

**Lipopeptide als TLR Antagonisten –
Synthese und Struktur-Wirkungs-Beziehungen
von Lanthionin-basierten Lipopeptiden**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Tobias Seyberth

Tag der mündlichen Prüfung 03.03.2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. E. Maier

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Günther Jung

in der Zeit von Oktober 2000 bis Dezember 2004 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Günther Jung danke ich sehr herzlich für die intensive Förderung, die Freiheit in der Bearbeitung des gestellten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller danke ich für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse und die Co-Betreuung dieser Arbeit.

Danksagungen

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei *Herrn Dr. Joachim Smerdka*, *Herrn Dr. Gerhard Sorg* und *Herrn Dr. Bernd Thern* für die vielen anregenden, lehrreichen Diskussionen sowie das angenehme Arbeitsklima in 10M37 und 10A31.

Mein Dank gilt auch:

Herrn Söhnke Voss für die hervorragende Zusammenarbeit, die Einweisung in die Durchführung der IL-8 Assays sowie die durchgeführten IL-8 Assays

Herrn Dr. Dietmar Schmid, *Frau Petra Hentschel* und *Herrn Graeme Nicholson* für die Durchführung von FT-ICR-MS-Messungen

Herrn Dr. Bernd Thern und der *Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Süßmuth* für Routine ES-MS-Messungen

Frau Nicole Sessler für Peptidsynthesen und die stete Aufheiterung des Laboralltags

Herrn Jörg Bauer für die vielen konstruktiven Diskussionen bezüglich der geteilten Liposorgen

Herrn Rainer Fischer für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse, die Einweisung in die Durchführung der MALDI-MS-Messungen und die oftmals von neuen Ideen gekrönten Gespräche

Herrn Adeeb El-Dashan für seine Freundschaft

Herrn Graeme Nicholson für die chirale GC-MS-Analysen

Herrn Wolfgang Bock für die Elementaranalysen

Herrn Paul Schuler für 600 MHz-NMR-Messungen

Frau Ursula Becker-Sanzenbacher für ihre unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft betreffend aller bürokratischen Hürden. Die positive Stimmung im Arbeitskreis ist zum Großteil ihr Verdienst.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller für viele Diskussionen und der Firma *EMC microcollections GmbH* für Peptidsynthesen und zur Verfügung gestelltes Pam₃Cys-OH.

Allen Kolleginnen und Kollegen, die nicht namentlich erwähnt wurden, für das gute Klima im Arbeitskreis

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Finanzierung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Identifizierung und Quantitative Analyse pharmazeutisch und biochemisch relevanter Verbindungen (Analytische Chemie)“

Herrn Dr. Michael Barth danke ich für sein intensives und kritisches Korrekturlesen dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	ALLGEMEINER TEIL.....	1
1.1	EINLEITUNG.....	1
1.2	KOMBINATORISCHE CHEMIE.....	3
1.2.1	PRINZIPIEN DER KOMBINATORISCHEN CHEMIE	3
1.2.2	DAS PRINZIP DER FESTPHASENSYNTHESE	4
1.3	CHEMIE AN FESTER PHASE	5
1.3.1	TRÄGERMATERIALIEN.....	5
1.3.2	LINKERMOLEKÜLE	9
1.3.3	ANALYTIK IN DER FESTPHASENCHEMIE	11
1.4	LANTHIONIN	14
1.4.1	SYNTHESE VON LANTHIONIN	15
1.5	TOLL-LIKE REZEPTOREN.....	22
1.5.1	AUFBAU DER TOLL-LIKE REZEPTOREN	23
1.5.2	SIGNALTRANSDUKTION DER TLR'S	25
1.5.3	TOLL-LIKE REZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN	27
1.5.4	LIPOPROTEINE UND LIPOPEPTIDE ALS TLR-2 LIGANDEN	29
1.5.5	TLR'S ALS POTENTIELLE THERAPEUTISCHE ZIELMOLEKÜLE	32
2	AUFGABENSTELLUNG.....	33
3	ERGEBNIS TEIL	34
3.1	SYNTHESE DES LANTHIONIN-GRUNDGERÜSTS IN LÖSUNG.....	36
3.1.1	AUSWAHL EINER GEEIGNETEN LANTHIONIN-SYNTHESEMETHODE.....	36
3.1.2	VORVERSUCHE ZUR LANTHIONIN-SYNTHESE.....	38
3.1.3	SYNTHESE DES β -BROMALANINS	40
3.1.4	SYNTHESE DES LANTHIONIN-GRUNDGERÜSTS	42
3.1.5	LANTHIONIN ODER NORLANTHIONIN?	44
3.1.6	SYNTHESE UND ANALYTIK DER STEREOISOMEREN DER LANTHIONINDERIVATE	47
3.1.7	LÖSUNGSSYNTHESE DES PAM ₂ LANHDA-OH BAUSTEINS	50
3.1.8	ANALYTIK DES SYNTHETISIERTEN PAM ₂ LANHDA-OH.....	52
3.1.9	ÜBERTRAGUNG DER ENTWICKELTEN SYNTHESE AUF METHYLLANTHIONIN	56
3.2	FESTPHASEN-SYNTHESE PROTOKOLL FÜR LIPOLANTHIONIN-PEPTIDE	58
3.2.1	SYNTHESE DER HARZGEBUNDENEN PEPTID-SEQUENZ SER-(LYS) ₄	59
3.2.2	SYNTHESEPLAN FÜR PAM ₂ LANHDA-SK ₄ -NH ₂	59
3.2.3	KUPPLUNG DES PAM ₂ LANHDA-OH BAUSTEINS (SYNTHESEWEG 1).....	61

3.2.4	ERSTE VARIATION DER FETTSÄURE-RESTE (SYNTHESEWEG 2)	63
3.2.5	ETABLIERUNG DES SYNTHESEWEGES 3	65
3.2.6	OXIDATION DES LANTHIONIN- UND DHC-SCHWEFELS	75
3.2.7	AUFBAU DES LANTHIONIN-GERÜSTS AN FESTER PHASE (VORVERSUCHE)	76
3.3	SYNTHESE UND SCREENING DER LIPOLANTHIONIN-PEPTID-ARRAYS	78
3.3.1	SCREENING DER SYNTHETISIERTEN VERBINDUNGEN	79
3.3.2	VERBINDUNGSKOLLEKTION I: VARIATION DER FETTSÄURE UND FETTAMIN KETTENLÄNGE	80
3.3.3	VERBINDUNGSKOLLEKTION II: VARIATION DER STEREOISOMEREN	86
3.3.4	VERBINDUNGSKOLLEKTION III: VARIATION DER OXIDATIONSSTUFE DES SCHWEFELS	91
3.3.5	WEITERE SYNTHETISIERTE LANTHIONIN-PEPTID DERIVATE	94
3.3.6	KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER TLR-2 AKTIVITÄT	95
3.3.7	SCREENING AUF TLR-4 ANTAGONISTISCHE AKTIVITÄT	98
4	ZUSAMMENFASSUNG	100
5	EXPERIMENTELLER TEIL	103
5.1	CHEMIKALIEN	103
5.2	ZELLKULTUR	103
5.3	GERÄTE UND ANALYTISCHE METHODEN	103
5.3.1	HPLC	103
5.3.2	ES-MASSENSPEKTROMETRIE	104
5.3.3	FT-ICR-MASSENSPEKTROMETRIE	104
5.3.4	MALDI-TOF-MASSENSPEKTROMETRIE	104
5.3.5	GC-MS-ENANTIOMEREN-TRENNUNGEN	105
5.3.6	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE	105
5.3.7	INFRAROTSPEKTROSKOPIE	105
5.3.8	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	105
5.3.9	KAISER-TEST	106
5.3.10	BELEGUNGSBESTIMMUNG DURCH UV-SPEKTROMETRISCHE FMOC-BESTIMMUNG	106
5.3.11	UV-SPEKTROSKOPIE	107
5.3.12	ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA); IL-8 ASSAY	107
5.3.13	ZELLTOXIZITÄTS-TEST	108
5.4	SYNTHESEN	109
5.4.1	EINFÜHREN DER ALLYLSCHUTZGRUPPE (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	109
5.4.2	SPALTUNG DER TRITYLSCHUTZGRUPPE DES CYSTEINS (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	110
5.4.3	EINFÜHREN DER <i>tert.</i> -BUTYLSCHUTZGRUPPE (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	112
5.4.4	N-FMOC-(2S,3RS)-THREONIN- <i>tert.</i> -BUTYLESTER (77)	114
5.4.5	TRANSFORMATION DER HYDROXYFUNKTION ZUM BROMID (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	114
5.4.6	LANTHIONIN-SYNTHESE (63A-D) (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	117
5.4.7	ABSPALTUNG O- <i>tert.</i> -BUTYL-CARBOXYSCHUTZGRUPPE (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	120

5.4.8	N ² ,N ⁶ -BIS-(FMOC)-(2R,6R)-LANTHIONIN-O ¹ - <i>TERT.</i> -BUTYLMONOESTER (70).....	122
5.4.9	N ² ,N ⁶ -BIS-(FMOC)-(2R,6R)-LANTHIONIN-N ⁷ -HEXADECYLAMID-O ¹ - <i>TERT.</i> -BUTYLESTER (71).....	123
5.4.10	N ² ,N ⁶ -BIS-(FMOC)-(2R,6R)-LANTHIONIN-N ⁷ -HEXADECYLAMID (72).....	124
5.4.11	N ² ,N ⁶ -BIS-(PALMITOYL)-(2R,6R)-LANTHIONIN-N ⁷ -HEXADECYLAMID-O ¹ - <i>TERT.</i> -BUTYLESTER (73)	125
5.4.12	N ² ,N ⁶ -BIS-(PALMITOYL)-(2R,6R)-LANTHIONIN-N ⁷ -HEXADECYLAMID (74).....	126
5.4.13	SPALTUNG HARZGEBUNDENER FMOC-SCHUTZGRUPPEN (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	126
5.4.14	ABSPALTEN DER PRODUKTE VOM RINK-AMID-HARZ (ALLGEMEINE VORSCHRIFT).....	127
5.4.15	DIC/HOBT KUPPLUNG VON AMINOSÄUREN (ALLGEMEINE VORSCHRIFT).....	127
5.4.16	KUPPELN DES PAM ₂ LANHDA-OH (74) AUF SK ₄ -RAM-HARZ (82A).....	130
5.4.17	KUPPELN DES FMOC ₂ LANHDA-OH (72) AUF SK ₄ -RAM-HARZ (83).....	130
5.4.18	SPALTUNG HARZGEBUNDENER ALLYLESTER (ALLGEMEINE VORSCHRIFT).....	131
5.4.19	KUPPELN DER FETTAMINE AUF FMOC ₂ LAN(OH)-SK ₄ -HARZ (ALLGEMEINE VORSCHRIFT).....	133
5.4.20	VERESTERUNG VON FMOC ₂ LAN(OH)-SK ₄ -HARZ MIT METHANOL (ALLGEMEINE VORSCHRIFT).....	136
5.4.21	FMOC-SCHUTZ HARZGEBUNDENER AMINFUNKTIONEN (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	138
5.4.22	KUPPLUNG DER FETTSÄUREN (ALLGEMEINE VORSCHRIFT).....	138
5.4.23	OXIDATION DES SCHWEFELS ZUM SULFOXID (ALLGEMEINE VORSCHRIFT)	145
5.4.24	OXIDATION DES SCHWEFELS ZUM SULFON (ALLGEMEINE VORSCHRIFT).....	146
6	LITERATUR.....	148
7	ANHANG.....	158
7.1	BERECHNUNG DER HARZBELEGUNG NACH EINEM SYNTHESCHRITT	158
7.2	EI-MS-SPEKTREN DER LANTHIONINE	159
7.3	GC-MS-CHROMATOGRAMME DER LANTHIONIN-DERIVATE (AUSWAHL).....	160
7.4	NMR-ANALYTIK.....	161
7.5	FT-ATR-IR-SPEKTREN	169

Abkürzungsverzeichnis

Für die Aminosäuren wurde entsprechend der Vorschläge der IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9-37] der Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code verwendet.

ACN	Acetonitril
Al	Allyl
AS	Aminosäure
ATR	Attenuated-Total-Reflection
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-
br.	breiter Peak
Bzl	Benzyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEAD	Azodicarbonsäurediethylester
DEE	Diethylether
Dha	Dehydroalanin
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenon
Dhc	S-(2,3-Dihydroxy-propyl)cystein
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diispropylethylamin
DIEA	Diisopropylethylamine
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ES-MS	Electrospray-MS
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol

FCS	Fötales Kälberserum(fetal calf serum)
Fmoc	Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-
Fmoc ₂ LanHda-OH	N ² ,N ⁶ -Bis-(Fmoc)-lanthionin-N ⁷ -hexadecylamid
Fmoc-Cl	Chlorameisensäure-(fluoren-9-ylmethyl)-ester
Fmoc-OSu	Fluorenylmethoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimid
FT-ATR-IR	Fourier-Transform-Attenuated-Total-Reflection-IR
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ion-Cyclotron Resonance-MS
gef.	gefundene Werte
HEK293 Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells) 293
HOBt	1 <i>H</i> -1-Hydroxy-1,2,3-benzotriazol
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-8	Interleukin-8
iPrOH	Isopropanylalkohol
IR	Infrarot
IRAK	IL-Rezeptor-assoziierte Kinase
Lan	Lanthionin
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich repeats
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid)
MALDI-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-MS
MALP-2	mycoplasmales makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2
MAP3K	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MAS-NMR	magic-angle-spinning-NMR
mCPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeOH	Methanol
Mes	Mesyl/Methylsulfonyl
MesCl	Mesylchlorid bzw. Methylsulfonylchlorid
MS	Massenspektrometrie

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid/Thiazolylblau
MyD 88	myeloid differentiation primary response gene (88)
Myr	Myristoyl
NEM	N-Ethylmorpholin
NF- κ B	Necrosis factor - κ B
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Pam	Palmitoyl
Pam ₂ LanHda-OH	N ² ,N ⁶ -Bis-(Palmitoyl)-(2R,6R)-lanthionin- N ⁷ -hexadecylamid
Pam ₃ Cys-OH	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis-(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)- cystein
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster (Pathogen- associated molecular pattern)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PDPI	Polystyroidiphenylphosphin-Iod-Komplex
PEG	Polethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
PRR	Mustererkennender Rezeptor (pattern recognizing receptor)
PS	Polystyrol
quant.	quantitativ
RAM-Harz	Rink-Amid-Harz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecyl-sulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SIMS	Sekundärionen-MS
sPG	lösliches Peptidoglycan
SPOS	Solid-Phase-Organic-Synthesis
SPPS	Solid-Phase-Peptide-Synthesis
Strept-HRP	Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-horse radish peroxidase)

TBAHS	Tertiärbutylammonium-hydrogensulfat
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
tBuOH	<i>tert.</i> Butylalkohol
TEA	Triethylamin
<i>tert.</i>	tertiär
TFE	1,1,1-Trifluormethanol
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
theor.	theroretische / berechnete Werte
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TIRAP	TIR domain containing protein
TIR-Domäne	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TOF	time-of-flight
TRAF-6	Tumor Nekrosis Faktor Rezeptor assoziierten Faktor-6
Trityl	Triphenylmethyl
UV	Ultraviolett
Z	Benzyloxycarbonyl
z. B.	zum Beispiel

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Die Leitstruktursuche ist der erste Schritt in der Wirkstoff- und Arzneimittelforschung ^[1]. Die Miniaturisierung und Beschleunigung der Assaytechnologie und die stetig steigende Zahl der verfügbaren biologischen Targets führte zu einer gesteigerten Anzahl an Verbindungen, die in kurzer Zeit auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden können. Im High-Throughput-Screening - vollautomatischen etablierten Testsystemen - können pro Woche bis zu 100.000 Verbindungen gescreent werden. Die kombinatorische Chemie bietet den synthetisch arbeitenden Chemikern das nötige Handwerkszeug, um diese gesteigerte Nachfrage an synthetischen Verbindungen zu befriedigen. Die Übertragung der Synthesen an die feste Phase und die Ausarbeitung allgemein gültiger Syntheseprotokolle erlauben hier die Synthese von Verbindungsbibliotheken wie auch großer Arrays von Einzelverbindungen durch multiple, parallele Reaktionsfolgen in kürzester Zeit und mit hoher Diversität ^[2;3]. Die Anzahl der in einer Zeiteinheit synthetisierten Verbindungen lässt sich durch die Automatisierung der festphasengebundenen Synthesen zusätzlich steigern.

Die Festphasensynthese wurde bereits 1963 von Merrifield vorgestellt ^[4], jedoch ursprünglich nur für die Synthese von oligomeren Peptiden, Oligosacchariden und Peptoiden durch repetitive Reaktionsfolgen an fester Phase verwendet ^[5-7].

Gerade das Gebiet der festphasengebundenen Peptidsynthese erlebte in den letzten Jahren eine Renaissance. Nie stieg die Zahl der Publikationen betreffend Peptidsynthesen bzw. Peptiden und deren biologische Aktivität so rasant an wie in den letzten zehn Jahren. Dem ursprünglichen Grundsatz, dass Peptide im Organismus metabolisch nicht stabil sind und eine schlechte Bioverfügbarkeit innehaben, stehen heute verbesserte pharmakologische Formulierungen und Carrier-Systeme gegenüber. Für das Gebiet der therapeutischen Peptide wird von vielen Firmen für die kommenden Jahre ein Wachstum von über 15 % pro Jahr prognostiziert ^[8].

Viele der therapeutischen Peptide werden bis heute auf biotechnologischem Weg oder durch Fermentation gewonnen (Insulin, Cyclosporin A). Nicht selten wird eine Möglichkeit gesucht, das isolierte Peptid auf synthetischem Wege herzustellen. Im Falle des Omphalotin A z. B. ist die fermentative Gewinnung mit einem hohen Aufwand verbunden, der in einem derart schlechten Verhältnis zur erlangten Ausbeute steht, dass eine Möglichkeit gesucht wurde, das Omphalotin A auf synthetischem Wege herzustellen^[9]. Dieses Beispiel und die Synthese des Vancomycins^[10] zeigen außerdem deutlich, dass es sich bei der Peptidsynthese nicht wie weitläufig angenommen um simples Knüpfen von Amidbindungen handelt. Vielmehr stellt die Synthese der isolierten Naturstoffe, die oftmals nicht rein peptidisch sind oder ungewöhnliche Aminosäuren enthalten, stets neue und interessante Anforderungen an den synthetisch arbeitenden Chemiker.

Mit der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren (TLR's) und der Zuordnung bakterieller Lipoproteine und Lipopeptide zu den agonistischen Liganden des TLR-2^[11] bekam ein Teilgebiet der Peptidsynthese, die Lipopeptidsynthese, einen neuen Aufgabenbereich: die Suche nach weiteren agonistisch oder sogar antagonistisch wirkenden Lipopeptiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese eines, dem TLR-2 agonistischen Lipopeptid Pam₃Cys-SK₄-OH strukturell eng verwandten Lipopeptids (Pam₂LanHda-SK₄-NH₂) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zunächst drei geeignet geschützte Bausteine, das Fmoc₂Lan(OAll)-OH, das Fmoc₂LanHda-OH und das Pam₂LanHda-OH, in Lösung hergestellt, und später in einer Festphasensynthese zum gewünschten Lipohexapeptid Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ umgesetzt. Nach biologischer Testung der synthetisierten Verbindung und ihrer Identifizierung als TLR-2 Antagonist wurde eine Struktur-Wirkungs-Beziehung bezüglich des Einflusses der Länge der Fettsäure, der Länge des Fettamins, der Stereozentren des Lanthionins und der Oxidationsstufe des Schwefels auf die TLR-2 Aktivität der Verbindungen durchgeführt.

1.2 Kombinatorische Chemie

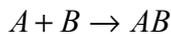
1.2.1 Prinzipien der Kombinatorischen Chemie

Durch die Kombination von lediglich 20 Grundbausteinen, den natürlichen Aminosäuren, ist die Natur in der Lage, eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Peptiden und Proteinen aufzubauen. Dies zeigt sich bereits eindrucksvoll bei der Synthese eines Pentapeptides mit $20^5 = 3,2 \cdot 10^6$ Kombinationsmöglichkeiten der Aminosäuren.

Dieses Prinzip der Kombinatorik wird in der Kombinatorischen Chemie angewandt. Anstatt zwei Edukte (A, B) zu einem einzelnen Produkt umzusetzen, werden ganze Gruppen von Edukt-Bausteinen, die so genannten Building Blocks (A_m, B_n), miteinander kombiniert.

Wird jeder Eduktbaustein A_m separat mit jedem Eduktbaustein B_n umgesetzt, führt dies zu Arrays von Einzelverbindungen. Bei der Umsetzung von definierten Mischungen der Eduktbausteine miteinander erhält man (Sub-)Bibliotheken bzw. Verbindungskollektionen.

Klassische Synthese:



Kombinatorische Synthese:

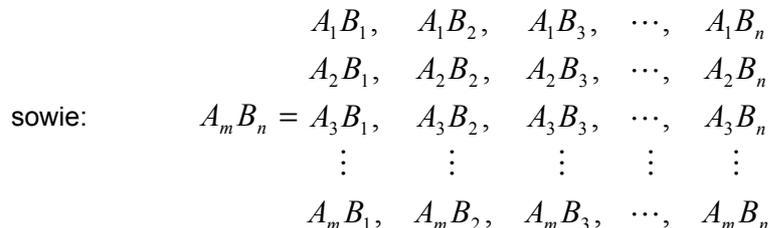


Abb. 1 Schematische Darstellung der klassischen und der kombinatorischen Synthese

1.2.2 Das Prinzip der Festphasensynthese

Das von Merrifield 1963 publizierte Prinzip der Festphasensynthese fand zunächst nur in der Peptid- (SPPS, Solid Phase Peptide Synthesis) und Oligonucleotidsynthese Anwendung^[4]. Erst mit der von Bunin und Ellman im Jahre 1992 vorgestellten Synthese von Benzodiazepinderivaten an fester Phase begann die Festphasen gebundene Synthese nichtoligomerer, organischer Verbindungen^[12]. Dieses Syntheseprinzip etablierte sich als Methode der Wahl zur Synthese kombinatorisch hergestellter Verbindungsbibliotheken^[13-17].

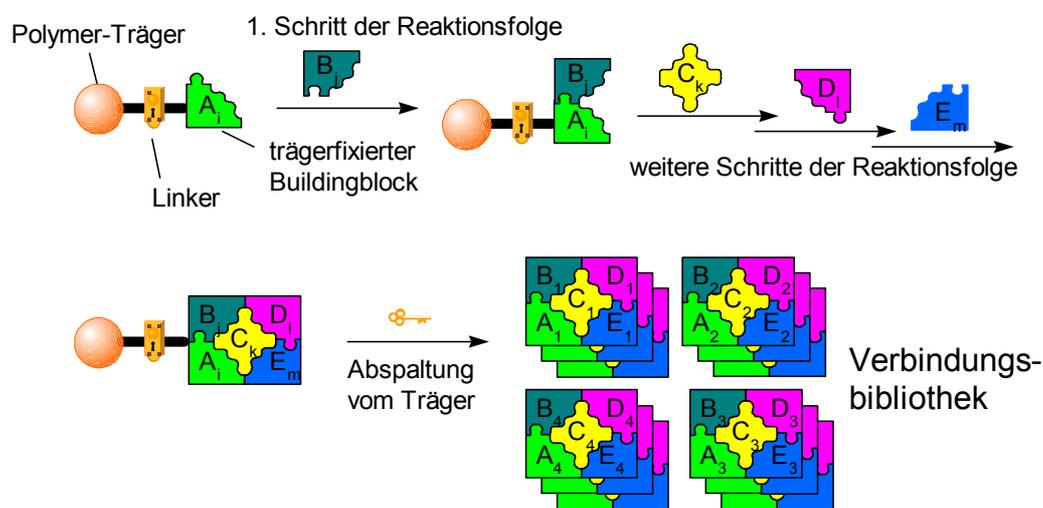


Abb. 2 Schematische Darstellung einer Bibliothekensynthese an fester Phase

Bei der Festphasensynthese wird das Edukt über einen so genannten Linker kovalent an das polymere Trägermaterial gebunden. Im Hinblick auf das Edukt übernimmt der Linker die Funktion einer orthogonalen Schutzgruppe. Diese Edukt-Linker-Bindung soll folglich nur von spezifischen, nicht in der Synthese vorkommenden Bedingungen gespalten werden. Die Linker-Träger-Bindung muss dahingegen unter allen vorkommenden Synthesebedingungen inert sein.

Im Folgenden sind die Vor- und Nachteile der Festphasenchemie gegenüber der klassischen Lösungssynthese aufgeführt.

Vorteile der Festphasenchemie:

- Reaktionsbeschleunigung durch hohe Reagenzienüberschüsse
- Erhöhte Ausbeute und Reinheit pro Reaktionsschritt bedingt durch Reagenzienüberschüsse

- Einfaches Abfiltrieren der Reaktionslösung und Waschen des Polymers mit verschiedenen Lösungsmitteln ersetzt oftmals zeit- und arbeitsaufwändige Reinigungsschritte
- Möglichkeit zur Automatisierung mit hohem Parallelisierungsgrad
- Deutlich vereinfachte Schutzgruppenstrategie, da aufgrund der räumlichen Trennung im Idealfall weder Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Reaktanden noch Quervernetzungen der Produktmoleküle auftreten können (Verdünnungsprinzip kommt zum Tragen)

Nachteile der Festphasenchemie:

- Durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Polymers und des Linkers eingeschränkte Auswahl an Reagenzien und Reaktionsbedingungen
- Zeitaufwändige Ausarbeitung und Optimierung einer Festphasenreaktion, da sich die Synthesebedingungen aus der Lösungssynthese oftmals nicht eins zu eins auf Festphasenreaktionen übertragen lassen
- Analytik während der Reaktion eingeschränkt auf spezielle „on-bead“ Methoden bzw. erfordert die Abspaltung der Zwischenstufe
- Verminderte Reinheiten und Ausbeuten durch unvollständige Umsetzung trotz hoher Reagenzienüberschüsse und die damit verbundene zeitaufwändige Aufreinigung der Verbindungen ^[18]

1.3 Chemie an fester Phase

Nachdem Kapitel 1.2 die Grundzüge der Festphasenchemie erläutert, wird nun näher auf das benötigte Handwerkszeug (Trägermaterial, Linker sowie Analytische Methoden) eingegangen.

1.3.1 Trägermaterialien

Im Gegensatz zu den meisten Synthesen in der organischen Lösungschemie finden die Reaktionen der Festphasenchemie in einem Zwei-Phasen-System statt. Deswegen kommt den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Trägermaterials besondere Bedeutung zu.

Kapazität: Die Kapazität spiegelt die Anzahl der reaktiven Zentren des Trägermaterials wider, an denen ein Substrat immobilisiert werden kann. Sie wird in mmol/g angegeben. Eine hohe Kapazität führt zu einer erhöhten Ausbeute in Bezug auf das eingesetzte Polymer und erleichtert die Analytik an fester Phase. Eine niedrige Kapazität vermeidet unerwünschte Wechselwirkungen und Quervernetzung zwischen zwei immobilisierten Substratmolekülen.

Quellbarkeit: Als Quellbarkeit wird die Volumenänderung eines Trägermaterials in Abhängigkeit des Lösungsmittels bezeichnet ^[19]. Für eine gute Zugänglichkeit der immobilisierten Moleküle muss das Trägermaterial so gewählt werden, dass über den gesamten Syntheseverlauf eine gute Quellbarkeit in dem benötigten Lösungsmittel gewährleistet ist. Zu beachten ist, dass das Quellverhalten des Trägermaterials durch den Linker und das immobilisierte Molekül verändert wird.

Vielseitige Funktionalisierbarkeit: Eine vielseitige und leichte Funktionalisierbarkeit ermöglicht das Anbringen eines breiten Spektrums an Linkern am Trägermaterial. So wird eine hohe Kompatibilität des Trägermaterials für verschiedenste Reaktionsbedingungen erreicht.

Stabilität: Die Stabilität eines Trägermaterials besteht aus drei Bereichen:

Chemische Stabilität: Sie muss gegenüber allen in der Synthesesequenz auftretenden Chemikalien gewährleistet sein. Neben der Art des Trägermaterials wird sie maßgeblich von der Art des Linkers mitbestimmt.

Thermische Stabilität: Um ein breites Anwendungsspektrum des Trägermaterials zu erreichen, sollten Reaktionen über einen möglichst großen Temperaturbereich durchführbar sein.

Druckstabilität: Eine hohe Druckstabilität gestattet eine Anwendung des Trägermaterials bei Durchflussverfahren.

Eine Auswahl der gebräuchlichsten Trägermaterialien der Festphasenchemie ist in **Tab. 1** dargestellt. Weitere Trägermaterialien sind in Büchern über Kombinatorische Chemie aufgeführt ^[2;3].

Tab. 1 Trägermaterialien in der Festphasenchemie

Trägermaterial	Eigenschaften
Styrol-Divinylbenzol-Copolymer (Quervernetzungsgrad: 1 – 2 %) [18;20;21]	<ul style="list-style-type: none"> - gute Quelleigenschaften in DCM, DMF, THF, DMSO, NMP, Pyridin, Dioxan; keine Quellung in MeOH, Wasser, DEE [19] - thermische Stabilität bis ca. 150°C - Beladung 0,5 – 4,5 mmol/g - meistgenutztes Trägermaterial in der SPOS
TentaGel, Pfropfcopolymer aus PS/DVB und Polyethylenglykol (PEG) [18;22-24]	<ul style="list-style-type: none"> - polares Harz; gute Quelleigenschaften in DCM, DMF, THF, DMSO, NMP, Pyridin, Dioxan, Methanol und Wasser; keine Quellung in Ethanol und DEE - Beladung 0,1 – 0,5 mmol/g - schwierig von Wasser zu befreien, enthält oft Salze
Fractogel, Copolymer aus Methacrylat und Vinylalkohol [25]	<ul style="list-style-type: none"> - stabil im Bereich $1 < \text{pH} < 14$ - druckstabil bis 7 bar - thermisch stabil bis 100°C - Beladung 0,01 – 0,125 mmol/g
PolyHIPE (High Internal Phase Emulsion), Copolymer aus PS/DVB und Polydimethylacrylamid [26]	<ul style="list-style-type: none"> - druckstabil, Einsatz in Durchfluss-Peptid-Synthese - Beladung bis 5,0 mmol/g
POEPOP, POEPS; Copolymerisat aus PEG mit Epichlorhydrin (POEPOP) bzw. Vinylbenzylchlorid (POEPS) [27;28]	<ul style="list-style-type: none"> - hohe chemische und mechanische Stabilität - Einsatz insbesondere bei enzymatischen Umsetzungen von polymergebundenen Substraten

Tab. 1 Trägermaterialien in der Festphasenchemie (Fortsetzung)

Trägermaterial	Eigenschaften
Pepsin K oder Macrosorb SPR, Polydimethylacrylamid in Kieselgurmatrix ^[29;30]	- druckstabil, Einsatz in Durchfluss-Peptid-Synthese - Beladung 0,05 – 0,2 mmol/g
PEGA, Polyacrylamid-PEG Copolymer ^[21]	- quellbar auch in polaren Lösungsmitteln - Verwendung für SPOS, Enzymkatalysierte Reaktionen ^[31] sowie „on-bead“ Enzym-Essays ^[32] - Beladung 0,2 – 0,8 mmol/g
Ultra-Hochbeladene Harze, bestehend aus Polyethylenimin, vernetzt mit Terephthalaldehyd ^[33]	- sehr gutes Quellverhalten in Wasser und in organischen Lösungsmitteln - hohe Kapazität und Atomökonomie - schwer zu trocknen
CPG (controlled pore glass), LCAA-CPG (long chain Alkylamine CPG), Silica	- keinerlei Quellung, aber erhältlich in Porengrößen von 25 – 300 nm - hoher Preis - geringe Beladung (LCAA-CPG bis 0,1 mmol/g)

Das bereits von Merrifield eingesetzte, mit 1 – 5 % Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol besitzt die größte Bedeutung in der organischen Festphasensynthese. Hierbei stellt das mit 1 % Divinylbenzol (DVB) quervernetztes Polystyrol den besten Kompromiss zwischen hohem Quellvermögen und mechanischer Stabilität dar. Dem fehlenden Quellvermögen in protischen Lösungsmitteln wie Alkoholen und Wasser und der daraus resultierenden Unzugänglichkeit für Reagenzien kann mit der Zugabe von Co-Solventien, in denen das Polymer ein gutes Quellvermögen aufweist, begegnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Festphasensynthesen an bewährten 1 % DVB/PS-Harzen mit unterschiedlicher Beladung und verschiedenen Linkern durchgeführt.

1.3.2 Linkermoleküle

Die Verbindungsmoleküle zwischen dem Polymer und dem immobilisierten Substrat, die so genannten Linker ^[34], sind in der Regel bifunktionelle Moleküle. Über die erste Funktionalität erfolgt die irreversible Anbindung des Linkers an das Polymer, die zweite Funktionalität dient der reversiblen Immobilisierung des Substratmoleküles.

Wegen der hohen Varianz der an den Linker gestellten physikochemischen Anforderungen in Abhängigkeit von der durchgeführten Synthese kommt der Auswahl des Linkers in der Festphasenchemie eine zentrale Rolle zu. Als Anforderungen stellen sich:

- einfache Substratimmobilisierung
- Stabilität gegenüber allen in der Synthese auftretenden Reaktionsbedingungen
- keine verfrühte Abspaltung des Substrats
- selektive, zerstörungsfreie Abspaltung des Substrats vom Harz

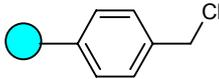
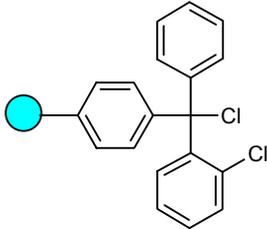
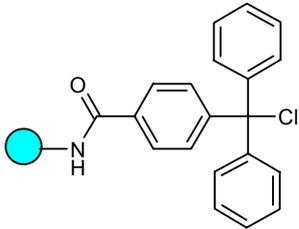
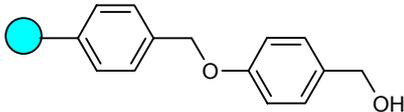
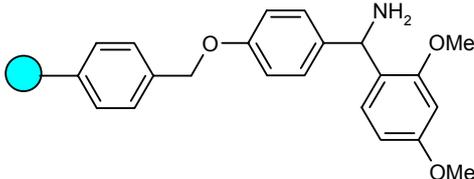
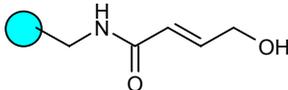
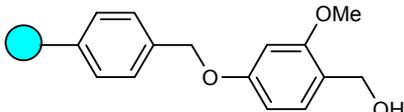
Seit Jahren ist eine Vielzahl von Linkern bekannt, die sich sowohl in den Bedingungen zur Substratimmobilisierung und Produktabspaltung als auch in ihrer Toleranz gegenüber verschiedenen Reaktionsbedingungen unterscheiden. Teilweise wurden Linker auf die Erfordernisse einer bestimmten Reaktion hin entwickelt.

Eine Einteilung der Linker erfolgt in der Regel nach den Abspaltbedingungen in

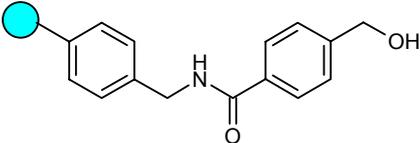
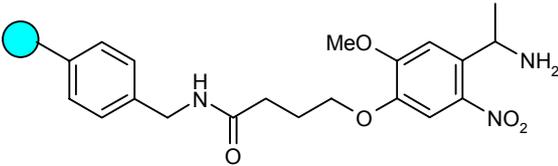
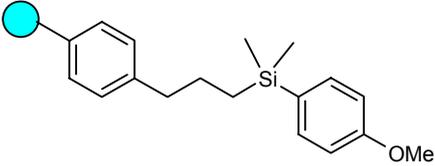
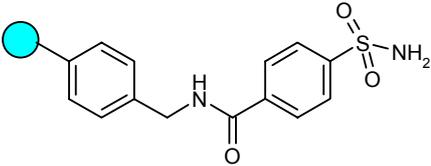
- säurelabile Linker (Abspaltung unter sauren Bedingungen)
- basenlabile Linker (Abspaltung unter basischen Bedingungen)
- photolabile Linker (Abspaltung durch Bestrahlen mit UV-Licht geeigneter Wellenlänge)
- Allyl-Linker (Abspaltung mit Pd(PPh₃)₄)
- Silyl-Linker (Abspaltung ohne Verbleib einer funktionellen Gruppe am Produkt; sog. „traceless“-Linker).
- „Safety-Catch“-Linker (vor der Abspaltung des Produkts muss der Linker in eine labile Form überführt werden)

In **Tab. 2** sind einige Vertreter der oben genannten Klassen an Linkern aufgelistet.

Tab. 2 Auswahl an Linkern der Festphasenchemie

Linker	Eigenschaften
 <p>Chlormethyl-Linker ^[35]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbonsäuren und Phenolen - Abspaltung mit HF, TFMSA, BF₃·Et₂O
 <p>2-Chlorotriptylchlorid-Linker ^[36]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Aminen, Alkoholen, Carbonsäuren, Hydrazinen, Phenolen und Thiolen - Abspaltung mit 1 – 10 % TFA/DCM, Eisessig, Hexafluorisopropanol 20 % TFE/DCM
 <p>TCP-Linker</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung wie 2-Chlorotriptylchlorid-Linker - Abspaltung mit 1 – 10 % TFA/DCM, Eisessig, Hexafluorisopropanol, 20 % TFE/DCM; etwas säurestabiler als der 2-Chlorotriptylchloridlinker
 <p>Wang-Linker ^[37]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbonsäuren und Phenolen - Abspaltung mit 20 – 40 % TFA/DCM
 <p>Rink-Amid-Linker; RAM-Linker ^[38]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbon- und Sulfonsäuren - Abspaltung mit 20 – 95 % TFA/DCM zum entsprechenden Säureamid
 <p>HYCRAM (Hydroxycrotonylamido)-Linker ^[39]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbonsäuren - Abspaltung mit Pd(PPh₃)₄
 <p>SASRIN-Linker (Super Acid Sensitive Resin) ^[40]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbonsäuren und Phenolen - Abspaltung mit 0,5 % TFA/DCM

Tab. 2 Auswahl an Linkern der Festphasenchemie (Fortsetzung)

Linker	Eigenschaften
 <p>HMBA (Hydroxymethylbenzoesäure)-Linker ^[41]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbonsäuren - Abspaltung mit Nucleophilen wie Aminen, Hydrazinen, Alkoholaten als entsprechendes Carbonsäurederivat
 <p>Aminoethyl-Photolinker ^[42]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbonsäuren - stabil gegenüber Piperidin und TFA - Abspaltung durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) als Carbonsäureamid
 <p>Silyl-Linker ^[43]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Aktivierung mit HCl zu R_3SiCl - Immobilisierung von Lithiumorganen - Abspaltung mit Bu_4NF, TFA
 <p>4-Sulfamylbenzoyl-Linker ^[44-46]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Immobilisierung von Carbonsäuren - nach Aktivierung mit Diazomethan oder Iodacetonitril: Abspaltung durch Nucleophile als Carbonsäurederivate

1.3.3 Analytik in der Festphasenchemie

Die Analytik polymergebundener Produkte erfordert spezielle Methoden. An fester Phase erfolgt eine Analytik erst nach Beendigung des Reaktionsschrittes und Abspalten einer kleinen Probemenge Harz. Allerdings ist dieses Prozedere zeitaufwändig, und häufig sind einzelne Zwischenstufen gegenüber den Abspaltbedingungen nicht stabil.

Zur Lösung dieses Problems gibt es mittlerweile eine Reihe von „on-bead“-Analysemethoden. Zum Beispiel in der Peptid- und Oligonucleotidsynthese: Hier existieren standardisierte Methoden zur Bestimmung der Umsetzung mittels UV-spektrometrischer Quantifizierung des Fmoc- bzw. Trt-Abspaltungsproduktes der letzten gekuppelten Aminosäure bzw. des letzten gekuppelten Nucleotids. Edman-Sequenzierungen sind am polymeren Träger ebenfalls möglich.

Im Folgenden sind die wichtigsten „on-bead“-Analyseverfahren zusammengefasst und kurz erläutert.

Elementaranalyse: Sie dient überwiegend der Analyse von Stickstoff, Schwefel und Halogenen ^[47]. Außerdem benutzt man sie zur Beladungsbestimmung oder zum Nachweis beispielsweise der Vollständigkeit von Halogensubstitutionen.

Farbreaktionen: Die breiteste Verwendung findet sicherlich der Kaiser-Test ^[48]. Der aus der Reaktion von Ninhydrin mit primärem Amin entstehende tiefblaue Farbstoff wird z. B. zur Überprüfung der Vollständigkeit von Aminosäurekupplungen oder anderen Acylierungen in der SPPS verwendet. Andere, weniger angewandte Tests dienen dem Nachweis von z. B. sekundären Aminen ^[49], Alkoholen ^[50;51], Aldehyden ^[52] und Carbonsäuren^[53].

FT-ATR-IR-Spektroskopie: Bei der ATR-IR-Technik müssen keine KBr-Presslinge hergestellt werden und die Harzbeads können direkt in der Messung eingesetzt werden. Deswegen ist ATR-IR eine schnelle und aussagekräftige Methode zur qualitativen Bestimmung einer Reihe von funktionellen Gruppen mit charakteristischen Absorptionen am polymeren Träger ^[54;55]. Durch FT-ATR-IR-Spektroskopie und FT-IR-Mikroskopie ist darüber hinaus die Vermessung einzelner Harzkugeln möglich ^[56-59]. Durch Bildung von Differenzspektren zwischen belegtem und unbelegtem Harz lassen sich störende Polymerbanden beseitigen.

Gravimetrische Analyse: Hierbei handelt es sich um eine bei kleinen Harzmengen eher ungenaue Methode, die hauptsächlich zur Beladungsbestimmung herangezogen wird.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie: Bei Verwendung photolabiler Linker kann mittels MALDI-TOF-MS eine direkte MS-Analytik des polymergebundenen (Zwischen)Produkts erfolgen ^[60]. Nicht photolabil gebundene Substrate lassen sich mittels TOF-SIMS direkt analysieren ^[61].

NMR-Spektroskopie: Das Harz wird bei der Gelphasen-NMR-Spektroskopie in einem geeigneten Lösungsmittel suspendiert und wie eine flüssige Probe vermessen ^[62;63], wobei sich nur Kerne mit einer großen chemischen Verschiebung (¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ³¹P)

vernünftig vermessen lassen. Aufgrund der starken Linienverbreiterung sind ^1H -NMR-Spektren schlecht interpretierbar. Besser aufgelöste ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren erhält man durch Aufnahme von MAS-NMR-Spektren ^[64-67]. Unter optimalen Bedingungen werden ^1H -NMR-Spektren von guter Qualität aufgenommen.

UV/VIS-Spektroskopie: Bei Kupplung von Fmoc-geschützten Aminosäuren besteht die Möglichkeit nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe über eine photometrische Bestimmung des Fmoc-Gehaltes die Beladung zu bestimmen.

Die Fortschritte auf diesem analytischen Sektor verdeutlicht sehr eindrucksvoll die von Grice et al. durchgeführte, vollständige „on-bead“-Charakterisierung eines Festphasen-Syntheseproduktes mittels FT-IR, ^1H -NMR und ^{13}C -NMR ^[68].

Üblicherweise spaltet man die Syntheseprodukte vom Harz ab und charakterisiert sie mit HPLC und ES-MS. NMR-Analytik findet aufgrund des großen Probenaufkommens in der Kombinatorischen Chemie trotz der Möglichkeit der Einzelbead- und Durchfluss-NMR-Analysen ^[69] nicht bei jeder, sondern nur bei repräsentativen Proben Anwendung.

Zur Bestimmung von Summenformeln ersetzt man die Elementaranalysen in zunehmendem Maße durch hoch aufgelöste und extrem massengenaue ES-FT-ICR-MS-Spektren ^[70;71].

Die Analyse von Verbindungsmischungen erfolgt durch den Einsatz von Hochdurchsatz-HPLC-MS-Kopplung ^[3;72-75].

1.4 Lanthionin

Lanthionin (**1**), von Horn et al. 1941 erstmals als Artefakt in alkalischen Woll-Hydrolysaten beschrieben, ist eine natürlich vorkommende Dicarboxy-Diaminosäure mit zwei Stereozentren ^[76]. Aufgrund der Molekül-Symmetrie existieren nur drei Stereoisomere: (2R,6R)-Lanthionin (L-Lanthionin), (2S,6S)-Lanthionin (D-Lanthionin) und (2R,6S)-/(2S,6R)-Lanthionin (*meso*-Lanthionin; D,L-Lanthionin). Durch die höhere Priorität des Schwefels kehrt sich hier die Konfigurationsbezeichnung in der R/S-Nomenklatur im Vergleich zu anderen Aminosäuren um (L-Serin $\hat{=}$ (S)-Serin aber L-Cystein $\hat{=}$ (R)-Cystein. Bei natürlich vorkommendem Lanthionin handelt es sich in den meisten Fällen um (2S,6R)-, also *meso*-Lanthionin ^[77-79].

Lanthionin findet sich jedoch nicht nur in Wolle, sondern auch im menschlichen Haar ^[80], in Federn ^[81], Hühnerembryos ^[82] und epidermalem Keratin ^[83]. Von großer Bedeutung war auch die Entdeckung des Lanthionins in kataraktösen Linsen des menschlichen Auges (Grauer Star). Man vermutet, dass der photo-oxidative Abbau von Cystin zu Lanthionin in einer Zunahme der Proteinvernetzung resultiert, damit zu einer erhöhten Rigidität und folglich zur Verhärtung der Linse führt ^[84].

Lanthionin ist der entscheidende strukturbildende Bestandteil in natürlich vorkommenden bioaktiven Peptiden, den so genannten Lantibiotica ^[77;79]. Zu dieser Klasse von Verbindungen gehören z. B. Nisin, ein bedeutendes Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie; Epidermin, ein Therapeutikum für Akne sowie eine Vielzahl von Enzyminhibitoren und immunologisch aktiven Peptiden wie Ancovenin, Duramycin, Mersacidin und Actagardin. Einen guten Einblick in das breite Feld der Lantibiotica gibt Jung et al. ^[79;85].

Neben der Nutzung in der Lebensmittel-, Leder- ^[86] und Seiden- ^[87] Industrie wird Lanthionin in der Forschung als Cystin-Mimetikum verwendet. Ösapay et al. ersetzen in Sandostatin, einem Somatostatinanalogon, Cystin durch Lanthionin, wodurch die Rezeptorselektivität und die Stabilität gegenüber enzymatischer Zersetzung gesteigert wurde ^[88].

1.4.1 Synthese von Lanthionin

Mit dem Nachweis von Lanthionin in natürlich vorkommenden Proteinen und Peptiden begann die Suche nach einer Möglichkeit, Lanthionin in unterschiedlicher Konfiguration zu synthetisieren. In historischen Synthesen wurde es durch die Kondensation von Cystein mit β -Chloralanin ^[89], Reaktion von Natriumphthalimidomalonsäureester mit Bis-(Chlormethyl)sulfid ^[90;91] und Michael-Addition von Cystein an N-Acetyl-dehydroalanin hergestellt. Die Idee sowohl der Kondensation von Cysteinen an β -Halogenalanine (**2**) als auch der Michael-Addition von Cysteinen an Dehydroalanine (**3**) ist noch heute Basis von Lanthionin-Synthesen in Lösung als auch an fester Phase.

Einen guten neueren Überblick über die möglichen Synthesen von Lanthionin, Methyllanthionin und Lanthionin-Peptiden bietet Süssmuth et al. ^[77]. Die im Folgenden vorgestellten Synthesemethoden für Lanthionin sind in **Abb. 3** skizziert.

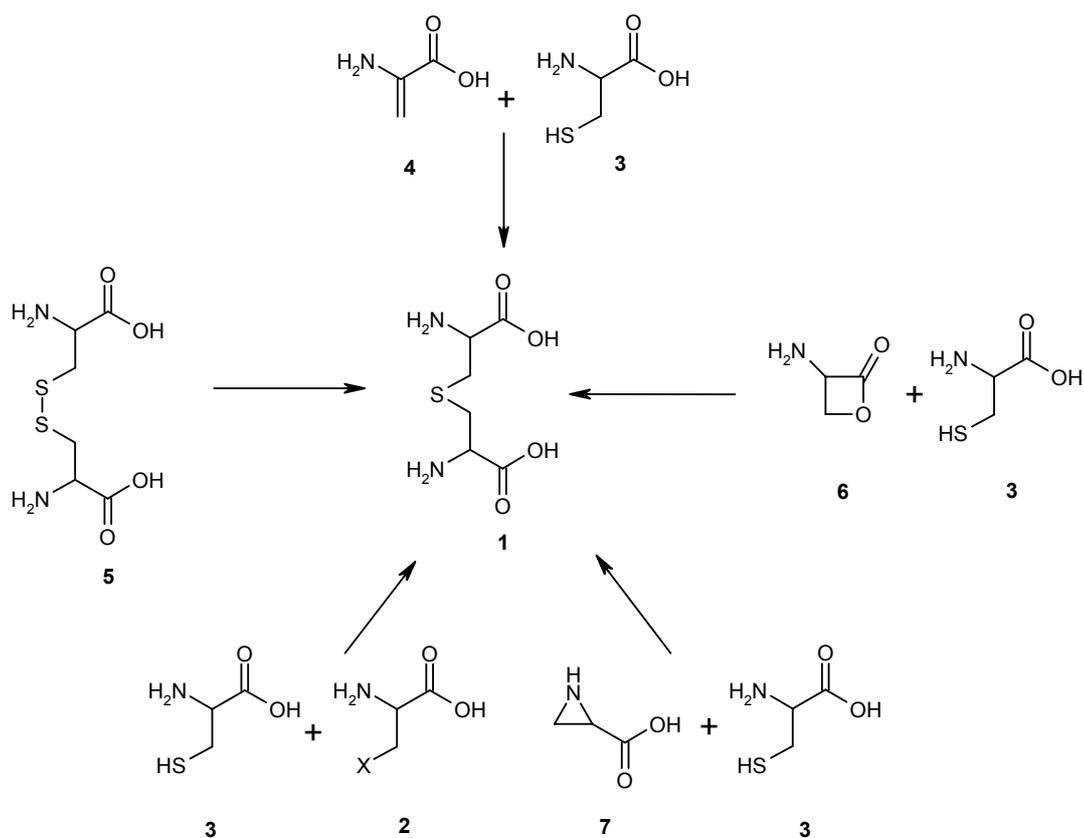


Abb. 3 Möglichkeiten der Lanthionin-Synthese ^[77]

1.4.1.1 **Synthese via Dehydroalanin (3)**

Eine von Probert et al. vorgestellte Synthese von, für die Festphasensynthese geeignetem Lanthionin basiert auf der Michael-Addition von Fmoc-(R)-Cys-OAllyl an Boc-Dha-OMe in Acetonitril unter Anwesenheit einer katalytischen Menge an Cesiumcarbonat (Ausbeute 72 %) ^[92]. Das entstehende Diastereomergemisch 2R,6S und 2R,6R muss über RP-HPLC getrennt werden.

Für die Generierung des Dehydroalanins gibt es mehrere Möglichkeiten:

- β -Eliminierung von O-tosylierten- bzw. O-diphenylphosphorylierten Serinen und Threoninen ^[93]
- Hoffman-Abbau von α , β -Diaminopropionsäure ^[94]
- Reaktion von Serin und Threonin mit DIC/CuCl ^[95]
- Dehydratisierung von Z-Ser-OMe durch Kochen in Methanol/HCl ^[96]
- Dehydratisierung von Serin mit N,N'-Disuccinimidylcarbonat (DSC) ^[97]

Die von Matteucci et al. vorgestellte Festphasensynthese eines B-Ring-Analogons des Nisins beruht ebenfalls auf einer Michael-Addition ^[98]. Als Dehydroalanin-Precursor wird S-Methylcystein in die Peptidkette eingebaut und mit 60 % H₂O₂ in Wasser / Ethanol / Scandiumtrifluormethansulfonat selektiv zum Sulfoxid umgesetzt. Nach Eliminierung zum Dehydroalanin mit DBU in DCM / Methanol und anschließender Trityl-Entschützung des Cysteins wird mit 10 % DBU in DMF zum Lanthionin zyklisiert. Die Zyklisierung innerhalb der Peptidkette verläuft in diesem Fall enantioselektiv.

1.4.1.2 **Synthese via Cystin (5)**

Die Entschwefelung der Disulfidbrücke des Cystins (**5**) mittels Aminophosphinen ermöglicht die Synthese enantiomerenreiner Lanthionin-Derivate ^[99;100]. Entschwefelungsreagenz ist Tris(diethylamino)phosphin. Bei 25fachem Überschuss an P(NEt₂)₃ verläuft die Entschwefelung verglichen mit anderen Phosphinen wie PBu₃, P(C₆H₅)₃, P(OC₆H₅)₃, P(NMe₂)₃ am effektivsten ^[101]. In Untersuchungen zur Lösungsmittelabhängigkeit der Entschwefelung erwies sich DMF als das beste Lösungsmittel. In THF, Benzen, CHCl₃, EtOAc, ACN und Dioxan wurde die Eliminierung zum Dehydroalanin begünstigt ^[102].

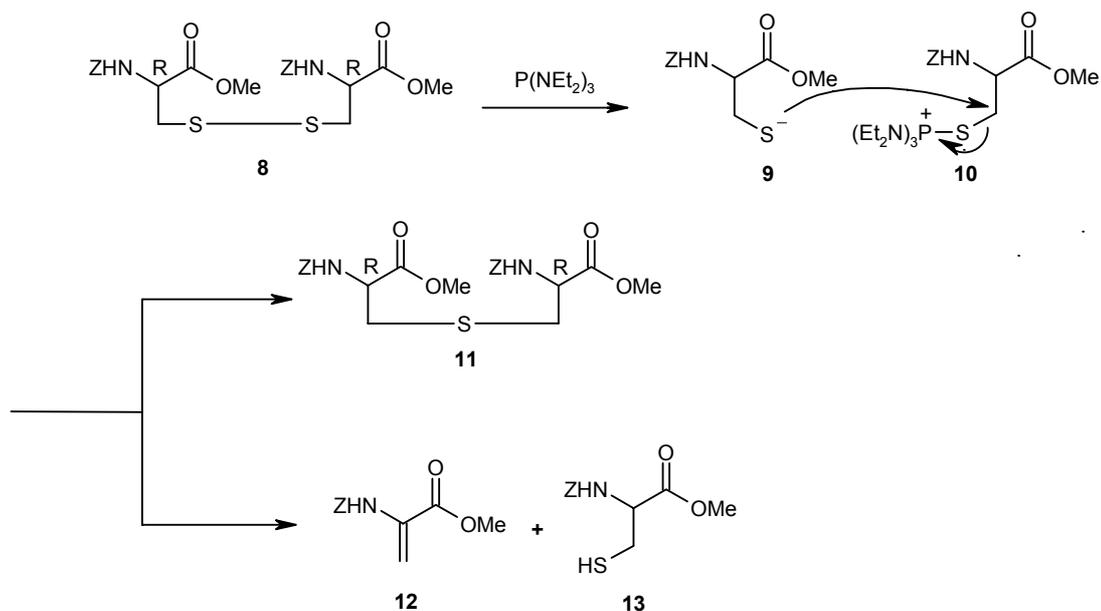


Abb. 4 Mechanismus der Cystin Entschwefelung^[102]

In **Abb. 4** ist die Synthese eines symmetrisch substituierten Lanthionins (**11**) dargestellt^[102]. Eine direkte Synthese von unterschiedlich substituierten Lanthioninen führt wegen der auftretenden ionischen Zwischenprodukte (**9**) und (**10**)^[100;102] zu einem Gemisch, das aus zwei symmetrisch substituierten und einem unsymmetrisch substituierten Lanthionin^[99] besteht. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, zeigt **Abb. 5**^[101].

Der Nachteil dieser Synthesemethode wird deutlich in den beiden ungeschützten, und

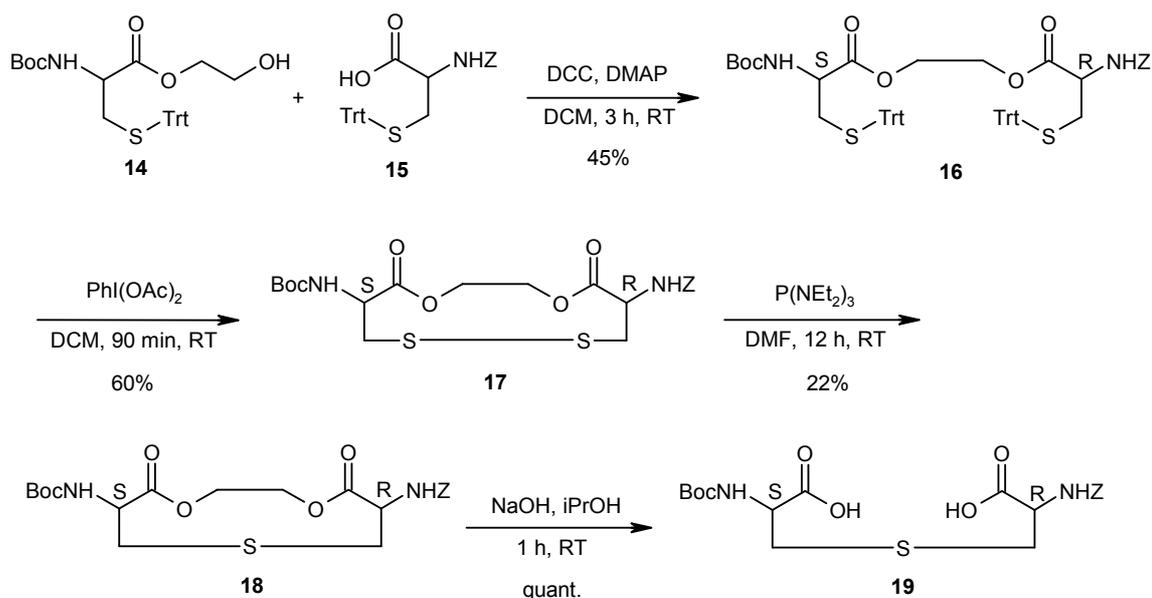


Abb. 5 Synthese eines unsymmetrisch substituierten Lanthionins über Entschwefelung eines Cystins^[101]

somit nicht einzeln adressierbaren Carboxy-Funktionen des entstehenden Lanthionins (**19**). Eine weitere Nutzung des auf diese Weise synthetisierten Lanthionins für den Aufbau von Peptiden ist somit unmöglich.

Swali et al. verweisen auf Probleme bei der Umsetzung dieser Synthesemethode ^[103]. Dehydroalanin blieb trotz optimierter Reaktionsbedingungen das Hauptprodukt ^[92]. Im Gegensatz hierzu gelang Shiba et al. mit dieser Methode die aufwendige Totalsynthese des Lantibiotikums Nisin ^[104]. Shiba et al. synthetisierte einzelne Lanthioninring-Fragmente, die anschließend aneinander kondensiert wurden.

1.4.1.3 *Synthese via β -Lactone (6)*

Die regioselektive Ringöffnung von N-geschützten Serinlactonen (**6**) mit Cystein-thiolat ^[105-107] bietet eine einfache Möglichkeit, enantiomerenreine Lanthionine jeder gewünschten Konfiguration zu synthetisieren ^[105]. Problematisch erweist sich die mit der Ringöffnung zum Thioether konkurrierende Ringöffnung zum Thiolester ^[88]. Je nach eingesetztem Lacton finden sich trotz optimierter Reaktionsbedingungen nur Ausbeuten von knapp 50 %. Eine weitere Schwierigkeit dieser Synthesemethode stellte sich Probert et al. bei dem Versuch, orthogonal geschütztes Lanthionin als Building Block für die Festphasensynthese zu synthetisieren ^[92]. Das eingesetzte Serinlacton ließ sich in Vorversuchen mit Boc- bzw. Z-(R)-Cysteinmethylester (Acetonitril, 1 eq Cesiumcarbonat) in 48 %iger Ausbeute zum gewünschten Lanthionin öffnen. Die Ringöffnung mit Fmoc-(R)-Cysteinallylester gelang jedoch trotz breiter Variation der Reaktionsbedingungen (pH, Base, Lösungsmittel) nicht: Das Cystein bzw. das Lacton zersetzte sich bei allen getesteten Bedingungen.

1.4.1.4 *Synthese via Aziridin (7)*

Ursprünglich wurde die Ringöffnung von Aziridin (**7**) mit Cystein (**3**) in der Gegenwart von $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ für die Synthese von Thioethern durch Ringöffnung mit unterschiedlichen Alkylthiolen genutzt (Ausbeuten 50-90 %). Jedoch gelingt die Umsetzung von Z-(R)-Cys-OBzl mit N-Z-(R)-Aziridin-2-carboxylat zum symmetrischen Lanthionin nur mit Ausbeuten von 12-37 % bei Reaktionszeiten von 2-5 Tagen ^[108]. Die Aziridine werden über einen intramolekularen, nukleophilen Angriff aus den entsprechenden Serin- bzw. Threoninderivaten hergestellt ^[109-111]. Aziridine finden sich als Nebenprodukt in der

Lanthionin-Synthese aus β -Iodalaninen, wo sie eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des unerwünschten Nebenprodukts Norlanthionin einnehmen.

1.4.1.5 **Synthese via Halogenalanine (2)**

Die erste, im Jahre 1940 von du Vigneaud und Brown durchgeführte Lanthionin-Synthese beruhte auf der Umsetzung von (R)- β -Chloralanin mit (R)-Cystein ^[89;112]. Bei dieser Reaktion findet jedoch nicht wie anzunehmen eine Substitution des Chlors statt, sondern das β -Chloralanin eliminiert bei den stark basischen Bedingungen zum Dehydroalanin, das anschließend mit Cystein in einer Michael-Addition zum racemischen Lanthionin reagiert. Möglichkeiten für die β -Chloralanin Synthese:

- Umsetzung von Serin mit Phosphorpentachlorid (82 % Ausbeute) ^[113]
- Umsetzung von Cystin mit Chlor (68 % Ausbeute) ^[114]

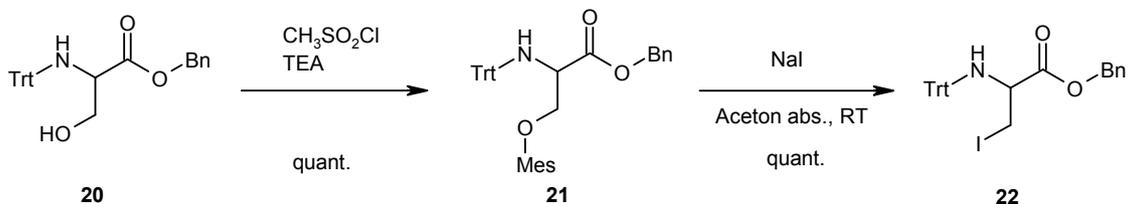
Dugave et al. verwendeten anstelle des β -Chloralanins β -Iodalanin ^[115]. Durch die leichtere Substituierbarkeit des Iods im Vergleich zu Chlor sind bei der Umsetzung zum Lanthionin keine stark basischen Bedingungen nötig, was die Substitution in den Vordergrund rückt. Eine Michael-Addition an das als Nebenprodukt entstehende Dehydroalanin wurde nicht festgestellt.

Ausgehend von N-Trityl-serinbenzylester (**20**) synthetisierten Dugave et al. den O-(Methylsulfonyl)-N-trityl-serinbenzylester (**21**), der in das entsprechende β -Iodalanin (**22**) umgewandelt wurde (**Abb. 6**) ^[116]. Die N-terminale Tritylschutzgruppe verhinderte eine Abstraktion des α -Protons. Folglich konnte keine Eliminierung beobachtet werden. Der Einsatz anderer Schutzgruppen führte im Hauptprodukt zu Dehydroalanin. Die eigentliche Synthese des Lanthionins erfolgte durch Umsetzung des synthetisierten β -Iod-N-trityl-alaninbenzylesters mit N-Fmoc-cystein-*tert.*-butylester in Gegenwart von Cs₂CO₃ in DMF mit Ausbeuten von 88 % und einem Enantiomerenüberschuss von >98 % ee ^[115].

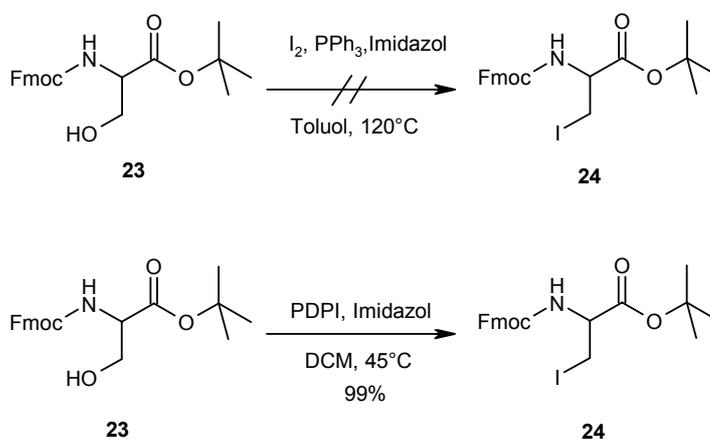
Eine Synthese für das N-Fmoc-geschützte β -Iodalanin (**24**) wurde von Jobron et al. vorgestellt ^[117]. Jobron zeigte zunächst, dass die direkte Umsetzung mit Triphenylphosphin, Iod und Imidazol in Toluol nicht zum erhofften Produkt führte. Erst der Einsatz eines Polystyroidiphenylphosphin-Iod Komplexes brachte den gewünschten Erfolg.

Gair et al. stellten eine weitere Synthesemethode für β -Iodalanin vor, die ohne den Einsatz des teuren, polymergebundenen Diphenylphosphins auskommt ^[118]. Analog der Synthese von Jobron et al. wird das Serin (**25**) mit Methyltriphenoxyphosphonium Iodid direkt in das gewünschte β -Iodalaninderivat (**26**) konvertiert.

Dugave et al.



Jobron et al.



Gair et al.

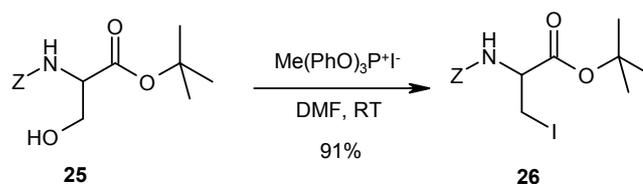


Abb. 6 Unterschiedliche Synthesewege für β -Iodalanin

Swali et al. verwendeten die von Dugave et al. publizierten Methoden für ihre Lanthioninsynthese. Ausgehend von β -Iod-N-trityl-alaninylester und N-Fmoc-cystein-*tert.*-butylester erhält man in Anwesenheit von Cs_2CO_3 in DMF mit 75 %iger Ausbeute das entsprechende Lanthionin ^[103].

Der Versuch von Mustapa et al., diese Synthesemethode auf für die Festphasensynthese geeignet geschützte Ausgangsverbindungen umzustellen, führte zu einem überraschenden Ergebnis^[119;120]. Neben dem gewünschten Lanthionin (**30**) entstand Norlanthionin (**32**) in einem Verhältnis von 1:2. Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Bildung des β -Iodalanins nicht nur über den direkten Angriff des Iodid an O-Mesylserin (**27**) erfolgt (**Abb. 7**). Das als Nebenprodukt auftretende Aziridin (**28**) kann durch Iodid auf zwei Wegen geöffnet werden. Der β -Angriff (**29**) ist hierbei reversibel, während der α -Angriff des Iodids (**31**) irreversibel verläuft. Eine direkte Öffnung des Aziridins mit Cysteins zum Lanthionin (**30**) war nicht nachweisbar.

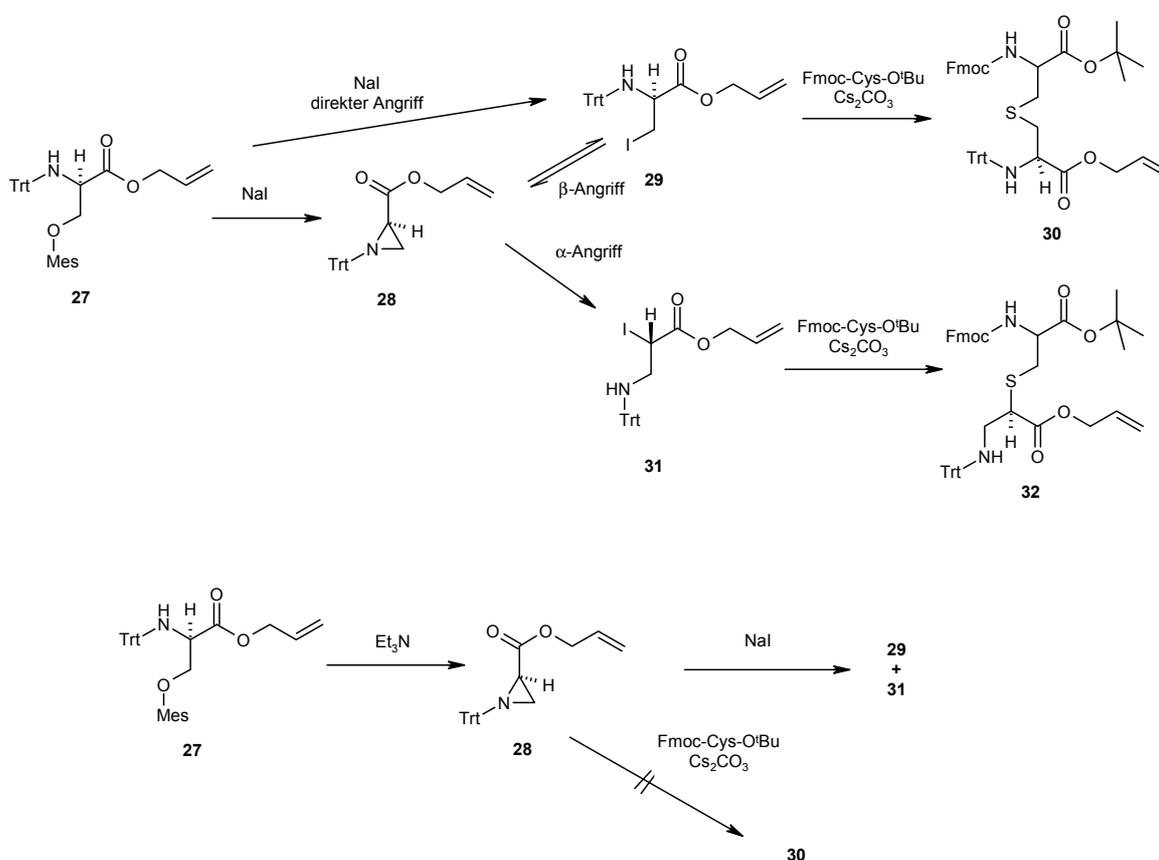


Abb. 7 Mechanismus der Norlanthioninbildung^[119;120]

Diese Ausführungen zeigen deutlich, dass es keine, auf jedes Problem anwendbare, allgemein gültige Lanthionin-Synthese gibt. Jede der möglichen Lanthionin-Synthesen weist deutliche Nachteile auf. Entweder ist sie nicht enantioselektiv oder wurde von mehreren Arbeitsgruppen mit stark unterschiedlichen Ergebnissen eingesetzt, noch liefert sie das gewünschte Lanthionin bzw. dieses in für die Festphasensynthese ungeeigneter

Form. Diese Gründe und die Schwierigkeiten bei eigenen Versuchen der Lanthionin-Synthese führten zu dem Entschluss, eine Lanthionin-Synthese mit einfacher zugänglichen und stabileren Zwischenstufen zu entwickeln.

1.5 Toll-like Rezeptoren

Eine der faszinierendsten Fragen der Immunologie ist, wie ein Wirtorganismus die Anwesenheit eines infektiösen Agens erkennt und den „Eindringling“ beseitigt, ohne dabei eigenes Gewebe in Mitleidenschaft zu ziehen. Als Antwort haben sich in multizellulären Organismen mehrere ausgeprägte Immunsysteme entwickelt. Bei Wirbeltieren lassen sich diese Systeme im Allgemeinen in das angeborene und das erworbene Immunsystem unterteilen.

Das erworbene Immunsystem basiert auf der Erzeugung eines zufälligen und hoch diversen Repertoires von Antigenrezeptoren - den T- und B-Zellrezeptoren (TCR und BCR) – gefolgt von klonaler Selektion und Verbreitung der Rezeptoren mit der relevanten Spezifität. Trotz der hohen Anpassungsfähigkeit, die dieses System garantiert, hat es zwei entscheidende Nachteile. Zum einen können die zufällig generierten Antigenrezeptoren nicht den Ursprung und den biologischen Kontext des Antigens erkennen, zum anderen müssen bei der klonalen Verteilung eines Antigenrezeptors die Zellen proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren, bevor sie ihren Beitrag an der Immunantwort leisten können. Daraus resultiert die Zeitverzögerung – typischerweise 4-7 Tage -, mit der das erworbene Immunsystem auf das Antigen reagiert. Die Bekämpfung eines sich schnell reproduzierenden mikrobiellen Eindringlings ist mit einer derartigen Verzögerung unmöglich.

Allerdings ist an der Immunantwort nicht nur das erworbene, sondern auch das - evolutionär gesehen viel ältere und universellere - angeborene Immunsystem beteiligt. Sämtliche Aspekte der erworbenen Immunantwort werden von einer Kombination aus erlaubenden und anweisenden Signalen von ihm gesteuert.

Die Entdeckung von antimikrobiellen Peptiden und dendritischen Zellen sowie Studien über das Immunsystem von Pflanzen und Invertebraten haben einen großen Beitrag zum heutigen Verständnis des angeborenen Immunsystems geleistet. Die hieraus resultierende Entdeckung und Charakterisierung der Toll-like Rezeptoren (TLR's) als Muster

erkennende Rezeptoren (PRR's; pattern recognizing receptors) des angeborenen Immunsystems eröffnete ein neues und spannendes Forschungsgebiet.

Viele Stoffwechselwege und individuelle Erbgutprodukte finden sich nur in Mikroorganismen, nicht in Wirtszellen. Einige dieser Stoffwechselwege sind überlebenswichtig für die Mikroorganismen. Ihre Produkte lassen sich in allen Mikroorganismen einer bestimmten Klasse nachweisen. Beispielsweise werden Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan und Lipoteichonsäuren (LTA's; lipoteichoic acids) von Bakterien produziert, nicht von eukaryotischen Zellen. Folglich können diese Produkte als molekulare Signatur von mikrobiellen Eindringlingen gesehen werden, deren Erkennung durch das angeborene Immunsystem eine Infektion signalisiert ^[121;122]. Eine spezifische Erkennung beruht jedoch nicht auf dem kompletten Stoffwechselprodukt. Vielmehr werden einzelne, in einer Mikroorganismenklasse unveränderliche Teile dieser Stoffwechselprodukte durch die PRR's erkannt. Die veränderlichen Teile spielen hierbei keine Rolle. Der von TLR-4 spezifisch erkannte Lipid-A Teil des LPS ist ein Beispiel für ein solches invariantes Muster, das in allen Gram-negativen Bakterien gefunden wird und für den entzündungsfördernden Effekt des LPS verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu ist der O-Antigen Teil des LPS bei verschiedenen Klassen von Bakterien unterschiedlich. Die für die Erkennung wichtigen Muster können bestimmten Pathogenen zugeordnet werden, woraus der Name pathogen-assoziiertes molekulares Muster (PAMP's; pathogen-associated molecular patterns) abgeleitet wird. Bei einem Großteil der den PAMP's zugeordneten PRR's handelt es sich um Toll-like Rezeptoren. Die Induktion einer TLR vermittelten Signaltransduktion durch ein PAMP resultiert folglich in einer vom angeborenen Immunsystem gesteuerten Immunantwort.

Ungeklärt ist, wie das Immunsystem zwischen pathogenen und symbiotischen Mikroorganismen unterscheidet. Als gesichert gilt, dass die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems hoch spezifisch zwischen Selbst- und Nicht-Selbst-Pathogenen unterscheiden ^[123].

1.5.1 Aufbau der Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren setzen sich aus einer extrazellulären und einer zytoplasmatischen Region zusammen. Aufgrund der Homologien in der zytoplasmatischen Region werden sie

zusammen mit den IL-1 Rezeptoren (IL-1R's) zu einer Rezeptorfamilie zusammengefasst. Die für alle TLR's und IL-1R's konservierte Region von ~200 Aminosäuren innerhalb der zytoplasmatischen Region wird Toll/IL-1R (TIR)-Domäne genannt. Sie beinhaltet drei konservierte Bereiche, die für die Signalgebung entscheidend sind. Die Auswertung der Kristallstrukturen der TIR-Domänen von humanem TLR-1 und TLR-2 ergab ^[124], dass das durch eine Punktmutation ausgelöste Ausbleiben einer Antwort auf LPS in C3H/HeJ Mäusen nicht durch eine aufgrund der Punktmutation stattfindenden Umorganisation der TIR-Domänenstruktur selbst zustande kommt, sondern durch die Veränderung eines direkten Kontaktpunktes der TIR-Domäne mit anderen Molekülen.

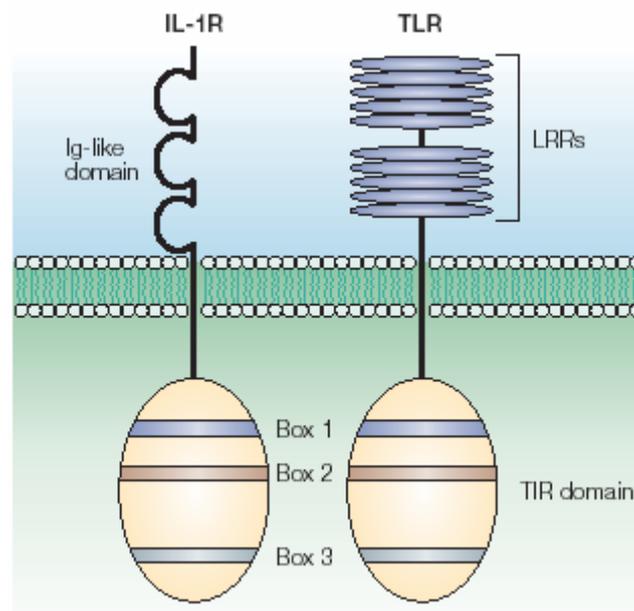


Abb. 8 Schematischer Aufbau des extra- und intrazellulären Bereichs der TLR's im Vergleich zu IL-1R ^[125]

Der extrazelluläre Bereich der TLR's setzt sich aus Leucinreichen Repeats (LRR's) zusammen. Diese bestehen aus 24-29 Aminosäuren und enthalten die Leucinreiche Sequenz XLXXLXLXX und die konservierte Sequenz XΦXXΦX₄FXXLX, wobei X eine beliebige und Φ eine beliebige hydrophobe Aminosäure darstellt.

Die LRR-Domäne der TLR's bildet eine hufeisenförmige Struktur und es wird vermutet, dass die konkave Oberfläche dieser Domäne direkt an der Erkennung der verschiedenen Liganden beteiligt ist.

1.5.2 Signaltransduktion der TLR's

Nach der Erkennung eines Liganden durch den TLR wird über die Interaktion der intrazellulären Domäne des Rezeptors mit einem TIR-Domänen enthaltenden Adaptermolekül die Signaltransduktion eingeleitet. **MyD88** ist das bislang am besten charakterisierte TIR-Domänen enthaltende Adaptermolekül ^[126], das von allen TLR's für die Signaltransduktion genutzt wird. MyD88 verbindet die TLR's mit den IL-Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK)-1 und -4, die den Tumor-Nekrosis-Faktor Rezeptor assoziierten Faktor-6 (TRAF-6) aktivieren. TRAF-6 seinerseits aktiviert Mitogen-aktivierte Protein Kinase durch eine Reihe von Phosphorylierungsreaktionen, die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase (MAP3K) beinhaltet. Dieser Signalweg resultiert in der Phosphorylierung von I- κ B, welches die Kernlokalisations-Sequenz des NF- κ B maskiert. Nach der Phosphorylierung wird I- κ B abgebaut und NF- κ B wandert in den Zellkern, wo es die Transkription mehrerer proinflammatorischer Gene aktiviert. Die so induzierte Produktion von Cytokinen beinhaltet Tumor-Nekrose-Faktor TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12. Durch die Quantifizierung des ausgeschiedenen IL-8 wurde die TLR-2 Aktivität der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen bestimmt.

TIRAP (TIR domain containing protein) wurde als zweites TIR-Domänen enthaltendes Adaptermolekül nach der Charakterisierung des MyD88 unabhängigen Signalweges entdeckt. Die physiologische Rolle des TIRAP wurde durch die Verwendung von Knock-out Mäusen geklärt. Die LPS vermittelte Produktion von inflammatorischen Zytokinen blieb bei TIRAP defizitären Mäusen aus. Allerdings wurde die Expression von IFN induzierten Genen und die verzögerte Aktivierung von NF- κ B weiterhin beobachtet ^[127,128]. Analoge Beobachtungen erfolgten bei MyD88 defizitären Mäusen, was für eine essentielle Rolle des TIRAP im TLR-4 vermittelten, MyD88 abhängigen Signalweg sprach. Der MyD88 unabhängige Signalweg ist bei TIRAP defizitären Mäusen nicht betroffen.

Die Cytokin-Produktion nach Stimulation mit TLR-2 Liganden ist in TIRAP defizitären Mäusen ebenfalls beeinträchtigt. Ein normales Verhalten zeigt sich bei Stimulation mit TLR-3, TLR-7 und TLR-9 Liganden. Folglich ist TIRAP nur für den MyD88 abhängigen Signalweg von TLR-2 und TLR-4 erforderlich.

TRIF wurde als drittes TIR-Domänen enthaltendes Molekül identifiziert ^[129]. In einer anderen Studie wurde dasselbe Molekül als TLR-3 bindendes Molekül identifiziert und TICAM-1 genannt ^[130]. Die erzwungene Expression von TRIF führte zur Aktivierung des IFN- β Promoters in HEK293 (human embryonic kidney 293) Zellen. Eine dominant-negative Form des *Trif* führte zur Inhibition der TLR-3 abhängigen Aktivierung

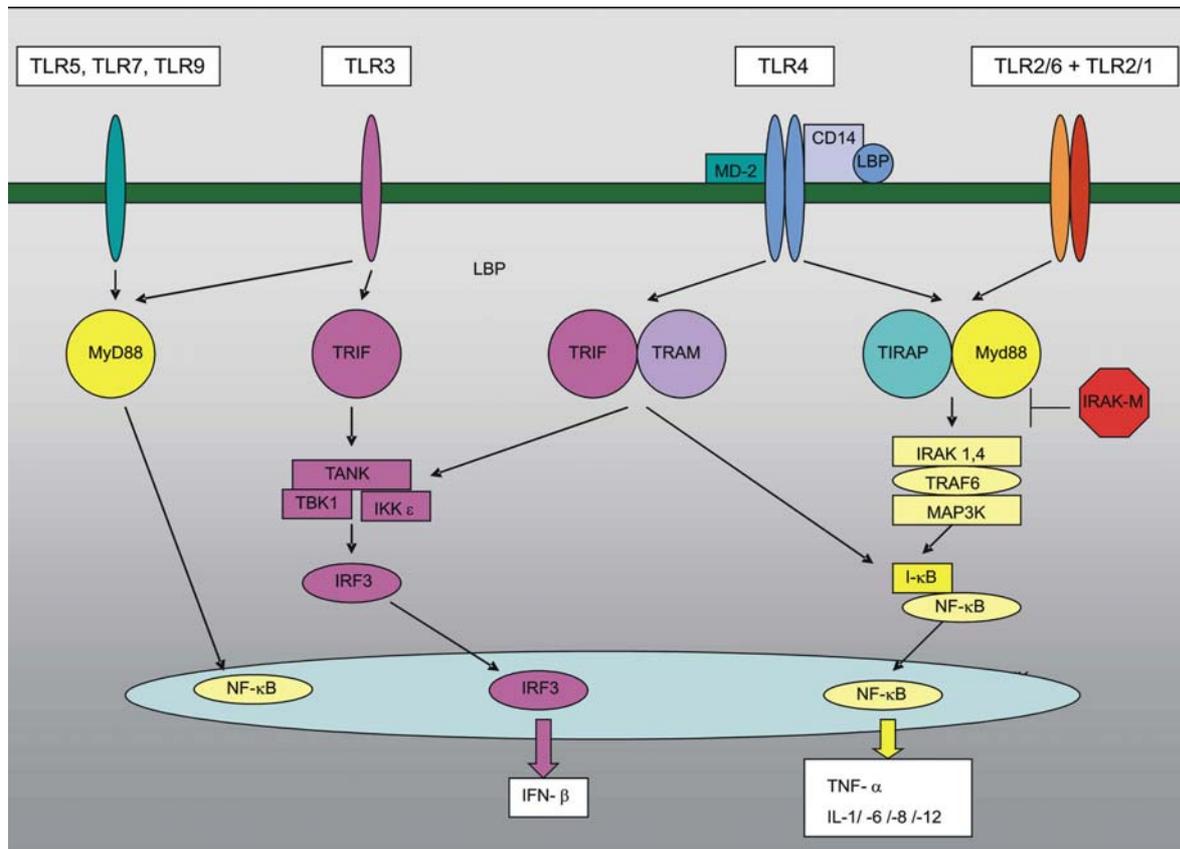


Abb. 9 Schematische Darstellung der Signaltransduktion verschiedener TLR's. Als Kreise sind die Adaptermoleküle dargestellt; der allen TLR's gemeine MyD88 Signalweg in Gelb und der TICAM-1 Signalweg in Lila. Das rote Achteck stellt die IL-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK)-M dar, welche einen negativ regulatorischen Effekt auf den MyD88 Signalweg ausübt ^[131].

des IFN- β Promoters. Diese *in vitro* Studien legten eine Beteiligung von TRIF in der MyD88 unabhängigen Induktion von IFN- β nahe. Der Einsatz von zwei unabhängig generierten Stämmen *Trif*-mutierter Mäuse zeigte letztlich die essentielle Bedeutung von TRIF für den TLR-3 und TLR-4 induzierten, MyD88 unabhängigen Signalweg, der letztendlich zur Produktion von IFN- β führt ^[132;133].

Die Behandlung von TRIF-defizienten Mäusen mit TLR-4 Liganden führte - obwohl die TLR-4 vermittelte Aktivierung des MyD88 Signalwegs nicht unterbunden war - nicht zur erwarteten Produktion von inflammatorischen Zytokinen ^[132;133].

Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass sowohl der MyD88 abhängige als auch der MyD88 unabhängige, TRIF abhängige Signalweg benötigt werden, um eine TLR-4 vermittelte Expression von inflammatorischen Zytokinen zu induzieren. Im Gegensatz hierzu ist der MyD88 abhängige Signalweg ausreichend für die Induktion der Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen nach Ligation von TLR-2, TLR-5, TLR-7 und TLR-9.

TRAM wurde als viertes TIR-Domänen enthaltendes Adaptermolekül identifiziert ^[134-137]. *In vitro* Studien zeigten, dass TRAM mit TRIF und TLR-4 assoziiert, jedoch nicht mit TLR-3 ^[134;135]. Mit TRAM-defizienten Mäusen konnte die Annahme bestätigt werden, dass TRAM eine essentielle Rolle im TLR-4 induzierten, MyD88 unabhängigen Signalweg einnimmt. Ähnlich zu TRIF-defizienten Mäusen zeigten die TRAM-defizienten Mäuse keine IRF-3 Aktivierung und eine eingeschränkte Expression von IFN-induzierbaren Genen. TLR-3 Stimulation führte allerdings anders als bei den TRIF-defizienten Mäusen zu einer normalen Immunantwort ^[137]. Folglich ist TRAM spezifisch nur an der TLR-4 vermittelten Aktivierung des MyD88 unabhängigen, TRIF abhängigen Signalwegs beteiligt.

1.5.3 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Die erste Entdeckung eines Toll-Rezeptors in *Drosophila* ist der Arbeitsgruppe der Tübinger Nobelpreisträgerin Nüsslein-Volhard zuzuschreiben. Ein humanes Homologon des *Drosophila* Toll (heute bekannt als TLR-4) wurde erstmals von Medzhitov et al. beschrieben ^[138]. TLR-4 ist Auslöser der Expression von inflammatorischen Zytokinen und des Kostimulator-Moleküls B7 in der monozytischen Zellreihe THP-1. Dies war das erste Anzeichen dafür, dass TLR's als PRR's fungieren ^[138]. Bei der Untersuchung eines auf LPS nicht reagierenden Mäusestammes, C3H/HeJ, zeigte sich, dass eine Punktmutation in der intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) des TLR-4 für eine fehlerhafte LPS-Signaltransduktion verantwortlich war ^[139;140]. Eine dritte Studie ergab, dass Mäuse mit gezielt eliminiertem TLR-4 Gen nicht auf LPS reagieren ^[141]. Diese drei Studien zusammen belegten die essentielle Rolle des TLR-4 bei der Erkennung einer der Hauptkomponenten von Gram-negativen Bakterien.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind elf TLR's bekannt. TLR-1 bis TLR-10 lassen sich im Menschen finden. TLR-11 ist anstelle von TLR-10 in Mäusen vertreten ^[142]. Den meisten TLR's sind bereits einige von ihnen erkannte Verbindungen zugeordnet (ihre Liganden).

Bislang unbekannt sind einzig die Liganden des TLR-10 und TLR-11. **Tab. 3** zeigt eine Zusammenfassung der jeweiligen Liganden der Toll-like Rezeptoren und deren Ursprung. In der folgenden Tabelle sind jene Verbindungen gekennzeichnet, bei denen nicht endgültig geklärt ist, ob es sich um Liganden der TLR's handelt. Man vermutet eher, dass sich die gefundene Aktivität auf Verunreinigungen mit LPS begründet.

Tab. 3 Mitglieder der TLR-Familie, ihre Liganden und deren Ursprung ^[125]

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR-1	Triacylierte Lipopeptide	Bakterien und Mycobakterien
	Lösliche Faktoren	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR-2	Lipoprotein / Lipopeptide	Unterschiedliche Pathogene
	Peptidoglycan	Gram-positive Bakterien
	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
	Lipoarabinomannan	Mycobakterien
	Phenol-lösliches Modulin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	Glycoinositolphospholipide	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Glycolipide	<i>Treponema maltophilum</i>
	Porine	<i>Neisseria</i>
	Atypisches Lipopolysaccharid	<i>Leptospira interrogans</i>
	Atypisches Lipopolysaccharid	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
TLR-3	Zymosan	Pilze
	Heat-shock Protein 70*	Wirt
TLR-3	Doppelstrang RNA	Viren
	Lipopolysaccharide	Gram-negative Bakterien
TLR-4	Taxol	Pflanzen
	Fusions Proteine	Syncytialer Atemwegsvirus
	Hüll Proteine	Murines Mamacarcinomvirus
	Heat-shock Protein 60*	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
	Heat-shock Protein 70*	Wirt
	Type III repeat domain A des Fibronectins*	Wirt
	Oligosaccharidfragmente des	Wirt
	Heperansulphats*	Wirt
	Fibrinogen*	Wirt
	TLR-5	Flagellin

Tab. 3 Mitglieder der TLR-Familie, ihre Liganden und deren Ursprung (Fortsetzung)

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR-6	Diacylierte Lipopeptide	<i>Mycoplasma</i>
	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
	Zymosan	Pilze
TLR-7	Imidazoquinolin	Synthetische Verbindung
	Loxoribin	Synthetische Verbindung
	Bropirimin	Synthetische Verbindung
	Einzelstrang RNA	Viren
TLR-8	Imidazoquinolin	Synthetische Verbindung
	Einzelstrang RNA	Viren
TLR-9	CpG enthaltende DNA	Bakterien und Viren
TLR-10	N. b.	N. b.
TLR-11	N. b.	Uropathogene Bakterien

Bei den mit * gekennzeichneten Verbindungen besteht die Möglichkeit einer Kontamination mit LPS und/oder anderen potenten mikrobiellen Komponenten. Genauere Analysen sind notwendig, um diese Verbindungen eindeutig als Liganden der TLR's identifizieren zu können. N. b. Nicht bekannt.

Der genaue Mechanismus der Erkennung des Liganden durch den Rezeptor ist bislang ungeklärt. TLR-2 bildet jedoch, um zwischen zweifach und dreifach acylierten Lipopeptiden unterscheiden zu können, Heterodimere mit TLR-1 (dreifach acylierte Lipopeptide) und TLR-6 (zweifach acylierte Lipopeptide) ^[143]. Im Fall von TLR-4 wird eine Homodi- bzw. -oligomerisierung diskutiert.

1.5.4 Lipoproteine und Lipopeptide als TLR-2 Liganden

Lipoproteine stellen einen Bestandteil der Zellwand von Gram-negativen Bakterien, Gram-positiven Bakterien sowie von Mycoplasmen dar ^[144-147]. Das erste bakterielle Lipoprotein (Braun's Lipoprotein) wurde von Volkmar Braun (Universität Tübingen) vor über 30 Jahren aus *Escherichia coli* isoliert und charakterisiert ^[148-150]. Die Entdeckung und Isolierung weiterer bakterieller Lipoproteine zeigte, dass die Peptidsequenz der Lipoproteine/-peptide keine Homologien aufweist. Vielmehr werden die bakteriellen Lipoproteine durch den „Lipidbaustein“, das mit drei Fettsäuren acylierte S-(2,3-Dihydroxypropyl)-L-cystein, charakterisiert. Bereits 1975 wurde von V. Braun et al.

gezeigt, dass das isolierte Lipoprotein das murine B-Zellwachstum stimuliert ^[151]. Weitere Studien von Norgard bzw. Kreuz et al. belegten die Fähigkeit der Lipoproteine unterschiedlicher Bakterien sowohl NF- κ B ^[152], als auch die Cytokin-Produktion ^[153] zu aktivieren.

Diesen Beobachtungen folgte die Synthese eines Analogons des *E. coli* Lipoproteines ^[154], das eine dem natürlich vorkommenden Lipoprotein gleichwertige Aktivierung von B-Zellen ^[154;155], Monozyten ^[156] und Neutrophilen ^[157] aufweist. Die synthetischen Analoga des Braunschens Lipoproteins fungieren zudem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als potente Immunadjuvantien ^[158].

Der Einsatz von Lipopeptid-Vaccinen wurde in allen relevanten Tiermodellen untersucht ^[159]. Bislang konnten auch am Menschen keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet werden ^[160]. In Mäusen erwies sich das wasserlösliche Hexapeptid Pam₃Cys-SK₄-OH als effektivstes Additiv zur Auslösung einer zellvermittelten Immunantwort.

Trotz intensiver Untersuchungen blieb lange Zeit unklar, über welchen Mechanismus die Lipopeptide die von ihnen vermittelte Immunantwort auslösen. Erst die Entdeckung der TLR's und die Zuordnung der Lipopeptide und Lipoproteine zu den Liganden des TLR-2 ermöglichte ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise der Lipoproteine ^[11;161].

Bereits 1997 berichtete Ozinsky über erste Anzeichen einer Hetero- bzw. Homodimerisierung der TLR's ^[143]. Diese Annahme berücksichtigend, untersuchte die Arbeitsgruppe um Akira den Einfluss von TLR-6 (bis zu diesem Zeitpunkt kein zugewiesener Ligand) auf die Wirkungsweise anderer TLR's. Durch Einsatz von TLR-6 defizienten Mäusen konnten Akira et al. beweisen, dass TLR-6 für die Erkennung von mycoplasmalem makrophagen-aktivierendem Lipopeptid-2 kD (MALP-2), einem nur zweifach mit Fettsäuren acylierten Lipopeptid mit freiem N-Terminus, benötigt wird ^[162]. Die Immunantwort auf dreifach acylierte Lipopeptide blieb dahingegen unverändert. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen TLR-1 und TLR-6 wurden bei gleichartigen Experimenten TLR-1 defiziente Mäuse eingesetzt. Die Pam₃Cys-SK₄-OH vermittelte Immunantwort wurde in den TLR-1^{-/-} Mäusen im Gegensatz zu den Wild-Typ Mäusen stark gehemmt, während beide Stämme vergleichbar auf MALP-2 reagierten ^[163].

Bereits bei Akiras Studien zeigte sich der Einfluss der Kettenlänge der N-gebundenen Fettsäure der Lipopeptide hinsichtlich einer TLR-2/TLR-1 oder TLR-2/TLR-6 vermittelten Immunantwort. Um den Einfluss der unterschiedlichen Fettsäurelängen sowie den Einfluss der Stereozentren und des Grundgerüsts zu untersuchen, führten Spohn et al. im letzten Jahr eine Struktur-Wirkungs-Beziehung für das Pam₃Cys-SK₄-OH durch ^[164]. Durch

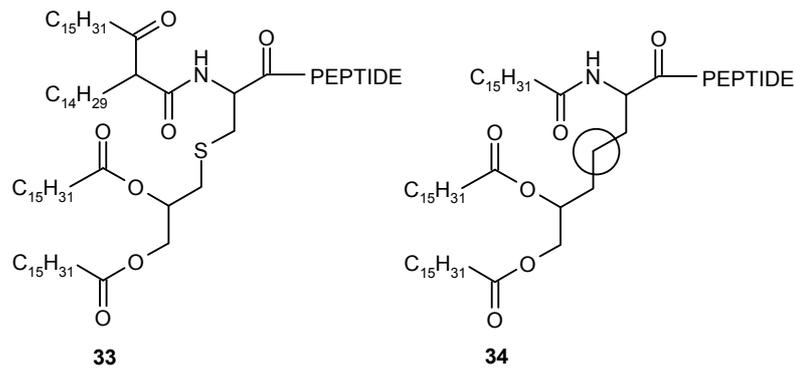


Abb. 10 Strukturen zweier von Spohn et al. synthetisierten Variationen der Dhc basierten Lipopeptide ^[164]

Variation des Peptidteils der Lipopeptide wurde gezeigt, dass dieser für die Aktivität der Verbindungen unabdingbar ist. Ein signifikanter Einfluss der Peptid-Kette war jedoch nur bei wenigen Peptid-Sequenzen zu beobachten. Außerdem variierten Spohn et al. die Anzahl der Fettsäure-Reste und deren Länge. Lipopeptide mit nur einer Fettsäure wiesen hierbei keine Aktivität auf. Die Aktivität von Lipopeptiden mit vier Fettresten (**33**) war deutlich vermindert. Eine Verkürzung der Kettenlänge der Fettsäuren führte ab einer Kohlenstoffzahl von zehn und geringer (pro Fettsäure) ebenfalls zu einer deutlich verringerten Aktivität der Verbindungen. Der Austausch des im Dhc enthaltenen Schwefels (**34**) ^[164] verringerte die biologische Aktivität der Verbindungen signifikant. Untersucht wurden auch die Stereoisomeren des Dhc ^[164]. Das (R,R)-Dhc wies hierbei die höchste Aktivität auf.

Diese Untersuchungen zeigten, dass weitere agonistische oder antagonistische Verbindungen auf Lipopeptid-Basis entweder Dhc oder einen Baustein mit einer dem Dhc eng verwandten Struktur als Grundgerüst enthalten müssen. Ein Vergleich der Struktur des Dhc (**35**, **Abb. 11**) mit Lanthionin (**1**) weist deutlich die gewünschten Ähnlichkeiten auf. Die Synthese von Lipopeptiden auf Lanthionin-Basis wurde somit von unserer Tübinger Forschergruppe als viel versprechender Ansatz für die Suche nach neuen TLR-2 Agonisten oder sogar Antagonisten gesehen.

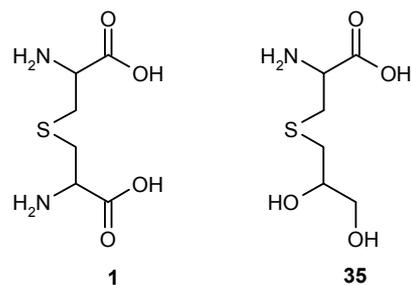


Abb. 11 Strukturformeln des Lanthionins (**1**) und des Dhc (**35**). Um die Ähnlichkeiten der Verbindungen hervorzuheben, wurde die Zeichnungsweise des Dhc leicht abgeändert.

1.5.5 TLR's als potentielle therapeutische Zielmoleküle

Die Tatsache, dass TLR's ein Teil des angeborenen Immunsystems sind, und das angeborene Immunsystem neueren Studien zufolge das erlernte Immunsystem in weiten Teilen steuert^[165], weist den TLR's nicht nur eine Rolle in der Immunantwort zu, sondern auch eine potentiell wichtige Rolle bei der Behandlung unterschiedlichster Krankheiten. Verdeutlichen lässt sich dies am Beispiel der Sepsis. Die mikrobielle Sepsis ist definiert als „die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Erreger und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“^[166]. Bis heute ist die Mortalitätsrate bei einer Sepsis inakzeptabel hoch. In den Vereinigten Staaten sterben jährlich etwa 200.000 Patienten an einer Sepsis^[167]. Es wird angenommen, dass die Zahl der Sepsis-Todesfälle in der Europäischen Union deutlich höher liegt. Patel et al. publizierte bereits vor 50 Jahren die Theorie, dass die durch den Einsatz von Antibiotika therapiebedingte rasche Zerstörung von Bakterien - die zur Freisetzung von toxischen mikrobiellen Verbindungen (Endotoxine) führt - Krankheitsmanifestationen induziert, die nicht durch sich vermehrende Bakterien ausgelöst werden^[168].

Vergleicht man einige der publizierten Endotoxine (LPS, Lipooligosaccharide LOS, lösliche Peptidoglycane sPG)^[167] mit den Liganden der TLR's, wird der enge Zusammenhang der TLR's mit dem Auftreten einer Sepsis und die daraus resultierende potentielle Bedeutung ihrer Antagonisten schnell erkennbar. Kirschning et al. verifizierten dies durch die Applikation eines TLR-2 Antikörpers mAB T2.5 an Mäusen, der bei deren anschließender Behandlung mit Lipopeptid Sepsissymptome verhinderte^[169]. Ein Einsatz von 40 mg/kg von mAB T2.5 schützte die Mäuse bereits drei Stunden vor einer andernfalls tödlichen Infektion mit *Bacillus subtilis*. Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll das Potential der TLR-2-Antagonisten für die Behandlung einer Sepsis und allgemein das Potential der TLR-Agonisten und Antagonisten bei der Behandlung unterschiedlichster Krankheiten. Eine gute Übersicht über die möglichen Einsatzgebiete weiterer TLR-Agonisten und Antagonisten geben Zuany-Amorim et al.^[170] und Ulevitch^[171].

2 Aufgabenstellung

Begründet auf der bereits beschriebenen Ähnlichkeit der Dhc- und Lanthionin-Strukturen waren Lipopeptide auf Lanthionin-Basis zu synthetisieren und auf ihre TLR-2-Aktivität hin zu untersuchen. Dazu mussten im ersten Teil dieser Doktorarbeit das nicht käufliche Lanthionin einmal als orthogonal geschützter Baustein und einmal als dreifach lipophilisierter Baustein für die Festphasensynthese synthetisiert und charakterisiert werden. Ausgehend von diesen Building-Blocks war ein erster Array von Lipopeptiden zu synthetisieren und diese Lipopeptide auf ihre TLR-2-Aktivität hin zu untersuchen. Zusätzlich sollten Versuche unternommen werden, die gefundene Lösungssynthese des Lanthionins auf die feste Phase zu übertragen.

Im zweiten Teil der Arbeit galt es Struktur-Wirkungs-Beziehungen bezüglich der Einflüsse der einzelnen variablen Positionen der Lipolanthionine (Kettenlänge der Fettsäure und des Fettamins, Stereozentren des Lanthionins und die Oxidationsstufe des Schwefels) auf die Aktivität der Lipopeptide durchzuführen.

Alle synthetisierten Verbindungen sollten bezüglich Struktur und Reinheit eindeutig charakterisiert werden.

3 Ergebnis Teil

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Synthese von Lipolanthionin-Peptiden, die auf ihre TLR-Aktivität hin untersucht werden sollten. Falls die Lipolanthionine Aktivität zeigen würden, dann galt es Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzustellen. Um diese Aufgabe durchführen zu können, mussten unterschiedliche Derivate dieser Lipopeptide auf möglichst einfachem Weg synthetisierbar sein. Die einfachste Möglichkeit eine Vielzahl von Lipolanthionin Derivaten herzustellen, bietet nach wie vor die Synthese dieser Verbindungen an fester Phase dar. Für die Durchführung dieser Festphasensynthesen mussten jedoch zuerst für die Festphasensynthese geeignet geschützte Lanthionin-Bausteine hergestellt werden. Mit der Lösungssynthese dreier dieser Bausteine (Fmoc₂Lan(OAll)-OH (**36**), Fmoc₂LanHda-OH (**37**) und Pam₂LanHda-OH (**38**); in **Abb. 12** dargestellt) beschäftigt sich das erste Kapitel dieses Abschnitts.

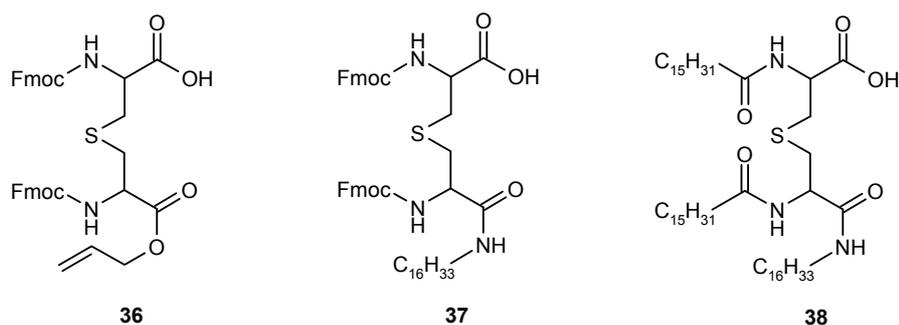


Abb. 12 Darstellung der drei zu synthetisierenden, Lanthionin enthaltenden Lipopeptid Bausteine

Im zweiten Kapitel dieses Abschnitts wird die Etablierung von Synthesemethoden beschrieben, die unter Einsatz der drei Bausteine die Festphasensynthese von Lipolanthionin-Peptiden ermöglichen. Ebenfalls dargelegt sind die Synthesemethoden, die eine weitere Derivatisierung der Lipopeptide an fester Phase erlauben. In **Abb. 13** sind die zu etablierenden Festphasensynthesen schematisch dargestellt. Die variablen Positionen sind durch Kreise markiert. Nicht eingezeichnet sind die α -Kohlenstoffatome, deren Chiralität durch die Konfiguration des eingesetzten Lanthionin-Building-Blocks bestimmt wird.

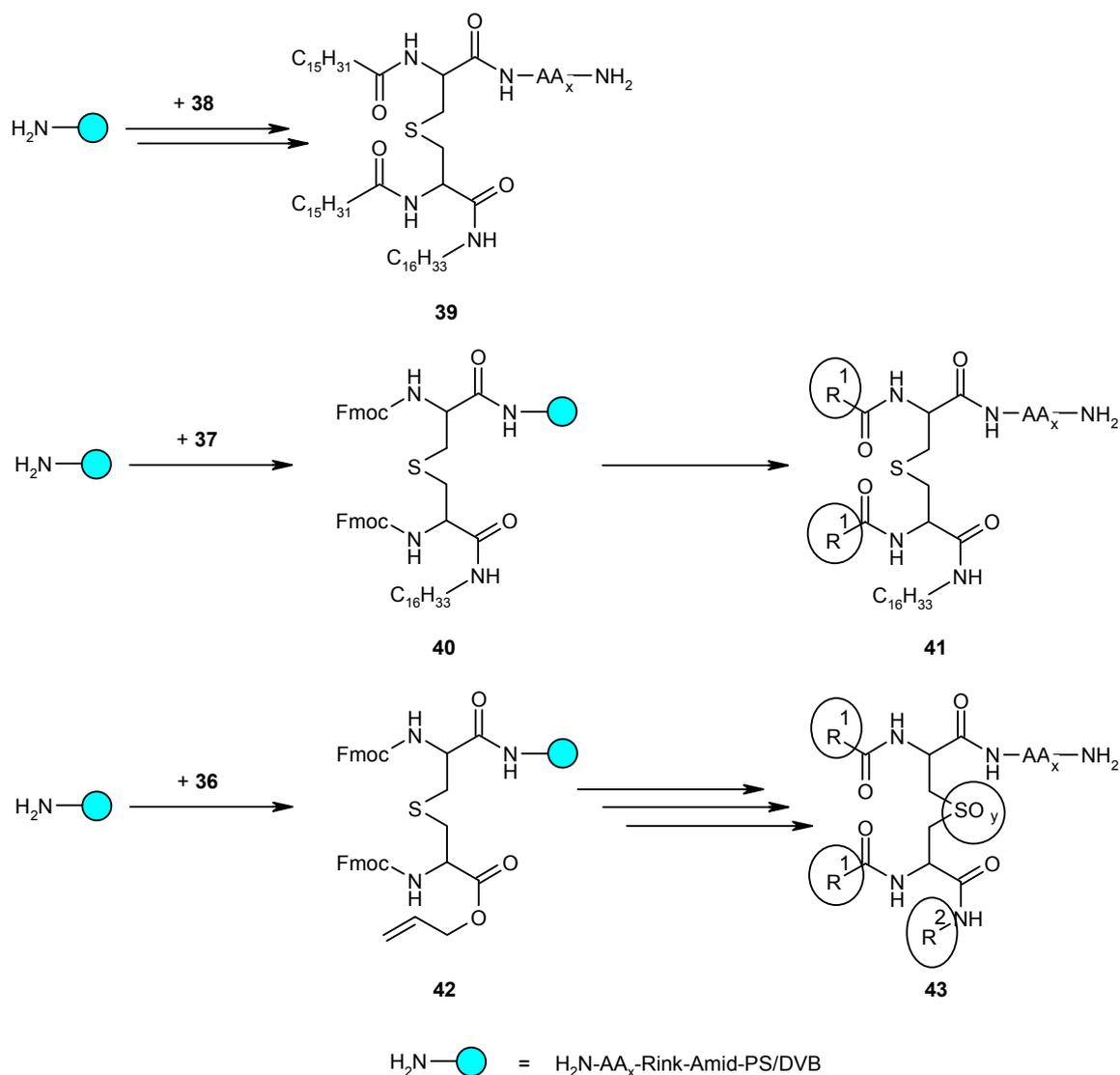


Abb. 13 Schematische Darstellung der zu etablierenden Festphasensynthesen

Im dritten Schritt sollten Lipopeptide mit abgewandeltem Amid Teil (R^2 , **43**), verschiedenen Fettsäure (R^1) sowie drei Oxidationsstufen des Schwefels synthetisiert werden, um deren Einfluss auf die TLR-Aktivität der Verbindungen zu untersuchen. Ebenfalls variiert wurde die Konfiguration des eingesetzten Lanthionins, um den Einfluss der Stereozentren auf die Aktivität der Verbindungen zu untersuchen. Das dritte Kapitel dieses Abschnitts fasst die synthetisierten Verbindungen zusammen und beschreibt die durchgeführten TLR-Assays und deren Ergebnisse.

3.1 Synthese des Lanthionin-Grundgerüsts in Lösung

Ausgehend von den bereits in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Synthesen sollte Lanthionin in einer, für die Festphasen-Synthese geeignet geschützten Form synthetisiert werden. Diese Synthesemethode sollte dabei möglichst auf die feste Phase übertragbar sein, so dass der Aufbau des Lanthionin-Grundgerüsts am polymeren Träger erfolgen kann. Die auf diesen Schritt folgende Synthese der Lipopeptide an fester Phase grenzte die Auswahl an Lanthionin-Synthesen weiter ein. Bedingt durch die voraussichtlich sehr schwierige bis unmögliche Aufreinigung der synthetisierten Lipopeptide durften während der gesamten Synthese keine Diastereomeren oder andere Nebenprodukte am Harz entstehen. Anhand dieser Voraussetzungen wurden die bereits beschriebenen Synthesen auf diese Vorgaben hin überprüft.

3.1.1 Auswahl einer geeigneten Lanthionin-Synthesemethode

Die Synthese des Lanthionins via Cystin eignete sich nicht für unsere Zwecke, da orthogonal geschütztes Cystin schwer zugänglich ist. Ein weiteres Problem dieser Synthesemethode waren die beiden ungeschützt verbleibenden Säure-Gruppen. Die bei dieser Synthese an fester Phase entstehenden Nebenprodukte sprachen zusätzlich gegen eine Verwendung dieser Synthesemethode.

Durch die unvermeidliche Diastereomeren-Bildung bei der Umsetzung des Cysteins mit Dehydroalanin und die dadurch nach der Synthese notwendige Diastereomeren-Trennung des in Lösung synthetisierten Lanthionin-Derivates bzw. der an fester Phase synthetisierten Lipolanthionin-Peptide wurde auch die Synthese via Dehydroalanin für unsere Zwecke nicht weiter in Betracht gezogen.

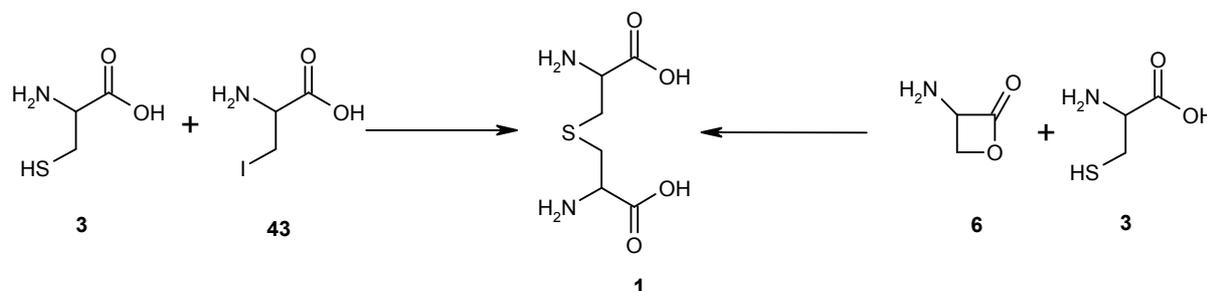


Abb. 14 Darstellung der beiden geeigneten Lanthionin-Synthesen

Die Synthese via Aziridine wurde aufgrund der schlechten Ausbeuten und harschen Bedingungen in der weiteren Syntheseplanung nicht berücksichtigt. Die somit verbleibenden Synthesewege via β -Iodalanin (**43**) und Ringöffnung der β -Lactone des Serins (**6**) sind in **Abb. 14** dargestellt. Aufgrund der aufgrund von Literaturangaben vermeintlich leichteren Zugänglichkeit des β -Iodalanins und den höheren Literatúrausbeuten der β -Iodalanin-Synthese verglichen mit Synthesen der β -Lactone des Serins wurde dieser Syntheseweg gegenüber der Ringöffnung der Lactone bevorzugt. Ausgehend von diesen Überlegungen wurde ein erster Syntheseplan erstellt (**Abb. 15**).

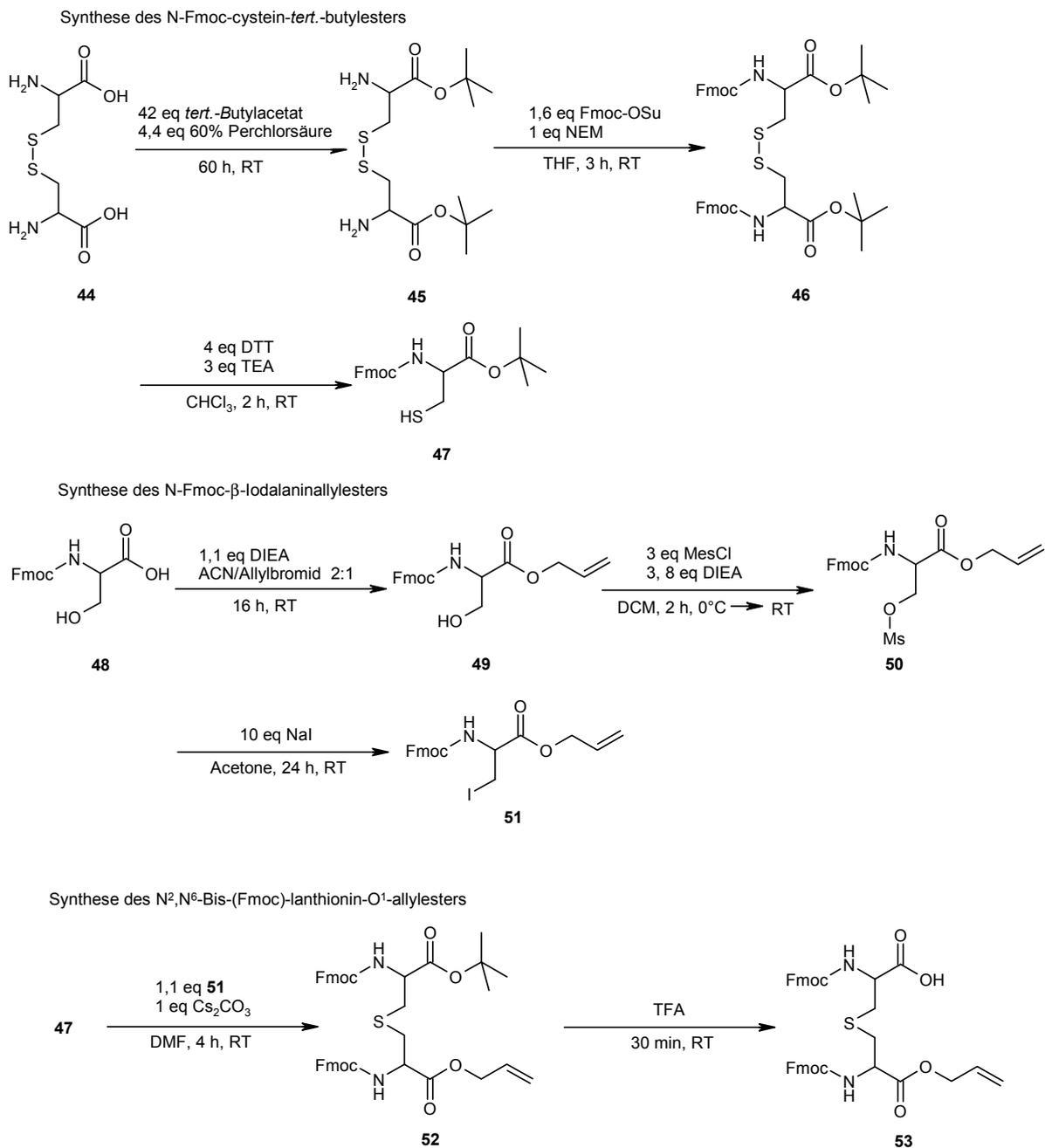


Abb. 15 Syntheseplan für die Lanthionin-Synthese

Analog der Edukte zu Synthese des Pam₃Cys-OH Grundgerüsts S-(2,3 Dihydroxypropyl)-cystein (Dhc) sollte ausgehend von Cystin (**44**) der N-Fmoc-cystein-*tert.*-butylester (**47**) synthetisiert werden^[154;172]. Die Synthese des N-Fmoc- β -Iodalaninylesters (**51**) sollte nach Einführung der Allyl-Schutzgruppe analog Jensen et al. (**49**)^[173] über die Umsetzung zum O-Mesyl-serin (**50**)^[116] und anschließende Substitution zum β -Iodalanin (**51**)^[115] erfolgen.

Die weitere Umsetzung analog Dugave et al.^[115] sollte zum gewünschten Lanthionin (**52**) führen. Nach anschließender Spaltung des *tert.*-Butylesters läge Lanthionin in für die Festphasensynthese geeigneter geschützter Form vor (**53**).

3.1.2 Vorversuche zur Lanthionin-Synthese

Für die Synthese des gewünschten β -Iodalanins (**51**) wurde zunächst Fmoc-Serin-OH mit Allylbromid und DIEA in Acetonitril zum Fmoc-Serinallylester (**49**) umgesetzt (Ausbeute 92 %). Die weitere Umsetzung zum β -Iodalanin wurde zunächst auf dem oben beschriebenen Weg über O-Mesyl-serin versucht, das direkt ohne weitere Aufreinigung in Aceton mit NaI umgesetzt wurde. Das gewünschte Iodid konnte jedoch nur in Ausbeuten <10 % isoliert werden. Ähnlich verhielt es sich bei der direkten Umsetzung des Fmoc-Serinallylestere (**49**) zum β -Iodalanin **51** analog der von Jobron et al. beschriebenen Methoden mit Diphenylphosphin-Harz, Iod und Imidazol. Das gewünschte β -Iodalanin **51** fand sich nur in Ausbeuten zwischen 10 und 20 %. Betrachtet man die hohen Kosten des Diphenylphosphin-Harzes, so ist diese Synthesemethode für die Herstellung einer größeren Menge an Lanthionin ungeeignet.

Im Folgenden wurde die Umsetzung von Cystein mit zwei unterschiedlichen Serinlactonen erwogen (**Abb. 16**). Dazu wurde Serin in einer NaHCO₃-Lösung mit Chlorameisensäurebenzylester zum Z-Serin (**54a**), anschließend nach einer Vorschrift von Kaldor et al.^[174] mit DEAD und PPh₃ in THF bei -78°C zum Z- β -Serinlacton (**55a**) umgesetzt. Analog dazu wurde das Boc- β -Serinlacton (**55b**) synthetisiert. Beide Lactone wurden nur in Ausbeuten <30 % erhalten. Aufgrund dieser geringen Ausbeuten der Lacton-Synthesen und den gescheiterten Versuchen, die Lacton-Synthese auf Fmoc-Serinlactone zu übertragen, was einen Einsatz des daraus synthetisierten Lanthionins in der Festphasensynthese erlauben würde, wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt.

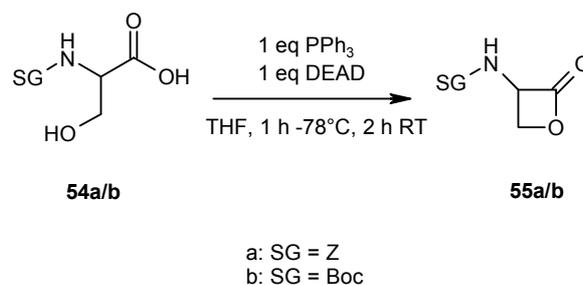


Abb. 16 Synthese der β -Serinlactone

Nachdem alle Versuche, Lanthionin entsprechend den bereits bekannten Synthesemethoden herzustellen scheiterten, galt es für unsere Problemstellung eine neue Lanthionin-Synthese zu entwickeln. Der Anspruch, eine enantioselektive und möglichst an die feste Phase übertragbare Synthesemethode zu finden, deren Nebenprodukte bei einer Übertragung an den polymeren Träger möglichst in Lösung verbleiben, erschwerte die Suche. Die Synthese über β -Halogenalanine wurde immer noch als die geeignetste Methode für die Lanthionin-Synthese angesehen. Eine Literaturrecherche bezüglich dieser Verbindungen zeigte, dass bis zu diesem Zeitpunkt zwar viele Versuche unternommen worden waren Lanthionin über unterschiedliche Iod- und Chloralanine zu synthetisieren, aber nur ein Versuch der Synthese via Bromalanin.

Mayer et al. ^[175] synthetisierten ein Peptid, das ein Seitenketten geschütztes Serin und ein Trityl-geschütztes Cystein enthält. Nach Konvertierung der Hydroxy-Funktion des Serins zum Bromid wurde das Cystein Trityl-entschützt und mit 5 % DIEA in DMF zum Lanthionin zyklisiert. Allerdings verdeutlichte das entstehende Diastereomeren-Gemisch, bestehend aus (R,R)- und (R,S)-Lanthionin, dass die Reaktion nicht über eine Substitution, sondern über einen Eliminierung-Addition-Mechanismus verläuft. Allerdings liegt das β -Bromalanin hier innerhalb des Peptides vor. Die Tatsache, dass Brom schwerer zu eliminieren ist als Jod, jedoch leichter zu substituieren als Chlor, erhöhte zusätzlich die Erfolgsaussichten beim Einsatz dieses Syntheseweges. Überträgt man diese Überlegungen auf den angepeilten Syntheseweg, so gelangt man zum β -Brom-N-Fmoc-alaninylesters als Ausgangsverbindung für die Lanthionin-Synthese.

Die Synthese eines β -Brom-N-Fmoc-alaninylesters war bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur noch nicht beschrieben worden, so dass zunächst ein geeignetes Syntheseprotokoll zu erarbeiten war.

3.1.3 Synthese des β -Bromalanins

Ausgehend von dem Syntheschema **Abb. 15** wurde zunächst der N-Fmoc-Serinallylester (**49**) synthetisiert. Für die Umsetzung zum β -Bromalanin wurde die von Sinha et al. beschriebene Methode zur Konvertierung von N-Z-Ser-OMe zum entsprechenden Bromid mit Tetrabromkohlenstoff (CBr_4) und Triphenylphosphin (PPh_3) bei 0°C in DCM durchgeführt ^[176]. Bei dieser Methode entstand jedoch nicht nur der gewünschte

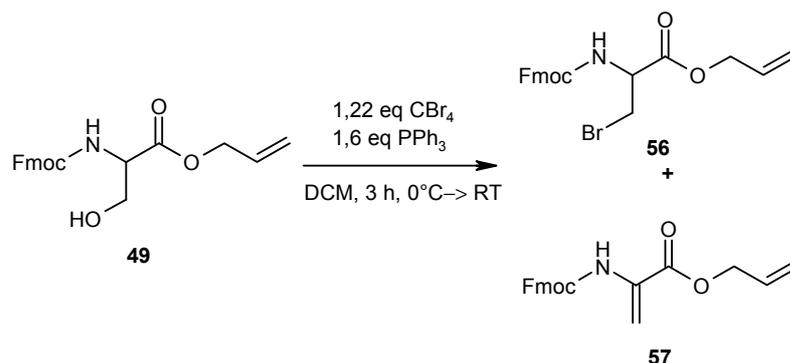


Abb. 17 Synthese des N-Fmoc- β -Bromalanin-allylesters **56**

β -Brom-N-Fmoc-alanin-allylester (**56**), sondern auch der N-Fmoc-Dehydroalanin-allylester (**57**) in einem Verhältnis von 1:4. Die Fmoc- oder Allyl-Schutzgruppe reichte folglich nicht aus, eine Eliminierung des β -Bromalanins zu verhindern. Um eine spätere Übertragung an die feste Phase zu gewährleisten, sollte die Fmoc-Schutzgruppe nicht ausgetauscht werden, da für die Einführung einer sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe nur eine Variation der Carboxy-Schutzgruppe in Frage kam. Im Folgenden wurden die Carboxy-Schutzgruppen des Cysteins und des Serins ausgetauscht, was zu N-Fmoc-S-trityl-cysteinallylester und N-Fmoc-serin-*tert.*-butylester (**58a**) als Ausgangsverbindungen für die Synthese führte (**Abb. 18**). Analog einer Vorschrift von Schultz et al. wurde N-Fmoc-(S)-Serin (**48a**) mit einer Mischung aus DIC, *tert.*-Butylalkohol und Kupfer(I)chlorid umgesetzt. Diese Methode kann auch zur Synthese des Dehydroalanins verwendet werden ^[95], eine kurze Reaktionszeit von vier Stunden führte jedoch in 65 % Ausbeute zum gewünschten N-Fmoc-(S)-serin-*tert.*-butylester (**58a**). Die Umsetzung des N-Fmoc-(S)-serin-*tert.*-butylesters (**58a**) mit CBr_4 und PPh_3 führte zum gewünschten β -Brom-N-Fmoc-(R)-alanin-*tert.*-butylester (**59a**) in 85 % Ausbeute. Zu beachten ist hierbei die Umkehr der Konfigurationsbezeichnung vom N-Fmoc-(S)-serin-*tert.*-butylester (**58a**) zum β -Brom-N-Fmoc-(R)-serin-*tert.*-butylester (**59a**), bedingt durch die höhere Priorität des Broms gegenüber dem Sauerstoff (Cahn-Ingold-Prelog Regeln).

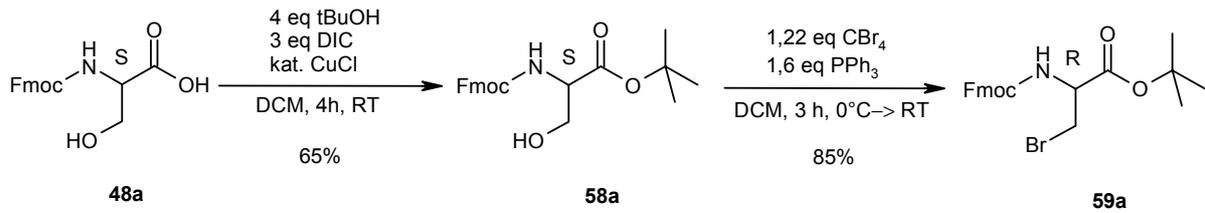


Abb. 18 Synthese des β -Brom-N-Fmoc-(R)-serin-*tert.* butylesters

Die Syntheseprodukte wurden mit HPLC, ES-MS und NMR analysiert. In **Abb. 19** sind die ^{13}C -NMR-Spektren des N-Fmoc-(S)-serin-*tert.*-butylesters (**58a**) und des β -Brom-N-Fmoc-(R)-serin-*tert.*-butylesters (**59a**) dargestellt. Gut zu erkennen ist die starke Veränderung der Tieffeldverschiebung sowohl des β - als auch des α -Kohlenstoffatoms beim Austausch der Hydroxy-Funktion durch Brom.

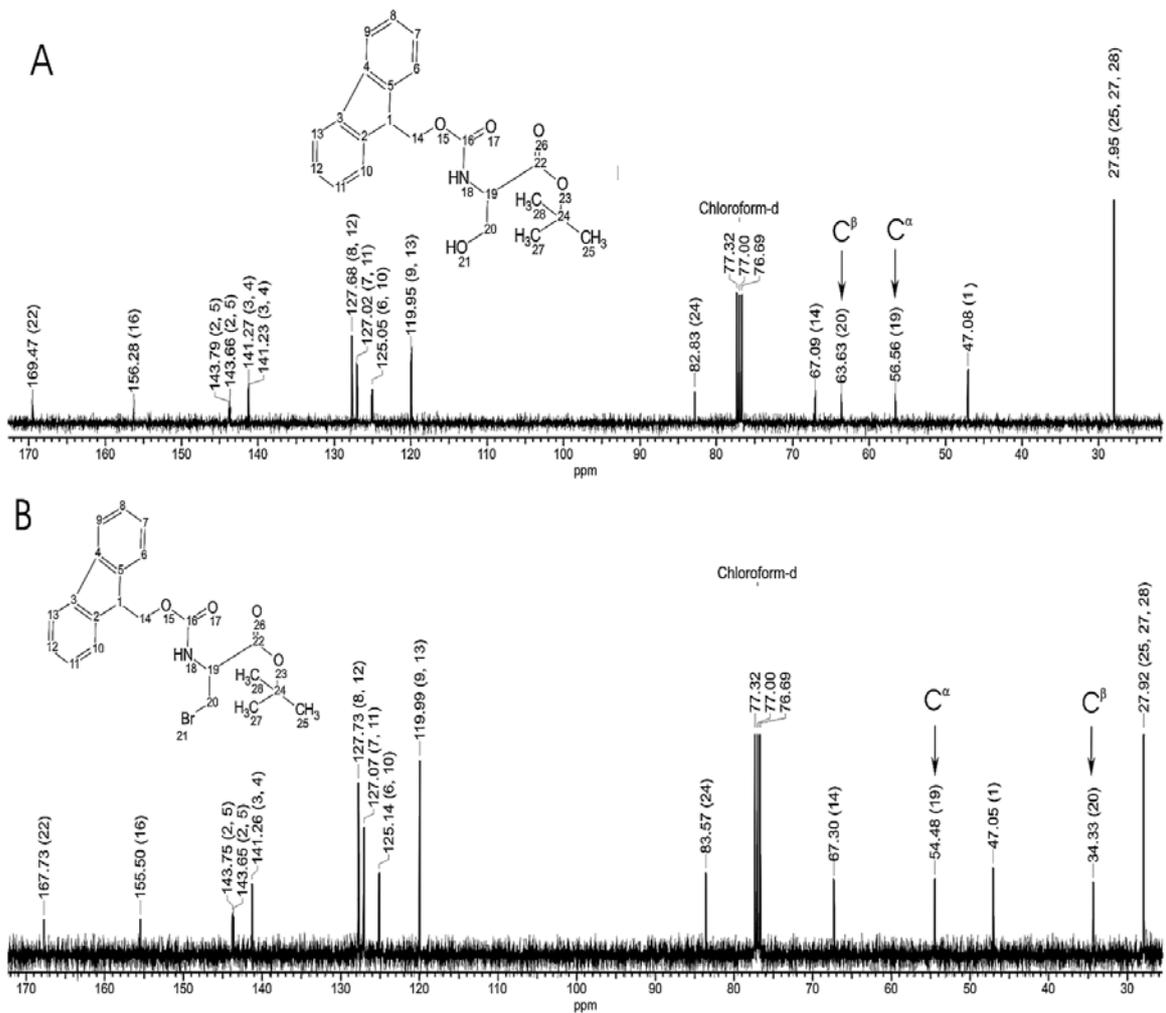
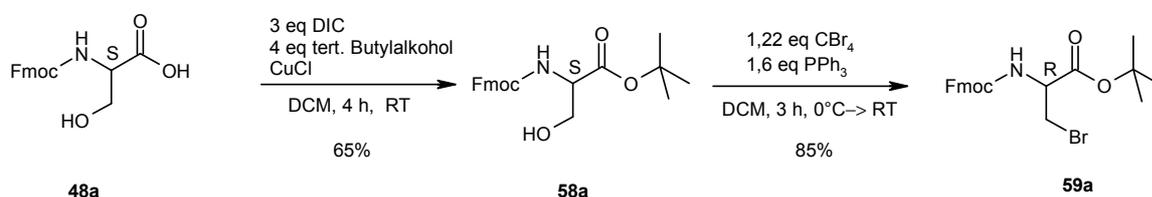


Abb. 19 ^{13}C -NMR-Spektren des N-Fmoc-(S)-serine-*tert.*-butylesters (**58a**; **A**) und des β -Brom-N-Fmoc-(R)-alanin-*tert.*-butylesters (**59a**; **B**) (400.16 MHz bzw 100.62 MHz; CDCl_3)

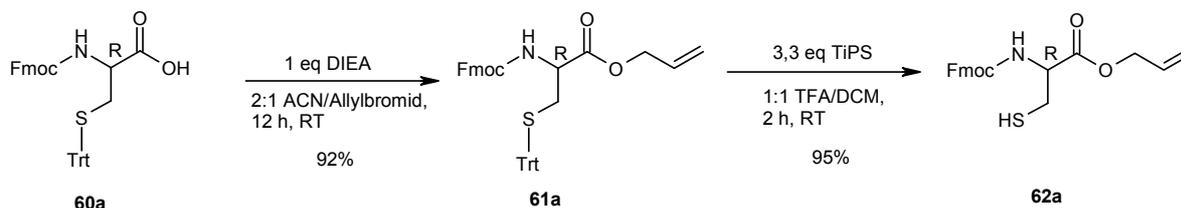
3.1.4 Synthese des Lanthionin-Grundgerüsts

Nach gelungener Synthese des β -Bromalanins (**59a**) war es notwendig eine Möglichkeit für die Synthese des N-Fmoc-(R)-Cysteinallylesters (**62a**) zu finden. Die Einführung der Allylschutzgruppe konnte aus **60a** über die Umsetzung mit Allylbromid und DIEA in ACN mit 92 %iger Ausbeute durchgeführt werden (**61a**, **Abb. 20**). Die Stabilität des Allylesters gegenüber sauren Bedingungen ermöglichte die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe in Anwesenheit von TIPS mit TFA/DCM (1:1) in 95 %iger Ausbeute. Die Reinigung des N-Fmoc-(R)-Cysteinallylesters **62a** erfolgte durch Fällen aus DCM/DEE (1:20).

Synthese des β -Brom-N-Fmoc-alanin-tert.-butylesters :



Synthese des N-Fmoc-cysteinallylesters :



Synthese des N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-lanthionin-O¹-allylesters :

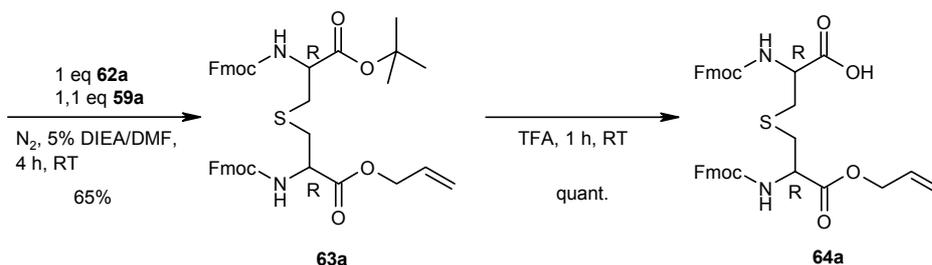


Abb. 20 Schematische Darstellung der entwickelten Lanthionin-Synthese

Die folgende Umsetzung zum Lanthionin wurde in einem ersten Versuch mit den von Dugave et al. beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden das Cystein **62a** und das Bromid **59a** in trockenem DMF gelöst und Cesiumcarbonat zugegeben. Als Hauptprodukt fand sich jedoch bei diesen Bedingungen Dehydroalanin, während nur Spuren des Lanthionins **63a** isoliert wurden. Um die auftretende Eliminierung in den

Hintergrund zu drängen, wurden Versuche mit unterschiedlichen, sterisch stärker gehinderten Basen durchgeführt. Dazu wurden 2,6-Di-*tert.*-Butylpyridin, DIEA und Triethylamin zusammen mit einem leichten Überschuss an Bromid eingesetzt. Das beste Ergebnis ergaben schließlich die bereits von Mayer et al. bei ihrer Festphasen-Synthese eines Enkephalin-Analogons aus einem Bromalanin und Cystein enthaltenden Peptid verwendeten Bedingungen (5 % DIEA in DMF; 65 % Ausbeute, **Abb. 20**) [175]. Anschließende Spaltung des *tert.*-Butylesters mit reiner TFA führte zu dem gewünschten N^2,N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-Lanthionin- O^1 -allylmonoesters (**64a**).

Trotz breit angelegter Variation der Bedingungen (Temperatur, Konzentration der Base, Menge des zugesetzten Bromids und Cysteins) konnte die Eliminierung des Bromids zum Dehydroalanin nicht vollständig unterdrückt werden.

Die auch bei verlängerten Reaktionszeiten in der Reaktionsmischung verbliebenen Reste von nicht umgesetztem Cystein und Dehydroalanin weisen als erstes Indiz auf einen stattfindenden Substitutions-Mechanismus hin und sprechen gegen den möglichen Eliminierung-Addition-Mechanismus. Aziridin konnte entgegen den Lanthionin-Synthesen via β -Iodalanin weder bei der Bromid-Synthese noch bei der Lanthionin-Synthese als Nebenprodukt nachgewiesen werden, was wiederum gegen die Bildung von unerwünschtem Norlanthionin spricht. Beide Punkte wurden noch einer genaueren Überprüfung unterzogen (Kapitel 3.1.5 und 3.1.6).

Zu einem späteren Zeitpunkt während dieser Arbeit wurde eine vergleichbare Lanthionin-Synthese von Zhu et al. publiziert [177]. Zhu setzte anstelle der Umsetzung mit DIEA in DMF eine Phasen-Transfer-Katalyse für die Lanthionin-Synthese ein (**Abb. 21**). Das Bromid **59a** wurde zusammen mit dem Cystein **65** in Ethylacetat gelöst und eine Natriumhydrogencarbonat Lösung (pH 8,5) zugegeben. Als Phasen-Transfer-Katalysator wurde TBAHS zugesetzt, die Mischung 12 Stunden gerührt und anschließend aufbereitet.

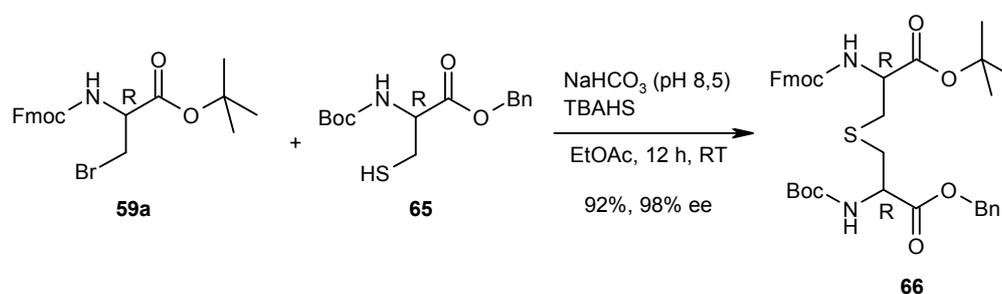


Abb. 21 Lanthionin-Synthese via Phasentransfer-Katalyse; entwickelt von Zhu et al. [177]

Die von Zhu et al. gefundenen Ausbeuten von 92 % **66** bei einem Enantiomerenüberschuss von 98 % ee konnten mit den in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsverbindungen (**62a** und **59a**) nicht reproduziert werden. Vielmehr lagen unsere Ausbeuten bei maximal 65 % Lanthionin bei einem Enantiomerenüberschuss von 96 und 90 % ee (R,R). Neben Dehydroalanin fand sich als weiteres Nebenprodukt das entsprechende Cystinderivat, wodurch die Reinigung des Produktes über Säulenchromatographie, bedingt durch das ähnliche Laufverhalten des Cystins und des Lanthionins, erschwert wurde. Über ein Cystinderivat als Nebenprodukt machen Zhu et al. keine Angaben^[177].

Bezüglich der entwickelten Lanthionin-Synthese blieben nun noch zwei Fragen offen: Handelt es sich bei der isolierten Verbindung um Lanthionin oder Norlanthionin? Und über welchen Mechanismus erfolgt die Lanthionin-Synthese, einen Eliminierung-Addition-Mechanismus oder über Substitution?

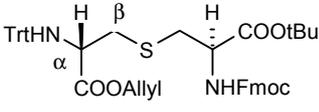
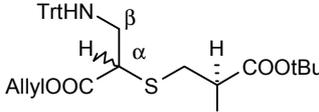
3.1.5 Lanthionin oder Norlanthionin?

Um die Frage Lanthionin oder Norlanthionin beantworten zu können, wurden die NMR-Daten von Mustapa et al.^[120] mit berechneten und den von uns gefundenen NMR-Daten verglichen. Bei Mustapa et al. (**Tab. 4**) zeigten sich die Unterschiede zwischen Lanthionin und Norlanthionin am deutlichsten in den Verschiebungen der α -Kohlenstoffe im ^{13}C -NMR und der starken Veränderung der β -Protonen-Verschiebung. Zu beachten war die offensichtlich ungenaue Berechnung der H_β -Werte des Norlanthionins. Der berechnete Wert der H_β -Protonen lag deutlich über dem berechneten H_α -Wert, während die gefundenen H_β -Werte unter den Werten der α -Protonen des Lanthionins lagen.

Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Vergleich der gemessenen Daten der isolierten Verbindung mit den berechneten Daten des Lanthionins und des Norlanthionins (**Tab. 5**) zeigte bei den gefundenen Werten eine ähnliche Differenz zu den berechneten wie bei Mustapa et al. Dies erhärtete einerseits die Vermutung, dass es sich bei der isolierten Verbindung um Lanthionin handelt, konnte aber andererseits aufgrund der Abweichung der berechneten Werte von den gemessenen nicht als Identitätsbeweis herangezogen werden. Die Ähnlichkeit der gemessenen C_α -Verschiebungen mit den berechneten Werten ließ vermuten, dass es sich bei der isolierten Verbindung um Lanthionin, nicht um Norlanthionin handelte. Endgültigen Aufschluss über die genaue Struktur der isolierten Verbindung brachte die Aufnahme eines H,H -COSY Spektrums, in welchem deutlich die

Kopplung der beiden Stickstoff-Protonen (18 + 24, **Abb. 22**) mit den α -Protonen (19 + 23) des Lanthionins zu erkennen war (in **Abb. 23** dargestellt).

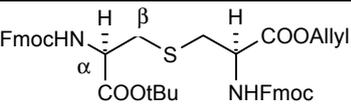
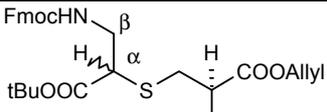
Tab. 4 Vergleich der NMR-Daten des Lanthionins und Norlanthionins

		 67	 68
Berechnet: ^c	$\delta(\text{H}_\alpha)/\text{ppm}$	4.02	3.77
	$\delta(\text{C}_\alpha)/\text{ppm}$	62.87	44.31
	$\delta(\text{H}_\beta)/\text{ppm}$	3.00	3.40 und 3.21
	$\delta(\text{C}_\beta)/\text{ppm}$	35.01	51.59
Mustapa et al.: ^[120]	$\delta(\text{H}_\alpha)/\text{ppm}$	3.56	3.49 und 3.56 ^b
	$\delta(\text{C}_\alpha)/\text{ppm}$	56.2	48.0 und 48.8 ^b
	$\delta(\text{H}_\beta)/\text{ppm}$	2.70-2.89	2.45 und 2.61 ^b
	$\delta(\text{C}_\beta)/\text{ppm}$	^a	44.6 und 44.9 ^b

^a Signal zu schwach, um detektiert zu werden. ^b Zwei Signale aufgrund von Diastereomeren.

^c Berechnete Daten wurden mit ACD-¹H-NMR Predictor generiert.

Tab. 5 Vergleich der berechneten Daten für Lanthionin und Norlanthionin mit den gefundenen Werten

		 63a	 69
Berechnet: ^a	$\delta(\text{H}_\alpha)/\text{ppm}$	4.53	3.89
	$\delta(\text{C}_\alpha)/\text{ppm}$	57.53	42.0
	$\delta(\text{H}_\beta)/\text{ppm}$	3.17 und 3.36	3.37 und 3.41
	$\delta(\text{C}_\beta)/\text{ppm}$	36.18	40.9
Gefunden:	$\delta(\text{H}_\alpha)/\text{ppm}$	4.63	---
	$\delta(\text{C}_\alpha)/\text{ppm}$	54.74	---
	$\delta(\text{H}_\beta)/\text{ppm}$	2.90–3.15	---
	$\delta(\text{C}_\beta)/\text{ppm}$	35.98	---

^a Berechnete Daten wurden mit ACD-¹H-NMR Predictor generiert.

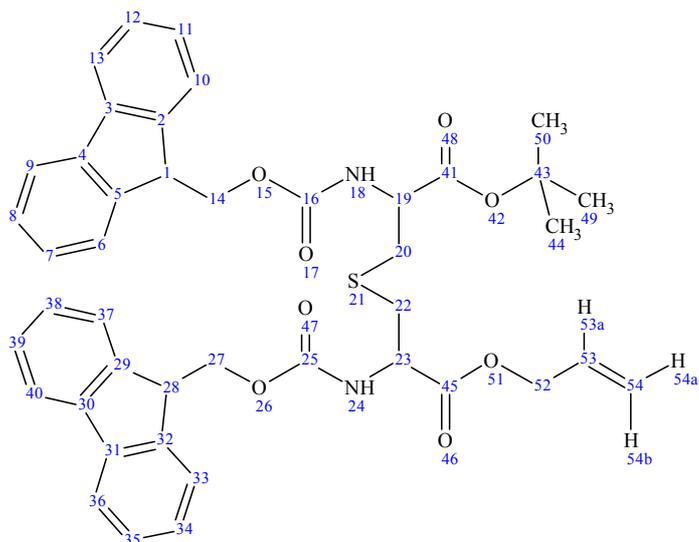


Abb. 22 Für die Zuordnung der Signale im H/H-COSY-Spektrum verwendete Nummerierung des synthetisierten Lanthionins **63a**

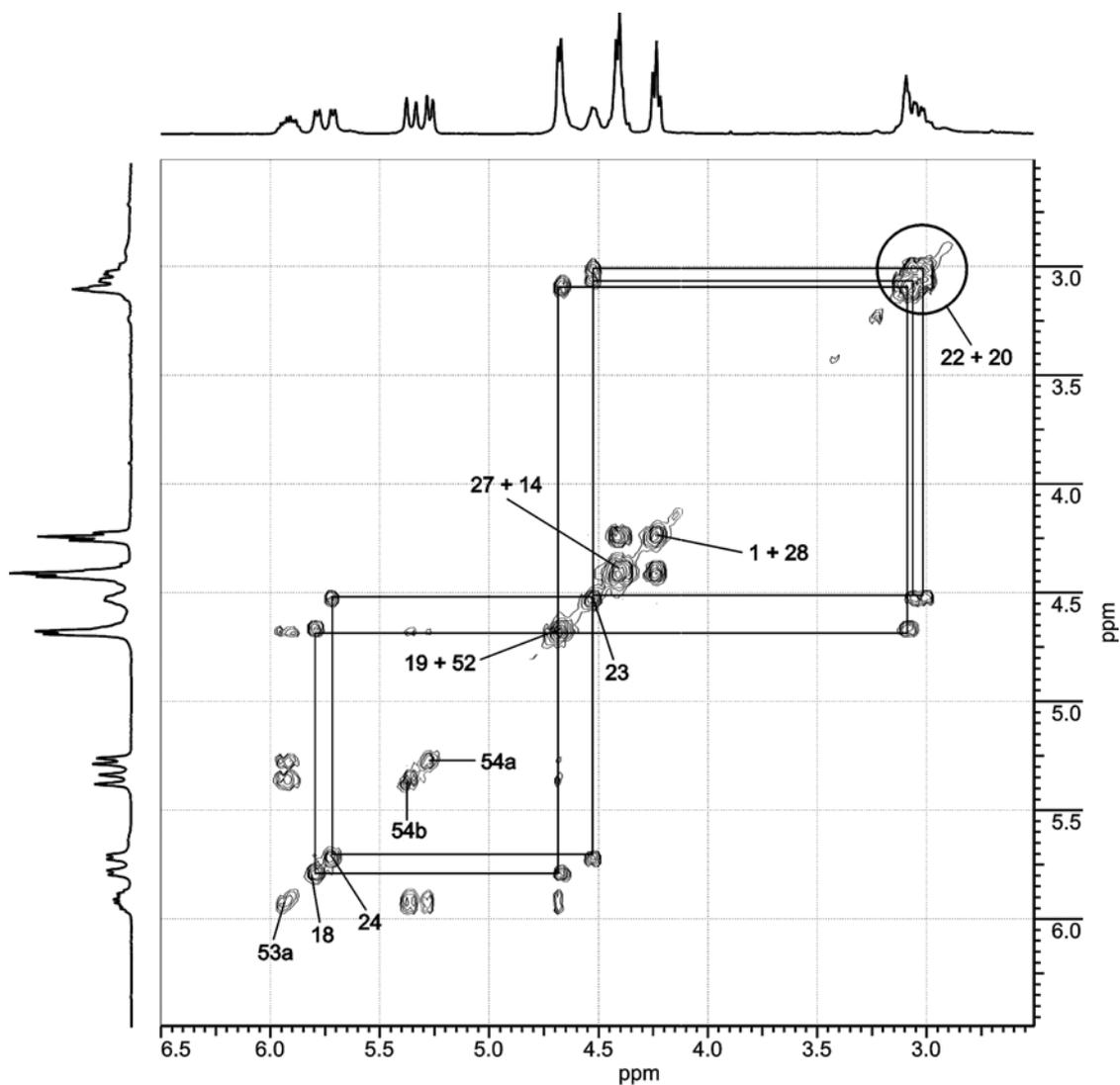


Abb. 23 H/H-COSY des N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-Lanthionin-O⁷-allyl-O¹-*tert.*-butyldiesters (**63a**).
Zoom des Bereichs der Stickstoff-, α - und β -Protonen. (600.13 MHz, CDCl₃)

Aufgrund der gefundenen Kopplungskonstanten lassen sich auch die Protonen *54a* und *54b* zuordnen. Aus der Karplus-Kurve ist ersichtlich, dass der Betrag der Kopplungskonstante einer *trans*-Kopplung signifikant größer ist als der einer *cis*-Kopplung. Die beobachteten Kopplungskonstanten der beiden betreffenden Dublets ($J = 17.18$ Hz und $J = 10.36$ Hz) erlauben damit eine Zuordnung der Peaks zu den betreffenden Protonen *54b* und *54a*.

Bei der isolierten Verbindung handelt es sich, wie die Betrachtung der in diesem Kapitel dargestellten Daten deutlich ergibt, um Lanthionin und nicht um Norlanthionin.

3.1.6 Synthese und Analytik der Stereoisomeren der Lanthioninderivate

Nachdem die Identität des (2R,6R)-Lanthionins eindeutig geklärt war, wurden die drei verbliebenen Stereoisomere des Lanthionins synthetisiert. Dazu wurden die jeweiligen (R)- und (S)-Aminosäuren (**48a/b** und **60a/b**) im bereits dargestellten Syntheseprotokoll (**Abb. 20**) eingesetzt, was letztlich zu den vier Stereoisomeren des N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-Lanthionin-O⁷-allyl-O¹-*tert.* butyldiesters (2R,6R (**63a**); 2R,6S (**63b**); 2S,6R (**63c**) und 2S,6S (**63d**)) führte. Um die Enantiomerenreinheiten der Verbindungen zu überprüfen, waren die Lanthionine und die ebenfalls untersuchten Ausgangsverbindungen (**51a** und **58b** sowie **62a** und **62b**) in eine für die GC-MS-Analyse geeignete Form zu überführen.

Im ersten Schritt der Derivatisierung erfolgte unter Schutzgas mit 20 % Piperidin/DCM in 15 min bei RT die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Nach Abdampfen der Lösungsmittel im Stickstoffstrom wurde eine 15 % Mischung von Acetylchlorid in Methanol-d¹ zugegeben und die Lösung 30 min bei 110°C gerührt, wodurch der *tert.*-Butylester in den Methylester überführt wurde. Bei diesen Bedingungen unterblieb ein Austausch der Allyl-Schutzgruppe. Der Einsatz von Methanol-d¹ erlaubte, das bei sauren Bedingungen teilweise racemisierte Lanthionin von nicht racemisiertem unterscheiden zu können: Der im Verlauf der Racemisierung stattfindende Austausch der α -Wasserstoffatome durch Deuterium bewirkt, dass die Molekülfragmente des racemisierten Lanthionins um 1 u bzw. 2 u schwerer sind als die nicht racemisierten. Diese Ionen konnten dann durch die Verwendung des Selected-Ion-Modes (Festlegung eines Ions definierter Molekülmasse) von der Bestimmung ausgeschlossen werden.

Zum Schluss wurden die freien Amine mit Trifluoressigsäureanhydrid/DCM 1:4 in 10 min bei 100°C acyliert und die (TFA)₂-Lanthionindiester in den GC-MS-Analysen eingesetzt.

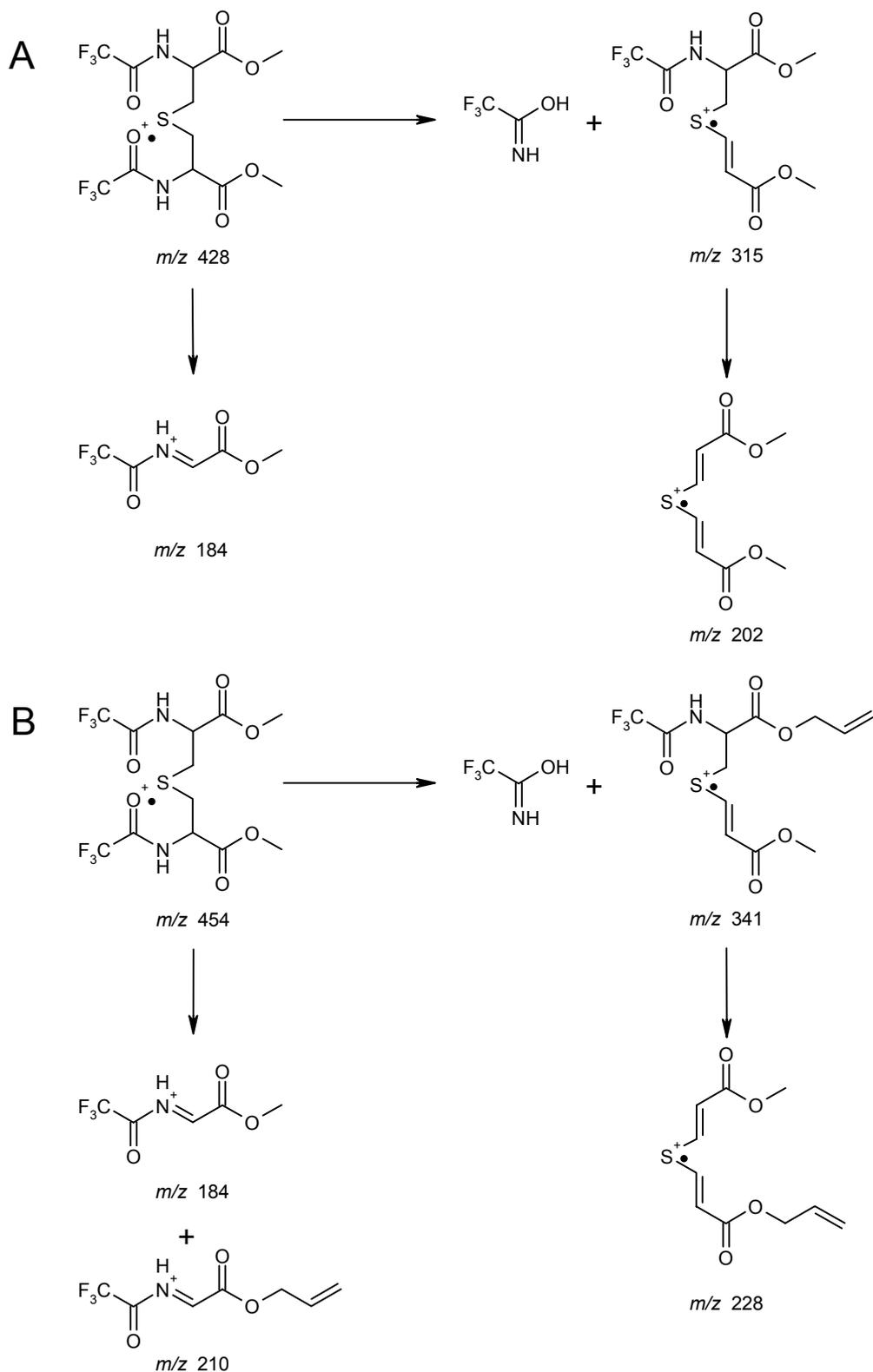


Abb. 24 EI-MS Spektren des von Harpp und Gleason (A) und des von uns (B) verwendeten Lanthionin-Derivats

In **Abb. 24** sind die Fragmentierungsmuster des von Harpp und Gleason ^[100] beschriebenen und des von uns verwendeten Lanthionin-Derivates abgebildet. Eine Abbildung der aufgenommenen EI-MS-Spektren findet sich im Anhang. Die Ionen 184 und 202 bzw. 184

und 228 erbrachten stark unterschiedliche Racemisierungswerte. Die höchsten Enantiomerenreinheiten wurden für die Ionen 202 bzw 228 gefunden. Diese wurden für die Aufnahme der GC-MS-Chromatogramme im Selected-Ion-Mode verwendet.

Tab. 6 Ergebnisse der Enantiomeren-Bestimmung der Ausgangsverbindungen

Verbindung	R	S
N-Fmoc-(R)-Cysteinallylester (62a)	99,75	0,25
N-Fmoc-(S)-Cysteinallylester (62b)	3,30	96,70
N-Fmoc-(S)-Serin- <i>tert.</i> butylester (58a)	0,15	99,85
N-Fmoc-(R)-Serin- <i>tert.</i> Butylester (58b)	99,34	0,66

Die Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse der Ausgangsverbindungen brachte keine Überraschungen. Die Synthesen verliefen alle unter Retention des Stereozentrums (**Tab. 6**). Die leichte Abweichung von den erwarteten Werten im Falle des N-Fmoc-(S)-Cysteinallylesters fand sich bereits im eingesetzten N-Fmoc-S-trityl-(S)-cystein wieder, und könnten auf lange Lagerzeiten der Verbindung bei falschen Bedingungen zurückzuführen. Da die gefundenen Reinheiten der Lanthionine für unsere Zwecke ausreichend waren, wurde aus Kostengründen auf eine erneute Synthese des Bausteins verzichtet. Die β -Bromalanine waren gegenüber den GC-MS-Bedingungen nicht stabil und wurden nicht vermessen.

Tab. 7 Ergebnisse der Enantiomeren-Bestimmung der synthetisierten Lanthionine

Verbindung	RR	RS SR	SS
N ² ,N ⁶ -bis-Fmoc-(2R,6R)-Lanthionin-O ⁷ -allyl-O ¹ - <i>tert.</i> butyldiester (63a)	97,32	2,66	0,03
N ² ,N ⁶ -bis-Fmoc-(2R,6S)-Lanthionin-O ⁷ -allyl-O ¹ - <i>tert.</i> butyldiester (63b)	1,28	97,06	1,66
N ² ,N ⁶ -bis-Fmoc-(2S,6R)-Lanthionin-O ⁷ -allyl-O ¹ - <i>tert.</i> butyldiester (63c)	2,59	96,69	0,72
N ² ,N ⁶ -bis-Fmoc-(2S,6S)-Lanthionin-O ⁷ -allyl-O ¹ - <i>tert.</i> butyldiester (63d)	0,12	4,05	95,83

Ein Vergleich der gefundenen Enantiomerenreinheiten der Ausgangsverbindungen mit den gefundenen Werten der Lanthionine (**Tab. 7**) zeigt deutlich die Retention der Stereozentren und beweist damit den Verlauf über einen Substitutions-Mechanismus. Der Eliminierung-Addition-Mechanismus würde zu signifikant größeren Abweichungen der Reinheiten der synthetisierten Enantiomeren führen. Im Falle des R,R-Lanthionins müssten die Verhältnisse der gefundenen Werte bei einer stattfindenden Michael-Addition bei ca. 1:1 für R,R zu S,R liegen.

3.1.7 Lösungssynthese des Pam₂LanHda-OH Bausteins

Probleme könnten bei der Festphasensynthese durch inverse Kupplung des Amins auf Harz-gebundenes Lanthionin auftreten. Um dies zu vermeiden und um einen einfach einsetzbaren Baustein für die Lipolanthionin-Peptide zur Verfügung zu haben, wurde ausgehend von N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin-O⁷-allyl-O¹-tert.-butyldiester (**63a**) eine Lösungssynthese für N²,N⁶-Bis-(Palmitoyl)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-hexadecylamid (Pam₂LanHda-OH, **74**) entwickelt (**Abb. 25**). Augenmerk lag hierbei auf dem als Zwischenprodukt während der Synthese anfallenden N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-hexadecylamid-O¹-tert.-butylester (**71**), aus dem sich durch einfache Esterspaltung das für die Festphasensynthese ebenfalls interessante N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-lanthionin-N⁷-hexadecylamid (Fmoc₂LanHda-OH, **72**) herstellen lässt.

Pam₂LanHda-OH (**73**) diene als Pam₃Cys-OH analoger Baustein für eine schnelle Synthese von Lanthionin enthaltenden Lipopeptiden. Der Einsatz des Fmoc₂LanHda-OH Bausteins (**72**) erlaubte eine erste Variation der Fettsäurelänge und damit orientierende Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Während die aus diesen Verbindungen synthetisierten Lipopeptide in einem ersten Screening auf ihre Aktivität hin untersucht wurden, konnten parallel geeignete Bedingungen für die Spaltung der Allyl-Schutzgruppe an fester Phase und die Kupplung des Fettamins gesucht werden.

Für die Synthese des Fmoc₂LanHda-OH Bausteins (**Abb. 25**) wurde im ersten Schritt die Allyl-Schutzgruppe des Lanthionins **63a** mit Tetrakis(triphenylphosphin)paladinat (Pd(Ph₃)₄) und Morpholin in DCM unter Schutzgas und Lichtausschluss abgespalten (**70**). Die säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts ergab das Allyl-entschützte Lanthioninderivat **70** in 91 %iger Ausbeute. Nach Umsetzung des Lanthionins **70** mit DIC und HOBT in DCM/DMF (5:2) zum HOBT-Ester wurde langsam eine Lösung aus

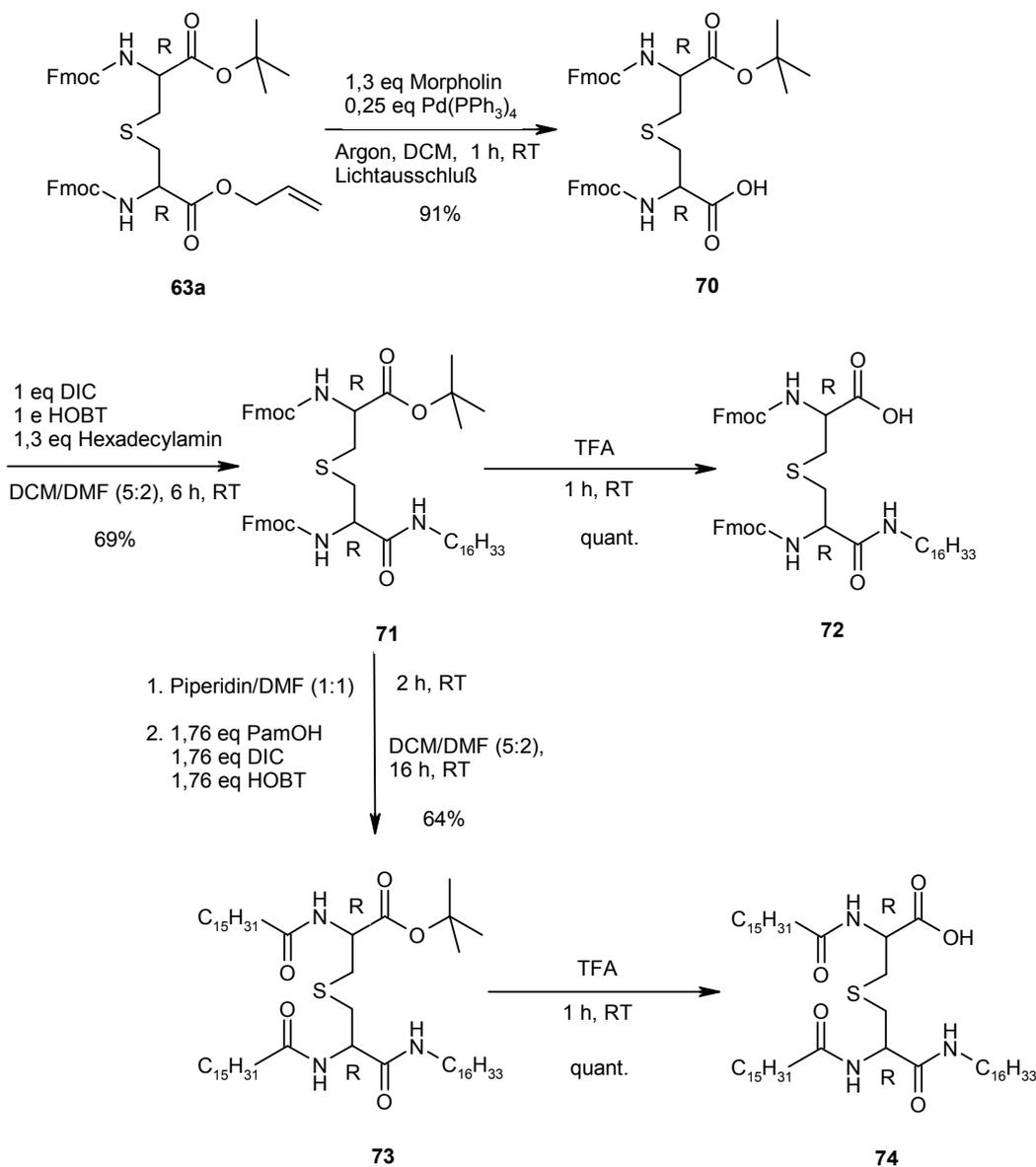


Abb. 25 Schematische Darstellung der Pam₂LanHda-OH(72) und der Fmoc₂LanHda-OH (74) Synthese. Hexadecylamin in demselben Lösungsmittelgemisch zugetropft. Die Ausbeute an 71 lag bei dieser Reaktion nur bei 69 %, was auf eine teilweise Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch das Hexadecylamin und die damit verbundenen Nebenreaktionen (Lanthionin-Lanthionin Kupplung) zurückzuführen war. Eine weitere Erniedrigung der eingesetzten Hexadecylamin Äquivalente brachte keine Verbesserung der Ausbeute. Der auf diese Weise synthetisierte N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-Lanthionin-N⁷-hexadecylamid-O¹-*tert*-butylester (71) konnte nach Spaltung des *tert*-Butylesters in der Festphasensynthese eingesetzt werden.

Für die Synthese des Pam₂LanHda-OH wurde zunächst Palmitinsäure als HOBT-Ester voraktiviert. Zeitgleich wurde Fmoc₂LanHda-OtBu (71) mit einer Mischung aus Piperidin/DMF 1:1 behandelt, um die Fmoc-Schutzgruppen zu entfernen. Nach beendeter

Abspaltung wurde die Piperidin/DMF Mischung am Hochvakuum entfernt, das resultierende LanHda-OtBu in DMF/DCM 5:2 aufgenommen und tropfenweise zu der voraktivierten Mischung aus Palmitinsäure, DIC und HOBT gegeben. Nach beendeter Reaktion wurde das gewünschte Produkt (**73**) durch Fällen aus Chloroform/Methanol bei -20°C gewonnen (63 % Ausbeute). Spaltung des *tert.*-Butylesters mit reiner TFA führte nach Lyophilisieren in quantitativer Ausbeute zum gewünschten Pam₂LanHda-OH (**74**).

3.1.8 Analytik des synthetisierten Pam₂LanHda-OH

Die Analytik des Produktes Pam₂LanHda-OH (**74**) gestaltete sich schwierig. Als Problem erwies sich die schlechte Löslichkeit des Bausteins in allen getesteten Lösungsmitteln. Die Aufnahme von HPLC-Chromatogrammen schied von vornherein aus, da das stark lipophile Pam₂LanHda-OH auf den zur Verfügung stehenden Säulen (C₁₈ und C₄) nicht getrennt werden kann. Zur Reinheitskontrolle wurden ersatzweise DC's aufgenommen und eine Elementaranalyse durchgeführt. Mit beiden Methoden konnte die Reinheit der Verbindung bestätigt werden. Die Ergebnisse der Elementaranalyse sind mit den theoretisch erwarteten Werten in **Tab. 8** zusammengefasst.

Tab. 8 Ergebnisse der Elementaranalyse von Pam₂LanHda-OH **74**

C ₅₄ H ₁₀₅ N ₃ O ₅ S	Theoret. [%]	Gefunden [%]
C	71,39	71,29
H	11,65	11,40
N	4,63	4,55
S	3,53	3,50

Die schlechte Löslichkeit bereitete auch bei der Aufnahme von ES-MS-Spektren Schwierigkeiten. Letztlich wurde der Überstand einer Suspension von 1 mg Verbindung in 1 ml DCM/Methanol (1:9; 1 % NaCl) vermessen (**Abb. 26**). Während im Positiv-Modus

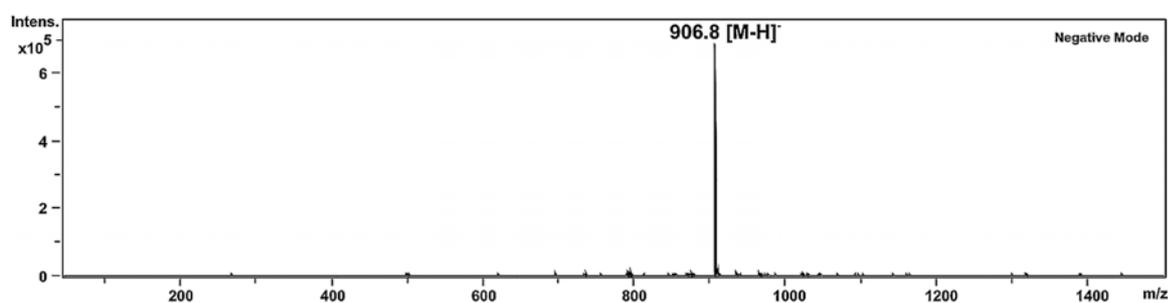


Abb. 26 ES-MS Spektrum des synthetisierten Pam₂LanHda-OH (M = 907) (**67**); Negativ-Modus

die Verbindung nur schwach zu detektieren war, ließ sich die deprotonierte Form im Negativ-Modus eindeutig nachweisen.

Zusätzlich wurde ein FT-ICR-MS-Spektrum aufgenommen, das die Elementaranalyse bestätigte ($\Delta = 0,57$ ppm). Der Erhalt der Stereochemie konnte durch die Aufnahme eines GC-MS-Chromatogramms bewiesen werden (91,1 % RR).

Die Aufnahme von NMR-Spektren wurde in Chloroform bei 50°C durchgeführt. Erst bei dieser Temperatur löste sich die Verbindung in der benötigten höheren Konzentration (45 mg/ml). In **Abb. 27** ist die für die Zuordnung verwendete Nummerierung der Protonen bzw. Kohlenstoffatome dargestellt.

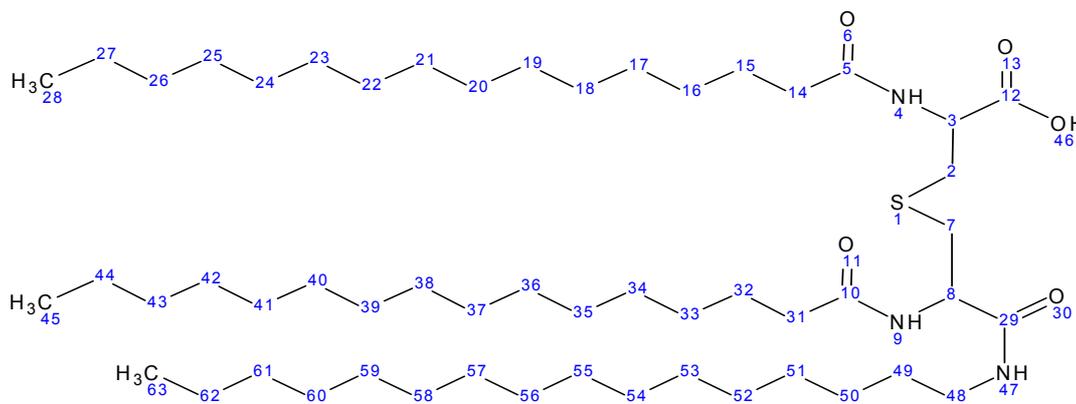


Abb. 27 Pam₂LanHda-OH (**74**); verwendete Nummerierung für die NMR-Auswertungen

Eine direkte Zuordnung der α -Protonen zu den zugehörigen Kohlenstoffatomen erlaubten die erhaltenen Spektren nicht. Die berechneten Werte wiesen jedoch eine hohe Übereinstimmung mit den gefundenen Werten auf. Zusammen mit der Annahme, dass Proton 3 aufgrund des größeren negativ-induktiven Effekts der Säure-Gruppe gegenüber der Säureamid-Gruppe eine höhere Tieffeldverschiebung aufweisen muss als Proton 8, ließen sich die beiden Protonen eindeutig zuordnen (3 5.15 ppm, 8 4.87 ppm). Durch die Korrelationspeaks im H/H-COSY-Spektrum (**Abb. 28**) konnten damit auch die Stickstoff- (4 6.72 ppm; 9 6.87 ppm) und β -Protonen (2 3.00 ppm, 7 2.89 ppm) eindeutig ihren jeweiligen Signalen zugewiesen werden. Bemerkenswert war hier die stark unterschiedliche Verschiebung der β -Protonen 2a und 2b. Auf eine genauere Unterscheidung der beiden Protonen wurde jedoch verzichtet. Nach der Zuordnung der α - und β -Protonen konnte im Spektrum das letzte Stickstoff-Proton (47 7.19 ppm), und durch die Korrelationspeaks die ersten Protonen der Fettamin-Kette (48 3.26 ppm, 49 1.54 ppm und 50 1.37 ppm) zugeordnet werden. Die Zuweisung der ersten Protonen der Fettsäureketten, 14 und 31 (2.27 ppm), erfolgte aufgrund ihrer Verschiebung und einer fehlenden zweiten Kopplung.

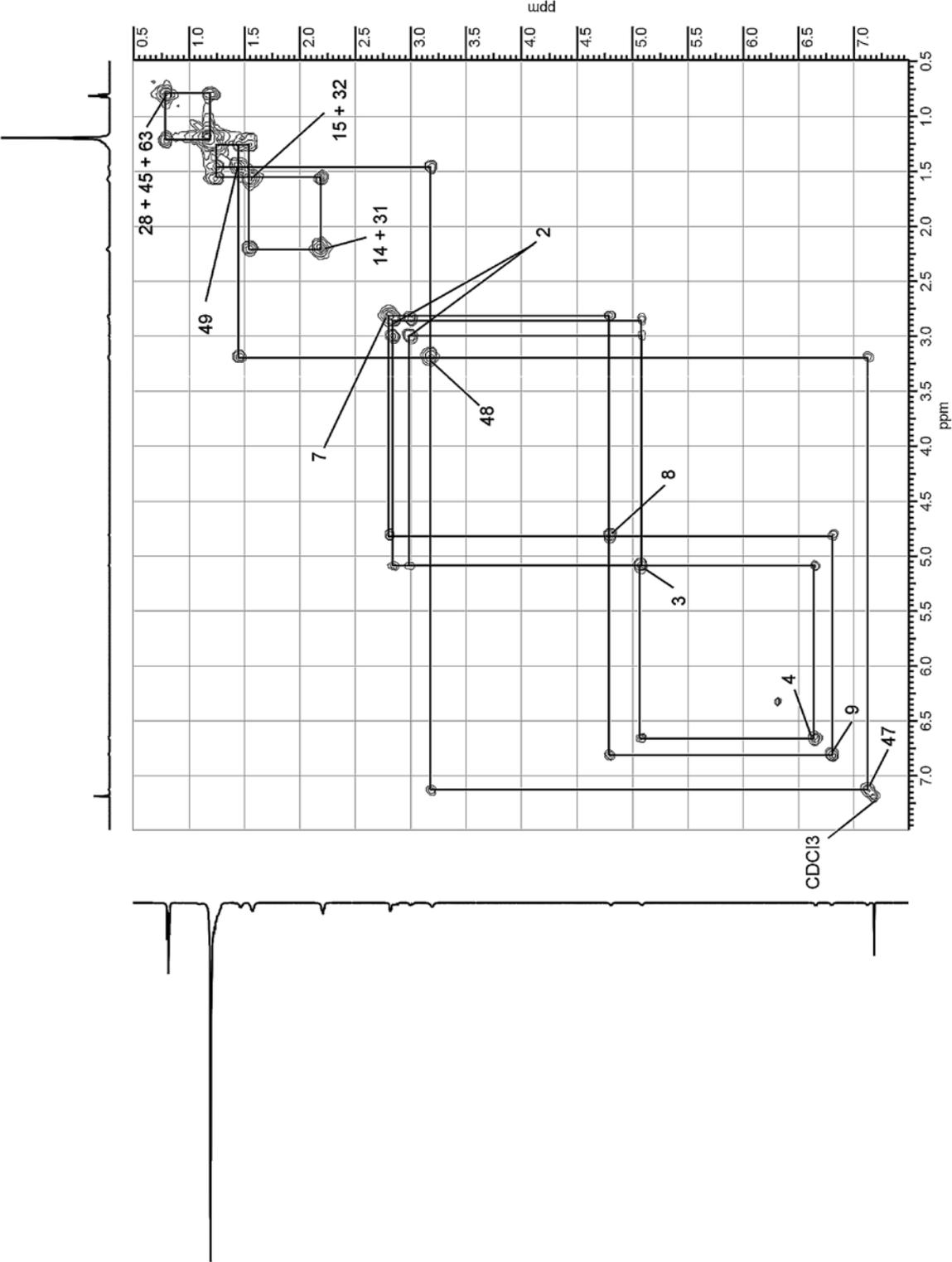


Abb. 28 H/H-COSY-Spektrum von Pam₂LanHda-OH (74) (600.13 MHz; 323K; CDCl₃)

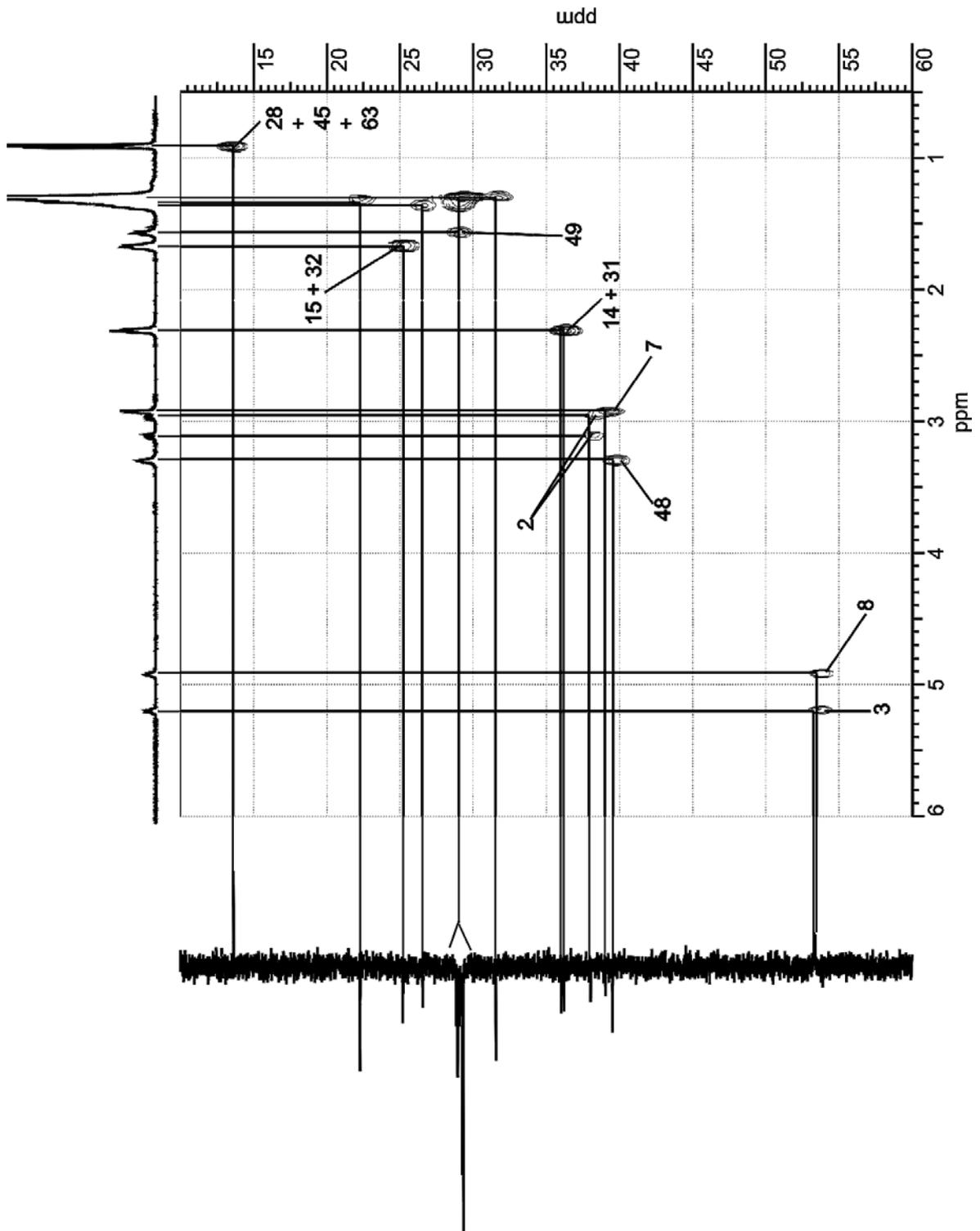


Abb. 29 HSQC-Spektrum von Pam₂LanHda-OH (74) (600.13/150.90 MHz; 323K; CDCl₃)

15 und 32 (1.64 ppm) sowie 16 und 33 (1.35 ppm) wurden dann durch die jeweils mit ihren Nachbarprotonen auftretenden Korrelationspeaks zugeordnet. Durch das Kopplungsmuster (Triplet) und die geringe Tieffeldverschiebung wurde das Signal bei 0.88 ppm den Protonen 28, 45 und 63 zugewiesen. Die restlichen Protonen (17-27, 34-44 und 51-62) fielen in einem Multiplett bei 1.31 ppm zusammen und ließen sich nicht weiter unterscheiden.

Mit den zugewiesenen ^1H -NMR-Signalen konnten nun die wichtigsten Signale im ^{13}C -NMR durch die Aufnahme eines HSQC-Spektrums (**Abb. 29**) den jeweiligen Kohlenstoffatomen zugeordnet werden. Die Kohlenstoffe der Säureamide (5, 10, 29) bzw. der Carboxyl-Gruppe (12) wurden hierbei durch den Vergleich der berechneten Werte mit den gefundenen zugeordnet (5 174.76 ppm, 10 174.40 ppm, 12 171.66 ppm, 29 169.83 ppm). Aus dem HSQC-Spektrum ließen sich ferner eindeutig die Signale der α -Kohlenstoffatome (8 53.78 ppm und 3 53.70 ppm), der β -Kohlenstoffatome (7 39.45 ppm und 2 38.43 ppm) sowie die ersten Kohlenstoffe der Fettamin-Kette (48 39.93 ppm und 49 29.54 ppm) und der Fettsäurereste (14 und 31 36.62 und 36.41 ppm; 15 und 32 25.60 und 25.57 ppm) zuweisen. Eine exakte Zuordnung der Kohlenstoffe 14 und 31 sowie 15 und 32 war mit den verwendeten Methoden nicht möglich. Eindeutig definiert wurde auch das Signal der drei endständigen Kohlenstoffatome der Fettsäure- bzw. Fettaminreste (28, 45 und 63 14.02 ppm). Die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der Syntheseprodukte sind auch in Übereinstimmung mit den ^{13}C -NMR-daten ähnlicher Sulfide^[154].

3.1.9 Übertragung der entwickelten Synthese auf Methyllanthionin

Nach Abschluss der Synthese der drei Lanthionin-Building-Blocks wurde versucht, die für den Fmoc₂LanOAllyl-OH Baustein entwickelte Synthese auf einen vergleichbaren Fmoc₂MeLanOAllyl-OH Baustein zu übertragen.

Dazu wurde Fmoc-Thr(Trt)-OH (**75**) mit Cu(I)Cl, DIC und *tert.*-Butylalkohol in 54 %iger Ausbeute zum Fmoc-Thr(Trt)-O^tBu (**76**) umgesetzt (**Abb. 30**). Abgeleitet von den Bedingungen der Spaltung komplett geschützter Peptide vom Trityl- bzw. TCP-Harz (20 % TFE in DCM) wurde die Trityl-Schutzgruppe selektiv mit TFE/DCM/TIPS 10:5:1 (94 % Ausbeute) gespalten (**77**). Die Verwendung der 20 %igen TFE/DCM Lösung führte in Lösung nicht zur Spaltung der Trityl-Gruppe (Überwachung der Reaktion mit DC

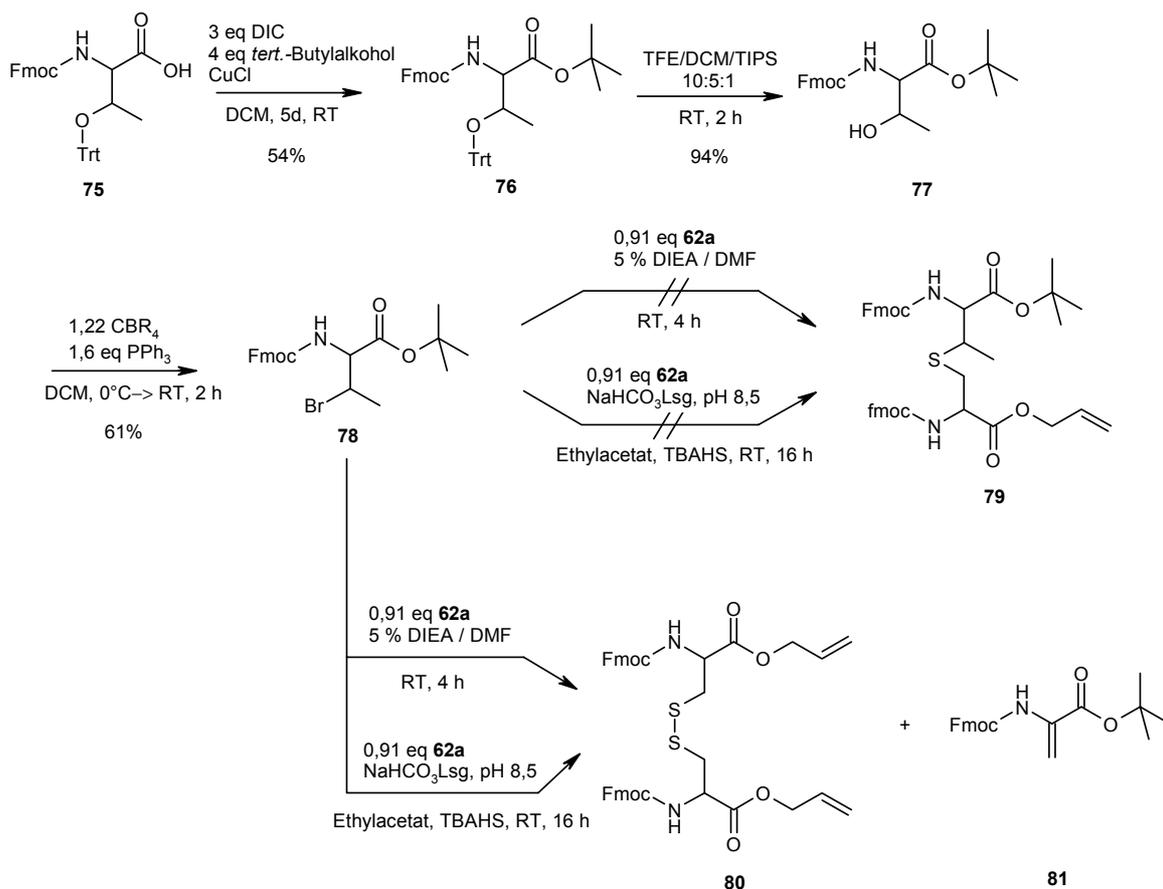


Abb. 30 Versuch der Synthese des β -Methylanthionins analog der entwickelten Lanthionin-Synthese Hexan/Ethylacetat 2:1). Die anschließende Konversion der Hydroxyfunktion zum Bromid gelang mit den bereits beschriebenen Bedingungen (**78**; CBr_4 und PPh_3 , 61 % Ausbeute).

Anders als bei der Umwandlung der Hydroxyfunktion des Fmoc-Ser- O^tBu zum Bromid fand sich hier Dehydroalanin als Nebenprodukt. Die Charakterisierung des synthetisierten, in der Literatur bislang nicht beschriebenen Bromids erfolgte mit HPLC, MS und NMR. In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (**Abb. 31**) des Threonins (A) und des Bromids (B) erlaubten die höhere Tieffeldverschiebung der β -Methylprotonen (21) durch den Einfluss des Broms und des Verschwindens des Signals des Hydroxyprotons (26) eine eindeutige Unterscheidung des Edukts vom Produkt.

Die folgende Umsetzung zum Methyllanthionin **79** wurde sowohl mit den von Zhu et al. beschriebenen (Phasentransfer-Katalyse) als auch mit unseren Bedingungen (5 % DIEA in DMF) getestet. Keine der beiden Bedingungen führte zum gewünschten Methyllanthionin. Als Hauptprodukt der Synthesen fand sich das entsprechende Cystin **80** neben Dehydroalanin **81**, nicht umgesetztem Cystein **62a** und Bromid **78**. Eine direkte Übertragung der Synthesebedingungen ist somit unmöglich.

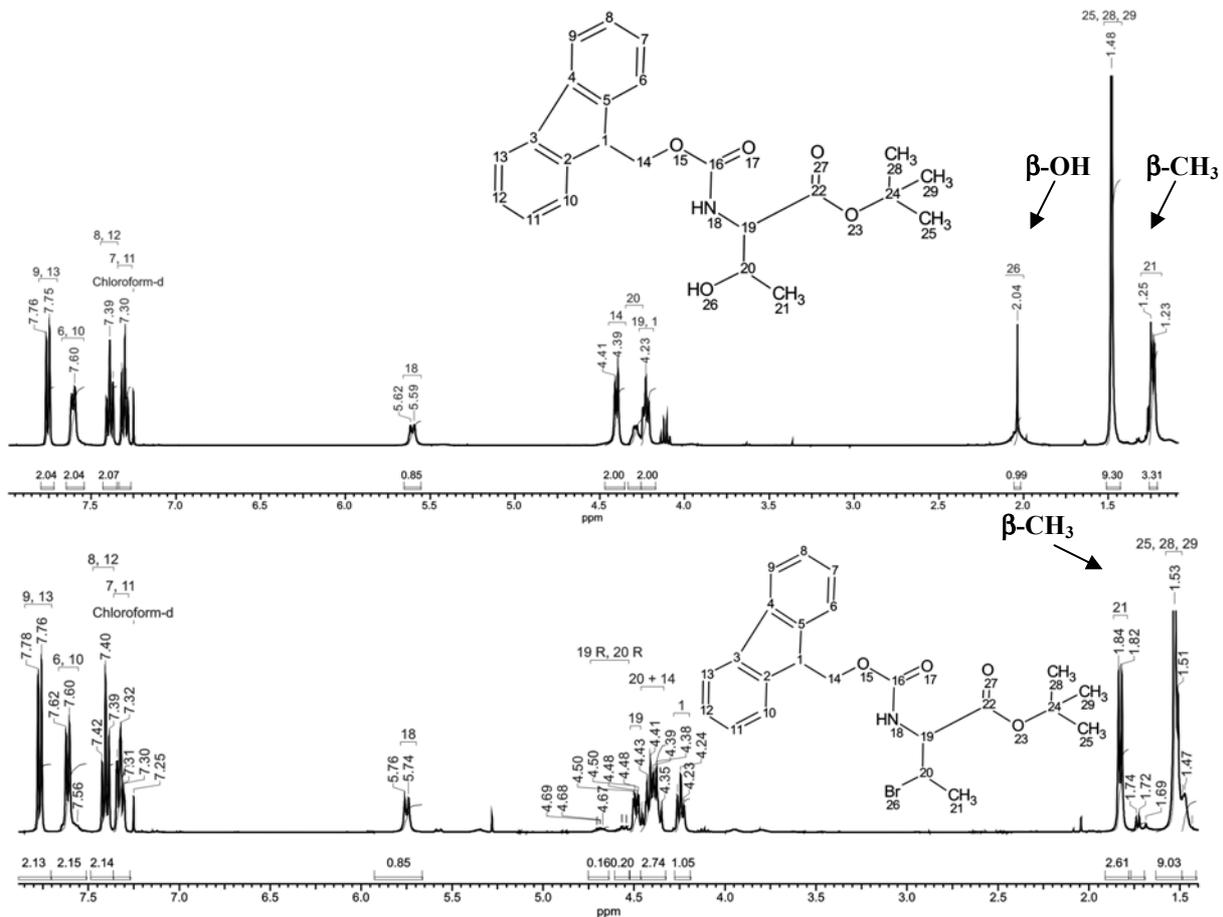


Abb. 31 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Fmoc-Thr- O^tBu (**77**; A) und des N-Fmoc-2-amino-3-brombutansäure-*tert.*-butylesters (**78**; B). Die Pfeile kennzeichnen die signifikantesten Veränderungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum.

3.2 Festphasen-Synthese Protokoll für Lipolanthionin-Peptide

Nachdem alle für eine Festphasen-Synthese benötigten Bausteine synthetisiert und charakterisiert waren, richtete sich das Augenmerk auf die Herstellung der Lipopeptide an fester Phase. Im ersten Schritt galt es ein Peptid auszuwählen und zu synthetisieren, an dessen N-Terminus die Lipo-Aminosäure aufgebaut werden sollte. Um die aus den Testserien auf TLR-agonistische und -antagonistische Aktivität resultierenden Daten mit den publizierten und von der Firma EMC microcollections GmbH (Tübingen, Germany) zur Verfügung gestellten Daten des Pam₃Cys-SK₄-OH und seiner Derivate vergleichen zu können, wurde Seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysine als Peptidteil der Lipopeptide gewählt. Der hauptgrund für die Wahl des Ser-(Lys)₄ ist die durch diesen Peptidrest signifikant verbesserte Löslichkeit der Lipopeptide in wässrigem Medium, was für ein Screening der Lipolanthionine an lebenden Zellen unerlässlich ist.

3.2.1 Synthese der Harzgebundenen Peptid-Sequenz Ser-(Lys)₄

Die Peptid-Sequenz SK₄ wurde als Amid mit Fmoc-Strategie an Rink-Amid-Harz (0,74 mmol/g) aufgebaut. Die einzelnen Aminosäuren wurden dazu mit DIC/HOBT in DMF/DCM 1:8 voraktiviert und auf das mit 20 % Piperidin/DMF entschützte Harz gekuppelt. Nach jeder Kupplung wurde die Vollständigkeit der Reaktion durch Kaiser-Test überprüft^[48]. Für die weitere Analytik wurde nach jedem Kupplungsschritt eine Probe des Harzes entnommen (2 mg) und mit TFA/H₂O 95:5 das Fmoc-Peptidamid vom Harz gespalten. Nach Lyophilisieren wurde das Peptid mit HPLC und ES-MS charakterisiert (bei allen Reaktionsschritten HPLC: > 99 %). Im Anschluss an den letzten Kupplungsschritt (Serin-Kupplung) wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Analysen durch quantitative Fmoc-Bestimmung die resultierende Beladung des Harzes ermittelt. Ein Vergleich dieser Werte mit der berechneten Beladung (siehe Anhang) bestätigte die quantitative Synthese des Fmoc-Ser-(Lys)₄-NH₂ am Harz (gem.: 0,409 mmol/g; theoret.: 0,416 mmol/g). Im Folgenden wird das synthetisierte, Fmoc-entschützte Ser-(Lys)₄-Rink-Amid Harz als SK₄-Harz bezeichnet.

3.2.2 Synthesepfad für Pam₂LanHda-SK₄-NH₂

Für die Synthese des Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ standen mehrere Möglichkeiten zur Wahl (**Abb. 32**):

1. Kupplung des Pam₂LanHda-OH Bausteins (**74**) auf SK₄-Harz
2. Kupplung des Fmoc₂LanHda-OH Bausteins (**72**) auf SK₄-Harz, gefolgt von Fmoc-Spaltung und Palmitinsäure-Kupplung
3. Kupplung des Fmoc₂Lan(OAll)-OH Bausteins (**64a**), anschließende Allylspaltung und Hexadecylamin-Kupplung gefolgt von Fmoc-Spaltung und Palmitinsäure-Kupplung

Abgesehen von der Anzahl der durchzuführenden Stufen unterschieden sich die drei Synthesewege hauptsächlich durch die Anzahl der im Verlauf der Synthese variablen Positionen des Lipopeptids (in **Abb. 32** durch Kreise gekennzeichnet). Für die schnelle Synthese erster Testverbindungen wurden die ersten beiden Synthesewege gewählt. Nach der erfolgreichen Synthese der Testverbindungen und deren viel versprechenden Testergebnissen wurde der dritte Syntheseweg etabliert. Zeitgleich wurden erste Versuche bezüglich des Aufbaus des Lanthionin-Grundgerüsts an fester Phase durchgeführt.

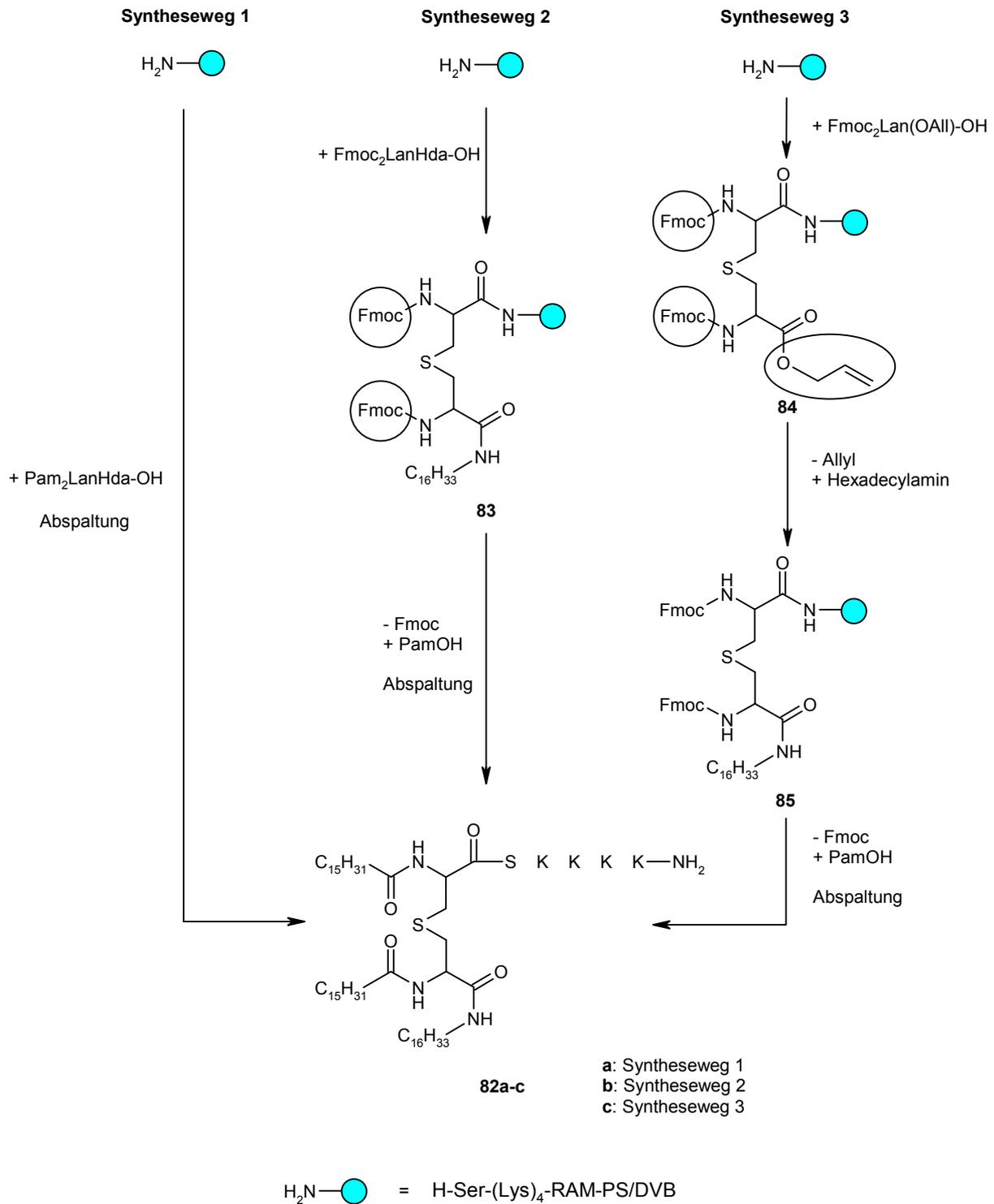


Abb. 32 Schematische Darstellung der getesteten $\text{Pam}_2\text{LanHda-Ser-(Lys)}_4\text{-NH}_2$ (**82a-c**) Synthesewege

3.2.3 Kupplung des Pam₂LanHda-OH Bausteins (Syntheseweg 1)

Pam₂LanHda-OH (**74**) ist bei RT in nahezu allen organischen Lösungsmitteln unlöslich (Kapitel 3.1.8). Dies erschwert nicht nur die Analytik, sondern schränkt auch die Anwendbarkeit der Verbindung in der Festphasensynthese ein. Um geeignete Bedingungen für die Kupplung des Lipolanthionin-Bausteins an das harzgebundene Peptid zu finden, wurden Löslichkeitsversuche in DCM/DMF 8:1 bzw. DMF durchgeführt, also jenen Lösungsmitteln, die in den Routinekupplungsprotokollen (DIC/HOBT bzw. TBTU/HOBT) zum Einsatz kommen. Bereits 11,3 mg Pam₂LanHda-OH (**74**), eine Verbindungsmenge, die für die Belegung von 10 mg SK₄-Harz (4,16 µmol) benötigt wurde, lösten sich nicht in 400 µl DMF bzw. DCM/DMF 8:1. Umsetzungsversuche über die Routinekupplungsprotokolle resultierten folglich in stark positiven Kaiser-Tests. Löslichkeits- und Umsetzungsversuche in anderen, für die Festphasensynthese geeigneten Lösungsmitteln (THF, Dioxan, NMP und DMSO) resultierten ebenfalls in stark positiven Kaiser-Tests.

Im nächsten Schritt wurde die Löslichkeit in CHCl₃/DMF 8:1 bei stetig steigender Temperatur betrachtet. CHCl₃ ersetzte aufgrund des höheren Siedepunkts DCM. Die 11,3 mg Pam₂LanHda-OH (**74**) wurden in 400 µl des Lösungsmittelgemisches suspendiert und unter Rühren im Ölbad erwärmt. Bei einer Temperatur von 45°C konnten keine Pam₂LanHda-OH (**74**) Aggregate mehr beobachtet werden. Die bei diesen Bedingungen mit DIC/HOBT durchgeführte Kupplung des Pam₂LanHda-OH auf 10 mg des SK₄-Harzes resultierte in einem schwach positiven Kaiser-Test. Nach einer weiteren Kupplung mit TBTU/HOBT in DMF bei 45°C verlief der Kaiser-Test negativ (**Abb. 33**).

Zu beachten ist, dass das synthetisierte Pam₂LanHda-Ser-(Lys)₄-NH₂ (**82a**) keine enantiomerenreine Verbindung war, da nicht urethan-geschützte jedoch acylierte Aminosäuren bei der Kupplung mit DIC/HOBT an der α-Position racemisieren. Auf eine genaue Bestimmung des resultierenden Enantiomerenverhältnisses wurde verzichtet, da bei

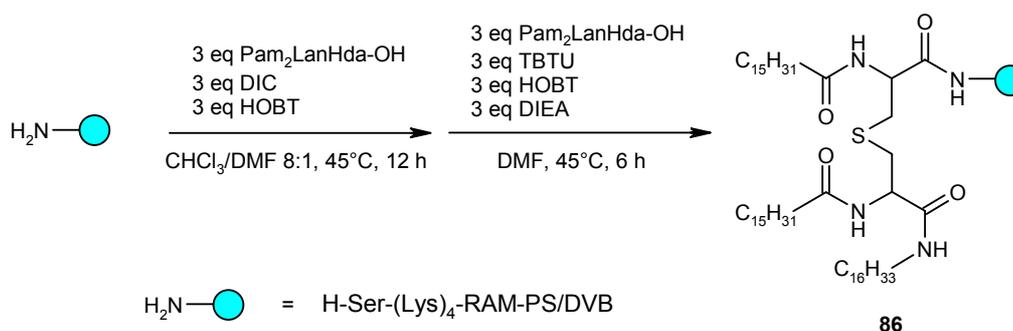


Abb. 33 Kupplung des Pam₂LanHda-OH (**74**) auf SK₄-Harz

beiden verbleibenden Synthesewegen 2 und 3 der Erhalt enantiomerenreiner Verbindungen erwartet wurde.

Die Analytik des Lipopeptids **82a** gestaltete sich schwierig. So konnten z. B. keine HPLC-Chromatogramme aufgenommen werden. Selbst die Anwendung der von Reuter ^[178] in seiner Dissertation beschriebenen Bedingungen für die HPLC- und LC-MS-Analytik von Pam₃Cys-SK₄-OH (ACN/iPrOH gegen Wasser auf einer C₄-Säule) führten zu keinem Ergebnis.

ES-MS-Messungen resultierten nur in nicht reproduzierbaren Spektren mit der Masse des Lipopeptids im Grundrauschen. Grund war die Adsorption der Lipopeptide an den Kapillarleitungen des ES-MS-Instruments.

Eine einfache und verlässliche Methode, dieses Problem zu umgehen, bot die Charakterisierung der Lipopeptide mittels MALDI-TOF-MS. Das direkte Herauslösen der Verbindung aus der Matrix unterband eine Adsorption der Lipopeptide. Als Beispiel ist die Vermessung des Lipopeptides **82a** (M = 1505 u) mit ES-MS und MALDI-TOF-MS in **Abb. 34** dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die niedrige Intensität und damit geringe Aussagekraft des ES-MS-Spektrums (aufgenommen aus einer 100 µg/ml Lösung des Peptids in ACN/Wasser 1:1) gegenüber dem MALDI-TOF-MS-Spektrum (1 µl einer 1 mg/ml Lösung des Peptids in ACN/Wasser 1:1 in 1 µl der DHAP-Matrix; 25 Lasershots).

Nach Spaltung des Lipopeptids vom Harz **86** mit TFA/H₂O 95:5 wurde das resultierende Pam₂LanHda-Ser-(Lys)₄-NH₂ (**82a**) dreimal aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser 4:1 lyophilisiert und in zellulären Assays auf seine TLR-2-agonistische bzw. -antagonistische Aktivität hin untersucht.

Die Test-Ergebnisse gaben Grund zu der Annahme, dass es sich bei den Lanthionin basierten Lipopeptiden um TLR-2-Antagonisten handelt. Während die Behandlung der THP-1 Zellen mit dem Lipopeptid (25 µMol) zu keiner nennenswerten IL-8 Ausschüttung führte, verringerte sich die Pam₃Cys-SK₄-OH induzierte IL-8 Ausschüttung von 100 % (50 nM Pam₃Cys-SK₄-OH) auf 58 % (25 µM Lipopeptid, 50 nM Pam₃Cys-SK₄-OH). Die genaue Durchführung der IL-8 Assays ist in Kapitel 3.3.1 bzw. 5.3.12 beschrieben.

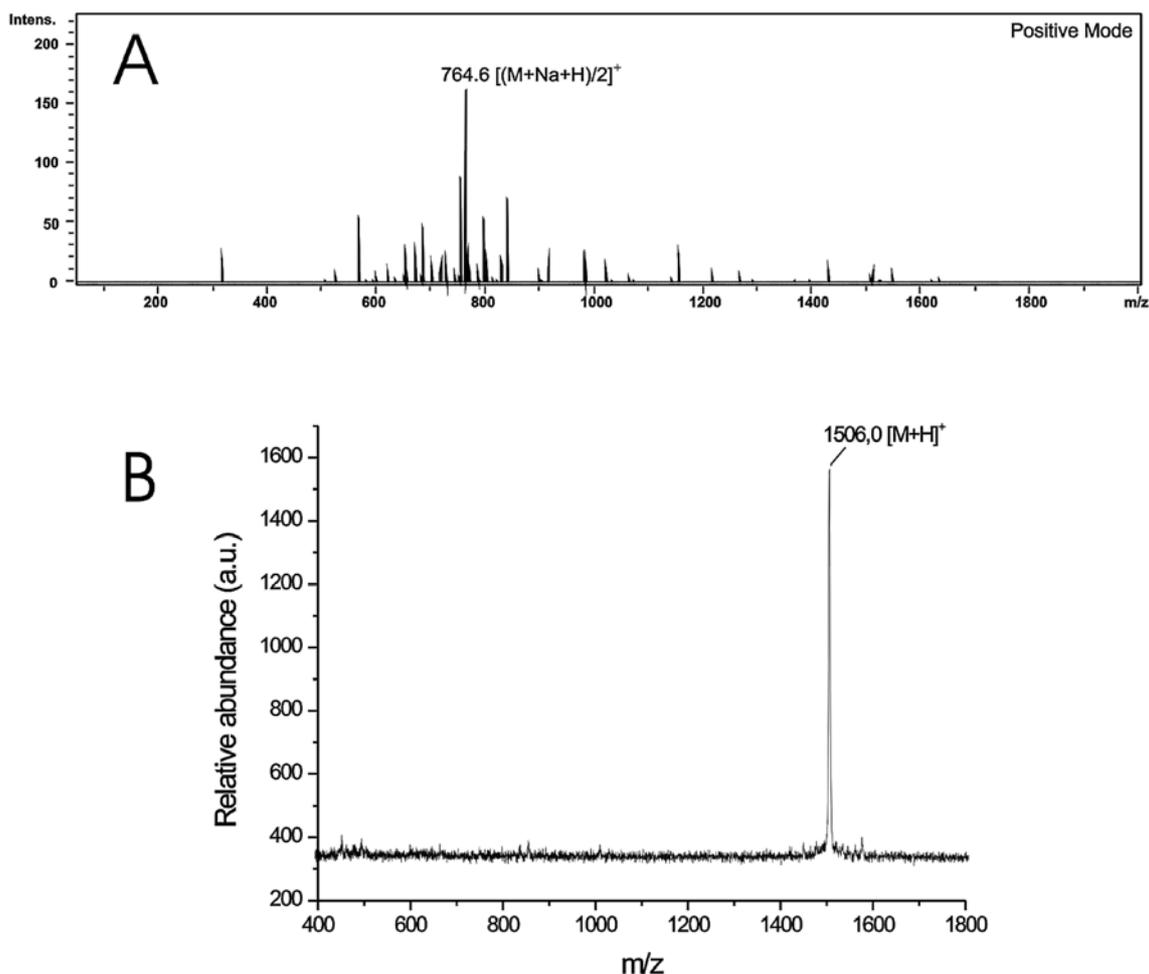


Abb. 34 MS-Spektren des Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**82a**; M = 1505 u): ES-MS Messung (A) und MALDI-TOF-MS Messung (B)

3.2.4 Erste Variation der Fettsäure-Reste (Syntheseweg 2)

Parallel zu der beschriebenen Synthese des Pam₂LanHda-Ser-(Lys)₄-NH₂ (**82a**) wurden erste Kupplungsversuche mit Fmoc₂LanHda-OH (**72**) auf SK₄-Harz unternommen. Anders als bei Pam₂LanHda-OH (**74**) gab es keine Probleme die Verbindung in DCM/DMF 8:1 zu lösen, so dass die Kupplung bei Raumtemperatur erfolgen konnte (**Abb. 35**). Analog der Kupplung des Pam₂LanHda-OH (**74**) musste Fmoc₂LanHda-OH (**72**) nach einfacher Umsetzung mit DIC/HOBT mindestens ein weiteres Mal mit TBTU/HOBT gekuppelt werden. Zu beachten ist, dass eine schwach bräunliche - nicht bläuliche - Verfärbung des Harzes im Kaiser-Tests (keine farblichen Veränderung der Lösung) eine unvollständige Kupplung anzeigt. Wies der Kaiser-Test nach wiederholter Kupplung des Bausteins **72** keine farbliche Veränderung des Harzes mehr auf, wurde ein letztes Mal mit TBTU/HOBT

gekuppelt. Nach Aufteilen des Harzes in drei Portionen wurden durch Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF die Fmoc-Schutzgruppen entfernt. Die Fettsäuren (Myristin-, Palmitin- bzw. Stearinsäure) wurden als HOBT-Ester voraktiviert und auf das entschützte Harz **86** gekuppelt. Die drei resultierenden harzgebundenen Lipopeptide (**87a-c**) wurden vom Harz gespalten (**88a-c**), mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert und einem Screening auf TLR-2-Aktivität unterzogen.

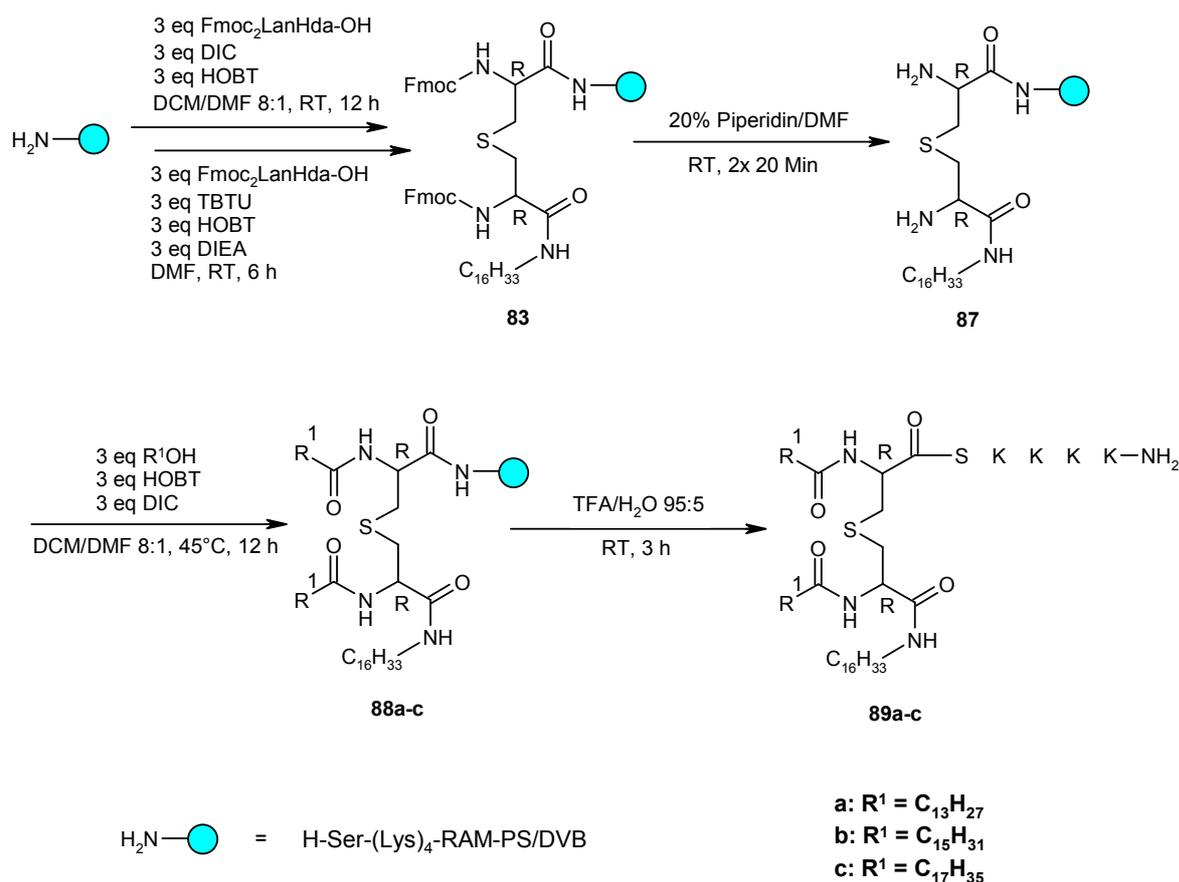


Abb. 35 Synthese von drei Lipolanthionin-Peptiden mit unterschiedlichen Fettsäure-Resten

Die auf dem Syntheseweg 1 synthetisierten Lipopeptide erlaubten keine Reinheitskontrolle der Produkte über HPLC. Beim oben gezeigten Syntheseweg 2 konnte die Vorstufe der Lipopeptide, das vom Harz **83** abgespaltene Fmoc₂LanHda-SK₄-NH₂, durch Aufnahme von HPLC-Chromatogrammen auf seine Reinheit hin überprüft werden (**Abb. 36**).

Die anschließende Kupplung der Fettsäuren wurde mittels Kaiser-Test und MALDI-TOF-MS analysiert.

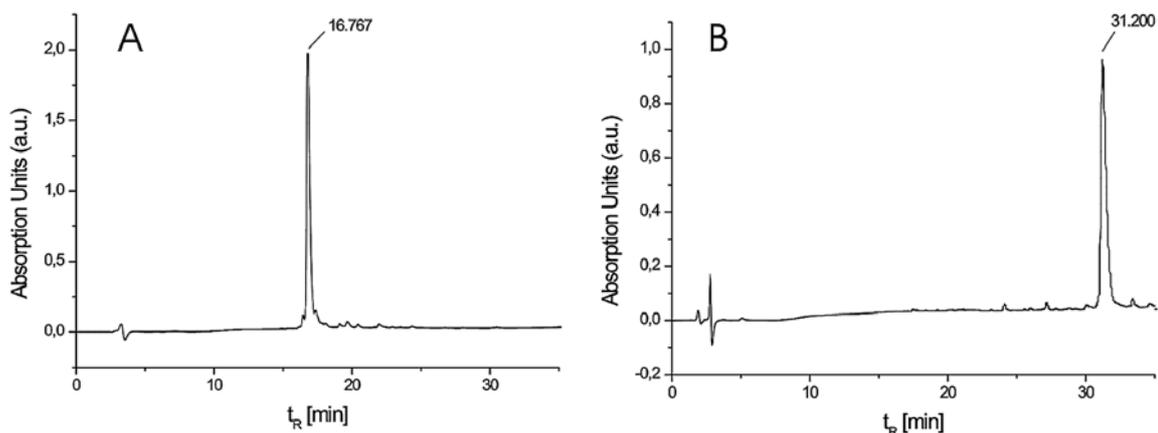


Abb. 36 HPLC-Chromatogramme des Fmoc-SK₄-NH₂ (A; >99 %) und des Fmoc₂LanHda-SK₄-NH₂ (B; 95,6 %)

Die drei synthetisierten Verbindungen wurden auf ihre TLR-2-Aktivität hin untersucht. Die in **Tab. 9** dargestellten Screening-Ergebnisse zeigen deutlich den Einfluss der Kettenlänge der Fettsäure und bestätigen die antagonistische Wirkungsweise der Lanthionin-basierten, dreifach acylierten Lipopeptide.

Tab. 9 Screening-Ergebnisse von drei Lipolanthionin-Peptiden mit variierender Länge der Fettsäure

Nr.	Verbindung	Agonismus [%]	Antagonismus [%]
89a	Myr ₂ LanHda-SK ₄ -NH ₂	6,62	17,5
89b	Pam ₂ LanHda-SK ₄ -NH ₂	2,35	43,5
89c	Stea ₂ LanHda-SK ₄ -NH ₂	21,5	49,9

3.2.5 Etablierung des Syntheseweges 3

Ausgehend von SK₄-Harz wurde im ersten Schritt der Baustein Fmoc₂Lan(OAll)-OH (**36**) gekuppelt (Abb. 37). Anders als bei den Synthesewegen 1 und 2 verlief hier die Umsetzung bereits bei einfacher Kupplung mit DIC/HOBT meist quantitativ. Zur Sicherheit wurde nach 12 h Reaktionszeit die Reaktionsmischung mit 1 eq Lanthionin, 1 eq DIC und 1 eq HOBT angereichert werden. Nach weiteren 12 h wurde die Reaktion abgebrochen und das Harz gewaschen und getrocknet. Durch HPLC, ES-MS und MALDI-TOF-MS konnte die quantitative Umsetzung bewiesen und das Produkt charakterisiert werden. Zusätzlich wurde durch UV-spektrometrische Fmoc-Bestimmung die Beladung des resultierenden Harzes **84** bestimmt und mit den berechneten Werten einer quantitativen Umsetzung verglichen (gef.: 0,372 mmol/g; theoret.: 0,363 mmol/g).

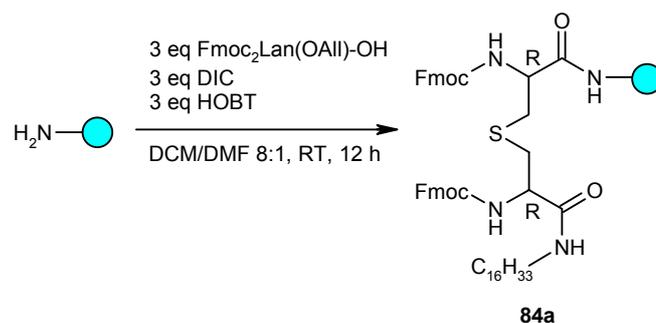


Abb. 37 Kupplung des Fmoc₂Lan(OAll) (**63a**) auf SK₄-Harz

3.2.5.1 Allylester-Spaltung an fester Phase

Für die Allylester-Spaltung gab es mehrere Möglichkeiten. Während alle Methoden einheitlich Pd(PPh₃)₄ als Katalysator verwendeten, kamen zum Abfangen des entstehenden Allylium-Ions unterschiedliche Nucleophile zum Einsatz **Abb. 38**.

Einige der in der Literatur beschriebenen Bedingungen:

- Pd(PPh₃)₄, Morpholin, DCM ^[179]
- Pd(PPh₃)₄, Chloroform / Essigsäure / NMM ^[180]
- Pd(PPh₃)₄, DMSO / THF / 0,5N HCl / Morpholin ^[173]
- Pd(PPh₃)₄, Dimedone, DCM / THF ^[181]
- Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM ^[182]

Um eine breite Anwendbarkeit der Lipolanthionin-Peptidsynthese zu gewährleisten sollte das Syntheseprotokoll an stark säurelabile Harze (z. B. TCP- oder Trt-Harz) übertragbar sein. Um dies zu gewährleisten wurden die Allylester-Spaltungsprotokolle bei denen Säuren zum Einsatz kamen nicht weiter in Betracht gezogen. Die Allylester-Spaltung mit Morpholin wurde bereits bei der Lösungssynthese des Bausteins Pam₂LanHda-OH erfolgreich angewandt. Dieses Verfahren wurde zu Testzwecken parallel zur von Grieco et al. ^[182] verwendete Spaltungsmethode mit Phenylsilan durchgeführt. Dazu wurde das Harz unter Argon und Lichtausschluss mit einer Lösung von 0,25 eq Pd(PPh₃)₄ und 24 eq des jeweiligen Nucleophils in 800 µl DCM behandelt. Das Lösungsmittel wurde nach 2 h durch Filtration entfernt und das Harz gewaschen und getrocknet.

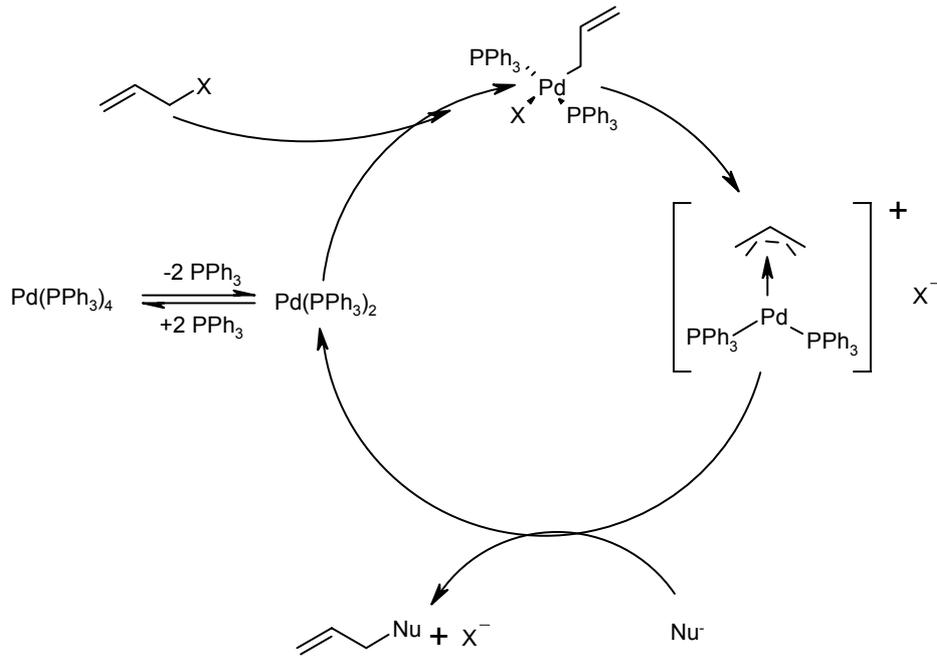


Abb. 38 Mechanismus der katalytischen Allylester-Spaltung

Dem getrockneten Harz wurde eine Probe entnommen und von dieser das Produkt mit TFA/ H_2O 95:5 abgespalten. Beide Reaktionsbedingungen wiesen in den HPLC-Chromatogrammen eine quantitative Spaltung des Allylesters auf. Um die Bildung von Morpholin-Salzen zu vermeiden, wurde die Methode von Grieco et al. mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und Phenylsilan verwendet. **Abb. 39** zeigt die HPLC-Chromatogramme des Lanthionin-Peptids vor (A; 94,09 %) und nach (B; 91,60 %) der Allylester-Spaltung.

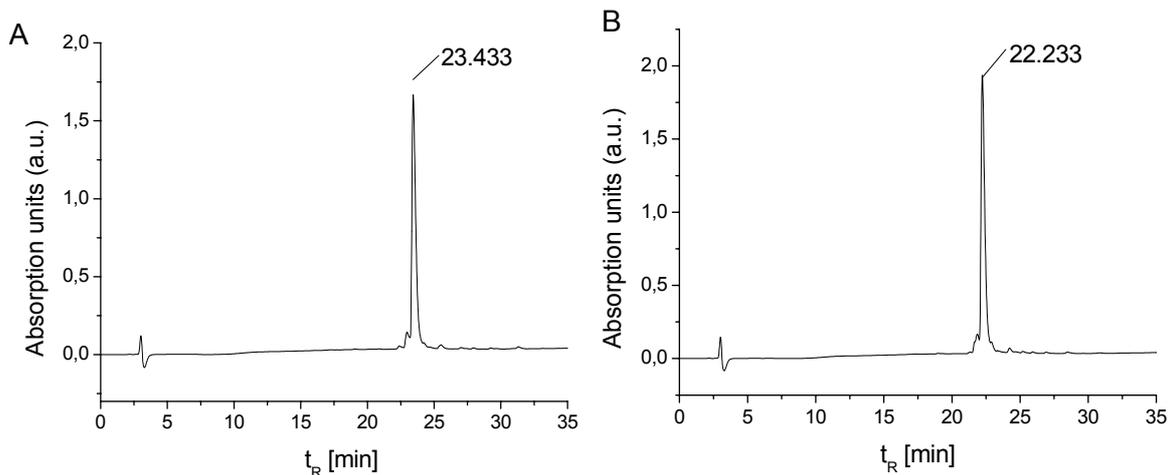


Abb. 39 HPLC-Chromatogramme des $\text{Fmoc}_2\text{Lan}(\text{OAll})\text{-SK}_4\text{-NH}_2$ (A) und des $\text{Fmoc}_2\text{LanOH-SK}_4\text{-NH}_2$ (B)

Um sicherzustellen, dass bei den verwendeten Bedingungen keine Abspaltung des Produktes vom Harz stattfindet, wurde die Beladung des Harzes vor und nach der Reaktion durch Fmoc-Bestimmung quantifiziert. Sowohl an RAM-Harz als auch an Trt-Harz zeigte sich keine Abweichung von der erwarteten Beladung, so dass ein Abspalten des Peptids

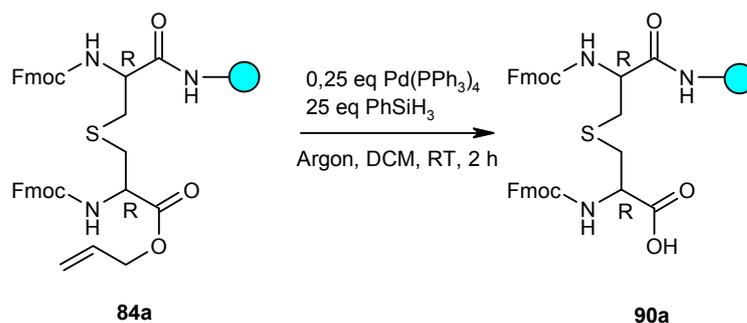


Abb. 40 Allylester-Spaltung an fester Phase

vom Harz während der Allylester-Spaltung ausgeschlossen werden konnte. **Abb. 40** zeigt die ausgewählte Methode für die Allylester-Spaltung.

Anzumerken ist, dass die Spaltung nur mit „frisch“ synthetisiertem $\text{Pd(PPh}_3)_4$ durchgeführt werden konnte. Die gekauften Katalysatoren (gelb-braune Färbung) wiesen, verglichen mit frisch synthetisiertem Katalysator (hell-gelbe Färbung), eine deutlich geringere oder keine Aktivität auf.

Der synthetisierte Katalysator kann unter Argon und Lichtausschluss bei -20°C mehrere Jahre ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

3.2.5.2 Die inverse Aminkupplung

Erste Versuche zur Kupplung des Hexadecylamins mit der harzgebundenen Säurefunktion des Lanthionins (**Abb. 41**) zum einen mit HOBT/DIC, TBTU/HOBT und zum anderen über eine Voraktivierung der Säurefunktion als Pfp-Ester ^[183] führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Vielmehr fanden sich geringe Mengen an Produkt neben vielen Nebenprodukten oder ausschließlich das eingesetzte Edukt.

Zunächst wurde dieses Problem auf eine ausbleibende Aktivierung der Säurefunktion durch die Kupplungsreagenzien zurückgeführt. Deswegen wurden weitere Kupplungsmethoden mit Aktivester bildenden Reagenzien (HOBT/DIC, TBTU/HOBT,

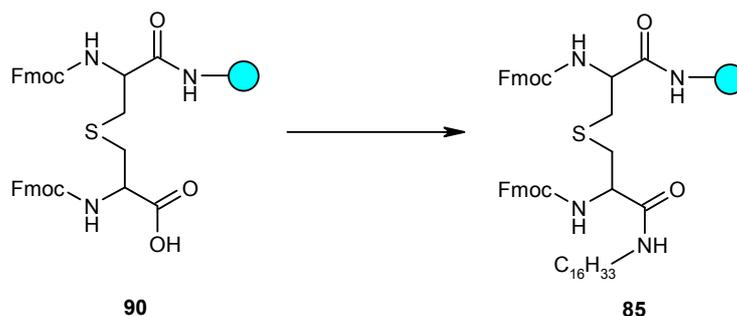


Abb. 41 Kupplung des Fettamins mit der allyl-entschützten Säurefunktion des Lanthionins

PfpOTFA, HOBT/EDC, HONB/DIC, MSNT und PyBOP) sowie mit Säurehalogenid bildenden Kupplungsreagenzien (TFFH [intermediäre Erzeugung des Säurefluorids] ^[184], CIP [Säurechlorid] ^[185] und BEMT bzw. BMTB [Säurebromid] ^[186]) ausprobiert. In **Tab. 10** sind die Bedingungen der Voraktivierung und die Ergebnisse der Umsetzungen mit Hexadecylamid aufgeführt. Die Säurefunktion wurde mit den angegebenen Äquivalenten an Kupplungsreagenz in 300 µl des jeweiligen Lösungsmittels voraktiviert. Danach wurde die Reaktionslösung durch Filtration entfernt, und eine Lösung aus 10 eq Hexadecylamin und 10 eq DIEA in 300 µl Lösungsmittel auf das Harz gegeben. Mit allen Reagenzien wurden Doppelkupplungen durchgeführt.

Wie aus **Tab. 10** ersichtlich ist, führte keine der untersuchten Kupplungsbedingungen in ausreichender Reinheit zum gewünschten Produkt.

Tab. 10 Variation der Kupplungsreagenzien für die inverse Aminkupplung; Lösungsmittel: ^a DMF/DCM 1:8; ^b DMF; ^c DCM; t = Dauer der Voraktivierung; Auswertung der Versuche mittels MALDI-TOF-MS

	Reagenz	DIPEA	t [Min]	Produkt	Nebenprodukte
HOBT/DIC ^a	4 / 2	---	60	++	+
TBTU/HOBT ^b	5 / 5	5	10	+	++
HONB/DIC ^a	4 / 2	---	5	++	++
PyBOP ^c	5	5	30	+	+++
HOBT/EDC ^a	4 / 2	---	60	++	++
HATU ^c	3	6	30	+	+++
TFFH ^c	3	10	30	+	+++
CIP ^c	3	6	30	++	++
BEMT ^c	3	6	30	-	+++
BMTB ^c	3	6	30	+	+++
MSNT ^c	5	5	30	+	+++

Welter zeigte in seiner Dissertation, dass die inverse Peptid-Kupplung über Pfp-Ester anderen Kupplungsreagenzien wie DIC/HOBT oder PyBOP überlegen ist ^[187]. Eine schlechte Umsetzung aufgrund ungenügender Voraktivierung der Säurefunktion erschien somit unwahrscheinlich. Um diese Überlegung zu stützen, wurde die freie Säurefunktion mit Pyridin/DMF/PfpOTFA 3:2:1 zum Pfp-Ester umgesetzt und nach Entfernen der Reaktionslösung 30 min mit einer Mischung aus Methanol/DCM/DIEA 1:1:1 behandelt. Probeabspaltungen zeigten 100 %ige Umsetzung zum Methylester. Die schlechten

Kupplungsergebnisse waren demnach keine Folge ungenügender Aktivierung der Säurefunktion.

Bei genauerer Betrachtung der Hexadecylamin/DCM/DIEA Lösung, fiel die starke Opaleszenz der Lösung auf. Diese Opaleszenz ist ein Indiz für eine ausgeprägte Myzellenbildung des Hexadecylamins, was eine schlechte Verfügbarkeit des Amins im Hinblick auf die Kupplung mit sich brachte. Um eine ausreichende Verfügbarkeit des Hexadecylamins zu erzielen, wurden daraufhin unterschiedliche Lösungsmittel und deren Gemische für die Umsetzung mit der aktivierten Säurefunktion getestet. In **Tab. 11** sind die verwendeten Lösungsmittel und die jeweiligen Ergebnisse der Umsetzungen zusammengefasst. Die Voraktivierung erfolgte mit 300 µl einer Mischung aus Pyridin/DMF/PfpOTFA 3:2:1, während die Umsetzung zum Hexadecylamid mit 10 eq Hexadecylamin und 30 eq DIEA in 300 µl des angegebenen Lösungsmittelgemisches vorgenommen wurde.

Tab. 11 Variation des Lösungsmittels bei der Umsetzung des Pfp-Aktivesters mit Hexadecylamin

Lösungsmittel	Produkt	Nebenprodukte
DCM	++	++
DMF	+	+++
THF	+++	-
DCM/THF 1:1	++	+
DMF/THF 1:1	++	+
DCM/DMF 1:1	++	+
DCM/THF/DMF 1:1:1	+++	+

Bei diesen Ergebnissen war zu beachten, dass bei der Umsetzung des Hexadecylamins mit der aktivierten Säurefunktion die Fmoc-Schutzgruppen der Aminfunktionen des Lanthionins teilweise abgespalten wurden. Im Falle einer Doppelumsetzung mit dem Amin führte dies während der zweiten Aktivierung mit PfpOTFA zu einer Trifluoracetylierung der freien Aminfunktionen des Lanthionins. Diese Nebenprodukte wurden, da sie durch Maskieren der freien Aminfunktionen mit Fmoc vor einer zweiten Behandlung mit PfpOTFA vermieden werden können, in **Tab. 11** den Produkten zugeordnet. Das beste Ergebnis erzielte die Umsetzung in THF. Hier fanden sich ausschließlich Produkte im MALDI-MS-Spektrum.

Um die bei zweifacher Umsetzung mit PfpOTFA auftretende Trifluoracetylierung der teilweise geschützten Aminfunktionen zu umgehen, wurde nach einfacher Umsetzung mit Hexadecylamin ein MALDI-MS-Spektrum aufgenommen. Dieses zeigte neben den drei zu erwartenden Produkten (Fmoc₂LanHda-Ser-(Lys)₄-NH₂, FmocLanHda-Ser-(Lys)₄-NH₂ und LanHda-Ser-(Lys)₄-NH₂) weder Edukt noch Nebenprodukte (**Abb. 43 A**).

Eine quantitative Aussage über die Reinheit des synthetisierten Fmoc₂LanHda-SK₄-NH₂ war erst nach Aufnahme von HPLC-Chromatogrammen möglich. Um die Auswertung dieser HPLC-Chromatogramme zu vereinfachen, mussten zuerst die freien Aminfunktionen der beiden entstandenen „Neben“-Produkte - FmocLanHda-SK₄-Harz und LanHda-SK₄-Harz (**90**) - mit Fmoc maskiert werden (**Abb. 42**). Die ersten Versuche, die Aminfunktionen mit 10 eq Fmoc-OSu in DMF/NEM 5:1 ^[31] zu maskieren, blieben sogar nach dreimaliger Behandlung des Harzes erfolglos. Im MALDI-MS-Spektrum ließ sich immer noch FmocLanHda-SK₄-NH₂ nachweisen (**Abb. 43 B**).

Ein zweiter Versuch wurde mit den von Eleftheriou et al. publizierten Bedingungen durchgeführt ^[188]. 10 eq Fmoc-Cl in DMF/DIEA 5:1 maskierten bereits bei einfacher Umsetzung quantitativ die freien Aminfunktionen mit Fmoc (**Abb. 43 C**).

Die freien Aminfunktionen zu schützen war nur dann notwendig, wenn eine HPLC-Analytik von der Zwischenstufe durchgeführt werden sollte oder falls das synthetisierte Harz aufgeteilt wurde.

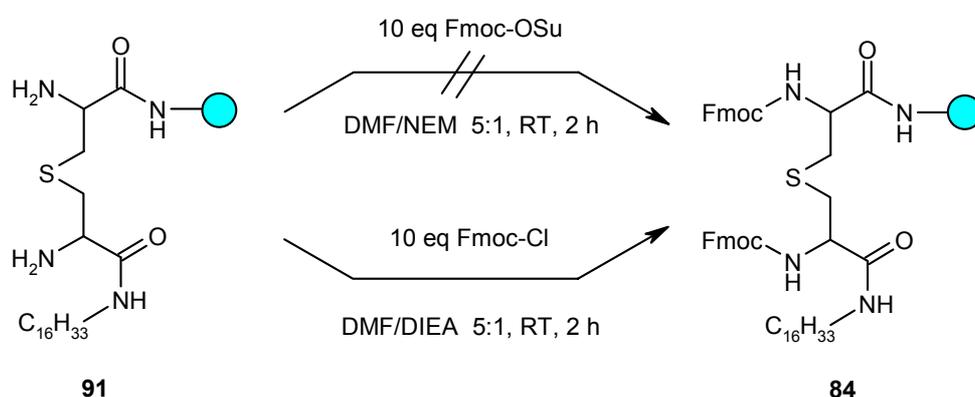


Abb. 42 Fmoc-Maskierung der entschützten Aminfunktionen

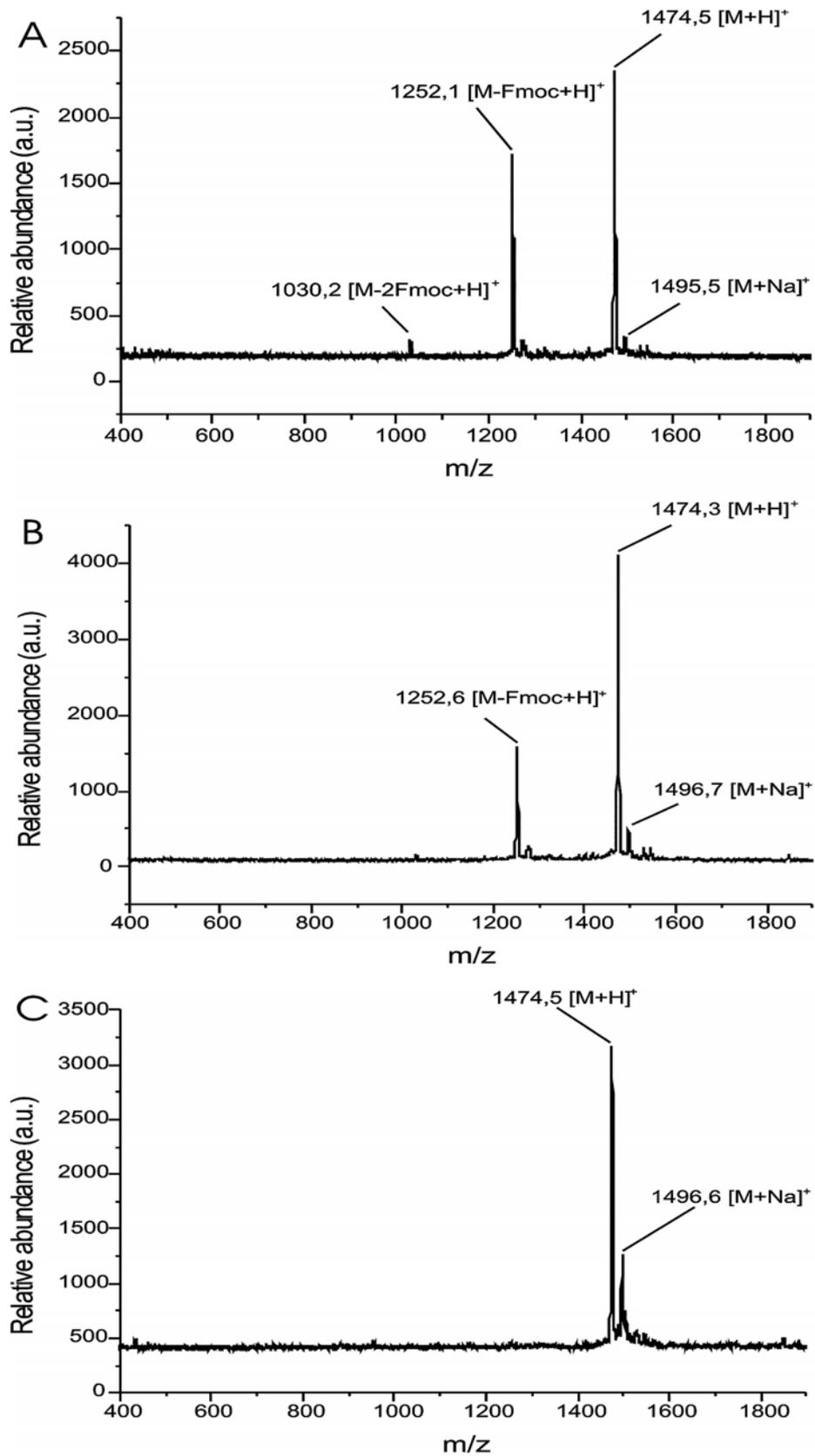


Abb. 43 MALDI-TOF-MS-Spektren des Fmoc₂LanHda-SK₄-NH₂ (A), nach dreimaliger Behandlung mit Fmoc-OSu (B) und nach einmaliger Behandlung mit Fmoc-Cl (C)

3.2.5.3 Kupplung der Fettsäure

Für die Kupplung der Fettsäuren wurde die bereits beschriebene Methode (DIC/HOBT in DCM/DMF 8:1) verwendet (**Abb. 44**). Einzige Schwierigkeit bei der Durchführung dieser einfachen Kupplungsmethode ist die Unzuverlässigkeit des Kaiser-Tests bei

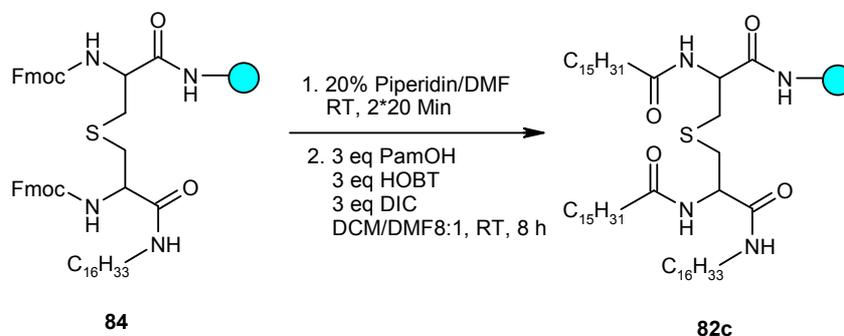


Abb. 44 Kupplung der Fettsäure auf die Aminfunktionen des Lanthionins

lipophilisierten Verbindungen am Harz. Eine unvollständige Kupplung der Fettsäuren wurde nicht durch eine eindeutige Blaufärbung des Harzes angezeigt. Vielmehr nahm das Harz eine schwach bräunliche Färbung an, während die Lösung ihre Farbe nicht veränderte. Trotz dieser kaum merklichen Farbänderung war im MALDI-MS-Spektrum deutlich das nicht umgesetzte Edukt LanHda-SK₄-NH₂ (M = 1029) zu erkennen. In **Abb. 45** sind zur Verdeutlichung die Spektren einer später synthetisierten Verbindung (Lauroyl₂LanHda-SK₄-NH₂; M = 1393) dargestellt. Spektrum A zeigt das Lauroyl₂LanHda-SK₄-NH₂ nach einfacher Umsetzung (Kaiser-Test: Harz leicht braun), während Spektrum B dieselbe Verbindung nach doppelter Umsetzung zeigt (Kaiser-Test: keine farbliche Veränderung).

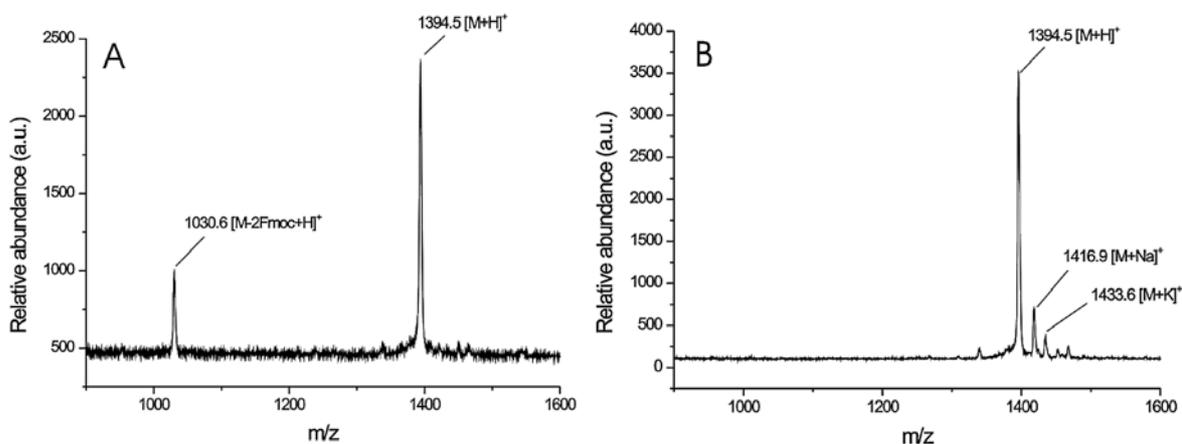


Abb. 45 MALDI-TOF-MS-Spektren von Lauroyl₂LanHda-SK₄-NH₂ (M = 1393): Braunfärbung des Harzes während des Kaiser-Tests (A) und keine farbliche Veränderung während des Kaiser-Tests (B).

Der somit vollständig etablierte Syntheseweg 3 (**Abb. 46**) erlaubt nicht nur eine Variation der Fettsäurereste an fester Phase, sondern auch den Einsatz unterschiedlichster Amine bei der Synthese der Lipolanthionin-Peptide. Von besonderem Interesse ist die Untersuchung des Einflusses der Reste an den Positionen 6 und 7 der Lipolanthionin-Peptide (**96**, **Abb. 46**). Eine selektive Variation dieser Positionen ist in den Pam₃Cys-Derivaten (**97**) nur mit großem Aufwand möglich und wurde bislang nur vereinzelt durchgeführt.

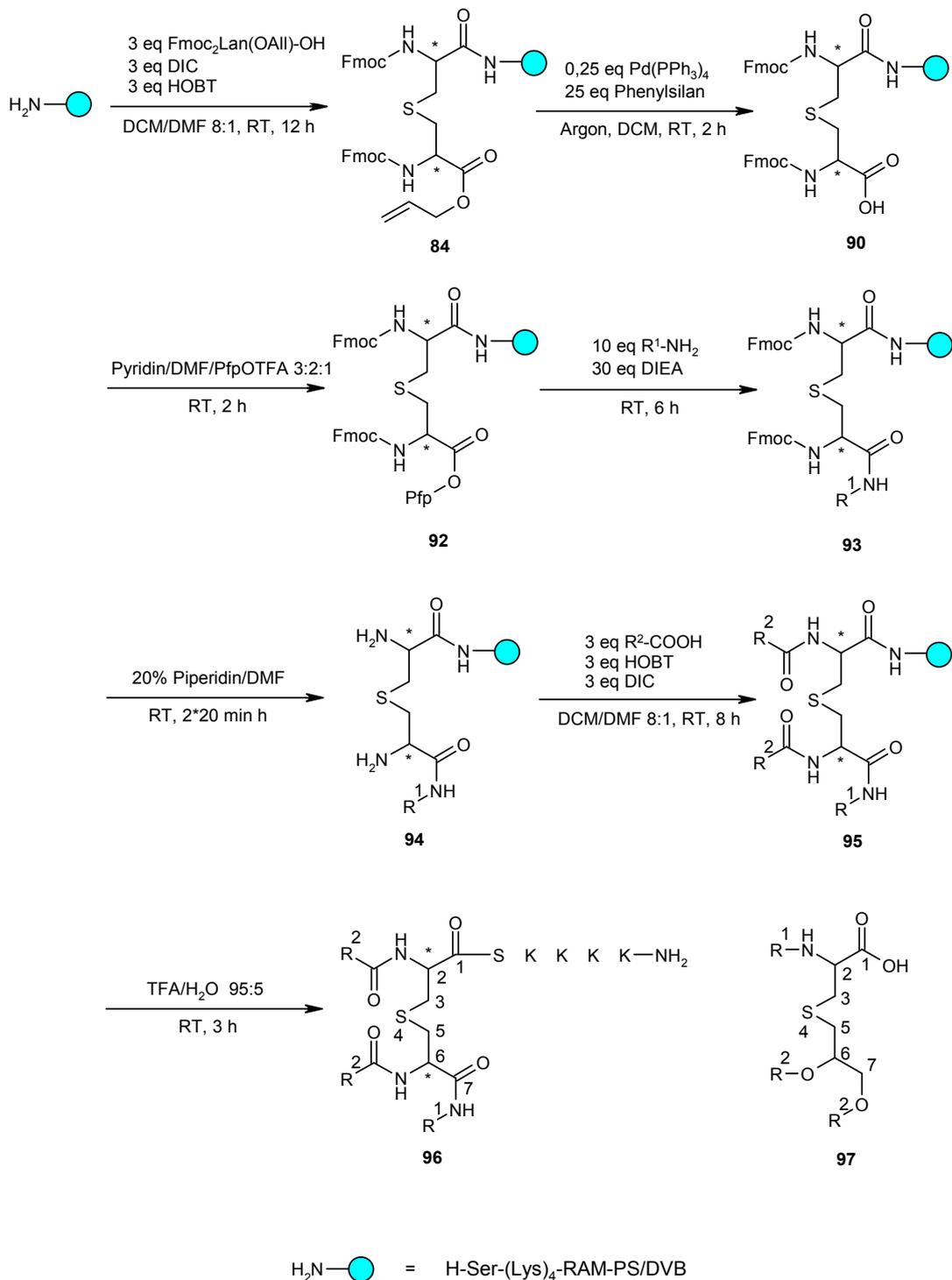


Abb. 46 Syntheseweg 3 für Lipolanthionin-Peptid

3.2.6 Oxidation des Lanthionin- und Dhc-Schwefels

Als letzte Variable der Lipolanthionin-Peptide blieb die Oxidationsstufe des Schwefels. Es galt eine Möglichkeit zu finden, die harzgebundenen Lipolanthionin-Peptide selektiv zu ihrem korrespondierenden Sulfoxid bzw. Sulfon zu oxidieren. Die von Mata et al. [189] beschriebenen Bedingungen für die Oxidation des Schwefels harzgebundener Penicillin-Derivate zu den jeweiligen Sulfoxiden und Sulfonen mit mCPBA in DCM schienen für die Oxidation der harzgebundenen Lipopeptide geeignet. Als Testpeptid wurde Myr₂LanHda-SK₄-Harz anhand des Syntheschemas (Abb. 46) synthetisiert. Die Oxidation zum Sulfon (99) wurde analog der Vorschrift von Mata mit 5 eq mCPBA in DCM bei RT und 96 h Reaktionszeit durchgeführt (Abb. 47) und resultierte mit >90 %iger Ausbeute in den gewünschten Sulfonen der Lipopeptide. Eine Verkürzung der Reaktionszeit auf 48 h wirkte sich nicht negativ auf die Sulfon-Ausbeute aus.

Die Übertragung der für die Sulfoxid-Generierung verwendeten Bedingungen (1,4 eq mCPBA, RT, 20 h) auf das Lipolanthionin-Peptid führte nicht zum gewünschten Sulfoxid, sondern zu einer Mischung aus nicht umgesetztem Lipopeptid (98), Sulfoxid (100) und Sulfon (99). Die selektive Oxidation zum Sulfoxid gelang erst mit den von Matteucci et al. [98] für die Oxidation von harzgebundenem Methylcystein beschriebenen Bedingungen. Matteucci verwendete für die Oxidation 5 eq H₂O₂ neben 0,2 eq Sc(OTf)₃ in einer Mischung aus DCM/Ethanol 9:1. Mit diesen Bedingungen konnte das Lipopeptid 98 selektiv zum entsprechenden Sulfoxid 100 oxidiert werden. Die synthetisierten Schwefel-Oxide wurden mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert (Abb. 48).

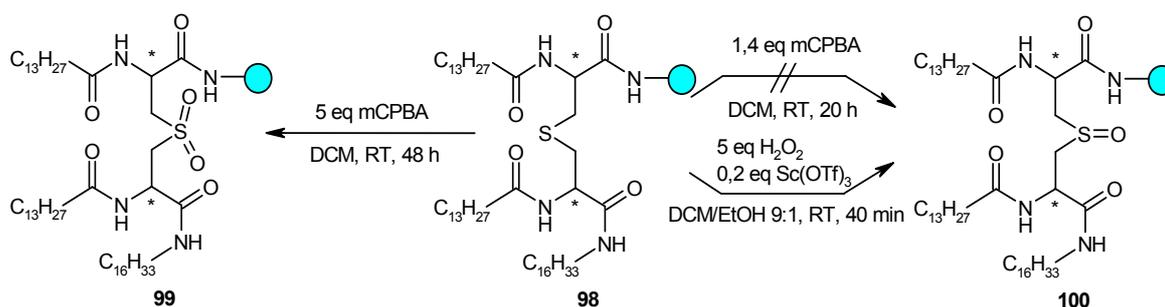


Abb. 47 Festphasensynthese der Lanthioninsulfone (98) und -sulfoxide (99)

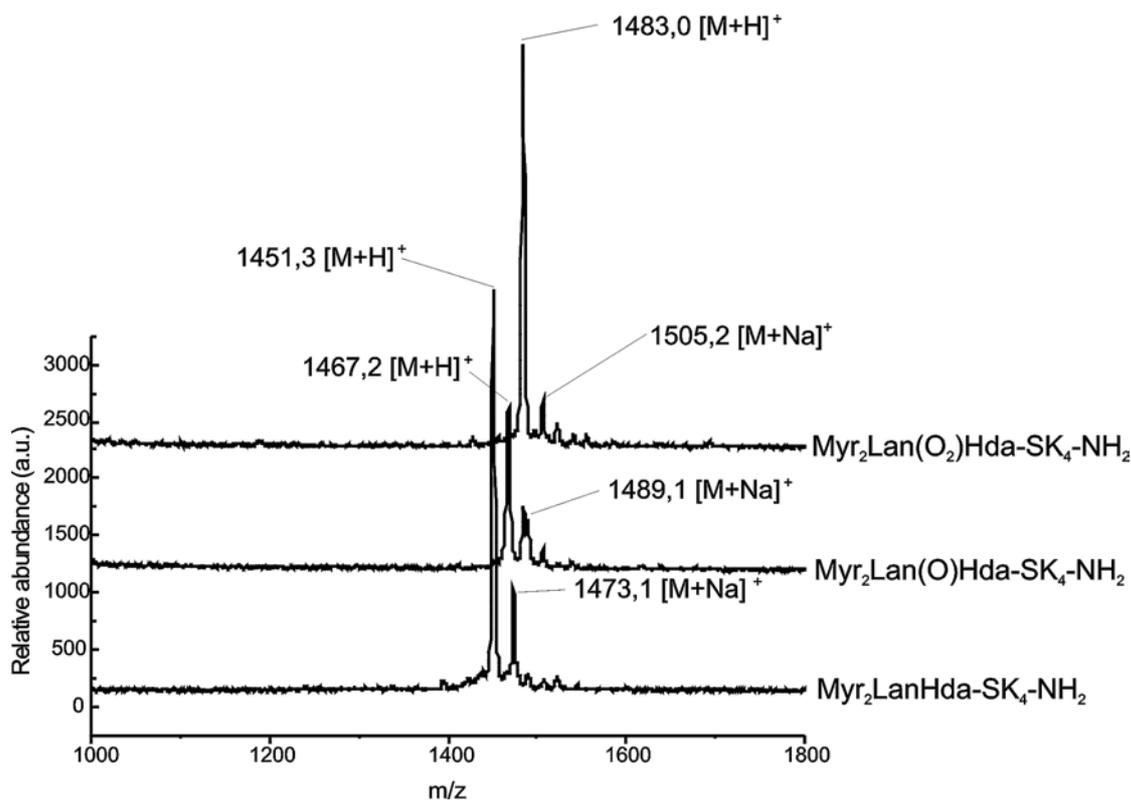


Abb. 48 MALDI-TOF-MS-Spektren von $\text{Myr}_2\text{LanHda-SK}_4\text{-NH}_2$ und des S-Oxids sowie S-Dioxids (Lan, $M = 1450$; Lan(O), $M = 1466$; Lan(O₂), $M = 1482$)

3.2.7 Aufbau des Lanthionin-Gerüsts an Fester Phase (Vorversuche)

Um die beiden Aminfunktionen des Lanthionins einzeln adressieren zu können, sollte das Lanthionin-Grundgerüst an fester Phase aufgebaut werden. Für die bereits zu Beginn dieser Arbeit geplante direkte Übertragung der Lösungssynthese des Lanthionins an die feste Phase standen zwei Möglichkeiten zur Wahl (**Abb. 49**): a) ausgehend von Fmoc-Cys(Trt)-SK₄-Harz über Trt-Spaltung (**101**) und anschließende Umsetzung mit β -Brom-N-Fmoc-alaninallylesters (**56**) zum harzgebundenen Lanthionin (**104**) sowie b) ausgehend von Fmoc-Ser(Trt)-SK₄-Harz über Trt-Spaltung (**102**), Konversion der freien Hydroxyfunktion zum Bromid (**103**) und Substitution des Bromids durch Fmoc-Cys(SH)-OAllyl (**62a**) zum harzgebundenen Lanthionin (**104**). Beide Wege würden eine unterschiedliche Substitution der beiden Aminfunktionen durch Umsetzung mit den gewünschten Fettsäuren auf der Stufe des Trityl-geschützten, harzgebundenen Peptides erlauben.

Der β -Brom-N-Fmoc-alaninallylester (**56**) ist wie bereits beschrieben sehr anfällig wegen seiner Eliminierungstendenz zum Dehydroalanin. Aus diesem Grund wurden zunächst

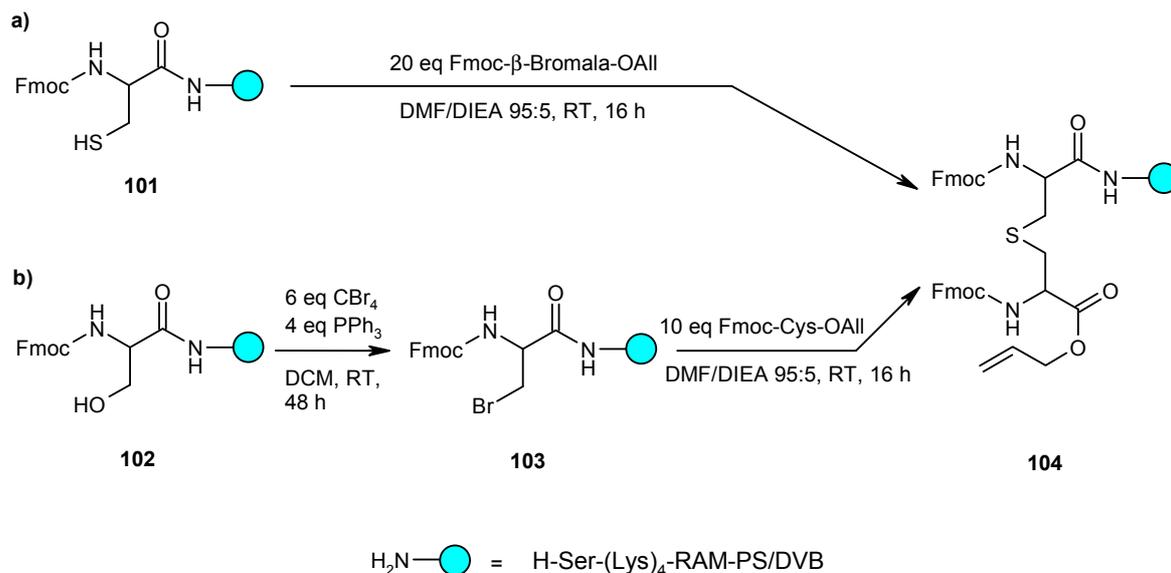


Abb. 49 Mögliche Synthesewege für den Aufbau des Lanthionin-Grundgerüsts an Fester Phase

unterschiedliche Bedingungen für die Synthese des harzgebundenen β -Bromalanins (**103**) aus Serin getestet. Fmoc-Ser(Trt)-OH wurde auf SK₄-Harz gekuppelt und anschließend mit 2 % TFA in DCM Trityl-entschützt (**102**). Die folgende Anwendung der von Mayer et al.^[190] beschriebenen Bedingungen (CBr₄ und PPh₃) erbrachte trotz einer breiten Variation der Konzentrationen (jeweils 2 eq bis 8 eq in unterschiedlicher Zusammensetzung), des Lösungsmittels (DCM, THF, DMF, Dioxan), der Reaktionsdauer (24 h bis 72 h) und der Temperatur (0°C bis 35°C) nicht den gewünschten Erfolg. Neben Bromid wurde eine Vielzahl an Nebenprodukten und nicht umgesetztes Edukt gefunden. Auch die von Bhandari et al.^[191] verwendeten Bedingungen mit einer vorreagierten Mischung aus PPh₃ und Br₂ erbrachten keine Verbesserung der Reinheit des Produkts. Ebenfalls erfolglos blieb der Versuch, das analoge Iodid über Umsetzung der Hydroxyfunktion des harzgebundenen Serins mit Iod und Imidazol zu synthetisieren.

Nachdem sich die Synthese des harzgebundenen Bromids als nicht durchführbar erwiesen hatte, wurde der zweite mögliche Syntheseweg überprüft. Dazu wurde Fmoc-Cys(Trt)-OH auf SK₄-Harz gekuppelt und anschließend mit einer Mischung aus 3 % TFA in DCM Trityl-entschützt (**101**). Durch den Einsatz eines hohen Überschusses an β -Brom-N-Fmoc-alaninallylester (**56**) (20 eq) in 5 % DIEA/DMF konnte das Lanthionin (**104**) neben einer Reihe von Nebenprodukten synthetisiert werden. Vor der Durchführung einer aufwändigen Syntheseoptimierung wurde zunächst versucht, diese Ergebnisse auf die gewünschte Synthese eines N²-Palmityl-N⁶-Fmoc-Lan(OAll)-SK₄-Harzes zu übertragen (**Abb. 50**). Dazu wurde N-Fmoc-Cys(Trt)-SK₄-Harz (**105**) Fmoc-entschützt und Palmitinsäure auf die

freie Aminfunktion gekuppelt (**106**). Die Trityl-Schutzgruppe wurde mit 3 % TFA/DCM im Durchflussverfahren abgespalten (**107**) und das Harz mit einer Lösung des Bromids **56** (20 eq) in 5 % DIEA/DMF umgesetzt. Das gewünschte Produkt **108** konnte im MALDI-TOF-MS-Spektrum nicht nachgewiesen werden. Der Versuch, die beiden Fettsäuren einzeln zu variieren, wurde nach diesen Ergebnissen eingestellt.

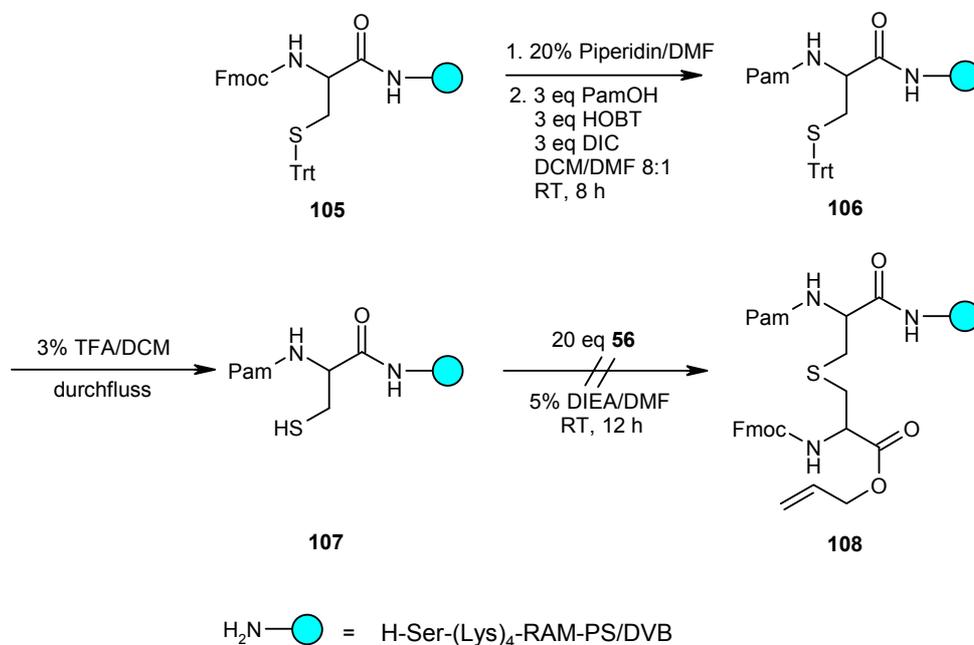


Abb. 50 Syntheseversuch des einfach palmitoylierten Lanthioninpeptids

3.3 Synthese und Screening der Lipolanthionin-Peptid-Arrays

Ausgehend von der etablierten Lipolanthionin-Peptid-Synthese (Syntheseweg 3) wurden mehrere Arrays von Einzelverbindungen synthetisiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Verbindungen basierend auf (2R, 6R)-Lanthionin hergestellt. In **Abb. 51** sind die Grundgerüste der synthetisierten Lipopeptide dargestellt. Die Einzelverbindungsarrays umfassen sowohl eine Variation des eingesetzten Fettamins (R^1) bei gleich bleibender Fettsäure (R^2) wie auch die Variation der Fettsäure (R^2) bei gleich bleibendem Fettamin (R^1). Ebenfalls variiert wurde die Oxidationsstufe des Schwefels ($y = 0-2$) der beiden aktivsten Lipopeptide (Myr₂- (**135**) und Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**)) und des Pam₃Cys-SK₄-NH₂ (**185**). Für die Untersuchung des Einflusses verschiedenen Konfigurationsisomere auf die Aktivität wurden von Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ die vier Stereoisomeren sowie Derivate der Verbindung (Methylester und freie Säure) synthetisiert. Auf weitere synthetisierte Lipolanthionin-Peptide wird kurz in Kapitel 3.3.5 eingegangen.

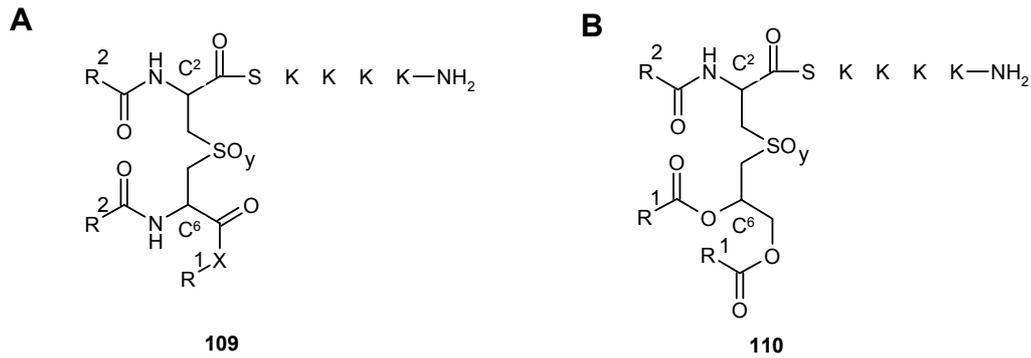


Abb. 51 Grundgerüst der synthetisierten Lipolanthionin-Peptide **A** und des Pam₃Cys-SK₄-NH₂ **B**

3.3.1 Screening der synthetisierten Verbindungen

Für die Bestimmung der TLR-2 agonistischen bzw. antagonistischen Aktivität wurde die bereits in Kapitel 1.5.2 beschriebene, von TLR-2-Agonisten induzierte IL-8 Sekretion genutzt. Mit einem von Söhnke Voss in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Arthur E. Ulmer (Forschungszentrum Borstel, Borstel, Germany) entwickelten Protokoll für die Durchführung der matched-pair-ELISA's wird die Menge an von der Zelle sekretiertem IL-8 bestimmt. Mit diesem Wert können nach Vergleich mit der Positiv-Probe (Pam₃Cys-SK₄-OH) Aussagen über eine vorhandene oder nicht vorhandene agonistische Aktivität getroffen werden. Die Stimulation der Zellen mit Agonist (Pam₃Cys-SK₄-OH) nach bereits erfolgter kurzer Inkubation mit der Testverbindung erlaubt Aussagen über die antagonistische Aktivität der Verbindung. Eine antagonistische Verbindung hat in diesem Testsystem eine gegenüber der Positiv-Probe (Zellen mit 50 nM Pam₃Cys-SK₄-OH behandelt) verminderte IL-8 Sekretion der Zelle zur Folge.

Im Folgenden sind die IL-8 Werte in % angegeben. 100 % entsprechen der IL-8 Sekretion der Positiv-Probe und 0 % der IL-8 Sekretion der Negativ-Probe (Verwendung unbehandelter Zellen im ELISA-Protokoll). Die antagonistische Aktivität ist in % Restaktivität des Pam₃Cys-SK₄-OH angegeben. Die eingesetzte Testverbindungskonzentration lag bei 25 µM im Zellüberstand. Die für die Positiv-Probe und die Testungen auf antagonistische Aktivität eingesetzte Pam₃Cys-SK₄-OH Konzentration lag bei 50 nM im Überstand. Bei allen Testungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, wobei jede Testreihe einmal reproduziert wurde.

3.3.2 Verbindungskollektion I: Variation der Fettsäure und Fettamin Kettenlänge

3.3.2.1 Synthese und Analytik der Einzelverbindungsarrays

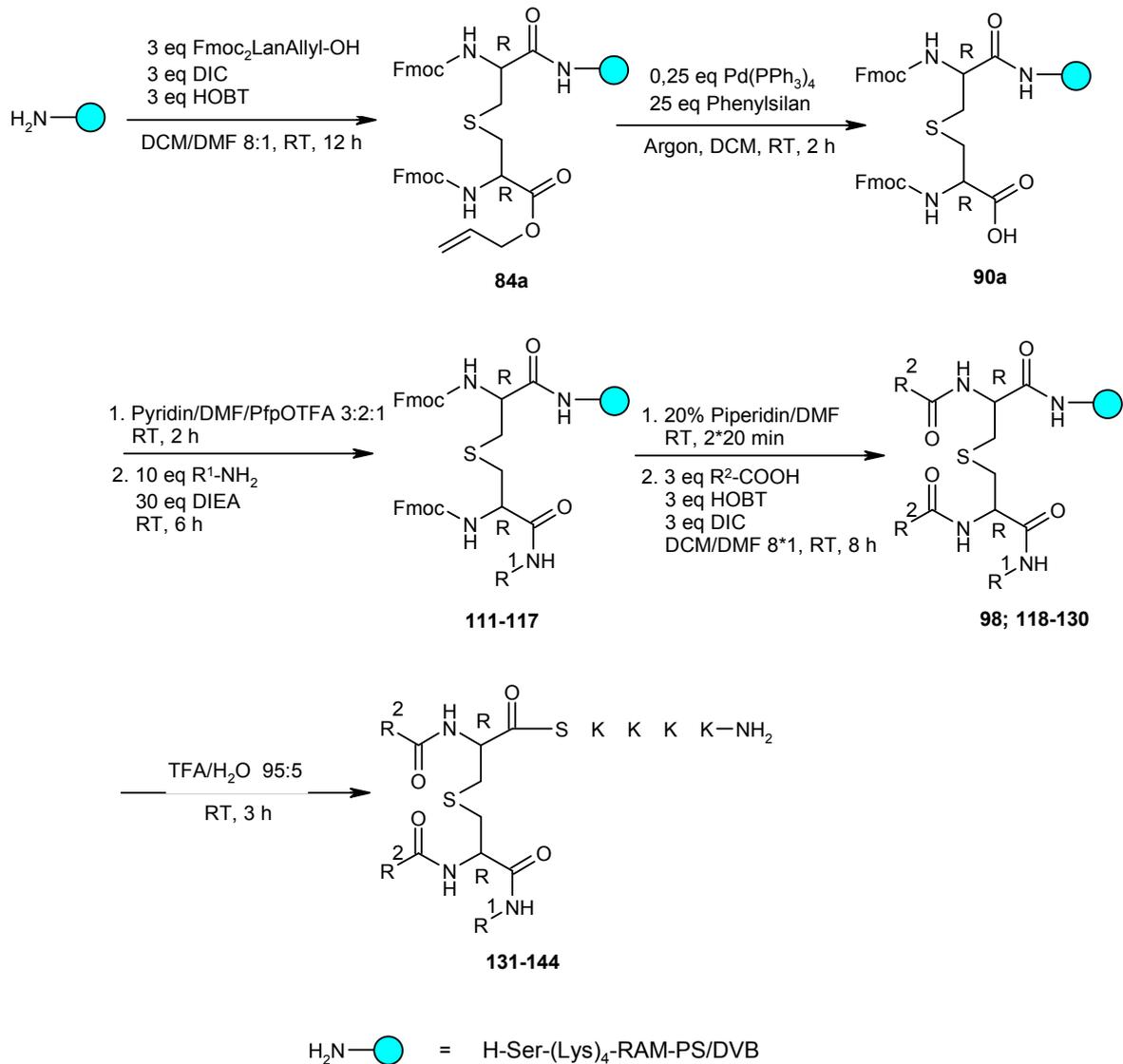
Um den Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge bestimmen zu können, wurde ein erster Einzelverbindungsarray synthetisiert, bei dem die Kettenlänge der Fettsäure (R^2) variiert wurde (C_6 , C_8 ; ..., C_{20}), während die Kettenlänge des Fettamins (R^1) unverändert blieb (C_{16}). Ähnlich wurde bei der Untersuchung des Einflusses der Fettamin-Kettenlänge verfahren. Die Fettsäure (R^2) wurde konstant gehalten (C_{14}) und das Amin (R^1) variiert (C_6 , C_8 , ..., C_{18}). Eicosylamin ist nicht käuflich und wurde folglich in den Synthesen nicht eingesetzt.

Abb. 52 zeigt das verwendete Syntheseprotokoll, **Tab. 12** fasst die Strukturen der Verbindungen sowie die Reinheiten der letzten, über eine C_{18} -Säule trennbaren Stufe (Fmoc₂LanAmin-SK₄-NH₂) zusammen.

Tab. 12 Synthetisierte Lipolanthionine; Variation der Fettsäure- und der Fettamin-Reste

Verb.	R^1	R^2	X	C^2	C^6	SO _y	HPLC ^a [%]
131	C ₁₆ H ₃₃	C ₅ H ₁₁	NH	R	R	0	^b
132	C ₁₆ H ₃₃	C ₇ H ₁₅	NH	R	R	0	^b
133	C ₁₆ H ₃₃	C ₉ H ₁₉	NH	R	R	0	^b
134	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₁ H ₂₃	NH	R	R	0	^b
135	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	^b
136	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₅ H ₃₁	NH	R	R	0	^b
137	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₇ H ₃₅	NH	R	R	0	^b
138	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₉ H ₃₉	NH	R	R	0	^b
139	C ₆ H ₁₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	96
140	C ₈ H ₁₇	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	93
141	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	96
142	C ₁₂ H ₂₅	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	96
143	C ₁₄ H ₂₉	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	92
135	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	94
144	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	98

^a Die angegebenen Reinheiten beziehen sich auf die Zwischenstufe Fmoc₂LanAmin-SK₄-NH₂, ^b Alle aus einem Batch Fmoc₂LanHda-SK₄-NH₂ synthetisiert Reinheit 94 %, $\lambda = 214$ nm.


Abb. 52 Synthese der ersten Verbindungskollektion

Die Synthese der Verbindungen wurde analog des entwickelten Syntheschemas (**Abb. 46**) durchgeführt und bis zur Kupplung des Fettamins durch HPLC- und ES-MS, bzw. MALDI-TOF-MS Messungen überwacht. Exemplarisch wurde von Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**) als aktivster Verbindung über GC-MS-Analyse das Enantiomerenverhältnis bestimmt. Aufgrund der basischen Bedingungen bei der Fettamin-Kupplung fand sich eine 12 %ige Racemisierung der Verbindung (**Tab. 13**). Die Routinekupplung der Fettsäure wurde bei allen Verbindungen durch Aufnahme von MALDI-TOF-MS-Spektren überwacht.

Zusätzlich zu den Routineanalysen wurde von Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**) ein FT-ICR-MS-Spektrum (**Abb. 53**) aufgenommen und eine Elementaranalyse (**Tab. 14**) durchgeführt. Die Elementaranalyse zeigte einerseits den hohen Reinheitsgrad der Verbindung und bestätigte die Summenformel. Im FT-ICR-MS-Spektrum fand

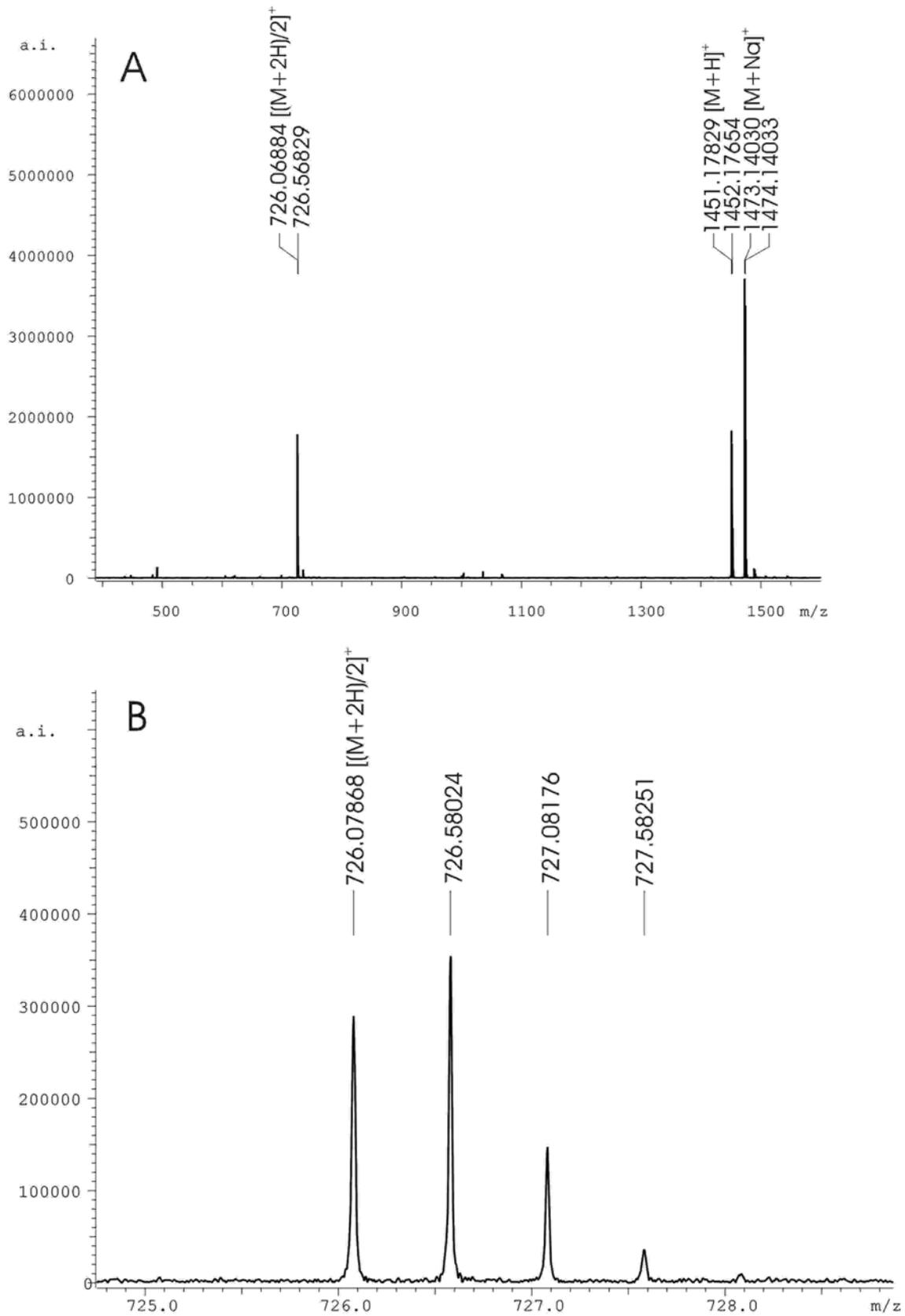


Abb. 53 FT-ICR-MS-Spektren des Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**133**): A Routine-Spektrum; B Spektrum geeicht auf internen Standard zur Summenformelbestimmung

sich eine Abweichung der gemessenen (726,07868 u) von der theoretischen Masse (726,07844 u) des zweifach geladenen Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**) von nur $\Delta = 0,28$ ppm. Dies bestätigte zusätzlich die Identität der Verbindung.

Tab. 13 Ergebnisse der Enantiomeren-Bestimmung von Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ verglichen mit der des eingesetzten Lanthionin-Bausteins

Verbindung	RR	RS	SS
		SR	
N ² ,N ⁶ -bis-Fmoc-(2R,6R)-Lanthionin-O ⁷ -allyl-O ¹ - <i>tert.</i> butyldiester (63a)	97,32	2,66	0,03
(2R,6R)-Myr ₂ LanHda-SK ₄ -NH ₂ (135)	85,44	13,95	0,61

Tab. 14 Elementaranalyse von Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**)

Atom	Theoret. [%]	Gef. [%]
C	63,73	63,64
H	10,49	10,52
N	12,55	12,32
S	2,21	2,20

3.3.2.2 Screeningergebnisse der Variation der Fettsäure

Abb. 54 zeigt die Testergebnisse der Lipolanthionin-Peptide mit variierender Kettenlänge der Fettsäure. Zu beachten ist, dass ein direkter Vergleich der Prozentangaben der agonistischen Aktivitäten mit den Prozentangaben der Positiv-Probe aufgrund der unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen (25 μ M Peptid; 50 nM Pam₃Cys-SK₄-OH) nicht möglich war. Die Werte können nur als Anhaltspunkte für eine nennenswerte oder eine unbedeutende agonistische Aktivität der getesteten Verbindungen dienen.

Gut zu erkennen war der signifikante Einfluss der Kettenlänge der Fettsäure auf die antagonistische Aktivität der Lipolanthionin-Peptide. Die höchste antagonistische Aktivität (der geringste %-Satz an Restaktivität) fand sich für Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**; 19,6 %). das Palmitoyl-Derivat zeigte einen geringfügig niedrigeren Antagonismus gegenüber dem Myristoyl-Derivat, wobei die agonistische Aktivität leicht erhöht war.

Ähnlich waren die Ergebnisse für das Laurinsäure-Derivat (C₁₂). Hier war die agonistische Aktivität gegenüber dem Myristinsäure-Derivat geringfügig erniedrigt. Eine weitere Verkürzung der Kettenlänge (Caprin- bis Capronsäure) führte zu einer deutlichen Verminderung der antagonistischen Aktivität. Das Caprylsäure-Derivat (C₈) wies die geringste antagonistische Aktivität auf. Für die Capronsäure war wiederum eine leichte Verbesserung der antagonistischen Aktivität zu finden, wobei die Werte immer noch weit hinter den gefundenen Werten für das Myristinsäure-Derivat lagen. Diese geringfügige Verbesserung der antagonistischen Aktivität war jedoch sehr wahrscheinlich in der Toxizität der Verbindung begründet. Das Capronsäurederivat wies entgegen den restlichen Verbindungen dieses Arrays eine leichte Zelltoxizität auf (Zelltoxizitäts-Test 88 %), was vermutlich der Grund für die, verglichen mit dem Caprylsäure-Derivat erhöhte antagonistische Aktivität der Verbindung war.

Das antagonistisch aktivste Derivat stellte Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ dar. Folglich wurde Myristinsäure als Fettsäure in den weiteren Synthesen der Oxide und Stereoisomeren eingesetzt. Bei den Oxiden wurde zusätzlich das Palmitinsäure-Derivat synthetisiert.

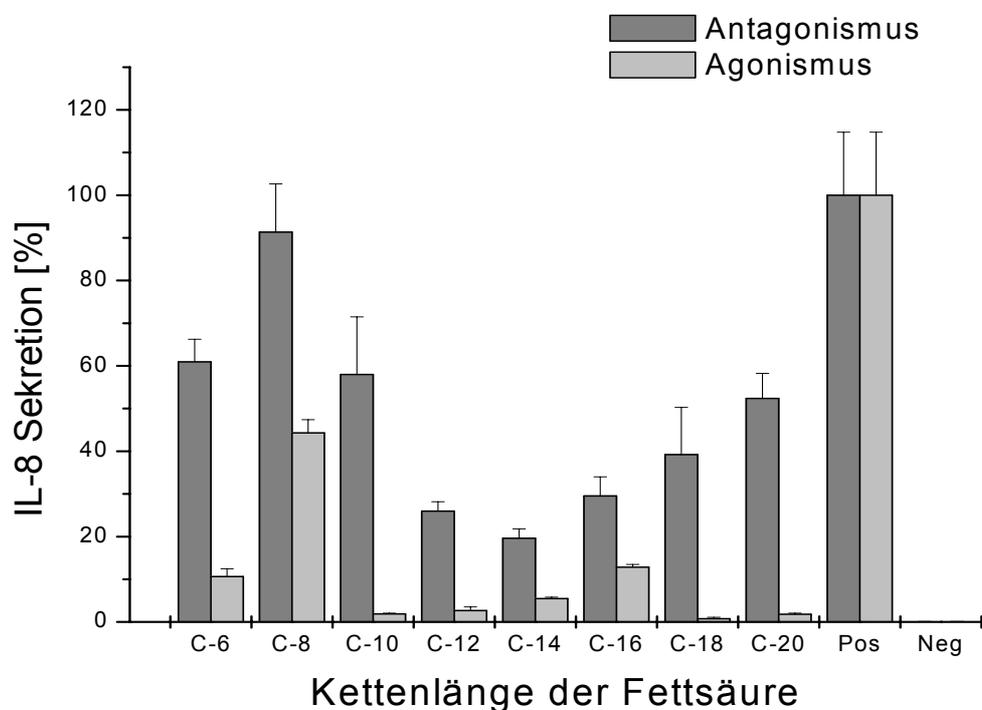


Abb. 54 Gemessene IL-8 Sekretion bei variierender Fettsäurelänge der Lipolanthionin-Peptide (R² in **Abb. 52**)

3.3.2.3 Screeningergebnisse der Variation des Fettamins

Durch Variation der Kettenlänge des eingesetzten Fettamins wurde dessen Einfluss auf die antagonistische Aktivität der Verbindungen bestimmt. **Abb. 55** zeigt den nur sehr geringen Einfluss des Fettamins bei einer Kettenlänge von C₈ bis C₁₈. Unter Berücksichtigung der angegebenen Mittelwertabweichungen konnte keines dieser Derivate als antagonistisch aktivstes hervorgehoben werden. Bei einer kürzeren Kettenlänge (C₆) verringerte sich die antagonistische Aktivität der Verbindungen drastisch. Das Hexylamin-Derivat wies keine antagonistische Aktivität mehr auf und zeigte im Gegenzug einen deutlichen agonistischen Effekt. Im Falle des Octadecylamin-Derivats zeigte sich ein eindeutig zelltoxischer Effekt. Im Zelltoxizitätstest (MTT-Test) zeigte sich gegenüber der Negativ-Probe ein deutlich verringerter Absorptionswert (**Abb. 56**). Für die nachfolgend synthetisierten Verbindungen wurde willkürlich Hexadecylamin als Fettamin eingesetzt.

Bei einem Vergleich von **Abb. 54** und **Abb. 55** ist der Unterschied der antagonistischen Aktivität der Verbindung Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (einmal 19 % in **Abb. 54** (C-14) und 35 % in **Abb. 55** (C-16)) auffallend. Die erste Annahme, dass diese Verminderung des Antagonismus durch die kurze Lagerung und das einmalige Einfrieren und wieder Auftauen der DMSO-Stammlösung ausgelöst wurde, konnte alsbald durch den Vergleich der Aktivitäten einer frisch hergestellten mit einer alten, 3 Monate bei 4°C gelagerten,

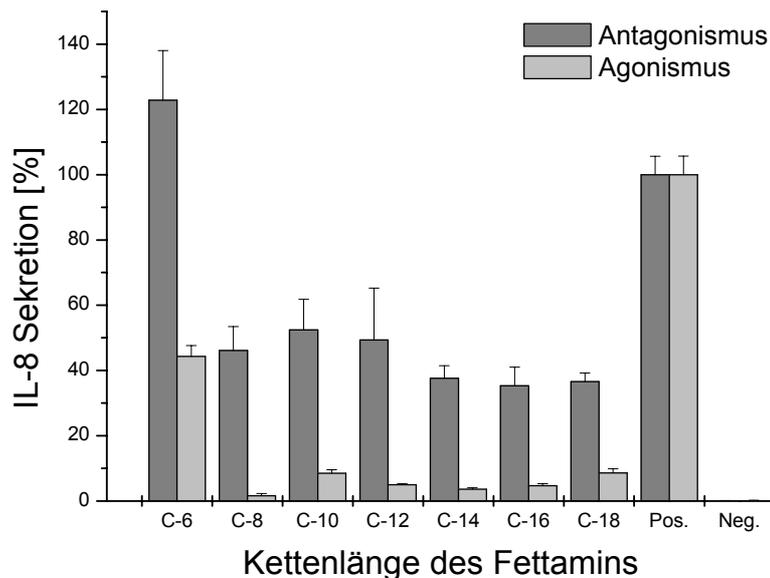


Abb. 55 Gemessene IL-8 Sekretion bei variierender Fettaminlänge der Lipolanthionin-Peptide (R¹ in **Abb. 52**)

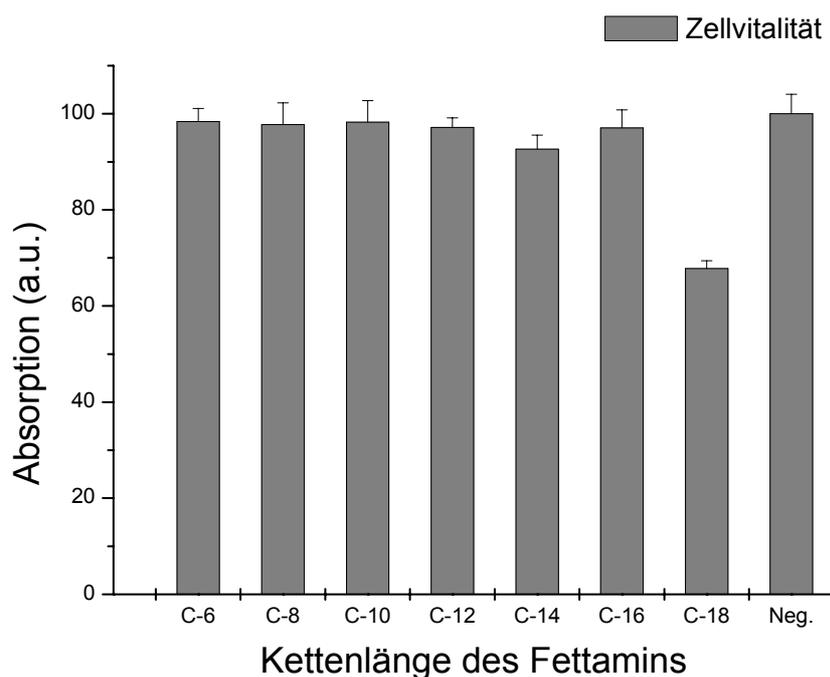


Abb. 56 Zelltoxizitätstests der Lipolanthionin-Peptide mit variierende Fettaminkettenlänge

mehrfach eingefrorenen und wieder aufgetauten Stammlösung bewiesen werden. Während die frisch angesetzte Stammlösung die Aktivität des Pam₃Cys-SK₄-OH auf 30 % herabsetzte, verminderte die ältere die Aktivität nur auf 75 %.

Grund für den Antagonismusverlust ist sehr wahrscheinlich die Adsorption der Verbindung an die Kunststoffwände der für die Lagerung benutzten Eppendorf-Cups oder eine durch die häufige Änderung des Aggregatzustandes der Stammlösung ausgelöste Aggregation der Verbindung.

Alle Messungen wurden unter Einsatz frisch hergestellter Stammlösungen der Lipolanthionin-Peptide in DMSO (10mM) durchgeführt.

3.3.3 Verbindungskollektion II: Variation der Stereoisomeren

3.3.3.1 *Synthese der Einzelverbindungsarrays*

Durch Synthese und Einsatz aller vier Stereoisomeren (**64a-d**) der Lipolanthionin-Derivate (**Abb. 57**) und Screening der Produkte konnte der Einfluss der Stereozentren auf die antagonistische TLR-2-Aktivität der Verbindungen untersucht werden. Die geringfügige Racemisierung der Verbindungen (~12 %) wurde bereits in Kapitel 3.3.2.1 erwähnt.

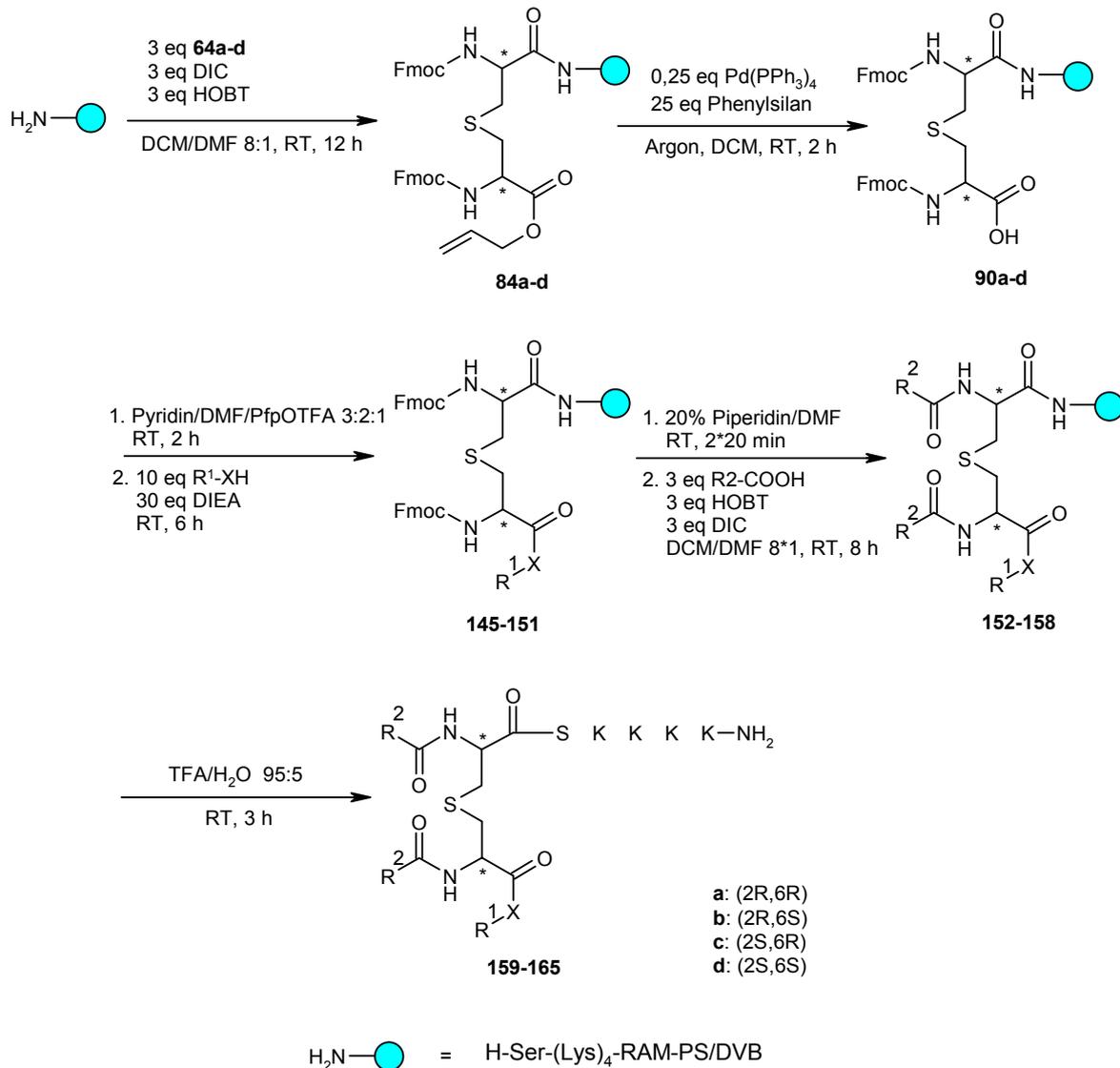


Abb. 57 Synthese der Stereoisomern des $\text{Myr}_2\text{LanHda-}$ und $\text{Myr}_2\text{Lan(OMe)-SK}_4\text{-NH}_2$

Zusätzlich zu den beschriebenen Verbindungen wurden durch Einsatz von Methanol anstelle des Hexadecylamins alle vier Stereoisomeren des $\text{Myr}_2\text{Lan(OMe)-SK}_4\text{-NH}_2$ (**162-165**) synthetisiert und ebenfalls auf ihren TLR-2 Antagonismus hin untersucht.

Die Synthese von Fettalkohol-Lanthioninester durch Umsetzung der Pfp aktivierten Lanthionin-Harze **90a-d** mit den entsprechenden Fettalkoholen gelang trotz breiter Variation der Reaktionsbedingungen (Temperatur, eingesetzte Basen, Lösungsmittel für die Umsetzung mit den Fettalkoholen) nicht. Ebenso verliefen die Kupplungsversuche mit TBTU/HOBT, DIC/HOBT und BEMT erfolglos. Die klassischen Bedingungen für die Kupplung von Fettalkoholen auf freie, harzgebundene Säurefunktionen (Umsetzung der freien Säurefunktion mit Hexadecylbromid und Cesiumcarbonat in DMF) führten ebenfalls

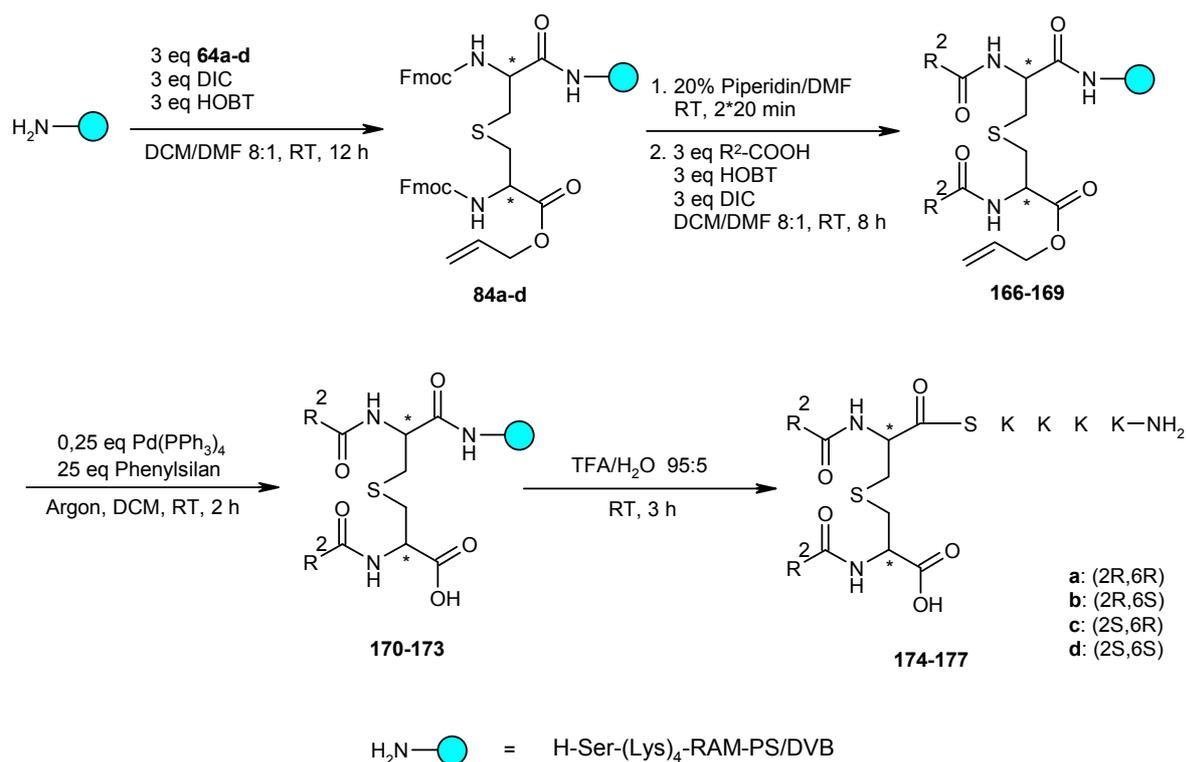


Abb. 58 Synthese der Stereoisomeren des Myr₂Lan(OH)-SK₄-NH₂ (**174-177**)

ausschließlich zu nicht umgesetztem Edukt. Der Versuch der Umsetzung mit Fettalkoholen wurde daraufhin eingestellt.

Durch Variation des Syntheschemas waren zusätzlich die Stereoisomeren der freien Säuren Myr₂Lan(OH)-SK₄-NH₂ zugänglich (**Abb. 58**), wobei die Allylschutzgruppe erst nach Kupplung der Fettsäuren abgespalten.

Die Strukturen der synthetisierten Stereoisomeren sind in **Tab. 15** tabellarisch zusammengefasst. Alle Verbindungen wurden auf ihre antagonistische wie auch agonistische Aktivität hin untersucht und einem Test auf zelltoxische Eigenschaft unterzogen.

3.3.3.2 Screening-Ergebnisse der Variation der Stereoisomeren

Die Ergebnisse der Testung an THP-1 Zellen zeigen deutlich den Einfluss des Stereozentrums auf die antagonistische Aktivität (**Abb. 59**). Während sich die Aktivitäten des (2R,6R)- und des (2S,6R)-Stereoisomers (**135** und **160**) nur geringfügig unterscheiden, zeigt das (2R,6S)-Stereoisomer (**159**) einen deutlich schlechteren Antagonismus. Für das (2S,6S)-Stereoisomer (**161**) finden sich Testdaten, die zwischen denen des (2R,6R)- und des (2S,6R)-Stereoisomers liegen.

Tab. 15 Synthetisierte Lipolanthionin-Peptide; Variation der Stereoisomerie des Lanthionins

Verb.	R ¹	R ²	X	C ²	C ⁶	SO _y	HPLC [%]
132	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0	94 ^a
159	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	S	0	89 ^a
160	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	S	R	0	90 ^a
161	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	S	S	0	93 ^a
162	CH ₃	C ₁₃ H ₂₇	O	R	R	0	91 ^b
163	CH ₃	C ₁₃ H ₂₇	O	R	S	0	89 ^b
164	CH ₃	C ₁₃ H ₂₇	O	S	R	0	91 ^b
165	CH ₃	C ₁₃ H ₂₇	O	S	S	0	93 ^b
174	H	C ₁₃ H ₂₇	O	R	R	0	97 ^c
175	H	C ₁₃ H ₂₇	O	R	S	0	91 ^c
176	H	C ₁₃ H ₂₇	O	S	R	0	94 ^c
177	H	C ₁₃ H ₂₇	O	S	S	0	93 ^c

Werte bezogen auf: ^a die Stereoisomeren des Myr₂LanHda-SK₄-NH₂; ^b die Stereoisomeren des Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-NH₂; ^c die Stereoisomeren des Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-NH₂.

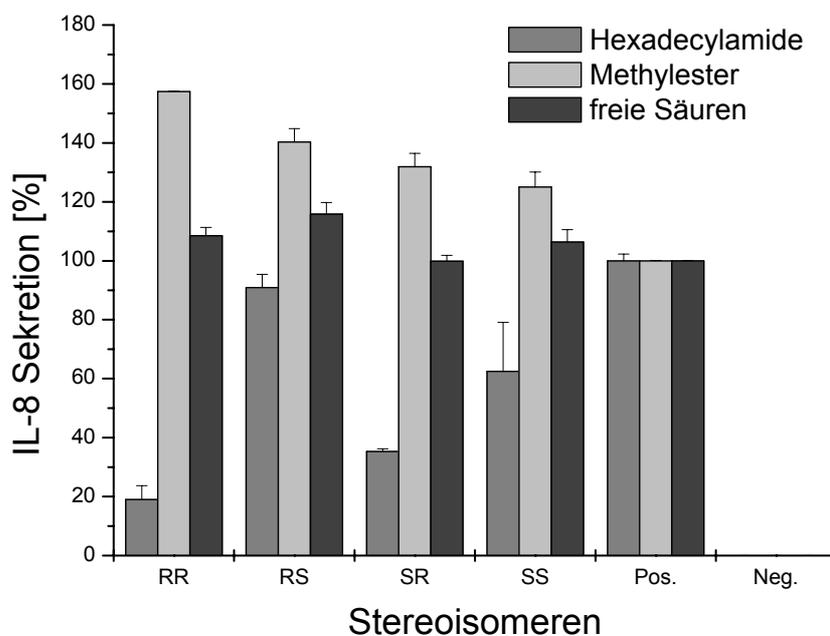


Abb. 59 Antagonistische Aktivität der Lipolanthionin-Peptide mit unterschiedlicher Konfiguration des Lanthionins

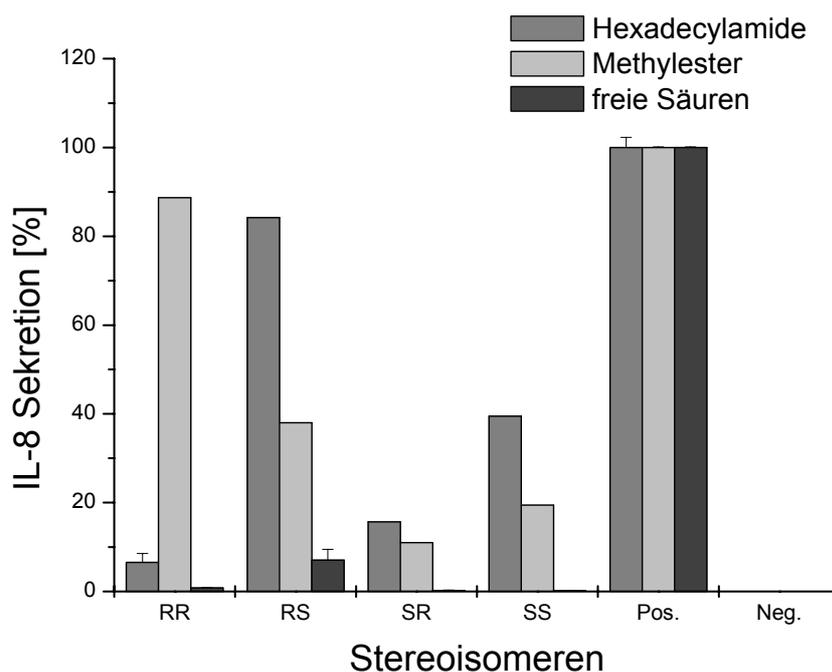


Abb. 60 Agonistische Aktivität der Lipolanthionin-Peptide mit unterschiedlichen Konfiguration des Lanthionins

Betrachtet man die agonistischen Aktivitäten der Verbindungen (**Abb. 60**), werden die nennenswerten Aktivitäten der beiden antagonistisch wenig aktiven Verbindungen **159** (2R,6S) und **161** (2S,6S) offensichtlich. Dahingegen weisen die beiden antagonistisch aktiven Verbindungen nur eine geringe agonistische Aktivität auf. Ein genauer Vergleich der gefundenen agonistischen Aktivitäten mit allen vier Stereoisomeren der Standardtestverbindung Pam₃Cys-SK₄-OH war nicht Ziel dieser Arbeit.

Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass die Konfiguration am α -Kohlenstoffatom des „Lipidteils“ (C⁶) des Lanthionins einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der Verbindung hat. Nur die (2R,6R)- und (2S,6R)-Stereoisomeren zeigen eine starke antagonistische Aktivität (**Abb. 59**). Im Gegensatz dazu hat die Konfiguration am α -Kohlenstoffatom des „Peptidteils“ des Lanthionins (C²) nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität der Verbindung. Der Unterschied im Antagonismus des (2R,6R)- und des (2S,6R)-Stereoisomers beträgt nur 15 %.

Im Fall der freien Säuren der Lipolanthionin-Peptide (**174-177**) fand sich für keine der Verbindungen eine agonistische oder antagonistische Aktivität, was die Notwendigkeit einer lipophilen Gruppierung am Rest R¹ der Lipolanthionin-Peptide verdeutlicht.

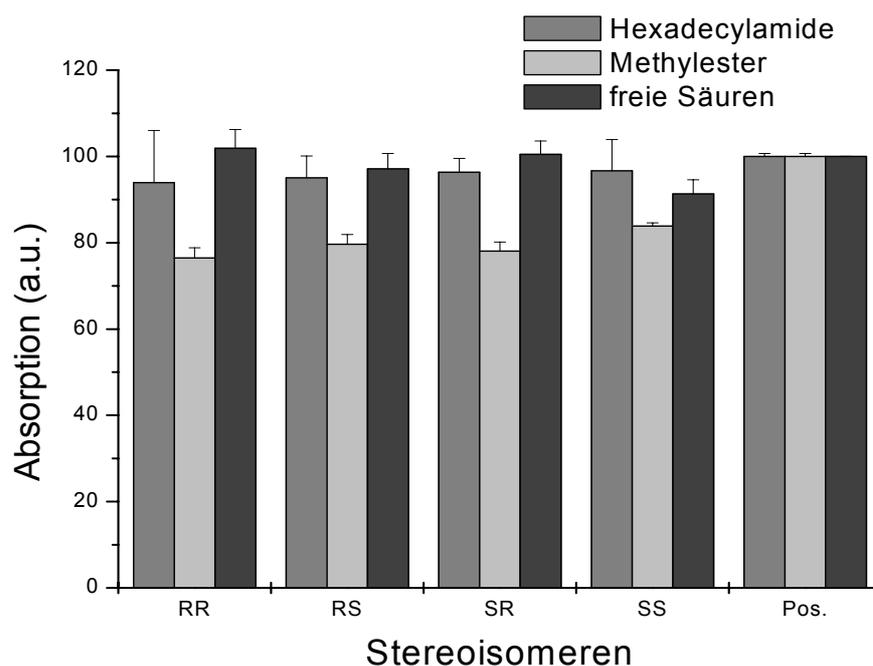


Abb. 61 Zellvitalität nach Behandlung mit den verschiedenen Stereoisomeren

Diese Aussage wurde durch die ausbleibende antagonistische Aktivität der Methylester der Lipolanthionine (**162-165**) zunächst bestätigt. Die Methylester wiesen ebenfalls keine antagonistischen Aktivitäten auf. Allerdings zeigte sich eine von den Stereozentren des Lanthionins abhängige agonistische Aktivität, wobei das (2R,6R)-Isomer (**162**) den mit Abstand stärksten Effekt zeigte, während für das (2S,6R)-Isomer (**164**) die geringste Aktivität gefunden wurde. Eine genauere Untersuchung der Ergebnisse wurde nicht durchgeführt, da alle Methylester eine leichte Zelltoxizität aufwiesen (**Abb. 61**). Die gefundenen Ergebnisse konnten somit nicht weitergehend verwertet werden.

3.3.4 Verbindungskollektion III: Variation der Oxidationsstufe des Schwefels

3.3.4.1 Synthese des Einzelverbindungsarrays

Um den Einfluss einer weiteren Variationsmöglichkeit in der Struktur der Lipolanthionin-Peptide, nämlich die Oxidationsstufe des Schwefels, auf die TLR-2 Aktivität der Verbindungen zu untersuchen, wurden anhand der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Syntheseprotokolle die

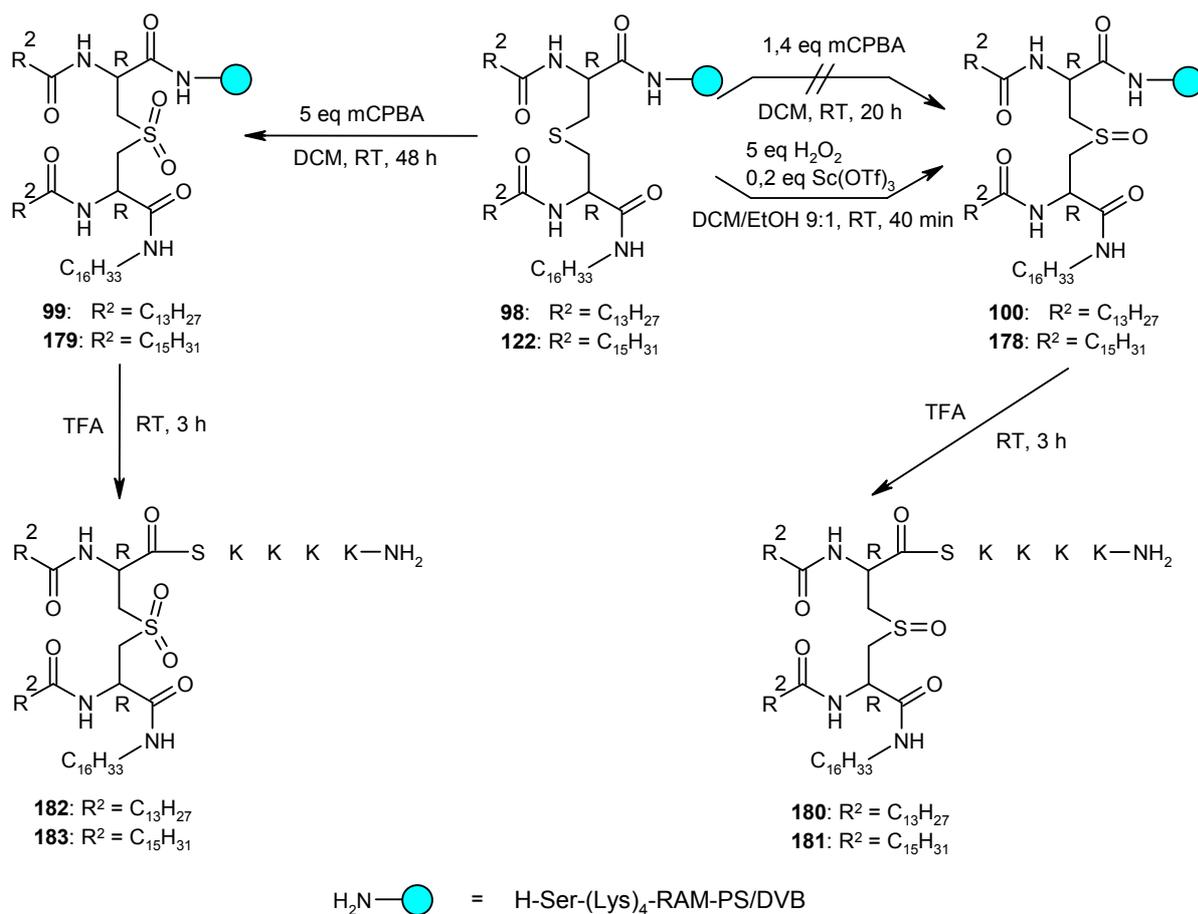


Abb. 62 Synthese der Sulfoxide und Sulfone zweier Lipolanthionin-Peptide

Tab. 16 Synthetisierte Sulfone und Sulfoxide des Myr₂LanHda-, Pam₂LanHda- und Pam₃Cys-SK₄-NH₂

Verb.	Grundger.	R ¹	R ²	X	C ²	C ⁶	SO _y
135	Lan	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	0
180	Lan	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	1
182	Lan	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₃ H ₂₇	NH	R	R	2
136	Lan	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₅ H ₃₁	NH	R	R	0
181	Lan	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₅ H ₃₁	NH	R	R	1
183	Lan	C ₁₆ H ₃₃	C ₁₅ H ₃₁	NH	R	R	2
185	Cys	C ₁₅ H ₃₁	C ₁₅ H ₃₁	---	R	R/S	0
186	Cys	C ₁₅ H ₃₁	C ₁₅ H ₃₁	---	R	R/S	1
187	Cys	C ₁₅ H ₃₁	C ₁₅ H ₃₁	---	R	R/S	2

Sulfoxide und Sulfone des Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**), des Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**) und des Pam₃Cys-SK₄-NH₂ (**185**) synthetisiert. **Abb. 62** fasst nochmals die Synthese der Sulfoxide und Sulfone der Lipolanthionin-Peptide zusammen.

Für die Synthese der Oxide von Pam₃Cys-SK₄-NH₂ wurde zunächst Pam₃Cys-OH auf SK₄-Harz gekuppelt (**184**). Von einem Teil des Harzes wurde das nicht oxidierte Produkt abgespalten (**185**), ein zweiter Teil wurde zum Sulfoxid und der dritte Teil zum Sulfon oxidiert. Spaltung der Produkte vom Harz führte zum gewünschten Sulfoxid (**186**) und Sulfon (**187**). Die Strukturen der Verbindungen sind in **Tab. 16** zusammengefasst.

3.3.4.2 Screenigergebnisse der Oxidationsprodukte

Die Ergebnisse für die antagonistische (**Abb. 63**) bzw. im Fall der Oxide von Pam₃Cys-SK₄-NH₂ agonistische Aktivität (**Abb. 64**) der Oxidationsprodukte waren eher uneinheitlich. So fand sich für die Oxide des Pam₂LanHda-Derivats im Falle des Sulfoxids (**181**) ein leicht erhöhter Antagonismus, während das Sulfon (**183**) verringerte Inhibierung aufwies. Im Gegensatz dazu führte die Oxidation des Schwefels im Myr₂LanHda-Derivat zu einem nahezu völligen Verlust des Antagonismus. Interessanter Weise wies keines der oxidierten Derivate eine agonistische Aktivität auf.

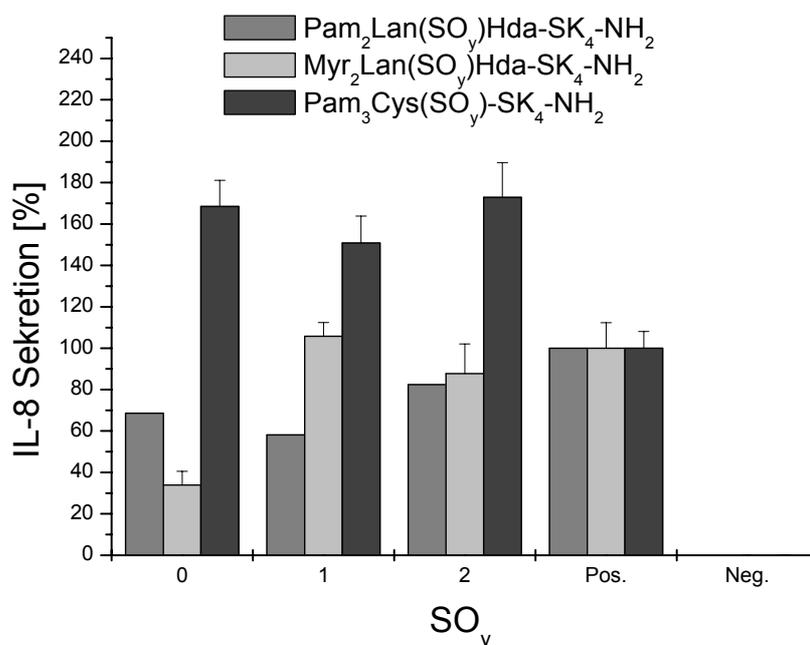


Abb. 63 Antagonistische Aktivität der Oxide des Pam₂- und des Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ sowie des Pam₃Cys-SK₄-NH₂

Im Fall der Pam₃Cys-SK₄-NH₂ Oxide fand sich eine leicht erniedrigte agonistische Aktivität des Sulfons (**187**) und ein deutlich veringertes Agonismus des Sulfoxids (**186**). Aufgrund dieser uneinheitlichen Daten kann keine allgemeingültige Aussage über den Einfluss der Oxidationsstufe des Schwefels auf die TLR-2 Aktivität gemacht werden. Für alle drei oxidierten Lipopeptide wurden signifikant unterschiedliche Ergebnisse gefunden, wobei die Ergebnisse eine Erklärung nicht erlauben.

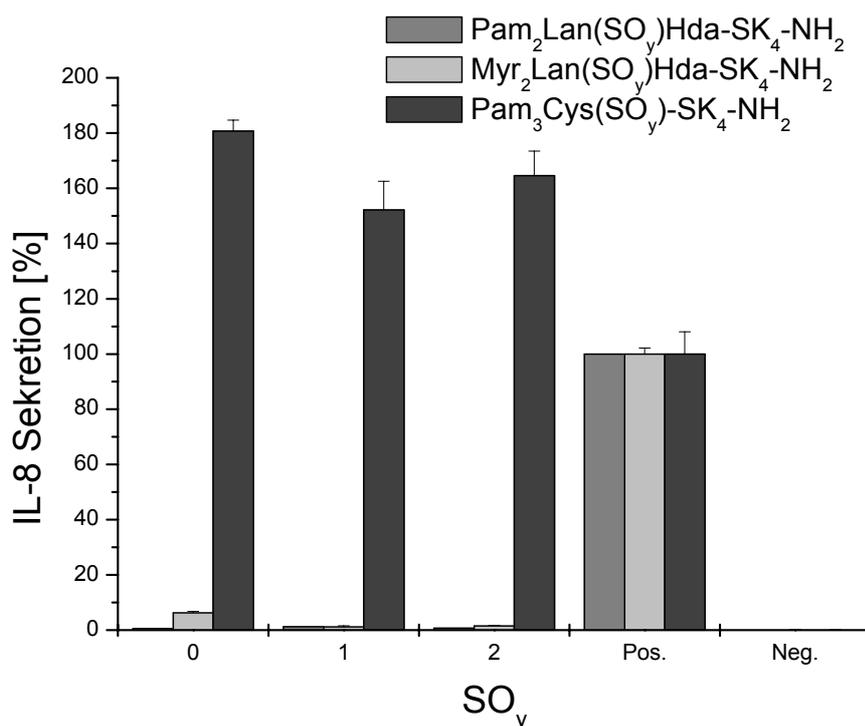


Abb. 64 Agonistische Aktivität der Oxide des Pam₂- und des Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ sowie des Pam₃Cys-SK₄-NH₂

3.3.5 Weitere synthetisierte Lanthionin-Peptid Derivate

Eine Reihe von weiteren Lipolanthionin- und Lanthionin-Peptiden trat während der Synthesen als Zwischenstufen auf. Diese wurden ebenfalls auf ihre TLR-2 Aktivität hin untersucht. **Tab. 17** fasst die Strukturen der getesteten (Lipo-)Lanthionin-Peptide zusammen.

Keines der Zwischenprodukte wies eine TLR-2 Aktivität auf. Das Anbringen zweier (R²) bzw. einer Kohlenwasserstoffkette (R¹) an die Lanthionin-Peptide ist folglich nicht ausreichend für das Auftreten einer TLR-2 Aktivität. In kommenden Studien soll ein

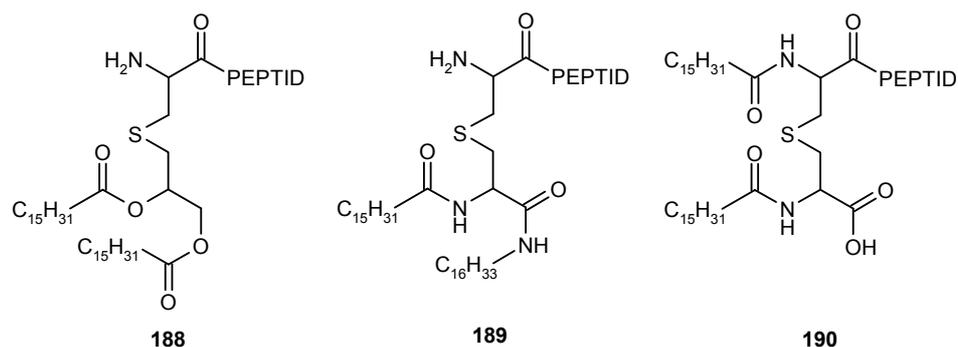


Abb. 65 Kopfgruppe des Lipopeptids MALP-2 (**188**), dessen Lanthionin-Analogon (**189**) und eines der Lanthionin-Peptide mit zwei lipophilen Resten (**190**)

MALP-2 Analogon der Lanthionine (**189**; **Abb. 65**) synthetisiert werden, um zu untersuchen, ob diese anderweitige zweifach Lipophilisierung der Lanthionin-Peptide eine TLR-2 Aktivität zur Folge hat.

Auf eine weitergehende Variation der eingesetzten Säuren und Amine über den Fettsäure- und Fettamin-Bereich hinaus wurde verzichtet, da bislang keine nicht lipophilisierten Peptide ohne langkettigen Reste mit TLR-Aktivität beschrieben sind.

Tab. 17 Synthetisierte Zwischenstufen der Lipolanthionin-Synthese

Verb.	R ¹	R ²	X	C ²	C ⁶	SO _y
191	H	Fmoc	O	R	R	0
190	H	C ₁₅ H ₃₁	O	R	R	0
192	Allyl	H	O	R	R	0
193	Allyl	Fmoc	O	R	R	0
194	Allyl	C ₁₅ H ₃₁	O	R	R	0
195	C ₁₆ H ₃₃	H	NH	R	R	0
196	C ₁₆ H ₃₃	Fmoc	NH	R	R	0

3.3.6 Konzentrationsabhängigkeit der TLR-2 Aktivität

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Lipolanthionin-Peptide zu bestimmen, wurde die TLR-2 antagonistische Aktivität bei variierender Konzentration des Testpeptids (25 µM – 0,39 µM) bestimmt. Dazu wurde die Konzentration der eingesetzten DMSO-Stammlösung (10 mM) in sechs Verdünnungsschritten jeweils halbiert und die resultierenden Stammlösungen abnehmender Konzentration im bereits beschriebenen ELISA-Protokoll zur IL-8 Bestimmung im zellulären Essay eingesetzt.

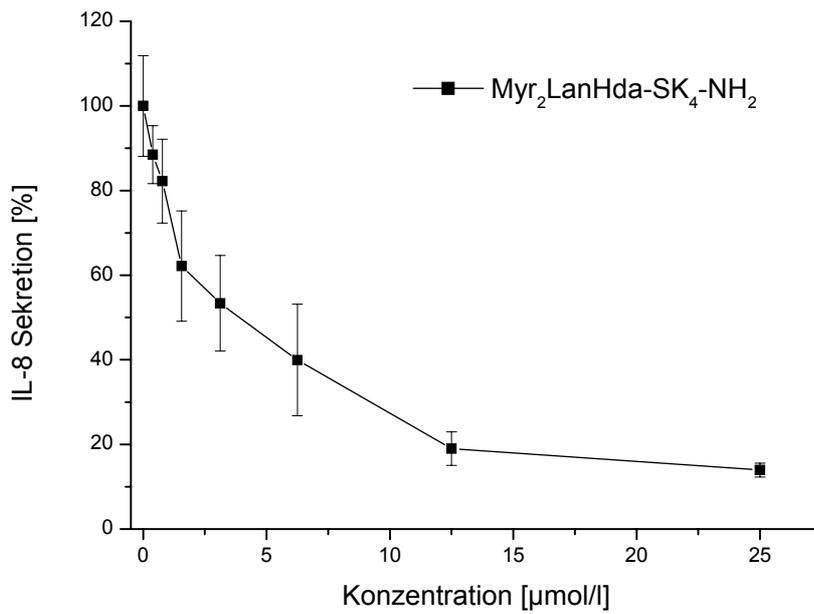


Abb. 66 Konzentrationsabhängigkeit der Verminderung der IL-8 Sekretion durch Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**)

Gut zu erkennen ist die Sättigung des Antagonismus bei der für die Testungen eingesetzten Konzentration von 25 µM der Peptide (**135** und **136**) (**Abb. 66**; **Abb. 67**). Im Falle des Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**; **Abb. 67**) fand sich ein etwas niedrigerer Antagonismus der

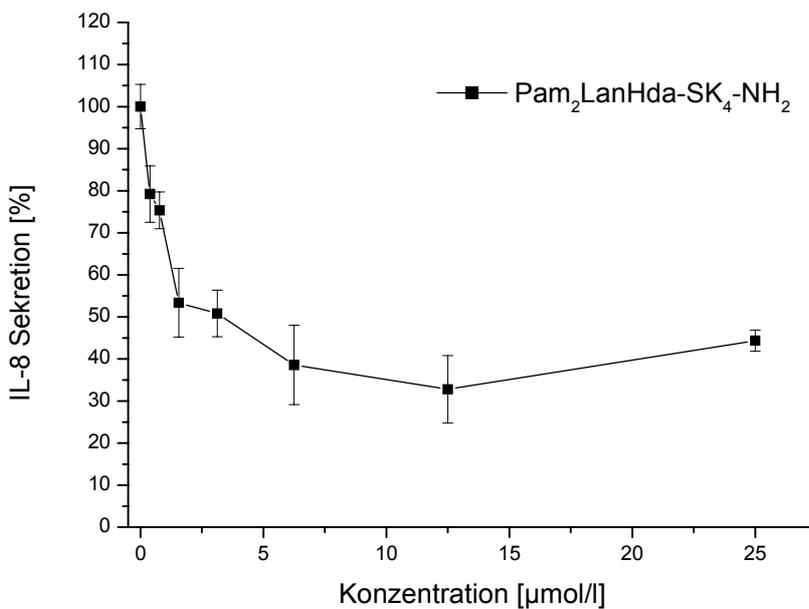


Abb. 67 Konzentrationsabhängigkeit der Verminderung der IL-8 Sekretion durch Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**)

25 μM Lösung gegenüber der 12,5 μM Lösung. Die Gründe hierfür sind vermutlich in einer verstärkten Aggregation der Verbindung bei hohen Konzentrationen und einer damit verbundenen verminderten Verfügbarkeit des Lipopeptids zu suchen. Genauere Studien zur Aggregationsneigung der Verbindungen wird Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

Das Myr₂LanHda-SK₄-NH₂-Derivat zeigte einen im Rahmen der Mittelwertabweichung vergleichbaren Antagonismus bei 12,5 μM und 25 μM .

Zusätzlich zu den beiden antagonistisch aktivsten Derivaten wurde das Sulfoxid des Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**181**; **Abb. 68**), das eine gegenüber dem Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**) erniedrigte antagonistische Aktivität aufwies, titriert. Das Sulfoxid wies bei diesem Versuch wiederum den gegenüber der nicht oxidierten Verbindung erhöhten Antagonismus auf, was sich am deutlichsten bei einer Konzentration von 6 μM zeigte.

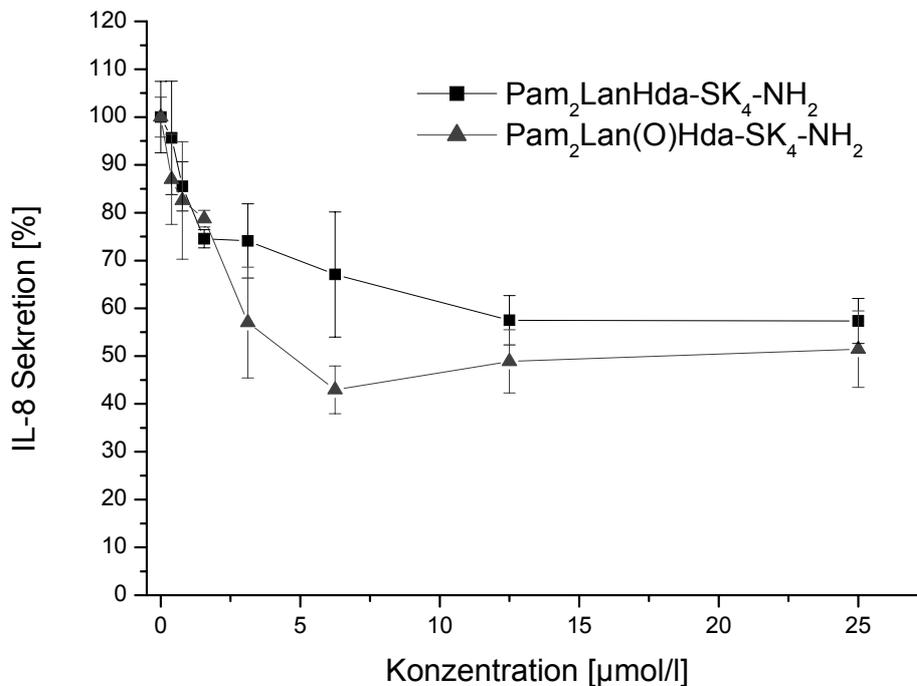


Abb. 68 Konzentrationsabhängigkeit der Verminderung der IL-8 Sekretion durch Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**) sowie dessen korrespondierendes Sulfoxid (**181**).

Zusammenfassend lässt sich für dieses Kapitel sagen, dass die Lipolanthionin-Peptide eine vergleichsweise hohe Konzentration benötigen, um eine signifikante antagonistische Aktivität aufzuweisen (Antagonismus der Lipolanthionin-Peptide bei 12,5 μM ; Agonismus des Pam₃Cys-SK₄-OH bei 20 nM).

Häufig werden bei der Leitstruktursuche im Primärscreening Antagonisten von Hormonen oder Inhibitoren von Enzymen gefunden, deren Aktivität im Bereich von 10 μM liegt.

3.3.7 Screening auf TLR-4 antagonistische Aktivität

Gegen Ende dieser Arbeit wurde noch ein Versuch unternommen, die Aktivität des Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**) in Bezug auf TLR-4, den zweiten TLR, der durch lipophilisierte Verbindungen aktiviert wird, zu untersuchen. Dazu wurden die Lipopeptide Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ (**135**) sowie Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**) in steigender Konzentration (0,4 – 25 µM) eingesetzt und LPS (Konzentration im Well: 40 ng/ml) anstelle des Pam₃Cys-SK₄-NH₂ als TLR-4 Agonist eingesetzt.

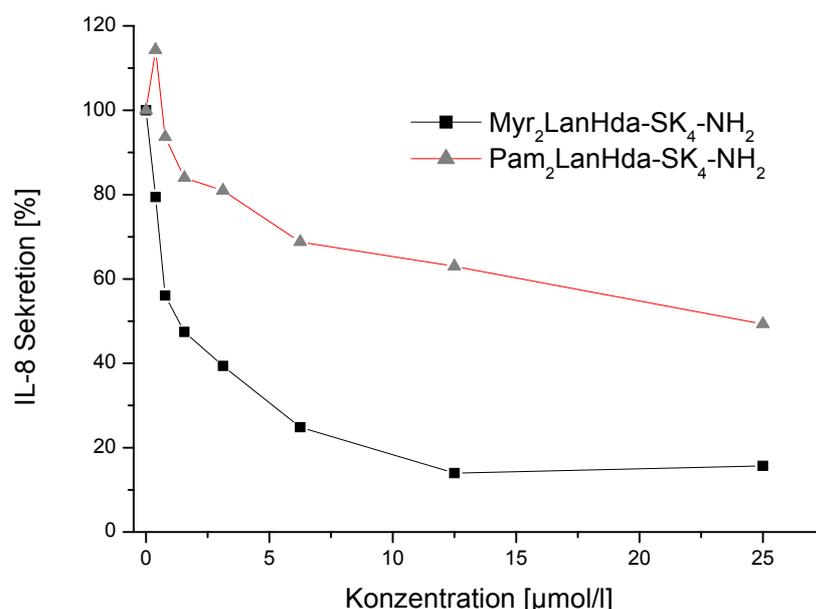


Abb. 69 Konzentrationsabhängigkeit der TLR-4 antagonistischen Aktivität des Myr₂- (**135**) und des Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ (**136**)

Erstaunlicherweise zeigten die beiden Lipolanthionin-Peptide (**135** und **136**) sowohl bei TLR-2 als auch bei TLR-4 eine vergleichbare antagonistische Aktivität. Diese Ergebnisse erhöhten einerseits das Interesse an den Lipolanthionin-Peptiden, da Verbindungen, die sowohl auf TLR-2 als auch auf TLR-4 antagonistisch wirken, für die Behandlung einer Sepsis von höchstem Interesse sind, andererseits wurden so neue Fragen bezüglich des Wirkmechanismus aufgeworfen. Neben der direkten Erkennung durch den Rezeptor musste nun zusätzlich eine Wirkungsweise als löslicher „Rezeptor“ in Betracht gezogen werden. Die Lipopeptide würden in diesem Fall durch Aggregation an den Agonisten eine Erkennung durch den TLR verhindern.

Genauere Aussagen zum Wirkmechanismus lassen sich ohne Kristallstrukturanalysen der extrazellulären Domänen der Rezeptoren, der Lipolanthionin-Peptide und des Agonisten

nicht treffen. Weiterführende Experimente (Einsatz fluoreszent markierter Antagonisten und Agonisten bei fluoreszenzmikroskopischen Experimenten; Einsatz der Antagonisten bei weiteren TLR's; physikochemische Charakterisierung der Lipolanthionin-Peptide) werden zusätzliche Hinweise auf den Wirkmechanismus des gefundenen Antagonisten geben.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige Synthese in Lösung eines für die Festphasensynthese geeigneten Lanthionin-Bausteins entwickelt.

Ausgehend von Fmoc-Serin wurde zunächst der bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur nicht beschriebene Fmoc- β -Bromalanin-*tert.*-butylester synthetisiert, der nachfolgend mit Fmoc-Cysteinallylester in zufrieden stellenden Ausbeuten zum Lanthionin umgesetzt wurde. Die Aufnahme und Auswertung von 2D-NMR-Spektren bewies eindeutig die Identität der Verbindung. Da bei der Synthese über β -Iodalanin Norlanthionin als Hauptprodukt auftritt ist dieser Weg von grossem Vorteil.

Über den etablierten Syntheseweg ließen sich nun gezielt alle vier Stereoisomeren des Lanthionins herstellen. Eine Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse der Lanthionine mit chiraler GC-MS bewies die Retention der Stereozentren und damit den Syntheseverlauf über einen Substitutionsmechanismus.

Ausgehend vom synthetisierten Lanthionin-Baustein wurden zwei weitere Edukte für die Festphasensynthese der Lipolanthionin-Peptide synthetisiert, Fmoc₂LanHda-OH und Pam₂LanHda-OH.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Syntheseprotokolle für den Einsatz der synthetisierten geeignet geschützten Lanthionin-Bausteine in der Festphasensynthese entwickelt. Erste Testverbindungen wurden durch Kupplung von Fmoc₂LanHda-OH und Pam₂LanHda-OH an polymergebundene Peptide hergestellt. Erste Testergebnisse wiesen die Lipolanthionin-Peptide als TLR-2 Antagonisten aus, so dass im Folgenden ein Syntheseprotokoll für den Einsatz des Fmoc₂Lan(OAll)-OH entwickelt wurde. Um weitere Testverbindungen synthetisieren und Struktur-Wirkungs-Beziehungen durchführen zu können, wurde ein Syntheseplan für die Synthese von Lipolanthionin-Peptiden mit variierender Fettsäure, variierendem Fettamin, variierender Stereoisomerie des Lanthionins wie auch variierender Oxidationsstufe des Schwefels erstellt. Für die Umsetzung dieses Synthesepplans wurden allgemeine Synthesevorschriften für die Allylester-Spaltung an fester Phase bei neutralen Bedingungen und die inverse Aminkupplung eines Fettamins auf die Säurefunktion des Lanthionins etabliert. Ferner konnten die harzgebundenen Verbindungen durch selektive Oxidation des Lanthionin- und des Dhc-Schwefels zum Sulfoxid und Sulfon mit mCPBA bzw. H₂O₂ übergeführt werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden unterschiedliche Einzelverbindungsarrays synthetisiert. Diese erlaubten die Untersuchung der Einflüsse der oben genannten Variationen der Reste am Grundgerüst der Lipolanthionin-Peptide auf TLR-2 antagonistische Aktivität. Im Verlauf der Screenings wurde Myristinsäure als bester Fettsäurerest identifiziert. Ferner stellte sich heraus, dass im Bereich des Octyl- bis zum Hexadecylamid alle synthetisierten Myr₂Lan*Fettamid*-Peptide einen vergleichbaren Antagonismus aufwiesen. Einzig das Hexylamid-Derivat wies keine antagonistische Aktivität auf. Für das Octadecylamid-Derivat fand sich eine durch das Octadecylamid verursachte Zelltoxizität.

Die Variation der Konfigurationen an C² und C⁶ zeigte deutlich die vergleichbar gute antagonistische Aktivität der (2R,6R)- und (2S,6R)-Stereoisomeren des Lanthionins. Dahingegen wiesen die (2S,6S)- und (2R,6S)-Stereoisomeren einen deutlichen agonistischen und stark verminderten antagonistischen Effekt auf.

Die Methylester der Lipolanthionin-Peptide (Myr₂Lan(OMe)-SK₄-NH₂) zeigten alle einen zelltoxischen Effekt und wurden somit in den Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt. Der Test der nicht zelltoxischen freien Säuren der Lipolanthionin-Peptide (Myr₂Lan(OH)-SK₄-NH₂) zeigte, dass zwei lipophile Reste an den Positionen 6 und 7 des Lanthionins vorhanden sein müssen, um eine TLR-2 Aktivität zu gewährleisten. Für alle vier Stereoisomeren der freien Säuren fanden sich weder agonistische noch antagonistische Aktivitäten.

Die Variation der Oxidationsstufen der Lanthionine brachte sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während die Oxide des Pam₂LanHda-SK₄-NH₂ noch antagonistische Aktivitäten aufwiesen, das Sulfoxid zeigte sogar einen leicht erhöhten Antagonismus als das nicht oxidierte Produkt, wurde der Agonismus des Pam₃Cys-SK₄-NH₂ durch die Oxidation am Schwefel nicht beeinträchtigt. Für das Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ wurde weder agonistische noch antagonistische Aktivität der Oxide gefunden.

Als antagonistisch wirksamste Verbindung wurde nicht oxidiertes Myr₂LanHda-SK₄-NH₂ identifiziert.

Im Folgenden wurde die Konzentrationsabhängigkeit des TLR-2 Antagonismus der Lipolanthionin-Peptide bestimmt. Es zeigte sich, dass für die maximale Wirksamkeit der Lipopeptide eine Konzentration von mindestens 12,5 µM notwendig ist. Bei einer geringeren Konzentration sinkt die antagonistische Aktivität rapide ab.

In einem weiteren Test konnte die antagonistische Aktivität der Lipolanthionin-Peptide in Bezug auf TLR-4 gezeigt werden. Während dieses Ergebnis einerseits für die medikamentöse Behandlung einer Sepsis mit aus den Lipolanthionin-Peptiden abgeleiteten Verbindungen von grösstem Interesse ist, warf es andererseits doch die Frage auf, ob die Lipolanthionin-Peptide ihre antagonistische Wirkungsweise am Rezeptor entfalten oder evtl. an anderer Stelle, z. B. als eine Art lösliche Rezeptoren die Agonisten abfangen. Dies soll in weiteren Experimenten u. a. durch Mischen und Inkubieren von LPS mit Lipolanthionin-Peptiden vor Zugabe zu den TLR-4 exprimierenden Zellen geklärt werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien

Wasserfreie Lösungsmittel der Firma FLUKA (Neu-Ulm) wurden mit Stickstoff gesättigt und über einem 4 Å Molsieb aufbewahrt. Für die HPLC wurden Acetonitril und Methanol der Reinheit LiChrosolv Gradient Grade der Firma Merck (Darmstadt) und Acetonitril der Reinheit HPLC Far UV Gradient Grade der Firma J. T. Baker (Deventer, Holland) eingesetzt. Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol stammte ebenfalls von der Firma Merck (Darmstadt). Das verwendete Wasser wurde in einer MilliRo Filteranlage von Millipore (Eschborn) deionisiert. In der NMR-Spektroskopie kamen Chloroform-d₁ sowie DMSO-d₆ der Firma Merck zum Einsatz. Fmoc-geschützte Aminosäuren stammten von der Firma Novabiochem (Bad Soden) sowie der Firma Bachem (Heidelberg). Rink-Amid- und 2-Chlor-tritylchlorid-Harze wurden von Rapp-Polymere (Tübingen) bezogen. Alle weiteren Chemikalien stammten von Aldrich oder FLUKA und wurden ohne vorherige Reinigung eingesetzt.

5.2 Zellkultur

Die humane myelomonozytische Zellreihe THP-1 wurde von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) erworben. Die Zellen wurden in 10 % FCS/RPMI 1640 Medium (beides PAN Biotech, Aidenbach) bei 37°C und 5 % CO₂ in einem offenen Puffersystem im Brutschrank kultiviert und jeden dritten bis vierten Tag passagiert.

5.3 Geräte und analytische Methoden

5.3.1 HPLC

Ein Waters LC System der Firma Millipore (Milford, USA), bestehend aus einem Autosampler Waters 712 WISP, einer programmierbaren Pumpeneinheit Waters 626 mit einem 600S Controller und einem Waters 486 UV-Detektor kam zum Einsatz.

Als Trennsäule wurde eine Nukleosil 300 C₁₈ RP-Säule (Korngröße 5 µm, 250 x 2 mm, Fa. Grom, Herrenberg) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min benutzt. Als mobile Phase wurde ein Gradientensystem aus Acetonitril/0,1 % TFA (A) und Wasser/0,1 % TFA (B) verwendet, wobei ein Gradient von 10 Vol % A zu 100 Vol % A innerhalb von 35 min gefahren wurde. Die Detektion erfolgte 214 nm und die Produktreinheiten wurden über die Peakflächen bestimmt.

5.3.2 ES-Massenspektrometrie

Alle ES-MS-Messungen wurden mit einem Bruker Esquire 3000plus LC-ES-MSⁿ-System (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde mit der EsquireControl-Software (Bruker Daltonics Esquire NT 4.0) gesteuert. Die Proben wurden soweit nicht anders angegeben in ACN/H₂O (1:1; 0,1 % Ameisensäure; 0,05 mg/ml) gelöst und die Spektren im Positiv-Modus aufgenommen. Die Probenzuführung erfolgte über eine Spritzenpumpe (Syringe Infusion Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts, USA) mit einer Flussrate von 240 µl/h.

5.3.3 FT-ICR-Massenspektrometrie

Für FT-ICR-MS Messungen wurde ein Bruker Daltonics APEX II Gerät (Bruker Daltonics, Billerica, USA) mit einem 4,7 T Magneten verwendet. Die Ionisierung fand über Electron-Spray-Ionisation (ES-MS) statt. Als interner Standard für die hoch auflösenden Massenspektren wurde PEG oder Ultramark verwendet.

5.3.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

MALDI-MS Spektren wurden auf einem Hewlett-Packard G2025A matrix-assisted-laser-desorption time-of-flight System aufgenommen. Die Proben wurden in ACN/Wasser (1:1) oder reinem ACN (1mg/ml) gelöst. Jeweils 1 µl der Probe und der DHAP-Matrix (bestehend aus 20 mg DHAP, 5 mg Ammonium Citrat in 1 ml 80 % Isopropylalkohol) wurden auf einem Gold-Target gemischt. Für die Signalgenerierung wurden 20-50 Lasershots im Single-Shot-Modus aufsummiert.

5.3.5 GC-MS-Enantiomeren-Trennungen

Die GC-MS-Analysen wurden an einem Agilent (früher HP) System, bestehend aus einem 6890 GC-System und einem 5973 MS-Detektor, durchgeführt. Die Ionisation erfolgte über Electronimpact-Ionisation (EI-MS). Die enantiomeren Reinheiten wurden im Selected-Ion-Mode (SIM) bestimmt. Trägergas war Helium und die stationäre Phase eine Chirasil-Val Säule. Alle Aminosäuren wurden mit einem Standard-Temperatur-Programm vermessen. Beim Lanthionin kam ein verkürztes Temperatur-Programm zum Einsatz.

Standard-Programm: 55°C/3min/3,2°C/180°C

Verkürztes-Programm: 55°C/3min/25°C/145°C/10min/2,5°C/180°C

5.3.6 Kernresonanzspektroskopie

Die ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren und zweidimensionale Spektren wurden soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur an einem Bruker Avance 400 MHz oder einem Bruker AMX 600 MHz Spektrometer (Bruker BioSpin, Karlsruhe-Ettingen) aufgenommen ($c = 30 \text{ mg/ml}$ im jeweils angegebenen Lösungsmittel).

5.3.7 Infrarotspektroskopie

Infrarotspektren wurden auf einem mit einer Harrick's Split-Pea-ATR-Einheit ausgestattet ATR-FT-IR-Spektrometer Vector 22 mit der Steuersoftware Opus 3.01 der Firma Bruker aufgenommen. Bei einem Meßbereich von $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ wurden die Spektren mit 16 Scans aufgenommen. Die Background- und ATR-Korrektur erfolgte automatisch.

Die im Text angegebenen Wellenzahlen beschränken sich auf die für das jeweilige Reaktionsprodukt charakteristischen Absorptionsbanden.

5.3.8 Dünnschichtchromatographie

Die R_f Werte wurden auf DC-Platten der Firma Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄ 5 x 10 cm, mit den folgenden Lösungsmittelgemischen (v/v) in gesättigten DC-Kammern bei Raumtemperatur bestimmt:

I	Hexan/Ethylacetat	3:1
II	Hexan/Ethylacetat	2:1
III	Hexan/Ethylacetat	7:1
IV	Hexan/Ethylacetat/Essigsäure	8:4:1
V	Chloroform/Methanol/ Essigsäure	90:10:1
VI	Ethylacetat/Chloroform/25 % Ammoniak	130:8:1.

5.3.9 Kaiser-Test

Zur Kontrolle der Kupplungseffizienz auf primäre Amine wurde die Farbreaktion mit Ninhydrin an fester Phase nach Kaiser durchgeführt. Hierbei fanden folgende Reagenzlösungen Verwendung:

Kaiser I: 50 µl einer 0,01 M wässrigen KCN-Lösung werden mit Pyridin auf 25 ml aufgefüllt.

Kaiser II: 5 g Ninhydrin werden in 100 ml n-Butylalkohol gelöst.

Kaiser III: 80 g Phenol werden in 20 ml n-Butylalkohol gelöst.

Wenige Harzkugeln wurden in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen der drei Reagenzlösungen versetzt und die Suspension 5 min bei 110 °C erhitzt. Trat dabei keine intensive Blaufärbung des Harzes oder der Lösung auf, lagen keine freien Aminogruppen vor.

5.3.10 Belegungsbestimmung durch UV-spektrometrische Fmoc-Bestimmung

In einen 10 ml Messkolben wurden 10 mg gewaschenes und getrocknetes Harz eingewogen, mit 0,5 ml einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und für 30 min geschüttelt. Danach wurde der Kolben bis zur Eichmarke mit DMF aufgefüllt. In einem zweiten 10 ml Messkolben wurde eine Referenzlösung angesetzt, indem 500 µl der Piperidin/DMF-Lösung zupipettiert und der Messkolben mit DMF bis zur Eichmarke aufgefüllt wurde.

Am UV-Spektrometer wurde im Wellenlängenbereich von 250 bis 320 nm zunächst mit der Referenzlösung eine Hintergrundkorrektur durchgeführt und anschließend die Abspaltlösung gegen diese Referenz gemessen. Die Extinktionswerte an den drei

Absorptionsmaxima im UV-Spektrum bei $\lambda_1 = 267$ nm, $\lambda_2 = 289$ nm und $\lambda_3 = 301$ nm wurden gemäß folgender Gleichung ausgewertet:

$$x \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{100.000 \cdot E_\lambda}{\epsilon_\lambda \cdot (\text{Einwaage})}$$

x = Harzbelegung

E_λ = Extinktion

ϵ_λ = Extinktionskoeffizient

(Einwaage) = eingewogene Harzmenge in [mg]

Verwendete Extinktionskoeffizienten:

$$\epsilon_{267} = 17500 \text{ cm}^{-1}, \quad \epsilon_{289} = 5800 \text{ cm}^{-1}, \quad \epsilon_{301} = 7800 \text{ cm}^{-1}$$

Die Harzbelegung ergab sich durch Mittelung der drei bei den verschiedenen Wellenlängen erhaltenen Werte.

5.3.11 UV-Spektroskopie

Für die quantitative Fmoc-Beladungsbestimmung der verschiedenen Harze wurden UV-Spektren an einem Lambda 5 UV/VIS-Spektrometer (Perkin-Elmer, Überlingen) aufgenommen.

5.3.12 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA); IL-8 Assay

In die einzelnen Kavitäten einer 96-Well Kulturplatte wurden je 150 μl einer Lösung aus THP-1 Zellen in 10 % FCS/RPMI 1640 Medium (260.000 Zellen/ml) pipetiert. Aus den zu testenden, dreifach lyophilisierten Lipopeptiden wurde eine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und 2 μl dieser Lösung 1:100 mit 10 % FCS/RPMI 1640 Medium verdünnt. Jeweils 50 μl der hergestellten Lösung wurden in die mit Zelllösung gefüllten Wells pipettiert, was zu einer Peptidkonzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ führte.

Für Testung auf antagonistische Aktivität wurden nach 5 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 jeweils 10 μl einer 1 μM Lösung von Pam₃Cys-SK₄-OH in

RPMI 1640 Medium zugegeben (resultierende Konzentration: 50 nM). Bei Messungen auf agonistische Aktivität wurden stattdessen nach 5 min 10 µl reines RPMI 1640 Medium hinzupipettiert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Mischungen 5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Negativ-Kontrolle erfolgte durch Inkubation der Zellen mit peptidfreiem Medium gleichen DMSO Gehalts, im Fall der Positiv-Kontrolle enthielt das Medium nur Pam₃Cys-SK₄-OH in der angegebenen Konzentration.

Nach der Inkubation wurden jeweils 100 µl der zellfreien Überstände abgenommen und bei -80°C bis zur Quantifizierung der IL-8 Sekretion durch matched-pair ELISA aufbewahrt. Die Zellsuspension wurde für Zelltoxizitäts-Tests (Kapitel 5.3.13) eingesetzt.

Für die Durchführung des matched-pair ELISA's wurde eine 96-well ELISA Platte 16 h mit mAnti IL-8 Antikörper (100 µl; 2 µg/ml in PBS) belegt und anschließend die Wells dreimal mit einem Waschpuffer (250 µl; 0,2 % TweenTwenty in PBS) gewaschen. Die nicht spezifischen Adsorptionsstellen wurden durch einen Blockpuffer (200 µl; 4 % BSA in PBS; 1 h) blockiert und nach zweimaligem Waschen eine Mischung aus Überstand und Blockpuffer (100 µl; 1:1) zugegeben. Nach 1,5 h wurde die Mischung entfernt, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die immobilisierten IL-8-Antikörper-Komplexe 1 h mit einer Lösung aus biotinyliertem mAnti IL-8 AK (100 µl; 0,5 µg/ml) in Blockpuffer behandelt. Nach dreimaligem Waschen wurde Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Strept-HRP) (100 µl; Strept.-HRP/Blockpuffer 1:5000; 1 h) über eine Streptavidin-Biotin-Bindung an den IL-8-Antikörper-Komplex angebunden. Der Überstand wurde entfernt und nach dreimaligem Waschen TMB-Substrat (100 µl) zugegeben. Als eine ausreichende Blaufärbung der Lösung erreicht war, wurde die Reaktion mit 0,5M H₂SO₄ (100 µl) abgebrochen und die umgesetzte Substratmenge in einem Spectra Max 340 ELISA-Reader der Firma Molecular Devices bei 450 nm photometrisch bestimmt.

5.3.13 Zelltoxizitäts-Test

Nach Abnahme der Überstände (Kapitel 5.3.12) wurde der verbleibenden Zellsuspension 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (20 µl; 5 mg/ml in PBS; MTT; Sigma, Taufkirchen) zugegeben. Nach 4 h wurde das entstandene Formazan mit SDS (90 µl; 10 % (m/v) in 10mM HCl; Fluka, Neu-Ulm) gelöst und der Prozentsatz der

lebenden Zellen durch Vergleich der bei 570 nm gemessenen Absorptionen der Probe und der Negativ-Probe bestimmt.

5.4 Synthesen

5.4.1 Einführen der Allylschutzgruppe (Allgemeine Vorschrift)

Die zu schützende Fmoc-Aminosäure wurde mit 1,1 eq DIEA in 10 ml/g ACN/Allylbromid (2:1) 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit dem 5fachen an Ethylacetat verdünnt und je dreimal mit 10 % Na₂CO₃ und ges. NaCl Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel am Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Hexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt.

5.4.1.1 *N-Fmoc-S-trityl-(R)-cysteinallylester (61a)*

Eingesetzt: N-Fmoc-S-trityl-(R)-cystein (60a; 7,50 g; 12,81 mmol); DIEA (2,41 ml; 14,09 mmol) ACN/Allylbromid (2:1; 75 ml).

Ausbeute: 7,37 g (92 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: R_F(I) = 0,23.

ES-MS: m/z = 648,4 [M+Na]⁺.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): δ = 7.69 (m, 2H), 7.54 (d, 2H), 7.33 (m, 8H), 7.23-7.12 (m, 11H), 5.80 (m, 1H), 5.23 (d, 1H), 5.18 (d, 1H), 4.55 (d, 2H), 4.31-4.28 (m, 3H), 4.16 (t, 1H), 2.65-2.55 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 170.19(Cys-CO), 155.57 (Fmoc-CO), 144.19 (Trt-Phenyl-C-1), 143.68 (Fmoc-C-8a/9a), 141.25 (Fmoc-C-4a/4b), 131.35 (Allyl-C-2), 129.46 (Trt-Phenyl-C-2/6), 128.00 (Trt-Phenyl-C-3/5), 127.70 (Fmoc-C-3/6), 127.07 (Fmoc-C-2/7), 126.88 (Trt-Phenyl-C-4), 125.09 (Fmoc-C-1/8), 119.95 (Fmoc-C-4/5), 118.79 (Allyl-C-3), 67.12 (Trt-C-q), 66.99 (Allyl-C-1), 66.25 (Fmoc-CH₂-O), 52.92 (Cys-C-α), 47.03 (Fmoc-C-9), 34.01 (Cys-C-β) ppm.

5.4.1.2 *N-Fmoc-S-trityl-(S)-cysteinallylester (61b)*

Eingesetzt: N-Fmoc-S-trityl-(S)-cystein (**60b**; 2,00 g; 3,42 mmol), DIEA (643,03 μ l; 3,75 mmol), ACN/Allylbromid (2:1; 20 ml).

Ausbeute: 1,92 g (90 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: $R_f(I) = 0,23$.

ES-MS: $m/z = 648,4 [M+Na]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.69$ (m, 2H), 7.54 (d, 2H), 7.33 (m, 8H), 7.23-7.12 (m, 11H), 5.80 (m, 1H), 5.23 (d, 1H), 5.18 (d, 1H), 4.55 (d, 2H), 4.31-4.28 (m, 3H), 4.16 (t, 1H), 2.65-2.55 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.19$ (Cys-CO), 155.57 (Fmoc-CO), 144.19 (Trt-Phenyl-C-1), 143.68 (Fmoc-C-8a/9a), 141.25 (Fmoc-C-4a/4b), 131.35 (Allyl-C-2), 129.46 (Trt-Phenyl-C-2/6), 128.00 (Trt-Phenyl-C-3/5), 127.70 (Fmoc-C-3/6), 127.07 (Fmoc-C-2/7), 126.88 (Trt-Phenyl-C-4), 125.09 (Fmoc-C-1/8), 119.95 (Fmoc-C-4/5), 118.79 (Allyl-C-3), 67.12 (Trt-C-1), 66.99 (Allyl-C-1), 66.25 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 52.92 (Cys-C- α), 47.03 (Fmoc-C-9), 34.01 (Cys-C- β) ppm.

5.4.2 Spaltung der Tritylschutzgruppe des Cysteins (Allgemeine Vorschrift)

Das in der Seitenkette Trityl-geschützte Cystein wurde in TFA/DCM (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 3,3 eq TIPS wurde die Lösung 2 h bei RT gerührt, das Lösungsmittelgemisch am Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM gelöst und das Produkt mit dem 20fachen an DEE bei -20°C gefällt.

5.4.2.1 *N-Fmoc-(R)-cysteinallylester (62a)*

Eingesetzt: **61a** (7,00 g; 11,19 mmol), TFA/DCM (1:1; 40 ml), TIPS (7,58 ml; 36,93 mmol); DCM (15 ml), DEE (300 ml).

Ausbeute: 4,08 g (95 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: $R_F(I) = 0,34$.

ES-MS: $m/z = 403,1 [M+Na]^+$; $422,0 [M+K]^+$.

GC-MS: 99,8 % R; 0,3 % S.

1H -NMR (400.16 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.76$ (d, 2H), 7.60 (d, 2H), 7.40 (t-like, 2H), 7.32 (t-like, 2H), 5.92 (m, 1H), 5.71 (d, 1H), 5.36 (d, 1H), 5.28 (d, 1H), 4.69 (m, 3H), 4.42 (m, 2H), 4.23 (t, 1H), 3.05 (m, 2H), 1.37 (t, 1H) ppm.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 169.66$ (Cys-CO), 155.64 (Fmoc-CO), 143.76 und 143.57 (Fmoc-C-8a/9a), 141.31 (Fmoc-C-4a/4b), 131.20 (Allyl-C-2), 127.75 (Fmoc-C-3/6), 127.06 (Fmoc-C-2/7), 125.00 (Fmoc-C-1/8), 120.01 (Fmoc-C-4/5), 119.40 (Allyl-C-3), 67.12 (Allyl-C-1), 66.48 (Fmoc- CH_2 -O), 55.20 (Cys-C- α), 47.11 (Fmoc-C-9), 27.13 (Cys-C- β) ppm.

5.4.2.2 *N*-Fmoc-(*S*)-cysteinallylester (62b)

Eingesetzt: **61b** (1,80 g; 2,88 mmol), TFA/DCM (1:1; 20 ml), TIPS (1,95 ml; 9,50 mmol); DCM (5 ml), DEE (100 ml).

Ausbeute: 1,05 g (95 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: $R_F(I) = 0,34$.

ES-MS: $m/z = 403,1 [M+Na]^+$; $422,0 [M+K]^+$.

GC-MS: 3,3 % R; 96,7 % S.

1H -NMR (400.16 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.76$ (d, 2H), 7.60 (d, 2H), 7.40 (t-like, 2H), 7.32 (t-like, 2H), 5.92 (m, 1H), 5.73 (d, 1H), 5.36 (d, 1H), 5.28 (d, 1H), 4.69 (m, 3H), 4.43 (m, 2H), 4.23 (t, 1H), 3.06 (m, 2H), 1.37 (t, 1H) ppm.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 169.66$ (Cys-CO), 155.64 (Fmoc-CO), 143.73 und 143.55 (Fmoc-C-8a/9a), 141.29 (Fmoc-C-4a/4b), 131.19 (Allyl-C-2), 127.75 (Fmoc-C-3/6), 127.06 (Fmoc-C-2/7), 125.05 (Fmoc-C-1/8), 120.00 (Fmoc-C-4/5), 119.39 (Allyl-C-3), 67.11 (Allyl-C-1), 66.48 (Fmoc- CH_2 -O), 55.19 (Cys-C- α), 47.09 (Fmoc-C-9), 27.12 (Cys-C- β) ppm.

5.4.3 Einführen der *tert.*-Butylschutzgruppe (Allgemeine Vorschrift)

Eine Mischung aus 3 eq DIC, 4 eq *tert.*-Butylalkohol und einer katalytischen Menge CuCl wurde unter Argon 5 d gerührt. Die Mischung wurde mit DCM verdünnt und zu einer Lösung aus N-Fmoc-(S)-serin in DCM/DMF (14:1) getropft. Die Mischung wurde 4 h bei RT gerührt, anschließend filtriert und das Filtrat je dreimal mit einer ges. NaHCO₃ und einer ges. NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Hexan/Ethylacetat 3:1 → 1:1) gereinigt.

5.4.3.1 *N-Fmoc-(S)-serin-tert.-butylester (58a)*

Eingesetzt: DIC (14,19 ml; 91,66 mmol), *tert.*-Butylalkohol (11,61 ml; 122,21 mmol), CuCl (60 mg; 0,61 mmol), DCM (70 ml), N-Fmoc-(S)-serin (**48a**; 10,00 g; 30,55 mmol), DCM/DMF (14:1; 75 ml).

Ausbeute: 7,62 g (65 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: R_F(II) = 0,15.

ES-MS: $m/z = 406,2 [M+Na]^+$; $422,1 [M+K]^+$.

GC-MS: 0,2 % R; 99,8 % S.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.75$ (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.39 (t-like, 2H), 7.30 (t-like, 2H), 5.78 (d, 1H), 4.40 (d, 2H), 4.33 (s br., 1H), 4.21 (t, 1H), 3.92 (s br., 2H), 2.36 (s br., 1H), 1.48 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.47$ (Ser-CO), 156.28 (Fmoc-CO), 143.79 und 143.66 (Fmoc-C-8a/9a), 141.27 (Fmoc-C-4a/4b), 127.68 (Fmoc-C-3/6), 127.02 (Fmoc-C-2/7), 125.05 (Fmoc-C-1/8), 119.95 (Fmoc-C-4/5), 82.83 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.09 (Fmoc-CH₂-O), 63.63 (Ser-C- β), 56.56 (Fmoc-C- α), 47.09 (Fmoc-C-9), 27.95 (*tert.*-Butyl-CH₃) ppm.

5.4.3.2 *N-Fmoc-(R)-serin-tert.-butylester (58b)*

Eingesetzt: DIC (2,84 ml; 18,33 mmol), *tert.*-Butylalkohol (2,32 ml; 24,42 mmol), CuCl (20 mg; 0,20 mmol), DCM (10 ml), N-Fmoc-(R)-serin (**48b**; 2,00 g; 6,11 mmol), DCM/DMF (14:1; 15 ml).

Ausbeute: 1,30 g (55 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_F(\text{II}) = 0,15$.

ES-MS: $m/z = 350,0$ [M-tBu+Na]⁺; 406,1 [M+Na]⁺; 422,0 [M+K]⁺.

GC-MS: 99,3 % R; 0,7 % S.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.75$ (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.39 (t-like, 2H), 7.30 (t-like, 2H), 5.74 (d, 1H), 4.40 (d, 2H), 4.32 (s br., 1H), 4.21 (t, 1H), 3.92 (s br., 2H), 1.48 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.45$ (Ser-CO), 156.27 (Fmoc-CO), 143.80 und 143.67 (Fmoc-C-8a/9a), 141.27 (Fmoc-C-4a/4b), 127.69 (Fmoc-C-3/6), 127.02 (Fmoc-C-2/7), 125.05 (Fmoc-C-1/8), 119.96 (Fmoc-C-4/5), 82.86 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.10 (Fmoc-CH₂-O), 63.68 (Ser-C- β), 56.57 (Fmoc-C- α), 47.10 (Fmoc-C-9), 27.96 (*tert.*-Butyl-CH₃) ppm.

5.4.3.3 *N-Fmoc-O³-trityl-(2S,3RS)-threonin-tert.-butylester (76)*

Eingesetzt: DIC (795 μ l; 5,14 mmol), *tert.*-Butylalkohol (651 μ l; 6,85 mmol), CuCl (60,4 mg; 0,17 mmol), DCM (5 ml), N-Fmoc-O³-trityl-(2R,3RS)-threonin (**75**; 1,00 g; 1,71 mmol), DCM/DMF (14:1; 7,5 ml).

Ausbeute: 594 mg (54 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_F(\text{II}) = 0,52$.

ES-MS: $m/z = 420,1$ [M-Trt+Na]⁺; 662,1 [M+Na]⁺.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.78$ (d, 2H), 7.68 (dd, 2H), 7.50 – 7.19 (m, 19H), 5.79 (d, 1H), 4.43 (m, 2H), 4.31 (t, 1H), 4.17 (dd, 1H), 3.87 (qd, 1H), 1.34 (s, 9H), 0.95 (d, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 169.87 (Thr-CO), 156.59 (Fmoc-CO), 144.51 (Trt-Phenyl-C-1), 143.79 (Fmoc-C-8a/9a), 141.29 (Fmoc-C-4a/4b), 128.95 (Trt-Phenyl-C-3/5), 127.90 (Fmoc-C-3/6), 127.70 (Fmoc-C-2/7), 127.63 (Trt-Phenyl-C-2/6), 127.17 (Trt-Phenyl-C-4), 125.17 (Fmoc-C-1/8), 119.97 (Fmoc-C-4/5), 86.35 (Trt-C-q), 82.03 (*tert.*-Butyl-C-q), 71.36 (Thr-C- β), 67.14 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 60.05 (Thr-C- α), 47.21 (Fmoc-C-9), 27.90 (*tert.*-Butyl- CH_3), 18.67 (Thr- CH_3) ppm.

5.4.4 N-Fmoc-(2S,3RS)-threonin-*tert.*-butylester (77)

Der N-Fmoc-O³-trityl-(2R,3RS)-threonin-*tert.*-butylester (76; 594 mg; 0,93 mmol) wurde in einer Mischung aus TFE/DCM/TIPS (10:5:1; 16 ml) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Hexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 348 mg (94 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_f(\text{II}) = 0,31$.

ES-MS: $m/z = 420,1$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

^1H -NMR (400.16 MHz, CDCl_3): δ = 7.75 (d, 2H), 7.60 (d, 2H), 7.39 (t-like, 2H), 7.30 (t-like, 2H), 5.61 (d, 1H), 4.40 (d, 2H), 4.29 (m, 1H), 4.23 (t, 2H), 2.04 (s, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.24 (dd, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 170.19 (Thr-CO), 156.69 (Fmoc-CO), 143.51 (Fmoc-C-8a/9a), 141.26 (Fmoc-C-4a/4b), 127.67 (Fmoc-C-3/6), 127.03 (Fmoc-C-2/7), 125.09 (Fmoc-C-1/8), 119.95 (Fmoc-C-4/5), 82.63 (*tert.*-Butyl-C-q), 68.29 (Thr-C- β), 67.12 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 59.49 (Thr-C- α), 47.12 (Fmoc-C-9), 27.98 (*tert.*-Butyl- CH_3), 19.90 (Thr- CH_3) ppm.

5.4.5 Transformation der Hydroxyfunktion zum Bromid (Allgemeine Vorschrift)

Die Verbindung wurde zusammen mit 1,22 eq CBr_4 unter Argon in 10 ml/g DCM gelöst. Zu der gerührten Lösung wurden bei 0°C über den Zeitraum von 1 h portionsweise 1,6 eq PPh_3 gegeben. Nach 20 min Rühren bei 0°C wurde das Eisbad entfernt und die

Reaktionsmischung weitere 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig DCM aufgenommen und in Ethylacetat gegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Es wurde bei -20°C nachgefällt und erneut filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Hexan/Ethylacetat 7:1) gereinigt.

5.4.5.1 3-Brom-N-Fmoc-(R)-alanin-tert.-butylester (59a)

Eingesetzt: N-Fmoc-(S)-serin-*tert.*-butylester (**58a**; 7,00 g; 18,26 mmol), CBr₄ (7,39 g; 22,27 mmol), DCM (70 ml), PPh₃ (7,66 g; 29,21 mmol), Ethylacetat (100 ml).

Ausbeute: 6,91 g (85 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: R_F(III) = 0,15.

ES-MS: $m/z = 412,2$ und $414,2$ [M-tBu+Na]⁺; $468,0$ und $470,0$ [M+Na]⁺.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.76$ (d, 2H), 7.61 (d, 2H), 7.40 (t-like, 2H), 7.32 (t-like, 2H), 5.73 (d, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.38 (m, 2H), 4.24 (t, 2H), 3.79 , (m, 2H), 1.51 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 167.72$ (Ala-CO), 155.50 (Fmoc-CO), 143.74 und 143.63 (Fmoc-C-8a/9a), 141.25 (Fmoc-C-4a/4b), 127.73 (Fmoc-C-3/6), 127.06 (Fmoc-C-2/7), 125.14 (Fmoc-C-1/8), 119.98 (Fmoc-C-4/5), 83.56 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.29 (Fmoc-CH₂-O), 54.47 (Ala-C- α), 47.03 (Fmoc-C-9), 34.33 (Ala-C- β), 27.92 (*tert.*-Butyl-CH₃) ppm.

5.4.5.2 3-Brom N-Fmoc-(S)-alanin-tert.-butylester (59b)

Eingesetzt: N-Fmoc-(R)-serin-*tert.*-butylester (**58b**; 500 mg; 1,30 mmol), CBr₄ (527 mg; 1,59 mmol), DCM (8 ml), PPh₃ (547 mg; 2,09 mmol), Ethylacetat (20 ml).

Ausbeute: 451 mg (78 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_F(\text{III}) = 0,15$.

ES-MS: $m/z = 412,2$ und $414,2$ $[\text{M-tBu+Na}]^+$; $468,0$ und $470,0$ $[\text{M+Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.76$ (d, 2H), 7.61 (d, 2H), 7.40 (t-like, 2H), 7.32 (t-like, 2H), 5.72 (d, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.39 (m, 2H), 4.24 (t, 1H), 3.79 (m, 2H), 1.51 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.73$ (Ala-CO), 155.50 (Fmoc-CO), 143.75 und 143.65 (Fmoc-C-8a/9a), 141.27 (Fmoc-C-4a/4b), 127.73 (Fmoc-C-3/6), 127.07 (Fmoc-C-2/7), 125.15 und 125.11 (Fmoc-C-1/8), 119.99 (Fmoc-C-4/5), 83.58 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.30 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 54.47 (Ala-C- α), 47.05 (Fmoc-C-9), 34.34 (Ala-C- β), 27.93 (*tert.*-Butyl- CH_3) ppm.

5.4.5.3 2-Amino-3-Brom-N-Fmoc-(2S,3RS)-butansäure-*tert.*-butylester (78)

Eingesetzt: N-Fmoc-(2S,3RS)-threonin-*tert.*-butylester (**77**; 318 mg; 0,80 mmol), CBr_4 (324 mg; 0,98 mmol), DCM (8 ml), PPh_3 (336 mg; 1,28 mmol), Ethylacetat (20 ml).

Ausbeute: 225 mg (61 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_F(\text{II}) = 0,46$.

ES-MS: $m/z = 426,1$ und $428,0$ $[\text{M-tBu+Na}]^+$; $482,2$ und $484,0$ $[\text{M+Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.77$ (d, 2H), 7.61 (d, 2H), 7.40 (t-like, 2H), 7.32 (m, 2H), 5.75 (d, 1H), 4.49 (dd, 1H), 4.39 (m, 3H), 4.24 (t, 1H), 1.83 (d, 3H), 1.53 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.42$ (But-CO), 155.56 (Fmoc-CO), 143.72 und 143.63 (Fmoc-C-8a/9a), 141.24 (Fmoc-C-4a/4b), 127.70 (Fmoc-C-3/6), 127.03 (Fmoc-C-2/7), 125.11 und 125.06 (Fmoc-C-1/8), 119.96 (Fmoc-C-4/5), 83.57 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.23 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 59.86 (But-C-3), 49.99 (But-C-2), 47.05 (Fmoc-C-9), 28.01 (*tert.*-Butyl- CH_3), 22.95 (But-C-4) ppm.

5.4.6 Lanthionin-Synthese (63a-d) (Allgemeine Vorschrift)

Das jeweilige Cystein-Derivat wurde unter Argon in 5 % DIEA/DMF gelöst. Eine Lösung aus 1,1 eq des jeweiligen Bromids in DMF wurde zugetropft und die Mischung 4 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wurde mit dem 5fachen an DEE verdünnt und die Lösung fünfmal mit 10 % Zitronensäure gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DEE ausgezogen und die vereinigten organischen Phasen je dreimal mit 10 % Zitronensäure und ges. NaCl Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Hexan/Ethylacetat 4,5:1→2:1) gereinigt.

5.4.6.1 *N*²,*N*⁶-Bis-(Fmoc)-(2*R*,6*R*)-lanthionin-*O*⁷-allyl-*O*¹-*tert*.-butyldiester (63a)

Eingesetzt: N-Fmoc-(*R*)-cysteinallylester (**62a**; 5,00 g; 13,04 mmol) und 3-Brom-N-Fmoc-(*R*)-alanin-*tert*.-butylester (**59a**; 6,40 g; 14,34 mmol), 5 % DIEA/DMF (30 ml).

Ausbeute: 6,30 g (65 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_F(I) = 0,14$.

ES-MS: $m/z = 771,2 [M+Na]^+$; $787,1 [M+K]^+$.

FT-ICR-MS: $m/z = 771,2710250 [M+Na]^+$ ($C_{43}H_{44}N_2O_8SNa = 771,2710582$)
 $\Delta = 0,04$ ppm.

GC-MS: 97,3 % RR; 2,7 % Meso; 0,0 % SS.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.74$ (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.38 (t-like, 4H), 7.29 (t-like, 4H), 5.89 (m, 1H), 5.76 (d, 1H), 5.69 (d, 1H), 5.33 (d, 1H), 5.24 (d, 1H), 4.65 (m, 3H), 4.49 (m, 1H), 4.37 (m, 4H), 4.21 (t, 2H), 3.02 (m, 4H), 1.48 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.17$ (Lan-C-1), 169.37 (Lan-C-7), 155.75 (Fmoc-CO), 143.79 und 143.68 (Fmoc-C-8a/9a), 141.24 (Fmoc-C-4a/4b), 131.19 (Allyl-C-2), 127.68 (Fmoc-C-3/6), 127.03 (Fmoc-C-2/7), 125.09 (Fmoc-C-1/8), 119.94 (Fmoc-C-4/5), 119.32 (Allyl-C-3), 83.12 (*tert*.-Butyl-C-q), 67.24 und 67.12 (Fmoc-CH₂-O), 66.48 (Allyl-C-1), 54.30 (Lan-C-2), 53.82 (Lan-C-6), 47.03 (Fmoc-C-9), 35.53 (Lan-C-3), 35.37 (Lan-C-4), 27.94 (*tert*.-Butyl-CH₃) ppm.

5.4.6.2 N^2, N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6S)-lanthionin- O^7 -allyl- O^1 -tert.-butyldiester (63b)

Eingesetzt: N-Fmoc-(S)-cysteinallylester (**62b**; 350 mg; 0,91 mmol) und 3-Brom-N-Fmoc-(R)-alanin-*tert.*-butylester (**59a**; 448 mg; 1,00 mmol), 5 % DIEA/DMF (8 ml).

Ausbeute: 420 mg (62 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_f(I) = 0,14$.

ES-MS: $m/z = 771,2 [M+Na]^+$; 787,1 $[M+K]^+$.

FT-ICR-MS: $m/z = 771,2707890 [M+Na]^+$ ($C_{43}H_{44}N_2O_8SNa = 771,2710582$)
 $\Delta = 0,3$ ppm.

GC-MS: 1,3 % RR; 97,0 % Meso; 1,7 % SS.

1H -NMR (400.16 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.74$ (d, 4H), 7.59 (d, 4H), 7.38 (t-like, 4H), 7.29 (t-like, 4H), 5.88 (m, 1H), 5.81 (d, 1H), 5.76 (d, 1H), 5.32 (d, 1H), 5.24 (d, 1H), 4.64 (m, 3H), 4.50 (m, 1H), 4.38 (m, 4H), 4.22 (t, 2H), 3.03 (m, 4H), 1.47 (s, 9H) ppm.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170.14$ (Lan-C-1), 169.31 (Lan-C-7), 155.77 (Fmoc-CO), 143.73 und 143.69 (Fmoc-C-8a/9a), 141.25 (Fmoc-C-4a/4b), 131.19 (Allyl-C-2), 127.68 (Fmoc-C-3/6), 127.05 (Fmoc-C-2/7), 125.11 (Fmoc-C-1/8), 119.94 (Fmoc-C-4/5), 119.29 (Allyl-C-3), 83.09 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.28 und 67.18 (Fmoc- CH_2 -O), 66.44 (Allyl-C-1), 54.36 (Lan-C-2), 53.91 (Lan-C-6), 47.03 (Fmoc-C-9), 35.93 (Lan-C-3), 35.76 (Lan-C-4), 27.93(*tert.*-Butyl- CH_3) ppm.

5.4.6.3 N^2, N^6 -Bis-(Fmoc)-(2S,6R)-lanthionin- O^7 -allyl- O^1 -tert.-butyldiester (63c)

Eingesetzt: N-Fmoc-(R)-cysteinallylester (**62a**; 350 mg; 0,91 mmol) und 3-Brom-N-Fmoc-(S)-alanin-*tert.*-butylester (**59b**; 448 mg; 1,00 mmol), 5 % DIEA/DMF (8 ml).

Ausbeute: 394 mg (58 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: $R_f(I) = 0,14$.

ES-MS: $m/z = 771,2$ [M+Na]⁺; 787,1 [M+K]⁺.

FT-ICR-MS: $m/z = 771,27107380$ [M+Na]⁺ (C₄₃H₄₄N₂O₈SNa = 771,2710582)

$\Delta = 0,4$ ppm.

GC-MS: 2,6 % RR; 96,7 % Meso; 0,7 % SS.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.74$ (d, 4H), 7.59 (d, 4H), 7.38 (t-like, 4H), 7.29 (t-like, 4H), 5.88 (m, 1H), 5.81 (d, 1H), 5.76 (d, 1H), 5.32 (d, 1H), 5.24 (d, 1H), 4.64 (m, 3H), 4.51 (m, 1H), 4.38 (m, 4H), 4.22 (t, 2H), 3.01 (m, 4H), 1.47 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.14$ (Lan-C-1), 169.31 (Lan-C-7), 155.76 (Fmoc-CO), 143.73 und 143.69 (Fmoc-C-8a/9a), 141.25 (Fmoc-C-4a/4b), 131.19 (Allyl-C-2), 127.68 (Fmoc-C-3/6), 127.05 (Fmoc-C-2/7), 125.11 (Fmoc-C-1/8), 119.94 (Fmoc-C-4/5), 119.29 (Allyl-C-3), 83.10 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.28 und 67.18 (Fmoc-CH₂-O), 66.44 (Allyl-C-1), 54.36 (Lan-C-2), 53.91 (Lan-C-6), 47.03 (Fmoc-C-9), 35.91 (Lan-C-3), 35.77 (Lan-C-4), 27.93(*tert.*-Butyl-CH₃) ppm.

5.4.6.4 *N*²,*N*⁶-Bis-(Fmoc)-(2*S*,6*S*)-lanthionin-*O*⁷-allyl-*O*¹-*tert.*-butyldiester (63d)

Eingesetzt: N-Fmoc-(*S*)-cysteinallylester (**62b**; 350 mg; 0,91 mmol) und 3-Brom-N-Fmoc-(*S*)-alanin-*tert.*-butylester (**59b**; 448 mg; 1,00 mmol), 5 % DIEA/DMF (8 ml).

Ausbeute: 383 mg (56 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: R_F(I) = 0,14.

ES-MS: $m/z = 771,3$ [M+Na]⁺; 787,2 [M+K]⁺.

FT-ICR-MS: $m/z = 771,2704620$ [M+Na]⁺ (C₄₃H₄₄N₂O₈SNa = 771,2710582)

$\Delta = 0,8$ ppm.

GC-MS: 0,1 % RR; 4,0 % Meso; 95,9 % SS.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.74$ (d, 4H), 7.58 (d, 4H), 7.38 (t-like, 4H), 7.29 (t-like, 4H), 5.89 (m, 1H), 5.77 (d, 1H), 5.69 (d, 1H), 5.33 (d, 1H), 5.24 (d, 1H), 4.65 (m, 3H), 4.49 (m, 1H), 4.38 (m, 4H), 4.21 (t, 2H), 3.02 (m, 4H), 1.48 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 170.17 (Lan-C-1), 169.38 (Lan-C-7), 155.75 (Fmoc-CO), 143.76 und 143.68 (Fmoc-C-8a/9a), 141.24 (Fmoc-C-4a/4b), 131.20 (Allyl-C-2), 127.68 (Fmoc-C-3/6), 127.03 (Fmoc-C-2/7), 125.09 (Fmoc-C-1/8), 119.94 (Fmoc-C-4/5), 119.31 (Allyl-C-3), 83.12 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.24 und 67.12 (Fmoc-CH₂-O), 66.47 (Allyl-C-1), 54.30 (Lan-C-2), 53.82 (Lan-C-6), 47.03 (Fmoc-C-9), 35.53 (Lan-C-3), 35.37 (Lan-C-4), 27.94 (*tert.*-Butyl-CH₃) ppm.

5.4.7 Abspaltung O-*tert.*-Butyl-Carboxyschutzgruppe (Allgemeine Vorschrift)

Das betreffende Lanthionin wurde in reiner TFA gelöst und die Lösung 1 h bei RT gerührt. Die TFA wurde anschließend am Vakuum entfernt und der Rückstand aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) lyophilisiert.

5.4.7.1 N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin-O¹-allylmonoester (64a)

Eingesetzt: N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin-O⁷-allyl-O¹-*tert.*-butyldiester (63a; 3,00 g; 4,01 mmol); TFA (15 ml).

Ausbeute: 2,78 g (100 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: R_F(I) = 0,00.

ES-MS: m/z = 715,1 [M+Na]⁺.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): δ = 7.72 (d, 4H), 7.54 (d, 4H), 7.36 (t-like, 4H), 7.27 (t-like, 4H), 5.85 (m, 1H), 5.81 (d, 1H), 5.31 (d, 1H), 5.23 (d, 1H), 4.64 (m, 3H), 4.49 (s br., 1H), 4.37 (m, 4H), 4.19 (t, 2H), 3.05 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 173.34 (Lan-C-7), 170.25 (Lan-C-1), 156.11 (Fmoc-CO), 143.58 (Fmoc-C-8a/9a), 141.23 (Fmoc-C-4a/4b), 131.10 (Allyl-C-2), 127.71 (Fmoc-C-3/6), 127.07 (Fmoc-C-2/7), 125.07 (Fmoc-C-1/8), 119.96 (Fmoc-C-4/5), 119.43 (Allyl-C-3), 67.43 und 67.33 (Fmoc-CH₂-O), 66.59 (Allyl-C-1), 53.75 (Lan-C-6), 53.51 (Lan-C-2), 46.99 und 46.93 (Fmoc-C-9), 35.16 (Lan-C-4), 34.80 (Lan-C-3) ppm.

5.4.7.2 N^2,N^6 -Bis-(Fmoc)-(2S,6R)-lanthionin-O¹-allylmonoester (64b)

Eingesetzt: N^2,N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6S)-lanthionin-O⁷-allyl-O¹-*tert.*-butyldiester (**63b**;
420 mg, 0,56 mmol), TFA (5 ml).

Ausbeute: 389 mg (100 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: $R_F(I) = 0,00$.

ES-MS: $m/z = 715,1 [M+Na]^+$.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.73$ (d, 4H), 7.57 (d, 4H), 7.37 (t-like, 4H), 7.27 (t-like, 4H), 5.86 (m, 2H), 5.30 (d, 1H), 5.22 (d, 1H), 4.63 (m, 3H), 4.53 (s br., 1H), 4.38 (m, 4H), 4.20 (t, 2H), 2.99 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.98$ (Lan-C-7), 170.22 (Lan-C-1), 156.00 (Fmoc-CO), 143.61 (Fmoc-C-8a/9a), 141.22 (Fmoc-C-4a/4b), 131.13 (Allyl-C-2), 127.70 (Fmoc-C-3/6), 127.06 (Fmoc-C-2/7), 125.08 (Fmoc-C-1/8), 119.94 (Fmoc-C-4/5), 119.32 (Allyl-C-3), 67.38 und 67.31 (Fmoc-CH₂-O), 66.53 (Allyl-C-1), 54.02 (Lan-C-6), 53.56 (Lan-C-2), 46.99 und 46.95 (Fmoc-C-9), 35.44 (Lan-C-4), 35.35 (Lan-C-3) ppm.

5.4.7.3 N^2,N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6S)-lanthionin-O¹-allylmonoester (64c)

Eingesetzt: N^2,N^6 -Bis-(Fmoc)-(2S,6R)-lanthionin-O⁷-allyl-O¹-*tert.*-butyldiester (**63c**;
394 mg, 0,53 mmol), TFA (5 ml).

Ausbeute: 365 mg (100 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: $R_F(I) = 0,00$.

ES-MS: $m/z = 715,1 [M+Na]^+$.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.73$ (d, 4H), 7.57 (d, 4H), 7.36 (t-like, 4H), 7.27 (t-like, 4H), 5.87 (m, 2H), 5.30 (d, 1H), 5.22 (d, 1H), 4.62 (m, 3H), 4.52 (s br., 1H), 4.38 (m, 4H), 4.20 (t, 2H), 2.97 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 173.04 (Lan-C-7), 170.22 (Lan-C-1), 156.03 (Fmoc-CO), 143.60 (Fmoc-C-8a/9a), 141.25 (Fmoc-C-4a/4b), 131.12 (Allyl-C-2), 127.71 (Fmoc-C-3/6), 127.07 (Fmoc-C-2/7), 125.08 (Fmoc-C-1/8), 119.96 (Fmoc-C-4/5), 119.37 (Allyl-C-3), 67.39 und 67.34 (Fmoc-CH₂-O), 66.57 (Allyl-C-1), 54.04 (Lan-C-6), 53.54 (Lan-C-2), 47.00 und 46.96 (Fmoc-C-9), 35.46 (Lan-C-4), 35.37 (Lan-C-3) ppm.

5.4.7.4 **N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2S,6S)-lanthionin-O¹-allylmonoester (64d)**

Eingesetzt: N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2S,6S)-lanthionin-O⁷-allyl-O¹-tert.-butyldiester (**63d**; 383 mg, 0,51 mmol), TFA (5 ml).

Ausbeute: 354 mg (100 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: R_F(I) = 0,00.

ES-MS: m/z = 715,1 [M+Na]⁺.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): δ = 7.72 (d, 4H), 7.56 (d, 4H), 7.36 (t-like, 4H), 7.27 (t-like, 4H), 5.85 (m, 1H), 5.82 (d, 1H), 5.31 (d, 1H), 5.23 (d, 1H), 4.63 (m, 3H), 4.49 (s br., 1H), 4.37 (m, 4H), 4.19 (t, 2H), 3.01 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 173.02 (Lan-C-7), 170.25 (Lan-C-1), 156.06 (Fmoc-CO), 143.62 (Fmoc-C-8a/9a), 141.24 (Fmoc-C-4a/4b), 131.13 (Allyl-C-2), 127.71 (Fmoc-C-3/6), 127.07 (Fmoc-C-2/7), 125.08 (Fmoc-C-1/8), 119.96 (Fmoc-C-4/5), 119.40 (Allyl-C-3), 67.41 und 67.31 (Fmoc-CH₂-O), 66.58 (Allyl-C-1), 53.80 (Lan-C-6), 53.54 (Lan-C-2), 47.01 und 46.95 (Fmoc-C-9), 35.13 (Lan-C-4), 34.86 (Lan-C-3) ppm.

5.4.8 **N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin-O¹-tert.-butylmonoester (70)**

63a (3,00 g; 4,01 mmol) wurde unter Argon in DCM (50 ml) gelöst. Der Lösung wurde Morpholin (454 μ l; 5,21 mmol) und Pd(PPh₃)₄ (100 mg; 0,09 mmol) zugegeben, die Mischung vor Lichteinfall geschützt und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Hexan/Ethylacetat/ Essigsäure 8:4:1) gereinigt.

Ausbeute: 2,58 g (91 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: $R_F(\text{I}) = 0,00$; $R_F(\text{IV}) = 0,11$.

ES-MS: $m/z = 731,4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $1439,5$ $[2\text{M}+\text{Na}]^+$; $707,1$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; $1415,2$ $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.72$ (d, 4H), 7.56 (d, 4H), 7.36 (t-like, 4H), 7.27 (t-like, 4H), 5.92 (d, 1H), 5.80 (d, 1H), 4.62 (q-like, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.35 (t-like, 4H), 4.18 (t, 2H), 3.05 (m, 4H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.39$ (Lan-C-7), 169.56 (Lan-C-1), 156.01 (Fmoc-CO), 143.66 (Fmoc-C-3/6), 141.21 (Fmoc-C-4a/4b), 127.67 (Fmoc-C-3/6), 127.04 (Fmoc-C-2/7), 125.11 (Fmoc-C-1/8), 119.91 (Fmoc-C-4/5), 83.23 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.32 und 67.28 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 54.22 (Lan-C-6), 53.51 (Lan-C-2), 46.99 und 46.96 (Fmoc-C-9), 35.25 (Lan-C-4), 34.91 (Lan-C-3), 27.92 (*tert.*-Butyl- CH_3) ppm.

5.4.9 N^2, N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin- N^7 -hexadecylamid- O^1 -*tert.*-butylester (71)

70 (2,60 g; 3,67 mmol), HOBT (562 mg; 3,67 mmol) und DIC (568 μl ; 3,67 mmol) wurden in DCM/DMF (5:2; 20 ml) gelöst und die Mischung 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus Hexadecylamin (974 mg; 4,03 mmol) in DCM/DMF (5:2; 20 ml) zutropft und die Mischung weitere 6 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an einer Kieselgelsäule (Hexan/Ethylacetat 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2,35 g (69 %) kristalline farblose Verbindung.

DC: $R_F(\text{II}) = 0,23$.

ES-MS: $m/z = 467,2$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$; $954,6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.72$ (t-like, 4H), 7.54 (m, 4H), 7.36 (q-like, 4H), 7.26 (m, 4H), 6.47 (s br., 1H), 5.94 (s br., 1H), 5.91 (s br. 1H), 4.54 (s br., 1H), 4.37 (m, 5H), 4.20 (t, 1H), 4.14 (t, 1H), 3.21 (m, 2H), 2.93 (m, 4H), 1.48 (m, 11H), 1.22 (m, 26H), 0.87 (t, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.13$ (Lan-C-1), 169.65 (Lan-C-7), 156.22 und 156.08 (Fmoc-CO), 143.76 und 143.62 (Fmoc-C-8a/9a), 141.21 (Fmoc-C-4a/4b), 127.67 (Fmoc-C-3/6), 127.02 (Fmoc-C-2/7), 125.08 und 125.01 (Fmoc-C-1/8), 119.93 (Fmoc-C-4/5), 83.08 (*tert.*-Butyl-C-q), 67.29 und 67.18 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 54.64 (Lan-C-2), 54.52 (Lan-C-6), 46.97 (Fmoc-C-9), 39.77 (Hda-C-1), 36.15 und 35.67 (Lan-C-3/5), 31.88 (Had- CH_2), 29.66 (Had- CH_2), 29.61 (Hda- CH_2), 29.56 (Hda- CH_2), 29.50 (Hda- CH_2), 29.38 (Hda- CH_2), 29.32 (Hda- CH_2), 29.21 (Hda- CH_2), 27.95 (*tert.*-Butyl- CH_3), 26.86 (Hda- CH_2), 22.65 (Hda- CH_2), 14.09 (Hda- CH_3) ppm.

5.4.10 N^2, N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin- N^7 -hexadecylamid (72)

71 (1,15 g, 1,23 mmol) wurde in reiner TFA (11,5 ml) gelöst und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die TFA am Vakuum entfernt und der Rückstand aus *tert.* Butylalkohol/ H_2O 4:1 lyophilisiert.

Ausbeute: 1,08 g (100%) farbloses amorphes Pulver.

DC: $R_{\text{F}}(\text{II}) = 0,00$.

ES-MS: $m/z = 898,2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

^1H -NMR (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.71$ (d, 4H), 7.53 (d, 4H), 7.35 (t-like, 4H), 7.25 (m, 4H), 6.80 (s br., 1H), 6.22 (d, 1H), 6.05 (d, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.16 (s br. 2H), 2.93 (m, 4H), 1.41 (s br., 2H), 1.28 (m, 26H), 0.87 (t, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.44$ (Lan-C-1), 170.26 (Lan-C-7), 156.64 (Fmoc-CO), 143.69 und 143.46 (Fmoc-C-8a/9a), 141.22 (Fmoc-C-4a/4b), 127.75 (Fmoc-C-3/6), 127.08 (Fmoc-C-2/7), 125.03 (Fmoc-C-1/8), 119.96 (Fmoc-C-4/5), 67.55 und 67.47 (Fmoc- $\text{CH}_2\text{-O}$), 46.95 und 46.91 (Fmoc-C-9), 39.97 (Hda-C-1), 36.57 und 36.45 (Lan-C-3/5), 31.90 (Hda- CH_2), 29.69 (Hda- CH_2), 29.64 (Hda- CH_2), 29.58 (Hda- CH_2), 29.53 (Hda- CH_2), 29.35 (Hda- CH_2), 29.21 (Hda- CH_2), 26.83 (Hda- CH_2), 22.67 (Hda- CH_2), 14.11 (Hda- CH_3) ppm.

5.4.11 N²,N⁶-Bis-(Palmitoyl)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-Hexadecylamid-O¹- tert.-butylester (73)

Eine Lösung aus Palmitinsäure (1,11 g; 4,34 mmol), HOBT (665 mg, 4,34 mmol) und DIC (672 μ l, 4,34 mmol) in DCM/DMF (5:2, 70 ml) wurde 2 h bei RT gerührt. Zeitgleich wurde **71** (1,15 g; 1,23 mmol) 2 h bei RT mit einer Piperidin/DMF-Mischung (1:1; 30 ml) behandelt. Anschließend wurde die Piperidin/DMF-Mischung am Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM/DMF (5:2; 49 ml) aufgenommen und tropfenweise zu der voraktivierten Palmitinsäurelösung gegeben.

Die Mischung wurde für weitere 16 h bei RT gerührt und die Lösungsmittel anschließend am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CHCl₃ aufgenommen und je dreimal mit einer 10 % Na₂CO₃ und einer ges. NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CHCl₃/MeOH (1:6) aufgenommen und das Produkt bei -20°C gefällt.

Ausbeute: 752 mg (63 %) farblose kristalline Verbindung.

DC: R_F(I) = 0,16; R_F(V) = 0,83; R_F(VI) = 0,72.

ES-MS: m/z = 986,7 [M+Na]⁺; 998,7 [M+Cl]⁻.

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): δ = 6.86 (m, 1H), 6.76 (m, 1H), 6.61 (d, 1H), 4.74 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 3.21 (d, 2H), 2.92 (m, 4H), 2.21 (m, 4H), 1.60 (m, 4H), 1.47 (s br., 11H), 1.16 (m, 74H), 0.86 (t, 9H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 173.85 und 173.64 (Pam-CO), 170.22 (Lan-C-1), 169.90 (Lan-C-7), 82.84 (tert.-Butyl-C-q), 52.96 (Lan-C-6), 52.93 (Lan-C-2), 39.73 (Hda-C-1), 36.48 und 36.38 (Pam-C-2), 35.05 (Lan-C-5), 34.09 (Lan-C-3), 31.90 (Alk-CH₂), 29.69 (Alk-CH₂), 29.66 (Alk-CH₂), 29.55 (Alk-CH₂), 29.39 (Alk-CH₂), 29.35 (Alk-CH₂), 29.29 (Alk-CH₂), 29.22 (Alk-CH₂), 29.03 (Alk-CH₂), 28.02 (Alk-CH₂), 26.90 (Alk-CH₂), 25.66 (Alk-CH₂), 25.60 (Alk-CH₂), 25.37 (Alk-CH₂), 24.19 (Alk-CH₂), 23.21 (Alk-CH₂), 22.67 (Alk-CH₂), 14.11 (Hda- und Pam-CH₃) ppm.

5.4.12 N²,N⁶-Bis-(Palmitoyl)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-Hexadecylamid (74)

73 (752 mg; 0,78 mmol) wurde in reiner TFA (10 ml) gelöst und die Lösung 1 h bei RT gerührt. Die TFA wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand aus *tert.* Butylalkohol/H₂O (4:1) lyophilisiert.

Ausbeute: 708 mg (100 %) farbloses amorphes Pulver.

DC: R_F(V) = 0,40; R_F(VI) = 0,00.

ES-MS: $m/z = 906,8$ [M-H]⁻; $930,7$ [M+Na]⁺.

FT-ICR-MS: $m/z = 930,76619$ [M+Na]⁺ (C₅₄H₁₀₅N₃O₅SNa = 930,76672)
 $\Delta = 0,57$ ppm.

GC-MS: 91,1 % RR; 8,0 % Meso; 0,9 % SS.

¹H-NMR (600.13 MHz, CDCl₃, 323 K): $\delta = 7.19$ (m, 1H), 6.87 (d, 1H), 6.72 (d, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.87 (q-like, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.00 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 2.27 (m, 4H), 1.64 (m, 4H), 1.54 (m, 2H), 1.31 (m, 74H), 0.88 (t, 9H) ppm.

¹³C-NMR (150.90 MHz, CDCl₃, 323 K): $\delta = 174.76$ und 174.40 (Pam-CO), 171.66 (Lan-C-1), 169.83 (Lan-C-7), 53.78 (Lan-C-6), 53.70 (Lan-C-3), 39.93 (Hda-C-1), 39.45 (Lan-C-5), 38.43 (Lan-C-3), 36.62 und 36.41 (Pam-C-2), 31.94 (Alk-CH₂), 29.72 (Alk-CH₂), 29.67 (Alk-CH₂), 29.63 (Alk-CH₂), 29.60 (Alk-CH₂), 29.54 (Hda-C-2), 29.50 (Alk-CH₂), 29.39 (Alk-CH₂), 29.35 (Alk-CH₂), 29.32 (Alk-CH₂), 29.28 (Alk-CH₂), 29.23 (Alk-CH₂), 26.95 (Alk-CH₂), 25.60 und 25.57 (Pam-C-3), 22.67 (Alk-CH₂), 14.02 (Hda- und Pam-CH₃) ppm.

C₅₄H₁₀₅N₃O₅S (M.W. = 908,52): theoret. C 71,39 %; H 11,65 %; N 4,63 %; S 3,53 %
gef. C 71,29 %; H 11,40 %; N 4,55 %; S 3,50 %

5.4.13 Spaltung harzgebundener Fmoc-Schutzgruppen (Allgemeine Vorschrift)

Das Harz wurde bei RT zweimal 20 min mit einer Mischung aus 20 % Piperdin in DMF behandelt. Das Lösungsmittel wurde durch Filtration entfernt, das Harz je dreimal mit DMF/DCM/MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet.

5.4.14 Abspalten der Produkte vom Rink-Amid-Harz (Allgemeine Vorschrift)

Eine Suspension des Harzes in TFA/H₂O (95:5) wurde 3 h bei RT durchmischt. Nach Entfernen des Harzes durch Filtration wurde die TFA am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.

5.4.15 DIC/HOBT Kupplung von Aminosäuren (Allgemeine Vorschrift)

Eine Lösung aus 3 eq Aminosäure (AS), 3 eq HOBT und 3 eq DIC in DCM/DMF (8:1) wurde 1 h bei RT gerührt, anschließend auf das trockene, Fmoc-entschützte Harz gegeben und die Suspension 8 h bei RT durchmischt. Danach wurde das Lösungsmittel durch Filtration entfernt, das Harz je dreimal mit DMF/DCM/MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet. Nach jedem Kupplungsschritt wurde die Vollständigkeit der Kupplung durch Kaiser-Test überprüft. Bei einer unvollständigen Kupplung wurde das oben beschriebene Protokoll wiederholt. Für die HPLC- und ES-MS-Analytik wurden nach jedem Reaktionsschritt eine Harzprobe (1-2 mg) entnommen und das Produkt mit der oben beschriebenen Methode vom Harz gespalten.

5.4.15.1 *N*-Fmoc-L-Lys(Boc)-RAM-Harz

Eingesetzt: Rink-Amid-Harz (3,00 g; 2,22 mmol), *N*-Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (3,12 g; 6,66 mmol), HOBT (1,02 g; 6,66 mmol), DIC (1031 μ l; 6,66 mmol).

HPLC: >99 %.

ES-MS: $m/z = 368,2$ [M+H]⁺; $380,2$ [M+Na]⁺.

5.4.15.2 *N*-Fmoc-[L-Lys(Boc)]₂-RAM-Harz

Eingesetzt: *N*-Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (3,12 g; 6,66 mmol); HOBT (1,02 g; 6,66 mmol); DIC (1031 μ l; 6,66 mmol).

HPLC: >99 %.

ES-MS: $m/z = 496,3$ [M+H]⁺.

5.4.15.3 *N-Fmoc-[L-Lys(Boc)]₃-RAM-Harz*

Eingesetzt: N-Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (3,12 g; 6,66 mmol); HOBT (1,02 g; 6,66 mmol);
DIC (1031 μ l; 6,66 mmol).

HPLC: >99 %.

ES-MS: $m/z = 624,6$ [M+H]⁺.

5.4.15.4 *N-Fmoc-[L-Lys(Boc)]₄-RAM-Harz*

Eingesetzt: N-Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (3,12 g; 6,66 mmol); HOBT (1,02 g; 6,66 mmol);
DIC (1031 μ l; 6,66 mmol).

HPLC: >99 %.

ES-MS: $m/z = 376,9$ [(M+2H)/2]⁺; 752,4 [M+H]⁺.

5.4.15.5 *N-Fmoc-L-Ser^t(Bu)-[L-Lys(Boc)]₄-RAM-Harz (Fmoc-SK₄-Harz)*

Eingesetzt: N-Fmoc-L-Ser(tBu)-OH (2,55 g; 6,66 mmol), HOBT (1,02 g; 6,66 mmol),
DIC (1031 μ l; 6,66 mmol).

HPLC: >99 %.

ES-MS: $m/z = 420,4$ [(M+2H)/2]⁺, 839,4 [M+H]⁺.

5.4.15.6 *(2R,6R)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (84a)*

Eingesetzt: Fmoc-SK₄-Harz (500,00 mg; 208,00 μ mol), **64a** (432,30 mg; 624,00 μ mol),
HOBT (95,55 mg; 624,00 μ mol), DIC (96,62 μ l; 624 μ mol).

HPLC: 96,9 %.

ES-MS: $m/z = 1313,3$ [M+Na]⁺.

MALDI-MS: $m/z = 1291,8$ [M+H]⁺.

5.4.15.7 (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (84b)

Eingesetzt: Fmoc-SK₄-Harz (30,00 mg; 12,48 μmol), **64b** (25,94 mg; 37,44 μmol), HOBT (5,73 mg; 37,44 μmol), DIC (5,80 μl; 37,44 μmol).

HPLC: 90,6 %.

ES-MS: $m/z = 1313,2$ [M+Na]⁺.

MALDI-MS: $m/z = 1291,5$ [M+H]⁺

5.4.15.8 (2S,6R)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (84c)

Eingesetzt: Fmoc-SK₄-Harz (30,00 mg; 12,48 μmol), **64c** (25,94 mg; 37,44 μmol), HOBT (5,73 mg; 37,44 μmol), DIC (5,80 μl; 37,44 μmol).

HPLC: 93,9 %.

ES-MS: $m/z = 1291,3$ [M+H]⁺; $1313,2$ [M+Na]⁺.

MALDI-MS: $m/z = 1291,7$ [M+H]⁺

5.4.15.9 (2S,6S)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (84d)

Eingesetzt: Fmoc-SK₄-Harz (30,00 mg; 12,48 μmol), **64d** (25,94 mg; 37,44 μmol), HOBT (5,73 mg; 37,44 μmol), DIC (5,80 μl; 37,44 μmol).

HPLC: 93,0 %.

ES-MS: $m/z = 1291,3$ [M+H]⁺; $1313,2$ [M+Na]⁺.

MALDI-MS: $m/z = 1291,6$ [M+H]⁺.

5.4.15.10 N-Palmitoyl-S-[2,3-bis-(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (185)

Eingesetzt: Fmoc-SK₄-Harz (30,00 mg; 12,48 μmol), Pam₃Cys-OH (34,09 mg; 37,44 μmol), HOBT (1,91 mg; 37,44 μmol), DIC (1,9 μl, 37,44 μmol).

Ausbeute: 5,15 mg (96,01 %) farbloses amorphes Pulver.

MALDI-MS: 1508,1 [M+H]⁺.

Von einem Teil des Harzes (**184**; 10,95 mg; 3,56 μmol) wurde das Produkt abgespalten. Der Rest wurde für die Oxidation zum Sulfoxid und zum Sulfon verwendet.

5.4.16 Kuppeln des Pam₂LanHda-OH (**74**) auf SK₄-RAM-Harz (**82a**)

1. *Kupplung:* Fmoc-SK₄-Harz (10,00 mg; 4,16 μmol) wurde wie in Abschnitt 5.4.13 beschrieben Fmoc-entschützt. Pam₂LanHda-OH (**74**; 11,34 mg; 12,48 μmol), HOBT (1,91 mg; 12,48 μmol) und DIC (1,93 μl ; 12,480 μmol) wurden bei 45°C in CHCl₃/DMF (8:1) gelöst und nach 1 h Rühren auf SK₄-Harz gegeben. Die Suspension wurde weitere 12 h bei 45°C durchmischt und das Lösungsmittel anschließend durch Filtration abgetrennt. Nach Waschen mit DMF/DCM/MeOH wurde das Harz am Vakuum getrocknet und die 2. Kupplung durchgeführt.

2. *Kupplung:* Auf das getrocknete Harz wurde eine bei 45°C hergestellten Lösung aus 3 eq Pam₂LanHda-OH (**74**; 11,34 mg; 12,48 μmol), 3 eq TBTU (2,75 mg; 12,48 mmol), 3 eq HOBT (1,91 mg; 12,48 μmol) und 3 eq DIEA (2,13 μl ; 12,48 mmol) gegeben und die Suspension bei 45°C durchmischt. Nach 4 h wurden weitere 6 eq DIEA (4,16 μl ; 24,96 μmol) zugegeben. Nach weiteren 2 h wurde das Lösungsmittel durch Filtration entfernt, das Harz wie bereits beschrieben gewaschen und am Vakuum getrocknet.

MALDI-MS: $m/z = 1506,0$ [M+H]⁺.

5.4.17 Kuppeln des Fmoc₂LanHda-OH (**72**) auf SK₄-RAM-Harz (**83**)

Die Kupplung wurde analog der oben aufgeführten Kupplung von Pam₂LanHda-OH (**74**) durchgeführt.

Eingesetzt: Fmoc-SK₄-Harz (100,00 mg; 41,60 μmol), **72** (109,35 mg; 124,80 μmol), HOBT (19,11 mg; 124,80 μmol), DIC (19,32 μl ; 124,80 μmol).

HPLC: 98,0 %.

MALDI-MS: $m/z = 1474,2$ [M+H]⁺.

5.4.18 Spaltung harzgebundener Allylester (Allgemeine Vorschrift)

Unter Argon wurden eine Lösung aus 24 eq Phenylsilan in DCM und eine Lösung aus Pd(PPh₃)₄ in DCM vorbereitet. Die Phenylsilan-Lösung wurde auf das trockene Harz gegeben und die Suspension unter Argon 5 min durchmischt. Nach anschließender Zugabe der Pd(PPh₃)₄ Lösung wurde die Mischung vor Lichteinfall geschützt und für 2 h bei RT unter Argon durchmischt. Danach wurde die Reaktionslösung durch Filtration entfernt, das Harz dreimal 15 min mit einer 0,5 % Natriumdiethyldithiocarbamat*Trihydrat Lösung in DMF gewaschen und nach weiterem, je fünfmaligem Waschen mit DMF/DCM/MeOH am Vakuum getrocknet.

5.4.18.1 (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (90a)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**84a**; 580,00 mg; 202,42 µmol), Phenylsilan (598 µl; 4858,08 µmol), Pd(PPh₃)₄ (58,47 mg; 50,60 µmol).

HPLC: 90,7 %.

ES-MS: $m/z = 1251,5 [M+H]^+$; $1273,3 [M+Na]^+$.

MALDI-MS: $m/z = 1251,1 [M+H]^+$; $1273,1 [M+Na]^+$.

5.4.18.2 (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (90b)

Eingesetzt: (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**84b**; 20,00 mg; 6,98 µmol), Phenylsilan (20,61 µl; 167,52 µmol), Pd(PPh₃)₄ (2,01 mg; 1,75 µmol).

HPLC: 89,3 %.

ES-MS: $m/z = 1251,3 [M+H]^+$; $1273,4 [M+H]^+$.

5.4.18.3 (2S,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (90c)

Eingesetzt: (2S,6R)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**84c**; 20,00 mg; 6,98 µmol), Phenylsilan (20,61 µl; 167,52 µmol), Pd(PPh₃)₄ (2,01 mg; 1,75 µmol).

HPLC: 91,4 %.

ES-MS: $m/z = 1251,8 [M+H]^+$; $1273,9 [M+Na]^+$.

5.4.18.4 (2S,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (90d)

Eingesetzt: (2S,6S)-Fmoc₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**84d**; 20,00 mg; 6,98 μmol), Phenylsilan (20,61 μl; 167,52 μmol), Pd(PPh₃)₄ (2,01 mg; 1,75 μmol).

HPLC: 93,0 %.

ES-MS: $m/z = 1251,7 [M+H]^+$; $1273,8 [M+Na]^+$.

5.4.18.5 N²,N⁶-Bis-(Myristyl)-(2R,6R)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (174)

Eingesetzt: (2R,6R)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**166**; 9 mg; 3,18 μmol), Phenylsilan (9,38 μl; 76,25 μmol), Pd(PPh₃)₄ (0,92 mg; 0,79 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1228,0 [M+H]^+$; $1250,2 [M+Na]^+$; $1272,4 [M-H+2Na]^+$.

5.4.18.6 N²,N⁶-Bis-(Myristyl)-(2R,6S)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (175)

Eingesetzt: (2R,6S)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**167**; 9 mg; 3,18 μmol), Phenylsilan (9,38 μl; 76,25 μmol), Pd(PPh₃)₄ (0,92 mg; 0,79 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1227,9 [M+H]^+$; $1250,1 [M+Na]^+$; $1272,3 [M-H+2Na]^+$.

5.4.18.7 N²,N⁶-Bis-(Myristyl)-(2S,6R)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (176)

Eingesetzt: (2S,6R)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**168**; 9 mg; 3,18 μmol), Phenylsilan (9,38 μl; 76,25 μmol), Pd(PPh₃)₄ (0,92 mg; 0,79 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1228,1 [M+H]^+$; $1250,5 [M+Na]^+$; $1272,6 [M-H+2Na]^+$.

5.4.18.8 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristyl)-(2S,6S)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (177)

Eingesetzt: (2S,6S)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (**169**; 9 mg; 3,18 μmol), Phenylsilan (9,38 μl; 76,25 μmol), Pd(PPh₃)₄ (0,92 mg; 0,79 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1228,4 [M+H]^+$; 1250,5 $[M+Na]^+$; 1272,8 $[M-H+2Na]^+$.

5.4.19 Kuppeln der Fettamine auf Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (Allgemeine Vorschrift)

Das trockene Harz wurde mit einer Mischung aus Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1) versetzt und die Suspension 2 h bei RT durchmischt. Nach beendeter Reaktion wurde das Harz abfiltriert und je einmal mit DCM und DEE gewaschen. Eine Lösung aus 10 eq des Amins und 30 eq DIEA in THF wurde auf das trockene Harz gegeben und die Suspension bei RT für 6 h durchmischt. Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Filtration entfernt, das Harz je dreimal mit DMF/DCM/DEE gewaschen und am Vakuum getrocknet.

Für die Durchführung der Analytik wurde dem Harz eine Probe (1 mg) entnommen und diese vor der Abspaltung des Produkts mit 10 eq Chlorameisensäure-(fluoren-9-ylmethyl)-ester (Fmoc-Cl) in Pyridin/DMF 1:4 behandelt.

5.4.19.1 Kuppeln des Hexylamins (110)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Hexylamin (9,4 μl; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 96,0 %.

MALDI-MS: $m/z = 1334,6 [M+H]^+$; 1356,8 $[M+Na]^+$.

5.4.19.2 Kuppeln des Octylamins (112)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Octylamin (11,8 μl; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 92,6 %.

MALDI-MS: $m/z = 1362,6 [M+H]^+$; $1384,8 [M+Na]^+$.

5.4.19.3 Kuppeln des Decylamins (113)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Decylamin (14,1 μl; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 96,0 %.

MALDI-MS: $m/z = 1390,5 [M+H]^+$; $1412,6 [M+Na]^+$.

5.4.19.4 Kuppeln des Dodecylamins (114)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Dodecylamin (13,20 mg; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 95,7 %.

MALDI-MS: $m/z = 1418,8 [M+H]^+$; $1441,2 [M+Na]^+$.

5.4.19.5 Kuppeln des Tetradecylamins (115)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Tetradecylamin (15,19 mg; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 92,4 %.

MALDI-MS: $m/z = 1446,4 [M+H]^+$; $1468,6 [M+Na]^+$.

5.4.19.6 Kuppeln des Hexadecylamins auf (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (116)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 300,00 mg; 106,80 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 1200 μl), Hexadecylamin (257,88 mg; 1,07 mmol), DIEA (548,50 μl; 3,20 mmol)

HPLC: 93,9 %.

MALDI-MS: $m/z = 1474,6 [M+H]^+$; $1496,7 [M+Na]^+$.

5.4.19.7 Kuppeln des Hexadecylamins auf (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (145)

Eingesetzt: (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90b**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Hexadecylamin (17,19 mg; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 88,7 %

MALDI-MS: $m/z = 1474,9 [M+H]^+$.

5.4.19.8 Kuppeln des Hexadecylamins auf (2S,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (146)

Eingesetzt: (2S,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90c**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Hexadecylamin (17,19 mg; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 90,0 %

MALDI-MS: $m/z = 1475,1 [M+H]^+$.

5.4.19.9 Kuppeln des Hexadecylamins auf (2S,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (147)

Eingesetzt: (2S,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90d**; 20,00 mg; 7,12 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Hexadecylamin (17,19 mg; 71,20 μmol), DIEA (36,6 μl; 214,60 μmol).

HPLC: 92,5 %

MALDI-MS: $m/z = 1474,9 [M+H]^+$.

5.4.19.10 Kuppeln des Octadecylamins (117)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 30,00 mg; 10,68 μmol), Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl), Octadecylamin (28,78 mg; 106,80 μmol), DIEA (54,85 μl; 320,04 μmol).

HPLC: 97,9 %

MALDI-MS: $m/z = 1502,8 [M+H]^+$; $1524,9 [M+Na]^+$.

5.4.20 Veresterung von Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz mit Methanol (Allgemeine Vorschrift)

Das jeweilige Harz wurde bei RT 2 h mit einer Mischung auf Pyridin/DMF/PfpOTFA 3:2:1 behandelt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung durch Filtration vom Harz getrennt und das Harz je einmal mit DCM und DEE gewaschen. Das gewaschene Harz wurde danach mit einer Mischung aus Methanol/DCM/DIEA 1:1:1 versetzt und die Suspension bei RT 2 h durchmischt. Das Harz wurde dann je dreimal mit DMF/DCM/MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet.

Für die Durchführung der Analytik wurde 1 mg des Harzes entnommen, mit der in 5.4.13 beschriebenen Methode Fmoc-entschützt, mit DMF/Essigsäureanhydrid//DIEA (8:2:1 ; 880 μl) gekappt und analog 5.4.14 das Produkt vom Harz gespalten.

5.4.20.1 (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (148)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90a**; 10,00 mg; 3,56 μmol); Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl); Methanol/DCM/DIEA (1:1:1; 300 μl).

ES-MS: 905,5 [M+H]⁺; 927,4 [M+Na]⁺.

5.4.20.2 (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (149)

Eingesetzt: (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90b**; 10,00 mg; 3,56 μmol); Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl); Methanol/DCM/DIEA (1:1:1; 300 μl).

ES-MS: 905,5 [M+H]⁺; 927,4 [M+Na]⁺.

5.4.20.3 (2S,6R)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (150)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90c**; 10,00 mg; 3,56 μmol); Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl); Methanol/DCM/DIEA (1:1:1; 300 μl).

ES-MS: 905,5 [M+H]⁺; 927,4 [M+Na]⁺.

5.4.20.4 (2S,6S)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (151)

Eingesetzt: (2S,6S)-Fmoc₂Lan(OH)-SK₄-Harz (**90d**; 10,00 mg; 3,56 μmol); Pyridin/DMF/PfpOTFA (3:2:1; 300 μl); Methanol/DCM/DIEA (1:1:1; 300 μl).

ES-MS: 905,5 [M+H]⁺; 927,4 [M+Na]⁺.

5.4.21 Fmoc-Schutz harzgebundener Aminfunktionen (Allgemeine Vorschrift)

Die betreffenden Harze wurden 2 h mit einer Mischung aus 10 eq Fmoc-Cl in Pyridin/DMF (1:4) behandelt. Nach beendeter Reaktion wurde das Harz je dreimal mit DMF/DCM/MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet.

5.4.21.1 Fmoc-Schutz der Harze 110 - 115 und 145 - 147

Eingesetzt: Fmoc-Cl (36,83 mg; 71,20 μ mol), Pyridin/DMF (1:4; 1,00 ml).

5.4.21.2 Fmoc-Schutz des Harzes 116

Eingesetzt: Fmoc-Cl (552,58 mg; 1,07 mmol), Pyridin/DMF (1:4; 3,00 ml).

5.4.21.3 Fmoc-Schutz des Harzes 117

Eingesetzt: Fmoc-Cl (55,26 mg; 106,80 μ mol), Pyridin/DMF (1:4; 1,00 ml)

5.4.22 Kupplung der Fettsäuren (Allgemeine Vorschrift)

Analog der Vorschrift für die Kupplung der Aminosäuren wurden 3 eq der jeweiligen Fettsäure zusammen mit 3 eq HOBT und 3 eq DIC in DCM/DMF 8:1 gelöst. Die Mischung wurde unter Rühren 1 h bei RT voraktiviert und anschließend auf das Fmoc-entschützte Harz gegeben. Nach 8 h bei RT wurden die Lösungsmittel durch Filtration entfernt, das Harz je dreimal mit DMF/DCM/MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet.

Soweit nicht anders angegeben wurden die Verbindungen anschließend analog dem in 5.4.14 angegebenen Protokoll abgespalten, dreimal lyophilisiert und für die Testungen verwendet.

5.4.22.1 *N*²,*N*⁶-Bis-(Capronoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysineamide (131)

Eingesetzt: Harz **116** (10,82 mg; 3,56 μmol), Capronsäure (2,7 μl; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1225,4 [M+H]^+$.

5.4.22.2 *N*²,*N*⁶-Bis-(Caproyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysineamide (132)

Eingesetzt: Harz **116** (10,82 mg; 3,56 μmol), Caprylsäure (3,4 μl; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1281,6 [M+H]^+$; $1304,0 [M+Na]^+$.

5.4.22.3 *N*²,*N*⁶-Bis-(Caprinoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysineamide (133)

Eingesetzt: Harz **116** (10,82 mg; 3,56 μmol), Caprinsäure (3,68 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1338,4 [M+H]^+$.

5.4.22.4 *N*²,*N*⁶-Bis-(Lauroyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysineamide (134)

Eingesetzt: Harz **116** (10,82 mg; 3,56 μmol), Laurinsäure (4,28 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1394,0 [M+H]^+$; $1416,4 [M+Na]^+$.

5.4.22.5 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (135)

Eingesetzt: Harz **116** (32,46 mg; 10,68 μmol), Myristinsäure (14,64 mg; 64,08 μmol), HOBT (9,81 mg; 64,08 μmol), DIC (9,9 μl; 64,08 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1450,5 [M+H]^+$; $1472,7 [M+Na]^+$.

FT-ICR-MS: $m/z = 726,07868 [(M+2H)/2]^+$ ($[C_{77}H_{151}N_{13}O_{10}S+H^+] = 1451,15004$;
 $[(C_{77}H_{151}N_{13}O_{10}S+2H)/2]^+ = 726,07844$) $\Delta = 0,28$ ppm.

GC-MS: 85,44 % RR; 13,95 % Meso; 0,61 % SS.

Nur ein Drittel des Harzes (10,76 mg; 3,56 μmol) wurde abgespalten. Der Rest (Harz **98**) wurde für die jeweiligen Oxidationen zum Sulfoxid bzw. Sulfon eingesetzt.

5.4.22.6 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*S*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (159)

Eingesetzt: Harz **145** (10,82 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1450,4 [M+H]^+$.

5.4.22.7 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*S*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (160)

Eingesetzt: Harz **146** (10,82 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1450,5 [M+H]^+$.

5.4.22.8 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*S*,6*S*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (161)

Eingesetzt: Harz **147** (10,82 mg; 3,56 µmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 µmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 µmol), DIC (3,3 µl; 21,36 µmol).

MALDI-MS: $m/z = 1450,7 [M+H]^+$.

5.4.22.9 *N*²,*N*⁶-Bis-(Palmitoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (136)

Eingesetzt: Harz **116** (32,48 mg; 10,68 µmol), Palmitinsäure (16,44 mg; 64,08 µmol), HOBT (9,81 mg; 64,08 µmol), DIC (9,9 µl; 64,08 µmol).

MALDI-MS: $m/z = 1507,2 [M+H]^+$; $1529,6 [M+Na]^+$.

Nur ein Drittel des Harzes (10,95 mg; 3,56 µmol) wurde abgespalten. Der Rest (Harz **122**) wurde für die jeweiligen Oxidationen zum Sulfoxid bzw. Sulfon eingesetzt.

5.4.22.10 *N*²,*N*⁶-Bis-(Stearoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (137)

Eingesetzt: Harz **116** (10,82 mg; 3,56 µmol), Stearinsäure (6,08 mg; 21,36 µmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 µmol), DIC (3,3 µl; 21,36 µmol).

MALDI-MS: $m/z = 1561,9 [M+H]^+$.

5.4.22.11 *N*²,*N*⁶-Bis-(Arachidoyl)-*N*⁷-hexadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (138)

Eingesetzt: Harz **116** (10,82 mg; 3,56 µmol), Arachidinsäure (6,68 mg; 21,36 µmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 µmol), DIC (3,3 µl; 21,36 µmol).

MALDI-MS: $m/z = 1617,9 [M+H]^+$.

5.4.22.12 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-hexyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (139)

Eingesetzt: Harz 111 (10,32 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1311,1 [M+H]^+$; $1333,4 [M+Na]^+$.

5.4.22.13 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-octyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (140)

Eingesetzt: Harz 112 (10,44 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1339,0 [M+H]^+$; $1361,2 [M+Na]^+$.

5.4.22.14 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-decyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (141)

Eingesetzt: Harz 113 (10,53 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1366,6 [M+H]^+$; $1388,7 [M+Na]^+$.

5.4.22.15 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-dodecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (142)

Eingesetzt: Harz 114 (10,63 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1395,0 [M+H]^+$.

5.4.22.16 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-tetradecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (143)

Eingesetzt: Harz **115** (10,72 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1423,1 [M+H]^+$; $1445,5 [M+Na]^+$.

5.4.22.17 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*N*⁷-octadecyl-(2*R*,6*R*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (144)

Eingesetzt: Harz **117** (10,92 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,88 mg; 21,36 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,36 μmol), DIC (3,3 μl; 21,36 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1479,4 [M+H]^+$; $1501,6 [M+Na]^+$.

5.4.22.18 (2*R*,6*R*)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (166)

Eingesetzt: Harz **84a** (10,00 mg; 3,49 μmol), Myristinsäure (4,78 mg; 20,94 μmol), HOBT (3,21 mg; 20,94 μmol), DIC (3,2 μl; 20,94 μmol).

5.4.22.19 (2*R*,6*S*)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (167)

Eingesetzt: Harz **84b** (10,00 mg; 3,49 μmol), Myristinsäure (4,78 mg; 20,94 μmol), HOBT (3,21 mg; 20,94 μmol), DIC (3,2 μl; 20,94 μmol).

5.4.22.20 (2*S*,6*R*)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (168)

Eingesetzt: Harz **84c** (10,00 mg; 3,49 μmol), Myristinsäure (4,78 mg; 20,94 μmol), HOBT (3,21 mg; 20,94 μmol), DIC (3,2 μl; 20,94 μmol).

5.4.22.21 (2S,6S)-Myr₂Lan(OAll)-SK₄-Harz (169)

Eingesetzt: Harz **84d** (10,00 mg; 3,49 μ mol), Myristinsäure (4,78 mg; 20,94 μ mol), HOBT (3,21 mg; 20,94 μ mol), DIC (3,2 μ l; 20,94 μ mol).

5.4.22.22 N²,N⁶-Bis-(Myristoyl)-O⁷-methyl-(2R,6R)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (162)

Eingesetzt: (2R,6R)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (**148**; 10,08 mg; 3,56 μ mol), Myristinsäure (4,87 mg; 21,35 μ mol), HOBT (3,27 mg; 21,35 μ mol), DIC (3,3 μ l; 21,35 μ mol).

MALDI-MS: $m/z = 1240,9 [M+H]^+$.

5.4.22.23 N²,N⁶-Bis-(Myristoyl)-O⁷-methyl-(2R,6S)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (163)

Eingesetzt: (2R,6S)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (**149**; 10,08 mg; 3,56 μ mol), Myristinsäure (4,87 mg; 21,35 μ mol), HOBT (3,27 mg; 21,35 μ mol), DIC (3,3 μ l; 21,35 μ mol).

MALDI-MS: $m/z = 1241,8 [M+H]^+$.

5.4.22.24 N²,N⁶-Bis-(Myristoyl)-O⁷-methyl-(2S,6R)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (164)

Eingesetzt: (2S,6R)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (**150**; 10,08 mg; 3,56 μ mol), Myristinsäure (4,87 mg; 21,35 μ mol), HOBT (3,27 mg; 21,35 μ mol), DIC (3,3 μ l; 21,35 μ mol).

MALDI-MS: $m/z = 1241,1 [M+H]^+$.

5.4.22.25 *N*²,*N*⁶-Bis-(Myristoyl)-*O*⁷-methyl-(2*S*,6*S*)-lanthionyl-seryl-lysyl-lysyl-lysyl-lysineamide (165)

Eingesetzt: (2*S*,6*S*)-Fmoc₂Lan(OMe)-SK₄-Harz (151; 10,08 mg; 3,56 μmol), Myristinsäure (4,87 mg; 21,35 μmol), HOBT (3,27 mg; 21,35 μmol), DIC (3,3 μl; 21,35 μmol).

MALDI-MS: $m/z = 1241,5 [M+H]^+$.

5.4.23 Oxidation des Schwefels zum Sulfoxid (Allgemeine Vorschrift)

Eine Lösung aus 1 eq Sc(OTf)₃ in DCM/Ethanol (9:1) wurde auf das trockene Harz gegeben. Nach Zugabe von 5 eq H₂O₂ (30 %) wurde die Suspension 40 min bei RT durchmischt. Die Lösungsmittel wurden anschließend durch Filtration entfernt, das Harz je dreimal mit DMF/DCM/MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet.

Die Produkte wurden analog dem in 5.4.14 beschriebenen Verfahren vom Harz gespalten und dreimal lyophilisiert.

5.4.23.1 Oxidation des Myr₂LanHda-SK₄-Harz zum Sulfoxid (180)

Eingesetzt: Harz 98 (10,76 mg; 3,56 μmol), Sc(OTf)₃ (1,76 mg; 3,56 μmol), 30 % H₂O₂ (1,8 μl; 17,81 μmol), DCM/Ethanol (9:1; 500 μl).

Ausbeute: 5,1 mg (97,8 %).

MALDI-MS: $m/z = 1467,2 [M+H]^+$; $1489,1 [M+Na]^+$.

5.4.23.2 Oxidation des Pam₂LanHda-SK₄-Harz zum Sulfoxid (181)

Eingesetzt: Harz 122 (10,95 mg; 3,56 μmol), Sc(OTf)₃ (1,76 mg; 3,56 μmol), 30 % H₂O₂ (1,8 μl; 17,81 μmol), DCM/Ethanol (9:1; 500 μl).

Ausbeute: 5,0 mg (94,8 %).

MALDI-MS: $m/z = 1522,6 [M+H]^+$.

5.4.23.3 Oxidation des Pam₃Cys-SK₄-Harz zum Sulfoxid (186)

Eingesetzt: Harz **184** (10,95 mg; 3,56 μ mol), Sc(OTf)₃ (1,76 mg; 3,56 μ mol), 30 % H₂O₂ (1,8 μ l; 17,81 μ mol), DCM/Ethanol (9:1; 500 μ l).

Ausbeute: 5,0 mg (92,2 %).

MALDI-MS: $m/z = 1524,3 [M+H]^+$.

5.4.24 Oxidation des Schwefels zum Sulfon (Allgemeine Vorschrift)

Eine Lösung aus 5 eq mCPBA in DCM wurde auf das trockene Harz gegeben und die Suspension 48 h bei RT durchmischt. Nach Entfernen der Lösungsmittel durch Filtration wurde das Harz je dreimal mit DMF/DCM/MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet. Die Produkte wurden analog dem in 5.4.14 beschriebenen Verfahren vom Harz gespalten und lyophilisiert.

5.4.24.1 Oxidation des Myr₂LanHda-SK₄-Harz zum Sulfon (182)

Eingesetzt: Harz **98** (10,76 mg; 3,56 μ mol), mCPBA (3,09 mg; 17,81 μ mol) DCM (500 μ l).

Ausbeute: 5,0 mg (94,8 %).

MALDI-MS: 1483,0 $[M+H]^+$; 1505,2 $[M+Na]^+$.

5.4.24.2 Oxidation des Pam₂LanHda-SK₄-Harz zum Sulfon (183)

Eingesetzt: Harz **122** (10,95 mg; 3,56 μ mol), mCPBA (3,09 mg; 17,81 μ mol) DCM (500 μ l).

Ausbeute: 5,2 mg (95,1 %).

MALDI-MS: $m/z = 1538,5 [M+H]^+$.

5.4.24.3 Oxidation des Pam₃Cys-SK₄-Harz zum Sulfon (187)

Eingesetzt: Harz **184** (10,95 mg; 3,56 µmol), mCPBA (3,09 mg; 17,81 µmol) DCM (500 µl).

Ausbeute: 5,4 mg (98,6 %).

MALDI-MS: $m/z = 1540,5 [M+H]^+$.

6 Literatur

1. H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **1996**.
2. G. Jung, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, (Ed.: G. Jung) Wiley-VCH, Weinheim **1996**.
3. G. Jung, *Combinatorial Chemistry - Synthesis, Analysis, Screening*, (Ed.: G. Jung) Wiley-VCH, Weinheim **1999**.
4. R. Merrifield, *J.Am.Chem.Soc.* **1963**, *85*, 2149-2153.
5. S. F. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311.
6. M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J.Am.Chem.Soc.* **1994**, *116*, 1135-1138.
7. G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1992**, *31*, 367-383.
8. K. J. Watkins, *Chem.Engin.News* **2001**, *79*, 11-15.
9. Thern, B., *Dissertation*, Universität Tübingen, **2002**.
10. K. C. Nicolaou, N. F. Mitchell, N. F. Jain, T. Bando, R. Hughes, N. Winssinger, S. Natarajan, A. E. Koumbis, *Chem.Eur.J.* **1999**, *5*, 2648-2667.
11. A. O. Aliprantis, R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, A. Zychlinsky, *Science* **1999**, *285*, 736-739.
12. B. Bunin, J. Ellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1992**, *114*, 10997-10998.
13. F. Balkenhohl, Ch. Von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, Ch. Zechel, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1996**, *35*, 2288-2237.
14. B. A. Bunin, *The Combinatorial Index*, (Ed.: B. A. Bunin) Academic Press, San Diego **1998**.
15. J. Früchtel, G. Jung, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1996**, *35*, 17-42.
16. L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem.Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
17. F. Zaragoza Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Support*, Wiley-VCH, Weinheim **2000**.
18. E. Bayer, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1991**, *30*, 113-119.
19. R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951-8954.

20. B. Gutte, R. B. Merrifield, *J.Biol.Chem.* **1971**, *246*, 1922-1941.
21. M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
22. E. Bayer, *Int.J.Pept.Prot.Res.* **1985**, *25*, 178-186.
23. E. Bayer, W. Rapp, *Chem.Pept.Prot.* **1986**, *3*, 3-8.
24. E. Bayer, *Angew.Chem.* **1991**, *103*, 117-133.
25. P. M. Reddy, M. A. Michael, F. Farooqui, S. Girgis, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5771-5774.
26. P. W. Small, D. C. Sherrington, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1989**, 1589-1591.
27. J. Rademann, M. Meldal, K. Bock, *Chem.Eur.J.* **1999**, *5*, 1218-1225.
28. M. Renil, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6185-6188.
29. E. Atherton, E. Brown, R. C. Sheppard, A. J. Rosevar, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1981**, 1151-1152.
30. A. Dryland, R. C. Sheppard, *J.Chem.Soc.Perk.Trans.I* **1986**, 125-137.
31. M. Meldal, F. I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1994**, 1849-1850.
32. P. M. St.Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J.Am.Chem.Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320.
33. J. Rademann, M. Barth, *Angew.Chem.Int.Ed.* **2002**, *41*, 2975-2978.
34. I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
35. R. S. Feinberg, R. B. Merrifield, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 3209-3212.
36. K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiou, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
37. S.-S. Wang, *J.Am.Chem.Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
38. H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
39. H. Kunz, B. Dombo, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1988**, *27*, 711-713.
40. R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int.J.Pept.Prot.Res.* **1982**, *20*, 451-454.
41. E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1981**, 538-546.
42. C. P. Holmes, D. G. Jones, *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 2318-2319.
43. F. Woolard, J. Paetsch, J. Ellman, *J.Org.Chem.* **1997**, *62*, 6102-6103.

44. B. Backes, J. Ellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1994**, *116*, 11171-11172.
45. B. J. Backes, A. A. Virgilio, J. A. Ellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1996**, *118*, 3055-3056.
46. G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1971**, 636-637.
47. B. R. Stranix, J. P. Gao, R. Barghi, J. Salha, G. D. Darling, *J.Org.Chem.* **1997**, *62*, 8987-8993.
48. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal.Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
49. T. Vojkovsky, *Pept.Res.* **1995**, *8*, 236-237.
50. M. E. Attardi, A. Falchi, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7395-7399.
51. M. E. Attardi, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2927.
52. J. Vázquez, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6691-6693.
53. M. E. Attardi, G. Porcu, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7391-7394.
54. H. Bandel, W. J. Haap, G. Jung, *Combinatorial Chemistry - Synthesis, Analysis, Screening*, (Ed.: G. Jung) Wiley-VCH, Weinheim **1999**, pp. 479-498.
55. W. J. Haap, T. Redemann, J. S. Früchtel, G. Jung, *GIT Special "Prof.Bayer"* **1997**, *4*, 94-97.
56. B. Yan, G. Kumaravel, H. Anjaria, A. Wu, R. C. Petter, C. F. Jewell Jr., J. R. Wareing, *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 5736-5738.
57. B. Yan, J. B. Fell, G. Kumaravel, *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 7467-7472.
58. W. J. Haap, T. B. Walk, G. Jung, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1998**, *37*, 3311-3314.
59. W. J. Haap, T. B. Walk, G. Jung, *Angew.Chem.* **1998**, *110*, 3506-3509.
60. T. Ruhland, K. Anderson, H. Pederson, *J.Org.Chem.* **1998**, *63*, 9204-9211.
61. K. C. Nicolaou, J. pastor, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem.Commun.* **1998**, *63*, 1947-1948.
62. E. Bayer, K. Albert, H. Willisch, W. Rapp, B. Hemmasi, *Macromolecules* **1990**, *23*, 1937-1940.
63. E. Giralt, J. Rizo, E. Pedroso, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 4141-4152.
64. K. Anderson, M. A. Jarema, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, M. J. Ziliox, *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 2650-2651.
65. R. S. Garigipati, B. Adams, J. L. Adams, S. K. Sarkar, *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 2911-2914.
66. P. A. Keifer, L. Baltusis, D. M. Rice, A. A. Tymiak, J. N. Shoolery, *J.Magn.Res.A* **1996**, *119*, 65-75.

67. T. Wehler, J. Westman, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 4771-4774.
68. P. Grice, A. G. Leach, S. V. Leach, A. Massi, D. M. Mynett, *J.Comb.Chem.* **2000**, 2, 491-495.
69. M. Pursch, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, K. Albert, W. Rapp, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1996**, 35, 2867-2868.
70. D. G. Schmid, P. Grosche, H. Bandel, G. Jung, *Biotech.Bioeng.(Combinatorial Chemistry)* **2001**, 71, 149-161.
71. Schmid, D. G., *Dissertation*, Universität Tübingen, **2002**.
72. R. D. Süßmuth, *J.Chromatograph.B, Biomed.Sci.Appl.* **1999**, 725, 49-65.
73. H. Zhang, K. Heinig, J. Henion, *J.Mass.Spectrom.* **2000**, 35, 423-431.
74. M. Bauser, *J.Chromatogr.Sci.* **2002**, 40, 292-296.
75. M. S. Lee, *Practical Spectroscopy* **2002**, 32, 187-210.
76. M. J. Horn, D. B. Jones, S. J. Ringel, *J.Biol.Chem.* **1941**, 138, 141-149.
77. R. D. Süßmuth, R. W. Jack, G. Jung, in *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)*, Vol. E22b *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl)*, (Eds.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo), Thieme, Stuttgart **2003**, pp. 184-213.
78. N. Schnell, K. D. Entian, U. Schneider, F. Gotz, H. Zahner, R. Kellner, G. Jung, *Nature* **1988**, 333, 276-278.
79. G. Jung, *Nisin and Novel Lantibiotics*, (Eds.: G. Jung, H. G. Sahl), ESCOM, Leiden **1991**, pp. 1-34.
80. M. J. Horn, D. B. Jones, *J.Biol.Chem.* **1941**, 139, 473.
81. M. J. Horn, D. B. Jones, S. J. Ringel, *J.Biol.Chem.* **1942**, 144, 87.
82. N. H. Sloane, K. G. Untch, *Biochemistry* **1966**, 5, 2658-2665.
83. P. M. Steinert, W. W. Idler, *Biochemistry* **1979**, 18, 5664-5669.
84. G. J. Bessems, H. J. J. M. Rennen, H. J. Hoenders, *Exp.Eye Res.* **1987**, 44, 691-695.
85. G. Jung, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1991**, 30, 1051-1068.
86. A. M. S. Kamal, Y. Nomura, Y. Ishii, K. Shirai, *J.Am.Leather Chem.As.* **1998**, 93, 272.
87. H. Shinbo, *Comp.Biochem.Physiol.* **1998**, 91, 301.

88. G. Ösapay, L. Prokai, H. S. Kim, K. F. Medzihradzsky, D. H. Coy, G. Liapakis, T. Reisine, G. Melacini, Q. Zhu, S. H. H. Wang, R. H. Mattern, M. Goodman, *J.Med.Chem.* **1997**, *40*, 2241-2251.
89. G. Brown, V. du Vigneaud, *J.Biol.Chem.* **1941**, *138*, 151-154.
90. R. Kuhn, G. Quadbeck, *Ber.Dtsch.Chem.Ges.* **1943**, *76*, 527.
91. A. Schöberl, A. Wagner, *Chem.Ber.* **1947**, *80*, 379.
92. J. M. Probert, D. Rennex, M. Bradley, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1101-1104.
93. I. Photaki, *J.Am.Chem.Soc.* **1963**, *85*, 1123.
94. S. Nomoto, A. Sano, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *6*, 521.
95. M. J. Miller, *J.Org.Chem.* **1980**, *45*, 3131-3132.
96. E. Hardegger, F. Szabo, P. Liechti, C. Rostetter, W. Zankowska-Jasinska, *Helv.Chim.Acta* **1968**, *51*, 78.
97. H. Ogura, O. Sato, K. Takeda, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 4817.
98. M. Matteucci, G. Bhalay, M. Bradley, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1399-1401.
99. D. N. Harpp, J. G. Gleason, *J.Am.Chem.Soc.* **1971**, *93*, 2437-2445.
100. D. N. Harpp, J. G. Gleason, *J.Org.Chem.* **1971**, *36*, 73-80.
101. F. Cavelier-Frontin, J. Daunis, R. Jacquier, *Tetrahedron Asymmetry* **1992**, *3*, 85-94.
102. T. Wakamiya, K. Shimbo, A. Sano, K. Fukase, T. Shiba, *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1983**, *56*, 2049.
103. V. Swali, M. Matteucci, R. Elliot, M. Bradley, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9101-9109.
104. K. Fukase, M. Kitazawa, A. Sano, K. Shimbo, S. Horimoto, H. Fujita, A. Kubo, T. Wakamiya, T. Shiba, *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1992**, *65*, 2227-2240.
105. L. D. Arnold, T. H. Kalantar, J. C. Vederas, *J.Am.Chem.Soc.* **1985**, *107*, 7105.
106. G. Oesepay, G. Melacini, Q. Zhu, L. Tehrani, M. Goodman, *Letters in Peptide Science* **1994**, *1*, 81.
107. H. Shao, S. H. H. Wang, C. W. Lee, G. Ösapay, M. Goodman, *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 2956-2957.
108. K. Nakajima, H. Oda, K. Okawa, *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1983**, *56*, 520.
109. K. Okawa, K. Nakajima, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1811.
110. K. Okawa, K. Nakajima, T. Tanaka, Y. Kawana, *Chem.Lett.* **1975**, 591.

111. K. Nakajima, F. Takai, T. Tanaka, K. Okawa, *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1978**, *51*, 1570.
112. G. Brown, V. du Vigneaud, *J.Biol.Chem.* **1941**, *140*, 767-771.
113. E. Fischer, K. Raske, *Ber.Dtsch.Chem.Ges.* **1907**, *40*, 3717.
114. Benoiton.L., *Can.J.Chem.* **1968**, *46*, 1549.
115. C. Dugave, A. Menez, *Tetrahedron Asymm.* **1997**, *8*, 1453-1465.
116. C. Dugave, A. Menez, *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 6067-6070.
117. L. Jobron, G. Hummel, *Org.Lett.* **2000**, *2*, 2265-2267.
118. S. Gair, R. F. W. Jackson, P. A. Brown, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3059-3062.
119. M. F. M. Mustapa, R. Harris, D. Esposito, N. A. L. Chubb, J. Mould, D. Schultz, P. C. Driscoll, A. B. Tabor, *J.Org.Chem.* **2003**, *68*, 8193-8198.
120. M. F. M. Mustapa, R. Harris, N. Bulic-Subanovic, S. L. Elliott, S. Bregant, M. F. A. Groussier, J. Mould, D. Schultz, N. A. L. Chubb, P. R. J. Gaffney, P. C. Driscoll, A. B. Tabor, *J.Org.Chem.* **2003**, *68*, 8185-8192.
121. C. A. Janeway, Jr., *Immunol.Today* **1992**, *13*, 11-16.
122. C. A. Janeway, Jr., *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **1989**, *54*, 1-13.
123. C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, *Annu.Rev.Immunol.* **2002**, 197-216.
124. Y. Xu, X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. L. Manley, L. Tong, *Nature* **2000**, *408*, 111-115.
125. S. Akira, K. Takeda, *Nature Rev.Immun.* **2004**, *4*, 499-511.
126. J. L. Mitcham, P. Parnet, T. P. Bonnert, K. E. Garka, M. J. Gerhart, J. L. Slack, M. A. Gayle, S. K. Dower, J. E. Sims, *J.Biol.Chem.* **1996**, *271*, 5777-5783.
127. K. A. Fitzgerald, E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, L. A. O'Neill, *Nature* **413**, 78-83.
128. M. Yamamoto, S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, S. Akira, *Nature* **2002**, *420*, 324-329.
129. M. Yamamoto, S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, *Journal of Immunology* **2002**, *169*, 6668-6672.
130. H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, T. Seya, *Nature Immunol.* **2003**, *4*, 1144-1150.

131. D. N. Cook, J. W. I. Hollingsworth, D. A. Schwartz, *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* **2003**, *3*, 523-529.
132. M. Yamamoto, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, S. Akira, *Science* **2003**, *301*, 640-643.
133. K. Hoebe, *Nature* **2003**, *424*, 743-748.
134. H. Oshiumi, *J.Biol.Chem.* **2003**, *278*, 49751-49762.
135. K. A. Fitzgerald, *J.Exp.Med.* **2003**, *198*, 1043-1055.
136. L. H. Bin, L. G. Xu, H. B. Shu, *J.Biol.Chem.* **2003**, *278*, 24526-24532.
137. M. Yamamoto, S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, *Nature Immunol.* **2003**, *4*, 1144-1150.
138. R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway, Jr., *Nature* **1997**, *388*, 394-397.
139. S. T. Qureshi, L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, D. Malo, *J.Exp.Med.* **1999**, *189*, 615-625.
140. A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M.-Y. Liu, C. v. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, Ricciardi-Castagnoli, P. , B. Layton, B. Beutler, *Science* **2002**, *282*, 2085-2088.
141. K. Hoshina, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, K. Takeda, Y. Takeda, S. Akira, *Journal of Immunology* **1999**, *162*, 3749-3752.
142. R. S. Hotchkiss, I. E. Karl, *Science* **2003**, *303*, 1522-1526.
143. A. Ozinsky, D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, A. Aderem, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **2000**, *97*, 13766-13771.
144. K. A. Weyer, W. Schäfer, F. Lottspeich, H. Michel, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2909-2914.
145. A. Herrmann, R. Schlösser, R. Schmid, E. Schneider, *Res.Microbiol.* **1996**, *147*, 733-737.
146. M. J. Gomes-Miguel, I. Moriyon, B. Alonso-Urmeneta, J. I. Riezu-Boj, R. Diaz, *Infekt.Immun.* **1988**, *56*, 716-718.
147. P. F. Mühlrath, M. Kieß, H. Meyer, R. Süßmuth, G. Jung, *J.Exp.Med.* **1997**, *185*, 1951-1958.
148. V. Braun, *Biochim.Biophys.Acta* **1975**, *415*, 335-377.
149. K. Hantke, V. Braun, *Eur.J.Biochem.* **1973**, *34*, 284-296.

150. V. Braun, K. rehn, *Eur.J.Biochem.* **1969**, *10*, 425-438.
151. F. Melchers, V. Braun, C. Galanos, *J.Exp.Med.* **1975**, *142*, 473-482.
152. M. V. Norgard, L. L. Arndt, D. R. Akins, L. L. Curetty, D. A. Harrich, J. D. Radolf, *Infect.Immun.* **1996**, *64*, 3845-3852.
153. M. Kreutz, U. Ackermann, S. Hauschildt, S. W. Krause, D. Riedel, W. Bessler, R. Adreesen, *Immunology* **1997**, *92*, 396-401.
154. K.-H. Wiesmüller, W. Bessler, G. Jung, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* **1983**, *364*, 593-606.
155. W. G. Bessler, M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *J.Immunol.* **1988**, *135*, 1900-1905.
156. P. Hoffmann, S. Heinle, U. F. Schade, H. Lopponow, A. J. Ulmer, H. D. Flad, *Immunobiology* **1988**, *177*, 158-170.
157. R. Seifert, G. Schultz, M. Richter-Freund, J. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Biochem.J.* **1990**, *267*, 795-802.
158. K.-H. Wiesmüller, W. G. Bessler, G. Jung, *Int.J.Pept.Protein Res.* **1992**, *40*, 255-260.
159. F. Wiedemann, R. Link, K. Pumpe, U. Jakobshagen, H. E. Schäfer, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *J.Pathology* **1990**, *164*, 1-7.
160. A. Seth, Y. Yasutomi, H. Jacoby, J. C. Callery, S. M. Kaminsky, W. C. Koff, D. F. Nixon, N. L. Letvin, *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **2000**, *16*, 337-343.
161. J. K. Means, D. T. Golenbock, M. J. Fenton, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2000**, *11*, 219-232.
162. O. Takeuchi, T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, S. Akira, *International Immunology* **2001**, *13*, 933-940.
163. O. Takeuchi, S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Y. Dong, R. L. Modlin, S. Akira, *Journal of Immunology* **2002**, *169*, 10-14.
164. R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494-2499.
165. M. Schnare, G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, R. Medzhitov, *Nature Immunol.* **2001**, *2*, 947-950.
166. K.-F. Bodmann, F. Vogel, *Chemotherapie Journal* **2001**, *10*, 43-56.
167. M. Heinemann, M. Trautmann, *Chemotherapie Journal* **1999**, *8*, 176-182.

168. J. C. Patel, D. D. Banker, J. C. Modi, *Br.Med.J.* **1949**, *41*, 908.
169. G. Meng, M. Rutz, M. Schiemann, J. Metzger, A. Grabiec, R. Schwandner, P. B. Lupp, F. Ebel, D. H. Busch, S. Bauer, H. Wagner, C. J. Kirschning, *J.Clin.Invest.* **2004**, *113*, 1473-1481.
170. C. Zuany-Amorim, J. Hastewell, C. Walker, *Nature Rev.Drug.Disc.* **2002**, *1*, 797-807.
171. R. J. Ulevitch, *Nature Rev.Immun.* **2004**, *4*, 512-520.
172. J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, R. Schaub, W. G. Bessler, G. Jung, *Int.J.Pept.Protein Res.* **1991**, *38*, 545-554.
173. K. J. Jensen, J. Alsina, F. Albericio, M. F. Songster, J. Vagner, G. Barany, *J.Am.Chem.Soc.* **1998**, *120*, 5441-5452.
174. S. W. Kaldor, V. J. Kalish, J. F. Davies, B. V. Shetty, J. E. Fritz, K. Appelt, J. A. Burgess, K. M. Campanale, N. Y. Chirgadze, D. K. Clawson, B. A. Dressman, S. D. Hatch, D. A. Khalil, M. B. Kosa, P. P. Lubbehusen, M. A. Muesing, A. K. Patick, S. H. Reich, K. S. Su, J. H. Tatlock, *J.Med.Chem.* **1997**, *40*, 3979-3985.
175. J. P. Mayer, L. Zhang, S. Groeger, C.-F. Liu, M. A. Jarosinski, *J.Pept.Res.* **1998**, *51*, 432.
176. S. Sinha, P. Ilankumaran, S. Chandrasekaran, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 14769-14776.
177. X. M. Zhu, R. R. Schmidt, *Eur.J.Org.Chem.* **2003**, 4069-4072.
178. Reutter, F., *Dissertation*, Universität Tübingen, **1999**.
179. A. Cotté, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chemistry-A European Journal* **1999**, *5*, 922-936.
180. S. E. Kates, N. A. Solé, C. R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1549.
181. I. R. Marsh, M. Bradley, S. J. Teague, *J.Org.Chem.* **1997**, *62*, 6199-6203.
182. P. Grieco, P. M. Gitu, V. J. Hruby, *J.Pept.Res.* **2001**, *57*, 250-256.
183. D. Vetter, H. W. Tumelty, S. K. Singh, M. A. Gallop, *Angew.Chem.Int.Ed.* **1995**, *34*, 60-63.
184. L. A. Carpino, A. El-Faham, *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.
185. K. Akaji, N. Kuriyama, T. Kimura, Y. Fujiwara, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3177-3180.
186. R. Wischnat, J. Rudolph, R. Hanke, R. Kaese, A. May, H. Theis, U. Zuther, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4393-4394.
187. Welter, M. G., *Dissertation*, Universität Tübingen, **2001**.

188. S. Eleftheriou, D. Gatos, A. Panagopoulos, St. Stathopoulos, K. Barlos, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2825-2828.
189. E. G. Mata, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6335-6338.
190. J. P. Mayer, J. Zhang, S. Groeger, C. F. Liu, M. A. Jarosinski, *J.Pept.Res.* **1998**, *51*, 432-436.
191. A. Bhandari, D. G. Jones, J. R. Schullek, K. Vo, C. A. Schunk, L. L. Tamahana, D. Chen, Z. Yuan, M. C. Needels, M. A. Gallop, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1998**, *8*, 2303.

7 Anhang

7.1 Berechnung der Harzbeladung nach einem Syntheseschritt

Als Beladung eines Harzes wird die Anzahl reaktiver Zentren in Millimol bezogen auf die Masse der Harzportion in Gramm bezeichnet.

Mit B_{vor} als Beladung des Harzes vor dem Syntheseschritt in [mmol/g] und m_{vor} als Masse des Harzes vor der Reaktion in [g] errechnet sich die Anzahl der reaktiven Zentren:

$$n_{\text{vor}} = m_{\text{vor}} B_{\text{vor}} \quad (1)$$

Nach einem Syntheseschritt hat sich (unter Annahme einer quantitativen Umsetzung) die Masse der umgesetzten Harzportion um

$$\Delta m = n_{\text{vor}} \frac{\Delta M}{1000} = m_{\text{vor}} B_{\text{vor}} \frac{M_{\text{nach}} - M_{\text{vor}}}{1000} \quad (2)$$

auf

$$m_{\text{nach}} = m_{\text{vor}} + \Delta m = m_{\text{vor}} + m_{\text{vor}} B_{\text{vor}} \frac{M_{\text{nach}} - M_{\text{vor}}}{1000}$$
$$m_{\text{nach}} = m_{\text{vor}} \left(1 + B_{\text{vor}} \frac{M_{\text{nach}} - M_{\text{vor}}}{1000} \right) \quad (3)$$

geändert. Δm ist hierbei die Massenänderung der Harzportion in [g]; ΔM die Änderung der Molmasse des am Harz immobilisierten Moleküls in [g/mol]. Der Faktor 1000 resultiert aus den unterschiedlichen Dimensionen der Einheiten von Beladung [mmol/g] und Molgewicht [g/mol].

Die Zahl der reaktiven Zentren bleibt konstant, das heißt, die Anzahl an Produktmolekülen nach der Reaktion, n_{nach} , entspricht der Anzahl der eingesetzten Eduktmoleküle n_{vor} . Folglich gilt

$$n_{\text{nach}} = n_{\text{vor}} = \text{const.} \quad (4)$$

Somit ist auch

$$m_{\text{nach}} B_{\text{nach}} = m_{\text{vor}} B_{\text{vor}} \quad (5)$$

Die Beladung des Harzes nach der Reaktion beträgt demnach

$$B_{\text{nach}} = \frac{m_{\text{vor}} B_{\text{vor}}}{m_{\text{nach}}} \quad (6)$$

Diese Formel wird für die Berechnung der theoretischen Harzbeladungen verwendet.

7.2 EI-MS-Spektren der Lanthionine

Abb. 70 zeigt die EI-MS-Spektren der in Kapitel 3.1.6, S. 47, beschriebenen Lanthionin-Derivate. Die Ionen 202 u bzw. 228 u wurden für die Aufnahme der GC-MS-Chromatogramme im SIM-Modus verwendet.

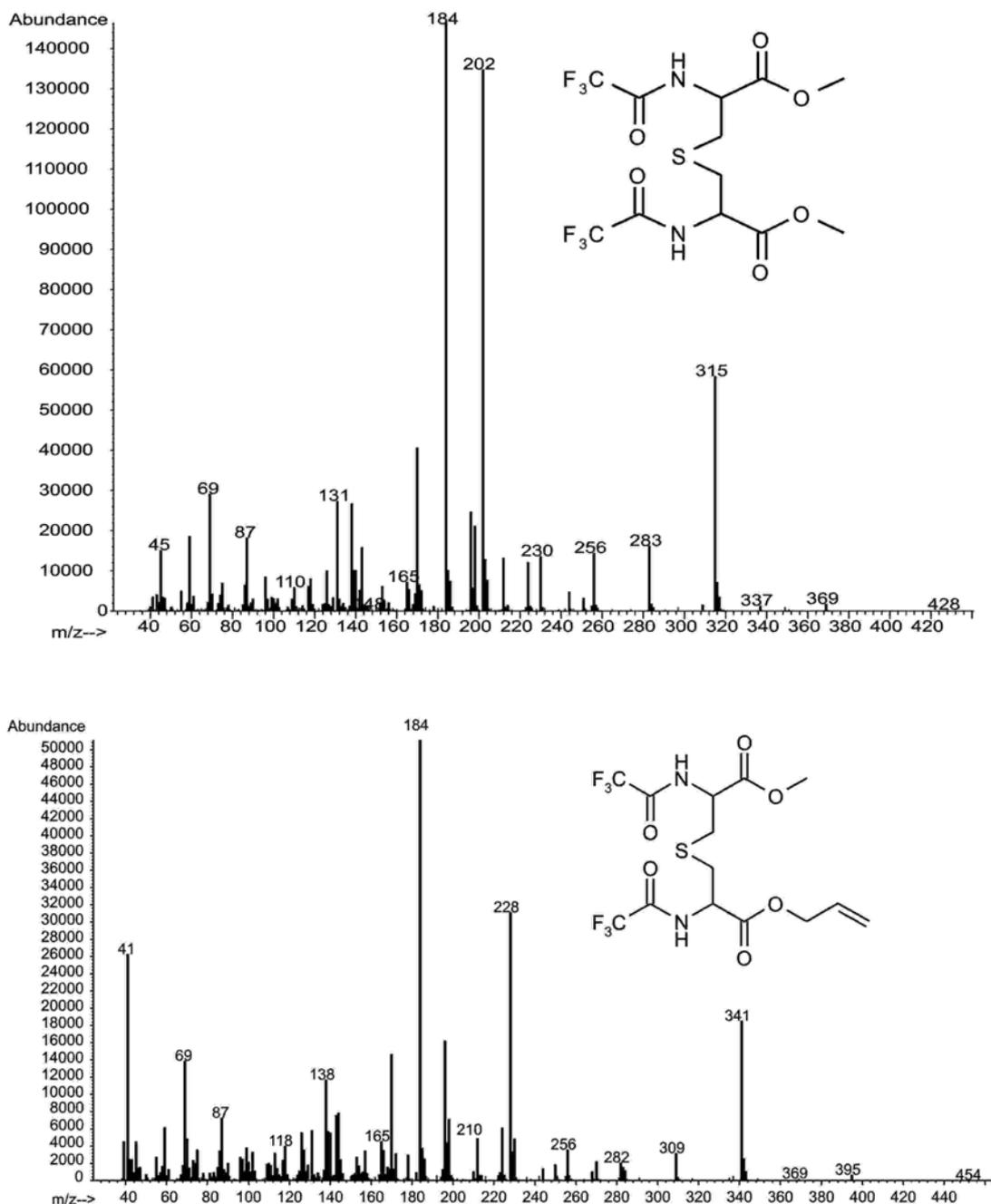


Abb. 70 EI-MS-Spektren des von Harpp und Gleason (A) und für die Enantiomerenbestimmung verwendeten (B) Lanthionin-Derivats

7.3 GC-MS-Chromatogramme der Lanthionin-Derivate (Auswahl)

In **Abb. 71** sind exemplarisch die GC-MS-Chromatogramme des synthetisierten (2R,6R)- (B) und des (2S,6S)-Lanthionins (C) dargestellt. Ebenfalls abgebildet ist das Vergleichschromatogramm einer Mischung aus D-, L- und Meso-Lanthionin (A).

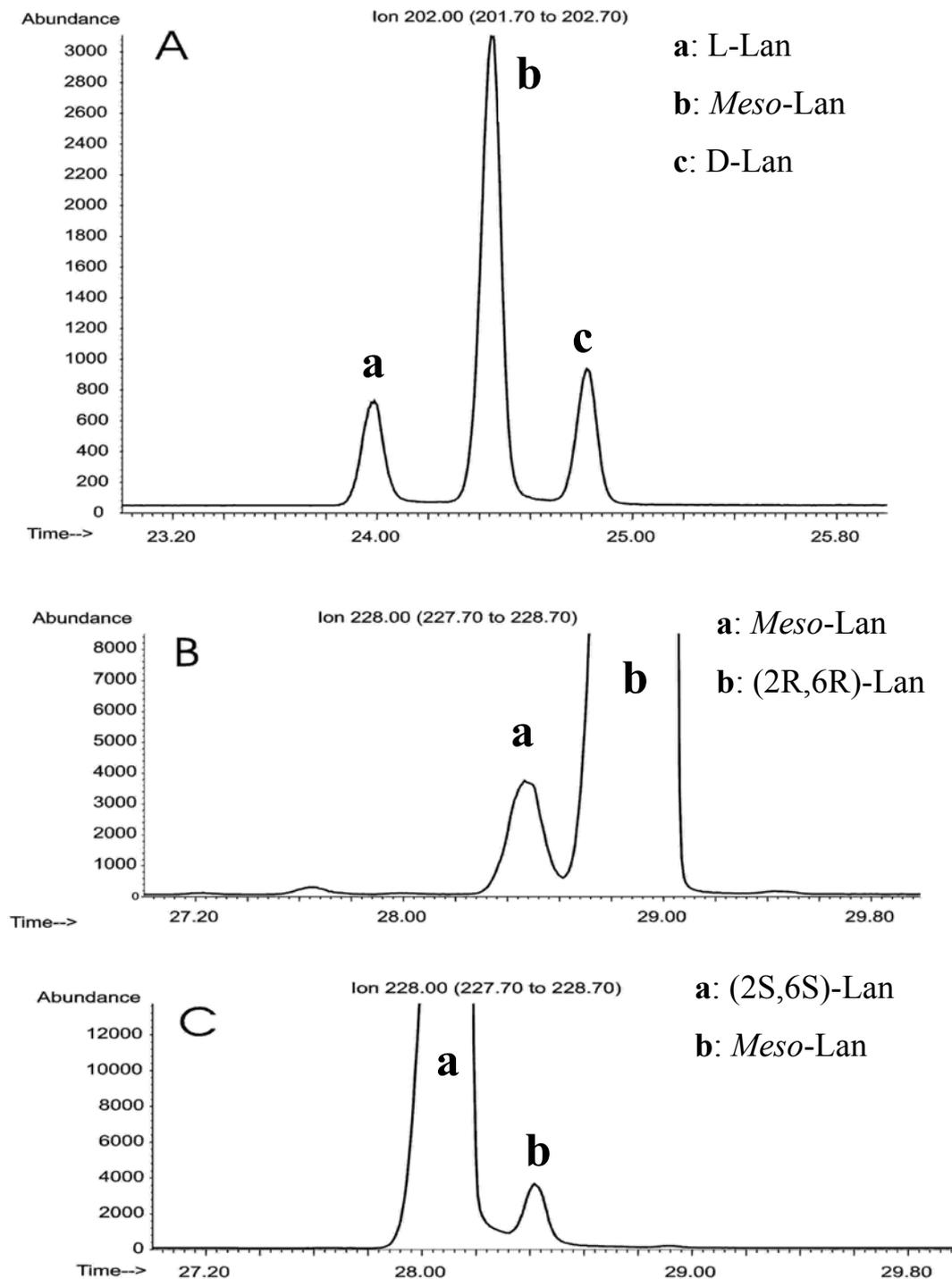


Abb. 71 GC-MS-Chromatogramme des D-/L-/Meso-Lanthionin-Gemischs (A), des synthetisierten (2R,6R)- (B) und (2S,6S)-Lanthionins (C).

7.4 NMR-Analytik

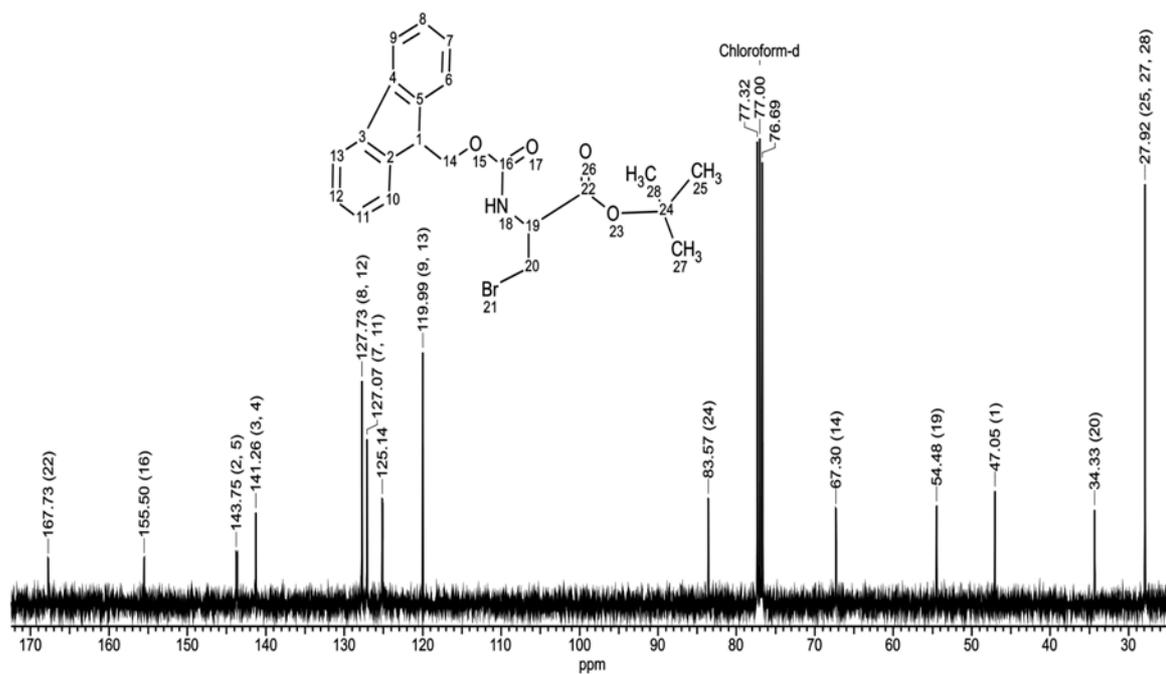
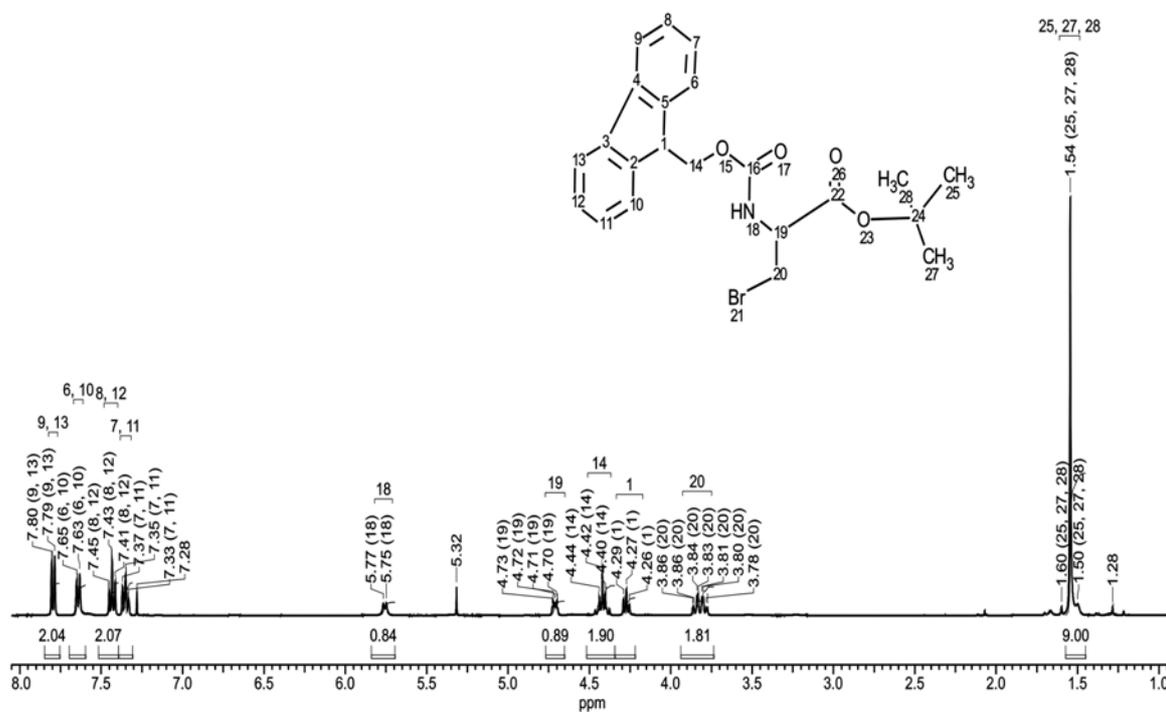
 β -Brom-N-Fmoc-alanin-*tert.*-butylester

Abb. 72 ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum des β -Brom-N-Fmoc-(R)-alanin-*tert.*-butylesters (**59a**)
(400.16 MHz bzw. 100.62 MHz; CDCl_3)

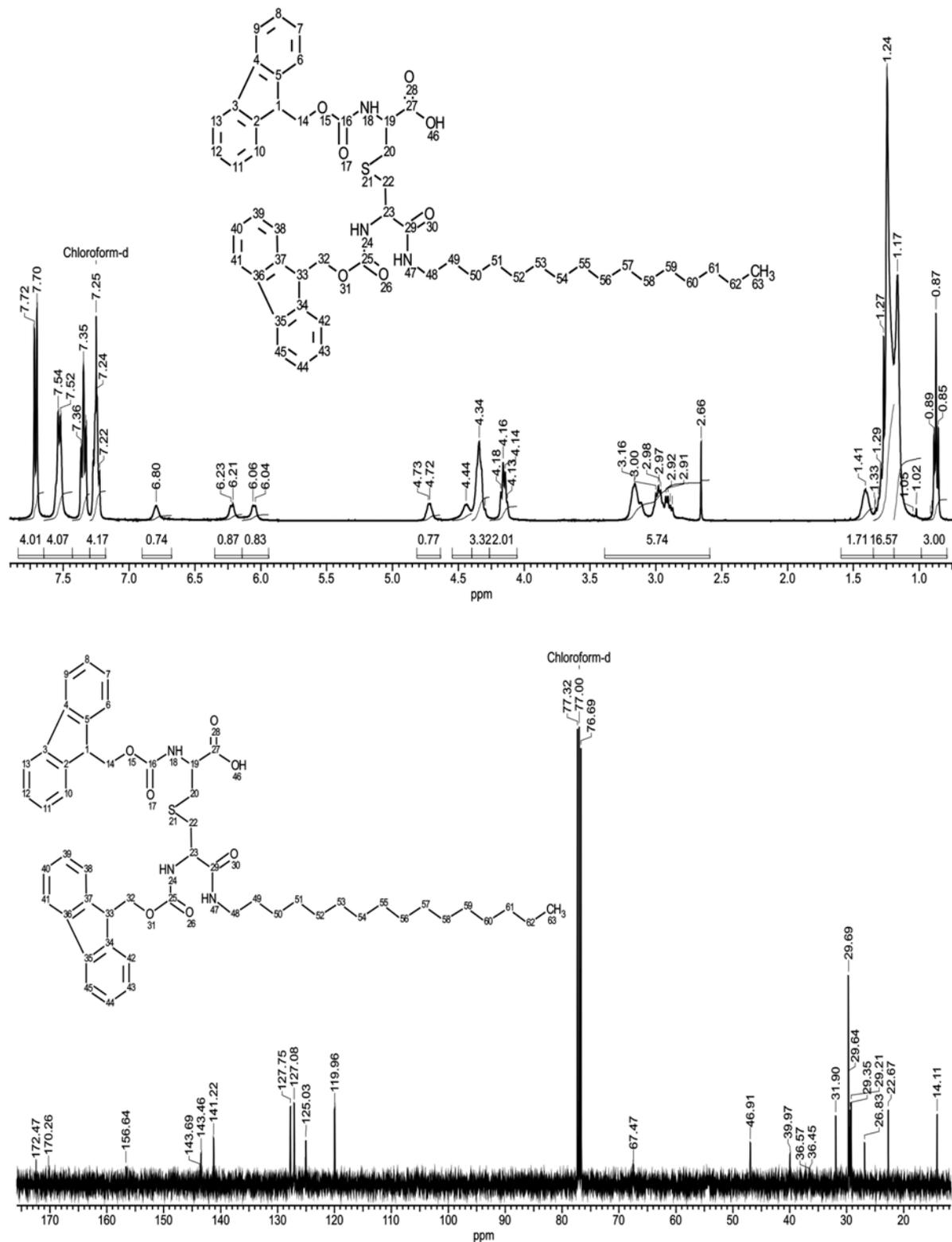
N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-hexadecylamid

Abb. 73 ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren des N²,N⁶-Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-hexadecylamid (400.16 MHz bzw. 100.62 MHz; CDCl₃)

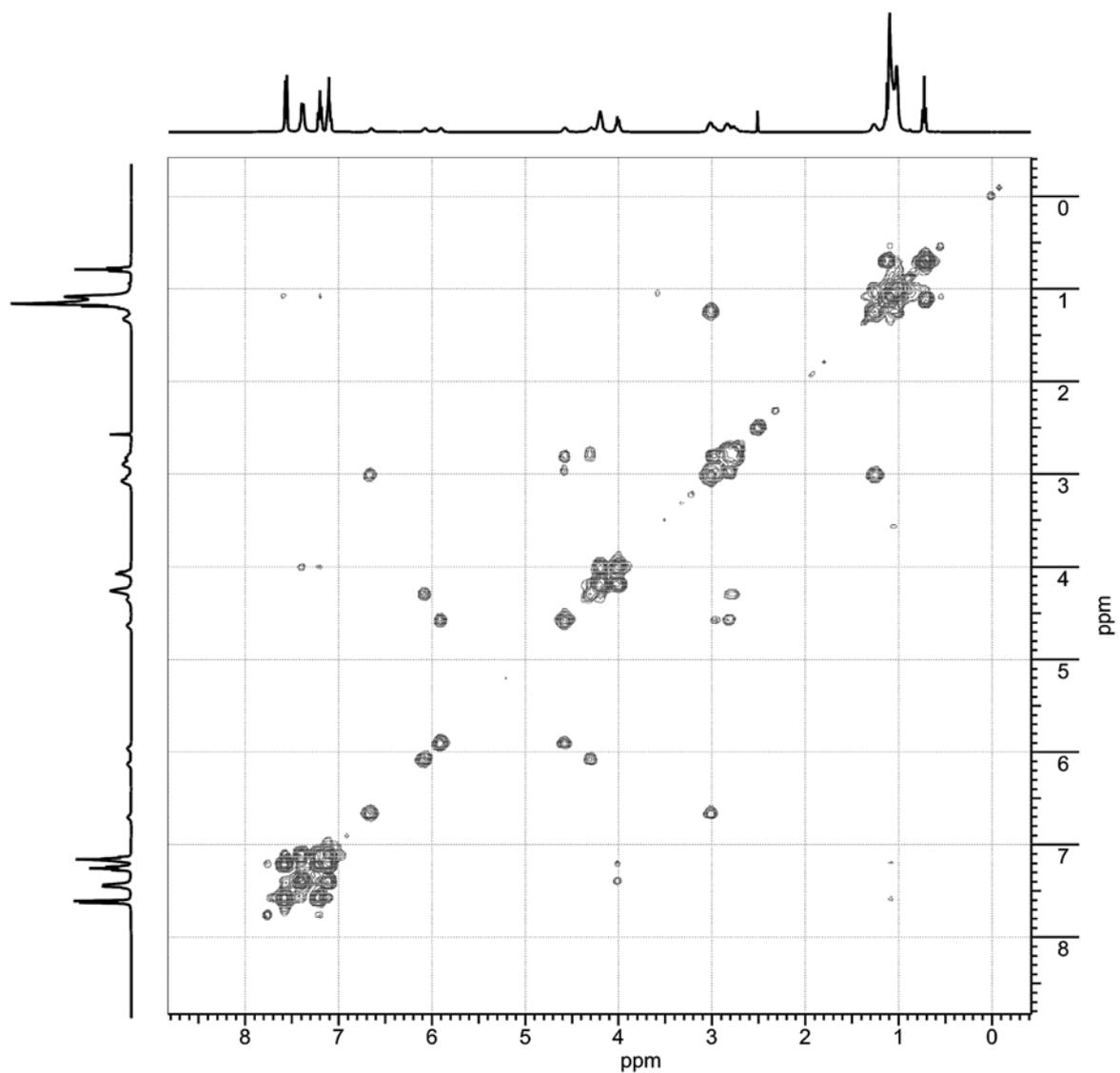


Abb. 74 HH-COSY-Spektrum des N^2,N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin- N^7 -hexadecylamid (400.16 MHz; $CDCl_3$)

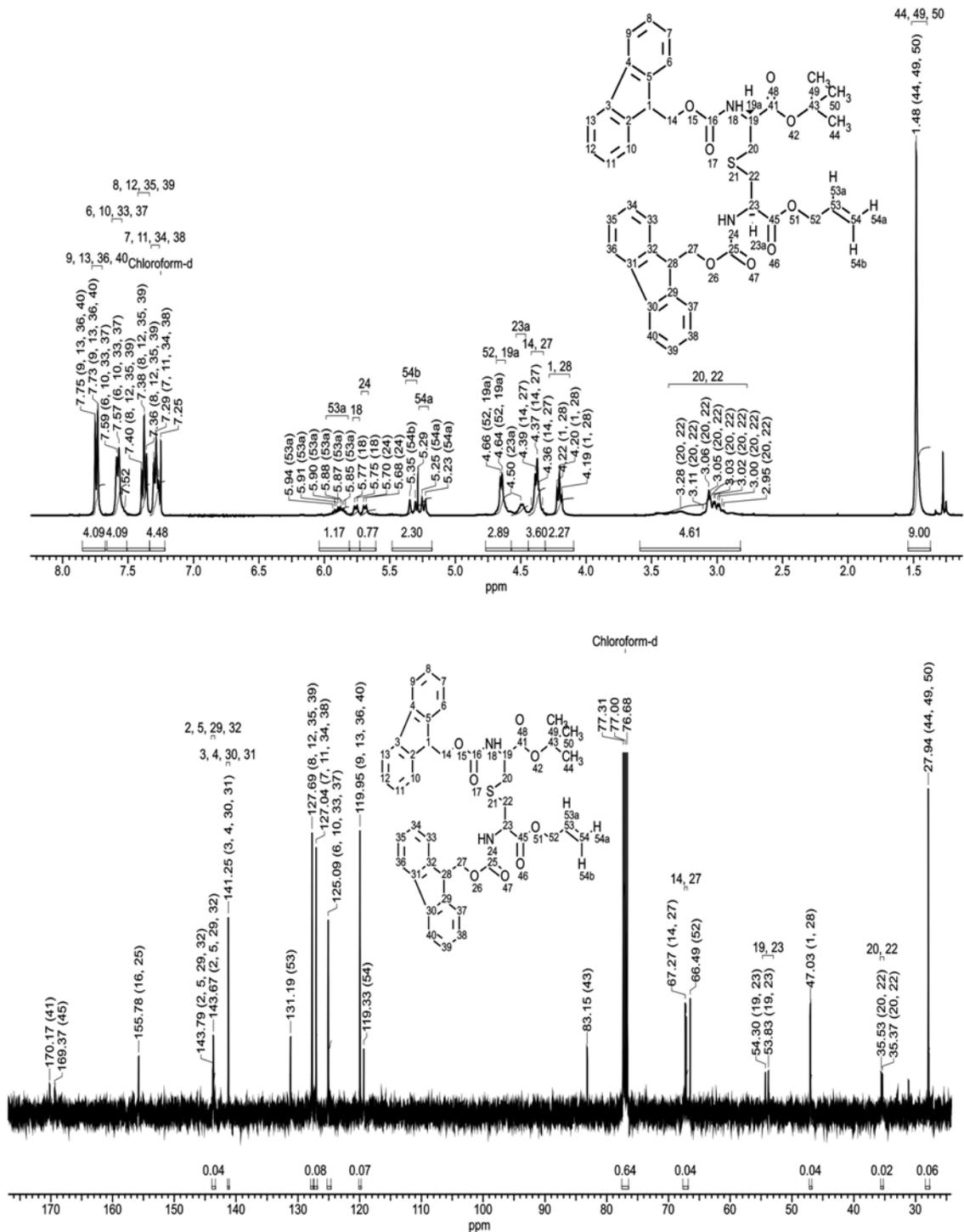
N^2, N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin- O^7 -allyl- O^1 -*tert.*-butyldiester


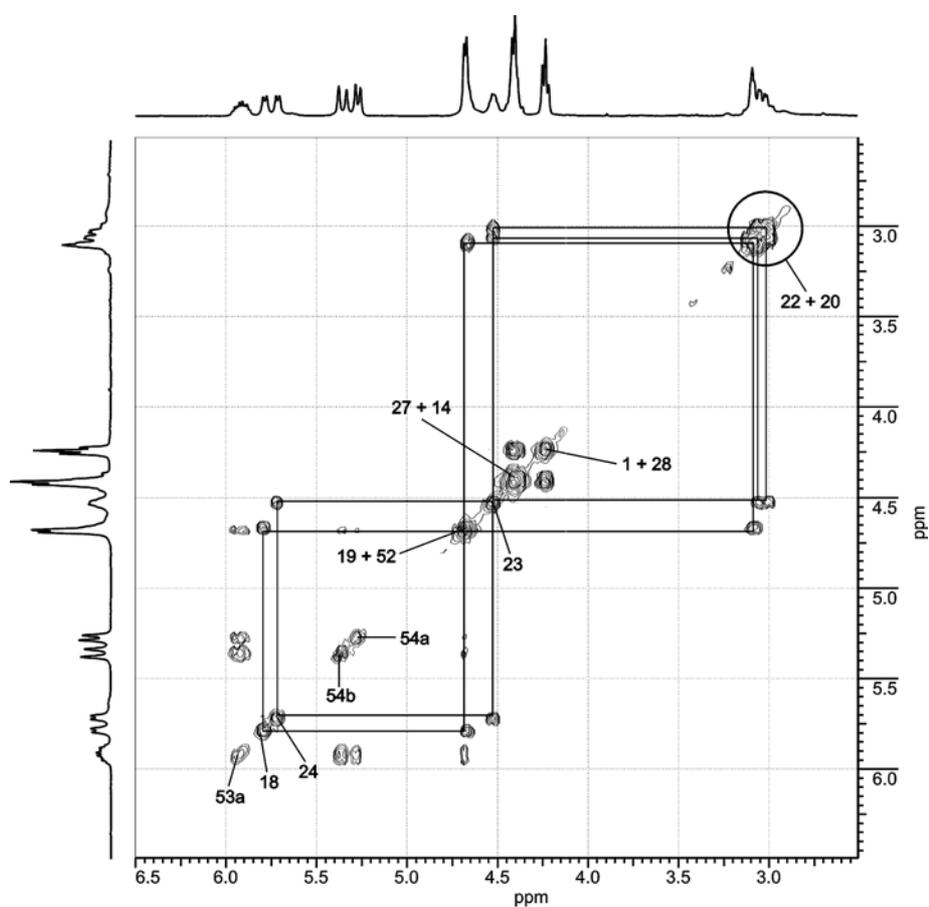
Abb. 75 ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des N^2, N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-lanthionin- O^7 -allyl- O^1 -*tert.*-butyldiesters (400.16 MHz bzw. 100.62 MHz; CDCl_3)

Tab. 18 ^1H -NMR-Daten der Stereoisomeren des Lanthionins (400.16 MHz; CDCl_3)

Lanthionin	19	23	18	24	54a	54b
(2R,6S)	n. d.	4.504	5.805	5.757	5.321	5.238
(2S,6S)	n. d.	4.495	5.766	5.693	5.327	5.242
(2S,6R)	n. d.	4.509	5.810	5.762	5.324	5.241
(2R,6R)	n. d.	4.492	5.755	5.684	5.326	5.241

Tab. 19 ^{13}C -NMR-Daten der Stereoisomeren des Lanthionins (100.62 MHz; CDCl_3)

Lanthionin	19	23	20	22	53	54
(2R,6S)	54.36	53.91	35.93	35.76	131.19	119.29
(2S,6S)	54.30	53.82	35.53	35.37	131.20	119.31
(2S,6R)	54.36	53.91	35.91	35.77	131.19	119.29
(2R,6R)	54.31	53.83	35.54	35.37	131.20	119.32

**Abb. 23** H/H-COSY des N^2, N^6 -Bis-(Fmoc)-(2R,6R)-Lanthionin- O^7 -allyl- O^1 -*tert.*-butyldiesters (**63a**).Zoom des Bereichs der Stickstoff-, α - und β -Protonen. (600.13 MHz, CDCl_3)

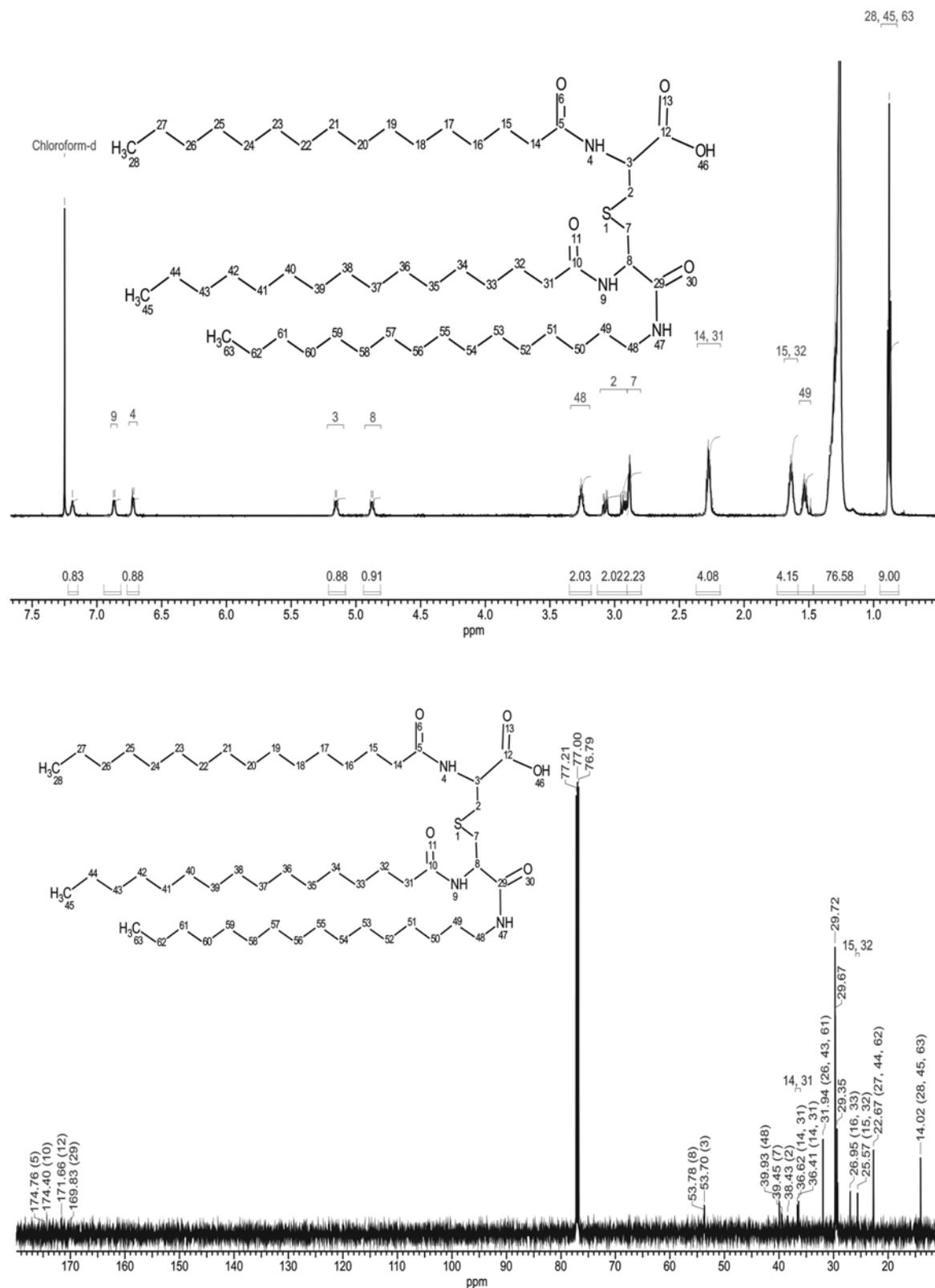
N²,N⁶-Bis-(Palmitoyl)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-hexadecylamid

Abb. 76 ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren des N²,N⁶-Bis-(palmitoyl)-(2R,6R)-lanthionin-N⁷-hexadecylamids (600.13 MHz bzw. 150.90 MHz; CDCl₃)

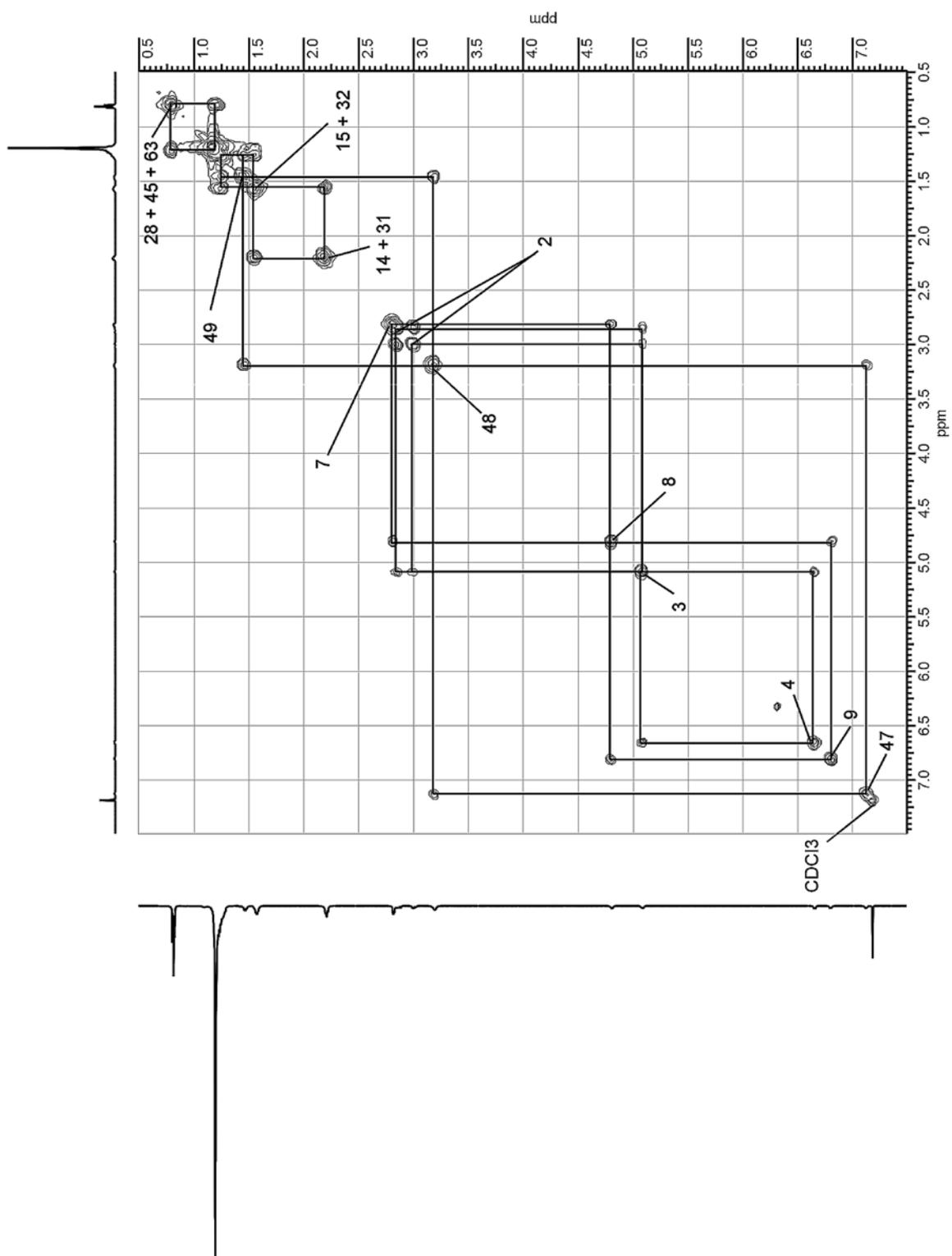


Abb. 28 H/H-COSY-Spektrum von Pam₂LanHda-OH (74) (600.13 MHz; 323K; CDCl₃)

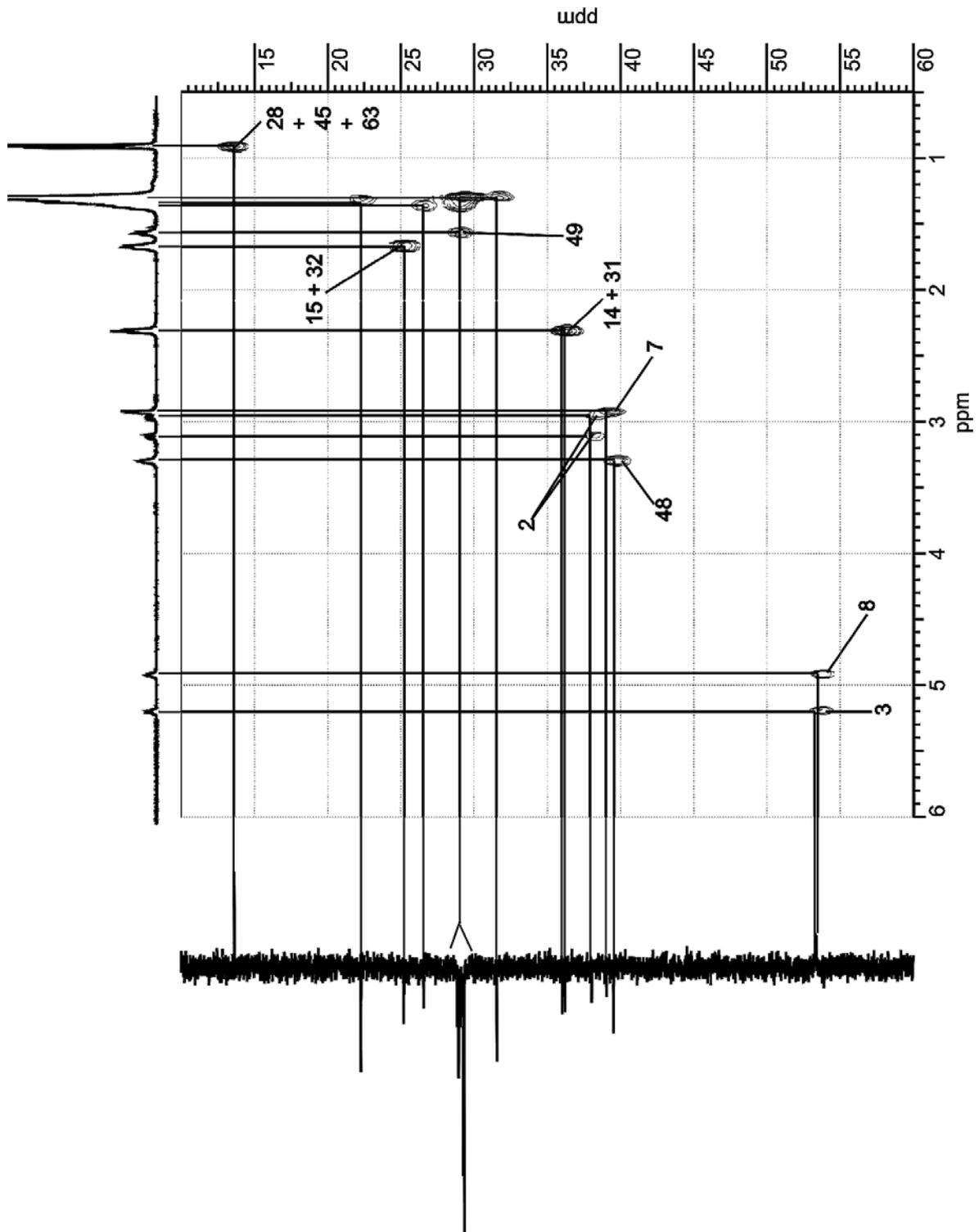


Abb. 29 HSQC-Spektrum von Pam₂LanHda-OH (74) (600.13/150.90 MHz; 323K; CDCl₃)

7.5 FT-ATR-IR-Spektren

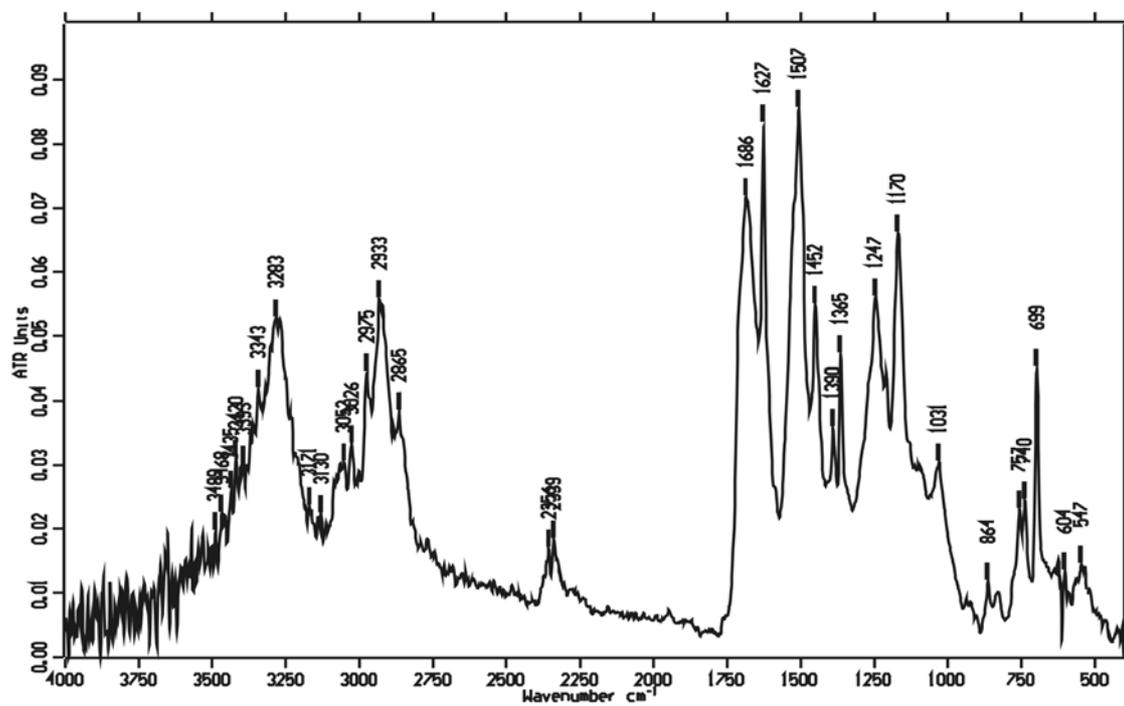


Abb. 77 FT-ATR-IR-Spektrum des Fmoc-SK₄-Harzes

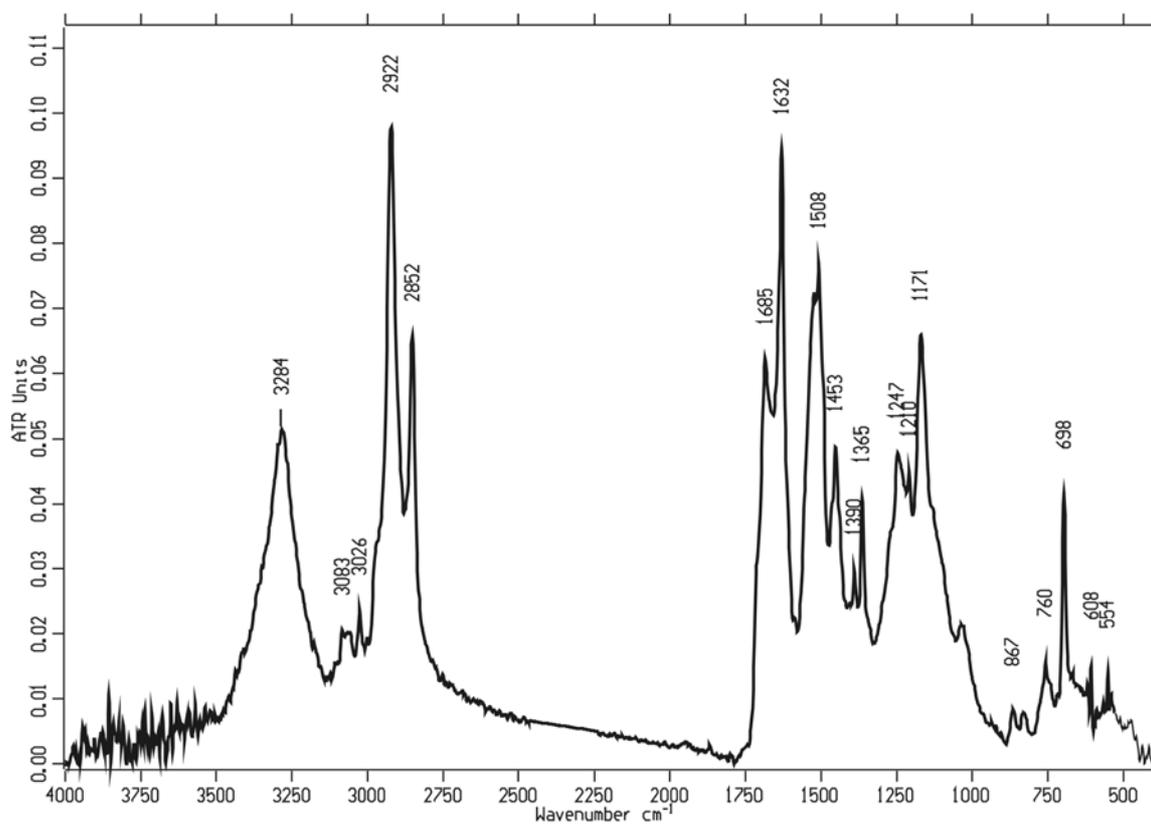


Abb. 78 FT-ATR-IR-Spektrum des Pam₂LanHda-SK₄-Harzes

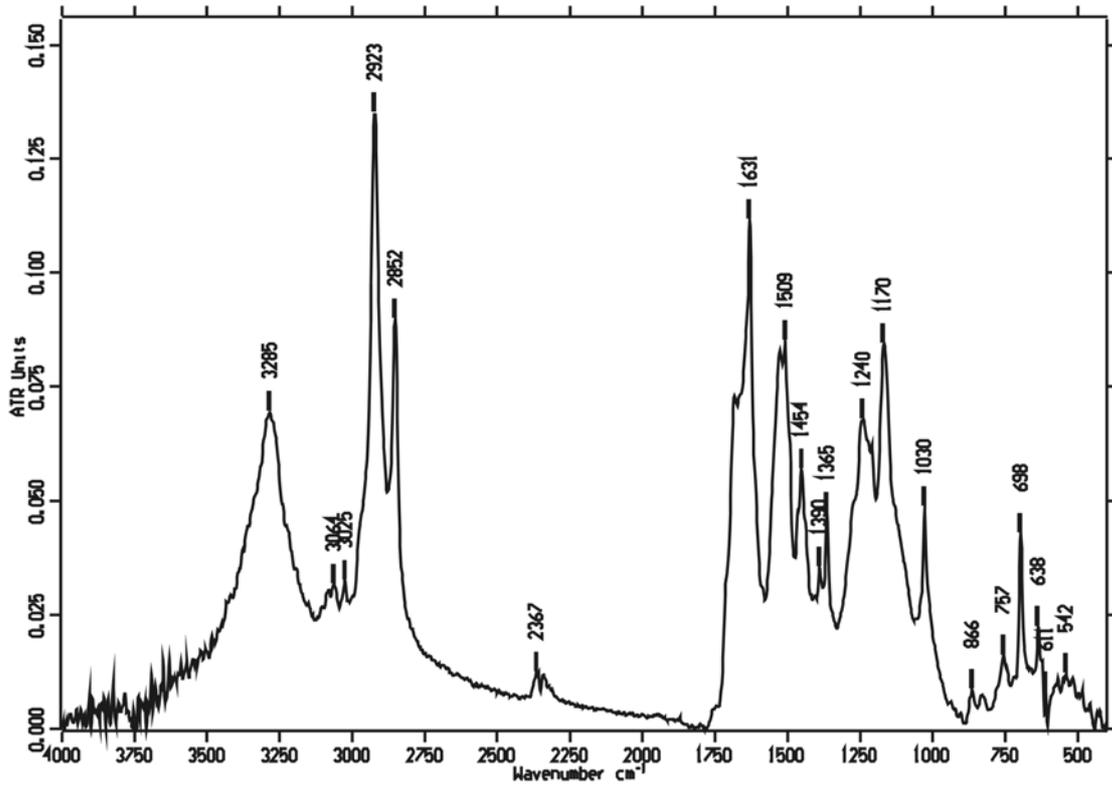


Abb. 79 FT-ATR-IR-Spektrum des Pam₂Lan(O)Hda-SK₄-Harzes

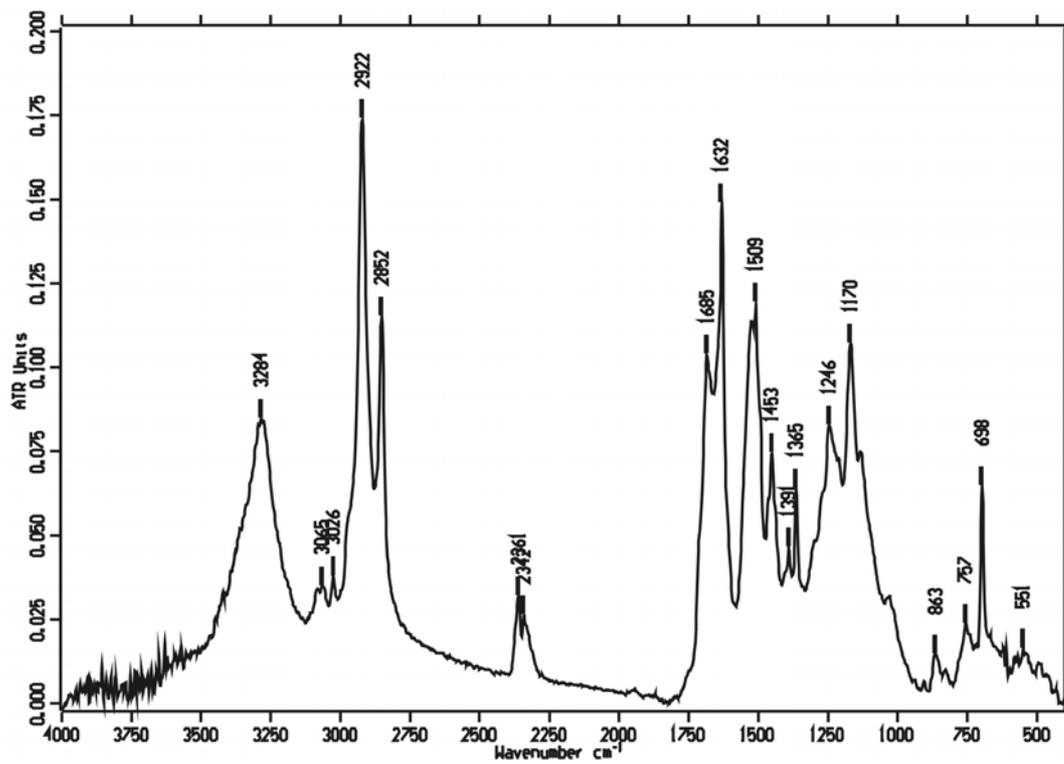


Abb. 80 FT-ATR-IR-Spektrum des Pam₂Lan(O₂)Hda-SK₄-Harzes

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, K. W. Bock, H. Brendle, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel†, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, W. Jäger, J. Jauch, G. Jung, S. Kemmler-Sack†, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, H. Pommer, G. Reinhardt, V. Schurig, M. Schwarz, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, U. Weimar, K.-P. Zeller, C. Ziegler

Lebenslauf

05. Januar 1975

August 1981- Juli 1983

Juli 1983 – Januar 1984

Januar 1984 – Dezember 1984

Dezember 1984 – Juli 1985

Juli 1985- Juni 1987

Juni 1987 – Juni 1994

14. Juni 1994

Oktober 1994 – August 2000

Oktober 1996

Januar 2000

März 2000 – August 2000

Oktober 2000 – Dezember 2004

Oktober 2000 – August 2001 und

Januar 2003 – Oktober 2004

Tobias Marc Seyberth

Geboren in Heidelberg

Theodor-Heuss-Grundschule Sandhausen

Burgunderschule Neuss

Theodor-Heuss-Grundschule Sandhausen

Michael Friedrich-Wild-Grundschule Müllheim

Markgräfler Gymnasium Müllheim

Quenstedt Gymnasium Mössingen

Abitur

Chemie-Studium an der Eberhard-Karls-Universität

Tübingen

Vordiplom

mündliche Diplomprüfungen

Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel

*„Kombinatorische Festphasensynthese von
 α -Diazoestern aus natürlichen Aminosäuren“*

am Institut für Organische Chemie der Universität

Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung

Anfertigung der Dissertation mit dem Titel

*„Lipopeptide als TLR Antagonisten – Synthese und
Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Lanthionin- basierten
Lipopeptiden“*

am Institut für Organische Chemie der Universität

Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Jung

Promotionsstipendiat des Graduiertenkollegs

*„Quantitative Analyse und Charakterisierung
pharmazeutisch und biochemisch relevanter Substanzen
(Analytische Chemie)“* der DFG