

**Synthese von Cryptophycin-Analoga für SAR- und
subzelluläre Lokalisationsstudien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Christine Weiß

aus Herten

Bielefeld, Juni 2012

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier im Sinne von DIN-ISO 9706.

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

2. Gutachter: Prof. Dr. Harald Gröger

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2012

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald
in der Zeit von Dezember 2008 bis Juni 2012
an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt.

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald für die interessante Aufgabenstellung, die stetige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. Harald Gröger danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Den Mitarbeitern der Serviceabteilungen möchte ich für die Durchführung der zahlreichen Messungen danken.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe OC III danke ich für die freundliche Aufnahme, die kollegiale Zusammenarbeit und das angenehme Betriebsklima. Ein besonderer Dank gilt der „Cryptophycin-Subgroup“ (Dr. Benedikt Sammet, Dr. Tobias Bogner, Dr. Markus Nahrwold und Bianca Osswald) für die enge und gute Zusammenarbeit, den zahlreichen Diskussionen und die stetige Hilfsbereitschaft. Bei Dr. Tobias Bogner und Bianca Osswald möchte ich mich herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts bedanken. Dr. Tobias Bogner danke ich des Weiteren für die Durchführung der Cytotoxizitätsbestimmungen sowie Felix Mertink für die Aufnahme von NMR-Spektren.

Für die engagierte und hilfreiche Mitarbeit im Rahmen von Bachelorarbeiten und Forschungspraktika danke ich allen meinen Praktikantinnen und Praktikanten. Insbesondere möchte ich mich bei Anke Nieß und der Auszubildenden Lena Ahlers für ihre außergewöhnliche engagierte Mitarbeit, ihre Einsatzbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder für ihre in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung, und die mir dieses Studium ermöglicht haben, sowie meinem Freund Daniel, der mir in den letzten Jahren stets liebevoll unterstützend zur Seite stand.

Abkürzungsverzeichnis

$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [cm^{-1}]
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut (wasserfrei)
Ac	Acetonitril
All	Allyl
Äq.	Äquivalent(e)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
br	breit (NMR, IR)
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
CAN	Cerammoniumnitrat = $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$
C^{ar}	Arylkohlenstoffatom
CI	Chemische Ionisation
COSY	<i>correlated spectroscopy</i> (Korrelationsspektroskopie)
CPBA	<i>meta</i> -Chlorperoxybenzoesäure
d	<i>day</i> (Tag); Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCE	1,2-Dichlorethan
<i>de</i>	<i>diastereomeric excess</i> (Diastereomerenüberschuss)
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DET	Diethyltartrat
(DHQ) ₂ PHAL	Dihydrochiniphthalazin-1,4-diyl-diether
(DHQD) ₂ PHAL	Dihydrochinidinphthalazin-1,4-diyl-diether
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin (<i>N</i> -Ethyl- <i>N,N</i> -diisopropylamin, Hünigs Base)
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan (Ethylenglykoldimethylether, Glyme)

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMM	Dipropylenglykoldimethylether
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>dr</i>	<i>diastereomeric ratio</i> (Diastereomerenverhältnis)
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	<i>electron impact ionization</i> (Elektronenstoß-Ionisierung)
ESI	Elektrospray-Ionisierung
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere
FID	Flammenionisationsdetektor
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FmocOSu	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid
F_R	Resistenzfaktor
FT	Fourier-Transformation
ges.	gesättigt(e)
h	<i>hour</i> (Stunde)
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum (Drehschieberpumpe)
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
IC ₅₀	Konzentration der halbmaximalen Wirkung
IR	Infrarot (-Spektroskopie)
i. Vak.	im Vakuum
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR)
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lsg.	Lösung
m	Multiplett (NMR); <i>medium</i> (mittel, Intensität einer IR-Bande)

M	Molekül der charakterisierten Verbindung (MS), mol L ⁻¹ (Einheit), molar
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MDR	<i>multiple drug resistant</i> (mehrfach medikamentenresistent)
Me	Methyl
MeI	Methyliodid
μM	Mikromol bzw. Mikromolar
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NaHMDS	Natriumhexamethyldisilazid, Natrimbis(trimethylsilyl)amid
n. b.	nicht bestimmt
nM	Nanomol bzw. Nanomolar
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernmagnetresonanz)
NPC	<i>para</i> -Nitrophenylchlorformiat
p. a.	<i>pro analysi</i> (zur Analyse)
PCC	Pyridiniumchlorchromat
PE	Petrolether
PGA	Penicilin-G-Amidase
P-gp	P-Glykoprotein
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i> (1 000 000 ⁻¹)
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
p-TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
q	Quartett (NMR)
R	beliebiger Substituent
R _f	Retentionsfaktor
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR); <i>strong</i> (stark, Intensität einer IR-Bande)
SAR	structure-activity relationship
S _N	nucleophile Substitution
t	Triplett (NMR)

TBS(Cl)	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl(chlorid)
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>tert</i>	tertiär-
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl, Tetramethylsilan
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
ToF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
t_R	Retentionszeit (GC, HPLC)
uA	<i>unit A</i> (= Cryptophycin-Fragment A)
uB	<i>unit B</i> (= Cryptophycin-Fragment B)
uC	<i>unit C</i> (= Cryptophycin-Fragment C)
uD	<i>unit D</i> (= Cryptophycin-Fragment D)
UV	Ultraviolett
vs	<i>very strong</i> (sehr stark, Intensität einer IR-Bande)
v/v	Volumenverhältnis
w	<i>weak</i> (schwach, Intensität einer IR-Bande)
X	soweit nicht anders vermerkt = Cl, Br oder I

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cryptophycine	2
1.2	Fluorierte Pharmazeutika	10
1.3	<i>Tumor targeting</i> und <i>prodrugs</i>	14
2	Zielsetzung	23
3	Darstellung von Cryptophycin-52 nach einer neuen konvergente Syntheseroute.....	25
3.1	Motivation und Syntheseplanung.....	25
3.2	Synthese der nativen Fragment-Bausteine	26
3.3	Aufbau des Makrocyclus und Diol-Epoxid-Transformation.....	29
4	Synthese eines Cyclopropan-funktionalisierten Fragment-A-Bausteins.....	33
4.1	Motivation und Syntheseplanung.....	33
4.2	Asymmetrische Simmons-Smith-Reaktion	35
4.3	Asymmetrische Epoxidierung	39
4.4	Diastereoselektive Methylierung.....	44
5	Fluorierte Cryptophycine für SAR-Studien	46
5.1	Motivation und Syntheseplanung.....	46
5.2	Synthese eines Trifluormethyl-substituierten Fragment-A-Bausteins	47
5.3	Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation zu dem trifluormethylierten Cryptophycin 74.....	54
5.4	Synthese eines Pentafluorphenyl-modifizierten Fragment-B-Bausteins.....	56
5.5	Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation zu dem pentafluorierten Cryptophycin 76.....	57
5.6	Cytotoxizitäten der fluorierten Cryptophycin-Derivate	58
6	Alkylazid-funktionalisierte Cryptophycine.....	60
6.1	Motivation	60
6.2	Synthese der Azid-funktionalisierten Fragment-C-Bausteine.....	60
6.3	Alkylazid-funktionalisierte Cryptophycine ausgehend von einem gemeinsamen DAB- Segment.....	62

6.4	Alkylazid-funktionalisierte Cryptophycine durch konvergente Synthese	63
7	Design eines Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugats zur mikroskopischen Untersuchung der zellulären Aufnahme und finalen Lokalisation.....	66
7.1	Motivation	66
7.2	Synthese des Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugats.....	67
7.3	Ergebnisse der Lokalisationsstudie	71
8	Synthese von Cryptophycin-55 und Konjugation mit selbstelimierenden Linkersystemen als Plattform für neuartige <i>prodrug</i>-Strategien	74
8.1	Motivation	74
8.2	Synthese von Cryptophycin-55	75
8.3	Aktivierung als <i>para</i> -Nitrophenyl-Carbonat und Konjugation mit selbstelimierenden Linkern	75
9	Ausblick	79
10	Zusammenfassung	81
11	Summary	87
12	Methoden und Materialien	92
13	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	99
14	Synthese von Cryptophycin-52 und -55	105
14.1	Fragment A.....	105
14.2	Fragment B	109
14.3	Fragment C	113
14.4	Fragment D.....	115
14.5	Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation	118
15	Synthese eines Cyclopropan-funktionalisierten Fragment-A-Bausteins	127
15.1	(<i>E</i>)-(3,3-Diethoxyprop-1-enyl)benzol (45).....	127
15.2	(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Diethyl 2-Styryl-1,3-dioxolan-4,5-dicarboxylat (46)	127
15.3	(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Diethyl 2-((1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-2-Phenylcyclopropyl)-1,3-dioxolan-4,5-dicarboxylat (47).....	128
15.4	(<i>E</i>)-Methyl 3-((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-Phenylcyclopropyl)acrylat (49).....	129
15.5	(<i>E</i>)-3-((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-Phenylcyclopropyl)prop-2-en-1-ol (50)	130
15.6	((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-((1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-2-Phenylcyclopropyl)oxiran-2-yl)methanol (51).....	131

15.7	(2 <i>R</i> ,6 <i>R</i> / <i>S</i> , <i>E</i>)-6-Phenylhept-3-en-1,2-diol (65/65a)	132
16	Synthese des Shi-Katalysators <i>ent</i>-61	133
16.1	1,2:4,5-Di- <i>O</i> -isopropyliden- β -L-fructopyranose (64)	133
16.2	1,2:4,5-Di- <i>O</i> -isopropyliden- β -L-erythro-2,3-hexodiulo-2,6-pyranose (<i>ent</i> -61)	134
17	Synthese eines Trifluormethyl-funktionalisierten Cryptophycins.....	135
17.1	Synthese des trifluormethylierten Fragment-A-Bausteins	135
17.2	Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation	143
18	Synthese eines Pentafluorphenyl-funktionalisierten Cryptophycins.....	149
18.1	Synthese des fluorierten Fragment-B-Bausteins	149
18.2	Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation	151
19	Synthese der Alkylazid-funktionalisierten Cryptophycine.....	157
19.1	Darstellung der funktionalisierten Fragment-C-Bausteine.....	157
19.2	Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation	169
20	Synthese eines Cryptophycin-Fluorophor-RGD-Peptid-Konjugats	186
20.1	Synthese des Fluorophors.....	186
20.2	Cryptophycin-Fluorophor-RGD-Peptid-Konjugat (154)	188
20.3	Cryptophycin-Fluorophor-Konjugat (155).....	189
20.4	Darstellung der Pufferlösung	190
20.5	Aufnahme der Fluoreszenzspektren	190
21	Literaturverzeichnis.....	191

1 Einleitung

Krebs ist die umgangssprachliche Bezeichnung für einen malignen Tumor, d. h. eine bösartige Gewebeneubildung. Unkontrolliertes Zellwachstum und –teilung führen zu einer Verdrängung und Zerstörung von gesundem Gewebe. Bösartige Tumore neigen außerdem zur Ausbildung von Metastasen, so dass der Tumor streut und weitere Organe betroffen sind.

In Deutschland ist Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache.^[1] Besonders betroffen sind hierzulande Organe wie Lunge, Dickdarm, Brustdrüse (Frauen) und Prostata (Männer). Die relative 5-Jahresüberlebensrate, über alle Tumorarten ermittelt, lag 2006 in Deutschland bei einem durchschnittlichen Wert von 58.5 %. Ein Patient gilt als geheilt, wenn er mindestens fünf Jahre ohne Rückfall überlebt, allerdings treten viele Rückfälle erst zu einem späteren Zeitpunkt auf. Durch eine frühe Diagnose und eine rechtzeitige Therapie können die Überlebenschancen der Erkrankten erhöht werden. Die konventionelle Krebstherapie beinhaltet die Chemo- und Strahlentherapie sowie die operative Entfernung von Tumoren. Seltener angewandt werden die Immun- und die Gentherapie. Die Gabe von Medikamenten wird auch palliativ zur Verbesserung der Lebensqualität und Linderung der Symptome bei Tumorarten ohne Heilungschancen eingesetzt.

Die Krebstherapie ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Die Hauptursache liegt in der Ähnlichkeit von Tumor- und gesunden Zellen, da ein Krebs aus körpereigenem Gewebe entstanden ist und sich daher nicht wie Bakterien oder Viren auf molekularer Ebene von den Wirtszellen unterscheidet. Tumorzellen haben allerdings eine höhere Proliferationsrate als gesunde Zellen und deshalb wird versucht die rasche Zellteilung als Therapieansatz zu nutzen. In der Chemotherapie wird die Zellvermehrung durch die Gabe von antineoplastischen Medikamenten eingeschränkt oder gänzlich gestoppt, allerdings werden auch alle anderen, sich schnell teilenden Gewebearten beeinträchtigt. Dieses resultierte in den mit der Chemotherapie in Verbindung gebrachten Nebenwirkungen, wie Schwächung des Immunsystems, Haarausfall, Magen-Darm-Beschwerden sowie Schädigungen der Leber, Niere und Knochenmark. Als Antitumorthapeutikum werden häufig Naturstoffe, die aus Pflanzen oder Mikroorganismen isoliert wurden und eine cytostatische oder cytotoxische Wirkung besitzen, verwendet. Hierzu zählen zum Beispiel die Chinolinalkaloide, Anthracycline und Taxane. Des Weiteren sind unter den natürlich vorkommenden Cytostatika die Cryptophycine aufgrund ihrer hohen biologischen Aktivität sehr vielversprechende Wirkstoffkandidaten, jedoch verhinderte die hohe Neurotoxizität bis jetzt ihren Einsatz in der Chemotherapie.^[2]

1.1 Cryptophycine

Cryptophycine sind eine Stoffklasse 16-gliedriger makrocyclischer Depsipeptide. Der erste Vertreter, Cryptophycin-1 (**1**) wurde 1990 von Mitarbeitern der Firma MERCK aus Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* sp. ATCC 53789 isoliert (Abbildung 1).^[3] Der Name resultiert aus der hohen Toxizität gegenüber Hefen der Spezies *Cryptococcus*. Später wurde dieses Derivat mit der Nummer 1 betitelt, da es das in der Natur am häufigsten vorkommende sowie biologisch aktivste Mitglied der Cryptophycin-Gruppe ist. MOORE *et al.* extrahierten Verbindung **1** aus dem verwandten *Nostoc*-Stamm GSV 224 und lieferten 1994 die ersten Beiträge zur Aufklärung der Stereochemie. Weiterhin identifizierten sie Cryptophycin-1 als die Toxizität-induzierende Komponente.^[4] Zur gleichen Zeit gelang KOBAYASHI *et al.* die vollständige Strukturaufklärung sowie die erste Totalsynthese einer zu Cryptophycin-1 analogen Verbindung.^[5,6] Bis heute sind insgesamt 28 natürlich vorkommende Cryptophycin-Derivate isoliert worden,^[7-9] während zahlreiche synthetische Analoga im Rahmen von Struktur-Aktivitäts- (engl.: *structure activity relationship*; SAR-) Studien dargestellt wurden.^[10,11] Diese Naturstoffklasse zeichnet sich neben der Toxizität gegenüber Hefen vorwiegend durch ihre hohes cytostatisches und cytotoxisches Potential aus. Insbesondere ihre bemerkenswerte biologische Aktivität gegenüber mehrfach medikamenten-resistenten (engl.: *multiple drug resistant*; MDR-) Tumorzellen macht sie für die Chemotherapie interessant, da die Ausbildung von Resistenzen die Heilung von Tumorerkrankungen wesentlich erschwert.

In Hinblick auf eine effiziente Totalsynthese sind alle natürlich vorkommenden Cryptophycine in vier Bausteine unterteilbar, die mit den Buchstaben A-D bezeichnet werden (Abbildung 1).^[2] Bei den Fragmenten A und D handelt es sich dabei um Hydroxycarbonsäuren, während die Bausteine B und C Aminosäuren sind. Der Fragment-A-Baustein, eine für Cryptophycine typische α,β -ungesättigte δ -Hydroxycarbonsäure, die im Falle des Naturstoffs **1** vier Stereozentren und ein benzylisches Epoxid besitzt, ist die synthetisch anspruchsvollste Komponente. Das als B-Fragment bezeichnete D-Tyrosin-Derivat muss für eine hohe biologische Aktivität eine Methoxygruppe sowie einen Chlorsubstituenten in 3'-Position tragen. Die Fragment-C-Bausteine sind entweder auf eine α -mono- oder eine α,α -dialkylierte β -Aminosäure zurückzuführen. Das D-Fragment ist eine von L-Leucin oder einer homologen Verbindung abgeleitete α -Hydroxycarbonsäure.

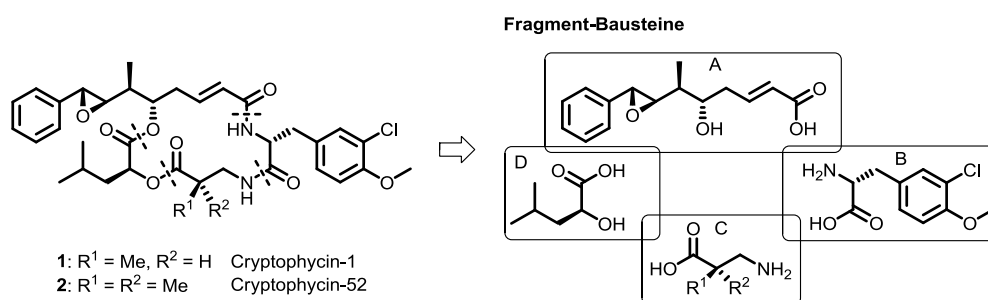


Abbildung 1: Struktur der Cryptophycine-1 (**1**) und -52 (**2**) sowie deren retrosynthetische Analyse.

Durch strukturelle Modifikationen der Leitstruktur Cryptophycin-1 entwickelten Forscher von ELI LILLY das synthetische Analogon LY355703, auch Cryptophycin-52 (**2**) genannt (Abbildung 1). Dieses Derivat ist aufgrund einer zusätzlichen Methylgruppe im Fragment-C-Baustein synthetisch weniger anspruchsvoll, da ein Stereozentrum entfernt wurde. Zusätzlich ist die Esterbindung zwischen den Fragmenten C und D nun sterisch gehinderter und die Hydrolyseempfindlichkeit konnte auf diese Weise reduziert werden. Die Labilität dieser Esterbindung wurde schon von MOORE *et al.* bei der methanolischen Extraktion von Cryptophycinen aus Cyanobakterien durch die Entstehung acyclischer Nebenprodukten erkannt.^[4] Die solvolytische Spaltung der Esterbindung zwischen Fragment A und Fragment D hingegen ist bis jetzt nicht beobachtet worden.

Neben der erhöhten Stabilität konnte durch den Einbau einer weiteren Methylgruppe im Fragment-C-Baustein die hohe Cytotoxizität gegen resistente Zelllinien aufrechterhalten werden. Cryptophycin-52 war deshalb von therapeutischem Interesse und gelangte bis in klinische Phase-II-Studien, scheiterte jedoch infolge der neurologischen Nebenwirkungen, die die Verabreichung ausreichend hoher Dosen verhinderten und das therapeutische Fenster wesentlich eingrenzten.^[12-15] Obwohl die Antitumoraktivität niedrig war, wurde eine deutliche Stabilisierung des Krankheitsbildes im Verlauf der Phase-II-Untersuchungen bemerkt.^[13,15] Die Kombinationstherapie ist der Behandlung mit einem einzigen Medikament häufig überlegen. Vor diesem Hintergrund wurden Cryptophycine zusammen mit anderen Chemotherapeutika, die einen unterschiedlichen Wirkmechanismus besitzen, getestet. Die erzielte Aktivitätssteigerung war dabei größer als die Summe der Einzeleffekte.^[16]

1.1.1 Biologische Aktivität und Cytotoxizität

Die hohe cytotoxische Aktivität der Cryptophycine beruht auf einer Wechselwirkung mit dem globulären Protein Tubulin. Tubulin ist als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut.^[17] Beide Untereinheiten sind zur Bindung von Guanidin-5'-triphosphat (GTP) befähigt. Während die GTP-Bindung an die α -Untereinheit irreversibel ist und ohne die Hydrolyse einer Phosphorsäureanhydridbindung verläuft, bindet das Nucleosidtriphosphat reversibel unter Hydrolyse zu Guanidin-5'-triphosphat (GDP) und Phosphat an die β -Untereinheit. Die Tubulin-Dimere können in zwei unterschiedlichen Konformationen existieren. Ist das freie Tubulin-Dimer mit GTP komplexiert, besitzt es eine gestreckte Konformation. Erfolgt die Hydrolyse von GTP zu GDP unter Freigabe eines Phosphats, ändert das Tubulin-Dimer seine Konformation und liegt nun gekrümmt vor. Die Tubulin-Dimere können sich GTP-induziert zu Protofilamenten zusammenlagern, die wiederum zu zylindrischen-röhrenförmigen Filamenten, den so genannten Mikrotubuli, polymerisieren (Abbildung 2). Die Mikrotubuli sind Bestandteil des Cytoskeletts eukaryotischer Zellen und sorgen während der Interphase für die Stabilität der Zelle, den zellulären Transport von Organellen sowie die Zellkommunikation.^[18] Während der Zellteilung bilden die Mikrotubuli den Spindelapparat und

richten so die Chromosomen in einer Ebene aus, trennen die Chromatiden und transportieren sie in beide Tochterzellhäften. Alle diese Prozesse setzen eine hohe Dynamik und Flexibilität der Mikrotubuli voraus, die durch stetige Anlagerung und Abspaltung einzelner Tubulin-Dimere gewährleistet und als dynamische Instabilität bezeichnet wird. Gerät die Mikrotubuli-Dynamik während der Mitose aus dem Gleichgewicht, so verharren die Zellen in einem Prometaphase/Metaphase-artigen Stadium bis schließlich der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet wird. Im Verlauf der Mitose ist die Dynamik der Mikrotubuli verglichen mit der Interphase um den Faktor 4 bis 100 erhöht,^[18] daher eignen sie sich als zelluläre *targets* von Cytostatika mit dem Ziel schnell proliferierende Zellen selektiv zu schädigen.

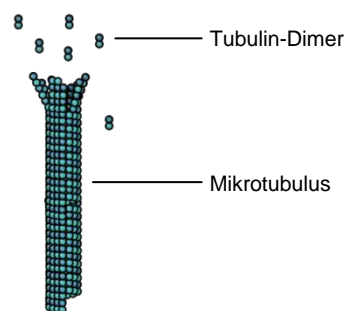


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Mikrotubuli.^[19]

Viele der niedermolekularen Zellgifte entfalten ihre Wirkung, indem sie entweder an die Taxol-Bindungsstelle,^[20,21] die *Vinca*-Domäne^[22] oder die Colchicin-Domäne^[23] des Tubulin-Dimers binden. Cryptophycine binden mit hoher Affinität an oder in der Nähe der *Vinca*-Domäne unter Ausbildung eines außerordentlich stabilen Komplexes. Die genauen Bindungsverhältnisse sind bis heute nicht eindeutig entschlüsselt. Zum einen ist eine kovalente Bindung durch nucleophile Epoxid-Ringöffnung mit einer Aminosäureseitenkette des Tubulins denkbar,^[7] zum anderen wird eine nicht-kovalente Koordination in Betracht gezogen. Für die letztere Möglichkeit sprechen, dass Cryptophycin nach thermischer oder chemischer Denaturierung des Proteins aus dem Tubulin-Wirkstoff-Komplex zurück gewonnen werden kann sowie die Tatsache, dass Cryptophycin auch in Gegenwart von Stickstoff- und Schwefelnucleophilen, wie Glutaminsäure, Histidin und β -Mercaptoethanol, die Tubulin-Polymerisation inhibiert.^[24,25] Cryptophycine besitzen folglich eine geringe Reaktivität gegenüber Stickstoff-, Schwefel und sowohl Sauerstoff-Nucleophilen. Derzeitig liegen keine Röntgenstrukturdaten des Cryptophycin-Tubulin-Komplexes vor, jedoch inhibiert diese Naturstoffklasse nicht-kompetitiv die Bindung von Vinblastin an Tubulin.^[26] Des Weiteren wird nach Behandlung mit Vinblastin oder Cryptophycin ein ähnliches Tubulin-Fragmentierungsmuster durch tryptischen oder chymotryptischen Verdau erhalten.^[27] Die Vermutung einer gemeinsamen Bindungsstelle der niedermolekularen, (depsi-)peptidischen Cytostatika wird zusätzlich durch *molecular modelling*-Experimente gestützt. Hier konnte eine identische Koordinationsstelle an der β -Untereinheit des Tubulins identifiziert werden,^[28] die daraufhin *peptide site* genannt wurde.^[26,29]

Cryptophycine verursachen eine Konformationsänderung im Tubulin-Dimer, die bei einer hohen Wirkstoffkonzentration zu einer Oligomerisierung von 8 oder 9 Proteinen unter Ausbildung kleiner Ringstrukturen führt.^[30-32] Darüber hinaus binden Cryptophycine an die Mikrotubuli-Enden und bewirken dort ebenfalls eine konformative Änderung der Tubulin-Dimer-Einheiten. Dieses resultiert in einer Abspaltung von Protofilamenten aus dem Mikrotubuli-Polymer, die gleichermaßen zu ringförmigen Strukturen oligomerisieren.^[30,31] Zusammengefasst unterdrücken Cryptophycine in geringen Dosen die Mikrotubuli-Dynamik, in hohen Konzentrationen bewirken sie, wie die übrigen *Vinca*-Domänen-aktiven Wirkstoffe, eine Destabilisierung der Mikrotubuli und lösen so deren Abbau aus. Die antimitotische Aktivität dieser Wirkstoffklasse ist möglicherweise auch für die reversible Neurotoxizität verantwortlich, die während der Phase-II-Studien mit Cryptophycin-52 (**2**) beobachtet wurde. Bekanntermaßen ist dieses ein Nachteil aller Mitose-hemmender Cytotoxine, da Mikrotubuli als Hauptbestandteil der Neuronen im Körper zahlreich vorhanden sind.^[18]

Die Aufnahme der Cryptophycine in die Tumorzellen erfolgt außerordentlich schnell und die Cytostatika reichern sich im Zellinneren an.^[33] Nach Aktivierung des Apoptose-Effektorenzyms Caspase 3 leiten die Zellen die Apoptose ein und ein schneller Zelltod folgt ohne ein längeres Ausharren im mitotischen Zustand.^[34,35] Zusätzlich fördern Cryptophycine eine Phosphorylierung des Apoptosesuppressorproteins Bcl2, deaktivieren es somit und begünstigen auf diese Weise die Auslösung der Apoptose.^[36,37]

Cryptophycine sind hochgradig cytotoxisch, so liegen ihre IC₅₀-Werte im niedrigen picomolaren Bereich. Ihre *in vitro*-Aktivitäten sind um das 100- bis 1000-fache höher als die der üblicherweise verwendeten Chemotherapeutika Paclitaxel und Vinblastin. Besonders interessant für die Krebstherapie sind Cryptophycine aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit gegenüber multimedikamenten-resistenten Tumorzelllinien.^[38] Krebszellen bilden häufig im Verlauf der Therapie Resistenzen gegen die eingesetzten Medikamente aus. Eine entscheidende Rolle haben dabei Transmembrantransporter inne, die Fremdstoffe aus der Zelle hinaus schleusen. Das *ABCB1*-(*MDR1*)-Gen zum Beispiel kodiert für das sogenannte P-Glycoprotein (P-gp), das als integraler Bestandteil der Zellmembran den ATP-abhängigen Transport von fremden Substraten aus der Zelle vermittelt.^[39-42] Dies dient dem Schutz der Zelle vor toxischen Substanzen. Das P-gp kommt im menschlichen Körper in vielen Geweben, wie Darm, Niere, Leber und Epithelgewebe, vor. Im Darm wird dadurch die Resorption von Substanzen kontrolliert, während im Gefäßendothel die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke reguliert wird. Das P-gp hat eine geringe Substratspezifität und folglich werden viele strukturell unterschiedliche Arzneistoffe, darunter Chemotherapeutika, Antibiotika sowie Protease-Inhibitoren von der Effluxpumpe aus der Zelle transportiert.^[43] Cryptophycine sind vermutlich aufgrund ihrer unpolaren Struktur schlechte Substrate für das P-gp.^[38,44] Zusätzlich komplexieren Cryptophycine mit einer geringen Reversibilität an Tubulin, was zu einer niedrigen Konzentration an freiem Wirkstoff innerhalb der Zelle führt.^[33]

1.1.2 Struktur-Aktivitäts-Studien

Cryptophycin-52 (**2**) ist aufgrund der ausgeprägten, wenn auch reversiblen, Neurotoxizität nicht als Chemotherapeutikum für die klinische Verwendung geeignet. Zur Steigerung der Tumorselektivität und der Wasserlöslichkeit sowie die damit einhergehende bessere Bioverfügbarkeit wurden zahlreiche synthetische Analoga im Rahmen von SAR-Studien dargestellt. Weiterhin wurde eine vereinfachte Struktur angestrebt, um den synthetischen Aufwand bei der Darstellung des Cryptophycin-Makrocylus bzw. der entsprechenden Fragment-Bausteine zu minimieren und kostengünstiger zu gestalten. Die kostenintensive Synthese von Naturstoffen ist häufig ein limitierender Faktor bei ihrem medikamentösen Einsatz. Das rationale Design von Cryptophycin-Derivaten mit verbesserten Eigenschaften wird durch die fehlenden Röntgenstrukturdaten erschwert, da die exakte Bindungsstelle und die Orientierung der Cryptophycine in dem Tubulin-Wirkstoff-Komplex unbekannt sind. Aus diesem Grund mussten die zur Modifikation geeigneten Strukturelemente experimentell ermittelt werden. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Erläuterung allgemeiner Tendenzen und ausgewählter Beispiele (siehe Abbildung 4, Seite 9), da die durchgeführten SAR-Studien an anderer Stelle schon ausführlich referiert wurden.^[2,10,45-47]

Im Fragment-A-Baustein waren hauptsächlich die Inversion der stereogenen Zentren und Substitutionen am Phenylring Gegenstand der Untersuchungen. Das (*R,R*)-konfigurierte β -Epoxid ist für die hohe Cytotoxizität dieser Substanzklasse essentiell und so resultiert die Inversion eines oder beider Stereozentren in einem signifikanten Aktivitätsverlust.^[9,48,49] Ebenso führt der Ersatz der Epoxidfunktionalität gegen ein Aziridin, Thiiran oder *trans*-Styrol zu einer stark verringerten *in vitro*-Aktivität.^[50] Eine 100-fache Aktivitätsabnahme wird bei der Hydrolyse zum geminalen Diol beobachtet.^[7] Derivate mit Cryptophycin-1 und -52 vergleichbaren *in vitro*-Aktivitäten konnten durch die nucleophile Öffnung des Epoxids mit Halogenwasserstoffen erhalten werden.^[7,51] Insbesondere die Chlorhydrine, wie Cryptophycin-55, zeichneten sich durch ihre um den Faktor 100 bis 1000 erhöhten *in vivo*-Cytotoxizität verglichen mit den epoxidischen Leitstrukturen sowie der verbesserten Pharmakokinetik aus (Abbildung 3).^[52] Der einzige Nachteil der Chlorhydrine besteht darin, dass sie in wässrigen Medien in einer intramolekularen S_N2 -Reaktion zu den epoxidischen Ausgangsverbindungen zurück reagieren und somit ebenfalls stark neurotoxisch sind.^[51,52] Dabei sinkt die Stabilität der Halohydrine mit steigender Ordnungszahl ($\text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$). Eine Lösung dieses Problems bietet die Veresterung der Halohydrin-Hydroxylgruppe mit zum Beispiel Glycin.^[52-54] Die resultierenden Cryptophycin-Glycinate sind in wässrigen Lösungen stabiler und werden vermutlich erst unter physiologischen Bedingungen in die aktiven Verbindungen überführt. Sie können somit als die ersten Proharmazeutika der epoxidischen Cryptophycine angesehen werden. Die höchste Aktivität *in vitro* besitzt der von Cryptophycin-55 abgeleitete Glycinester, die beste *in vivo*-Wirkung geht jedoch von Cryptophycin-249 aus, einem auf Cryptophycin-1 basierendem Analogon (Abbildung 3). Zusätzliche Methylsubstituenten in unterschiedlichen Positionen am A-Fragment-

Phenylring führen zu einer akzeptablen Aktivitätseinbuße.^[50] Polare Substituenten, wie Alkohol- oder Amino-Gruppen, erhöhen die Aktivität der Ausgangsverbindung, indem sie vermutlich deren Wasserlöslichkeit verbessern.^[53,55] Jedoch sind die polar-funktionalisierten Analoga gegenüber MDR-Zelllinien deutlich weniger aktiv und zeigen ein enges therapeutisches Fenster. Dieser Befund ist damit zu erklären, dass die polaren Derivate bessere Substrate für die Effluxpumpe P-gp darstellen und somit vermehrt aus den Zellen transportiert werden. Wird Cryptophycin-1 in uA-C^{4'}-Position mit einem Fluoratom substituiert, führt dieses zu einer 5-fach schwächeren Cytotoxizität. Ein Chlorsubstituent an der gleichen Stelle hat jedoch keine Auswirkungen auf die ursprüngliche Antitumoraktivität.^[10] Des Weiteren ist der C^ε-Methylsubstituent und dessen (S)-Konfiguration für eine hohe Bioaktivität unabdingbar.^[7,49,56]

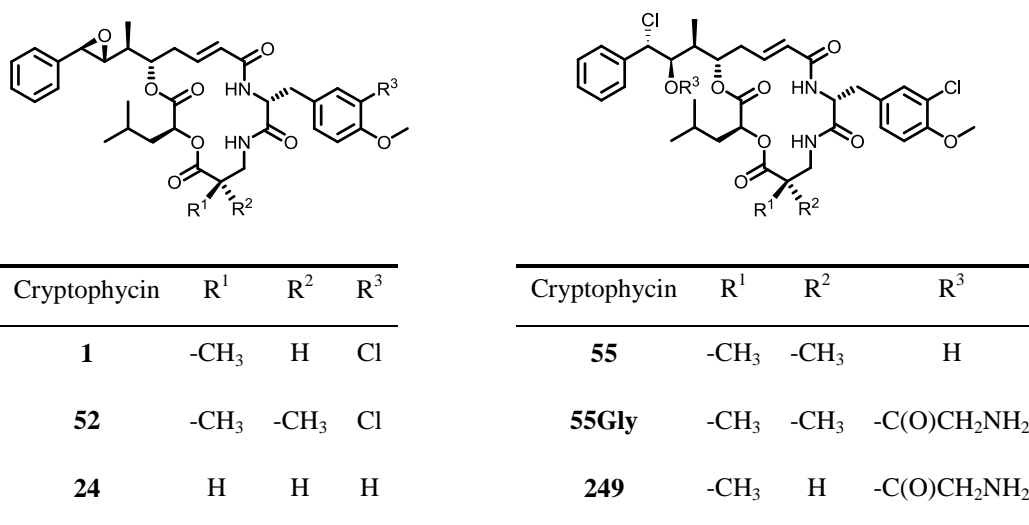


Abbildung 3: Strukturen einiger ausgewählter Cryptophycin-Epoxide und die relevantesten Vertreter der Chlorhydrine sowie Chlorhydrin-Glycinate.

Für eine hohe antimitotische Wirkung ist das native Chlor- und Methoxy-substituierte D-Tyrosin-Derivat als Fragment-B von entscheidender Bedeutung. Schon kleine Veränderungen führen zu einer verringerten Aktivität und bisher konnte kein potenteres Cryptophycin-Analogon durch Modifikationen dieses Bausteins dargestellt werden.^[2,45,52] So resultiert der Einbau eines zweiten Chlorsubstituenten in *ortho*-Position zur *para*-Methoxygruppe in einer Aktivitätsabnahme um den Faktor 350 verglichen mit der Ausgangsverbindung Cryptophycin-52. Wird der ursprüngliche, funktionalisierte Arylrest durch einen Phenylring ersetzt, ist ein 8-facher Rückgang der Bioaktivität zu verzeichnen. Die gleiche Aktivitätseinbuße wird bei dem Austausch des nativen Arylrests von Cryptophycin-1 gegen einen *para*-Methoxyphenylrest gemessen. Besonders drastisch ist der Cytotoxizitätsverlust bei der Inversion der Stereochemie an C^α, d. h. wenn das D-Tyrosin-Derivat gegen das L-konfigurierte Analogon ersetzt wird.^[49] Nahezu inaktive Verbindungen werden erhalten, wenn unpolare Substituenten, die außerdem kein benzylicher Aromat sind, eingeführt werden.^[48]

Neben dem A-Fragment stand der C-Fragment-Baustein im Mittelpunkt der SAR-Studien. Hier wurde überwiegend der Austausch von β^2 -Homoalanin gegen verschiedene achirale $\beta^{2,2}$ -, β^3 - und α -Aminosäuren untersucht.^[57,58] Eine sterisch gehinderte Fragment-C-D-Esterbindung wirkt sich im Allgemeinen günstig auf die Stabilität und somit auch auf die Cytotoxizität aus. In diesem Zusammenhang ist zu nennen, dass Cryptophycin-52 eine höhere *in vitro*-Aktivität besitzt als Cryptophycin-1, das die monomethylierte (*R*)- β -Aminobuttersäure als C-Fragment trägt. Das unsubstituierte Cryptophycin-24 ist noch hydrolyseempfindlicher und besitzt folglich auch eine geringere *in vivo*-Aktivität als Cryptophycin-1.^[59] Wird der Methylsubstituent von Cryptophycin-1 aus der α - in die β -Position verlegt, ist allerdings kein bemerkenswerter *in vitro*-Aktivitätsverlust zu verzeichnen.^[57] Jedoch führen größere Alkylsubstituenten in β -Position zu geringeren Cytotoxizitäten und außerdem sind die α -unsubstituierten Derivate *in vivo* nur marginal aktiv. Bei den α,α -dialkylierten Derivaten nimmt die Aktivität mit länger werdender Alkylkette, sprich sterischem Anspruch, ebenfalls stetig ab.^[58] Eine drastische Aktivitätseinbuße wird durch den Ersatz der nativen β -Aminosäure gegen eine proteinogene L- α -Aminosäure verzeichnet.^[57] Die höher substituierten L-Aminosäuren, wie Valin, Leucin und Phenylalanin, führen zu praktisch inaktiven Analoga. Möglicherweise ist der nun erhaltene 15-gliedrige Makrocyclus weniger flexibel und kann nicht wie der 16-gliedrige Ring die zur effektiven Wechselwirkung mit Tubulin benötigte aktive Konformation einnehmen. Aus den bisherigen Experimenten kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Antitumoraktivität der Fragment-C-Analoga durch zwei Faktoren beeinflusst wird.^[46] Erstens beeinträchtigen große Substituenten aufgrund der starken räumlichen Ausdehnung eine effektive Interaktion der Cryptophycine mit dem Zielmolekül Tubulin. Zweitens verhindert eine eingeschränkte Flexibilität sowie sterische Wechselwirkungen innerhalb des Makrocyclus, dass dieser die erforderliche Konformation annehmen kann. In neueren Untersuchungen wurden chirale β^2 -Aminosäuren mit polaren funktionellen Gruppen in der Seitenkette als Fragment-C eingebaut.^[46,60] Gegenstand dieser SAR-Studien war der Einfluss von polaren Substituenten sowie der Stereochemie an C $^{\alpha}$ auf die Cytotoxizität von Cryptophycinen. Als allgemeines Fazit gilt, je größer die Polarität des resultierenden Analogons, desto geringer ist dessen Bioaktivität. Allerdings konnte durch den Einbau einer (*S*)-konfigurierten Aminosäure mit Allylesterfunktion ein Derivat synthetisiert werden, das *in vitro* sogar aktiver ist als Cryptophycin-52. Im Fall der KB-3-1-Zelllinie war kein einheitlicher Trend zu beobachten, welchen Einfluss die Stereochemie auf die Bioaktivität ausübt, jedoch waren die (*R*)-konfigurierten Epimere gegenüber der MDR-Zelllinie KB-V-1 immer aktiver.

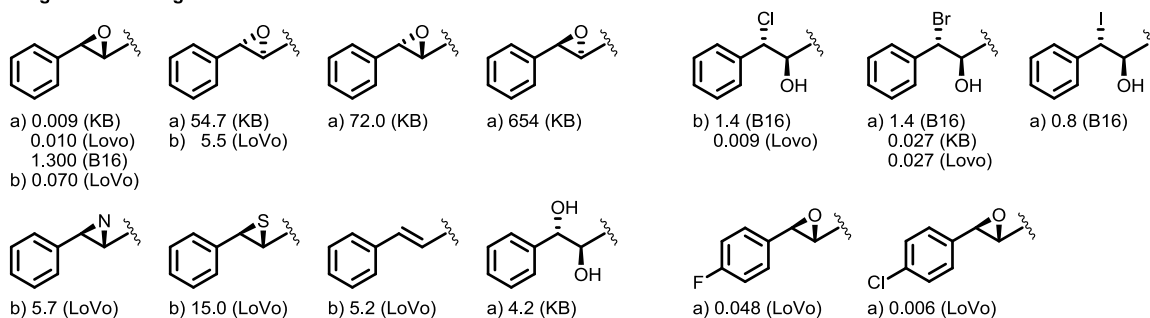
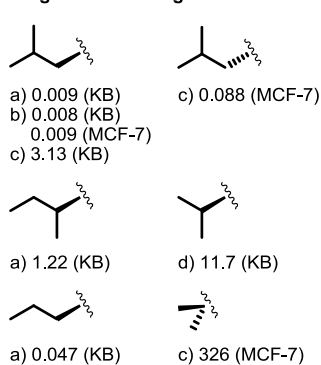
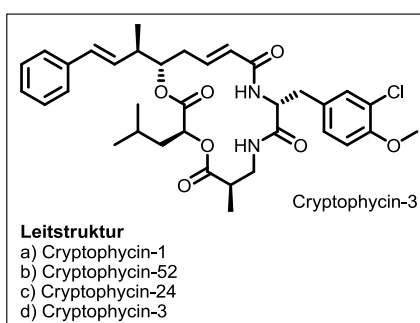
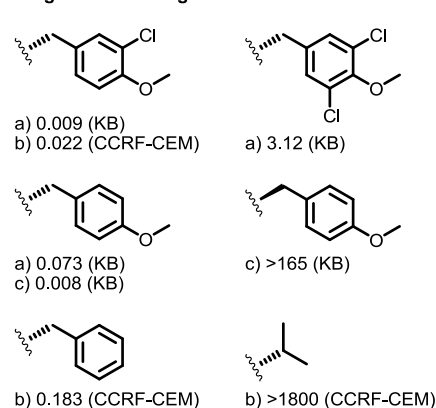
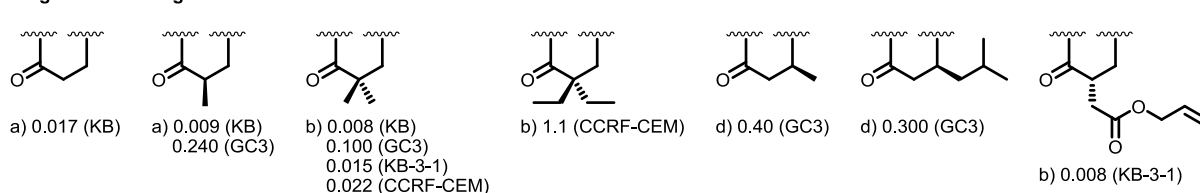
Fragment-A-Analoga

Fragment-D-Analoga

Fragment-B-Analoga

Fragment-C-Analoga


Abbildung 4: Der Einfluss verschiedener Substituenten auf die biologische Aktivität von Cryptophycinen (IC₅₀-Werte in nM). Vergleichbar sind ausschließlich Derivate, die von derselben Ausgangsverbindung abstammen und gegen die gleiche Zelllinie getestet wurden. Zelllinien: KB – humanes Gebärmutterhalskarzinom, LoVo – humanes Dickdarm-Adenocarcinom, CCRF-CEM – humanes T-Zell-Leukämie, GC3 – humanes Dickdarmkarzinom, MCF-7 – humanes Brust-Adenokarzinom.^[2,46,47,60]

Bezüglich des D-Fragment-Bausteins werden verschiedene L-konfigurierte α -Hydroxycarbonsäuren toleriert und so variieren die Alkylseitenketten bei denen aus *Nostoc* sp. isolierten Cryptophycinen. Neben dem am häufigsten vorkommenden *iso*-Butylrest sind auch Analoga mit *seco*-Butyl-, *iso*-Propyl- und *n*-Propylgruppen entdeckt worden.^[7] Während die hier aufgeführten Abweichungen zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Aktivitätsverlust führen, ist ein synthetisches *neo*-pentylsubstituiertes Analogon *in vivo* stärker aktiv.^[16] Die Inversion der Stereochemie wurde nur am Beispiel von Cryptophycin-24 untersucht und keine signifikante Cytotoxizitätseinbuße festgestellt.^[61] Mit Vorbehalten lässt sich sagen, dass das D-Fragment der einzige Cryptophycin-Baustein ist, bei dem ein stereogenes Zentrum ohne starken Aktivitätsverlust invertiert werden kann. Hinweise auf eine direkte Interaktion der Fragment-D-Alkylseitenkette mit Tubulin liefert der Austausch der chiralen gegen eine achirale, α,α -dimethylierte Seitenkette. In diesem Fall ist die Antitumoraktivität um den

Faktor 40 000 reduziert.^[62] Eine unter physiologischen Bedingungen labile CD-Esterbindung kann ausgeschlossen werden und ist daher auch nicht der Grund für die geringe Bioaktivität.

1.2 Fluorierte Pharmazeutika

In der Erdkruste kommt Fluor in gebundener Form als Fluorid relativ häufig vor, wohingegen die Fluoridkonzentration im Meerwasser sehr gering ist. Die wichtigsten Mineralien sind Flussspat (CaF_2) und Kryolith (Na_3AlF_6). Elementares Fluor ist in der Natur aufgrund des hohen Redoxpotentials sehr selten. Die niedrige Konzentration an freien Fluoridionen in der Umwelt verglichen mit Chloridionen ist der Grund für die geringe Anzahl natürlich vorkommender, fluorierter Wirkstoffe, die von Bakterien oder Mikroorganismen produziert werden. Zu den wenigen fluorierten Naturstoffen zählt unter anderem das Antibiotikum Nucleocidin, das aus *Streptomyces calvus* isoliert wurde, jedoch für den klinischen Einsatz zu toxisch ist (Abbildung 5).^[63] Eines der ersten synthetischen fluorierten Pharmazeutika war der antineoplastische Wirkstoff 5-Fluoruracil, der erstmalig 1957 dargestellt und 1962 von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE auf den Markt gebracht wurde. Die Antitumoraktivität dieser Verbindung beruht auf Inhibierung des Enzyms Thymidylat-Synthase und verhindert somit die zelluläre Synthese von Thymidin. Im Gegensatz dazu ist das bromierte Analogon zu groß um in der Biosynthese Uracil zu ersetzen und ist daher inaktiv.

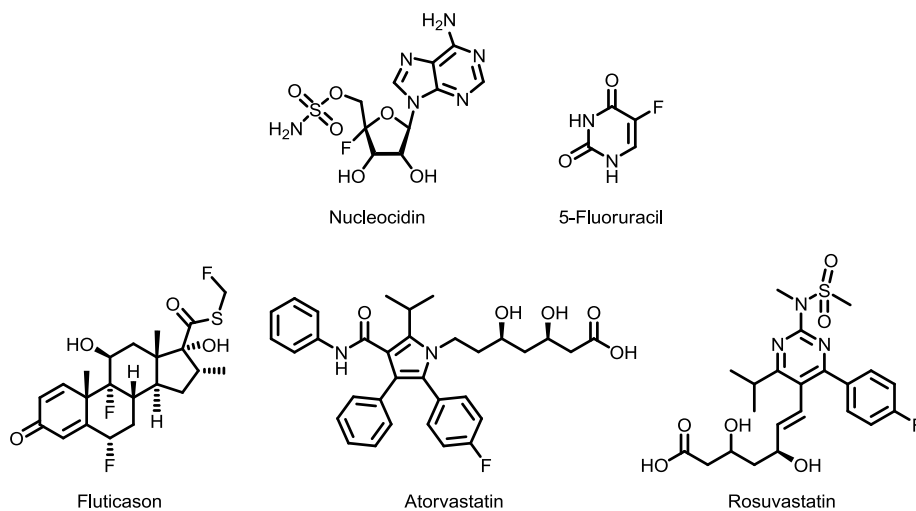


Abbildung 5: Beispiele fluorierter Pharmazeutika: das natürlich vorkommende Antibiotikum Nucleocidin, der erste synthetische Vertreter 5-Fluoruracil, das entzündungshemmende und immunsuppressive Fluticason sowie die Chloesterinsenker Atorvastatin und Rosuvastatin.

Seit der Einführung von 5-Fluoruracil gewinnen fluorierte Wirkstoffe zunehmend an Bedeutung und gegenwärtig enthalten ungefähr 20 % aller Pharmazeutika auf dem Weltmarkt mindestens ein Fluoratom.^[64,65] Mit Fluticason (Axotide[®]), Atorvastatin (Sortis[®] bzw. Lipitor[®]) und Rosuvastatin (Crestor[®]) befanden sich 2011 drei Fluor-haltige Pharmazeutika unter den 10 bestverkauftesten 10

Medikamenten und 7 der 35 im gleichen Jahr neu zugelassenen Wirkstoffe trugen zumindest einen Fluorsubstituenten.^[66]

Wasserstoff kann gegen Fluor aufgrund des ähnlichen van der Waals-Radius ohne signifikante Änderungen der Molekülgröße oder –form ausgetauscht werden,^[67] allerdings hat die starke Elektronegativität von Fluorsubstituenten eine große Auswirkung auf die elektronischen Eigenschaften der Ausgangsverbindung. Durch die Einführung von Fluoratomen kann sowohl die metabolische Stabilität als auch die Pharmakokinetik der Wirkstoffe positiv beeinflusst werden.^[68,69] Auf molekularer Ebene können die Lipophilie, die elektrostatischen Interaktionen sowie der Metabolismus der Wirkstoffe moduliert und verbessert werden.^[70] Darüber hinaus kann die Bioverfügbarkeit gesteigert, die Selektivität für die jeweiligen Rezeptoren erhöht und geringere Dosen ohne Aktivitätsverlust im Vergleich zu den analogen nicht-fluorierten Wirkstoffen verabreicht werden.^[71] Der van der Waals-Radius von Fluor (1.47 Å) ist dem Betrag nach zwischen dem von Wasserstoff (1.20 Å) und Sauerstoff (1.52 Å) einzuordnen, daher kann ein Fluorsubstituent auch eine Hydroxylgruppe nachahmen und ist außerdem in der Lage Wasserstoffbrücken-Bindungen einzugehen.^[72] In der Wirkstoffforschung ist Bioisosterie eine häufig angewandte Methode und bedeutet, dass zwei Moleküle bei identischer räumlicher Ausdehnung eine vergleichbare Wirkung in biologischen Systemen erzielen.^[73] Funktionelle Gruppen, die entweder metabolisch instabil oder zu toxischen Metaboliten abgebaut werden, können durch fluorierte Analoga in ihrer Geometrie, Polarität sowie elektrostatischer Ladungsverteilung nachgeahmt werden. So wird die C-F-Bindung auch dazu genutzt eine C-OMe-Bindung zu ersetzen, während die C-CF₃-Bindung einer Carbonylfunktion ähnelt.^[64,74] Weitere Beispiele für Bioisosterie sind die Fluorvinyl-Gruppe (C=CHF), die als Ersatz einer Amidbindung dienen kann, und die 1,2-Difluor-Substitution, die eine aromatische NO₂-Gruppe mimt (Abbildung 6). Aromatische, sterisch anspruchsvolle Gruppen, wie Chlor-Substituenten, können gegen eine *ortho*-Difluorierung ausgetauscht werden. Weiterhin fungiert die Trifluormethoxy-Gruppe als eine Art „Pseudohalogenid“ und kann ebenfalls aromatische Chlor-Substituenten bei ähnlichem elektrostatischem Potential ersetzen. Jedoch ist die CF₃O-Gruppe sterisch anspruchsvoller.

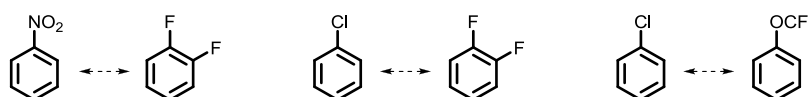


Abbildung 6: Beispiele für Bioisosterie.

Neben einzelnen Fluoratomen sind Trifluormethylgruppen, insbesondere an aromatische Systeme gebunden, die häufigsten Strukturmerkmale, die in der medizinischen Chemie zum Einsatz kommen.^[75] Fluorierte aromatische oder heterocyclische Verbindungen sind in großer Vielzahl kommerziell erhältlich und eignen sich daher als Plattform zur Synthese und Optimierung von Wirkstoffbibliotheken. Gewöhnlich liegt die Anzahl der eingeführten Fluoratome zwischen 1 und 4, einige Wirkstoffe tragen 5 bis 6, es sind aber auch Beispiele mit bis zu 10 Fluoratomen bekannt. Bei

Tafluposide handelt es sich um ein Etoposid-Derivat,^[76] dessen Hydroxylgruppen der Glykosideinheit mit Pentafluorphenoxyessigsäure acyliert wurden (Abbildung 7). Das fluoriierte Cytostatikum, das sich zur Zeit in klinischen Phase I Studien befindet, fungiert nicht als *prodrug* von Etoposid, sondern agiert in einem einzigartigen Wirkmechanismus mit beiden Topoisomerasen I und IIa.^[77,78] Ein Beispiel für ein Chemotherapeutikum mit CF₃-Einheit stellt Fludelon dar, das sich durch seine bemerkenswerte Cytotoxizität und verlängerte Plasmahalbwertszeit *in vivo* verglichen mit dem nicht-fluorierten Analogon auszeichnet. Die konvergente Synthese dieses trifluormethylierten Epothilon-Derivats basiert auf Makroloidbildung durch Ringschlussmetathese (RCM) und kann im Multigramm Maßstab durchgeführt werden.^[79] Die klinischen Studien sind derzeit noch nicht abgeschlossen.^[80]

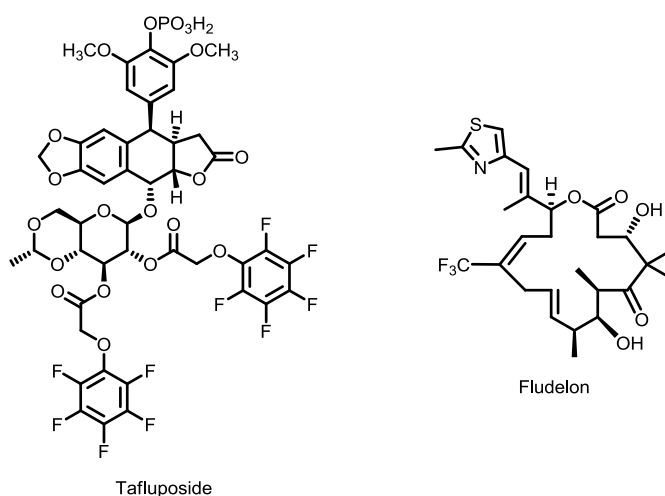


Abbildung 7: Fluorierte Analoga von Antitumoraktiven Naturstoffen. In dem Trifluormethyl-Derivat Fludelon eines Epothilon-Analogons wurde die cytotoxische Wirkung konserviert und gleichzeitig die nicht-spezifischen Nebenwirkungen reduziert, indem der oxidative Abbau beginnend an der C12-C13-Doppelbindung durch die Einführung der CF₃-Gruppe verhindert wurde.

Dieses Cytostatikum ist ein jüngstes Beispiel für das gelungene rationale Design eines Fluor-haltigen Analogons zur selektiven Blockade des oxidativen Abbaus und folglich erhöhter metabolischer Stabilität.^[81] Die Oxidationsempfindlichkeit der olefinischen Struktur konnte durch den Austausch einer Methylgruppe gegen einen Trifluormethyl-Substituenten verringert werden. In vielen Fällen wird die klinische Relevanz der Pharmazeutika durch ihren schnellen Abbau unter physiologischen Bedingungen eingeschränkt. Neben einer verringerten Effizienz kann der Einsatz der Wirkstoffe aufgrund der Entstehung toxischer oder mutagener Metabolite gänzlich verhindert werden.^[70] Die häufigste Ursache für den schnellen Abbau ist der oxidative Metabolismus durch die Enzymfamilie Cytochrom P450 Monooxygenase, die bevorzugt elektronenreiche Strukturelemente, wie Doppelbindungen oder aromatische Systeme, angreift und epoxidische Spezies generiert.^[82] Weitere Stoffwechselprozesse, die durch Cytochrom P450 ausgelöst werden, sind die oxidative Hydroxylierung aliphatischer Verbindungen mit labilen Wasserstoffsubstituenten sowie die oxidative Demethylierung aromatischer Methoxygruppen und Methylaminen. Die selektive Blockade

unerwünschter Abbauwege mittels Fluorierung an den entsprechenden Positionen im Molekül bietet einen Lösungsansatz zur Verbesserung der metabolischen Stabilität. Zusätzlich kann auf diese Weise der Metabolismus, der zur Aktivierung eines *prodrugs* dient, favorisiert werden. Dieses Konzept wurde bei dem Cholesterolabsorption-Inhibitor SCH 48461, einem Medikament zur Behandlung erhöhter Cholesterinwerte im Blut, erfolgreich umgesetzt und so ist die optimierte Verbindung SCH 58235 bis zu 50-mal aktiver als die Leitstruktur (Abbildung 8).^[83] Die Ausgangsverbindung wurde beim *drug design* an den Phenylringen in *para*-Positionen fluoriert, um die Oxidation durch Cytochrom P450 zu minimieren. In diesem Zusammenhang sind auch die Paclitaxel- und Docetaxel-Derivate zu erwähnen, die in C3'-Position eine CF₃- oder CF₂H-Gruppe tragen und deren Aktivität die der Ausgangsverbindungen bis zu drei Größenordnungen übersteigt. Zusätzlich konnten OJIMA *et al.* in metabolischen Studien nachweisen, dass diese fluorierten Taxoide die Funktion von Cytochrom P450 verhindern.^[84]

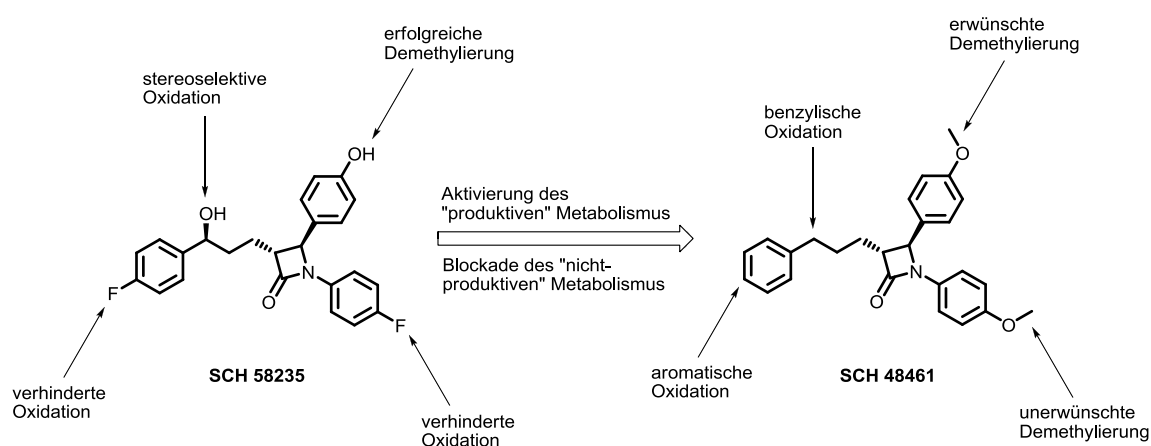


Abbildung 8: Durch Blockade des unerwünschten Stoffwechselwegs mittels Fluorierung an adäquaten Positionen in der Leitstruktur wird der gewünschte Metabolismus begünstigt und ein aktiveres Analogon erhalten. Diese Abbildung wurde entnommen aus GOUVERNEUR *et al.*^[85]

Des Weiteren können Fluorsubstituenten den Wirkmechanismus von Enzyminhibitoren auf verschiedene Weise beeinflussen und somit deren Effizienz steigern. Zum einen ahmen die Fluoratome andere funktionelle Gruppen nach, zum anderen wird die Konformation des Inhibitors aufgrund von stereoelektronischen Effekten verändert.^[74] Bei sogenannten *suicid*-Inhibitoren entstehen durch die Fluorierung Analoga mit neuartigen Wirkmechanismen, die häufig zu einer irreversiblen Enzyminhibierung führen. Zunächst ahmt der *suicid*-Inhibitor das natürliche Substrat nach und die ersten Schritte der enzymatischen Reaktion werden nach Bindung an das aktive Zentrum durchgeführt. Jedoch entsteht in deren Verlauf eine Spezies, die das Enzym irreversibel hemmt. Daher werden diese Substanzen auch als „Mechanismus-gestützte Inhibitoren“ bezeichnet. Für die Krebstherapie sind diese Wirkstoffe von besonderem Interesse, da schnell proliferierende Zellen meist hochaktive Enzyme besitzen und die *suicid*-Inhibitoren ihre Wirkung ausschließlich im aktiven Zentrum des Enzyms entfalten. Das bekannteste Beispiel dieser fluorierten Pseudosubstrate ist das bereits oben

erwähnte 5-Fluoruracil (Abbildung 5), dessen irreversible Enzymblockade damit erklärt werden kann, dass das eingeführte Fluoratom nicht an einer Protonentransferreaktion in dem Enzym-Inhibitor-Komplex teilnehmen kann. Zur Eliminierung des Enzyms müsste das Substrat in Position 5 deprotoniert werden. Der eingeführte Fluorsubstituent hingegen ist nur dazu befähigt, als Fluoridanion eliminiert zu werden. Aufgrund dessen kann das Substrat nicht aus dem Komplex abgespalten werden.

1.3 Tumor targeting und prodrugs

Der Therapieansatz der traditionellen Chemotherapie basiert auf der erhöhten Proliferationsrate von Tumorzellen verglichen mit physiologischem Gewebe.^[74,86] Folglich sollten ausschließlich Krebszellen von cytotoxischen Wirkstoffen abgetötet werden. In der Realität sind die verwendeten Cytostatika, wie Paclitaxel, Mitomycin C und Doxorubicin, nur geringfügig bis gar nicht tumorselektiv und so kommt es zu einer systematischen Toxizität und unerwünschten Nebenwirkungen (Abbildung 9). Dadurch wird die tolerierte Dosis der Cytotoxine erheblich herab gesetzt, so dass sie nicht mehr in ausreichenden Mengen verabreicht werden können. Allerdings ist die hoch dosierte Gabe der Chemotherapeutika für eine erfolgreiche Therapie notwendig, damit der Tumor vollständig abgetötet wird und die Gefahr eines Rückfalls ausgeschlossen werden kann.

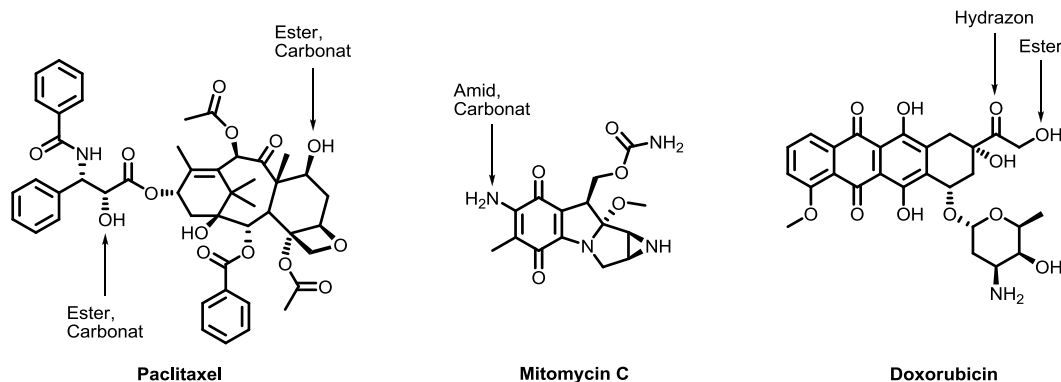


Abbildung 9: Strukturen der cytotoxischen Wirkstoffe Paclitaxel, Mitomycin C und Doxorubicin, sowie deren Derivatisierungsmöglichkeiten zum Aufbau von *prodrugs*.^[86]

Neben der Synthese von effektiveren und eventuell selektiveren Wirkstoffderivaten im Rahmen von SAR-Studien kann die Tumorselektivität durch den Einsatz von sogenannten *prodrugs* verbessert werden. Unter diesem englischen Begriff versteht man Propharmazeutika, die sich aus dem aktiven Wirkstoff, einem geeigneten Linkersystem und einer Tumorerkennungssequenz (*targeting group* bzw. *homing device*) zusammensetzen (Abbildung 10). Dabei sollte das intakte *prodrug* inaktiv bzw. die Aktivitätsdifferenz zwischen freiem Wirkstoff und Konjugat so hoch wie möglich sein. Dieses setzt einen unter physiologischen Bedingungen stabilen Linker voraus, der jedoch nach Aufnahme des Konjugats in die Tumorzellen gespalten wird und den aktiven Wirkstoff freisetzt. Mit Hilfe der

targeting group können die Tumorzellen selektiv adressiert werden ohne dass gesunde Zellen durch die Chemotherapeutika zerstört werden, dieses wird als *tumor targeting* bezeichnet. Hierbei werden die morphologischen und physiologischen Unterschiede zwischen Tumor- und gesundem Gewebe genutzt. Tumore haben einen erhöhten Nährstoff- und Vitaminbedarf und überexprimieren aufgrund dessen häufig zahlreiche Tumor-spezifische Rezeptoren, deren Liganden als *targeting group* für entsprechende *drug-delivery*-Systeme genutzt werden können.



Abbildung 10: Schematische Darstellung eines *prodrugs* und die Bindung an einen Tumor-spezifischen Rezeptor einer Krebszelle.

Während bei kleinen Tumoren die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über Diffusion erfolgt, wird der gesteigerte Bedarf von wachsenden Tumoren zusätzlich durch die Ausbildung neuer Blutgefäße sichergestellt, die sogenannte Angiogenese. Diese wird durch die vermehrte Ausschüttung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) induziert. Dieser Wachstumsfaktor wird unter anderem bei dem anti-angiogenetischen Therapieansatz zur Verhinderung der Gefäßneubildung durch einen VEGF-neutralisierenden monoklonalen Antikörper (Bevacizumab) adressiert.^[87-89] Wird die Angiogenese und somit die ausreichende Nährstoff- und Sauerstoffversorgung unterbunden, bleibt das Wachstum eines Tumors auf eine symptomlose und klinisch nicht relevante Größe beschränkt.^[90] Somit ist die Hypervaskularisation, die übermäßige Gefäßbildung mit gesteigerter Durchblutung, ein Indiz für maligne Tumore. Die neugebildeten Blutgefäße unterscheiden sich von denen des gesunden Gewebes und weisen Mängel in Form und Aufbau auf (Abbildung 11). In Tumoren haben die Endothelzellen der Kapillargefäße deutlich größere Öffnungen (Fenestrierungen) und daher können Makromoleküle leichter in das Tumorgewebe eindiffundieren (*permeation*). Zusätzlich wird die Gewebedurchlässigkeit aufgrund der gesteigerten Produktion von Verbindungen, wie Stickstoffmonoxid, VEGF, Prostaglandine und Matrix Metalloproteinasen, erhöht. Auf der anderen Seite hat auch das lymphatische System von Tumoren Mängel und folglich ist eine effiziente Lymphdrainage, d. h. der Abtransport der eindiffundierten Materialien, nicht gegeben (*retention*). Die gesteigerte Gefäßdurchlässigkeit und das erhöhte Rückhaltevermögen für eindiffundierte Makromoleküle wird als EPR-Effekt (engl.: *enhanced permeability and retention effect*) bezeichnet. Da die Anreicherung von Makromolekülen im Tumorgewebe keinen spezifischen Rezeptor benötigt, kann der EPR-Effekt zur passiven gezielten Pharmakotherapie genutzt werden. Als makromolekulare Wirkstoffträger eignen sich sowohl biokompatible Polymere, Liposome und Nanopartikel als auch das globuläre Protein Albumin. Oberhalb einer Molekülgröße von 20 kD ist dieser EPR-Effekt möglich. Des Weiteren können

Wirkstoffe dieser Größe nicht über den Harn ausgeschieden werden und haben eine höhere Verweildauer in Blutkreislauf als die niedermolekularen Cytotoxine, die bei der konventionellen Chemotherapie eingesetzt werden. Deren Molekülgröße liegt unterhalb der Nierenschwelle und folglich werden sie in der Niere von Blut abgetrennt und rasch über den Harn ausgeschieden (*renal clearance*). Ein weiterer Nachteil der niedermolekularen Wirkstoffe besteht darin, dass sie auch in gesundes Gewebe eindiffundieren können und sich somit gleichmäßig im Körper verteilen. Dies führt zu den bekannten Nebenwirkungen und der begrenzten Wirkstoffdosis.

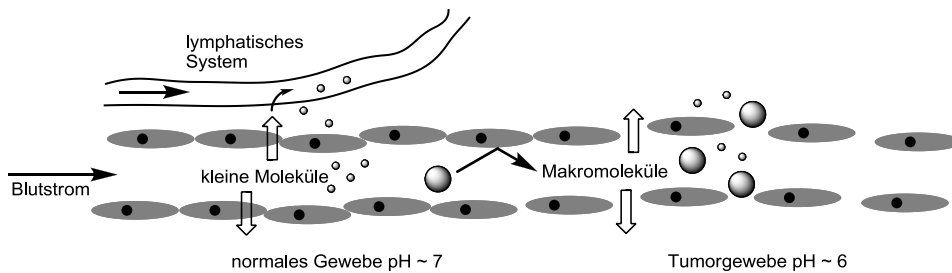


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines an gesundes und tumorales Gewebe grenzenden Blutgefäßes. Während die Epithelzellen des gesunden Gewebes intakt sind, sind sie im Tumor fenestriert, so dass Makromoleküle eindringen können.

1.3.1 Die Tumorerkennungseinheit

Im Gegensatz zu dem passiven *tumor targeting* durch Ausnutzen des EPR-Effekts bei makromolekularen Wirkstoffformulierungen, erfolgt die Tumorerkennung bei den oben genannten *prodrugs* mittels aktiven Transports zu den Tumorzellen. Diese Arzneistoffträgersysteme können anhand der Tumorerkennungseinheit klassifiziert werden. Hierzu zählen unter anderem monoklonale Antikörper, Folsäure und Oligopeptide, zu denen die integrinbindenden RGD-Peptide gehören. Auf diese drei Kategorien wird im Folgenden kurz eingegangen.

Tumorzellen überexprimieren auf ihren Zelloberflächen zahlreiche Antigene, an die entsprechende Antikörper spezifisch binden und somit Tumore von normalem Gewebe unterschieden werden können. Fünf Antikörper sind derzeit von der FDA für die Tumortherapie zugelassen.^[91-93] Zusätzlich befinden sich zahlreiche Antikörper in der Pipeline der pharmazeutischen Industrie und werden gegenwärtig hinsichtlich ihres Einsatzes in der Krebstherapie untersucht. Bei den zugelassenen Immunglobulinen handelt es sich um Trastuzumab (Herceptin[®]), Alemtuzumab (Campath[®]), Rituximab (Rituxan[®]), Bevacizumab (Avastin[®]), Cetuximab (Erbix[®]). In sogenannten *antibody-drug-conjugats* (ADCs) fungieren monoklonale Antikörper (mAbs) als Tumorerkennungssequenz und transportieren die gebundenen Wirkstoffmoleküle zu den Tumorzellen (Abbildung 12).^[94-96] Durch Bindung des Antikörpers an das Antigen auf der Zelloberfläche wird das gesamte Konjugat endocytiert und der Wirkstoff nach Abbau des Antikörpers bzw. nach Spaltung des Linkers frei

gesetzt. Auf der einen Seite begünstigt das hohe Molekulargewicht von ADCs aufgrund des EPR-Effekts eine Akkumulation in dem Tumorgewebe. Auf der anderen Seite erschwert die molekulare Ausdehnung der Konjugate das Eindringen in solide Tumore. Aus diesem Grund und angesichts der hohen Kosten bei der ADC-Produktion werden neuerdings auch Antikörperfragmente und Affibodys, künstliche Peptide die zur Antigen-Bindung befähigt sind, auf ihre Eignung in Immunokonjugaten geprüft.^[86,97] Die in ADCs eingesetzten Cytostatika müssen hochgradig toxisch sein, da nur eine geringe Anzahl an Molekülen mit dem Antikörper gekoppelt werden können, um die Bindungsaffinität des mAbs nicht zu beeinträchtigen.^[95] Auch die begrenzte Expression von Antigenen auf den Tumorzellen ist ein limitierender Faktor. Seit KÖHLER und MILSTEIN^[98] 1975 die Herstellung monoklonaler Antikörper publizierten nahm der Forschungsumfang auf diesem Gebiet stetig zu. Mit Mylotarg[®] (Gemtuzumab-Ozogamicin) wurde im Jahre 2000 das erste *prodrug* basierend auf mAbs durch die FDA für die klinische Tumortherapie zugelassen, das allerdings 2010 wieder vom Markt genommen wurde.^[97] Das einzige derzeit von der FDA zugelassene Immunokonjugat ist Adcetris[®], jedoch sind weitere ADCs in der klinischen Prüfung.

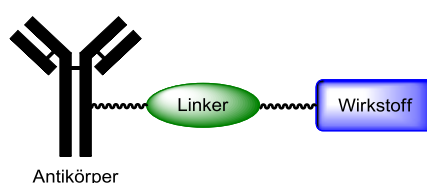


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines ADCs.

Im Zusammenhang mit den ADCs ist auch die *antibody-directed enzyme prodrug therapy*, kurz ADEPT, zu nennen. Hierunter versteht man die von BAGSHAW^[99] und SENTER^[100] entwickelte zweistufige Strategie zur gezielten Tumortherapie (Abbildung 13). Dabei wird zuerst ein Antikörper-Enzym-Konjugat intravenös verabreicht.^[101-103] Das körperfremde Enzym wird durch den gebundenen Antikörper selektiv zu den Tumorzellen transportiert und dient dazu das im zweiten Schritt applizierte *prodrug* zu aktivieren. Das nicht-toxische *prodrug* wird systematisch verabreicht und erst durch die Enzyme, die sich auf den Tumorzelloberflächen befinden in die aktive Spezies überführt.

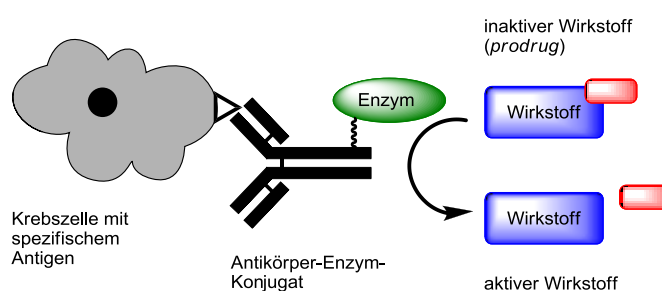


Abbildung 13: Prinzip der Wirkstoffaktivierung bei der ADEPT-Strategie. Zuerst wird ein Antikörper-Enzym-Konjugat an die Tumorzelloberfläche gebracht, dann wird der inaktive Wirkstoff verabreicht, der im Tumorgewebe durch das Enzym aktiviert wird.

Die idealen Wirkstoffkomponenten für diese Strategie sind kleine Moleküle, die in der Lage sind, sich im Tumorgewebe auszubreiten. Dadurch können auch Tumorzellen in der nahen Umgebung, die selbst keine mAb-Enzym-Konjugate gebunden haben, abgetötet werden (*bystander effect*). Eine große Schwierigkeit bei der Anwendung dieser Strategie besteht darin, die optimale Zeitspanne zwischen der Vergabe des Konjugats und des *prodrugs* zu identifizieren. Bei der Injektion des inaktiven Wirkstoffs sollte der mAb-Enzym-Komplex ausschließlich im Tumor und nicht im Blut oder gesundem Gewebe angereichert sein, um eine systematische Toxizität auszuschließen. Zusätzliche Voraussetzungen sind zum einen, dass das Enzym seine maximale Aktivität bei dem pH-Wert haben muss, der in der extrazellulären Flüssigkeit des Tumors vorliegt. Zum anderen sollte das Enzym kein humanes Homologon besitzen, um eine *prodrug*-Aktivierung außerhalb des Tumors zu vermeiden. Einige ADEPT-Systeme befinden sich zurzeit in klinische Phase I Studien und zeigten erste Erfolge, die indizieren, dass diese Strategie möglicherweise eine wirksame Therapie für solide Tumore ist.^[74]

Folsäure, auch Folat genannt, gehört zu der Vitamin B-Familie und ist durch Teilnahme an der Nukleinbasen-Biosynthese an der Neubildung von Zellen beteiligt. Dieses Vitamin ist aus einem Pterinderivat, *p*-Aminobenzoesäure und L-Glutaminsäure aufgebaut, wobei die Einheit aus Pterin und *p*-Aminobenzoesäure auch als Pterinsäure bezeichnet wird (Abbildung 14). Die Aufnahme von

Folsäure in die Epithelzellen erfolgt durch Rezeptor-medierte Endocytose.^[104] Es gibt zwei Membran-gebundene Folsäure-Rezeptoren (FR), FR- α und FR- β , die beide Folsäure mit hoher Affinität ($K_D < 1$ nM) binden.^[105] Diese Folsäure-Rezeptoren sind als zelluläre Zielstrukturen gut geeignet, da ihre Expression in gesundem Gewebe niedrig, aber bei vielen humanen Tumorarten, besonders dem

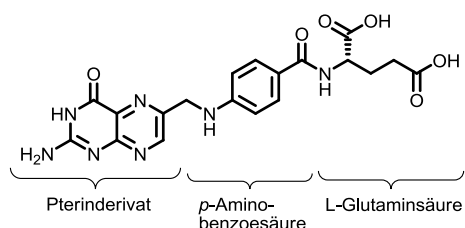


Abbildung 14: Folsäure.

Ovarialkarzinom und dem Gebärmutterkrebs, erhöht ist. Außerdem nimmt die FR-Dichte auf den Tumorzelloberflächen mit der Größe des Tumors stetig zu. Folsäure wurde sowohl bei Wirkstoffen mit niedrigem Molekulargewicht als auch bei makromolekularen Komplexen als Tumorerkennungseinheit genutzt. Die cytotoxische Spezies sind bei den niedermolekularen Konjugaten häufig Paclitaxel, Maytansin und Mitomycin C. Zum Beispiel verknüpften LADINO *et al.*^[106] bei dem Maytansin-Derivat DM1 den Wirkstoff mit der *targeting*-Einheit über eine Disulfidbrücke. Dieses Konjugat zeigte eine hoch spezifische Affinität für FR und erwies sich als hoch potent gegenüber einer Vielzahl an Tumorzelllinien. In Zelllinien, die den Folsäure-Rezeptor nicht exprimieren, war das Konjugat ungefähr 100-mal weniger aktiv als in den FR-positiven Zelllinien. Der Forschungsschwerpunkt liegt jedoch bei den makromolekularen Konjugaten, die Folsäure als *targeting group* enthalten, da diese die FR in der Niere nicht erreichen können und somit keine renale Toxizität auftritt. Als Trägersysteme werden hier Liposome,^[107] polymere Micellen,^[108] synthetische Polymere^[109] und Nanopartikel^[110] genutzt. Zusätzlich werden Folsäure-Antagonisten als cytotoxische

Reagenzien eingesetzt. Der bekannteste Vertreter dieser Antitumorwirkstoffe ist Methotrexat, der bei dem Mammakarzinom und der akuten lymphatischen Leukämie angewandt wird.^[111]

Peptide sind aufgrund der einfachen Synthese, der strukturellen Simplizität und der geringen immunogenen Aktivität vielversprechende Tumorerkennungseinheiten.^[112] Darüber hinaus erleichtert das Screening von kombinatorischen Bibliotheken das Auffinden hoch-affiner Peptidsequenzen. Die zellulären Ziele dieses Therapieansatzes sind verschiedene Tumorzelloberflächen-Rezeptoren, wie zum Beispiel die Integrine. Hierbei handelt es sich um ubiquitäre, heterodimere Transmembranproteinen, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Integrine sind für die Zell-Zell-Adhäsion sowie der Bindung von Proteinen der extrazellulären Matrix zuständig.^[113] Des Weiteren sind sie an der intrazellulären Signalweiterleitung und Geneexpression, die ihrerseits in den Zellwachstum und -migration involviert sind, beteiligt. Bei einer fehlerhaften Regulation dieser Prozesse kann dieses zur Entstehung von bösartigen Gewebeschwüsten führen. Es existieren mehrere Subtypen dieses Rezeptors, wobei das Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine besondere Rolle bei der Tumorthherapie spielt, da dieses von einigen Tumorarten überexprimiert wird.^[114] Ebenfalls exprimieren aktivierte Endothelzellen diesen Rezeptor, wobei er auf nicht aktivierten Endothelzellen und anderem Gewebe fast nicht zu finden ist.^[115] Tumore leiten zu ihrem Wachstum die Angiogenese ein und aktivieren zu diesem Zweck die umgebenden Endothelzellen. Daher kann das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auch dann als Zielstruktur für ein entsprechendes *prodrug* genutzt werden, wenn die vorliegende Tumorart diesen Rezeptor nicht exprimiert.^[116] Nach Bindung des Peptid-Liganden an den Rezeptor wird die Angiogenese abgebrochen. Peptide mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) binden an viele Integrine und sind daher als *targeting group* für die zielgerichtete Tumorthherapie geeignet (Abbildung 15).^[117] Durch Modulation der Peptidstruktur kann die Spezifität dieser Liganden variiert werden und somit selektiv bestimmte Integrine adressiert werden.^[118] Bewährt haben sich cyclische Penta- und Hexapeptide, die stabiler und selektiver als ihre linearen Analoga sind.^[119] Die Affinität der Arzneistoffträgersysteme kann zusätzlich durch das Einbringen zweier oder mehrerer RGD-Motive gesteigert werden.^[120] In diesem Zusammenhang berichten CHEN *et al.* über die integrin-spezifische Akkumulation *in vivo* eines dimeren RGD-Peptid-Paclitaxel-Konjugats.^[121] Bereits 1998 lieferten COLIN *et al.* den ersten Beweis, dass die Aufnahme der RGD-Peptide und davon abgeleiteten Konjugate nach Bindung an Integrin $\alpha_v\beta_3$ mittels Rezeptor-mediierter Endocytose erfolgt.^[122]

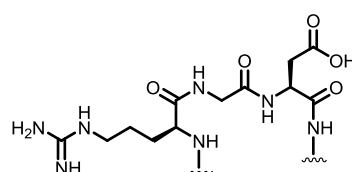


Abbildung 15: RGD-Sequenz (-Arg-Gly-Asp-).

1.3.2 Der Linker

Auch die Wahl des Linkersystems will wohl überlegt sein und so sollte ein geeigneter Linker folgende Kriterien erfüllen. Zum einen muss der Linker im Blutkreislauf stabil sein, zum anderen muss er schnell und effizient im Tumorgewebe gespalten werden.^[123] Dazu sollte der Linker im *prodrug* für ein entsprechendes Enzym leicht zugänglich sein. Ist das Linkerkonstrukt unter den im Tumor herrschenden Bedingungen zu stabil, würde der Wirkstoff nicht in ausreichenden Mengen freigesetzt werden und eine verringerte oder ineffiziente Cytotoxizität wäre die Folge. Die am meisten verwendeten Linkersysteme können anhand ihres Spaltmechanismus in verschiedene Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 16), wobei die Auswahl eines adäquaten Linkers durch die Tumorart und dem jeweiligen Wirkstoff bestimmt wird.

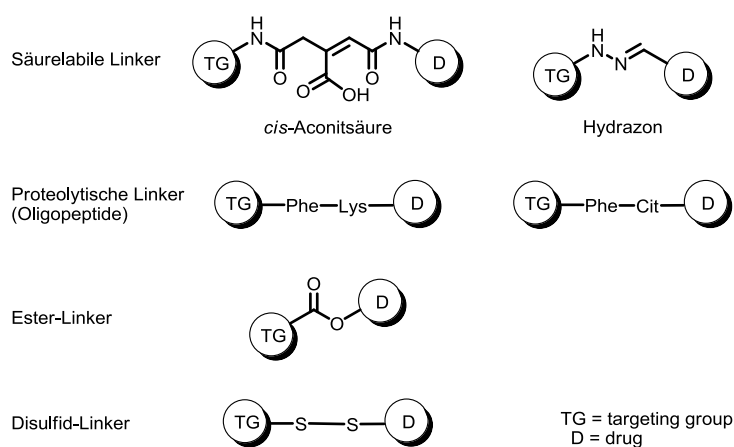


Abbildung 16: Strukturen der verschiedenen Linkersysteme.

Unter den säurelabilen Linkern haben sich *cis*-Aconitsäure^[124,125] und Hydrazonderivate^[126-128] bewährt. Zudem wurden pH-abhängige Sollbruchstellen durch Trityl-Spacer,^[129] *N*-Alkoxyalkylimidazole,^[130] und Imine^[131,132] realisiert. Diese Verbindungen zersetzten sich unter sauren Bedingungen ($\text{pH} \leq 5$), wie sie zum Beispiel in Endosomen und Lysosomen vorliegen, und geben den Wirkstoff mittels nicht-enzymatischer Hydrolyse frei. Die Rezeptor-vermittelte Internalisierung von *prodrugs* in die Lysosome von Tumorzellen kann zusätzlich genutzt werden, um die Linkereinheit durch nur dort vorhandene Enzyme zu spalten. Diese „sauren Proteasen“ gehören überwiegend zu den Cathepsinen und Exopeptidasen. In diesem Fall werden häufig kurze Peptid-Linker mit zwei bis fünf Aminosäureresten eingesetzt^[133] zu denen unter anderem das Tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly^[134] sowie die Dipeptide Phe-Lys und Val-Citrulline (Cit)^[135] zählen. Ester-Linker sind ebenfalls pH-sensitiv oder werden durch Lipasen *in vivo* hydrolysiert. Die hohe Labilität dieser Linkerkategorie schränkt ihre Verwendung auf sterisch gehinderte sekundäre Alkohole ein. In diesem Zusammenhang entwickelten SAFAVY *et al.* ein Paclitaxel-C225-Immunokonjugat, indem der Antikörper mittels Esterbindung über eine Bernsteinsäure als Platzhalter (engl.: *spacer*) mit der C2'-Hydroxylgruppe des Wirkstoffs verknüpft wurde.^[136] Sowohl die Stabilität als auch die *in vivo*

Cytotoxizität konnten durch Einbau eines Glutarsäure-*spacer* verbessert werden.^[137] Besonders im Falle der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate haben sich die Disulfid-Linker etabliert, da sie sich durch eine hervorragende Effizienz verglichen mit anderen Linkersystemen auszeichnen.^[138] In der Zelle werden die Disulfid-Linker durch Disulfid-Austausch mit intrazellulären Thiolen, wie zum Beispiel dem Glutathion, gespalten. Die Glutathion-Konzentration ist in Zellen höher als im Serum,^[139,140] wobei Tumore wiederum eine höhere Konzentration als gesunde Zelle haben.^[141] Um eine vorzeitige Spaltung der Linker im Blutkreislauf zu unterbinden, werden gewöhnlich sterisch gehinderte Disulfide verwendet.

Eine neuartige Linkerkategorie, die in den letzten Jahren intensiv erforscht wurde, sind die selbsteliminiierenden Linker (engl.: *self-immolative linker*). Die entsprechenden *prodrugs* bestehen aus drei Komponenten, dem Wirkstoff, dem Linker und einer tumorspezifischen Sollbruchstelle bzw. Auslöser (engl.: *trigger*) (Abbildung 17). Die Spaltungsreaktion erfolgt im Tumorgewebe selektiv zwischen der Sollbruchstelle und der Linkereinheit und generiert ein Wirkstoff-Linker-Derivat, das infolge spontaner Eliminierungs- oder Cyclisierungsreaktionen den aktiven Wirkstoff freisetzt.^[142] Bevorzugt eingesetzt werden die auf einem Eliminierungsmechanismus basierenden Systeme, da sie häufig eine schnellere Wirkstoff-Freigabe zeigen.^[143-145]

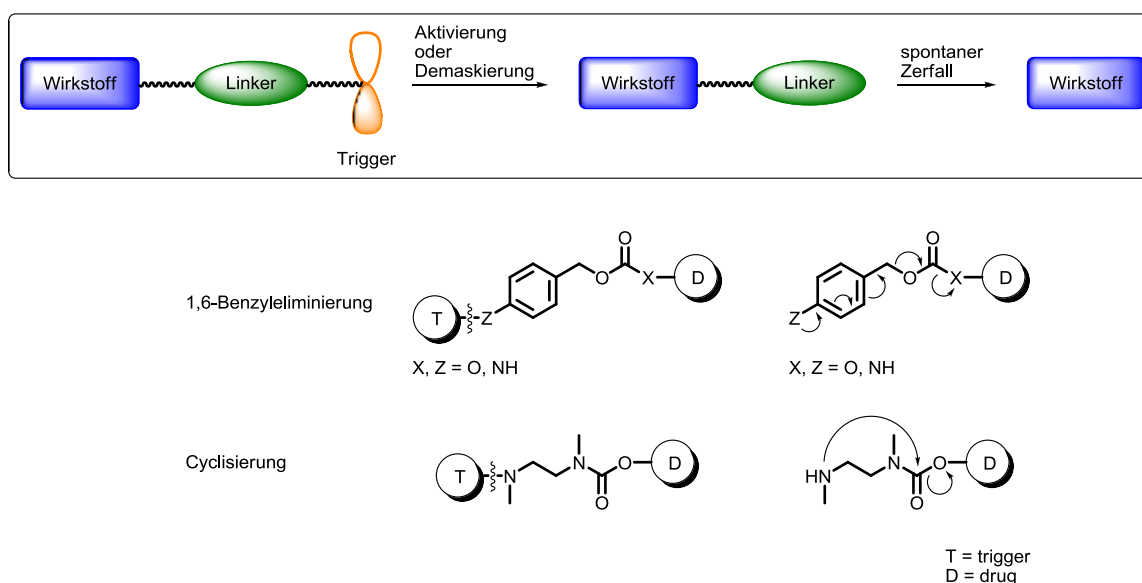


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines selbsteliminiierenden *prodrugs* sowie Beispiele für labile Linkersysteme und der zugehörige Spaltungsmechanismus.

Deren bekanntester und am meisten verwendete Vertreter ist der *p*-Aminobenzoyloxycarbonyl- (PABC-) Linker, der erstmalig 1981 von KATZENELLENBOGEN *et al.*^[146] in die Literatur eingeführt wurde. Die aromatische Aminofunktion wird beispielsweise als Nitrogruppe, Azid oder mittels Acylierung maskiert, so dass eine Eliminierung unter physiologischen Bedingungen nicht erfolgen kann. Erst nach Reduktion,^[147,148] enzymatischer Spaltung^[149,150] oder Staudinger-Reaktion^[151] wird der selbsteliminiierende Linker zur spontanen Zerlegung aktiviert, wobei die Freisetzung des gebundenen

Wirkstoffs auf einer 1,6-Benzyl-Eliminierung beruht (Abbildung 18).^[152] Die Dreikomponenten-Verbindung **A**, bestehend aus Wirkstoff, PABC-Linker und *trigger*, wird nach Abspaltung des Letzteren in das vinyloge Halbaminal **B** überführt.^[153] Im wässrigen Milieu erfolgt spontan eine 1,6-Benzyl-Eliminierung des Linkersystems und als instabile Zwischenprodukte werden ein Carbamin- bzw. Kohlensäurederivat der Wirkstoffkomponente und ein Chinoidderivat (*p*-Iminoquinomethan) gebildet, welches in einer Additionsreaktion mit Wasser *p*-Aminobenzylalkohol **C** ergibt. Der aktive Wirkstoff **D** wird durch Abspaltung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) generiert.

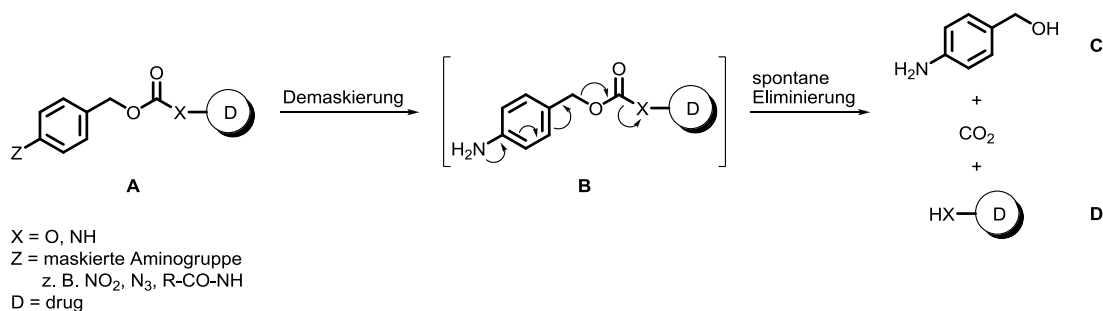


Abbildung 18: Eliminierungsmechanismus des PABC-Linkers nach Aktivierung.

2 Zielsetzung

Cryptophycine sind hochgradig cytotoxische Naturstoffe und daher wird diese Substanzklasse als Chemotherapeutikum in Betracht gezogen. Allerdings scheiterte bislang ihr Einsatz in der Krebstherapie aufgrund der hohen Neurotoxizität.^[12,15] Cryptophycine binden mit hoher Affinität an Tubulin, wobei eine nicht-kovalente Koordination angenommen wird.^[25] Da das Epoxid in wässrigen Lösungen langsam zum vicinalen Diol reagiert,^[154] soll diese Funktionalität mit dem Ziel, ein stabileres Cryptophycin-Derivat zu generieren, gegen einen Cyclopropanring ausgetauscht werden. Bei Epothilonen wurde dieses bereits erfolgreich umgesetzt.^[155-158] Epothilone sind ebenfalls Mitoseinhibitoren, die im Gegensatz zu Cryptophycinen die Mikrotubuli stabilisieren und so deren Abbau verhindern.^[159] Die Epothiloncyclopropane waren sowohl in Tubulinpolymerisations- als auch in Cytotoxizitätsassays hoch aktiv.^[155-158] Dieses stützt die Vermutung, dass die Epoxidfunktionalität zumindest im Falle der Epothilone eine konformationelle Rolle spielt und das Epoxidsauerstoffatom für die biologische Aktivität nicht erforderlich ist. In der geplanten Syntheseroute soll die Cyclopropaneinheit mittels asymmetrischer Simmons-Smith-Reaktion stereoselektiv eingeführt werden. Ausgehend vom cyclopropanierten Fragment-A-Baustein soll der Cryptophycin-Makrocyclus analog zu den bekannten Vorschriften aufgebaut werden.

Fluorierte, biologisch relevante Moleküle spielen eine bedeutende Rolle sowohl in der medizinischen Chemie, Pharmakologie und Arzneimittelforschung als auch in der Diagnostik und Therapie.^[69,75] Durch die Einführung von Fluorsubstituenten lassen sich die metabolische Stabilität, die Bioverfügbarkeit und die Protein-Ligand-Wechselwirkungen von Wirkstoffen positiv beeinflussen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist demzufolge die Synthese von fluorierten Cryptophycinen. Selektive Fluorierungsreaktionen gebrauchen häufig schädliche Reagenzien, wie elementares Fluor oder Fluorwasserstoff bzw. sehr teure Fluorierungsmittel, wie Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST). Um den synthetischen Aufwand bei diesem Projekt möglichst gering zu halten, soll die Darstellung der Fluor-haltigen Fragmente-Bausteine daher auf kommerziell erhältlichen, fluorierten Edukten basieren und die bewährten Synthesesequenzen für die entsprechenden Fragment-Bausteine sollen beibehalten und optimalerweise verkürzt werden.

Das Ziel zahlreicher SAR-Studien bestand unter anderem darin potentere Cryptophycin-Analoga zu synthetisieren sowie ihre Spezifität gegenüber Tumorzellen zu erhöhen, um das Problem der systematischen Toxizität zu überwinden. Die bisherigen Studien zu Fragment-C-funktionalisierten Cryptophycinen beschränkten sich auf die Untersuchung von unpolaren Gruppen in der Seitenkette. Die von NAHRWOLD^[46] entwickelte Strategie entsprechend funktionalisierte, chirale β^2 -Aminosäuren als Fragment-C-Bausteine einzusetzen, ebnet den Weg zur Darstellung von Cryptophycin-Analoga mit polaren Gruppen. Darunter zeichnen sich die Alkylazid-funktionalisierten Derivate durch ihre Möglichkeit zur weiteren Funktionalisierung des Cryptophycin-Grundgerüsts aus. Im Rahmen dieser

Arbeit sollen die SAR-Studien weitergeführt und der Einfluss der Alkylkettenlänge der Alkylazid-Analoga sowie die Konfiguration am C^α des C-Fragments betrachtet werden.

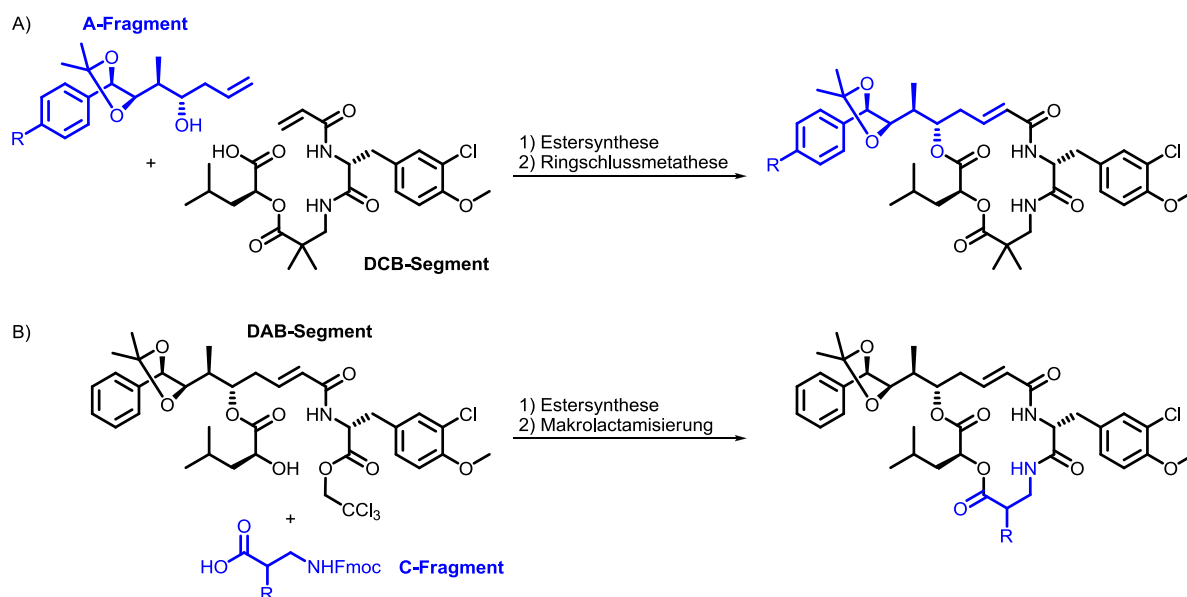
Die strukturelle Modifikation von Antitumorwirkstoffen kann zu einer erhöhten intrinsischen Tumorselektivität führen. Die Selektivität von Chemotherapeutika lässt sich zudem durch das Anbringen von sogenannten *tumor-targeting*-Gruppen verbessern. Hierzu wird der Wirkstoff entweder direkt oder über ein geeignetes Linkersystem mit der Tumorerkennungssequenz verbunden. Ist das resultierende Biokonjugat inaktiv und wird der aktive Wirkstoff selektiv im Tumorgewebe freigesetzt, spricht man von einem *prodrug*.^[160,161] Für die Synthese eines Cryptophycin-*prodrugs*, sollte die erforderliche Kupplungsstrategie kompatibel sein mit den funktionellen Gruppen des Wirkstoffs, insbesondere dem labilen, benzylichen Epoxid. Die Kupfer-katalysierte Huisgen-1,3-Cycloaddition weist sich durch ihre Orthogonalität zu einer Vielzahl an Funktionalitäten aus^[162,163] und scheint deswegen für eine Verknüpfung des Cryptophycins mit Tumorerkennungseinheiten geeignet zu sein. Vor diesem Hintergrund soll ein Azid-funktionalisiertes Cryptophycin über ein Alkin-haltiges Fluorophor mit einem cyclischen RGD-Peptid verbunden werden. Dieses Konjugat kann als Model-*prodrug* betrachtet werden, das zusätzlich die Visualisierung der Aufnahme und die finale Lokalisation in der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Cryptophycine gelangen durch passive Diffusion in die Zellen, das polarere Konjugat hingegen sollte aufgrund des RGD-Peptids durch aktive Endocytose aufgenommen werden. Zusätzlich sollen diese Untersuchungen Informationen für die Synthese eines geeigneten Linkers liefern, der selektiv am intrazellulären Ziel des RGD-Peptid-Konjugats gespalten wird und somit den Wirkstoff bevorzugt im Tumor freigibt.

Für eine hohe biologische Aktivität ist die benzyliche Epoxidfunktion des A-Fragments essentiell.^[10] Die nucleophile Ringöffnung des Epoxids mit HCl führt zu dem Chlorhydrin Cryptophycin-55, das *in vitro* vergleichbar aktiv ist wie die Ausgangsverbindung Cryptophycin-52, aber eine verbesserte *in vivo*-Aktivität sowie ein breiteres therapeutisches Fenster besitzt.^[52] In wässriger Lösung reagiert das Chlorhydrin in einer intramolekularen S_N-Reaktion zurück zu dem ursprünglichen Epoxid und kann infolgedessen als *prodrug* des epoxidischen Analogons betrachtet werden. Aus diesem Grund ist das Chlorhydrin ein attraktiver Kandidat für das Design von *tumor-targeting*-Konjugaten. In Vorversuchen sollen daher Reaktionen erprobt werden, die die Aktivierung und Verknüpfung des Chlorhydrins mit spaltbaren Linkersystemen ermöglichen.

3 Darstellung von Cryptophycin-52 nach einer neuen konvergente Syntheseroute

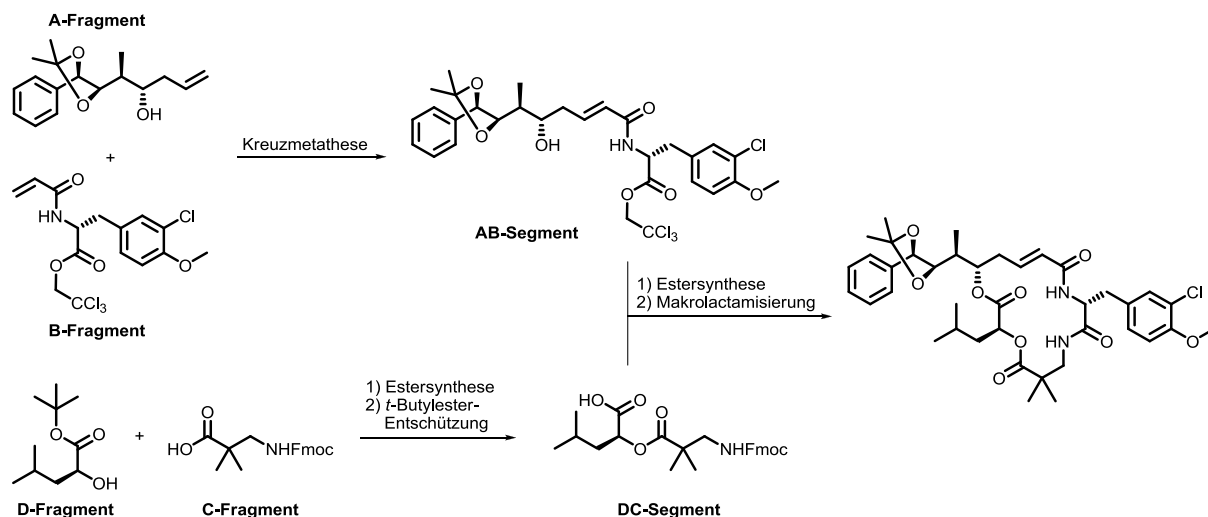
3.1 Motivation und Syntheseplanung

Cryptophycine sind eine Stoffklasse von 16-gliedrigen makrocyclischen Depsipeptiden, die sich retrosynthetisch betrachtet in vier Fragmente einteilen lassen (siehe Abbildung 1, Seite 2). Die Fragmente A und B sind Hydroxycarbonsäuren, während es sich bei den Bausteinen C und D um Aminosäuren handelt. Bei Cryptophycin-1 (**1**) und Cryptophycin-52 (**2**) ist das Fragment A mit den vier stereogenen Zentren und der Epoxideinheit die synthetisch anspruchsvollste Komponente. Aufgrund der Labilität des Epoxids hat es sich bewährt, dieses Strukturelement erst nach vollendeter Synthese des Makrocyclus einzuführen. In den von unserem Arbeitskreis veröffentlichten Synthesen^[164-167] wird das Epoxid zunächst als Acetonid geschützt und später durch eine Diol-Epoxid-Transformation eingeführt. EIBLER entwickelte die Synthese von Fragment-A-funktionalisierten Cryptophycinen.^[47] Aufgrund dessen wurde für eine effiziente Syntheseroute ein einheitliches DCB-Segment gewählt, das in einer Yamaguchi-Veresterung mit den verschiedenen A-Fragmenten kondensiert wurde (Schema 1). Die erhaltenen *seco*-Depsipeptide wurden anschließend durch Ringschlussmetathese cyclisiert. NAHRWOLD untersuchte im Rahmen von SAR-Studien den Einfluss unterschiedlich funktionalisierter C-Fragmente auf die Bioaktivität von Cryptophycinen.^[46] In diesem Fall wurde der synthetische Aufwand durch ein gemeinsames DAB-Segment minimiert. Die verschiedenen Fragment-C-Bausteine wurden über eine Esterbindung eingeführt und die cyclischen Depsipeptide daraufhin durch Makrolactamisierung aufgebaut.



Schema 1: Synthese des Acetonid-geschützten Cryptophycin-Makrocyclus nach A) EIBLER und B) NAHRWOLD.

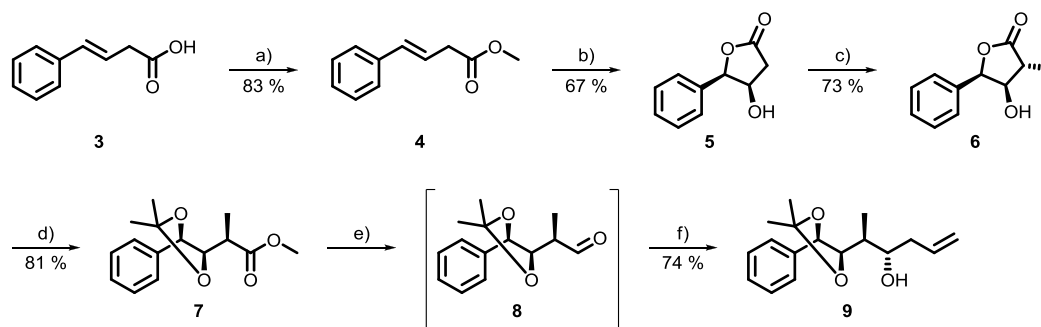
In der hier vorliegenden Arbeit sollte eine stärker konvergent orientierte Synthesesequenz erarbeitet werden, die entsprechend den Aufgabenstellungen die Modifikation der einzelnen Fragment-Bausteine ermöglicht und gleichzeitig den synthetischen Arbeitsaufwand möglichst effizient gestaltet. Vor diesem Hintergrund wurden die Fragmente A und B durch Kreuzmetathese verknüpft, während das CD-Segment mittels Steglich-Veresterung aufgebaut wurde (Schema 2). Anschließend wurden die Fragmente A und D durch eine Esterbindung verknüpft und so die entsprechenden *seco*-Depsipeptide erhalten, die dann durch Makrolactamisierung in die cyclischen Derivate überführt wurden.



Schema 2: Geplante konvergente Syntheseroute am Beispiel von Cryptophycin-52.

3.2 Synthese der nativen Fragment-Bausteine

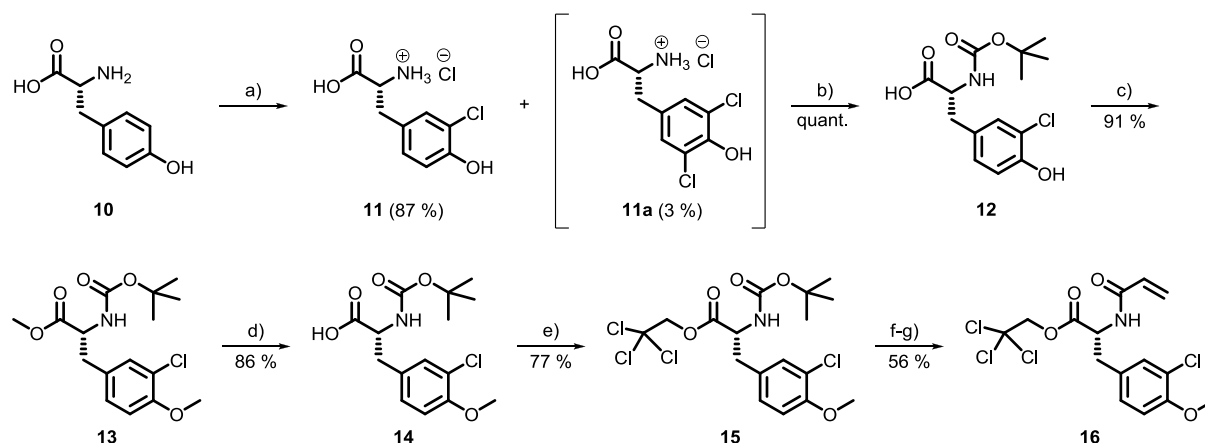
Ausgehend von der kommerziell erhältlichen (*E*)-4-Phenylbut-3-ensäure **3** wurde der native A-Fragment-Baustein **9** analog zur Vorschrift von EIBLER^[167] dargestellt (Schema 3). Die β,γ -ungesättigte Carbonsäure **3** kann ebenfalls durch die nach RAGOISSIS^[168] modifizierte Knoevenagel-Kondensation mit Malonsäure und Phenylacetaldehyd unter neutralen Bedingungen und in Anwesenheit des Dehydratisierungskatalysators Piperidiniumacetat erhalten werden. Im Gegensatz dazu wird die klassische Knoevenagel-Kondensation im basischen Milieu durchgeführt und die entsprechende α,β -ungesättigte Carbonsäure entsteht.^[169] Nach Methylierung von **3** mit Thionylchlorid in Methanol wurde der Methyl ester **4** in guter Ausbeute erhalten. Die anschließende asymmetrische Sharpless-Dihydroxylierung und intramolekulare Cyclisierung ergab nach Umkristallisation das enantiomerenreine β -Hydroxy- γ -Lacton **5**. Die darauf folgende α -Methylierung mit Methyljodid (MeI) gelang diastereoselektiv und **6** wurde in einer Ausbeute von 73 % erhalten. Die Öffnung des Lactons zum Methyl ester und die Schützung des vicinalen Diols als Acetonid mit Acetondimethylacetal in Gegenwart des polymeren Säurekatalysators Amberlyst-15[®] erfolgte in einem Reaktionsschritt.



Scheme 3: Synthese des Fragment-A-Bausteins **9**. a) SOCl_2 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1 h; b) K_2CO_3 , $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $(\text{DHQD})_2\text{-PHAL}$, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$, $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 44 h; c) LDA, MeI, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 15 h; d) $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$, MeOH, Amberlyst-15[®], RT, 4 d; e) DIBAL-H, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h; f) $n\text{-Bu}_3\text{SnAll}$, $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 15 h.

Der erhaltene Methylester **7** wurde im Folgenden mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) selektiv zum entsprechenden Aldehyd **8** reduziert. Um eine Epimerisierung des chiralen α -Aldehyds zu vermeiden, wurde dieser ohne chromatographische Reinigung weiter umgesetzt. Zur Einführung des vierten stereogenen Zentrums wurde **8** mit Allyl-tri-*n*-butylzinn zur Reaktion gebracht. Die Magnesiumbromid-Diethyletherat-vermittelte Reaktion verlief chelatkontrolliert und mit exzellenter Diastereoselektivität. Der Homoallylkohol **9** wurde in 74 %iger Ausbeute über 2 Stufen erhalten und diente als Fragment-A-Baustein.

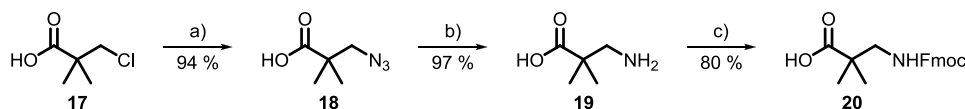
Die Darstellung des Fragment-B-Bausteins^[46] erfolgte ausgehend von D-Tyrosin (**10**), dessen aromatischer Ring im ersten Schritt der Synthesesequenz mit Sulfurylchlorid in Essigsäure regioselektiv chloriert wurde (Schema 4).



Scheme 4: Synthese des Fragment-B-Bausteins **16**. a) SO_2Cl_2 , AcOH, RT, 90 min; b) Boc_2O , NaOH, $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$, RT, 17 h; c) K_2CO_3 , Me_2SO_4 , Aceton, Rückfluss, 4 h; d) LiOH- H_2O , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{THF}$, RT, 1 h; e) Pyridin, $\text{Cl}_3\text{CCH}_2\text{OH}$, DCC, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 15 h; f) TFA, RT, 1 h; g) NEt_3 , $\text{ClCOCH}=\text{CH}_2$, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h.

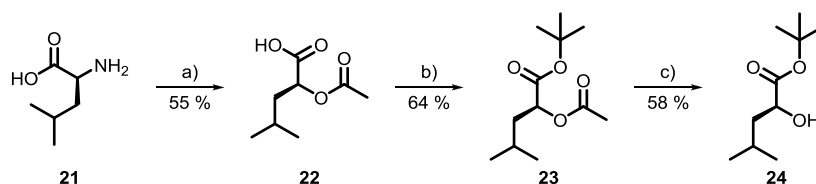
Allerdings entstand in geringen Mengen das Dichlorierungsprodukt **11a**, das im Gegensatz zu dem unchlorierten Edukt im weiteren Verlauf der Synthese abgetrennt werden kann. Um eine vollständige Umsetzung der Ausgangssubstanz sicher zu stellen, wurde das Tyrosin/Essigsäure-Gemisch vor Zugabe des Sulfurylchlorids im Ultraschallbad homogenisiert. Die Umsetzung von **11** mit Di-*tert*-butyldicarbonat führte quantitativ zu dem *tert*-Butylcarbammat **12**, das anschließend ohne weitere Reinigung mit Dimethylsulfat zur Reaktion gebracht wurde. Dabei wurde sowohl die phenolische Hydroxylgruppe als auch die Carboxylfunktionalität methyliert. Auf dieser Stufe gelang die säulenchromatographische Abtrennung des dichlorierten Nebenprodukts und das Methylierungsprodukt **13** wurde in einer sehr guten Ausbeute isoliert. Nachdem der Methylester **13** mit Lithiumhydroxid zur Carbonsäure **14** verseift worden war, wurde das Rohprodukt durch Veresterung zum Trichlorethylester **15** umgesetzt. Im letzten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten und das entstandene Amin mit Acryloylchlorid in das Acrylamid **16** überführt.

In einer nucleophilen Substitutionsreaktion wurde die kommerziell erhältliche Chorpivalinsäure (**17**) mit Natriumazid in das entsprechende Azid **18** überführt (Schema 5).^[170] Die Hydrierung der Azidopivalinsäure (**18**) mit Palladium auf Kohle unter einer statischen Wasserstoffatmosphäre lieferte, wie von MA *et al.* beschrieben, die $\beta^{2,2}$ -Aminosäure **19**, welche anschließend mit FmocOSu zu entsprechend Fmoc-geschützten Aminosäure **20** umgesetzt wurde. Diese fungierte als nativer Fragment-C-Baustein zur Darstellung von Cryptophycin-52.



Schema 5: Synthese des Fragment-C-Bausteins **20**. a) NaNO₃, H₂O, Rückfluss, 3 d; b) Pd/C, H₂, MeOH, RT, 16 h; c) NaHCO₃, FmocOSu, H₂O/Aceton, RT, 4 h.

Der Fragment-D-Baustein wurde durch Derivatisierung von L-Leucin (**21**) gemäß einer Literaturvorschrift^[47] aufgebaut (Schema 6). Die Diazotierung von primären, aliphatischen Aminen erzeugt instabile Diazonium-Ionen, die sofort unter Stickstoff-Abspaltung in die entsprechenden Carbenium-Ionen übergehen. Bei dem hier vorliegenden Substrat erfolgte die Eliminierung von Stickstoff unter Beteiligung der benachbarten Carbonylgruppe und folglich kam es zur Ausbildung eines Oxoniumions, das daraufhin von dem Lösungsmittel Essigsäure abgefangen wurde. Die Acetat-geschützte Carbonsäure **22** entstand somit unter Retention der Konfiguration. Nach anschließender Steglich-Veresterung mit *tert*-Butanol wurde der *tert*-Butylester **23** erhalten. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert und das Produkt durch Destillation gereinigt. Die darauffolgende basische Verseifung der Acetat-Schutzgruppe mit Kaliumcarbonat ergab nach destillativer Reinigung den α -Hydroxyester **24**.



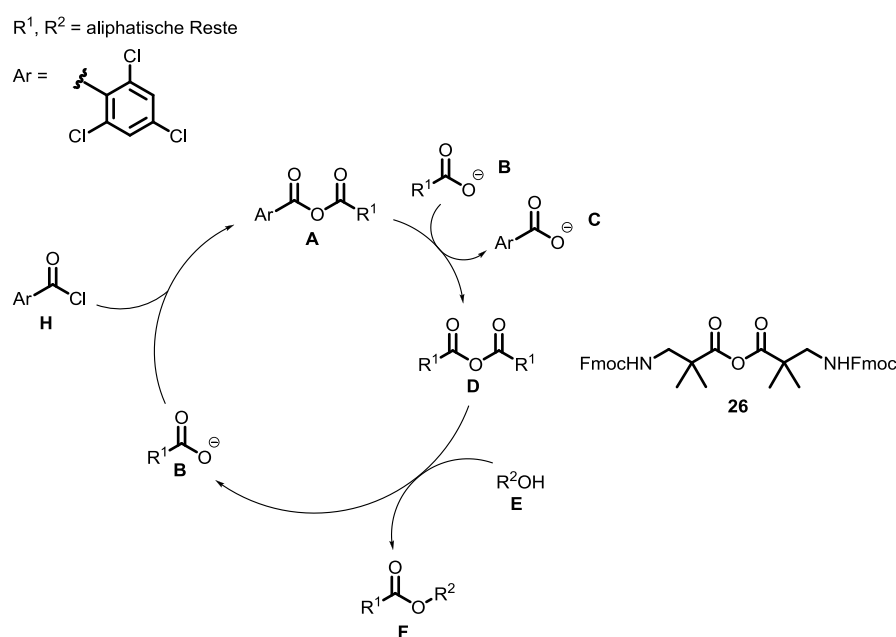
Schema 6: Synthese des Fragment D-Bausteins **24**. a) NaNO_2 , AcOH , RT, 3 h; b) *t*-BuOH, DMAP, DCC, CH_2Cl_2 , 0 °C \rightarrow RT, 15 h; c) K_2CO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, RT, 17 h.

3.3 Aufbau des Makrocyclus und Diol-Epoxid-Transformation

Die Esterverknüpfung der Fragmente C **20** und D **24** erfolgte mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenz und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) als Katalysator (siehe Schema 8, Seite 31). Diese Methode zur Esterkondensation wurde erstmals von STEGLICH^[171] beschrieben und ermöglicht die Umsetzung von sterisch gehinderten und säurelabilen Edukten. Die DCC/DMAP-induzierte Veresterung eines Fmoc-geschützten C-Fragments mit einem *tert*-Butylester-geschützten D-Fragment wurde erstmals von MAIER^[172] zur Synthese von Cryptophycin-3 in die Literatur eingeführt. Die Carbonsäure wurde dabei in einem 1.2-fachen Überschuss eingesetzt, um eine vollständige Reaktion zu erzielen. Zur Beschleunigung der Esterkondensation wurde im Vergleich zur Originalvorschrift^[171] die Katalysatormenge von 0.1 auf 0.4 Äquivalente erhöht. Nachdem das Reaktionsgemisch wie in der Literatur^[172] beschrieben 6 Stunden bei RT gerührt worden war, wurde das gewünschte Produkt **25** in einer mäßigen Ausbeute von 46 % erhalten [Lit: 80 %]. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde in einem weiteren Ansatz die Reaktionszeit verlängert. Anhand der dünnschichtchromatographischen Reaktionskontrolle wurde auch nach 14 Stunden kein vollständiger Umsatz detektiert. Die Reaktion wurde dennoch abgebrochen, da eine Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit DMAP denkbar ist. Nach dem Abfiltrieren des entstandenen Harnstoffs und säulenchromatographischer Reinigung wurde das Kupplungsprodukt **25** in einer leicht gesteigerten Ausbeute von 58 % isoliert. Des Weiteren wurde versucht die Ausbeute durch die Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid ($\text{EDC}\cdot\text{HCl}$) als Aktivierungsreagenz zu steigern. Allerdings wurden in diesem Fall mit 39 % nach 8 Stunden Reaktionszeit bzw. 8 % nach 16 Stunden noch geringere Ausbeuten erhalten.

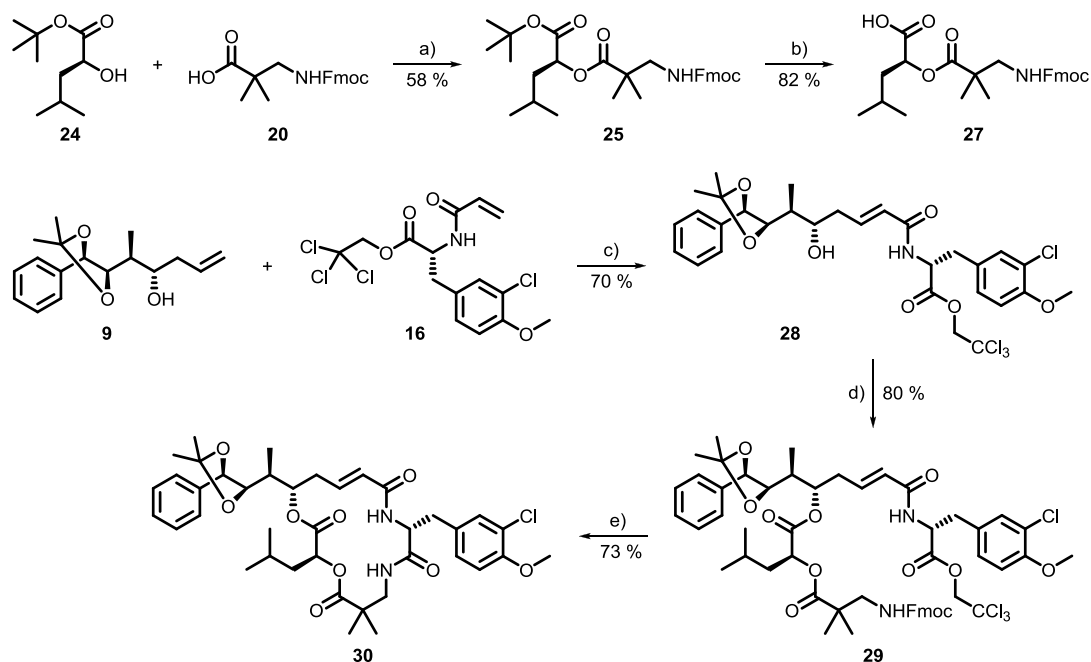
Der Versuch die Veresterung unter Yamaguchi-Bedingungen durchzuführen misslang. Anstelle des gewünschten Esters **25** konnte im ESI-Massenspektrum das symmetrische, aliphatische Anhydrid **26** identifiziert werden (gemessen: $m/z = 683.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $[\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_7+\text{Na}]^+$: $m/z = 683.3$). Die Yamaguchi-Veresterung wird initiiert durch die Bildung eines gemischten, aliphatischen-2,4,6-Trichlorbenzoyl-Anhydrids aus der aliphatischen Carbonsäure und 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid.^[173] In Anwesenheit eines Alkohols und in Gegenwart von DMAP wird aus dem gemischten Anhydrid der entsprechende Ester gebildet. SANTALUCIA postuliert für die Yamaguchi-Veresterung einen

Mechanismus, bei dem die *in situ*-Generierung des symmetrischen aliphatischen Anhydrids **D** die Schlüsselrolle darstellt (Schema 7).^[174] Alle abgebildeten Reaktionsschritte sind, mit Ausnahme der Esterkondensation, reversibel. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht das aliphatische Carboxylat **B**, das wieder in den Reaktionscyclus eintritt. Daher konkurriert das aliphatische Carboxylat **B** mit dem aromatischen Carboxylat **C** und dem Alkohol **E**. Dieser Mechanismus basiert auf der Annahme, aliphatische Carboxylate seien bessere Nucleophile als aromatische Carboxylate oder Alkohole, d. h. die Entstehung des Homoanhydrids aus dem gemischten Anhydrid verläuft schneller als die Esterbildung. Im Falle der sterisch anspruchsvollen Carbonsäure **20** ist das entstandene Homoanhydrid **26** vermutlich so unreaktiv geworden, dass der Reaktionscyclus auf dieser Stufe zum Erliegen kam.



Schema 7: Postulierter Reaktionsmechanismus der Yamaguchi-Veresterung.^[174]

Die mäßige Ausbeute der Kondensationsreaktion von C- und D-Fragment ist in Anbetracht einer effizienten Syntheseroute nicht schwerwiegend, da es sich um eine Reaktion zu Beginn der Syntheseroute handelt und die beiden Komponenten im großen Maßstab in wenigen Schritten sowie aus kommerziell erhältlichen, günstigen Edukten dargestellt werden können. Die nachfolgenden Reaktionen verlaufen in zufriedenstellenden Ausbeuten. Beim Aufbau des Cryptophycin-Grundgerüsts ist auf eine orthogonale Schutzgruppenstrategie zu achten. Demgemäß wurde als Schutzgruppe der Fragment-D-Carboxylfunktion ein *tert*-Butylester gewählt. Dieser lässt sich im sauren Milieu in Gegenwart der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe des Fragment-C-Bausteins selektiv entfernen. Die Abspaltung des *tert*-Butylester von **25** mit TFA ergab nach Flash-Chromatographie die entsprechende Carbonsäure **27** in guter Ausbeute.

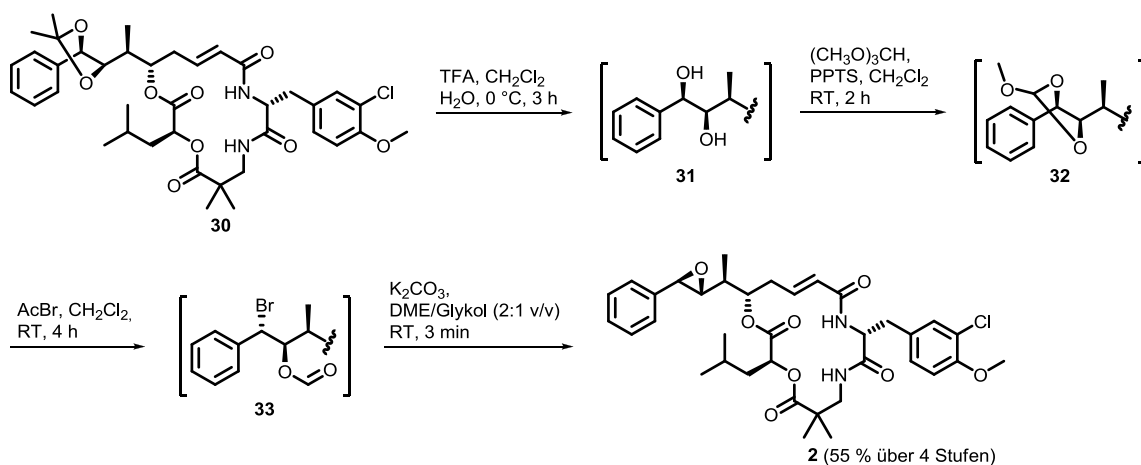


Scheme 8: Konvergente Synthese des Acetonid-geschützten *cyclo*-Depsipeptids **30**. a) DCC, [DMAP], CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h dann RT, 15 h; b) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 3.5 h; c) Grubbs-II-Kat., CH₂Cl₂, Rückfluss, 16 h; d) **27**, [DMAP], NEt₃, 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, THF, 0 °C, 1 h; e) Piperidin, DMF, RT, 16 h.

Die Metathese-Kupplung der Fragmente A **9** und B **16** wurde durch einen Rutheniumkomplex der 2. Generation von Grubbs katalysiert.^[175] Das terminale Olefin **9** wurde mit 1.2 Äquivalenten in einem geringen Überschuss eingesetzt und zur Entfernung des entstandenen Ethens wurde die Reaktionslösung unter Rückfluss erhitzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Kreuzmetathese-Produkt **28** in 70%iger Ausbeute erhalten. Die Yamaguchi-Veresterung findet neben der Synthese von Makrolactonen Anwendung in der regioselektiven Darstellung von hochfunktionalisierten Estern.^[176,177] So ergibt die Kondensation der Segmente AB **28** und CD **27** nach Chromatographie das *seco*-Depsipeptid **29** in 80% Ausbeute. Anschließend wurde das cyclische Depsipeptid **30** einer Vorschrift von MOHER *et al.*^[178] folgend dargestellt, indem die Fmoc-Schutzgruppe der acyclischen Verbindung **29** mit einem fünffachen molaren Überschuss an Piperidin abgespalten wurde. Unmittelbar erfolgte in einer Eintopfsynthese die intramolekulare Aminolyse des Fragment-B-Trichlorethylesters und das cyclische Analogon **30** wurde nach Flash-Chromatographie in guter Ausbeute erhalten. Zusammengefasst erzielte der konvergente Aufbau des Cryptophycin-Makrocyclus ausgehend von den Segmenten AB **28** und CD **27** sehr gute Ausbeuten. Ebenfalls in zufriedenstellenden Ausbeuten verliefen die *tert*-Butylesterspaltung von **25** sowie die Kreuzmetathese zur Generierung von **28**. Die einfache Durchführbarkeit der erforderlichen Synthesen ermöglicht zudem die Darstellung von Cryptophycinen in größerem Maßstab.

Die Epoxidfunktion wurde ausgehend von dem Acetonid-geschützten Depsipeptid **30** in einer vierstufigen Reaktionssequenz eingeführt, wobei die Intermediate nur als Rohprodukte isoliert und nach Trocknung im Hochvakuum direkt weiter umgesetzt wurden. Dazu wurde zunächst das

Acetonid **30** mit TFA in das freie *syn*-Diol **31** überführt (Schema 9). Die Zugabe einer geringen Menge Wasser zur Reaktionslösung gewährleistete eine vollständige Hydrolyse, die anhand des Dünnschichtchromatogramms nach 3 Stunden abgeschlossen war. Eventuell entstandene Ringöffnungsprodukte, die auf die Hydrolyse von Makrolid-Esterbindungen zurückgeführt werden können, wurden mittels basischer Aufarbeitung entfernt. Die Transformation des freien Diols in das entsprechende Epoxid erfolgte nach einer von SHARPLESS^[179] entwickelten und von HOARD,^[180] STONČIUS,^[181] und EIBLER^[47] modifizierten Syntheseroute. Der cyclische Orthoester **32** wurde nach Umsetzung von **31** mit Trimethylorthoformiat unter Pyridinium-*para*-toluolsulfonat-(PPTS)-Katalyse erhalten. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und die Reaktion nach 2 Stunden beendet. Zur Abtrennung des Katalysators wurde der Reaktionsansatz über eine kurze Kieselgelschicht filtriert. Anschließend wurde der Orthoester **32** mit Acetylbromid regioselektiv unter Inversion der Konfiguration am benzylichen Kohlenstoffatom zum Bromhydrinformiat **33** geöffnet. Im letzten Schritt wurde das Formiat mit Kaliumcarbonat in einer Emulsion aus 1,2-Dimethoxyethan und Ethylenglykol verseift. Unmittelbar darauf folgend wurde der Bromsubstituent durch eine intramolekulare S_N -Reaktion stereoselektiv verdrängt und der Epoxidring geschlossen. Die Überführung in das Epoxid **2** verlief sehr schnell und war innerhalb von 3 Minuten abgeschlossen. Die Wahl milder Reaktionsbedingungen ist für die Epoxidsynthese essentiell um die Spaltung ringständiger Esterbindungen zu verhindern. Stereospezifisch betrachtet verläuft die Gesamtreaktion unter Retention der Konfiguration, daher ist die Konfiguration des *syn*-Diol ausschlaggebend für die Stereochemie des Epoxids.



Schema 9: Acetonid-Spaltung von **30** und Diol-Epoxid-Transformation zum Cryptophycin-52 (**2**).

4 Synthese eines Cyclopropan-funktionalisierten Fragment-A-Bausteins

4.1 Motivation und Syntheseplanung

Das benzyliche Epoxid hat einen starken Einfluss auf die biologische Aktivität der Cryptophycine. Einerseits führt ein Austausch dieser Funktionalität gegen ein Aziridin, Thiiran oder *trans*-Styrol zu einem starken Aktivitätsverlust *in vitro*.^[50] Zusätzlich ist die (*R,R*)-Konfiguration des Epoxids von großer Bedeutung für eine hohe cytotoxische Wirkung. Andererseits konnte bei Epothilonen die Epoxidfunktion erfolgreich gegen einen Cyclopropanring mit identischer Stereochemie ersetzt werden ohne eine signifikante Abnahme der biologischen Aktivität zu verzeichnen.^[155-158] Epothilone sind Cytostatika, die aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert wurden^[182,183] und eine Paclitaxel-ähnliche Wirkung gegen Tumorzellen besitzen.^[159] Das bedeutet, ihre cytotoxische Wirksamkeit basiert auf einer Stabilisierung der Mikrotubuli. Sie unterscheiden sich in diesem Aspekt von den Cryptophycinen, die die Mikrotubuli destabilisieren. Die Cytotoxizitäten der Leitstrukturen Epothilon A (**34**) und B (**35**) sind mit denen der Cyclopropan-Epothilon-Derivate **36** und **37** vergleichbar (Abbildung 19). Des Weiteren sind diese Analoga in Tubulinpolymerisationsassays aktiv. Mutmaßlich ist für eine hohe *in vitro*-Aktivität die Gesamtform des Epothilon-Grundgerüsts essentiell und nicht die Epoxidfunktionalität. Diese Vermutungen werden durch die Ergebnisse von *molecular modelling*-Studien gestützt, welche ergaben, dass die energieärmsten Konformationen von Epothilon A (**34**) und dem Cyclopropan-Analogon **36** nahezu identisch sind.^[155] Ein weiterer Beweis, dass die Epoxidfunktion größtenteils eine konformationelle Rolle spielt ist die geringere Aktivität der entsprechenden Cyclobutan-Analoga.^[156,157]

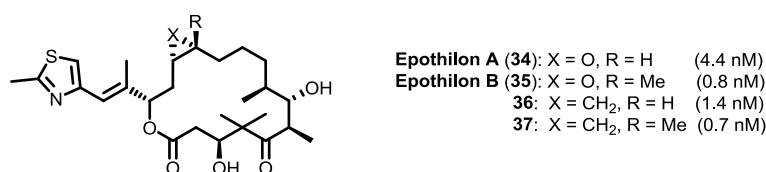
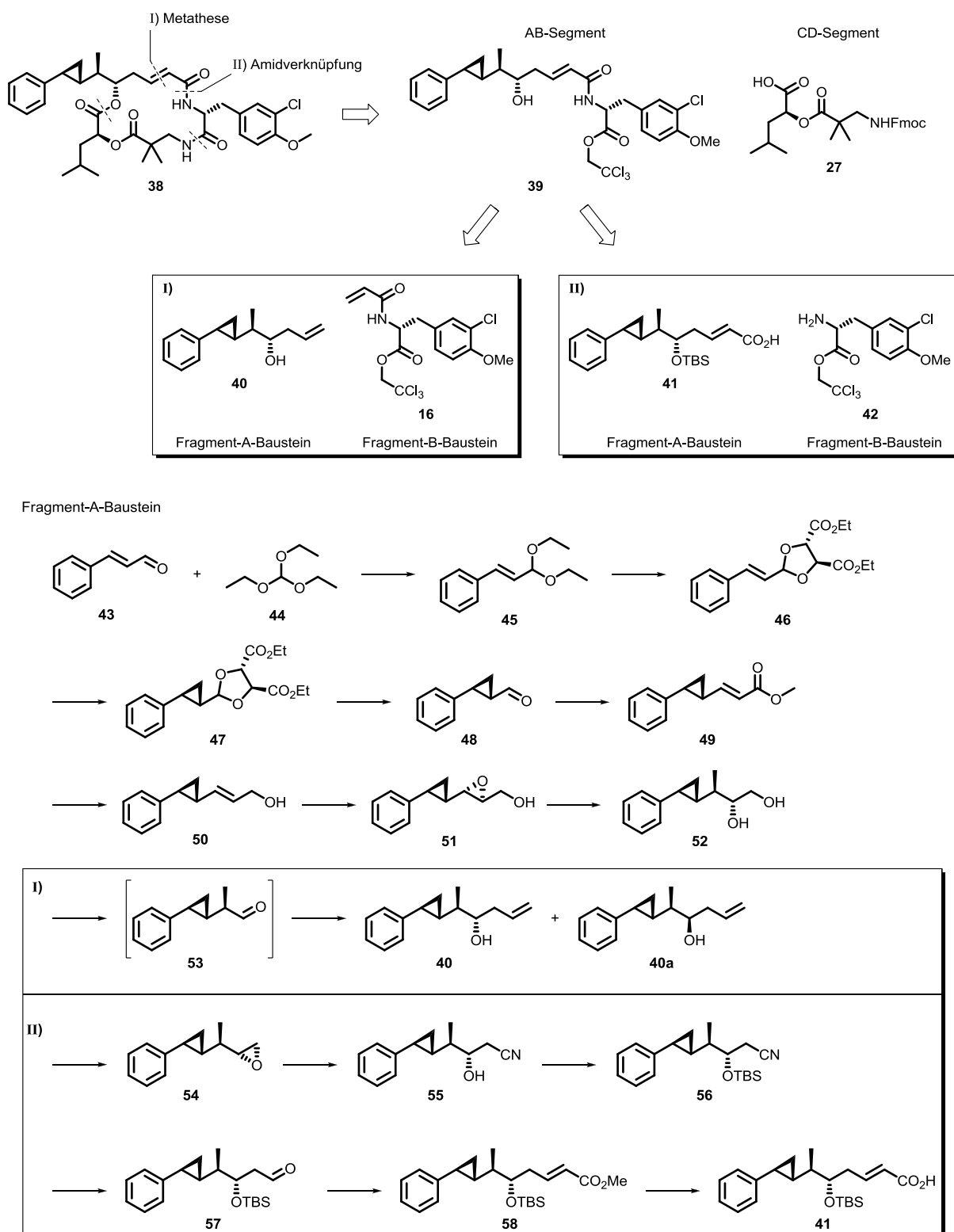


Abbildung 19: *In vitro*-Cytotoxizitäten von Epothilon A und B sowie deren Cyclopropan-Analoga. Die IC₅₀-Werte wurden gegen die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT-116 bestimmt.

Vor diesem Hintergrund und hinsichtlich des Bestrebens stabilere Cryptophycin-Derivate zu generieren, wurde die Synthese eines Cyclopropan-funktionalisierten Fragment-A-Bausteins im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Der Schlüsselschritt der Syntheseroute ist die stereoselektive Installation des Cyclopropanrings. Dieses kann in einer auxiliarvermittelten diastereoselektiven Simmons-Smith-Reaktion erfolgen. Der Cryptophycin-Makrocyclus kann anschließend mit Hilfe der neu entwickelten konvergenten Syntheseroute basierend auf einer Metathesereaktion zwischen den Bausteinen A und B aufgebaut werden (Schema 10, Variante I).

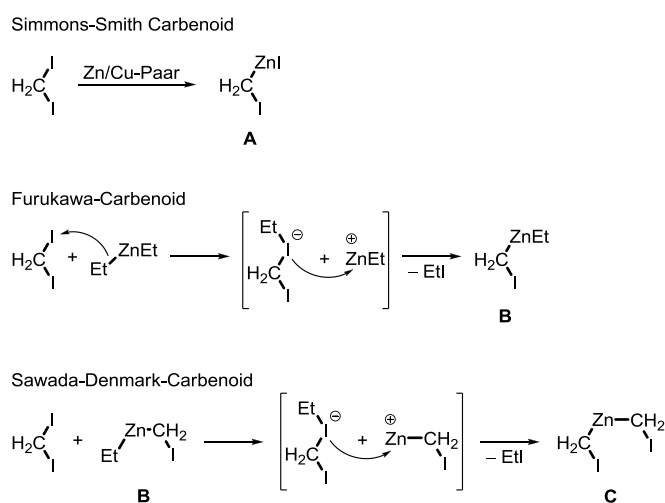


Schema 10: Retrosynthetische Analyse des Cyclopropan-Cryptophycin-Analogons **38** sowie die Syntheserouten für die entsprechenden Fragment-A-Bausteine **40** bzw. **41**. Ausgehend von dem Diol **52** ist Variante I analog zu EIBLER^[167] bzw. Variante II nach einer Vorschrift von POUSSET und LARCHEVÊQUE^[184] anwendbar.

Dazu wird der Homoallylkohol **40** als A-Fragment benötigt. Alternativ kann die Kondensation der beiden Bausteine auch durch Amidverknüpfung erfolgen (Schema 10, Variante II). In diesem Fall fungiert die Carbonsäure **41** als A-Fragment. Variante II beinhaltet jedoch 4 Reaktionsschritte mehr und soll daher erst ausgearbeitet werden, falls die diastereomeren Homoallylkohole **40** und **40a** nicht trennbar sein sollten. Nach vollendeter Synthese des Cyclopropan-Analogons kann dessen biologische Aktivität evaluiert werden. Zusätzlich können die Auswirkungen des Austausches der Epoxidfunktion gegen einen Cyclopropanring auf die Konformation des Gesamtmoleküls mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ermittelt werden.

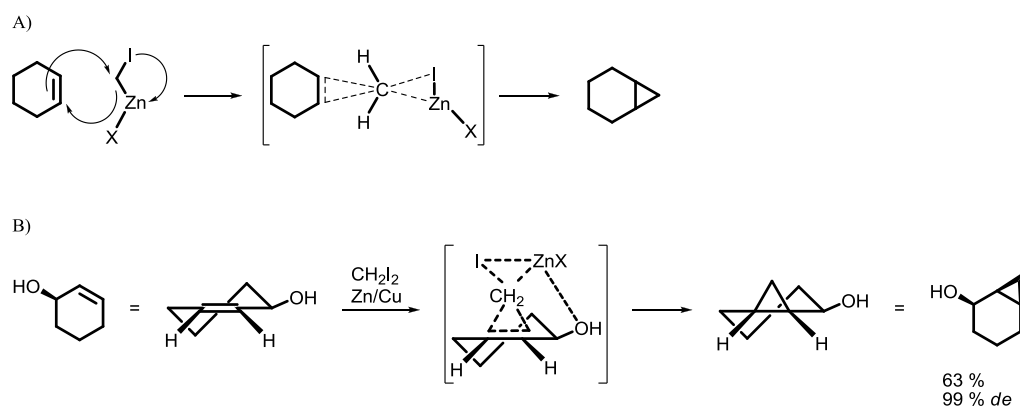
4.2 Asymmetrische Simmons-Smith-Reaktion

Zum stereoselektiven Aufbau der Cyclopropaneinheit eines entsprechend modifizierten A-Fragments wurde die auxiliarvermittelte asymmetrische Simmons-Smith-Reaktion nach YAMAMOTO^[185] aufgrund der einfachen Eduktsynthese und Durchführung sowie guten Diastereoselektivitäten gewählt. Die Simmons-Smith-Reaktion wurde erstmalig 1985 in der Literatur^[186] erwähnt und ist bis heute die wichtigste Methode zur Darstellung von Cyclopropanverbindungen. Das Simmons-Smith-Reagenz wird nach dem ursprünglichen Verfahren aus Diiodmethan und einem so genannten Zn/Cu-Paar erzeugt, das seinerseits aus überschüssigem Zinkstaub und katalytischen Mengen an Kupfersalzen, wie CuSO₄, CuCl oder Cu(OAc)₂, dargestellt wird (Schema 11, Verbindung **A**).^[187,188] Heutzutage werden leichter handhabbare Edukte eingesetzt und die Generierung der aktiven Spezies erfolgt in einer Iod/Zink-Austauschreaktion (Schema 11, Verbindung **B** und **C**). In den drei Simmons-Smith-Reagenzien **A**, **B** und **C** sind sowohl die von der CH₂-Gruppe ausgehende C–Zn-Bindung als auch die C–I-Bindung aufgrund des als Abgangsgruppe fungierenden Iodatoms stark gedehnt.



Schema 11: Darstellungsmethoden der Zinkcarbonide für Simmons-Smith-Cyclopropanierungen.^[187]

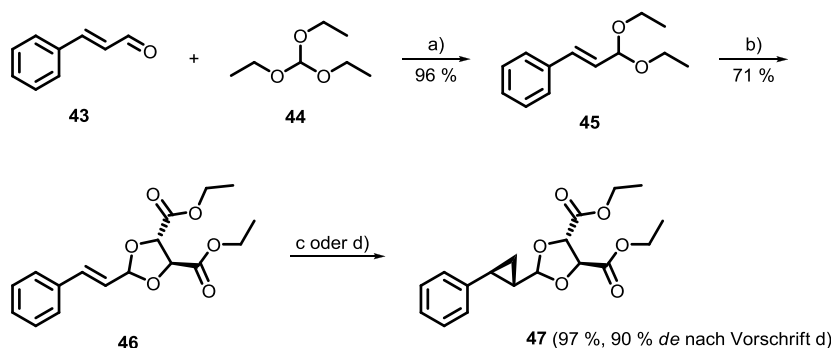
Die Cyclopropanierungsreaktion verläuft in einem konzertierten Mechanismus bei dem kein freies Carben erzeugt wird, sondern das Zink bleibt während der gesamten Reaktion am Kohlenstoffatom assoziiert (Schema 12, Teil A). Daher werden die aktiven Spezies auch als Carbenoide bezeichnet, die befähigt sind CH_2 -Gruppen auf Olefine zu übertragen. Die Reaktion ist sowohl stereoselektiv als auch stereospezifisch, und so erfolgt der Angriff des Carbenoids im Falle eines chiralen Allylalkohols von derselben Seite der Doppelbindung auf der sich auch die Hydroxylgruppe befindetet (Schema 12, Teil B). Dabei koordiniert das Zinkreagenz zunächst an das Sauerstoffatom und nach Methylentransfer wird das *cis*-Produkt mit exzellenter Diastereoselektivität erhalten. Achirale Edukte können mit Hilfe von chiralen Auxiliaren^[185,189,190] oder Katalysatoren^[191-193] enantioselectiv cyclopropaniert werden.



Schema 12: A) Mechanismus der Simmons-Smith-Reaktion; B) Koordination des Zinkreagenz an den Sauerstoff einer chiralen Hydroxylgruppe bewirkt diastereoselektiven Methylentransfer.

Die Untersuchungen zur Darstellung des cyclopropanierten Fragment-A-Bausteins **40** erfolgten ausgehend von *trans*-Zimtaldehyd (**43**), der zunächst mit Triethylorthoformiat (**44**) in das Acetal **45** überführt wurde^[185] (Schema 13). Zu diesem Zweck wurde eine ethanolische Lösung von Ammoniumnitrat nacheinander mit dem Aldehyd **43** und Triethylorthoformiat (**44**) versetzt und das Reaktionsgemisch anschließend 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Diethylacetal **45** wird in exzellenter Ausbeute und Reinheit erhalten. Aufgrund dessen wurde auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet und **45** direkt in der Folgereaktion eingesetzt. Zur Umacetalisierung wurde **45** zusammen mit 1.2 Äquivalenten D-Diethyltartrat (D-DET) und einer katalytischen Menge an PPTS 6 Stunden in Toluol refluxiert.^[194] Das dabei entstehende Ethanol wurde fortlaufend abdestilliert, um das chemische Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zuverschieben. Nach basischer Extraktion wurde das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie gereinigt und das enantiomerenreine Acetal **46** in einer Ausbeute von 71 % isoliert. Alternativ kann **46** auch in einer einstufigen Synthese aus *trans*-Zimtaldehyd (**43**) und D-DET in Anwesenheit von Pentaphosphoroxid als Dehydratisierungsmittel dargestellt werden.^[195] Allerdings ist die Ausbeute in diesem Fall mit 12 % ausgesprochen niedrig und die Reaktion wurde aus diesem Grund nicht in Betracht gezogen. Die Cyclopropanierung wurde anfangs in Analogie zu einer Vorschrift von YAMAMOTO^[185] durchgeführt

(Schema 13, Vorschrift c). Das α,β -ungesättigte Acetal **46** wurde in Hexan mit einem 10-fachen Überschuss an Diethylzink als 1 molare Lösung in Hexan und einem 5-fachen Überschuss an Diiodmethan zur Reaktion gebracht. Als problematisch erwies sich, dass das Acetal **46** im Lösungsmittel Hexan schwerlöslich war und bei der erforderlichen Reaktionstemperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ teilweise auskristallisierte. Die Suspension wurde zuerst 16 Stunden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ und daraufhin 10 Stunden bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, um einen möglichst vollständigen Umsatz zu erzielen. Die Reaktionskontrolle wurde dadurch erschwert, dass Edukt **46** und Produkt **47** den gleichen Retentionsfaktor und eine identische Retentionszeit sowohl bei der analytischen HPLC als auch bei der Gaschromatographie haben. Der Umsatz ließ sich nur anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der Reaktionsmischung bestimmen, da das Edukt aufgrund der charakteristischen olefinischen Signale identifiziert werden konnte. Die NMR-spektroskopische Untersuchung nach 16-stündiger Reaktionszeit bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ zeigte, dass ungefähr noch 5 % des Eduktes vorhanden waren. Daraufhin wurde das Gemisch auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt, jedoch konnte nach weiteren 10 Stunden keine Verbesserung des Umsatzes durch erneute NMR-Kontrolle nachgewiesen werden. Infolgedessen wurde der Ansatz aufgearbeitet und nach säulenchromatographischer Reinigung wurde in 86 %iger Ausbeute eine Produktfraktion isoliert, die, wie im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ersichtlich, noch 5 % Edukt enthielt. Da das Edukt auch im weiteren Verlauf der Synthesesequenz nicht abgetrennt werden konnte, ist eine vollständige Umsetzung notwendig.



Schema 13: Synthese des cyclopropanierten Fragment-A-Bausteins, Teil 1: Einführung zweier stereogener Zentren durch asymmetrische Simmons-Smith-Reaktion. a) $[\text{NH}_4\text{NO}_3]$, EtOH, RT, 16 h; b) D-DET, [PPTS], Toluol, $120\text{ }^\circ\text{C}$, 6 h; c) Et_2Zn , I_2CH_2 , Hexan, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, dann $0\text{ }^\circ\text{C}$, 10 h; d) Et_2Zn , ClCH_2I , DCE, $-23\text{ }^\circ\text{C}$, 6 h.

DENMARK und EDWARDS berichten von einer schnelleren Reaktion sowie einem besseren Umsatz bei der Verwendung von Chloriodmethan (ClCH_2I) anstelle von Diiodmethan (I_2CH_2).^[196] Außerdem ist der Gebrauch von 1,2-Dichlorethan (DCE) als Lösungsmittel für eine erfolgreiche Cyclopropanierung ausschlaggebend. Die Cyclopropanierung von **46** wurde daraufhin in Analogie zu der Vorschrift von DENMARK getestet (Schema 13, Vorschrift d). Dazu wurde das Acetal **46** in 1,2-Dichlorethan gelöst und bei $-23\text{ }^\circ\text{C}$ mit 5.5 Äquivalenten Diethylzink versetzt, gefolgt von 10 Äquivalenten

Chloriodmethan. Bei Temperaturen über 0 °C kommt es vermutlich zu einer Öffnung des Acetalrings, ausgelöst durch Zinkhalogenid-Nebenprodukte, und zu einer Zersetzung des Produkts.^[196] Die Reaktion war bereits innerhalb von 6 Stunden abgeschlossen, wie die NMR-spektroskopische Untersuchung der Reaktionsmischung ergab. Anhand des ¹H-NMR-Spektrums des Rohprodukts konnte außerdem eine gute Diastereoselektivität von 90 % ermittelt werden. Während die Signale der beiden Diastereomere in deuteriertem Chloroform komplett überlagern, sind die Multipletts der benzylichschen CH-Gruppe bei 2.18 ppm in deuteriertem Benzol Basislinien-getrennt (Abbildung 20). Die Diastereomere konnten jedoch nicht säulenchromatographisch getrennt werden und nach Flash-Chromatographie wurde **47** in einer exzellenten Ausbeute von 97 % (*de* 90 %) als gelbliches Öl erhalten. Die leichte Handhabung der Cyclopropanierung ermöglicht die Synthese von **47** im Gramm-Maßstab. Des Weiteren lässt sich die absolute Konfiguration der Cyclopropaneinheit durch die Wahl des chiralen Auxiliars steuern. Da beide Enantiomere des Weinsäurediethylesters kommerziell erhältlich sind, kann der Cyclopropanring in der jeweils gewünschten Stereochemie aufgebaut werden. Die erforderliche (*S,S*)-Konfiguration des hier dargestellten Substrats wurde anhand des Drehwerts ($[\alpha]_D^{RT} = +92.4$; *c* = 1.00 in Ethanol) sichergestellt. Durch Verwendung von L-DET synthetisierten YAMAMOTO *et al.*^[197] das (*R,R*)-konfigurierte Enantiomer (Drehwert: $[\alpha]_D^{RT} = -94.8$; *c* = 1.03 in Ethanol), dessen absolute Konfiguration durch Überführung in die korrespondierende Carbonsäure^[198] bestimmt wurde.

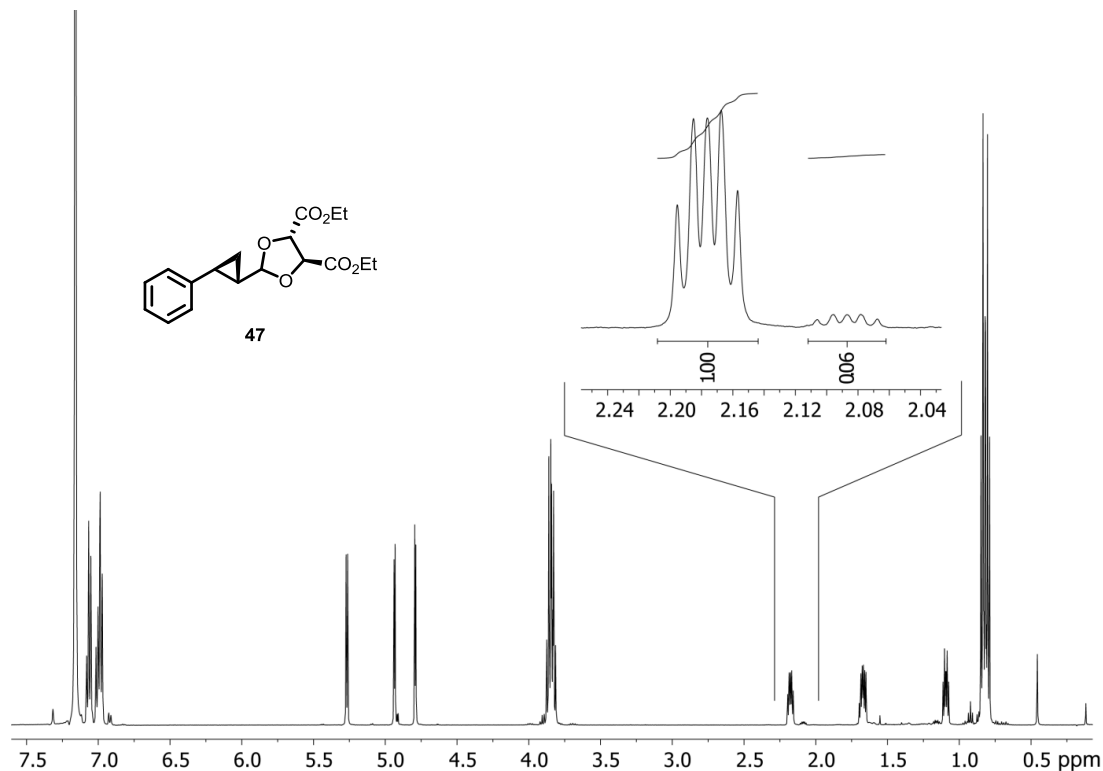
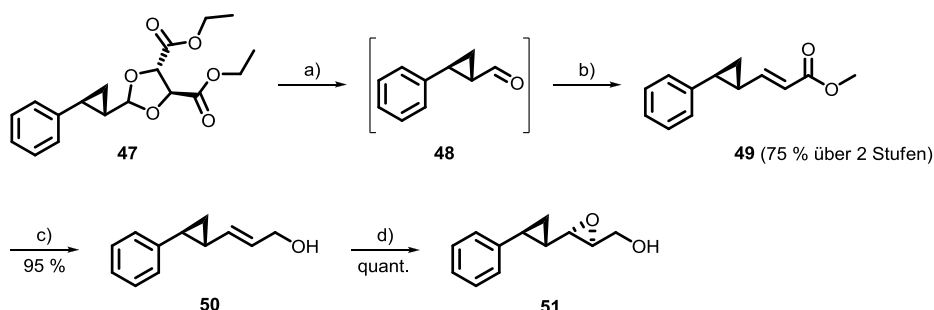


Abbildung 20: ¹H-NMR (500 MHz, C₆D₆) von Verbindung **47**. Vergrößert dargestellt sind die Signale der benzylichschen Protonen, die integriert wurden, um die Diastereoselektivität der Cyclopropanierung zu ermitteln.

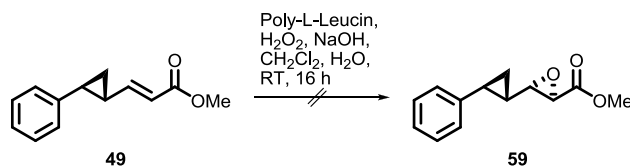
4.3 Asymmetrische Epoxidierung

Der im A-Fragment-Baustein enthaltene ε -Methylsubstituent sollte durch Epoxidringöffnung eines entsprechenden Vorläufermoleküls mit Trimethylaluminium stereoselektiv eingeführt werden. Diesbezüglich musste der Allylkohol **50** synthetisiert und die Epoxidfunktion mit der in Schema 14 gezeigten Konfiguration aufgebaut werden. Zunächst wurde das Acetal **47** durch Umsetzung mit 1.2 Äquivalenten *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in einem Lösungsmittelgemisch aus Tetrahydrofuran und Wasser nach einer Vorschrift von YAMAMOTO entschützt.^[185] Da der entstehende Aldehyd **48** oxidationsempfindlich ist und mit Luftsauerstoff zu der korrespondierenden Carbonsäure reagiert, wurde 10 Minuten ein Argonstrom durch die Reaktionslösung geleitet. Das Gemisch wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt und eine vollständige Umsetzung dünnenschichtchromatographisch bestätigt. Nach basischer Extraktion wurde die organische Phase über Celite[®] filtriert. Das Rohprodukt wurde nach Entfernung des Lösungsmittels ohne weitere Reinigung unverzüglich in der darauffolgenden Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)-Reaktion eingesetzt. Dazu wurde der Aldehyd **48** in absolutiertem Tetrahydrofuran aufgenommen und mit 1.2 Äquivalenten Trimethylphosphonoacetat versetzt.^[199] Nach Abkühlen der Lösung auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde Tetramethylguanidin in einem 1.1-fachen molaren Überschuss langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde weitere 30 Minuten bei erniedrigter Temperatur gerührt, bevor sie über Nacht unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Der ungesättigte Ester **49** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung ausschließlich *trans*-konfiguriert und in einer Ausbeute von 75 % über zwei Stufen erhalten. Analog zu MOORE^[199] wurde der Methylester **49** daraufhin durch Reduktion mit DIBAL-H in den entsprechenden Alkohol überführt. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung von **49** in Tetrahydrofuran auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, mit 2.5 Äquivalenten DIBAL-H versetzt und das Reaktionsgemisch wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die anschließende Flash-Chromatographie und Trocknung im Hochvakuum lieferte den Allylkohol **50** in 95 %iger Ausbeute als leicht bewegliches Öl, das im Kühlschrank zu einem farblosen Feststoff erstarrte.



Schema 14: Synthese des cyclopropanierten Fragment-A-Bausteins, Teil 2: Umwandlung des Acetals **47** in den Allylkohol **50** und dessen asymmetrische Epoxidierung. a) *p*-TsOH·H₂O, THF/H₂O, Rückfluss, 15 h; b) Trimethylphosphonoacetat, Tetramethylguanidin, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, dann RT, 16 h; c) DIBAL-H, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, dann RT, 16 h; d) *ent*-**61**, K₂CO₃, AcOH, Na₂(EDTA), DMM/CH₃CN, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 h.

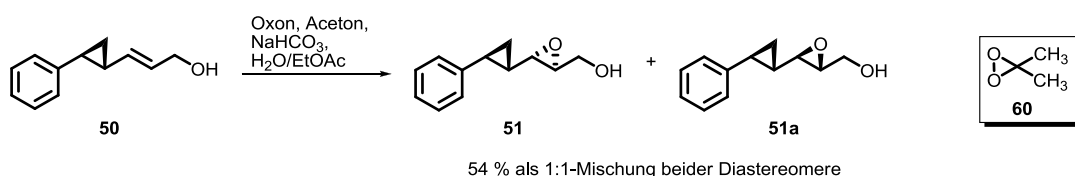
Die Epoxidierung des Allylkohols **50** sollte ursprünglich in Analogie zu POUSSET *et al.*^[184] unter Sharpless-Bedingungen erfolgen. Der katalytische Komplex, bestehend aus L-DET und Titan-tetraisopropoxid, wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebildet und 30 Minuten bei dieser Temperatur altern gelassen. Daraufhin wurde der Allylkohol **50** zugegeben und das Gemisch erneut 30 Minuten gerührt. Nachdem auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt worden war, wurde langsam *tert*-Butylhydroperoxid zugetropft und die Reaktionsmischung bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht gerührt. Das Dünnschichtchromatogramm der Reaktionslösung zeigte eine vollständige Umsetzung, zudem war ein sehr polares Produkt mit starker Intensität sichtbar. Außerdem waren im Chromatogramm mehrere Nebenprodukte geringerer Intensität erkennbar. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes bestätigte ebenfalls die vollständige Umsetzung von **50**, da dessen olefinische Signale nicht mehr vorhanden waren. Jedoch konnte das gewünschte Epoxid **51** nicht NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Bekanntermaßen schlug die Epoxidierung des strukturell ähnlichen (2*E*,4*E*)-5-Phenylpenta-2,4-dien-1-ol unter Sharpless-Bedingungen fehl.^[200] Aus diesem Grund wurde die Sharpless-Epoxidierung zur Generierung von **51** als nicht zielführend erachtet und die Juliá-Colonna-Epoxidierung des Methylesters **49** als Alternative in Betracht gezogen (Schema 15).^[201] In diesem Rahmen wurde eine wässrige Natriumhydroxidlösung auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und Dichlormethan, Poly-L-Leucin sowie 30 %iges Wasserstoffperoxid zugegeben. Das Gemisch wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um ein Aufquellen des Polymers zu gewährleisten. Anschließend wurde **49** hinzugefügt und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Da keine Reaktion erfolgt war, wurde erneut Natriumhydroxid und Wasserstoffperoxid zugegeben und die Mischung weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Abermals konnte mittels Dünnschichtchromatographie keine Umsetzung des Eduktes **49** detektiert werden und diese Methode wurde nicht weiter verfolgt.



Schema 15: Juliá-Colonna -Epoxidierung von **49** mit Poly-L-Leucin.

Im Anschluss wurde die nicht-stereoselektiv verlaufende Epoxidierung mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) untersucht.^[202] Hierzu wurde der Allylkohol **50** in Dichlormethan gelöst, bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 1.5 Äquivalenten *m*-CPBA versetzt und bei dieser Temperatur gerührt. Nach 2 Stunden war bereits ein vollständiger Umsatz erreicht, jedoch war eine Vielzahl an Zersetzungsprodukten im Dünnschichtchromatogramm sichtbar. Das entsprechende Epoxidierungsprodukt konnte NMR-spektroskopisch nicht identifiziert werden. Da die Epoxidierung von *trans*-Zimtalkohol mit Kaliumperoxomonosulfat (Oxon[®]) als primäres Oxidationsmittel in einem Zweiphasensystem bestehend aus Wasser und Ethylacetat in guter Ausbeute verläuft, wurde diese Methode in einem nächsten Versuchsansatz getestet.^[203] Das aktive Epoxidierungsreagenz ist in diesem Fall

Dimethyldioxiran (**60**), das *in situ* aus Aceton und Oxon[®] dargestellt wird (Schema 16). Dioxirane sind allgemein starke Epoxidierungsreagenzien, die zwar nicht stabil sind, aber durch Oxidation eines Ketons mit Oxon[®] oder Wasserstoffperoxid in der Reaktionsmischung gebildet werden können. Da das Keton nach erfolgter Epoxidierung regeneriert wird, sind katalytische Mengen ausreichend. Demgemäß wurde eine Mischung aus Natriumhydrogencarbonatlösung, Aceton und Ethylacetat mit dem Allylalkohol **50** versetzt. Anschließend wurde eine wässrige Oxon[®]-Lösung innerhalb von 30 Minuten zugetropft und der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt. Das Oxon[®] wurde dabei in äquimolaren Mengen bezüglich des Alkohols **50** eingesetzt. Die Reaktion war bereits nach 1 Stunde abgeschlossen und das Dünnschichtchromatogramm zeigte eine saubere Umsetzung. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden die Diastereomere **51** und **51a** in einem Verhältnis von 1:1 als nicht trennbares Gemisch isoliert, wobei die Ausbeute 54 % betrug. Aufgrund der moderaten Ausbeute trotz des vollständigen Umsatzes und dem Auftreten eines Basislinien-Spots in den bei der Chromatographie erhaltenen Produktfraktion wurde eine teilweise Zersetzung der Epoxide vermutet.



Schema 16: Epoxidierung von Allylalkohol **50** mit Dimethyldioxiran **60** ergibt die Diastereomere **51** und **51a** zu gleichen Anteilen.

Da die Epoxidierung von **50** mit Dimethyldioxiran gelang, wurde nun eine Möglichkeit zur diastereoselektiven Reaktionsführung, die überwiegend das Diastereomer **51** bildet, in Betracht gezogen. Shi und Mitarbeiter entwickelten das auf Fructose basierende chirale Dioxiran **62** (Abbildung 21) und setzten dieses erfolgreich bei der enantioselektiven Epoxidierung von *trans*-disubstituierten sowie trisubstituierten Alkanen ein.^[204-207] Diese Reaktionen werden für gewöhnlich in gepufferten Zweiphasensystemen in Anwesenheit eines Phasentransferkatalysators durchgeführt. Die Zugabe von Kaliumcarbonat beschleunigt einerseits die Bildung des katalytisch aktiven Dioxirans, erniedrigt aber gleichzeitig die Stabilität des Oxons[®]. Des Weiteren begünstigt ein basisches Milieu eine längere Lebensdauer des Katalysators sowie eine höhere Reaktionsrate. Das pH-Optimum bei der Epoxidierung von Hydroxyalkenen liegt bei 10.5 und kann durch die Zugabe von Kaliumcarbonat eingestellt werden.

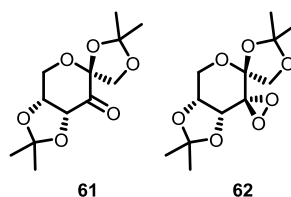
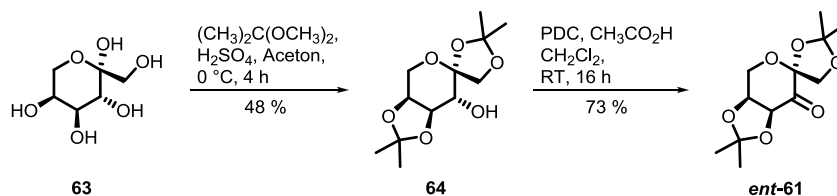


Abbildung 21: Shi-Katalysator **61** und das korrespondierende Dioxiran **62**.

Der kommerziell erhältliche Shi-Katalysator **61** (D-Epoxon[®]) wird aus D-Fructose dargestellt und erzeugt bei der Epoxidierung von Allylkohlen mit Oxon[®] als Oxidationsmittel die (*R,R*)-konfigurierten Produkte.^[208] Der Aufbau des (*R*)-konfigurierten Methylsubstituenten in dem Cyclopropan-A-Fragment **40** erfordert das Epoxid **51** mit (*S,S*)-Konfiguration, welches mit Hilfe von *ent*-**61** zugänglich sein sollte. Zur Evaluierung der Shi-Epoxidierung wurde zunächst das kostengünstige D-Epoxon[®] **61** verwendet. Analog zu einer Literaturvorschrift^[208] wurde der Allylkohol **50** mit 0.3 Äquivalenten **61** und 1.4 Äquivalenten Oxon[®] in einem Lösungsmittelgemisch aus Dipropylenglykoldimethylether (DMM) und Acetonitril bei 0 °C zur Reaktion gebracht, wobei das Oxidationsmittel innerhalb von 3 Stunden zugetropft wurde. Gewöhnlich ist die Epoxidierung nach beendeter Zugabe abgeschlossen, jedoch wurde in diesem Fall dünnschichtchromatographisch keine vollständige Umsetzung detektiert. Daher wurde die Reaktionsmischung eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt, allerdings konnte auch danach keine Verbesserung des Umsatzes festgestellt werden. Unter den vorherrschenden Reaktionsbedingungen zersetzt sich das Keton **61** mit der Zeit und die Stereoinduktion der Epoxidierung wird vermutlich durch ein katalytisch aktives, achirales Zersetzungsprodukt verringert.^[206] Aus diesem Grund wurde der Ansatz trotz unvollständiger Reaktion aufgearbeitet und eine NMR-spektroskopische Analyse des Rohprodukts ergab, dass noch 50 % des Eduktes **50** vorhanden waren. Daraufhin wurde in einem zweiten Ansatz die Katalysatormenge auf ebenfalls 1.4 Äquivalente erhöht. Dieses Mal konnte im ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts ein 90 %iger Umsatz festgestellt werden, allerdings war dieses Spektrum wegen der vollständigen Überlagerung der Signale nicht zur Bestimmung der Diastereoselektivität geeignet. Quantitative ¹³C-NMR-Spektren können mit der *inversed gated decoupling*-Methode erhalten werden und so wurde bei der Epoxidierung mit **61** als Katalysator ein Diastereomerenverhältnis von ungefähr 4:1 anhand der Signale des integrierbaren ¹³C-NMR-Spektrums ermittelt.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurde der Organokatalysator *ent*-**61** in einer zweistufigen Synthese ausgehend von L-Fructose (**63**) hergestellt (Schema 17). Zunächst wurde **63** mit Aceton säurekatalysiert in das Ketal **64** überführt, das daraufhin mit Pyridiniumdichromat (PDC) in guter Ausbeute zu dem Keton *ent*-**61** oxidiert wurde.^[209]



Schema 17: Darstellung des Shi-Katalysators *ent*-**61** ausgehend von L-Fructose (**63**).

Bei der Verwendung von *ent*-**61** als Katalysator waren 0.3 Äquivalente zur vollständigen Epoxidierung von **50** ausreichend. Die Reaktion wurde bei –5 bis –10 °C durchgeführt und war unmittelbar nach beendeter Zugabe des Oxidationsmittels abgeschlossen. Nach Aufarbeitung konnte das Epoxid **51** in

quantitativer Ausbeute erhalten werden, wobei die ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchung des Rohprodukts ergab, dass dieses noch ungefähr 5 % des Ketons **ent-61** enthielt. Ansonsten wurde das Produkt in zufriedenstellender Reinheit isoliert und daher von einer säulenchromatographischen Reinigung abgesehen, da dieses vermutlich zu einer Zersetzung des Epoxids und folglich zu einem Ausbeutenverlust führt. Des Weiteren beeinträchtigte das Keton **ent-61** nicht die nachfolgende Reaktion und so wurde **51** als Rohprodukt weiter umgesetzt. Die Analyse des integrierbaren ^{13}C -NMR-Spektrums ergab ein Diastereomerenverhältnis von 10:1 vermutlich zugunsten des Diastereomers **51** (Abbildung 22). Die Konfiguration des Epoxids könnte durch eine noch ausstehende Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden.

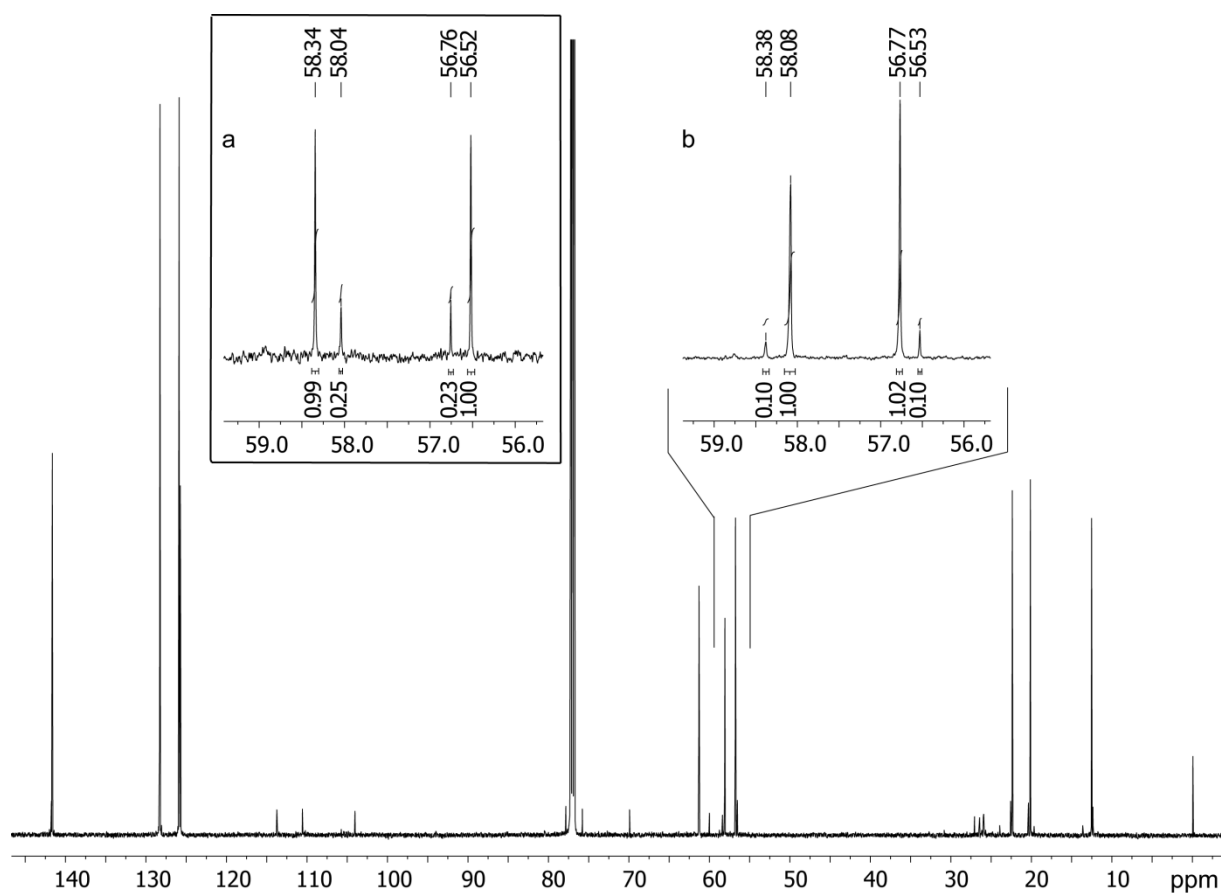


Abbildung 22: Integrierbares ^{13}C -NMR-Spektrum des Epoxids **51**. Der Organokatalysator **ent-61** ist noch in geringen Mengen in dem Rohprodukt enthalten. Die Diastereoselektivität der Epoxidierung wurde durch Integration der jeweiligen Signale der beiden epoxidischen CH-Gruppen ermittelt. a) Wird **61** als Katalysator eingesetzt, wird vermutlich **51a** als Hauptprodukt gebildet. b) Die Verwendung von **ent-61** als Katalysator generiert demzufolge **51** als Hauptdiastereomer.

4.4 Diastereoselektive Methylierung

Epoxide sind zum einen wichtige Strukturelemente von Wirkstoffen, zum anderen spielen sie eine bedeutende Rolle als Intermediate bei der Darstellung von Naturstoffen und deren synthetischen Analoga.^[210] Durch nucleophile Ringöffnung von Epoxiden lässt sich eine Vielzahl an strukturell unterschiedlichen Alkoholen erzeugen. Zusätzlich verläuft der Ringöffnungsprozess stereoselektiv und so ist die Stereochemie an den benachbarten Kohlenstoffatomen der entstehenden Produkte zuverlässig voraussagbar. Daher wird die asymmetrische Epoxidierung routinemäßig zur Einführung der geforderten Chiralität von funktionellen Gruppen angewandt. So erzeugt die regio- und stereoselektive Ringöffnung von 2,3-Epoxyalkoholen mit Trialkylaluminiumreagenzien hauptsächlich 1,2-Diole, wobei der Alkylsubstituent in Position 3 unter Inversion der Konfiguration eingeführt wird.^[211,212] Die Stereoinduktion kann mit Hilfe einer S_N2 -Reaktion über ein Kontaktionenpaar erklärt werden. Ein Epoxyalkoholmolekül koordiniert sowohl über den Epoxy- als auch den Hydroxylsauerstoff an ein Aluminium (Abbildung 23). Aufgrund dessen wird die Epoxysauerstoff-Kohlenstoff(C^3)-Bindung geschwächt und der Bindungsbruch erfolgt simultan zum nucleophilen Angriff eines Alkylanions, das von einem zweiten Trialkylaluminiummolekül, gebunden an ein weiteres Substratmolekül, freigesetzt wird. Vor diesem Hintergrund wurde versucht die ε -Methylgruppe mittels stereoselektiver

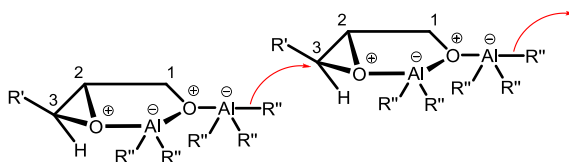
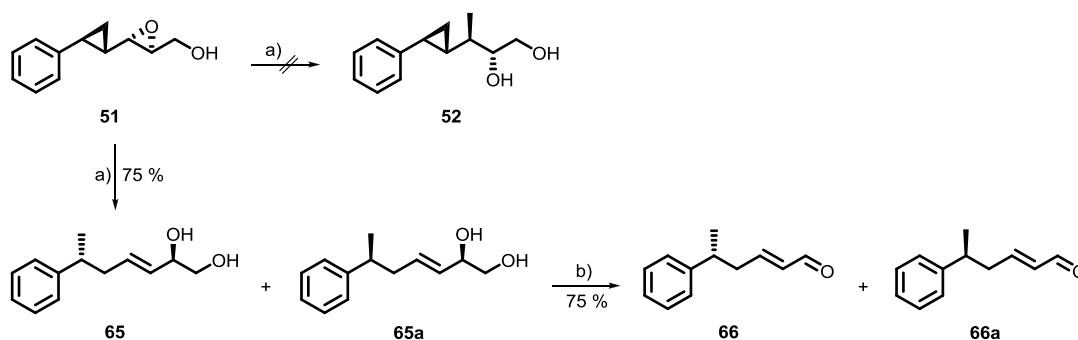


Abbildung 23: Stereo- und regioselektive Ringöffnung von Epoxyalkoholen durch S_N2 -Reaktion mit Trialkylaluminiumreagenzien.^[211,212]

Ringöffnung des Epoxyalkohols **51** mit Trimethylaluminium ($AlMe_3$) gemäß einer Vorschrift von PESECKIS einzuführen.^[212] Hierzu wurde eine auf $-10^\circ C$ gekühlte Lösung von **51** in Dichlormethan langsam mit 3.5 Äquivalenten $AlMe_3$ als 2 M Lösung in Hexan versetzt. Die Reaktion war innerhalb einer Stunde beendet und nach Flash-Chromatographie wurde in 75 %iger Ausbeute eine Produktfraktion isoliert, die allerdings nicht das gewünschte 1,2-Diol **52**, sondern ein 2:1-Gemisch der Diastereomere **65** und **65a** enthielt (Schema 18). Diese Verbindungen wurden sowohl durch NMR-Spektroskopie als auch massenspektroskopisch (HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 435.25053 [2M+Na]^+$, berechnet für $[(C_{13}H_{18}O_2)_2+Na]^+$: $m/z = 435.25058$) eindeutig charakterisiert. Die olefinische Struktur äußert sich durch die Protonensignale zwischen 5.30 und 5.70 ppm. Das Diastereomerenverhältnis wurde durch Integration der 1H -NMR-Signale eines der beiden diastereotopen Methylenprotonen der CH_2OH -Gruppe bei 3.46 bzw. 3.52 ppm ermittelt, da die übrigen Signale der beiden Diastereomere einander entweder partiell oder vollständig überlagern. Allerdings wurde nicht aufgeklärt, welches der Diastereomere in geringfügigem Überschuss gebildet wurde. In einem möglichen Reaktionsmechanismus, der zur Bildung der Diole **65** und **65a** führt, koordiniert $AlMe_3$ als Lewis-Säure zunächst an die Hydroxyl- und Epoxidfunktionalität der Verbindung **51**, wodurch die Epoxysauerstoff-Kohlenstoff(C^3)-Bindung geschwächt wird. Daraufhin erfolgt wahrscheinlich der

Bindungsbruch unter Epoxidringöffnung und ein sekundäres Carbeniumion wird intermediär gebildet. Die anschließende Ringöffnung der Cyclopropaneinheit führt vermutlich zur Ausbildung der C=C-Doppelbindung und eines Benzylkations, das nun nucleophil von einem Methylanion angegriffen wird. Folglich wird die Methylgruppe in einer S_N1 -Reaktion eingeführt. Ein solcher Reaktionsmechanismus würde die Bildung von Diastereomeren erklären.

In einem weiteren Versuch wurde die Reaktion bei $-100\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt und Trimethylaluminium in äquimolaren Mengen eingesetzt. Jedoch erfolgte auch dieses Mal der nucleophile Angriff am benzylichen Kohlenstoffatom, wie anhand der NMR-spektroskopischen Analyse des Rohprodukts belegt werden konnte. Zur Bestätigung der 1,2-Diol-Struktur wurde das Diastereomerenmisch in die korrespondierenden Aldehyde überführt. Dazu wurden **65** und **65a** in wässrigem THF vorgelegt und mit Natriumperiodat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine vollständige Umsetzung der Diole erfolgte. Die charakteristischen Aldehydsignale waren sowohl im $^1\text{H-NMR}$ - (9.42 ppm) als auch im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (193.9 ppm) des Rohprodukts sichtbar. Bei den Aldehyden **66** und **66a** handelt es sich um Enantiomere und demgemäß war in den NMR-Spektren jeweils nur ein Signalsatz vorhanden. Für die Fortführung dieses Projekts erscheint es sinnvoll weitere Methylierungsreagenzien zu testen. Allerdings konnte dieses aus zeitlichen Gründen nicht im Rahmen dieser Dissertation realisiert werden.

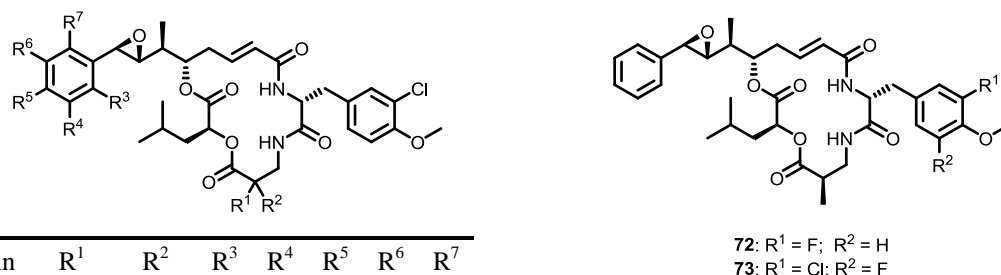


Schema 18: Synthese des cyclopropanierten Fragment-A-Bausteins, Teil 3: Umsetzung von **51** mit Trimethylaluminium führte zu der nucleophilen Ringöffnung der Cyclopropaneinheit. a) AlMe_3 , CH_2Cl_2 , $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; b) NaIO_4 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, RT, 2 h.

5 Fluorierte Cryptophycine für SAR-Studien

5.1 Motivation und Syntheseplanung

Der Einfluss von Fluorsubstituenten auf die Cytotoxizität von Cryptophycinen ist derzeit nur in geringem Maße untersucht worden. MOORE stellte fluorierte Fragment-A-Analoga von Cryptophycin-1 und -52 totalsynthetisch dar (Abbildung 24).^[213] Das Cryptophycin-Derivat **68** (IC₅₀-Wert = 39 pM) trägt einen Fluorsubstituenten in uA-C⁴-Position und besitzt eine mit Cryptophycin-1 (IC₅₀-Wert = 29 pM) vergleichbare *in vitro*-Aktivität gegenüber der humanen Krebszelllinie KB-3-1.^[214] Das Chlorhydrin von **71** (IC₅₀-Wert = 33 pM, CEM-Zelllinie), einem auf Cryptophycin-52 (IC₅₀-Wert = 22 pM, CCRF-CEM-Zelllinie) basierenden Analogon, wurde von ELI LILLY als sehr viel versprechender Kandidat patentiert.^[215] Mittels bakterieller Fermentation produzierten MOORE *et al.* die B-Fragment-fluorierten Verbindungen **72** und **73** (Abbildung 24). Zu diesem Zweck wurden Stämme von *Nostoc* sp. in einem, mit den entsprechend substituierten Phenylalanin-Derivaten, die als Ausgangsstoffe für das Fragment-B fungieren, angereicherten Nährmedium kultiviert. Die biologische Aktivität der Derivate **72** und **73** gegenüber KB-Tumorzellen ist allerdings nicht explizit wiedergegeben (MIC-Werte¹ <1 nM).



Cryptophycin	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
67	-CH ₃	H	F	H	H	H	H
68	-CH ₃	H	H	H	F	H	H
69	-CH ₃	H	H	F	H	F	H
70	-CH ₃	-CH ₃	H	F	H	H	H
71	-CH ₃	-CH ₃	H	H	F	H	H

Abbildung 24: Fluorierte Derivate von Cryptophycin-1 und -52.^[213-215]

In der Literatur sind aktuell keine epoxidischen Cryptophycine bekannt, die mehr als zwei Fluoratome beziehungsweise eine Trifluormethylgruppe tragen. Ziel dieses Projekts war daher die Synthese zweier fluoriertes Cryptophycin-Derivate, die zum einen eine Trifluormethylgruppe in *para*-Position am Fragment-A-Phenylring, zum anderen einen pentafluorierten Phenylring im Fragment-B-Baustein tragen, da diese Strukturmerkmale bekannterweise die metabolische Stabilität erhöhen (Abbildung 25).^[75] Vorteilhaft ist, dass die Fragment-Bausteine auf kommerziell erhältliche *building*

¹ Der MIC-Wert bezeichnet die minimal inhibierende Konzentration (*minimal inhibitory concentration*).

blocks zurückgeführt werden können. Die etablierten Syntheserouten zur Darstellung der jeweiligen fluorierten Fragment-Bausteine sowie die konvergente Cyclisierungsstrategie zu den depsipeptidischen Makrocyclen sollten beibehalten werden.

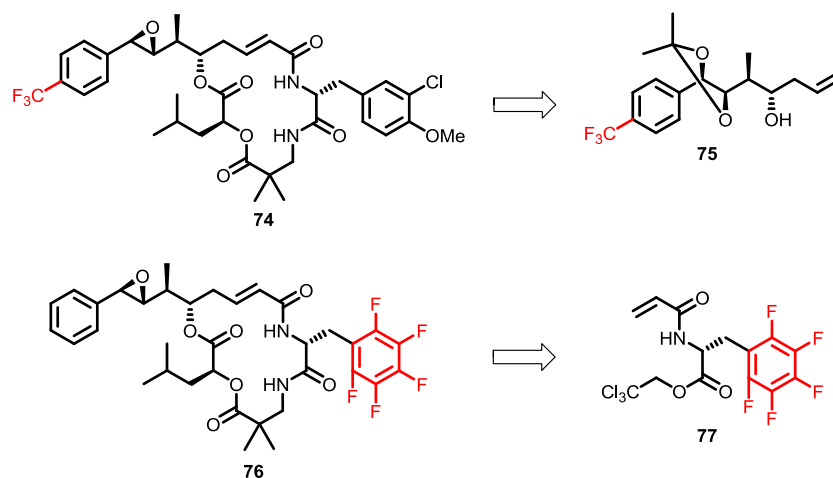
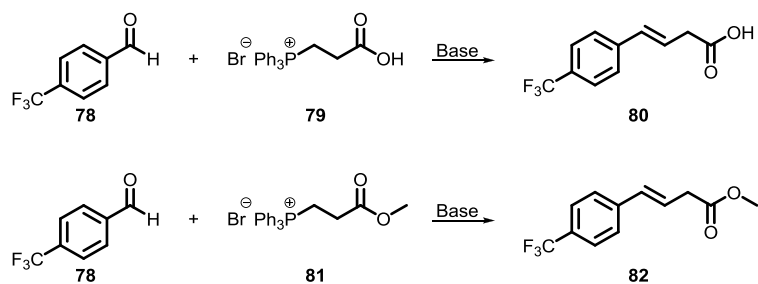


Abbildung 25: Struktur der fluorierten Cryptophycine und der modifizierten Fragment-Bausteine.

5.2 Synthese eines Trifluormethyl-substituierten Fragment-A-Bausteins

5.2.1 *trans*-Selektive Wittig-Reaktion

Die Darstellung des fluorierten Fragment-A-Bausteins **75** sollte ausgehend von (*E*)-4-(4-Trifluormethylphenyl)-but-3-ensäure (**80**) bzw. dem entsprechenden Methyl ester **82** erfolgen (Schema 19). Es wurde zunächst versucht diese Verbindung durch Wittig-Reaktion von 4-Trifluormethylbenzaldehyd (**78**) mit den Wittigreagenzien **79** bzw. **81** in einem einzigen Reaktionsschritt zu erhalten. Die *trans*-selektive Wittig-Reaktion wurde bereits von EIBLER^[47] erfolgreich bei der Synthese des nativen A-Fragments angewendet und nach Methylierung wurde das nicht-trifluormethylierte Analogon von **82** in guter Ausbeute und *trans*-Selektivität gewonnen.



Schema 19: Die *E*-selektive Wittig-Reaktion von Aldehyd **78** sollte zu den β,γ -ungesättigten Substraten **80** und **82** führen.

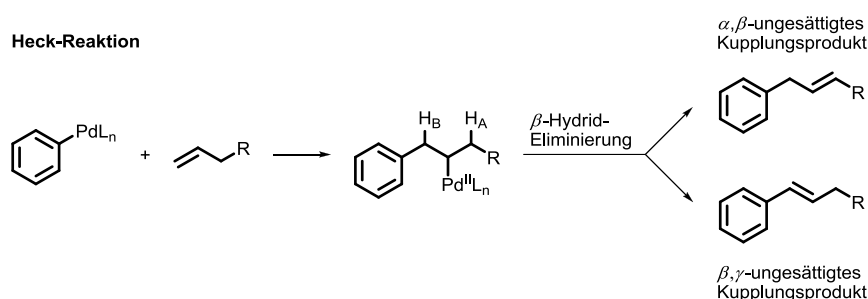
In Anlehnung an eine Literatursynthese^[216] wurde daher 4-Trifluormethylbenzaldehyd (**78**) mit **79** in Gegenwart von 2.2 Äquivalenten Kalium-*tert*-butanolat (KO*t*Bu) in THF versetzt und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung bestätigte die Entstehung einer neuen Verbindung und daraufhin wurde der Ansatz aufgearbeitet. Das ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts wies jedoch nicht die typischen Olefin-Signale im Bereich von 4.5 bis 8.0 ppm auf. Das Wittig-Salz **79** besitzt eine Carbonsäurefunktion, die ebenfalls von der Base deprotoniert wird. Aus diesem Grund sind 2.2 Äquivalente Base möglicherweise nicht ausreichend, um das CH-acide Proton zu abstrahieren und das entsprechende Ylid zu generieren. Folglich wurde in einem weiteren Versuch die Menge an KO*t*Bu auf einen 4.5-fachen molaren Überschuss erhöht. Auch in diesem Fall konnte das gewünschte Olefin NMR-spektroskopisch nicht nachgewiesen werden. Anstelle der Carbonsäure **80** kann auch der entsprechende Methylester **82** durch Verwendung von **81** als Wittig-Reagenz dargestellt werden. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die anschließende Methylierung der ungesättigten Carbonsäure mit cancerogenem Methyljodid entfallen würde. Infolgedessen wurde der Aldehyd **78** mit **81** und einem 2.2-fachen Überschuss an Base umgesetzt. Abermals konnte das Wittig-Produkt nicht NMR-spektroskopisch erfasst werden. Die hohe *E*-Selektivität von Carboxy-Yliden ist bei der Verwendung von Li⁺, K⁺ oder Na⁺ als Gegenion identisch.^[217] Deshalb wurde in einem weiteren Ansatz die stärkere Base NaH verwendet und als Lösungsmittel ein Gemisch aus DMSO und THF gewählt, um eine vollständige Lösung der beiden Reaktanden sicher zu stellen.^[218] Dennoch ist auch in diesem Versuch keine Umsetzung zu dem gewünschten Produkt **80** beobachtet worden. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen der Ansätze sind in Tabelle 1 abgebildet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die β,γ -ungesättigten Verbindungen **80** und **82** nicht durch Wittig-Reaktion darstellbar waren. Aldehyde bilden mit Wasser in einer Gleichgewichtsreaktion die entsprechenden geminalen Dirole, wobei das Gleichgewicht in der Regel zu Gunsten des Aldehyds verschoben ist. Im Falle von 4-Trifluormethylbenzaldehyd (**78**) konnte das Vorliegen eines geminalen Diols mittels NMR-spektroskopischer Untersuchung, die die charakteristischen Aldehydsignale aufwies, ausgeschlossen werden.

Tabelle 1: Verschiedene Reaktionsbedingungen wurden bei den Wittig-Reaktionen getestet.

Eintrag	Wittig-Reagenz (Äq.)	Aldehyd (Äq.)	Base (Äq.)	Lösungsmittel	Temperatur, Reaktionszeit	Ausbeute
1	79 (1.0)	78 (1.5)	KO <i>t</i> Bu (2.2)	THF	0 °C → RT, 16 h	0 %
2	79 (1.0)	78 (1.5)	KO <i>t</i> Bu (4.5)	THF	0 °C → RT, 16 h	0 %
3	81 (1.0)	78 (1.5)	KO <i>t</i> Bu (2.2)	THF	0 °C → RT, 16 h	0 %
4	79 (1.0)	78 (1.0)	NaH (0.83)	THF/DMSO	0 °C → RT, 16 h	0 %

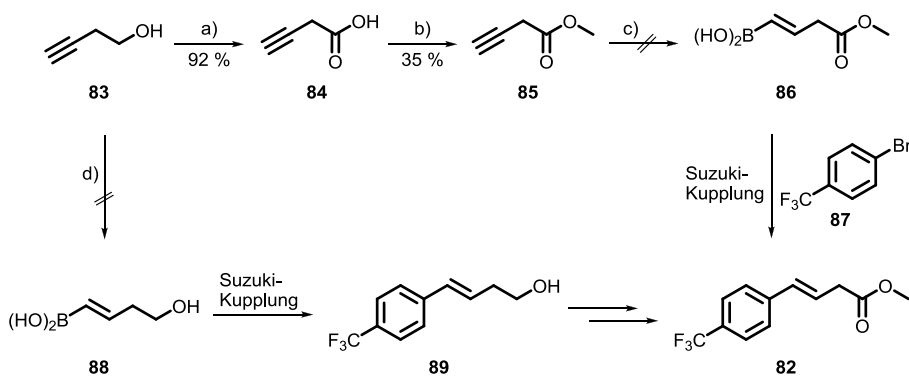
5.2.2 Suzuki-Kupplung

Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen sind ein wichtiges Werkzeug in der organischen präparativen Chemie, so spielt zum Beispiel die Suzuki-Kupplung eine bedeutende Rolle bei der Synthese von Naturstoffen.^[219-221] Die vorläufigen Ergebnisse von EIBLER^[47] zum Einsatz einer metall-katalysierten Kreuzkupplung, namentlich Heck-Reaktion, bei der Synthese des nativen A-Fragment-Bausteins rechtfertigen eine Vertiefung dieser Studien. Die Suzuki-Kupplung bietet gegenüber der Heck-Reaktion den Vorteil, dass bei der reduktiven Eliminierung selektiv nur ein Kupplungsprodukt gebildet werden kann. Im Falle der Heck-Kupplung kann die β -Hydrideliminierung aufgrund der unzulänglichen Differenzierung des Metallzentrums zwischen dem benzylichen (H_B) und allylichen (H_A) Proton zu einem Gemisch aus den α,β - und β,γ -ungesättigten Kupplungsprodukten führen (Schema 20).^[222]



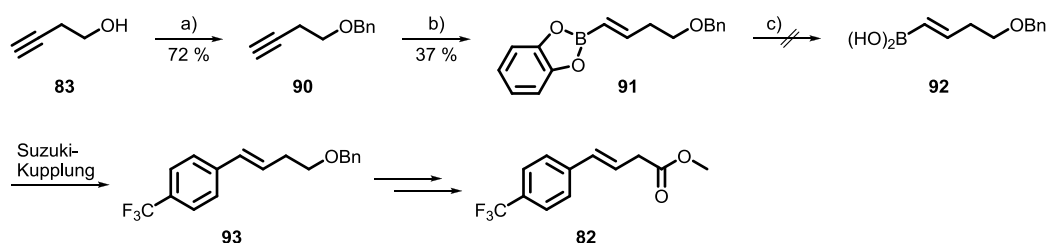
Schema 20: Die Heck-Reaktion kann nach β -Hydrideliminierung zu einem Gemisch der α,β - und β,γ -ungesättigten Kupplungsprodukte führen.

Vor diesem Hintergrund sollte die Suzuki-Kupplung von 4-(Trifluormethyl)brombenzol (**87**) und einer geeigneten Organo-Borverbindung untersucht werden (Schema 21).^[223] Der β,γ -ungesättigte Ester **82** sollte dabei in hoher Regio- und Stereoselektivität gebildet werden. Die benötigte Boronsäure **86** sollte in einer dreistufigen Synthese ausgehend von But-3-in-1-ol (**83**) dargestellt werden. Die Oxidation von **83** mit Chromtrioxid führte in 92 %iger Ausbeute zu der entsprechenden Carbonsäure **84**, die ohne weitere Reinigung zu dem Methylester **85** umgesetzt wurde.^[224] Das Alkin **85** sollte daraufhin durch Hydroborierung mit Catecholboran und unmittelbarer Hydrolyse des intermediär gebildeten Boronsäureesters in die Boronsäure **86** überführt werden.^[225] Das Produkt **86** konnte allerdings nicht isoliert werden, da der Ester **85** vermutlich durch das Catecholboran zu dem entsprechenden Aldehyd reduziert wurde, der seinerseits dann zum Alkohol reduziert wurde.^[226] Infolgedessen wurde zunächst versucht But-3-in-1-ol (**83**) durch Hydroborierung mit Catecholboran zu der korrespondierenden Boronsäure **88** umzusetzen. Nach anschließender Suzuki-Reaktion mit **87** sollte der Alkohol **89** erhalten werden, der durch Oxidation und darauffolgende Veresterung in das gewünschte Produkt **82** überführt werden sollte. Jedoch konnte die Boronsäure **88** nicht über den gewählten Weg hergestellt werden, da eventuell die freie Alkoholfunktion die Reaktivität des Substrats bei der Hydroborierung beeinflusst.



Schema 21: Geplante Darstellung von **82** mittels Suzuki-Kupplung. a) CrO_3 , H_2SO_4 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 4 h; b) $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$, HCl , MeOH , RT , 15 h; c) 1. Catecholboran, THF , $75\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h; 2. H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$; d) 1. Catecholboran, THF , $75\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h; 2. H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$.

Daraufhin wurde die Hydroborierung des benzylgeschützten Alkohols **90** untersucht, der in guter Ausbeute ausgehend von **83** erhalten wurde^[227] (Schema 22). **90** konnte mit Catecholboran in einer Ausbeute von 37 % zu dem entsprechenden Boronsäureester **91** umgesetzt werden,^[225,228] wobei die destillative Reinigung größtenteils zur Zersetzung der Verbindung führte und für die niedrige Ausbeute verantwortlich ist. Die anschließende Hydrolyse mit Wasser lieferte die Boronsäure **92**, welche allerdings stark verunreinigt war. Eine weitere Aufreinigung mittels Säulenchromatographie blieb erfolglos, da die Säure **92** nicht wieder isoliert werden konnte. Die geplante Suzuki-Kupplung konnte aufgrund der hier beschriebenen Probleme nicht getestet werden und dieser Ansatz zur Darstellung von **82** wurde daraufhin nicht weiter verfolgt.

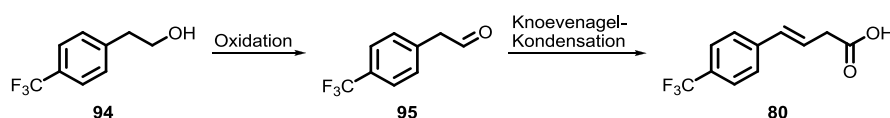


Schema 22: Geplante Hydroborierung des benzylgeschützten Alkohols und Suzuki-Kupplung der Boronsäure **92** mit 4-(Trifluormethyl)brombenzol (**87**) sowie die weitere Umsetzung zu **82**. a) 1. NaH , Imidazol, THF , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min; 2. BnBr , TBAB , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 4 h; b) Catecholboran, THF , $75\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h; c) H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.3 Knoevenagel-Kondensation

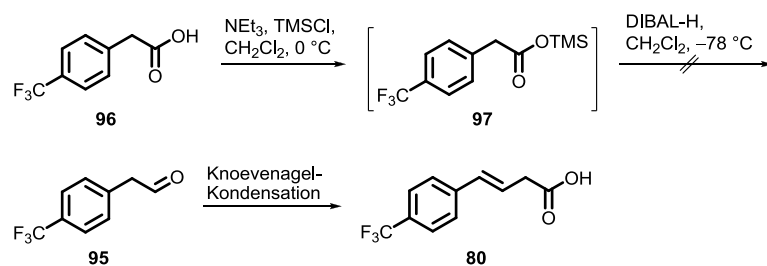
Die nach RAGOISSIS^[168] modifizierte Knoevenagel-Kondensation findet standardmäßig Anwendung bei der Synthese des nativen Fragment-A-Bausteins.^[46,47,167] Zur Darstellung von **80** durch Knoevenagel-Kondensation wird der Aldehyd **95** benötigt, der wiederum durch Oxidation von 4-(Trifluormethyl)phenylethanol (**94**) gewonnen werden kann (Schema 23). Allerdings blieben die

hier untersuchten Oxidationsmethoden erfolglos. So führten die milden Reaktionsbedingungen der Swern-Oxidation^[229] zu keinem Umsatz von **94** und 60 % des Eduktes wurden nach Chromatographie zurück gewonnen. Bei dem Einsatz von Pyridiniumchlorchromat^[230] als Oxidationsmittel zeigte das Dünnschichtchromatogramm eine Vielzahl an Spots geringer Intensität, die bei der anschließenden chromatographischen Reinigung nicht separat isoliert werden konnten. Die erhaltenen Mischfraktionen wurden NMR-spektroskopisch analysiert, jedoch enthielt keine das gewünschte Produkt **95** und daher kam es unter diesen Versuchsbedingungen vermutlich zu einer Zersetzung des Eduktes **94**. In einem weiteren Ansatz wurde die Oxidation von **94** mit Dess-Martin-Periodinan^[231] getestet. Nach Flash-Chromatographie konnte in 40 %iger Ausbeute eine Produktfraktion isoliert werden, allerdings zeigte die NMR-spektroskopische Untersuchung eine starke Verunreinigung der Substanz. Diese Verunreinigung konnte jedoch aufgrund eines nahezu identischen Retentionsfaktors auch nicht in einem zweiten säulenchromatographischen Reinigungsschritt von dem Produkt abgetrennt werden. Aufgrund dessen wurde die Dess-Martin-Oxidation zur Darstellung von **95** im größeren Maßstab als nicht praktikabel erachtet.



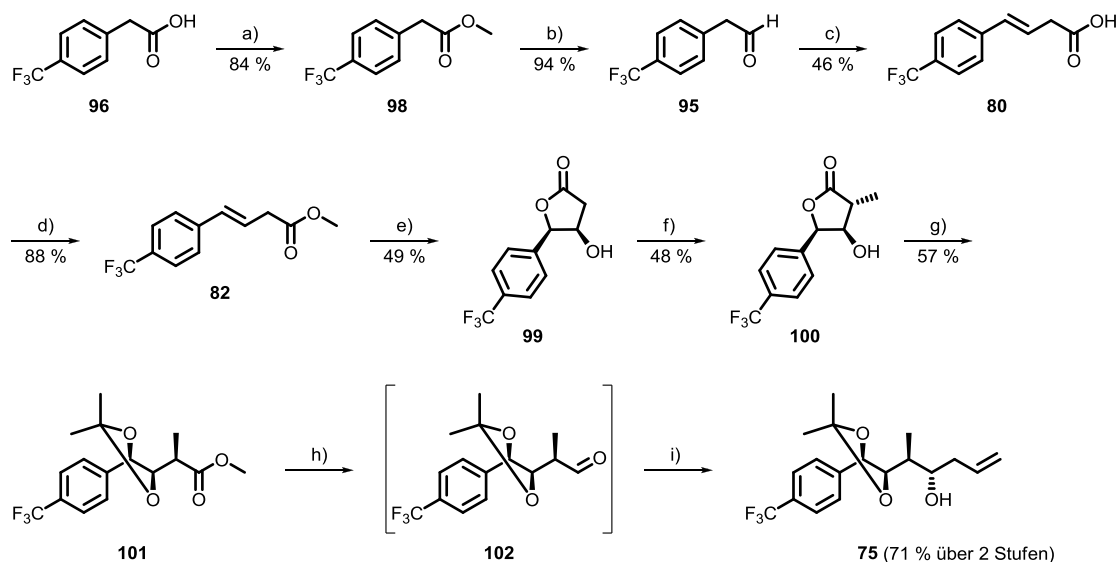
Schema 23: Darstellung der Carbonsäure **80** in einer zweistufigen Synthesesequenz.

Neben der Oxidation von Alkoholen bietet die direkte Reduktion von Carbonsäuren zu den korrespondierenden Aldehyden eine weitere Möglichkeit zur Generierung dieser Funktionalität. In diesem Kontext berichtet MURALIDHAR^[232] über die unmittelbare Umwandlung von Carbonsäuren zu Aldehyden durch chemoselektive Reduktion der *in situ* dargestellten TMS-Ester mit DIBAL-H in einer Eintopfreaktion (Schema 24). Die Vorzüge dieses Protokolls bestehen in der einfachen Durchführung und Aufarbeitung sowie den milden Reaktionsbedingungen. Dieser Vorschrift folgend wurde 4-(Trifluormethyl)phenylessigsäure (**96**) mit äquimolaren Mengen an Triethylamin und Trimethylsilylchlorid bei 0 °C versetzt. Nachdem die exotherme Reaktion abgeschlossen war, wurde das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde der Ansatz auf -78 °C gekühlt und 1.0 Äquivalente DIBAL-H zugegeben. Wie in der Literatur beschrieben wurde der Reaktionsansatz nach 30 Minuten aufgearbeitet. Die Analyse des Rohprodukts mittels analytischer HPLC zeigte jedoch keine Umsetzung und so wurde nach säulenchromatographischer Reinigung das Edukt zu 50 % reisoliert. Auch dieser Ansatz zur Generierung der β,γ -ungesättigten Carbonsäure **80** war nicht zielführend.



Schema 24: Direkte Umwandlung einer Carbonsäure zu dem entsprechenden Aldehyd durch Reduktion des *in situ* generierten TMS-Ester. Die anschließende Knoevenagel-Kondensation sollte zu der β,γ -ungesättigten Carbonsäure **80** führen.

Die Synthese von (*E*)-4-[4-(Trifluormethyl)phenyl]prop-3-ensäuremethylester (**82**) gelang schließlich durch Veresterung von **96** mit Methanol nach einer Vorschrift von BODNAR^[233] (Schema 25). Dazu wurde die Carbonsäure **96** mit einem 2.3-fachen molaren Überschuss an Thionylchlorid in Methanol zur Reaktion gebracht und nach Entfernung des Eisbades wurde das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dabei mittels analytischer RP-HPLC kontrolliert und bei einem vollständigen Umsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser beendet. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde das Rohprodukt in guter Ausbeute erhalten und das ^1H - sowie ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt dessen Reinheit, so dass **98** ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt wurde. Im Anschluss wurde der Ester **98** gemäß einer Literaturvorschrift^[167] mit 3.0 Äquivalenten DIBAL-H bei tiefer Temperatur in den korrespondierenden Aldehyd **95** überführt. Die Reaktion war nach 3.5 Stunden beendet und **95** wurde nach wässriger Aufarbeitung und Filtration über Celite[®] in einer sehr guten Ausbeute von 94 % als Rohprodukt isoliert. Die säulenchromatographische Reinigung von **95** wurde mit einer geringen Substanzmenge getestet, allerdings erwies sich die Verbindung als instabil und eine Vielzahl an Zersetzungsprodukten wurde isoliert. Abermals erlaubte jedoch die hohe Reinheit des Rohproduktes, die NMR-spektroskopisch belegt wurde, dessen Einsatz in der darauffolgenden Reaktion. Die Knoevenagel-Kondensation sowie die anschließenden Reaktionsschritte erfolgten analog zu der Darstellung des nativen A-Fragment-Bausteins. In diesem Rahmen wurde **95** mit Malonsäure in Gegenwart des Dehydratisierungskatalysators Pyridiniumacetat in DMSO bei 65°C für 1.5 Stunden erwärmt. Die Entstehung vieler Nebenprodukte erforderte eine Reinigung des Rohproduktes auf dieser Stufe. Da die Umkristallisation der erhaltenen Carbonsäure **80** zu einer sehr geringen Ausbeute führte, wurde eine säulenchromatographische Reinigung bevorzugt und **80** daraufhin in einer Ausbeute von 46 % isoliert.



Scheme 25: Syntheseroute des Trifluormethyl-funktionalisierten Fragment-A-Bausteins. a) SOCl_2 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$ \rightarrow RT, 16 h; b) DIBAL-H, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 3.5 h; c) Malonsäure, Piperidin, AcOH, DMSO, $65\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h; d) SOCl_2 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$ \rightarrow RT, 1 h; e) K_2CO_3 , $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $(\text{DHQD})_2\text{-PHAL}$, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$, $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 42 h; f) LDA, MeI, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 3 d; g) $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$, MeOH, Amberlyst-15[®], RT, 8 d; h) DIBAL-H, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 4.5 h; i) $n\text{-Bu}_3\text{SnAll}$, $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 15 h.

Zur anschließenden Methylierung wurde **80** intermediär als Säurechlorid aktiviert und mit Methanol, das sowohl als Reagenz als auch als Lösungsmittel diente, zu dem Methylester **82** umgesetzt. Die Methylierung gelang in guter Ausbeute und **82** wurde aufgrund der hohen Reinheit ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden asymmetrischen Dihydroxylierung verwendet. Der Einsatz von Osmiumtetroxid und $(\text{DHQD})_2\text{PHAL}$ als chiraalem Katalysatorkomplex lieferte nach intramolekularer Kondensationsreaktion und säulenchromatographischer Reinigung das α -Hydroxy-Lacton **99** als alleiniges Enantiomer. Die Enantiomerenreinheit wurde mittels analytischer HPLC an einer chiralen Phase (Säule: Chiralpak OD[®]) nachgewiesen (Abbildung 26). Dazu wurde das zugehörige Enantiomer *ent*-**99** durch Verwendung des chiralen Liganden $(\text{DHQ})_2\text{PHAL}$ bei der Sharpless Dihydroxylierung generiert. Auch dieser Antipode wurde im Rahmen der Meßgenauigkeiten vollständig enantiomerenrein nach chromatographischer Reinigung erhalten, wie das Chromatogramm der chiralen HPLC belegt. Nach Deprotonierung von **99** mit LDA, verlief die unmittelbar folgende α -Methylierung mit Iodmethan vollkommen diastereoselektiv. Um jedoch dünnschichtchromatographisch eine vollständige Umsetzung zu erzielen, musste die Reaktionszeit von 15 Stunden auf 3 Tage ausgedehnt werden. Das Lacton **100** wurde, wie schon bei der Darstellung des nativen A-Fragments **9** beschrieben, in den Acetonid-geschützten Methylester **101** überführt. In diesem Fall musste die Reaktionszeit verglichen mit dem nicht-fluorierten Analogon bis zu einem vollständigen Umsatz auf 8 Tage verdoppelt werden. Die Kettenverlängerung des Fragment-Bausteins erfolgte in einer zweistufigen Synthesesequenz. Zunächst wurde der Methylester **101** selektiv durch DIBAL-H-Reduktion bei tiefen Temperaturen in den entsprechenden Aldehyd **102** transformiert. Zur

Vermeidung einer Epimerisierung des α -chiralen Aldehyds, beschränkte sich die Reinigung auf eine Filtration durch Celite[®] und **102** wurde unverzüglich mit Allyl-tri-*n*-butylzinn zu dem Homoallylalkohol **75** umgewandelt. Nach Flash-Chromatographie wurde **75** diastereoselektiv in einer Ausbeute von 71 % über zwei Stufen erhalten.

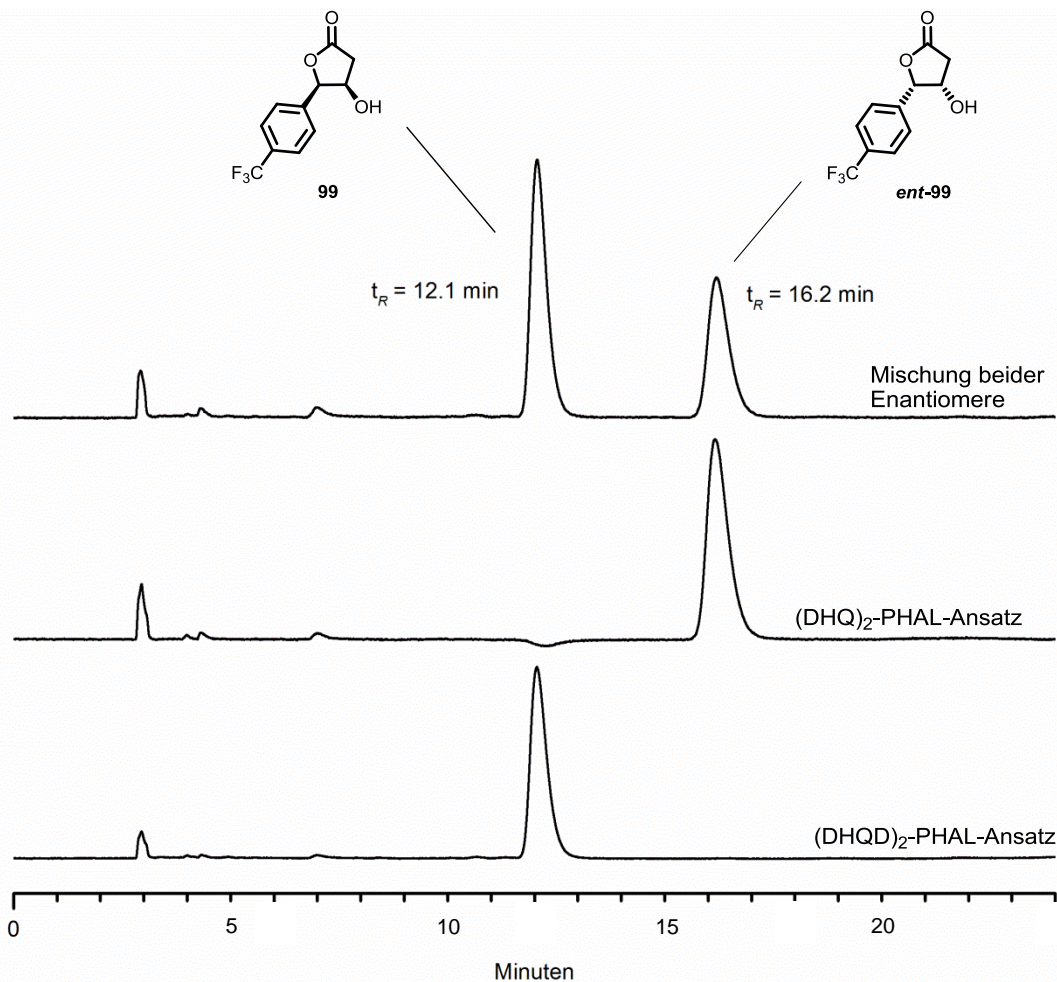
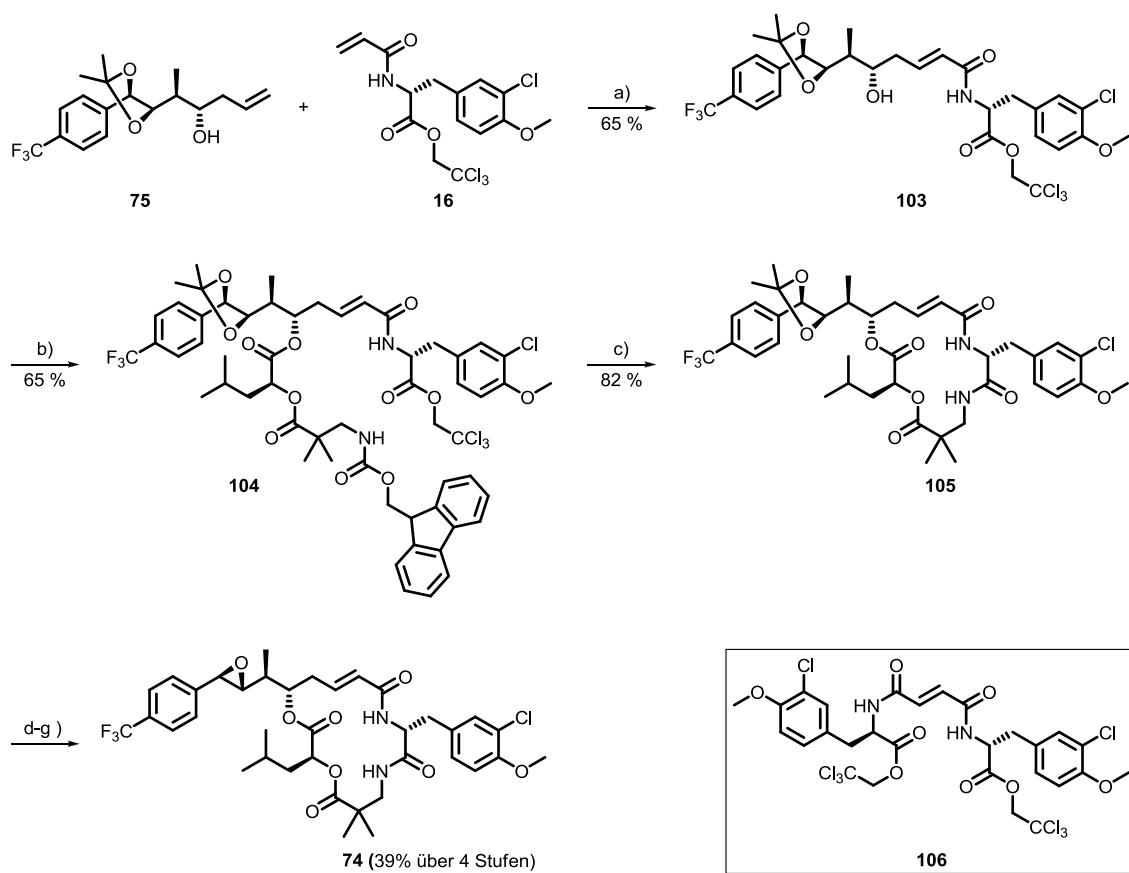


Abbildung 26: Das HPL-Chromatogramm einer chiralen HPLC (Chiralpak OD[®]) der α -Hydroxy-Lactone **99** ($t_R = 12.1$ min) und *ent*-**99** ($t_R = 16.2$ min) sowie eine Mischung derselben (Methode 3, UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 245$ nm).

5.3 Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation zu dem trifluormethylierten Cryptophycin **74**

Die Makroloiddarstellung und Diol-Epoxid-Transformation des trifluormethylierten Cryptophycin-Derivats **74** erfolgte analog zu den Reaktionen von Cryptophycin-52 (**2**). Abweichend zu der Synthese des nativen AB-Segments wurde in diesem Fall das Acrylamid **16** anstelle des Homoallylalkohols **75** in einem 1.2-fachen Überschuss bei der Metathese-Kupplung eingesetzt, um eine vollständige

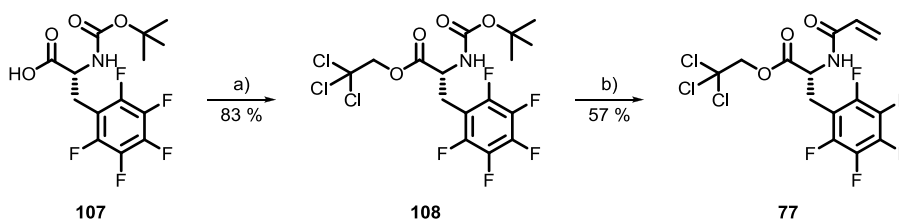
Reaktion von **75** zu erzielen (Schema 26). Nach Flash-Chromatographie wurde ein untrennbares Gemisch gewonnen, das zu 85 % aus dem Kreuzmetatheseprodukt **103** und zu 15 % aus dem Homokupplungsprodukt **106** des B-Fragment-Bausteins bestand. Dieses Nebenprodukt beeinträchtigte nicht die anschließende Yamaguchi-Veresterung mit dem CD-Segment **27** und so wurde das *seco*-Depsipeptid **104** nach säulenchromatographischer Reinigung in zufriedenstellender Ausbeute isoliert. Die Cyclisierung geschah durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit einem Überschuss an Piperidin und nach Flash-Chromatographie wurde das Acetonid-geschützte Depsipeptid **105** in 82 %iger Ausbeute isoliert. Abschließend erfolgte die vierstufige Transformation zu dem epoxidischen Cryptophycin **74** in einer Gesamtausbeute von 39 %, das nach Reinigung durch Säulenchromatographie und anschließender Lyophilisation der Produktfraktion als voluminöser, farbloser Feststoff erhalten wurde. Die einzelnen Reaktionsschritte der Transformation entsprechen denen der in Kapitel 3.3 auf Seite 32 beschriebenen Synthesesequenz.



Schema 26: Aufbau des *cyclo*-Depsipeptids **105** nach dem konvergenten Syntheschema und Diol-Epoxid-Transformation zu dem trifluormethylierten Cryptophycin **74**. a) Grubbs-II-Kat., CH₂Cl₂, Rückfluss, 16 h; b) **27**, [DMAP], NEt₃, 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, THF, 0 °C, 1 h; c) Piperidin, DMF, RT, 16 h; d) TFA, CH₂Cl₂, H₂O, 0 °C, 3 h; e) (CH₃O)₃CH, PPTS, CH₂Cl₂, RT, 2 h; f) AcBr, CH₂Cl₂, RT, 4 h; g) K₂CO₃, DME, Glykol, RT, 3 min.

5.4 Synthese eines Pentafluorphenyl-modifizierten Fragment-B-Bausteins

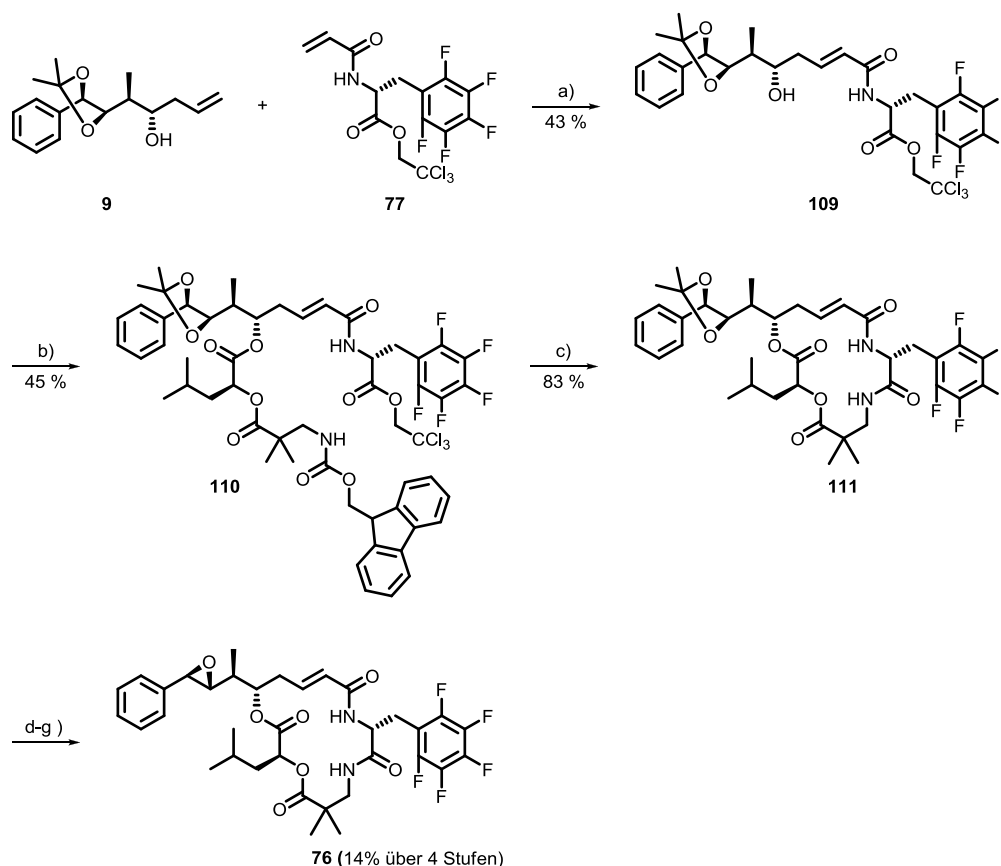
Die Darstellung des fluorierten Fragment-B-Bausteins **77** geschah ausgehend von kommerziell erhältlichem Boc-Pentafluor-D-phenylalanin (**107**) und erfolgte in Anlehnung an die Syntheseroute des nativen Fragmentvorläufers **16**. In einem ersten Schritt wurde die Hydroxylfunktion von **107** mit Hilfe der bewährten Steglich-Veresterung als Trichlorethylester **108** geschützt (Schema 27). Dazu wurde **107** mit Pyridin und Trichlorethanol in Dichlormethan versetzt und nach Abkühlung auf 0 °C wurde DCC zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei dieser Temperatur gerührt und, da das Dünnschichtchromatogramm eine nicht vollständige Umsetzung anzeigte, wurden die drei Reagenzien erneut zugegeben. Schließlich betrug der Überschuss an Pyridin insgesamt 4 Äquivalente, an Trichlorethanol 3 Äquivalente und DCC wurde in einem 1.5-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Die Suspension wurde weitere 5.5 Stunden unter Eisbadkühlung gerührt und als eine vollständige Umsetzung des Eduktes detektiert wurde, wurde der entstandene Feststoff abfiltriert. Der organische Extrakt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt und das Produkt **108** in einer guten Ausbeute von 83 % isoliert. Im Anschluss wurde die Boc-Schutzgruppe mit TFA abgespalten und das freie Amin basisch aufgearbeitet. Daraufhin wurde dieses als Rohprodukt mit Acryloylchlorid zu dem Acrylamid **77** umgesetzt. Auch bei dieser Umsetzung konnte die Ausbeute durch eine Erhöhung der Reagenzäquivalente verbessert werden. So wurde Triethylamin dieses Mal im 4-fachen und Acryloylchlorid im 2.5-fachen Überschuss verwendet und die Ausbeute konnte von 31% auf 57 % gesteigert werden. Aufgrund der Gefahr einer lichtinduzierten radikalischen Polymerisation von **77** wurde der letzte Reaktionsschritt in einem abgedunkelten Gefäß durchgeführt. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie und unter Lichtausschluss.



Schema 27: Synthese des pentafluorierten Fragment-B-Bausteins. a) Pyridin, Trichlorethanol, DCC CH₂Cl₂, 0 °C, 20 h; b) 1. TFA, RT, 2 h; 2. NEt₃, Acryloylchlorid, CH₂Cl₂, 0 °C, 7 h.

5.5 Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation zu dem pentafluorierten Cryptophycin 76

Zur Kreuzmetathese von **9** und **77** wurde der Homoallylalkohol **9** in einem 1.2-fachen molaren Überschuss eingesetzt (Schema 28). Das Gemisch, bestehend aus den beiden Fragment-Bausteinen und dem Grubbs-Katalysator der 2. Generation, wurde über Nacht in Dichlormethan in einem abgedunkelten Reaktionsgefäß erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Flash-Chromatographie wurde das Metatheseprodukt **109** in einer moderaten Ausbeute von 43% bezüglich des Acrylamids **77** isoliert. Anschließend erfolgte die Veresterung mit dem CD-Segment **27** unter Yamaguchi-Bedingungen. Das acyclische Cryptophycin-Vorläufermolekül **110** wurde zunächst säulenchromatographisch gereinigt, allerdings waren in den NMR-Spektren noch leichte Verunreinigungen sichtbar. Aufgrund dessen wurde **110** durch präparative HPLC weiter aufgereinigt und danach als analysenreine Substanz in 45%iger Ausbeute erhalten.



Schema 28: Aufbau des *cyclo*-Depsipeptids **111** nach dem konvergenten Syntheschema und Diol-Epoxid-Transformation zu dem pentafluorierten Cryptophycin **76**. a) Grubbs-II-Kat., CH₂Cl₂, Rückfluss, 16 h; b) **27**, [DMAP], NEt₃, 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, THF, 0 °C, 1 h; c) Piperidin, DMF, RT, 16 h; d) TFA, CH₂Cl₂, H₂O, 0 °C, 3 h; e) (CH₃O)₃CH, PPTS, CH₂Cl₂, RT, 2 h, f) AcBr, CH₂Cl₂, RT, 4 h; g) K₂CO₃, DME, Glykol, RT, 3 min.

Unter Verwendung der Makrolactamisierungsmethode nach MOHER *et al.*^[178] verlief die Entschützung der Aminfunktion und der Ringschluss zum cyclischen Analogon **111** simultan. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie wurde **111** in guter Ausbeute erhalten. Zum Abschluss der Cryptophycin-Totalsynthese wurde das Acetonid **111** mit TFA entschützt und das korrespondierende *syn*-Diol erzeugt, welches ohne weitere Reinigung in der finalen Diol-Epoxid-Transformation eingesetzt wurde. Diese Umsetzung erfolgte, wie schon erläutert, in einer dreistufigen Reaktionssequenz und nach Reinigung des entstandenen Epoxids **77** mittels präparativer HPLC wurde dieses als voluminöser, farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 14 % ausgehend von dem Acetonid **111** erhalten.

5.6 Cytotoxizitäten der fluorierten Cryptophycin-Derivate

Generell verfolgen SAR-Studien das Ziel effektivere Wirkstoffe sowie metabolisch stabilere und besser wasserlösliche Analoga zu entwickeln. Im Rahmen der Untersuchungen mit Fragment-A-modifizierten Cryptophycinen stehen der Einfluss der stereogenen Zentren sowie Substituenten am Phenylring im Fokus des Interesses. Prinzipiell erhöhen polare Substituenten am Phenylring die Wasserlöslichkeit von Cryptophycin-52 (**2**) und viele dieser Analoga besitzen eine signifikant verbesserte Cytotoxizität.^[53,55] Allerdings sind viele der polaren Derivate verglichen mit Cryptophycin-52 deutlich weniger aktiv gegenüber multimedikamenten-resistenten Zelllinien.^[53] Ein möglicher Grund für diesen Befund wäre, dass polare Verbindungen bessere Substrate für die resistenzverantwortlichen Transmembranpumpen, wie zum Beispiel die P-gp-Pumpe, sind.^[39,42,53] Ein Vergleich der Analoga untereinander wird durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien in den verschiedenen Studien erschwert. Konkrete Aussagen über die Auswirkung der jeweiligen Substituenten auf die Cytotoxizität sind nur innerhalb der gleichen Zelllinie möglich. Ein Fluor-Substituent in *para*-Position zum Beispiel bewirkt bei den humanen Dickdarm-Adenocarcinom LoVo-Zellen eine Abnahme der biologischen Aktivität um den Faktor 5 im Vergleich zu der Leitstruktur Cryptophycin-1.^[10] Bei KB-3-1-Zellen ist die Cytotoxizität der beiden Spezies, wie oben beschrieben, nahezu identisch.^[214]

Die biologischen Aktivitäten der Fluor-funktionalisierten Cryptophycine **74** und **76** wurden von BOGNER, wie im Folgenden erläutert wird, bestimmt. Die Cytotoxizitätsassays beruhen auf der Reduktion von blauem Resazurin zu rosafarbenen Resorufin durch intrazelluläre Enzyme von lebenden Zellen. Da Resorufin fluoreszierend ist, ist die Anzahl der lebenden Zellen nach einer bestimmten Inkubationszeit mit dem Wirkstoff proportional zu der Fluoreszenzintensität der Zelllösung. Üblicherweise ist der IC₅₀-Wert definiert als die Konzentration eines Wirkstoffs, die zur 50 %igen Inhibierung *in vitro* benötigt wird.^[234] In dem hier verwendeten Assays ist unter diesem Begriff die Konzentration zu verstehen bei der 50 % des Resazurins umgesetzt sind, d. h. 50 % der Zellen abgetötet wurden. Die IC₅₀-Werte der Cryptophycin-Analoga wurden gegen zwei

Krebszelllinien ermittelt. Zum einen wurde die humane Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie KB-3-1 verwendet, zum anderen kam die multimedikamenten-resistente Zelllinie KB-V1 zum Einsatz, bei der es sich um einen Subklon der Ersten handelt. Aufgrund der dauerhaften Exposition der Zellen mit geringen Mengen an Vinblastin exprimieren diese das MDR1-Gen. Das Genprodukt P-Glykoprotein, eine Effluxpumpe mit auffallend geringer Substratspezifität, ist für die Multimedikamentenresistenz (MDR) der Zelllinie verantwortlich.^[43] Der Resistenzfaktor (F_R) ist definiert als der Quotient aus dem IC_{50} -Wert gegenüber der MDR-Zelllinie und dem entsprechenden Wert gegen die nicht-resistente Zelllinie und ist anhand der unten stehenden Gleichung zu ermitteln. Er gibt Auskunft über die Aktivitätsabnahme eines Wirkstoffs gegenüber resistenten Krebszellen. Ein niedriger Resistenzfaktor bedeutet einen geringen Aktivitätsverlust basierend auf den Resistenzgenen der Zelllinie. Der Einbau eines Trifluormethyl-Substituenten in uA-C⁴-Position generiert den Wirkstoff **74**, dessen Aktivität gegenüber den KB-3-1-Zellen im niedrigen picomolaren Bereich liegt und ungefähr um den Faktor 4 größer ist als die von Cryptophycin-52 (**2**) (Tabelle 2). Damit zählt **74** zu den sehr potenten Cryptophycin-Analoga. Im Falle der MDR-Zelllinie KB-V1 ist die biologische Aktivität von **74** mit 10.11 nM um das 40-fache reduziert verglichen mit der nicht-fluorierten Leitstruktur. Der Resistenzfaktor F_R beträgt somit 153. Möglicherweise ist das trifluormethylierte Analogon **74** aufgrund der höheren Polarität ein besseres Substrat für das P-gp als Cryptophycin-52 (**2**). Dieses würde den größeren Aktivitätsunterschied der beiden Wirkstoffe im Fall der resistenten Zelllinie KB-V1 erklären.

$$F_R = \frac{IC_{50} \text{ (resistente Zelllinie)}}{IC_{50} \text{ (nicht-resistente Zelllinie)}}$$

Modifikationen des Fragment-B-Bausteins führten bisher nicht zu potenteren Wirkstoffen. Geringe Veränderungen des nativen Substitutionsmusters werden jedoch toleriert.^[7,9,48] Der Austausch des 3-Chlor-4-methoxyphenyl-Strukturelements gegen einen pentafluorierten Phenylring bewirkt eine Aktivitätsabnahme um den Faktor 190 (Tabelle 2). Gegenüber Zellen des Typs KB-V1 ist die Cytotoxizität von **76** 378-mal geringer verglichen mit Cryptophycin-52 (**2**). Der Resistenzfaktor von $F_R = 33$ drückt einen relativ geringen Aktivitätsverlust gegenüber den MDR-Zellen aus.

Tabelle 2: Biologische Aktivitäten der fluorierten Cryptophycine **74** und **76** gegenüber zwei humanen Krebszelllinien sowie deren Resistenzfaktoren im Vergleich zu Cryptophycin-52 (**2**).

Verbindung	IC_{50} (KB-3-1)	IC_{50} (KB-V1)	F_R
2	15.5 pM	0.26 nM	16.7
74	66.0 pM	10.11 nM	153
76	2970 pM	98.36 nM	33

6 Alkylazid-funktionalisierte Cryptophycine

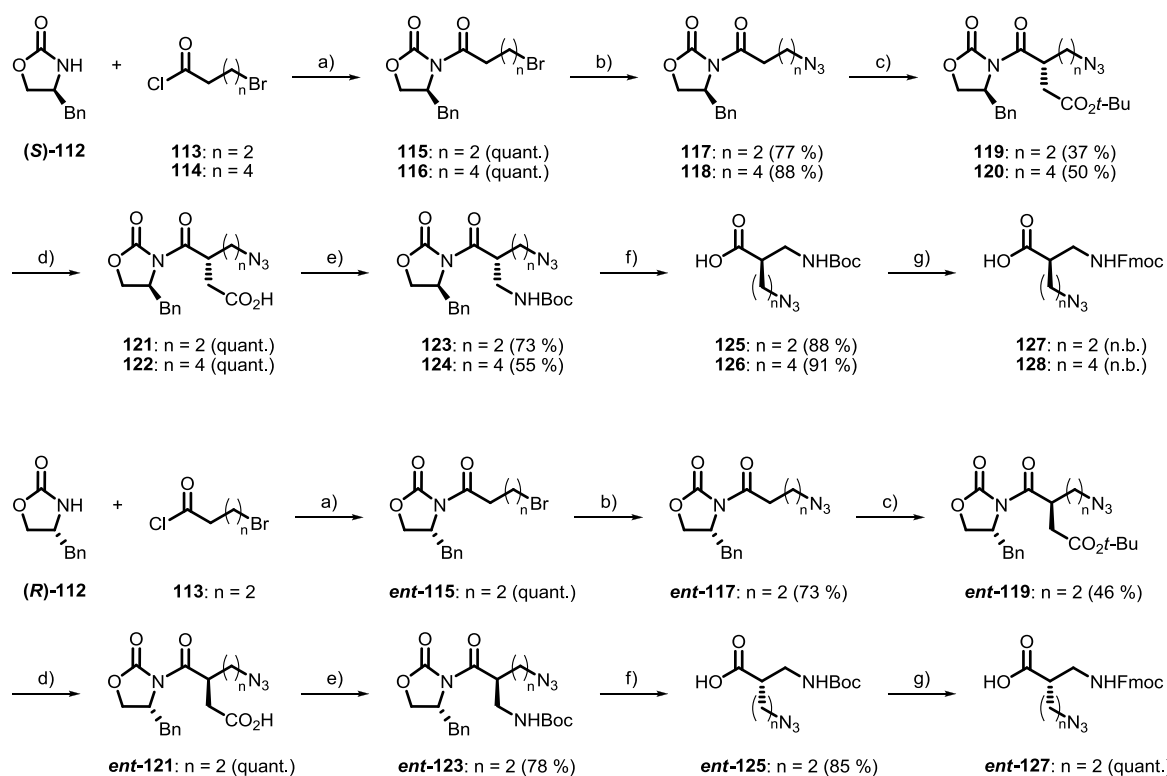
6.1 Motivation

Die inhärente Cytotoxizität vieler Chemotherapeutika lässt sich durch Modifikationen der Leitstruktur verbessern, im Idealfall wird zusätzlich die Spezifität gegenüber Tumorzellen erhöht. Die SAR-Studien an Fragment-C-funktionalisierten Cryptophycinen mit polaren Seitenkettenresten belegen, dass die biologische Aktivität mit steigender Polarität abnimmt.^[46,60] So ist zum Beispiel die Cytotoxizität der Alkylazid-modifizierten Cryptophycine **147** ($IC_{50} = 111.9 \text{ pM}$) und **148** ($IC_{50} = 11450 \text{ pM}$) (siehe Schema 34, Seite 65) gegenüber der KB-3-1-Zelllinie um den Faktor 7 bzw. 740 niedriger verglichen mit Cryptophycin-52 (**2**) ($IC_{50} = 15.5 \text{ pM}$). Trotz der verringerten Aktivitäten dieser Analoga bleiben sie weiterhin interessant, da sie gute Verknüpfungsmöglichkeiten mit anderen Molekülen, basierend auf der Azid-Alkin-Cycloaddition, bieten. Zum einen sind viele unterschiedlich funktionalisierte Alkine kommerziell erhältlich und erlauben so den schnellen Aufbau einer Substanzbibliothek bestehend aus den korrespondierenden Triazolderivaten, zum anderen ermöglichen sie durch Konjugation mit sogenannten *tumor targeting*-Einheiten die Synthese von *prodrugs* und somit die selektive Adressierung von Tumorzellen. Auffallend ist außerdem die deutlich höhere Aktivität des (*R*)-konfigurierten Epimers **147**. Der Einfluss der Konfiguration am C^α des C-Fragments sowie der Alkyllinkerlänge auf die Cytotoxizität waren Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit. Dafür sollten Azid-Analoga mit sowohl einer kürzeren als auch einer längeren Alkylkette synthetisiert werden. NAHRWOLD^[46] postulierte, dass eine Linkerlänge von drei Methyleneinheiten sowohl den erforderlichen Abstand zwischen dem Cryptophycin-Ring und der funktionellen Gruppe für eine effiziente Interaktion des Wirkstoffs mit dem Protein Tubulin gewährleistet, als auch unspezifische Wechselwirkungen aufgrund einer zu langen Kettenlänge ausschließt. Zusätzlich sollte die Effizienz der konvergenten Synthesesequenz bei der Darstellung Fragment-C-funktionalisierter Cryptophycine erprobt werden.

6.2 Synthese der Azid-funktionalisierten Fragment-C-Bausteine

Die als Fragment-C-Bausteine fungierenden β^2 -Aminosäuren wurden analog zu der von NAHRWOLD entwickelten Syntheseroute dargestellt,^[46] beginnend mit der Acylierung der 4-benzylsubstituierten Evans-Auxiliare (*S*)-**112** und (*R*)-**112** (Schema 29). Angesichts dessen wurden die Auxiliare nach Lithierung entweder mit 4-Brombuttersäurechlorid (**113**) oder 6-Bromhexansäurechlorid (**114**) zu den entsprechenden *N*-Acylimiden **115-116** umgesetzt. **114** wurde zuvor durch Chlorierung von 6-Bromcapronsäure mit Thionylchlorid dargestellt und nach Trocknung im Hochvakuum als Rohprodukt eingesetzt. Anschließend wurde die Azid-Funktionalität in einer nucleophilen

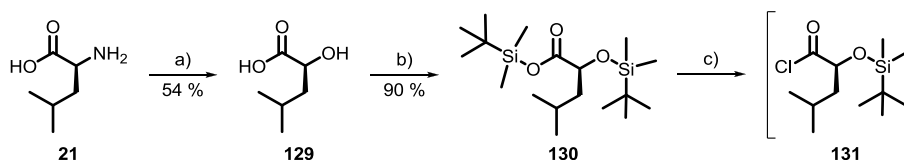
Substitutionsreaktion eingeführt und die erhaltenen Alkylazide **117-118** wurden mit Iodessigsäure-*tert*-butylester diastereoselektiv alkyliert. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren belegten die diastereomere Reinheit von **119-120** nach Umkristallisation. Die Spaltung der *tert*-Butylester erfolgte im sauren Milieu und die freien Carbonsäuren **121-122** wurden unverzüglich durch Curtius-Abbau in die korrespondierenden *tert*-Butylcarbamate **123-124** überführt. Die Abspaltung der Boc-geschützten β^2 -Aminosäuren geschah durch Behandlung mit Lithiumhydroperoxid-Lösung und die freien Carbonsäuren **125-126** wurden in sehr guten Ausbeuten erhalten. In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren waren sowohl die *tert*-Butyl-Signale als auch die Amidprotonen der Boc-Gruppe infolge einer Rotamerbildung verdoppelt. Zusätzlich waren die Signale einiger Protonen so stark verbreitert, dass die erwartete Signalstruktur nicht erkennbar war. In den $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren zeigte sich die Boc-Rotamerbildung durch die Verdopplung einiger Signalsätze. Die Boc-Schutzgruppe wurde mit TFA abgespalten und nach erneuter Schützung mit FmocOSu wurden die *N*-Fmoc-Aminosäuren **127-128** isoliert. Diese wurden ohne weitere Aufreinigung direkt in den entsprechenden Folgereaktionen zum Aufbau des Cryptophycin-Makrocyclus eingesetzt. Da die Evans-Auxiliare (*S*)-**112** und (*R*)-**112** enantiomerenrein erhältlich sind, sind beide Enantiomere der jeweiligen *N*-Fmoc-Aminosäure basierend auf diesem Syntheschema darstellbar.



Schema 29: Synthese der Azid-funktionalisierten β^2 -Aminosäuren. a) *n*-BuLi, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, über Nacht; b) NaN_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$, Rückfluss, 2 h, dann RT, 3 d; c) 1. NaHMDS, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 30-60 min; 2. $\text{ICH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$, $-95\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow -78\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; d) TFA, CH_2Cl_2 , RT, über Nacht; e) 1. ClCO_2Et , NEt_3 , THF, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1 h; 2. NaN_3 , THF/ H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; 3. *t*-BuOH/Toluol, Rückfluss, über Nacht; f) 1. $\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}_2$, THF/ H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h; 2. $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{H}_2\text{O}$; g) 1. TFA, CH_2Cl_2 , RT, über Nacht; 2. FmocOSu, NaHCO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$, RT, 4 h.

6.3 Alkylazid-funktionalisierte Cryptophycine ausgehend von einem gemeinsamen DAB-Segment

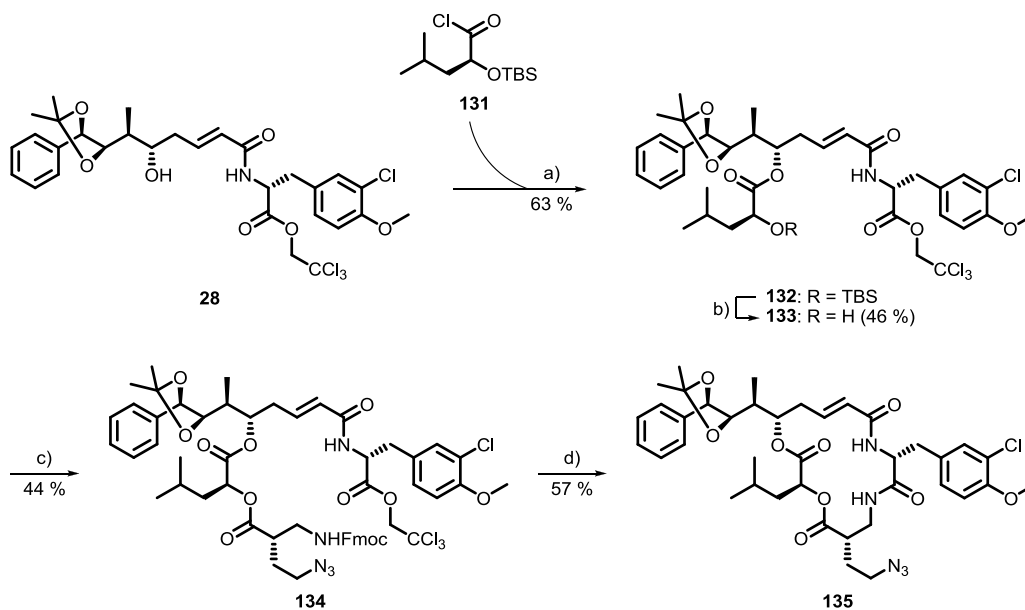
Unter Berücksichtigung einer geeigneten Schutzgruppenstrategie wurde die Fragment-D-Hydroxylfunktion des DAB-Segments als *tert*-Butyldimethylsilyl-(TBS)-Ether geschützt.^[46] Ausgangsstoff für die Synthese des entsprechenden D-Fragments **131** war L-Leucin (**21**), das im ersten Schritt durch Diazotierung in L-Leucinsäure (**129**) überführt wurde (Schema 30). Nach zweifacher Silylierung der Hydroxycarbonsäure **129** mit TBS-Cl in Gegenwart von Imidazol wurde der Silylester **130** destillativ gereinigt. Die darauffolgende DMF-katalysierte Reaktion von **130** mit Oxalylchlorid ergab das Acylchlorid **131**, das aufgrund seiner Hydrolyseempfindlichkeit als Rohprodukt in der Folgereaktion verwendet wurde.



Schema 30: Darstellung des TBS-geschützten Fragment-D-Bausteins **131**. a) NaNO_2 , H_2SO_4 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, RT, 16 h; b) TBS-Cl, [Imidazol], DMF, 18 h; c) $(\text{COCl})_2$, [DMF], $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3.5 h.

Zur Synthese des Cryptophycin-DAB-Segments **133** wurde das frisch dargestellte Säurechlorid **131** in einer DMAP-medierten Veresterung mit dem AB-Metatheseprodukt **28** verknüpft (Schema 31).^[46] Nach Flash-Chromatographie wurde der Silylether **132** in 63 %iger Ausbeute erhalten. Die nachfolgende Abspaltung der TBS-Schutzgruppe mit Cer(IV)ammoniumnitrat (CAN) erfolgte bei $0\text{ }^\circ\text{C}$, um eine Zersetzung des Eduktes zu vermeiden. Obwohl nach 15-stündiger Reaktionszeit die Umsetzung nicht abgeschlossen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat beendet. Die säulenchromatographische Reinigung lieferte den Alkohol **133** in einer mäßigen Ausbeute von 46 % [Lit.: 57 %], wobei 16 % des Silylethers **132** zurückgewonnen werden konnten. In der anschließenden Kondensationsreaktion mit der β^2 -Aminosäure *ent*-**127** wurde diese in einem 1.5-fachen Überschuss eingesetzt, um einen vollständigen Umsatz des DAB-Segments **133** zu erzielen. Das korrespondierende *seco*-Depsipepid **134** wurde nach Flash-Chromatographie in einer Ausbeute von 44 % isoliert. Dieses wurde daraufhin mit einem Überschuss an Piperidin in das cyclische Analogon **135** überführt.

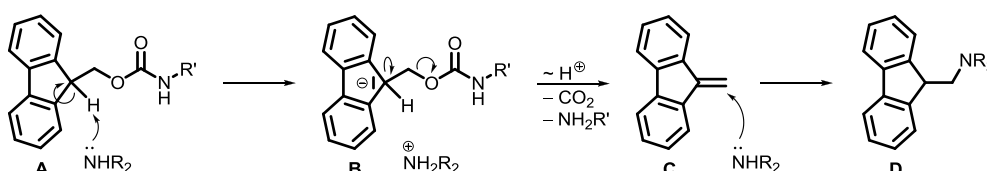
Die Desilylierung von **132** verlief auch in der Literatur mit moderater Ausbeute, allerdings ermöglichte das gemeinsame DAB-Segment die effiziente Synthese einer Fragment-C-funktionalisierten Cryptophycin-Bibliothek.^[46] Eine konvergente Synthese wird im Allgemeinen aufgrund der höheren Gesamtausbeute bevorzugt, daher wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden anderen Azid-funktionalisierten Derivate mit Hilfe des konvergenten Syntheseansatzes aufgebaut.



Schema 31: Syntheseroute des Azid-funktionalisierten *cyclo*-Depsipeptids **135** basierend auf einem DAB-Segment. a) NEt_3 , [DMAP], CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, b) CAN, abs. MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 15 h; c) *ent*-**127**, DCC, [DMAP], CH_2Cl_2 , RT, 16 h; d) Piperidin, DMF, RT, 16 h.

6.4 Alkylazid-funktionalisierte Cryptophycine durch konvergente Synthese

Die Synthese der Azid-modifizierten Makrocyclen **142** und **143** begann mit der Steglich-Kondensation der Fragment-C-Bausteine **127** und **128** mit dem Fragment-D-Baustein **24** (siehe Schema 33, Seite 64). Im Gegensatz zu der Veresterung der nativen Cryptophycin-Bausteine **20** und **24** entstand bei einer Reaktionszeit von 15 Stunden vermehrt ein unpolares Nebenprodukt, das stark UV-aktiv war. Dieses ist vermutlich auf die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch die Stickstoffbase DMAP zurückzuführen. Die Eliminierung verläuft nach einem E1_{cb} -Mechanismus und wird durch das mesomeriestabilisierte Intermediat Fluorenyl-Anion **B** begünstigt (Schema 32).^[235] Wird eine sekundäre Stickstoffbase zur Fmoc-Abspaltung eingesetzt, reagiert diese mit dem entstandenen Dibenzofulven **C** zu dem stabilen Addukt **D**.

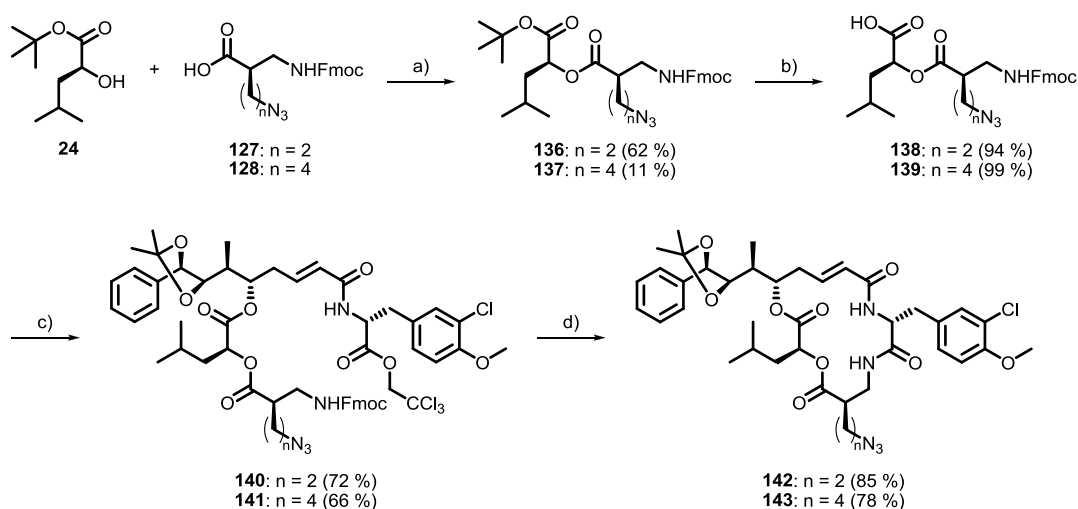


Schema 32: Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch eine sekundäre Stickstoffbase nach dem E1_{cb} -Mechanismus.^[235]

Die besten Ausbeuten bei der Esterkondensation wurden mit einer Reaktionszeit von 7 Stunden erzielt. Im Fall des Kupplungsprodukts **136** konnte die Ausbeute (62 %) verglichen mit der Veresterung der

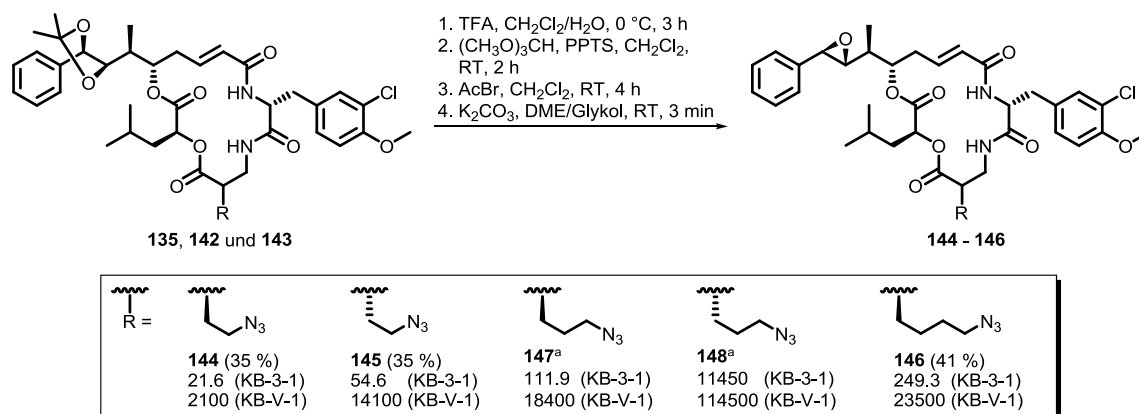
nativen Fragmente (58 %) sogar leicht gesteigert werden. Die Ausbeute der Estersynthese mit dem C-Fragment **128** hingegen fiel mit 11 % sehr gering aus. Nach Ablauf von 7 Stunden wies das Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsgemischs bereits auf eine zunehmende Abspaltung der Fmoc-Gruppe hin. Des Weiteren konnte die β^2 -Aminosäure **128** nicht bei der säulenchromatographischen Reinigung des Esterprodukts zurückgewonnen werden, was auf einen fast vollständigen Umsatz schließen lässt. In diesem Fall erzielte auch die Verwendung von EDC·HCl als Aktivierungsreagenz keine bessere Ausbeute (6 %).

Die anschließende Fmoc-Entschützung der CD-Segmente **136** und **137** mit TFA verlief nahezu quantitativ und die nach Trocknung im Hochvakuum erhaltenen freien Carbonsäuren **138** und **139** wurden ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt (Schema 33). In den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **138** und **139** äußerte sich die jeweilige Anwesenheit zweier stabiler Rotamere in der Verdopplung einiger Signalsätze. Interessanterweise zeigten die NMR-spektroskopischen Daten der *tert*-Butylester geschützten Analoga keine Rotamer-Bildung. Vermutlich sind diese Verbindungen wegen der beiden sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen an der Ausbildung stabiler Rotamere gehindert. Die Yamaguchi-Veresterung mit dem AB-Segment **28** zu den offenkettigen Depsipeptiden **140** und **141** verlief jeweils in zufriedenstellenden Ausbeuten, wobei der Anteil der Carbonsäuren **138** und **139** aufgrund ihrer anspruchsvollen Synthese von 1.5 auf 1.0 Äquivalente verglichen mit dem Aufbau des Cryptophycin-52-Grundgerüsts reduziert wurde. Bei Zugabe von 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid trübten sich die Reaktionsmischungen sofort ein und nach 1 Stunde war eine vollständige Umsetzung erzielt. Die abschließende Makrolactamisierung erfolgte in DMF mit 5 Äquivalenten Piperidin über Nacht in einem abgedunkelten Reaktionsgefäß und die *cyclo*-Depsipeptide **142** und **143** wurden nach Flash-Chromatographie in guten Ausbeuten erhalten.



Schema 33: Darstellung der Azid-funktionalisierten *cyclo*-Depsipeptide **142** und **143** mit Hilfe der konvergenten Synthesesequenz. a) DCC, [DMAP], CH_2Cl_2 , 0 °C, 1 h, RT, 17 h; b) TFA, CH_2Cl_2 , 0 °C, 3.5 h; c) **28**, NEt_3 , [DMAP], 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, CH_2Cl_2 , 0 °C, 1 h; d) Piperidin, DMF, RT, 16 h.

Im finalen Schritt wurden die dargestellten cyclischen Depsipeptide **135**, **142** und **143** analog zu der oben beschriebenen 4-stufigen Reaktionsabfolge in die entsprechenden Epoxide **144-146** überführt (Schema 34). Die biologische Aktivität dieser Cryptophycin-Derivate wurde von BOGNER im Rahmen seiner Dissertation anhand von Zell-basierten Cytotoxizitätsassays bestimmt.^[60] Die hier durchgeführte SAR-Studie belegt, dass die Konfiguration am C^α der C-Fragment-Seitenkette Einfluss auf die cytotoxische Wirksamkeit der Alkylazid-funktionalisierten Cryptophycine nimmt. So sind die (*R*)-konfigurierten Epimere sowohl in der KB-3-1 Zelllinie als auch in der MDR-Zelllinie KB-V1 potenter. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, dass ebenfalls alle von MOORE isolierten, natürlich vorkommenden Cryptophycine, die einen chiralen Fragment-C-Baustein tragen, (*R*)-konfiguriert sind und folglich die Stereochemie am C^α der C-Fragment-Seitenkette entscheidend für die Aktivität ist.^[7-9] Zusätzlich wurde die Methylenkettenlänge der Linkereinheit variiert. Hier zeigte sich, dass die biologische Aktivität mit länger werdender Alkylseitenkette bei gleicher Stereochemie des C^α-Atoms stetig abnimmt. Eine einheitliche Aussage zu treffen, ob die Konfiguration oder die Kettenlänge die Cytotoxizität stärker beeinflusst, ist nicht möglich. Der Vergleich von **145** und **147** zeigt, dass **147** trotz (*R*)-Konfiguration weniger aktiv ist als das (*S*)-konfigurierte Derivat **145** mit kürzerer Seitenkette. Dieser Trend kehrt sich beim Vergleich von **146** und **148** um, so ist in diesem Fall das längerkettige, (*R*)-konfigurierte Analogon **146** aktiver. Die Resistenzfaktoren der Analoga **144** und **146** sind mit einem Wert von 97 bzw. 94 fast identisch. Im Fall des Derivats **145** beträgt der F_R-Wert 258.



Schema 34: Spaltung der Acetonide und Diol-Epoxid-Transformation der Alkylazid-funktionalisierten Cryptophycine **144-146** (Ausbeuten über 4 Stufen) sowie ihre cytotoxische Wirkung (IC₅₀-Werte in pM) gegenüber zwei humanen Krebszelllinien; ^a siehe Dissertation NAHRWOLD.

7 Design eines Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugats zur mikroskopischen Untersuchung der zellulären Aufnahme und finalen Lokalisation

7.1 Motivation

Die konventionelle Chemotherapie beruht auf der Annahme, dass Tumorzellen sich schneller teilen als physiologisches Gewebe und daher verstärkt von Antitumorwirkstoffen, die in den Mechanismus der Proliferation eingreifen, abgetötet werden.^[74,86] Dieses ist jedoch nur bedingt gültig, da solide Tumore sich nur sehr langsam teilen und ein Großteil der Zellen sich in der G₀-Phase (Ruhe-Phase) befindet. Tatsächlich sind Chemotherapeutika nicht oder nur sehr wenig spezifisch und führen infolgedessen zu einer systematischen Toxizität und unerwünschten Nebenwirkungen. In den letzten drei Jahrzehnten wurden Fortschritte in der Krebstherapie durch das Design von *prodrugs*, die spezifisch Tumorzellen adressieren, erzielt. *Drug delivery*-Systeme mit RGD-Peptiden als *targeting*-Einheit zeichnen sich durch ihre einfache Synthese und definierte Zusammensetzung sowie Wirkstoffbeladung aus. Erst kürzlich wurde eine Vielzahl dieser Arzneistoffträger entwickelt, die gute Aktivitäten *in vitro* und *in vivo* zeigten.^[121,236-238]

Eine intakte Epoxidfunktion ist für die biologische Aktivität der Cryptophycine von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund sollte die Konjugationsstelle für die Verknüpfung mit der Linkereinheit räumlich vom Epoxid getrennt sein, falls das Epoxid nicht im Verlauf der Linkerabspaltung regeneriert wird. SANOFI-AVENTIS patentierte Antikörper-Wirkstoff Konjugate (ADCs), bei denen das Cryptophycin über die *para*-Position des Fragment-A-Phenylrings mit dem Linker verbunden ist.^[239] Vor diesem Hintergrund sind die Fragment-C-funktionalisierten Cryptophycine interessante Kandidaten zur Synthese von Arzneiträgersystemen. Aus synthetischer Sicht ist die Konjugation eines Azid-funktionalisierten Cryptophycins mit *tumor targeting*-Gruppen am einfachsten mit Hilfe der Huisgen-1,3 Cycloaddition zu realisieren, die sich aufgrund ihrer Toleranz gegenüber vielen funktionellen Gruppen und ihrer Unabhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität bewährt hat. SHARPLESS definierte 2001 für die Kupfer(I)-katalysierte Variante dieser Reaktion den Namen „Klick-Chemie“.^[240] Dieser Begriff umfasst Reaktionen, die breit angewandt werden können und mit hohen Ausbeuten verlaufen. Die verwendeten Lösungsmittel sind entweder leicht zu entfernen oder umweltfreundlich und die reinen Produkte können häufig durch Filtration isoliert werden. Eine weitere Reinigung durch Chromatographie oder Umkristallisation ist oft nicht notwendig. Darüber hinaus führen „Klick-Reaktionen“, deren Prototyp die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition ist, zu keinen oder gut abtrennbaren Nebenprodukten. Erste Ligationsexperimente zur Konjugation von Azid-funktionalisierten Cryptophycinen und cyclischen RGD-Peptiden mittels „Klick-Reaktion“ wurden von NAHRWOLD durchgeführt (Abbildung 27).^[46] Der entstehende Triazolring ist unter

physiologischen Bedingungen stabil und der Wirkstoff kann daher nicht wieder freigesetzt werden. Wie erwartet führte die Konjugation mit dem sterisch anspruchsvollen Substituenten zu einer verringerten Cytotoxizität. Die biologische Aktivität des Konjugats **149** (IC_{50} -Wert = 55.8 nM gegen KB-3-1 Zellen) ist verglichen mit dem freien Cryptophycin **148** (IC_{50} -Wert = 11.4 nM gegen KB-3-1 Zellen) um den Faktor 5 erniedrigt.^[60] Ungeklärt bleibt die Frage, ob das Konjugat weiterhin durch passive Diffusion oder Integrin-vermittelte Endocytose in die Zellen gelangt. Des Weiteren ist das intrazelluläre Schicksal von *drug delivery*-Systemen basierend auf RGD-Peptiden nach erfolgter Endocytose bisher unerforscht.

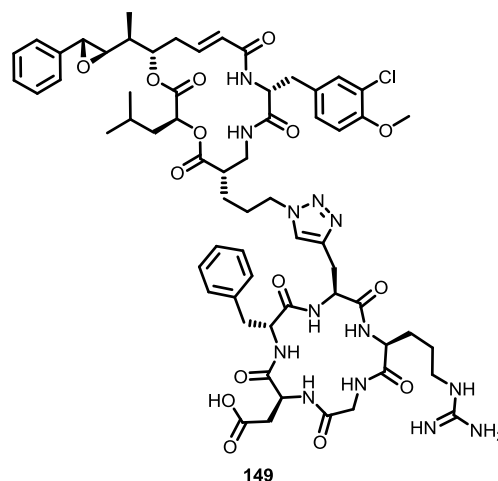
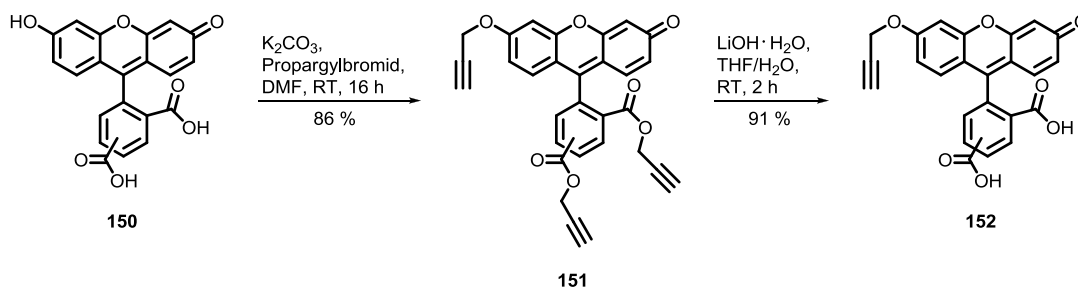


Abbildung 27: Cryptophycin-RGD-Peptid-Konjugat **149**.^[46]

Aus diesem Grund soll durch den Einbau eines fluoreszierenden Linkers die Aufnahme des Cryptophycin-Konjugats in die Zelle und der intrazelluläre Transport mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden.

7.2 Synthese des Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugats

Die Wahl des fluoreszierenden Linkers fiel auf ein Carboxyfluorescein-Derivat, das einen terminalen Alkinrest trägt. Carboxyfluorescein bietet zum einen den Vorteil, dass es kommerziell und günstig zu erwerben ist, zum anderen ist das funktionalisierte Analogon **152** leicht und in hohen Ausbeuten darstellbar. Des Weiteren ist die Fluoreszenzmarkierung von bioaktiven Naturstoffen mit Propargyl-funktionalisiertem Fluorescein in der Literatur wohl dokumentiert.^[241-244] In Analogie zu CHEN *et al.*^[244] wurde zunächst ein Isomerengemisch aus 5(6)-Carboxyfluorescein (**150**) mit einem dreifachen Überschuss an Kaliumcarbonat und Propargylbromid in DMF zur Reaktion gebracht (Schema 35).



Schema 35: Synthese des Propargyl-funktionalisierten Carboxyfluorescein **152**.

Das Zwischenprodukt **151** wurde nach Flash-Chromatographie in einer Ausbeute von 86 % isoliert. In der Folgereaktion wurden die Esterfunktionalitäten selektiv mit Lithiumhydroxid in wässrigem THF verseift. Der Propargylether **152** wurde nach Reinigung mittels präparativer RP-HPLC in 91 %iger Ausbeute erhalten. In den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **151** und **152** zeugte die Verdopplung einiger Signalsätze vom Vorhandensein der jeweiligen Konstitutionsisomere.

Hinsichtlich des Gebrauchs von Propargyl-Carboxyfluorescein **152** in der Fluoreszenzmikroskopie, wurden die Fluoreszenzeigenschaften dieses Fluorphor mit denen von 5(6)-Carboxyfluorescein **150**^[245] verglichen. Die Fluoreszenzspektren von **150** und **152** wurden in einem Phosphatpuffer bei den pH-Werten 5, 7 und 9 und einer konstanten Ionenstärke von 50 mM aufgenommen (Abbildung 28). In einer ersten Messreihe betrug die Konzentration des Propargyl-funktionalisierten Carboxyfluorescein **152** $3.33 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Da die detektierte Emissionsintensität verglichen mit der des unfunktionalisierten Carboxyfluoresceins sehr gering war, wurde in einer zweiten Messreihe die Konzentration von **152** auf $3.33 \cdot 10^{-6}$ mol/L erhöht. Die Emissionsspektren von Carboxyfluorescein **150** wurden bei einer Konzentration von $3.33 \cdot 10^{-7}$ mol/L gemessen. Die Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm, dem Absorptionsmaximum von Carboxyfluorescein,^[245] und in einem Messbereich von 490 bis 700 nm aufgezeichnet.

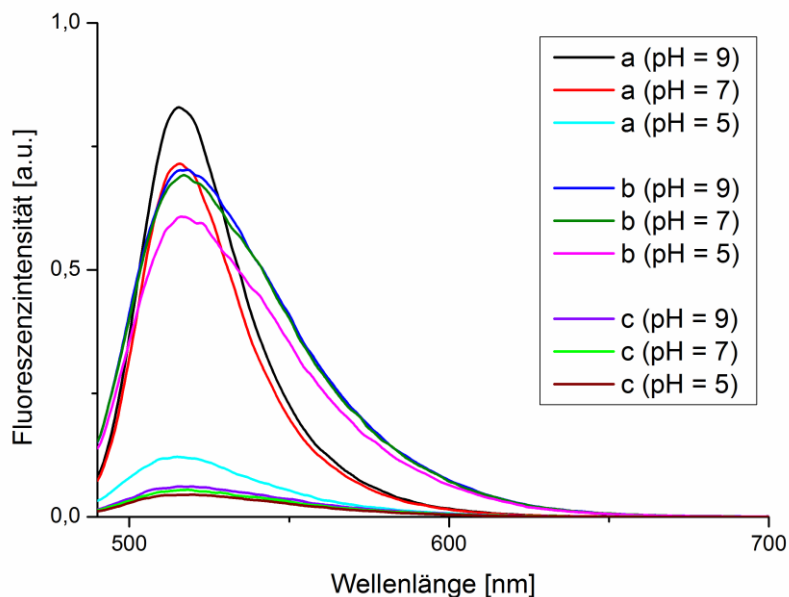
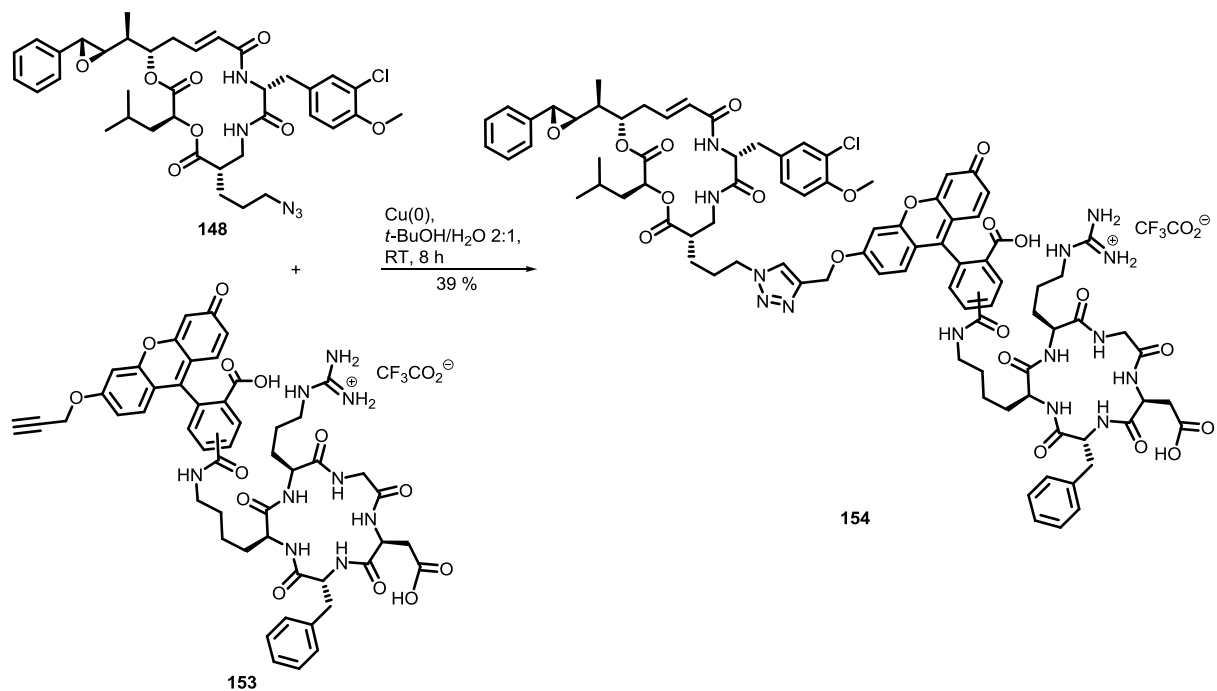


Abbildung 28: Fluoreszenzemissionsspektren von **150** und **152** in der Gegenwart eines Phosphatpuffers bei unterschiedlichen pH-Werten und konstanter Ionenstärke; a) Carboxyfluorescein **150**, $c = 3.33 \cdot 10^{-7}$ mol/L; b) Propargyl-Carboxyfluorescein **152**, $c = 3.33 \cdot 10^{-6}$ mol/L; c) Propargyl-Carboxyfluorescein **152**, $c = 3.33 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

Die Chromophore **150** und **152** zeigten jeweils ein einziges Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von ungefähr 520 nm. Die Fluoreszenzintensität von Carboxyfluorescein sank stark mit abnehmendem pH-Wert. Für pH-Werte niedriger als 4 verschwindet die Emissionsintensität vollständig, da das Chromophor lactonisiert.^[245] Die pH-Wertabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von **152** fiel deutlich geringer aus. Die Emissionsspektren zeigen, dass durch die Einführung des Propargylrests zwar die Fluoreszenzintensität von Carboxyfluorescein ungefähr um den Faktor 10 verringert wurde, jedoch das Emissionsmaximum bei nahezu identischer Wellenlänge liegt und daher ist das Chromophor **152** weiterhin zur Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist.

Die freie Carboxylgruppe in 5- bzw. 6-Position des organischen Farbstoffs **152** diene zur Verknüpfung mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins des cyclischen RGD-Peptids, die von BOGNER während seiner Dissertation durchgeführt wurde.^[246] Die Carboxylfunktion in Position 2 ist aufgrund der sterischen Hinderung und intramolekularer Lactonisierung unter den verwendeten Kupplungsbedingungen inert.^[247] Das Peptid c-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-] wurde ebenfalls von BOGNER mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Cyclische RGD-Pentapeptide, bei denen nach der RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) die Aminosäure D-Phenylalanin (D-Phe) folgt, binden selektiv an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und ermöglichen auf diese Weise die Integrin-vermittelte Endocytose eines Biokonjugats.^[114-116,248] Die anschließende Ligation mit dem von NAHRWOLD synthetisierten Cryptophycin-Derivat **148** erfolgte über die Propargyleinheit des Fluorescein-Peptid-Konjugats **153** (Schema 36).



Schema 36: Verknüpfung des Cryptophycins **148** mit dem Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugat **153**.

Sowohl das RGD-Peptid als auch das Cryptophycin-Grundgerüst tragen zahlreiche funktionelle Gruppen, die bei der Konjugation der beiden Komponenten nicht reagieren sollen. Die „Klick-Reaktion“ eines Azids mit einem terminalen Alkin erfordert keine Schutzgruppen für die anderen vorliegenden Funktionalitäten. Während die klassische Huisgen-1,3-dipolare Cycloaddition erst bei hohen Temperaturen abläuft und oft zu einem 1:1-Gemisch der Regioisomere 1,4- und 1,5-disubstituierter Triazole führt,^[249] erzeugt die Kupfer(I)-katalysierte Variante dieser Reaktion selektiv 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole.^[250] Die Reaktionsgeschwindigkeit der katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition ist um den Faktor 10^7 bis 10^8 beschleunigt und verläuft bereits bei Raumtemperatur. Zusätzlich zeichnet sich diese Reaktion durch ihre Anwendbarkeit in vielen Lösungsmitteln und einer großen pH-Wert-Toleranz (pH-Wert = 4-12) aus. Als Kupfer(I)-Katalysator kommen teilweise Kupfer(I)-Salze, wie zum Beispiel Kupferiodid, zum Einsatz,^[251] teilweise Kupfer(II)-Salze, wie Kupfersulfat, die durch *in situ*-Reduktion in Cu(I)-Spezies überführt werden.^[249] Die Komproportionierung von Kupferdraht mit anhaftendem Cu(II) bietet eine weitere Möglichkeit zur Generierung der katalytisch aktiven Komponente.^[250,252] Voraussetzung für die Verwendung von metallischem Kupfer ist allerdings ein leicht saures Milieu, damit die Metalloberfläche angegriffen und ausreichend $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ -Ionen gebildet werden können. In dem hier durchgeführten Ligationsexperiment wurde der pH-Wert durch die als Trifluoracetat-Salz vorliegende Guanidinfunktion des Arginins und die Carboxylgruppe des Aspartats hinreichend erniedrigt. Zur Steigerung der Reaktionsrate wurde das elementare Kupfer als feines Pulver eingesetzt. Aufgrund der polaren Eigenschaften des RGD-Peptids wurde für die Verknüpfung von **153** mit dem Cryptophycin **148** analog zu den Reaktionsbedingungen von NAHRWOLD^[46] ein *tert*-Butanol/Wasser-Gemisch als Lösungsmittel gewählt. **148** und **153** wurden in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt und die Suspension wurde bei Raumtemperatur gerührt, wobei der Reaktionsverlauf mit Hilfe von analytischer RP-HPLC verfolgt werden konnte (Abbildung 29). Nach 8 Stunden war die Reaktion fast vollständig abgeschlossen und wurde daraufhin beendet, um eine Hydrolyse des Epoxids zu vermeiden. Der Katalysator wurde durch Filtration des Gemisches über Celite[®] abgetrennt und das Rohprodukt durch Lyophilisation von Lösungsmitteln befreit. Aufgrund der Säurelabilität der benzyllischen Epoxidfunktion des Cryptophycins wurde bei der anschließenden Reinigung des Konjugats mittels präparativer RP-HPLC die Produktfraktion unmittelbar nach der Isolierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Das Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugat **154** wurde als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 39 % erhalten. Die Identität dieses Konjugats konnte massenspektroskopisch (HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 862.34873$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, berechnet für $[\text{C}_{88}\text{H}_{99}\text{N}_{14}\text{O}_{21}\text{Cl}+2\text{H}]^{2+}$: $m/z = 862.34716$) belegt werden.

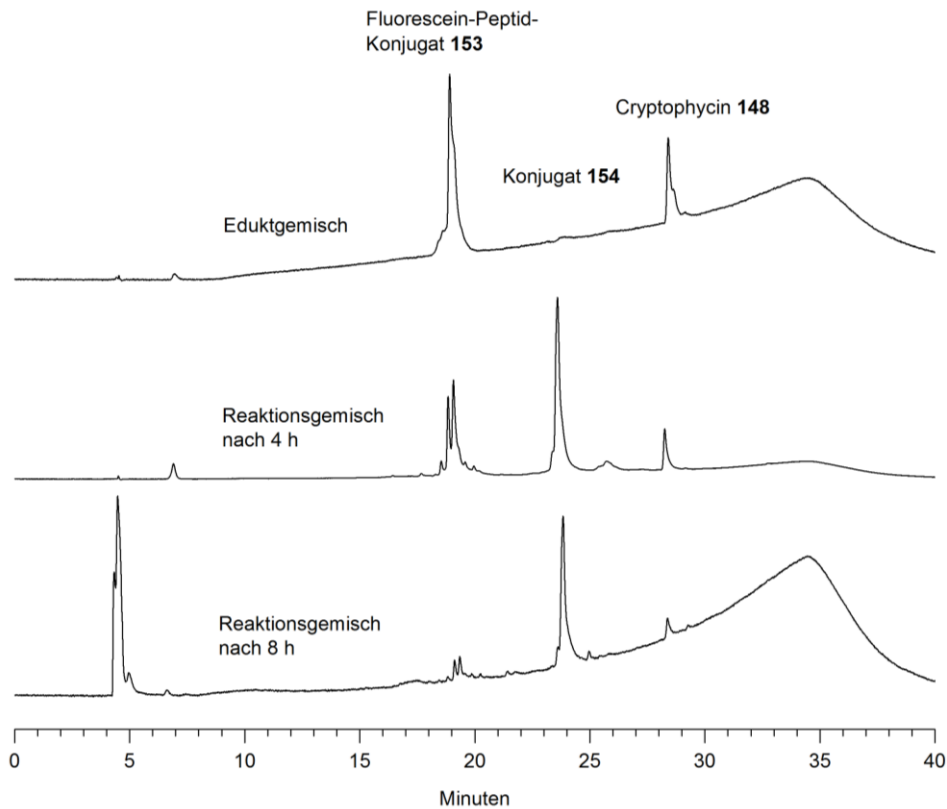


Abbildung 29: Reaktionskontrolle der Ligation von Cryptophycin **148** mit dem Fluorescein-Peptid-Konjugat **153** zum finalen Konjugat **154** durch analytische HPLC (Methode 1, UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 245 \text{ nm}$).

7.3 Ergebnisse der Lokalisationsstudie

Die auf der Integrinbindung basierende Endocytose von Biokonjugaten mit dem RGD-Peptid c-[-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-] als Erkennungseinheit ist in der Literatur dokumentiert,^[253-255] allerdings ist die finale Lokalisation der Konjugate innerhalb der Zelle bisher nicht untersucht worden. Diese Fragestellung sollte durch die Synthese eines Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugats aufgeklärt werden. Mit Hilfe des fluoreszierenden Linkers sollte sowohl die Aufnahme als auch die zelluläre Lokalisation des Konjugats mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden können. Die dazugehörigen Lokalisationsstudien wurden von BOGNER angefertigt und die konfokalen Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von PALMISANO an der Universität Erlangen durchgeführt. Der Vorteil der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie verglichen mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht in der Möglichkeit aus einer Probe ausschließlich eine dünne Präparatschicht, den sogenannten optischen Schnitt, abzubilden. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, dass zwei unterschiedlich angefärbte Zellkompartimente übereinander liegen und somit eine Kolokalisation angezeigt wird, obwohl diese nicht vorhanden ist.

Im Rahmen der Lokalisationsstudien wurden Zellen der humanen Hautkrebszelllinie WM-115 für drei verschiedene Zeitintervalle mit dem Konjugat **154** inkubiert (Abbildung 30). Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Endocytosestadien mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Lokalisation des Konjugats in den Lysosomen wurde mit Hilfe von LysoTrackerTM red verifiziert. Dieser Farbstoff ist hoch selektiv für saure Zellorganellen und färbt somit ausschließlich die Lysosome an. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten war das Konjugat bereits endocytiiert und befand sich überwiegend in den Lysosomen. Die Kolokalisationsstudie mit LysoTrackerTM red zeigte ein hohes Maß an Übereinstimmung. Allerdings waren einige Vesikel sichtbar, die das Konjugat enthielten, aber nicht von dem LysoTracker markiert wurden. Hierbei handelt es sich vermutlich um Endosomen, die aufgrund des höheren pH-Werts nicht angefärbt werden. Der Grad der Kolokalisation nahm mit der Zeit stetig zu und so war nach 40 Minuten das Konjugat fast vollständig in den Lysosomen lokalisiert. Nach vierstündiger Inkubationszeit wurden keine Konjugat-enthaltenden Endosomen mehr detektiert und **154** befand sich ausschließlich in den Lysosomen.

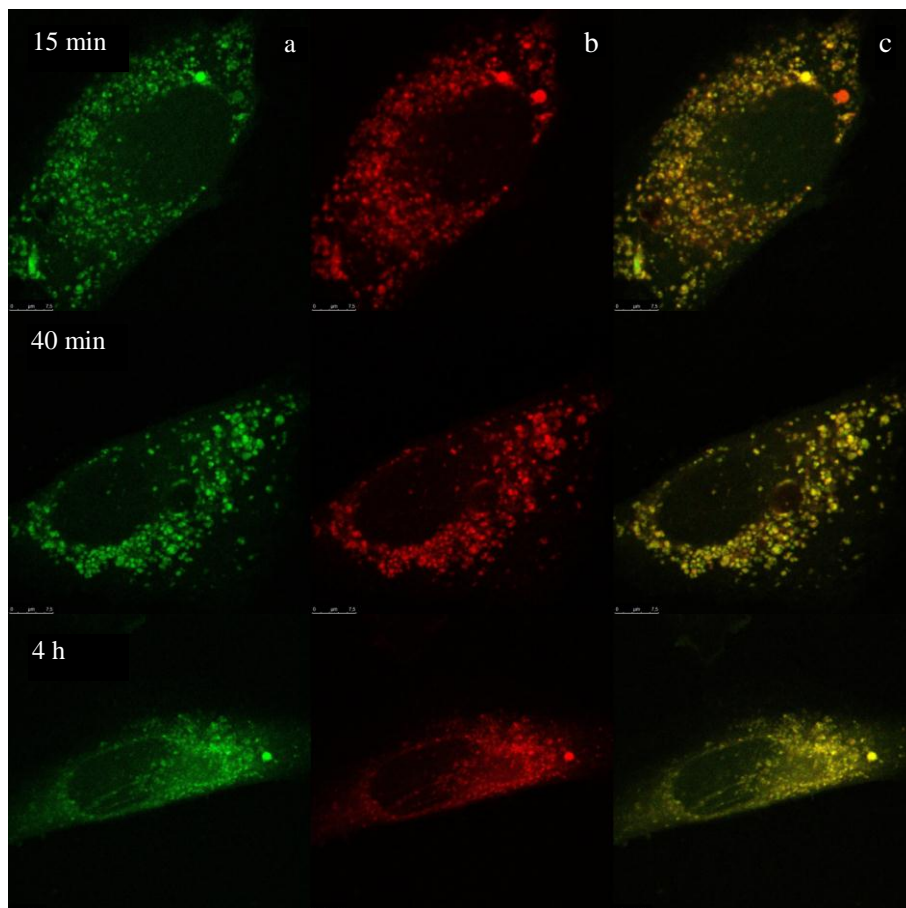
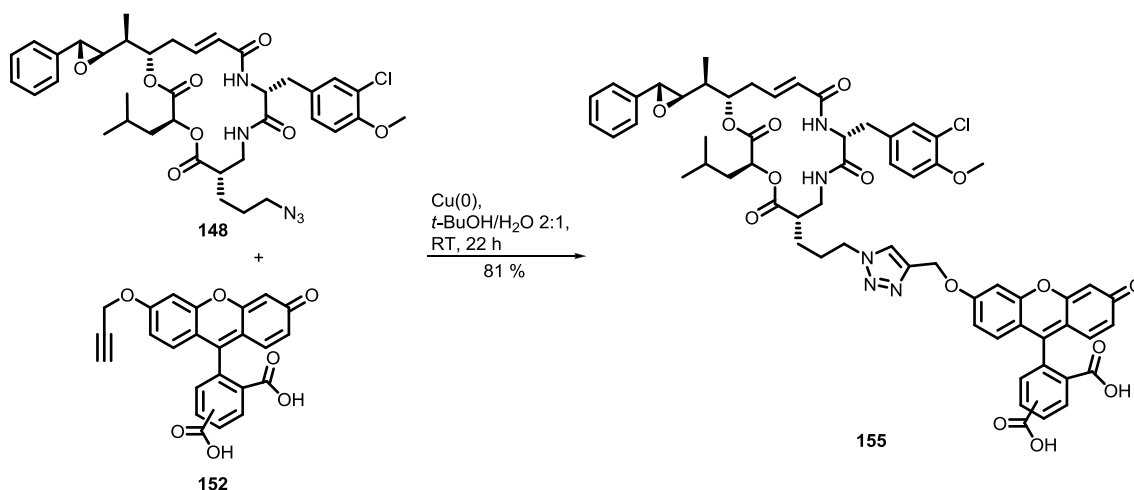


Abbildung 30: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Inkubation von WM-115-Krebszellen mit **154** für I) 15 min; II) 40 min und III) 4 h. a) Das fluoreszierende Konjugat **154** wurde in Zellorganellen aufgenommen (Anregung: 458 nm). b) LysoTrackerTM red markiert selektiv die Lysosome (Anregung: 561 nm). c) Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle bestätigt die Kolokalisation.

Mit Hilfe dieser Studie konnte der Transportweg des Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugats **154** innerhalb von Krebszellen des Typs WM-115 aufgezeichnet werden. Die erhaltenen Informationen sollen der späteren Entwicklung von Cryptophycin-*prodrugs*, die den Wirkstoff selektiv unter denen am Zielort herrschenden Bedingungen freisetzen können, dienen. Hinsichtlich der physiologischen Stabilität des Triazolrings konnte das Cryptophycin, wie bereits erwähnt, nicht aus dem Konjugat **154** freigesetzt werden und somit gelangte auch keine signifikante Wirkstoffmenge in das Cytosol, wo es an die Mikrotubuli binden kann. Ein im sauren Milieu der Lysosome spaltbarer Linker eines Cryptophycin-RGD-Peptid-Konjugats würde die selektive Wirkstofffreisetzung innerhalb der Krebszellen ermöglichen. Auf diese Weise könnten die systematische Toxizität und die unerwünschten Nebenwirkungen, die mit der klassischen Chemotherapie einhergehen, reduziert und wenn möglich, gänzlich eliminiert werden.

Als Negativkontrolle wurde das Konjugat **155** bestehend aus dem Alkylazid-Cryptophycin **148** und dem Alkin-funktionalisierten Carboxyfluorescein **152** in Analogie zu den obigen Bedingungen synthetisiert (Schema 37). Das HPL-Chromatogramm der Reaktionslösung zeigte nach 12 Stunden nur einen geringen Umsatz. Eine mögliche Ursache könnte die geringe Löslichkeit des Fluorescein-Derivats **152** in dem gewählten Lösungsmittelgemisch sein. Um die Löslichkeit zu verbessern, wurde eine geringe Menge an DMF zugefügt und die Reaktionsmischung daraufhin weitere 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine erneute Kontrolle mittels analytischer HPLC bezeugte eine fast vollständige Umsetzung, wobei keinerlei Nebenprodukte infolge einer Hydrolyse des Epoxids sichtbar waren. Das Konjugat **155** wurde massenspektrometrisch (HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 1138.38706$ $[M+Na]^+$, berechnet für $[C_{61}H_{60}ClN_5O_{15}+H]^+$: $m/z = 1138.38472$; $m/z = 1160.36636$ $[M+Na]^+$, berechnet für $[C_{61}H_{60}ClN_5O_{15}+Na]^+$: $m/z = 1160.36667$) eindeutig charakterisiert. Das Biokonjugat **155** kann aufgrund des fehlenden RGD-Peptids nicht an die auf der Zelloberfläche befindlichen Integrine binden und daher nicht endocytiert werden. Tatsächlich konnte bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie keine Aufnahme von **155** in die Zellen beobachtet werden.

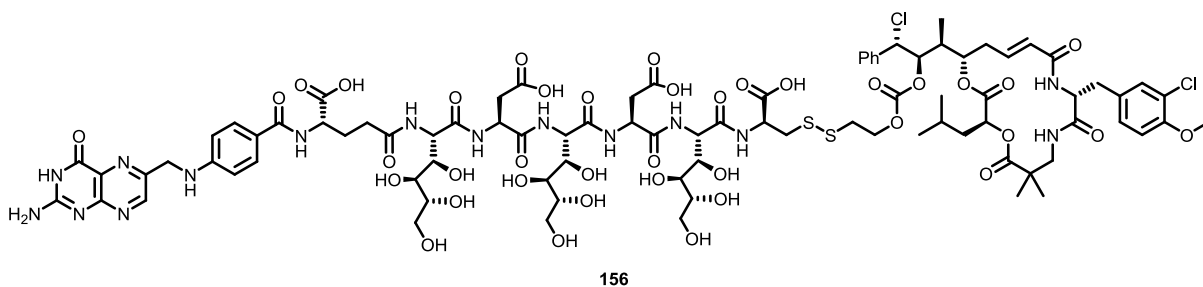


Schema 37: Konjugation des Cryptophycins **148** mit dem Propargyl-funktionalisierten Carboxyfluorescein **152**.

8 Synthese von Cryptophycin-55 und Konjugation mit selbsteliminierenden Linkersystemen als Plattform für neuartige *prodrug*-Strategien

8.1 Motivation

Cryptophycin-52 gelangte bis jetzt als einziges Derivat dieser Substanzklasse in klinische Untersuchungen. In Anbetracht dessen erscheint es sinnvoll die SAR-Studien um das Konzept des *tumor targetings* mit tumorselektiven Wirkstoffkonjugaten zu erweitern. Das korrespondierende Chlorhydrin, Cryptophycin-55, zeichnet sich durch eine hohe *in vivo*-Aktivität aus.^[7,51,52,54] Allerdings scheiterte eine Anwendung aufgrund unzureichender Stabilität in Formulierungen. Als stabiler erwiesen sich die analogen Glycinerester, bei denen die sekundäre Alkoholfunktion verestert wurde. Die Aminosäure-Chlorhydrinester werden vermutlich erst im Serum oder innerhalb der Zelle durch enzymatische Spaltung in die aktive Spezies umgewandelt.^[256] Demzufolge können sie als *prodrugs* der Chlorhydrine betrachtet werden, die ihrerseits *prodrugs* der epoxidischen Cryptophycine sind. Dieses stellt eine sehr intelligente *prodrug*-Strategie dar: das instabile Epoxid wird in ein stabiles Derivat überführt, aus dem erst unter physiologischen Bedingungen das aktive Epoxid generiert wird. Aus diesem Grund erscheint die Konjugation mit metabolisch spaltbaren Tumorererkennungseinheiten über die sekundäre Hydroxylgruppe der Chlorhydrine besonders vielversprechend. Ein großer Nachteil der Ester-*prodrugs* besteht in ihrer schnellen Hydrolyse unter physiologischen pH-Werten. Zusätzlich können endogene Enzyme mit Esteraseaktivität die Esterfunktion hydrolysieren. Dieses resultiert in einem geringen Aktivitätsunterschied der Esterkonjugate verglichen mit den freien Wirkstoffen. So wurde am Beispiel von Camptothecin (CPT)-Derivaten mit Estermaskierung ein Aktivitätsverlust um das 10- bis 20-fache im Vergleich zu dem Wirkstoff mit freier Hydroxylfunktion nachgewiesen.^[257] CPT-*prodrugs* hingegen, die durch eine stabilere Carbamatverknüpfung maskiert wurden, sind bis zu 1000-fach weniger cytotoxisch als die Ausgangsverbindung.^[258] Vor diesem Hintergrund ist zu erwähnen, dass ENDOCYTE 2008 das erste Cryptophycin-*prodrug* **156** mit Carbonatverknüpfung patentierte (Abbildung 31). Dieses Konjugat besteht aus Folsäure als *targeting group* und einem hydrophilen Linkersystem, das über eine Disulfidbrücke mit dem Wirkstoff verbunden ist.^[259]



156

Abbildung 31: Von ENDOCYTE patentiertes Cryptophycin-*prodrug*, das über eine Carbonatbrücke an das Linker-Erkennungseinheit-Konstrukt gekuppelt ist.^[259]

8.2 Synthese von Cryptophycin-55

In der Literatur ist die Synthese der Chlorhydrine durch Modifikation der entsprechenden Epoxide mit Trimethylsilylchlorid in Gegenwart von Triphenylphosphin bei tiefen Temperaturen beschrieben.^[51,55,260] Des Weiteren wurde über die Umsetzung mit konzentrierter Salzsäure (HCl) in 1,2-Dimethoxyethan bei Raumtemperatur berichtet.^[7] In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Chlorhydrin Cryptophycin-55 nach einer Vorschrift von MOORE^[213] synthetisiert. Dazu wurde Cryptophycin-52 (**2**) in absolutiertem Dichlormethan aufgenommen und bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem fünffachen Überschuss an HCl als 4 molare Lösung in Dioxan zur Reaktion gebracht (Schema 38). Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer RP-HPLC verfolgt und die Reaktion bei einem vollständigen Umsatz nach 2.5 Stunden beendet. Das Rohprodukt wurde umgehend nach Entfernung des Lösungsmittels durch präparative RP-HPLC aufgereinigt und Cryptophycin-55 (**157**) in einer guten Ausbeute von 82 % isoliert.

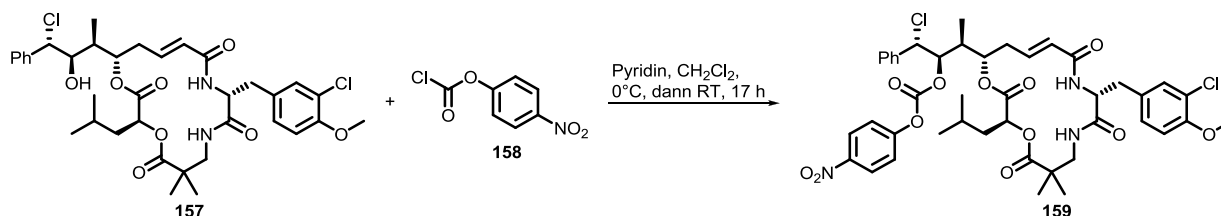


Schema 38: Überführung von Cryptophycin-52 (**2**) in das Chlorhydrin Cryptophycin-55 (**157**).

8.3 Aktivierung als *para*-Nitrophenyl-Carbonat und Konjugation mit selbsteliminierenden Linkern

Sterisch gehinderte oder reaktionsträge Alkohole werden häufig mit *para*-Nitrophenylchlorformiat (NPC) in die korrespondierenden Carbonate überführt und so für die Reaktion mit Alkoholen oder Aminen zu den entsprechenden Carbonaten bzw. Carbamaten aktiviert.^[216] Zum einen sind die entstehenden *para*-Nitrophenyl-Carbonate so stabil, dass sie durch Chromatographie oder Umkristallisation isoliert werden können, auf der anderen Seite wird die *para*-Nitrophenyl-Einheit in der Regel durch Zugabe eines weiteren Nucleophils *in situ* substituiert. In diesem Fall besteht ein gebräuchliches Verfahren darin, die Wirkstoff-Hydroxylfunktion mit NPC in Anwesenheit einer Base zu aktivieren und die *in situ* generierten *para*-Nitrophenyl-Wirkstoff-Carbonate anschließend mit dem Linkersystem zu konjugieren.^[258,261] Andererseits ist auch eine Aktivierung der Linkereinheit mit nachfolgender Konjugation an den Wirkstoff realisierbar.^[145]

Im Rahmen der Synthese von Cryptophycin-*prodrugs* war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die sekundäre Alkoholfunktion von Cryptophycin-55 (**157**) mit NPC (**158**) zu aktivieren und im Folgenden mit einem geeigneten Linkersystem zu koppeln. Aufgrund dessen wurde Cryptophycin-55 (**157**) mit einem dreifachen molekularen Überschuss an NPC und 6 Äquivalenten der Base Pyridin bei 0 °C versetzt (Schema 39).^[262]



Schema 39: Aktivierung von Cryptophycin-55 (**157**) mit NPC (**158**) als *para*-Nitrophenyl-Carbonat **159**.

Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Die anschließende Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie zeigte allerdings keine signifikante Umsetzung und nach Flash-Chromatographie wurden 67 % des Eduktes reisoliert. Eine Erhöhung des NPC-Überschusses auf ebenfalls 6 Äquivalente führte nach 17 Stunden zu einer vollständigen Umsetzung des Cryptophycin-55, welches auch durch das analytische HPL-Chromatogramm bestätigt wurde (Abbildung 32).

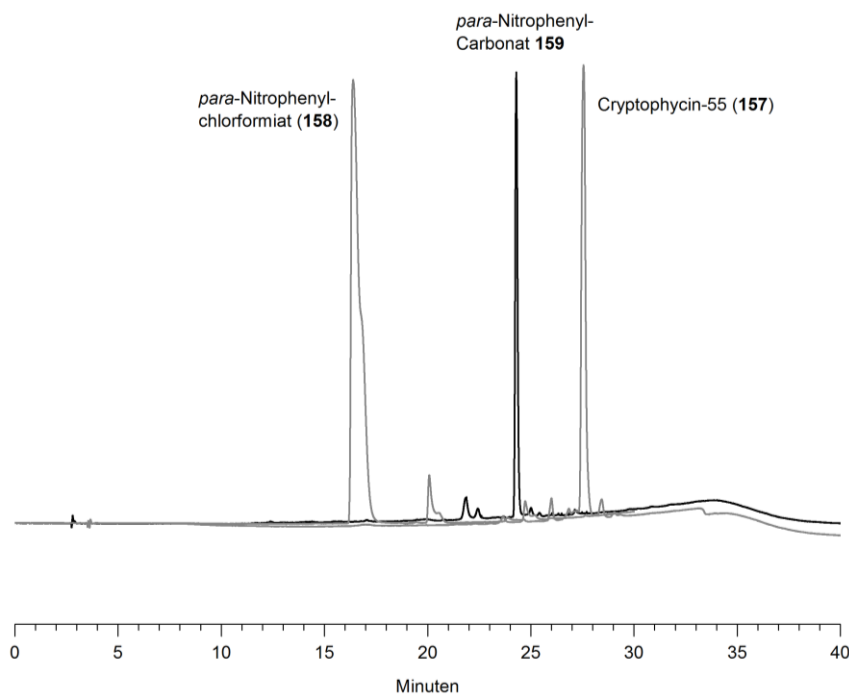
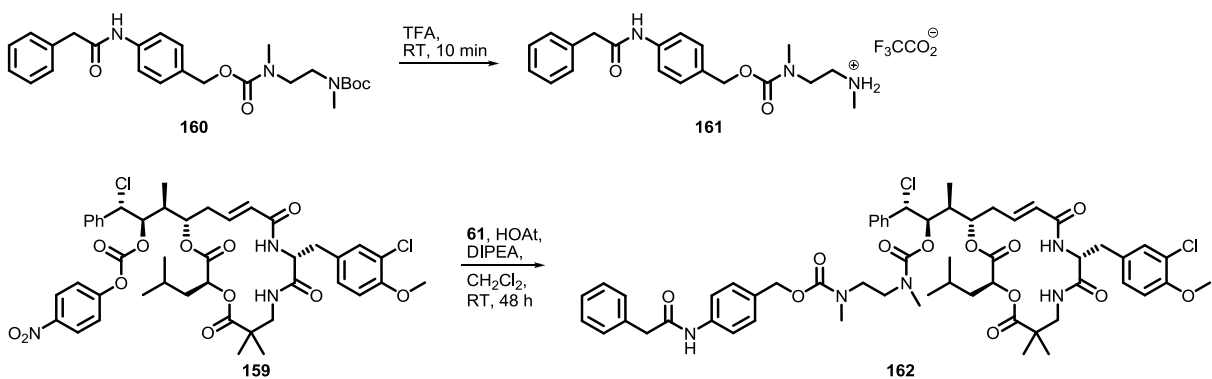


Abbildung 32: RP-HPL-Chromatogramm der Umsetzung von Cryptophycin-55 (**157**) mit NPC (**158**) zu dem Carbonat **159** (Methode 1, UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 245 \text{ nm}$).

Der Versuch das Rohprodukt säulenchromatographisch zu reinigen schlug fehl. Vermutlich kristallisierte das Produkt während der Säulenchromatographie aus und konnte auch nicht durch Waschen der stationären Phase mit dem polaren Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/Isopropanol zurück gewonnen werden. Deswegen wurde in einem weiteren Ansatz das dargestellte *para*-Nitrophenyl-Cryptophycin-Carbonat **159** nach saurer Aufarbeitung als Rohprodukt in der Folgereaktion eingesetzt. Die Extraktion mit einer wässrigen sauren Lösung sollte das überschüssige NPC entfernen. Die Linkereinheit **160** wurde von SAMMET synthetisiert und musste unmittelbar vor der Umsetzung mit dem aktivierten Cryptophycin **159** Boc-entschützt werden (Schema 40). Bei der Entschützungsreaktion ist Vorsicht geboten, da es sich bei **160** um einen selbsteliminierenden Linker handelt. **160** wurde in TFA gelöst und nach 10-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Säure am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Trifluoracetat-Salz **161** wurde nach Trocknung im Hochvakuum in Dichlormethan aufgenommen und zu einer Mischung aus Carbonat **159** und einer katalytischen Menge 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) gegeben.^[262] Das Reaktionsgemisch wurde mit der Base Diisopropylethylamin (DIPEA) versetzt und 24 Stunden gerührt. Der Überschuss an DIPEA und dem Linker **161** bezogen auf **159** betrug jeweils 2 Äquivalente. Trotz der langen Reaktionszeit konnte dünn-schichtchromatographisch nur ein geringer Umsatz des Carbonats **159** nachgewiesen werden. Daher wurden dem Reaktionsgemisch abermals 2 Äquivalente DIPEA zugefügt und es weitere 24 Stunden reagieren gelassen. Die dünn-schichtchromatographische Untersuchung zeigte erneut keinen vollständigen Umsatz, allerdings war eine Vielzahl in geringer Menge enthaltener Nebenprodukte entstanden. Die Reaktion wurde aus diesem Grund abgebrochen und das Rohprodukt nach Abtrennung des Lösungsmittels mit MALDI-ToF-Massenspektrometrie untersucht. Das gewünschte Carbamat-Konjugat **162** konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Denkbar wäre, dass das überschüssige NPC aus der vorherigen Reaktion nicht vollständig abgetrennt wurde und mit dem Linker **161** reagierte. Die korrespondierende Masse konnte allerdings ebenfalls nicht im MALDI-ToF-MS nachgewiesen werden.

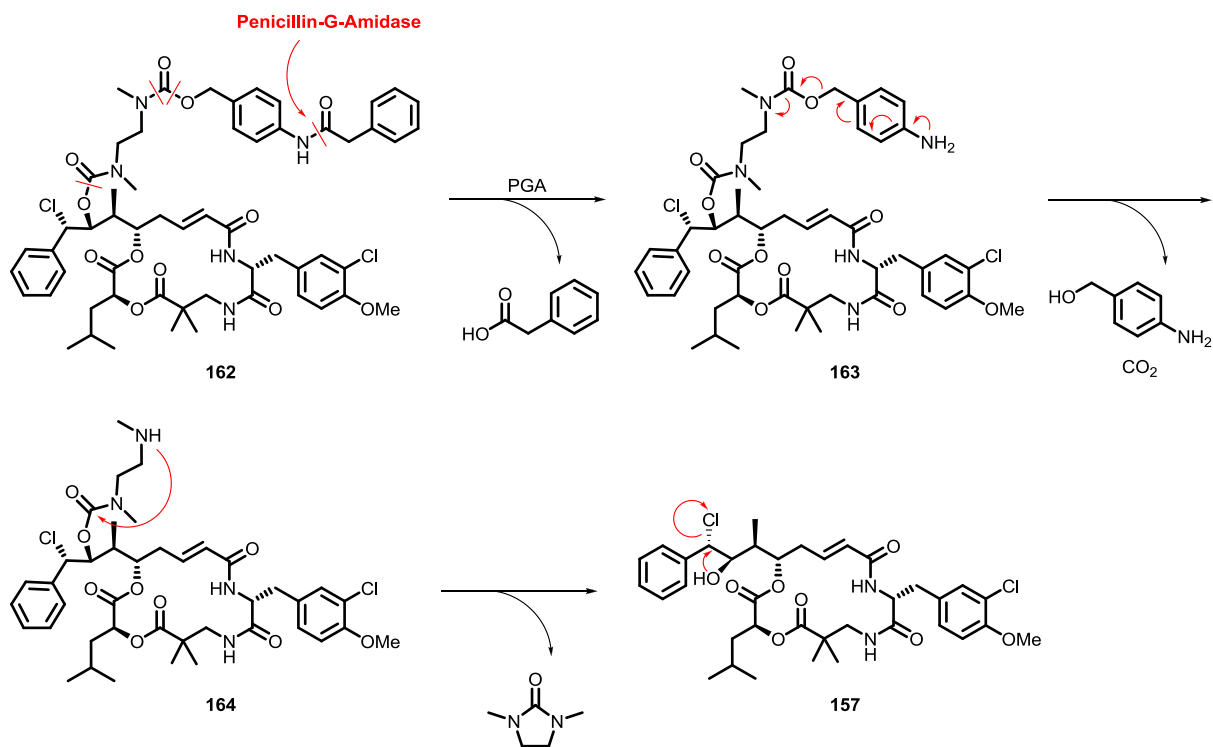


Schema 40: Entschützung der Linkereinheit **160** und versuchte Konjugation mit dem aktivierten Cryptophycin **159** zu dem Cryptophycin-Carbamat-*prodrug* **162**.

Eventuell kam es auch zu einer spontanen Zersetzung des Linkersystems nach dem in Kapitel 9 auf Seite 79 dargestellten Mechanismus, diese Vermutung wurde jedoch nicht weiter untersucht. Die Konjugation von Cryptophycin mit selbsteliminierenden Linkersystemen wurde nicht weiter verfolgt, dennoch rechtfertigen die erzielten, vorläufigen Ergebnisse zur Aktivierung des Wirkstoffes mit NPC eine Vertiefung dieser Studien.

9 Ausblick

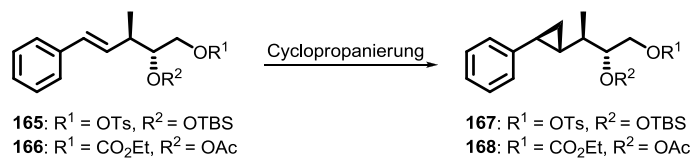
Das Cryptophycin-Carbamat-*prodrug* **162** ist als ein Testsystem für Propharmazeutika mit selbstelimierenden Linkersystemen zu betrachten. Das *self-immolative* Linkerkonstrukt **160** besitzt eine Erkennungssequenz für das Enzym Penicillin-G-Amidase (PGA). PGA zählt zu den Hydrolasen und ist befähigt alle C-N-Bindungen linearer Amide zu spalten.^[263] Allerdings ist PGA nicht im humanen Genom codiert, daher müsste das Enzym dem Zellkultur-Medium bei den Untersuchungen zur Linkerabspaltung zugefügt werden. Der Eliminierungsmechanismus des Linkers wird mit der enzymatischen Spaltung der Amidbindung der Phenylacetamid-Einheit von **162** ausgelöst (Schema 41).^[258] Das entstandene Intermediat **163** durchläuft daraufhin eine 1,6-Chinonmethid-ähnliche Umlagerung. Nach Decarboxylierung erfolgt die spontane Cyclisierung des Intermediats **164** und das Chlorhydrin **157** wird freigesetzt, welches anschließend unter *in vivo*-Bedingungen die aktive Epoxidspezies generieren könnte.



Schema 41: Spaltmechanismus des *self-immolativen* Linkersystems katalysiert durch das Enzym Penicillin-G-Amidase.

Aus zeitlichen Gründen konnte die Synthese des Cyclopropan-funktionalisierten A-Fragments nicht weiter verfolgt werden, jedoch ist es sicherlich lohnenswert bei der Methylierung des Epoxyalkohols **51** noch andere Methylierungsreagenzien zu testen. Falls das gewünschte 1,2-Diol **52** auf diesem Weg nicht darstellbar sein sollte, müsste eine andere Synthesestrategie zum Aufbau eines cyclopropanierten Fragment-A-Analogons angewandt werden. Aus synthetischer Sicht bietet es sich an die Cyclopropanierung eines literaturbekannten Fragment-A-Vorläuferolefins vom Typ **165** bzw.

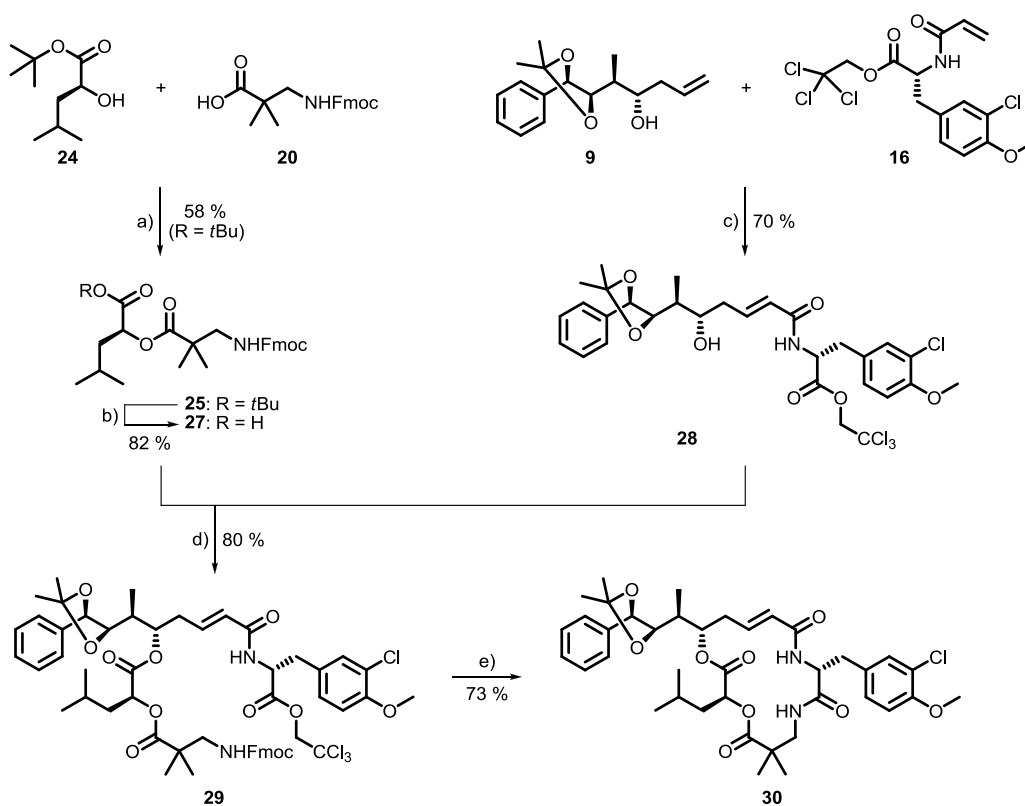
166 zu etablieren und bei erfolgreichem Verlauf die Baustein-Synthese analog zu der jeweiligen Literaturvorschrift^[176,199] abzuschließen (Schema 44).



Schema 44: Alternativer Syntheseweg zur Darstellung eines cyclopropanierten Fragment-A-Bausteins in Analogie zu TIUS^[199] bzw. GHOSH.^[176]

10 Zusammenfassung

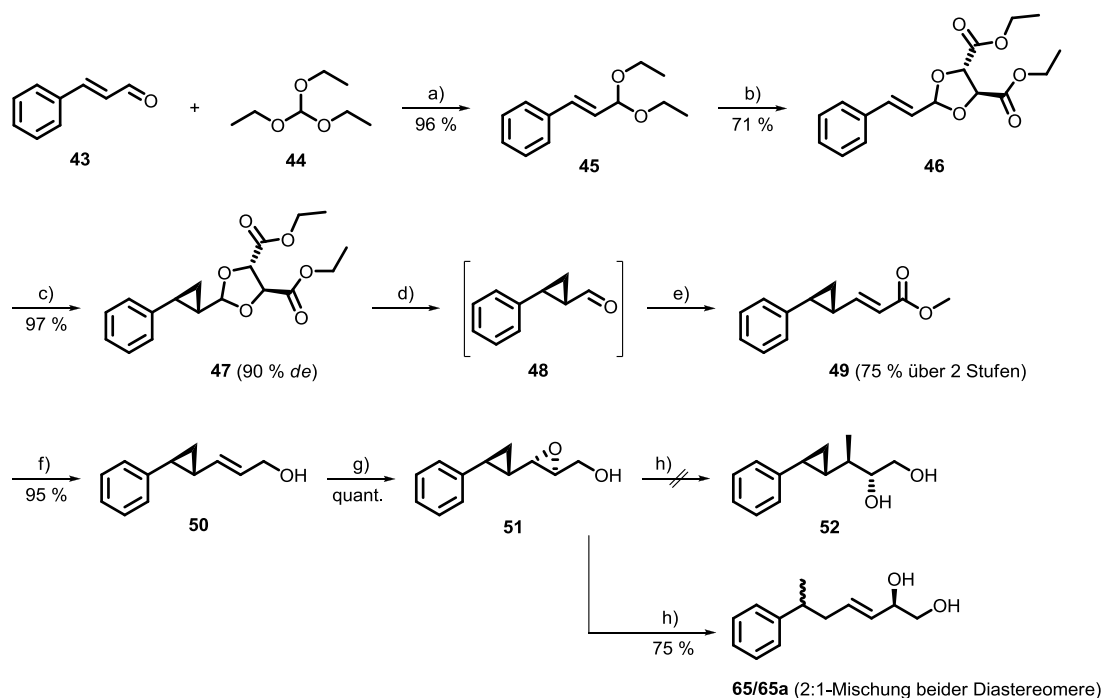
Cryptophycine sind cytotoxische Naturstoffe, die sogar gegenüber mehrfach medikamenten-resistenten Tumorzelllinien hohe Aktivitäten aufweisen.^[2,10,45,264] Cryptophycin-52 (**2**) besitzt die größte pharmakologische Relevanz und wurde bereits in klinischen Studien auf seine Eignung als Antitumorwirkstoff hin untersucht.^[12,14,15] Jedoch verhinderte die hohe Neurotoxizität bis jetzt den Einsatz dieser Wirkstoffklasse in der Krebstherapie. Aus diesem Grund wurden zahlreiche strukturelle Veränderung der Leitstruktur vorgenommen,^[2,10,45] sowie erste Pionierarbeiten zur Darstellung von tumorselektiven *prodrugs* geleistet.^[259] Die retrosynthetische Betrachtung führt zu vier Fragment-Bausteinen aus denen sich der Cryptophycin-Makrocyclus in unterschiedlicher Weise aufbauen lässt. Die Reihenfolge der Fragment-Verknüpfung richtet sich nach der Zielsetzung, wobei auf eine orthogonale Schutzgruppenstrategie und eine effiziente Syntheseroute zu achten ist. Im Rahmen der hier bearbeiteten Projekte war eine Variation vieler Fragment-Bausteine erforderlich und daher wurde eine konvergente Syntheseroute als geeignet erachtet. Zunächst wurden die Segmente AB **28** und CD **27** parallel aufgebaut und dann über eine Fragment-A-D-Esterbindung miteinander verknüpft (Schema 42). Das cyclische Depsipeptid **30** wurde mittels Makrolactamisierung erhalten und die Cryptophycin-Totalsynthese durch die Einführung der Epoxidfunktionalität abgeschlossen.



Schema 42: Konvergente Syntheseroute zum Aufbau des Makrocyclus am Beispiel von Cryptophycin-52 (**2**).

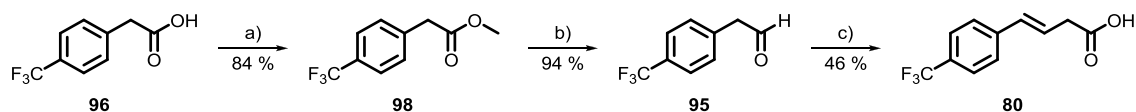
a) DCC, [DMAP], CH_2Cl_2 , 0 °C, 1 h dann RT, 15 h; b) TFA, CH_2Cl_2 , 0 °C, 3.5 h; c) Grubbs-II-Kat., CH_2Cl_2 , Rückfluss, 16 h; d) [DMAP], NEt_3 , 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, THF, 0 °C, 1 h; e) Piperidin, DMF, RT, 16 h.

Ein Projekt dieser Dissertation war die Synthese eines neuartigen Cyclopropan-A-Fragments zur Generierung stabilerer Cryptophycin-Derivate. Zu diesem Zweck wurde *trans*-Zimtaldehyd (**43**) in einer zweistufigen Synthese in das enantiomerenreine Acetal **46** überführt (Schema 43). Der Cyclopropanring wurde nach einer Vorschrift von DENMARK^[196] mittels asymmetrischer Simmons-Smith-Reaktion eingeführt und **47** mit einem Diastereomenüberschuss von 90 % erhalten. Das chirale Auxiliar wurde daraufhin säurekatalysiert abgespalten und der intermediär entstandene Aldehyd **48** aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit unverzüglich in einer Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)-Reaktion zu dem ungesättigten Methylester **49** umgesetzt. Dieser wurde zu dem Allylkohol **50** reduziert, der in der darauffolgenden Shi-Epoxidierung den 2,3-Epoxyalkohol **51** ergab. Das Hauptdiastereomer wurde in einem 10-fachen Überschuss erhalten, wobei die absolute Konfiguration des Epoxidrings noch zum Beispiel mittels Röntgenstrukturanalyse belegt werden muss. Bei der anschließenden Umsetzung mit Trimethylaluminium erfolgte die Einführung der Methylgruppe nicht, wie gewünscht, am Epoxid in 3-Position, sondern am benzylichen Kohlenstoffatom des Cyclopropanrings. Der nucleophile Angriff resultierte in einer Ringöffnung der Cyclopropaneinheit und die 1,2-Diole **65** und **65a** wurden in einem Diastereomenverhältnis von ungefähr 2:1 erhalten.



Schema 43: Synthese des 2,3-Epoxyalkohols **51** und nucleophile Cyclopropanringöffnung bei Umsetzung mit Trimethylaluminium. a) $[\text{NH}_4\text{NO}_3]$, EtOH, RT, 16 h; b) D-DET, [PPTS], Toluol, 120 °C, 6 h; c) Et_2Zn , ClCH_2I , DCE, -23 °C, 6 h; d) *p*-TsOH·H₂O, THF/H₂O, Rückfluss, 15 h; e) Trimethylphosphonoacetat, Tetramethylguanidin, THF, -78 °C, 30 min, dann RT, 16 h; f) DIBAL-H, THF, -78 °C, 30 min, dann RT, 16 h; g) *ent*-**61**, K_2CO_3 , AcOH, $\text{Na}_2(\text{EDTA})$, DMM/ CH_3CN , -10 °C, 3 h; h) AlMe_3 , CH_2Cl_2 , -10 °C, 1 h.

Fluorierte Pharmazeutika gewinnen immer mehr an Bedeutung.^[64,65,68,69] In diesem Zusammenhang wurden die Fluor-funktionalisierten Cryptophycine **74** und **76** mit Hilfe der konvergenten Syntheseroute dargestellt. Die im Arbeitskreis etablierten Fragment-Synthesen wurden zum Aufbau der modifizierten Bausteine genutzt, wobei die Synthese der β,γ -ungesättigten Carbonsäure **80** die größte Herausforderung darstellte. Die Darstellung von **80** mit dem geringsten Syntheseaufwand sollte die *trans*-selektive Wittig-Reaktion von 4-Trifluormethylbenzaldehyd (**78**) mit dem entsprechenden Ylid sein, allerdings konnte das gewünschte Produkt nicht auf diesem Weg erhalten werden. Ebenso waren die Ansätze zur Synthese von **80** mittels Suzuki-Kupplung nicht zielführend. Eine weitere Möglichkeit die β,γ -ungesättigte Carbonsäure **80** zu gewinnen, bietet die nach RAGOISSIS^[168] modifizierte Knoevenagel-Kondensation von Aldehyd **95**. Nachdem Versuche zur Oxidation von 4-(Trifluormethyl)phenylethanol (**94**) zur Generierung des Aldehyds fehlgeschlagen waren, gelang diese in einer zweistufigen Synthesesequenz (Schema 45). Dazu wurde 4-(Trifluormethyl)phenyllessigsäure (**96**) in den entsprechenden Methyl-ester **98** überführt, der daraufhin zu dem Aldehyd **95** reduziert wurde. Die gewünschte Carbonsäure **80** wurde nach anschließender Knoevenagel-Kondensation erhalten und die Synthese des fluorierten A-Fragments analog zur Literatur^[167] vervollständigt. In Hinblick auf die stereoselektive Synthese von **75** ist zu erwähnen, dass das Zwischenprodukt Lacton **99** nach der Sharpless-Dihydroxylierung enantiomerenrein erhalten wurde.



Schema 45: Synthese der β,γ -ungesättigten Carbonsäure **80**. a) SOCl_2 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 16 h; b) DIBAL-H, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 3.5 h; c) Malonsäure, Piperidin, AcOH, DMSO, $65\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h.

Die Synthese des fluorierten Fragment-B-Bausteins **77** erfolgte in zwei Schritten ausgehend von Boc-Pentafluor-D-phenylalanin (**107**), dessen Hydroxylfunktion zuerst in einer Steglich-Veresterung als Trichlorethylester geschützt wurde (siehe Schema 27, Seite 56). Im Folgenden wurde die Boc-Schutzgruppe im sauren Milieu entfernt und das intermediär erhaltene Amin zu dem gewünschten Acrylamid **77** umgesetzt.

Die fluorierten Cryptophycine wurden in einem zellbasierenden Cytotoxizitätsassay auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Der Trifluormethyl-Substituent in C^4 -Position des Fragment-A-Bausteins ergibt das hoch potente Cryptophycin-Derivat **74**, dessen Bioaktivität gegenüber der KB-3-1-Zelllinie im niedrigen picomolaren Bereich liegt (Abbildung 33). Die Aktivität gegenüber der multimedikamenten-resistenten Zelllinie KB-V1 ist um den Faktor 40 geringer als die der Leitstruktur Cryptophycin-52. Generell führten Modifikationen des Fragment-B-Bausteins bisher zu nur schwach cytotoxischen Analoga^[7,9,48] und so resultierte der Austausch des 3-Chlor-4-methoxyphenyl-

Substituent gegen einen pentafluorierten Phenylring in einer signifikanten Aktivitätsabnahme bei beiden Zelltypen.

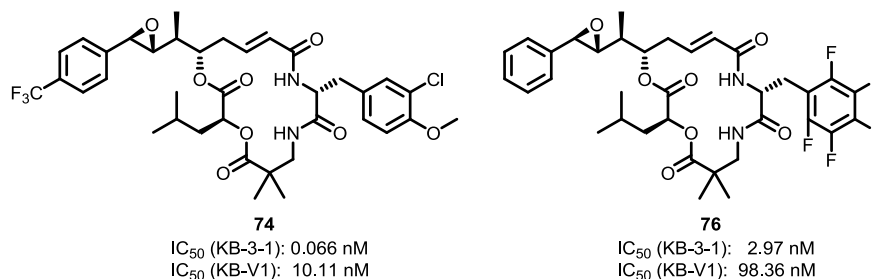


Abbildung 33: Strukturen und IC_{50} -Werte der fluorinierten Cryptophycine **74** und **76**.

NAHRWOLD entwickelte kürzlich die Synthese von Cryptophycin-Derivaten mit polaren Seitenketten im Fragment-C-Baustein.^[46] Darunter zeichneten sich die Alkylazid-modifizierte Analoga durch die Möglichkeit zur nachträglichen Konjugation der Wirkstoffe an beispielsweise Tumorerkennungssequenzen aus. Zusätzlich zur Synthese eines Cryptophycin-RGD-Peptid-Konjugats für Lokalisationsstudien wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Alkylazidkettenlänge sowie der Stereochemie am C^α -Atom evaluiert. Das Derivat **145** wurde analog zu NAHRWOLD aus einem DAB-Vorläufermolekül aufgebaut. Im Falle der Analoga **144** und **146** wurde die konvergente Syntheseroute erfolgreich angewandt. Zusammengefasst sind die (*R*)-konfigurierten Epimere sowohl in den KB-3-1-Zellen als auch in der MDR-Zelllinie KB-V1 potenter (Abbildung 34). Bei gleicher Stereochemie am C^α -Atom nimmt die biologische Aktivität mit länger werdender Kettenlänge drastisch ab. Eine generelle Aussage zu treffen, ob die Konfiguration oder die Alkylkettenlänge die Bioaktivität der Azid-funktionalisierten Cryptophycine stärker beeinflusst, ist nicht möglich.

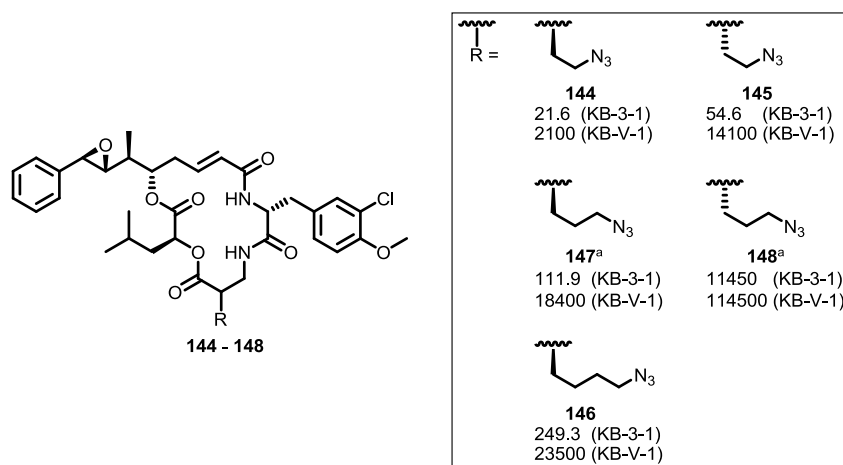


Abbildung 34: Alkylazid-funktionalisierte Cryptophycine und die biologischen Aktivitäten gegen zwei humane Krebszelllinien (IC_{50} -Werte in pM); ^a siehe Dissertation NAHRWOLD.^[46]

Das rationale Design von *prodrugs* zur zielgerichteten Tumorthherapie setzt die Kenntnis über die finale Lokalisation des Wirkstoffkonjugats in dem Organismus bzw. der Zelle voraus. Aus diesem Grund wurde das Fluorescein-markierte Cryptophycin-RGD-Peptid-Konjugat **154** synthetisiert (Abbildung 35) und dessen Aufnahme sowie finale Lokalisation in humanen Krebszellen des Typs WM-115 untersucht. Das Biokonjugat **154** wurde im Rahmen dieser Dissertation mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition aus dem Azid-Cryptophycin **148** und der Fluorophor-Peptid-Einheit **153** aufgebaut. Weiterhin wurde das Propargyl-funktionalisierte Carboxyfluorescein **152**, das als fluoreszierender Linker im finalen Konjugat dient, in einer zweistufigen Synthese aus 5(6)-Carboxyfluorescein (**150**) dargestellt (siehe Schema 35, Seite 67). Dazu wurde **150** mit einem Überschuss an Propargylbromid umgesetzt und der Propargylether **152** nach Verseifung mit Lithiumhydroxid erhalten. Die Lokalisationsstudien wurden von BOGNER^[60] durchgeführt und die konfokalen Fluoreszenzmikroskopiebilder von PALMISANO an der Universität Erlangen aufgenommen (siehe Abbildung 30, Seite 72). Das RGD-Peptid-Konjugat **154** wurde rasch durch Integrin-vermittelte Endocytose in die Zellen aufgenommen und durch Koloalokalisation mit dem selektiven Lysosomenfarbstoff LysoTrackerTM red konnte die finale Lokalisation des Konjugats in den Lysosomen nachgewiesen werden. Lysosome haben bekanntlich einen niedrigeren pH-Wert (4.5 bis 5.0) als das umgebende Cytosol (pH 7.4).^[265] Des Weiteren enthalten sie viele hydrolysierende Enzyme, die nur im sauren Milieu korrekt gefaltet und funktionsfähig sind. Das Wissen über die Anreicherung des Wirkstoff-RGD-Peptid-Konjugat in den Lysosomen nach erfolgter Endozytose kann nun für das Design hydrolysierbarer oder säurelabiler Linker zur selektiven Wirkstofffreisetzung innerhalb der Tumorzellen genutzt werden.

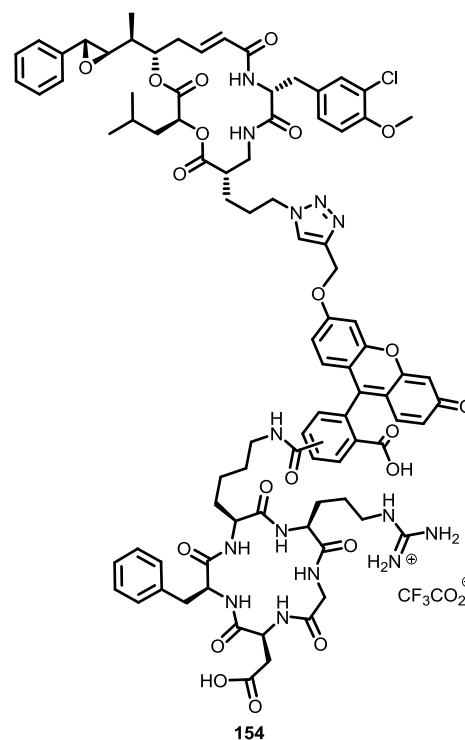
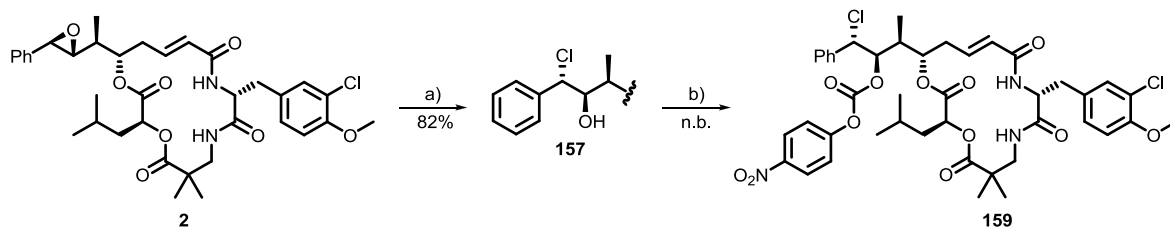


Abbildung 35: Cryptophycin-Fluorescein-RGD-Peptid-Konjugat **154**.

Während zahlreiche, hoch potente Wirkstoff-Analoga in SAR-Studien dargestellt wurden, verfolgt die moderne Krebstherapie eine gezielte Tumoradressierung durch die Chemotherapeutika zur Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen. Vor diesem Hintergrund wurde Cryptophycin-52 (**2**) in das korrespondierende Chlorhydrin **157** überführt und dessen Hydroxylgruppe erfolgreich mit 4-Nitrophenylchlorformiat NPC (**158**) aktiviert, um eine anschließende Verknüpfung mit geeigneten Linkersystemen über eine Carbonateinheit zum Aufbau von *prodrugs* zu ermöglichen (Schema 46). Propharmazeutika mit Carbonat-Verknüpfung sollten unter physiologischen Bedingungen stabiler sein als die analogen Esterverbindungen. Die Synthese von spaltbaren Linkern

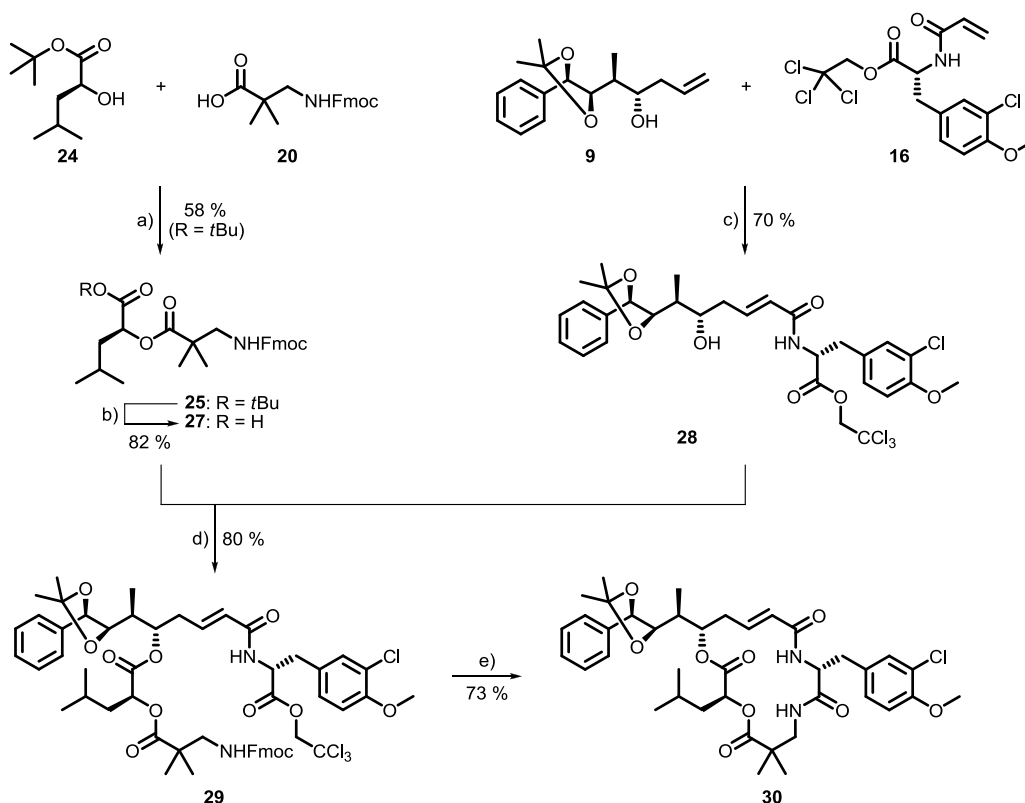
und deren Konjugation mit dem aktivierten Cryptophycin-Derivat **159** sind derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen im Arbeitskreis SEWALD.



Schema 46: Epoxidringöffnung zum Chlorhydrin **157** und dessen Aktivierung mit NPC zur weiteren Funktionalisierung des Cryptophycin-Makrocyclus. a) HCl, CH₂Cl₂, -50 °C, 2.5 h; b) **158**, Pyridin, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 17 h.

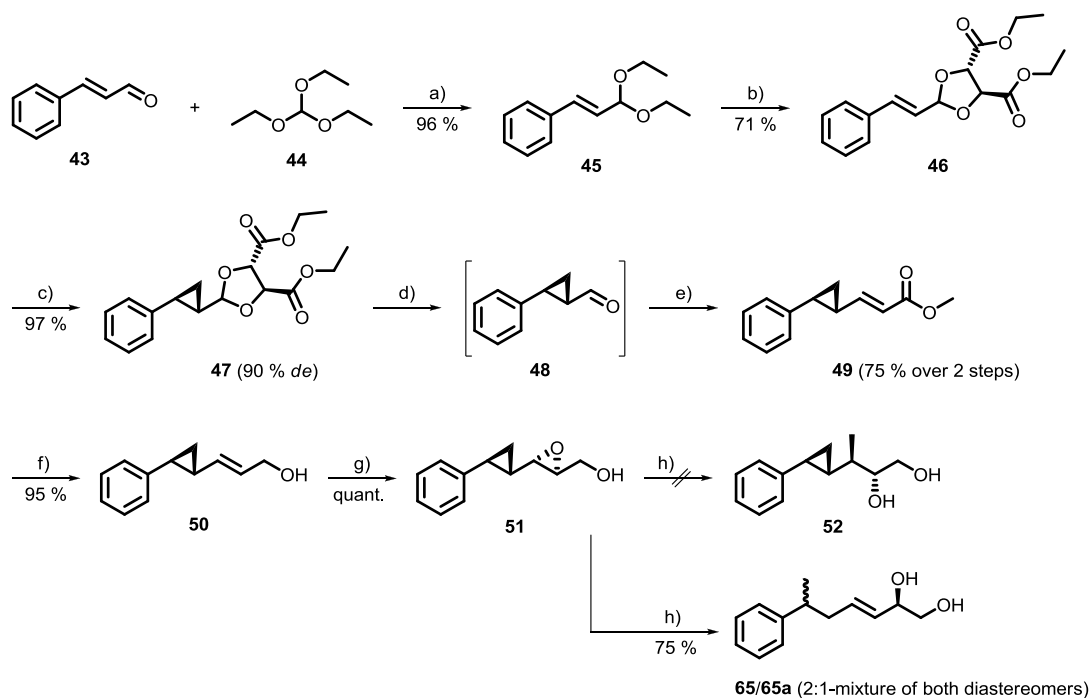
11 Summary

Cryptophycins are cytotoxic natural products that exhibit considerable activities even against multidrug-resistant tumor cell lines.^[2,10,45,264] Cryptophycin-52 (**2**) is a synthetic analog of major pharmacological relevance. This derivative already entered phase II clinical trials but failed due to its dose-limiting neurotoxicity and insufficient efficacy *in vivo*.^[12,14,15] Many structure-activity-relationship (SAR) studies were conducted^[2,10,45] and even first attempts for the synthesis of a tumor selective prodrug based on cryptophycins were made.^[259] The retrosynthetic analysis of cryptophycin-1 (**1**) leads to the four units A-D which can be joint together in different ways to assemble the macrocycle. The sequence of fragment condensation depends on the task and special attention has to be paid to an efficient synthetic route and orthogonal protecting group strategy. The aims of this thesis included the variation of different building blocks, and therefore, could be best realized using a convergent synthetic route. At first, the segments AB (**28**) and CD (**27**) were built up at the same time and then coupled via a unit A-D-ester linkage (Scheme 47). The cyclic depsipeptide **30** was obtained by macrolactamization and the total synthesis of cryptophycin was finalized by introduction of the epoxide moiety.



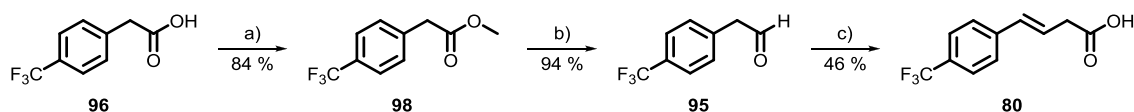
Scheme 47: Synthesis of cryptophycin-52 macrocycle **30** by the newly invented convergent route. a) DCC, [DMAP], CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h, then rt, 15 h; b) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 3.5 h; c) Grubbs-II catalyst, CH₂Cl₂, reflux, 16 h; d) [DMAP], NEt₃, 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, THF, 0 °C, 1 h; e) piperidine, DMF, rt, 16 h.

One project of the present work was the synthesis of a cyclopropane-functionalized unit A building block to generate a more stable cryptophycin analog. Therefore, *trans*-cinnamic aldehyde (**43**) was converted in a two-step synthesis to the enantiomerically pure acetal **46** (Scheme 48). The cyclopropane ring was introduced according to a procedure by DENMARK^[196] via asymmetric Simmons-Smith reaction and **47** was obtained in a diastereomeric excess of 90 %. The chiral auxiliary was then cleaved under acidic conditions and the oxidation-sensitive aldehyde **48** was immediately transformed to the unsaturated methylester **49** in a Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) reaction. Subsequent reduction gave rise to the corresponding alcohol **50** which was applied in a Shi epoxidation yielding the 2,3-epoxy alcohol **51**. The major diastereomer was achieved in a ten-fold excess while the desired configuration has to be proven by x-ray diffraction analysis. The epoxy alcohol **51** was then treated with trimethylaluminium to introduce the methyl substituent regioselectively at the 3-position with inversion of the configuration. According to the literature^[211,212] 1,2-diol **52** should be obtained preferentially, however a 2:1-mixture of the diols **65** and **65a** was received as assigned by the NMR data. Presumably, the nucleophilic attack occurred at the benzylic carbon which led to ring opening of the cyclopropane moiety and gave rise to the C=C-double bond and the 1,2-diol-structural motif.



Scheme 48: Synthesis of 2,3-epoxy alcohol **51** and reaction with trimethylaluminium leading to nucleophilic ring opening of the cyclopropane moiety. a) $[\text{NH}_4\text{NO}_3]$, EtOH, rt, 16 h; b) D-DET, [PPTS], toluene, 120 °C, 6 h; c) Et_2Zn , ClCH_2I , DCE, -23 °C, 6 h; d) *p*-TsOH·H₂O, THF/H₂O, reflux, 15 h; e) trimethyl phosphonoacetate, tetramethylguanidine, THF, -78 °C, 30 min, then rt, 16 h; f) DIBAL-H, THF, -78 °C, 30 min, then rt, 16 h; g) *ent*-**61**, K_2CO_3 , AcOH, $\text{Na}_2(\text{EDTA})$, DMM/ CH_3CN , -10 °C, 3 h; h) AlMe_3 , CH_2Cl_2 , -10 °C, 1 h.

Fluorinated pharmaceuticals have become more and more important during the last decades because of their unique properties.^[64,65,68,69] Therefore, the fluorine-functionalized cryptophycins **74** and **76** were synthesized using the convergent route. The established methods for the preparation of the native building blocks were applied for the construction of the modified units with β,γ -unsaturated carboxylic acid **80** being the most challenging part. The *trans*-selective Wittig reaction of 4-(trifluoromethyl)-benzaldehyde (**78**) and the respective ylid seemed to be the most efficient way of generating this compound. Unfortunately, the desired product was not formed as well as the attempts using Suzuki coupling for the synthesis of **80** were not successful. Another alternative is the modified Knoevenagel condensation^[168] of aldehyde **95** and malonic acid. After trying to oxidize 4-(trifluoromethyl)phenethyl alcohol (**94**) utilizing several oxidation methods, aldehyde **95** was obtained in a two-step reaction sequence starting with 4-(trifluoromethyl)phenylacetic acid (**96**) which was converted to the corresponding methylester **98** (Scheme 50). Subsequent reduction afforded aldehyde **95** and the following Knoevenagel condensation led to the β,γ -unsaturated carboxylic acid **80** which was then transformed into the trifluoromethyl-functionalized unit A building block **75** using a literature procedure.^[47] In the context of the stereoselective synthesis of building block **75** the intermediate lactone **99** was obtained enantiomerically pure after Sharpless dihydroxylation as proven by chiral HPLC.



Scheme 50: Synthesis of the β,γ -unsaturated carboxylic acid **80**. a) SOCl_2 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 16 h; b) LiAlH_4 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 3.5 h; c) malonic acid, piperidine, AcOH, DMSO, $65\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h.

In course of the fluorinated unit B building block-synthesis, Boc-pentafluoro-D-phenylalanine (**107**) was transformed into the trichloroethylester **108** via Steglich esterification. After cleavage of the Boc-protecting group in acidic medium, the intermediately obtained amine was converted into the desired acrylamide **77**.

Consequently, the fluorinated cryptophycins were evaluated in the cell-based cytotoxicity assay. The trifluoromethyl-modified cryptophycin **74** proved to be highly active against KB-3-1 cells and exhibited an IC_{50} -value in the low picomolar range (Figure 36). In the case of the multidrug resistant cell line KB-V1 the biological activity decreased by the factor of 40 compared to the lead structure cryptophycin-52 (**2**). Generally, modifications of unit B so far led to analogs with diminished cytotoxicities,^[7,9,48] and within this context, the exchange of the 3-chloro-4-methoxyphenyl-substituent against a pentafluorinated phenylring resulted in a significant loss of activity for both cell lines.

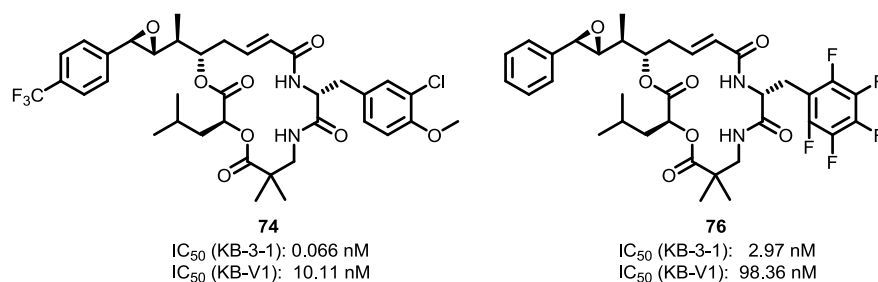


Figure 36: Structures and IC_{50} -values of the fluorinated cryptophycins **74** and **76**.

NAHRWOLD recently developed the synthesis of cryptophycins containing polar unit C side chain functionalities.^[46] The alkylazide-modified analogs stand out due to the facile conjugation to for example tumor targeting groups. In addition to the synthesis of a cryptophycin-RGD-peptide-conjugate for localization studies the effect of the alkylazide side chain length and the configuration at C^α -atom on the bioactivity was investigated in the framework of this dissertation. The derivative **145** was prepared in analogy to NAHRWOLD using a DAB-segment while the analogs **144** and **146** were built up successfully by the convergent approach (Figure 37). In conclusion, the (*R*)-configured epimers proved to be more potent as determined in a cell-based cytotoxicity assay using the cell line KB-3-1 and its multidrug-resistant subclone KB-V1. The biological activity significantly decreased with longer side chains in the case of the same stereochemistry at C^α -atom. A general trend whether the configuration or the side chain length has a stronger impact on the bioactivity was not observed.

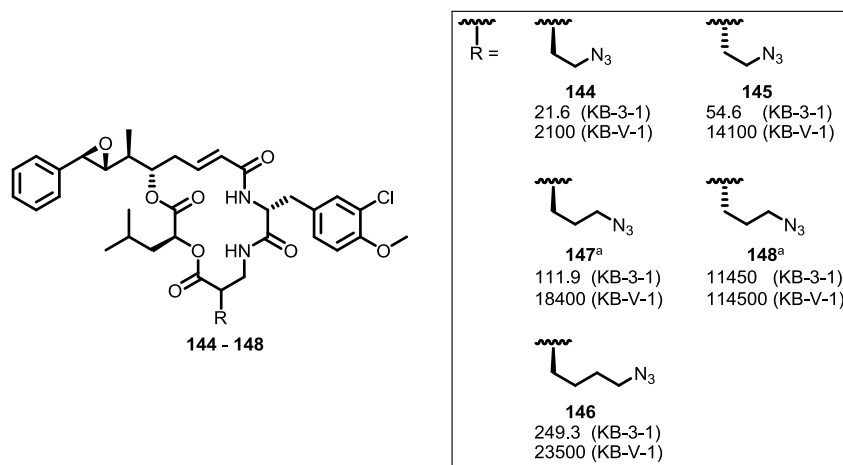


Figure 37: Alkylazide-functionalized cryptophycins and the respective bioactivities against two human tumor cell lines (IC_{50} -values in μ M); ^a compare dissertation NAHRWOLD.^[46]

The knowledge of the final localization of a drug conjugate inside an organism or a cell is crucial for the rational design of prodrugs in the case of target-oriented tumor therapy. For that purpose, the fluorescent cryptophycin-RGD-peptide conjugate **154** was synthesized and its internalization into human WM-115 cancer cells was investigated (Figure 38). The bioconjugate **154** was obtained via copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition of azide-functionalized cryptophycin **148** and the

fluorophor-peptide-device **153**. Additionally, the propargyl-modified carboxyfluorescein **152** serving as a fluorescent linker in the final conjugate was synthesized in a two-step procedure (see Scheme 35, page 67). The localization studies were performed by BOGNER during his thesis and the confocal fluorescence microscopy pictures were taken by PALMISANO at the University of Erlangen (see Figure 30, page 72). It could be shown that the conjugate was rapidly internalized via endocytosis and the majority was found inside the lysosomes. The localization was proven by colocalization with LysoTrackerTM red which stains lysosomes selectively. As it is known, lysosomes have a lower pH value (4.5 to 5.0) compared to the surrounding cytosol (pH 7.4).^[265] Furthermore, they contain many hydrolytic enzymes that are exclusively active in acidic environment. The knowledge about the accumulation of the drug-RGD-peptide-conjugate inside lysosomes after endocytosis can now be used for the design of hydrolysable or acid-labile linkers for the selective drug release inside tumor cells.

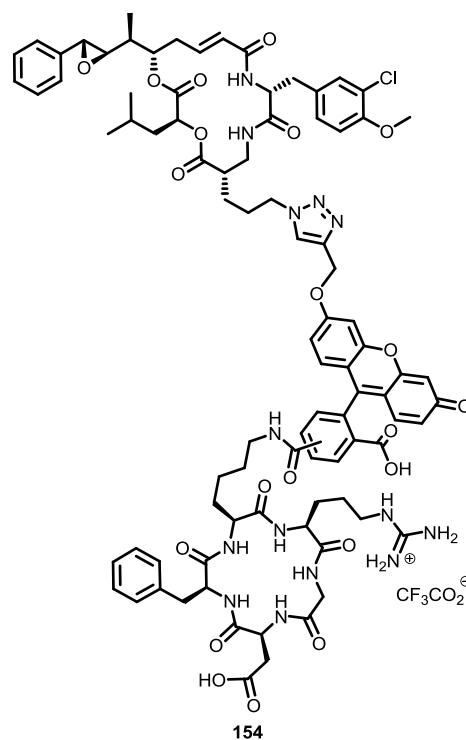
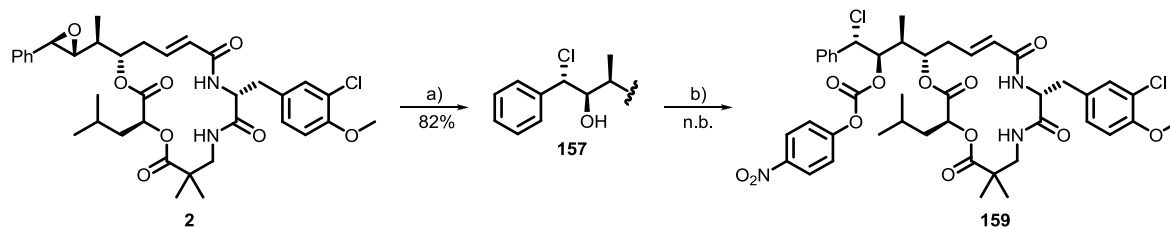


Figure 38: Cryptophycin-fluorescein-RGD-peptide-conjugate **154**.

The conducted SAR-studies led to many highly potent drug analogs, but the modern chemotherapy focuses on tumor targeting by selective prodrugs to prevent undesired side effects. In this context, cryptophycin-52 (**2**) was converted into the corresponding chlorohydrin **157** and its hydroxyl group was activated using NPC (**158**) (Scheme 51). The further coupling of the activated drug **159** with suitable linker systems via a carbonate linkage for the generation of prodrugs is currently under investigation by SEWALD and co-workers.



Scheme 51: Epoxide ring opening of cryptophycin-52 (**2**) and activation with NPC for further functionalization of the macrocycle. a) HCl, CH₂Cl₂, -50 °C, 2.5 h; b) **158**, pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C → rt, 17 h.

12 Methoden und Materialien

Allgemeine Arbeitstechniken

Sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden unter Verwendung der Schlenktechnik unter einer statischen Argonatmosphäre in mit Gummisepten verschlossenen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurden die Apparaturen mehrmals evakuiert (0.05-0.01 mbar) und mit einem handelsüblichen Heißluftgebläse erhitzt. Nach dem Abkühlen im Vakuum wurden die Apparaturen mit über Sicapent[®] getrocknetem Argon der Qualitätsstufe 4.6 (99.9996 %) befüllt. Die Abtrennung von Lösungsmitteln und flüchtigen Bestandteilen aus Extrakten und Reaktionslösungen erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei einer Badtemperatur von 40 °C. Von gereinigten Verbindungen wurden verbliebene Lösungsmittelreste im Drehschieberpumpenvakuum (HV, ≤ 0.05 mbar) vollständig entfernt. Dieser Prozess wurde ggf. durch Einfrieren der Produkte mit flüssigem Stickstoff oder Erwärmen auf 40-50 °C unterstützt.

Reagenzien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden, falls nicht anders angegeben, über den Handel in angemessener Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. *n*-BuLi (1.6 M in *n*-Hexan) wurde von der Firma ACROS ORGANICS bezogen und die genaue Konzentration der Lösung wurde vor Gebrauch titrimetrisch bestimmt (s. u.). Lösungsmittel zur Extraktion, Chromatographie und Kristallisation wurden in der Qualität „technisch“ bezogen und vor Gebrauch destilliert. Zur Chromatographie verwendetes Hexan wurde nicht destillativ gereinigt. Die verwendete Erdölfraktion „Petrolether“ (PE) hatte einen Siedebereich von 40-60 °C. Absoluierte Reagenzien und Lösungsmittel wurden, wie im Folgenden beschrieben, getrocknet und unter Argon und ggf. im Dunkeln aufbewahrt.

Acetondimethylacetal: Destillation über CaH₂; **Bromessigsäure-*tert*-butylester:** Vakuumdestillation über CaO; **Diisopropylamin:** Destillation über CaH₂; **Piperidin:** Destillation über CaH₂; **Pyridin:** Destillation über CaH₂; **Triethylamin:** Destillation über CaH₂; **Trimethylorthoformiat:** Destillation über CaH₂; **1,2-Dichlorethan:** Destillation über CaH₂; **DME:** Destillation über Na/Benzophenon; **DMF:** Vakuumdestillation über CaH₂; **Ethylenglykol:** Destillation über Na; **MeOH:** Destillation über Magnesiummethanolat, das *in situ* durch Reaktion mit Magnesiumspänen entsteht; **CH₂Cl₂:** Destillation über CaH₂; **THF:** Vortrocknung über KOH und CaH₂, dann Destillation über Na/Benzophenon, ***n*-Hexan, Toluol:** Destillation über Na.

Herstellung einer TBHP-Lsg. in CH₂Cl₂^[266]

Wässrige 70 %ige TBHP-Lsg. (60 mL) und abs. CH₂Cl₂ (70 mL) werden vorsichtig in einem Scheidetrichter vermischt. Nach Phasentrennung wird die organische Phase in einen mit Siedesteinchen bestückten Rundkolben überführt und 8 h unter Rückfluss erhitzt. Währenddessen wird das noch vorhandene H₂O (ca. 5 mL) mit Hilfe eines inversen Wasserabscheiders entfernt. Das Erhitzen von Peroxid-haltigen Lösungen sollte nur mit äußerster Vorsicht in einem leistungsstarken Abzug und hinter einem Splitterschutz erfolgen. Die abgekühlte Lösung wird über Nacht in einem Glaskolben, der mit Parafilm verschlossen wird, über 3 Å MS (20 g) im Kühlschrank weiter getrocknet und anschließend in PE-Flaschen über 3 Å MS bei 2 °C gelagert. Der Titer der TBHP-Lsg. (ca. 50 % TBHP/CH₂Cl₂ v/v, 5-6 M) wird, wie unten stehend beschrieben, mittels iodometrischer Titration bestimmt.

Iodometrische Titration der TBHP-Lsg.^[266]

Eine 50 mL-Bürette wird mit 50 mL einer 0.1 N Na₂SO₃-Lsg. befüllt. In einem 250 ml-Erlenmeyerkolben werden 25 mL Isopropanol und 1 mL Essigsäure gemischt und mit 10 mL einer kalten, frisch angesetzten Lösung von NaI (20 g) in Isopropanol (100 mL) versetzt. Nach Zugabe von 0.25 mL der wasserfreien TBHP/CH₂Cl₂-Lsg. wird die Mischung 30-45 s mit einem Heißluftgebläse bis zum Refluxieren erhitzt. Wird die Lösung nicht erhitzt, wird bei der anschließenden Titration ein zu niedriger Titerwert erhalten. Nach Verdünnung mit 100 mL H₂O wird die Lösung schnell mit der 0.1 N Na₂SO₃-Maßlösung (25-30 mL) bis zum Verschwinden der gelben Färbung titriert. Durch Zugabe von Stärke kurz vor dem Endpunkt kann dieser besser erkannt werden. Die Konzentration der TBHP-Lsg. berechnet sich wie folgt und sollte 5-6 M betragen:

$$M(\text{TBHP-Lsg.}) = \frac{M(\text{Titant}) \times V(\text{Titant})}{2 \times V(\text{TBHP-Lsg.})}$$

M (TBHP-Lsg.) = Molarität der dargestellten TBHP-Lsg. [mol L⁻¹]

V (TBHP-Lsg.) = eingesetztes Volumen der dargestellten TBHP-Lsg. [mL]

M (Titant) = Molarität der Na₂SO₃-Maßlösung [mol L⁻¹]

V (Titant) = verbrauchtes Volumen der Na₂SO₃-Maßlösung [mL]

Titration der kommerziell erhältlichen *n*-BuLi-Lsg.

Eine Mischung aus 300 mg Menthol und einer Spatelspitze 1,10-Phenanthrolin wird in 4 mL abs. THF gelöst und mit der kommerziell erhältlichen *n*-BuLi-Lsg. titriert. Die Titration ist beendet, wenn ein Farbumschlag von lindgrün nach hellrosa erfolgt. Dabei entspricht der Verbrauch von 3.25 mL Titrant einer Konzentration von 1.6 M. Die exakte Konzentration kann wie folgt aus dem verbrauchten Volumen berechnet werden:

$$c(n\text{-BuLi}) = \frac{m(\text{Menthol})}{M(\text{Menthol}) \times V(n\text{-BuLi})}$$

$c(n\text{-BuLi})$ = Konzentration der *n*-BuLi-Lsg. [mol L^{-1}]

$V(n\text{-BuLi})$ = verbrauchtes Volumen der *n*-BuLi-Lsg. [L]

$m(\text{Menthol})$ = eingewogene Masse an Menthol [g]

$M(\text{Menthol})$ = Molare Masse von Menthol [g mol^{-1}]

Chromatographie

Für die präparative säulenchromatographische Trennung wurde als stationäre Phase Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40-63 μm (230-400 mesh) der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet.

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Aluminium-Kieselgelkarten 60 mit dem Fluoreszenzindikator F_{254} der Firma MERCK verwendet. Das verwendete Laufmittel ist bei jedem Versuch explizit angegeben. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung mit Hilfe des Fluoreszenzindikators bei einer Wellenlänge von 254 nm und/oder durch Eintauchen in eine der unten aufgeführten Färbereagenzien und anschließendem kurzen Erwärmen mit einem Heißluftgebläse.

Ammoniumheptamolybdat/Cer(IV)sulfat-Reagenz: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10.0 g), $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (0.4 g), konz. H_2SO_4 (5.4 mL) in H_2O (180 mL).

Kaliumpermanganat-Reagenz: KMnO_4 (3.0 g), K_2CO_3 (20.0 g), KOH (0.3 g) in H_2O (300 mL).

Ninhydrin-Lsg.: 5 %ig in EtOH.

Analytische RP-HPL-Chromatographie

HPLC-Anlage Accela der Firma THERMO SCIENTIFIC (Pumpe: Accela 600; Autosampler: Accela; Diodenarray-Detektor: Accela PDA; Vorsäule: PHENOMENEX Vydac High Performance Protein and Peptide C18; Säule: THERMO SCIENTIFIC Hypersil Gold, Korngröße 3 µm, 2.1 (ID) × 150 mm). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Eluent A: H₂O/CH₃CN/TFA 95:5:0.1 v/v/v.

Eluent B: H₂O/CH₃CN/TFA 5:95:0.1 v/v/v.

Methode 1:

Flußrate: 1 mL/min

0-3 min	100 % A	0 % B
3-30 min	0 % A	100 % B
30-40 min	100 % A	0 % B

HPLC-Anlage Spectra SYSTEM der Firma THERMO SCIENTIFIC (Controller: SN 4000; Pumpe: P 4000; Autosampler: AS 100; Diodenarray-Detektor: UV 6000 LP; Vorsäule: PHENOMENEX Vydac High Performance Protein and Peptide C18; Säule: PHENOMENEX Jupiter C18, Korngröße 5 µm, 4.6 (ID) × 250 mm). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Methode 2: (Eluenten A und B s.o.)

Flußrate: 0.7 mL/min

0 min	100 % A	0 % B
0-5 min	0 % A	100 % B
5-6 min	100 % A	0 % B
6-6.5 min	100 % A	0 % B

Chirale analytische HPL-Chromatographie: HPLC-Anlage Accela (s.o.).

Säule: DAICEL Chiralpak AD, Korngröße 10 µm, 4.6 (ID) × 250 nm.

Methode 3: Flußrate: 1 mL/min, Hexan/2-Propanol 9:1 v/v.

Präparative RP-HPL-Chromatographie

Präparative HPLC-Analyse LaChrom der Firma MERCK-HITACHI (Controller: D-7000; Pumpe: L7150; UV-Vis-Detektor: L7420; Säule: PHENOMENEX Jupiter C18, Korngröße 10 µm, 21.2 (ID) × 250 mm). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Methode 4: (Eluenten A und B s.o.)

Flussrate: 7.5 mL/min

0-3 min	80 % A	20 % B
3-20 min	50 % A	50 % B
20-35 min	0 % A	100 % B
35-50 min	0 % A	100 % B
50-55 min	80 % A	20 % B

Methode 5: (Eluenten A und B s.o.)

Flussrate: 7.5 mL/min

0-3 min	80 % A	20 % B
3-13 min	0 % A	100 % B
13-35 min	0 % A	100 % B
35-50 min	80 % A	20 % B

HPLC-Anlage SpectraSYSTEM der Firma THERMO SCIENTIFIC (Controller: SN-4000; Pumpe: P4000; UV-Vis-Detektor: UV1000; Säule: PHENOMENEX Jupiter C18, Korngröße 10 µm, 21.2 (ID) × 250 mm). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Methode 6: (Eluenten A und B s.o.)

Flussrate: 7.5 mL/min

0-3 min	70 % A	30 % B
3-20 min	30 % A	70 % B
20-50 min	30 % A	70 % B
50-55 min	70 % A	30 % B

Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die Messung der ^1H -NMR- und ^1H -Breitband-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte an den supraleitenden Multikernresonanzspektrometern Avance III 500, DRX 500 und Avance 600 der Firma BRUKER. Die Aufnahme der Spektren erfolgte standardmäßig bei einer Temperatur von 293 K. Die Spektren wurden anschließend mit dem Programm MESTRENOVA der Firma MESTRELAB RESEARCH SL bearbeitet. Die chemischen Verschiebungen sind als δ -Werte in ppm relativ zu

Tetramethylsilan mit $\delta = 0.00$ ppm angegeben. Das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels wurde dabei als Referenz verwendet.^[267] Die Multiplizitäten werden als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett) und m (Multipllett) bezeichnet. Breiten Signalen wird ein br (*engl.*: broad) vorangestellt. Die Kopplungskonstanten J werden in Hertz (Hz) angegeben. Zur vollständigen Zuordnung der einzelnen Signale wurden zusätzlich 2D-Spektren (COSY, HMQC und HMBC) sowie DEPT-135-Spektren aufgenommen.

Die Signalzuordnung bei Spektren der Cryptophycine bzw. der Fragmentbausteine erfolgte in Relation zur Position in der längsten Kette und ggf. fragmentbezogen (Abbildung 39). Die Kohlenstoffatome werden entlang der jeweils längsten Kette aufsteigend vom höchstoxidierten Kohlenstoffatom mit griechischen Kleinbuchstaben versehen (C^α , C^β , ... C^η). Bei den Fragment-C-Analoga wird die Alkylkette des Substituenten gemäß dieser Kennzeichnung benannt. Zur Unterscheidung der verschiedenen Fragmente werden diese mit den Vorsätzen uA, uB, uC und uD gekennzeichnet.

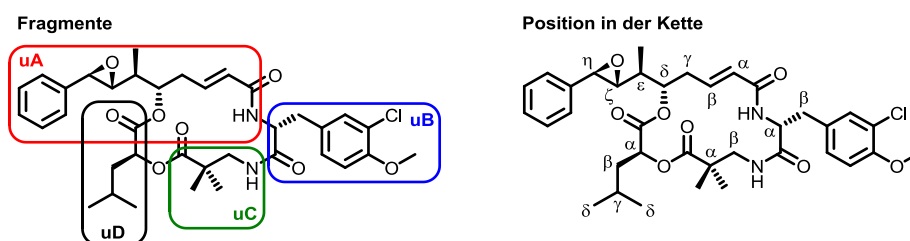


Abbildung 39: Signalzuordnung in der NMR-Spektroskopie am Beispiel von Cryptophycin-52.

Infrarot-Spektroskopie (IR)

Die Messung der IR-Spektren wurde mit Reinsubstanzen an einem Nicolet 380 FT-IR mit ATR-Einheit der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Messwerte sind als Wellenzahl ($\tilde{\nu}$) in cm^{-1} angegeben. Die relativen Intensitäten der charakteristischen Banden werden wie folgt wiedergegeben: vs (*engl.*: very strong), s (*engl.*: strong), m (*engl.*: medium) und w (*engl.*: weak), sowie br (*engl.*: broad).

Fluoreszenzspektroskopie

Zur Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren wurde ein Lumineszenz Spektrometer LS 50 B der Firma PERKIN ELMER verwendet.

Massenspektrometrie

EI- und CI-Massenspektren wurden mit dem Magnetsektorfeld-Massenspektrometer Autospec X mit EBE Geometrie der Firma VACUUM GENERATORS gemessen. Das Gerät ist mit einer Standard-EI- bzw. CI-Quelle ausgestattet. Proben werden über eine Schubstange in Aluminiumtiegel eingeführt. Die Beschleunigungsspannung beträgt 8 kV im EI-Modus und 6 kV im CI-Modus. Ein Ionenfallen-Massenspektrometer mit Standard-ESI-Quelle vom Typ Esquire 3000 der Firma BRUKER DALTONIK diente zur Aufnahme der ESI-Massenspektren. Die Proben werden direkt über eine Spritzenpumpe als Lösung in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ oder Acetonitril eingeführt. Als Zerstäubungs- und Trockengas dient Stickstoff, als Kollisionsgas für MS^n -Experimente wird Helium verwendet. Die Feinmassenbestimmung (HRMS) erfolgte an einem FT-ICR-Massenspektrometer vom Typ APEX III der Firma BRUKER DALTONIK mit externer (Nano-)ESI-Ionenquelle. Als Zerstäubungs- und Trockengas dient auch hier Stickstoff. MALDI-ToF-Massenspektren wurden mit dem Gerät Voyager DE der Firma PE BIOSYSTEMS gemessen (Flugrohrlänge: 1.2 m). Die Messung erfolgt durch Ionisation mittels eines Stickstofflasers (Wellenlänge: 337 nm, Pulsbreite: 3 ns, Wiederholungsrate: 3 Hz) unter Verwendung von 2,4-Dihydroxybenzoesäure als Matrix (Beschleunigungsspannung: 20 kV, Mittelung über 50 Laserschüsse, geräteinterne Standardkalibrierung).

Polarimetrie

Die spezifischen Drehwerte wurden bei Raumtemperatur im angegebenen Lösungsmittel und genannter Konzentration mit einem Digitalpolarimeter vom Typ DIP-360 der Firma JASCO bestimmt. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 589 nm (Natrium-D-Line und Monochromator) durchgeführt. Der spezifische Drehwert lässt sich anhand der folgenden Formel aus dem arithmetischen Mittel von 10 Messungen ermitteln:

$$[\alpha]_D^{RT} = 100 \frac{\alpha}{l \times c}$$

$[\alpha]_D^{RT}$ = spezifischer Drehwert [10^{-1} deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$]

α = arithmetisches Mittel der gemessenen Drehwerte [deg]

l = Küvettenlänge [dm]

c = Konzentration der Probenlsg. [$\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$]

Potentiometrie

Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde das pH-Meter MP 220 mit der pH-Elektrode Inlab 420 genutzt. Beide Geräte entstammen der Firma METTLER TOLEDO.

13 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV-1: Acylierung des Auxiliars

Thionylchlorid (5.0 Äq.) und DMF (3 Tropfen) werden zu einer Lösung der funktionalisierten Carbonsäure in abs. CH_2Cl_2 (0.2 M) gegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch 3 h unter Rückfluss erhitzt wurde, wird auf RT abgekühlt und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wird in abs. Toluol (3 mL/mmol) aufgenommen und coevaporiert. Nach Trocknung i. V. (20 mbar, 40 °C, 30 min) wird das dargestellte Acylchlorid mit abs. THF (2.5 mL/mmol) versetzt und ohne Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

(*R*)- bzw. (*S*)-Oxazolidinon **112** wird in abs. THF (0.2 M) gelöst, auf -78 °C abgekühlt und *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 1.1 Äq.) wird tropfenweise zugegeben. Nach 30 minütigem Rühren bei dieser Temperatur wird das Reaktionsgemisch mit der Lösung des frisch hergestellten Acylchlorids langsam versetzt und es wird über Nacht unter Rühren auf RT erwärmt. Anschließend wird die Reaktionslösung in ges. NaHCO_3 -Lsg. (8 mL/mmol Auxiliar), die sich in einem Scheidetrichter befindet, gegossen. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (4×4 mL/mmol) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit 5 %iger KHSO_4 -Lsg., ges. NaHCO_3 -Lsg. und ges. NaCl -Lsg. (je 3 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt.

AAV-2: Nucleophile Substitution

Zu einer Lösung des Alkylbromids (1.0 Äq.) in Aceton/ H_2O (11 mL/mmol, 2:1 v/v) wird festes NaN_3 (5.0 Äq.) gegeben. Das Gemisch wird 2 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend 3 Tage bei RT gerührt. Dann wird das Aceton i. V. entfernt, der wässrige Rückstand mit H_2O (2 mL/mmol) verdünnt und mit CH_2Cl_2 (3×4 mL/mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit ges. NaCl -Lsg. (4 mL/mmol) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach Filtration durch Kieselgel (4×6 cm) und wiederholtem Nachspülen mit CH_2Cl_2 (4×8 mL/mmol) wird das Lösungsmittel i. V. entfernt. Trocknung des Rückstandes im HV ergibt das entsprechende Alkylazid.

AAV-3: Diastereoselektive Alkylierung

Eine Lösung des Alkylazids (1.00 Äq.) in abs. THF (7 mL/mmol) wird auf -78 °C gekühlt und mit einer Lösung von NaHMDS (2 M in THF, 1.15 Äq.) versetzt. Dieses Gemisch (Lösung A) wird 30-60 min bei -78 °C gerührt.

Gleichzeitig wird getrocknetes NaI (1.15-1.25 Äq.) in abs. THF (1.5 mL/mmol) suspendiert, Bromessigsäure-*tert*-butylester (1.25 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung (Lösung B) 30 min bei RT gerührt, wobei Natriumbromid als feinverteilter Feststoff ausfällt.

Lösung A wird auf $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, Lösung B wird innerhalb von 10 min zugetropft und es wird bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, bis anhand von Dünnschichtchromatographie der vollständige Umsatz nachgewiesen wird. Dann wird ges. NH_4Cl -Lsg. (7.5 mL/mmol) zugegeben und unter Rühren auf RT erwärmt. Anschließend wird bis zum Erreichen einer klaren wässrigen Phase H_2O zugefügt. Nach Zugabe von Et_2O (3 mL/mmol) und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (3×5 mL/mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5 %iger KHSO_4 -Lsg., ges. NaHCO_3 -Lsg. und ges. NaCl -Lsg. (je 5 mL/mmol) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt.

AAV-4: *tert*-Butylesterspaltung des β^2 -Aminosäurevorläufers

Der *tert*-Butylester wird in CH_2Cl_2 (0.1 M) gelöst, mit TFA (10 Äq.) versetzt und der Reaktionsansatz über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i. V. entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Die erhaltene Carbonsäure wird über Nacht im HV getrocknet.

AAV-5: Curtius-Abbau

Zu einer auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung der Carbonsäure in THF (0.1 M) werden nacheinander NEt_3 (1.5 Äq.) und Chlorameisensäureethylester (1.4 Äq.) zugetropft. Nach 15 min wird das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird erneut auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und eine wässrige NaN_3 -Lsg. (2.5 M, 2.8 Äq.) in einer Portion zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch 1 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt wurde, wird das enthaltene THF i. V. entfernt (Badtemperatur $\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), der wässrige Rückstand mit H_2O (10 mL/mmol) verdünnt und mit Et_2O (4×6 mL/mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, i. V. zur Trockne eingengt (Badtemperatur $\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und der so erhaltene Rückstand wird in abs. Toluol (10 mL/mmol) gelöst. Daraufhin wird eine geringe Menge des Toluols i. V. abdestilliert (Badtemperatur $\leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) und unter Argonatmosphäre abs. *tert*-Butanol (3 mL/mmol) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht unter Rückfluss erhitzt und, nach Abkühlen auf RT, wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt.

AAV-6: LiOOH-Abspaltung der β^2 -Aminosäure

Eine Lösung des acylierten Auxiliars in THF (8 mL/mmol) wird im Eisbad gekühlt und anschließend mit Wasserstoffperoxid-Lsg. (30 %ig in H₂O, 4.0 Äq.) und LiOH·H₂O (0.5 M in H₂O, 2.0 Äq.) umgesetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch 4 h bei 0 °C gerührt wurde, werden 5 %ige wässrige Na₂SO₃-Lsg. und ges. NaHCO₃-Lsg. (je 10 mL/mmol) zugegeben und die resultierende Lösung 10 min bei RT gerührt. Anschließend wird das THF i. V. entfernt, der wässrige Rückstand mit H₂O (10 mL/mmol) verdünnt und mit CH₂Cl₂ (4 × 10 mL/mmol) extrahiert. Die wässrige Phase wird durch Zugabe von 5 %iger KHSO₄-Lsg. angesäuert (pH 2-3) und erneut mit CH₂Cl₂ (4 × 20 mL/mmol) extrahiert. Diese organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet, i. V. zur Trockne eingengt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet.

AAV-7: Verknüpfung der Fragmente C und D

Eine Mischung der entsprechend funktionalisierten β^2 -Aminosäure (1.2 Äq.) und DMAP (0.4-0.5 Äq.) wird über Nacht im HV getrocknet und unter Argonatmosphäre mit einer Lösung des Fragment-D-Bausteins (1.0 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (6 mL/mmol) versetzt. Die Lösung wird im Eisbad gekühlt und DCC (1.5 Äq.) als Suspension in abs. CH₂Cl₂ (2 mL/mmol) langsam zugetropft. Nach 1 h wird das Eisbad entfernt und der Reaktionsansatz 7 h bzw. über Nacht unter Rühren auf RT erwärmt. Die erhaltene Suspension wird in ges. NaHCO₃-Lsg. (13 mL/mmol) filtriert und der Filter mit EtOAc (23 mL/mmol) und Et₂O (23 mL/mmol) gewaschen. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit EtOAc/Et₂O (3 × 30 mL/mmol, 1:1 v/v) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. (30 mL/mmol) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie gereinigt.

AAV-8: *tert*-Butylesterspaltung des CD-Segments

Eine auf 0 °C gekühlte Lösung des *tert*-Butylester-geschützten CD-Segments in CH₂Cl₂ (8.5 mL/mmol) wird langsam mit TFA (4.4 mL/mmol) versetzt und die Reaktionsmischung wird 3.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird i. V. entfernt und der Rückstand wird mit Toluol (3 ×) coevaporiert. Nach Trocknung im HV wird die entsprechende Carbonsäure erhalten, die, soweit nicht anders erwähnt, ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt wird.

AAV-9: Verknüpfung der AB- und CD-Segmente

Eine Mischung bestehend aus AB-Segment (1.00 Äq.), CD-Segment (1.00 bzw. 1.50 Äq.) und DMAP (0.25 Äq.) wird für mehrere Stunden im HV getrocknet und unter Argonatmosphäre in abs. THF (10 mL/mmol) gelöst. Nach Zugabe von abs. NEt_3 (2.00 Äq.) wird die Lösung auf 0 °C gekühlt und anschließend langsam mit 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (1.50-2.50 Äq.) versetzt, wobei eine sofortige Trübung der Lösung eintritt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C gerührt und dann die Reaktion durch Zugabe von 10 %iger Zitronensäure-Lsg. (17 mL/mmol) beendet. Es wird auf RT erwärmt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 55 mL/mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (25 mL/mmol) und ges. NaCl -Lsg. (25 mL/mmol) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie oder präparativer RP-HPLC gereinigt.

AAV-10: Makrolactamisierung

Nach Zugabe von abs. Piperidin (5.0 Äq.) bei RT zu einer Lösung des acyclischen Depsipeptids (1.0 Äq.) in abs. DMF (30 mL/mmol) wird der Reaktionsansatz über Nacht in einem abgedunkelten Kolben gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit EtOAc (300 mL/mmol) verdünnt und mit H_2O (400 mL/mmol) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit EtOAc (3 × 200 mL/mmol) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl -Lsg. (100 mL/mmol) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt.

AAV-11: Acetonid-Spaltung

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung des Acetonids (1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (10 mL/mmol) werden nacheinander langsam TFA (10 mL/mmol) und H_2O (5 Tropfen) getropft und das Reaktionsgemisch bei dieser Temperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf kann mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt werden und bei vollständigem Umsatz (2-3 h) wird das Lösungsmittel i. V. entfernt (Badtemperatur = RT). Der Rückstand wird in EtOAc (500 mL/mmol) und ges. NaHCO_3 -Lsg. (750 mL/mmol) gelöst und nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 250 mL/mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Das erhaltene Diol wird im HV getrocknet und ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion verwendet.

AAV-12: Synthese des cyclischen Orthoformiats

Das dargestellte Diol (1.0 Äq.) und PPTS (2.5 Äq.) werden zusammen mit einem Rührmagneten über Nacht im HV getrocknet. In einer Argonschutzatmosphäre werden gleichzeitig unter Rühren abs. CH_2Cl_2 (30 mL/mmol) und abs. Trimethylorthoformiat (10 mL/mmol) zugespritzt. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei RT gerührt und der Umsatz mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie oder analytischer RP-HPLC kontrolliert. Der Reaktionsansatz wird durch Kieselgel (5×2 cm) filtriert, die Filtermasse mit EtOAc/ CH_2Cl_2 (300 mL, 1:1 v/v) nachgewaschen und die vereinigten Filtrate i. V. zur Trockne eingengt. Das erhaltene cyclische Orthoformiat wird nach Trocknung im HV ohne Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

AAV-13: Synthese des Bromhydrinformiats

Das Orthoformiat (1.0 Äq.; Ansatzgröße: 0.03-0.15 mmol) wird in abs. CH_2Cl_2 (15 mL/mmol) gelöst und mit einer 0.5 M-Lösung von Acetylbromid in abs. CH_2Cl_2 (2.5 Äq. Acetylbromid) zur Reaktion gebracht. Die resultierende Lösung wird 4 h bei RT gerührt und der vollständige Reaktionsumsatz mittels Dünnschichtchromatographie oder analytischer RP-HPLC nachgewiesen. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit abs. CH_2Cl_2 (10 mL) verdünnt und dann in eine eiskalte Mischung aus ges. NaHCO_3 -Lsg. und H_2O (50 mL, 1:1 v/v), die zusätzlich festes Eis enthält, gegossen. Der Reaktionskolben wird portionsweise mit abs. CH_2Cl_2 (12 mL) gewaschen und nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3×20 mL) extrahiert, wobei die organischen Phasen direkt über MgSO_4 gesammelt werden. Die vereinigten organischen Phasen werden i. V. zur Trockne eingengt, das erhaltene Bromhydrinformiat im HV getrocknet und im Anschluss ohne Reinigung in der nächsten Reaktionsstufe eingesetzt.

0.5 M Acetylbromid-Lösung: Acetylbromid (dest. über K_2CO_3 , 0.20 ml, 0.332 g, 2.70 mmol) wird in abs. CH_2Cl_2 (4.80 mL) aufgenommen.

AAV-14: Synthese des Epoxids

Das Bromhydrinformiat (1.0 Äq.; Ansatzgröße: 0.03-0.15 mmol) wird unter kräftigem Rühren in einer durch Schütteln homogenisierten 0.2 M K_2CO_3 /Ethylenglykol/DME-Emulsion (25 mL/mmol, 5.0 Äq. K_2CO_3) aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wird für 3 min bei RT gerührt und schnell durch Zugabe von abs. CH_2Cl_2 (20 mL) verdünnt. Die Lösung wird rasch in eine im Scheidetrichter vorliegende, eiskalte 0.5 %ige wässrige KHSO_4 -Lsg. (20 ml), die zusätzlich festes Eis enthält, überführt. Der Reaktionskolben wird portionsweise mit abs. CH_2Cl_2 (20 mL) gespült. Nach Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (2×20 mL) extrahiert,

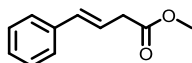
wobei die organischen Phasen direkt über MgSO_4 gesammelt werden. Um eine Hydrolyse des Epoxids in dem sauren, wässrigen Medium zu vermeiden, wird sofort nach Ausbildung einer scharfen Phasengrenze die organische Phase entnommen. Dabei wird eine mögliche Trübung der Lösung toleriert. Nachdem die vereinigten organischen Phasen i. V. zur Trockne eingeeengt wurden, wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

0.2 M K_2CO_3 /Ethylenglykol/DME-Emulsion: Eine Mischung aus K_2CO_3 (207.5 mg, 1.50 mmol) und aktiviertem Molekularsieb 3 Å (350 mg) werden zusammen mit einem Rührmagnet im HV ausgeheizt. Dann wird Ethylenglykol (dest. über Na, 2.50 mL), gefolgt von DME (dest. über Na/Benzophenon, 5.00 mL), zugegeben. Das Gemisch wird so lange kräftig bei RT gerührt, bis das K_2CO_3 sich vollständig gelöst hat. Da die erhaltene Emulsion sich ohne Rühren rasch in zwei Phasen aufteilt, muss sie vor Gebrauch durch Schütteln oder Rühren homogenisiert werden.

14 Synthese von Cryptophycin-52 und -55

14.1 Fragment A

14.1.1 *trans*-1-Phenylcrotonsäuremethylester (**4**)^[46]



$$M = 176.21 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$$

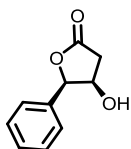
Eine Lösung von (*E*)-4-Phenylbut-3-ensäure (**3**) (16.25 g, 100 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH p. a. (12 mL) wird auf 0 °C gekühlt und dann innerhalb von 30 min mit Thionylchlorid (10.9 mL, 150 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird auf RT erwärmt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Nachdem die Lösung erneut auf 0 °C abgekühlt wurde, wird sie mit H₂O (90 mL) verdünnt und mit Et₂O (5 × 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O (5 × 60 mL) und ges. NaHCO₃-Lsg. (2 × 60 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend wird das Lösungsmittel i. V. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels fraktionierter Destillation im Wasserstrahlvakuum gereinigt und **4** als leicht gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 14.73 mg (83.6 mmol, 83 %).

Sdp.: 140 °C (15 mbar); Lit.: 131 °C (12 mbar).^[167]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 3.24 (dd, $J = 7.1, 1.5$ Hz, 2H, C ^{α} H₂), 3.70 (s, 3H, CH₃), 6.28 (dt, $J = 15.9, 7.1$ Hz, 1H, C ^{β} H), 6.47, (dm, $J = 15.9$ Hz, 1H, C ^{γ} H), 7.22 (m, 1H, C^{*ar*}H^{*para*}), 7.26-7.31 (m, 2H, C^{*ar*}H^{*meta*}), 7.33-7.38 (m, 2H, C^{*ar*}H^{*ortho*}).

14.1.2 (4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-phenyldihydrofuran-2-on (**5**)^[47,167]



$$M = 178.18 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$$

Nacheinander werden K₂OsO₄·2H₂O (0.28 mg, 0.818 mmol, 1 mol%), K₃[Fe(CN)₆] (67.27 g, 204.2 mmol, 2.5 Äq.) und K₂CO₃ (33.88 g, 245.3 mmol, 3.0 Äq.) in H₂O (360 mL) gelöst. Um eine vollständige Durchmischung zu gewährleisten wird ein KPG-Rührer verwendet. Nach Zugabe von *tert*-Butanol wird das Reaktionsgemisch mit (DHQD)₂-PHAL (0.64 g, 0.818 mmol, 1 mol%) und Methansulfonamid (7.77 g, 81.75 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Anschließend wird der Ansatz auf 0 °C abgekühlt, *trans*-1-Phenylcrotonsäuremethylester (**4**) (14.41 g, 81.75 mmol, 1.0 Äq.) hinzugefügt und 44 h bei dieser Temperatur kräftig gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie wird auf

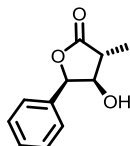
vollständigen Umsatz geprüft und dann die Reaktion durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (206 g, 817 mmol, 10.0 Äq.) und H_2O (160 mL) beendet. Das Eisbad wird entfernt und das Gemisch innerhalb von 2 h auf RT erwärmt, wobei alle Feststoffe gelöst werden. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase wiederholt mit Et_2O (4×120 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H_2O und ges. NaCl -Lsg. (je 120 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt (Badtemperatur = 50°C). Der Rückstand wird in EtOAc (120 mL) aufgenommen, durch Kieselgel (2×3 cm) filtriert und der Filterkuchen portionsweise mit EtOAc (500 mL) gewaschen. Die klaren Filtrate werden vereinigt und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt (Badtemperatur = 50°C). Der gelbe Rückstand wird im HV getrocknet, anschließend aus EtOAc/Hexan (18 mL, 3:1 v/v) umkristallisiert und **5** wird in Form hell gelber Kristalle isoliert.

Ausbeute: 9.74 g (54.72 mmol, 67 %).

$[\alpha]_D^{RT} = -37.3$ ($c = 1.52$ in MeOH); Lit.: -37.7 ($c = 0.92$ in MeOH).^[167]

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.58 (m, 1H, OH), 2.71 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^A\text{H}^B$), 2.88 (dd, $J = 17.6, 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^A\text{H}^B$), 4.61 (m, 1H, C^βH), 5.50 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, C^γH), 7.35-7.46 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

14.1.3 (3R,4R,5R)-4-Hydroxy-3-methyl-5-phenyldihydrofuran-2-on (6)^[47,167]



$M = 192.21 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$

Diisopropylamin (9.20 ml, 64.58 mmol, 2.5 Äq.) wird in abs. THF (150 mL) aufgenommen, auf -78°C gekühlt und tropfenweise mit $n\text{-BuLi}$ (1.6 M in Hexan, 40.30 mL, 64.58 mmol, 2.5 Äq.) versetzt. Die Lösung wird 15 min bei dieser Temperatur und nach Entfernung des Kältebads weitere 30 min gerührt. Die dargestellte LDA-Lösung wird erneut auf -78°C gekühlt und innerhalb von 90 min wird eine Lösung von **5** (4.60 g, 25.83 mmol, 1.0 Äq.) in abs. THF (110 mL) zugetropft. Nachdem das gelbe Reaktionsgemisch 45 min gerührt wurde, wird es auf -90°C abgekühlt und mit MeI , gelöst in abs. THF (80 mL), innerhalb von 150 min versetzt. Nach beendeter Zugabe wird der Ansatz 15 h bei -78°C gerührt, dann AcOH (3.6 mL) in THF (5.4 mL) zugegeben und auf RT erwärmt. Das Lösungsmittel wird größtenteils i. V. entfernt und der pinkfarbene Rückstand wird in H_2O (200 mL) und Et_2O (200 mL) aufgenommen. Nach kräftiger Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (4×150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit 5 %iger KHSO_4 -Lsg. und ges. NaCl -Lsg. (je 50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet

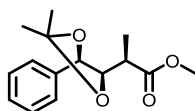
und i. V. zur Trockne eingengt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Hexan/EtOAc = 7/3 → 1/1) ergibt **6** als honigfarbenes Öl.

Ausbeute: 3.62 g (18.82 mmol, 73 %).

$R_f = 0.50$ (Hexan/EtOAc = 1/1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.68 (s, 1H, OH), 2.72 (dq, $J = 7.7, 3.0$ Hz, 1H, C^αH), 4.27 (m, 1H, C^βH), 5.59 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, C^γH), 7.31-7.46 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

14.1.4 (*R*)-2-[(4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]propionsäuremethylester (**7**)^[47,167]



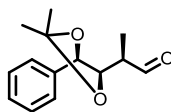
$M = 264.32 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$

Zu einer Lösung von **6** (3.10 g, 16.13 mmol, 1.0 Äq.) in abs. MeOH (5.3 mL) und abs. Acetondimethylacetal (19.9 mL) wird Amberlyst-15[®] zugegeben und die Reaktionsmischung 4 d bei RT gerührt. Anschließend wird die dunkelbraune Lösung durch Celite[®] filtriert und die Filtermasse mit Hexan (400 mL) gespült. Die vereinigten Filtrate werden mit ges. NaCl-Lsg. (50 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nachdem das Rohprodukt i. V. zur Trockne eingengt wurde, wird es durch Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 8/1) gereinigt und **7** als gelbes Öl, das nach Trocknung im HV bei RT kristallisiert, isoliert.

Ausbeute: 3.46 g (13.11 mmol, 81 %).

$R_f = 0.26$ (Hexan/EtOAc = 1/1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{C}^\alpha\text{HCH}_3$), 1.48 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.56 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.68 (m, 1H, C^αH), 3.40 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.11 (dd, $J = 8.4, 6.0$ Hz, 1H, C^βH), 4.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C^γH), 7.28-7.39 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

14.1.5 (R)-2-[(4R,5R)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]propanal (8**)**^[47,167]


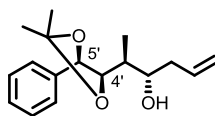
$$M = 234.29 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3$$

Eine auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlte Lösung von **7** (1.77 g, 6.70 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (40 mL) wird tropfenweise mit DIBAL-H (1.2 M in Toluol, 15.4 mL, 15.40 mmol, 2.3 Äq.) versetzt und 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach Abkühlung auf $-100\text{ }^\circ\text{C}$ wird die Reaktion durch Zugabe von abs. MeOH (8.5 mL) beendet und dann auf RT erwärmt. Die Lösung wird mit 1 M AcOH und Hexan (je 150 mL) verdünnt und anschließend die wässrige Phase mit Hexan ($4 \times 150\text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit 1 M AcOH und ges. NaCl-Lsg. (je 80 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nachdem die organische Phase durch Celite[®] filtriert wurde, wird das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der erhaltene Aldehyd **8** wird nach Trocknung im HV ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

Ausbeute: 1.49 g (95 % d. Th.).

$R_f = 0.30$ (Hexan/EtOAc = 8/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.24 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 3H, $\text{C}^{\alpha}\text{HCH}_3$), 1.49 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.58 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.54 (dq, $J = 7.0, 3.2\text{ Hz}$, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.24 (dd, $J = 8.8, 3.2\text{ Hz}$, 1H, C^{β}H), 4.77 (d, $J = 8.8\text{ Hz}$, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$), 7.30-7.39 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 9.62 (s, 1H, CHO).

14.1.6 (2S,3S)-2-[(4R,5R)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]-hex-5-en-3-ol (9**)**^[47,167]


$$M = 276.37 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$$

$\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1.66 g, 6.41 mmol, 1.5 Äq.) wird in abs. CH_2Cl_2 (6.4 mL) suspendiert, auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und tropfenweise mit einer Lösung des frisch dargestellten Aldehyds **8** (0.98 g, 4.18 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (4.0 mL) versetzt. Die Mischung wird 15 min bei dieser Temperatur gerührt und dann wird Allyl-tri-*n*-butylzinn (1.96 mL, 6.39 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in abs. CH_2Cl_2 (13.0 mL) langsam zutropft. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und dann in Et_2O und H_2O (je 200 mL) aufgenommen. Nachdem auf RT erwärmt wurde, wird die organische Phase mit Et_2O ($3 \times 200\text{ mL}$) extrahiert und anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. (500 mL) gewaschen. Nach Trocknung über MgSO_4 und Entfernung des Lösungsmittels i. V. wird der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc = 5/1) gereinigt. Der Homoallylalkohol **9** wird daraufhin nach Trocknung im HV als hellgelbes Öl erhalten.

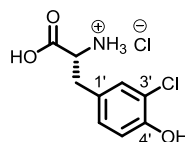
Ausbeute: 855 mg (3.09 mmol, 74 %).

$R_f = 0.26$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.07 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.50 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.57 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.78 (ddq, $J = 7.1, 5.8, 2.2$ Hz, 1H, CHCH_3), 2.13 (m, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CH}=\text{CH}_2$), 2.26 (m, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CH}=\text{CH}_2$), 2.34 (br m, 1H, OH), 3.60 (m, 1H, CHOH), 4.11 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H, C^4H), 4.78 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, C^5H), 4.94-5.04 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.71 (dddd, $J = 17.2, 10.3, 7.2, 7.1$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.28-7.39 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

14.2 Fragment B

14.2.1 3-Chlor-D-Tyrosinhydrochlorid (**11**)^[46]

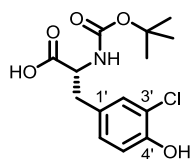


$$M = 252.09 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_3$$

Eine Suspension von D-Tyrosin (**10**) (10.00 g, 55.20 mmol, 1.0 Äq.) in AcOH p.a. (100 mL) wird 10 min im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend im Wasserbad (ca. 15 °C) gekühlt, wobei die Durchmischung mit einem KPG-Rührer erfolgt. Innerhalb von 30 min wird eine Lösung von Sulfurylchlorid (5.4 mL, 66.72 mmol, 1.2 Äq.) in AcOH p.a. (30 mL) zugetropft. Zunächst wird eine klare Lösung erhalten, die dann eintrübt und schließlich eine dickflüssige Suspension ergibt. Nachdem das Reaktionsgemisch 90 min bei RT gerührt wurde, wird Et_2O (100 mL) zugegeben und das Gemisch weitere 15 min gerührt. Der weiße Feststoff wird abfiltriert, mit AcOH/ Et_2O (200 mL, 1:2 v/v) und Et_2O (200 mL) gewaschen und anschließend über Nacht im HV getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt (13.17 g) besteht aus 12.10 g (87 %) Monochlorierungsprodukt **11**, 0.51 g (3 %) Dichlorierungsprodukt **11a** und 1.08 g (0.4 Äq.) AcOH.

Spektroskopische Daten von **11**:

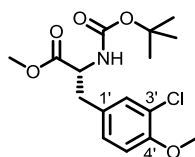
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 3.04 (dd, $J = 14.8, 7.6$ Hz, 1H, $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.17 (dd, $J = 14.8, 5.6$ Hz, 1H, $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 4.20 (dd, $J = 7.5, 5.6$ Hz, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, C^5H), 7.02 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, C^6H), 7.22 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, C^2H).

14.2.2 (R)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-hydroxyphenyl)-propionsäure (12)^[46]

$$M = 315.75 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClNO}_5$$

3-Chlor-D-Tyrosinhydrochlorid **11** (13.15 g, 48.00 mmol; als Gemisch mit 0.51 [1.78 mmol] Dichlorierungsprodukt **11a** und 1.08 g [17.92 mmol] AcOH) wird in 1 N NaOH (130 ml) gelöst. Nach Zugabe von *tert*-Butanol (75 mL) und Boc₂O (13.20 mL, 57.38 mmol, 1.2 Äq.) bei RT wird die Reaktionsmischung über Nacht bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit festem NaOH versetzt, bis ein pH-Wert von pH ≥ 10 erreicht ist, und dann mit Hexan (3 × 75 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem KHSO₄ angesäuert (pH = 2-3) und erneut mit EtOAc (3 × 130 mL) extrahiert. Die vereinigten EtOAc-Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Trocknung im HV ergibt das Rohprodukt **12** (16.91 g, quant. bezogen auf Mono- und Dichlorierungsprodukt) als einen farblosen, erstarrter Schaum, der ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt wird.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, Rotamere): δ [ppm] = 1.35/1.43 (2 s, 9H, C(CH₃)₂), 2.98 (m, 1H, C^βH^AH^B), 3.12 (m, 1H, C^βH^AH^B), 4.56 (m, 1H, C^αH), 5.04 (m, 0.7H, NH), 6.37 (m, 0.3H, NH), 6.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, C^{5'}H), 6.99 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, C^{6'}H), 7.15 (br m, 1H, C^{2'}H).

14.2.3 (R)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäure-methyl-ester (13)^[46]

$$M = 343.80 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClNO}_5$$

Zu einer Lösung von **12** (16.90 g Rohprodukt; als Gemisch aus Monochlorierungsprodukt [15.16 g, 48.00 mmol] und Dichlorierungsprodukt [0.63 g, 1.79 mmol]) in Aceton p.a. (500 mL) werden nacheinander K₂CO₃ (30.34 g, 220.16 mmol, 4.4 Äq.) und Dimethylsulfat (11.9 mL, 125.10 mmol, 2.5 Äq.) gegeben. Das Gemisch wird daraufhin 4 h unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlen auf RT wird das Aceton am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in EtOAc und H₂O (je 570 mL) aufgenommen. Nach kräftiger Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit EtOAc (2 × 275 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie

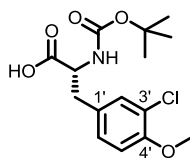
(Hexan/EtOAc = 4/1) gereinigt, wobei das dichlorierte Nebenprodukt als Vorfraktion vollständig abgetrennt werden kann. Der Methylester **13** wird nach Trocknung im HV als hellrotes Öl isoliert.

Ausbeute: 15.02 g (43.69 mmol, 91 %).

$R_f = 0.38$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.96 (dd, $J = 14.0, 5.9$ Hz, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.06 (dd, $J = 14.0, 5.7$ Hz, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.73 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 4.53 (m, 1H, C^αH), 4.99 (m, 1H, NH), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C^5H), 6.99 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, C^6H), 7.13 (br m, 1H, C^2H).

14.2.4 (*R*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäure (**14**)^[46]



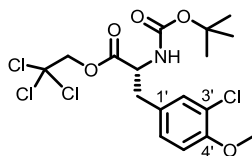
$M = 329.78 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{ClNO}_5$

13 (13.20 g, 38.39 mmol, 1.0 Äq.) wird in MeOH p.a. und THF p.a. (je 96 mL) aufgenommen und dann eine Lösung von $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2.43 g, 57.85 mmol, 1.5 Äq.) in H_2O (96 mL) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei RT gerührt und anschließend wird das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der wässrige Rückstand wird mit H_2O (96 mL) verdünnt und mit CH_2Cl_2 ($2 \times 40 \text{ mL}$) extrahiert. Die wässrige Phase wird durch Zugabe von festem KHSO_4 angesäuert ($\text{pH} = 2\text{-}3$) und erneut mit CH_2Cl_2 ($5 \times 145 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte der sauren Lösung werden über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Die Trocknung des Rückstandes im HV ergibt **14** als farblosen, erstarrten Schaum, der ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktionsstufe eingesetzt wird.

Ausbeute: 10.88 g (32.99 mmol, 86 %).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS, Rotamere): δ [ppm] = 1.32/1.43 (2 s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.87 (m, 0.3H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.00 (ddm, $J = 14.0, 6.1$ Hz, 0.7H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.14 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 4.38 (m, 0.3H, C^αH), 4.56 (m, 0.7H, C^αH), 4.97 (m, 0.7H, NH), 6.51 (m, 0.3H, NH), 6.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, C^5H), 7.05 (dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 1H, C^6H), 7.20 (br m, 1H, C^2H), 7.61 (br s, 1H, CO_2H).

14.2.5 (*R*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäure-2,2,2-trichlorethylester (**15**)^[46]



$$M = 461.16 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{Cl}_4\text{NO}_5$$

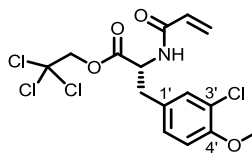
Eine Lösung von **14** (10.69 g, 32.42 mmol, 1.00 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (155 mL) wird bei RT tropfenweise mit abs. Pyridin (5.2 mL, 64.84 mmol, 2.00 Äq.), gefolgt von 2,2,2-Trichlorethanol (4.7 mL, 48.76 mmol, 1.50 Äq.), versetzt. Das Reaktionsgemisch wird auf 0°C gekühlt, eine Lösung von DCC (7.03 g, 34.05 mmol, 1.05 Äq.) in CH_2Cl_2 (9 mL) zugegeben und die resultierende Lösung über Nacht bei 0°C gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und mit CH_2Cl_2 (4×70 mL) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit ges. NaCl-Lsg. (85 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingedunstet. Nach Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 4/1) und Trocknung im HV wird **15** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 14.46 g (24.85 mmol, 77 %).

$R_f = 0.32$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.02 (ddm, $J = 14.1, 6.6$ Hz, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.16 (ddm, $J = 14.2, 5.6$ Hz, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 4.66 (m, 1H, C^αH), 4.71 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CCl}_3$), 4.82 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CCl}_3$), 4.94 (m, 1H, NH), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C^5H), 7.05 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, C^6H), 7.20 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, C^2H).

14.2.6 (*R*)-2-Acryloylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäure-2,2,2-trichlorethylester (**16**)^[46]



$$M = 415.10 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Cl}_4\text{NO}_4$$

Eine Lösung des Trichlorethylesters **15** (11.16 g, 24.16 mmol, 1.0 Äq.) in TFA (24 mL) wird 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Toluol (150 mL) wird das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Rückstand wird in CH_2Cl_2 (300 mL) aufgenommen. Die organische Lösung wird mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (2×50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingedunstet. Der erhaltene Rückstand wird 2 h im HV getrocknet, dann unter Argonatmosphäre in abs. CH_2Cl_2 (150 mL) gelöst und im Eisbad gekühlt. Nacheinander werden langsam NEt_3 (10.0 mL, 72.06 mmol,

3.0 Äq.) und Acryloylchlorid (3.0 mL, 36.92 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung wird über Nacht bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die bräunliche Lösung in eine Mischung aus EtOAc (750 mL) und wässriger 5 %iger KHSO₄ (150 mL) gegossen. Nach Phasentrennung wird die organische Phase mit ges. NaHCO₃-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. (je 150 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan/EtOAc = 2/1 → 1/1) ergibt **16** als amorphem, hellbraunen Feststoff.

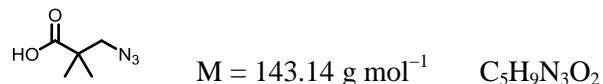
Ausbeute: 5.66 g (13.64 mmol, 56 %).

$R_f = 0.28$ (Hexan/EtOAc = 2/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 3.13 (dd, $J = 14.3, 6.0$ Hz, 1H, C ^{β} H^AH^B), 3.22 (dd, $J = 14.2, 5.8$ Hz, 1H, C ^{β} H^AH^B), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 4.74 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, CH^AH^BCCl₃), 4.80 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, CH^AH^BCCl₃), 5.08 (ddd, $J = 7.6, 6.0, 5.9$ Hz, 1H, C ^{α} H), 5.71 (dd, $J = 10.2, 1.3$ Hz, 1H, CH=CH₂^{trans}), 6.05 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH), 6.12 (dd, $J = 17.0, 10.4$ Hz, 1H, CH=CH₂), 6.31 (dd, $J = 17.0, 1.3$ Hz, 1H, CH=CH₂^{cis}), 6.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C^{5'}H), 7.04 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, C^{6'}H), 7.19 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, C^{2'}H).

14.3 Fragment C

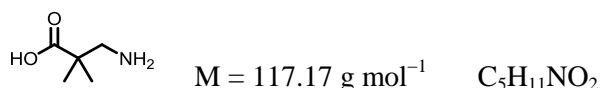
14.3.1 3-Azido-2,2-dimethylpropionsäure (**18**)^[46]



Chlorpivalinsäure (**17**) (3.03 g, 21.17 mmol, 1.0 Äq.) und NaN₃ (4.77 g, 73.34 mmol, 3.5 Äq.) werden in H₂O (45 mL) aufgenommen und das Reaktionsgemisch wird 3 d unter Rückfluss erhitzt. Nachdem auf RT abgekühlt wurde, wird die Lösung mit konz. HCl angesäuert und dann mit Et₂O (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Nach Trocknung im HV wird **18** als analysenreines, hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 2.97 g (20.75 mmol, 94 %).

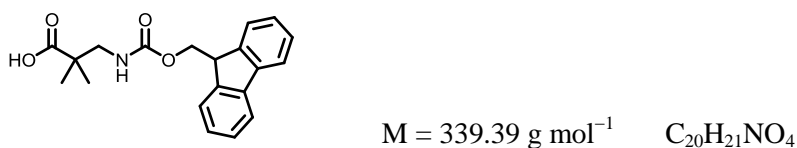
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.26 (s, 6H, C(CH₃)₂), 3.44 (s, 2H, CH₂), 10.73 (br s, 1H, CO₂H).

14.3.2 3-Amino-2,2-dimethylpropionsäure (19)^[268]

Analog zu einer Vorschrift von MA *et al.* wird Azidopivalinsäure (**18**) (1.11 g, 7.77 mmol) in MeOH p.a. (150 mL) vorgelegt und dann Pd/C (0.77 g) zugegeben. Das Gemisch wird unter Wasserstoffatmosphäre über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit H₂O (150 mL) versetzt. Nachdem weitere 15 min bei RT gerührt wurde, wird die Lösung über Celite[®] filtriert, die Filtermasse mit MeOH gewaschen und die vereinigten Filtrate werden am Rotationsverdampfer eingengt. Coevaporation mit Toluol und Trocknung im HV ergibt **19** als hellbraunen Feststoff. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[269] überein.

Ausbeute: 0.882 g (7.53 mmol, 97 %).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1.15 (s, 6H, C(CH₃)₂), 2.97 (s, 2H, CH₂).

14.3.3 3-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-2,2-dimethylpropionsäure (20)

Die β -Aminosäure **19** (0.87 g, 7.44 mmol, 1.0 Äq.) wird in H₂O (73 mL) gelöst und NaHCO₃ (1.88 g, 22.32 mmol, 3.0 Äq.) zugegeben. Die Mischung wird kurze Zeit bei RT gerührt und dann mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid (2.76 g, 8.18 mmol, 1.1 Äq.) und Aceton (73 mL) versetzt. Die trübe Suspension wird 4 h bei RT gerührt und anschließend das Aceton i. V. entfernt. Der wässrige Rückstand wird in ges. NaHCO₃-Lsg. (225 mL) aufgenommen und mit Et₂O (3 \times 200 mL) extrahiert. Daraufhin wird die wässrige Phase mit festem KHSO₄ angesäuert (pH = 3) und erneut mit Et₂O (3 \times 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Nach Trocknung im HV wird **20** als farbloser, kristalliner Feststoff isoliert.

Ausbeute: 2.02 g (5.96 mmol, 80 %).

R_f = 0.36 (Hexan/EtOAc = 2/1 + 1 % AcOH).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, Rotamere): δ [ppm] = 1.04/1.24 (s, 6H, C(CH₃)₂), 3.12 (d, *J* = 6.2 Hz, 0.5H, CH₂NH), 3.34 (d, *J* = 6.2 Hz, 1.5H, CH₂NH), 4.21 (m, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.40 (d, *J* = 7.0 Hz, 1.5H, CHCH₂), 4.51 (d, *J* = 6.0 Hz, 0.5H, CHCH₂), 5.30 (t, *J* = 6.6 Hz, 0.7H, NH), 6.31 (t, *J* =

6.6 Hz, 0.3H, NH), 7.27-7.34 (m, 2H, C^{ar}H), 7.36-7.41 (m, 2H, C^{ar}H), 7.53-7.61 (m, 2H, C^{ar}H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, C^{ar}H), 11.02 (br s, 1H, CO₂H).

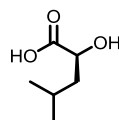
¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS, Rotamere): δ [ppm] = 22.7/22.9 (C(CH₃)₂), 43.4/43.5 (C(CH₃)₂), 47.1/47.2 (CHCH₂, Fmoc), 48.4/49.0 (CH₂NH), 66.8/67.2 (CHCH₂, Fmoc), 119.9, 124.7/125.0, 127.0/127.1, 127.6/127.7 (C^{ar}H), 141.3/141.4, 143.7/143.8 (C^{ar}), 156.8/157.8 (NHCO₂), 181.7/183.1 (CO₂H).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3276 br w, 2965 br w, 1726 s, 1708 s, 1655 vs, 1421 m, 1335 m, 1176 m, 1052 s, 931 m, 866 w, 736 s, 727 s.

MS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 362.13629$	362.13628	[C ₂₀ H ₂₁ NO ₄ +Na] ⁺

14.4 Fragment D

14.4.1 (S)-2-Hydroxy-4-methylpentansäure (L-Leucinsäure) (**129**)^[46]



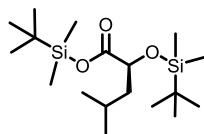
$M = 132.16 \text{ g mol}^{-1}$ C₆H₁₂O₃

Eine Lösung von L-Leucin (**21**) (16.00 g, 122 mmol, 1.0 Äq.) in 0.5 M H₂SO₄ (250 mL) wird auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit einer Lösung von NaNO₂ (12.62 g, 183 mmol, 1.5 Äq.) in H₂O versetzt. Die dabei entstehenden nitrosen Gase werden abgeleitet. Die Mischung wird 1 h bei 0 °C gerührt, dann das Eisbad entfernt und über Nacht auf RT erwärmt. Die wässrige Reaktionslösung wird mit Et₂O (5 × 200 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisation aus Hexan (50 mL) und Et₂O (3 mL) wird L-Leucinsäure (**129**) als farblose, nadelförmige Kristalle erhalten.

Ausbeute: 8.72 g (66.00 mmol, 54 %).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, C(CH₃)₂), 1.61-1.65 (m, 2H, C^βH₂), 1.91 (m, 1H, C^γH₂), 4.30 (dd, $J = 8.3, 5.1$ Hz, 1H, C^αH).

14.4.2 (S)-tert-Butyldimethylsilyl 2-(tert-butyldimethylsilyloxy)-4-methylpentanoat (**130**)^[46]



$$M = 360.68 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{Si}_2$$

L-Leucinsäure (**129**) (8.46 g, 64.0 mmol, 1.0 Äq.) und TBS-Cl (20.40 g, 135.0 mmol, 2.1 Äq.) werden nacheinander in abs. DMF (40 mL) gelöst. Bei der anschließenden Zugabe von Imidazol (18.00 g, 264.4 mmol, 4.1 Äq.) bei RT erwärmt sich die Lösung stark und es kommt zur Ausbildung eines Zweiphasengemisches. Dieses Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt und dann in H₂O (450 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Hexan (5 × 200 mL) extrahiert, die organischen Extrakte mit ges. NaHCO₃-Lsg. (120 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Destillation i. V. gereinigt. **130** wird als klares, farbloses Öl isoliert.

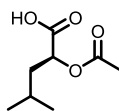
Ausbeute: 21.35 g (59.19 mmol, 90 %).

Sdp.: 85 °C (0.2 mbar).

$[\alpha]_D^{RT} = -33.9$ (c = 1.50 in CHCl₃); Lit.: -33.9 (c = 1.48 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.04 (s, 3H, SiCH₃, Ether), 0.08 (s, 3H, SiCH₃, Ether), 0.26 (s, 3H, SiCH₃, Ether), 0.27 (s, 3H, SiCH₃, Ether), 0.88-0.95 (m, 24H, CH(CH₃)₂ und 2 × SiC(CH₃)₃), 1.47 (ddd, $J = 13.4, 8.8, 4.3$ Hz, 1H, C^βH^AH^B), 1.62 (ddd, $J = 13.5, 8.6, 5.0$ Hz, 1H, C^βH^AH^B), 1.79 (m, 1H, C^γH), 4.15 (dd, $J = 8.6, 4.3$ Hz, 1H, C^αH).

14.4.3 (S)-2-Acetoxy-4-methylpentansäure (**22**)^[47]



$$M = 174.19 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$$

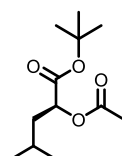
Eine auf 0 °C gekühlte Suspension von L-Leucin (**21**) (26.24 g, 0.20 mol, 1.0 Äq.) in AcOH p.a. (600 mL) wird portionsweise mit NaNO₂ (27.60 g, 0.40 mol, 2.0 Äq.) versetzt. Die dabei entstehenden nitrosen Gase werden abgeleitet. Das Gemisch wird 3 h bei RT gerührt und anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von festem Na₂SO₃·7H₂O gestoppt. Danach wird das Lösungsmittel i. V. entfernt (Badtemperatur = 50 °C), während wiederholt mit Toluol (4 × 100 mL) coevaporiert wird. Der Rückstand wird in H₂O (400 mL) aufgenommen, mit festem KHSO₄ angesäuert (pH = 2) und mit Et₂O (3 × 400 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5 %iger KHSO₄-Lsg.

(2 × 100 mL) und ges. NaCl-Lsg. (80 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird abermals mit Toluol (3 × 20 mL) coevaporiert und **22** wird als gelbliche Flüssigkeit erhalten. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

Ausbeute: 19.13 g (55 % d. Th.).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.94 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, C(CH₃)₂), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, C(CH₃)₂), 1.64-1.86 (m, 3H, C^βH₂ und C^γH), 2.14 (s, 3H, C(O)CH₃), 5.04 (dd, *J* = 9.5, 4.1 Hz, 1H, C^αH), 8.51 (br s, CO₂H).

14.4.4 (*S*)-*tert*-Butyl-2-acetoxy-4-methylpentanoat (**23**)^[47]



M = 230.30 g mol⁻¹ C₁₂H₂₂O₄

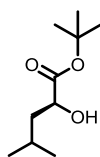
Eine Mischung bestehend aus **22** (19.13 g, 83.07 mmol, 1.0 Äq.), *tert*-Butanol (16 mL, 167.50 mmol, 2.0 Äq.) und DMAP (3.34 g, 27.34 mmol, 0.3 Äq.) gelöst in abs. CH₂Cl₂ (210 mL), wird auf 0 °C gekühlt und innerhalb von 45 min mit einer Lösung von DCC (29.39 g, 142.45 mmol, 1.7 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (96 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht unter Erwärmen auf RT gerührt. Der Niederschlag wird über Celite[®] abgesaugt und die Filtermasse mit H₂O (150 mL) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden über MgSO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der ausgefallene Harnstoff wird anschließend abfiltriert und das Rohprodukt durch Destillation i. V. gereinigt. (*S*)-*tert*-Butyl-2-acetoxy-4-methylpentanoat (**23**) wird als farblose Flüssigkeit isoliert.

Ausbeute: 16.20 g (70.34 mmol, 64 %).

Sdp.: 110 °C (11-14 mbar); Lit.: 103 °C (11 mbar).^[47]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.93 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, C(CH₃)₂), 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, C(CH₃)₂), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.56-1.80 (m, 3H, C^βH₂ und C^γH), 2.12 (s, 3H, C(O)CH₃), 4.89 (dd, *J* = 9.3, 4.2 Hz, 1H, C^αH).

14.4.5 (*S*)-*tert*-Butyl-2-hydroxy-4-methylpentanoat (**24**)^[47]



$$M = 188.26 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3$$

23 (16.88 g, 73.3 mmol, 1.0 Äq.) wird in MeOH p.a. (85 mL) und H₂O (120 mL) aufgenommen und bei RT mit K₂CO₃ (30.28 g, 219 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt wurde, wird das MeOH am Rotationsverdampfer entfernt (Badtemperatur = 50 °C) und der wässrige Rückstand mit CH₂Cl₂ (3 × 170 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet, i. V. zur Trockne eingengt und der Rückstand wird destillativ i. V. gereinigt. Dabei wird (*S*)-*tert*-Butyl-2-hydroxy-4-methylpentanoat (**24**) als klare, farblose Flüssigkeit erhalten.

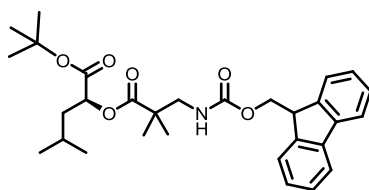
Ausbeute: 8.04 g (42.71 mmol, 58 %).

Sdp.: 90 °C (22 mbar).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.94 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H, C(CH₃)₂), 0.96 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H, C(CH₃)₂), 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.44-1.54 (m, 2H, C ^{β} H^AH^B oder C ^{γ} H und C ^{β} H^AH^B), 1.88 (m, 1H, C ^{β} H^AH^B oder C ^{γ} H), 2.72 (br s, 1H, OH), 4.06 (dd, $J = 7.8, 5.5$ Hz, 1H, C ^{α} H).

14.5 Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation

14.5.1 Fmoc-uC-uD-O^tBu (**25**)



$$M = 509.63 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_6$$

Die Estersynthese erfolgt gemäß AAV-7, ausgehend von Alkohol **24** (180 mg, 0.95 mmol, 1.0 Äq.) und Carbonsäure **20** (387 mg, 1.14 mmol, 1.2 Äq.). Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend wie unter AAV-7 beschrieben aufgearbeitet. Nach Flash-Chromatographie, Coevaporation mit Toluol und Trocknung im HV wird **25** als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 283 mg (0.55 mmol, 58 %).

R_f = 0.57 (Hexan/EtOAc = 4/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -12.2$ ($c = 1.00$ in CHCl_3).

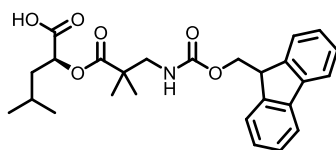
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 0.91 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 1.17 (s, 3H, uC-C(CH_3) $_2$), 1.19 (s, 3H, uC-C(CH_3) $_2$), 1.44 (s, 9H, uD-C(CH_3) $_3$), 1.59 (m, 1H, uD- $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 1.66-1.78 (m, 2H, uD- $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$ und uD- C^γH), 3.35 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, uC- CH_2NH), 4.14 (dd, $J = 7.6, 7.5$ Hz, 1H, CHCH_2 , Fmoc), 4.23 (dd, $J = 10.4, 7.6$ Hz, 1H, CHCH^AH^B , Fmoc), 4.31 (dd, $J = 10.4, 7.5$ Hz, 1H, CHCH^AH^B , Fmoc), 4.93 (dd, $J = 9.6, 3.9$ Hz, 1H, uD- C^αH), 6.00 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, NH), 7.19-7.24 (m, 2H, C^{ar}H , Fmoc), 7.29-7.34 (m, 2H, C^{ar}H , Fmoc), 7.55-7.61 (m, 2H, C^{ar}H , Fmoc), 7.68 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, C^{ar}H , Fmoc).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 21.6 (uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 22.2 (uC-C(CH_3) $_2$), 23.1 (uC-C(CH_3) $_2$ und uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 24.9 (uD- C^γH), 28.0 (uD-C(CH_3) $_3$), 39.6 (uD- C^βH_2), 44.1 (uC-C(CH_3) $_2$), 47.3 (CHCH_2 , Fmoc), 49.5 (uC- CH_2NH), 66.8 (CHCH_2 , Fmoc), 71.3 (uD- C^αH), 82.7 (uD-C(CH_3) $_3$), 119.9 (C^{ar}H , Fmoc), 125.23, 125.32, 126.95, 127.00, 127.55, 127.57 (C^{ar}H , Fmoc), 141.23, 141.24, 144.0, 144.2 (C^{ar} , Fmoc), 157.0 (uC-NHCO $_2$), 170.7, 176.2 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3350 br w, 2958 br m, 1720 vs, 1532 m, 1449 m, 1392 w, 1368 m, 1243 s, 1123 s, 1072 w, 1039 m, 843 m, 757 s, 738 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	532.26722	532.26696	$[\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_6 + \text{Na}]^+$
	1041.54505	1041.54470	$[(\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_6)_2 + \text{Na}]^+$

14.5.2 Fmoc-uC-uD-OH (27)



$M = 453.53 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{NO}_6$

Die Spaltung des *tert*-Butylesters wird analog zu AAV-8 durchgeführt, ausgehend vom CD-Segment **25** (509 mg, 0.10 mmol). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Pentan/EtOAc = 1/1 + 1 % AcOH) gereinigt und nach Trocknung im HV wird **27** als farbloser, erstarrter Schaum erhalten.

Ausbeute: 372 mg (0.82 mmol, 82 %).

$R_f = 0.52$ (Pentan/EtOAc = 1/1 + 1 % AcOH).

$[\alpha]_D^{RT} = -13.5$ ($c = 1.03$ in CHCl_3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.87 (d, J = 6.4 Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.92 (d, J = 6.4 Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.21 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.22 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.60-1.85 (m, 3H, uD-C ^{β} H^AH^B, uD-C ^{β} H^AH^B und uD-C ^{γ} H), 3.38 (d, J = 6.5 Hz, 2H, uC-CH₂NH), 4.20 (t, J = 7.5 Hz, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.29 (dd, J = 10.4, 7.5 Hz, 1H, CHCH^AH^B, Fmoc), 4.35 (dd, J = 10.5, 7.5 Hz, 1H, CHCH^AH^B, Fmoc), 5.10 (dd, J = 10.1, 3.6 Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 5.90 (t, J = 6.5 Hz, 1H, NH), 6.97 (br s, 1H, CO₂H), 7.26-7.30 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.34-7.40 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.49-7.59 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.74 (d, J = 7.5 Hz, 2H, C^{ar}H, Fmoc).

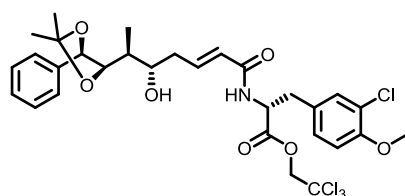
¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 21.3 (uD-C ^{δ} H₃), 22.3 (uC-C(CH₃)₂), 23.0 (uC-C(CH₃)₂ und uD-C ^{δ} H₃), 24.8 (uD-C ^{γ} H), 39.3 (uD-C ^{β} H₂), 44.0 (uC-C(CH₃)₂), 47.1 (CHCH₂, Fmoc), 49.1 (uC-CH₂NH), 67.0 (CHCH₂, Fmoc), 70.5 (uD-C ^{α} H), 119.9 (C^{ar}H, Fmoc), 125.15, 125.24, 126.99, 127.00, 127.61 (C^{ar}H, Fmoc), 141.21, 141.22, 1443.9, 144.0 (C^{ar}, Fmoc), 157.0 (uC-NHCO₂), 175.5 (CO₂H), 176.3 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3735 w, 2360 vs, 2341 vs, 2203 w, 2161 w, 2041 w, 2011 w, 1971 w, 1653 w, 1540 w, 668 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):

	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	476.20368	476.20436	[C ₂₆ H ₃₁ NO ₆ +Na] ⁺

14.5.3 H-uA[Acetonid]-uB-OTce (**28**)^[46]



$M = 663.41 \text{ g mol}^{-1}$ C₃₀H₃₅Cl₄NO₇

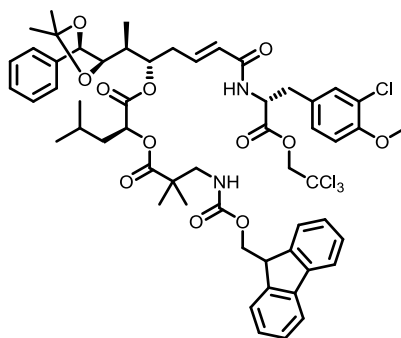
Eine Lösung von **16** (502 mg, 1.21 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (8 mL) wird nacheinander mit Grubbs-II-Katalysator (52 mg, 0.06 mmol, 5 mol%) und **9** (400 mg, 1.45 mmol, 1.2 Äq.), jeweils als Lösung in abs. CH₂Cl₂ (2 mL), versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht in einem abgedunkelten Reaktionsgefäß unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Rückstand sofort säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc = 2/1 → 1/1) gereinigt. Nach Trocknung im HV wird das AB-Segment **28** als hellbrauner, erstarrter Schaum erhalten.

Ausbeute: 560 mg (0.89 mmol, 70 %).

$R_f = 0.38$ (Hexan/EtOAc = 1/1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.07 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, uA-C $^{\epsilon}$ HCH $_3$), 1.49 (s, 3H, uA-C(CH $_3$) $_2$), 1.56 (s, 3H, uA-C(CH $_3$) $_2$), 1.79 (m, 1H, uA-C $^{\epsilon}$ H), 2.23-2.36 (m, 2H, uA-C $^{\nu}$ H $_2$), 2.55 (br m, 1H, uA-OH), 3.09 (dd, $J = 14.3, 6.0$ Hz, 1H, uB-C $^{\beta}$ H A H B), 3.19 (dd, $J = 14.2, 5.9$ Hz, 1H, uB-C $^{\beta}$ H A H B), 3.70 (br m, uA-C $^{\delta}$ H), 3.87 (s, 3H, uB-OCH $_3$), 4.05 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H, uA-C $^{\zeta}$ H), 4.72 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, uB-CH A H B CCl $_3$), 4.78 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, uA-C $^{\eta}$ H), 4.79 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH A H B CCl $_3$), 5.02 (ddd, $J = 7.8, 5.8, 5.8$ Hz, 1H, uB-C $^{\alpha}$ H), 5.62 (dm, $J = 15.4$ Hz, 1H, uA-C $^{\alpha}$ H), 5.85 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, uB-NH), 6.78 (ddd, $J = 14.9, 7.6, 7.4$ Hz, 1H, uA-C $^{\beta}$ H), 6.85 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, uB-C 5 H), 7.03 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, uB-C 6 H), 7.16 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, uB-C 2 H), 7.29-7.38 (m, 5H, uA-C ar H).

14.5.4 *seco*-uA[Acetonid]-Cryptophycin-52 (**29**)



$$M = 1098.93 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{56}\text{H}_{64}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_{12}$$

Die Estersynthese erfolgt gemäß AAV-9, ausgehend von Alkohol **28** (97.5 mg, 0.147 mmol, 1.0 Äq.) und Carbonsäure **27** (100 mg, 0.220 mmol, 1.5 Äq.). Nach Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 3/1) und Trocknung im HV wird **29** als farbloser, erstarrter Schaum erhalten.

Ausbeute: 129 mg (0.117 mmol, 80 %).

$R_f = 0.35$ (Hexan/EtOAc = 5/2).

$[\alpha]_D^{RT} = -16.0$ ($c = 1.00$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.94 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 0.98 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 1.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, uA-C $^{\epsilon}$ HCH $_3$), 1.17 (s, 3H, uC-C(CH $_3$) $_2$), 1.25 (s, 3H, uC-C(CH $_3$) $_2$), 1.47 (s, 3H, uA-C(CH $_3$) $_2$), 1.53 (s, 3H, uA-C(CH $_3$) $_2$), 1.62 (m, 1H, uD-C $^{\nu}$ H), 1.75-1.86 (m, 2H, uD-C $^{\nu}$ H $_2$), 1.97 (m, 1H, uA-C $^{\epsilon}$ H), 2.31-2.49 (m, 2H, uA-C $^{\nu}$ H $_2$), 3.06 (dd, $J = 14.1, 6.6$ Hz, 1H, uB-C $^{\beta}$ H A H B), 3.18 (dd, $J = 14.1, 5.8$ Hz, 1H, uB-C $^{\beta}$ H A H B), 3.40 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, uC-CH $_2$ NH), 3.81-3.88 (m, 4H, uB-OCH $_3$ und uA-C $^{\zeta}$ H), 4.23 (m, 1H, CHCH $_2$, Fmoc), 4.33-4.38 (m, 2H, CHCH $_2$, Fmoc), 4.67 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH A H B CCl $_3$), 4.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, uA-C $^{\eta}$ H), 4.76 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH A H B CCl $_3$), 4.96 (dd, $J = 10.0, 3.5$ Hz, 1H, uD-C $^{\alpha}$ H), 5.03 (m, 1H, uB-C $^{\alpha}$ H), 5.10 (ddm, $J = 11.9, 6.2$ Hz, 1H, uA-C $^{\delta}$ H), 5.65 (dm, $J = 15.7$ Hz, 1H, uA-C $^{\alpha}$ H), 6.09 (m, 1H, NH), 6.42 (d, $J = 8.0$

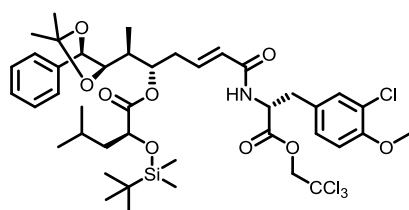
Hz, 1H, NH), 6.65 (ddd, $J = 15.6, 6.5, 6.5$ Hz, 1H, uA-C ^{β} H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, uB-C ^{5} H), 7.03 (dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 1H, uB-C ^{6} H), 7.16 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, uB-C ^{2} H), 7.27-7.43 (m, 9H, uA-C ^{ar} H und C ^{ar} H, Fmoc), 7.57-7.68 (m, 2H, C ^{ar} H, Fmoc), 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, C ^{ar} H, Fmoc).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 9.6 (uA-C ^{ϵ} HCH₃), 21.5 (uD-C ^{δ} H₃), 22.2 (uC-C(CH₃)₂), 22.7 (uC-C(CH₃)₂), 23.2 (uD-C ^{δ} H₃), 24.9 (uD-C ^{γ} H), 27.0 (uA-C(CH₃)₂), 27.2 (uA-C(CH₃)₂), 32.5 (uA-C ^{γ} H₂), 35.6 (uA-C ^{ϵ} H), 36.5 (uB-C ^{β} H₂), 39.2 (uD-C ^{β} H₂), 44.1 (uC-C(CH₃)₂), 47.2 (CHCH₂, Fmoc), 49.4 (uC-CH₂NH), 53.2 (uB-C ^{α} H), 56.0 (uB-OCH₃), 66.8 (CHCH₂, Fmoc), 71.2 (uD-C ^{α} H), 74.6 (uB-CH₂CCl₃), 75.7 (uA-C ^{δ} H), 80.4 (uA-C ^{γ} H), 82.0 (uA-C ^{ϵ} H), 94.2 (uB-CCl₃), 109.0 (uA-C(CH₃)₂), 112.0 (uB-C ^{5} H), 119.9 (C ^{ar} H, Fmoc), 125.25 (uB-C ^{3}), 125.26 (C ^{ar} H, Fmoc), 125.4 (uA-C ^{α} H), 126.8, 127.0, 127.6 (uA-C ^{ar} H), 128.45 (uB-C ^{6} H), 128.49 (uB-C ^{1}), 128.7 (uA-C ^{ar} H), 131.2 (uB-C ^{2} H), 137.4 (uA-C ^{ar}), 139.0 (uA-C ^{β} H), 141.21, 141.23, 143.99, 144.05 (C ^{ar}), 154.0 (uB-C ^{4}), 156.9 (uC-NHCO₂), 165.1 (uA-C=O), 169.9, 170.1, 176.7 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3726 w, 3629 w, 2926 br w, 2359 vs, 2341 vs, 1718 br m, 1499 w, 1457 w, 1370 w, 1243 w, 1141 w, 1018 w, 808 w, 757 w, 720 w, 668 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 1119.31151$	1119.31056	[C ₅₆ H ₆₄ Cl ₄ N ₂ O ₁₂ +Na] ⁺

14.5.5 TBS-uD-uA[Acetonid]-uB-OTce (132)^[46]



$M = 891.82 \text{ g mol}^{-1}$ C₄₂H₅₉Cl₄NO₉Si

Eine Lösung von **130** (593 mg, 1.64 mmol, 2.1 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (5.2 mL) wird mit abs. DMF (4 Tropfen) versetzt und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Dann wird Oxalylchlorid (3.30 mL, 3.84 mmol, 4.8 Äq.) zugetropft und die Reaktionsmischung nach Entfernung des Eisbads 3.5 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (7 mbar, 30 °C, 15 min) und das erhaltene Säurechlorid ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion verwendet.

Zu einer Lösung von **28** (520 mg, 0.78 mmol, 1.0 Äq.) und DMAP (203 mg, 1.66 mmol, 2.1 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (5.2 mL) wird NEt₃ (0.24 ml, 1.72 mmol, 2.2 Äq.) bei 0 °C zugegeben. Eine Lösung des frisch dargestellten Säurechlorids in abs. CH₂Cl₂ (2.6 mL) wird langsam zugetropft, das Reaktionsgemisch 1 h bei 0 °C gerührt und anschließend in ges. NaHCO₃-Lsg. (25 mL) gegossen. Nach kräftiger Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et₂O (1 × 40 mL,

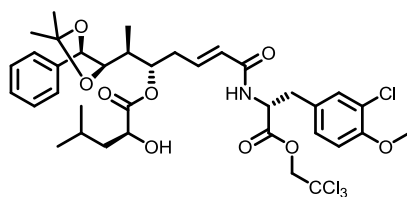
3 × 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 5/1) gereinigt und nach Trocknung im HV wird **132** als farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 438 mg (0.49 mmol, 63 %).

$R_f = 0.53$ (Hexan/EtOAc = 2/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = -0.01 (s, 3H, uD-SiCH₃), 0.02 (s, 3H, uD-SiCH₃), 0.84-0.92 (m, 15H, uD-SiC(CH₃)₃ und 2 × uD-C^δH₃), 1.08 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.38 (ddd, $J = 13.4, 9.2, 3.8$ Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.52 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.57 (ddd, $J = 13.8, 9.3, 4.6$ Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B) 1.75 (m, 1H, uA-C^εH), 1.93 (m, 1H, uD-C^γH), 2.29-2.41 (m, 2H, uA-C^γH₂), 3.11 (dd, $J = 14.3, 5.7$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.18 (dd, $J = 14.3, 5.9$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B) 3.83 (dd, $J = 8.8, 3.2$ Hz, 1H, uA-C^δH), 3.88 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.13 (dd, $J = 9.4, 3.8$ Hz, 1H, uA-C^δH), 4.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, uA-C^γH), 4.73 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.78 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.94 (m, 1H, uD-C^αH), 5.02 (ddd, $J = 7.6, 5.9, 5.9$ Hz, 1H, uB-C^αH), 5.45 (dm, $J = 15.4$ Hz, 1H, uA-C^αH), 5.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, uB-NH), 6.60 (ddd, $J = 14.9, 7.4, 7.2$ Hz, 1H, uA-C^βH), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C⁵H), 7.02 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H, uB-C⁶H), 7.17 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, uB-C²H), 7.29-7.40 (m, 5H, uA-C^{ar}H).

14.5.6 HO-uD-uA[Acetonid]-uB-OTce (**133**)^[46]



$$M = 777.56 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{Cl}_4\text{NO}_9$$

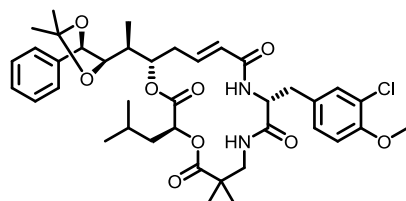
Eine Lösung des TBS-Ethers **132** (50 mg, 0.056 mmol) in abs. MeOH (0.25 mL) wird im Eisbad gekühlt und mit festem Cer(IV)ammoniumnitrat (im HV getrocknet, 37 mg, 0.067 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Die dunkelrote Reaktionsmischung wird 15 h bei 0 °C gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von ges. NaHCO₃-Lsg. (1.0 mL) beendet. Die wässrige Phase wird mit EtOAc (4 × 1 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Der gelbliche Rückstand wird mittels Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 2/1) gereinigt und nach Trocknung im HV wird **133** als hellgelber Feststoff isoliert.

Ausbeute: 20 mg (0.026 mmol, 46 %).

$R_f = 0.27$ (Hexan/EtOAc = 2/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 1.09 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.42-1.49 (m, 5H, uD-C^βH₂ und uA-C(CH₃)₂), 1.53 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.86 (m, 1H, uA-C^εH), 1.92 (m, 1H, uD-C^γH), 2.30-2.41 (m, 2H, uA-C^γH₂), 2.76 (br m, 1H, OH), 3.10 (dd, *J* = 14.3, 5.8 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.20 (dd, *J* = 14.3, 5.9 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.85 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, uA-C^δH), 3.88 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.10 (m, 1H, uA-C^ζH), 4.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, uA-C^γH), 4.73 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.80 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.95-5.03 (m, 2H, uB-C^αH und uD-C^αH), 5.41 (dm, *J* = 15.3 Hz, 1H, uA-C^αH), 5.80 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, uB-NH), 6.56 (ddd, *J* = 14.9, 7.4, 7.2 Hz, 1H, uA-C^βH), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, uB-C⁵H), 7.02 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, uB-C⁶H), 7.17 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, uB-C²H), 7.29-7.38 (m, 5H, uA-C^{ar}H).

14.5.7 uA[Acetonid]-Cryptophycin-52 (30)



$$M = 727.28 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{ClN}_2\text{O}_9$$

Die Makrolactamisierung erfolgt gemäß AAV-10, ausgehend von **29** (67 mg, 61 μmol). Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 1/2) und Trocknung im HV wird **30** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[47]

Ausbeute: 32.5 mg (44.7 μmol, 73 %).

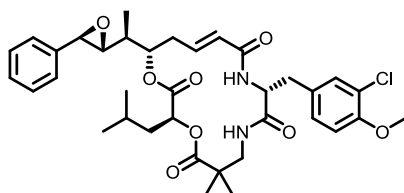
R_f = 0.27 (Hexan/EtOAc = 1/2).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.83 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 1.13 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.15 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.22 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.35 (ddd, *J* = 14.0, 8.9, 3.6 Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.50 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.65 (m, 1H, uD-C^γH), 1.75 (ddd, *J* = 14.0, 10.4, 5.1 Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.83 (m, 1H, uA-C^εH), 2.22 (ddd, *J* = 14.5, 11.0, 11.0 Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.47 (dm, *J* = 14.5 Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 3.02 (dd, *J* = 14.6, 7.7 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.11 (dd, *J* = 14.4, 4.9 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.13 (dd, *J* = 13.2, 3.6 Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.38 (dd, *J* = 13.5, 8.3 Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.79 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H, uA-C^ζH), 3.87 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, uA-C^γH), 4.73 (m, 1H, uB-C^αH), 4.79 (dd, *J* = 10.4, 3.6 Hz, 1H, uD-C^αH), 5.04 (ddd, *J* = 11.3, 6.9, 2.0 Hz, 1H, uA-C^δH), 5.64 (m, 1H, NH), 5.67 (dm, *J* = 15.2 Hz, 1H, uA-C^αH), 6.63 (ddd, *J* = 15.0, 10.6, 4.3 Hz, 1H, uA-

$C^\beta H$), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB- $C^5 H$), 7.05 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H, uB- $C^6 H$), 7.18 (m, 1H, NH), 7.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, uB- $C^2 H$), 7.34-7.41 (m, 5H, uA- $C^{ar} H$).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ [ppm] = 9.7 (uA- $C^6 HCH_3$), 21.3 (uD- $C^5 H_3$), 22.7 (uC- $C(CH_3)_2$), 22.8 (uC- $C(CH_3)_2$), 22.9 (uD- $C^5 H_3$), 24.6 (uD- $C^7 H$), 27.0 (uA- $C(CH_3)_2$), 27.2 (uA- $C(CH_3)_2$), 35.3 (uB- $C^\beta H_2$), 35.8 (uA- $C^7 H_2$), 36.8 (uA- $C^6 H$), 39.5 (uD- $C^\beta H_2$), 42.8 (uC- $C(CH_3)_2$), 46.5 (uC- CH_2NH), 54.3 (uB- $C^a H$), 56.1 (uB- OCH_3), 71.1 (uD- $C^a H$), 75.8 (uA- $C^b H$), 80.1 (uA- $C^7 H$), 82.3 (uA- $C^5 H$), 109.1 (uA- $C(CH_3)_2$), 112.3 (uB- $C^5 H$), 122.5 (uB- C^3), 124.3 (uA- $C^a H$), 126.5 (uA- $C^{ar} H$), 128.2 (uB- $C^6 H$), 128.5, 128.7 (uA- $C^{ar} H$), 129.6 (uB- C^1), 130.9 (uB- $C^2 H$), 137.5 (uA- C^{ar}), 142.3 (uA- $C^\beta H$), 154.0 (uB- C^4), 165.0 (uA- $C(O)NH$), 170.1 ($C(O)NH$), 170.3, 177.8 ($C=O$).

14.5.8 Cryptophycin-52 (2)



$M = 669.20 \text{ g mol}^{-1}$ $C_{36}H_{45}ClN_2O_8$

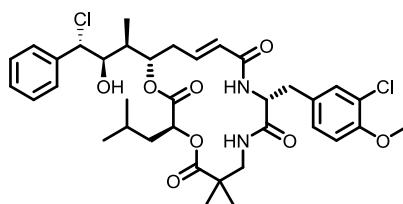
Das Acetonid **30** (56 mg, 77 μmol) wird gemäß AAV-11–AAV-14 in das entsprechende Epoxid überführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/EtOAc = 1/3) und Trocknung im HV wird **2** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten. Die spektroskopischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[47]

Ausbeute: 28.5 mg (42.4 μmol , 55 %).

$R_f = 0.40$ (Hexan/EtOAc = 1/3).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ [ppm] = 0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD- $C^5 H_3$), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD- $C^5 H_3$), 1.15 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA- $C^6 HCH_3$), 1.16 (s, 3H, uC- $C(CH_3)_2$), 1.22 (s, 3H, uC- $C(CH_3)_2$), 1.31 (ddd, $J = 13.6, 8.6, 3.6$ Hz, 1H, uD- $C^\beta H^A H^B$), 1.63-1.83 (m, 3H, uD- $C^7 H$, uD- $C^\beta H^A H^B$ und uA- $C^6 H$), 2.45 (ddd, $J = 14.5, 11.1, 11.0$ Hz, 1H, uA- $C^7 H^A H^B$), 2.47 (ddd, $J = 14.5, 2.0, 2.0$ Hz, 1H, uA- $C^7 H^A H^B$), 2.92 (dd, $J = 7.5, 2.1$ Hz, 1H, uA- $C^5 H$), 3.04 (dd, $J = 14.6, 7.6$ Hz, 1H, uB- $C^\beta H^A H^B$), 3.07-3.14 (m, 2H, uB- $C^\beta H^A H^B$ und uC- $CH^A H^B NH$), 3.42 (dd, $J = 13.5, 8.7$ Hz, 1H, uC- $CH^A H^B NH$), 3.68 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, uA- $C^7 H$), 3.87 (s, 3H, uB- OCH_3), 4.74 (ddd, $J = 7.6, 7.5, 5.4$ Hz, 1H, uB- $C^a H$), 4.83 (dd, $J = 10.2, 3.6$ Hz, 1H, uD- $C^a H$), 5.20 (ddd, $J = 11.3, 5.2, 2.1$ Hz, 1H, uA- $C^b H$), 5.61 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 5.72 (dm, $J = 15.0$ Hz, 1H, uA- $C^a H$), 6.76 (ddd, $J = 15.0, 10.6, 4.1$ Hz, 1H, uA- $C^\beta H$), 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB- $C^5 H$), 7.05 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, uB- $C^6 H$), 7.18 (m, 1H, NH), 7.19 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, uB- $C^2 H$), 7.20-7.26 (m, 2H, uA- $C^{ar} H$), 7.33-7.39 (m, 3H, uA- $C^{ar} H$).

14.5.9 Cryptophycin-55 (157)



$$M = 705.76 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8$$

Eine Lösung von Cryptophycin-52 (**2**) (57 mg, 85.3 μmol , 1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (1.0 mL) wird auf -50°C gekühlt und mit HCl (4 M in Dioxan, 82.5 μL , 427 μmol , 5.0 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 2.5 h bei dieser Temperatur gerührt, wobei der Reaktionsverlauf mittel analytischer RP-HPLC (Methode 1) verfolgt werden kann. Bei vollständiger Umsetzung wird das Kältebad entfernt und die Lösung auf RT erwärmt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Rückstand durch präparative RP-HPLC (Methode 4) gereinigt. Nach Lyophilisation wird das Chlorhydrin **157** als voluminöser, farbloser Feststoff erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[270] überein.

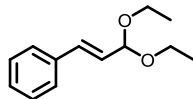
Ausbeute: 49.5 mg (70.2 μmol , 82 %).

HPLC: $t_R = 36.5$ min (Methode 4).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.04 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, uA-C ^{ϵ} HCH₃), 1.17 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.23 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.44 (ddd, $J = 13.7, 8.8, 3.5$ Hz, 1H, uD-C ^{β} H^AH^B), 1.72 (m, 1H, uD-C ^{γ} H), 1.78 (ddd, $J = 13.7, 10.2, 5.0$ Hz, 1H, uD-C ^{β} H^AH^B), 1.91 (br s, 1H, uA-OH), 2.40 (ddd, $J = 14.4, 11.1, 11.0$ Hz, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 2.49 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H), 2.67 (ddd, $J = 14.5, 4.4, 2.0$ Hz, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 3.01 (dd, $J = 14.5, 8.1$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.13 (dd, $J = 14.5, 4.9$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.17 (dd, $J = 13.5, 3.9$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.38 (dd, $J = 13.5, 8.1$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.87 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.02 (dd, $J = 9.7, 2.0$ Hz, 1H, uA-C ^{ζ} H), 4.66 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, uA-C ^{η} H), 4.72 (ddd, $J = 7.8, 7.7, 5.1$ Hz, 1H, uB-C ^{α} H), 4.94 (dd, $J = 10.2, 3.4$ Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 5.15 (ddd, $J = 10.7, 8.2, 2.1$ Hz, 1H, uA-C ^{δ} H), 5.81 (dd, $J = 15.1, 1.9$ Hz, 1H, uA-C ^{α} H), 5.93 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, uB-NH), 6.77 (ddd, $J = 15.1, 10.6, 4.2$ Hz, 1H, uA-C ^{β} H), 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C ^{ζ} H), 7.07 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H, uB-C ^{δ} H), 7.21 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, uB-C ^{ζ} H), 7.27 (m, 1H, NH), 7.33-7.43 (m, 5H, uA-C ^{α} H).

15 Synthese eines Cyclopropan-funktionalisierten Fragment-A-Bausteins

15.1 (*E*)-(3,3-Diethoxyprop-1-enyl)benzol (**45**)^[185]



$$M = 206.28 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$$

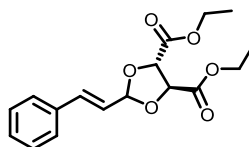
Eine Lösung von Ammoniumnitrat (195 mg, 2.44 mmol, 0.2 Äq.) in Ethanol p.a. (240 mL) wird nacheinander mit *trans*-Zimtaldehyd (**43**) (3.0 mL, 23.86 mmol, 1.0 Äq.) und Trimethylorthoformiat (**44**) (4.75 mL, 28.70 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt und das Ethanol anschließend i. V. entfernt. Der Rückstand wird in CH₂Cl₂ (150 mL) und ges. NaHCO₃-Lsg. (150 mL) aufgenommen und nach kräftiger Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3 × 150 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Das Diethylacetal **45** wird als gelbliches Öl erhalten und ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion verwendet. Die spektroskopischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[271]

Ausbeute: 4.70 g (96 % d. Th.).

$R_f = 0.68$ (PE/EtOAc = 10/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH₃), 3.58 (m, 2H, CH₂), 3.71 (m, 2H, CH₂), 5.07 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, OCHO), 6.21 (dd, $J = 16.1, 5.2$ Hz, 1H, CH=CHCH), 6.71 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, CH=CHCH), 7.24-7.46 (m, 5H, C^{ar}H).

15.2 (4*S*,5*S*)-Diethyl 2-Styryl-1,3-dioxolan-4,5-dicarboxylat (**46**)^[194]



$$M = 320.34 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6$$

(*E*)-(3,3-Diethoxyprop-1-enyl)benzol (**45**) (4.70 g, 22.80 mmol, 1.0 Äq.), D-Diethyltartrat (4.70 mL, 27.26 mmol, 1.2 Äq.) und PPTS (230 mg, 0.91 mmol, 4 mol%) werden in Toluol p.a. (300 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wird 6 h bei 110-120 °C gerührt, wobei das entstehende Ethanol durch Destillation entfernt wird. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wird mit ges. NaHCO₃-Lsg. (150 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3 × 150 mL) gewaschen. Die organische Phase wird anschließend über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird

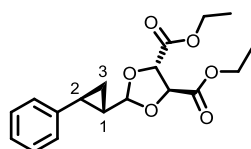
säulenchromatographisch (PE/Et₂O = 4/1) gereinigt und **46** wird als gelber, kristalliner Feststoff erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[194] überein.

Ausbeute: 5.17 g (16.15 mmol, 71 %).

R_f = 0.28 (PE/Et₂O = 3/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.23 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 4.71 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, OCH₂CHO), 4.80 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, OCH₂CHO), 5.75 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH=CH₂), 6.18 (dd, *J* = 16.0, 6.8 Hz, 1H, CH=CH₂), 6.78 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH₂), 7.18-7.38 (m, 5H, C^{ar}H).

15.3 (4*S*,5*S*)-Diethyl 2-((1*S*,2*S*)-2-Phenylcyclopropyl)-1,3-dioxolan-4,5-dicarboxylat (**47**)^[196]



$$M = 334.36 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$$

Eine Lösung von **46** (2.00 g, 6.24 mmol, 1.0 Äq.) in abs. DCE (45 mL) wird auf –23 °C gekühlt und dann mit Diethylzink (3.5 mL, 34.32 mmol, 5.5 Äq.) in abs. DCE (15 mL) innerhalb von 45 min versetzt. Anschließend wird langsam Chloriodmethan (4.5 mL, 62.40 mmol, 10.0 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung 6 h bei –23 °C gerührt, wobei der Reaktionsverlauf mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt werden kann. Bei vollständigem Umsatz wird die Reaktion durch Zugabe von ges. NH₄Cl-Lsg. (50 mL) beendet und die Lösung auf RT erwärmt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase wiederholt mit Et₂O (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O und ges. NaCl-Lsg. (je 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockene eingeeengt. Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 9/1) und Trocknung im HV wird **47** als gelbes Öl erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[185] überein.

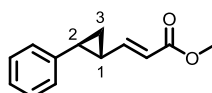
Ausbeute: 2.01 g (6.02 mmol, 97 %, 90 % *de* [¹H-NMR]).

R_f = 0.37 (Hexan/EtOAc = 4/1).

[α]_D^{RT} = +92.4 (c = 1.00 in Ethanol).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 0.81 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 0.82 (m, 1H, $\text{C}^3\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 0.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.09 (ddd, $J = 9.0, 5.3, 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}^3\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.67 (m, 1H, C^1H), 2.18 (m, 1H, C^2H), 3.84 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.86 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 4.79 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, OCHCHCHO), 4.93 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, OCHCHCHO), 5.26 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, CH), 6.96-7.09 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

15.4 (*E*)-Methyl 3-((1*R*,2*S*)-2-Phenylcyclopropyl)acrylat (**49**)^[185,199]



$$M = 202.25 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_2$$

In einer ausgeheizten Reaktionsapparatur wird das Acetal **47** (2.01 g, 6.01 mmol, 1.0 Äq.) in abs. THF (60 mL) vorgelegt und mit *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (1.83 g, 9.62 mmol, 1.2 Äq.) und H_2O (12 mL) unter Argonschutzatmosphäre versetzt. Da der entstehende Aldehyd oxidationsempfindlich ist, wird ein Argonstrom 10 min durch die Reaktionslösung geleitet, um noch vorhandenen Sauerstoff zu entfernen. Anschließend wird das Gemisch 15 h unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlen auf RT wird die organische Reaktionslösung mit ges. NaHCO_3 -Lgs. (30 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wird wiederholt mit Pentan (3×30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und dann durch Celite[®] filtriert. Der Filtrückstand wird mehrmals mit Pentan gewaschen und die vereinigten Filtrate werden i. V. zur Trockne eingengt. Das erhaltene Rohprodukt **48** wird unter Argonatmosphäre gelagert und schnellstmöglich in der Folgereaktion ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Der dargestellte Aldehyd **48** (6.01 mmol, 1.0 Äq.) wird in abs. THF (12 mL) aufgenommen und Trimethylphosphonoacetat (1.00 mL, 7.09 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf -78 °C gekühlt und dann mit Tetramethylguanidin (0.83 mL, 6.61 mmol, 1.1 Äq.) innerhalb von 30 min versetzt. Nachdem 30 min bei dieser Temperatur gerührt wurde, wird das Kältebad entfernt und die Reaktionsmischung über Nacht unter Erwärmen auf RT gerührt. Die Lösung wird mit H_2O (10 mL) in einen Scheidetrichter überführt und nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (3×5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Flash-Chromatographie (Pentan/ $\text{Et}_2\text{O} = 10/1$) und Trocknung im HV ergibt **49** als farbloses, leicht bewegliches Öl.

Ausbeute: 907 mg (4.48 mmol, 75 % über 2 Stufen).

$R_f = 0.34$ (Hexan/ $\text{Et}_2\text{O} = 7/1$).

$[\alpha]_D^{RT} = +402.4$ ($c = 1.01$ in CHCl_3).

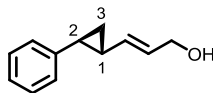
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.82 (ddd, $J = 8.9, 5.4, 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}^3\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.09 (ddd, $J = 8.3, 6.1, 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}^3\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.67 (dddd, $J = 9.7, 8.3, 5.4, 4.1$ Hz, 1H, C^1H), 2.18 (dddd, $J = 9.0, 6.1, 4.1$ Hz, 1H, C^2H), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 5.90 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}_2$), 6.60 (dd, $J = 15.4, 9.9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}_2$), 7.05-7.31 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 17.8 (C^3H_2), 26.8 (C^2H), 26.9 (C^1H), 51.4 (CH_3), 118.4 ($\text{CH}=\text{CHCO}_2$), 125.8, 126.2, 128.5 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 140.7 (C^{ar}), 151.9 ($\text{CH}=\text{CHCO}_2$), 167.1 (CO_2).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3026 w, 2948 w, 1712 vs, 1643 s, 1603 w, 1497 w, 1434 m, 1255 m, 1144, 1093 m, 1030 m, 934 m, 862 w, 750 m, 696 s.

HRMS (EI):	gemessen	berechnet	Ion
	m/z = 202.09850	202.09938	$[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_2]^+$

15.5 (*E*)-3-((1*R*,2*S*)-2-Phenylcyclopropyl)prop-2-en-1-ol (**50**)^[199]



$M = 174.10 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}$

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von **49** (852 mg, 4.21 mmol, 1.0 Äq.) in abs. THF (9.5 mL) wird langsam DIBAL-H (1.2 M in Toluol, 8.77 mL, 10.52 mmol, 2.5 Äq.) getropft. Die Reaktionslösung wird 30 min bei -78 °C und anschließend unter Erwärmen auf RT über Nacht gerührt. Die Reaktion wird durch vorsichtige Zugabe von H_2O (2.75 mL) beendet. Nachdem weitere 10 min bei RT gerührt wurde, wird die Lösung mit EtOAc und H_2O (je 20 mL) in einen Scheidetrichter überführt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (3×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10 %iger NaOAc-Lsg., H_2O und ges. NaCl-Lsg. (je 20 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Reinigung durch Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 3/1) und Trocknung im HV ergibt **50** als farbloses, leicht bewegliches Öl, das im Kühlschrank erstarrt.

Ausbeute: 695 mg (3.99 mmol, 95 %).

$R_f = 0.34$ (Pentan/EtOAc = 3/1).

$[\alpha]_D^{RT} = +251.9$ ($c = 1.00$ in CHCl_3).

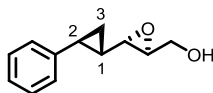
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.13 (ddd, $J = 8.8, 5.4, 5.4$ Hz, 1H, $\text{C}^3\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.25 (ddd, $J = 8.6, 5.4, 5.4$ Hz, 1H, $\text{C}^3\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.43 (br s, 1H, OH), 1.72 (m, 1H, C^1H), 1.96 (ddd, $J = 8.8, 5.8, 4.3$ Hz, 1H, C^2H), 4.14 (dd, $J = 6.1, 1.4$ Hz, 2H, CH_2OH), 5.45 (dd, $J = 15.4, 8.5$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.78 (dt, $J = 15.3, 6.0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 7.07-7.33 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 16.7 (C^3H_2), 25.2 (C^2H), 26.1 (C^1H), 63.5 (CH_2OH), 125.63, 125.65 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 127.3 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 128.3 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 135.2 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 142.1 (C^{ar}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3304 m, 3023 w, 2860 w, 1664 m, 1603 m, 1496 m, 1458 m, 1219 w, 1079 m, 998 m, 959 s, 930 m, 755 s, 695 s.

HRMS (EI):	gemessen	berechnet	Ion
m/z =	174.10446	174.10447	$[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_2]^+$

15.6 ((2S,3S)-3-((1S,2S)-2-Phenylcyclopropyl)oxiran-2-yl)methanol (**51**)



$M = 190.24 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$

In Anlehnung an eine Vorschrift von SHI^[208] wird der Allylalkohol **50** (500 mg, 2.87 mmol, 1.0 Äq.), das Keton *ent*-**61** (246 mg, 0.95 mmol, 0.3 Äq.) und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (15 mg, 0.045 mmol, 1.6 mol%) in einer DMM/Acetonitril-Mischung (30 mL, 2:1 v/v) gelöst. Eine wässrige $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{AcOH}$ -Lsg. (20 mL; hergestellt aus 100 mL 0.1 M wässriger K_2CO_3 -Lsg. und 0.5 mL AcOH (pH = 9.3)) wird unter Rühren zugegeben und das Gemisch wird mit Hilfe eines NaCl-Eis-Bads auf -10°C gekühlt. Gleichzeitig werden eine Lösung von Oxon[®] (2.40 g, 3.95 mmol, 1.4 Äq.) in 0.4 mM wässriger $\text{Na}_2(\text{EDTA})$ (14.25 mL) und eine K_2CO_3 -Lsg. (14.25 mL; hergestellt aus 1.6 g K_2CO_3 und 10 mL H_2O) separat mittels Spritzenpumpen innerhalb von 3 h zugetropft. Die Reaktion wird unverzüglich durch Zugabe von CH_2Cl_2 (60 mL) und H_2O beendet. Die wässrige Phase wird mit CH_2Cl_2 (3 \times 60 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (75 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Anschließend wird der Rückstand im HV getrocknet. Da noch geringe Mengen des Ketons *ent*-**61** (ca. 8 %) im Rohprodukt vorhanden sind, wurde kein Drehwert gemessen und kein IR-Spektrum aufgenommen.

Ausbeute: 595 mg (quantitativ).

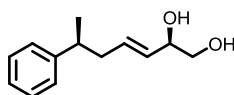
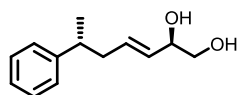
$R_f = 0.22$ (Pentan/EtOAc = 3/1).

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.99-1.07 (m, 2H, C^3H_2), 1.26 (ddd, $J = 8.8, 5.3, 5.2$ Hz, 1H, C^1H), 1.82 (dd, $J = 7.4, 5.3$ Hz, 1H, OH), 1.95 (ddd, $J = 8.8, 5.2, 5.2$ Hz, 1H, C^2H), 2.98 (dd, $J = 5.3, 2.3$ Hz, 1H, C^1HCH), 3.05 (ddd, $J = 4.3, 2.4, 2.3$ Hz, 1H, CHCH_2OH), 3.67 (ddd, $J = 12.6, 7.3, 4.1$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{OH}$), 3.94 (ddd, $J = 12.7, 5.2, 2.4$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{OH}$), 7.03-7.27 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 12.6 (C^3H_2), 20.2 (C^2H), 22.4 (C^1H), 56.7 (C^1HCH), 58.0 (CHCH_2OH), 61.3 (CH_2OH), 125.8, 125.9, 128.3 (C^{ar}H), 141.7 (C^{ar}).

MS (ESI, Kationen-Modus): $m/z = 403.0$ [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (berechnet für $[(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2)_2+\text{Na}]^+$: 403.2).

15.7 (2R,6R/S,E)-6-Phenylhept-3-en-1,2-diol (65/65a)



$M = 206.28 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$

Analog zu einer Literaturvorschrift^[199] wird der 2,3-Epoxyalkohol **51** (271 mg, 1.43 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (2 mL) aufgenommen, auf -10°C gekühlt und daraufhin langsam mit Trimethylaluminium (2.0 M in Hexan, 2.49 mL, 4.99 mmol, 3.5 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei RT gerührt und dann mit Et_2O (8 mL) verdünnt. Anschließend wird solange 10 %ige HCl zugegeben bis der entstandene Feststoff wieder gelöst ist. Nach Phasentrennung wird die organische Phase mit H_2O und ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Nach Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 4/1 \rightarrow 2/1) wird eine Fraktion isoliert, die die Diastereomere **65** und **65a** in einem Verhältnis von ungefähr 2:1 enthält. Da die Signale der beiden Diastereomere größtenteils im ^1H -NMR-Spektrum einander partiell bzw. vollständig überlagern, sind häufig Multipletts zu erkennen. Drehwert und IR-Spektrum wurden aufgrund des Vorliegens zweier Isomere nicht gemessen.

Ausbeute: 220 mg (1.07 mmol, 75 %).

$R_f = 0.53$ (Pentan/EtOAc = 1/1).

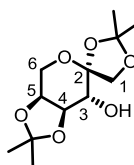
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS, Diastereomere 2:1): δ [ppm] = 1.25 (d, $J = 6.9$ Hz, 1.5H, CH_3), 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.85-2.06 (br s, 3H, $4 \times \text{OH}$), 2.30-2.41 (m, 3H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 2.73-2.82 (m, 1.5H, $2 \times \text{CHCH}_3$), 3.33-3.41 (m, 1.5H, $2 \times \text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{OH}$), 3.46 (dd, $J = 11.3, 3.7$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{OH}$), 3.52 (dd, $J = 11.3, 3.6$ Hz, 0.5H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{OH}$), 4.06-4.14 (m, 1.5H, $2 \times \text{CHOH}$), 5.31-5.40 (m, 1.5H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 5.58-5.70 (m, 1.5H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 7.11-7.33 (m, 8.3H, C^{ar}H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS, Diastereomere 2:1): δ [ppm] = 21.5/21.6 (CH_3), 39.78/39.79 (CHCH_3), 41.09 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 66.36/66.39 (CH_2OH), 72.8/73.0 (CHOH), 126.0, 127.0, 128.3 (C^{ar}H), 130.06/130.13 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 131.99/132.12 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 146.54/146.60 (C^{ar}).

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 435.25053$	435.25058	$[(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2)_2+\text{Na}]^+$

16 Synthese des Shi-Katalysators *ent*-61

16.1 1,2:4,5-Di-*O*-isopropyliden- β -L-fructopyranose (**64**)



$$M = 260.28 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$$

In Anlehnung an eine Literaturvorschrift^[209] wird L-Fructose (**63**) (1.00 g, 5.55 mmol, 1.0 Äq.) in Aceton (21 mL) vorgelegt und mit 2,2-Dimethoxypropan (0.4 mL, 3.25 mmol, 0.6 Äq.) versetzt. Nachdem die Mischung auf 0 °C gekühlt wurde, wird H₂SO₄ (95 %ig, 150 μ L, 2.78 mmol, 0.5 Äq.) zugegeben. Die Lösung wird 4 h bei 0 °C gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von NH₄OH-Lsg. bis pH = 7-8 beendet. Das Gemisch wird daraufhin i. V. eingengt und der Rückstand in CH₂Cl₂ (20 mL) aufgenommen. Die organische Phase wird mit H₂O und gest. NaCl-Lsg. (jeweils 10 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. V. zur Trockne eingengt. Die Säulenchromatographische Reinigung (Pentan/EtOAc = 5/1 \rightarrow 3/1) ergibt eine saubere Produktfraktion sowie eine Mischfraktion. Die Mischfraktion wird durch Umkristallisation (Pentan/CH₂Cl₂ = 4/1) weiter aufgereinigt. Nach Trocknung im HV wird **64** als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

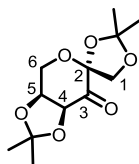
Ausbeute: 693 mg (2.66 mmol, 48 %).

$R_f = 0.38$ (Pentan/EtOAc = 3/1).

$[\alpha]_D^{RT} = +140.8$ ($c = 1.05$ in CHCl₃); Lit.: +142.4 ($c = 1.05$ in CHCl₃).^[209]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.37 (s, 3H, CH₃), 1.45 (s, 3H, CH₃), 1.52 (s, 3H, CH₃), 1.54 (s, 3H, CH₃), 1.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, OH), 3.67 (dd, $J = 8.3, 6.9$ Hz, 1H, C³H), 3.99 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, C¹H^AH^B), 4.01 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, C⁶H^AH^B), 4.12 (dd, $J = 13.4, 2.6$ Hz, 1H, C⁶H^AH^B), 4.13 (dd, $J = 6.9, 5.7$ Hz, 1H, C⁴H), 4.19 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, C¹H^AH^B), 4.22 (dd, $J = 5.7, 2.6$ Hz, 1H, C⁵H).

16.2 1,2:4,5-Di-*O*-isopropyliden- β -*L*-erythro-2,3-hexodiulo-2,6-pyranose (*ent*-61)



$$M = 258.27 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$$

Analog zu einer Vorschrift von SHI^[209] wird **64** (0.69 g, 2.65 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (7.0 mL) gelöst und Pyridiniumdichromat (1.50 g, 3.98 mmol, 1.5 Äq.) sowie pulverisiertes 3 Å Molsieb (2.50 g) zugegeben. Nachdem die Mischung mit einem Tropfen Essigsäure versetzt wurde, wird über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wird über eine kurze Kieselgelschicht filtriert, die mit ausreichend Lösungsmittel (Pentan/EtOAc = 1/1) gewaschen wird. Nach dem Einengen der organischen Phase wird der Rückstand aus heißem Hexan umkristallisiert. Die anschließende Trocknung im HV ergibt *ent*-**61** als farblose Nadeln. Die spektroskopischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.

Ausbeute: 500 mg (1.93 mmol, 73 %).

$R_f = 0.71$ (Pentan/EtOAc = 3/1).

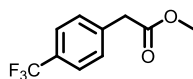
$[\alpha]_D^{RT} = +120.0$ (c = 1.02 in CHCl₃); Lit.: +120.0 (c = 1.00 in CHCl₃).^[209]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.40 (s, 6H, 2 × CH₃), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.56 (s, 3H, CH₃), 1.54 (s, 3H, CH₃), 4.00 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, C¹H^AH^B), 4.13 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, C⁶H^AH^B), 4.39 (dd, $J = 13.5, 2.2$ Hz, 1H, C⁶H^AH^B), 4.55 (dd, $J = 5.4, 1.9$ Hz, 1H, C⁵H), 4.62 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C¹H^AH^B), 4.75 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, C⁴H).

17 Synthese eines Trifluormethyl-funktionalisierten Cryptophycins

17.1 Synthese des trifluormethylierten Fragment-A-Bausteins

17.1.1 Methyl 4-trifluormethylphenylacetat (**98**)



$$M = 218.17 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{10}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}_2$$

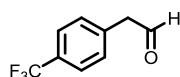
In Anlehnung an eine Vorschrift von BODNAR^[233] wird 4-Trifluormethylphenylelessigsäure (**96**) (5.00 g, 24.49 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH p.a. (260 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Thionylchlorid (4.00 mL, 56.33 mmol, 2.3 Äq.) wird innerhalb von 30 min bei 0 °C zugetropft und die Reaktionsmischung für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Eisbad wird entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Um die Reaktion zu beenden, wird H₂O (50 mL) zugegeben und für 10 min gerührt. Das Methanol wird am Rotationsverdampfer i. V. entfernt (Badtemperatur = 30 °C, Eisbad unter Vorlagekolben). Der Rückstand wird in H₂O (50 mL) und CH₂Cl₂ (200 mL) aufgenommen. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (4 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO₃-Lsg. (2 × 150 mL) und H₂O (100 mL) gewaschen und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird vorsichtig am Rotationsverdampfer i. V. entfernt. Der Ester **98** wird als farbloses, leicht bewegliches Öl erhalten und ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Stufe eingesetzt. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[233]

Ausbeute: 4.37 g (82 % d. Th.).

HPLC: $t_R = 4.380$ min (Methode 2).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 3.69 (s, 2H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 7.40 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, C^{ar}H), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, C^{ar}H).

17.1.2 (4-Trifluormethylphenyl)-acetaldehyd (**95**)



$$M = 188.15 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_9\text{H}_7\text{F}_3\text{O}$$

Nach einer Vorschrift von EIBLER^[167] wird Methyl 4-trifluormethylphenylacetat (**98**) (3.08 g, 14.11 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (85 mL) gelöst und die Mischung auf -78 °C abgekühlt.

DIBAL-H-Lösung (1.0 M in CH₂Cl₂, 42.0 mL, 42.00 mmol, 3.0 Äq.) wird bei -78 °C innerhalb von 60 min zugetropft und die Lösung wird bei dieser Temperatur 3.5 h gerührt. Es wird auf -100 °C abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von MeOH (18 mL) beendet. Nachdem auf RT erwärmt wurde, wird die Lösung mit 1 M AcOH (160 mL) und Hexan (160 mL) versetzt. Es wird kräftig durchmischt und die wässrige Phase mit PE (3 × 160 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1 M AcOH (100 mL) und ges. NaCl-Lsg. (100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und durch Celite® filtriert. Es wird i. V. zur Trockne eingengt und das Produkt **95** als klare, farblose Flüssigkeit erhalten, die ohne weitere Reinigung eingesetzt wird.

Ausbeute: 2.51 g (94 % d. Th.).

HPLC: t_R = 3.752 min (Methode 2).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 3.79 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H, CH₂), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C^{ar}H), 7.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C^{ar}H), 9.79 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, CHO).

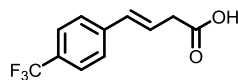
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 50.2 (CH₂), 124.0 (q, *J* = 272.5 Hz, CF₃), 125.8 (q, *J* = 3.8 Hz, C^{ar}HCCF₃), 129.8 (q, *J* = 32.7 Hz, C^{ar}CF₃), 130.0 (C^{ar}H), 135.9 (C^{ar}), 198.1 (CHO).

¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -62.7 (s, 3F, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2832 w, 1723 s, 1618 m, 1418 m, 1320 s, 1160 s, 1108 s, 1065 s, 1018 s, 829 m, 732 w.

HRMS (EI):	gemessen	berechnet	Ion
<i>m/z</i> =	188.04420	188.04490	[C ₉ H ₇ F ₃ O] ⁺

17.1.3 (*E*)-4-(*p*-Trifluormethylphenyl)-but-3-ensäure (**80**)



$M = 230.18 \text{ g mol}^{-1}$ C₁₁H₉F₃O₂

Angelehnt an eine Vorschrift von NAHRWOLD^[46] wird Malonsäure (1.05 g, 10.08 mmol, 2.2 Äq.) in DMSO (3.8 mL) gelöst. Die Lösung wird mit Essigsäure (5 µL, 0.09 mmol, 0.2 Äq.), gelöst in DMSO (110 µL), und Piperidin (9 µL, 0.09 mmol, 0.2 Äq.), ebenfalls in DMSO (110 µL) gelöst, versetzt. Es wird auf 65 °C erwärmt und (4-Trifluormethylphenyl)-acetaldehyd (**95**) (0.86 g, 4.56 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in DMSO (2 mL), innerhalb von 30 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 1.5 h bei 65 °C gerührt und dann auf RT abgekühlt. Es wird H₂O (20 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit Et₂O (4 × 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5 %iger KHSO₄-Lsg. (5 mL) und mit ges. NaCl-Lsg. (5 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel

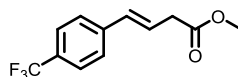
entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc = 8/1 + 1 % AcOH) gereinigt. Nach dreimaliger Coevaporation mit Toluol, wird die Säure **80** als hellgelber Feststoff isoliert. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[272]

Ausbeute: 481 mg (2.09 mmol, 46 %).

$R_f = 0.34$ (PE/EtOAc = 5/1 + 1 % AcOH).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 3.34 (dd, $J = 7.1, 1.4$ Hz, 2H, CH₂), 6.40 (dt, $J = 15.9, 7.1$ Hz, 1H, CH=CHCH₂), 6.56 (dm, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH=CHCH₂), 7.47 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H C^{ar}H), 7.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, C^{ar}H), 11.22 (br s, 1H, CO₂H).

17.1.4 (*E*)-4-[4-(Trifluormethyl)phenyl]prop-3-ensäuremethylester (**82**)



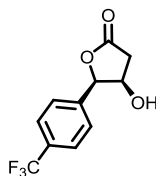
$$M = 244.21 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{O}_2$$

Der Vorschrift von NAHRWOLD^[46] folgend wird (*E*)-4-(*p*-Trifluormethylphenyl)-but-3-ensäure (**80**) (0.48 g, 2.08 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (22 mL) vorgelegt und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Thionylchlorid (227 μ L, 3.12 mmol, 1.5 Äq.) wird langsam zugetropft. Das Eisbad wird entfernt und die Reaktionsmischung 1 h bei RT gerührt. Es wird erneut auf 0 °C gekühlt und zum Beenden der Reaktion H₂O (16 mL) zugegeben. Nachdem weitere 10 min gerührt wurde, wird die wässrige Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden jeweils zweimal mit ges. NaHCO₃-Lsg. und mit H₂O gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i. V. entfernt. Das Produkt **82** wird als gelblicher Feststoff erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[273]

Ausbeute: 428 mg (84 % d. Th.).

$R_f = 0.33$ (PE/EtOAc = 1/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 3.29 (dd, $J = 7.1, 0.6$ Hz, 2H, CH₂), 3.73 (s, 3H, CH₃), 6.41 (dt, $J = 15.9, 7.1$ Hz, 1H, CH=CHCH₂), 6.53 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH=CHCH₂), 7.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, C^{ar}H), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, C^{ar}H).

17.1.5 (4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-[4-(trifluormethyl)phenyl]-dihydrofuran-2(3*H*)-on (99)

$$M = 246.18 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}$$

$\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17 mg, 0.047 mmol, 1 mol%), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (3.87 g, 11.77 mmol, 2.5 Äq.) und K_2CO_3 (1.95 g, 14.13 mmol, 3.0 Äq.) werden in H_2O (20.5 mL) gelöst, dann werden *tert*-Butanol (20.0 mL), $(\text{DHQD})_2\text{-PHAL}$ (36.5 mg, 0.047 mmol, 1 mol%) und Methansulfonamid (448 mg, 4.71 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Es wird auf 0 °C abgekühlt und die Reaktionsmischung mit dem Methylester **82** (1.15 g, 4.71 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in *tert*-Butanol (0.8 mL), versetzt. Nachdem das Gemisch 42 h kräftig bei 0 °C gerührt wurde, ist ein vollständiger Umsatz des Eduktes per DC zu erkennen. Na_2SO_3 (5.84 g, 47.10 mmol, 10.0 Äq.) und H_2O (10 mL) werden zugegeben, es wird auf RT erwärmt und weitere 2 h bei RT gerührt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (4 ×) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H_2O (2 ×) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und durch Kieselgel filtriert. Die Filtermasse wird mit ausreichend EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i. V. entfernt. Der Rückstand wird umkristallisiert (PE/EtOAc = 10/1) und mehrere Stunden im HV getrocknet. Es werden hellbeige Kristalle (307 mg, 1.25 mmol, 27 %, $[\alpha]_D^{RT} = -29.7$) erhalten. Das nichtkristalline Material wird mittels Flash-Chromatographie (PE/EtOAc = 3/2) gereinigt und ein weißer Feststoff (214 mg, 0.87 mmol, 18 %, $[\alpha]_D^{RT} = -27.7$) isoliert. Das erhaltene Produkt **99** ist jeweils enantiomerenrein, wie die chirale HPLC belegt.

Ausbeute (gesamt): 521 mg (2.12 mmol, 45 %).

$R_f = 0.21$ (PE/EtOAc = 1/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -29.7$ (c = 1.00 in MeOH).

HPLC: $t_R = 12.1$ min (Methode 3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.72 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, OH), 2.73 (dm, $J = 17.5$ Hz, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 2.93 (dd, $J = 17.5, 5.0$ Hz, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 4.70 (m, 1H, C^{β}H), 5.54 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

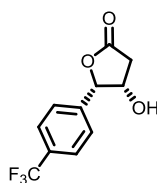
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 38.6 ($\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$), 70.1 (C^{β}H), 84.4 ($\text{C}^{\gamma}\text{H}$), 123.8 (q, $J = 272.3$ Hz, CF_3), 125.8 (q, $J = 3.5$ Hz, $\text{C}^{\text{ar}}\text{HCCF}_3$), 126.8 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 131.1 (q, $J = 32.6$ Hz, $\text{C}^{\text{ar}}\text{CF}_3$), 137.4 (C^{ar}), 175.0 (C=O).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -62.7 (s, 3F, CF_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3410 w, 2359 s, 2342 m, 2152 w, 2032 w, 1987 w, 1752 s, 1621 m, 1416 m, 1326 s, 1230 w, 1211 m, 1159 s, 1106 s, 1065 s, 1033 s, 1016 m, 987 m, 956 w, 901 w, 853 m, 792 s, 723 w, 703 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	281.01894	281.01978	$[\text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}+\text{Cl}]^-$
$m/z =$	527.06922	527.07016	$[(\text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{O})_2+\text{Cl}]^-$

17.1.6 (4*S*,5*S*)-4-Hydroxy-5-[4-(trifluormethyl)phenyl]-dihydrofuran-2(3*H*)-on (*ent*-**99**)



$$M = 246.18 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}$$

$\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.0 mg, 0.02 mmol, 1 mol%), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1.55 g, 4.7 mmol, 2.5 Äq.) und K_2CO_3 (0.78 g, 5.64 mmol, 3.0 Äq.) werden in H_2O (8.2 mL) gelöst, dann werden *tert*-Butanol (8.0 mL), (DHQ)₂-PHAL (15.0 mg, 0.02 mmol, 1 mol%) und Methansulfonamid (179 mg, 1.88 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Es wird auf 0 °C abgekühlt und die Reaktionsmischung mit dem Methylester **82** (0.46 g, 1.88 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in *tert*-Butanol (0.4 mL), versetzt. Nachdem das Gemisch 42 h kräftig bei 0 °C gerührt wurde, ist ein vollständiger Umsatz des Eduktes per DC zu erkennen. Na_2SO_3 (2.37 g, 18.80 mmol, 10.0 Äq.) und H_2O (4.0 mL) werden zugegeben, es wird auf RT erwärmt und weitere 2 h bei RT gerührt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (4 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H_2O (2 × 25 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und durch Kieselgel filtriert. Die Filtermasse wird mit ausreichend EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i. V. entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (PE/EtOAc = 3/2) gereinigt. Das Lacton *ent*-**99** wird enantiomerenrein als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

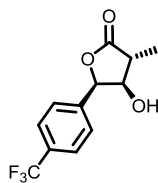
Ausbeute: 226 mg (0.92 mmol, 49 %).

$[\alpha]_D^{RT} = +31.1$ (c = 1.00 in MeOH).

HPLC: $t_R = 16.2$ min (Methode 3).

Die übrigen physikalischen Daten von *ent*-**99** entsprechen denen des Enantiomers **99**.

17.1.7 (3*R*,4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-[4-(trifluormethyl)phenyl]-3-methyl-dihydrofuran-2(3*H*)-on (100)



$$M = 260.21 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{O}_3$$

Diisopropylamin (0.45 mL, 3.05 mmol, 2.5 Äq.) wird in abs. THF (7.6 mL) gelöst und auf -78°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wird langsam *n*-BuLi (1.3 M in Hexan, 2.21 mL, 3.05 mmol, 2.5 Äq.) zugetropft und die Lösung wird 15 min bei -78°C und anschließend 30 min ohne Kältebad gerührt. Es wird erneut auf -78°C abgekühlt und **99** (300 mg, 1.22 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in abs. THF (5.1 mL), mittels Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 90 min zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei -78°C gerührt wurde, wird es auf -90°C abgekühlt und Methyljodid (0.22 mL, 3.66 mmol, 3.0 Äq.) mittels Spritzenpumpe innerhalb von 150 min bei dieser Temperatur zugetropft. Anschließend wird die Reaktionslösung 3 d bei -78°C gerührt und dann die Reaktion durch Zugabe von AcOH (0.12 mL) in abs. THF (0.25 mL) beendet. Der Ansatz wird auf RT erwärmt und dann am Rotationsverdampfer i. V. (50°C) eingengt, so dass eine dickflüssige, orangebraune Suspension zurückbleibt. Diese wird mit H_2O und Et_2O (jeweils 10 mL) in einen Scheidetrichter überführt und nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O ($4 \times 10 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5%iger KHSO_4 -Lsg. und ges. NaCl -Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. V. entfernt. Die Aufreinigung erfolgt durch Chromatographie an Kieselgel (Pentan/ $\text{EtOAc} = 1/1$), wobei **100** als hellbrauner Feststoff und diastereomerenrein ($^1\text{H-NMR}$) erhalten wird.

Ausbeute: 154 mg (0.592 mmol, 48 %).

$R_f = 0.53$ (Pentan/ $\text{EtOAc} = 1/1$).

$[\alpha]_D^{RT} = -10.5$ ($c = 1.00$ in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.41 (d, $J = 7.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.58 (s, 1H, OH), 2.76, (dq, $J = 7.7, 2.9$ Hz, 1H, C^αH), 4.36 (m, 1H, C^βH), 5.64 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, C^γH), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, C^{ar}H), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, C^{ar}H).

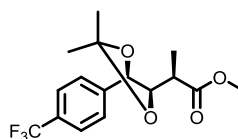
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 13.0 (CH_3), 43.7 (C^αH), 75.9 (C^βH), 81.8 (C^γH), 123.8 (q, $J = 272.3$ Hz, CF_3), 125.8 (q, $J = 3.5$ Hz, $\underline{\text{C}}^{ar}\text{HCCF}_3$), 126.7 (C^{ar}H), 131.1 (q, $J = 32.7$ Hz, $\underline{\text{C}}^{ar}\text{CF}_3$), 137.5 (C^{ar}), 177.8 ($\text{C}=\text{O}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -62.7 (s, 3F, CF_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3735 w, 2360 vs, 2341 s, 1172 w, 1321 w, 1165 w, 1108 w, 1065 w, 999 w, 792 w, 669 m.

HRMS (EI):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 260.06390$	260.06603	$[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{O}_3]^+$

17.1.8 (S)-2-[(4R,5R)-5-(4-(Trifluormethyl)phenyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]propansäuremethyl-ester (**101**)



$M = 332.31 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{O}_4$

Das Lacton **100** (206 mg, 0.793 mmol, 1.0 Äq.) und Amberlyst-15[®] (16 mg) werden in einem ausgeheizten Schlenkcolben vorgelegt und anschließend werden abs. MeOH (0.26 mL) und abs. Acetondimethylacetal (0.98 mL) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 8 d bei RT gerührt, dann mit Pentan verdünnt und durch ein Celitepad filtriert. Der Filterkuchen wird mit Pentan (200 mL) nachgewaschen und die vereinigten Filtrate werden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO_4 wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. V. entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 20/1) gereinigt. Dabei wird das gewünschte Produkt **101** als gelbliches Öl isoliert.

Ausbeute: 152 mg (2.12 mmol, 58 %).

$R_f = 0.48$ (Pentan/EtOAc = 15/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -11.5$ ($c = 1.00$ in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.28 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{C}^\alpha\text{HCH}_3$), 1.48 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.56 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.70 (m, 1H, C^αH), 3.44 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.09 (dd, $J = 8.2, 6.1$ Hz, 1H, C^βH), 4.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, C^γH), 7.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, C^{ar}H), 7.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, C^{ar}H).

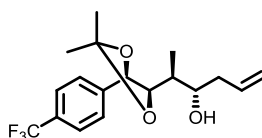
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.9 ($\text{C}^\alpha\text{HCH}_3$), 27.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 41.5 (C^αH), 51.3 (CO_2CH_3), 80.6 (C^βH), 83.3 (C^γH), 109.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 124.0 (q, $J = 272.2$ Hz, CF_3), 125.4 (q, $J = 3.4$ Hz, $\text{C}^{ar}\text{HCCF}_3$), 127.6 (C^{ar}H), 130.7 (q, $J = 32.7$ Hz, C^{ar}CF_3), 141.7 (C^{ar}), 173.6 (CO_2).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -62.7 (s, 3F, CF_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2987 w, 2941 w, 1735 s, 1621 w, 1456 m, 1435 w, 1422 w, 1372 m, 1322 s, 1236 m, 1162 m, 1162 m, 1121 m, 1063 s, 1016 s, 982 w, 888 m, 833 s, 812 m, 766 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 355.11285$	355.11276	$[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{O}_4+\text{Na}]^+$

17.1.9 (2S,3S)-2-[(4R,5R)-5-(4-(Trifluormethyl)phenyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]hex-5-en-3-ol (75)



$$M = 344.37 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{O}_3$$

Eine Lösung von **101** (145 mg, 0.436 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (2.7 mL) wird auf -78°C gekühlt. Innerhalb von 10 min wird eine Lösung von DIBAL-H (1.2 M in Toluol, 0.84 mL, 1.00 mmol, 2.3 Äq.) zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 4.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Nachdem auf -100°C abgekühlt wurde, wird die Reaktion durch langsame Zugabe von abs. MeOH (0.55 mL) beendet. Die Lösung wird auf RT erwärmt und mit 1 M AcOH (10 mL) und Pentan (10 mL) verdünnt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Pentan (4×10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1 M AcOH (6 mL) und ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer i. V. eingengt. Als Rohprodukt wird (R)-2-[(4R,5R)-5-(4-Trifluormethyl)phenyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]propanal (**102**) erhalten, das unter Argon-schutzatmosphäre über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

Dazu wird der Aldehyd **102** (0.436 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (0.33 mL) gelöst und bei -78°C zu einer Lösung von $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (171 mg, 0.664 mmol, 1.5 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (0.37 mL) getropft. Die Mischung wird 15 min gerührt, wobei sich die Lösung rot färbt. Anschließend wird Allyltri-*n*-butylstannan (205 μL , 0.660 mmol, 1.5 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (0.90 mL) langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch über Nacht bei -78°C gerührt. Nachdem Et_2O (15 mL) zugegeben und die Lösung auf RT erwärmt wurde, wird sie mit H_2O (10 mL) versetzt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Et_2O (3×15 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 12/1) und Trocknung im HV wird ein klares, farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 106 mg (0.308 mmol, 71 % über 2 Stufen).

$R_f = 0.26$ (Pentan/EtOAc = 10/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -1.5$ ($c = 1.00$ in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.09 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.50 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.56 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.75 (ddq, $J = 7.0, 5.9, 2.0$ Hz, 1H, CHCH_3), 2.13 (m, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CH}=\text{CH}_2$), 2.20 (br m, 1H, OH), 2.30 (m, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.59 (m, 1H, CHOH), 4.11 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H, C^4H), 4.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, C^5H), 4.96-5.07 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.72 (dddd, $J = 16.9, 10.1, 7.7, 6.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 7.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10.5 (CHCH_3), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 36.4 (CHCH_3), 39.5 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 73.2 (CHOH), 79.2 (C^5H), 82.6 (C^4H), 109.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 118.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 124.0 (q, $J = 272.2$ Hz, CF_3), 125.5 (q, $J = 3.7$ Hz, $\text{C}^{\text{ar}}\text{HCCF}_3$), 126.9 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 130.4 (q, $J = 32.4$ Hz, $\text{C}^{\text{ar}}\text{CF}_3$), 134.6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 142.1 (C^{ar}).

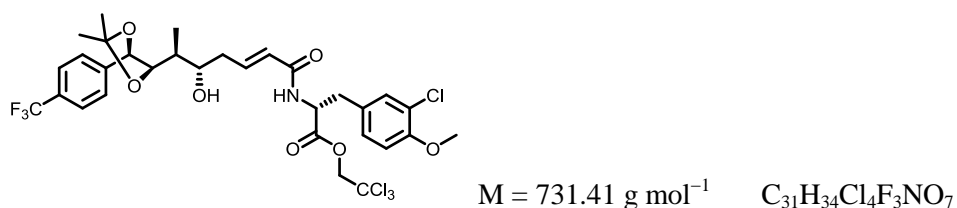
$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -62.6 (s, 3F, CF_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3453 br w, 2984 w, 2934 w, 1640 w, 1621 w, 1457 w, 1419 w, 1381 w, 1371 w, 1322 s, 1233 m, 1163 m, 1122 s, 1065 s, 1015 s, 994 m, 915 w, 887 m, 832 s, 767 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 379.12961$	379.12933	$[\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{O}_3 + \text{Cl}]^-$

17.2 Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation

17.2.1 H-uA[Acetonid]- C^4 -Trifluormethyl-uB-OTce (103)



Eine Mischung aus dem B-Fragmentvorläufer **16** (154 mg, 0.366 mmol, 1.2 Äq.) und Grubbs-II-Katalysator (13 mg, 0.015 mmol, 5 mol%) wird zusammen mit einem Magnetrührkern 1 h im HV getrocknet. Unter Argonatmosphäre wird das Gemisch in abs. CH_2Cl_2 (2.0 mL) aufgenommen und bei RT mit einer Lösung von A-Fragmentvorläufer **75** (105 mg, 0.305 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH_2Cl_2 (1.35 mL) versetzt. Der Ansatz wird über Nacht in einem abgedunkelten Reaktionsgefäß unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf RT abgekühlt. Das Lösungsmittel wird i. V. entfernt (Badtemperatur ≤ 30 °C) und der Rückstand direkt durch Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 2/1 \rightarrow 1/1 \rightarrow 6/4) gereinigt. Nach Trocknung im HV werden 170 mg eines Gemisches erhalten, das aus 145 mg (85 %) des gewünschten Metatheseprodukts **103** und 25 mg (15 %) B-Fragment-

Homokupplungsprodukts **106** besteht. Das Nebenprodukt kann in der darauffolgenden Reaktion abgetrennt werden. Aufgrund dieser Verunreinigung wurde kein Drehwert bestimmt sowie kein IR-Spektrum aufgenommen.

Physikalische Daten von **103**:

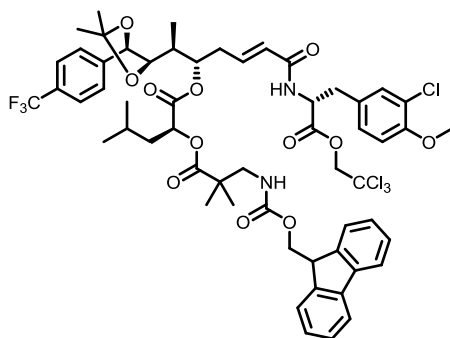
$R_f = 0.24$ (Pentan/EtOAc = 6/4).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.04 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA-C^eHCH₃), 1.46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.51 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.72 (m, 1H, uA-C^eH), 2.23 (m, 1H, uA-C^{\gamma}H^AH^B), 2.34 (m, 1H, uA-C^{\gamma}H^AH^B), 2.36 (br m, 1H, uA-OH), 3.05 (dd, $J = 14.2, 6.1$ Hz, 1H, uB-C^{\beta}H^AH^B), 3.13 (dd, $J = 14.4, 5.8$ Hz, 1H, uB-C^{\beta}H^AH^B), 3.66 (br m, uA-C^{\delta}H), 3.83 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.02 (dd, $J = 8.9, 2.1$ Hz, 1H, uA-C^{\zeta}H), 4.67 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.74 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.80 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, uA-C^{\eta}H), 4.99 (ddd, $J = 7.7, 6.0, 5.9$ Hz, 1H, uB-C^{\alpha}H), 5.75 (dm, $J = 15.3$ Hz, 1H, uA-C^{\alpha}H), 5.84 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, uB-NH), 6.79 (ddd, $J = 15.1, 8.0, 7.9$ Hz, 1H, uA-C^{\beta}H), 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C^{\delta}H), 6.98 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H, uB-C^{\delta}H), 7.12 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, uB-C²H), 7.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, C^{ar}H), 7.57 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, C^{ar}H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10.6 (uA-C^eHCH₃), 27.0 (uA-C(CH₃)₂), 27.1 (uA-C(CH₃)₂), 36.5 (uA-C^{\gamma}H₂), 36.9 (uA-C^eH), 37.7 (uB-C^{\beta}H₂), 53.0 (uB-C^{\alpha}H), 56.1 (uB-OCH₃), 73.3 (uA-C^{\delta}H), 74.7 (uB-CH₂CCl₃), 79.1 (uA-C^{\eta}H), 82.7 (uA-C^{\zeta}H), 94.2 (uB-CCl₃), 109.3 (uA-C(CH₃)₂), 112.2 (uB-C^{\delta}H), 122.5 (uB-C³), 124.0 (q, $J = 272.0$ Hz, CF₃), 125.2 (uA-C^{\alpha}H), 125.6 (q, $J = 3.7$ Hz, C^{ar}HCCF₃), 126.9 (uA-C^{ar}H), 128.4 (uB-C^{\delta}H), 128.5 (uB-C¹), 130.5 (q, $J = 32.4$ Hz, C^{ar}CF₃), 130.9 (uB-C²H), 141.9 (uA-C^{ar}), 142.3 (uA-C^{\beta}H), 154.2 (uB-C⁴), 165.0 (uA-C=O), 170.1 (uB-C=O).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -62.5 (s, 3F, CF₃).

HRMS (MALDI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	752.09273	752.09337	[C ₃₁ H ₃₄ Cl ₄ F ₃ NO ₇ +Na] ⁺
$m/z =$	768.06697	768.06731	[C ₃₁ H ₃₄ Cl ₄ F ₃ NO ₇ +K] ⁺

17.2.2 *seco*-uA[Acetonid]-C^{4'}-Trifluormethyl-Cryptophycin-52 (**104**)

$$M = 1166.92 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{57}\text{H}_{63}\text{Cl}_4\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{12}$$

Die Estersynthese erfolgt gemäß AAV-9, ausgehend von AB-Segment **103** (145 mg, 0.198 mmol, 1.0 Äq.; als Gemisch mit 25 mg B-Fragment-Homokupplungsprodukt) und CD-Segment **27** (135 mg, 0.296 mmol, 1.5 Äq.). Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 2/1) und Trocknung im HV wird **104** als farbloser, erstarrter Schaum erhalten.

Ausbeute: 151 mg (0.129 mmol, 65 %).

$R_f = 0.32$ (Pentan/EtOAc = 2/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -13.2$ (c = 1.00 in CHCl_3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.89 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.13 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, uA-C ^{ϵ} HCH₃), 1.14 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.22 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.47 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.49 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.53 (m, 1H, uD-C ^{β} H^AH^B), 1.70-1.81 (m, 2H, uD-C ^{β} H^AH^B und uD-C ^{γ} H), 1.95 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H), 2.46 (m, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 2.57 (m, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 3.04 (dd, $J = 14.2, 6.7$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.16 (dd, $J = 14.2, 5.7$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.38 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, uC-CH₂NH), 3.79-3.85 (m, 4H, uB-OCH₃ und uA-C ^{ζ} H), 4.21 (m, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.30-4.37 (m, 2H, CHCH₂, Fmoc), 4.64 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.76 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, uA-C ^{η} H), 4.93 (dd, $J = 9.9, 3.4$ Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 5.02 (m, 1H, uB-C ^{α} H), 5.08 (m, 1H, uA-C ^{δ} H), 5.78 (dm, $J = 15.7$ Hz, 1H, uA-C ^{α} H), 6.03 (m, 1H, NH), 6.41 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 6.71 (ddd, $J = 15.5, 6.5, 6.5$ Hz, 1H, uA-C ^{β} H), 6.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C ^{$5'$} H), 7.02 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, uB-C ^{$6'$} H), 7.14 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, uB-C ^{$2'$} H), 7.25-7.30 (m, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc), 7.35-7.41 (m, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc), 7.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, uA-C^{*ar*}H), 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, uA-C^{*ar*}H), 7.60-7.65 (m, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc), 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.2 (uA-C ^{ϵ} HCH₃), 21.4 (uD-C ^{δ} H₃), 22.2 (uC-C(CH₃)₂), 22.7 (uC-C(CH₃)₂), 23.1 (uD-C ^{δ} H₃), 24.9 (uD-C ^{γ} H), 26.99 (uA-C(CH₃)₂), 27.01 (uA-C(CH₃)₂), 32.6 (uA-C ^{γ} H₂), 35.5 (uA-C ^{ϵ} H), 36.5 (uB-C ^{β} H₂), 39.3 (uD-C ^{β} H₂), 44.1 (uC-C(CH₃)₂), 47.2 (CHCH₂, Fmoc), 49.4 (uC-CH₂NH), 53.2 (uB-C ^{α} H), 56.0 (uB-OCH₃), 66.8 (CHCH₂, Fmoc), 71.1 (uD-C ^{α} H), 74.6 (uB-CH₂CCl₃), 75.7 (uA-C ^{δ} H), 79.3 (uA-C ^{η} H), 81.9 (uA-C ^{ζ} H), 94.2 (uB-CCl₃), 109.5 (uA-

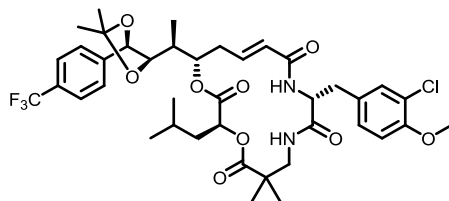
$\underline{C}(\text{CH}_3)_2$, 112.0 (uB-C⁵H), 119.9 (C^{ar}H, Fmoc), 122.2 (uB-C³), 123.9 (q, $J = 272.1$ Hz, CF₃), 125.3 (C^{ar}H, Fmoc), 125.5 (uA-C^αH), 125.7 (q, $J = 3.7$ Hz, $\underline{C}^{ar}\text{HCCF}_3$), 126.7 (uA-C^{ar}H), 127.6 (C^{ar}H, Fmoc), 128.4 (uB-C⁶H), 128.7 (uB-C¹), 130.6 (q, $J = 32.5$ Hz, $\underline{C}^{ar}\text{CF}_3$), 131.1 (uB-C²H), 138.9 (uA-C^βH), 141.22, 141.24 (C^{ar}), 141.9 (uA-C^{ar}), 144.0 (C^{ar}), 154.0 (uB-C⁴), 156.9 (uC-NHCO₂), 165.1 (uA-C=O), 169.9 171.0, 176.7 (C=O).

¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -62.6 (s, 3F, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3320 br w, 2960 br w, 2014 w, 1978 w, 1723 vs, 1676 m, 1644 m, 1521 m, 1502 s, 1449 m, 1371 w, 1323 s, 1255 br m, 1123 br s, 1065 s, 1015 br m, 889 w, 832 m, 809 m, 758 m, 740 m, 718 m.

HRMS (MALDI -FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	1187.29628	1187.29794	[C ₅₇ H ₆₃ Cl ₄ F ₃ N ₂ O ₁₂ +Na] ⁺
$m/z =$	1203.27139	1203.27188	[C ₅₇ H ₆₃ Cl ₄ F ₃ N ₂ O ₁₂ +K] ⁺

17.2.3 uA[Acetonid]-C^{4'}-Trifluormethyl-Cryptophycin-52 (105)



$M = 795.28 \text{ g mol}^{-1}$ C₄₀H₅₀ClF₃N₂O₉

Ausgehend von **104** (150 mg, 0.129 mmol) erfolgt die Makrolactamisierung gemäß AAV-10. Die Flash-chromatographische Reinigung (Pentan/EtOAc = 1/2) und Trocknung im HV ergibt **105** als farblosen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 84 mg (0.106 mmol, 82 %).

$R_f = 0.28$ (Pentan/EtOAc = 1/2).

$[\alpha]_D^{RT} = +10.6$ (c = 0.93 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.78 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C^δH₃), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C^δH₃), 1.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.15 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.21 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.25 (ddd, $J = 13.6, 9.4, 3.6$ Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.47 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.48 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.62 (m, 1H, uD-C^γH), 1.73 (ddd, $J = 13.8, 10.5, 5.0$ Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.83 (m, 1H, uA-C^εH), 2.24 (ddd, $J = 14.4, 11.0, 11.0$ Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.57 (dm, $J = 14.6$ Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 3.03 (dd, $J = 14.6, 7.6$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.10 (dd, $J = 14.6, 5.0$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.13 (dd, $J = 13.5, 3.6$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.38 (dd, $J = 13.5, 8.4$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.77

(dd, $J = 8.7, 1.6$ Hz, 1H, uA-C⁵H), 3.87 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.73 (ddd, $J = 7.7, 5.1, 5.1$ Hz, 1H, uB-C^αH), 4.75 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, uA-C^ηH), 4.76 (dd, $J = 10.4, 3.6$ Hz, 1H, uD-C^αH), 5.04 (ddd, $J = 11.4, 7.4, 2.1$ Hz, 1H, uA-C^δH), 5.57 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 5.67 (dm, $J = 15.1$ Hz, 1H, uA-C^αH), 6.69 (ddd, $J = 15.1, 10.6, 4.3$ Hz, 1H, uA-C^βH), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C⁵H), 7.05 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, uB-C⁶H), 7.18 (m, 1H, NH), 7.19 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, uB-C²H), 7.45 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, uA-C^{ar}H), 7.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, uA-C^{ar}H).

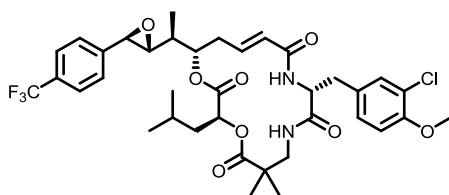
¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.5 (uA-C^εHCH₃), 21.2 (uD-C^δH₃), 22.7 (uC-C(CH₃)₂), 22.8 (uC-C(CH₃)₂), 22.9 (uD-C^δH₃), 24.6 (uD-C^γH), 26.96 (uA-C(CH₃)₂), 27.03 (uA-C(CH₃)₂), 35.3 (uB-C^βH₂), 36.1 (uA-C^γH₂), 36.5 (uA-C^εH), 39.5 (uD-C^βH₂), 42.7 (uC-C(CH₃)₂), 46.4 (uC-CH₂NH), 54.3 (uB-C^αH), 56.1 (uB-OCH₃), 71.0 (uD-C^αH), 75.8 (uA-C^δH), 79.1 (uA-C^ηH), 82.1 (uA-C⁵H), 109.7 (uA-C(CH₃)₂), 112.3 (uB-C⁵H), 122.5 (uB-C³), 123.9 (q, $J = 272.5$ Hz, CF₃), 124.4 (uA-C^αH), 125.7 (q, $J = 3.5$ Hz, C^{ar}HCCF₃), 126.5 (uA-C^{ar}H), 128.2 (uB-C⁶H), 129.5 (uB-C¹), 130.6 (q, $J = 32.5$ Hz, C^{ar}CF₃), 130.9 (uB-C²H), 142.2 (uA-C^βH und uA-C^{ar}), 154.0 (uB-C⁴), 165.0 (uA-C(O)NH), 170.1 (C(O)NH), 170.2, 177.9 (C=O).

¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -62.6 (s, 3F, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3411 br w, 2961 br w, 1747 m, 1719 m, 1655 br m, 1503 s, 1472 w, 1370 w, 1324 s, 1257 w, 1125 br s, 1066 s, 1015 m, 969 w, 869 w, 832 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 817.30490$	817.30491	[C ₄₀ H ₅₀ ClF ₃ N ₂ O ₉ +Na] ⁺

17.2.4 uA-C⁴-Trifluormethyl-Cryptophycin-52 (74)



$M = 737.20 \text{ g mol}^{-1}$ C₃₇H₄₄ClF₃N₂O₈

Das Acetonid **105** (31 mg, 0.039 mmol) wird AAV-11 – AAV-14 entsprechend umgesetzt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 1/3) gereinigt und das gereinigte Produkt wird mit CH₃CN/H₂O versetzt und lyophilisiert. Das Epoxid **74** wird als voluminöser, farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 11.3 mg (0.015 mmol, 39 % über 4 Stufen).

$R_f = 0.35$ (Pentan/EtOAc = 1/3).

$[\alpha]_D^{RT} = +16.8$ ($c = 0.45$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 1.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{uA-C}^\epsilon\text{HCH}_3$), 1.16 (s, 3H, $\text{uC-C}(\text{CH}_3)_2$), 1.22 (s, 3H, $\text{uC-C}(\text{CH}_3)_2$), 1.30 (ddd, $J = 13.9, 8.8, 3.6$ Hz, 1H, $\text{uD-C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.65 (m, 1H, $\text{uD-C}^\gamma\text{H}$), 1.73 (ddd, $J = 14.6, 10.6, 4.9$ Hz, 1H, $\text{uD-C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.82 (m, 1H, $\text{uA-C}^\epsilon\text{H}$), 2.43 (ddd, $J = 14.5, 11.1, 11.0$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\gamma\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 2.57 (ddd, $J = 14.5, 2.2, 2.2$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\gamma\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 2.90 (dd, $J = 7.4, 1.9$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\zeta\text{H}$), 3.03-3.13 (m, 3H, $\text{uB-C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$, $\text{uB-C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$ und $\text{uC-CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{NH}$), 3.42 (dd, $J = 13.5, 8.6$ Hz, 1H, $\text{uC-CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{NH}$), 3.74 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\eta\text{H}$), 3.87 (s, 3H, uB-OCH_3), 4.74 (ddd, $J = 7.5, 7.4, 5.3$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^\alpha\text{H}$), 4.82 (dd, $J = 10.3, 3.5$ Hz, 1H, $\text{uD-C}^\alpha\text{H}$), 5.20 (ddd, $J = 11.3, 5.0, 2.0$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\delta\text{H}$), 5.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 5.72 (dm, $J = 15.1$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\alpha\text{H}$), 6.76 (ddd, $J = 14.9, 10.6, 4.2$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\beta\text{H}$), 6.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^5\text{H}$), 7.04 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^6\text{H}$), 7.19 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^2\text{H}$), 7.20 (m, 1H, NH), 7.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $\text{uA-C}^{\text{ar}}\text{H}$), 7.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $\text{uA-C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 13.5 ($\text{uA-C}^\epsilon\text{HCH}_3$), 21.3 ($\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 22.7 ($\text{uC-C}(\text{CH}_3)_2$), 22.8 ($\text{uC-C}(\text{CH}_3)_2$), 22.9 ($\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 24.6 ($\text{uD-C}^\gamma\text{H}$), 35.3 ($\text{uB-C}^\beta\text{H}_2$), 36.9 ($\text{uA-C}^\gamma\text{H}_2$), 39.4 ($\text{uD-C}^\beta\text{H}_2$), 40.5 ($\text{uA-C}^\epsilon\text{H}$), 42.7 ($\text{uC-C}(\text{CH}_3)_2$), 46.4 ($\text{uC-CH}_2\text{NH}$), 54.3 ($\text{uB-C}^\alpha\text{H}$), 56.1 (uB-OCH_3), 58.2 ($\text{uA-C}^\eta\text{H}$), 63.5 ($\text{uA-C}^\zeta\text{H}$), 71.1 ($\text{uD-C}^\alpha\text{H}$), 75.7 ($\text{uA-C}^\delta\text{H}$), 112.3 ($\text{uB-C}^5\text{H}$), 122.6 (uB-C^3), 123.9 (q, $J = 271.8$ Hz, CF_3), 124.7 ($\text{uA-C}^\alpha\text{H}$), 125.7 (q, $J = 3.6$ Hz, $\text{C}^{\text{ar}}\text{HCCF}_3$), 125.8 ($\text{uA-C}^{\text{ar}}\text{H}$), 128.3 ($\text{uB-C}^6\text{H}$), 129.3 (uB-C^1), 130.7 (q, $J = 32.7$ Hz, $\text{C}^{\text{ar}}\text{CF}_3$), 130.9 ($\text{uB-C}^2\text{H}$), 140.9 (uA-C^{ar}), 141.6 ($\text{uA-C}^\beta\text{H}$), 154.1 (uB-C^4), 164.8 ($\text{uA-C}(\text{O})\text{NH}$), 170.2 ($\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 170.4, 178.0 ($\text{C}=\text{O}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = -62.6 (s, 3F, CF_3).

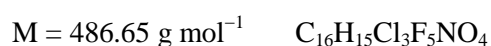
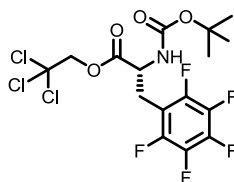
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3851 w, 3733 w, 3674 w, 3415 w, 3272 w, 2958 br w, 2167 w, 1970 w, 1748 m, 1718 m, 1654 br m, 1504 br s, 1472 m, 1324 s, 1257 m, 1126 br s, 1066 s, 1017 m, 970 w, 894 w, 838 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	737.28008	737.28111	$[\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_8+\text{H}]^+$
$m/z =$	759.26191	759.26305	$[\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_8+\text{Na}]^+$

18 Synthese eines Pentafluorphenyl-funktionalisierten Cryptophycins

18.1 Synthese des fluorierten Fragment-B-Bausteins

18.1.1 (*R*)-2,2,2-Trichlorethyl 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(perfluorphenyl)-propanoat (**108**)



In Analogie zu NAHRWOLD^[46] wird Boc-Pentafluor-D-phenylalanin (**107**) (1.00 g, 2.82 mmol, 1.00 Äq.) in abs. CH₂Cl₂ (14 mL) gelöst. Nacheinander werden abs. Pyridin (0.46 mL, 5.63 mmol, 2.00 Äq.) und Trichlorethanol (0.41 mL, 4.22 mmol, 1.50 Äq.) bei RT zugegeben, dann wird die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt. Gleichzeitig wird DCC (612 mg, 2.96 mmol, 1.05 Äq.) 30 min unter HV getrocknet, in abs. CH₂Cl₂ (1.0 mL) suspendiert und bei 0 °C zur Reaktionsmischung zugetropfelt. Die Suspension wird anschließend über Nacht bei dieser Temperatur gerührt. Da die Reaktion nicht vollständig verlaufen war (DC-Kontrolle), wird der Lösung erneut bei 0 °C abs. Pyridin (0.46 mL, 5.63 mmol, 2.00 Äq.), Trichlorethanol (0.41 mL, 4.22 mmol, 1.50 Äq.) und festes DCC (260 mg, 1.27 mmol, 0.45 Äq.) zugefügt. Der Ansatz wird weitere 5.5 h bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wird der Feststoff abfiltriert und der Filter mit CH₂Cl₂ (4 × 5 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wird mittels Flash-Chromatographie (PE/EtOAc = 15/1) gereinigt und das Produkt **108** als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.14 g (2.34 mmol, 83 %).

$R_f = 0.32$ (Hexan/EtOAc = 10/1).

HPLC: $t_R = 5.6$ min (Methode 2).

$[\alpha]_D^{RT} = -7.8$ (c = 1.00 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.12 (dd, $J = 14.1, 8.2$ Hz, 1H, C ^{β} H^AH^B), 3.42 (dd, $J = 14.1, 5.0$ Hz, 1H, C ^{β} H^AH^B), 4.73 (ddd, $J = 8.4, 5.2, 5.1$ Hz, 1H, C ^{α} H), 4.79 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH^AH^BCCl₃), 4.82 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH^AH^BCCl₃), 5.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH).

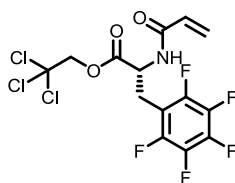
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 25.9 (C^βH_2), 28.1 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 52.6 (C^αH), 74.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CCl}_3$), 80.7 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 94.1 (CCl_3), 109.6 (tm, $J = 18.2$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\underline{\text{C}}^{ipso}$), 137.4 (dm, $J = 251.3$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\underline{\text{C}}^{meta}$), 140.5 (dm, $J = 251.3$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\underline{\text{C}}^{para}$), 145.5 (dm, $J = 246.2$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\underline{\text{C}}^{ortho}$), 154.8 (NCO_2), 169.6 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = -142.3 (dd, $J = 22.4, 8.2$ Hz, 2F, F^{ortho}), -155.0 (t, $J = 20.8$ Hz, 1F, F^{para}), -161.9 (td, $J = 21.6, 8.2$ Hz, 2F, F^{meta}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3481 w, 2357 w, 2341 w, 1763 m, 1693 s, 1523 s, 1501 s, 1444 w, 1369 m, 1270 m, 1250 w, 1157 s, 1123 w, 1061 m, 959 s, 889 w, 826 w, 776 m, 720 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 507.98737$	507.98790	$[\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Cl}_3\text{F}_5\text{NO}_4 + \text{Na}]^+$

18.1.2 (*R*)-2,2,2-Trichlorethyl 2-acrylamido-3-(perfluorphenyl)propanoat (77)



$M = 440.58 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{F}_5\text{NO}_3$

In Anlehnung an eine Literaturvorschrift^[46] wird eine Lösung von **108** (728 mg, 1.50 mmol, 1.0 Äq.) in TFA (1.46 ml) 2 h bei RT gerührt, dann i. Vak. zur Trockne eingengt und zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird in CH_2Cl_2 (18 mL) aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird über Nacht im HV getrocknet und anschließend in abs. CH_2Cl_2 (10 mL) aufgenommen. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt und mit abs. NEt_3 (0.83 mL, 5.98 mmol, 4.0 Äq.) und Acryloylchlorid (278 μL , 3.74 mmol, 2.5 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 7 h in einem abgedunkelten Kolben bei 0 °C gerührt, dann mit EtOAc (47 mL) und 5%iger KHSO_4 -Lsg. (10 mL) verdünnt und in einen Scheidetrichter überführt. Nach Phasentrennung wird die organische Phase mit ges. NaHCO_3 -Lsg. und ges. NaCl -Lsg. (je 10 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingengt. Reinigung durch Flash-Chromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O} = 25/1$) ergibt einen farblosen, kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 373 mg (0.847 mmol, 57 %).

$R_f = 0.25$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -29.6$ ($c = 1.00$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 3.19 (dd, $J = 14.2, 7.7$ Hz, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 3.48 (dd, $J = 14.2, 5.3$ Hz, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 4.80 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CCl}_3$), 4.83 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CCl}_3$), 5.15 (ddd, $J = 7.9, 5.4, 5.3$ Hz, 1H, C^αH), 5.73 (dd, $J = 10.4, 1.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2^{\text{trans}}$), 6.08 (m, 1H, NH), 6.10 (dd, $J = 16.9, 10.4$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.28 (dd, $J = 17.0, 1.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2^{\text{cis}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 25.6 (C^βH_2), 51.2 (C^αH), 75.0 (CH_2CCl_3), 94.0 (CCl_3), 109.3 (tm, $J = 18.2$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{ipso}}$), 128.2 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 129.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 137.4 (dm, $J = 252.4$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{meta}}$), 140.6 (dm, $J = 254.4$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{para}}$), 145.5 (dm, $J = 245.9$ Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{ortho}}$), 165.2 (NCO_2), 169.3 (CO_2CH_2).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = -142.3 (dd, $J = 21.9, 7.7$ Hz, 2F, F^{ortho}), -154.3 (t, $J = 20.8$ Hz, 1F, F^{para}), -161.5 (td, $J = 21.9, 8.1$ Hz, 2F, F^{meta}).

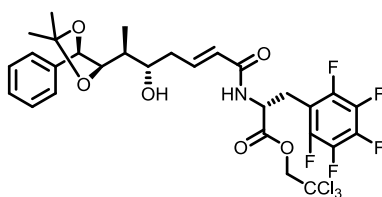
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3339 w, 2358 m, 2340 m, 1739 s, 1660 m, 1629 w, 1519 s, 1502 s, 1449 w, 1374 w, 1311 m, 1218 m, 1190 m, 1126 w, 1051 m, 1023 w, 983 m, 956 s, 827 w, 807 s, 785 m, 720 s.

HRMS (MALDI-FT-ICR):

gemessen	berechnet	Ion
$m/z = 461.94609$	461.94604	$[\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{F}_5\text{NO}_3 + \text{Na}]^+$

18.2 Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation

18.2.1 H-uA[Acetonid]-uB-Pentafluorphenyl-OTce (109)



$M = 688.90 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Cl}_3\text{F}_5\text{NO}_6$

Eine Mischung aus dem B-Fragmentvorläufer **77** (100 mg, 0.227 mmol, 1.0 Äq.) und Grubbs-II-Katalysator (10.5 mg, 0.015 mmol, 5 mol%) wird in abs. CH_2Cl_2 (1.50 mL) gelöst und 45 min bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung mit dem A-Fragmentvorläufer **9** (75 mg, 0.272 mmol, 1.2 Äq.), gelöst in abs. CH_2Cl_2 (0.75 mL), versetzt und über Nacht in einem abgedunkelten Kolben unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch (Pentan/EtOAc = 3/1) gereinigt. Es wird ein bräunliches, hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 67 mg (0.097 mmol, 43 %).

$R_f = 0.56$ (Pentan/EtOAc = 2/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -20.6$ ($c = 0.98$ in CHCl_3).

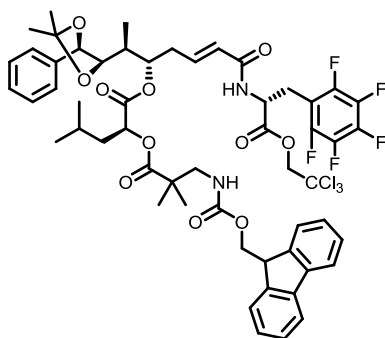
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.06 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.49 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.56 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.77 (m, 1H, uA-C^εH), 2.23-2.36 (m, 2H, uA-C^γH₂), 2.53 (br m, 1H, uA-OH), 3.15 (dd, $J = 14.1, 7.6$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.42 (dd, $J = 14.3, 5.6$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.69 (br m, uA-C^δH), 4.05 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H, uA-C^ζH), 4.78 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, uA-C^ηH), 4.81 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 5.08 (ddd, $J = 7.8, 5.5, 5.5$ Hz, 1H, uB-C^αH), 5.67 (dm, $J = 15.4$ Hz, 1H, uA-C^αH), 5.95 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, uB-NH), 6.76 (ddd, $J = 14.9, 7.4, 7.3$ Hz, 1H, uA-C^βH), 7.32-7.38 (m, 5H, uA-C^{ar}H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10.9 (uA-C^εHCH₃), 25.7 (uB-C^βH₂), 27.0 (uA-C(CH₃)₂), 27.2 (uA-C(CH₃)₂), 36.5 (uA-C^εH), 37.6 (uA-C^γH₂), 51.2 (uB-C^αH), 73.5 (uA-C^δH), 74.9 (uB-CH₂CCl₃), 79.9 (uA-C^ηH), 82.7 (uA-C^ζH), 94.0 (uB-CCl₃), 109.0 (uA-C(CH₃)₂), 109.4 (tm, $J = 18.2$ Hz, C₆F₅C^{ipso}), 124.7 (uA-C^αH), 126.8, 128.5, 128.7 (uA-C^{ar}H), 137.4 (uA-C^{ar}), 137.4 (dm, $J = 252.5$ Hz, C₆F₅C^{meta}), 140.5 (dm, $J = 254.8$ Hz, C₆F₅C^{para}), 142.8 (uA-C^βH), 145.5 (dm, $J = 245.9$ Hz, C₆F₅C^{ortho}), 165.2 (uA-C=O), 169.4 (uB-C=O).

$^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -142.2 (dd, $J = 22.5, 8.0$ Hz, 2F, F^{ortho}), -154.5 (t, $J = 20.9$ Hz, 1F, F^{para}), -161.6 (td, $J = 21.6, 7.9$ Hz, 2F, F^{meta}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2983 w, 2935 w, 2359 vs, 2341 s, 1736 m, 1670 m, 1637 m, 1520 s, 1503 s, 1453 w, 1371 m, 1235 m, 1167 m, 1123 w, 1040 m, 970 m, 882 w, 811 w, 755 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	710.08810	710.08728	[C ₂₉ H ₂₉ Cl ₃ F ₅ NO ₆ +Na] ⁺
$m/z =$	726.06204	726.06122	[C ₂₉ H ₂₉ Cl ₃ F ₅ NO ₆ +K] ⁺
$m/z =$	1397.18624	1397.18534	[(C ₂₉ H ₂₉ Cl ₃ F ₅ NO ₆) ₂ +Na] ⁺

18.2.2 *seco*-uA[Acetonid]-uB-Pentafluorphenyl-Cryptophycin-52 (**110**)

$$M = 1124.41 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{55}\text{H}_{58}\text{Cl}_3\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_{11}$$

Die Estersynthese erfolgt gemäß AAV-9, ausgehend von AB-Segment **109** (67 mg, 97 μmol , 1.0 Äq.) und CD-Segment **27** (66 mg, 146 μmol , 1.5 Äq.). Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 4/1) und präparative RP-HPLC (Methode 5) gereinigt. Nach Lyophilisation wird **110** als voluminöser farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 49 mg (43.6 μmol , 45 %).

$R_f = 0.24$ (Pentan/EtOAc = 4/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -9.0$ ($c = 0.95$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.92 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 0.97 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 1.12 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA-C $^{\epsilon}$ HCH $_3$), 1.16 (s, 3H, uC-C(CH $_3$) $_2$), 1.24 (s, 3H, uC-C(CH $_3$) $_2$), 1.45 (s, 3H, uA-C(CH $_3$) $_2$), 1.51 (s, 3H, uA-C(CH $_3$) $_2$), 1.58 (m, 1H, uD-C $^{\gamma}$ H), 1.67-1.83 (m, 2H, uD-C $^{\beta}$ H $_2$), 1.94 (m, 1H, uA-C $^{\epsilon}$ H), 2.35-2.52 (m, 2H, uA-C $^{\gamma}$ H $_2$), 3.14 (dd, $J = 14.2, 7.6$ Hz, 1H, uB-C $^{\beta}$ H A H B), 3.36-4.5 (m, 3H, uB-C $^{\beta}$ H A H B und uC-CH $_2$ NH), 3.82 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H, uA-C $^{\zeta}$ H), 4.21 (m, 1H, CHCH $_2$, Fmoc), 4.30-4.39 (m, 2H, CHCH $_2$, Fmoc), 4.70 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, uA-C $^{\eta}$ H), 4.72 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH A H B CCl $_3$), 4.74 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH A H B CCl $_3$), 4.89 (dd, $J = 10.0, 3.3$ Hz, 1H, uD-C $^{\alpha}$ H), 5.02-5.15 (m, 2H, uB-C $^{\alpha}$ H und uA-C $^{\delta}$ H), 5.68 (dm, $J = 15.5$ Hz, 1H, uA-C $^{\alpha}$ H), 6.07 (m, 1H, NH), 6.61 (ddd, $J = 15.4, 6.4, 6.4$ Hz, 1H, uA-C $^{\beta}$ H), 6.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 7.24-7.43 (m, 9H, uA-C ar H und C ar H, Fmoc), 7.55-7.65 (m, 2H, C ar H, Fmoc), 7.75 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, C ar H, Fmoc).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.4 (uA-C $^{\epsilon}$ HCH $_3$), 21.3 (uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 22.1 (uC-C(CH $_3$) $_2$), 22.8 (uC-C(CH $_3$) $_2$), 23.1 (uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 24.9 (uD-C $^{\gamma}$ H), 25.4 (uB-C $^{\beta}$ H $_2$), 27.0 (uA-C(CH $_3$) $_2$), 27.2 (uA-C(CH $_3$) $_2$), 32.4 (uA-C $^{\gamma}$ H $_2$), 35.8 (uA-C $^{\epsilon}$ H), 39.2 (uD-C $^{\beta}$ H $_2$), 44.1 (uC-C(CH $_3$) $_2$), 47.2 (CHCH $_2$, Fmoc), 49.5 (uC-CH $_2$ NH), 51.2 (uB-C $^{\alpha}$ H), 66.9 (CHCH $_2$, Fmoc), 71.3 (uD-C $^{\alpha}$ H), 74.8 (uB-CH $_2$ CCl $_3$), 75.6 (uA-C $^{\delta}$ H), 80.3 (uA-C $^{\eta}$ H), 82.1 (uA-C $^{\zeta}$ H), 94.1 (uB-CCl $_3$), 109.0 (uA-C(CH $_3$) $_2$), 119.9 (C ar H, Fmoc), 124.9 (uA-C $^{\alpha}$ H), 125.2 (C ar H, Fmoc), 126.7 (C ar H), 126.96, 127.00, 127.6 (C ar H, Fmoc), 128.5, 128.7 (C ar H), 137.3 (uA-C ar), 139.5 (uA-C $^{\beta}$ H), 141.23, 141.25, 143.96, 144.02 (C ar), 157.0 (uC-NHCO $_2$),

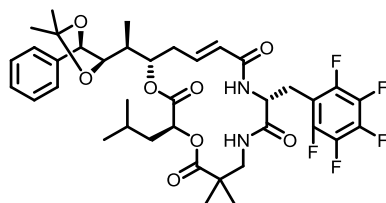
165.8 (uA-C=O), 169.8, 171.0, 176.9 (C=O). Die Signale der C₆F₅-Gruppe sind im ¹³C-NMR Spektrum nicht sichtbar.

¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -142.1 (dd, *J* = 22.9, 7.9 Hz, 2F, F^{ortho}), -154.9 (t, *J* = 20.9 Hz, 1F, F^{para}), -161.9 (td, *J* = 22.0, 8.0 Hz, 2F, F^{meta}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3368 br w, 2959 br m, 2249 w, 1721 br s, 1678 m, 1646 m, 1519 s, 1504 s, 1449 m, 1371 m, 1241 m, 1141 m, 1124 m, 1041 m, 1023 w, 969 m, 906 s, 813 w, 757 m, 726 s.

HRMS (MALDI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
<i>m/z</i> =	1145.29277	1145.29186	[C ₅₅ H ₅₈ Cl ₃ F ₅ N ₂ O ₁₁ +Na] ⁺

18.2.3 uA[Acetonid]-uB-Pentafluorphenyl-Cryptophycin-52 (111)



M = 752.76 g mol⁻¹ C₃₈H₄₅F₅N₂O₈

Gemäß AAV-10 erfolgt die Makrolactamisierung ausgehend von **110** (48 mg, 42.7 μmol). Nach Flash-Chromatographie (Pentan/EtOAc = 2/1) und Trocknung im HV wird **111** als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 26.5 mg (35.2 μmol, 83 %).

R_f = 0.21 (Pentan/EtOAc = 2/1).

[α]_D^{RT} = +21.4 (c = 0.98 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.84 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 1.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.18 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.24 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂), 1.36 (ddd, *J* = 13.8, 8.9, 3.5 Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.50 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.66 (m, 1H, uD-C^γH), 1.75 (ddd, *J* = 13.9, 10.5, 5.0 Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.85 (m, 1H, uA-C^εH), 2.22 (ddd, *J* = 14.3, 10.8, 10.8 Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.47 (dm, *J* = 14.2 Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.97 (dd, *J* = 14.5, 11.2 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.20 (dd, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.38 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.44 (dd, *J* = 14.5, 4.3 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.79 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, uA-C^δH), 4.68 (m, 1H, uB-C^αH), 4.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, uA-C^γH), 4.83 (dd, *J* = 10.4, 3.5 Hz, 1H, uD-C^αH), 5.02 (ddd, *J* = 11.3, 7.2, 2.0 Hz, 1H, uA-C^δH), 5.68 (dm, *J* = 15.2 Hz, 1H, uA-C^αH), 5.80 (m, 1H, NH), 6.61 (ddd, *J* = 15.1, 10.2, 4.8 Hz, 1H, uA-C^βH), 7.09 (m, 1H, NH), 7.32-7.41 (m, 5H, uA-C^{ar}H).

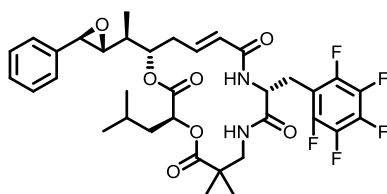
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.7 (uA-C $^{\text{e}}$ H $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.3 (uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 22.8 (uC-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_2$), 23.0 (uC-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_2$ und uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 24.0 (uB-C $^{\beta}$ H $_2$), 24.7 (uD-C $^{\gamma}$ H), 27.0 (uA-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_2$), 27.2 (uA-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_2$), 35.8 (uA-C $^{\gamma}$ H $_2$), 36.7 (uA-C $^{\text{e}}$ H), 39.5 (uD-C $^{\beta}$ H $_2$), 42.8 (uC-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_2$), 46.8 (uC-CH $_2$ NH), 54.2 (uB-C $^{\alpha}$ H), 71.0 (uD-C $^{\alpha}$ H), 75.8 (uA-C $^{\delta}$ H), 80.1 (uA-C $^{\eta}$ H), 82.3 (uA-C $^{\zeta}$ H), 109.1 (uA-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_2$), 111.0 (tm, J = 18.6 Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{ipso}}$), 124.4 (uA-C $^{\alpha}$ H), 126.6, 128.6, 128.8 (uA-C $^{\text{ar}}$ H), 137.4 (dm, J = 252.0 Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{meta}}$), 137.5 (uA-C $^{\text{ar}}$), 140.2 (dm, J = 249.0 Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{para}}$), 142.5 (uA-C $^{\beta}$ H), 145.3 (dm, J = 242.1 Hz, $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}^{\text{ortho}}$), 165.5 (uA-C(O)NH), 169.3 (C(O)NH), 170.3, 177.2 (C=O).

^{19}F -NMR (470 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -142.7 (dd, J = 22.6, 8.0 Hz, 2F, F^{ortho}), -155.6 (t, J = 20.8 Hz, 1F, F^{para}), -161.9 (td, J = 21.8, 7.9 Hz, 2F, F^{meta}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2931 br w, 2359 w, 2344 w, 1752 w, 1718 w, 1676 br m, 1519 s, 1501 s, 1473 w, 1369 w, 1302 w, 1229 w, 1187 w, 1151 m, 1122 m, 1060 w, 1009 w, 973 m, 882 w, 756 m, 700 m.

HRMS (MALDI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 775.29718$	775.29883	$[\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_8 + \text{Na}]^+$

18.2.4 uB-Pentafluorphenyl-Cryptophycin-52 (76)



$M = 694.69 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_7$

Das Acetonid **11** (26 mg, 34.5 μmol) wird AAV-11 – AAV-14 folgend umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels präparativer RP-HPLC (Methode 6) gereinigt und Produkt wird lyophilisiert. Das Epoxid **76** wird als voluminöser, farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.4 mg (4.9 μmol , 14 % über 4 Stufen).

HPLC: $t_R = 37.9$ min (Methode 6).

$[\alpha]_D^{RT} = +47.8$ ($c = 0.50$ in CHCl_3).

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.85 (d, J = 6.0 Hz, 3H, uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 0.86 (d, J = 6.0 Hz, 3H, uD-C $^{\delta}$ H $_3$), 1.16 (d, J = 6.9 Hz, 3H, uA-C $^{\text{e}}$ H $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 1.19 (s, 3H, uC-C(CH $_3$) $_2$), 1.25 (s, 3H, uC-C(CH $_3$) $_2$), 1.35 (ddd, J = 13.6, 8.8, 3.3 Hz, 1H, uD-C $^{\beta}$ H $^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.69 (m, 1H, uD-C $^{\beta}$ H $^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 17.3 (m, 1H, uD-C $^{\gamma}$ H),

1.81 (m, 1H, uA-C^εH), 2.47 (ddd, $J = 14.4, 10.9, 10.9$ Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.58 (ddd, $J = 14.4, 2.0, 2.0$ Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.94 (dd, $J = 7.6, 2.0$ Hz, 1H, uA-C^ζH), 2.98 (m, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.24 (dd, $J = 13.6, 7.1$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.35 (dd, $J = 13.6, 4.8$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.45 (dd, $J = 15.0, 4.3$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.70 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, uA-C^ηH), 4.72 (ddd, $J = 11.0, 8.5, 4.3$ Hz, 1H, uB-C^αH), 4.88 (dd, $J = 10.2, 3.4$ Hz, 1H, uD-C^αH), 5.18 (ddd, $J = 11.4, 5.1, 2.0$ Hz, 1H, uA-C^δH), 5.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 5.75 (dm, $J = 15.1$ Hz, 1H, uA-C^αH), 6.75 (ddd, $J = 15.1, 10.4, 4.7$ Hz, 1H, uA-C^βH), 7.15 (m, 1H, NH), 7.25-7.28 (m, 2H, uA-C^{ar}H), 7.33-7.40 (m, 3H, uA-C^{ar}H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 13.6 (uA-C^εHCH₃), 21.3 (uD-C^δH₃), 22.8 (uC-C(CH₃)₂), 22.9 (uC-C(CH₃)₂), 23.0 (uD-C^δH₃), 24.0 (uB-C^βH₂), 24.6 (uD-C^γH), 37.0 (uA-C^γH₂), 39.4 (uD-C^βH₂), 40.7 (uA-C^εH), 42.7 (uC-C(CH₃)₂), 46.8 (uC-CH₂NH), 53.4 (uB-C^αH), 59.1 (uA-C^ηH), 63.0 (uA-C^ζH), 71.1 (uD-C^αH), 76.0 (uA-C^δH), 110.9 (m, C₆F₅C^{ipso}), 124.7 (uA-C^αH), 125.6, 128.6, 128.8 (uA-C^{ar}H), 136.7 (uA-C^{ar}), 137.5 (dm, $J = 249.4$ Hz, C₆F₅C^{meta}), 140.3 (dm, $J = 245.0$ Hz, C₆F₅C^{para}), 142.1 (uA-C^βH), 145.4 (dm, $J = 245.4$ Hz, C₆F₅C^{ortho}), 165.4 (uA-C(O)NH), 169.3 (C(O)NH), 170.6, 177.4 (C=O).

¹⁹F-NMR (564 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -142.7 (dd, $J = 22.6, 8.1$ Hz, 2F, F^{ortho}), -155.3 (t, $J = 20.9$ Hz, 1F, F^{para}), -161.7 (td, $J = 21.9, 8.0$ Hz, 2F, F^{meta}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3289 w, 2958 br w, 2177 w, 2038 w, 2010 w, 1975 w, 1748 m, 1718 m, 1662 br m, 1520 s, 1503 s, 1473 m, 1371 w, 1322 w, 1305 w, 1189 m, 1147 s, 1125 s, 1067 w, 974 m, 887 w, 752 w, 698 m.

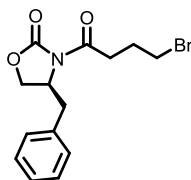
HRMS (MALDI-FT-ICR):

	gemessen	berechnet	
$m/z =$	717.25676	717.25696	[C ₃₅ H ₃₉ F ₅ N ₂ O ₇ +Na] ⁺

19 Synthese der Alkylazid-funktionalisierten Cryptophycine

19.1 Darstellung der funktionalisierten Fragment-C-Bausteine^[46]

19.1.1 (S)-4-Benzyl-3-(4-bromobutanoyl)-oxazolidin-2-on (**115**)



$$M = 326.19 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrNO}_3$$

Ausgehend von 4-Bromobutylchlorid (**113**) (3.14 g, 16.9 mmol, 1.2 Äq.) erfolgt die Acylierung des Auxiliars (S)-4-Benzyl-2-oxazolidinon (**112**) (2.50 g, 14.1 mmol, 1.0 Äq.) gemäß AAV-1. N-Acylurethan **115** wird nach Trocknung im HV als hellgelbes, hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 4.61 g (quantitativ).

$R_f = 0.38$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

$[\alpha]_D^{RT} = +44.0$ (c = 1.03 in CHCl_3).

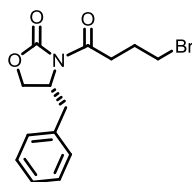
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 2.23-2.29 (m, 2H, C^βH_2), 2.79 (dd, $J = 13.4, 9.5$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 3.10 (dt, $J = 18.0, 7.0$ Hz, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.16 (dt, $J = 18.0, 7.0$ Hz, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.28 (dd, $J = 13.4, 3.4$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 3.52 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$), 4.18 (dd, $J = 9.1, 2.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CHBn}$), 4.22 (dd, $J = 9.0, 7.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CHBn}$), 4.68 (dddd, $J = 9.5, 7.8, 3.4, 3.1$ Hz, 1H, CHBn), 7.17-7.37 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 27.1 (C^βH_2), 32.6 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 33.9 ($\text{C}^\alpha\text{H}_2$), 37.9 (CH_2Ph), 55.1 (CHBn), 66.3 (CH_2CHBn), 127.4, 129.0, 129.4 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 135.1 (C^{ar}), 153.4 (NCO_2), 172.0 ($\text{NC(O)C}^\alpha\text{H}_2$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2917 br w, 2359 w, 1770 vs, 1693 s, 1496 w, 1453 w, 1383 s, 1286 w, 1197 br s, 1102 m, 1048 m, 988 m, 918 w, 836 w, 760 s, 741 s, 699 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	348.02030	348.02058	$[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrNO}_3 + \text{Na}]^+$
$m/z =$	343.06489	343.06518	$[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrNO}_3 + \text{NH}_4]^+$

19.1.2 (R)-4-Benzyl-3-(4-bromobutanoyl)-oxazolidin-2-on (ent-115)

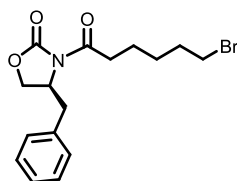


$$M = 326.19 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrNO}_3$$

$$[\alpha]_D^{RT} = -46.9 \text{ (c = 1.02 in CHCl}_3\text{)}.$$

Die übrigen physikalischen Daten von *ent*-**115** entsprechen denen des Enantiomers **115**.

19.1.3 (S)-4-Benzyl-3-(6-bromohexanoyl)-oxazolidin-2-on (116)



$$M = 354.24 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BrNO}_3$$

Ausgehend von 6-Bromcapronsäure (3.03 g, 15.5 mmol, 1.1 Äq.) erfolgt die Acylierung des Auxiliars (S)-4-Benzyl-2-oxazolidinon (**112**) (2.50 g, 14.1 mmol, 1.0 Äq.) gemäß AAV-1. N-Acylurethan **116** wird nach Trocknung im HV als hellgelbes, hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 5.33 g (quantitativ).

$R_f = 0.42$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

$$[\alpha]_D^{RT} = +29.9 \text{ (c = 1.00 in CHCl}_3\text{)}.$$

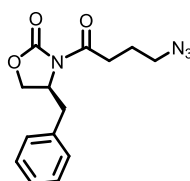
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.51-1.57 (m, 2H, C ^{γ} H₂), 1.70-1.76 (m, 2H, C ^{β} H₂), 1.88- 1.95 (m, 2H, C ^{δ} H₂), 2.77 (dd, $J = 13.5, 9.7$ Hz, 1H, CH^AH^BPh), 2.91 (dt, $J = 17.3, 7.4$ Hz, 1H, C ^{α} H^AH^B), 3.00 (dt, $J = 17.1, 7.5$ Hz, 1H, C ^{α} H^AH^B), 3.29 (dd, $J = 13.5, 3.3$ Hz, 1H, CH^AH^BPh), 3.43 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, C ^{ϵ} H₂), 4.17 (dd, $J = 9.1, 3.1$ Hz, 1H, CH^AH^BCHBn), 4.20 (dd, $J = 9.1, 7.7$ Hz, 1H, CH^AH^BCHBn), 4.67 (dddd, $J = 9.4, 7.7, 3.1, 3.0$ Hz, 1H, CHBn), 7.17-7.35 (m, 5H, C^{*ar*}H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 23.3 (C ^{β} H₂), 27.5 (C ^{γ} H₂), 32.4 (C ^{δ} H₂), 33.5 (C ^{ϵ} H₂), 35.2 (C ^{α} H₂), 37.9 (CH₂Ph), 55.1 (CHBn), 66.2 (CH₂CHBn), 127.3, 128.9, 129.4 (C^{*ar*}H), 135.2 (C^{*ar*}), 153.4 (NCO₂), 172.9 (NC(O)C ^{α} H₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2932 br m, 2860 w, 1772 vs, 1694 s, 1644 w, 1453 w, 1384 m, 1350 m, 1255 w, 1208 m, 1195 m, 1102 w, 1049 w, 993 w, 920 w, 745 m, 699 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	376.05195	376.05188	$[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BrNO}_3+\text{Na}]^+$
$m/z =$	729.11369	729.11453	$[(\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BrNO}_3)_2+\text{Na}]^+$

19.1.4 (S)-3-(4-Azidobutanoyl)-4-benzyloxazolidin-2-on (117)



$$M = 288.30 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$$

Die Einführung der Azidgruppe erfolgt gemäß AAV-2, ausgehend vom Alkylbromid **115** (4.61 g, 14.1 mmol, 1.0 Äq.) und NaN_3 (1.84 g, 28.2 mmol, 2.0 Äq.). Trocknung im HV ergibt das Alkylazid **117** als farbloses, leichtbewegliches Öl.

Ausbeute: 3.12 g (77 % d. Th.).

$R_f = 0.25$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

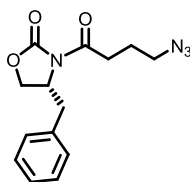
$[\alpha]_D^{RT} = +47.5$ (c = 1.02 in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.96-2.03 (m, 2H, C^βH_2), 2.78 (dd, $J = 13.4, 9.7$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 3.00 (dt, $J = 17.8, 7.2$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.08 (dt, $J = 17.8, 7.2$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.29 (dd, $J = 13.5, 3.3$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 3.41 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 4.18 (dd, $J = 9.1, 3.0$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CHBn}$), 4.21 (dd, $J = 9.1, 7.7$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CHBn}$), 4.68 (dddd, $J = 9.7, 7.7, 3.3, 3.0$ Hz, 1H, CHBn), 7.20-7.36 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 23.4 (C^βH_2), 32.5 ($\text{C}^\alpha\text{H}_2$), 37.8 (CH_2Ph), 50.5 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 55.1 (CHBn), 66.3 (CH_2CHBn), 127.3, 129.0, 129.3 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 135.1 (C^{ar}), 153.4 (NCO_2), 172.1 ($\text{NC(O)C}^\alpha\text{H}_2$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2923 br w, 2359 w, 2093 vs, 1769 vs, 1693 s, 1496 w, 1453 w, 1385 m, 1350 m, 1208 br m, 1111 w, 1076 w, 989 m, 927 w, 857 w, 761 m, 741 m, 700 s.

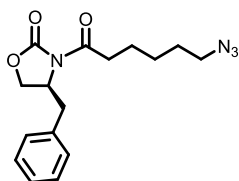
HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	311.1116	311.11146	$[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3+\text{Na}]^+$

19.1.5 (R)-3-(4-Azidobutanoyl)-4-benzyloxazolidin-2-on (ent-117)

$$M = 288.30 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$$

$$[\alpha]_D^{RT} = -53.1 \text{ (c = 1.05 in CHCl}_3\text{)}.$$

Die übrigen physikalischen Daten von *ent*-**117** entsprechen denen des Enantiomers **117**.

19.1.6 (S)-3-(6-Azidohexanoyl)-4-benzyloxazolidin-2-on (118)

$$M = 316.36 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$$

Die Einführung der Azidgruppe erfolgt gemäß AAV-2, ausgehend vom Alkylbromid **116** (5.33 g, 14.1 mmol, 1.0 Äq.) und NaN_3 (1.84 g, 28.2 mmol, 2.0 Äq.). Trocknung im HV ergibt das Alkylazid **118** als farbloses, leichtbewegliches Öl.

Ausbeute: 3.93 g (88 % d. Th.).

$R_f = 0.24$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

$$[\alpha]_D^{RT} = +47.1 \text{ (c = 1.00 in CHCl}_3\text{)}.$$

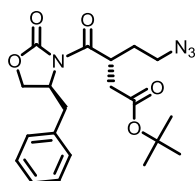
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.44-1.51 (m, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$) 1.63-1.69 (m, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$), 1.70-1.77 (m, 2H, C^βH_2), 2.77 (dd, $J = 13.4, 9.6$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 2.92 (dt, $J = 17.1, 7.4$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 2.99 (dt, $J = 17.0, 7.4$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.27-3.32 (m, 3H, C^6H_2 und $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 4.17 (dd, $J = 9.1, 3.0$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CHBn}$), 4.20 (dd, $J = 9.1, 7.6$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CHBn}$), 4.67 (dddd, $J = 9.6, 7.4, 3.3, 3.0$ Hz, 1H, CHBn), 7.20-7.35 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 23.6 (C^βH_2), 26.1 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 28.6 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$), 35.3 ($\text{C}^\alpha\text{H}_2$), 37.8 (CH_2Ph), 51.2 (C^6H_2), 55.1 (CHBn), 66.2 (CH_2CHBn), 127.3, 128.9, 129.4 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 135.2 (C^{ar}), 153.4 (NCO_2), 172.9 ($\text{NC(O)C}^\alpha\text{H}_2$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2935 br m, 2867 w, 2360 s, 2341 s, 2093 s, 1782 m, 1728 s, 1697 m, 1455 w, 1384 w, 1349 w, 1255 m, 1195 br m, 1108 m, 748 w, 701 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 339.14236$	339.14276	$[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3+\text{Na}]^+$

19.1.7 (*R*)-5-Azido-3-((*S*)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-pentansäure-*tert*-butylester (**119**)



$$M = 402.44 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$$

Die Alkylierung wird gemäß AAV-3 durchgeführt, ausgehend von **117** (3.12 g, 10.8 mmol, 1.00 Äq.), Bromessigsäure-*tert*-butylester (2.00 mL, 13.5 mmol, 1.25 Äq.) und NaI (2.03 g, 13.5 mmol, 1.25 Äq.). Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei -78°C gerührt wurde, wird das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 3/1) gereinigt und **119** (2.03 g, 47 %) als farbloser Feststoff erhalten. Umkristallisation aus Hexan/EtOAc (35 mL, 10:1 v/v) ergibt **119** diastereomerenrein als farblose Kristalle.

Ausbeute: 1.61 g (4.00 mmol, 37 %).

$R_f = 0.43$ (Hexan/EtOAc = 3/1).

$[\alpha]_D^{RT} = +40.7$ (c = 1.02 in CHCl_3).

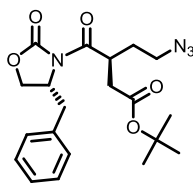
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.79 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 2.00 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 2.50 (dd, $J = 16.6, 4.8$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 2.75 (dd, $J = 13.5, 10.0$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{Ph}$), 2.84 (dd, $J = 16.6, 9.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 3.34 (dd, $J = 13.5, 3.2$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{Ph}$), 3.37-3.41 (m, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 4.15-4.28 (m, 3H, C^αH und CH_2CHBn), 4.68 (dddd, $J = 10.0, 6.7, 3.2, 3.2$ Hz, 1H, CHBn), 7.24-7.37 (m, 5H, C^{ar}H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.7 (C^βH_2), 37.2 ($\text{CH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 37.3 (C^αH), 37.5 (CH_2Ph), 49.1 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 55.5 (CHBn), 66.0 (CH_2CHBn), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.2, 128.9, 129.4 (C^{ar}H), 135.5 (C^{ar}), 153.1 (NCO_2), 170.6 ($\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 174.8 ($\text{NC}(\text{O})\text{C}^\alpha\text{H}_2$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2975 w, 2930 w, 2359 m, 2339 w, 2109 br m, 1764 s, 1730 s, 1694 s, 1453 w, 1385 m, 1351 m, 1212 m, 1154 s, 1100 m, 1021 w, 996 m, 843 w, 762 m, 703 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 425.17934$	425.17954	$[\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5+\text{Na}]^+$
	$m/z = 827.36887$	827.36986	$[(\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5)_2+\text{Na}]^+$

19.1.8 (S)-5-Azido-3-((R)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-pentansäure-tert-butylester (ent 119)

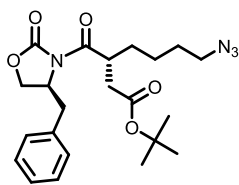


$$M = 402.44 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$$

$$[\alpha]_D^{RT} = -38.9 \text{ (c = 1.00 in CHCl}_3\text{)}.$$

Die übrigen physikalischen Daten von **ent-119** entsprechen denen des Enantiomers **119**.

19.1.9 (R)-5-Azido-3-((S)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-heptansäure-tert-butylester (120)



$$M = 430.50 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$$

Die Alkylierung wird gemäß AAV-3 durchgeführt, ausgehend von **118** (3.90 g, 12.3 mmol, 1.00 Äq.), Bromessigsäure-*tert*-butylester (2.30 mL, 15.4 mmol, 1.25 Äq.) und NaI (2.31 g, 15.4 mmol, 1.25 Äq.). Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei -78°C gerührt wurde, wird das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie (Hexane/EtOAc = 3/1) gereinigt. Umkristallisation aus Hexan/EtOAc (65 mL, 10:1 v/v) ergibt **120** diastereomerenrein als farblose Kristalle.

Ausbeute: 2.67 g (6.20 mmol, 50 %).

$R_f = 0.38$ (Hexan/EtOAc = 3/1).

$$[\alpha]_D^{RT} = +38.2 \text{ (c = 1.00 in CHCl}_3\text{)}.$$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.40-1.56 (m, 3H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$ und $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.60-1.68 (m, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$), 1.72 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 2.50 (dd, $J = 16.8, 4.5$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 2.76 (dd, $J = 13.5, 10.0$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{Ph}$), 2.84 (dd, $J = 16.8, 10.5$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 3.27-3.32 (m, 2H, C^6H_2), 3.36 (dd, $J = 13.5, 3.2$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{Ph}$), 4.16-4.23 (m, 3H, C^aH und CH_2CHBn), 4.69 (dddd, $J = 10.0, 6.7, 3.2, 3.2$ Hz, 1H, CHBn), 7.26-7.38 (m, 5H, C^{ar}H).

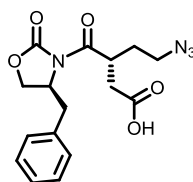
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 23.9 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.7 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$), 31.2 (C^βH_2), 37.0 ($\text{CH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 37.5 (CH_2Ph), 39.0 (C^aH), 51.1 (C^6H_2), 55.5 (CHBn), 65.9 (CH_2CHBn),

80.8 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 127.2, 128.9, 129.5 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 135.6 (C^{ar}), 153.0 (NCO_2), 171.2 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2t\text{-Bu}$), 175.6 ($\text{N}\underline{\text{C}}(\text{O})\text{C}^{\text{ar}}\text{H}_2$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2981 w, 2938 w, 2358 s, 2341 s, 2090 s, 2026 w, 1757 s, 1725 s, 1688 s, 1473 w, 1393 s, 1349 s, 1292 w, 1249 m, 1150 m, 1101 m, 1071 w, 993 m, 920 w, 842 m, 764 s, 703 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	453.21059	453.21084	$[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5+\text{Na}]^+$
$m/z =$	883.43181	883.43246	$[(\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5)_2+\text{Na}]^+$

19.1.10 (*R*)-5-Azido-3-((*S*)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-pentansäure (**121**)



$M = 346.34 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$

Gemäß AAV-4 erfolgt die Spaltung des *tert*-Butylesters **119** (1.61 g, 4.00 mmol). Nach Coevaporation mit Toluol und Trocknung im HV wird die Carbonsäure **121** als farbloses, hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 1.38 g (quantitativ).

$R_f = 0.30$ (Hexan/EtOAc = 2/1).

$[\alpha]_D^{25} = +52.1$ ($c = 1.23$ in CHCl_3).

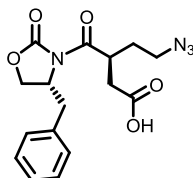
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.78 (m, 1H, $\text{C}^{\beta}\underline{\text{H}}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.98 (m, 1H, $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}\underline{\text{H}}^{\text{B}}$), 2.60 (dd, $J = 17.4, 4.6$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CO}_2\text{H}$), 2.72 (dd, $J = 13.5, 9.7$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 2.97 (dd, $J = 17.4, 9.7$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\underline{\text{H}}^{\text{B}}\text{CO}_2\text{H}$), 3.26 (dd, $J = 13.5, 3.1$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\underline{\text{H}}^{\text{B}}\text{Ph}$), 3.37 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$), 4.13-4.22 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CHBn}$), 4.26 (m, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.67 (dddd, $J = 9.7, 6.8, 3.1, 3.1$ Hz, 1H, CHBn), 7.14-7.34 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 11.34 (s, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 30.7 ($\text{C}^{\beta}\text{H}_2$), 35.7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$), 37.0 ($\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 37.3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 49.0 ($\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$), 55.5 (CHBn), 66.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CHBn}$), 127.3, 128.9, 129.4 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 135.2 (C^{ar}), 153.2 (NCO_2), 174.3 ($\text{N}\underline{\text{C}}(\text{O})\text{C}^{\text{ar}}\text{H}_2$), 177.4 (CO_2H).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2914 w, 2358 w, 2094 s, 1770 vs, 1692 vs, 1495 w, 1453 w, 1386 m, 1349 m, 1194 br m, 1100 w, 998 w, 909 w, 840 w, 761 m, 733 m, 697 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 369.11698$	369.11694	$[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5 + \text{Na}]^+$

19.1.11 (S)-5-Azido-3-((R)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-pentansäure (ent-121)

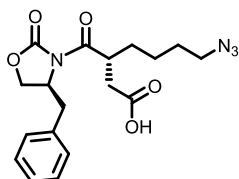


$$M = 346.34 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$$

$$[\alpha]_D^{RT} = -46.9 \text{ (c = 1.08 in CHCl}_3\text{)}.$$

Die übrigen physikalischen Daten von **ent-121** entsprechen denen des Enantiomers **121**.

19.1.12 (R)-5-Azido-3-((S)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-heptansäure (122)



$$M = 374.39 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_5$$

Gemäß AAV-4 erfolgt die Spaltung des *tert*-Butylesters **120** (2.65 g, 6.16 mmol). Nach Coevaporation mit Toluol und Trocknung im HV wird die Carbonsäure **122** als farbloses, hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 2.68 g (quantitativ).

$R_f = 0.15$ (Hexan/EtOAc = 3/1).

$$[\alpha]_D^{RT} = +53.3 \text{ (c = 1.02 in CHCl}_3\text{)}.$$

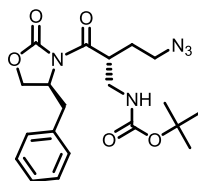
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.37-1.46 (m, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 1.51 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 1.56-1.62 (m, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$), 1.70 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 2.57 (dd, $J = 17.5, 4.2$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CO}_2\text{H}$), 2.73 (dd, $J = 13.5, 9.7$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$), 2.95 (dd, $J = 17.5, 10.3$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CO}_2\text{H}$), 3.22-3.29 (m, 3H, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{Ph}$ und $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$), 4.15-4.22 (m, 3H, CH_2CHBn und C^αH), 4.66 (dddd, $J = 9.7, 6.8, 3.1, 3.1$ Hz, 1H, CHBn), 7.14-7.34 (m, 5H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 10.1 (s, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 23.8 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 28.6 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$), 31.2 (C^βH_2), 35.3 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 37.3 (CH_2Ph), 38.8 (C^αH), 51.0 ($\text{C}^\epsilon\text{H}_2$), 55.5 (CHBn), 66.0 (CH_2CHBn), 127.3, 128.9, 129.5 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 135.3 (C^{ar}), 153.1 (NCO_2), 175.1 ($\text{NC(O)C}^\alpha\text{H}_2$), 177.7 (CO_2H).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2928 br m, 2092 s, 1773 s, 1735 s, 1693 s, 1496 w, 1453 w, 1386 m, 1349 m, 1287 w, 1193 br m, 1102 w, 998 w, 951 w, 912 w, 732 m, 698 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 397.14820$	397.14824	[C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₅ +Na] ⁺

19.1.13 [(S)-4-Azido-2-((R)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-butyl]-carbaminsäure-tert-butylester (123)



M = 417.46 g mol⁻¹ C₂₀H₂₇N₅O₅

Der Curtius-Abbau der Carbonsäure **121** (1.38 g, 4.00 mmol) erfolgt gemäß AAV-5. Reinigung durch Flash-Chromatographie (Hexane/EtOAc = 3/1) und Trocknung im HV ergibt das *tert*-Butylcarbamat **123** als farbloses, hochviskoses Öl.

Ausbeute: 1.22 g (2.92 mmol, 73 %).

$R_f = 0.26$ (Hexan/EtOAc = 3/1).

$[\alpha]_D^{RT} = +39.3$ (c = 1.05 in CHCl₃).

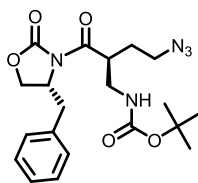
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.79 (m, 1H, C ^{β} H^AH^B), 2.08 (m, 1H, C ^{β} H^AH^B), 2.78 (dd, $J = 13.3, 9.8$ Hz, 1H, CH^AH^BPh), 3.31 (dd, $J = 13.3, 2.8$ Hz, 1H, CH^AH^BPh), 3.36-3.47 (m, 3H, C ^{γ} H₂ und CH^AH^BNH), 3.53 (m, 1H, CH^AH^BNH), 3.97 (br m, 1H, C ^{α} H), 4.19 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H, CH^AH^BCHBn), 4.22 (dd, $J = 9.1, 7.6$ Hz, 1H, CH^AH^BCHBn), 4.69 (dddd, $J = 9.8, 7.6, 2.8, 2.8$ Hz, 1H, CHBn), 4.90 (br m, 1H, NH), 7.18-7.38 (m, 5H, C ^{α} H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 28.3 (C(CH₃)₃), 28.5 (C ^{β} H₂), 37.9 (CH₂Ph), 41.5 (C ^{α} H), 41.8 (C ^{γ} H₂), 49.3 (CH₂NH), 55.5 (CHBn), 66.4 (CH₂CHBn), 79.5 (C(CH₃)₃), 127.3, 128.9, 129.3 (C ^{α} H), 135.2 (C ^{α}), 153.2 (NCO₂), 155.8 (CO₂*t*-Bu), 173.9 (NC(O)C ^{α} H₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3390 br w, 2977 w, 2931 w, 2095 vs, 1773 s, 1691 vs, 1507 m, 1453 w, 1388 s, 1365 m, 1350 m, 1240 m, 1161 m, 1101 w, 1044 w, 1011 w, 915 w, 862 w, 761 m, 701 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 440.19065$	440.19178	[C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₅ +Na] ⁺
	$m/z = 857.39386$	857.39619	[(C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₅) ₂ +Na] ⁺

19.1.14 [(R)-4-Azido-2-((S)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-butyl]-carbaminsäure-tert-butylester (ent-123)

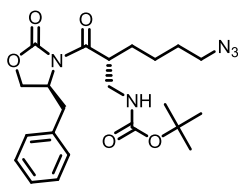


$$M = 417.46 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_5$$

$$[\alpha]_D^{RT} = -36.0 \text{ (c = 1.24 in CHCl}_3\text{)}.$$

Die übrigen physikalischen Daten von *ent*-**123** entsprechen denen des Enantiomers **123**.

19.1.15 [(S)-6-Azido-2-((R)-4-benzyl-2-oxo-oxazolidin-3-carbonyl)-hexyl]-carbaminsäure-tert-butylester (124)



$$M = 445.51 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_5$$

Der Curtius-Abbau der Carbonsäure **122** (2.31 g, 6.15 mmol) erfolgt gemäß AAV-5. Reinigung durch Flash-Chromatographie (Hexane/EtOAc = 3/1) und Trocknung im HV ergibt das *tert*-Butylcarbamat **124** als hellgelbes, hochviskoses Öl.

Ausbeute: 1.52 g (3.41 mmol, 55 %).

$R_f = 0.16$ (Hexan/EtOAc = 3/1).

$$[\alpha]_D^{RT} = +37.7 \text{ (c = 1.45 in CHCl}_3\text{)}.$$

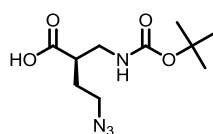
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.46-1.55 (m, 3H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$ und $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 1.57-1.64 (m, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$), 1.75 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 2.78 (dd, $J = 13.5, 9.6$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{Ph}$), 3.22-3.33 (m, 3H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ und $\text{CH}^A\text{H}^B\text{Ph}$), 3.36-3.54 (m, 2H, CH_2NH), 3.88 (br m, 1H, C^αH), 4.18 (dd, $J = 9.0, 2.8$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CHBn}$), 4.22 (dd, $J = 9.2, 7.6$ Hz, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CHBn}$), 4.68 (dddd, $J = 9.6, 7.6, 2.8, 2.8$ Hz, 1H, CHBn), 4.90 (br m, 1H, NH), 7.18-7.37 (m, 5H, C^{ar}H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 24.2 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.7 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$), 28.9 (C^βH_2), 37.8 (CH_2Ph), 41.5 (CH_2NH), 43.6 (C^αH), 51.1 ($\text{C}^\epsilon\text{H}_2$), 55.5 (CHBn), 66.2 (CH_2CHBn), 79.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.3, 128.9, 129.3 (C^{ar}H), 135.3 (C^{ar}), 153.1 (NCO_2), 155.8 ($\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 174.7 ($\text{NC(O)-C}^\alpha\text{H}_2$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3390 br w, 2975 w, 2931 w, 2865 w, 2361 w, 2092 s, 1774 s, 1692 s, 1505 m, 1453 w, 1388 m, 1364 m, 1349 m, 1240 br m, 1209 m, 1162 m, 1100 w, 1073 w, 1011 w, 944 w, 860 w, 761 w, 701 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	468.22178	468.22174	$[\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_5+\text{Na}]^+$
$m/z =$	913.45455	913.45426	$[(\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_5)_2+\text{Na}]^+$

19.1.16 (*R*)-4-Azido-2-(*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-butansäure (**125**)



$M = 258.27 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$

Die Abspaltung der β^2 -Aminosäure vom Auxiliar wird gemäß AAV-6 durchgeführt, ausgehend von **123** (1.22 g, 2.91 mmol, 1.0 Äq.) und $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.25 g, 5.82 mmol, 2.0 Äq.). Nach einer Reaktionszeit von 4 h und Trocknung im HV wird **125** als farbloses, hochviskoses Öl isoliert.

Ausbeute: 661 mg (88 % d. Th.).

$R_f = 0.19$ (Hexan/EtOAc = 1/1).

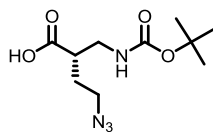
$[\alpha]_D^{RT} = +25.7$ ($c = 1.15$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS, Rotamere): δ [ppm] = 1.44/1.49 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.75 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 1.93 (m, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^A\text{H}^B$), 2.74 (br m, 1H, C^αH), 3.19 (br m, 0.4H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{NH}$), 3.34-3.48 (m, 3.6H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{NH}$, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{NH}$ und $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 5.08 (br m, 0.6H, NH), 6.67 (br m, 0.4H, NH), 10.87 (s, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS, Rotamere): δ [ppm] = 28.3/28.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.0 (C^βH_2), 42.5/42.8 (CH_2NH), 43.2 (C^αH), 49.0 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 79.8/81.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156.0 ($\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 177.8/179.0 (CO_2H).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3350 br w, 2977 w, 2934 w, 2359 w, 2095 vs, 1701 vs, 1513 s, 1454 w, 1366 m, 1248 m, 1158 s, 1110 w, 853 w, 776 m.

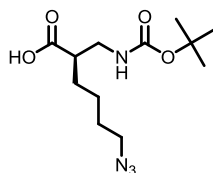
HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	281.12203	281.12203	$[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4+\text{Na}]^+$
$m/z =$	539.25469	539.25483	$[(\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4)_2+\text{Na}]^+$

19.1.17 (S)-4-Azido-2-(tert-butoxycarbonylaminomethyl)-butansäure (ent-125)

$$M = 258.27 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$$

$$[\alpha]_D^{RT} = -22.4 \text{ (c = 1.00 in CHCl}_3\text{)}.$$

Die übrigen physikalischen Daten von **ent-125** entsprechen denen des Enantiomers **125**.

19.1.18 (R)-6-Azido-2-(tert-butoxycarbonylaminomethyl)-hexansäure (126)

$$M = 286.33 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$$

Die Abspaltung der β^2 -Aminosäure vom Auxiliar wird gemäß AAV-6 durchgeführt, ausgehend von **124** (1.52 g, 3.41 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH · H₂O (0.29 g, 6.81 mmol, 2.0 Äq.). Nach einer Reaktionszeit von 4 h und Trocknung im HV wird **126** als farbloses, hochviskoses Öl isoliert.

Ausbeute: 891 mg (91 % d. Th.).

$R_f = 0.15$ (Hexan/EtOAc = 1/2).

$$[\alpha]_D^{RT} = +11.0 \text{ (c = 1.14 in CHCl}_3\text{)}.$$

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, Rotamere): δ [ppm] = 1.41-1.73 (m, 6H, C ^{β} H₂, C ^{γ} H₂ und C ^{δ} H₂), 1.44/1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.62 (br m, 1H, C ^{α} H), 3.12 (br m, 0.4H, CH^AH^BNH), 3.24-3.43 (m, 3.6H, CH^AH^BNH, CH^AH^BNH und C ^{ϵ} H₂), 5.02 (br m, 0.6H, NH), 6.69 (br m, 0.4H, NH).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS, Rotamere): δ [ppm] = 24.2 (C ^{β} H₂), 28.3 (C(CH₃)₃), 28.7 (C ^{γ} H₂), 29.0/29.3 (C ^{δ} H₂), 41.3/42.7 (CH₂NH), 45.4/45.8 (C ^{α} H), 51.1/53.4 (C ^{ϵ} H₂), 79.7/81.3 (C(CH₃)₃), 155.9 (CO₂-t-Bu), 178.6/180.0 (CO₂H).

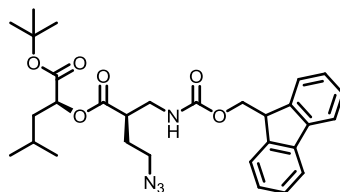
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3349 br w, 2976 w, 2935 w, 2865 w, 2360 w, 2341 w, 2092 s, 1701 vs, 1514 m, 1455 w, 1393 w, 1366 m, 1250 m, 1161 m, 950 w, 860 w, 779 w, 736 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):

	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	309.15353	309.15333	[C ₁₂ H ₂₂ N ₄ O ₄ +Na] ⁺

19.2 Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation

19.2.1 Fmoc-uC[(R)-(CH₂)₂N₃]-uD-O^tBu (136)



$$M = 550.65 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6$$

Eine Lösung der *N*-Boc-geschützten Aminosäure **125** (390 mg, 1.51 mmol, 1.0 Äq.) in CH₂Cl₂ (9.0 mL) wird mit TFA (4.5 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt und dann i. V. zur Trockne eingeeengt (Badtemperatur = 50 °C). Der Rückstand wird dreimal mit Toluol coevaporiert, 2 h im HV getrocknet und anschließend in H₂O (15 mL) gelöst. Nacheinander werden NaHCO₃ (507 mg, 6.04 mmol, 4.0 Äq.), *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (560 mg, 1.66 mmol, 1.1 Äq.) und Aceton (15 mL) zugegeben. Die Mischung wird 4 h bei RT gerührt, das Aceton am Rotationsverdampfer entfernt und ges. NaHCO₃-Lsg. (45 mL) zugefügt. Nach kräftiger Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et₂O (3 × 45 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird durch Zugabe von 5 %iger KHSO₄-Lsg. angesäuert (pH = 2-3) und dann mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, i. V. zur Trockne eingeeengt und im HV getrocknet. Die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure **127** (468 mg, 81 %) wird als hellgelber Schaum erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

Die Ester-Synthese zwischen dem D-Fragment **24** (181 mg, 0.964 mmol, 1.0 Äq.) und der entsprechenden *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure **127** (440 mg, 1.16 mmol, 1.2 Äq.) erfolgt gemäß AAV-7. Reinigung durch Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 5/1) und Trocknung im HV ergibt **136** als hellgelbes Öl.

Ausbeute: 328 mg (0.596 mmol, 62 %).

$R_f = 0.34$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -18.2$ (c = 0.98 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.94 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.97 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.50 (s, 9H, uD-C(CH₃)₃), 1.65 (m, 1H, uD-C ^{β} H^AH^B), 1.72-1.85 (m, 3H, uD-C ^{β} H^AH^B, uD-C ^{γ} H und uC-C ^{β} H^AH^B), 1.95 (m, 1H, uC-C ^{β} H^AH^B), 2.83 (m, 1H, uC-C ^{α} H), 3.38-3.50 (m, 3H, uC-C ^{γ} H₂ und uC-CH^AH^BNH), 3.58 (ddd, $J = 13.8, 7.3, 4.4$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 4.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.32 (dd, $J = 10.5, 7.4$ Hz, 1H, CHCH^AH^B, Fmoc), 4.37 (dd, $J = 10.5, 7.5$ Hz, 1H, CHCH^AH^B, Fmoc), 5.02 (dd, $J = 9.5, 4.0$ Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 6.00 (m, 1H, NH), 7.27-7.35 (m, 2H,

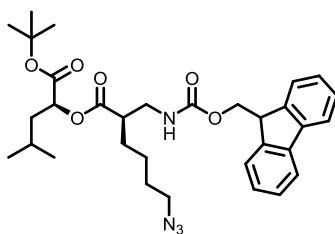
$C^{ar}H$, Fmoc), 7.36-7.44 (m, 2H, $C^{ar}H$, Fmoc), 7.56-7.66 (m, 2H, $C^{ar}H$, Fmoc), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $C^{ar}H$, Fmoc).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ [ppm] = 21.5 (uD- $C^{\delta}H_3$), 23.4 (uD- $C^{\delta}H_3$), 24.8 (uD- $C^{\gamma}H$), 28.0 (uD- $C(\underline{C}H_3)_3$), 28.6 (uC- $C^{\beta}H_2$), 39.5 (uD- $C^{\beta}H_2$), 42.1 (uC- CH_2NH), 43.9 (uC- $C^{\alpha}H$), 47.2 ($\underline{C}HCH_2$, Fmoc), 49.1 (uC- $C^{\gamma}H_2$), 66.9 ($\underline{C}HCH_2$, Fmoc), 71.7 (uD- $C^{\alpha}H$), 82.8 (uD- $C(\underline{C}H_3)_3$), 119.9 ($C^{ar}H$, Fmoc), 125.15, 125.20, 126.96, 127.01, 127.6 ($C^{ar}H$, Fmoc), 141.22, 141.24, 143.87, 143.99 (C^{ar} , Fmoc), 156.6 (uC-NHCO₂), 170.3, 173.0 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3349 br w, 2957 m, 2359 w, 2341 w, 2095 s, 1720 vs, 1525 m, 1449 m, 1392 w, 1367 m, 1243 m, 1143 m, 1075 w, 993 w, 843 w, 758 s, 740 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 573.26706$	573.26836	$[C_{30}H_{38}N_4O_6+Na]^+$

19.2.2 Fmoc-uC[(R)-(CH₂)₄N₃]-uD- O^tBu (137)



$M = 578.31 \text{ g mol}^{-1} \quad C_{32}H_{42}N_4O_6$

Eine Lösung der *N*-Boc-geschützten Aminosäure **126** (890 mg, 3.11 mmol, 1.0 Äq.) in CH_2Cl_2 (18.5 mL) wird mit TFA (9.3 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt und dann i. V. zur Trockne eingengt (Badtemperatur = 50 °C). Der Rückstand wird zweimal mit Toluol coevaporiert, 1.5 h im HV getrocknet und anschließend in H_2O (31 mL) gelöst. Nacheinander werden $NaHCO_3$ (1.05 g, 12.44 mmol, 4.0 Äq.), *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (1.10 g, 3.27 mmol, 1.1 Äq.) und Aceton (31 mL) zugegeben. Die Mischung wird 4 h bei RT gerührt, das Aceton am Rotationsverdampfer entfernt und ges. $NaHCO_3$ -Lsg. (90 mL) zugefügt. Nach kräftiger Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et_2O (3 × 90 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird durch Zugabe von 5 %iger $KHSO_4$ -Lsg. angesäuert (pH = 2-3) und dann mit $EtOAc$ (4 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, i. V. zur Trockne eingengt und im HV getrocknet. Die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure **128** (1.17 g, 92 %) wird als hellgelber Schaum erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

Die Ester-Synthese zwischen dem D-Fragment **24** (220 mg, 1.17 mmol, 1.0 Äq.) und der entsprechenden *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure **128** (572 mg, 1.40 mmol, 1.2 Äq.) erfolgt gemäß AAV-7. Reinigung durch Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 5/1) und Trocknung im HV ergibt **137** als hellgelbes Öl.

Ausbeute: 77 mg (0.133 mmol, 11 %).

$R_f = 0.35$ (Hexan/EtOAc = 4/1).

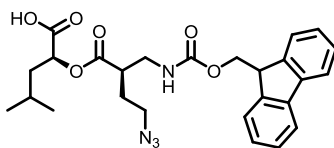
$[\alpha]_D^{RT} = -20.4$ ($c = 0.98$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.95 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 0.98 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 1.50 (s, 9H, uD-C(CH_3)₃), 1.42-1.85 (m, 9H, uD- C^βH_2 , uD- C^γH , uC- C^βH_2 , uC- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ und uC- $\text{C}^\delta\text{H}_2$), 2.72 (m, 1H, uC- C^αH), 3.22-3.30 (m, 2H, uC- $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$), 3.34 (ddd, $J = 14.1, 9.0, 5.4$ Hz, 1H, uC- $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{NH}$), 3.62 (ddd, $J = 13.8, 8.0, 4.4$ Hz, 1H, uC- $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{NH}$), 4.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CHCH_2 , Fmoc), 4.29 (dd, $J = 10.4, 7.6$ Hz, 1H, $\text{CHCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$, Fmoc), 4.37 (dd, $J = 10.4, 7.5$ Hz, 1H, $\text{CHCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$, Fmoc), 5.09 (dd, $J = 9.7, 3.9$ Hz, 1H, uD- C^αH), 6.13 (m, 1H, NH), 7.27-7.35 (m, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 7.36-7.43 (m, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 7.56-7.67 (m, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 7.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 21.5 (uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 23.1 (uD- $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 24.3 (uC- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 24.8 (uD- C^γH), 28.0 (uD-C(CH_3)₃), 28.6, 28.9 (uC- C^βH_2 and uC- $\text{C}^\delta\text{H}_2$), 39.5 (uD- C^βH_2), 42.5 (uC- CH_2NH), 46.7 (uC- C^αH), 47.2 (CHCH_2 , Fmoc), 51.1 (uC- $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$), 66.8 (CHCH_2 , Fmoc), 71.3 (uD- C^αH), 82.7 (uD- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 119.9 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 125.19, 125.27, 126.94, 127.01, 127.6 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 141.20, 141.22, 143.94, 144.09 (C^{ar} , Fmoc), 156.6 (uC-NHCO₂), 170.5, 173.5 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3350 br w, 2932 br m, 2869 w, 2093 s, 1720 vs, 1526 m, 1449 m, 1392 w, 1368 m, 1242 m, 1143 m, 1125 w, 1075 w, 993 w, 843 w, 758 s, 739 s.

HRMS (MALDI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	601.29899	601.29966	$[\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6+\text{Na}]^+$

19.2.3 Fmoc-uC[(R)-(CH₂)₂N₃]-uD-OH (**138**)

$$M = 494.54 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6$$

Die Spaltung des *tert*-Butylesters **136** (440 mg, 0.800 mmol) erfolgt gemäß AAV-8. Die nach Trocknung im HV erhaltene Carbonsäure **138** wird ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion verwendet.

Ausbeute: 372 mg (94 % d. Th.).

$R_f = 0.40$ (Hexan/EtOAc = 1/1 + 1 % AcOH).

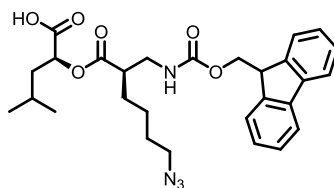
$[\alpha]_D^{RT} = -15.8$ (c = 0.99 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, Rotamere): δ [ppm] = 0.90 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.94 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.63-2.03 (m, 5H, uD-C ^{β} H₂, uD-C ^{γ} H und uC-C ^{β} H₂), 2.84 (m, 1H, uC-C ^{α} H), 2.61/3.09 (m, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.34-3.46 (m, 2.2H, uC-C ^{γ} H₂ und uC-CH^AH^BNH), 3.50 (m, 0.6H, uC-CH^AH^BNH), 4.19 (m, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.34/4.55 (m, 2H, CHCH₂, Fmoc), 5.06/5.13 (dd, $J = 9.9, 3.6$ Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 5.61/6.20 (m, 1H, NH), 7.27-7.34 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.36-7.43 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.50-7.60 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 10.08 (bs, 1H, CO₂H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS, Rotamere): δ [ppm] = 21.3/21.4 (uD-C ^{δ} H₃), 22.86/22.94 (uD-C ^{δ} H₃), 24.68/24.72 (uD-C ^{γ} H), 28.6/28.7 (uC-C ^{β} H₂), 39.2/39.3 (uD-C ^{β} H₂), 41.9/42.7 (uC-CH₂NH), 43.4/43.8 (uC-C ^{α} H), 47.01/47.06 (CHCH₂, Fmoc), 48.7/48.9 (uC-C ^{γ} H₂), 67.1/67.2 (CHCH₂, Fmoc), 70.9/71.0 (uD-C ^{α} H), 119.9 (C^{ar}H, Fmoc), 125.16, 125.24, 126.99, 127.04, 127.6 (C^{ar}H, Fmoc), 141.2/141.3, 143.5/143.7, 143.8 (C^{ar}, Fmoc), 156.7/157.3 (uC-NHCO₂), 172.7/173.3, 174.4/175.3 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3338 br w, 2955 m, 2871 w, 2095 s, 1720 vs, 1525 m, 1448 m, 1343 w, 1261 w, 1166 m, 1144 m, 1073 w, 986 w, 922 w, 758 m, 738 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	517.20496	517.20576	[C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₆ +Na] ⁺

19.2.4 Fmoc-uC[(R)-(CH₂)₄N₃]-uD-OH (139)

$$M = 522.60 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$$

Die Spaltung des *tert*-Butylesters **137** (116 mg, 0.200 mmol) erfolgt gemäß AAV-8. Die nach Trocknung im HV erhaltene Carbonsäure **139** wird ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion verwendet.

Ausbeute: 103 mg (99 % d. Th.).

$R_f = 0.52$ (Hexan/EtOAc = 1/1 + 1 % AcOH).

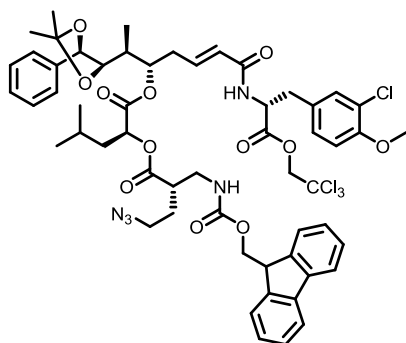
$[\alpha]_D^{RT} = -17.0$ ($c = 0.98$ in CHCl_3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS, Rotamere): δ [ppm] = 0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.40-1.91 (m, 9H, uD-C ^{β} H₂, uD-C ^{γ} H, uC-C ^{β} H₂, uC-C ^{γ} H₂ und uC-C ^{δ} H₂), 2.58/2.73 (m, 1H, uC-C ^{α} H), 3.15/3.24 (m, 2H, uC-C ^{ϵ} H₂), 3.32 (ddd, $J = 14.1, 9.1, 5.4$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.54 (ddd, $J = 13.8, 7.5, 4.4$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 4.20 (m, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.32/4.49 (m, 2H, CHCH₂, Fmoc), 5.09/5.13 (dd, $J = 10.1, 3.6$ Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 5.71/6.23 (m, 1H, NH), 7.27-7.33 (m, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc), 7.35-7.43 (m, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc), 7.50-7.60 (m, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc), 7.74 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, C^{*ar*}H, Fmoc), 8.54 (bs, 1H, CO₂H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS, Rotamere): δ [ppm] = 21.15/21.23 (uD-C ^{δ} H₃), 22.92/22.96 (uD-C ^{δ} H₃), 24.08/24.15 (uC-C ^{γ} H₂), 24.69/24.76 (uD-C ^{γ} H), 28.58/28.65, 29.0/29.1 (uC-C ^{β} H₂ und uC-C ^{δ} H₂), 39.26/39.32 (uD-C ^{β} H₂), 42.2/43.1 (uC-CH₂NH), 46.2/46.6 (uC-C ^{α} H), 47.1 (CHCH₂, Fmoc), 51.1 (uC-C ^{ϵ} H₂), 67.0/67.1 (CHCH₂, Fmoc), 70.5/70.6 (uD-C ^{α} H), 119.9 (C^{*ar*}H, Fmoc), 124.63/125.10, 124.66/125.18, 126.99/127.04, 127.66/127.76 (C^{*ar*}H, Fmoc), 141.2/141.3, 143.56/143.79, 143.64/143.92 (C^{*ar*}, Fmoc), 156.6/157.2 (uC-NHCO₂), 172.9/173.7, 174.7/175.3 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3337 br w, 2929 m, 2869 m, 2092 s, 1721 vs, 1527 m, 1448 m, 1343 w, 1251 br m, 1183 m, 1144 m, 1074 m, 988 w, 922 w, 758 m, 729 s.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	523.25484	523.25511	$[\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6+\text{H}]^+$
$m/z =$	540.28159	540.28166	$[\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6+\text{NH}_4]^+$
$m/z =$	545.23690	545.23706	$[\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6+\text{Na}]^+$

19.2.5 *seco*-uA[Acetonid]-uC[(S)-(CH₂)₂N₃]-Cryptophycin-1 (**134**)

$$M = 1139.94 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{56}\text{H}_{63}\text{Cl}_4\text{N}_5\text{O}_{12}$$

Eine Lösung der *N*-Boc-geschützten Aminosäure **ent-125** (370 mg, 1.43 mmol, 1.0 Äq.) in CH₂Cl₂ (8.6 mL) wird mit TFA (4.3 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt und dann i. V. zur Trockne eingengt (Badtemperatur = 50 °C). Der Rückstand wird dreimal mit Toluol coevaporiert, 2 h im HV getrocknet und anschließend in H₂O (14 mL) gelöst. Nacheinander werden NaHCO₃ (482 mg, 5.73 mmol, 4.0 Äq.), *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (532 mg, 1.58 mmol, 1.1 Äq.) und Aceton (14 mL) zugegeben. Die Mischung wird 4 h bei RT gerührt, das Aceton am Rotationsverdampfer entfernt und ges. NaHCO₃-Lsg. (45 mL) zugefügt. Nach kräftiger Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et₂O (3 × 45 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird durch Zugabe von 5 %iger KHSO₄-Lsg. angesäuert (pH = 2-3) und dann mit EtOAc (4 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, i. V. zur Trockne eingengt und im HV getrocknet. Die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure **ent-127** (512 mg, 94 %) wird als farbloser Schaum erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

Die Ester-Synthese zwischen dem DAB-Segment **133** (29 mg, 37 μmol, 1.0 Äq.) und der entsprechenden *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure **ent-127** (21 mg, 56 μmol, 1.5 Äq.) erfolgt gemäß AAV-7. Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 1/1) und Trocknung im HV wird das *seco*-Depsipeptid **134** als hellgelber, erstarrter Schaum erhalten.

Ausbeute: 18.5 mg (16.2 μmol, 44 %).

R_f = 0.58 (Hexan/EtOAc = 1/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -18.5$ (c = 0.99 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.91 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 0.94 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, uD-C^δH₃), 1.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.44 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.50 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.64-1.99 (m, 6H, uC-C^βH₂, uD-C^βH₂, uD-C^γH und uA-C^εH), 2.31-2.47 (m, 2H, uA-C^γH₂), 2.81 (m, 1H, uC-C^αH), 3.05 (dd, *J* = 14.0, 6.0 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.17 (dd, *J* = 14.2, 5.8 Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.26-3.46 (m, 3H, uC-C^γH₂ und uC-CH^AH^BNH), 3.59 (ddd, *J* = 13.9, 6.7, 4.2 Hz, 1H,

uC-CH^AH^BNH) 3.77-3.86 (m, 4H, uB-OCH₃ und uA-C^εH), 4.21 (m, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.29-4.37 (m, 2H, CHCH₂, Fmoc), 4.67 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, uA-C^ηH), 4.74 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.97 (dd, *J* = 9.9, 3.4 Hz, 1H, uD-C^αH), 5.02 (m, 1H, uB-C^αH), 5.08 (ddm, *J* = 11.2, 6.7 Hz, 1H, uA-C^δH), 5.65 (dm, *J* = 15.8 Hz, 1H, uA-C^αH), 6.10 (m, 1H, NH), 6.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 6.65 (m, 1H, uA-C^βH), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, uB-C⁵H), 7.01 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H, uB-C⁶H), 7.14 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, uB-C²H), 7.27-7.43 (m, 9H, uA-C^{ar}H und C^{ar}H, Fmoc), 7.55-7.64 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.76 (dm, *J* = 7.7 Hz, 2H, C^{ar}H, Fmoc).

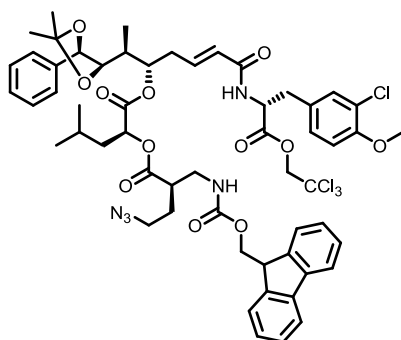
¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 9.6 (uA-C^εHCH₃), 21.4 (uD-C^δH₃), 23.2 (uD-C^δH₃), 24.7 (uD-C^γH), 27.0 (uA-C(CH₃)₂), 27.1 (uA-C(CH₃)₂), 27.8 (uC-C^βH₂), 32.7 (uA-C^γH₂), 35.7 (uA-C^εH), 36.6 (uB-C^βH₂), 39.2 (uD-C^βH₂), 42.4 (uC-CH₂NH), 43.1 (uC-C^αH), 47.2 (CHCH₂, Fmoc), 49.0 (uC-C^γH₂), 53.2 (uB-C^αH), 56.1 (uB-OCH₃), 66.9 (CHCH₂, Fmoc), 71.6 (uD-C^αH), 74.6 (uB-CH₂CCl₃), 75.7 (uA-C^δH), 80.3 (uA-C^ηH), 82.0 (uA-C^εH), 94.2 (uB-CCl₃), 109.0 (uA-C(CH₃)₂), 112.0 (uB-C⁵H), 119.9 (C^{ar}H, Fmoc), 122.2 (uB-C^{3'}), 125.3 (C^{ar}H, Fmoc), 126.7 (uA-C^αH), 126.96, 127.00, 127.6 (uA-C^{ar}H), 128.50 (uB-C⁶H), 128.54 (uB-C^{1'}), 128.7 (uA-C^{ar}H), 131.2 (uB-C²H), 137.4 (uA-C^{ar}), 139.2 (uA-C^βH), 141.2, 143.9/144.0 (C^{ar}H), 154.1 (uB-C⁴), 156.7 (uC-NHCO₂), 165.1 (uA-C=O), 170.0, 170.9, 174.2 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3325 br w, 2956 br w, 2359 vs, 2341 s, 2096 m, 1734 m, 1672 w, 1501 m, 1448 w, 1370 w, 1256 w, 1145 w, 1064 w, 1022 w, 883 w, 809 w, 758 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):

	gemessen	berechnet	Ion
<i>m/z</i> =	1160.31280	1160.31195	[C ₅₆ H ₆₃ Cl ₄ N ₅ O ₁₂ +Na] ⁺

19.2.6 *seco*-uA[Acetonid]-uC[(*R*)-(CH₂)₂N₃]-Cryptophycin-1 (140)



M = 1139.94 g mol⁻¹ C₅₆H₆₃Cl₄N₅O₁₂

Die Ester-Synthese zwischen dem AB-Segment **28** (490 mg, 0.738 mmol, 1.0 Äq.) und CD-Segment **138** (365 mg, 0.738 mmol, 1.0 Äq.) erfolgt gemäß AAV-9. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 2/1) gereinigt und nach Trocknung im HV wird das *seco*-Depsipeptid **140** als farbloser, erstarrter Schaum erhalten.

Ausbeute: 607 mg (0.532 mmol, 72 %).

$R_f = 0.46$ (Hexan/EtOAc = 6/4).

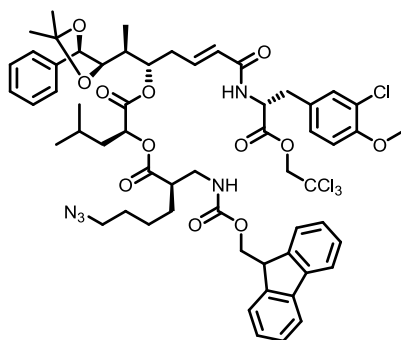
$[\alpha]_D^{RT} = -22.3$ ($c = 0.99$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 1.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, $\text{uA-C}^\epsilon\text{HCH}_3$), 1.46 (s, 3H, $\text{uA-C}(\text{CH}_3)_2$), 1.52 (s, 3H, $\text{uA-C}(\text{CH}_3)_2$), 1.54-1.81 (m, 5H, $\text{uC-C}^\beta\text{H}_2$, $\text{uD-C}^\beta\text{H}_2$ und $\text{uD-C}^\gamma\text{H}$), 1.92 (m, 1H, $\text{uA-C}^\epsilon\text{H}$), 2.37-2.47 (m, 2H, $\text{uA-C}^\gamma\text{H}_2$), 2.79 (m, 1H, $\text{uC-C}^\alpha\text{H}$), 3.06 (dd, $J = 14.1, 6.2$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.16 (dd, $J = 14.2, 5.9$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$), 3.31-3.51 (m, 4H, $\text{uC-C}^\gamma\text{H}_2$ und $\text{uC-CH}_2\text{NH}$), 3.79-3.85 (m, 4H, uB-OCH_3 und $\text{uA-C}^\zeta\text{H}$), 4.20 (m, 1H, CHCH_2 , Fmoc), 4.30-4.39 (m, 2H, CHCH_2 , Fmoc), 4.67 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $\text{uB-CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CCl}_3$), 4.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\eta\text{H}$), 4.75 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $\text{uB-CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CCl}_3$), 4.96 (dd, $J = 10.1, 3.4$ Hz, 1H, $\text{uD-C}^\alpha\text{H}$), 5.01 (m, 1H, $\text{uB-C}^\alpha\text{H}$), 5.06 (ddm, $J = 11.7, 6.2$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\delta\text{H}$), 5.63 (dm, $J = 15.6$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\alpha\text{H}$), 5.74 (m, 1H, NH), 6.42 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 6.61 (ddd, $J = 15.8, 6.6, 6.6$ Hz, 1H, $\text{uA-C}^\beta\text{H}$), 6.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^5\text{H}$), 7.01 (dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^6\text{H}$), 7.15 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, $\text{uB-C}^2\text{H}$), 7.27-7.43 (m, 9H, $\text{uA-C}^{\text{ar}}\text{H}$ und $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 7.54-7.63 (m, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 7.75 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 9.6 ($\text{uA-C}^\epsilon\text{HCH}_3$), 21.4 ($\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 23.1 ($\text{uD-C}^\delta\text{H}_3$), 24.8 ($\text{uD-C}^\gamma\text{H}$), 27.0 ($\text{uA-C}(\text{CH}_3)_2$), 27.1 ($\text{uA-C}(\text{CH}_3)_2$), 28.4 ($\text{uC-C}^\beta\text{H}_2$), 32.7 ($\text{uA-C}^\gamma\text{H}_2$), 35.7 ($\text{uA-C}^\epsilon\text{H}$), 36.5 ($\text{uB-C}^\beta\text{H}_2$), 39.2 ($\text{uD-C}^\beta\text{H}_2$), 41.9 ($\text{uC-CH}_2\text{NH}$), 43.6 ($\text{uC-C}^\alpha\text{H}$), 47.2 (CHCH_2 , Fmoc), 48.9 ($\text{uC-C}^\gamma\text{H}_2$), 53.2 ($\text{uB-C}^\alpha\text{H}$), 56.1 (uB-OCH_3), 66.9 (CHCH_2 , Fmoc), 71.6 ($\text{uD-C}^\alpha\text{H}$), 74.6 ($\text{uB-CH}_2\text{CCl}_3$), 75.6 ($\text{uA-C}^\delta\text{H}$), 80.3 ($\text{uA-C}^\eta\text{H}$), 82.0 ($\text{uA-C}^\zeta\text{H}$), 94.2 (uB-CCl_3), 109.0 ($\text{uA-C}(\text{CH}_3)_2$), 112.0 ($\text{uB-C}^5\text{H}$), 119.9 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 122.2 (uB-C^3), 125.1 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$, Fmoc), 125.5 ($\text{uA-C}^\alpha\text{H}$), 126.8, 127.0, 127.7 ($\text{uA-C}^{\text{ar}}\text{H}$), 128.5 ($\text{uB-C}^6\text{H}$), 128.7 (uB-C^1), 128.8 ($\text{uA-C}^{\text{ar}}\text{H}$), 131.2 ($\text{uB-C}^2\text{H}$), 137.4 (uA-C^{ar}), 139.0 ($\text{uA-C}^\beta\text{H}$), 141.2, 143.8/143.9 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H}$), 154.0 (uB-C^4), 156.5 (uC-NHCO_2), 165.1 (uA-C=O), 170.0, 170.5, 173.7 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3315 br w, 2954 br w, 2384 w, 2093 m, 1724 s, 1676 m, 1637 m, 1501 s, 1448 m, 1369 m, 1255 br s, 1165 s, 1063 m, 1023 m, 884 w, 809 w, 757 s, 740 s, 717 s, 700 s.

HRMS (MALDI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	1160.31187	1160.31195	$[\text{C}_{56}\text{H}_{63}\text{Cl}_4\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$
$m/z =$	1176.28507	1176.28589	$[\text{C}_{56}\text{H}_{63}\text{Cl}_4\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{K}]^+$

19.2.7 *seco*-uA[Acetonid]-uC[(*R*)-(CH₂)₄N₃]-Cryptophycin-1 (**141**)

$$M = 1168.00 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{58}\text{H}_{67}\text{Cl}_4\text{N}_5\text{O}_{12}$$

Die Ester-Synthese zwischen dem AB-Segment **28** (121 mg, 0.182 mmol, 1.0 Äq.) und CD-Segment **139** (95 mg, 0.182 mmol, 1.0 Äq.) erfolgt gemäß AAV-9. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 2/1) gereinigt und nach Trocknung im HV wird das *seco*-Depsipeptid **141** als farbloser, erstarrter Schaum erhalten.

Ausbeute: 139 mg (0.119 mmol, 66 %).

$R_f = 0.44$ (Hexan/EtOAc = 6/4).

$[\alpha]_D^{RT} = -23.1$ ($c = 1.00$ in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.91 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, uD-C^δH₃), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, uD-C^δH₃), 1.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.52 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.41-1.82 (m, 9H, uC-C^βH₂, uC-C^γH₂, uC-C^δH₂, uD-C^βH₂ und uD-C^γH), 1.93 (m, 1H, uA-C^εH), 2.30-2.44 (m, 2H, uA-C^γH₂), 2.67 (m, 1H, uC-C^αH), 3.05 (dd, $J = 14.2, 6.4$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.16 (dd, $J = 14.1, 5.9$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.20-3.34 (m, 3H, uC-C^εH₂ und uC-CH^AH^BNH), 3.52 (ddd, $J = 14.0, 7.5, 4.4$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.78-3.85 (m, 4H, uB-OCH₃ und uA-C^ζH), 4.20 (m, 1H, CHCH₂, Fmoc), 4.28-4.39 (m, 2H, CHCH₂, Fmoc), 4.66 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, uA-C^ηH), 4.74 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, uB-CH^AH^BCCl₃), 4.94-5.02 (m, 2H, uD-C^αH und uB-C^αH), 5.06 (ddm, $J = 11.4, 6.2$ Hz, 1H, uA-C^δH), 5.62 (dm, $J = 15.6$ Hz, 1H, uA-C^αH), 5.83 (m, 1H, NH), 6.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 6.61 (ddd, $J = 15.6, 6.6, 6.6$ Hz, 1H, uA-C^βH), 6.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, uB-C⁵H), 7.02 (dd, $J = 8.4, 2.3$ Hz, 1H, uB-C⁶H), 7.16 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, uB-C²H), 7.27-7.43 (m, 9H, uA-C^{ar}H und C^{ar}H, Fmoc), 7.54-7.63 (m, 2H, C^{ar}H, Fmoc), 7.75 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, C^{ar}H, Fmoc).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 9.6 (uA-C^εHCH₃), 21.4 (uD-C^δH₃), 23.1 (uD-C^δH₃), 24.8 (uD-C^γH), 27.0 (uA-C(CH₃)₂), 27.1 (uA-C(CH₃)₂), 24.2, 28.6, 28.8 (uC-C^βH₂, uC-C^γH₂ und uC-C^δH₂), 32.6 (uA-C^γH₂), 35.6 (uA-C^εH), 36.6 (uB-C^βH₂), 39.2 (uD-C^βH₂), 42.3 (uC-CH₂NH), 46.4 (uC-C^αH), 47.2 (CHCH₂, Fmoc), 51.0 (uC-C^εH₂), 53.2 (uB-C^αH), 56.1 (uB-OCH₃), 66.8 (CHCH₂, Fmoc), 71.2 (uD-C^αH), 74.6 (uB-CH₂CCl₃), 75.6 (uA-C^δH), 80.3 (uA-C^ηH), 82.0 (uA-C^ζH), 94.2 (uB-

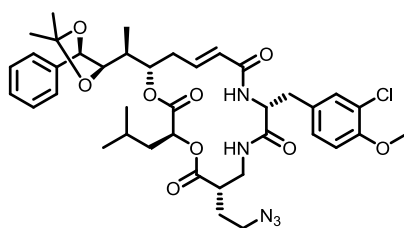
CCl₃), 109.0 (uA-C(CH₃)₂), 112.0 (uB-C⁵H), 119.9 (C^{ar}H, Fmoc), 122.2 (uB-C³), 125.2 (C^{ar}H, Fmoc), 125.6 (uA-C^αH), 126.8, 127.0, 127.6 (uA-C^{ar}H), 128.5 (uB-C⁶H and uB-C¹), 128.8 (uA-C^{ar}H), 131.1 (uB-C²H), 137.4 (uA-C^{ar}), 138.9 (uA-C^βH), 141.2, 143.9/144.0 (C^{ar}H), 154.0 (uB-C⁴), 156.5 (uC-NHCO₂), 165.1 (uA-C=O), 170.0, 170.6, 174.1 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3312 br w, 2931 m, 2870 m, 2091 s, 1722 vs, 1673 s, 1643 m, 1502 s, 1449 m, 1370 m, 1283 br s, 1162 br s, 1064 s, 1022 br s, 885 w, 807 w, 782 w, 575 m, 739 m.

HRMS (MALDI-FT-ICR):

	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	1188.34245	1188.34325	[C ₅₈ H ₆₇ Cl ₄ N ₅ O ₁₂ +Na] ⁺

19.2.8 uA[Acetonid]-uC[(S)-(CH₂)₂N₃]-Cryptophycin-1 (135)



$M = 768.30 \text{ g mol}^{-1}$ C₃₉H₅₀ClN₅O₉

Die Makrolactamisierung des *seco*-Depsipeptids **134** (45.5 mg, 0.037 mmol) erfolgt gemäß AAV-10. Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 1/1 → 1/2) und Trocknung im HV wird das cyclische Produkt **135** als hellgelber, erstarrter Schaum isoliert.

Ausbeute: 17.6 mg (22.8 μmol, 57 %).

$R_f = 0.20$ (Hexan/EtOAc = 1/1).

$[\alpha]_D^{RT} = -7.8$ (c = 0.88 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.85 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, uD-C^δH₃), 0.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, uD-C^δH₃), 1.15 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA-C^εHCH₃), 1.39 (ddd, $J = 12.9, 8.6, 3.7$ Hz, 1H, uD-C^βH^AH^B), 1.46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.51 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.64-1.76 (m, 4H, uC-C^βH₂, uD-C^βH^AH^B und uD-C^γH), 1.85 (m, 1H, uA-C^εH), 2.23 (ddd, $J = 14.2, 11.2, 8.6$ Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.43 (ddm, $J = 14.2, 6.8$ Hz, 1H, uA-C^γH^AH^B), 2.74 (m, 1H, uC-C^αH), 3.06 (dd, $J = 14.5, 5.4$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.18 (dd, $J = 14.3, 6.8$ Hz, 1H, uB-C^βH^AH^B), 3.27-3.40 (m, 3H, uC-CH^AH^BNH und uC-C^γH₂), 3.75 (ddd, $J = 13.7, 8.0, 5.7$ Hz, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.80 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H, uA-C^ζH), 3.86 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, uA-C^ηH), 4.80 (m, 1H, uD-C^αH), 4.83 (dd, $J = 10.2, 3.7$ Hz, 1H, uB-C^αH), 4.92 (ddd, $J = 11.5, 6.7, 1.5$ Hz, 1H, uA-C^δH), 5.68 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, uA-C^αH), 5.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 6.40-6.47 (m, 2H, uA-C^βH und NH), 6.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, uB-

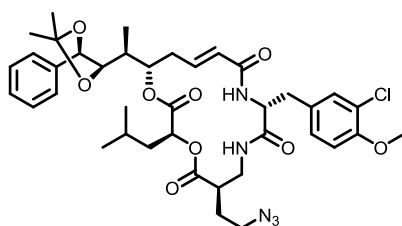
C^5H), 7.05 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H, uB- C^6H), 7.23 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, uB- C^{2H}), 7.32-7.41 (m, 5H, uA- C^{arH}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ [ppm] = 9.7 (uA- C^6HCH_3), 21.2 (uD- C^5H_3), 22.9 (uD- C^5H_3), 24.6 (uD- C^7H), 27.0 (uA- $C(CH_3)_2$), 27.2 (uA- $C(CH_3)_2$), 28.3 (uC- $C^{\beta}H_2$), 34.9 (uB- $C^{\beta}H_2$), 35.4 (uA- $C^{\gamma}H_2$), 36.9 (uA- C^6H), 38.9 (uC- CH_2NH), 39.5 (uD- $C^{\beta}H_2$), 41.1 (uC- $C^{\alpha}H$), 49.1 (uC- $C^{\gamma}H_2$), 53.6 (uB- $C^{\alpha}H$), 56.1 (uB-O CH_3), 71.5 (uD- $C^{\alpha}H$), 76.7 (uA- $C^{\delta}H$), 80.2 (uA- $C^{\eta}H$), 82.3 (uA- C^5H), 109.1 (uA- $C(CH_3)_2$), 112.0 (uB- C^5H), 122.3 (uB- C^3), 125.5 (uA- $C^{\alpha}H$), 126.6 (uA- C^{arH}), 128.6 (uB- C^6H), 128.6, 128.8 (uA- C^{arH}), 129.7 (uB- C^1), 131.3 (uB- C^2H), 137.4 (uA- C^{ar}), 141.0 (uA- $C^{\beta}H$), 153.9 (uB- C^4), 165.5 (uA-C=O), 170.4, 170.5, 174.0 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2929 br w, 2360 vs, 2341 s, 2096 w, 1733 w, 1670 w, 1501 w, 1457 w, 1369 w, 1257 w, 1167 w, 1063 w, 1023 w, 886 w, 755 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 790.31751$	790.31893	$[C_{39}H_{50}ClN_5O_9+Na]^+$

19.2.9 uA[Acetonid]-uC[(R)-(CH₂)₂N₃]-Cryptophycin-1 (142)



$M = 768.30 \text{ g mol}^{-1} \quad C_{39}H_{50}ClN_5O_9$

Die Makrolactamisierung des *seco*-Depsipeptids **140** (605 mg, 0.531 mmol) erfolgt gemäß AAV-10. Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 1/1) und Trocknung im HV wird das cyclische Produkt **142** als farbloser, erstarrter Schaum isoliert.

Ausbeute: 345 mg (0.449 mmol, 85 %).

$R_f = 0.23$ (Hexan/EtOAc = 6/4).

$[\alpha]_D^{RT} = +16.3$ ($c = 1.00$ in $CHCl_3$).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ [ppm] = 0.84 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, uD- $C^{\delta}H_3$), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD- $C^{\delta}H_3$), 1.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, uA- C^6HCH_3), 1.36 (ddd, $J = 13.4, 9.0, 3.9$ Hz, 1H, uD- $C^{\beta}H^AH^B$), 1.46 (s, 3H, uA- $C(CH_3)_2$), 1.51 (s, 3H, uA- $C(CH_3)_2$), 1.63-1.78 (m, 3H, uC- $C^{\beta}H_2$ und uD- $C^{\gamma}H$), 1.84 (qm, $J = 6.9$ Hz, 1H, uA- C^6H), 2.00 (m, 1H, uD- $C^{\beta}H^AH^B$), 2.23 (ddd, $J = 14.6, 11.1, 11.0$ Hz, 1H, uA- $C^{\gamma}H^AH^B$), 2.48 (ddm, $J = 14.8, 4.4$ Hz, 1H, uA- $C^{\gamma}H^AH^B$), 2.74 (m, 1H, uC- $C^{\alpha}H$), 2.97 (dd,

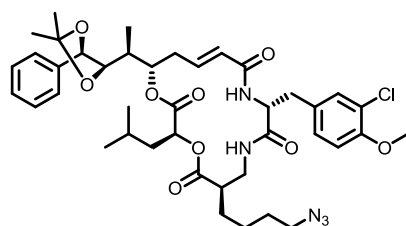
$J = 14.4, 7.8 \text{ Hz}$, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.11 (dd, $J = 14.5, 5.1 \text{ Hz}$, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.31 (m, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.47 (m, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.55-3.62 (m, 2H, uC-C ^{γ} H₂), 3.79 (dd, $J = 8.8, 1.9 \text{ Hz}$, 1H, uA-C ^{ζ} H), 3.86 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.68 (m, 1H, uB-C ^{α} H), 4.71 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, uA-C ^{η} H), 4.79 (dd, $J = 10.3, 3.7 \text{ Hz}$, 1H, uD-C ^{α} H), 5.03 (ddd, $J = 9.8, 7.3, 1.3 \text{ Hz}$, 1H, uA-C ^{δ} H), 5.67 (d, $J = 15.8 \text{ Hz}$, 1H, uA-C ^{α} H), 5.70 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, NH), 6.59 (ddd, $J = 15.0, 10.4, 4.4 \text{ Hz}$, 1H, uA-C ^{β} H), 6.83 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H, uB-C ^{ζ} H), 7.05 (dd, $J = 8.4, 2.1 \text{ Hz}$, 1H, uB-C ^{δ} H), 7.14-7.22 (m, 2H, uB-C ^{2} H und NH), 7.31-7.40 (m, 5H, uA-C ^{$\alpha\alpha'$} H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 9.7 (uA-C ^{ϵ} H₃), 21.3 (uD-C ^{δ} H₃), 23.0 (uD-C ^{δ} H₃), 24.5 (uD-C ^{γ} H), 27.0 (uA-C(CH₃)₂), 27.2 (uA-C(CH₃)₂), 28.1 (uC-C ^{β} H₂), 35.2 (uB-C ^{β} H₂), 35.8 (uA-C ^{γ} H₂), 36.8 (uA-C ^{ζ} H), 38.3 (uC-CH₂NH), 39.5 (uD-C ^{β} H₂), 40.5 (uC-C ^{α} H), 48.9 (uC-C ^{γ} H₂), 54.3 (uB-C ^{α} H), 56.1 (uB-OCH₃), 71.8 (uD-C ^{α} H), 76.2 (uA-C ^{δ} H), 80.1 (uA-C ^{η} H), 82.3 (uA-C ^{ζ} H), 109.1 (uA-C(CH₃)₂), 112.3 (uB-C ^{ζ} H), 122.3 (uB-C ^{$3'$}), 124.4 (uA-C ^{α} H), 126.5 (uA-C ^{$\alpha\alpha'$} H), 128.2 (uB-C ^{δ} H), 128.6, 128.8 (uA-C ^{$\alpha\alpha'$} H), 129.5 (uB-C ^{$1'$}), 130.9 (uB-C ^{2} H), 137.5 (uA-C ^{$\alpha\alpha'$}), 142.2 (uA-C ^{β} H), 154.0 (uB-C ^{$4'$}), 165.3 (uA-C=O), 170.5, 170.9, 175.2 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2985 br m, 2363 m, 2130 s, 2003 w, 1969 w, 1743 m, 1720 s, 1670 br s, 1528 m, 1501 s, 1439 w, 1369 m, 1345 w, 1232 s, 1194 s, 1166 vs, 1063 s, 1032 m, 1005 m, 967 w, 879 w, 809 w, 754 m.

HRMS (MALDI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 790.31814$	790.31893	[C ₃₉ H ₅₀ ClN ₅ O ₉ +Na] ⁺

19.2.10 uA[Acetonid]-uC[(R)-(CH₂)₄N₃]-Cryptophycin-1 (143)



$M = 796.35 \text{ g mol}^{-1}$ C₄₁H₅₄ClN₅O₉

Die Makrolactamisierung des *seco*-Depsipeptids **141** (138 mg, 0.118 mmol) erfolgt gemäß AAV-10. Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 1/1) und Trocknung im HV wird das cyclische Produkt **143** als farbloser, erstarrter Schaum isoliert.

Ausbeute: 73 mg (91.7 μmol , 78 %).

$R_f = 0.33$ (Hexan/EtOAc = 6/4).

$[\alpha]_D^{RT} = +16.0$ (c = 1.00 in CHCl₃).

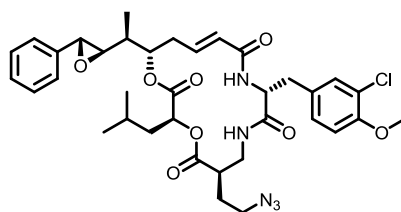
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.84 (d, J = 6.5 Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.94 (d, J = 6.6 Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.14 (d, J = 7.0 Hz, 3H, uA-C ^{ϵ} HCH₃), 1.37 (ddd, J = 13.3, 9.0, 3.7 Hz, 1H, uD-C ^{β} H^AH^B), 1.44-1.52 (m, 3H, uC-C ^{γ} H₂ und uD-C ^{γ} H), 1.46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.51 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1.58-1.78 (m, 5H, uC-C ^{β} H₂, uC-C ^{δ} H₂ und uD-C ^{β} H^AH^B), 1.84 (qm, J = 6.8 Hz, 1H, uA-C ^{ϵ} H), 2.22 (ddd, J = 14.3, 11.0, 9.4 Hz, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 2.45 (ddm, J = 14.5, 5.5 Hz, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 2.55 (m, 1H, uC-C ^{α} H), 3.01 (dd, J = 14.5, 7.4 Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.12 (dd, J = 14.5, 5.3 Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.24-3.34 (m, 2H, uC-C ^{ϵ} H₂), 3.38 (m, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.45 (m, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.80 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1H, uA-C ^{ζ} H), 3.86 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.70 (d, J = 8.8 Hz, 1H, uA-C ^{η} H), 4.76-4.81 (m, 2H, uB-C ^{α} H und uD-C ^{α} H), 4.98 (ddd, J = 11.1, 7.3, 1.5 Hz, 1H, uA-C ^{δ} H), 5.67 (d, J = 15.4 Hz, 1H, uA-C ^{α} H), 5.68 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH), 6.51 (ddd, J = 15.2, 9.6, 5.6 Hz, 1H, uA-C ^{β} H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H, uB-C⁵H), 6.93 (m, 1H, NH), 7.06 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H, uB-C⁶H), 7.21 (d, J = 2.1 Hz, 1H, uB-C²H), 7.32-7.41 (m, 5H, uA-C^{ar}H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 9.7 (uA-C ^{ϵ} HCH₃), 21.2 (uD-C ^{δ} H₃), 23.0 (uD-C ^{δ} H₃), 24.5 (uD-C ^{γ} H), 24.5 (uC-C ^{β} H₂), 27.0 (uA-C(CH₃)₂), 27.2 (uA-C(CH₃)₂), 27.8 (uC-C ^{γ} H₂), 28.5 (uC-C ^{δ} H₂), 35.0 (uB-C ^{β} H₂), 35.6 (uA-C ^{γ} H₂), 36.7 (uA-C ^{ϵ} H), 39.0 (uC-CH₂NH), 39.4 (uD-C ^{β} H₂), 44.0 (uC-C ^{α} H), 51.1 (uC-C ^{ϵ} H₂), 53.6 (uB-C ^{α} H), 56.1 (uB-OCH₃), 71.3 (uD-C ^{α} H), 76.3 (uA-C ^{δ} H), 80.1 (uA-C ^{η} H), 82.2 (uA-C ^{ζ} H), 109.1 (uA-C(CH₃)₂), 112.1 (uB-C⁵H), 122.3 (uB-C³), 124.9 (uA-C ^{α} H), 126.5 (uA-C^{ar}H), 128.3 (uB-C⁶H), 128.5, 128.7 (uA-C^{ar}H), 129.8 (uB-C¹), 130.9 (uB-C²H), 137.5 (uA-C^{ar}), 141.4 (uA-C ^{β} H), 153.8 (uB-C⁴), 165.3 (uA-C=O), 170.5, 170.9, 175.0 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2931 br m, 2385 w, 2090 s, 1962 w, 1748 m, 1719 m, 1676 br s, 1521 m, 1500 s, 1457 m, 1369 m, 1346 w, 1279 w, 1256 w, 1233 w, 1165 m, 1063 m, 1023 w, 1005 w, 966 w, 887 w, 810 w, 756 m, 700 m.

HRMS (MALDI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 818.34939$	818.35023	[C ₄₁ H ₅₄ ClN ₅ O ₉ +Na] ⁺

19.2.11 uC[(R)-(CH₂)₂N₃]-Cryptophycin-1 (144)



$M = 710.22 \text{ g mol}^{-1}$ C₃₆H₄₄ClN₅O₈

Die Überführung des Acetonids **142** (112 mg, 0.146 mmol) in das entsprechende Epoxid erfolgt gemäß AAV-11 – AAV-14. Die Reinigung durch Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 1/2) und anschließende Trocknung im HV ergibt das Cryptophycin-1 Analogon **144** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 36.4 mg (51.3 μmol , 35 % über 4 Stufen).

$R_f = 0.48$ (Hexan/EtOAc = 1/2).

$[\alpha]_D^{RT} = +30.4$ ($c = 0.53$ in CHCl_3).

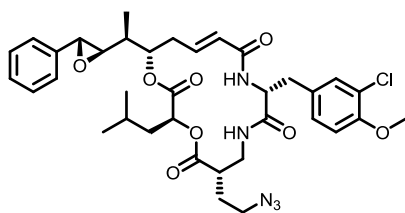
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C $^\delta$ H $_3$), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C $^\delta$ H $_3$), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA-C $^\epsilon$ HCH $_3$), 1.32 (ddd, $J = 13.9, 10.5, 5.0$ Hz, 1H, uD-C $^\beta$ H A H B), 1.65-1.76 (m, 3H, uC-C $^\beta$ H A H B , uD-C $^\beta$ H A H B und uD-C $^\gamma$ H), 1.80 (m, 1H, uA-C $^\epsilon$ H), 2.01 (m, 1H, uC-C $^\beta$ H A H B), 2.45 (ddd, $J = 14.6, 10.8, 10.8$ Hz, 1H, uA-C $^\gamma$ H A H B), 2.57 (ddd, $J = 14.8, 4.3, 2.3$ Hz, 1H, uA-C $^\gamma$ H A H B), 2.76 (m, 1H, uC-C $^\alpha$ H), 2.92 (dd, $J = 7.4, 2.0$ Hz, 1H, uA-C $^\zeta$ H), 2.97 (dd, $J = 14.6, 7.9$ Hz, 1H, uB-C $^\beta$ H A H B), 3.11 (dd, $J = 14.6, 5.1$ Hz, 1H, uB-C $^\beta$ H A H B), 3.26 (ddd, $J = 13.9, 7.8, 5.8$ Hz, 1H, uC-CH A H B NH), 3.48 (ddd, $J = 12.9, 7.8, 5.5$ Hz, 1H, uC-C $^\gamma$ H A H B), 3.55- 3.67 (m, 2H, uC-CH A H B NH und uC-C $^\gamma$ H A H B), 3.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, uA-C $^\eta$ H), 3.86 (s, 3H, uB-OCH $_3$), 4.69 (ddd, $J = 7.8, 7.5, 5.5$ Hz, 1H, uB-C $^\alpha$ H), 4.83 (dd, $J = 10.0, 3.6$ Hz, 1H, uD-C $^\alpha$ H), 5.19 (ddd, $J = 11.1, 5.2, 2.2$ Hz, 1H, uA-C $^\delta$ H), 5.68-5.76 (m, 2H, uA-C $^\alpha$ H und NH), 6.71 (ddd, $J = 15.0, 10.5, 4.3$ Hz, 1H, uA-C $^\beta$ H), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C 5 H), 7.03 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, uB-C 6 H), 7.12 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, uB-C 2 H), 7.19-7.25 (m, 3H, uA-C ar H und NH), 7.31-7.40 (m, 3H, uA-C ar H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 13.5 (uA-C $^\epsilon$ HCH $_3$), 21.2 (uD-C $^\delta$ H $_3$), 22.8 (uD-C $^\delta$ H $_3$), 24.4 (uD-C $^\gamma$ H), 28.0 (uC-C $^\beta$ H $_2$), 35.2 (uB-C $^\beta$ H $_2$), 36.8 (uA-C $^\gamma$ H $_2$), 38.0 (uC-CH $_2$ NH), 39.3 (uD-C $^\beta$ H $_2$), 40.3 (uC-C $^\alpha$ H), 40.5 (uA-C $^\epsilon$ H), 48.8 (uC-C $^\gamma$ H $_2$), 54.4 (uB-C $^\alpha$ H), 56.1 (uB-OCH $_3$), 59.0 (uA-C $^\eta$ H), 63.0 (uA-C $^\zeta$ H), 71.8 (uD-C $^\alpha$ H), 76.2 (uA-C $^\delta$ H), 112.3 (uB-C 5 H), 122.4 (uB-C 3), 124.6 (uA-C $^\alpha$ H), 125.5 (uA-C ar H), 128.2 (uB-C 6 H), 128.5, 128.7 (uA-C ar H), 129.4 (uB-C 1), 130.8 (uB-C 2 H), 136.7 (uA-C ar), 141.8 (uA-C $^\beta$ H), 154.0 (uB-C 4), 165.1 (uA-C=O), 170.8, 170.8, 175.4 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2921 br w, 2359 s, 2342 s, 2094 m, 2025 w, 1990 w, 1745 m, 1723 m, 1675 m, 1502 s, 1459 w, 1343 w, 1257 m, 1171 s, 1065 m, 1004 w, 972 w, 885 w, 814 w, 752 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):

	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	732.27884	732.27706	$[\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{ClN}_5\text{O}_8+\text{Na}]^+$

19.2.12 uC[(S)-(CH₂)₂N₃]-Cryptophycin-1 (145)

$$M = 710.22 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{ClN}_5\text{O}_8$$

Die Überführung des Acetonids **135** (27.5 mg, 0.036 mmol) in das entsprechende Epoxid erfolgt gemäß AAV-11 – AAV-14. Die Reinigung durch Flash-Chromatographie (Hexan/EtOAc = 1/3) und anschließende Trocknung im HV ergibt das Cryptophycin-1 Analogon **145** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 9 mg (12.7 μmol , 35 % über 4 Stufen).

$R_f = 0.46$ (Hexan/EtOAc = 1/2).

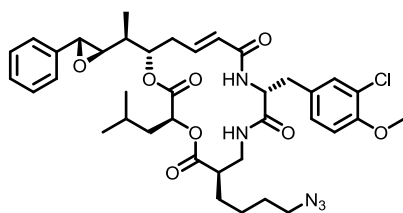
$[\alpha]_D^{RT} = -6.6$ ($c = 0.60$ in CHCl_3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, uA-C ^{ϵ} HCH₃), 1.39 (m, 1H, uD-C ^{β} H^AH^B), 1.64-1.77 (m, 4H, uC-C ^{β} H₂, uD-C ^{γ} H und uD-C ^{β} H^AH^B), 1.82 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H), 2.47 (ddd, $J = 14.1, 11.0, 8.6$ Hz, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 2.54 (dd, $J = 14.0, 6.6$ Hz, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 2.73 (m, 1H, uC-C ^{α} H), 2.93 (dd, $J = 7.3, 2.0$ Hz, 1H, uA-C ^{ζ} H), 3.04 (dd, $J = 14.3, 5.3$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.21 (dd, $J = 14.3, 6.5$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.28-3.35 (m, 2H, uC-CH₂NH), 3.38 (m, 1H, uC-C ^{γ} H^AH^B), 3.69 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, uA-C ^{η} H), 3.74 (ddd, $J = 13.7, 8.1, 5.7$ Hz, 1H, uC-C ^{γ} H^AH^B), 3.87 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.84 (ddd, $J = 7.8, 7.5, 6.0$ Hz, 1H, uB-C ^{α} H), 4.87 (dd, $J = 10.1, 3.1$ Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 5.08 (m, 1H, uA-C ^{δ} H), 5.61 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH), 5.80 (dm, $J = 15.6$ Hz, 1H, uA-C ^{α} H), 6.43 (m, 1H, NH), 6.58 (ddd, $J = 15.3, 8.5, 6.6$ Hz, 1H, uA-C ^{β} H), 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C ^{5} H), 7.05 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, uB-C ^{6} H), 7.21 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, uB-C ^{2} H), 7.22-7.25 (m, 2H, uA-C ^{η} H), 7.33-7.39 (m, 3H, uA-C ^{η} H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 13.4 (uA-C ^{ϵ} HCH₃), 21.2 (uD-C ^{δ} H₃), 22.9 (uD-C ^{δ} H₃), 24.6 (uD-C ^{γ} H), 28.3 (uC-C ^{β} H₂), 34.9 (uB-C ^{β} H₂), 36.7 (uA-C ^{γ} H₂), 38.9 (uC-CH₂NH), 39.5 (uD-C ^{β} H₂), 40.6 (uA-C ^{ϵ} H), 42.2 (uC-C ^{α} H), 49.2 (uC-C ^{γ} H₂), 53.5 (uB-C ^{α} H), 56.1 (uB-OCH₃), 58.9 (uA-C ^{η} H), 62.9 (uA-C ^{ζ} H), 71.8 (uD-C ^{α} H), 76.9 (uA-C ^{δ} H), 112.2 (uB-C ^{5} H), 122.5 (uB-C ^{3}), 125.6 (uA-C ^{η} H), 125.8 (uA-C ^{α} H), 128.6 (uB-C ^{6} H), 128.6, 128.7 (uA-C ^{η} H), 129.5 (uB-C ^{1}), 131.4 (uB-C ^{2} H), 136.7 (uA-C ^{η} H), 140.6 (uA-C ^{β} H), 154.0 (uB-C ^{4}), 165.4 (uA-C=O), 170.3, 170.9, 174.2 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2953 w, 2360 vs, 2341 s, 2099 w, 1728 w, 1654 w, 1503 m, 1440 w, 1370 w, 1257 w, 1179 m, 1064 w, 1006 w, 889 w, 816 w, 752 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 732.27689$	732.27706	$[\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{ClN}_5\text{O}_8 + \text{Na}]^+$

19.2.13 uC[(R)-(CH₂)₄N₃]-Cryptophycin-1 (**146**)

$$M = 738.27 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{ClN}_5\text{O}_8$$

Die Überführung des Acetonids **143** (30 mg, 0.038 mmol) in das entsprechende Epoxid erfolgt gemäß AAV-11 – AAV-14. Die Reinigung durch Flash-Chromatographie (Petrolether/EtOAc = 1/2) und anschließende Trocknung im HV ergibt das Cryptophycin-1 Analogon **146** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 11.5 mg (15.6 μmol , 41 %).

$R_f = 0.56$ (Hexan/EtOAc = 1/3).

$[\alpha]_D^{RT} = +30.8$ ($c = 0.50$ in CHCl_3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, uD-C ^{δ} H₃), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, uA-C ^{ϵ} HCH₃), 1.35 (m, 1H, uD-C ^{β} H^AH^B), 1.45-1.55 (m, 3H, uC-C ^{γ} H₂ und uC-C ^{β} H^AH^B), 1.59-1.64 (m, 2H, uC-C ^{δ} H₂), 1.68-1.76 (m, 3H, uC-C ^{β} H^AH^B, uD-C ^{β} H^AH^B und uD-C ^{γ} H), 1.80 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H), 2.46 (ddd, $J = 14.6, 10.7, 10.7$ Hz, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B), 2.51-2.59 (m, 2H, uA-C ^{γ} H^AH^B and uC-C ^{α} H), 2.92 (dd, $J = 7.5, 2.1$ Hz, 1H, uA-C ^{ζ} H), 3.04 (dd, $J = 14.5, 7.2$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.11 (dd, $J = 14.5, 5.5$ Hz, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B), 3.24-3.35 (m, 2H, uC-C ^{ϵ} H₂), 3.39 (m, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.46 (m, 1H, uC-CH^AH^BNH), 3.69 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, uA-C ^{η} H), 3.86 (s, 3H, uB-OCH₃), 4.78 (ddd, $J = 7.9, 7.7, 5.6$ Hz, 1H, uB-C ^{α} H), 4.82 (dd, $J = 10.1, 3.6$ Hz, 1H, uD-C ^{α} H), 5.16 (ddd, $J = 11.2, 5.0, 2.2$ Hz, 1H, uA-C ^{δ} H), 5.60 (m, 1H, NH), 5.74 (dm, $J = 15.5$ Hz, 1H, uA-C ^{α} H), 6.66 (ddd, $J = 15.1, 9.8, 5.2$ Hz, 1H, uA-C ^{β} H), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, uB-C ^{ζ} H), 7.00 (m, 1H, NH), 7.05 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, uB-C ^{δ} H), 7.20 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, uB-C ^{η} H), 7.22-7.26 (m, 2H, uA-C ^{ω} H), 7.33-7.39 (m, 3H, uA-C ^{ω} H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 13.6 (uA-C ^{ϵ} HCH₃), 21.2 (uD-C ^{δ} H₃), 22.9 (uD-C ^{δ} H₃), 24.5 (uD-C ^{γ} H), 24.5 (uC-C ^{β} H₂), 27.8 (uC-C ^{γ} H₂), 28.6 (uC-C ^{δ} H₂), 35.1 (uB-C ^{β} H₂), 36.7 (uA-C ^{γ} H₂), 38.8 (uC-CH₂NH), 39.4 (uD-C ^{β} H₂), 40.6 (uA-C ^{ϵ} H), 43.9 (uC-C ^{α} H), 51.1 (uC-C ^{ϵ} H₂), 53.7 (uB-C ^{α} H), 56.1 (uB-OCH₃), 59.0 (uA-C ^{η} H), 63.0 (uA-C ^{ζ} H), 71.5 (uD-C ^{α} H), 76.3 (uA-C ^{δ} H), 112.2 (uB-C ^{ζ} H), 122.4 (uB-C ^{ζ}), 125.2 (uA-C ^{α} H), 125.5 (uA-C ^{ω} H), 128.3 (uB-C ^{δ} H), 128.5, 128.7 (uA-C ^{ω} H), 129.6 (uB-C ^{ζ}), 131.0 (uB-C ^{η} H), 136.7 (uA-C ^{ω}), 141.1 (uA-C ^{β} H), 154.0 (uB-C ^{δ}), 165.2 (uA-C=O), 170.8, 170.8, 175.3 (C=O).

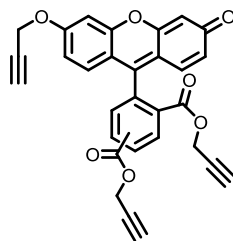
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2931 br w, 2385 br w, 2176 w, 2097 m, 1967 w, 1749 s, 1724 s, 1676 s, 1502 s, 1458 m, 1369 w, 1342 w, 1257 m, 1174 m, 1126 w, 1065 m, 1023 w, 974 w, 888 w, 812 w, 753 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	760.30984	760.30836	$[\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{ClN}_5\text{O}_8+\text{Na}]^+$

20 Synthese eines Cryptophycin-Fluorophor-RGD-Peptid-Konjugats

20.1 Synthese des Fluorophors

20.1.1 Diprop-2-inyl 2-(3-oxo-6-(prop-2-inyloxy)-3H-xanthen-9-yl)terephthalat/Diprop-2-inyl 4-(3-oxo-6-(prop-2-inyloxy)-3H-xanthen-9-yl)isophthalat (**151**)



$$M = 490.46 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_7$$

In Analogie zu CHEN^[244] wird ein Isomerengemisch von 5(6)-Carboxyfluorescein (**150**) (1.00 g, 2.66 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. DMF (15 mL) suspendiert und K₂CO₃ (1.10 g, 7.97 mmol, 3.0 Äquiv.) bei RT zugegeben. Anschließend wird Propargylbromid (0.86 mL, 7.97 mmol, 3.0 Äquiv.) zugetropft und das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht in einem abgedunkelten Kolben gerührt. Die Reaktionslösung wird mit EtOAc (220 mL) verdünnt und mit H₂O (3 x 45 mL) und ges. NaCl-Lsg. (2 x 45 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer i. V. eingengt. Das erhaltene orange, hochviskose Öl wird durch Flash-Chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH = 80/1→10/1) gereinigt und nach Trocknung im HV wird **151** als oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.123 g (2.29 mmol, 86 %).

R_f = 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH = 10/2).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, Isomere): δ [ppm] = 2.36 (m, 1H, C≡CH), 2.56 (t, *J* = 2.4 Hz, 0.4H, C≡CH), 2.60 (t, *J* = 2.4 Hz, 0.6H, C≡CH), 2.63 (m, 1H, C≡CH), 4.58-4.70 (m, 2H, CH₂), 4.79-4.84 (m, 2H, CH₂), 4.97 (t, *J* = 2.5 Hz, 0.8H, CH₂), 5.04 (t, *J* = 2.5 Hz, 1.2H, CH₂), 6.48 (m, 1H, C^{ar}H), 6.56 (ddd, *J* = 9.7, 4.9, 1.9 Hz, 1H, C^{ar}H), 6.82 (m, 3H, C^{ar}H), 7.08 (m, 1H, C^{ar}H), 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.6H, C^{ar}H), 8.03 (d, *J* = 1.5 Hz, 0.4H, C^{ar}H), 8.35 (m, 1H, C^{ar}H), 8.44 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 0.6H, C^{ar}H), 8.92 (d, *J* = 1.7 Hz, 0.4H, C^{ar}H).

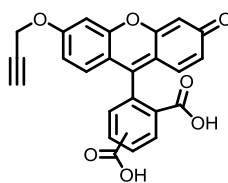
¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS, Isomere): δ [ppm] = 53.1, 53.2, 53.3, 56.3 (CH₂), 75.60, 75.65, 76.89, 77.04 (C≡CH), 75.79, 75.95, 76.09, 76.85 (C≡CH), 101.6, 106.03, 106.07, 113.81, 113.83 (C^{ar}H), 114.8, 115.1, 118.0, 118.3 (C^{ar}), 128.5, 128.7, 129.6, 129.8, 130.4, 130.8, 131.1, 131.5, 131.6, 132.5, 133.8 (C^{ar}H), 139.2, 147.8, 147.9, 153.9, 154.0, 158.5, 158.6, 161.8 (C^{ar}), 163.6, 163.7, 163.9, 164.0 (CO₂), 185.5 (C=O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2360 vs, 2341 vs, 1717 w, 1594 w, 1507 w, 1209 br w, 1105 w, 854 w, 668 m.

HRMS (ESI-FT-ICR):

	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	491.11279	491.11253	$[\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_7+\text{H}]^+$

20.1.2 2-(3-Oxo-6-(prop-2-inyloxy)-3H-xanthen-9-yl)terephthalsäure/4-(3-Oxo-6-(prop-2-inyloxy)-3H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (**152**)



$M = 414.36 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{O}_7$

In Anlehnung an eine Literaturvorschrift^[244] wird das dreifach Propargyl-geschützte Carboxyfluorescein **151** (100 mg, 0.204 mmol, 1.0 Äquiv.) in THF (3.5 mL) gelöst und mit LiOH·H₂O (43 mg, 1.02 mmol, 5.0 Äq.), gelöst in H₂O (1.0 mL), bei RT versetzt. Nach 2 h wird das Reaktionsgemisch mit H₂O (10 mL) verdünnt und mit 2 M HCl angesäuert (pH = 2). Die wässrige Phase wird mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. neutral gewaschen. Beim ersten Waschschrift werden einige Tropfen ges. NaHCO₃-Lsg. zugegeben. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingengt. Reinigung mittels präparativer RP-HPLC (Methode 4) und anschließende Lyophilisation ergibt das gewünschte Produkt **152** als voluminösen, hellgelben Feststoff.

Ausbeute: 77.3 mg (0.187 mmol, 91 %).

HPLC: $t_R = 20.8$ min (Methode 1).

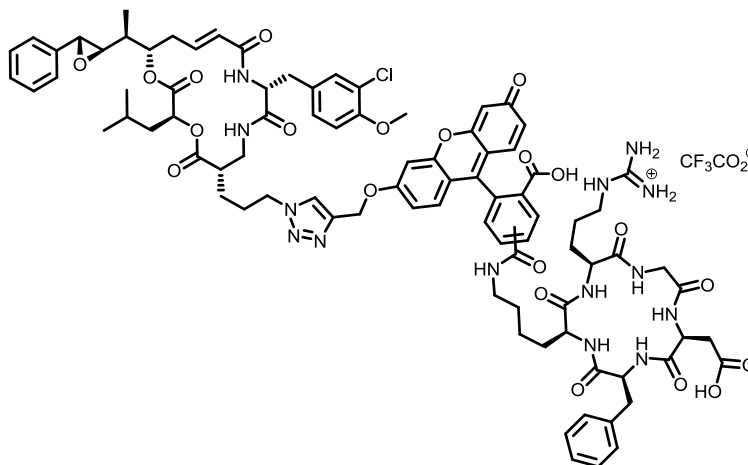
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, Isomere): δ [ppm] = 3.64 (m, 1H, C≡CH), 4.89 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, CH₂), 6.57 (ddd, $J = 8.7, 2.3, 2.2$ Hz, 1H, C^{ar}H), 6.64 (dd, $J = 8.7, 4.6$ Hz, 1H, C^{ar}H), 6.71-6.76 (m, 3H, C^{ar}H), 7.01 (m, 1H, C^{ar}H), 7.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.6H, C^{ar}H), 7.68 (m, 0.4H, C^{ar}H), 8.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.4H, C^{ar}H), 8.23 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 0.4H, C^{ar}H), 8.30 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 0.6H, C^{ar}H), 8.41 (m, 0.6 H, C^{ar}H).

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, DMSO-d₆, Isomere): δ [ppm] = 55.9 (CH₂), 78.76/78.81 (C≡CH), 82.88/82.94 (C≡CH), 101.9/102.3 (C^{ar}H), 108.07/108.8, 111.06/111.14 (C^{ar}), 112.5/113.0 (C^{ar}H), 124.5/124.6, 125.4/125.6 (C^{ar}H), 126.7(C^{ar}), 131.0 (C^{ar}H), 132.9(C^{ar}), 136.2(C^{ar}H), 137.4, 151.63/151.66, 151.72/151.75, 152.65, 156.0, 158.97/158.99, 159.72/159.76 (C^{ar}), 166.0, 167.80/167.83 (CO₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3283 w, 2358 w, 2338 w, 2127 w, 1757 s, 1607 s, 1502 m, 1461 m, 1333 w, 1217 s, 1178 vs, 1109 vs, 1022 s, 986 s, 849 m, 814 m, 760 m, 732 w.

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 415.08127$	415.08123	[C ₂₄ H ₁₄ O ₇ +H] ⁺

20.2 Cryptophycin-Fluorophor-RGD-Peptid-Konjugat (**154**)



$M = 1837.27 \text{ g mol}^{-1}$ C₉₀H₉₉ClF₃N₁₄O₂₃

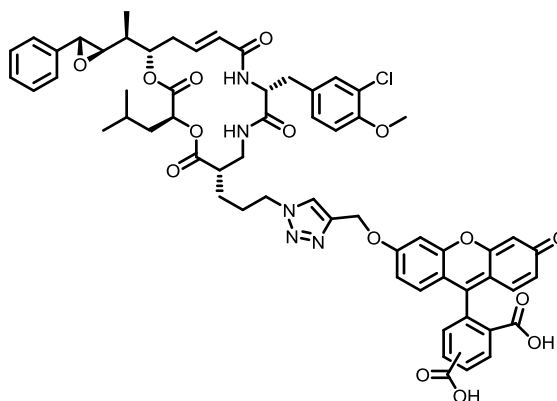
Analog zu NAHRWOLD^[46] wird eine Mischung aus uC[(S)-(CH₂)₃N₃]-Cryptophycin-1 **148** (1.5 mg, 2.10 μmol, 1.0 Äquiv.), Propargyl-Carboxyfluorescein-RGD-Peptid **153** (2.1 mg, 2.10 μmol, 1.0 Äquiv.) und Kupferpulver (2.0 mg) 30 min im HV getrocknet. Der Kolben wird mit Argon belüftet und *tert*-Butanol/H₂O (1 mL, 2:1 v/v) zugegeben. Die erhaltene Suspension wird 8 h bei RT gerührt. Daraufhin wird die Reaktionsmischung mit CH₃CN/H₂O (5 mL, 1:1 v/v) verdünnt, durch Celite[®] filtriert und das Filtrat lyophilisiert. Reinigung des erhaltenen Feststoffs durch präparative RP-HPLC (Methode 4) und unmittelbare Lyophilisation der Produktfraktion ergibt das Produkt **154** als gelben Feststoff.

Ausbeute: 1.5 mg (0.82 μmol, 39 %).

HPLC: $t_R = 23.6$ min (Methode 1).

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
	$m/z = 862.34873$	862.34716	[C ₈₈ H ₉₉ N ₁₄ O ₂₁ Cl+2H] ⁺²

20.3 Cryptophycin-Fluorophor-Konjugat (155)



$$M = 1138.61 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{C}_{61}\text{H}_{60}\text{ClN}_5\text{O}_{15}$$

Eine Mischung aus Cryptophycin **148** (1.75 mg, 2.4 μmol , 1.0 Äq.), dem Fluorophor **152** (1.00 mg, 2.4 μmol , 1.0 Äq.) und Kupferpulver (2.00 mg) wird in *tert*-Butanol (0.76 mL) und H₂O (0.38 mL) aufgenommen.^[46] Die Suspension wird über Nacht kräftig bei RT gerührt. Da die anschließende Reaktionskontrolle mittels analytischer RP-HPLC (Methode 1) einen nicht vollständigen Umsatz zeigt, wird abs. DMF (0.30 mL) zugegeben, um eine bessere Löslichkeit der Reagenzien zu erzielen. Nachdem das Reaktionsgemisch weitere 8 h bei RT gerührt und ein vollständiger Umsatz erzielt wurde, wird eine CH₃CN/H₂O-Mischung (20 mL, 1/1 v/v) zugegeben. Die Lösung wird lyophilisiert und der erhaltene Rückstand durch präparative RP-HPLC (Methode 4) gereinigt. Nach erneuter Lyophilisation wird das Konjugat **155** als voluminöser, gelber Feststoff isoliert.

Ausbeute: 2.2 mg (1.9 μmol , 81 %).

HPLC: $t_R = 25.5/25.7$ min (Methode 1).

HRMS (ESI-FT-ICR):	gemessen	berechnet	Ion
$m/z =$	1138.38706	1138.38472	$[\text{C}_{61}\text{H}_{60}\text{ClN}_5\text{O}_{15}+\text{H}]^+$
$m/z =$	1160.36636	1160.36667	$[\text{C}_{61}\text{H}_{60}\text{ClN}_5\text{O}_{15}+\text{Na}]^+$

20.4 Darstellung der Pufferlösung

Analog zur Vorschrift von WEIDGANS^[245] wird eine Phosphatpufferlösung mit einer Phosphatkonzentration von 10 mM hergestellt, indem zwei Maßlösungen mit einer Ionenstärke von 50 mM miteinander vermischt werden. Die Ionenstärke wird durch Zugabe von NaCl eingestellt. Für die Darstellung der sauren Maßlösung A werden 1.3799 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 2.3376 g NaCl in 1 L Millipore-Wasser gelöst. Das Lösen von 1.799 g $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 1.1688 g NaCl in 1 L Millipore-Wasser ergibt die basische Maßlösung B. Zur Einstellung der gewünschten pH-Werte werden die beiden Maßlösungen gemischt und der pH-Wert mit einem pH-Meter kontrolliert.

20.5 Aufnahme der Fluoreszenzspektren

Von Propargyl-Carboxyfluorescein **152** wird eine Maßlösung mit einer Konzentration von 10 nM in DMSO angesetzt. Im Falle von 5(6)-Carboxyfluorescein (**150**) beträgt die Konzentration der DMSO-Maßlösung 1 nM. Die Fluoreszenzspektren werden bei pH = 5, 7 und 9 aufgenommen. Dazu werden jeweils 3 mL der entsprechenden Pufferlösung mit 1 μL der Fluorophormaßlösung in der Küvette vermischt. Damit ergibt sich eine Konzentration von $c = 3.33 \cdot 10^{-6}$ mol/L für Propargyl-Carboxyfluorescein und $c = 3.33 \cdot 10^{-7}$ mol/L für Carboxyfluorescein. Für Propargyl-Carboxyfluorescein werden ebenfalls Emissionsspektren bei einer Konzentration von $c = 3.33 \cdot 10^{-7}$ mol/L gemessen. Dafür werden die Probelösungen um das 10-fache verdünnt. Die Emissionsspektren werden bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm in einem Meßbereich von 490 bis 700 nm aufgenommen.

21 Literaturverzeichnis

- [1] R. Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2007/2008*, Hrsg: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin, **2012**.
- [2] N. Sewald, S. Eißler, A. Stoncius, M. Nahrwold, *Synthesis* **2006**, 3747-3789.
- [3] R. E. Schwartz, C. F. Hirsch, D. F. Sesin, J. E. Flor, M. Chartrain, R. E. Fromtling, G. H. Harris, M. J. Salvatore, J. M. Liesch, K. Yudin, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *5*, 113-123.
- [4] G. Trimurtulu, I. Ohtani, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, L. Demchik, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4729-4737.
- [5] M. Kobayashi, M. Kurosu, N. Ohyabu, W. Wang, S. Fujii, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2196-2198.
- [6] M. Kobayashi, S. Aoki, N. Ohyabu, M. Kurosu, W. Wang, I. Kitagawa, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7969-7972.
- [7] T. Golakoti, J. Ogino, C. E. Heltzel, T. Le Husebo, C. M. Jensen, L. K. Larsen, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, S. L. Mooberry, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12030-12049.
- [8] G. V. Subbaraju, T. Golakoti, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 302-305.
- [9] S. Chaganty, T. Golakoti, C. Heltzel, R. E. Moore, W. Y. Yoshida, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1403-1406.
- [10] M. Eggen, G. I. Georg, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 85-101.
- [11] E. Hamel, D. G. Covell, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *2*, 19-53.
- [12] J. P. Stevenson, W. Sun, M. Gallagher, R. Johnson, D. Vaughn, L. Schuchter, K. Algazy, S. Hahn, N. Enas, D. Ellis, D. Thornton, P. J. O'Dwyer, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2524-2529.
- [13] M. J. Edelman, D. R. Gandara, P. Hausner, V. Israel, D. Thornton, J. DeSanto, L. A. Doyle, *Lung Cancer* **2003**, *39*, 197-199.
- [14] C. Sessa, K. Weigang-Köhler, O. Pagani, G. Greim, O. Mora, T. De Pas, M. Burgess, I. Weimer, R. Johnson, *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 2388-2396.
- [15] G. D'Agostino, J. Del Campo, B. Mellado, M. A. Izquierdo, T. Minarik, L. Cirri, L. Marini, J. L. Perez-Gracia, G. Scambia, *Int. J. Gynecol. Cancer* **2006**, *16*, 71-76.
- [16] K. Menon, E. Alvarez, P. Forler, V. Phares, T. Amsrud, C. Shih, R. Al-Awar, B. A. Teicher, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, *46*, 142-149.
- [17] K. W. Wolf, K. J. Böhm, *Biol. Unserer Zeit* **1997**, *27*, 87-95.
- [18] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253-265.
- [19] von Johannahoog (Eigenes Werk) CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>), 30.05.2012.
- [20] E. Nogales, S. Grayer Wolf, I. A. Khan, R. F. Luduena, K. H. Downing, *Nature* **1995**, *375*, 424-427.
- [21] J. Löwe, H. Li, K. H. Downing, E. Nogales, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045-1057.
- [22] B. Gigant, C. Wang, R. B. G. Ravelli, F. Roussi, M. O. Steinmetz, P. A. Curmi, A. Sobel, M. Knossow, *Nature* **2005**, *435*, 519-522.

- [23] R. B. G. Ravelli, B. Gigant, P. A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, M. Knossow, *Nature* **2004**, *428*, 198-202.
- [24] D. Panda, V. Ananthnarayan, G. Larson, C. Shih, M. A. Jordan, L. Wilson, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14121-14127.
- [25] D. Panda, R. H. Himes, R. E. Moore, L. Wilson, M. A. Jordan, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12948-12953.
- [26] R. Bai, R. E. Schwartz, J. A. Kepler, G. R. Pettit, E. Hamel, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4398-4406.
- [27] S. L. Mooberry, C. R. Taoka, L. Busquets, *Cancer Lett.* **1996**, *107*, 53-57.
- [28] A. Mitra, D. Sept, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13955-13962.
- [29] R. L. Bai, G. R. Pettit, E. Hamel, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17141-17149.
- [30] H. Boukari, R. Nossal, D. L. Sackett, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1292-1300.
- [31] P. Barbier, C. Gregoire, F. Devred, M. Sarrazin, V. Peyrot, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13510-13519.
- [32] H. Boukari, D. L. Sackett, P. Schuck, R. J. Nossal, *Biopolymers* **2007**, *86*, 424-436.
- [33] D. Panda, K. DeLuca, D. Williams, M. A. Jordan, L. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 9313-9318.
- [34] S. L. Mooberry, L. Busquets, G. Tien, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 440-448.
- [35] L. Drew, R. L. Fine, T. N. Do, G. P. Douglas, D. P. Petrylak, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3922-3932.
- [36] K. Lu, J. Dempsey, R. Schultz, C. Shih, B. Teicher, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2001**, *47*, 170-178.
- [37] C. Shih, B. A. Teicher, *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1259-1276.
- [38] C. D. Smith, X. Zhang, S. L. Mooberry, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3779-3784.
- [39] M. Al-Shawi, H. Omote, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2005**, *37*, 489-496.
- [40] M. M. Gottesman, V. Ling, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 998-1009.
- [41] C. F. Higgins, K. J. Linton, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 918-926.
- [42] C. F. Higgins, *Nature* **2007**, *446*, 749-757.
- [43] H. Yuan, X. Li, J. Wu, J. Li, X. Qu, W. Xu, W. Tang, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 470-476.
- [44] B. D. M. Chen, A. Nakeff, F. Valeriote, *Int. J. Cancer* **1998**, *77*, 869-873.
- [45] M. Nahrwold, S. Eißler, N. Sewald, *Chim. Oggi-Chem. Today (Suppl. S. Focus on Peptides)* **2008**, *26*, 13-16.
- [46] M. Nahrwold, β^2 -Aminosäuren als Bausteine funktionalisierter Cryptophycin-Analoga, Dissertation, Universität Bielefeld, **2009**.
- [47] S. Eißler, *Synthese von Cryptophycinen für SAR-Studien*, Dissertation, Universität Bielefeld, **2008**.
- [48] V. F. Patel, S. L. Andis, J. H. Kennedy, J. E. Ray, R. M. Schultz, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2588-2603.
- [49] M. Kobayashi, W. Wang, N. Ohyabu, M. Kurosu, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1598-600.

- [50] R. E. Moore, M. A. Tius, R. A. Barrow, J. Liang, T. H. Corbett, F. A. Valeriotte, T. K. Hemscheidt (University of Hawaii, Wayne State University), WO9640184A1, **1996**.
- [51] G. I. Georg, S. M. Ali, V. J. Stella, W. N. Waugh, R. H. Himes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1959-1962.
- [52] J. Liang, R. Moore, E. Moher, J. Munroe, R. Al-awar, D. Hay, D. Varie, T. Zhang, J. Aikins, M. Martinelli, C. Shih, J. Ray, L. Gibson, V. Vasudevan, L. Polin, K. White, J. Kushner, C. Simpson, S. Pugh, T. Corbett, *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 213-224.
- [53] R. S. Al-awar, T. H. Corbett, J. E. Ray, L. Polin, J. H. Kennedy, M. M. Wagner, D. C. Williams, *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1061-1067.
- [54] R. S. Al-Awar, W. J. Ehlhardt, S. V. Gottumukalla, M. J. Martinelli, E. D. Moher, R. E. Moore, J. E. Munroe, B. H. Norman, V. F. Patel, C. S. J. E. Ray, J. E. Toth, V. Vasudevan (Eli Lilly and Company, University of Hawaii, Wayne State University), United States Patent 6,680,311 B1, **2004**.
- [55] R. S. Al-awar, J. E. Ray, R. M. Schultz, S. L. Andis, J. H. Kennedy, R. E. Moore, J. Liang, T. Golakoti, G. V. Subbaraju, T. H. Corbett, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2985-3007.
- [56] J.-M. de Muys, R. Rej, N. Dieu, B. Go, S. Fortin, J.-F. Lavallée, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1111-1116.
- [57] C. Shih, L. S. Gossett, J. M. Gruber, C. S. Grossman, S. L. Andis, R. M. Schultz, J. F. Worzalla, T. H. Corbett, J. T. Metz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 69-74.
- [58] D. L. Varie, C. Shih, D. A. Hay, S. L. Andis, T. H. Corbett, L. S. Gossett, S. K. Janisse, M. J. Martinelli, E. D. Moher, R. M. Schultz, J. E. Toth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 369-374.
- [59] N. Murakami, W. Wang, S. Tamura, M. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1823-1826.
- [60] T. Bogner, *Cryptophycin Analoga: Synthese, Konjugation und biologische Studien*, Dissertation, Universität Bielefeld, **2011**.
- [61] S. B. Buck, J. K. Huff, R. H. Himes, G. I. Georg, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3697-3699.
- [62] N. Murakami, S. Tamura, W. Wang, T. Takagi, M. Kobayashi, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4323-4336.
- [63] O. H. David, D. B. Harper, *J. Fluorine Chem.* **1999**, *100*, 127-133.
- [64] K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, *317*, 1881-1886.
- [65] A. M. Thayer, *Chem. Eng. News* **2006**, *84*, 29-31.
- [66] S. K. Ritter, *Chem. Eng. News* **2012**, *90*, 10-17.
- [67] D. Michel, M. Schlosser, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4253-4260.
- [68] C. Isanbor, D. O'Hagan, *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 303-319.
- [69] W. K. Hagmann, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359-4369.
- [70] B. K. Park, N. R. Kitteringham, P. M. O'Neill, *Annu. Rev. Pharmacool. Toxicol.* **2001**, *41*, 443-470.
- [71] P. Kirsch, *Modern Fluoroorganic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [72] M. Crucianelli, *Chim. Ind. (Milan, Italy)* **2001**, *83*, 201-205.
- [73] C. D. Siebert, *Chemie in unserer Zeit* **2004**, *38*, 320-324.

- [74] F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen, *Drug Delivery in Oncology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, Vol. 1.
- [75] J.-P. Bégué, D. Bonnet-Delpon, *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2008**.
- [76] L. Schacter, *Semin. Oncol.* **1996**, *23*, 1-7.
- [77] T. Imbert, Y. Guminski, B. Monse, B. Hill, J.-P. Robin (Pierre Fabre Medicament, Fr.), WO9612727A1, **1996**.
- [78] J. M. Sargent, A. W. Elgie, C. J. Williamson, B. T. Hill, *Anti-Cancer Drugs* **2003**, *14*, 467-473.
- [79] A. Rivkin, T.-C. Chou, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2898-2910.
- [80] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01379287>, 30.05.2012.
- [81] T.-C. Chou, H. Dong, A. Rivkin, F. Yoshimura, A. E. Gabarda, Y. S. Cho, W. P. Tong, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4910-4915.
- [82] R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Second Edition, Elsevier Academic Press, Burlington, MA; San Diego, CA; London **1992**.
- [83] S. B. Rosenblum, T. Huynh, A. Afonso, H. R. Davis, N. Yumibe, J. W. Clader, D. A. Burnett, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 973-980.
- [84] I. Ojima, T. Inoue, S. Chakravarty, *J. Fluorine Chem.* **1999**, *97*, 3-10.
- [85] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330.
- [86] S. Jaracz, J. Chen, L. V. Kuznetsova, I. Ojima, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5043-5054.
- [87] C. G. Willett, Y. Boucher, E. di Tomaso, D. G. Duda, L. L. Munn, R. T. Tong, D. C. Chung, D. V. Sahani, S. P. Kalva, S. V. Kozin, M. Mino, K. S. Cohen, D. T. Scadden, A. C. Hartford, A. J. Fischman, J. W. Clark, D. P. Ryan, A. X. Zhu, L. S. Blazskowsky, H. X. Chen, P. C. Shellito, G. Y. Lauwers, R. K. Jain, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 145-147.
- [88] M. R. Mancuso, R. Davis, S. M. Norberg, S. O'Brien, B. Sennino, T. Nakahara, V. J. Yao, T. Inai, P. Brooks, B. Freimark, D. R. Shalinsky, D. D. Hu-Lowe, D. M. McDonald, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2610-2621.
- [89] R. K. Jain, *Science* **2005**, *307*, 58-62.
- [90] N. Almog, *Cancer Lett.* **2010**, *294*, 139-146.
- [91] G. P. Adams, L. M. Weiner, *Nat. Biotech.* **2005**, *23*, 1147-1157.
- [92] M. A. Fanale, A. Younes, *Drugs* **2007**, *67*, 333-350.
- [93] Q. Zhang, G. Chen, X. Liu, Q. Qian, *Cell Res.* **2007**, *17*, 89-99.
- [94] C. Liu, B. M. Tadayoni, L. A. Bourret, K. M. Mattocks, S. M. Derr, W. C. Widdison, N. L. Kedersha, P. D. Ariniello, V. S. Goldmacher, J. M. Lambert, W. A. Blättler, R. V. Chari, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 8618-8623.
- [95] R. V. J. Chari, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *31*, 89-104.
- [96] R. V. J. Chari, K. A. Jackel, L. A. Bourret, S. M. Derr, B. M. Tadayoni, K. M. Mattocks, S. A. Shah, C. Liu, W. A. Blättler, V. S. Goldmacher, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4079-4084.
- [97] B. Sammet, C. Steinkuehler, N. Sewald, *Pharm. Pat. Anal.* **2012**, *1*, 65-73.

- [98] G. Kohler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495-497.
- [99] K. D. Bagshawe, *Br. J. Cancer* **1987**, 56, 531-532.
- [100] P. D. Senter, M. G. Saulnier, G. J. Schreiber, D. L. Hirschberg, J. P. Brown, I. Hellström, K. E. Hellström, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85, 4842-4846.
- [101] K. N. Syrigos, A. A. Epenetos, *Anticancer Res.* **1999**, 19, 605-614.
- [102] S. M. Stribbling, J. Martin, R. B. Pedley, J. A. Boden, S. K. Sharma, C. J. Springer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, 40, 277-284.
- [103] K. N. Syrigos, G. Rowlinson-Busza, A. A. Epenetos, *Int. J. Cancer* **1998**, 78, 712-719.
- [104] R. Anderson, B. Kamen, K. Rothberg, S. Lacey, *Science* **1992**, 255, 410-411.
- [105] H. Elnakat, M. Ratnam, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, 1067-1084.
- [106] C. A. Ladino, R. V. J. Chari, L. A. Bourret, N. L. Kedersha, V. S. Goldmacher, *Int. J. Cancer* **1997**, 73, 859-864.
- [107] A. Gabizon, H. Shmeeda, A. T. Horowitz, S. Zalipsky, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, 1177-1192.
- [108] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 47, 113-131.
- [109] B. Říhová, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 29, 273-289.
- [110] Y. Hattori, Y. Maitani, *J. Controlled Release* **2004**, 97, 173-183.
- [111] L. Delmonte, T. H. Jukes, *Pharmacol. Rev.* **1962**, 14, 91-135.
- [112] S. Majumdar, T. J. Siahaan, *Med. Res. Rev.* **2012**, 32, 637-658.
- [113] M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, *Cell Tissue Res.* **2010**, 339, 269-280.
- [114] C. L. Gladson, D. A. Cheresch, *J. Clin. Invest.* **1991**, 88, 1924-1932.
- [115] P. Brooks, R. Clark, D. Cheresch, *Science* **1994**, 264, 569-571.
- [116] C. C. Kumar, *Curr. Drug. Targets* **2003**, 4, 123-131.
- [117] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, 12, 697-715.
- [118] A. L. Dunehoo, M. Anderson, S. Majumdar, N. Kobayashi, C. Berkland, T. J. Siahaan, *J. Pharm. Sci.* **2006**, 95, 1856-1872.
- [119] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 210, 911-921.
- [120] I. Dijkgraaf, J. Kruijtzter, S. Liu, A. Soede, W. Oyen, F. Corstens, R. Liskamp, O. Boerman, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, 34, 267-273.
- [121] X. Chen, C. Plasencia, Y. Hou, N. Neamati, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1098-1106.
- [122] M. Colin, R. P. Harbottle, A. Knight, M. Kornprobst, R. G. Cooper, A. D. Miller, G. Trugnan, J. Capeau, C. Coutelle, M. C. Brahimi-Horn, *Gene Therapy* **1998**, 5, 1488-1498.
- [123] J. Chen, S. Jaracz, X. Zhao, S. Chen, I. Ojima, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, 2, 873-890.
- [124] W.-C. Shen, H. J. P. Ryser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, 102, 1048-1054.

- [125] R. O. Dillman, D. E. Johnson, D. L. Shawler, J. A. Koziol, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 6097-6102.
- [126] T. Kaneko, D. Willner, I. Monkovic, J. O. Knipe, G. R. Braslawsky, R. S. Greenfield, D. M. Vyas, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 133-141.
- [127] R. S. Greenfield, T. Kaneko, A. Daus, M. A. Edson, K. A. Fitzgerald, L. J. Olech, J. A. Grattan, G. L. Spitalny, G. R. Braslawsky, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6600-6607.
- [128] P. R. Hamann, L. M. Hinman, C. F. Beyer, D. Lindh, J. Upešlacis, D. A. Flowers, I. Bernstein, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *13*, 40-46.
- [129] F. Kratz, U. Beyer, M. T. Schütte, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* **1999**, *16*, 245-288.
- [130] J. Yang, S. D. Kong, A. Luong, S. Howell (The University of California, USA), WO2007114946A2, **2007**.
- [131] K.-d. Yao, T. Peng, M.-x. Xu, C. Yuan, M. F. A. Goosen, Q.-q. Zhang, L. Ren, *Polym. Int.* **1994**, *34*, 213-219.
- [132] M. Sedlák, M. Pravda, F. Staud, L. Kubicová, K. Týčová, K. Ventura, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4069-4076.
- [133] M. Dyba, N. I. Tarasova, C. J. Michejda, *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 2311-2334.
- [134] P. Rejmanová, J. Kopeček, R. Duncan, J. B. Lloyd, *Biomaterials* **1985**, *6*, 45-48.
- [135] G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch, P. A. Trail, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 855-869.
- [136] A. Safavy, J. A. Bonner, H. W. Waksal, D. J. Buchsbaum, G. Y. Gillespie, R. Arani, D.-T. Chen, M. Carpenter, K. P. Raisch, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 302-310.
- [137] A. Safavy, G. I. Georg, D. V. Velde, K. P. Raisch, K. Safavy, M. Carpenter, W. Wang, J. A. Bonner, M. B. Khazaeli, D. J. Buchsbaum, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1264-1274.
- [138] L. Lam, C. Lam, W. Li, Y. Cao, *Drugs Future* **2003**, *28*, 905-910.
- [139] G. Saito, J. A. Swanson, K.-D. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 199-215.
- [140] A. Meister, *Pharmacol. Ther.* **1991**, *51*, 155-194.
- [141] J. Kigawa, Y. Minagawa, Y. Kanamori, H. Itamochi, X. Cheng, M. Okada, T. Oishi, N. Terakawa, *Cancer* **1998**, *82*, 697-702.
- [142] I. Tranoy-Opalinski, A. Fernandes, M. Thomas, J. P. Gesson, S. Papot, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 618-637.
- [143] K. A. Ajaj, M. L. Biniössek, F. Kratz, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 390-396.
- [144] P. J. Burke, P. D. Senter, D. W. Meyer, J. B. Miyamoto, M. Anderson, B. E. Toki, G. Manikumar, M. C. Wani, D. J. Kroll, S. C. Jeffrey, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1242-1250.
- [145] K. Miller, R. Erez, E. Segal, D. Shabat, R. Satchi-Fainaro, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2993-2998.
- [146] P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479-480.
- [147] A. Warnecke, F. Kratz, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1546-1552.
- [148] F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4628-4632.

- [149] I. Niculescu-Duvaz, D. Niculescu-Duvaz, F. Friedlos, R. Spooner, J. Martin, R. Marais, C. J. Springer, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2485-2489.
- [150] F. M. H. de Groot, G. F. Busscher, R. W. M. Aben, H. W. Scheeren, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2371-2376.
- [151] R. v. Brakel, R. C. M. Vulders, R. J. Bokdam, H. Grüll, M. S. Robillard, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 714-718.
- [152] M. Wakselman, *Nouv. J. Chim.* **1983**, *7*, 439-447.
- [153] Y. A. Müller, *Entwicklung säurelabiler Trigger-Gruppen auf Basis von Schiffischen Basen des p-Aminobenzylalkohols*, Dissertation, Universität Freiburg, **2010**.
- [154] M. J. Martinelli, R. Vaidyanathan, V. V. Khau, M. A. Staszak, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3365-3367.
- [155] J. Johnson, S.-H. Kim, M. Bifano, J. DiMarco, C. Fairchild, J. Gougoutas, F. Lee, B. Long, J. Tokarski, G. Vite, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1537-1540.
- [156] K. C. Nicolaou, K. Namoto, A. Ritzén, T. Ulven, M. Shoji, J. Li, G. D'Amico, D. Liotta, C. T. French, M. Wartmann, K.-H. Altmann, P. Giannakakou, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9313-9323.
- [157] K. C. Nicolaou, K. Namoto, J. Li, A. Ritzén, T. Ulven, M. Shoji, D. Zaharevitz, R. Gussio, D. L. Sackett, R. D. Ward, A. Hensler, T. Fojo, P. Giannakakou, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 69-75.
- [158] K. C. Nicolaou, P. K. Sasmal, G. Rassias, M. V. Reddy, K.-H. Altmann, M. Wartmann, A. O'Brate, P. Giannakakou, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3639-3644.
- [159] D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325-2333.
- [160] R. E. Notari, *Pharmacol. Ther.* **1981**, *14*, 25-53.
- [161] M. Shimaoka, T. A. Springer, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 703-716.
- [162] Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674-1689.
- [163] M. Roice, I. Johannsen, M. Meldal, *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 662-673.
- [164] B. Sammet, T. Bogner, M. Nahrwold, C. Weiss, N. Sewald, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6953-6960.
- [165] M. Nahrwold, T. Bogner, S. Eißler, S. Verma, N. Sewald, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1064-1067.
- [166] S. Eißler, T. Bogner, M. Nahrwold, N. Sewald, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11273-11287.
- [167] S. Eißler, M. Nahrwold, B. Neumann, H.-G. Stammer, N. Sewald, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 817-819.
- [168] N. Ragoussis, V. Ragoussis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3529-3534.
- [169] E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1163-1167.
- [170] E. Ratzke, *Synthese eines modifizierten D-Fragments für die Konjugation von Cryptophycinen mit Tumor-Targeting-Gruppen*, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, **2008**.
- [171] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557.
- [172] P. Danner, M. Bauer, P. Phukan, Martin E. Maier, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 317-325.
- [173] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989-1993.

- [174] I. Dhimitruka, J. SantaLucia, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 47-50.
- [175] M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953-956.
- [176] A. K. Ghosh, L. Swanson, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9823-9826.
- [177] T. Nagamitsu, D. Takano, T. Fukuda, K. Otaguro, I. Kuwajima, Y. Harigaya, S. Ōmura, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1865-1867.
- [178] D. W. Hoard, E. D. Moher, M. J. Martinelli, B. H. Norman, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1813-1815.
- [179] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10515-10530.
- [180] J. Liang, E. D. Moher, R. E. Moore, D. W. Hoard, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3143-3147.
- [181] C. A. Mast, S. Eißler, A. Stončius, H.-G. Stammer, B. Neumann, N. Sewald, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4667-4677.
- [182] G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1671-1673.
- [183] K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 560-563.
- [184] C. Pousset, M. Haddad, M. Larchevêque, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7163-7167.
- [185] A. Mori, I. Arai, H. Yamamoto, H. Nakai, Y. Arai, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 6447-6458.
- [186] H. E. Simmons, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5323-5324.
- [187] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, 3. Aufl., aktualisiert und überarb., Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, **2004**.
- [188] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic chemistry*, Oxford Univ. Press, Oxford [u.a.], **2006**.
- [189] J. Kang, G. J. Lim, S. K. Yoon, M. Y. Kim, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 564-577.
- [190] Z. Song, T. Lu, R. P. Hsung, Z. F. Al-Rashid, C. Ko, Y. Tang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4069-4072.
- [191] J. Balsells, P. J. Walsh, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5005-5008.
- [192] H. Shitama, T. Katsuki, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2450-2453.
- [193] H. Du, J. Long, Y. Shi, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2827-2829.
- [194] D. A. Anderson, P. A. Christenson, P. J. Riker, J. M. Yurecko, Jr. (Givaudan, L., et Cie. S. A., Switz.), WO9210107A1, **1992**.
- [195] Y. Tsuzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1939**, *14*, 35-40.
- [196] S. E. Denmark, J. P. Edwards, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6974-6981.
- [197] I. Arai, A. Mori, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8254-8256.
- [198] Y. Inouye, T. Sugita, H. M. Walborsky, *Tetrahedron* **1964**, *20*, 1695-1699.
- [199] R. A. Barrow, T. Hemscheidt, J. Liang, S. Paik, R. E. Moore, M. A. Tius, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2479-2490.

- [200] J. G. Hill, K. B. Sharpless, C. M. Exon, R. Regenye, *Org. Synth.* **1985**, *63*, 66-72.
- [201] W. Kroutil, M. E. Lasterra-Sanchez, S. J. Maddrell, P. Mayon, P. Morgan, S. M. Roberts, S. R. Thornton, C. J. Todd, M. Tuter, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 2837-2844.
- [202] R. Balamurugan, R. B. Kothapalli, G. K. Thota, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 1557-1569.
- [203] N. Hashimoto, A. Kanda, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 405-406.
- [204] Y. Tu, Z.-X. Wang, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9806-9807.
- [205] Z.-X. Wang, Y. Tu, M. Frohn, Y. Shi, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2328-2329.
- [206] Z.-X. Wang, Y. Tu, M. Frohn, J.-R. Zhang, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11224-11235.
- [207] M. Frohn, Y. Shi, *Synthesis* **2000**, 1979-2000.
- [208] Z.-X. Wang, Y. Shi, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3099-3104.
- [209] M.-X. Zhao, Y. Shi, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5377-5379.
- [210] K. C. Majumdar, S. K. Chattopadhyay, *Heterocycles in Natural Product Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [211] T. Suzuki, H. Saimoto, H. Tomioka, K. Oshima, H. Nozaki, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3597-3600.
- [212] W. R. Roush, M. A. Adam, S. M. Peseckis, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1377-1380.
- [213] R. S. Al-Awar, W. J. Ehlhardt, S. V. Gottumukkala, M. J. Martinelli, E. D. Moher, R. E. Moore, J. E. Munroe, B. H. Norman, V. F. Patel, C. Shih, J. E. Toth, V. Vasudevan, J. E. Ray (Eli Lilly and Company, University of Hawaii, Wayne State University), WO9808505A1, **1998**.
- [214] R. E. Moore, T. K. Hemscheidt (University of Hawaii, Wayne State University), WO9708334A1, **1997**.
- [215] C. Shih, D. C. Williams (Eli Lilly and Company), EP870510A2, **1998**.
- [216] B. Sammet, *Synlett* **2009**, 3050-3051.
- [217] B. E. Maryanoff, A. B. Reitz, B. A. Duhl-Emswiler, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 217-226.
- [218] R. G. F. Giles, R. W. Rickards, B. S. Senanayake, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3949-3956.
- [219] P. Cao, J. Qu, G. Burton, R. A. Rivero, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7204-7208.
- [220] S. Lin, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 512-515.
- [221] A. K. Mapp, C. H. Heathcock, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 23-27.
- [222] E. W. Werner, M. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13981-13983.
- [223] L. A. Körte, *Synthese eines CF₃-funktionalisierten Cryptophycin A-Fragments*, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, **2011**.
- [224] P. W. Collins, S. W. Kramer, A. F. Gasielcki, R. M. Weier, P. H. Jones, G. W. Gullikson, R. G. Bianchi, R. F. Bauer, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 193-197.
- [225] H. C. Brown, S. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4370-4371.
- [226] G. W. Kabalka, J. D. Baker, G. W. Neal, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 512-517.

- [227] E. A. Ilardi, C. E. Stivala, A. Zakarian, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1727-1730.
- [228] Y. Kobayashi, R. Mizojiri, E. Ikeda, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5391-5399.
- [229] R. Pedrosa, C. Andrés, J. Nieto, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 782-789.
- [230] E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2647-2650.
- [231] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
- [232] S. Chandrasekhar, M. S. Kumar, B. Muralidhar, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 909-910.
- [233] B. S. Bodnar, P. F. Vogt, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2598-2600.
- [234] <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/slides/3621s1d/sld036.htm>, 30.05.2012.
- [235] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [236] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, *Science* **1998**, *279*, 377-380.
- [237] K. Temming, D. L. Meyer, R. Zabinski, E. C. F. Dijkers, K. Poelstra, G. Molema, R. J. Kok, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1385-1394.
- [238] C. Rypa, H. Mann-Steinberg, I. Fichtner, H. Weber, R. Satchi-Fainaro, M. L. Biniössek, F. Kratz, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1414-1422.
- [239] H. Bouchard, M.-P. Brun, A. Commercon, J. Zhang (Sanofi-Aventis, Fr.), WO2011001052A1, **2011**.
- [240] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [241] L. Chen, F.-Q. Li, B.-H. Hou, G.-F. Hong, Z.-J. Yao, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8279-8285.
- [242] Y.-H. Zhang, Z.-X. Gao, C.-L. Zhong, H.-B. Zhou, L. Chen, W.-M. Wu, X.-J. Peng, Z.-J. Yao, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6813-6821.
- [243] S. Derbré, G. Roué, E. Poupon, S. A. Susin, R. Hocquemiller, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 979-982.
- [244] L. Chen, T.-S. Hu, J. Zhu, H. Wu, Z.-J. Yao, *Synlett* **2006**, 1225-1229.
- [245] B. M. Weidgans, *New Fluorescent Optical pH Sensors with Minimal Effects of Ionic Strength*, Dissertation, Universität Regensburg, **2004**.
- [246] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 653-660.
- [247] P. J. A. Weber, J. E. Bader, G. Folkers, A. G. Beck-Sickinger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 597-600.
- [248] R. J. Parkes, S. L. Hart, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *44*, 135-152.
- [249] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711.
- [250] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
- [251] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [252] H. A. Orgueira, D. Fokas, Y. Isome, P. C. M. Chan, C. M. Baldino, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2911-2914.
- [253] S. Cressman, Y. Sun, E. Maxwell, N. Fang, D. Chen, P. Cullis, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2009**, *15*, 49-59.

- [254] Y. Ye, S. Bloch, B. Xu, S. Achilefu, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2268-2275.
- [255] T. Bogner, *Synthese von Fluoreszenzsonden für Untersuchungen zur Endocytose*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, **2007**.
- [256] G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman, *Anticancer Agents from Natural Products*, CRC Press, LLC, Boca Raton, FL, **2005**.
- [257] D. Shabat, C. Rader, B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 6925-6930.
- [258] N. Pessah, M. Reznik, M. Shamis, F. Yantiri, H. Xin, K. Bowdish, N. Shomron, G. Ast, D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1859-1866.
- [259] C. P. Leamon, Y. Wang, I. R. Vlahov, F. You, P. J. Kleindl, H. K. R. Santhapuram (Endocyte, Inc., USA), WO2009002993A1, **2008**.
- [260] R. S. Al-Awar, W. J. Ehlhardt, S. V. Gottumukalla, M. J. Martinelli, E. D. Moher, R. E. Moore, J. E. Munroe, B. H. Norman, V. F. Patel, J. E. Ray, C. Shih, J. E. Toth, V. Vasudevan (Eli Lilly and Company, University of Hawaii, Wayne State University), United States Patent 6,680,311 B1, **2004**.
- [261] Z. Zhang, K. Tanabe, H. Hatta, S.-i. Nishimoto, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1905-1910.
- [262] A. Stoncius, *unveröffentlichte Ergebnisse*, Universität Bielefeld.
- [263] A. K. Chandel, L. V. Rao, M. L. Narasu, O. V. Singh, *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *42*, 199-207.
- [264] M. A. Tius, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4343-4367.
- [265] *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Eds.; Garland Science: New York, **2002**.
- [266] R. M. Hanson, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1922-1925.
- [267] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [268] D.-Y. Ma, D.-X. Wang, Q.-Y. Zheng, M.-X. Wang, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2366-2376.
- [269] K. Okano, T. Morimoto, M. Sekiya, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 2228-2234.
- [270] J. A. Aikins, B. S. Briggs, T. Y. Zhang, M. J. Zmijewski, Jr. (Eli Lilly and Company, Wayne State University, University of Hawaii), WO2000023429A2, **2000**.
- [271] A. E. Sheshenev, M. S. Baird, A. K. Croft, I. G. Bolesov, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10036-10046.
- [272] J. Thibonnet, M. Abarbri, J.-L. Parrain, A. Duchêne, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4433-4441.
- [273] P. Bulughapitiya, Y. Landais, L. Parra-Rapado, D. Planchenault, V. Weber, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1630-1641.