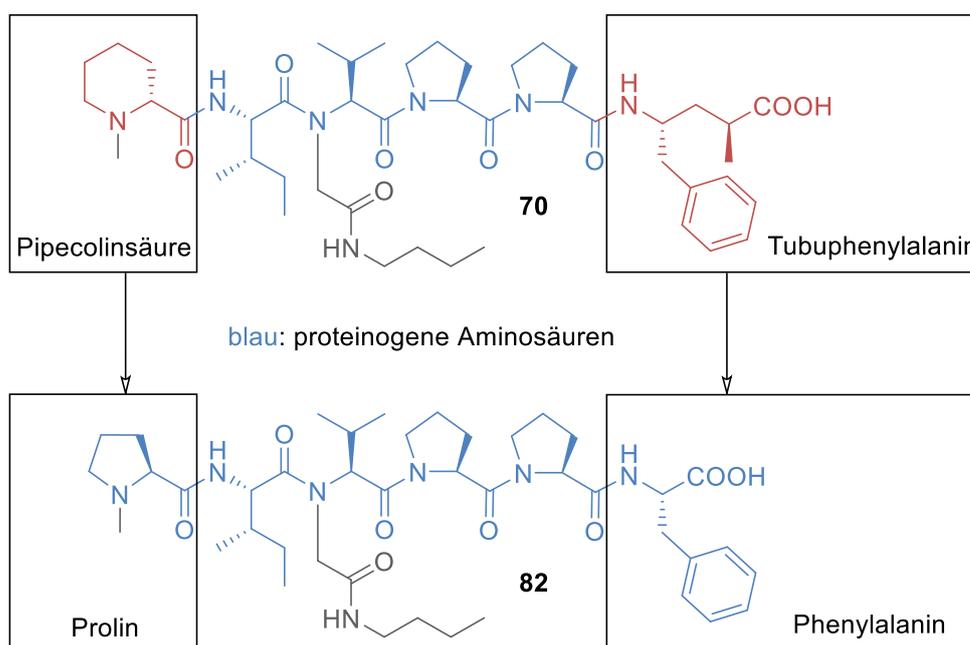


Abbildung 4.6 Tubugi-Dolastatin-Chimäre der 2. Generation (**82**) aufgebaut aus proteinogenen Aminosäuren (blau).

Da der Aufbau des Moleküls analog zur voranstehend bereits dargelegten Syntheseroute erfolgt, soll hier nicht erneut auf die Details der Darstellung eingegangen werden. In Abbildung 4.7 sind die einzelnen Reaktionsschritte ausgehend vom Tripeptid *N*-Cbz-Val-Pro-Pro **76** dargestellt. Die Synthese verläuft mit einer Gesamtausbeute von 1.9 % über zehn Stufen.

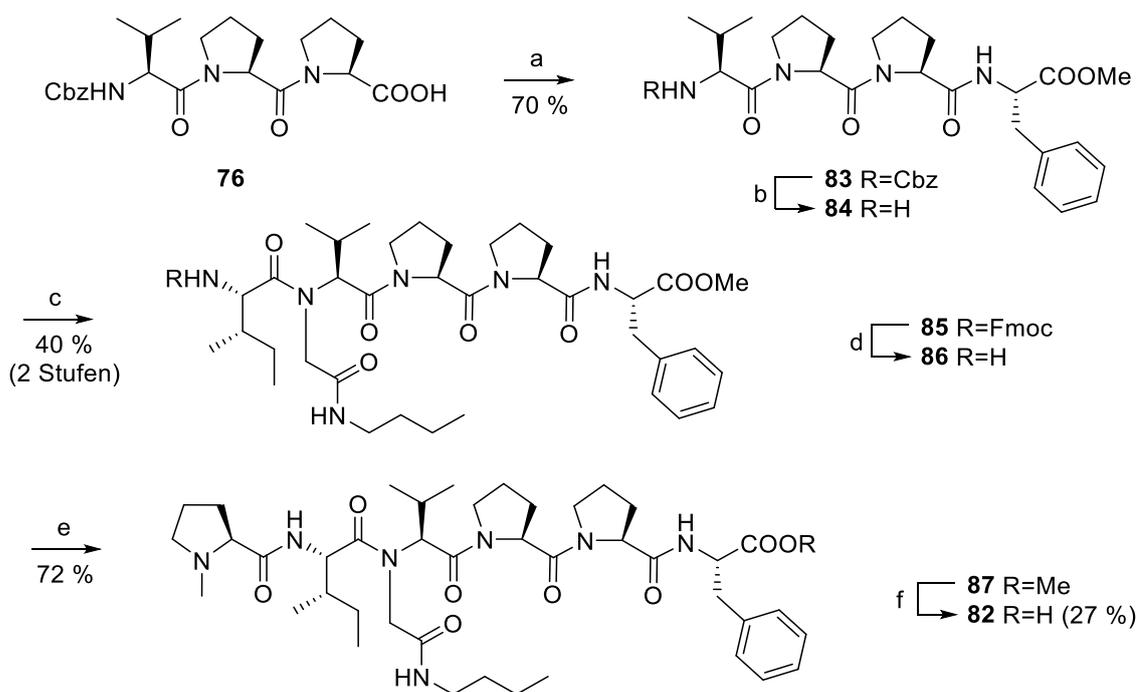


Abbildung 4.7 Synthese der Tubugi-Dolastatin-Chimäre der 2. Generation **82** unter Verwendung einer Ugi-MCR zum Aufbau des Schlüsselintermediats **85**. a) Phe-OMe·HCl, DIPEA, DCC, HOBt, DCM, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 70% ; b) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (20%), H_2 , MeOH; c) CH_2O , *N*-Fmoc-Ile, *n*-Butyl-Isocyanid, MeOH, 40% (2 Stufen); d) Piperidin, DMF; e) *N*-Me-Pro-OPFP, DMF, 72% (2 Stufen); f) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, THF/ H_2O , 27% .

4.4 Ergebnisse und Fazit

Die Synthesen der Tubugi-Dolastatin-Chimäre **70** sowie der Chimäre zweiter Generation **82** liefern den gewählten Synthesestrategien folgend nur schlechte Gesamtausbeuten von 0.4% bzw. 1.9% über jeweils zehn Stufen. Erste Tests^a gegen verschiedenen Krebszelllinien (HT-29^b, PC-3^c und Colo 320^d) ergaben IC_{50} -Werte größer 3000 nM . Die enormen Änderungen an der natürlichen Struktur sind demnach von einem massiven Aktivitätsverlust begleitet. Aus diesem Grund stehen diese Verbindungen gegenwärtig nicht im Fokus weiterer Untersuchungen und auch auf eine Optimierung der Ausbeuten wurde verzichtet.

^a Durchgeführt im eigenen Arbeitskreis von G. Kaluderovic bzw. A. Ehrlich

^b Humane Darmkrebszelllinie

^c Humane Prostatakrebszelllinie

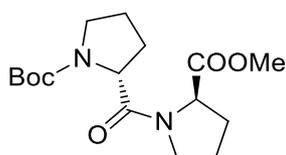
^d Humane Darmkrebszelllinie

4.5 Experimentelle Daten

4.5.1 Allgemeine Angaben

Siehe Abschnitt 2.5.1, Seite 19.

4.5.2 Darstellung von *N*-Boc-Pro-Pro-OMe (**73**)



Zu einer Lösung von *N*-Boc-Prolin (**71**, 5.2 g, 24.1 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (180 mL) werden bei 0 °C und unter Stickstoffatmosphäre DCC (6.0 g, 29 mmol, 1.2 Äq.) und DMAP (300 mg, 2.4 mmol, 0.1 Äq.) gegeben. Eine Lösung von Prolinmethylester-Hydrochlorid (**72**, 4.0 g, 24.1 mmol, 1.0 Äq.) und Triethylamin (3.4 mL, 24.1 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (50 mL) wird tropfenweise zugegeben. Das Kühlbad wird entfernt und der Reaktionsansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird filtriert, der Filterkuchen mit EtOAc (100 mL) gewaschen und die organischen Lösungsmittel werden unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (EtOAc:*n*-Hexan 3:1) des Rückstands liefert Verbindung **73** mit einer Ausbeute von 6.5 g (82 %) als gelbes Öl.

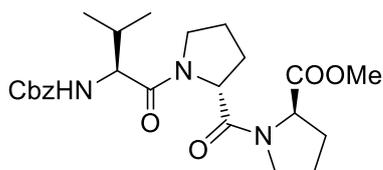
$R_f = 0.45$ (EtOAc:*n*-Hexane 3:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 4.62 - 4.53$ (m, 1.6H), 4.53 – 4.47 (m, 1.0H), 4.42 – 4.35 (m, 0.7H), 3.81 – 3.73 (m, 1.2H), 3.72 (s, 1.9H), 3.70 (s, 3H), 3.66 – 3.52 (m, 4.1H), 3.50 – 3.35 (m, 1.8H), 2.24 – 2.10 (m, 4.0H), 2.10 – 1.91 (m, 8.9H), 1.90 – 1.79 (m, 2.4H), 1.45 (s, 9H), 1.39 ppm (s, 5.8H). (*s-cis/s-trans*-Mischung)

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) a) $\delta = 172.87, 172.58, 171.53, 171.06, 154.52, 153.65, 79.38, 79.34, 60.31, 58.61, 57.68, 57.63, 52.12, 52.02, 46.79, 46.60, 46.41, 29.94, 29.00, 28.76, 28.65, 28.45, 28.30, 24.98, 24.92, 24.00, 23.50, 20.98, 14.14$ ppm. (*s-cis/s-trans*-Mischung)

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 349.1734, gef. 349.1731.

4.5.3 Darstellung von *N*-Cbz-Val-Pro-Pro-OMe (75)



Zu einer Lösung von Verbindung **73** (2.1 g, 6.76 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (50 mL) wird Trifluoressigsäure (20 mL) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt, Toluol (50 mL) wird zugegeben und die Mischung wird unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands in trockenem DCM (70 mL) werden bei 0 °C Triethylamin (1.4 mL, 10.14 mmol, 1.5 Äq.), *N*-Cbz-Valin (1.9 g, 7.43 mmol, 1.1 Äq.), DCC (1.5 g, 7.43 mmol, 1.1 Äq.) und DMAP (83 mg, 0.68 mmol, 0.1 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (EtOAc:*n*-Hexan 6:1) des Rückstands liefert Verbindung **75** mit einer Ausbeute von 1.7 g (56 % über zwei Stufen) als weißen Feststoff.

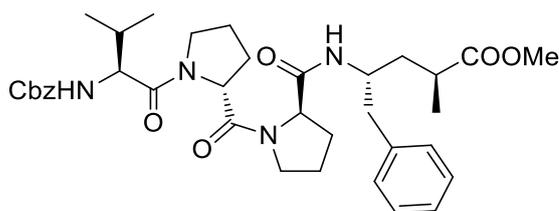
$R_f = 0.40$ (EtOAc:*n*-Hexan 5:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.38 - 7.28$ (m, 5H), 5.45 (d, $J=9.1$, 1H), 5.08 (q, $J=12.3$, 2H), 4.72 – 4.65 (m, 1H), 4.62 – 4.55 (m, 1H), 4.38 – 4.29 (m, 1H), 3.86 – 3.75 (m, 2H), 3.75 – 3.66 (m, 4H), 3.65 – 3.57 (m, 1H), 2.26 – 2.13 (m, 3H), 2.11 – 1.92 (m, 6H), 1.03 (d, $J=6.8$, 3H), 0.92 ppm (d, $J=6.7$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 172.61, 170.53, 170.25, 156.35, 136.34, 128.41, 127.99, 127.90, 66.75, 58.47, 57.85, 57.44, 52.10, 48.99, 47.48, 46.56, 33.91, 31.21, 28.72, 28.19, 25.58, 24.91, 24.83, 24.78, 19.37, 17.50$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 482.2262, gef. 482.2259.

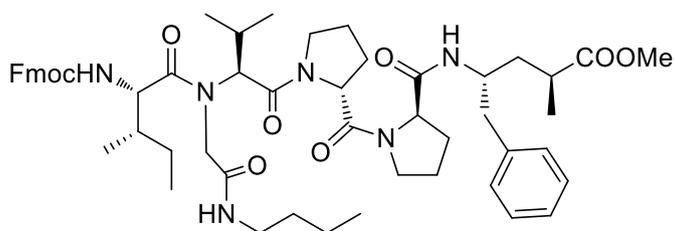
4.5.4 Darstellung von *N*-Cbz-Val-Pro-Pro-Tup-OMe (77)



Zu einer Lösung von Verbindung **75** (861 mg, 1.87 mmol, 1.0 Äq.) in THF/ H_2O (10 mL/5 mL) wird bei 0 °C Lithiumhydroxid-Monohydrat (196 mg, 4.68 mmol,

2.5 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und die organischen Lösungsmittel werden unter vermindertem Druck entfernt. Der wässrige Rückstand wird mit H₂O (20 mL) verdünnt, mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit EtOAc (4x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die korrespondierende Säure *N*-Cbz-Val-Pro-Pro-OH (**76**) wird mit einer Ausbeute von 593 mg (71 %) erhalten. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands (Teilmenge!, 115 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (3 mL) werden bei 0 °C DCC (60 mg, 0.29 mmol, 1.1 Äq.), HOBt (4 mg, 0.03 mmol, 0.1 Äq.), Tup-OMe·HCl (**31**, 200 mg, 0.78 mmol, 3.0 Äq.) und DIPEA (177 µL, 1.04 mmol, 4.0 Äq.) gegeben. Die Mischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit DCM (7 mL) verdünnt. Die organische Phase wird mit Salzsäure (1 M, 5 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5 mL) sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2x 5 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Verbindung **77** wird mit einer Ausbeute von 86 mg (50 %) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Reinigung direkt im nächsten Schritt eingesetzt.

4.5.5 Darstellung von Ugi-Produkt **79**



Zu einer Lösung von Verbindung **77** (85 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (1 mL) wird Pd(OH)₂/C (20 % Pd(OH)₂, 9 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend unter Verwendung eines Spritzenfilters filtriert. Der Filter wird mit MeOH (5 mL) gewaschen und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands in MeOH (1.3 mL) wird Paraformaldehyd (4.2 mg, 0.14 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Nach 2 Stunden werden *N*-Fmoc-Isoleucin (46 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) und *n*-Butylisocyanid (13.6 µL, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung

(DCM:MeOH 50:1) des Rückstands liefert Verbindung **79** mit einer Ausbeute von 39 mg (31 % über zwei Stufen) als farbloses Öl.

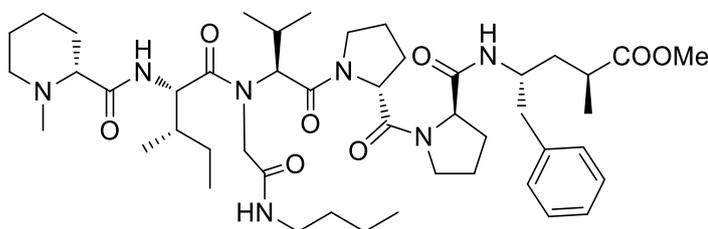
$R_f = 0.70$ (DCM:MeOH 10:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 7.79$ (d, $J=7.5$, 2H), 7.63 (d, $J=7.4$, 2H), 7.39 (t, $J=7.4$, 2H), 7.33 – 7.10 (m, 7H), 5.08 (d, $J=10.8$, 1H), 4.56 (d, $J=17.8$, 1H), 4.47 – 4.31 (m, 4H), 4.20 (t, $J=6.5$, 1H), 4.06 (d, $J=9.8$, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.24 – 3.08 (m, 2H), 3.01 (t, $J=6.8$, 1H), 2.86 – 2.79 (m, 1H), 2.72 – 2.63 (m, 1H), 2.59 – 2.47 (m, 1H), 2.34 – 2.23 (m, 1H), 2.20 – 1.75 (m, 11H), 1.55 – 1.26 (m, 8H), 1.08 (d, $J=7.1$, 3H), 0.96 – 0.84 (m, 12H), 0.74 ppm (t, $J=8.0$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 178.24, 174.97, 173.93, 172.82, 170.18, 169.69, 158.54, 145.16, 142.62, 139.43, 130.54, 129.29, 128.78, 128.14, 128.07, 127.31, 126.19, 126.11, 120.95, 120.93, 67.82, 61.80, 60.47, 60.25, 56.75, 52.12, 50.02, 48.49, 46.34, 42.39, 40.31, 39.20, 38.67, 37.65, 37.33, 34.87, 32.77, 30.50, 29.73, 28.96, 25.90, 25.66, 25.49, 21.09, 20.01, 18.52, 18.40, 16.30, 14.18, 10.99$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_6\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 963.5590, gef. 963.5585.

4.5.6 Darstellung von Peptoid **81**



Zu einer Lösung von Verbindung **79** (21 mg, 22 μmol , 1.0 Äq.) in DMF (800 μL) wird Piperidin (200 μL) gegeben. Nach 20 Minuten wird der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wird zu einer Lösung von *N*-Mep-OPFP (**64**, 0.22 mmol, 10.0 Äq.) in trockenem DMF (500 μL) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 2 Stunden gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 20:1) des Rückstands liefert Verbindung **81** mit einer Ausbeute von 3.8 mg (20 % über zwei Stufen) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.50$ (DCM:MeOH 15:1).

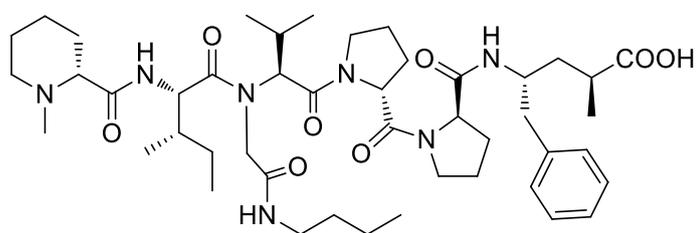
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 7.31$ – 7.10 (m, 5H), 5.09 (d, $J=10.8$, 1H), 4.71 (d, $J=17.7$, 1H), 4.46 – 4.32 (m, 2H), 4.10 – 4.00 (m, 1H), 3.95 (d, $J=17.7$, 1H), 3.85 –

3.57 (m, 6H), 3.23 – 3.08 (m, 2H), 3.07 – 2.91 (m, 2H), 2.87 – 2.79 (m, 1H), 2.72 – 2.60 (m, 2H), 2.58 – 2.49 (m, 1H), 2.36 – 2.09 (m, 8H), 2.06 – 1.90 (m, 5H), 1.90 – 1.73 (m, 6H), 1.70 – 1.26 (m, 15H), 1.08 (d, $J=7.1$, 2H), 0.96 – 0.83 (m, 11H), 0.76 ppm (d, $J=6.7$, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 178.24, 174.68, 173.93, 172.83, 170.20, 169.60, 139.44, 130.55, 129.29, 127.32, 70.22, 61.81, 60.48, 60.27, 56.60, 54.56, 52.12, 50.02, 44.53, 42.40, 40.30, 38.67, 37.65, 37.36, 32.77, 31.47, 30.52, 29.76, 28.89, 26.03, 25.91, 25.69, 25.51, 24.16, 21.10, 21.08, 19.94, 18.52, 18.40, 16.24, 14.17, 10.72$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{N}_7\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 866.5749, gef. 866.5731.

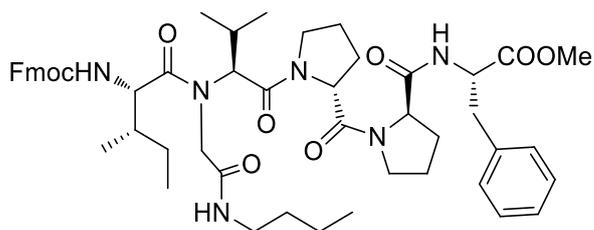
4.5.7 Darstellung von Tubugi-Dolastatin-Chimäre **70**



Zu einer Lösung von Verbindung **81** (3.0 mg, 3.5 μmol , 1.0 Äq.) in THF/ H_2O (400 μL /200 μL) wird Lithiumhydroxid-Monohydrat (1.0 mg, 24 μmol , 6.9 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 8 Stunden gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in H_2O (400 μL) aufgenommen, mit Salzsäure (2 M) auf einen pH-Wert von 1 eingestellt und mit EtOAc (5x 400 μL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, im Stickstoffstrom eingengt und unter vermindertem Druck intensiv getrocknet. Verbindung **70** wird mit einer Ausbeute von 0.9 mg (30 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) $\delta = 7.31 - 7.15$ (m, 7H), 5.13 – 5.08 (m, 1H), 4.67 – 4.61 (m, 1H), 4.47 – 4.31 (m, 4H), 4.09 (d, $J=18.0$, 1H), 4.08 – 4.02 (m, 1H), 4.02 – 3.97 (m, 1H), 3.90 – 3.83 (m, 1H), 3.80 (dd, $J=9.5, 6.3$, 1H), 3.77 – 3.70 (m, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.49 – 3.40 (m, 2H), 3.23 – 3.17 (m, 1H), 3.16 – 3.10 (m, 1H), 2.96 (s, 2H), 2.87 – 2.79 (m, 2H), 2.78 – 2.68 (m, 3H), 2.56 – 2.45 (m, 2H), 2.33 – 2.25 (m, 2H), 2.23 – 2.17 (m, 2H), 2.15 – 2.07 (m, 2H), 2.06 – 2.01 (m, 2H), 1.99 – 1.93 (m, 2H), 1.93 – 1.86 (m, 3H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.62 – 1.46 (m, 5H), 1.41 – 1.27 (m,

4.5.9 Darstellung von Ugi-Produkt **85**



Zu einer Lösung von Verbindung **83** (170 mg, 0.28 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (3 mL) wird Pd(OH)₂/C (20 % Pd(OH)₂, 17 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend unter Verwendung eines Spritzenfilters filtriert. Der Filter wird mit MeOH (3 mL) gewaschen und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands in MeOH (2.8 mL) wird Paraformaldehyd (9.0 mg, 0.30 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Nach 2 Stunden werden *N*-Fmoc-Isoleucin (99 mg, 0.28 mmol, 1.0 Äq.) und *n*-Butylisocyanid (29.2 µL, 0.28 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 50:1) des Rückstands liefert Verbindung **85** mit einer Ausbeute von 103 mg (40 % über zwei Stufen) als weißen Feststoff.

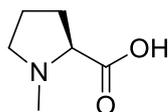
R_f = 0.50 (DCM:MeOH 9:1).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7.79 (d, *J*=7.5, 2H), 7.63 (d, *J*=7.5, 2H), 7.39 (t, *J*=7.0, 2H), 7.33 – 7.12 (m, 7H), 5.08 (d, *J*=10.9, 1H), 4.62 (t, *J*=6.9, 1H), 4.59 – 4.51 (m, 1H), 4.49 – 4.33 (m, 4H), 4.23 – 4.17 (m, 1H), 4.05 (d, *J*=9.9, 1H), 3.90 (d, *J*=17.8, 1H), 3.83 – 3.55 (m, 7H), 3.21 – 3.00 (m, 4H), 2.31 – 2.08 (m, 3H), 2.07 – 1.83 (m, 7H), 1.56 – 1.44 (m, 3H), 1.43 – 1.27 (m, 4H), 1.13 – 0.97 (m, 2H), 0.96 – 0.82 (m, 12H), 0.74 ppm (d, *J*=6.8, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 173.56, 171.82, 170.80, 167.46, 150.74, 143.58, 141.30, 129.18, 129.07, 128.55, 128.36, 127.72, 127.06, 126.89, 124.94, 120.01, 83.01, 72.20, 66.90, 62.82, 60.91, 58.84, 56.50, 55.19, 53.88, 52.26, 50.10, 47.21, 39.61, 39.47, 34.25, 31.59, 31.54, 30.74, 28.77, 27.57, 24.96, 20.08, 19.84, 17.79, 16.00, 15.66, 14.35, 13.77, 11.07 ppm.

HRMS (ESI) *m/z* ber. für C₅₂H₆₈N₆O₉ [M+H]⁺ 921.5121, gef. 921.5097.

4.5.10 Darstellung von *N*-Methyl-Prolin (**88**)^[62]



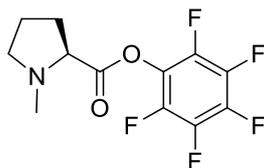
Zu einer Lösung von L-Prolin (500 mg, 4.3 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (10 mL) werden Formalin (37 % in H₂O, 578 µL, 7.7 mmol, 2.0 Äq.) und Pd/C (10 % Pd, 100 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, unter Verwendung von Celite filtriert und der Filterkuchen intensiv mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Durch Zugabe von Et₂O fällt das Produkt als weißer Feststoff aus. Die Mischung wird zentrifugiert und der Rückstand unter vermindertem Druck getrocknet. Verbindung **88** wird mit einer Ausbeute von 456 mg (81 %) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 3.81 – 3.73 (m, 1H), 3.71 – 3.64 (m, 1H), 3.33 – 3.28 (m, 1H), 3.14 – 3.05 (m, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.53 – 2.41 (m, 1H), 2.17 – 2.06 (m, 2H), 2.03 – 1.89 ppm (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 173.01, 72.18, 57.25, 41.36, 30.14, 24.16 ppm.

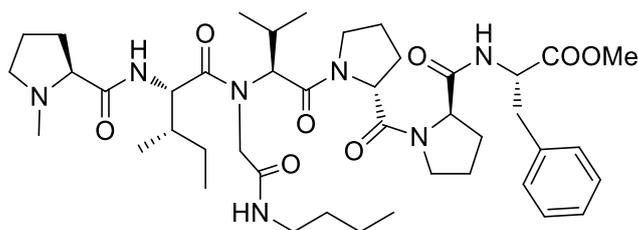
MS (ESI, neg) *m/z* ber. für C₆H₁₁NO₂ [M-H]⁻ 128.1, gef. 127.9.

4.5.11 Darstellung von *N*-Methyl-Prolinpentafluorphenylester (**89**)



Zu einer Lösung von Verbindung **88** (141 mg, 1.1 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem EtOAc (3 mL) werden Pentafluorphenol (241 mg, 1.3 mmol, 1.2 Äq.) und DCC (270 mg, 1.3 mmol, 1.2 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, filtriert und zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wird ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet.

4.5.12 Darstellung von Peptoid **87**



Zu einer Lösung von Verbindung **85** (100 mg, 0.11 μ mol, 1.0 Äq.) in DMF (2 mL) wird Piperidin (500 μ L) gegeben. Nach 20 Minuten wird der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wird zu einer Lösung von *N*-Me-Pro-OPFP (**89**, 1.1 mmol, 10.0 Äq.) in trockenem DMF (1 mL) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 2.5 Stunden gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 20:1, dann RP-HPLC: 150 mm x 20 mm YMC ODS-A, (ACN(A):H₂O(B)) + 0.1 % TFA, grad. 50 % A > 10 min > 25 % A, 14 mL/min, 220 nm) des Rückstands liefert Verbindung **87** mit einer Ausbeute von 12 mg (14 % über zwei Stufen) als weißen Feststoff.

R_f = 0.37 (DCM:MeOH 9:1).

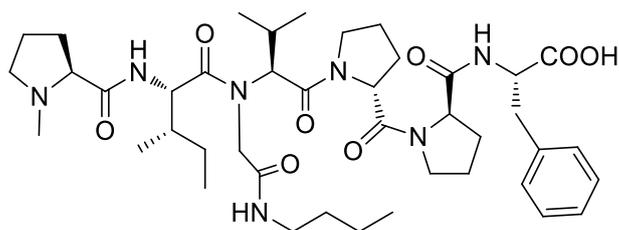
t_R = 13.3 min.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ = 7.28 – 7.19 (m, 5H), 5.10 (d, J =10.8, 1H), 4.68 – 4.58 (m, 2H), 4.48 – 4.39 (m, 3H), 4.07 (t, J =8.4, 1H), 3.97 (d, J =17.7, 1H), 3.83 – 3.77 (m, 1H), 3.75 – 3.68 (m, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.62 – 3.57 (m, 1H), 3.24 – 3.16 (m, 2H), 3.15 – 3.08 (m, 2H), 3.06 – 3.01 (m, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.55 – 2.48 (m, 1H), 2.31 – 2.24 (m, 1H), 2.22 – 2.11 (m, 3H), 2.06 – 1.85 (m, 9H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.52 – 1.44 (m, 2H), 1.40 – 1.34 (m, 2H), 1.33 – 1.26 (m, 1H), 1.18 – 1.09 (m, 1H), 0.98 – 0.86 (m, 14H), 0.75 ppm (d, J =6.8, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD) δ = 174.21, 174.12, 173.32, 172.80, 170.01, 169.53, 168.24, 137.92, 130.32, 129.49, 127.91, 69.94, 61.27, 60.52, 59.99, 57.28, 55.58, 55.35, 52.59, 48.48, 46.56, 40.87, 40.30, 38.36, 37.31, 32.78, 30.52, 30.18, 29.71, 28.90, 25.81, 25.66, 25.56, 23.66, 21.10, 19.82, 18.44, 16.11, 14.17, 10.94 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₄₃H₆₇N₇O₈ [M+H]⁺ 810.5123, gef. 810.5104.

4.5.13 Darstellung von Tubugi-Dolastatin-Chimäre **82**



Zu einer Lösung von Verbindung **87** (6.0 mg, 7.4 μmol , 1.0 Äq.) in THF/H₂O (400 μL /200 μL) wird Lithiumhydroxid-Monohydrat (1.0 mg, 24 μmol , 3.2 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 8 Stunden gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in H₂O (400 μL) aufgenommen, mit Salzsäure (2 M) auf einen pH-Wert von 1 eingestellt und mit EtOAc (5x 400 μL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, im Stickstoffstrom eingengt und unter vermindertem Druck intensiv getrocknet. Verbindung **82** wird mit einer Ausbeute von 1.6 mg (27 %) erhalten.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ = 7.32 – 7.16 (m, 5H), 5.10 (d, J =10.8, 1H), 4.63 – 4.57 (m, 2H), 4.48 – 4.38 (m, 3H), 4.06 (t, J =8.4, 1H), 3.97 (d, J =17.8, 1H), 3.82 – 3.75 (m, 1H), 3.73 – 3.67 (m, 2H), 3.67 – 3.61 (m, 1H), 3.61 – 3.57 (m, 1H), 3.24 – 3.09 (m, 4H), 3.06 – 3.01 (m, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.55 – 2.47 (m, 1H), 2.30 – 2.11 (m, 4H), 2.08 – 1.84 (m, 9H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.50 – 1.44 (m, 2H), 1.41 – 1.34 (m, 2H), 1.31 – 1.27 (m, 1H), 1.19 – 1.10 (m, 1H), 0.96 – 0.85 (m, 12H), 0.75 ppm (d, J =6.7, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD) δ = 174.3, 174.2, 174.1, 172.9, 170.0, 169.6, 168.3, 138.2, 130.5, 130.3, 129.5, 129.4, 127.8, 70.0, 61.4, 60.5, 60.0, 57.3, 55.6, 55.0, 48.5, 48.3, 46.6, 40.9, 40.3, 38.3, 37.4, 32.8, 30.9, 30.5, 30.1, 29.7, 28.9, 25.8, 25.7, 25.6, 23.7, 21.2, 21.1, 19.8, 18.5, 16.1, 14.2, 11.0 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₄₂H₆₅N₇O₈ [M+Li]⁺ 802.5049, gef. 802.5037.

5 Synthese von Tubugi-Konjugaten

5.1 Einleitung

Nach der Applikation eines Arzneimittels verteilt sich dieses im Körper des Patienten. Diese Distribution führt einerseits zu einer Minderung der tatsächlichen Wirksamkeit der aktiven Substanz(en), zum anderen können Nebenwirkungen verschiedenen Ausmaßes resultieren. Ein verbreiteter Ansatz, um diesem Umstand entgegenzuwirken, ist die Modifikation der aktiven Substanz mittels sogenannter Targeting-Komponenten. Über unterschiedlichste Mechanismen ist so die gezielte Anreicherung eines Wirkstoffs im zu behandelnden Gewebe möglich. Dieser Ansatz birgt enormes Potential zur Weiterentwicklung der Tubulysine, da diesen aufgrund ihrer enormen Aktivität ein eher enges therapeutisches Fenster zugeschrieben wird: Ein Wirkstoff mit einer zytotoxischen Aktivität im beschriebenen Bereich stellt einerseits eine enorme Chance für die Krebstherapie dar, legt jedoch andererseits auch bedeutendere Auswirkungen auf gesunde Zellen und damit verbundene Nebenwirkungen nahe. Es ist daher nicht verwunderlich, dass erste Versuche zur Entwicklung von Tubulysin-Konjugaten mit Targeting-Komponenten bereits auf das Jahr 2008 zurückgehen. Vlahov und Mitarbeiter legten mit der Darstellungen und Validierung von Tubulysin-Folsäuremonoglutamat-Konjugaten (s. Abbildung 5.1; im Folgenden als „Folsäure-Konjugat“ bezeichnet) auf diesem Gebiet einen Grundstein.^[38,39,63]

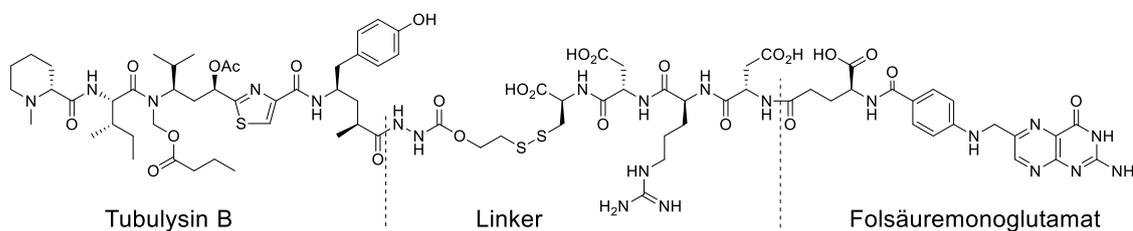


Abbildung 5.1 Tubulysin-Folsäure-Konjugat von Vlahov *et. al.*^[63] Die natürlichen Tubulysine sind nur mäßig wasserlöslich. Im abgebildeten Beispiel ist das Zytostatikum über einen hydrophilen Peptid-Linker mit der Targeting-Komponente verknüpft. Dies fördert die Wasserlöslichkeit des resultierenden Konjugats, und unterstützt so dessen Wirksamkeit im physiologischen Milieu.

Im Gegensatz zu gesunden Zellen überexprimieren eine Reihe primärer und metastatischer Krebszellen den membrangebundenen Folatrezeptor (dies trifft beispielsweise auf Brust-, Leber-, und Lungenkrebszellen zu). Das Konjugat kann durch Wechselwirkung mit den Folatrezeptoren (FR) an die Zellen andocken. Nach dem Internalisieren über die genannten Rezeptoren entfaltet die Substanz ihre Wirkung und die Zelle stirbt ab. Dieser (zunächst) theoretische Ansatz konnte durch die Gruppe um Vlahov wie folgt belegt werden: Nach guten Ergebnissen der Verbindung in Tests mit verschiedenen FR-positiven Zelllinien (IC_{50} -Werte zwischen 1 und 10 nmol/L) wurden Versuche mit xenogenen Nacktmäusen durchgeführt. Den Tieren wurden für zwei Wochen verschiedene Dosen verabreicht (sechs Injektionen zu je 0.5 bis 2 μ mol/kg). Während bei den Kontrollmäusen ein starkes Tumorwachstum beobachtet wurde, waren die Ergebnisse mit dem Konjugat beachtenswert: Selbst bei der kleinsten verabreichten Dosis waren die Tiere zum Ende der Behandlung teils tumorfrei. Ein Gewichtsverlust (als Indikator für Nebenwirkungen) war nicht zu verzeichnen. Einer weiteren Kontrollgruppe wurde neben dem zu untersuchenden Tubulysin-Folsäure-Konjugat ein Überschuss eines Folat-Analogen verabreicht. In diesem Fall breitete sich das Krebsgewebe analog zu den unbehandelten Tieren aus, sodass die Antitumoraktivität der Testsubstanz tatsächlich auf die Interaktion mit den Folatrezeptoren zurückzuführen ist.

Eine ähnlich vielversprechende Variante zur Reduktion der Toxizität der Tubulysine lieferten Schluëpp *et al.* mit der Entwicklung einer Nanopartikel-Prodrug von Tubulysin A (s. Abbildung 5.2).^[37]

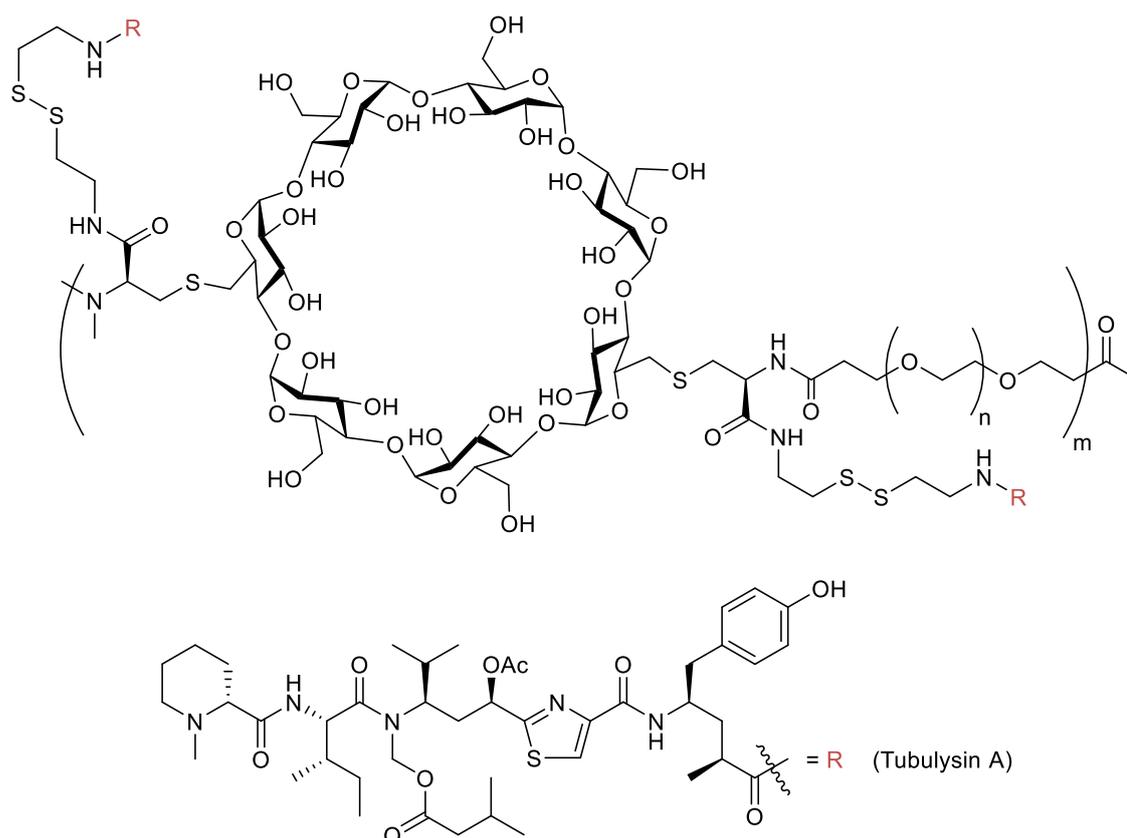


Abbildung 5.2 Tubulysin-CDP-Konjugat von Schluupp *et. al.*^[37]

Der Wirkstoff wird kovalent an ein auf β -Cyclodextrin basierendes Polymer (CDP) gebunden. Das Polymer bildet stabile Nanopartikel die in PBS (pH 7.4) und menschlichem Plasma (pH 7.4) über 72 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C nur minimale Mengen von Tubulysin (< 0.5 %) freisetzen. Diese Versuche deuten darauf hin, dass das Polymerkonjugat unter physiologischen Bedingungen stabil ist. Bei vergleichenden IC_{50} -Bestimmungen an den humanen Krebszelllinien NCI-H1299^a, HT-29^b und A2780^c zeigt CDP-TubA 4- bis 8-mal höhere Werte als natürliches Tubulysin A. Auch Schluupp und Mitarbeiter haben Versuche an xenogenen Nacktmäusen durchgeführt. Dabei wurde ersichtlich, dass die maximal tolerierte Dosis von CDP-TubA mit einem Wert von 6 mg/kg (in TubA-Äquivalenten) die von natürlichem Tubulysin A um Faktor 120 übersteigt. Die neue Substanz ist also um ein vielfaches verträglicher was letztlich auch eine deutlich aggressivere Dosierung erlaubt.

^a Humane Lungenkrebszelllinie

^b Humane Darmkrebszelllinie

^c Humane Eierstockkrebszelllinie

Sowohl diese Versuche zur Nanopartikel-Prodrug CDP-TubA als auch die Folsäure-Konjugate von Vlahov und Mitarbeitern belegen eindrucksvoll wie sich die außergewöhnlich aktiven Tubulysine durch geeignete Konjugation zähmen und lenken lassen. Auch basierend auf diesen ersten Arbeiten wurden die in den folgenden Abschnitten vorgestellten Verbindungen entworfen und synthetisiert.

5.2 Nicht-spaltbare Konjugate

Tubugi-Norspermidin-Konjugat

Die natürlichen Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin finden Verwendung im Prozess des Zellwachstums.^[64] Sich schnell teilende Zellen benötigen größere Mengen dieser Verbindungen.^[65] Es ist literaturbekannt, dass viele Tumortypen ein erhöhtes Polyaminlevel aufweisen (beispielsweise humane Dickdarm- und Lungenkrebszelllinien).^[66] Die Polyamine werden zum Teil innerhalb der Zellen auf biosynthetischem Weg hergestellt, darüber hinaus jedoch auch über das so genannte Polyamintransportsystem (PAT) aufgenommen. Das PAT zeichnet sich durch eine breite strukturelle Toleranz aus, sodass beispielsweise auch artifizielle Polyamine akzeptiert und so internalisiert werden können.^[65] Der erhöhte Polyaminbedarf der Tumorzellen in Kombination mit der breiten Substrattoleranz des PAT bildet einen möglichen Ansatzpunkt zur Entwicklung Targeting-gesteuerter Medikamente für die Krebstherapie. Auch wenn die genaue Funktionsweise des Transportsystems noch nicht abschließend geklärt werden konnte, sind Polyaminkonjugate beispielsweise mit Naphthochinon^[67], Artemisinin^[68], Paclitaxel^[69] oder Chlorambucil^[70] in der Literatur beschrieben. Ein erstes Tubugi-Konjugat mit Norspermidin als Targeting-Komponente **91** ist ausgehend von Tubugi 1 (**41**) über eine simple Zweistufensynthese zugänglich. Dazu wird das Tubulysin-Analogon zunächst als *N*-Hydroxysuccinimidester (**90**) aktiviert und anschließend mit zwei Äquivalenten Norspermidin umgesetzt (s. Abbildung 5.3).

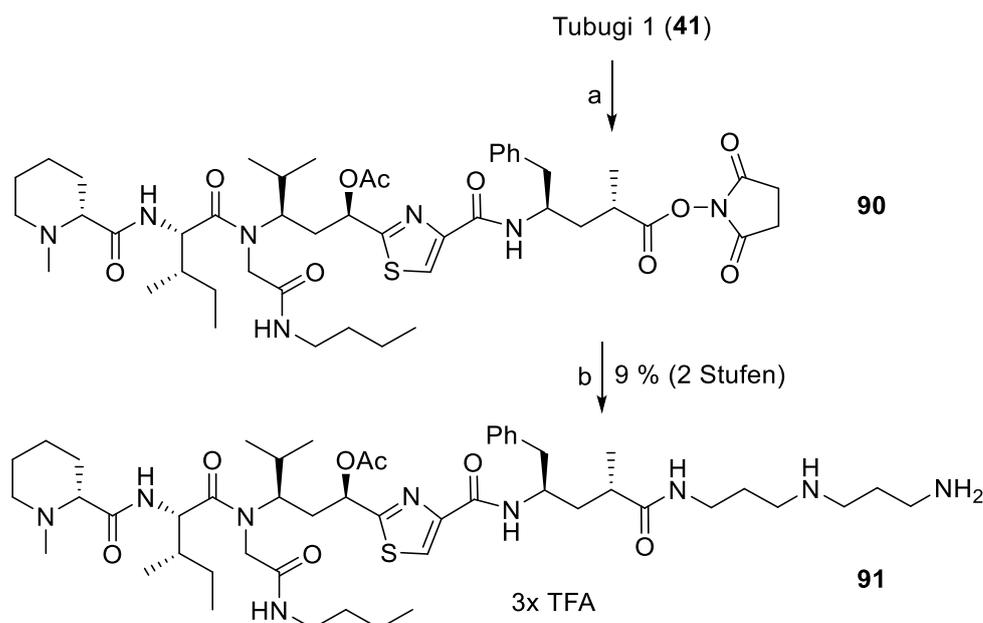


Abbildung 5.3 Synthese von Tubugi-Norspermidin-Konjugat **91** ausgehend von Tubugi **1** (**41**) über den NHS-Ester **90** als aktive Zwischenstufe. a) NHS, EDC·HCl, DCM; b) Norspermidin, DCM, 9 % (2 Stufen).

Die IC_{50} -Bestimmung^a gegen die Krebszelllinien A549^b, MCF-7^c, H12.1^d und 1411HP^e hat mit Werten im Bereich von 1 bis 2 μ M gezeigt, dass diese Modifikation des natürlichen Tubulysin-Gerüsts deutliche Aktivitätseinbußen mit sich bringt.

Tubugi-Rhodamin B-Konjugat

Durch die strukturelle Modifikation der Seitenkette stellen die Tubugis formal eine neue Substanzklasse dar. Ein Tubugi-Konjugat mit dem verbreiteten Fluoreszenzmarker Rhodamin B (**92**, s. Abbildung 5.4) könnte durch Versuche an (beispielsweise) Mäusen über die Anreicherung in den Organen den Zugang zu Informationen bezüglich der Transportwege und Wirkorte dieser Verbindungsklasse eröffnen.

^a Durchgeführt von Firma *EPO Exp. Pharmacol. & Oncol.*

^b Humane Lungenkrebszelllinie

^c Humane Brustkrebszelllinie

^d Humane Hodenkrebszelllinie

^e Humane Hodenkrebszelllinie

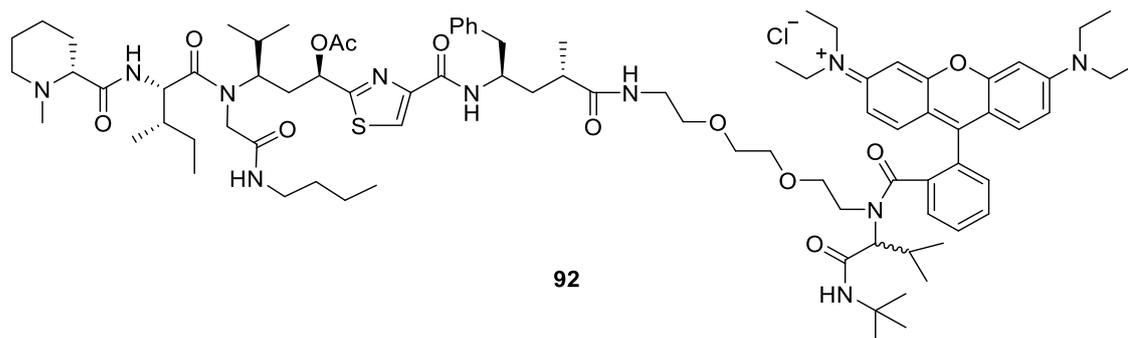


Abbildung 5.4 Tubuli-Konjugat mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B (92).

Der geplanten Synthesestrategie folgend sollte zunächst der Fluoreszenzfarbstoff um einen Linker erweitert werden, um anschließend die Bindung zu Tubuli 1 (41) herzustellen. Die einfache Verknüpfung von Rhodamin B (93) mit der Polyethylenglycol-Einheit 94 (PEG) als verbreiteten, biologisch inerten Linker liefert die in Abbildung 5.5 dargestellte Produktmischung der Verbindungen 95a und 95b.

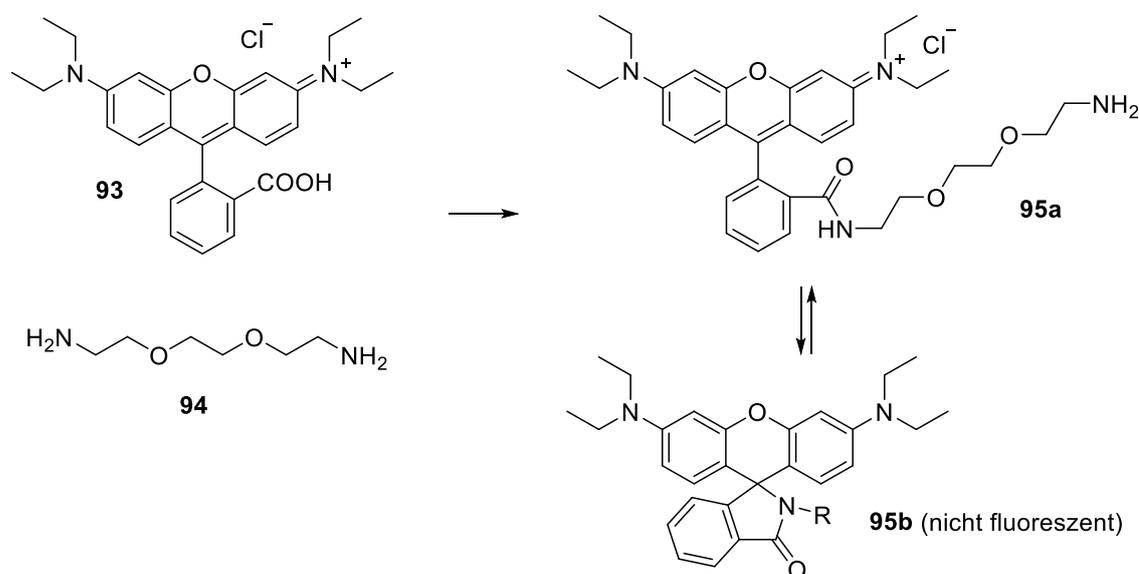


Abbildung 5.5 Produktmischung bei der Verknüpfung von Rhodamin B (93) mit dem PEG-Diamin 94. Die Zielverbindung 95a steht im Gleichgewicht mit der nicht-fluoreszierenden Verbindung 95b.

Da der dargestellte Ringschluss über das sekundäre Amid mit einem Verlust der Fluoreszenz einhergeht, liefert dieser Ansatz kein geeignetes Material für eine Verknüpfung mit dem Zytostatikum. Im Gegensatz dazu führt eine Ugi-Reaktion mit Rhodamin B (93), dem mono-Boc-geschütztem PEG-Diamin 96 sowie dem Aldehyd 97 und dem Isocyanid 98 zur Verbindung 99 (s. Abbildung 5.6). Durch die tertiäre

Amidfunktion wird die unerwünschte Zyklisierung unterbunden. Zur Aufreinigung des Reaktionsansatzes wird dieser über eine breite Kieselgel-Säule filtriert und mit reichlich Aceton gewaschen, um nichtumgesetztes Rhodamin B (**93**) zu entfernen. Daraufhin wird der Säulenkopf entnommen, mit Methanol extrahiert und das Lösungsmittel entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rückstands (DCM:MeOH 10:1) liefert das Ugi-Produkt **99** mit einer Ausbeute von 57 %.

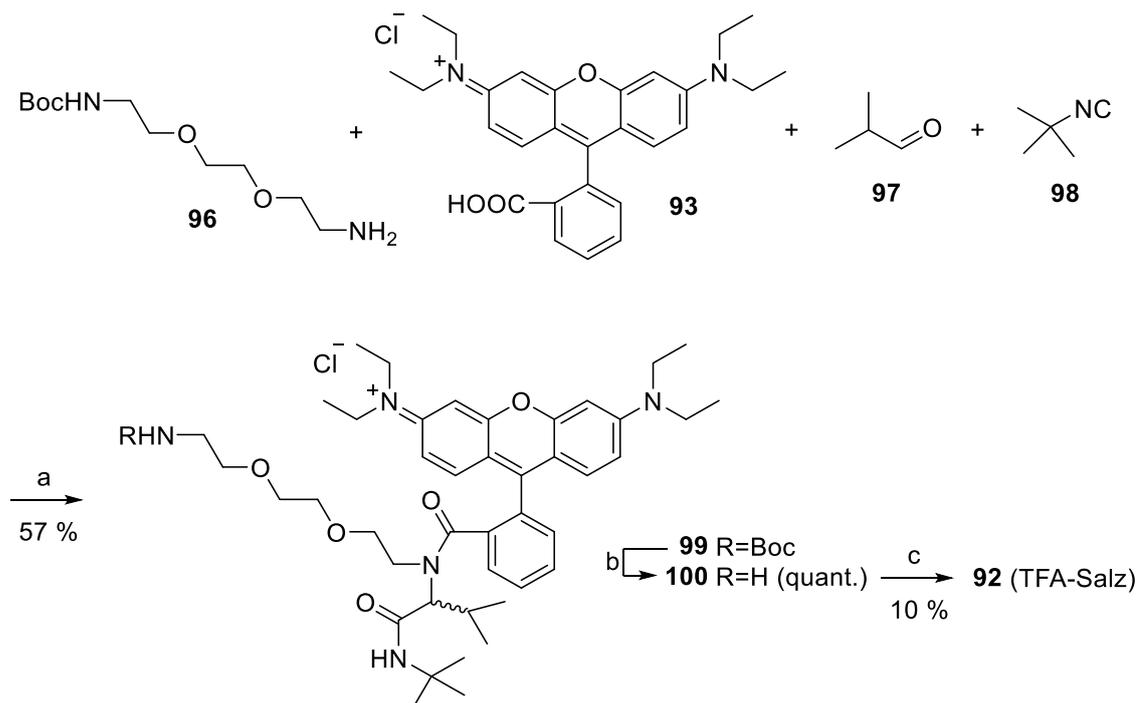


Abbildung 5.6 Ugi-Reaktion zum Verknüpfen von Rhodamin B (**93**) mit dem PEG-Linker (**96**) und Aufbau des Tubugi-Rhodamin-Konjugats **92**. a) NHBoc-PEG₂-(CH₂)₂NH₂ (**96**), Isobutanal (**97**), Rhodamin-B (**93**), *t*-Butylisocyanid (**98**), MeOH, 57 %; b) TFA, DCM; quant., c) **41**, HOAt, HATU, DMF, N₂-Atmosphäre, 0 °C → RT, 10 %.

Die Boc-Schutzgruppe wird durch TFA in DCM entfernt, bevor die Kupplung mit Tubugi 1 (**41**) unter Verwendung von HOAt und HATU unter Stickstoffatmosphäre erfolgt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Tubugi-Rhodamin-Konjugat **92** mittels RP-HPLC isoliert. Die Ausbeute des Kupplungsschritts beträgt 10 %.

Erste Zelltests^a konnten zeigen, dass die zytotoxische Aktivität durch die Konjugation stark nachlässt (bzgl. HT-29-Zellen^b um ca. Faktor 350; vgl. Tabelle 5.1 und Tabelle 3.1), jedoch noch immer im Bereich klassischer Zytostatika liegt.

^a Durchgeführt im eigenen Arbeitskreis von A. Denkert

^b Humane Darmkrebszelllinie

Tabelle 5.1 Aktivität des Tubugi-Rhodamin-Konjugats **92** gegen verschiedene Krebszelllinien.

| Zelllinie | IC ₅₀ [nM] |
|-----------------------|-----------------------|
| PC-3 ^a | 24.5 ± 3.4 |
| HT-29 ^b | 48.7 ± 4.2 |
| Colo 320 ^c | 439.4 ± 69.2 |

Weiterführende Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie^d haben ergeben, dass das untersuchte Konjugat in die Zellen eindringt und in länglichen Zellkompartimenten des Zytoplasmas angereichert wird. Eine spezifische Bindung an die Mikrotubuli ist nicht zu erkennen (s. Abbildung 5.7). Weiterhin zeigt sich bei der Inkubation der Zellen mit dem Rhodamin-Ugi-Produkt **99** (kein Wirkstoff) das gleiche Bild. Es ist literaturbekannt, dass Rhodamine bei Zellversuchen in Mitochondrien akkumulieren.^[71]

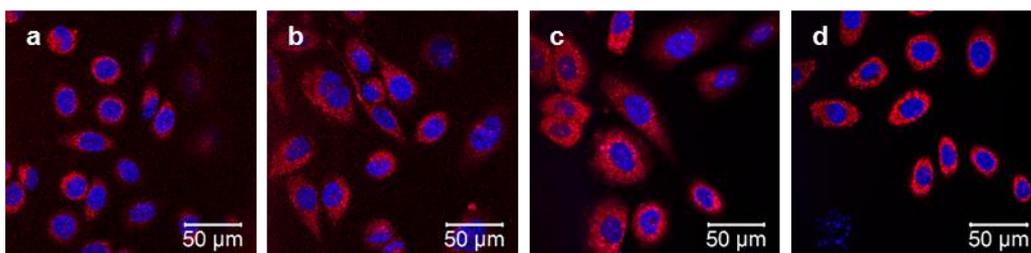


Abbildung 5.7 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von PC-3-Zellen nach Inkubation mit dem Ugi-Produkt **99** (sowie DAPI) und dem Tubugi-Rhodamin-Konjugat **92** (sowie DAPI).^c Beide Verbindungen reichern sich in Zellkompartimenten des Zytoplasmas an, sodass keine Aussage zur Distribution der Tubugis möglich ist. a) 10 nM **99**; b) 10 nM **92**; c) 3 µM **99**; d) 3 µM **92**. a-d) 1 µg/mL DAPI; DAPI: Anregungswellenlänge 405 nm, Emissionswellenlänge 448 nm; **92/99**: Anregungswellenlänge 514 nm, Emissionswellenlänge 593 nm.

Somit ist davon auszugehen, dass das neue Tubugi-Rhodamin-Konjugat **92** bei Einsatz im Tiermodell unspezifisch in den lebenden Zellen anreichert. Insgesamt erfüllt die Verbindung damit nicht die Erwartungen, sodass die Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen in Tiermodellen nicht gegeben sind.

^a Humane Prostatakrebszelllinie

^b Humane Darmkrebszelllinie

^c Humane Prostatakrebszelllinie

^d Durchgeführt im eigenen Arbeitskreis von A. Denkert

^e Weitere Aufnahmen im Anhang

Fazit

Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der beschriebenen Aktivitätseinbrüche in Zusammenhang mit den vorgenommenen Modifizierungen (Norspermidin-**91** und Rhodamin B-Konjugat **92**) der natürlichen Struktur, stehen klar im Einklang mit der einleitend diskutierten, steilen Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Tubulysine (s. Kapitel 1). Im Gegensatz zu dem voranstehend vorgestellten Konjugaten mit Norspermidin (**91**) und Rhodamin B (**92**) enthalten die vielversprechenden Folsäure- (s. Abbildung 5.1) und CDP-Konjugate (s. Abbildung 5.2) ein bis hierhin nicht weiter thematisiertes Strukturmerkmal: Eine spaltbare Disulfidbrücke. Im Folgenden wird diese entscheidende Komponente ausführlich diskutiert.

5.3 Spaltbare Konjugate

5.3.1 Konzept

Im Fall der Tubulysine bzw. der Tubugis setzt sich ein Konjugat im Wesentlichen aus den folgenden drei Elementen zusammen:

1. Dem Wirkstoff (*warhead*),
2. einer Targeting-Komponente (*carrier*), also einem Baustein der aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit bevorzugt in kanzerogenem Gewebe angereichert wird und
3. einer spaltbaren Verknüpfung zwischen den beiden Erstgenannten.

Abbildung 5.8 zeigt den schematischen Aufbau der bekannten Tubulysin-Konjugate. Das Zytostatikum (grün) ist über eine Disulfidbrücke mit einer Targeting-Komponente (blau) verbunden.

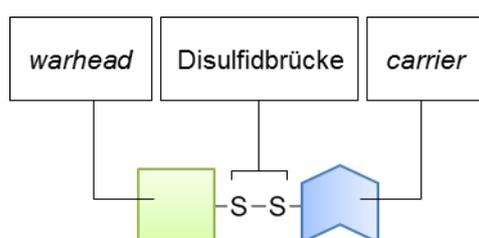


Abbildung 5.8 Schematischer Aufbau bekannter spaltbarer Tubulysin-Konjugate. Die in dieser Abbildung eingeführte Darstellungform wird in den folgenden Absätzen stets in genau diesem Kontext verwendet, also das grüne Quadrat stellt den Wirkstoff (*warhead*) dar und der blaue Pfeil steht für eine Targeting-Komponente (*carrier*).

Die steile quantitative SAR der Tubulysine bringt unter Verwendung dieses Ansatzes einen enormen Vorteil mit sich (s. Abbildung 5.9): Der am C-Terminus angefügte Rest stellt eine deutliche Modifikation des Tubulysin-Grundgerüsts dar und führt so zu einem massiven Aktivitätsverlust. Die Targeting-Komponente führt zu einer bevorzugten Anreicherung des Konjugats im zu behandelnden Gewebe. Im physiologischen Milieu führt die Spaltung der Disulfidbrücke zum Verlust der Targeting-Einheit. Der Wirkstoff wird so lokal konzentriert im kranken Zielgewebe freigesetzt. Durch diese temporäre Maskierung, verbunden mit einer Anreicherung der Verbindung im Krebsgewebe über eine geeignete Targeting-Einheit, sollte es möglich sein, das enge therapeutische Fenster der Tubugis signifikant zu erweitern.

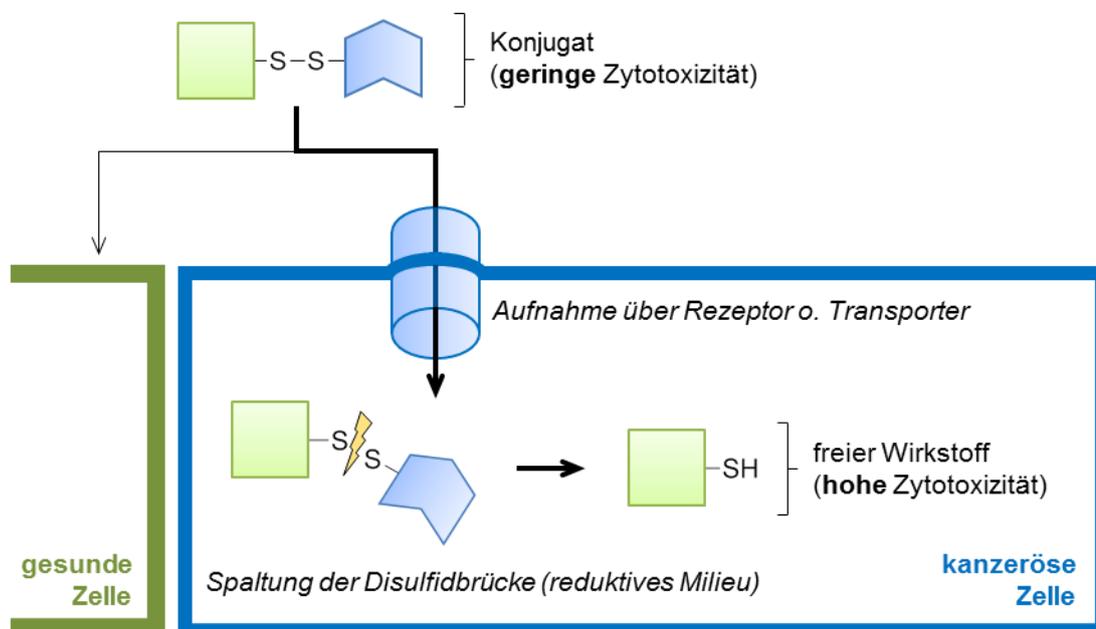


Abbildung 5.9 Wirkungsweise der spaltbaren Tubulysin- und Tubugi-Konjugate. Das wenig aktive Konjugat wird bevorzugt in kanzerogenen Zellen eingelagert. Die Disulfidbrücke wird gespalten und der eigentlich aktive Wirkstoff wird lokal konzentriert freigesetzt.

Auf diesen Rahmen fußend wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit ein vielseitiges Konzept entwickelt und etabliert, um ausgehend von einer breiten, zunächst nicht genauer zu definierenden Auswahl denkbarer Targeting-Komponenten direkt und unkompliziert die entsprechenden spaltbaren Tubugi-Konjugate aufzubauen. Die im Folgenden erläuterte Strategie beruht auf zwei Schlüsselverbindungen (s. Abbildung 5.10).

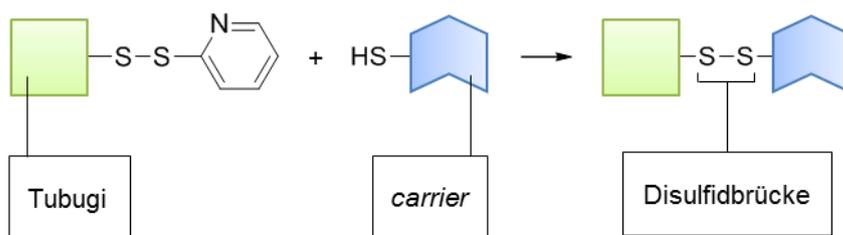


Abbildung 5.10 Aufbau der Tubugi-Konjugate durch Kupplung zweier Teilkomponenten.

Das erste der zentralen Fragmente bildet die aktivierte, aber dennoch zu isolierende und stabile Tubugi-Modifikation „Tubugi-SSPy“ (s. Abschnitt 5.3.2). Dieses Pyridyldithiol-Derivat liefert durch Umsetzung mit Thiol-funktionalisierten Targeting-Komponenten die gewünschten Disulfid-verknüpften Konjugate. Um beim Aufbau der Konjugate nicht auf Thiole beschränkt zu sein, stellt ein weiterer Baustein einen essentiellen Teil des vorliegenden Konzepts dar: Ein einfacher Linker (s. Abschnitt 5.3.3) erweitert den Pool der theoretisch verwendbaren Targeting-Komponenten auf Substanzen die über eine Aminofunktion verfügen. Dieser Ansatz ist schematisch in Abbildung 5.11 dargestellt (Linker: orange) und wird im Folgenden eingehend erläutert.

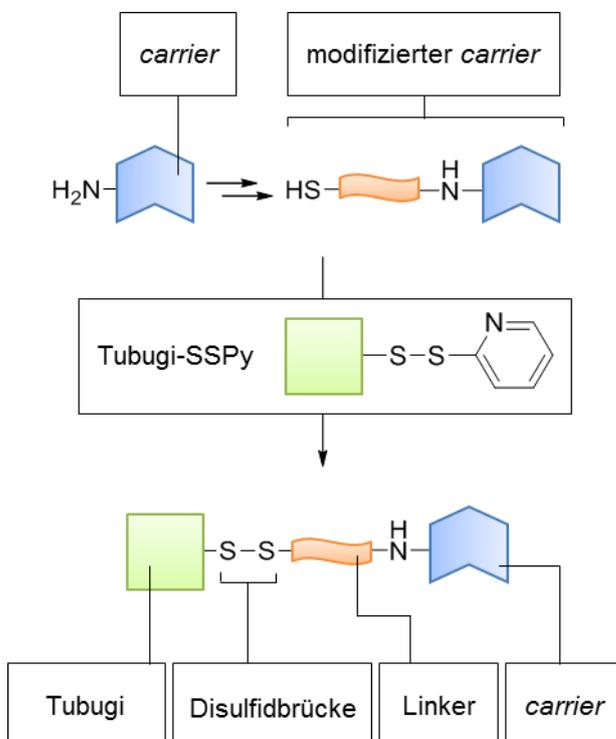


Abbildung 5.11 Aufbau der spaltbaren Tubugi-Konjugate ausgehend von Tubugi-SSPy (grün) und einer *N*-modifizierten (orange) Targeting-Komponente (blau).

In den nachstehenden zwei Abschnitten wird die Darstellung der beiden Schlüsselverbindungen, also des aktivierten Tubugi-Derivats Tubugi-SSPy und des erwähnten Linkers, beleuchtet. Die Verwendung dieser Substanzen zum Aufbau verschiedener Tubugi-Konjugate schließt sich an. Die Anwendung des beschriebenen Grundkonzeptes erlaubt darüber hinaus die Synthese eines Tubugi-Derivats, welches über eine Disulfid-verknüpfte, endständige C–C-Dreifachbindung verfügt. Ausgehend von dieser Verbindung eröffnen Umsetzungen mittels Click-Chemie einen weiteren, schnellen und unkomplizierten Zugang zu spaltbaren Tubugi-Konjugaten (s. Abschnitt 5.3.4).

5.3.2 Synthese des aktivierten Tubugi-Derivats Tubugi-SSPy

Die retrosynthetische Analyse (s. Abbildung 5.12) zeigt, dass zum Aufbau der aktivierten Verbindung Tubugi-SSPy **101** neben dem Tubugi selbst nur noch der literaturbekannte^[72] und leicht zugängliche Baustein **102** erforderlich ist.

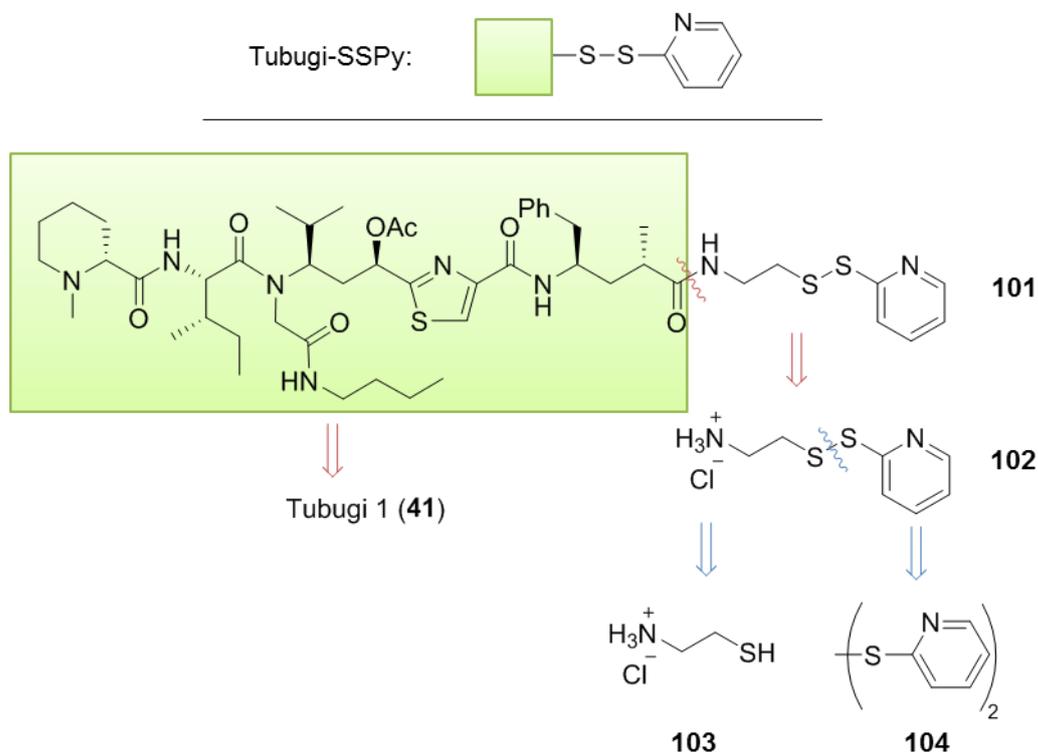


Abbildung 5.12 Retrosynthetischer Zugang zum Schlüsselintermediat Tubugi-SSPy **101**.

Dieser ist durch eine Umsetzung der kommerziell erhältlichen Substanzen Cysteamin **103** und 2,2'-Dithiodipyridin **104** zugänglich (s. Abbildung 5.13).

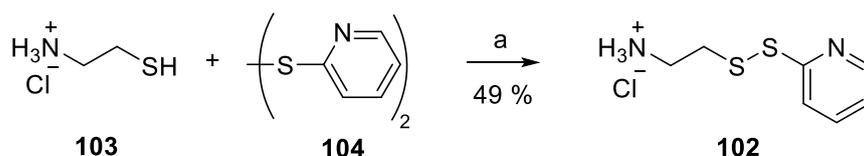


Abbildung 5.13 Synthese von Verbindung 102.^[72] a) MeOH, 49 %.

In der Praxis hat sich die Tubugi-SSPy-Darstellung ausgehend von der nicht-acetylierten Methylester-Vorstufe (**65**) von Tubugi 1 bewährt, da es in diesem Fall nicht notwendig ist, das Tubugi 1 (**41**) zu isolieren. Analog zur in Abschnitt 3.2 beschriebenen Tubugi-Synthese wird der Methylester **65** gespalten und die resultierende Säure **68** an der Tubuvalin-Hydroxygruppe acetyliert. Das so erhaltene Tubugi 1 (**41**) wird nun nicht isoliert sondern direkt mit dem Baustein **102** und unter Verwendung von HBTU und DIPEA in DMF umgesetzt (s. Abbildung 5.14).

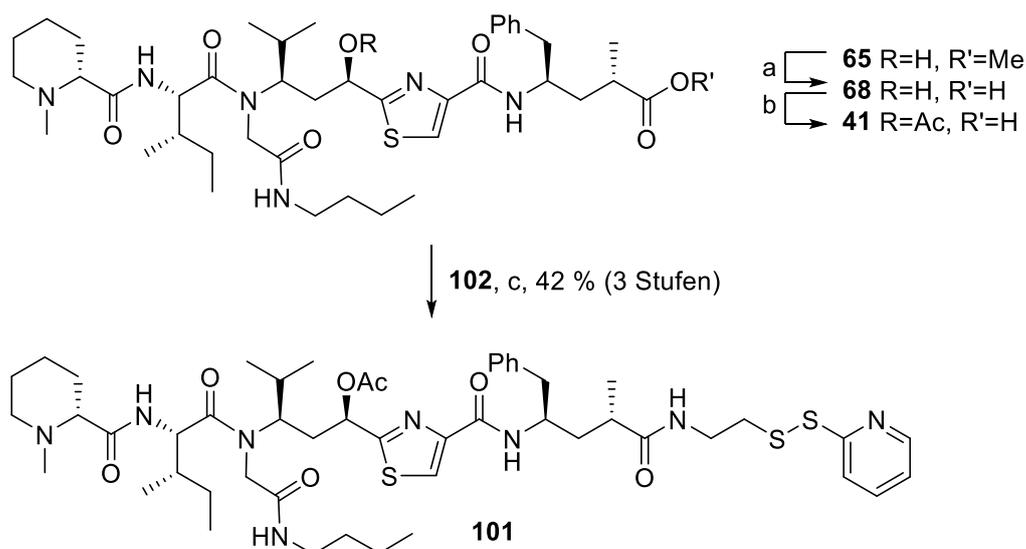


Abbildung 5.14 Synthese von Tubugi-SSPy **101**. a) LiOH·H₂O, THF/H₂O, 0 °C → RT; b) Ac₂O, Py; c) **102**, HBTU, DMF, DIPEA, MeOH, N₂-Atmosphäre, 42 % (3 Stufen).

Die säulenchromatographische Aufreinigung liefert schließlich die Zielverbindung **101** mit einer Ausbeute von 42 % über die genannten drei Stufen.

5.3.3 Synthese des aktivierten Thiol-Linkers

Die Aminofunktion ist als Strukturelement von Aminosäuren und somit von Peptiden bzw. Proteinen ein ubiquitärer Bestandteil natürlicher Verbindungen und somit stark verbreitet. Unzählbare potentielle Targeting-Komponenten können daher durch eine

minimale Modifikation, genauer durch die Verknüpfung mit einem Thiol-funktionalisierten Linker (s. Abbildung 5.11), einen Teil des hier vorgestellten Konzepts zur direkten und unkomplizierten Synthese von Tubugi-Konjugaten bilden. Die retrosynthetische Darstellung in Abbildung 5.15 verdeutlicht, dass eine Amino-funktionalisierte Targeting-Komponente (blau) durch Knüpfen einer Amidbindung mit 3-Mercaptopropionsäure (**103**, orange) um die gewünschte Thiolfunktion erweitert werden kann.

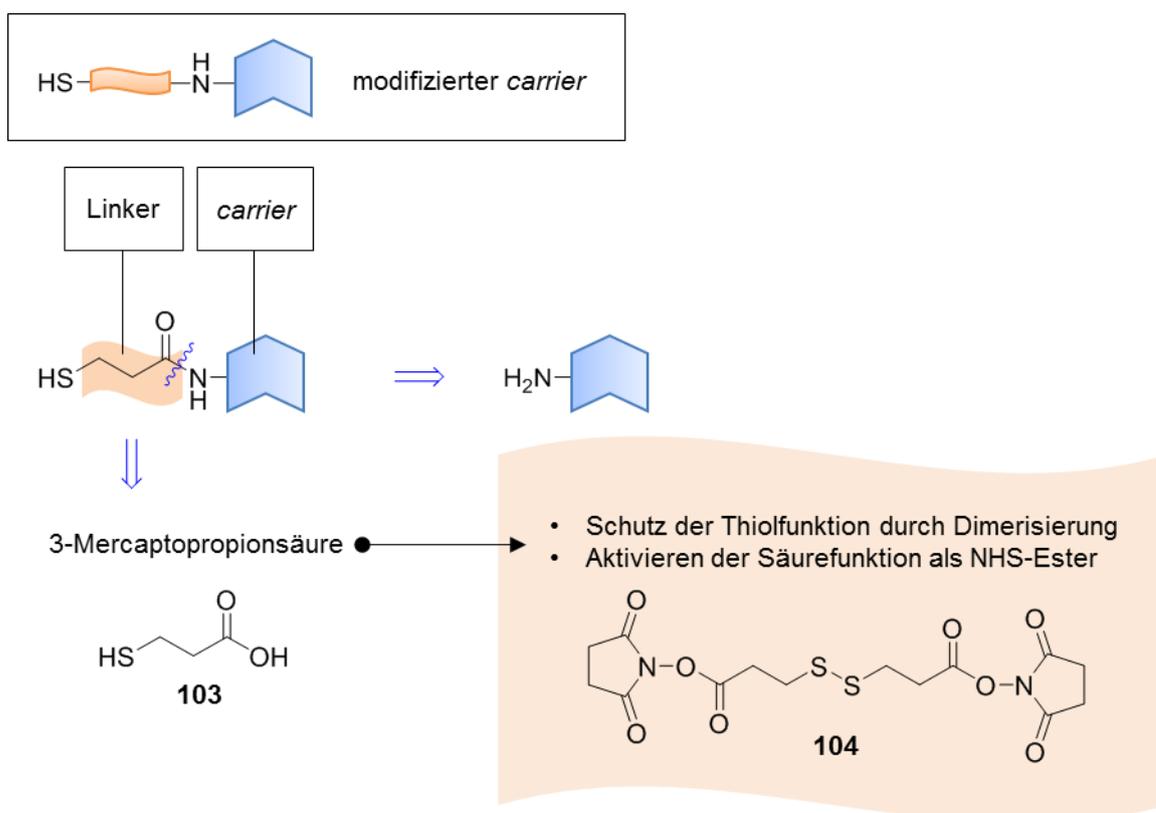


Abbildung 5.15 Modifikation von 3-Mercaptopropionsäure 103. 3-Mercaptopropionsäure (**103**) bildet den Linker zwischen Tubugi und Targeting-Komponente (*carrier*, blau). Zum Aufbau der Konjugate wird der *carrier* zunächst um den Linker **103** erweitert, bevor die Knüpfung mit dem Tubugi durchgeführt wird. Dafür ist 3-Mercaptopropionsäure (**103**) als Dimer zu schützen und als NHS-Ester zu aktivieren (Verbindung **104**).

Für eine breite Verwendbarkeit kombiniert mit einem unkomplizierten, praktischen Einsatz des späteren Linkers sind strukturelle Anpassungen der 3-Mercaptopropionsäure (**103**) erforderlich: Zum einen wird die Thiolgruppe durch schlichte Homodimerisierung geschützt und zum anderen der Säurerest durch Veresterung mit *N*-Hydroxysuccinimid für einen nukleophilen Angriff aktiviert (s. Abbildung 5.16).

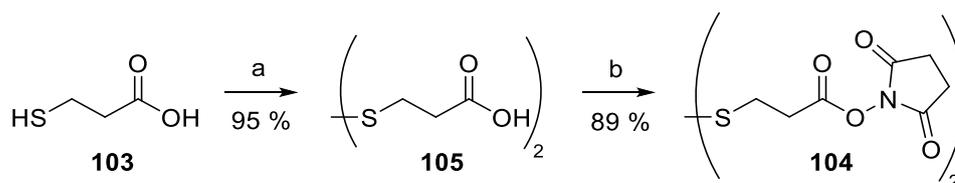


Abbildung 5.16 Synthese des *S*-geschützten, *O*-aktivierten Linkers **104** ausgehend von 3-Mercaptopropionsäure (**103**) in zwei Schritten.^[72] a) NaOH, KI, I₂, MeOH, 95 %; b) DCC, NHS, 0 °C → RT, DMF, 89 %.

Die Dimerisierung erfolgt durch Oxidation mit Iod in Methanol und die NHS-Esterbildung unter Verwendung von DCC als Kupplungsreagenz. Die Ausbeute beträgt für beide Teilschritte jeweils rund 90 %. Das Disulfid **104** ist stabil bei kühler und trockener Lagerung.

Eine nach dem hier beschriebenen System zu modifizierende Targeting-Komponente wird durch Rühren in DMF mit einem halben Äquivalent des aktivierten Disulfids **104** bei Raumtemperatur umgesetzt. Im Folgenden wird das resultierende Dimer durch eine Reduktion der Disulfidbindung mittels DTT gespalten. Die Umsetzung mit dem aktivierten Wirkstoff Tubugi-SSPy erfolgt ebenfalls durch schlichtes Rühren der beiden zu kuppelnden Komponenten bei Raumtemperatur in einem organischen Solvens.

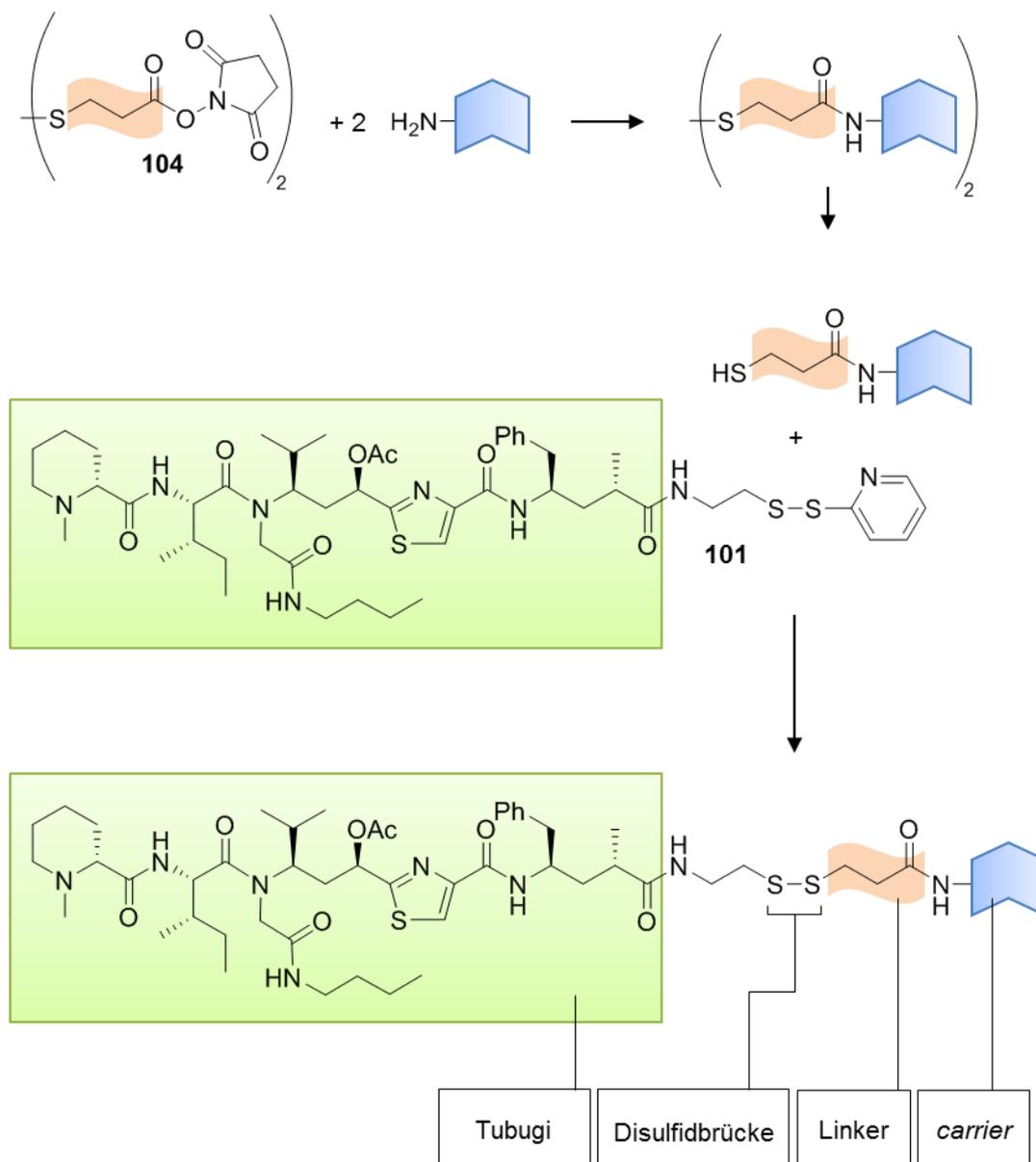


Abbildung 5.17 Allgemeiner Aufbau von spaltbaren Tubugi-Konjugaten unter Verwendung des aktivierten Thiol-Linkers.

Das auf den vorangegangenen Seiten beschriebene und unter Abbildung 5.17 zusammengefasste Prinzip findet bei der Darstellung der spaltbaren Tubugi-Konjugate mit Norspermidin (Abschnitt 5.3.5), mit Cholsäure (Abschnitt 5.3.6) und mit Neuropeptid Y (Abschnitt 5.3.7) sowie auch bei der Synthese des „Click-Tubugis“ Anwendung (folgender Abschnitt).

5.3.4 Weitere Möglichkeiten durch das „Click-Tubugi“

Herausforderungen bei der Modifikation natürlicher Stoffe können aufgrund eingeschränkter Verfügbarkeit sowie der oftmals notwendigen milden Reaktionsbedingungen auftreten. Neben der voranstehend vorgestellten

Pyridyldisulfid-Variante, eignet sich auch die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) hervorragend für die Modifikation von Biomolekülen. Im Jahr 2002 haben die Forschungsgruppen um Sharpless^[73] und Meldal^[74] unabhängig voneinander diesen Reaktionstyp vorgestellt. Während die länger bekannte, nicht-katalysierte Variante nach Huisgen^[75] eine Mischung von 1,4- und 1,5-disubstituierten Triazolen liefert, ergibt die CuAAC mit endständigen Alkinen selektiv das 1,4-disubstituierte Produkt^[73,74] (s. Abbildung 5.18).

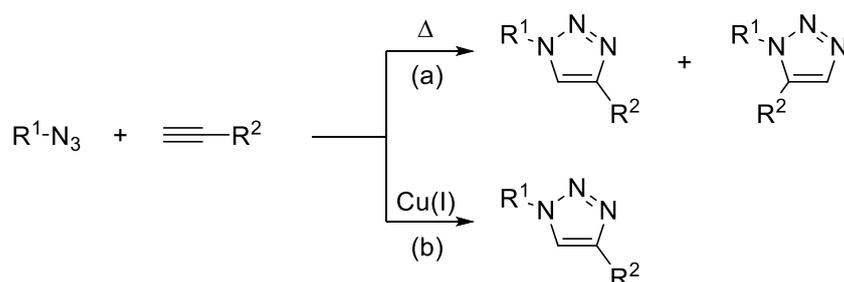


Abbildung 5.18 Azid-Alkin-Cycloaddition nach a) Huisgen *et. al.* (thermisch kontrolliert) und b) nach Sharpless bzw. Meldal *et. al.* (kupferkatalysiert).

In den 14 Jahren seit den Publikationen von Sharpless und Meldal im Jahr 2002 sind insgesamt über 1000 weitere wissenschaftliche Artikel inklusive zahlreicher Reviews auf diesem Gebiet erschienen.^[76,77] Diese Cu(I)-katalysierte Cycloaddition stellt den Prototypen einer sogenannten Click-Reaktion dar. Nach einer Definition von Sharpless handelt es sich dabei um stereospezifische chemische Transformationen die u. a. durch ein breites Anwendungsspektrum, gute Ausbeuten sowie wenige (oder gut abzutrennende) Nebenprodukte gekennzeichnet sind und in leicht entfernbaren oder umweltfreundlichen Lösungsmitteln ablaufen.^[78] Darüber hinaus besticht die CuAAC durch eine einfache praktische Durchführung sowie eine breite Toleranz gegenüber einem weitem Feld funktioneller Gruppen. Neben Cu(I) und „Cu(I)-Vorstufen“ enthalten weitere Katalysatoren Pd(II)^[79], Pt(II)^[80], Ni(II)^[80] oder Au(I)^[81].

Um diesen vielseitigen Reaktionstyp für den Aufbau spaltbarer Tubugi-Konjugate nutzen zu können, sollte über Tubugi-SSPy **101** als reaktive Zwischenstufe ein PEG-Linker mit endständiger Dreifachbindung eingeführt werden. Ausgehend von dieser Verbindung sind weitere spaltbare Tubugi-Konjugate durch Umsetzung mit Azid-funktionalisierten Targeting-Komponenten schnell und einfach aufzubauen (s. Abbildung 5.19).

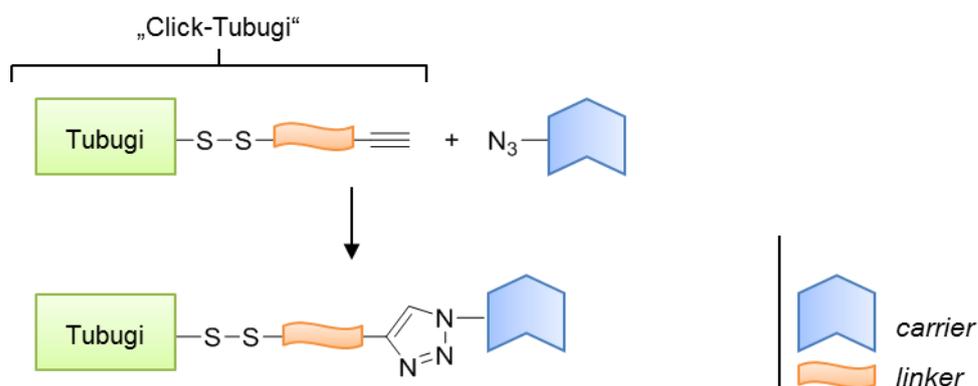


Abbildung 5.19 Schematischer Aufbau spaltbarer Tubugi-Konjugate durch Umsetzung des Click-Tubugis mit einer als Azid funktionalisierten Targeting-Komponente (*carrier*, blau).

Die Synthese des Click-Tubugis erfolgt ausgehend von 2-(2-Chlorethoxy)ethanol **106** durch Umsetzung mit Natriumazid in Wasser bei erhöhter Temperatur (s. Abbildung 5.20). Eine Substitution mit 3-Brompropin unter Verwendung von Natriumhydrid als Base schließt sich an. Die Reduktion des Azids **108** durch Triphenylphosphan in einer Wasser/THF-Mischung liefert das Amin **109** mit einer Gesamtausbeute von rund 34 % über drei Stufen.

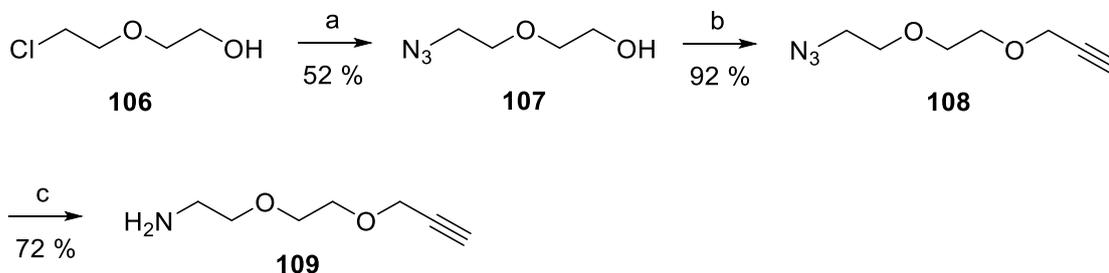


Abbildung 5.20 Erster Teil der Synthese des Linkers für das Click-Tubugi.^[82] a) NaN₃, H₂O, 110 °C, 52 %; b) NaH, 3-Brompropin (in Toluol), DMF, 0 °C → RT, 92 %; c) PPh₃, H₂O, THF, 72 %.

Abbildung 5.21 veranschaulicht den anschließenden Aufbau des zu kuppelnden Thiols. Die Umsetzung desamins **109** mit einem halben Äquivalent der aktivierten Vorstufe des Linkers **104** liefert das Disulfid **110** als leicht gelben Feststoff mit einer Ausbeute von 86 %. Die Spaltung des Disulfids **110** mittels DTT in einer Acetonitril/Wasser-Mischung ist nach dreißig Minuten abgeschlossen.

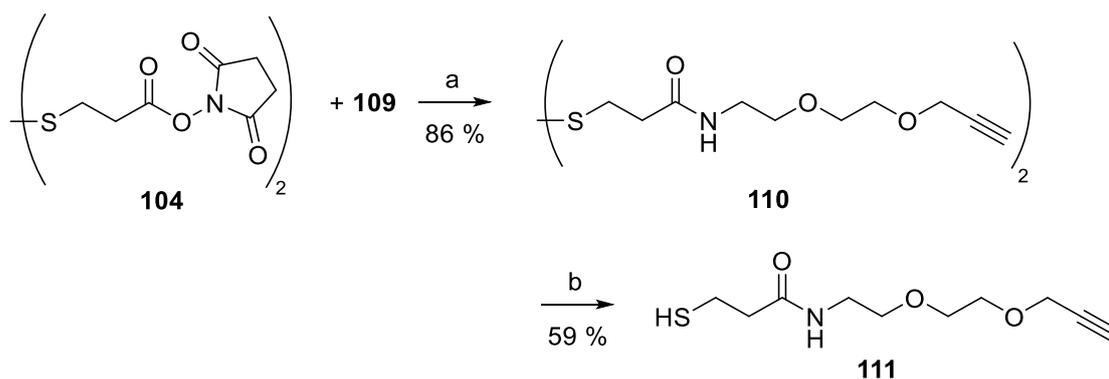


Abbildung 5.21 Zweiter Teil der Synthese des Linkers 111 für das Click-Tubugi. a) DMF, 86 %; b) DTT; K₂CO₃, ACN/H₂O, 59 %.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erfolgt direkt die Umsetzung mit dem aktivierten Wirkstoff Tubugi-SSPy **101** in trockenem Methanol (s. Abbildung 5.22). Die chromatographische Aufreinigung des Reaktionsansatzes liefert schließlich das Click-Tubugi **112** mit einer Ausbeute von 35 %.

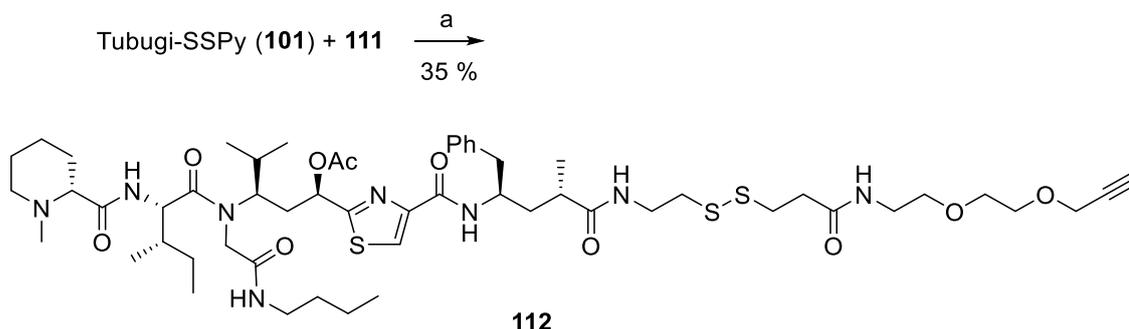


Abbildung 5.22 Synthese des Click-Tubugis 112 durch Verknüpfung der aktivierten Tubugi-Spezies 101 und dem PEG-Linker mit endständig Dreifachbindung 111. a) MeOH, 35 %.

Die Kupplung mit einer Azid-funktionalisierten Targeting-Komponente und damit die Validierung des vorgestellten Konzepts stehen gegenwärtig noch aus. Es ist zu beachten, dass das Dilsufid **112** bei einer Click-Reaktion, beispielsweise in Gegenwart von Kupfer(I)-Ionen, gespalten werden kann. Das Ermitteln geeigneter Reaktionsbedingungen zum erfolgreichen Verknüpfen stellt an dieser Stelle die vornehmliche Herausforderung dar. Weiterhin ist aufgrund der geringen Ausbeute von nur 35 % im letzten Reaktionsschritt beim Aufbau des Click-Tubugis **112** die Auswahl geeigneter Reaktionspartner stark eingeschränkt. Die Synthese eines Tubugi-Konjugats über das Click-Tubugi **112** kann nur einen Mehrwert bringen, wenn der Kupplungspartner schlechter zugänglich ist als das Click-Tubugi oder dessen

Produktion komplexer oder kostenintensiver ist. In aller Regel sollte der Konjugataufbau direkt über das Tubugi-Pyridyldithiol (Tubugi-SSPy **101**) einen geeigneteren Ansatz darstellen.

5.3.5 Erstes spaltbares Tubugi-Konjugat mit Norspermidin als Targeting-Komponente

Aufbauend auf den bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Konjugatsynthesen war der logische Ausgangspunkt für ein erstes spaltbares Konjugat das in Abschnitt 5.2 diskutierte nicht-spaltbare Norspermidin-Konjugat (s. Abbildung 5.23).

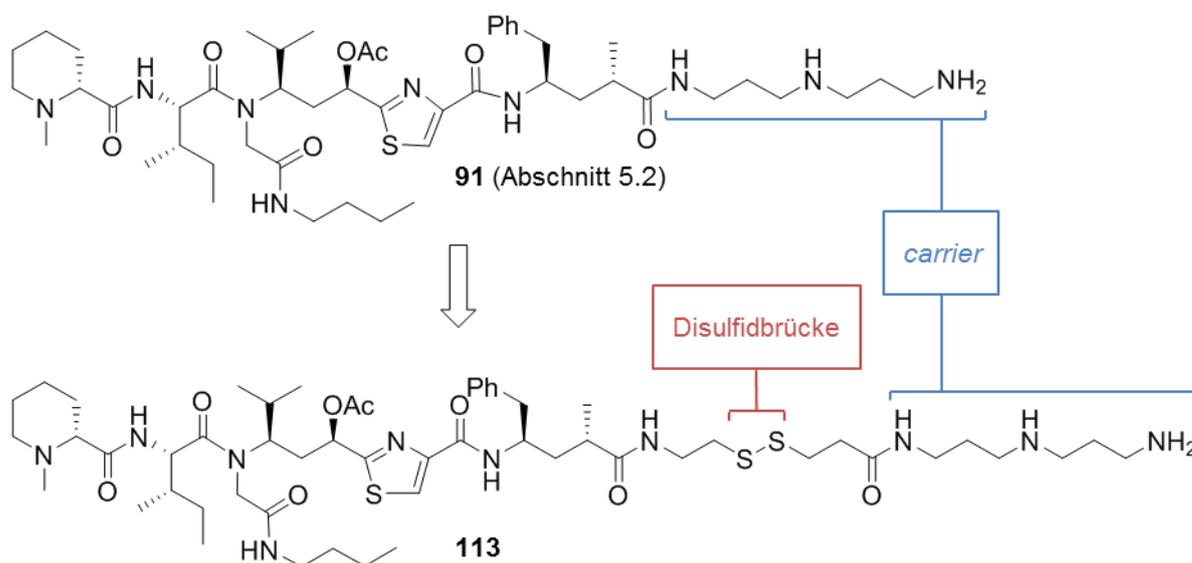


Abbildung 5.23 Weiterentwicklung des Tubugi-Norspermidin-Konjugats **91** durch die Einführung einer spaltbaren Disulfidbrücke (Verbindung **113**).

Theoretisch sollte das spaltbare Tubugi-Konjugat **113** mit Norspermidin als Targeting-Komponente aus dem synthetisierten Bausteinen Tubugi-SSPy **101**, der Linker-Vorstufe **104** sowie kommerziell erhältlichem Norspermidin zugänglich sein. Die Umsetzung des Polyamins **114** mit der aktivierten Vorstufe des Linkers **104** liefert jedoch nicht die gewünschte Zwischenverbindung **115**, sondern ausschließlich das durch intramolekularen Ringschluss gebildete Molekül **116** (s. Abbildung 5.24).

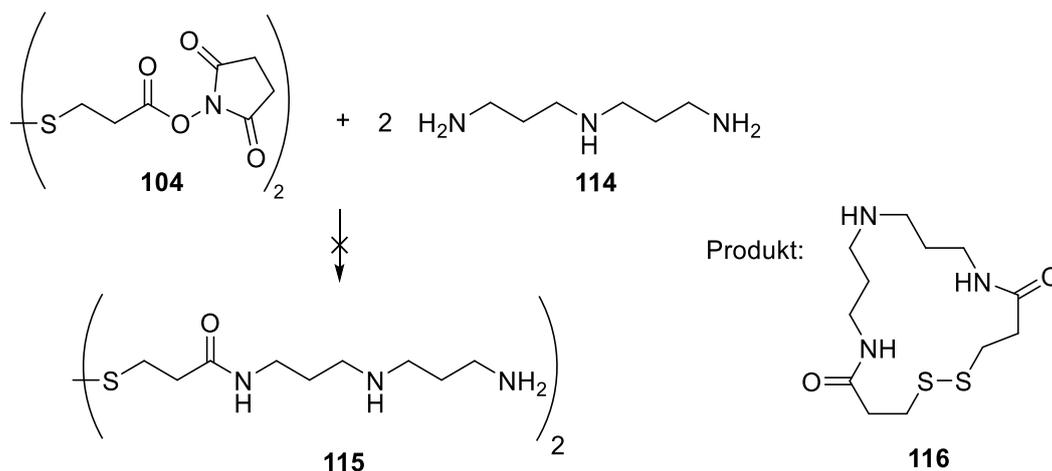


Abbildung 5.24 Unerwünschtes Ringprodukt beim Aufbau des spaltbaren Norspermidin-Konjugats.

Wie erwartet führt die Reaktion auch unter Verwendung eines Norspermidin-Überschusses (10 bzw. 20 Äquivalent) zu keiner Verbesserung. Die Synthese muss also mit teil-geschütztem Norspermidin durchgeführt werden. Da eine direkte Boc-Einfachschützung^[83] des Polyamins kein sauberes Produkt lieferte, sollte die folgende Syntheseroute zur Darstellung von *N,N'*-Di-Boc-Norspermidin (**117**) Anwendung finden (s. Abbildung 5.25).

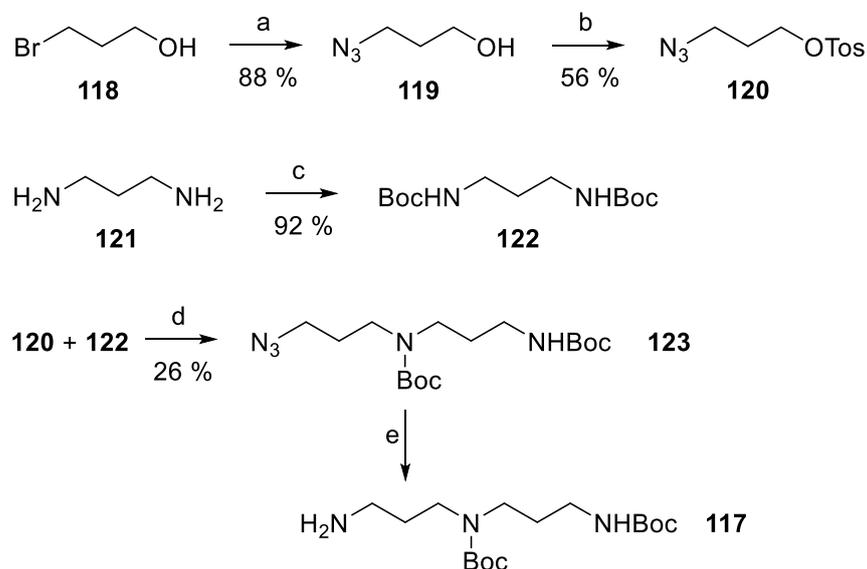


Abbildung 5.25 Synthese von *N,N'*-Di-Boc-Norspermidin 117 ausgehend von 3-Bromopropanol (118) über 5 Stufen. a) NaN_3 , TBAHS, H_2O , 80°C , 88 %; b) TsCl , DMAP, Py, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 56 %; c) NaOH , H_2O , $(\text{Boc})_2\text{O}$, THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 92 %; d) NaH , THF, DMF, N_2 -Atmosphäre, 26 %; e) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 , MeOH.

Zum schrittweisen Aufbau der Verbindung wird 3-Brompropanol (**118**) zunächst unter Verwendung von Natriumazid in den korrespondierenden Azidoalkohol **119** überführt und anschließend tosyliert. Es folgt der Umsatz mit *N,N'*-Di-Boc-geschütztem 1,3-Diaminopropan (**122**) in Gegenwart von Natriumhydrid als Base. Die Palladiumhydroxid-katalysierte Reduktion der Azidfunktion liefert schließlich doppelt geschütztes Norspermidin (**117**). Diese Verbindung erlaubt die Darstellung des Dimers (**124**), welches unter Zugabe von DTT zum entsprechenden Thiol **125** reduziert wird (s. Abbildung 5.26).

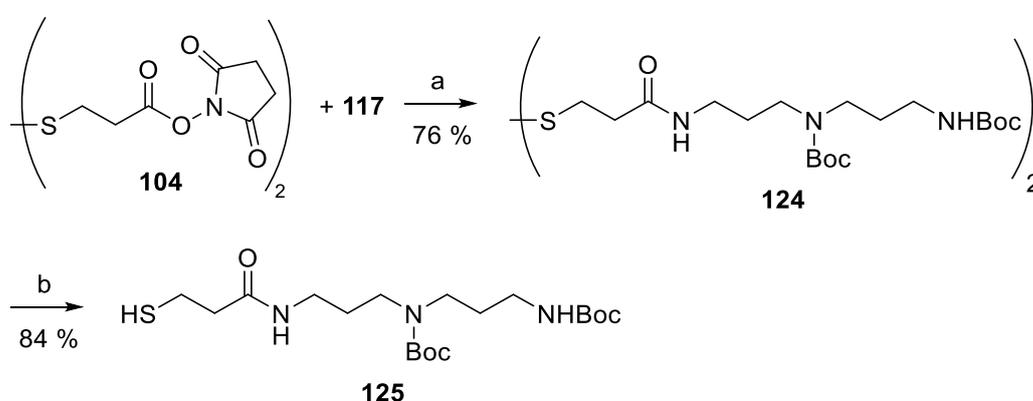


Abbildung 5.26 Modifikation des Norspermidin-Bausteins **125** durch den aktivierten Thiol-Linker **104**. a) DMF, 76 %; b) DTT, K₂CO₃, ACN/H₂O, 84 %.

Die Bindungsknüpfung mit dem aktivierten Wirkstoff Tubugi-SSPy **101** in trockenem Methanol liefert das Boc-geschützte Konjugat **126** mit einer Ausbeute von 49 %. Durch Entfernen der Schutzgruppen mit TFA wird das spaltbare Tubugi-Norspermidin-Konjugat **113** in einer Ausbeute von 73 % erhalten (s. Abbildung 5.27).

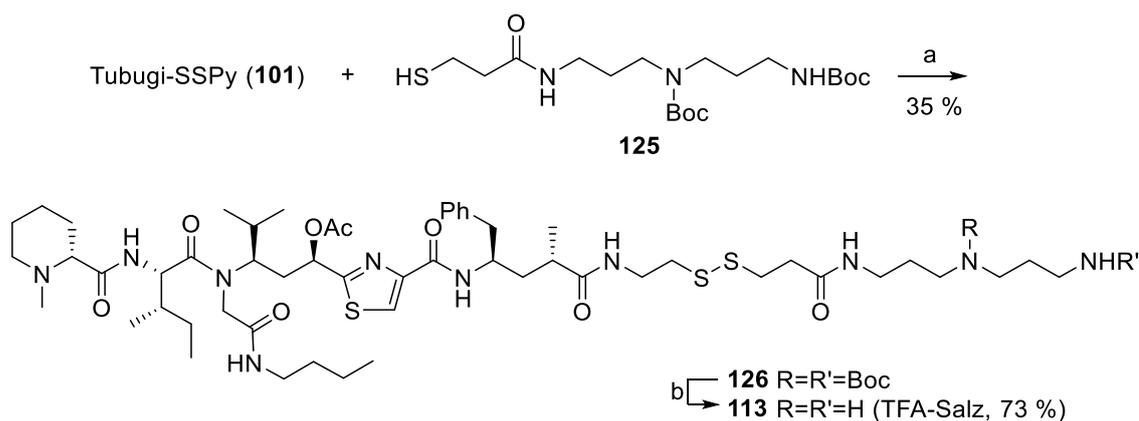


Abbildung 5.27 Die letzten Syntheseschritte zum Aufbau des spaltbaren Norspermidin-Konjugats **113**. a) MeOH, 35 %; b) TFA, DCM, 73 %.

5.3.6 Erstes spaltbares Tubugi-Konjugat mit Cholsäure als Targeting-Komponente

Steroide kommen in Tieren, Pflanzen sowie Pilzen vor und sind Bestandteil mannigfaltiger biochemischer Prozesse. Gallensäuren sind Steroide, die über ein spezifisches Transportsystem von der Pfortader selektiv in die Leber aufgenommen werden. Weiterhin zirkulieren diese im Darm-Leber-Kreislauf bevor sie in den großen Blutkreislauf gelangen. Die Pfortader sammelt das Blut aus den Bauchorganen Magen, Dünndarm, Dickdarm, Teilen des Mastdarms, Bauchspeicheldrüse sowie der Milz und führt dieses der Leber zu. Substanzen, die der Körper zur Aufrechterhaltung seiner Funktionen benötigt, sind durch den so genannten enterohepatischen Kreislauf (Darm-Leber-Kreislauf) gekennzeichnet. Die mehrfache Passage des Pfortadersystems führt zu einer Anreicherung der Gallensäuren in Darm und Leber. Aus pharmazeutischer Sicht liegt es daher nahe beispielsweise Cholsäure (**127**, s. Abbildung 5.28), als eine der wichtigsten Gallensäuren, zu verwenden, um biologisch aktive Substanzen gezielt in Leber, Galle sowie Darm zu transportieren und dort anzureichern. Grundlegende Untersuchungen dazu erfolgten bereits Anfang der 1990er Jahre durch Kramer und Kollegen. Sie synthetisierten u. a. verschiedene Chlorambucil-Konjugate mit Taurocholsäure und Cholsäure.^[84,85] Chlorambucil (**128**, s. Abbildung 5.28) wirkt zytostatisch sowie immunsuppressiv und dient vorrangig zur Behandlung von Leukosen und malignen Lymphomen.

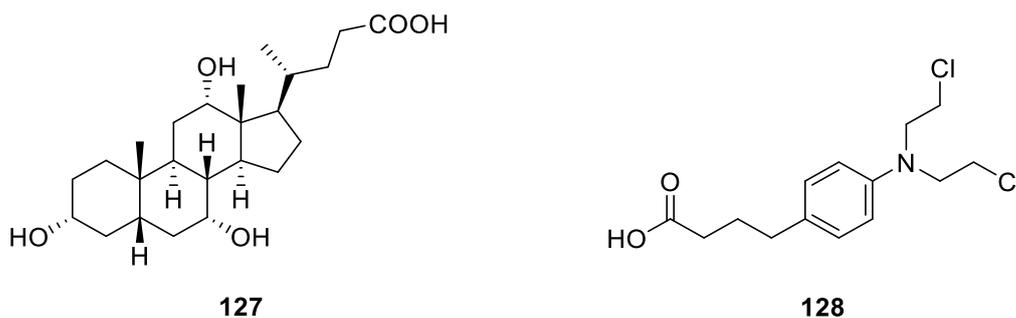


Abbildung 5.28 Strukturen der Gallensäure Cholsäure (127) und des Zytostatikums Chlorambucil (128, Leukeran®).

In vitro-Aufnahmeuntersuchungen belegen eine spezifische Interaktion dieser Gallensäure-Konjugate mit frisch isolierten Hepatozyten (Leberzellen) während der bloße Wirkstoff keine signifikante Affinität zeigt.^[86] In Abhängigkeit vom natürlichen Gallensäure-Transportsystem führt eine Verknüpfung von peptidischen Wirkstoffen an Gallensäuren zu einer erhöhten Membrangängigkeit und daraus resultierend zu einer vermehrten Aufnahme in das untersuchte Gewebe.^[86] Dieser Ansatz wurde unter anderem von Paschke und Mitarbeitern am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg aufgegriffen.^[87,88] Um die beschriebenen Transportmechanismen auszunutzen, synthetisierten sie u. a. das Cholsäure-Konjugat **129**, das über einen Alkyl-Spacer mit einem Cisplatin-Analogen verbunden ist (s. Abbildung 5.29).

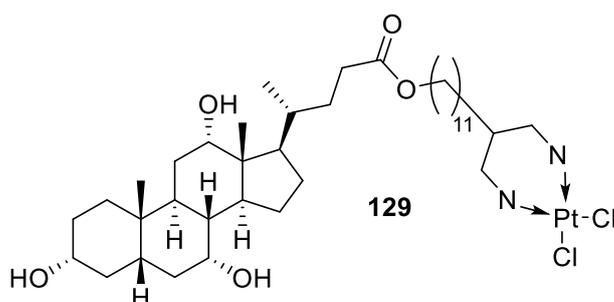


Abbildung 5.29 Beispiel eines Cisplatin-Cholsäure-Konjugats von Paschke *et. al.*^[86]

Bei Cisplatin handelt es sich um einen planaren Platinkomplex mit zwei *cis*-ständigen Chloridoliganden. Die Substanz initiiert die Querverknüpfung von DNS-Strängen und hemmt so deren Replikation.^[89] Die damit verbundene zytostatische Aktivität führte 1974 erstmalig zur Verwendung von Cisplatin in der Krebstherapie.^[90] Trotz zahlreicher unerwünschter Arzneimittelwirkungen ist dieser Wirkstoff bis heute ein fester Bestandteil der modernen Kombinationschemotherapie. Die Anwendung von Cisplatin ist stets von einer Resistenzentwicklung begleitet.^[91] Neben einem zielgerichteten

Wirkstofftransport kann das Cholsäure-Konjugat **129**, wie von Paschke und Kollegen gezeigt, hier entsprechend kompensieren: In Untersuchungen mit der Cisplatin-sensitiven Hodenkrebszelllinie H12.1 weisen das Konjugat **129** und die Ausgangsverbindung Cisplatin eine vergleichbare Aktivität auf. Bei derselben, niedrigen Dosis induziert Konjugat **129** auch die Apoptose der Cisplatin-resistenten Hodenkrebszellen 1411HP, wohingegen die Dosis von Cisplatin um Faktor 3.3 erhöht werden muss, um das gleiche Ergebnis zu erzielen.^[92]

Auf den nächsten Seiten folgt die Beschreibung der ersten Synthese eines Tubugi-Cholsäure-Konjugats. Auch diese Darstellung fußt auf dem unter Abschnitt 5.3.1 eingeführten Konzept zum Aufbau Disulfid-verbrückter und damit spaltbarer Tubugi-Konjugate. Um kommerziell erhältliche Cholsäure (**130**) für die bevorstehenden Umsetzungen vorzubereiten, erfolgt zunächst die Anknüpfung eines PEG-Spacers (s. Abbildung 5.30). Durch den Einbau des Spacers entsteht eine gewisse räumliche Trennung zwischen dem Wirkstoff und der Targeting-Komponente. Dies unterstützt den Erhalt der biologischen Eigenschaften bzw. Aktivität des *carriers* und somit dessen Erkennung in physiologischer Umgebung.

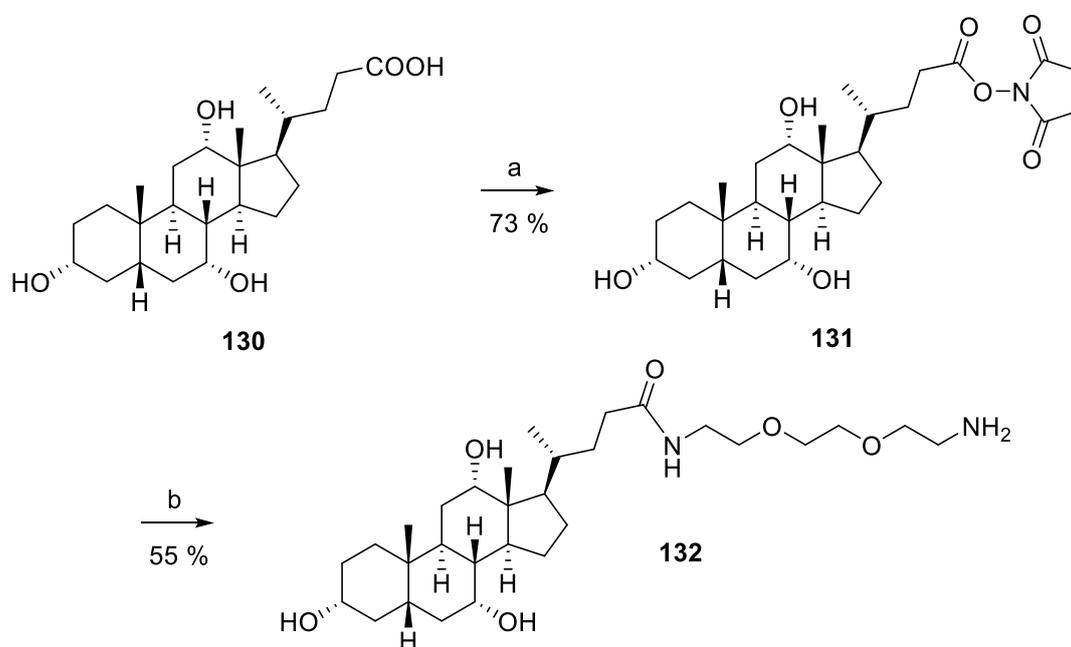


Abbildung 5.30 Modifikation von Cholsäure (**130**) durch einen PEG-Spacer. a) NHS, EDC·HCl, DMAP, DMF, 73 %; b) NH₂-PEG₂-(CH₂)₂NH₂, DCM, 55 %.

Die Synthese des NHS-Esters **131** in DMF erfolgt unter Verwendung von EDC·HCl als Hilfsstoff. Der Aktivester **131** wird durch Zusatz von Eiswasser ausgefällt und

abfiltriert. Die folgende Umsetzung mit einem 5-fachen Überschuss des PEG-Diamins 2,2'-Ethylendioxy-bis-ethylamin liefert die Zwischenverbindung **132**. Abbildung 5.31 veranschaulicht den anschließenden Aufbau des zu kuppelnden Thiols **134**. Die Umsetzung der Zwischenverbindung **132** mit einem halben Äquivalent der aktivierten Vorstufe des Linkers **104** liefert das Disulfid **133** mit einer Ausbeute von 51 %.

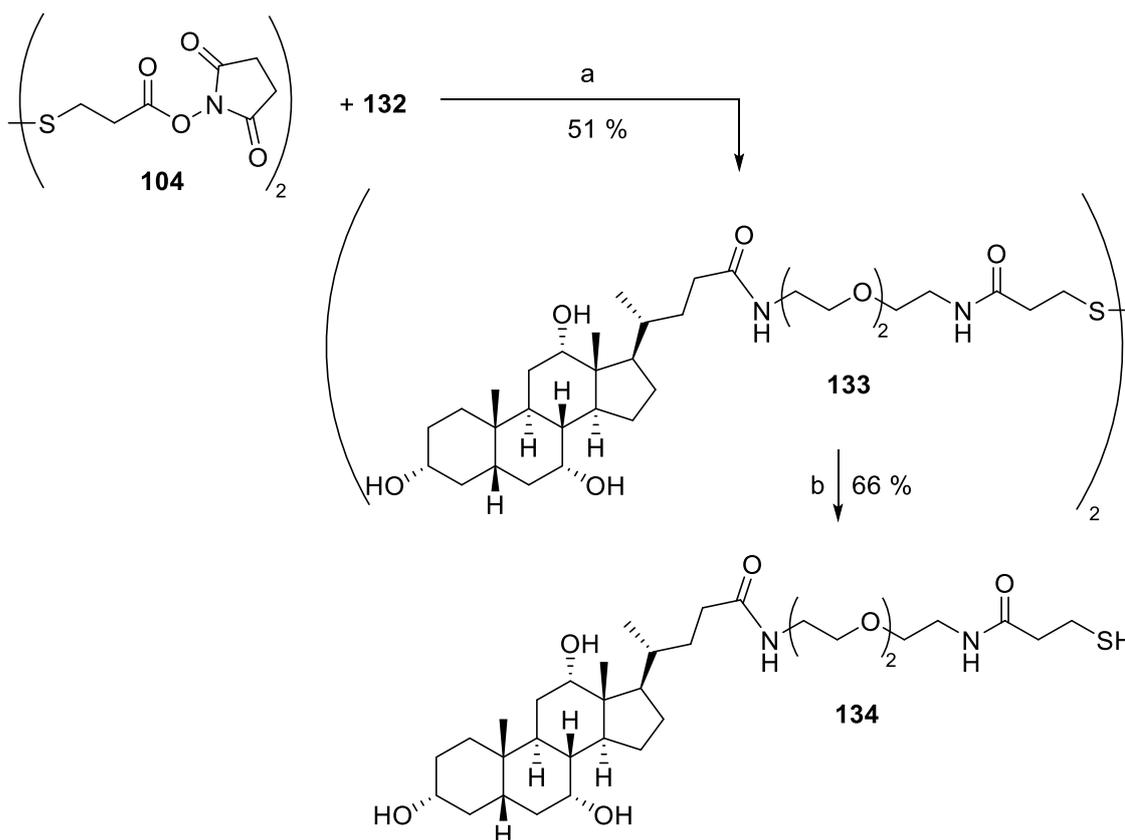


Abbildung 5.31 Aufbau der zu kuppelnden Cholsäure-Targeting-Einheit **134**. a) DCM/DMF, 51 %; b) DTT; K₂CO₃, ACN/H₂O, 66 %.

Die Spaltung des Disulfids **133** durch DTT in einer Acetonitril/Wasser-Mischung ist nach zwanzig Minuten abgeschlossen. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erfolgt schließlich die Umsetzung mit dem aktivierten Wirkstoff Tubugi-SSPy **101** in Methanol unter Stickstoffatmosphäre (s. Abbildung 5.32). Die chromatographische Aufreinigung des Reaktionsansatzes liefert das spaltbare Tubugi-Cholsäure-Konjugat **135** mit einer Ausbeute von 62 % (über zwei Stufen).

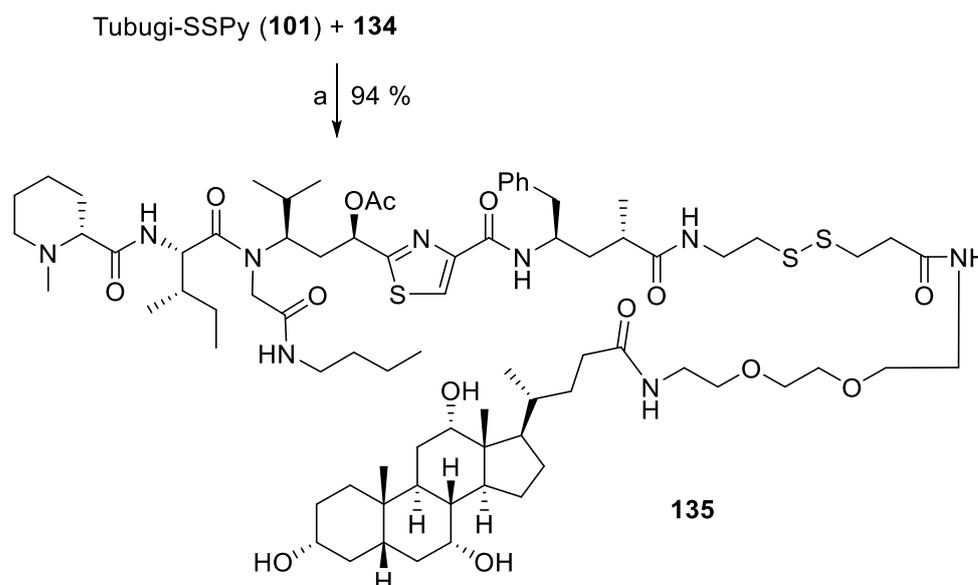


Abbildung 5.32 Kupplung der aktivierten Tubugi-Spezies 101 mit der modifizierten Cholsäure 135 als Targeting-Komponente. a) MeOH, N₂-Atmosphäre, 94 %.

5.3.7 Erstes spaltbares Tubugi-Konjugat mit Neuropeptid Y als Targeting-Komponente

Im Jahr 1982 haben Tatemoto und Kollegen Neuropeptid Y (NPY) in Schweinehirnextrakten entdeckt.^[93] Dieses lineare Polypeptid besteht aus insgesamt 36 Aminosäuren. Der Name „Neuropeptid Y“ ist auf den hohen Tyrosin-Anteil (abgekürzt als Y) zurückzuführen. Nur zwei Jahre später wurde erstmals humanes NPY aus einem Nebennierenmarktumor isoliert.^[94] Die Aminosäuresequenz unterscheidet sich nur minimal und ist in Abbildung 5.33 dargestellt.

H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Met-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂.

Abbildung 5.33 Aminosäuresequenz von humanen Neuropeptid Y.

Gemeinsam mit Peptid YY (PYY) und dem pankreatischen Polypeptid (PP) bildet NPY eine kleine Familie von Hormonen, die hauptsächlich an Prozessen in Gehirn und Gastrointestinaltrakt beteiligt sind.^[95] Als Bestandteil des peripheren Nervensystems wird NPY auch im Atem- und Urogenitalsystem gefunden. Weiterhin handelt es sich um das am weitesten verbreitete, bekannte Neuropeptid im Zentralnervensystem.^[96] Neuropeptid Y induziert Gefäßverengungen^[97] (Vasokonstriktion) und ist mit Insulinfreisetzung^[98] sowie Magen- und Darmmotilität^[99] verknüpft. Zusätzlich spielt dieses Hormon eine Rolle bei verschiedenen Störungen wie Depression, Epilepsie,

Adipositas (Fettleibigkeit) sowie Alkoholabhängigkeit und stellt daher einen vielversprechenden Behandlungsansatz für verschiedene Krankheiten dar.^[96]

Neuropeptid Y sowie auch PYY und PP binden an eine G-Protein-gekoppelte Rezeptorfamilie. Seit 1989 wurden sechs verschiedene Untertypen (Y1R–Y6R) in unterschiedlichen Gewebearten identifiziert. Davon werden Y1R, Y2R, Y4R und Y5R im Menschen exprimiert.^[100] Die Untertypen Y1R und Y2R sind bisher am intensivsten untersucht. Der Rezeptor Y1R besteht aus 384 Aminosäuren und wurde in Darm, Niere und Herz lokalisiert. Der aus 381 Aminosäuren aufgebaute Typ Y2R zeigt eine Strukturhomologie von nur 31 % zu Y1R und wurde bevorzugt im Gehirn identifiziert. Der aus 375 Aminosäuren aufgebaute Rezeptortyp Y4R wird in Darm, Prostata und Bauchspeicheldrüse exprimiert. In Hoden, Milz und ebenfalls der Bauchspeicheldrüse wird Y5R gefunden (445 Aminosäuren).^[96] Die Affinität von NPY zu den Rezeptoren ist vom jeweiligen Subtyp abhängig: Y2R > Y1R > Y5R > Y4R (stärkste zu schwächste Affinität).^[101] Auch die Internalisierungsgeschwindigkeit ist vom jeweiligen Rezeptortyp abhängig.^[102]

Die Überexpression der genannten Rezeptoren in Krebsgewebe ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeit (siehe Review von Körner und Reubi^[103] oder auch von Zhang *et al.*^[104]). Weiterhin ist beschrieben, dass NPY-Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden in Verbindung mit der Regulierung des Tumorwachstums sowie der Tumorangiogenese stehen.^[104] Reubi und Kollegen veröffentlichten eine richtungsweisende Arbeit bezüglich der Rolle von NPY bei Brustkrebs.^[105] Sie untersuchten die Auftrittshäufigkeit der genannten Rezeptoren in karzinomem Brustgewebe von 89 Patienten: Insgesamt waren 76 Proben NPY-Rezeptor-positiv (s. Tabelle 5.2). In ausnahmslos allen untersuchten Fällen war Y1R der dominante Subtyp. In 46 dieser 76 NPY-Rezeptor-positiven Proben wurde ausschließlich Y1R gefunden. Weitere 12 zeigten hauptsächlich (> 90 %) diesen Subtyp. In 24 % der 76 Proben konnten Reubi und Kollegen eine Y1R/Y2R-Mischexpression identifizieren, während in keiner ausschließlich der Rezeptor Y2R vorhanden war. Im deutlichen Gegensatz dazu zeigt das gesunde Vergleichsgewebe in 42 % der untersuchten Proben eine alleinige Expression von Y2R und in keinem Fall konnte ausschließlich der Rezeptorsubtyp Y1R nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die neoplastische Transformation gesunden Brustgewebes von einem Umschalten der Rezeptorexpression von hauptsächlich Y2R zu hauptsächlich Y1R begleitet ist. Daher – und allgemein aufgrund der starken Verbreitung des Rezeptorsubtyps Y1R in

annähernd allen Brustkrebszelllinien, Tumoren und Metastasen^[106] – bildet das *in vivo*-Y1R-Targeting eine aussichtsreiche Strategie zur Diagnose sowie der Behandlung von Brustkrebs.

Tabelle 5.2 Y1R/Y2R-Häufigkeit in gesundem und karzinomem Brustgewebe.^[105]

| | NPY-Rezeptor | | Häufigkeit |
|-------------------------------------|---------------|---------|-------------|
| | identifiziert | Subtyp | |
| Brustkrebsgewebe | 76/89 (85%) | Y1R | 58/76 (76%) |
| | | Y1R/Y2R | 18/76 (24%) |
| | | Y2R | 0/76 (0%) |
| Nicht-neoplastisches Brustgewebe | 45/45 (100%) | Y1R | 19/45 (42%) |
| | | Y1R/Y2R | 26/45 (58%) |
| | | Y2R | 0/45 (0%) |

Ein darauf beruhender Ansatz von 2001 beschreibt den direkten Transport von Daunorubicin in Krebszellen.^[107] Dieses erfolgreich zur Chemotherapie eingesetzte Zytostatikum bringt verschiedene dosisabhängige Nebenwirkungen wie Myelosuppression (Knochenmarkdepression), Paravasation sowie Nieren- und Kardiotoxizität mit sich.^[108] Um diesen entgegenzuwirken, haben Langer *et al.* das Konjugat **135** synthetisiert und evaluiert (s. Abbildung 5.34). Über einen säurelabilen Hydrazon-Linker (HYD) an der 13-Keto-Position ist Daunorubicin an ein [C15]-NPY-Analogon gebunden. Die Verbindung „[C15]-NPY-dauno-HYD“ zeigt zytotoxische Wirkung gegen die Y1R-exprimierende Zelllinie SK-N-MC. Als Negativkontrolle wurden Blockierungsversuche mit einem hohen Überschuss des Rezeptorantagonisten BIBP-3226 durchgeführt. Wie erwartet wurde dabei ein Einfluss auf die Aktivität des Konjugats registriert, während bei den Versuchen mit der nicht-modifizierten Substanz keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Darüber hinaus ist das Konjugat **135** im Gegensatz zum freien Wirkstoff inaktiv gegen NPY-rezeptorfremde Glioblastomzellen (Gehirntumor) XF-498L. Diese Ergebnisse unterstreichen das enorme Potential von NPY-gesteuerten Medikamenten.

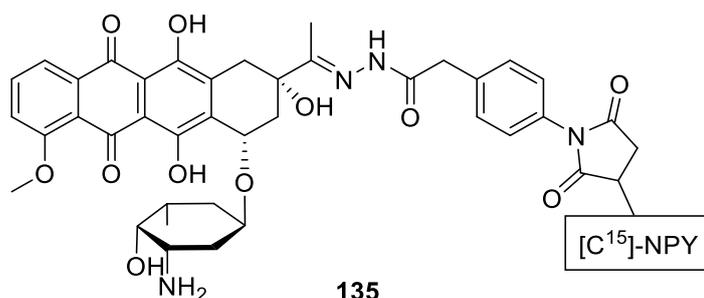


Abbildung 5.34 Daunorubicin-NPY-Konjugat **135** von Langer *et al.*^[107]

Im Jahr 2010 konnte die Gruppe um Beck-Sickinger eindrucksvoll die erfolgreiche Anwendung einer verwandten Targeting-Strategie zur Brustkrebsdiagnose demonstrieren.^[109] Sie synthetisierten ein radioaktiv markiertes NPY-Konjugat (**136**) (s. Abbildung 5.35), welches der Visualisierung von Tumoren dient. Unter Verwendung eines *N*-Acetyl-Histidin-Chelators (*N*^αHis-Ac) wurden ^{99m}Techneium und ein [⁷F, ³⁴P]-NPY-Analogon verknüpft.

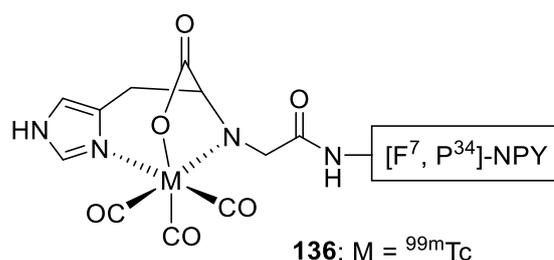


Abbildung 5.35 ^{99m}Tc-markiertes NPY-Analogon von Beck-Sickinger *et al.*^[109]

Nach vielversprechenden vorklinischen Untersuchungen wurde das markierte Neuropeptid vier Patienten mit Brustkarzinomen verschiedener Stadien verabreicht. Anhand szintigraphischer Untersuchungen konnte die selektive Anreicherung der Verbindung **136** im kanzerogenen Brustgewebe belegt werden. Bemerkenswert und im Einklang mit dem Krankheitsbild der Patientin ist ein Szintigramm, in welchem nicht nur der Tumor selbst sondern auch resultierende Metastasen in anderem Gewebe markiert waren. Die beschriebenen Befunde wurden in einem Kontrollexperiment durch die Injektion von ^{99m}Techneium-Methylendiphosphonat (^{99m}Tc-MDP) verifiziert. Diese Substanz wird bevorzugt von knochenbildenden Zellen aufgenommen und routinemäßig als Radiopharmakon in der Skelettszintigrafie eingesetzt. Die Gabe von Verbindung **136** an eine kreisfreie Testperson führte nicht zu einer radioaktiven Anreicherung im Brustgewebe. In gesunden Gewebe und anderen Organen war lediglich eine

Hintergrundstrahlung detektierbar. Insgesamt belegen diese Untersuchungsergebnisse das beachtliche Potential Y1R-selektiver Konjugate für den Substanztransport in maligne Tumore.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Tubugi-NPY-Konjugat synthetisiert und evaluiert. Das verwendete NPY-Analogon $[K^4(-\beta AC), F^7, L^{17}, P^{34}]$ -NPY (**137**, „CytoPep“, s. Abbildung 5.37) wurde von der Firma *OntoChem* zur Verfügung gestellt. Diese synthetische Substanz ist über gut etablierte Peptidsynthesen in reichlicher Menge zugänglich. Trotz Modifikation der natürlichen Peptidsequenz bleibt die Affinität zum Rezeptor Y1R erhalten. Darüber hinaus führt die strukturelle Anpassung zu einer reduzierten Aktivität gegenüber dem Subtyp Y2R (s. Abbildung 5.36).

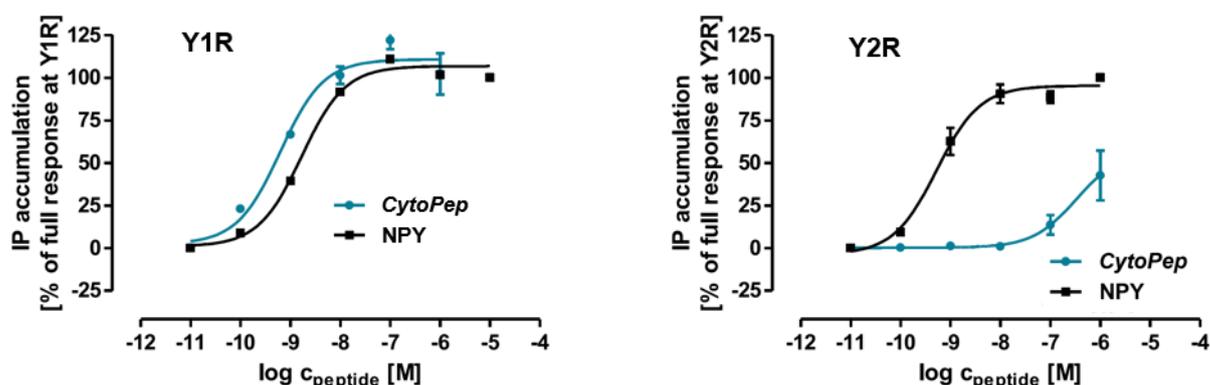


Abbildung 5.36 Rezeptoraktivierung (Y1R und Y2R) von „CytoPep“ (**137**) *in vitro*.^a

Erste *in vivo*-Versuche mittels weiblicher NMRI-Nacktmäuse ergaben keine Hinweise auf gefährliche systemische Nebenwirkungen von „CytoPep“: Bei insgesamt sechsmaliger Verabreichung der Substanz über einen Zeitraum von zwei Wochen wurde bei den Tieren kein Gewichtsverlust registriert.

Zum Aufbau des Konjugats wurde die Verbindung zur zytostatischen Komponente, dem Tubugi **1**, über die freie Thiofunktion des β -Alanin-Cystein-Linkers am Lys⁴ realisiert. Dazu wurden äquimolare Mengen von „CytoPep“ und dem aktivierten Tubugi-SSPy **101** für 1.5 Stunden in einer luft- und feuchtigkeitsfreien Atmosphäre umgesetzt (s. Abbildung 5.37). Das gewünschte Tubugi-NPY-Konjugat **138** mit spaltbarer Disulfidbrücke wurde über RP-HPLC isoliert und die Reinheit der Substanz anhand analytischer HPLC belegt.

^a Diagramme zur Verfügung gestellt von Firma *OntoChem*

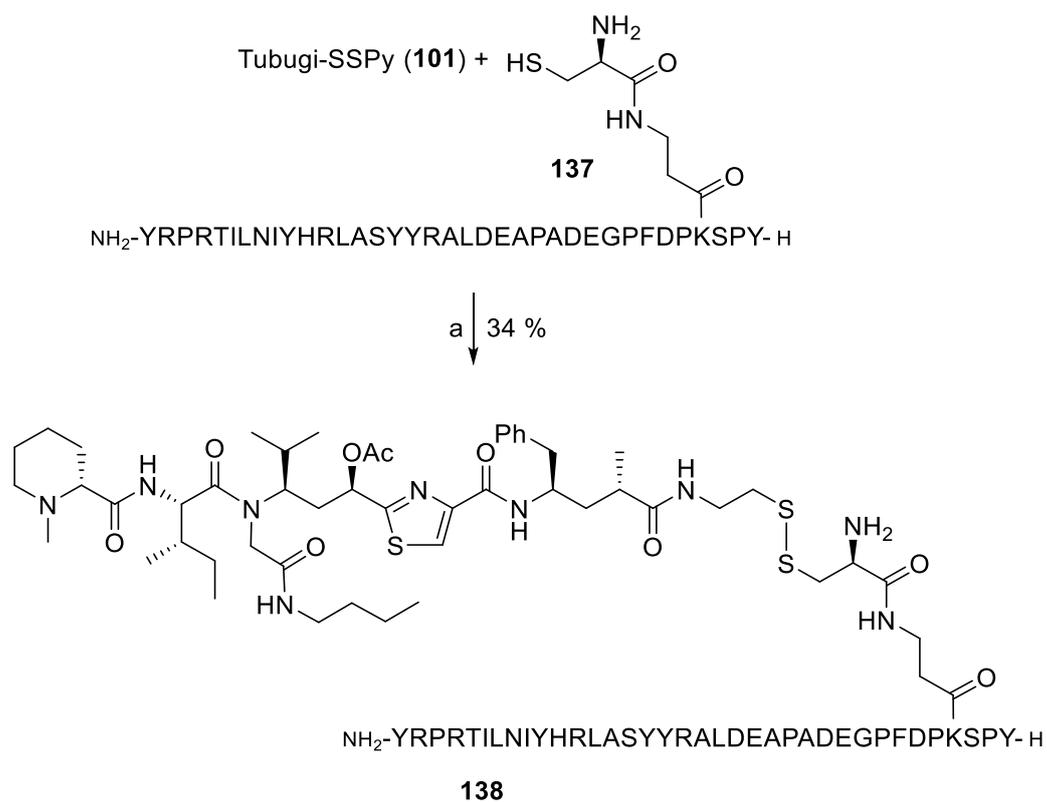


Abbildung 5.37 Synthese des Tubugi-NPY-Konjugats **138**. a) MeOH, N_2 -Atmosphäre, 34 %.

Die Verbindung wurde durch ESI-FTICR-MS-Messungen (s. Tabelle 5.3) charakterisiert. Alle Signale für $[\text{M}+\text{nH}]^{\text{n}+}$ mit n zwischen 4 und 8 konnten identifiziert werden.

Tabelle 5.3 ESI-FTICR-MS des Tubugi-NPY-Konjugats 138 (Dekonvolution des monoisotopischen Peaks). $C_{246}H_{368}N_{62}O_{64}S_3$; $H^+ = 1.0073$.

| m/z (gemessen) | m/z (berechnet) | Fehler [ppm] | $[M+nH]^{n+}$ | A ($m/z_{(gemessen)} \times n$) | $A-nH^+$ |
|-------------------|--------------------|-----------------|---------------|--------------------------------------|-----------|
| 664.8340 | 664.8399 | 0.1 | $[M+8H]^{8+}$ | 5318.6720 | 5310.6136 |
| 759.6726 | 759.6731 | 0.7 | $[M+7H]^{7+}$ | 5317.7082 | 5310.6571 |
| 886.1181 | 886.1174 | 0.8 | $[M+6H]^{6+}$ | 5316.7086 | 5310.6648 |
| 1063.1411 | 1063.1395 | 1.5 | $[M+5H]^{5+}$ | 5315.7055 | 5310.6690 |
| 1328.6740 | 1328.6725 | 1.1 | $[M+4H]^{4+}$ | 5314.7096 | 5310.6804 |
| Mittelwert: | | | | | 5310.657 |
| Berechnet: | | | | | 5310.661 |

5.3.8 Die biologische Aktivität der synthetisierten Konjugate und des Spaltprodukts Tubugi-SH

Erste Zelltests mit den synthetisierten Konjugaten wurden sowohl im eigenen Arbeitskreis (s. Tabelle 5.4) als auch durch die Firma *Ontochem* (s. Tabelle 5.5) durchgeführt. Diese Untersuchungen sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, erlauben jedoch erste Aussagen zum Potential des vorgestellten Targeting-Konzepts und werden daher im Folgenden kurz zusammengefasst.

In Abschnitt 5.1 ist beschrieben, dass Wirkstoffe mit einer Zytotoxizität im Bereich der Tubulysine und Tubugis auch bedeutende Auswirkungen auf gesunde Zellen und somit erhebliche Nebenwirkungen erwarten lassen. Einen wesentlichen Aspekt des vorliegenden Konzepts stellt daher die deutliche Aktivitätsreduktion im Fall der intakten Konjugate vor Bruch der Disulfidbrücke dar. Tabelle 5.4 zeigt die Aktivitäten der spaltbaren Tubugi-Konjugate mit Norspermidin **113**, Cholsäure **135** und Neuropeptid Y **138** in Versuchen mit drei Krebszelllinien. Im Vergleich zu natürlichem Tubulysin A und den Tubugis 1 bis 3 (vgl. Tabelle 3.1) ist die Aktivität der getesteten Konjugate um bis zu Faktor 1000 (PC-3) bzw. sogar Faktor 1500 (HT-29) herabgesetzt.

Tabelle 5.4 Aktivitäten der Konjugate **113**, **135**, **138** und von Tubugi-SH **139** gegen verschiedene Krebszelllinien.^a

| Verbindung | Zelllinie; IC ₅₀ [nM] | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|
| | HT-29 ^b | PC-3 ^c | Colo 320 ^d |
| Tubugi-SS-Norspermidin 113 | 176 ± 21 | 102 ± 19 | 613 ± 92 |
| Tubugi-SS-Cholsäure 135 | 268 ± 91 | 141 ± 52 | 23810 ± 183 |
| Tubugi-SS-NPY 138 | 452 ± 60 | 205 ± 49 | 706 ± 185 |
| Tubugi-SH 139 | 60 ± 6 | 41 ± 8 | 556 ± 77 |

Nach Anreicherung des jeweiligen Konjugats im Zielgewebe soll durch Spaltung der Disulfidbrücke der *warhead* Tubugi-SH **139** freigesetzt werden. Synthetisch ist diese Verbindung beispielsweise durch Reduktion von Tubugi-SSPy **101** mit DTT zugänglich (s. Abbildung 5.38).

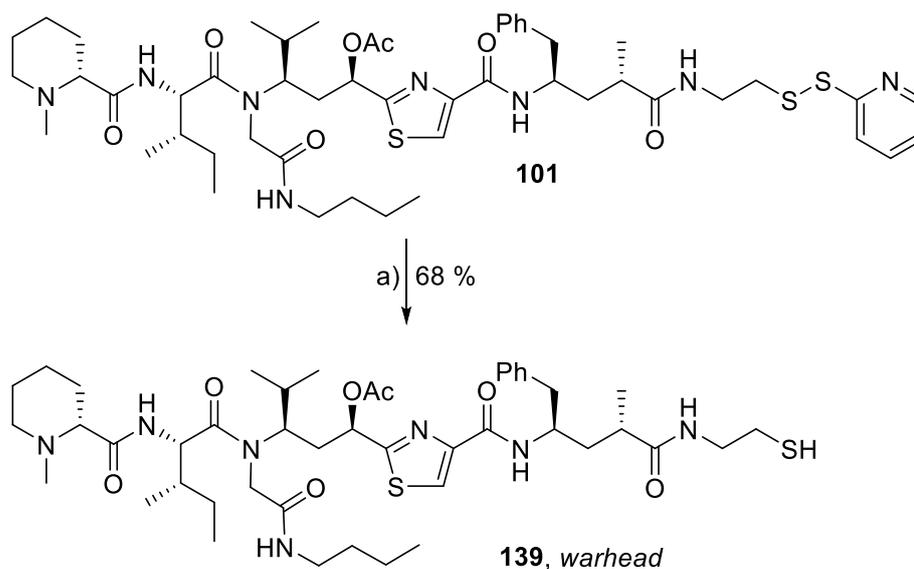


Abbildung 5.38 Synthese des *warheads* Tubugi-SH **139**. a) DTT, K₂CO₃, ACN/H₂O, 68 %.

Die Wirkung dieser Substanz auf das zu behandelnde Tumorgewebe ist von entscheidender Bedeutung. Erste biologische Untersuchungen (s. Tabelle 5.4) zeigen, dass Verbindung **139** unter den gewählten Bedingungen nicht im extremen

^a Durchgeführt im eigenen Arbeitskreis von G. Kaluderovic bzw. A. Ehrlich

^b Humane Darmkrebszelllinie

^c Humane Prostatakrebszelllinie

^d Humane Darmkrebszelllinie

Aktivitätsbereich von beispielsweise natürlichem Tubulysin A liegt, jedoch durchaus im akzeptablen Rahmen, um das Potential der dargestellten Konjugate genauer zu beleuchten und den vorgestellten Konjugationsansatz intensiv weiterzuverfolgen.

Fortführende Untersuchungen der Firma *OntoChem* zielen auf die Wirkung des NPY-Konjugats **138** auf Zellen mit unterschiedlich stark ausgeprägter Y1R-Expression ab. Die folgenden Zelllinien mit absteigendem Y1R-Expressionslevel (mRNA-Level) wurden dazu herangezogen: SK-N-MC, T-47D, MDA-MB-468, MS-MB-231, 184B5 und HEK293 (Y1R-defizient). Die genannten Zellen wurden unterschiedliche Zeitspannen mit dem zu testenden Konjugat **138** inkubiert. Die ermittelten IC₅₀-Werte liegen im Bereich von ähnlichen, von *OntoChem* untersuchten NPY-Wirkstoffkonjugaten. Das hier vorgestellte Konjugat **138** zeigt bei den getesteten Zelllinien eine antiproliferative Aktivität im tiefen mikromolaren bis hohen nanomolaren Bereich (s. Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5 Aktivität des Tubugi-NPY-Konjugats 138 gegen Zelllinien mit unterschiedlichen Y1R-Expressionsleveln.^a

| Zelllinie | Y1R-Expression | IC ₅₀ [µM] (6 h initiale Inkubation) | IC ₅₀ [µM] (72 h initiale Inkubation) |
|------------|----------------|---|--|
| SK-N-MC | sehr hoch | 1.07 | 0.18 |
| T-47D | hoch | ≈ 7 | 1.70 |
| MDA-MB-468 | moderat | 1.58 | 0.47 |
| MS-MB-231 | gering | 5.46 | 1.02 |
| 184B5 | sehr gering | ≈ 10 | 1.0 |
| HEK293 | keine | ≈ 6 | 0.65 |

Zwischen den ermittelten Aktivitäten und der Präsenz des Rezeptorsubtyps Y1R der unterschiedlichen Zelllinien ist eine Tendenz zu erkennen: Für die Zelllinie von SK-N-MC ergibt sich nach einer initialen Inkubation mit dem Konjugat für sechs

^a Durchgeführt von Firma *OntoChem*

Stunden mit einem IC₅₀-Wert von rund 1.1 µM eine circa sechsmal so hohe Aktivität wie gegen die Y1R-freien HEK293-Zellen. Das Rezeptorvorkommen in MDA-MB-468 ist niedriger als in SK-N-MC und auch die Wirksamkeit der untersuchten Substanz nimmt entsprechend leicht ab. Dennoch ist auch in diesem Fall die Aktivität noch um ein vielfaches höher als gegen die rezeptorfreie Vergleichszelllinie (rund Faktor 4). Das Ergebnis der Untersuchungen mittels der Zelllinie T-47D stellt eine Ausnahme dar: Trotz hoher Y1R-Expression zeigt das NPY-Konjugat nur eine geringe Aktivität. Die Rationale dafür ist bisher unklar, jedoch steht diese relative Resistenz im Einklang mit früheren von *OntoChem* durchgeführten Untersuchungen.^a Eine vergleichbare Tendenz zeigt sich auch bei längerer Inkubation der Zelllinien mit der zu untersuchenden Substanz, jedoch laufen die Messwerte nach 72-stündiger Inkubation stark zusammen. Auch diese Beobachtung deckt sich mit früheren Ergebnissen und wird auf einen Integritätsverlust der getesteten Peptid-Wirkstoff-Konjugate unter den gegebenen Bedingungen zurückgeführt.^b

Insgesamt liefern die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse und somit auch einen ersten Beitrag zur biologischen Validierung des entwickelten Konjugationsansatzes.

5.4 Experimentelle Daten

5.4.1 Allgemeine Angaben

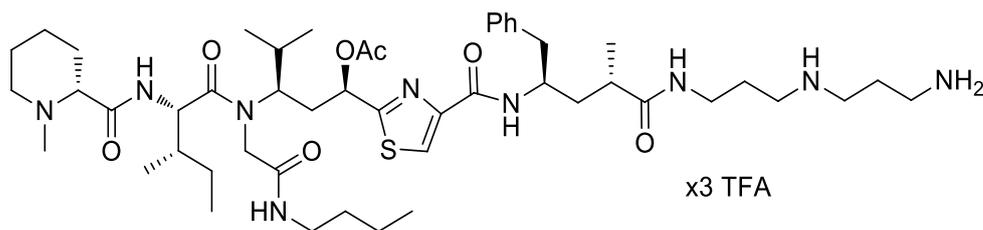
Siehe Abschnitt 2.5.1, Seite 19.

Das Neuropeptid Y-Analogon „CytoPep“ wurde von der Firma *OntoChem* (Halle/Saale) zur Verfügung gestellt.

^a Persönliche Mitteilung von R. Rennert, *OntoChem*

^b Persönliche Mitteilung von R. Rennert, *OntoChem*

5.4.2 Darstellung von Tubugi-Norspermidin-Konjugat **91** (TFA-Salz)



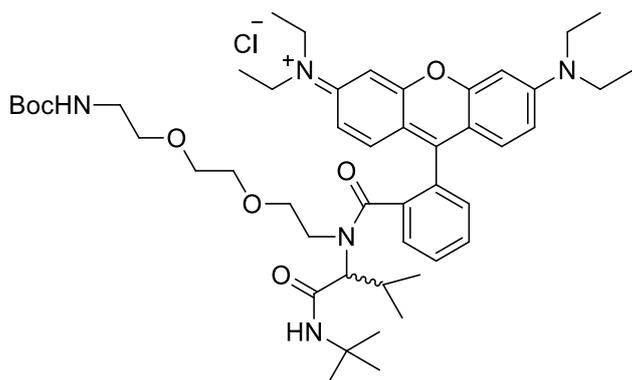
Zu einer Lösung von Tubugi 1 (**41**) (15.0 mg, 18.1 μmol , 1.0 Äq.) in trockenem DCM (1 mL) werden EDC·HCl (13.9 mg, 73.4 μmol , 4.0 Äq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (8.4 mg, 73.4 μmol , 4.0 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, mit DCM (9 mL) verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wird in trockenem DCM (1 mL) gelöst und Norspermidin (5.1 μL , 36.2 μmol , 2.0 Äq.) wird zugegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufarbeitung des Rückstands mittels RP-HPLC (150 mm x 10 mm YMC ODS-A, (MeOH(A):H₂O(B)) + 0.1 % TFA, grad. 20 % A > 40 min > 100 % A (10 min), 6 mL/min, 220 nm) liefert Verbindung **91** mit einer Ausbeute von 2.1 mg (9 % über zwei Stufen) als weißen Feststoff.

$t_{\text{R}} = 26.4$ min.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) $\delta = 8.09$ (s, 1H), 7.31 – 7.23 (m, 5H), 6.36 – 6.30 (m, 1H), 4.72 – 4.60 (m, 1H), 4.25 – 4.09 (m, 1H), 3.90 – 3.83 (m, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 3.52 – 3.46 (m, 1H), 3.44 – 3.37 (m, 1H), 3.17 – 3.01 (m, 9H), 2.87 – 2.69 (m, 8H), 2.52 – 2.40 (m, 2H), 2.33 – 2.26 (m, 1H), 2.21 (dd, $J=15.6, 8.0$, 1H), 2.14 – 2.09 (m, 2H), 2.08 – 2.00 (m, 3H), 1.94 (d, $J=12.6$, 2H), 1.88 – 1.75 (m, 7H), 1.64 – 1.56 (m, 3H), 1.49 – 1.43 (m, 2H), 1.36 – 1.27 (m, 5H), 1.12 (d, $J=6.9$, 3H), 1.09 – 1.05 (m, 6H), 1.00 (d, $J=6.8$, 2H), 0.92 – 0.85 (m, 8H), 0.80 ppm (d, $J=6.5$, 2H).

HRMS (ESI) m/z ber. für C₄₉H₈₁N₉O₇S [M+2H]²⁺ 470.8063, gef. 470.8057.

5.4.3 Darstellung von Rhodamin-Ugi-Produkt **99**



Zu einer Lösung von *N*-Boc-1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan^[110] (250 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (1.5 mL) wird Isobutanal (91.3 μ L, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Nach 2 Stunden werden Rhodamin B (479 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) und *t*-Butylisonitril (113.1 μ L, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird auf eine Kieselgelsäure gegeben und intensiv mit Aceton gewaschen. Der Säulenkopf wird entnommen, 10 Minuten mit MeOH (50 mL) extrahiert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 10:1) des Rückstands liefert Verbindung **99** mit einer Ausbeute von 490 mg (57 %) als purpurfarbenen Feststoff.

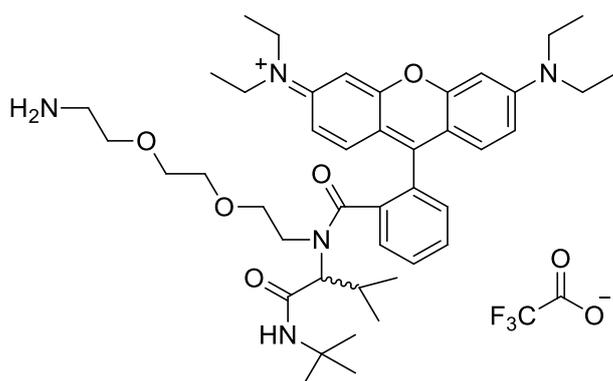
$R_f = 0.42$ (DCM:MeOH 10:1).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) $\delta = 7.83 - 7.80$ (m, 1H), $7.79 - 7.72$ (m, 2H), $7.52 - 7.43$ (m, 2H), $7.35 - 7.26$ (m, 2H), $7.12 - 7.04$ (m, 2H), $7.00 - 6.94$ (m, 2H), $3.75 - 3.64$ (m, 9H), $3.62 - 3.48$ (m, 8H), $3.45 - 3.36$ (m, 1H), $3.26 - 3.21$ (m, 2H), $2.25 - 2.18$ (m, 1H), 1.42 (s, 9H), $1.34 - 1.27$ (m, 12H), 1.15 (s, 9H), 0.80 (d, $J=6.5$, 3H), 0.47 ppm (d, $J=6.1$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CD_3OD) $\delta = 172.70, 171.37, 159.34, 159.29, 158.40, 157.31, 156.63, 137.33, 133.71, 133.52, 131.28, 131.23, 130.89, 129.99, 115.46, 115.28, 115.04, 114.98, 97.34, 97.23, 80.08, 71.37, 71.32, 71.05, 69.33, 51.95, 46.89, 41.30, 28.78, 28.75, 28.36, 20.10, 18.99, 12.84$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{48}\text{H}_{70}\text{N}_5\text{O}_7$ $[\text{M}]^+$ 828.5270, gef. 828.5242.

5.4.4 Darstellung von Rhodamin-Peptoid 100 (TFA-Salz)



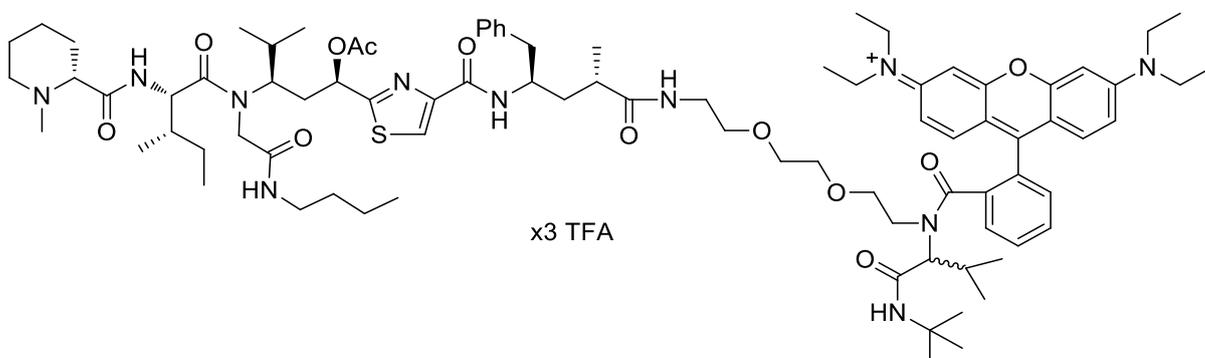
Eine Mischung aus DCM und Trifluoressigsäure (20:1, 630 μL .) wird zu Verbindung **99** (50 mg, 58 μmol) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, mit Toluol (1 mL) verdünnt und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird ohne Aufarbeitung im nächsten Schritt eingesetzt.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 7.79 – 7.72 (m, 3H), 7.51 – 7.45 (m, 1H), 7.32 – 7.24 (m, 2H), 7.12 – 7.03 (m, 2H), 6.97 (d, $J=3.5$, 2H), 3.79 – 3.50 (m, 18H), 3.44 – 3.26 (m, 4H), 3.18 – 3.11 (m, 2H), 2.30 – 2.16 (m, 1H), 1.37 – 1.25 (m, 14H), 1.17 (s, 9H), 0.80 (d, $J=6.4$, 3H), 0.48 ppm (d, $J=6.2$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 172.62, 171.35, 159.29, 159.26, 157.31, 157.26, 156.46, 137.26, 133.64, 133.33, 131.41, 131.32, 131.16, 130.97, 129.57, 115.40, 115.25, 115.02, 114.91, 97.39, 97.24, 71.49, 71.12, 69.61, 67.87, 51.84, 46.89, 40.58, 28.69, 28.35, 20.01, 18.97, 12.81 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}]^+$ 728.4745, gef. 728.4742.

5.4.5 Darstellung von Tubugi-Rhodamin-Konjugat 92



Zu einer Lösung von Tubugi 1 (**41**) (4.3 mg, 5.0 μmol , 1.0 \AA q.) in trockenem DMF (300 μL) werden bei 0 $^\circ\text{C}$ HOAt (0.6 M in DMF, 9.4 μL , 5.5 μmol , 1.1 \AA q.), HATU (2.2 mg, 5.5 μmol , 1.1 \AA q.) und Rhodamin-Peptoid **100** (4.0 mg, 5.0 μmol , 1.0 \AA q.)

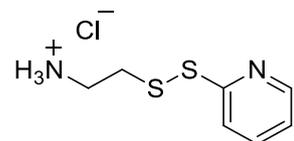
gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufarbeitung des Rückstands mittels RP-HPLC (150 mm x 4.6 mm YMC ODS-A, (ACN(A):H₂O(B)) + 0.1 % TFA, grd. 2 % A > 40 min > 100 % A (5 min), 0.8 mL/min, 220 nm) liefert Verbindung **92** mit einer Ausbeute von 0.96 mg (10 %) als purpurfarbenen Feststoff.

$t_R = 30.4$ min.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) $\delta = 8.06$ (s, 1H), 7.83 – 7.67 (m, 3H), 7.52 – 7.42 (m, 2H), 7.32 – 7.23 (m, 2H), 7.17 – 7.11 (m, 1H), 7.09 – 7.02 (m, 2H), 6.99 – 6.93 (m, 2H), 6.31 (d, $J=11.2$, 1H), 5.34 (t, $J=4.7$, 1H), 4.71 – 4.65 (m, 1H), 4.63 – 4.56 (m, 1H), 4.44 (d, $J=8.5$, 1H), 4.32 – 4.23 (m, 1H), 3.88 – 3.83 (m, 1H), 3.76 – 3.62 (m, 12H), 3.61 – 3.46 (m, 12H), 3.45 – 3.39 (m, 3H), 3.20 – 3.15 (m, 1H), 3.14 – 3.02 (m, 2H), 2.92 – 2.81 (m, 3H), 2.79 (s, 3H), 2.50 – 2.40 (m, 1H), 2.24 – 2.17 (m, 3H), 2.07 – 1.99 (m, 3H), 1.99 – 1.85 (m, 7H), 1.85 – 1.71 (m, 4H), 1.64 – 1.52 (m, 7H), 1.49 – 1.39 (m, 4H), 1.18 – 1.11 (m, 14H), 1.10 – 1.05 (m, 7H), 1.00 (d, $J=6.8$, 3H), 0.93 – 0.82 (m, 11H), 0.82 – 0.75 ppm (m, 6H).

HRMS (ESI) m/z ber. für C₈₆H₁₂₆N₁₁O₁₂S [M+H]²⁺ 768.9688, gef. 768.9688.

5.4.6 Darstellung von S-(2-Pyridylthio)-cysteamin-Hydrochlorid (**102**)^[72]



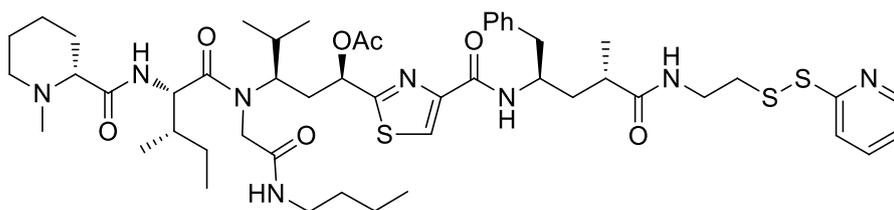
Zu einer Lösung von Cysteamin-Hydrochlorid (516 mg, 4.5 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (10 mL) wird 2,2'-Dithiopyridin (1.1 g, 5.0 mmol, 1.1 Äq.) tropfenweise zugegeben. Der Reaktionsansatz wird für 90 Minuten gerührt und das Lösungsmittel wird bei 30 °C unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 10:1) des Rückstands liefert Verbindung **102** mit einer Ausbeute von 493 mg (49 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.18$ (DCM:MeOH 10:1).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) $\delta = 8.51$ – 8.48 (m, 1H), 7.82 – 7.77 (m, 1H), 7.71 – 7.68 (m, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 3.19 (d, $J=6.0$, 2H), 3.06 ppm (d, $J=6.0$, 2H).

HRMS (ESI) m/z ber. für C₇H₁₁N₂S₂ [M]⁺ 187.0358, gef. 187.0356.

5.4.7 Darstellung von Tubugi-SSPy 101



Zu einer Lösung von Verbindung **65** (80 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) in THF/H₂O (1 mL/0.5 mL) wird bei 0 °C Lithiumhydroxid-Monohydrat (21.0 mg, 0.5 mmol, 5.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in H₂O (2.5 mL) aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit EtOAc (5x 2 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Zu einer Lösung des so erhaltenen Rückstands in trockenem Pyridin (1 mL) wird bei 0 °C Essigsäureanhydrid (75 µL, 0.8 mmol, 8 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0 °C gekühlt. Eine Mischung von Dioxan/H₂O (1 mL/1 mL) wird zugegeben. Die Mischung wird über Nacht gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand und HBTU (41.7 mg, 0.11 mmol, 1.1 Äq.) werden in DMF (4 mL) gelöst und bei 0 °C und unter Stickstoffatmosphäre tropfenweise zu einer Lösung von Verbindung **102** (42.8 mg, 0.2 mmol, 2.0 Äq) und DIPEA (94.0 µL, 0.55 mmol, 5.5 Äq.) in trockenem MeOH (4 mL) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 2 Stunden gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 10:1 → 50:1) des Rückstands liefert Verbindung **101** mit einer Ausbeute von 41 mg (42 % über drei Stufen) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.48$ (DCM:MeOH 10:1).

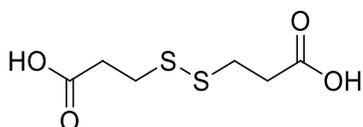
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) $\delta = 8.39 - 8.36$ (m, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.84 - 7.75 (m, 3H), 7.20 - 7.18 (m, 5H), 6.35 (d, $J=9.8$, 1H), 4.79 - 4.73 (m, 1H), 4.64 - 4.55 (m, 2H), 4.45 - 4.38 (m, 1H), 4.32 - 4.24 (m, 1H), 3.80 - 3.72 (m, 1H), 3.58 - 3.49 (m, 1H), 3.44 - 3.36 (m, 1H), 3.25 (d, $J=7.0$, 1H), 3.18 - 3.06 (m, 2H), 2.97 - 2.90 (m, 3H), 2.85 (dd, $J=11.3, 7.0$, 2H), 2.59 - 2.52 (m, 1H), 2.49 - 2.42 (m, 1H), 2.32 - 2.24 (m, 1H), 1.80 -

1.71 (m, 3H), 1.66 – 1.53 (m, 6H), 1.48 – 1.41 (m, 2H), 1.33 – 1.27 (m, 5H), 1.12 – 1.04 (m, 8H), 0.97 (d, $J=6.7$, 4H), 0.91 – 0.82 (m, 9H), 0.76 ppm (t, $J=5.9$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 178.68, 175.79, 172.08, 171.83, 171.17, 163.18, 161.20, 150.56, 150.41, 139.53, 139.12, 130.42, 129.31, 127.36, 125.28, 122.90, 122.38, 121.32, 71.41, 70.35, 56.67, 54.94, 50.79, 44.73, 44.58, 42.63, 40.54, 39.86, 39.29, 39.05, 38.96, 37.20, 36.66, 32.60, 31.63, 31.13, 26.20, 25.65, 24.33, 21.11, 20.94, 20.90, 20.12, 19.10, 16.37, 14.12, 10.69 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{50}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}_3$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 498.2494, gef. 498.2493.

5.4.8 Darstellung von Disulfid **105**^[72]



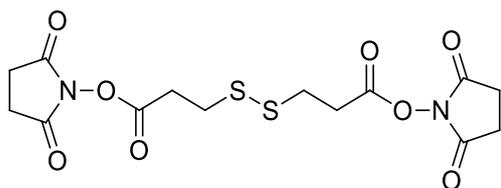
Zu einer Lösung von 3-Mercaptopropansäure (2.13 g, 20.0 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (100 mL) werden Natriumhydroxid (0.8 g, 20.0 mmol, 1.0 Äq.) und Kaliumiodid (1.0 g, 6 mmol, 0.3 Äq.) gegeben. Iod wird portionsweise zugegeben bis die Lösung gelb bleibt. Anschließend wird Natriumsulfit zugegeben bis die Reaktionslösung farblos ist. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wird in H_2O (20 mL) aufgenommen. Die Mischung wird mittels konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit EtOAc (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Et_2O (60 mL) gewaschen. Verbindung **105** wird mit einer Ausbeute von 2.0 g (95 %) als weißer Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

R_f = 0.47 (EtOAc).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ = 4.93 (s, 2H), 2.96 – 2.87 (m, 4H), 2.75 – 2.67 ppm (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ = 175.32, 34.70, 34.24 ppm.

5.4.9 Darstellung von Disulfid **104**^[72]



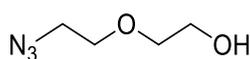
Zu einer Lösung von Verbindung **105** (1.0 g, 4.8 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (50 mL) werden bei 0 °C DCC (2.2 g, 10.5 mmol, 2.2 Äq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (1.2 g, 10.5 mmol, 2.2 Äq.) gegeben. Das Kühlbad wird entfernt, der Reaktionsansatz wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in MeOH (30 mL) aufgenommen. Die Mischung wird filtriert und der Filterkuchen mit MeOH gewaschen. Der Rückstand wird unter vermindertem Druck getrocknet. Verbindung **104** wird mit einer Ausbeute von 1.7 g (89 %) als weißer Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 3.16 – 3.07 (m, 4H), 3.07 – 2.99 (m, 4H), 2.81 ppm (s, 8H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 170.08, 167.51, 31.85, 30.29, 25.44 ppm.

MS (ESI) *m/z* ber. für C₁₄H₁₆N₂O₈S₂ [M+Na]⁺ 427.0, gef. 427.4.

5.4.10 Darstellung von 2-(2-Azidoethoxy)ethanol (**107**)^[111]



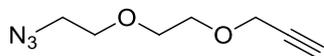
Zu einer Lösung von 2-(2-Chlorethoxy)ethanol (2.0 g, 16.1 mmol, 1.0 Äq.) in H₂O (10 mL) wird Natriumazid (2.6 g, 40.3 mmol, 2.5 Äq.) gegeben und der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 110 °C unter Rückfluss gerührt. Die Mischung wird auf Raumtemperatur gekühlt und nach Zugabe einer 5 %igen Natriumhydroxid-Lösung (15 mL) wird mit Et₂O (4x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Verbindung **107** wird mit einer Ausbeute von 1.1 g (52 %) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.78 – 3.72 (m, 2H), 3.70 (t, *J*=5.2, 2H), 3.61 (d, *J*=5.8, 2H), 3.42 (t, *J*=5.2, 2H), 2.71 ppm (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 72.29, 69.77, 61.47, 50.52$ ppm.

MS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 154.1, gef. 154.4.

5.4.11 Darstellung von 3-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)propin (**108**)^[82]



Zu einer Lösung von Verbindung **107** (500 mg, 3.82 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (17 mL) werden bei 0 °C langsam Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 305 mg, 7.63 mmol, 2.0 Äq.) und 3-Brompropin (80 % in Toluol, 840 mg, 5.73 mmol, 1.5 Äq.) gegeben. Nach 10 Minuten wird das Kühlbad entfernt. Die Reaktionslösung wird für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit H_2O (5 mL) gequenchet und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Eine Lösung des so erhaltenen Rückstands in gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (50 mL) wird mit Et_2O (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM) des Rückstands liefert Verbindung **108** mit einer Ausbeute von 595 mg (92 %) als braunes Öl.

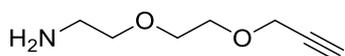
$R_f = 0.19$ (DCM).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 4.22$ (d, $J=2.4$, 2H), 3.74 – 3.67 (m, 6H), 3.41 (t, $J=5.1$, 2H), 2.44 ppm (t, $J=2.4$, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 79.50, 74.54, 70.45, 70.01, 69.12, 58.44, 50.63$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ 361.1595, gef. 361.1593.

5.4.12 Darstellung von 3-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)propin (**109**)^[82]



Zu einer Lösung von Verbindung **108** (595 mg, 3.52 mmol, 1.0 Äq.) in THF (9 mL) werden Triphenylphosphan (1.1 g, 4.22 mmol, 1.2 Äq.) und H_2O (76 μL , 4.22 mmol, 1.2 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und die Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 9:1 \rightarrow DCM:MeOH:Et₃N 9:1:1) des Rückstands liefert Verbindung **109** mit einer Ausbeute von 362 mg (72 %) als braunes Öl.

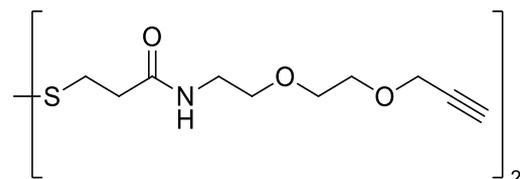
$R_f = 0.27$ (DCM:MeOH:Et₃N 90:10:1).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.22 (d, $J=2.4$, 2H), 3.74 – 3.69 (m, 2H), 3.69 – 3.63 (m, 2H), 3.52 (t, $J=5.2$, 2H), 2.88 (t, $J=5.2$, 2H), 2.44 (t, $J=2.4$, 1H), 1.58 ppm (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ = 79.53, 74.50, 73.35, 70.05, 69.02, 58.35, 41.69 ppm.

MS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 144.1, gef. 144.0.

5.4.13 Darstellung von Disulfid **110**



Zu einer Lösung von NHS-Ester **104** (233 mg, 1.2 mmol, 0.5 Äq.) in trockenem DMF (11 mL) wird Alkin **109** (165 mg, 2.3 mmol, 1.0 Äq.) portionsweise zugegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 9:1) des Rückstands liefert Verbindung **110** mit einer Ausbeute von 239 mg (86 %) als leicht gelben Feststoff.

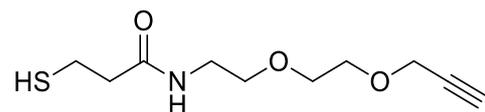
R_f = 0.52 (DCM:MeOH 10:1).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 4.20 (d, $J=2.4$, 4H), 3.70 – 3.66 (m, 4H), 3.64 – 3.61 (m, 4H), 3.54 (t, $J=5.5$, 4H), 3.37 (t, $J=5.5$, 4H), 2.95 (t, $J=7.1$, 4H), 2.86 (t, $J=2.4$, 2H), 2.61 ppm (t, $J=7.1$, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 173.78, 80.51, 76.06, 71.06, 70.54, 70.18, 59.11, 40.43, 36.43, 35.10 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 483.1594, gef. 483.1591.

5.4.14 Darstellung von Thiol **111**



Zu einer Lösung von Verbindung **110** (50.0 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) in ACN/ H_2O (1 mL/1 mL) werden Kaliumcarbonat-Lösung (0.2 M, 500 μL) und DTT (33.5 mg, 0.22 mmol, 2.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 30 Minuten gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der so erhaltene

Rückstand wird in MeOH (8 mL) aufgenommen, mittels Spritzenfilter filtriert und erneut unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 40:1) des Rückstands liefert Verbindung **111** mit einer Ausbeute von 30 mg (59 %) als weißen Feststoff. Die Substanz wird direkt weiter umgesetzt.

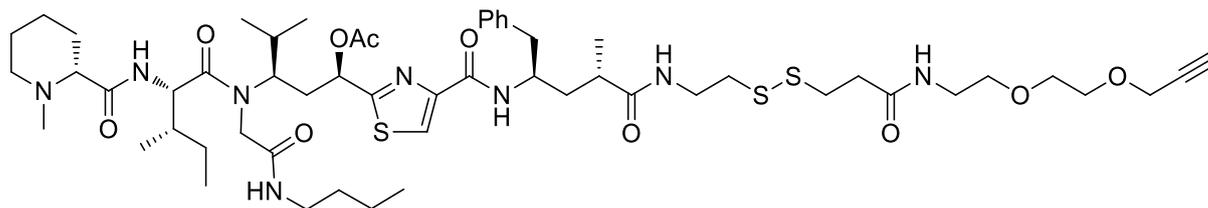
$R_f = 0.24$ (DCM:MeOH 40:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 4.19$ (d, $J=2.4$, 2H), 3.70 – 3.65 (m, 2H), 3.65 – 3.60 (m, 2H), 3.54 (t, $J=5.5$, 2H), 3.37 (t, $J=5.4$, 2H), 2.88 – 2.84 (m, 1H), 2.74 (t, $J=7.0$, 2H), 2.63 (d, $J=6.2$, 1H), 2.50 ppm (t, $J=6.8$, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 173.88$, 80.48, 76.03, 71.04, 70.56, 70.15, 59.09, 40.99, 40.34, 21.08 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 254.0821, gef. 254.0820.

5.4.15 Darstellung von Click-Tubugi **112**



Zu einer Lösung von frisch hergestelltem Thiol **111** (1.5 mg, 6.5 μmol , 1.2 Äq.) in trockenem MeOH (100 μL) wird Tubugi-SSPy **101** (5.4 mg, 5.4 μmol , 1.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Stickstoffstrom entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 40:1 \rightarrow 30:1) des Rückstands liefert Verbindung **112** mit einer Ausbeute von 2.1 mg (35 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.42$ (DCM:MeOH 10:1).

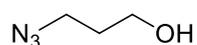
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) $\delta = 8.08$ (s, 1H), 7.21 – 7.19 (m, 3H), 7.17 – 7.11 (m, 2H), 6.37 – 6.33 (m, 1H), 4.81 – 4.73 (m, 1H), 4.64 – 4.56 (m, 1H), 4.44 – 4.38 (m, 1H), 4.32 – 4.26 (m, 1H), 4.22 – 4.16 (m, 2H), 3.81 – 3.72 (m, 1H), 3.69 – 3.59 (m, 6H), 3.59 – 3.49 (m, 4H), 3.43 – 3.33 (m, 3H), 3.16 – 3.08 (m, 1H), 2.99 – 2.91 (m, 3H), 2.89 – 2.79 (m, 5H), 2.65 – 2.57 (m, 1H), 2.53 – 2.42 (m, 2H), 2.32 – 2.25 (m, 1H), 2.20 (d, $J=10.4$, 2H), 2.15 (s, 2H), 2.06 – 1.85 (m, 2H), 1.80 – 1.51 (m, 6H), 1.48 –

1.40 (m, 1H), 1.34 – 1.26 (m, 12H), 1.11 – 1.05 (m, 5H), 0.97 (d, $J=6.7$, 2H), 0.90 – 0.84 (m, 7H), 0.80 – 0.74 ppm (m, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ = 178.71, 175.80, 173.84, 172.15, 171.86, 171.21, 171.16, 163.26, 150.60, 139.60, 130.50, 129.38, 127.43, 125.38, 80.56, 76.13, 71.12, 70.60, 70.21, 59.16, 42.66, 40.59, 40.48, 40.02, 39.57, 38.94, 38.57, 37.47, 37.23, 36.70, 35.26, 32.66, 31.85, 31.65, 31.60, 31.22, 31.17, 30.80, 26.15, 24.29, 21.16, 21.00, 20.95, 20.17, 20.14, 19.17, 16.49, 16.41, 14.19, 10.79, 10.74 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{86}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1115.5702, gef. 1115.5668.

5.4.16 Darstellung von 3-Azidopropanol (**119**)

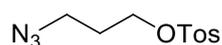


Zu einer Lösung von 3-Bromopropanol (11.4 g, 82.1 mmol, 1.0 Äq.) in H_2O (200 mL) werden Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (557 mg, 1.64 mmol, 0.02 Äq.) sowie Natriumazid (10.7 g, 164.2 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 80 °C gerührt. Die Mischung wird auf Raumtemperatur gekühlt und nach Zugabe eine gesättigte Natriumhydroxid-Lösung (0.2 mL) wird mit Et_2O (4x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt. Verbindung **119** wird mit einer Ausbeute von 7.3 g (88 %) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 3.62 (t, $J=6.4$, 2H), 3.40 (t, $J=6.8$, 2H), 1.81 – 1.72 ppm (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ = 59.73, 48.82, 32.70 ppm.

5.4.17 Darstellung von *p*-Toluolsulfonsäure-(3-azidopropyl)ester (**120**)



Zu einer Lösung von Verbindung **119** (7.2 g, 71.2 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (150 mL) werden bei 0 °C *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (14.9 g, 78.3 mmol, 1.1 Äq.) und DMAP (50.0 mg, 0.41 mmol, 0.006 Äq) gegeben. Pyridin (8.6 mL, 106.8 mmol, 1.5 Äq.) wird tropfenweise zugesetzt und das Kühlbad anschließend entfernt. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und H_2O (150 mL) wird zugegeben. Nach 10 Minuten werden die Phasen getrennt und die organische Phase

wird mit Salzsäure (2 M, 150 mL), H₂O (150 mL), erneut Salzsäure (2 M, 150 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (150 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (150 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Verbindung **120** wird mit einer Ausbeute von 10.2 g (56 %) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

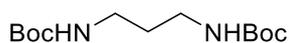
$R_f = 0.25$ (*n*-Hexan:EtOAc 4:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.84 - 7.75$ (m, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 2H), 4.11 (t, $J=6.0$, 2H), 3.38 (t, $J=6.5$, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.93 – 1.85 ppm (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 145.00, 132.72, 129.90, 127.87, 66.95, 47.25, 28.42, 21.62$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₀H₁₃N₃O₃S [M+Na]⁺ 278.0570, gef. 278.0569.

5.4.18 Darstellung von *N,N'*-Di-Boc-1,3-Diaminopropan (**122**)



Zu einer Lösung von Natriumhydroxid (3.2 g, 79.2 mmol, 3.0 Äq.) in H₂O (280 mL) werden 1,3-Diaminopropan (2.2 mL, 26.4 mmol, 1.0 Äq.) und THF (80 mL) gegeben. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und Di-*tert*-butyldicarbonat (17.6 g, 79.2 mmol, 3.0 Äq.) wird zugegeben. Nach 15 Minuten wird das Kühlbad entfernt. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit Salzsäure (3 M) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit EtOAc (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*n*-Hexan:EtOAc 7:1 → 1:1) des Rückstands liefert Verbindung **122** mit einer Ausbeute von 6.6 g (92 %) als weißen Feststoff.

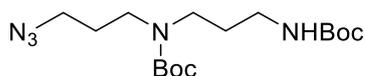
$R_f = 0.49$ (*n*-Hexan:EtOAc 3:7).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 4.91$ (br s, 2H), 3.22 – 3.12 (m, 4H), 1.65 – 1.57 (m, 2H), 1.44 ppm (s, 18H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 156.28, 79.14, 37.27, 30.67, 28.38$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₃H₂₆N₂O₄ [M+Na]⁺ 297.1785, gef. 297.1783.

5.4.19 Darstellung von Azid **123**



Zu einer Lösung von *N,N'*-Di-Boc-1,3-Diaminopropan (**122**, 537 mg, 1.96 mmol, 5.0 Äq.) in trockenem DMF (12 mL) wird unter Stickstoffatmosphäre Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 78 mg, 1.96 mmol, 5.0 Äq.) gegeben. Nach 30 Minuten wird eine Lösung von Verbindung **120** (100 mg, 0.39 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (3 mL) zugegeben. Nach weiteren 5 Minuten werden gesättigte Natriumchlorid-Lösung (50 mL) und H₂O (50 mL) zugegeben. Die Mischung wird auf Raumtemperatur gekühlt und mit DCM (8x 80 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockne eingeeengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 40:1) des Rückstands liefert Verbindung **123** mit einer Ausbeute von 36 mg (26 %) als farbloses Öl.

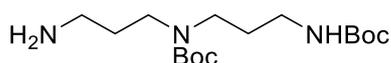
$R_f = 0.75$ (DCM:EtOAc 4:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 3.35 - 3.19$ (m, 6H), 3.16 – 3.06 (m, 2H), 1.85 – 1.76 (m, 2H), 1.72 – 1.62 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.44 ppm (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 155.95, 79.91, 77.19, 50.76, 49.01, 44.34, 28.37$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₆H₃₁N₅O₄ [M+Na]⁺ 380.2268, gef. 380.2265.

5.4.20 Darstellung von *N,N'*-Di-Boc-Norspermidin (**117**)



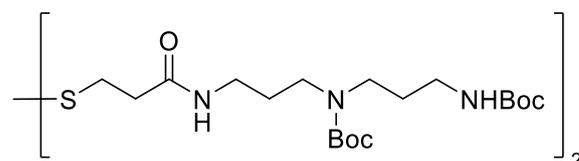
Zu einer Lösung von Verbindung **123** (370 mg, 1.0 mmol) in MeOH (10 mL) wird Pd(OH)₂/C (20 % Pd(OH)₂, 15 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend unter Verwendung von Celite filtriert. Der Filterkuchen wird intensiv mit MeOH gewaschen und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt eingesetzt.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 3.30 - 3.17$ (m, 3H), 3.13 – 3.05 (m, $J=11.0$, 2H), 2.72 – 2.65 (m, 1H), 1.71 – 1.60 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.44 ppm (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 156.01, 155.53, 79.60, 78.82, 77.19, 74.38, 43.89, 43.58, 39.41, 37.33, 32.49, 31.83, 28.79, 28.37$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{16}H_{33}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 332.2544, gef. 332.2539.

5.4.21 Darstellung von Disulfid **124**



Zu einer Lösung von *N,N'*-Di-Boc-Norspermidin (**121**, 305 mg, 0.92 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (11 mL) wird NHS-Ester **104** (186 mg, 0.46 mmol, 0.5 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 10:1) des Rückstands liefert Verbindung **124** mit einer Ausbeute von 293 mg (76 %) als farbloses Öl.

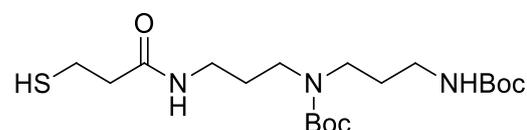
R_f = 0.44 (DCM:MeOH 10:1).

1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ = 3.32 – 3.29 (m, 2H), 3.25 – 3.20 (m, 6H), 3.18 (t, $J=6.9$, 4H), 3.03 (t, $J=6.8$, 4H), 2.99 (s, 2H), 2.95 (t, $J=7.1$, 4H), 2.86 (s, 2H), 2.60 (t, $J=7.1$, 4H), 1.76 – 1.65 (m, 8H), 1.46 (s, 18H), 1.43 ppm (s, 18H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ = 173.55, 164.82, 158.38, 157.38, 81.09, 79.93, 46.19, 45.70, 38.91, 36.94, 36.45, 34.97, 31.64, 28.81, 28.75 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{38}H_{72}N_6O_{10}S_2$ $[M+Na]^+$ 859.4644, gef. 859.4634.

5.4.22 Darstellung von Thiol **125**



Zu einer Lösung von Verbindung **124** (60 mg, 72 μ mol, 1.0 Äq.) in ACN/ H_2O (1 mL/0.5 mL) werden Kaliumcarbonat-Lösung (0.2 M, 500 μ L) und DTT (22 mg, 143 μ mol, 2.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird eine Stunde gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wird in MeOH (3 mL) aufgenommen, mittels Spritzenfilter filtriert und erneut unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 60:1) des Rückstands liefert

Verbindung **125** mit einer Ausbeute von 51 mg (84 %) als weißen Feststoff. Die Substanz wird direkt weiter umgesetzt.

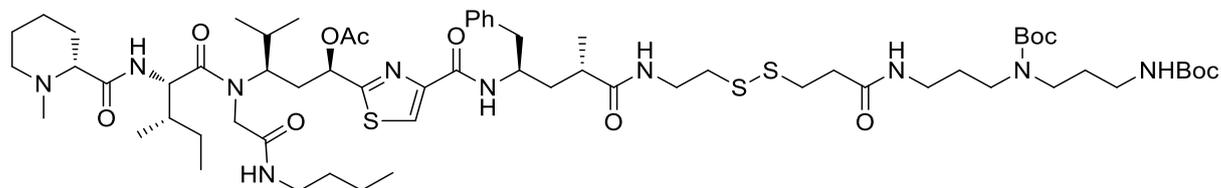
$R_f = 0.75$ (DCM:MeOH 10:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 3.30$ (s, 2H), 3.27 – 3.15 (m, 6H), 3.06 – 2.99 (m, 2H), 2.74 (t, $J=6.7$, 2H), 2.48 (t, $J=6.8$, 2H), 1.78 – 1.64 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.43 ppm (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 173.74, 158.40, 157.41, 81.11, 79.95, 74.99, 54.79, 45.70, 41.06, 38.89, 38.08, 28.78, 28.72, 21.07$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 442.2346, gef. 442.2345.

5.4.23 Darstellung von Tubugi-*N,N'*-Di-Boc-Norspermidin-Konjugat **126**



Zu einer Lösung von frisch hergestelltem Thiol **125** (2.1 mg, 5 μmol , 1.0 Äq.) in trockenem MeOH (74.1 μL) wird Tubugi-SSPy **101** (5.0 mg, 0.5 μmol , 1.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 25 Minuten gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Stickstoffstrom entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 30:1 \rightarrow 20:1) des Rückstands liefert Verbindung **126** mit einer Ausbeute von 3.2 mg (35 %) als weißen Feststoff.

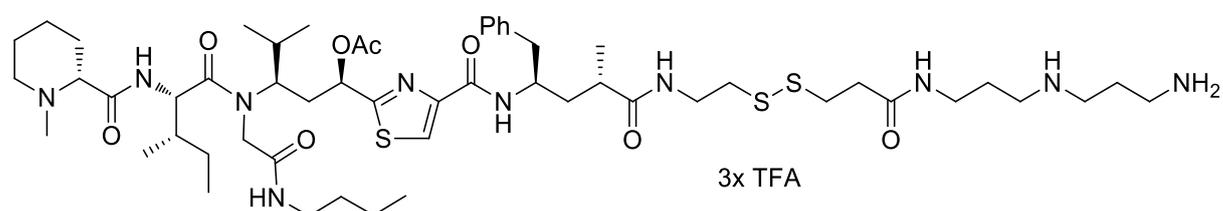
$R_f = 0.65$ (DCM:MeOH 10:1).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) $\delta = 8.07$ (s, 1H), 7.24 – 7.19 (m, 4H), 7.18 – 7.11 (m, 1H), 6.38 – 6.33 (m, 1H), 4.81 – 4.73 (m, 1H), 4.64 – 4.56 (m, 1H), 4.42 (t, $J=9.3$, 1H), 4.32 – 4.24 (m, 1H), 3.81 – 3.74 (m, 1H), 3.57 – 3.51 (m, 1H), 3.43 – 3.37 (m, 1H), 3.28 – 3.24 (m, 1H), 3.24 – 3.18 (m, 4H), 3.18 – 3.09 (m, 3H), 3.02 (t, $J=6.7$, 2H), 2.98 – 2.93 (m, 3H), 2.91 – 2.77 (m, 4H), 2.63 – 2.57 (m, 3H), 2.49 – 2.42 (m, 1H), 2.32 – 2.25 (m, 1H), 2.20 (d, $J=10.5$, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.14 – 2.08 (m, 1H), 2.04 – 1.84 (m, 4H), 1.81 – 1.51 (m, 13H), 1.45 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.37 – 1.27 (m, 8H), 1.11 – 1.05 (m, 6H), 0.99 – 0.96 (m, 3H), 0.91 – 0.84 (m, 7H), 0.78 – 0.74 ppm (m, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) $\delta = 178.65, 175.76, 175.73, 173.63, 171.80, 171.17, 171.13, 163.21, 157.39, 150.57, 139.54, 130.45, 129.33, 127.39, 125.28, 81.11, 79.95, 71.41, 70.30, 56.62, 55.08, 54.99, 50.76, 49.82, 44.57, 44.44, 42.55, 40.54, 39.97, 39.55, 38.89, 38.49, 37.42, 37.19, 36.74, 35.25, 32.61, 31.62, 31.57, 31.17, 31.12, 30.76, 28.81, 28.75, 26.14, 25.64, 25.58, 24.26, 21.12, 20.96, 20.91, 20.12, 20.09, 19.16, 16.45, 16.37, 14.15, 10.74, 10.70$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{64}\text{H}_{106}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1303.7227, gef. 1303.7162.

5.4.24 Darstellung von Tubugi-Norspermidin-Konjugat **113** (TFA-Salz)

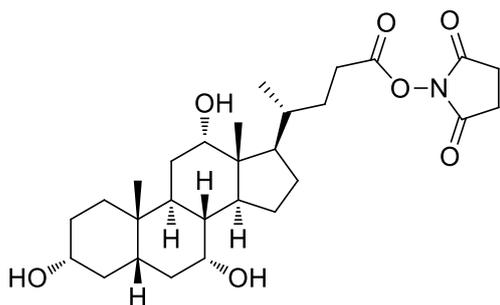


Eine Lösung von Verbindung **126** (2.3 mg, 1.8 μmol) in einer Mischung aus DCM/TFA (20/1 (v/v), 100 μL) wird für 4 Stunden gerührt. Anschließend wird Toluol zugegeben (500 μL) und der Reaktionsansatz im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird unter vermindertem Druck intensiv getrocknet. Verbindung **113** wird mit einer Ausbeute von 1.9 mg (73 %) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) $\delta = 8.08$ (s, 1H), 7.24 – 7.18 (m, 5H), 6.33 – 6.28 (m, 1H), 4.72 – 4.66 (m, 1H), 4.64 – 4.57 (m, 1H), 4.50 – 4.41 (m, 1H), 4.32 – 4.26 (m, 1H), 3.88 – 3.78 (m, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 3.55 – 3.38 (m, 5H), 3.13 – 2.97 (m, 12H), 2.90 – 2.78 (m, 9H), 2.69 – 2.66 (m, 2H), 2.48 – 2.41 (m, 1H), 2.33 – 2.26 (m, 1H), 2.16 – 2.13 (m, 3H), 2.11 – 1.84 (m, 13H), 1.84 – 1.73 (m, 3H), 1.64 – 1.53 (m, 5H), 1.48 – 1.38 (m, 3H), 1.36 – 1.26 (m, 9H), 1.12 – 0.97 (m, 13H), 0.94 – 0.74 ppm (m, 13H).

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1103.6178, gef. 1103.6184.

5.4.25 Darstellung von Cholsäure-NHS-Ester **131**



Zu einer Lösung von Cholsäure (5.0 g, 12.2 mmol, 1.0 Äq.) in trocken DMF (100 mL) werden EDC·HCl (3.5 g, 12.2 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Hydroxysuccinimid (2.1 g, 18.3 mmol, 1.5 Äq.) und DMAP (147.0 g, 1.2 mmol, 0.1 Äq.) gegeben. Die Mischung wird über Nacht gerührt und EDC·HCl (700 mg, 3.7 mmol, 0.3 Äq.) sowie *N*-Hydroxysuccinimid (400 mg, 3.4 mmol, 0.3 Äq.) werden erneut zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 3 Tage gerührt, in Eiswasser (300 mL) gegeben und filtriert. Der Filterkuchen wird in DCM (100 mL) gelöst und die wässrige Phase mit DCM (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3x 100 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Verbindung **131** wird mit einer Ausbeute von 4.5 g (73 %) als weißer Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

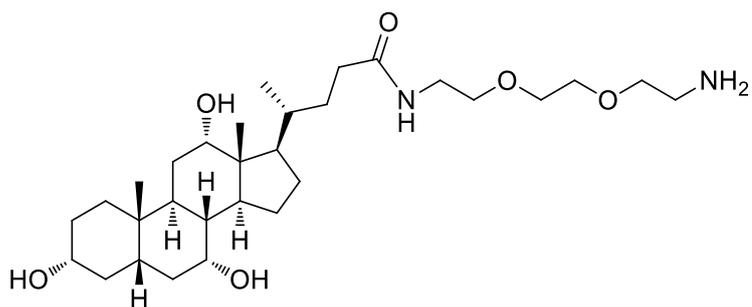
$R_f = 0.52$ (DCM:MeOH 10:1).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) $\delta = 3.96$ (s, 1H), 3.82 – 3.76 (m, 1H), 3.43 – 3.32 (m, 1H), 3.32 – 3.28 (m, 3H), 2.82 (s, 4H), 2.69 – 2.50 (m, 2H), 2.36 – 2.19 (m, 2H), 2.07 – 1.72 (m, 7H), 1.65 – 1.30 (m, 11H), 1.19 – 1.07 (m, 1H), 1.05 (d, $J=6.3$, 3H), 0.98 (d, $J=3.4$, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.73 ppm (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) $\delta = 171.88, 170.67, 73.98, 72.86, 69.02, 54.81, 47.97, 47.54, 43.18, 43.00, 41.01, 40.45, 36.48, 36.43, 35.89, 35.82, 31.94, 31.17, 29.56, 28.77, 28.56, 27.86, 26.47, 24.21, 23.16, 17.44, 12.98$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{NO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 528.2932, gef. 528.2932.

5.4.26 Darstellung von Cholsäure-Derivat **132**



Zu einer Lösung von 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamin) (2.9 mL, 20.0 mmol, 5.0 Äq.) in DCM (50 mL) wird eine Lösung von Cholsäure-NHS-Ester **131** (2.0 g, 4.0 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (50 mL) tropfenweise zugegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der so erhaltene Rückstand wird in H₂O (50 mL) gelöst und mit DCM (10x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Verbindung **132** wird mit einer Ausbeute von 1.2 g (55 %) als weißer Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

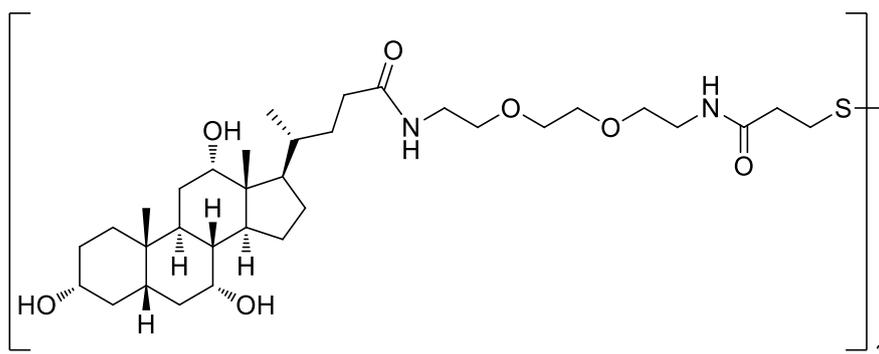
$R_f = 0.64$ (DCM:MeOH 3:2).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) $\delta = 3.97 - 3.92$ (m, 1H), $3.82 - 3.75$ (m, 1H), $3.65 - 3.60$ (m, 5H), $3.57 - 3.49$ (m, 5H), $3.40 - 3.32$ (m, 3H), $3.32 - 3.28$ (m, 1H), 2.79 (t, $J=5.3$, 2H), $2.32 - 2.20$ (m, 3H), $2.17 - 2.06$ (m, 1H), $2.04 - 1.70$ (m, 8H), $1.68 - 1.49$ (m, 6H), $1.46 - 1.24$ (m, 5H), $1.16 - 1.06$ (m, 1H), 1.02 (d, $J=6.3$, 3H), $1.00 - 0.93$ (m, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.70 ppm (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) $\delta = 176.86, 73.96, 73.36, 73.29, 72.82, 71.29, 71.25, 70.61, 68.96, 47.99, 47.45, 43.16, 42.97, 42.03, 40.99, 40.43, 40.29, 36.92, 36.48, 35.87, 34.03, 33.30, 31.16, 29.58, 28.71, 27.84, 24.22, 23.19, 17.72, 13.02$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₃₀H₅₄N₂O₆ [M+H]⁺ 539.4055, gef. 539.4046.

5.4.27 Darstellung von Disulfid **133**



Zu einer Lösung von Cholsäure-Derivat **132** (700 mg, 1.30 mmol, 2.0 Äq.) in DCM/DMF (10 mL/5 mL) wird NHS-Ester **104** (263 mg, 0.65 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 7:1 → 4:1) des Rückstands liefert Verbindung **133** mit einer Ausbeute von 418 mg (51 %) als weißen Feststoff.

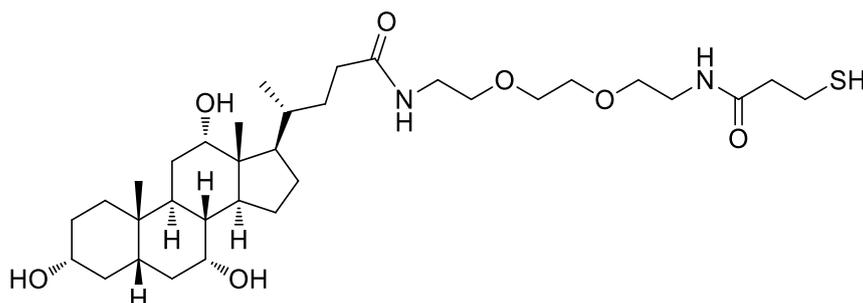
$R_f = 0.71$ (DCM:MeOH 5:1).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 3.97 - 3.92$ (m, 2H), 3.81 – 3.76 (m, 2H), 3.62 (s, 10H), 3.54 (q, $J=5.4$, 8H), 3.41 – 3.32 (m, 10H), 3.32 – 3.27 (m, 2H), 2.95 (t, $J=7.1$, 4H), 2.62 (t, $J=7.1$, 4H), 2.32 – 2.21 (m, 6H), 2.16 – 2.07 (m, 2H), 2.03 – 1.71 (m, 16H), 1.68 – 1.49 (m, 13H), 1.45 – 1.27 (m, 11H), 1.14 – 1.07 (m, 2H), 1.03 (d, $J=6.3$, 6H), 0.98 (d, $J=3.1$, 1H), 0.91 (s, 6H), 0.71 ppm (s, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) $\delta = 176.89, 173.73, 73.98, 72.84, 71.31, 70.65, 70.56, 68.98, 48.03, 47.48, 43.17, 42.99, 41.00, 40.41, 40.30, 36.95, 36.49, 36.40, 35.89, 35.04, 34.10, 33.32, 31.17, 29.59, 28.74, 27.86, 24.25, 23.21, 17.77, 13.06$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{66}\text{H}_{114}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1251.7846, gef. 1251.7862.

5.4.28 Darstellung von Thiol **134**



Zu einer Lösung von Verbindung **133** (50.0 mg, 39.9 μmol , 1.0 Äq.) in ACN/H₂O (1 mL/1 mL) werden Kaliumcarbonat-Lösung (0.2 M, 500 μL) und DTT (24.6 mg, 0.16 mmol, 4.0 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 20 Minuten gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 20:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 7:1) des Rückstands liefert Verbindung **134** mit einer Ausbeute von 33 mg (66 % bezogen auf den Umsatz) als farbloses Öl. Die Substanz wird direkt weiter umgesetzt.

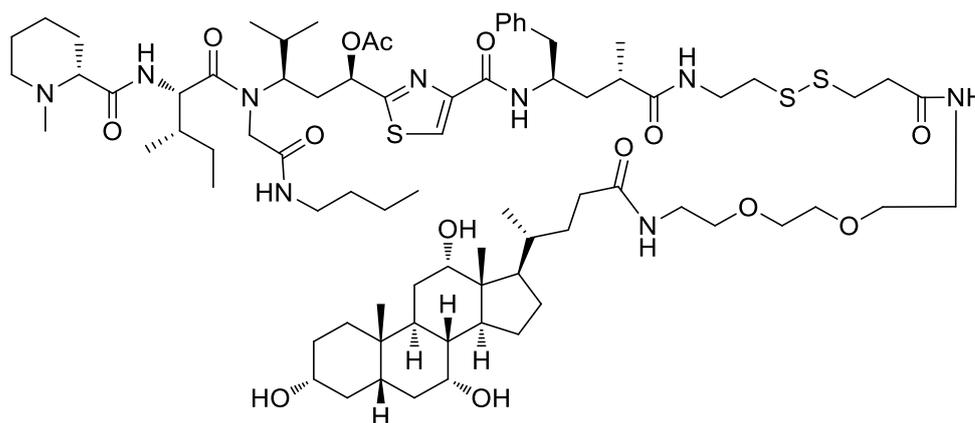
$R_f = 0.31$ (DCM:MeOH 10:1).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) $\delta = 3.97 - 3.91$ (m, 1H), 3.83 – 3.74 (m, 1H), 3.62 (s, 4H), 3.58 – 3.51 (m, 4H), 3.41 – 3.33 (m, 5H), 3.32 – 3.27 (m, 1H), 2.96 (dd, $J=15.4$, 8.3, 1H), 2.74 (t, $J=6.8$, 1H), 2.62 (t, $J=7.1$, 1H), 2.50 (t, $J=6.8$, 1H), 2.32 – 2.21 (m, 3H), 2.17 – 2.08 (m, 1H), 2.04 – 1.71 (m, 7H), 1.69 – 1.49 (m, 6H), 1.46 – 1.24 (m, 5H), 1.15 – 1.07 (m, 1H), 1.03 (d, $J=6.3$, 3H), 0.98 (d, $J=2.9$, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.71 ppm (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) $\delta = 176.92, 173.95, 73.99, 72.85, 71.29, 70.64, 70.59, 69.00, 49.27, 48.04, 47.48, 43.18, 42.99, 41.00, 40.45, 40.30, 36.93, 36.48, 35.88, 35.07, 34.10, 33.31, 31.17, 29.58, 28.71, 27.87, 24.22, 23.17, 21.13, 17.75, 13.02$ ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₃₃H₅₈N₂O₇S [M+Na]⁺ 649.3857, gef. 649.3845.

5.4.29 Darstellung von Tubugi-Cholsäure-Konjugat **135**



Zu einer Lösung von frisch hergestelltem Thiol **134** (1.8 mg, 2.8 μmol , 1.0 Äq.) in MeOH (100 μL , 10 min mit Stickstoff gespült) wird unter Stickstoffatmosphäre eine Lösung von Tubugi-SSPy **101** (2.8 mg, 2.8 μmol , 1.0 Äq.) in MeOH (100 μL , 10 min mit Stickstoff gespült) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Stickstoffstrom entfernt. Die säulenchromatographische

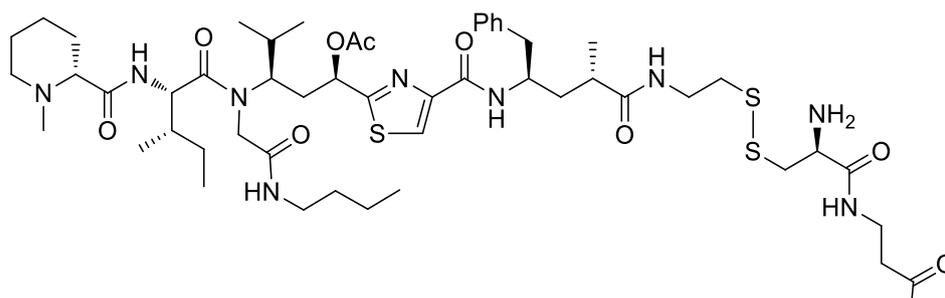
Aufarbeitung (DCM:MeOH 20:1 → 10:1 → 7:1) des Rückstands liefert Verbindung **135** mit einer Ausbeute von 4.0 mg (94 %) als weißen Feststoff.

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ = 8.08 (s, 1H), 7.24 – 7.10 (m, 5H), 4.77 – 4.71 (m, 1H), 4.62 – 4.56 (m, 1H), 4.46 – 4.40 (m, 1H), 4.32 – 4.26 (m, 1H), 3.96 – 3.93 (m, 1H), 3.81 – 3.77 (m, 2H), 3.63 – 3.59 (m, 5H), 3.56 – 3.51 (m, 5H), 3.38 – 3.33 (m, 6H), 2.95 (t, $J=7.2$, 2H), 2.85 – 2.78 (m, 3H), 2.63 – 2.59 (m, 2H), 2.46 – 2.40 (m, 3H), 2.32 – 2.22 (m, 5H), 2.14 – 2.08 (m, 1H), 2.02 – 1.73 (m, 15H), 1.67 – 1.50 (m, 13H), 1.44 – 1.37 (m, 6H), 1.34 – 1.28 (m, 18H), 1.12 – 1.05 (m, 6H), 1.02 (d, $J=6.4$, 3H), 1.00 – 0.97 (m, 3H), 0.92 – 0.84 (m, 12H), 0.79 – 0.75 (m, 2H), 0.71 ppm (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ = 178.67, 176.95, 173.82, 172.01, 171.80, 163.20, 150.58, 139.56, 130.46, 129.36, 127.41, 125.36, 74.02, 72.88, 71.33, 70.67, 70.59, 69.03, 56.46, 55.21, 50.79, 49.85, 49.57, 48.09, 47.51, 43.92, 43.21, 43.02, 42.63, 41.03, 40.53, 40.47, 40.43, 40.32, 39.96, 39.55, 38.90, 38.50, 37.43, 37.20, 36.96, 36.66, 36.50, 35.91, 35.88, 35.25, 34.15, 33.34, 33.07, 32.61, 31.81, 31.19, 31.12, 30.77, 30.64, 30.47, 29.60, 28.75, 27.89, 25.64, 25.49, 25.32, 24.25, 23.73, 23.19, 21.11, 20.96, 20.91, 20.12, 19.14, 17.78, 16.45, 16.35, 14.43, 14.16, 13.05, 10.81, 10.76 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{78}\text{H}_{127}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ 766.9315, gef. 766.9309.

5.4.30 Darstellung von Tubugi-NPY-Konjugat **138**



$\text{H}_2\text{N}-\text{Y}-\text{R}-\text{P}-\text{R}-\text{T}-\text{I}-\text{L}-\text{N}-\text{I}-\text{Y}-\text{H}-\text{R}-\text{L}-\text{A}-\text{S}-\text{Y}-\text{Y}-\text{R}-\text{A}-\text{L}-\text{D}-\text{E}-\text{A}-\text{P}-\text{A}-\text{D}-\text{E}-\text{G}-\text{P}-\text{F}-\text{D}-\text{P}-\text{K}-\text{S}-\text{P}-\text{Y}-\text{H}$

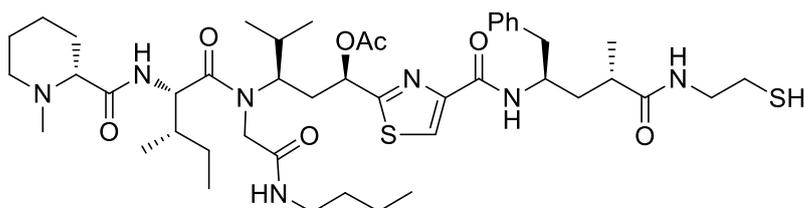
Zu einer Lösung von Tubugi-SSPy **101** (1 mg, 1 μmol , 1.0 Äq.) in trockenem MeOH (100 μL , 10 min mit Stickstoff gespült) wird unter Argonatmosphäre eine Lösung von „CytoPep“ **137** (4.4 mg, 1 μmol , 1.0 Äq.) in MeOH (100 μL , 10 min mit Stickstoff gespült) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 1.5 Stunden gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Stickstoffstrom entfernt. Die Aufarbeitung des Rückstands mittels RP-HPLC (150 mm x 20 mm YMC ODS-A, (ACN(A): H_2O (B)) + 0.1 % TFA, grd.

60 % A > 30 min > 30 % A > 1 min > 100 % A (5 min), 14 mL/min, 220 nm) liefert Verbindung **138** mit einer Ausbeute von 1.8 mg (34 %) als weißen Feststoff.

$t_R = 13.3$ min.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{246}H_{368}N_{62}O_{64}S_3$ $[M+7H]^{7+}$ 759.6731, gef. 759.6727.

5.4.31 Darstellung von Tubugi-SH **139**



Zu einer Lösung von Tubugi-SSPy **101** (3.9 mg, 3.9 μ mol, 1.0 Äq.) in ACN/H₂O (150 μ L/75 μ L) werden Kaliumcarbonat-Lösung (0.2 M, 50 μ L) und DTT (1.0 mg, 6.0 μ mol, 1.5 Äq.) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 25 Minuten gerührt und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM:MeOH 40:1) des Rückstands liefert Verbindung **139** mit einer Ausbeute von 2.4 mg (68 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.64$ (DCM:MeOH 10:1).

1H NMR (600 MHz, CD₃OD) $\delta = 8.06$ (s, 1H), 7.23 – 7.18 (m, 4H), 7.16 – 7.10 (m, 1H), 6.35 (d, $J=11.6$, 1H), 4.63 – 4.56 (m, 1H), 4.45 – 4.38 (m, 1H), 4.31 – 4.25 (m, 1H), 3.82 – 3.74 (m, 1H), 3.63 (s, 1H), 3.51 – 3.45 (m, 6H), 3.05 – 3.00 (m, 4H), 2.90 – 2.81 (m, 9H), 2.67 – 2.57 (m, 2H), 2.24 – 2.20 (m, 1H), 2.16 – 2.14 (m, 1H), 1.64 – 1.52 (m, 5H), 1.34 – 1.28 (m, 5H), 1.10 – 1.05 (m, 6H), 0.99 – 0.96 (m, 3H), 0.93 – 0.84 (m, 9H), 0.80 – 0.73 ppm (m, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD₃OD) $\delta = 178.69$, 175.73, 172.10, 171.76, 171.13, 163.19, 150.56, 139.54, 134.47, 130.42, 129.91, 129.48, 129.31, 127.38, 114.94, 71.57, 56.64, 54.99, 50.83, 50.39, 44.47, 44.43, 43.94, 42.60, 41.79, 40.57, 32.61, 31.81, 31.12, 30.77, 24.55, 24.20, 21.11, 20.89, 20.09, 19.17, 14.12 ppm.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{45}H_{71}N_7O_7S_2$ $[M+H]^+$ 886.4929, gef. 886.4926.

6 Zusammenfassung

Bei den Tubulysinen handelt es sich um Naturstoffe mit herausragender zytotoxischer Aktivität. Zur Darstellung dieser Tetrapeptide sind einfallsreiche Lösungsansätze gefordert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu eingeführten Syntheserouten für die ungewöhnlichen Aminosäuren *N*-Boc-Tubuvalinmethylester (**17a**) und Tubutyrosin (**28a**) ermöglichten die erste Totalsynthese von natürlichem Tubulysin B.

Das neu vorgestellte artifizielle Tubulysin-Derivat **34** („Diethyl-Tubulysin“) verfügt über die wesentlichen Strukturmerkmale der natürlichen Tubulysine, wenn auch in teils vereinfachter Form. Diese Verbindung kombiniert die Vorteile einer schnellen und unkomplizierten Darstellung mit einer herausragenden zytotoxischen Aktivität.

Weiterhin wurden zwei Varianten einer von Grund auf neuen Syntheseroute zur Darstellung der bereits bekannten, hochaktiven Tubulysin-Derivate „Tubugis“ entwickelt. Diese Methode stellt vor allem durch eine gute Reproduzierbarkeit und die effiziente Produktion größerer Materialmengen eine deutliche Verbesserung gegenüber der bekannten Vorschrift dar. Erst diese neue Synthesestrategie ermöglicht zum einen die Darstellung von Tubugi-Konjugaten mit beispielsweise Targeting-Komponenten und bildet zum anderen die Grundlage für die Synthese der neuartigen Tubugi-Dolastatin-Chimären **70** und **82**. Bei diesen Chimären wurde das Tubuvalin-Fragment der Tubugis, welches bisher nur über anspruchsvolle Syntheserouten zugänglich ist, durch die einfach darzustellende Val-Pro-Pro-Einheit, dem zentralen Baustein des Zytostatikums Dolastatin 15 (**69**), ersetzt.

Darüber hinaus wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Tubugi-Konjugate mit Norspermidin (**91**) und Rhodamin B (**92**) synthetisiert. Diese „nicht-spaltbaren“ Konjugate konnten in den bisher durchgeführten biologischen Tests nicht überzeugen. Ein vielseitiges Konzept wurde entwickelt, um ausgehend von Thiol-, Amin- oder auch Azid-funktionalisierten Targeting-Komponenten direkt und unkompliziert Disulfid-verbrückte und damit spaltbare Tubugi-Konjugate aufzubauen. Konjugate mit Norspermidin (**113**), mit Cholsäure (**135**) und mit Neuropeptid Y (**138**) konnten auf diese Weise synthetisiert werden. Die intakten Konjugate (vor Spaltung der Disulfidbrücke) weisen eine stark verminderte Zytotoxizität auf. Durch diese temporäre „Maskierung“, verbunden mit der bevorzugten Anreicherung der Konjugate im zu behandelnden Gewebe, sollte es so möglich sein, das enge therapeutische Fenster der Tubugis signifikant zu erweitern.

7 Abstract

Tubulysins are natural products showing an outstanding cytotoxic activity against various cancer cell lines. The synthesis of these tetrapeptides requires inventive approaches. Procedures for the synthesis of *N*-*boc*-tubuvalin methyl ester (**17a**) and tubutyrosine (**28a**) introduced in the present work, led to the first total synthesis of tubulysin B.

The new artificial tubulysin derivative **34** (“diethyl-tubulysin”) contains all the essential structural elements of the natural tubulysins, slightly simplified in some cases. It combines an easy and straightforward production with an outstanding cytotoxic activity.

Furthermore two new approaches for the synthesis of the highly active tubulysin derivatives “tubugis” were developed. These convenient methods outperform the known procedure due to their good reproducibility and their effective production of large amounts of material. They allow the further modification of the active substance, such as the conjugation with targeting components for the guided enrichment in cancerous tissue. Also the synthesis of novel tubugi-dolastatin-chimaeras **70** and **82** are based on these new strategies. Herein, the difficult to synthesize tubuvalin building block of the tubugis is replaced by the easy to produce Val-Pro-Pro tripeptide, which forms the central part of the well-known cytostatic agent dolastatin 15 (**69**).

First tubugi conjugates with norspermidine (**91**) and rhodamine B (**92**) were synthesized successfully within the scope of the present work. These “non-cleavable” conjugates performed low in biological assays with different cancer cell lines. Subsequently a versatile concept for the simple and straightforward synthesis of disulfide containing (and therefore cleavable) tubugi conjugates, starting from thiol-, amine- or azide-functionalized targeting components, was developed. Applying this method, the first cleavable tubugi conjugates with norspermidine (**113**), cholic acid (**135**) and neuropeptide Y (**138**) were synthesized. The intact conjugates (before the disulfide bridge is cleaved) show a distinctly decreased cytotoxicity. This temporary “masking” in combination with the guided enrichment of the conjugates in the cancerous tissue should contribute significantly to the extension of the tight therapeutic window of the tubugis.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Sasse, F.; Steinmetz, H.; Heil, J.; Höfle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2000**, *53*, 879–885.
- [2] *Forschungsbericht HZI, Braunschweig* **2011**.
- [3] Steinmetz, H.; Glaser, N.; Herdtweck, E.; Sasse, F.; Reichenbach, H.; Höfle, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 4888–4892.
- [4] Höfle, G.; Glaser, N.; Leibold, T.; Karama, U.; Sasse, F.; Steinmetz, H. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 167–178.
- [5] Iwagawa, T.; Kaneko, M.; Okamura, H.; Nakatani, M.; van Soest, R. W. M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1310–1312.
- [6] Korsch, B. H.; Riggs, N. V. *Tetrahedron Lett.* **1964**, *5*, 523–525.
- [7] Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q.-Z.; Lu, Y.; Wessjohann, L. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 7235–7239.
- [8] Sandmann, A.; Sasse, F.; Müller, R. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1071–1079.
- [9] <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>; 06.10.2014.
- [10] Kaur, G.; Hollingshead, M.; Holbeck, S.; Schauer-Vukasinović, V.; Camalier, R. F.; Dömling, A.; Agarwal, S. *Biochem. J.* **2006**, *396*, 235–242.
- [11] Kubicek, K.; Grimm, S. K.; Orts, J.; Sasse, F.; Carlomagno, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 4809–4812.
- [12] Nicolaou, K. C.; Yin, J.; Mandal, D.; Erande, R. D.; Klahn, P.; Jin, M.; Aujay, M.; Sandoval, J.; Gavriljuk, J.; Vourloumis, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1698–708.
- [13] Patterson, A. W.; Peltier, H. M.; Sasse, F.; Ellman, J. *Chemistry* **2007**, *13*, 9534–9541.
- [14] Rath, S.; Liebl, J.; Fürst, R.; Ullrich, A.; Burkhart, J. L.; Kazmaier, U.; Herrmann, J.; Müller, R.; Günther, M.; Schreiner, L.; Wagner, E.; Vollmar, A. M.; Zahler, S. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1048–1061.
- [15] Irschik, H.; Jansen, R.; Gerth, K.; Höfle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1995**, *48*, 962–966.
- [16] Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Höfle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1995**, *48*, 1262–1266.
- [17] Sasse, F.; Steinmetz, H.; Höfle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1993**, *46*, 741–748.
- [18] Höfle, G.; Bedorf, N.; Steinmetz, H.; Schomburg, D.; Gerth, K.; Reichenbach, H. *Angew. Chemie* **1996**, *108*, 1671–1673.
- [19] Jansen, R.; Irschik, H.; Reichenbach, H.; Wray, V.; Höfle, G. *Liebigs Ann. der Chemie* **1994**, *1994*, 759–773.
- [20] Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253–265.
- [21] Khalil, M. W.; Sasse, F.; Lünsdorf, H.; Elnakady, Y. A.; Reichenbach, H. *Chembiochem* **2006**, *7*, 678–683.

- [22] Peltier, H. M.; McMahon, J. P.; Patterson, A. W.; Ellman, J. a. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16018–9.
- [23] Wang, Z.; McPherson, P.; Raccor, B. S.; Balachandran, R.; Zhu, G.; Day, B. W.; Vogt, A.; Wipf, P. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *70*, 75–86.
- [24] Wipf, P.; Wang, Z. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1605–1607.
- [25] Sani, M.; Fossati, G.; Huguenot, F.; Zanda, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3526–3529.
- [26] Patterson, A. W.; Peltier, H. M.; Ellman, J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4362–4369.
- [27] Raghavan, B.; Balasubramanian, R.; Steele, J. C.; Sackett, D. L.; Fecik, R. A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1530–1533.
- [28] Balasubramanian, R.; Raghavan, B.; Steele, J. C.; Sackett, D. L.; Fecik, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2996–2999.
- [29] Balasubramanian, R.; Raghavan, B.; Begaye, A.; Sackett, D. L.; Fecik, R. A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 238–240.
- [30] Ullrich, A.; Chai, Y.; Pistorius, D.; Elnakady, Y.; Herrmann, J. E.; Weissman, K. J.; Kazmaier, U.; Müller, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 4422–4425.
- [31] Shibue, T.; Hirai, T.; Okamoto, I.; Morita, N.; Masu, H.; Azumaya, I.; Tamura, O. *Chemistry* **2010**, *16*, 11678–11688.
- [32] Burkhardt, J. L.; Kazmaier, U. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 3785.
- [33] Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q.-Z.; Lu, Y.; Wessjohann, L. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 2347–2348.
- [34] Preusentanz, R.; Pando, O.; Wessjohann, L. A. *Nachrichten aus der Chemie* **2010**, *58*, 526–532.
- [35] Henkel, B.; Beck, B.; Westner, B.; Mejat, B.; Dömling, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8947–8950.
- [36] Peltier, H. M.; McMahon, J. P.; Patterson, A. W.; Ellman, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16018–16019.
- [37] Schlupe, T.; Gunawan, P.; Ma, L.; Jensen, G. S.; Düringer, J.; Hinton, S.; Richter, W.; Hwang, J. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 181–189.
- [38] Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Dorton, R.; Westrick, E.; Parker, N.; Wang, Y.; Vlahov, I. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9839–9844.
- [39] Reddy, J. A.; Dorton, R.; Dawson, A.; Vetzal, M.; Parker, N.; Nicoson, J. S.; Westrick, E.; Klein, P. J.; Wang, Y.; Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1518–1525.
- [40] Wipf, P.; Takada, T.; Rishel, M. J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4057–4060.
- [41] Chandrasekhar, S.; Mahipal, B.; Kavitha, M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9531–9534.
- [42] Shibue, T.; Hirai, T.; Okamoto, I.; Morita, N.; Masu, H.; Azumaya, I.; Tamura, O. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3845–3848.
- [43] Pando, O. Total Synthesis of Tubulysins and Derivatives by Multicomponent Reactions, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitskreis L. Wessjohann, 2011.
- [44] Nicolaou, K. C.; Estrada, A. A.; Zak, M.; Lee, S. H.; Safina, B. S. *Angew. Chem.*

- Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 1378–1382.
- [45] Pando, O.; Dörner, S.; Preusentanz, R.; Denkert, A.; Porzel, A.; Richter, W.; Wessjohann, L. A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5567–5569.
- [46] Sherrill, R. G.; Andrews, C. W.; Bock, W. J.; Davis-Ward, R. G.; Furfine, E. S.; Hazen, R. J.; Rutkowske, R. D.; Spaltenstein, A.; Wright, L. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 81–84.
- [47] Pelletier, J. C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 781–783.
- [48] Dömling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3168–3210.
- [49] Ugi, I.; Werner, B.; Dömling, A. *Molecules* **2003**, *8*, 53–66.
- [50] Mumm, O. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1910**, *43*, 886–893.
- [51] Mumm, O.; Hesse, H.; Volquartz, H. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1915**, *48*, 379–391.
- [52] Chéron, N.; Ramozzi, R.; Kaïm, L. El; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1361–1366.
- [53] Fleischmann, M.; Drettwan, D.; Sugiono, E.; Rueping, M.; Gschwind, R. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 6364–6369.
- [54] Pando, O.; Stark, S.; Denkert, A.; Porzel, A.; Preusentanz, R.; Wessjohann, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7692–7695.
- [55] Ugi, I.; Demharter, A.; Hörl, W.; Schmid, T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11657–11664.
- [56] Hulme, C.; Morrissette, M. M.; Volz, F. A.; Burns, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1113–1116.
- [57] Marcaccini, S.; Pepino, R.; Pozo, M. C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2727–2728.
- [58] Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883–6885.
- [59] Pettit, G. R.; Herald, D. L.; Singh, S. B.; Thornton, T. J.; Mullaney, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6692–6693.
- [60] Supko, J. G.; Lynch, T. J.; Clark, J. W.; Fram, R.; Allen, L. F.; Velagapudi, R.; Kufe, D. W.; Eder, J. P. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, *46*, 319–328.
- [61] Bonate, P.; Ebbinghaus, S.; Eder, J. P.; Mita, A.; Rubin, E.; Cunningham, C. C.; Rowinsky, E. K.; Hersh, E.; Craig, A. R.; Hammond, L. A. *ASCO Meet. Abstr.* **2004**, *22*, 2082.
- [62] Aurelio, L.; Box, J. S.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B.; Sleebs, M. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2652–2667.
- [63] Vlahov, I. R.; Wang, Y.; Kleindl, P. J.; Leamon, C. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4558–4561.
- [64] Price, H. L.; Wang, L.; Juusola, J.; Kline, M.; Shah, S. M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5590–5599.
- [65] Wang, C.; Delcros, J.-G.; Cannon, L.; Konate, F.; Carias, H.; Biggerstaff, J.; Gardner, R. A.; Phanstiel IV, O. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5129–5138.
- [66] Cullis, P. M.; Green, R. E.; Merson-Davies, L.; Travis, N. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 717–729.

- [67] Esteves-Souza, A.; Lucio, K. A.; Da Cunha, A. S.; Da Cunha Pinto, A.; Da Silva Lima, E. L.; Camara, C. A.; Vargas, M. D.; Gattass, C. R. *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 225–231.
- [68] Chadwick, J.; Jones, M.; Mercer, A. E.; Stocks, P. A.; Ward, S. A.; Park, B. K.; O'Neill, P. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2586–2597.
- [69] Battaglia, A.; Guerrini, A.; Baldelli, E.; Fontana, G.; Varchi, G.; Samorì, C.; Bombardelli, E. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2667–2670.
- [70] Holley, J. L.; Mather, A.; Wheelhouse, R. T.; Cullis, P. M.; Hartley, J. A.; Bingham, J. P.; Cohen, G. M. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4190–4195.
- [71] Pendergrass, W.; Wolf, N.; Poot, M. *Cytometry. A* **2004**, *61*, 162–169.
- [72] Daly, T. A.; Almeida, P. F.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17245–17252.
- [73] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [74] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [75] Huisgen, R. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1963**, *2*, 565–598.
- [76] Liang, L.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933–2945.
- [77] Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- [78] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [79] Chowdhury, C.; Mandal, S. B.; Achari, B. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8531–8534.
- [80] Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2006**, *39*, 6451–6457.
- [81] Partyka, D. V.; Updegraff, J. B.; Zeller, M.; Hunter, A. D.; Gray, T. G. *Organometallics* **2007**, *26*, 183–186.
- [82] Zhang, A. X.; Murelli, R. P.; Barinka, C.; Michel, J.; Cocleaza, A.; Jorgensen, W. L.; Lubkowski, J.; Spiegel, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12711–12716.
- [83] Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. *Synthesis (Stuttg.)* **2002**, 2195–2202.
- [84] Wess, G.; Kramer, W.; Enhsen, A.; Glombik, H.; Baringhaus, K.-H.; Bock, K.; Kleine, H.; Schmitt, W. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 817–818.
- [85] Wess, G.; Kramer, W.; Schubert, G.; Enhsen, A.; Baringhaus, K.-H.; Glombik, H.; Müllner, S.; Bock, K.; Kleine, H.; John, M.; Neckermann, O.; Hoffmann, A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 819–822.
- [86] Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G.; Bickel, M.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K. H.; Enhsen, A.; Glombik, H. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18598–18604.
- [87] Paschke, R.; Kalbitz, J.; Paetz, C. *Inorganica Chim. Acta* **2000**, *304*, 241–249.
- [88] Paschke, R.; Paetz, C.; Mueller, T.; Schmoll, H.-J.; Mueller, H.; Sorkau, E.; Sinn, E. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2033–2044.
- [89] Florea, A.-M.; Büsselberg, D. *Cancers (Basel)* **2011**, *3*, 1351–1371.
- [90] Einhorn, L. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 4592–4595.

-
- [91] Siddik, Z. H. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279.
- [92] Paschke, R.; Kalbitz, J.; Paetz, C.; Luckner, M.; Mueller, T.; Schmoll, H.-J.; Mueller, H.; Sorkau, E.; Sinn, E. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94*, 335–342.
- [93] Tatemoto, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 5485–5489.
- [94] Corder, R.; Emson, P. C.; Lowry, P. J. *Biochem. J.* **1984**, *219*, 699–706.
- [95] Körner, M.; Waser, B.; Reubi, J. C. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 8426–8433.
- [96] Tatemoto, K. *Neuropeptide Y and Related Peptides*; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2004; Vol. 162.
- [97] Michel, M. C.; Rascher, W. *J. Hypertens.* **1995**, *13*, 385–395.
- [98] Wang, Z. L. *Endocrinology* **1994**, *135*, 200–206.
- [99] Sheikh, S. P. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **1991**, *261*, G701–G715.
- [100] Michel, M. C.; Beck-Sickinger, A.; Cox, H.; Doods, H. N.; Herzog, H.; Larhammar, D.; Quirion, R.; Schwartz, T.; Westfall, T. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 143–150.
- [101] Blomqvist, A. G.; Herzog, H. *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 294–298.
- [102] Mörl, K.; Stichel, J. A. N.; Beck-Sickinger, A. *Biospektrum* **2009**, *15*, 734–736.
- [103] Körner, M.; Reubi, J. C. *Peptides* **2007**, *28*, 419–425.
- [104] Zhang, L.; Bijker, M. S.; Herzog, H. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *131*, 91–113.
- [105] Reubi, J. C.; Gugger, M.; Waser, B.; Schaer, J.-C. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4636–4641.
- [106] Sheriff, S.; Ali, M.; Yahya, A.; Haider, K. H.; Balasubramaniam, A.; Amlal, H. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 604–614.
- [107] Langer, M.; Kratz, F.; Rothen-Rutishauser, B.; Wunderli-Allenspach, H.; Beck-Sickinger, A. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1341–1348.
- [108] Carter, S. K. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 1265–1274.
- [109] Khan, I. U.; Zwanziger, D.; Böhme, I.; Javed, M.; Naseer, H.; Hyder, S. W.; Beck-Sickinger, A. G. *Angew. Chemie* **2010**, *122*, 1174–1177.
- [110] Guy, J.; Caron, K.; Dufresne, S.; Michnick, S. W.; Skene, W. G.; Keillor, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11969–11977.
- [111] Sinha, J.; Sahoo, R.; Kumar, A. *Macromolecules* **2009**, *42*, 2015–2022.

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| 4CR | four component reaction |
| ACN | Acetonitril |
| aq. | Aqua |
| Aux* | chirales Auxiliar |
| ber. | Berechnet |
| Bn | Benzyl |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| CBS | Corey Bakshi Shibata |
| Cbz | Benzyloxycarbonyl |
| CDP | β -Cyclodextrin Polymer |
| CuAAC | kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DCC | <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| DEPBT | 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-on |
| DIC | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid |
| DIPEA | <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)-pyridin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid |
| ESI | Elektrosprayionisation |

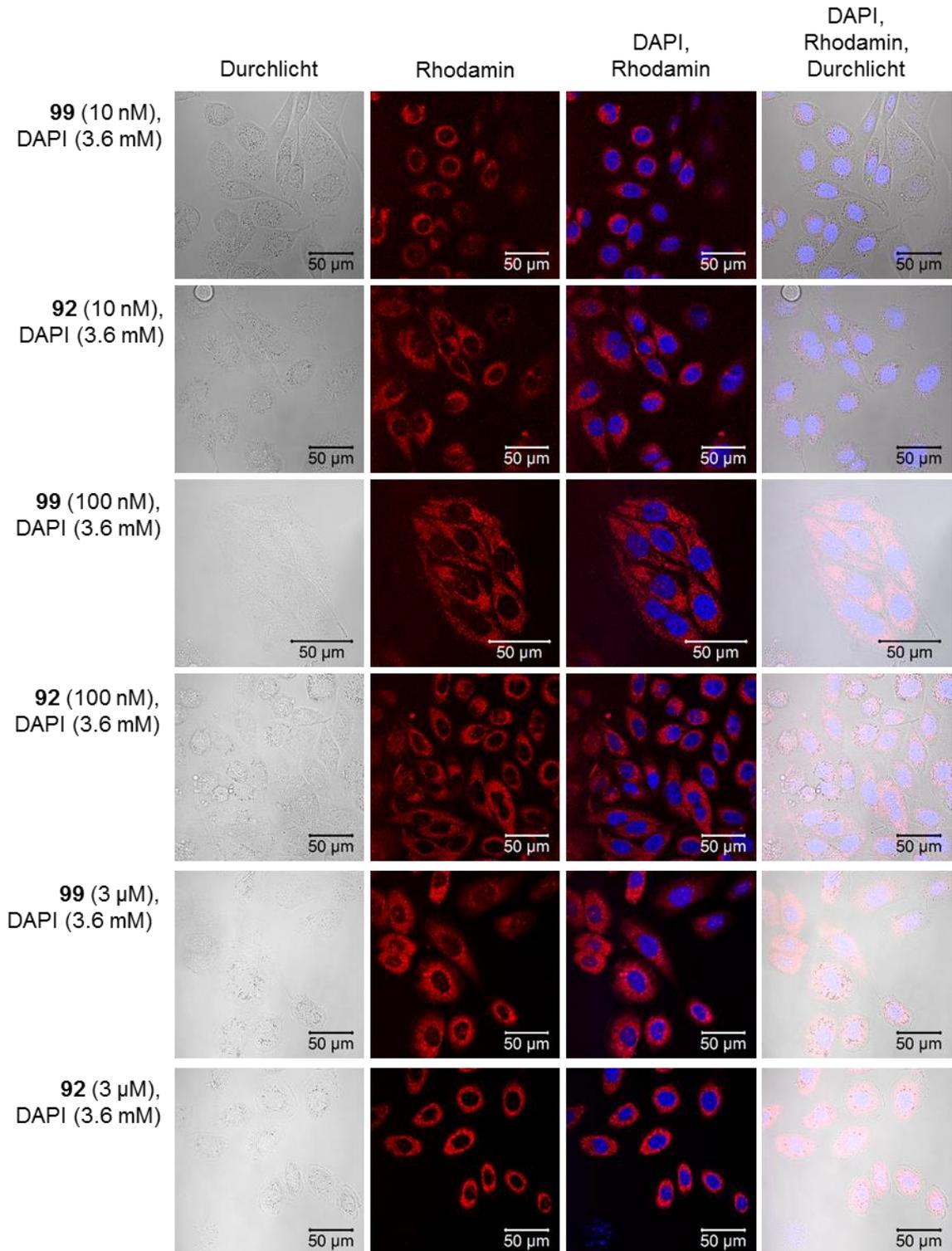
| | |
|-------|---|
| Fmoc | Fluorenylmethoxycarbonyl |
| FR | Folatrezeptor |
| FTICR | Fourier transform ion cyclotron resonance |
| gef. | gefunden |
| GI | growth inhibition |
| grd. | Gradient |
| HATU | <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HBTU | 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HOAt | 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HRMS | high resolution mass spectrometry |
| HYD | Hydrazon |
| HZI | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) |
| IC | inhibitory concentration |
| KHMDS | Kaliumhexamethyldisilazid |
| MCR | multi component reaction |
| MDP | Methylendiphosphonat |
| MDR | multi drug resistance |
| MeOH | Methanol |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MS | Massenspektrometrie |
| NCI | National Cancer Institut |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |

| | |
|---------------|--|
| <i>N</i> -Mep | <i>N</i> -Methylpipecolinsäure |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| NMRI | Naval Medical Research Institute |
| NPY | Neuropeptid Y |
| ODS | Octadecylsilan |
| PAT | Polyamintransportsystem |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PFP | Pentafluorphenol |
| PP | pankreatisches Polypeptid |
| Py | Pyridin |
| PYY | Peptid YY |
| quant. | quantitativ |
| QSAR | quantitative structure–activity relationship |
| RP | reverse phase |
| RT | Raumtemperatur |
| TBAHS | Tetrabutylammoniumhydrogensulfat |
| TBDMS | <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl |
| TEA | Triethylamin |
| TEMPO | 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl |
| TFA | trifluoro acetic acid |
| TGI | total growth inhibition |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Tup | Tubuphenyalanin |
| Tut | Tubutyrosin |
| Tuv | Tubuvalin |

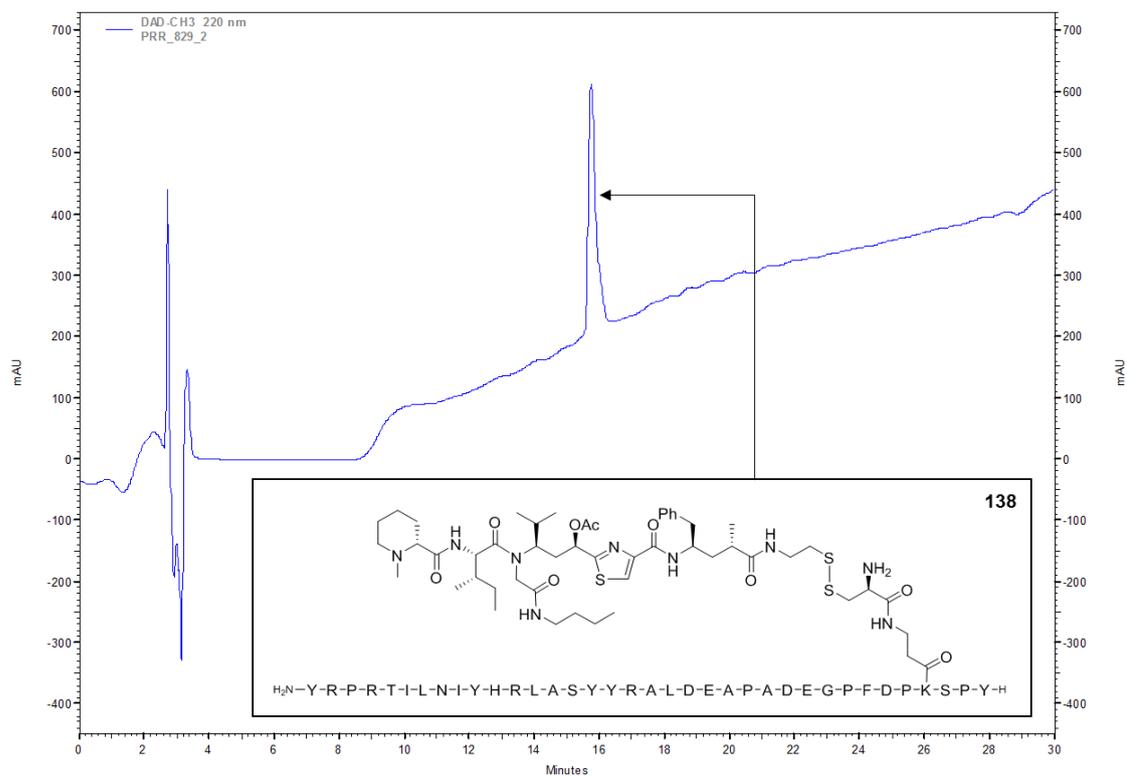
Y1R bis Y6R Neuropeptid-Hormonrezeptor-Subtyp 1 bis 6

10 Anhang

Fluoreszenzspektroskopische Aufnahmen von Tubugi-Rhodamin-Konjugat 92 und dem Rhodamin-Derivat 99



HPL-Chromatogramm des Tubugi-NPY-Konjugats 138



- (150 mm x 4.6 mm YMC ODS-A, (ACN(A):H₂O(B)), grad. 60 % A > 30 min > 30 % A)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen / Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Marburg, 23.11.2016

Rainer Kufka

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ludger A. Wessjohann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung dieses sehr interessanten Themas.

Ich danke Martina Lerbs für die Aufnahme unzähliger ESI-MS-Spektren und Dr. Jürgen Schmidt für die hochauflösenden Massenspektren. Bei Dr. Andrea Porzel und Gudrun Hahn bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren. Ich danke Prof. Dr. Bernhard Westermann für die Diskussion synthetischer Fragestellungen und seinen Beitrag zum Zusammenhalt unserer Synthesegruppe. Anja Ehrlich danke ich für die Unterstützung bei der Reinigung synthetisierter Substanzen mittels HPLC und die Durchführung von Zelltests. Für die Auswertung dieser Zelltests danke ich Prof. Dr. Goran Kaluderovic sowie Annika Denkert. Ich danke Hans-Christian Kautz für die Synthese des Peptids Val-Pro-Pro und Katharina Wolf für die freundliche Unterstützung bei der Nachproduktion verschiedener Grundbausteine. Bei Dr. Robert Rennert (Firma *OntoChem*) bedanke ich mich für die Bereitstellung des Neuropeptid Y-Analogen „CytoPep“ sowie für die Durchführung und Auswertung der entsprechenden Zelltests.

Der gesamten Abteilung NWC danke ich für ein großartiges Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt diesbezüglich meinen ehemaligen Kollegen und Freunden Sebastian Stark, Jeanette Keim, Steve Ludwig, Benjamin Weigel, Robert Berger und Anne-Katrin Bauer sowie meiner lieben Ehefrau Julia Kufka.

Abschließend danke ich meiner Familie für den steten Rückhalt sowie die uneingeschränkte und bedingungsfreie Unterstützung.