
Synthese von Antibody-Drug Konjugaten auf Grundlage von Cryptophycin-55-Derivaten

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

in der Organischen und Bioorganischen Chemie

der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Bianca Osswald

aus Buchholz i. d. N.

Bielefeld, Januar 2015

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN-ISO 9706.

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Westermann

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald

in der Zeit von Januar 2011 bis März 2015

an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Meinen Großeltern Resi und Georg

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald möchte ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung und die viele Unterstützung während meiner Arbeit danken.

Für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Westermann.

Den Kooperationspartnern von EXIRIS in Italien (Dr. Christian Steinkühler, Dr. Paola Gallinari, Gessica Filocamo) danke ich für ihre Arbeit mit meinen Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten. Herrn Prof. Dr. Gütschow und seinen Mitarbeitern, sowie Prof. Dr. Süßmuth und seinem Mitarbeiter Daniel Petras gebührt Dank für die Hilfe beim Aktivieren des Enzyms und Messen der hochauflösenden HPLC/MS-Spektren.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der OCIII gebührt mein Dank für die freundliche Aufnahme, die vielen Diskussionen (sowohl chemischer- als auch nicht-chemischer Natur), die stete Hilfe und viele feuchtfrohliche ausseruniversitäre Aktivitäten. Besonderer Dank gilt dem „C-Team“ (Dr. Benedikt Sammet, Dr. Christine Weiß, Dr. Tobias Bogner und Guillermo Blanchard Nerin) für die gute Zusammenarbeit am Cryptophycin-Projekt. Carmela Michalek danke ich für das Durchführen der Zytotoxizitätstests.

Vielen Dank an all meine fleißigen Korrekturleser (Dr. Felix Mertink, Dr. Christine Weiß, Dr. Ansgar Zobel, Markus Wiesener, Oliver Kracker und Marcel Frese) für das sorgfältige Korrigieren dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch den Leuten, die engagiert an meinem Projekt mitgearbeitet haben in Form von Bachelorarbeiten (Julia Wegner und Daniel Kreßmann) und Forschungspraktika (Matthias Pieper und Susanne Romberg), sowie Anke Nieß, die als Technische Angestellte mit mir arbeiten durfte und Marit Neuhaus, die einige Zeit während ihrer Ausbildung bei mir war.

Auch bei den Mitarbeitern der Serviceabteilung und dem Chemikalienlager möchte ich mich für das Messen der vielen Spektren und das Aushändigen der ganzen verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien bedanken.

Sch danke meinen Freunden Roman, Bernd und Markus für das gemeinsame Durchhalten des Studiums, die vielen Doppelkopfabende, die eine gelungene Balance zum Studium boten, und alles Weitere, was wir gemeinsam erleben durften.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich so weit gebracht und unterstützt haben. Für ihre immer offenen Ohren, ihren bedingungslosen Rückhalt, die viele Kraft, die sie mir gegeben haben und unzählige Wochenenden an denen es mir in ihrer Gesellschaft immer gelang abzuschalten und zur Ruhe zu kommen. Ihr seid die Besten!

Und natürlich danke ich meinem Freund Markus für seine unendliche Geduld, das Gefühl immer jemanden im Rücken zu haben und seine großartige Liebe.

Abkürzungsverzeichnis

(

(DHQD)₂-PHAL Dihydrochinidinphthalazin-1,4-diydiether

2

2-MEA 2-Mercaptoethylamin Hydrochlorid

A

ABA 4-Aminobutyric Acid

abs. absolutiert (trocken)

AcBr Acetylbromid

AcOH Essigsäure

ADC *Antibody Drug Conjugate* (Antikörper-Wirkstoff-Konjugat)

ADCs *Antibody-Drug Conjugates*

ADEPT *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy*

AML Akute myeloische Leukämie

Arg Arginin

B

Bis-NPC Bis(4-nitrophenyl)carbonat

Boc *tert*-Butyloxycarbonyl

Boc₂O Di-*tert*-butyldicarbonat

C

ca. *circa*

Cit Citrullin

COSY *correlated spectroscopy* (Korrelationsspektroskopie)

CTSB Cathepsin B

D

DAR *Drug-to-Antibody-Ratio* (Wirkstoff-zu-Antikörper Verhältnis)

DCM Dichlormethan

DEPT *distortionless enhancement by polarization transfer*

DIBAL-H Diisobutylaluminiumhydrid

DIC *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid

DM1 Derivat des Maytansin 1

DMAP 4-Dimethylaminopyridin

DME 1,2-Dimethoxyethan (Ethylenglykoldimethylether)
 DMF *N,N'*-Dimethylformamid
 DMI 1,3-Dimethylimidazolidin-2-on
 DMSO Dimethylsulfoxid
 DNA *Deoxyribonucleic Acid* (Desoxyribonukleinsäure)

E

ee *Enantiomeric Excess* (Enantiomerenüberschuss)
 EEDQ 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
 EPR *Enhanced Permeability and Retention Effect*

F

FDA *Food and Drug Administration*
 Fmoc 9-Fluorenylmethoxycarbonyl
 FmocOSu *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid

G

GDP Guanosindiphosphat
 GlyA *Glycolic Acid* (Glycolsäure)
 GTP Guanosintriphosphat

H

HER2 *Human epidermal growth factor receptor 2* (Humaner epidermaler Wachstumsrezeptor 2)
 HMBC *heteronuclear multiple bond correlation*
 HMQC *heteronuclear multiple quantum coherence*
 HOBt 1-Hydroxybenzotriazol

I

IARC *International Agency for Research on Cancer* (Internationale Agentur für Krebsforschung)
 IgG Immunglobulin G
 insges. insgesamt

K

kDa Kilodalton (atomare Masseneinheit)

L

LDA Lithiumdiisopropylamid
 Lys Lysin

M

MDR *Multiple Drug Resistant*

MeOH	Methanol
MMAE	Monomethyl Auristatin E
MRP-1	<i>Multidrug resistance-associated protein 1</i>
N	
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
P	
PABA	<i>p</i> -Aminobenzylalkohol
PABC	<i>p</i> -Aminobenzylcarbamat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
P-gp	<i>P</i> -Glycoprotein
Phe	Phenylalanin
ppm	<i>parts per million</i> (1 000 000 ⁻¹)
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
R	
R _f	Retentionsfaktor
rlgG	<i>reduced IgG</i> (halbierter Antikörper)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
S	
SAR	Struktur-Aktivitätsbeziehungen
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
S _N 2	Nukleophile Substitution 2. Ordnung
T	
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
<i>tert</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TFA	Trifluoressigsäure
TI	Therapeutischer Index
t _R	Retentionszeit (HPLC)
Trt	Trityl
V	
Val	Valin
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

W

WHO *World Health Organization* (Weltgesundheitsorganisation)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	CHEMOTHERAPIE	2
1.2	TUMOR TARGETING	5
1.2.1	<i>Die ADEPT-Strategie</i>	<i>8</i>
1.2.2	<i>Antibody-Drug Conjugates.....</i>	<i>10</i>
1.3	CRYPTOPHYCINE	15
1.3.1	<i>Pharmakologische Wirkung.....</i>	<i>17</i>
1.3.2	<i>Struktur-Aktivitäts-Studien an Cryptophycinen</i>	<i>19</i>
1.3.3	<i>Konjugate von Cryptophycinen</i>	<i>21</i>
2	MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	22
3	SPEZIELLER TEIL	24
3.1	SYNTHESEPLANUNG	24
3.2	SYNTHESE DER CRYPTOPHYCIN-55-DERIVATE	27
3.2.1	<i>Synthese der Fragment-Bausteine.....</i>	<i>28</i>
3.2.2	<i>Fragmentkondensation, Cyclisierung und Diol-Epoxid-Transformation mit Derivatisierung ..</i>	<i>32</i>
3.2.3	<i>Synthese der Cryptophycin-55-Derivate</i>	<i>34</i>
3.3	SYNTHESE DER LINKER-CRYPTOPHYCIN-KONJUGATE.....	41
3.3.1	<i>Festphasensynthese des Tetrapeptid-Linkers</i>	<i>42</i>
3.3.2	<i>Synthese des Tetrapeptid-Linker-Cryptophycin-Konjugats</i>	<i>43</i>
3.3.3	<i>Synthese des PABA-basierten Linkersystems</i>	<i>48</i>
3.3.4	<i>Synthese der PABA-Linker-Cryptophycin-Konjugate</i>	<i>51</i>
3.3.5	<i>Stabilitätsassays</i>	<i>53</i>
3.3.6	<i>Spaltungsassay der Linker-Cryptophycin-Konjugate mit Cathepsin B</i>	<i>59</i>
3.4	ANTIKÖRPERKONJUGATION	66
4	AUSBLICK.....	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	SUMMARY	79
7	EXPERIMENTELLER TEIL	84
7.1	MATERIALIEN UND METHODEN	84
7.1.1	<i>Chemikalien und Lösungsmittel.....</i>	<i>84</i>
7.1.2	<i>Allgemeine Arbeitstechniken</i>	<i>84</i>
7.1.3	<i>Titration der kommerziell erhältlichen n-BuLi-Lösung.....</i>	<i>85</i>

7.1.4	Säulenchromatographie	85
7.1.5	NMR-Spektroskopie	86
7.1.6	Massenspektrometrie	87
7.1.7	Analytische RP-HPLC	88
7.1.8	Präparative RP-HPLC	88
7.1.9	Polarimetrie	89
7.1.10	Stabilitätsassays	90
7.1.11	Antikörperreduktion	91
7.1.12	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) des Antikörpers und der ADCs	92
7.2	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	94
7.3	SYNTHESE DER CRYPTOPHYCINE	96
7.3.1	Synthese des A-Fragments	96
7.3.2	Synthese des B-Fragments	101
7.3.3	Synthese des C-Fragments	105
7.3.4	Synthese des D-Fragments	106
7.3.5	Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation mit Öffnung des Epoxids zum Chlorhydrin	109
7.3.6	Synthese der modifizierten Cryptophycine	116
7.4	SYNTHESE DER LINKER-CRYPTOPHYCIN-KONJUGATE	120
7.4.1	<i>tert</i> -Butyl-15-hydroxy-4,7,10,13-tetroxapentadecanoat (49) ^[137]	120
7.4.2	<i>tert</i> -Butyl-15-maleimido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoat (50) ^[133]	121
7.4.3	15-Maleimido-4,7,10,13-tetraoxapentadecansäure (51) ^[133]	121
7.4.4	Maleimid-PEG-Val-Cit-Pro-Gly (52)	122
7.4.5	Maleimid-PEG-Val-Cit-Pro-Gly-Cryptophycin-55-glycinat (53)	124
7.4.6	<i>tert</i> -Butyl-1-acetoxy-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oat (54)	124
7.4.7	Acetyl-PEG-Val-Cit-Pro-Gly-7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)Cumarin (59)	129
7.4.8	Acetyl-PEG-Val-Cit-Pro-Gly-Gly-7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)Cumarin (60)	130
7.4.9	Fmoc-Val-NHS (62) ^[109]	131
7.4.10	Fmoc-Val-Cit (63) ^[109]	131
7.4.11	Fmoc-Val-Cit-PABA (64) ^[109]	132
7.4.12	Val-Cit-PABA (65) ^[109]	132
7.4.13	Maleimid-PEG-Val-Cit-PABA (66)	133
7.4.14	Maleimid-PEG-Val-Cit-PAB-PNP (67) ^[145]	134
7.4.15	<i>tert</i> -Butylmethyl-(2-(methylamino)ethyl)carbonat (69) ^[146]	135
7.4.16	Maleimid-PEG-Val-Cit-PABC-N,N'-Dimethylethylendiamin-Trifluoroacetat (70)	135
7.4.17	Maleimid-PEG-Val-Cit-PAB-Cry-55-Glycinat (72)	136
7.4.18	Maleimid-PEG-Val-Cit-PAB-Cry-55-N-Me-aminobutyrat (73)	136
7.5	BIOCHEMISCHE TESTS	137

7.5.1	<i>Spaltungsassay</i>	137
7.5.2	<i>Antikörperkonjugation</i>	139
8	ANHANG	141
8.1	STABILITÄTSASSAY	141
8.1.1	<i>Stabilitätsassay von 53</i>	141
8.1.2	<i>Stabilitätsassay von 72</i>	146
8.1.3	<i>Stabilitätsassay von 73</i>	151
8.2	SPALTUNGSASSAY	156
8.2.1	<i>Spaltungsassay von 74</i>	156
8.2.2	<i>Spaltungsassay von 75</i>	162
8.2.3	<i>Spaltungsassay von 76</i>	166
9	LITERATURVERZEICHNIS	169

1 Einleitung

Eine Studie der INTERNATIONALEN AGENTUR FÜR KREBSFORSCHUNG (IARC, eine zur WHO gehörende Agentur) ist zu dem Schluss gekommen, dass die Anzahl der Krebserkrankungen weiter zunehmen werde. Bis 2025 könnten jährlich 20 Millionen Menschen an Krebs erkranken, was im Vergleich zu heute einen Anstieg um 40 Prozent bedeuten würde. Als Gründe hierfür werden nicht nur das Bevölkerungswachstum und die zunehmende Lebenserwartung genannt, sondern auch, dass Menschen immer mehr gesundheitsschädigende Gewohnheiten annehmen würden. Hierzu zählen beispielsweise das Rauchen und der Konsum von Alkohol, sowie stark gesüßten Getränken. ^[1]

Aber nicht nur die Anzahl der Neuerkrankungen werde zunehmen, sondern auch die Anzahl der Todesfälle. Es werde damit gerechnet, dass in den nächsten zwei Jahrzehnten die Anzahl der Todesfälle auf 13 Millionen Menschen steigen wird. Im Vergleich dazu gab es in 2008 „nur“ 8.2 Millionen Todesopfer. ^[1]

Bemessen an den gesamten Todesursachen ist Krebs mit 25% die Zweithäufigste. Dies geht aus einer Graphik des Statistischen Bundesamtes hervor (Abbildung 1-1) und zeigt, dass es unbedingt nötig ist die bestehenden Krebstherapiemöglichkeiten zu verbessern und gleichzeitig neue Wege einzuschlagen.

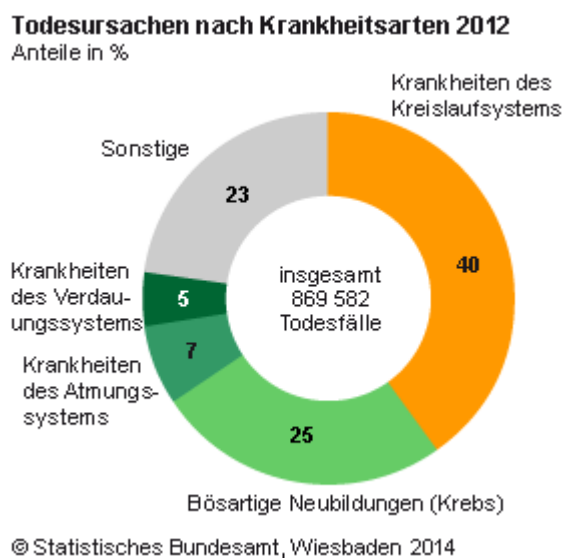


Abbildung 1-1: Todesursachen nach Krankheitsarten im Jahr 2012. ^[2]

Die bisherigen konventionellen Therapiemethoden (Extraktion des Tumors durch operatives Entfernen, Hormontherapie, Bestrahlung oder Chemotherapie) stellen teilweise schon eine gute Möglichkeit dar, das Krebswachstum aufzuhalten oder den Krebs zu entfernen, jedoch sind die meisten dieser Methoden neurotoxisch und/oder zerstören umgebendes, gesundes Gewebe

(beispielsweise bei Brustkrebsoperationen). Vielversprechende Verbesserungsmöglichkeiten werden momentan getestet und eine davon, das gezielte Tumor *Targeting* mit Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.1 Chemotherapie

In der Chemotherapie wird der Tumor mit Zytostatika (Substanzen, die das Zellwachstum bzw. die Zellteilung hemmen) behandelt. Diese greifen in den Vermehrungszyklus (siehe Abbildung 1-2) der Krebszellen ein, der im Vergleich zum Vermehrungszyklus gesunder Zellen häufiger abläuft. Somit weisen Chemotherapeutika schon eine gewisse Selektivität für Krebszellen auf, da diese ihnen gegenüber durch ihre erhöhte Zellteilungsrate anfälliger sind als normale Zellen.

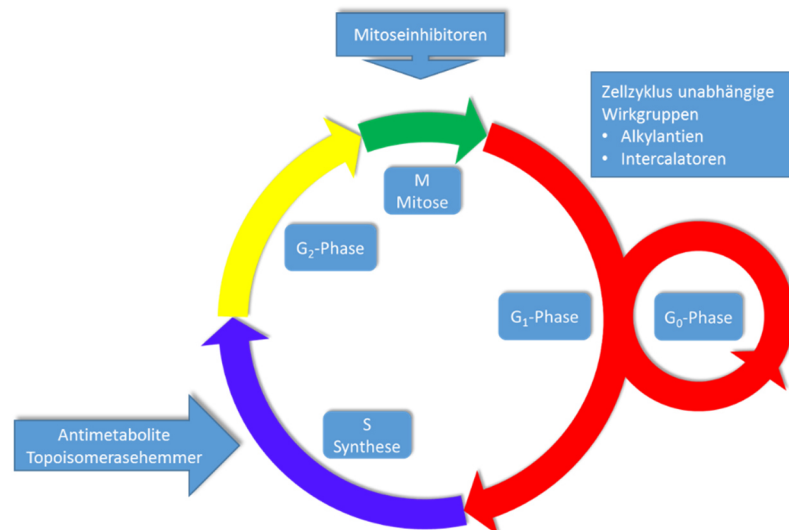


Abbildung 1-2: Der Zellzyklus eingeteilt in seine unterschiedlichen Phasen mit den oben genannten Wirkstoffgruppen.

Bezogen auf ihre Wirkorte im Zellzyklus lassen sich die Chemotherapeutika in verschiedene Wirkstoffgruppen (siehe auch Abbildung 1-3) einteilen. Einige davon sind nachfolgend aufgelistet:

- Alkylantien
Die Alkylantien greifen sowohl Proteine, die für die Zellteilung oder die Reparatur der DNA wichtig sind, als auch die DNA selbst an und gehen kovalente Bindungen ein. Dies ist der Grund dafür, dass teilweise ganze DNA-Stränge gespalten oder quervernetzt werden, was zu einer Inhibierung der Zellteilung führt. ^[3,4]
- Antibiotika
Oft wird diese Wirkstoffklasse als Tumorantibiotika bezeichnet, weil ihre frühen Repräsentanten von Mikroorganismen produziert wurden. Die meisten dieser Wirkstoffe

wirken nicht spezifisch im Zellzyklus und werden daher hauptsächlich in der Behandlung langsam wachsender Tumore eingesetzt. Hierzu zählen auch die Anthracycline, deren Vertreter sowohl in die DNA interkalieren (Interkalatoren), als auch freie, als Alkylantien wirkende Radikale produzieren können. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Topoisomerase II Inhibition, was zur Folge hat, dass selbige nicht mehr dazu in der Lage ist, die DNA zu entspiralisieren. ^[4]

- Antimetabolite

Bei den Antimetaboliten handelt es sich um Gegenspieler verschiedener Stoffwechselbausteine (Metabolite), die bei der DNA-Replikation an Stelle von den natürlichen Metaboliten in die DNA eingebaut werden. Es werden dadurch an den betroffenen Stellen Abschnitte der Erbinformation zerstört. Weitere Antimetabolite ähneln Substanzen, die beim Zellstoffwechsel wichtige Rollen spielen. Sie können dadurch beispielsweise Enzyme inhibieren, die im Zellzyklus (Abbildung 1-2) wichtig sind. ^[3,5]

- Mitoseinhibitoren

Indem sie den Spindelapparat blockieren, lässt sich eine Hemmung der Zellteilung hervorrufen. Hierbei kann eine Einteilung gemacht werden in Inhibitoren, die den Aufbau der Kernspindeln verhindern, und solche, die deren Abbau verhindern. Die Zelle ist so nicht mehr in der Lage, sich zu teilen, und leitet die Apoptose ein. ^[3,5]

- Topoisomerase Hemmer

Topoisomerase I Inhibitoren hemmen die Stabilisierung des Topoisomerase I Komplexes mit der DNA und der jeweils verwendeten Substanz. Dadurch werden Brüche im DNA-Strang hervorgerufen. Bei den Topoisomerase II Hemmern kann es hingegen zu einer Inhibition der RNA- und Proteinsynthese kommen (beispielsweise mit Actinomycin D), oder aber es kommt zu einer Interkalation in die DNA, zu DNA-Strangbrüchen durch enzymatisches Redoxcycling oder zu einer direkten Hemmung der Topoisomerase II. ^[4,5]

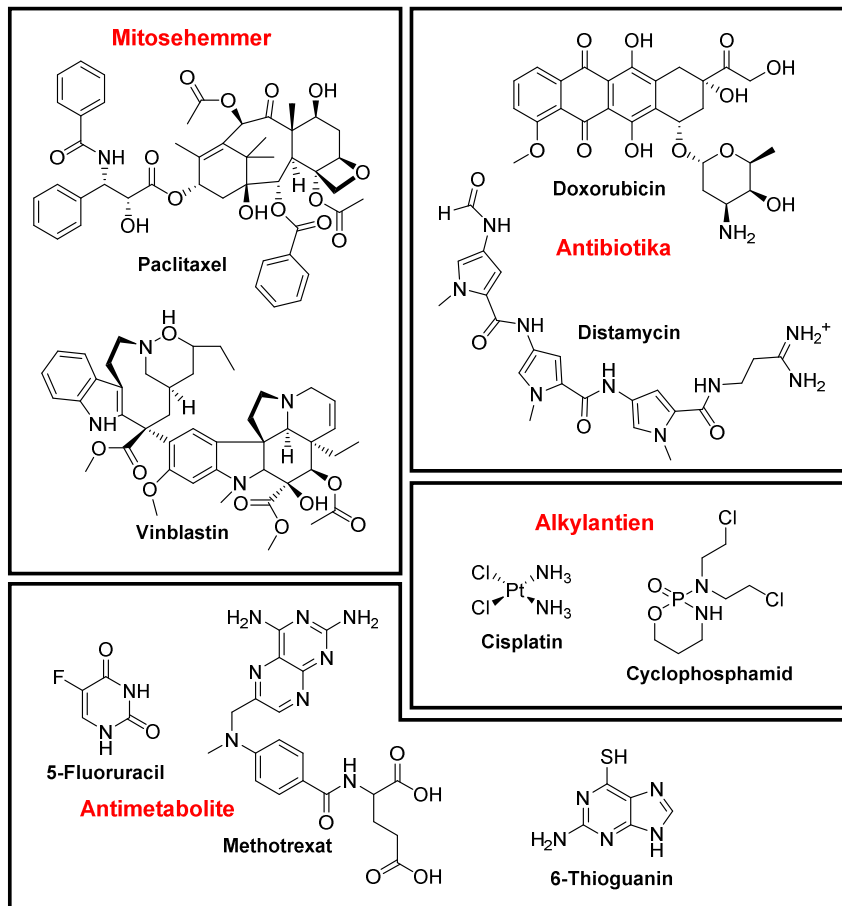


Abbildung 1-3: Beispiele unterschiedlicher Typen von Chemotherapeutikagruppen mit exemplarischen Substanzen.

In der Chemotherapie ist es von Vorteil, dass Tumorzellen eine sehr hohe Proliferationsrate aufweisen. Jedoch ist der Effekt der Zytostatika nicht spezifisch, sodass auch anderes Gewebe mit hoher Proliferationsrate (beispielsweise das Knochenmark, die Schleimhäute und die Haarwurzeln) angegriffen wird. ^[6] Diese sogenannte systemische Toxizität führt dazu, dass Patienten unter Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression oder Haarausfall leiden. Solche Körperantworten sind auch der limitierende Faktor bei der Dosierung der Zytostatika. Durch eine geeignete Kombination mehrerer Chemotherapeutika, deren Wirkmechanismen und Nebenwirkungen sich voneinander unterscheiden, ist es jedoch möglich die unkontrollierte Proliferation des Tumorgewebes zu verlangsamen oder sogar zu stoppen.

1.2 Tumor Targeting

Das Tumor *Targeting* bietet die Möglichkeit, das neoplastische Gewebe selektiv zu adressieren und so Nebenwirkungen zu verringern. Das Fundament hierfür liefern die sechs Merkmale von Krebs, die im Jahr 2000 von HANAHAN und WEINBERG vorgeschlagen wurden. Es handelt sich dabei um das beständige Aufrechterhalten der Wachstumssignale, das Umgehen von Wachstumsunterdrückungsfaktoren, die grenzenlose Reproduktionsmöglichkeit, die Invasion umliegender Gewebes und die Metastasierung, das Anregen zur Tumor-Angiogenese sowie das Vermögen, dem Zelltod zu widerstehen.^[7]

Über das physikalische, das biologische und das chemische *Targeting* lassen sich diese Phänomene adressieren.^[8] Bei dem physikalischen *Targeting* ist die Orts-Spezifität meist durch eine höhere Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort als an anderen Stellen im Organismus (Verdünnung) gekennzeichnet.^[8,9] Ein Beispiel hierfür ist das *Targeting* der Tumor-Angiogenese. Diese führt dazu, dass neue Blutgefäße zu den Tumoren gebildet werden, um den Tumor so mit Sauerstoff und wichtigen Nährstoffen zu versorgen. Kleine Tumore können ihren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf, sofern sie in der näheren Umgebung von Kapillaren oder größeren Blutgefäßen liegen, bis zu einer Größe von 1 – 2 mm³ (circa 10⁶ Zellen^[10]) durch Diffusion decken. Da die Diffusionsdistanz von Sauerstoff bei 150 – 200 µm liegt, befinden sich die meisten neu gebildeten Tumore auch in diesem Umkreis von Blutgefäßen. Allerdings ist es besonders für schnell wachsende und zellreiche Tumore ab einer bestimmten Größe nicht mehr möglich, ihren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf nur durch Diffusion zu decken. Daher stellen viele Tumore ihr Wachstum bei einer Größe von 1 – 2 mm³ ein, sofern sie sich nicht nahe genug an Blutgefäßen befinden.^[11] Diese sind dann in der Regel noch symptomlos und somit klinisch irrelevant.^[12] Jedoch können sie durch die vermehrte Ausschüttung angiogenetischer Wachstumsfaktoren die Tumor-Angiogenese induzieren, was dazu führt, dass vermehrt Blutgefäße um und zu den Tumoren gebildet werden. Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren in diesem Zusammenhang ist der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).^[13] Dieser lässt sich mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin®) adressieren (siehe auch das biologische Tumor *Targeting*), was dazu führt, dass die Gefäßneubildung gestoppt und sogar zurückgedrängt werden kann.^[14-16] Das durch die Tumor-Angiogenese neu gebildete Gewebe und die neuen Blutgefäße weisen im Vergleich zu gesundem Gewebe und gesunden Blutgefäßen einige Besonderheiten auf. Hierzu gehören die Hypervaskularisation (die erhöhte Anzahl von Blutgefäßen um Tumore, anhand derer diese auch erkannt werden können), die gesteigerte Permeabilität des Tumorgewebes, eine weniger starke Funktion des Lymphgewebes und die strukturellen, sowie funktionellen Unregelmäßigkeiten des Tumorgewebes. Aus der gesteigerten Permeabilität und der verminderten Leistung des

lymphatischen Gewebes lässt sich der EPR-Effekt (*Enhanced Permeability and Retention Effect*) ableiten, der gut für das passive, physikalische Tumor *Targeting* genutzt werden kann. Durch die deutlich größeren Zwischenräume zwischen den Endothelzellen der Kapillargefäße ist es möglich, Makromoleküle, von einer Größe über 40 kDa und einer langen Halbwertszeit im Plasma, selektiv in Krebszellen einzuschleusen (Abbildung 1-4).^[17-20] Als Trägermoleküle lassen sich unter anderem polymere Nanopartikel, Mizellen oder Nanogele, sowie auf Kohlenstoffgittern beruhende Nanoröhren oder Liposomen verwenden.^[21]

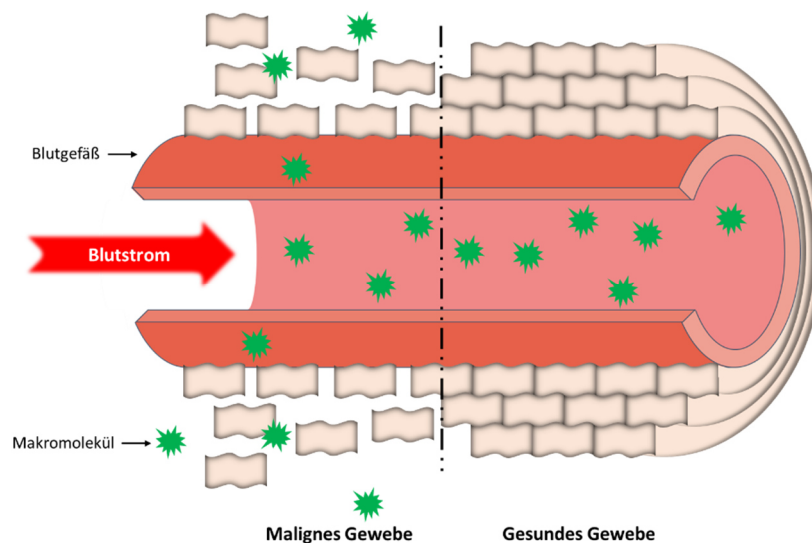


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung eines Blutgefäßes, das an malignes und gesundes Gewebe grenzt (EPR-Effekt).

Jedoch stößt das physikalische *Targeting* sehr schnell an seine Grenzen, da viele der gewünschten Zielorte nicht zugänglich gemacht werden können und die Konzentrationsunterschiede der Wirkstoffe im Körper durch die Verdünnung meist nicht ausreichend sind, um eine signifikante Verbesserung des TI (Therapeutischer Index) hervorzurufen.^[8]

Bei dem biologischen *Targeting*-Ansatz wurde viel Arbeit in die Suche neuer Wirkstoffe investiert, welche charakteristische Stellen der Krebszellen adressieren können. Erreicht wird dies durch die Nutzung von Molekülen, die eine spezifische Bindung zu den Zellen oder den Geweberezeptoren herstellen können, und/oder zumindest eine gesteigerte Affinität diesen gegenüber aufweisen. So wurden beispielsweise viele Antikörper, Proteine und Peptidsysteme, Hormone und Glycokonjugate entwickelt, die sich alle als Liganden für Tumorrezeptoren einsetzen lassen. Hierbei wurde auf die Entwicklung von Antikörpern besonders viel Wert gelegt, da viele Krebszelltypen im Vergleich zu normalen Zellen diverse Antigene überexprimieren.^[9,22] Zudem können Antikörper, da sie große Moleküle sind (150 kDa), für mehrere Wochen im Gefäßsystem zirkulieren und breiten sich nur langsam ins perivaskuläre Gewebe aus.^[23] Zu den bisher von der

FDA für die Krebstherapie zugelassenen Antikörpern zählen auch Bevacizumab (siehe oben), Rituximab und Trastuzumab. Die Wirkung von Rituximab (Rituxin[®]/Mabthera[®]) richtet sich gegen das CD20-Antigen, welches auf über 90% der B-Lymphozyten exprimiert ist. Es ist ein Transmembranprotein und scheint als Kalziumkanal zu fungieren sowie eine wichtige Rolle im Zellzyklus einzunehmen. Da es nach der Anwendung des Antikörpers nicht internalisiert oder von der Membran abgestoßen wird, ist es ein ideales Ziel für die Behandlung mit Antikörpern. ^[24,25] Der Antikörper aktiviert so die körpereigene Immunabwehr und die Zerstörung der Lymphzellen wird eingeleitet. Bei Trastuzumab (Herceptin[®]) handelt es sich um einen gegen den HER2-Rezeptor gerichteten humanisierten monoklonalen Antikörper. Dieser wird in 20 – 25% aller Brustkrebstumore überexprimiert und geht mit einer schlechten Prognose für die Patienten einher. ^[26] Er inhibiert das Wachstum der HER2-überexprimierenden Zellen und reguliert den HER2-Protein-Level herunter. ^[27] Jedoch haben die meisten der monoklonalen Antikörper nur eine begrenzte Aktivität als einzelner Wirkstoff (bisher sind nur 9 Antikörper für die Einzeltherapie zugelassen). Sie werden daher oft in Kombination mit einer Chemotherapie genutzt. ^[23]

Das chemische *Targeting* beruht zu einem großen Teil auf der *Prodrug*-Strategie. Der Name *Prodrug* wurde erstmals im Jahr 1958 von ALBERT ^[28] verwendet und beschreibt eine Substanz, die nach Einführung in den Organismus selbst nicht toxisch ist, sondern ihre pharmakologische Wirkung erst nach chemischer oder enzymatischer Transformation erlangt. ^[29] So ist es möglich, die *Prodrug* standortspezifisch in ihre aktive Form zu transformieren. Hierfür gibt es verschiedene Wege, die abhängig von der chemischen Struktur und auch der Größe der *Prodrug* sind. Besteht die *Prodrug* beispielsweise aus einem einzigen, relativ kleinen Molekül, das durch eine enzymatische Reaktion in seine aktive Form überführt werden kann, kann dies mittels tumorspezifischer Enzyme am Tumor selbst erfolgen, oder aber über die ADEPT-Strategie (*Antibody-directed enzyme prodrug therapy*; zu Deutsch: Antikörper-gerichtete Enzym-Prodrug Therapie) realisiert werden. ^[9] Eine *Prodrug* kann aber auch aus einem Wirkstoff, der an eine Erkennungseinheit (*targeting group*) gebunden ist, bestehen. Hierbei kann die Bindung entweder direkt oder über einen geeigneten Linker erfolgen (siehe Abbildung 1-5). Als Erkennungseinheiten lassen sich beispielsweise Folsäure, Hyaluronsäure, Oligopeptide und auch monoklonale Antikörper einsetzen. Die Verwendung eines Antikörpers als *Targeting Group* führt zu den Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (engl.: *Antibody-drug conjugates*; ADCs), welche in Kapitel 1.2.2 näher erläutert werden.

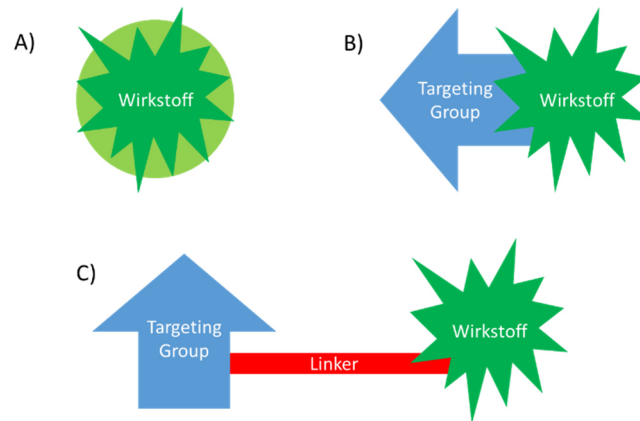


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der verschiedenen *Prodrug*-Typen. A) *Prodrug* bestehend aus einem inaktiven Wirkstoff. B) *Prodrug* bestehend aus *Targeting Group* und Wirkstoff (direkt aneinander gebunden). C) *Prodrug* bestehend aus *Targeting Group*, *Linker* und Wirkstoff.

Damit ein effektives Tumor *Targeting* erfolgen kann, muss die *Prodrug* einige wichtige Eigenschaften aufweisen:

1. Sie muss so stabil sein, dass sie den Wirkstoff ausliefern kann, ohne selbst zerstört zu werden, bevor sie am Wirkort angekommen ist.
2. Es sollte ihr möglich sein, das körpereigene und krebszelleigene Abwehrsystem zu umgehen, um innerhalb einer angemessenen Zeitspanne ihre Wirkung am Wirkort zu entfalten.
3. Passives oder von bestimmten Methoden gestütztes *Targeting* ist essentiell, um körpereigenes Gewebe zu schützen und nur die Zellen des Tumors zu schädigen.
4. Letztendlich sollte der Wirkstoff am Wirkungsort in seiner toxischen Form freigesetzt werden.

1.2.1 Die ADEPT-Strategie

Die ADEPT-Strategie wurde von BAGSHAWE^[30] und SENTER^[31] unabhängig voneinander entwickelt und bezeichnet einen zwei-Stufen-Mechanismus. Hierbei wird zunächst ein Enzym, das spezifisch die *Prodrug* in ihre aktive Form überführen kann, an einen Antikörper gebunden, der gegen ein tumortypisches Antigen gerichtet ist, und in den Organismus eingeschleust. Sobald das Antikörper-Enzym-Konjugat an seinem Bestimmungsort angelangt ist, wird die *Prodrug* verabreicht und an der Tumorzelle vom Enzym in ihre aktive Form überführt (siehe Abbildung 1-6).^[32,33]

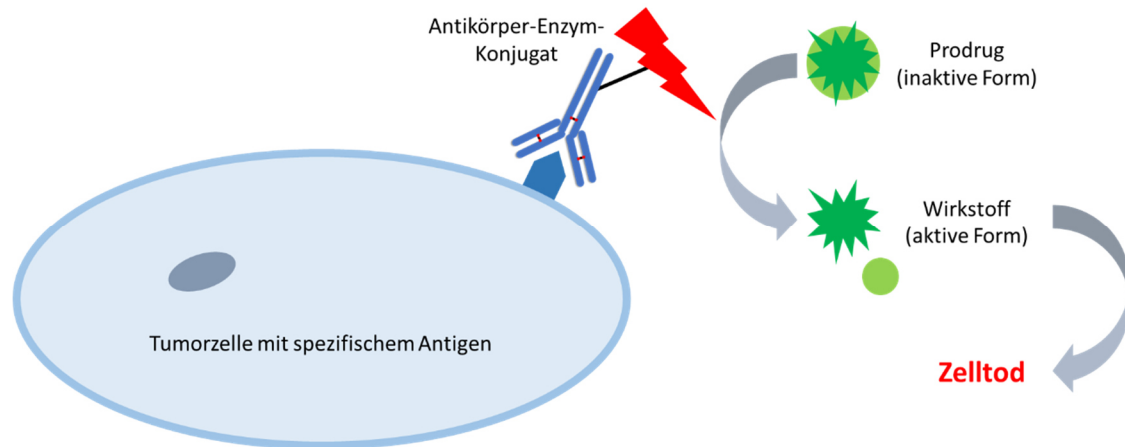


Abbildung 1-6: Ablauf der ADEPT-Strategie; zuerst wird mit einem Antikörper-Enzym-Konjugat die Tumoroberfläche anvisiert und dann eine Prodrug appliziert, welche in der Nähe des Tumors vom verwendeten Enzym in ihre aktive Form überführt wird und dann dort den Zelltod herbeiführt.

Von Vorteil ist die Verwendung körperfremder Enzyme, die keine körpereigenen Analoga besitzen, da so sichergestellt werden kann, dass die *Prodrug* nur von dem an den Antikörper gebundenen Enzym in den aktiven Wirkstoff umgewandelt werden kann. ^[30] Hierbei muss allerdings gewährleistet sein, dass die Plasmakonzentration des Antikörper-Enzym-Konjugates, sobald die *Prodrug* appliziert wird, möglichst nahe an 0 ist, um toxische Wirkungen auf die gesunden Zellen zu vermeiden. ^[34] Bei Menschen wird daher meist sieben Tage gewartet, bis die *Prodrug* verabreicht wird. ^[35] Die verwendeten Wirkstoffe sind möglichst klein und weisen eine relativ kurze Halbwertszeit auf, da hierdurch eine hohe Diffusionsrate durch das Tumorgewebe gegeben ist und durch den schnellen Zerfall (bestenfalls unterhalb einer Minute) eine toxische Wirkung auf umliegendes gesundes Gewebe gering gehalten werden kann. ^[30,34]

Durch Enzyme mit starker katalytischer Aktivität lässt sich auch bei geringer Konzentration des Antikörper-Enzym-Konjugates (hervorgerufen durch Heterogenität in der Antigenexpression auf den Tumorzellen) eine hohe Konzentration an aktivem Wirkstoff an den Tumorzellen erzeugen. Dies gewährleistet eine gute toxische Wirkung. Eventuell auftretende Immunantworten lassen sich durch die gleichzeitige Anwendung von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A unterdrücken, sodass mehrere Anwendungszyklen der Antikörper-Enzym-Konjugate durchlaufen werden können. ^[32,36] Als Träger für die Enzyme können jedoch nicht nur Antikörper verwendet werden, auch der Einsatz von Peptiden gegen von Tumorzellen und angiogenen Blutzellen häufig stark exprimierte Integrine ist möglich. ^[37,38]

1.2.2 Antibody-Drug Conjugates

Die Verwendung von Antikörpern als Tumorerkennungseinheit, welche über einen Linker an einen Wirkstoff gekuppelt sind führen zu Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs). Sie vereinen die Selektivität der Antikörper für auf Tumorzellen exprimierte Antigene mit der Toxizität eines Wirkstoffes, welcher sich über den Linker freisetzen lässt. Bisher wurden nur drei ADCs für den Einsatz in der Krebstherapie zugelassen. Bei dem ersten von der FDA zugelassenen ADC handelt es sich um Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg[®]). Es erhielt im Jahr 2000 die Zulassung für die Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML), da erste Studienergebnisse vielversprechend aussahen. ^[39,40] Schon 2010 wurde es jedoch wieder vom Markt genommen weil es mit schweren Nebenwirkungen (z.B. venöse okklusive Leberkrankheit) in Verbindung gebracht wurde. ^[41,42] Die einzigen momentan auf dem Markt erhältlichen und von der FDA zugelassenen ADCs (Abbildung 1-7) sind Brentuximab Vedotin (Adcetris[®]) und Ado-Trastuzumab Emtansin (Kadcyla[®]). In Brentuximab Vedotin ist der CD-30-spezifische monoklonale Antikörper cAC10 über einen enzymatisch spaltbaren Dipeptidlinker mit Monomethyl-Auristatin E, einem synthetischen Derivat von Dolastatin 10, einem Inhibitor der Tubulindynamik, verbunden. Nach proteolytischer Spaltung des Dipeptidlinkers in den Lysosomen wird, nach spontaner Eliminierung des *self-immolative Spacers* *p*-Aminobenzylcarbamate, MMAE (Monomethyl-Auristatin E) freigesetzt und bindet an das Tubulin, wodurch der Zellzyklus zwischen der G2-Phase und der Mitose unterbrochen und die Apoptose eingeleitet wird. ^[43,44] Das im Februar 2013 von der FDA zugelassene Ado-Trastuzumab Emtansin beruht auf dem gegen den in 20-25% der Brustkrebstumore überexprimierten HER2-Rezeptor gerichteten Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) und einem Derivat des Maytansin (DM1). Beide Substanzen sind über einen Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat-Linker (SMCC) verbunden. ^[45]

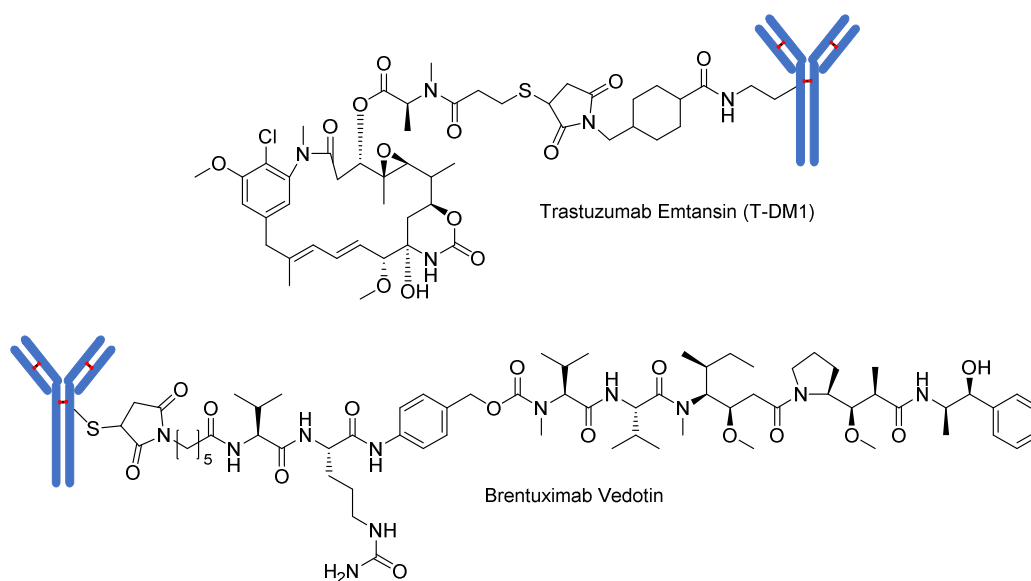


Abbildung 1-7: Momentan zugelassene ADCs: Trastuzumab Emtansin und Brentuximab Vedotin.

Die Auswahl des Wirkstoffs ist mit verschiedenen Voraussetzungen verknüpft, die möglichst gut erfüllt werden sollten. Dazu gehört, dass er a) synthetisch relativ leicht zugänglich sein sollte, b) funktionelle Gruppen besitzen muss, die eine Konjugation mit dem Linker ermöglichen, und c) eine ausreichend hohe Toxizität aufweisen sollte (IC_{50} -Werte im Bereich von 0.01 – 0.1 nM), um bei einem Wirkstoff-zu-Antikörper Verhältnis (DAR, *Drug-to-Antibody Ratio*) von 2 oder 4 noch ausreichend gut wirken zu können, wobei ein Verhältnis von 4 als eine optimale Kombination aus pharmakokinetischer Stabilität und Zytotoxizität gesehen wird. ^[23] Gleichzeitig ist eine hohe Stabilität den Bedingungen im menschlichen Körper gegenüber unerlässlich und es muss eine ausreichende Löslichkeit im Zellplasma gewährleistet sein. Die Wahl des Wirkstoffes kann zusätzlich auch durch die Art des Tumors erschwert werden. Beispielsweise sind Brust- und Eierstockkrebs gegenüber Mitosehemmern sensitiver, Lymphdrüsenkrebs gegenüber DNA-Interkalantien.^[46,47] Nachdem ein ADC an das Antigen gebunden ist, werden viele Antigene endozytotisch in die Zelle aufgenommen (Abbildung 1-8). Die Aufnahmezeit und auch deren Ausmaß können dabei von gebundenem freiem Antikörper zu gebundenem ADC variieren. Allerdings sind sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Aufnahme eines ADC und die darauffolgende Freisetzung des Wirkstoffs in der Zelle von großer Wichtigkeit. ^[48,49]

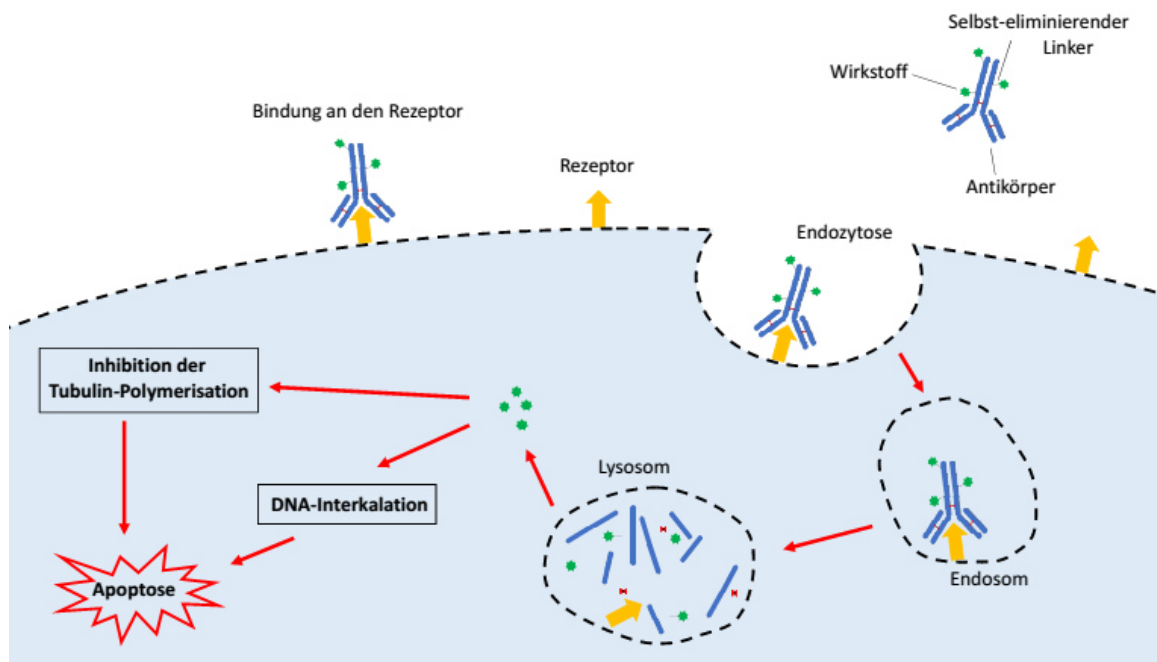


Abbildung 1-8: Modell für die Internalisation und Aktivierung des ADC.

Nach der endozytotischen Aufnahme in die Tumorzelle, werden die ADCs in den Lysosomen gespalten und der Wirkstoff freigesetzt, welcher aus dem Lysosom in das Cytoplasma diffundiert und dort entweder durch Inhibition der Tubulindynamik oder Interkalation mit der DNA im Zellkern zum Zelltod führt. ^[50,51] Durch weitere Diffusion in die nähere Umgebung der zerstörten Tumorzelle, was vor allem für kleine Wirkstoffmoleküle möglich ist, können somit auch noch weitere Krebszellen getötet werden (*bystander Effekt*). ^[52]

Eine wichtige Rolle bei der Freisetzung des Wirkstoffes spielt ebenfalls der Linker. Dieser sollte idealerweise im Blutkreislauf stabil sein und das ADC intakt an das Zielantigen ausliefern, danach allerdings instabil genug sein, um eine effiziente Freisetzung des Wirkstoffes in der Tumorzelle zu ermöglichen. ^[53] Diese Eigenschaften lassen sich auf verschiedene Module des Linkers verteilen (Abbildung 1-9). Für die Verbindung zum Antikörper (A) werden häufig Lysin- oder Cystein-Reste des Antikörpers verwendet. Im ADC Ado-Trastuzumab Emtansin wird der Linker über einen endständigen *N*-Hydroxysuccinimidester mit einem der 84 verfügbaren Lysin-Reste des Antikörpers zu einer stabilen Peptidbindung umgesetzt. Es kann aber auch, wie bei Brentuximab Vedotin, eine Sulfhydryl-Gruppe eines Cysteins des Antikörpers in einer MICHAEL-Addition an einen Maleimid-Rest des Linkers gekuppelt werden. Dies ist meist nur nach vorheriger Reduktion der Disulfidbrücken des Antikörpers möglich, daher allerdings auch regioselektiver. ^[53] Der Einbau unnatürlicher Aminosäuren, an die dann später der Linker mit dem Wirkstoff gekuppelt werden kann, in die Antikörpersequenz stellt eine Möglichkeit dar, Antikörper ortsspezifisch und mit einem bestimmten Verhältnis zum Wirkstoff zu derivatisieren. ^[54] Der polare Teil (B) wird häufig durch

eine PEG-Einheit gebildet. Er wird benötigt, da viele der in ADCs verwendeten zytotoxischen Komponenten sowie andere Linkermodule hydrophob sind. Nicht nur die Wasserlöslichkeit, sondern auch die Bindungsaffinität des Antikörpers leiden hierunter. Zusätzlich können sich bei zu hoher Hydrophobie Aggregate der ADCs bilden. ZHAO *et al.* konnten durch die Verwendung von PEG- und Sulfonsäurebausteinen als polare Linkerbestandteile das Wirkstoff-zu-Antikörper Verhältnis (DAR) am Beispiel von Maytansin und einem Antikörper auf bis zu 9 steigern, ohne wesentliche Aggregatbildung oder Affinitätsverlust zum Antigen. Weiterhin besitzen diese Konjugate, bedingt durch den höheren Wirkstoffanteil, eine bessere Leistungsfähigkeit als Konjugate mit kleinerem DAR. [53,55]

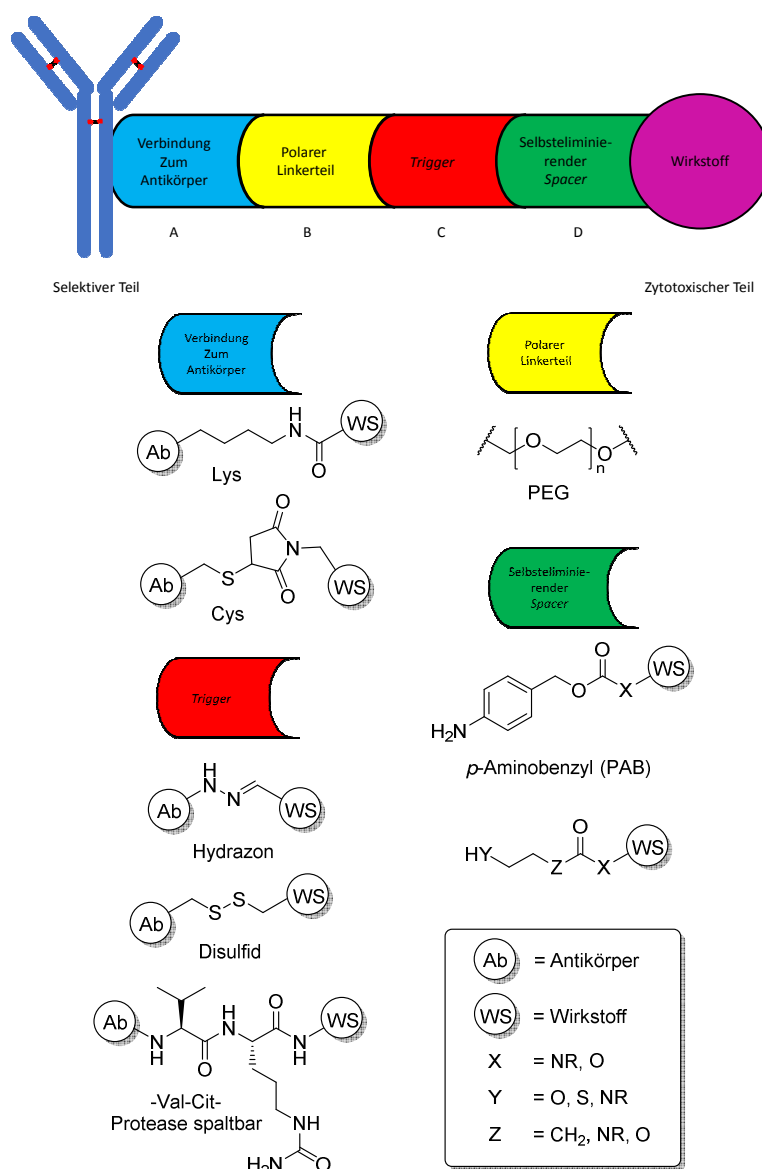


Abbildung 1-9: Aufbau eines ADC mit Einteilung des Linkers in verschiedene Module (A-D) sowie Beispiele für die einzelnen Module.

Als *Trigger* (C) wird der Teil des Linkers bezeichnet, der die Spaltung initiiert und danach die Freisetzung der zytotoxischen Komponente hervorruft. Bisher gibt es hauptsächlich drei *Trigger*, die in den in klinischen Phasen befindlichen ADC verwendet werden. Es handelt sich dabei um das Hydrazonfragment, die Disulfidbrücke und das enzymatisch spaltbare Dipeptid Valin-Citrullin. Das Hydrazonfragment ist säure-labil und zersetzt sich durch Hydrolyse bei sauren Bedingungen ($\text{pH} < 6.2$), die in den Endosomen und Lysosomen vorliegen. ^[56] Disulfidbrücken sind stabil bei physiologischem pH ($\text{pH} \approx 7.4$), werden aber nach Internalisation in die Zelle reduziert und somit gespalten. Die Reduktion geschieht durch Glutathion, ein intrazelluläres Thiol-enthaltendes Tripeptid, welches innerhalb von Tumorzellen im millimolaren Bereich, und ausserhalb von Zellen im micromolaren Bereich vorliegt. ^[47] Um zu verhindern, dass der Disulfidlinker vorzeitig im Blutkreislauf reduziert wird, werden sterisch gehinderte Disulfidlinker eingesetzt. ^[57,58] Durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose von *Prodrugs* in die Lysosomen spielen auch Proteasen der Cathepsin-Familie eine Rolle, welche ihre Substrate im sauren Milieu spalten und teilweise nur dort aktiv und stabil sind. Hierzu gehört unter anderem das Cathepsin B, welches in den Lysosomen am Abbau des endozytotisch aufgenommenen extrazellulären Materials und des durch Autophagie aufgenommenen intrazellulären Materials beteiligt ist. ^[58,59] Als dipeptidische Substrate kommen hauptsächlich die -Phe-Lys-Sequenz und die -Val-Cit-Sequenz in Frage. Aus verschiedenen Studien kann jedoch gefolgert werden, dass die -Val-Cit-Sequenz für den Einsatz in ADCs besser geeignet ist, ^[60-62] was sich auch darin zeigt, dass sich das ADC Brentuximab Vedotin dieses Dipeptids als *Trigger* bedient. ^[43] Abhängig vom Wirkstoff, sowie vom Rest des Linkersystems ist zusätzlich, ob ein selbst-eliminierendes Modul (D) benötigt wird oder nicht. Diese sogenannten *Spacer* (der erste Vertreter wurde 1981 von KATZENELLENBOGEN *et al.* eingeführt ^[63]) sollen den Wirkstoff räumlich vom Rest des Linkers beziehungsweise der *targeting* Gruppe trennen, sodass eine enzymatische Spaltung des *Triggers* möglich ist. Diese würde für den Fall einer sterischen Hinderung des Enzyms schlimmstenfalls ausbleiben. Gleichzeitig eliminieren sich diese *Spacer* irreversibel selbst, sodass sie den Wirkstoff in seiner nativen, aktiven Form freisetzen können. Der bekannteste *Spacer* ist der *p*-Aminobenzylalkohol (PABA)^[63], der auch im Brentuximab Vedotin als selbst eliminierende Sequenz verwendet wird. Er wird dort über seine Hydroxyfunktion als Carbamat (PABC, *p*-Aminobenzylcarbamate) an das Monomethylauristatin E gebunden. ^[43] Sein Spaltungsmechanismus beruht auf einer 1,6-Benzyleliminierung, die in Abbildung 1-10 unter A exemplarisch dargestellt ist. Sie setzt spontan nach der Abspaltung des *Triggers* ein, und führt in wässrigem Medium zunächst zum *p*-Iminochinomethan und einem Kohlensäurederivat des Wirkstoffs. Beide Zwischenprodukte reagieren auf Grund ihrer Instabilität in einer Additionsreaktion mit Wasser zum *p*-Aminobenzylalkohol beziehungsweise in einer Decarboxylierung zum freien Wirkstoff. ^[64]

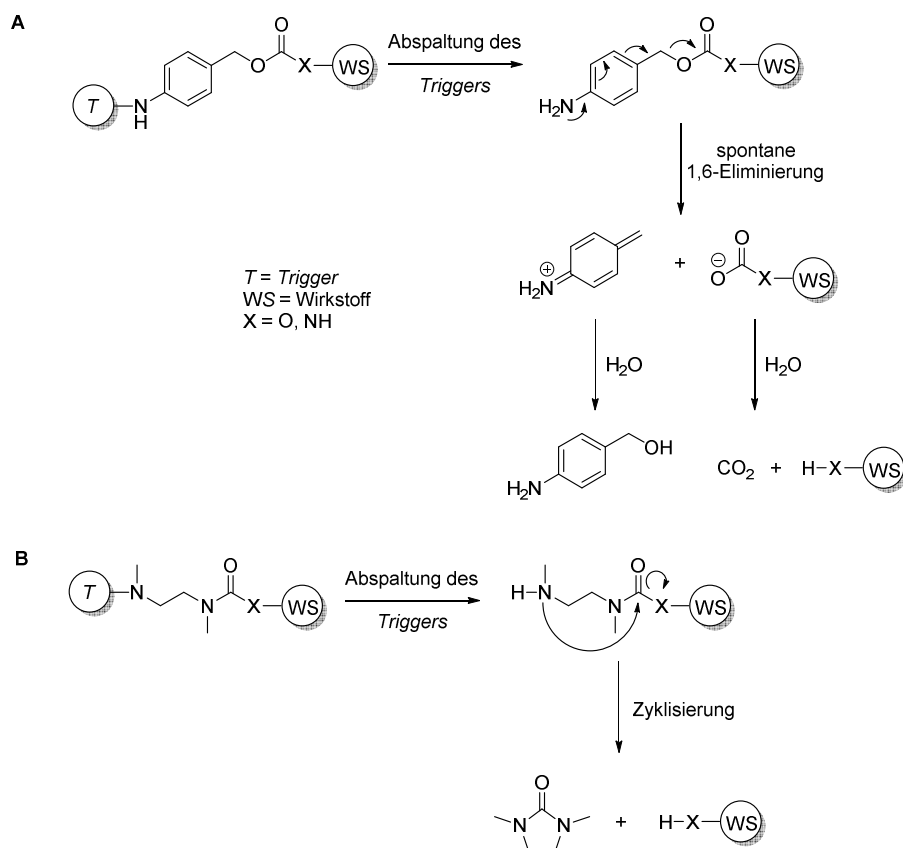


Abbildung 1-10: Mechanismen für selbsteliminierende Spacer. A: 1,6-Benzyleliminierung am Beispiel des *p*-Aminobenzylalkohols. B: Zyklisierung am Beispiel des *N,N'*-Dimethylethylendiamins. ^[65,66]

Einer der bekanntesten zyklisierenden, selbsteliminierenden Spacer ist das *N,N'*-Dimethylethylendiamin, welches mit seinen Aminofunktionen über Carbamatbindung an einen Hydroxy-funktionalisierten Wirkstoff und einen Hydroxy-funktionalisierten Peptidtrigger gebunden wird. Nach Abspaltung des Triggers unterliegt das Diamin einer Zyklisierung und es entstehen das 1,3-Dimethylimidazolidin-2-on (DMI) und der freie Wirkstoff. ^[65]

1.3 Cryptophycine

Bei den Cryptophycinen handelt es sich um 16-gliedrige makrozyklische Depsipeptide, deren erster Vertreter Cryptophycin-A (später in Cryptophycin-1 umbenannt, **1**) 1990 von SCHWARTZ *et al.* aus Zellen von Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* sp. ATCC 53789 isoliert wurde. Ursprünglich sollte Cryptophycin-1 (**1**) als Toxin gegen faserige Pilze und Hefen der Gattung *Cryptococcus*, von denen auch der Name Cryptophycin abgeleitet wurde, eingesetzt werden. ^[67] MOORE *et al.* fanden 1994 jedoch heraus, dass der von ihnen gewonnene Extrakt aus Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* sp. GSV224 hoch zytotoxisch ist und stellten fest, dass hierfür hauptsächlich Verbindung **1**

verantwortlich war. Sie klärten auch die komplette Struktur und Stereochemie der Verbindung auf. ^[68–70] Zeitgleich wurde von KOBAYASHI *et al.* ein zu **1** analoges Depsipeptid (Arenastatin A, **2**) aus dem marinen Schwamm *Dysidea arenaria* isoliert und dessen Totalsynthese veröffentlicht. ^[71]

Alle Cryptophycine lassen sich retrosynthetisch in vier Fragmente (Fragment A-D, siehe Abbildung 1-11) einteilen. Hierbei sind Fragment A und D Hydroxysäuren und Fragmente B und C Aminosäuren. Für diese Substanzklasse spezifisch ist die Struktur des A-Fragments, da es aus einer α,β -ungesättigten δ -Hydroxycarbonsäure mit vier stereogenen Zentren und einem benzylichen Epoxid, dessen Vorhandensein wichtig für die Zytotoxizität ist, besteht. Die Struktur des Fragments B lässt sich von D-Tyrosin ableiten und muss einen Chlorsubstituenten in 3'-Position besitzen sowie eine Methoxygruppe in 4'-Position aufweisen, um die gute *in vivo* Aktivität des Cryptophycins zu gewährleisten. Die β -Aminosäure, auf der die Struktur des Fragments C beruht, ist meist entweder α -mono- oder α,α -dialkyliert. Fragment D lässt sich auf die L-Leucinsäure oder eine analoge Verbindung zurückführen. ^[72]

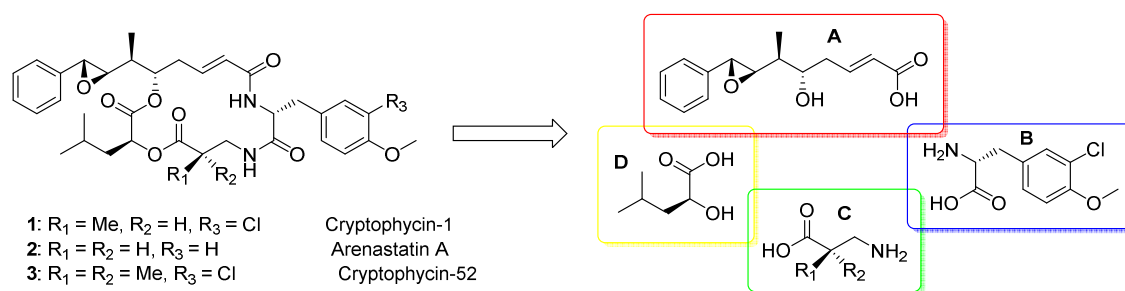


Abbildung 1-11: Struktur von Cryptophycin-1 (**1**), dessen Analogon Arenastatin A (**2**) und Cryptophycin-52 (**3**), sowie die retrosynthetische Analyse der Cryptophycine.

Bis heute wurden insgesamt 28 verschiedene Cryptophycine aus *Nostoc* sp. ATCC 53789 und GSV224 isoliert. ^[73,74] Darüber hinaus wurden zahlreiche Cryptophycin-Derivate synthetisiert und in Struktur-Aktivitäts-Studien (SAR-Studien von englisch: *structure-activity relationship*) auf ihre Toxizität gegenüber Tumorzellen getestet. ^[72,75,76]

Im Zuge der SAR-Studien wurde auch das Cryptophycin-1 Analogon Cryptophycin-52 (**3**), welches auch als LY355703 bezeichnet wird, synthetisiert. ^[77] Es weist im Vergleich zu **1** ein Stereozentrum weniger auf (doppelte α -Methylierung im Fragment C) und verfügt dennoch über alle, für die Zytotoxizität essentiellen Gruppen. Dies wird auch durch *in vitro* Assays gestützt, in denen **3** mit den Mitosehemmern Vinblastin und Paclitaxel (siehe Abbildung 1-3) verglichen wird. Im Vergleich zu den beiden Wirkstoffen weist Cryptophycin-52 (**3**) IC₅₀-Werte auf, deren Werte signifikant unterhalb derer von Paclitaxel und Vinblastin liegen. Zusätzlich bleibt seine Wirksamkeit auch gegenüber mehrfach medikamenten-resistenten Tumorzellen (engl.: *multiple drug resistant*, MDR) weitgehend erhalten und durch seine zweifache Methylsubstitution ist die Esterbindung zwischen

Fragment C und D weniger Hydrolyse-sensitiv. ^[78] Verbindung **3** durchlief beruhend auf seiner vielversprechenden Zytotoxizität klinische Phase I und II Studien. Der Einsatz als Anti-Krebsmedikament wurde allerdings auf Grund seiner, hauptsächlich neurologischen Toxizität nicht mehr weiter verfolgt. ^[79]

1.3.1 Pharmakologische Wirkung

Die pharmakologische Wirkung der Cryptophycine beruht auf einer Interaktion mit dem Tubulin, sie gehören daher zu den Mitosehemmern. Tubulin setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, dem α -Tubulin und dem β -Tubulin, und ist ein Guanosintriphosphat (GTP) bindendes Protein. In jedem Tubulin-Dimer gibt es zwei GTP-Bindungsstellen. Am α -Tubulin befindet sich die N-Stelle (engl.: *non-exchangable*; nicht austauschbar) und am β -Tubulin die E-Stelle (engl.: *exchangable*; austauschbar). Unter physiologischen Bedingungen bilden sich aus den Tubulinen die Mikrotubuli, welche in viele Zellprozesse involviert und essentiell sind. Hierzu zählt beispielsweise die Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose, die Festlegung der Zellform und -Beweglichkeit, der intrazelluläre Vesikeltransport, sowie die Organisation und Anordnung von Membranorganellen. Die Mikrotubulibildung besteht aus zwei Phasen, der Keimbildung und der Verlängerung und wird von der Hydrolyse des GTP aus der E-Stelle zu GDP (Guanosindiphosphat) begleitet. Das GDP bleibt nach der Hydrolyse fest an der Mikrotubuli-Struktur gebunden. Diese Hydrolyse findet vor oder während des Einbaus des α,β -Dimers in die Mikrotubuli statt. Ein Mikrotubulus setzt sich aus 13 Protofilamenten zusammen, welche alle versetzt gegeneinander angeordnet sind und dadurch die Röhrenstruktur der Mikrotubuli hervorrufen. In den Protofilamenten liegen α - und β -Untereinheit des Tubulins alternierend hintereinander, was dazu führt, dass Mikrotubuli polare Anordnungen sind, welche ein Plus- und ein Minus-Ende besitzen (Abbildung 1-12). Beide Enden wachsen unterschiedlich schnell, wobei das Plus-Ende das schneller wachsende Ende darstellt. Der Auf- und Abbau der Mikrotubuli ist ein dynamischer Prozess, in dem zu jedem Zeitpunkt gleichzeitig ein Auf- und Abbau stattfindet. Während des stationären Zustandes (engl.: *steady state*) liegen Auf- und Abbaurate im Gleichgewicht vor und laufen mit äquivalenter Geschwindigkeit ab. Dieser Prozess wird als Tretmühlen-Mechanismus (engl.: *treadmilling*) bezeichnet und ist GTP-getrieben. ^[80-82]

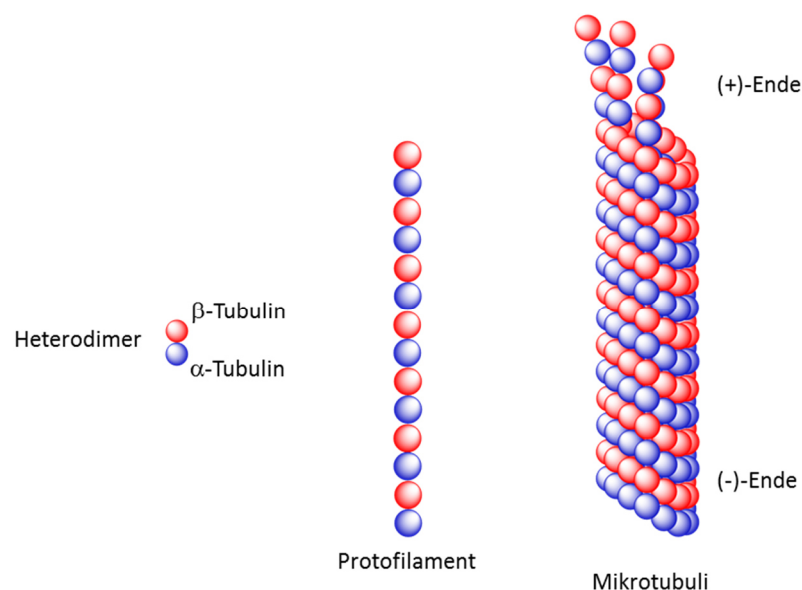


Abbildung 1-12: Heterodimer aus α - und β -Tubulin, welches zu einem Protofilament wächst und mit 12 weiteren Protofilamenten ein Mikrotubuli bildet.

Neben weiteren antimittotischen Wirkstoffen sind auch die Cryptophycine in der Lage die Mikrotubuli-Dynamik zu stören und den Zellzyklus sogar mit picomolaren Konzentrationen in der G2/M-Phase anzuhalten.^[83] Hierfür gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten, nämlich die der Hemmung der Tubulin-Polymerisation oder die Hemmung der Depolymerisation. Die Tubulin-Polymerisation hemmenden Wirkstoffe umfassen sowohl das Colchicin, als auch die Vinca-Alkaloide, zu denen das Vinblastin und das Vincristin zählen. Taxane wie Paclitaxel und Docetaxel fördern hingegen die Tubulin-Polymerisation und hemmen dafür die Depolymerisation.^[84] Es ist aber auch eine Einteilung der Mitosehemmer nach ihrer Bindungsstelle möglich. Dabei wird zwischen der Colchicin-Domäne, der Vinca-Domäne, der Taxan-Domäne und den anderen Domänen unterschieden. Die Colchicin-Domäne befindet sich in der Umgebung der GTP-bindenden N-Stelle des α -Tubulins, genau an der Schnittstelle der α - und β -Untereinheiten des Tubulin-Dimers. In der Nähe der E-Stelle des β -Tubulins ist die Vinca-Domäne positioniert. Direkt benachbart dazu befindet sich in einer tiefen hydrophoben Tasche des β -Tubulins die Taxan-Domäne, was auch dadurch gestützt wird, dass die Taxol-Bindung durch gebundenes Vinblastin inhibiert wird.^[85,86] Cryptophycin-1 (**1**) bindet mit hoher Affinität reversibel an den Enden der Mikrotubuli, wobei nicht geklärt ist, ob es eventuell einen Cryptophycin-1-Tubulin-Komplex bildet.^[87] Es inhibiert die Tubulin-Polymerisation und induziert stattdessen die Bildung von überwiegend einwandigen Tubulin-Ringen, welche aus acht Tubulin-Dimeren bestehen und einen Durchmesser von ungefähr 24 nm besitzen.^[88] Cryptophycin-52 (**3**) hingegen induziert die Bildung von Ringen aus neun Tubulin-Dimeren, mit einem Durchmesser von 28 nm.^[89] Durch die kompetitive Inhibierung der Bindung von Dolastatin 10 an Tubulin wurde herausgefunden, dass **1** in oder in der Nähe der Vinca-Domäne bindet.^[90,91] Weiterhin behalten die Cryptophycine auch in

mehrfach medikamentenresistenten Zellen ihre Aktivität bei, denn im Gegensatz zu Paclitaxel und den Vinca-Alkaloiden stellen sie kein Ziel für den Effluxtransporter P-Glykoprotein (P-gp) oder das MDR-assoziierte Protein (MRP-1) dar. Beide transportieren zellfremde Substanzen aus der Zelle heraus in den extrazellulären Raum und tragen somit dazu bei, dass Resistenzen entstehen.^[92] Ein weiterer Vorteil der Cryptophycine ist, dass sie auch die Phosphorylierung des Faktors Bcl-2 induzieren, wodurch dieser nicht mehr in der Lage ist die Zelle vor der Apoptose zu schützen.^[93]

1.3.2 Struktur-Aktivitäts-Studien an Cryptophycinen

Bedingt durch seine hohe Neurotoxizität kann Cryptophycin-52 (**3**) nicht in der Krebstherapie eingesetzt werden. Daher war es Ziel vieler Struktur-Wirkungsbeziehungs Studien die Struktur des Cryptophycins so zu verändern, dass es sowohl weniger neurotoxisch, als auch möglichst leicht und kostengünstig zugänglich in der Synthese ist. Problematisch war hierbei, dass es bis heute keine Kristallstruktur des Cryptophycins als Cryptophycin-Tubulin-Komplex gibt, mit welcher die Generierung einer neuen Leitstruktur über computergestütztes Strukturmodeling realisierbar wäre. Es blieb daher nur die Synthese weiterer Cryptophycine, bei denen jeweils an einer Stelle des Cryptophycins die Struktur verändert wurde, und diese im Anschluss an Krebszellen auf ihre Zytotoxizität zu testen.^[76,94] An allen Fragmenten des Cryptophycins wurden Strukturänderungen vorgenommen, allerdings ist Fragment A das einzige, an dem diese signifikanten Änderungen auch toleriert wurden.^[95] Im Folgenden wird nur auf ausgewählte SAR-Studien des A-Fragments näher eingegangen, da dieses auch Gegenstand dieser Arbeit ist. Am A-Fragment wurden sowohl unterschiedliche Substituenten am aromatischen Ring eingeführt, als auch die drei Stereozentren variiert und das Epoxid geöffnet (Beispiele in Abbildung 1-13).

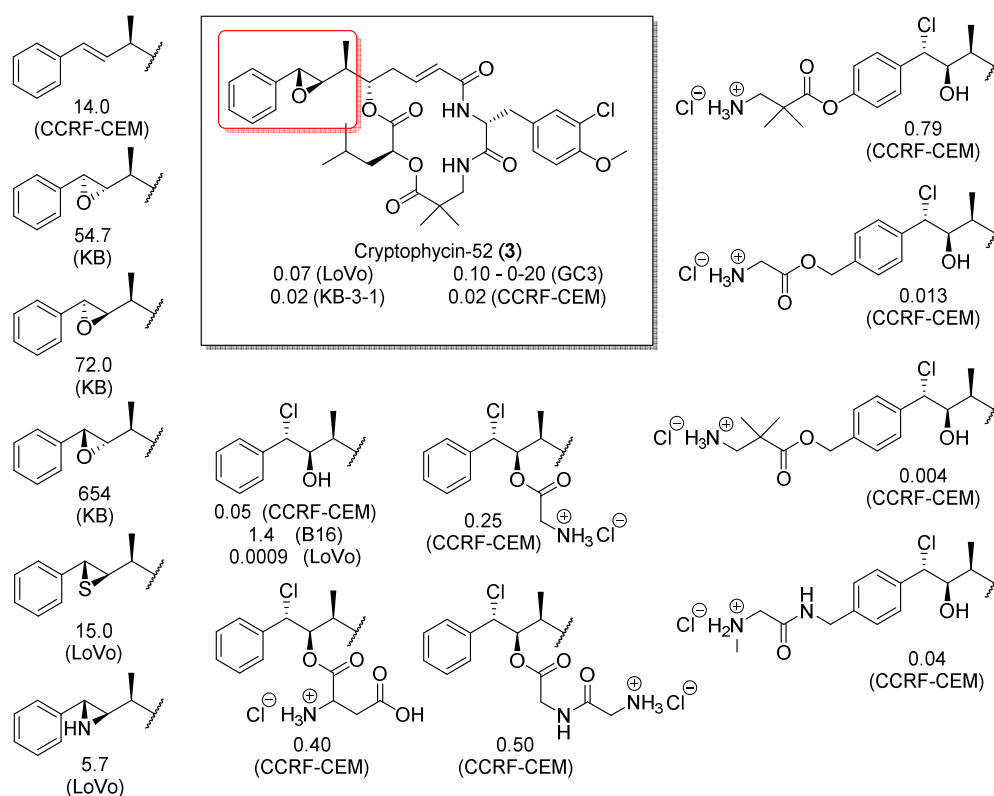


Abbildung 1-13: IC₅₀-Werte (in nM) der verschieden substituierten Cryptophycine. Sie sind jeweils bezogen auf die in Klammern angegebene Zelllinie. (Zelllinien: KB – humanes Gebärmutterhalskarzinom; KB-3-1 – Derivat der HELA-Zelllinie (Gebärmutterhalskarzinom); CCRF-CEM – lymphozytische Leukämie; LoVo – Dickdarm-Adenokarzinom; B16 – Mausmodell des menschlichen Hautkrebses; GC3 – humanes Dickdarmkarzinom) ^[72,75,76,96]

Die Variation der Stereochemie des Epoxides am Cryptophycin-52 (**3**) führte zu weniger aktiven Cryptophycinen. Ein Beibehalten der Stereochemie des Epoxides bei gleichzeitiger Substitution des Sauerstoffs durch Schwefel zum Episulfid oder durch Stickstoff zum Aziridin führte nicht zur Verbesserung der Zytotoxizität. Höchstens eine Öffnung des Epoxidringes zum β -Chlorhydrin (Cryptophycin-55) führte zu equivalenten Zytotoxizitäten. Da das β -Epoxid oder das β -Chlorhydrin essentiell für die zytotoxische Aktivität ist, wurden weiterhin Substitutionen am Phenylring des A-Fragments, sowohl beim Epoxid als auch beim Chlorhydrin, vorgenommen. Diese führten zu vergleichbaren und teilweise auch stark verbesserten Zytotoxizitätswerten. Auch die Wasserlöslichkeit konnte gesteigert werden. Allerdings waren die so substituierten Cryptophycine sensibler gegenüber MDR-Zellen, was eine inakzeptable Veränderung darstellt. ^[75,76,92] Da das Cryptophycin-55 in wässriger Lösung wieder zurück zum Cryptophycin-52 (**3**) reagiert, wurde über eine Veresterung der Hydroxyfunktion des Chlorhydrins versucht ein stabileres Derivat zu synthetisieren. Dies gelang auch, allerdings wurden die Zytotoxizitätswerte schlechter, lagen jedoch weiterhin in einem guten Bereich. ^[75]

1.3.3 Konjugate von Cryptophycinen

Der Einsatz von Cryptophycinen in ADCs und anderen Immunkonjugaten wird derzeit getestet. SANOFI AVENTIS und ENDOCYTE haben dazu bereits Patente veröffentlicht, in denen sie Cryptophycin-52 (**3**) und dessen Derivate, sowie Cryptophycin-55 über verschiedene Linker an einen Antikörper oder Folsäure konjugieren (Abbildung 1-14).^[97-99]

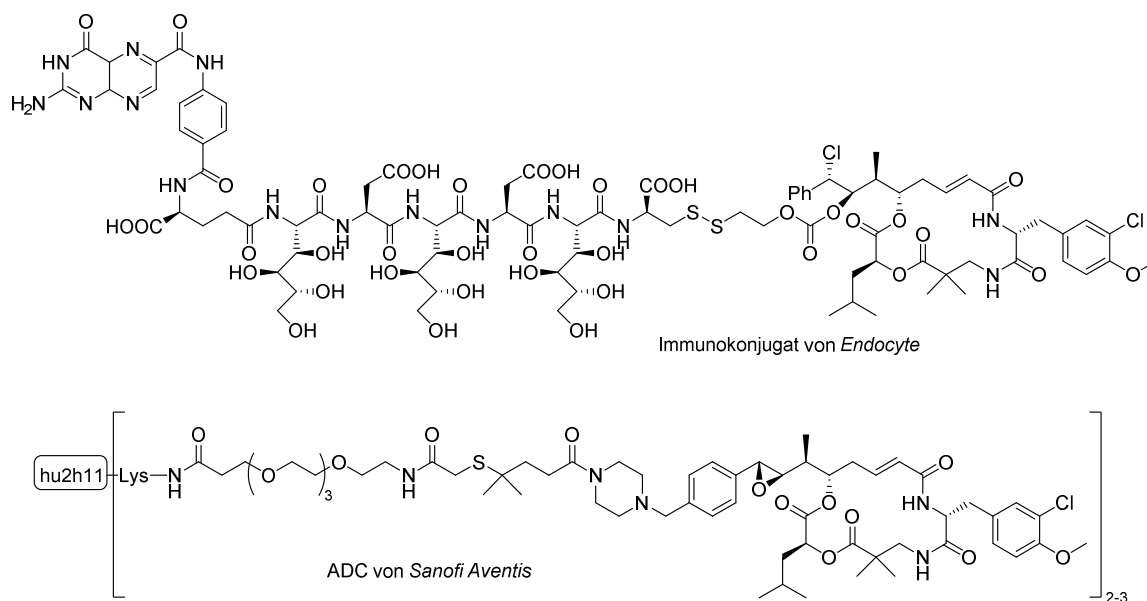


Abbildung 1-14: Strukturen des Cryptophycin-Folsäure-Konjugats von ENDOCYTE und des Antikörper-Cryptophycin-Konjugats von SANOFI AVENTIS.

2 Motivation und Zielsetzung

Krebs ist momentan die zweithäufigste Todesursache für Menschen, direkt nach den Krankheiten des Kreislaufsystems. Abhängig von der Art des Tumors ist darüberhinaus eine komplette Heilung meist nicht möglich, sondern nur eine Verlängerung der Überlebensdauer. In der Krebstherapie gibt es aktuell nur zwei zugelassene ADCs zur zielgerichteten Tumortherapie. Es handelt sich dabei um Trastuzumab-Emtansin (Kadcyla[®]) und Brentuximab Vedotin (Adcetris[®]). Im Gegensatz zur bis dahin gängigen Krebstherapie, die hauptsächlich auf wenig selektiven Techniken beziehungsweise der operativen Entfernung des Tumors beruhen, stellen sie eine wesentliche Verbesserung dar. Viele weitere ADCs befinden sich zurzeit in der Entwicklung in Phase I – III-Studien. ^[100]

Tabelle 2-1: Beispiele für sich zurzeit in der Entwicklung befindende ADCs. ^[100]

Entwicklungsstufe	Wirkstoff	Indikationen	Zielstruktur	Toxin
Phase III	Inotuzumab ozogamicin	NHL, ALL	CD22	Calicheamicin
Phase II	BT-062	Multipl. Myelom	CD138	Maytansinoid
	Milatuzumab-doc	Multipl. Myelom	CD74	Doxorubicin
	Lorvotuzumab mertansin	Kleinzelliges Lungenkarzinom	CD56	Maytansinoid
	PSMA ADC	Prostatakarzinom	PSMA	Auristatin
Phase I	ASG-22ME	Solide Tumore	Nectin-4	Auristatin
	IMGN-853	Solide Tumore, Ovarialkarzinom	Folat- rezeptor 1	Maytansinoid
	RG-7458	Ovarialtumor	Mucin 1	Auristatin

Bisher gibt es, obwohl die Cryptophycine durch ihre hohe Zytotoxizität vielversprechende Wirkstoffkandidaten darstellen, noch kein in der Krebstherapie zugelassenes ADC, welches auf dieser Wirkstoffgruppe beruht. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit ein ADC zu synthetisieren, welches auf einem Cryptophycin als zytotoxische Komponente basiert. Cryptophycin-55 sowie das Cryptophycin-55-glycinat sind durch ihre funktionellen Gruppen geeignete Kandidaten für die Konjugation an einen Linker und somit auch an einen Antikörper. Zudem zeigen sie vielversprechende Zytotoxizitäten. Cryptophycin-55 besitzt *in vivo* eine vergleichbar gute Aktivität wie das Epoxid Cryptophycin-52, zu welchem es in wässriger Lösung durch eine intramolekulare S_N2-Reaktion zurück reagiert. ^[101,102] Demnach lässt sich Cryptophycin-55 auch als *Prodrug* des Cryptophycin-52 bezeichnen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass in Mausplasma (ebenso in

Hunde- und menschlichem Plasma, hier jedoch langsamer) eine Esterhydrolyse des Cryptophycin-55-glycinats stattfindet, welches somit sowohl als *Prodrug* des Cryptophycin-55 als auch des Cryptophycin-52 bezeichnet werden kann. ^[103]

Zugleich sollen neue Cryptophycin-Derivate synthetisiert werden, welche an der Hydroxy-Funktion des Chlorhydrins verestert werden, um sie über geeignete Linker an Antikörper binden zu können. Diese neuen Cryptophycine sollen sowohl auf ihre Stabilität als auch die Zytotoxizität getestet werden.

Als Antikörper soll das, gegen den in Brustkrebstumoren häufig überexprimierten Rezeptor HER2 gerichtete, Trastuzumab verwendet werden. Bisher gibt es nur ein zugelassenes ADC auf Trastuzumab-Basis (TDM-1), welches als zytotoxische Komponente DM-1 (ein Derivat des Maytansin-1) verwendet, die über einen MCC-Linker ([*N*-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat) an den Antikörper gebunden ist. ^[104] In dieser Arbeit soll Trastuzumab über verschiedene selbst-eliminierende Linker an die Cryptophycin-Derivate gebunden werden.

Für den Start der Selbsteliminierungs-Kaskade ist eine enzymatische Spaltung (durch Cathepsin B) als Initiationsreaktion vorgesehen. Da das ADC endozytotisch in die Tumorzelle aufgenommen werden soll, eignet sich das Cathepsin B dazu sehr gut, da es häufig in den Lysosomen von Tumorzellen vorkommt und das ADC vorzugsweise erst dort gespalten werden soll.

Das bei Cryptophycinen häufig bestehende Problem der geringen Wasserlöslichkeit soll durch den Einbau von Polyethylenglykolbausteinen in das Konjugat gewährleistet werden. Eine weitere Aufgabe dieser Bausteine ist ihre Funktion als *Spacer* zwischen dem Antikörper und der enzymatisch spaltbaren Stelle im Linker. Gleichzeitig lassen sich durch spezielle funktionelle Gruppen am Antikörper zugewandten Ende des PEG-Bausteins mehrere Möglichkeiten realisieren, um den Linker-Wirkstoff-Teil an den Antikörper zu konjugieren. Hier soll die Möglichkeit der Thioetherbrücke zwischen Antikörper und Linker getestet werden.

Alle synthetisierten Linker-Cryptophycin-Konjugate sollen auf ihre Stabilität in verschiedenen wässrigen Puffersystemen sowie ihre Spaltbarkeit durch das Enzym Cathepsin B getestet werden. Nach erfolgter Synthese der vollständigen ADCs sollen diese dann auf ihre Krebszellselektivität untersucht werden. Dies soll über *in vitro* Zelltests mit HER2-überexprimierenden Zellen und HER2-negativen Zellen überprüft werden.

3 Spezieller Teil

3.1 Syntheseplanung

Für die Synthese des Cryptophycin-ADC wurde zunächst die Wasserlöslichkeit betrachtet, die für einen späteren intravenösen Einsatz in der Chemotherapie wichtig ist. Da die Cryptophycine selbst wenig hydrophil sind, muss eine Erhöhung der Hydrophilie durch den Einbau eines polaren Fragmentes in das ADC gewährleistet werden. Hierfür wird ein Polyethylenglykolbaustein gewählt, der in den Linker integriert werden soll. Dieser verbessert nicht nur die Wasserlöslichkeit, er kann auch, durch seine Länge, als Spacer zwischen Antikörper und Cryptophycin-Derivat fungieren und somit einer sterischen Hinderung des spaltenden Enzyms entgegenwirken.

Im Hinblick darauf, dass das ADC erst endozytotisch von der Zelle aufgenommen und anschließend im Lysosom gespalten werden soll, muss eine geeignete Spaltstelle gewählt werden. Geeignet hierfür ist die Valin-Citrullin-Sequenz, die auch schon im Brentuximab Vedotin verwendet wird. Sie ist *Target* der Cystein-Protease Cathepsin B (CTSB) und diese gehört mit zehn weiteren Cathepsinen (C, F, H, K, L, O, S, V, W und X) zu den menschlichen lysosomalen Cystein Cathepsinen.^[105] Der Vorteil von peptidischen spaltbaren Linkern als Wirkstoffträger im Vergleich zu pH-sensitiven Linkern ist ihre verbesserte Stabilität. Als erste spaltbare Sequenz für Cathepsin B gilt die Phe-Arg-Sequenz. Zu einer verbesserten systemischen Stabilität sowie einer erleichterten Synthese führt der Ersatz von Arginin durch Lysin. Auch das Ersetzen von Arginin durch Citrullin, welches isosterisch und isoelektronisch mit ihm ist, liefert verwendbare Peptidsequenzen. Gleichzeitiger Austausch des Phenylalanins gegen die Aminosäuren Leucin oder Valin resultiert in einer Verbesserung der Spaltungsgeschwindigkeit.^[60] Allerdings ergaben Spaltungsversuche mit der Val-Cit-Sequenz, dass der angehängte Wirkstoff (Doxorubicin) nur freigesetzt wird, wenn zwischen der Spaltsequenz und dem Wirkstoff noch eine selbst-eliminierende Einheit (PABC) eingefügt ist. Dies scheint darauf zurückzuführen sein, dass das Konjugat ohne PABC nicht in die tiefe aktive Tasche des Enzyms passt (sterische Hinderung durch den großen Wirkstoff Doxorubicin).^[60,61] Daher soll in einigen der Cryptophycin-ADCs *p*-Aminobenzylalkohol als selbst-eliminierender *Spacer* verwendet werden. Dieser soll über eine Carbamat-Bindung an ein weiteres selbst-eliminierendes Element (*N*-Methylaminobuttersäure oder *N,N*-Dimethylethylaminocarbonyl) gekuppelt werden, da zumindest durch Letzteres die Freisetzungsgeschwindigkeit erhöht werden würde.^[106] Auch eine Carbamat-Bindung an das Cryptophycin-55-glycinat ist vorgesehen. Eine weitere, noch nicht publizierte Möglichkeit ist ein *Spacer* aus Prolin und Glycin, die nach Spaltung vor dem Prolin zum Diketopiperazin zyklisieren können und dadurch das Cryptophycin freisetzen würden. Für die Konjugation an den Antikörper

soll an einem Ende des PEG-Linkers als reaktive Gruppe ein Maleimid eingeführt werden. Dieses kann kovalent an eine Thiolfunktion eines Cysteins des Antikörpers binden. Bei der so entstehenden Thioetherbrücke handelt es sich um eine ausgesprochen stabile Verbindung.^[107] Die andere Seite soll so funktionalisiert sein, dass eine Konjugation an die enzymatisch spaltbare Sequenz möglich ist. Hier bietet sich eine Carboxyfunktion an, die zur Bildung einer Amidbindung in der Lage ist. Zum Testen des selbst-eliminierenden Verhaltens des *Spacers* aus Prolin und Glycin in Kombination mit einem Farbstoff anstelle eines Wirkstoffes muss das Maleimid, um eine Reaktion mit Thiolen des spaltenden Enzyms zu verhindern, gegen eine chemisch inerte Funktionalität ausgetauscht werden. Hierfür ist ein Acetylrest vorgesehen.

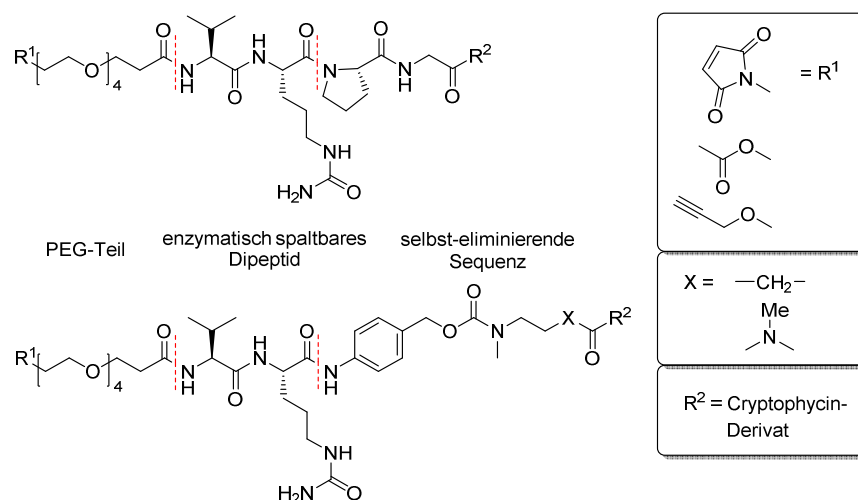


Abbildung 3-1: Geplante Linker-Systeme mit ihrer Einteilung in PEG-Teil, enzymatisch spaltbares Dipeptid und selbst-eliminierende Sequenz.

Aus den gestellten Anforderungen ergeben sich die in Abbildung 3-1 dargestellten geplanten Linker-Systeme. Sie lassen sich in vier Teile gliedern, dies sind das Cryptophycin-Derivat, der PEG-Teil, das enzymatisch spaltbare Dipeptid und die selbst-eliminierende Sequenz. Die Cryptophycine werden einzeln synthetisiert und später mit dem Linker kombiniert. Sobald dies geschehen ist, wird der Wirkstoff-Linker-Teil mit dem Antikörper verbunden.

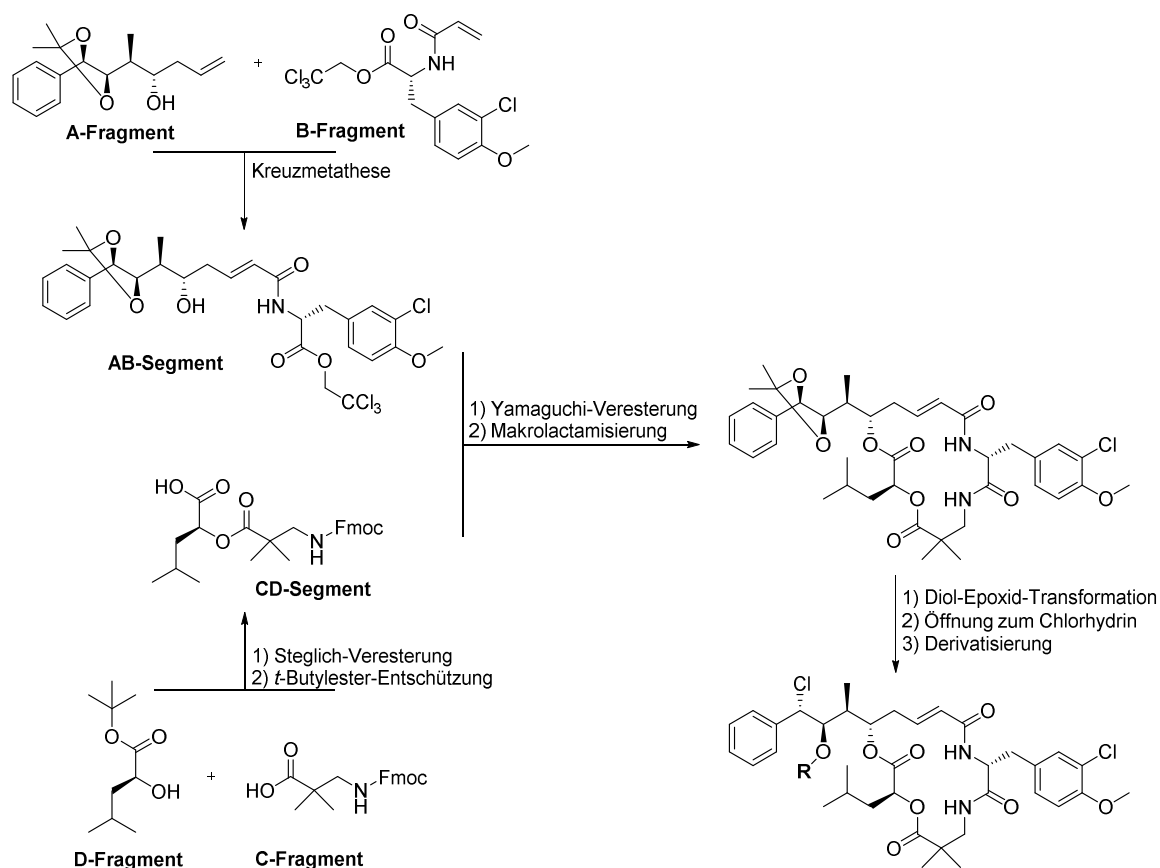
Als Synthesestrategie für das obere Linkersystem, welches aus einem Tetrapeptid und dem PEG-Teil besteht, bietet sich eine Synthese an der festen Phase nach MERRIFIELD an.^[108] Vorteil dieser Synthese ist, dass sämtliche Reagenzien und Nebenprodukte durch einfaches Filtrieren entfernt werden können, sie kann schnell und einfach durchgeführt werden und die Reinigung von Zwischenprodukten ist unnötig. All dies ist möglich durch die Immobilisierung der ersten Aminosäure an einen polymeren Träger. Danach werden die weiteren Aminosäuren nacheinander verknüpft und sobald die Sequenz vollständig ist, wird das gesamte Produkt vom polymeren Träger abgespalten und kann aufgereinigt werden.^[108] Der PEG-Teil wird als letztes eingeführt und sollte schon vollständig funktionalisiert sein.

Das untere Linkersystem, in welchem $X = \text{CH}_2$ wäre, lässt sich retrosynthetisch in zwei Teile zerlegen. Dies sind die PEG-Val-Cit-PAB-Sequenz und das mit *N*-Methylaminobuttersäure funktionalisierte Cryptophycin-55, welche nachfolgend über ein Carbamat verbunden werden sollen. Die Synthese der PEG-Val-Cit-PAB-Sequenz soll analog der Vorschriften von FIRESTONE und DUBOWCHIK erfolgen, die in ihrer Patentschrift die Synthese von Antitumor-Wirkstoff-Konjugaten beschreiben, die von lysosomalen Enzymen gespalten werden können. ^[109]

Die Cryptophycin-55-Derivate werden bis zum Cryptophycin-55 (**36**) nach einer bekannten konvergenten Syntheseroute nach WEISS synthetisiert. ^[96] Hierbei wird zunächst das vollständige Cryptophycin-52 (**3**) aufgebaut, welches zum Chlorhydrin geöffnet und anschließend funktionalisiert wird.

3.2 Synthese der Cryptophycin-55-Derivate

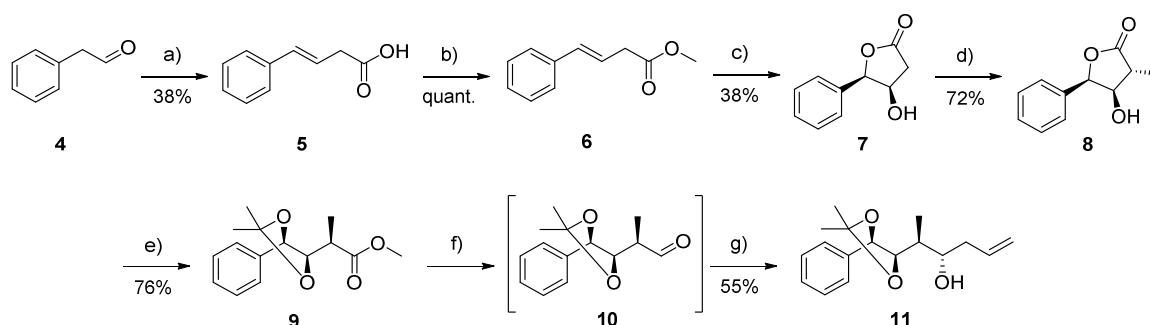
Die Cryptophycin-55-Derivate wurden bis zum Cryptophycin-52 (**3**) nach einer von WEISS entwickelten konvergenten Syntheseroute synthetisiert.^[96] Zunächst wurden die einzelnen Fragmente dargestellt, worauf eine Verknüpfung des A- mit dem B-Fragment durch Kreuzmetathese folgte. Das C-Fragment wurde mit dem D-Fragment durch Steglich-Veresterung verbunden. Anschließend wurde zwischen dem A- und D-Fragment eine Esterbindung nach YAMAGUCHI eingeführt und nachfolgend die Makrolactamisierung zwischen dem C- und B-Fragment vorgenommen. Danach wurde das Epoxid am A-Fragment durch die 4-stufige Diol-Epoxid-Transformation gebildet, welches zum Chlorhydrin geöffnet und dann an der Hydroxyfunktion derivatisiert wurde. (Schema 3-1)



Schema 3-1: Konvergente Syntheseroute zur Synthese der Cryptophycin-55-Derivate.

3.2.1 Synthese der Fragment-Bausteine

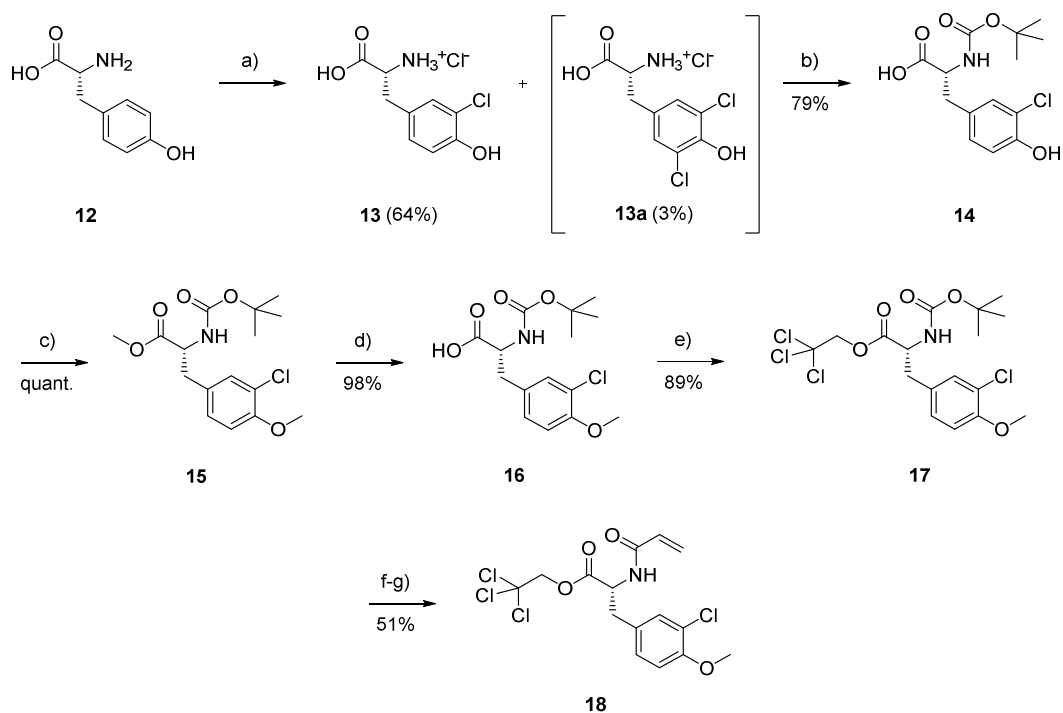
Die Synthese des A-Fragments **11** geht von dem kommerziell erworbenen Phenylacetaldehyd (**4**) aus und wurde nach EISSLER^[110] durchgeführt (Schema 3-2). Die β,γ -ungesättigte Carbonsäure **5** wurde durch eine modifizierte KNOEVENAGEL-Kondensation aus Malonsäure und **4** durch Katalyse mit dem Dehydratisierungsgagens Piperidiniumacetat in neutraler Umgebung synthetisiert.^[111]



Schema 3-2: Synthese des A-Fragments **11**. a) Malonsäure, AcOH, Piperidin, DMSO, 65°C, 3 h; b) SOCl₂, MeOH, 0°C → RT, 1 h; c) K₂OsO₄·2H₂O, K₃[Fe(CN)₆], K₂CO₃, (DHQD)₂-PHAL, CH₃SO₂NH₂, *tert*-BuOH/H₂O, 0°C, 48 h; d) LDA, MeI, abs. THF, -78°C, 18 h; e) (CH₃)₂C(OCH₃)₂, Amberlyst-15[®], abs. MeOH, RT, 4 d; f) DIBAL-H, abs. DCM, -78°C, 4 h; g) *n*-Bu₃SnAll, MgBr₂·Et₂O, abs. DCM, -78°C, 21.5 h.

Durchführung einer klassischen KNOEVENAGEL-Kondensation in basischem Milieu hätte zu der α,β -ungesättigten Carbonsäure geführt. Säure **5** wird durch Thionylchlorid zum Säurechlorid aktiviert und mit Methanol zum Methylester **6** umgesetzt, was sich mit quantitativer Ausbeute durchführen ließ. Die darauffolgende asymmetrische Dihydroxylierung nach SHARPLESS^[112] konnte durch den Einsatz des chiralen Osmat-Liganden (DHQD)₂-PHAL mit dem enantiomerenreinen Lacton **7** abgeschlossen werden. Eine diastereoselektive α -Methylierung mit Methyljodid lieferte nach 18 h mit 72% Ausbeute das α -methylierte β -Hydroxy- γ -Lacton **8**. Das Lacton **8** wurde mit Methanol im sauren Milieu (Amberlyst 15[®]) geöffnet und verestert, und der *in situ* entstandene β,γ -Diol als Acetonid **9** geschützt. Selektive Reduktion des Methylesters **9** mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) führte zu Aldehyd **10**, der ohne Aufreinigung direkt in der Folgereaktion eingesetzt wurde, um eine Epimerisierung zu verhindern. In der darauffolgenden diastereoselektiven Allylierung mit Allyl-tri-*n*-butylzinn, die unter Substratkontrolle abläuft und MgBr₂·Et₂O als Lewis-Säure verwendet, konnte das A-Fragment **11** mit 55% Ausbeute synthetisiert werden.^[113]

Für die Synthese des B-Fragments **18** wurde nach der von EIBLER und NAHRWOLD^[110] weiterentwickelten Syntheseroute von LAUTENS^[114] vorgegangen (siehe Schema 3-3).



Scheme 3-3: Synthese des B-Fragments **18**. a) SO_2Cl_2 , AcOH, RT, 90 min; b) Boc_2O , NaOH, *tert*-BuOH/ H_2O , RT, 17.5 h; c) K_2CO_3 , Me_2SO_4 , Aceton, Rückfluss, 4 h; d) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, THF/ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, RT, 45 min; e) Pyridin, DCC, $\text{Cl}_3\text{CCH}_2\text{OH}$, abs. DCM, 0°C , 16.5 h; f) TFA, RT, 4 h; g) NEt_3 , $\text{ClCOCH}=\text{CH}_2$, abs. DCM, ü. N.

Bei der selektiven Chlorierung des Aromaten von D-Tyrosin **12** mit Sulfurylchlorid in Essigsäure wurde darauf geachtet, dass ein möglichst vollständiger Umsatz erreicht wird. Dies wurde annähernd durch Homogenisierung des D-Tyrosin/Essigsäure-Gemisches im Ultraschallbad erreicht. Durch den 0.2-fachen Überschuss an eingesetztem Sulfurylchlorid wurde allerdings neben dem Monochlorierungsprodukt **13** in geringem Anteil auch das Dichlorierungsprodukt **13a** erhalten (siehe Abbildung 3-2).

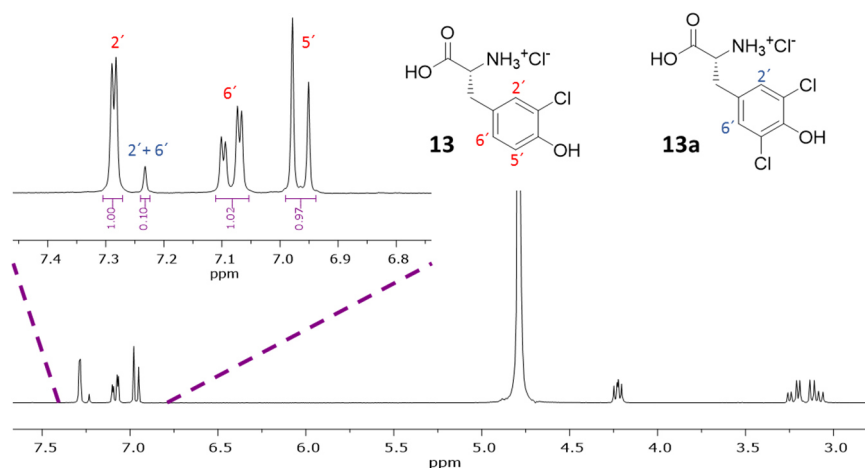
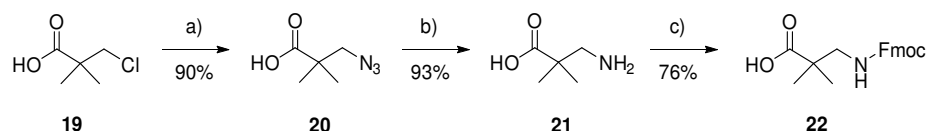


Abbildung 3-2: ^1H -Spektrum (300 MHz, D_2O) der Rohprodukte der Chlorierung von D-Tyrosin.

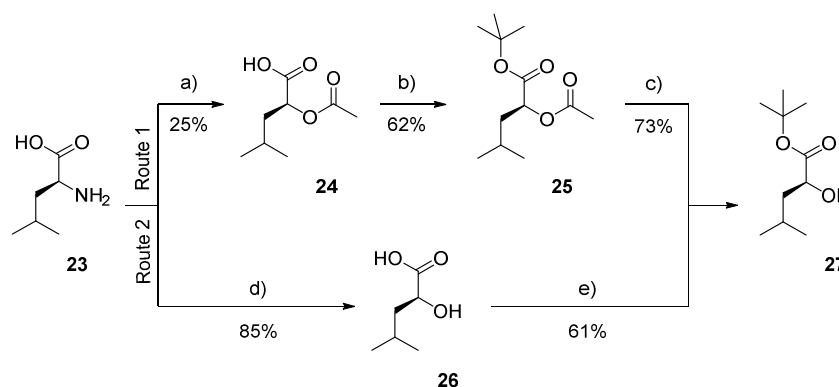
Das Rohprodukt wurde nicht weiter aufgearbeitet sondern direkt in der darauffolgenden Reaktion an der Aminofunktion als *tert*-Butylcarbamat **14** geschützt. Auch auf dieser Stufe wurde das dichlorierte Nebenprodukt noch nicht abgetrennt. Dies erfolgte erst nach der Methylierung der freien Carboxyfunktion und der phenolischen Hydroxyfunktion, welche mit Dimethylsulfat zur Reaktion gebracht wurden. Das erhaltene einfach chlorierte Methylierungsprodukt **15** konnte auf dieser Stufe säulenchromatographisch in quantitativer Ausbeute vom dichlorierten Methylierungsprodukt getrennt werden. Anschließend wurde der Methylester mit Lithiumhydroxid zur freien Carbonsäure **16** verseift und diese nachfolgend als Trichlorethylester **17** geschützt. Mit TFA wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt und das entstandene freie Amin mit Acryloylchlorid in das fertige B-Fragment **18** überführt.

Die Synthese des C-Fragments gelang in drei Stufen. Zuerst wurde das Chlorid der Pivalinsäure **19** in einer nucleophilen Substitution 2. Ordnung mit Natriumazid zum Azid **20** umgesetzt. In Anlehnung an eine Vorschrift von MA *et al.* wurde die Azidopivalinsäure (**20**) danach mit Palladium auf Kohle in Wasserstoffatmosphäre zum Amin **21** hydriert. Um eine selektive Umsetzung des C-Fragments mit dem D-Fragment zu gewährleisten, wurde das freie Amin **21** mit FmocOSu geschützt und so das C-Fragment **22** in guter Ausbeute erhalten (Schema 3-4).



Schema 3-4: Synthese des C-Fragments. a) NaN_3 , H_2O , Rückfluss, 3d; b) Pd/C , H_2 , MeOH , RT, ü. N.; c) NaHCO_3 , FmocOSu, Aceton/ H_2O , RT, ü. N.

In der Synthese des D-Fragments wurden zwei verschiedene Routen verfolgt (Schema 3-5). Beide Routen gehen von dem gleichen Edukt, dem L-Leucin (**23**) aus. In Route 1 wurde dessen freie Aminofunktion zunächst nach den Vorschriften von EISSLER^[110] mit Natriumnitrit diazotiert. Das entstandene Diazoniumion ist sehr instabil und zerfällt; dabei entsteht unter Retention der Konfiguration der gewünschte Ester **24**. Dieser wurde an seiner freien Carboxyfunktion in einer STEGLICH-Veresterung^[115] mit *tert*-BuOH zu **25** verestert. Die Entschützung des acetylierten α -Hydroxy-Carbonsäurediesters **25** unter basischen Bedingungen mit Kaliumcarbonat lieferte das fertige D-Fragment **27**.



Schema 3-5: Synthese des D-Fragments. a) NaNO_2 , AcOH, RT, 3 h; b) *tert*-BuOH, DCC, DMAP, abs. DCM, $0^\circ\text{C} \rightarrow$ RT, 18.5 h; c) K_2CO_3 , MeOH/ H_2O , RT, 20 h; d) NaNO_2 , H_2SO_4 , H_2O , RT, 23.5 h; e) 1. DIC, CuCl, *tert*-BuOH, RT, 6 d, 2. **26**, abs. DCM, RT, 4.5 h.

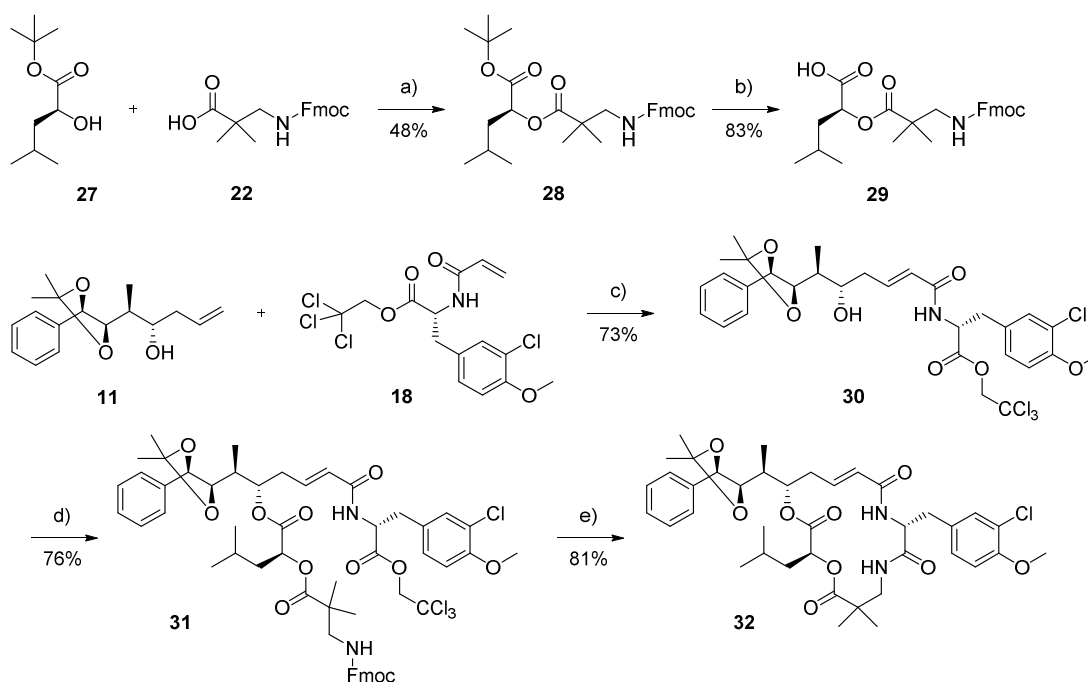
Route 2 ging, wie bereits erwähnt, ebenfalls vom L-Leucin (**23**) aus. Allerdings wurde die Aminofunktion hier direkt in eine freie Hydroxyfunktion überführt. Dies geschah gleichfalls nach vorheriger Diazotierung der Aminofunktion. Da allerdings hier in wässriger Lösung gearbeitet wurde, wurde auch das Carbeniumion mit Wasser abgefangen, sodass die α -Hydroxycarbonsäure **26** mit guter Ausbeute erhalten werden konnte. Von den Produkten der beiden Routen wurde jeweils der Drehwert bestimmt. Dieser lag für das Produkt der Route 1 bei $[\alpha]_{RT}^D = -5.43$ ($c = 0.7$ in CHCl_3), das Produkt der Route 2 besaß einen Drehwert von $[\alpha]_{RT}^D = -7.60$ ($c = 0.7$ in CHCl_3). Aus diesen beiden Werten lässt sich mit dem Drehwert des reinen Enantiomers $[\alpha]_{RT}^D = -8.6$ ($c = 0.7$ in CHCl_3) über folgenden Zusammenhang:

$$\text{optische Reinheit [\%]} = \left[\frac{[\alpha]_{\text{beobachtet}}}{[\alpha]_{\text{reines Enantiomer}}} \cdot 100 \right] = \text{Enantiomerenüberschuss (ee)}$$

die optische Reinheit beziehungsweise der Enantiomerenüberschuss berechnen. Die so berechneten optischen Reinheiten betragen für das Produkt aus Route 1 63% und für das Produkt aus Route 2 88%. Werden diese Werte in Korrelation mit den Gesamtausbeuten der beiden Syntheserouten gesetzt (11% in Route 1; 52% in Route 2), so lässt sich sagen, dass Route 2 zu besserer Gesamtausbeute und optischer Reinheit führt und somit eine gute Möglichkeit darstellt die Synthese des D-Fragments zu optimieren.

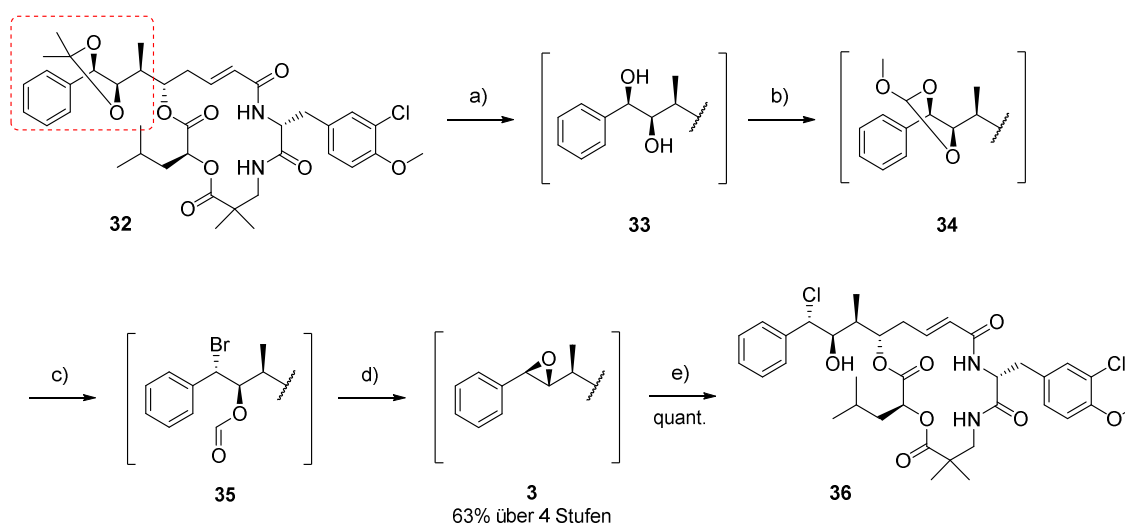
3.2.2 Fragmentkondensation, Cyclisierung und Diol-Epoxid-Transformation mit Derivatisierung

Die Kondensation der Fragmente C und D erfolgte als STEGLICH-Veresterung mit DCC, katalysiert durch DMAP. Das dabei entstandene Kopplungsprodukt **28** wurde mit TFA zur freien Säure **29** entschützt. Fragment A und Fragment B wurden in einer Metathesereaktion mit einem GRUBBS-Katalysator der 2. Generation verbunden. Hierbei wurde Fragment A **11** in 0.2-fachem Überschuss eingesetzt und mit 5 mol% des Katalysators gearbeitet.



Schema 3-6: Fragmentkondensation und Aufbau des Makrozyklus. a) DCC, DMAP, abs. DCM, 0°C → RT, 17 h; b) TFA, DCM, 0°C → RT, 5 h; c) Grubbs-II-Kat., abs. DCM, RT, ü. N.; d) **29**, 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, DMAP, NEt₃, abs. THF, 0°C, 3 h; e) Piperidin, abs. DMF, RT, 2 h.

Das Fmoc-geschützte CD-Fragment **29** wurde in einer YAMAGUCHI-Veresterung regioselektiv an die δ -Hydroxyfunktion des AB-Fragmentes **30** gekoppelt. ^[116] Diese Veresterung findet hauptsächlich in der regioselektiven Synthese von funktionalisierten Estern ihre Anwendung. ^[117,118] Das *seco*-uA[Acetonid]-Cryptophycin-52 (**31**) konnte in einer guten Ausbeute von 76% erhalten werden. Die Zyklisierung von **31** erfolgte in absolutem DMF nach Zugabe von 5 Äquivalenten Piperidin. ^[119] Dies bewirkte die Entschützung des Fmoc-geschützten Amins, was *in situ* direkt zur Aminolyse des Trichlorethylesters des B-Fragments führte. Der Cryptophycin-Makrozyklus **32** wurde mit 81% Ausbeute erhalten (Schema 3-6).

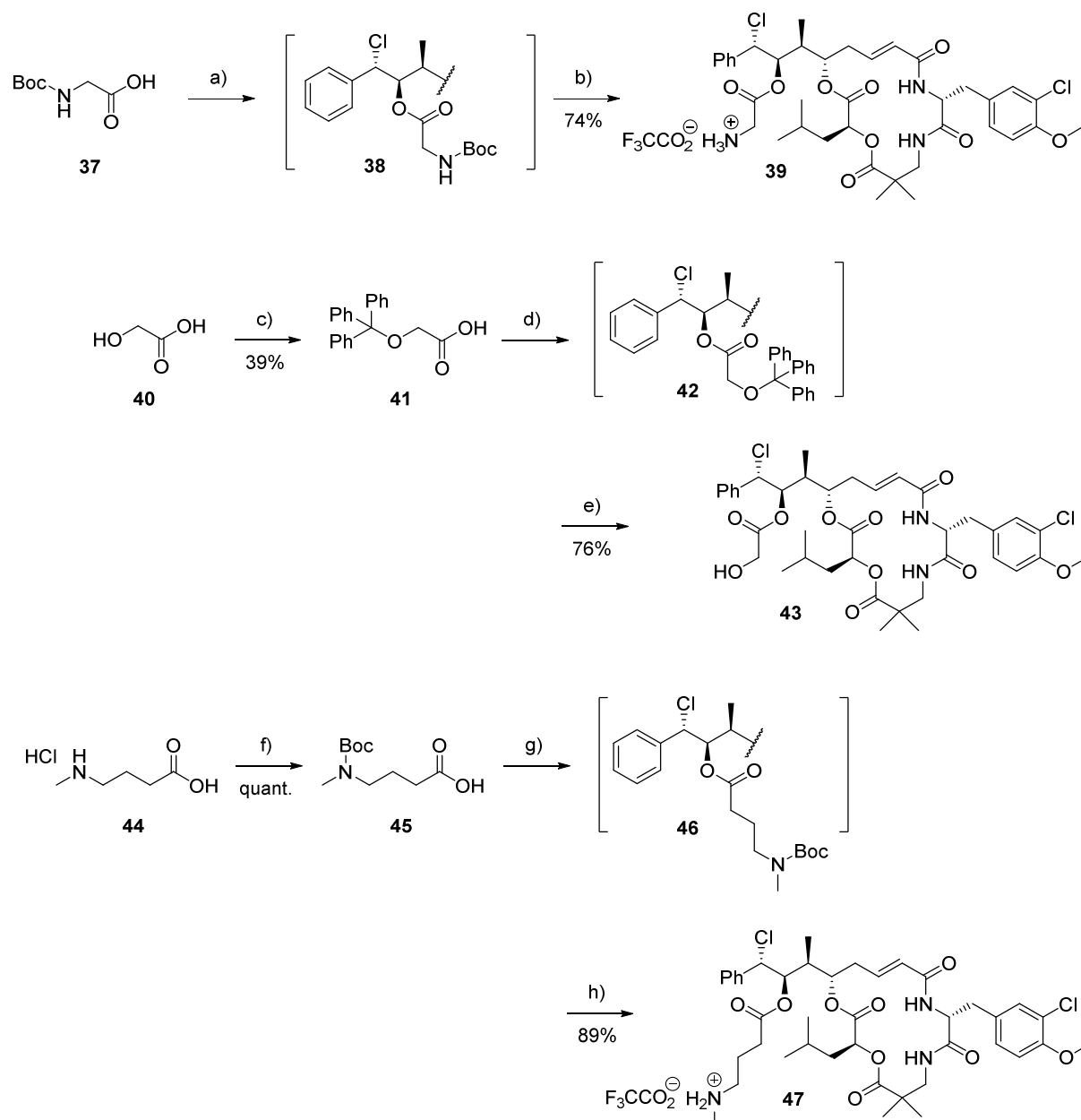


Schema 3-7: Acetonidsplaltung mit Diol-Epoxid-Transformation und Öffnung zum Chlorhydrin. a) TFA, abs. DCM, H₂O, RT, 1.5 h; b) PPTS, abs. (CH₃O)₂CH, abs. DCM, RT, 2.5 h; c) AcBr, abs. DCM, RT, 4.5 h; d) K₂CO₃, DME/Glykol (2:1 v/v), RT, 2.5 min; e) HCl in Dioxan, abs. DCM, -50°C, 2 h.

In fünf Stufen, wobei die ersten vier ohne direkte Aufreinigung durchgeführt wurden, wurde aus dem geschützten cyclischen Acetonid **32** das Chlorhydrin **37** hergestellt (Schema 3-7). Zunächst wurde das Acetonid **32** mit TFA und einer geringen Menge H₂O in den freien *syn*-Diol **33** überführt, wobei das Wasser dazu diente, die Hydrolyse zu vervollständigen. Die nachfolgende Diol-Epoxid-Transformation erfolgte nach einer von KOLB und SHARPLESS entwickelten^[120] und von LIANG^[121], MAST^[122] und EIBLER^[110] optimierten dreistufigen Syntheseroute. Der *syn*-Diol **33** wird hierbei mit Trimethylorthoformiat in das korrespondierende Acetal **34** überführt. Mit Acetyl bromid wird der *ortho*-Ester **34** ionisiert und durch den nucleophilen Angriff des Bromidions am C⁷ des A-Fragments unter Inversion der Konfiguration das Bromhydrinformiat **35** erhalten. Über eine intramolekulare S_N-Reaktion wird das Bromid, im Anschluss an das Verseifen des Formiats mit Kaliumcarbonat in einer Suspension aus Ethylenglykol und 1,2-Dimethoxypropan, verdrängt und Epoxid **3** entsteht stereoselektiv mit einer guten Ausbeute von 63% über vier Stufen. Die Diol-Epoxid-Transformation wurde unter milden Bedingungen durchgeführt, um eine Verseifung der Esterbindungen zwischen dem A- und D-Fragment sowie zwischen dem C- und D-Fragment zu verhindern. Anschließend wurde das Epoxid **3** in quantitativer Ausbeute mit HCl zum Cryptophycin-55 (**36**) geöffnet.

3.2.3 Synthese der Cryptophycin-55-Derivate

Für eine Konjugation an die synthetisierten Linker wäre in Cryptophycin-55 (**36**) die Hydroxyfunktion am A-Fragment am aussichtsreichsten. Je nach Linker wäre eine Carbonat- bzw. Carbamat-Bindung denkbar, wobei hierfür entweder das Cryptophycin-55 (**36**) oder der Linker aktiviert werden müssten. Eine bekannte Methode zur Synthese von Carbonaten und Carbamaten aus Hydroxy- und Aminogruppen ist deren Umsetzung mit 4-Nitrophenylchlorformiat (NPC) zum Carbonat bzw. Carbamat und nachfolgende Substitution der 4-Nitrophenyl-Gruppe durch einen weiteren Alkohol oder ein Amin.^[123,124] Versuche von WEISS das Cryptophycin-55 (**36**) selbst mit NPC umzusetzen und dieses aufzureinigen oder als Rohprodukt direkt in der Folgereaktion mit einem von SAMMET synthetisierten selbst-eliminierenden Linker zu konjugieren waren nicht sehr erfolgreich.^[96] Daher wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt sondern funktionalisierte Ester des Cryptophycins (siehe Schema 3-8) zur Konjugation über Carbamat- oder Peptidbindungen an die Linker vorgesehen. Vorteil hierbei ist, dass eine eventuelle Reaktion mit NPC an der reaktiven Gruppe des Esterfragments sterisch weniger gehindert wäre als direkt am Cryptophycin und die neuen Cryptophycin-Derivate außerdem als weitere *Prodrugs* des Cryptophycin-52 (**3**) gesehen werden könnten, da sie im Körper vermutlich einer Esterhydrolyse unterliegen würden, was zunächst zum Cryptophycin-55 (**36**) führen würde, das daraufhin zum Cryptophycin-52 (**3**) hydrolysiert.



Scheme 3-8: Synthese der modifizierten Cryptophycin-Derivate. a) **36**, DCC, DMAP, abs. DCM, RT, 2 h; b) HCl in Dioxan, abs. DCM, RT, 24 h; c) Ph_3CCl , Et_3N , abs. DCM, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, ü. N.; d) **36**, DCC, DMAP, abs. DCM, RT, 3 h; e) TFA/TIS/DCM, RT, 1 h; f) NaOH, Boc_2O , DCM/ H_2O , RT, 24 h; g) **36**, DCC, DMAP, abs. DCM, RT, 2 h; h) TFA, DCM, RT, 1 h.

Als bereits bekanntes Cryptophycin-55-Derivat wurde das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) gewählt. Es besitzt *in vivo* eine vergleichbare Aktivität wie das Cryptophycin-55 (**36**). Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von CORBETT *et al.*, die auch schon weitere Cryptophycin-Analoga synthetisiert und diese in SAR-Studien verglichen haben.^[102] Boc-Glycin (**37**) wurde unter STEGLICH-Bedingungen mit Cryptophycin-55 (**36**) verestert und, anders als bei CORBETT, der entstandene Ester ohne weitere Aufreinigung an der Aminofunktion mit HCl entschützt. Das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) wurde nach Reinigung durch präparative HPLC als

Trifluoressigsäure-Salz in einer guten Ausbeute von 74% erhalten. Als weiteres Cryptophycin-55-Derivat wurde das Cryptophycin-55-glycolat (**43**) synthetisiert. Hierfür wurde Glycolsäure (**40**) in Anlehnung an eine Vorschrift von LISKAMP *et al.* an der α -Hydroxyfunktion mit Tritylchlorid geschützt.^[125] Vorteil der Trityl-Schutzgruppe an der Hydroxyfunktion ist, dass sie sich mit TFA wieder entschützen lässt, was, wie in der Synthese des Cryptophycin-55-glycinats (**39**), nicht zu einer Zersetzung des Cryptophycins führt. Danach wurde die geschützte Glycolsäure **41** analog der Vorschrift zur Synthese des Cryptophycin-55-glycinats (**39**) mit DCC und einer katalytischen Menge DMAP mit dem Cryptophycin-55 (**36**) verestert. Der entstandene Ester **42** wurde nicht aufgereinigt sondern direkt mit TFA und TIS in DCM an der Hydroxyfunktion zum Cryptophycin-55-glycolat (**43**) entschützt.^[125] Für Cryptophycin-55-*N*-Me-Aminobutyrat (**47**) wurde zunächst das Hydrochlorid der *N*-methylierten Buttersäure (**44**) mit Boc₂O in die geschützte γ -Aminosäure **45** überführt und danach mit Cryptophycin-55 (**36**) unter STEGLICH-Bedingungen zu Ester **46** umgesetzt. Die Entschützung der Aminofunktion erfolgte ohne vorherige Aufreinigung des Esters **46** mit TFA in DCM, wobei nach Reinigung durch präparative HPLC (Methode 4) das TFA-Salz des Cryptophycin-55-*N*-Me-Aminobuttersäureesters (**47**) in guter Ausbeute erhalten wurde.

3.2.3.1 Stabilität der Cryptophycin-55-Derivate

Die synthetisierten Cryptophycine und deren Derivate wurden auf ihre Stabilität unter physiologischen Bedingungen getestet. Verbunden mit der einer intravenösen Injektion in den Körper wären sie dem pH-Wert des Blutes (pH = 7.35 -7.45), der bei einer Alkalose (Basifizierung) auch höher liegen kann (7.45 < pH < 8), sowie den sauren pH-Werten der Endosomen (pH = 6.5 – 6) und der Lysosomen (pH = 4.5 – 5) ausgesetzt.^[126] Diese pH-Bedingungen wurden mit Puffern nachgestellt. So wurde der basische pH, der bei einer Alkalose vorliegen würde, durch Verwendung eines HEPES-Puffers mit pH = 8 simuliert. Der normale pH-Wert des Blutes wurde durch einen Na₂HPO₄-Puffer mit pH = 7.4, und der niedrigste mögliche pH-Wert auf diesem Aufnahmeweg (Lysosomen) wurde mit einem Acetat-Puffer mit pH = 4 nachgeahmt. Die Stabilität wurde über die Dauer von einer Woche im Abstand von jeweils 24 h per analytischer HPLC verfolgt, wobei jeweils zum Zeitpunkt t = 0 eine Messung gemacht wurde, die nur das Cryptophycin (**3** oder **36**) beziehungsweise das jeweilige Derivat (**39**, **43** oder **47**) zeigt.

Die HPLC-Chromatogramme wurden für jede Substanz und jeden pH-Wert gegeneinander aufgetragen und verglichen. Cryptophycin-52 (**3**) ist über die Dauer von 1 Woche bei allen

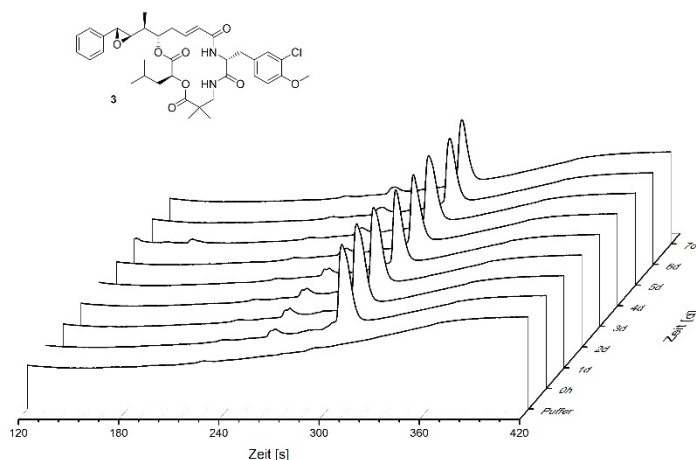


Abbildung 3-3: HPLC-Chromatogramme von **3** in Pufferlösung mit pH = 4, gemessen bei 220 nm über die Dauer von 1 Woche. (Es wurde in den Bereich von 2 – 7 min gezoomt, da sich nur dort relevante Signale befinden.)

getesteten pH-Werten stabil (ein exemplarisches Beispiel für die Stabilität bei pH = 4 ist in Abbildung 3-3 gegeben). Über das Cryptophycin-55 (**36**) kann bezüglich der Stabilität bei den verschiedenen pH-Werten keine genau Aussage gemacht werden, da die Retentionszeiten für das Chlorhydrin **36** und das Epoxid **3**, zu dem es sich der Erwartung nach zersetzen würde, [101,102]

mit 4.9 min genau gleich sind. Um dies zu vermeiden wurden weitere Gradienten für die HPLC-Lösungsmittelzusammensetzung getestet, jedoch ohne die Peaks trennen zu können. Per MALDI-ToF konnte jedoch bewiesen werden, dass Epoxid **3** gebildet wurde. Eine Quantifizierung dieses Ergebnisses war allerdings über die vorhandenen Methoden nicht möglich.

Für die Cryptophycin-Derivate **39** und **43** zeigt sich, dass beide über die Dauer von einer Woche und in allen drei gewählten Puffersystemen stabil sind. Auch eine Öffnung der Esterbindung zwischen C- und D-Fragment, wie sie bereits von anderen Gruppen beobachtet und publiziert wurde, fand nicht statt. [70,78]

Das dritte Derivat, Cryptophycin-55-*N*-Me-

Aminobutyrat (**47**), weicht von diesem Verhalten ab. Die Fläche unter dem Peak des Cryptophycin-Derivats **47** bei einer Retentionszeit von 4.4 min wird mit fortschreitender Inkubationszeit kleiner und ein anderer Peak ($t_R = 4.0$ min) entsteht (exemplarisch für pH = 4 dargestellt in Abbildung 3-4).

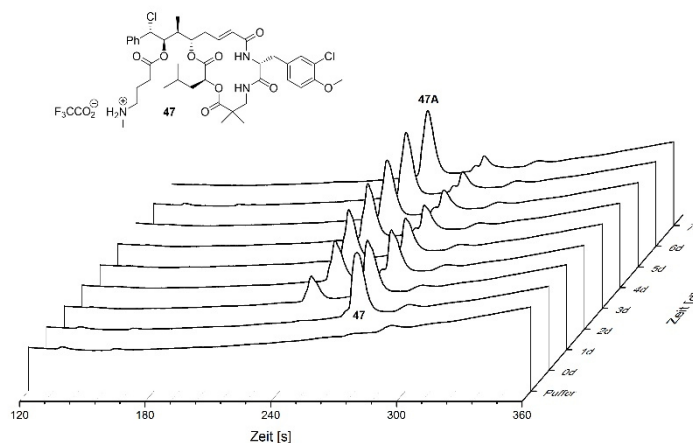


Abbildung 3-4: HPLC-Chromatogramme von **47** in Pufferlösung mit pH = 4, gemessen bei 220 nm über die Dauer von 1 Woche. (Es wurde in den Bereich von 2 – 6 min gezoomt, da sich nur dort relevante Signale befinden.)

3.2 Synthese der Cryptophycin-55-Derivate

Der gleiche Sachverhalt wurde bei allen getesteten pH-Werten beobachtet, und die neu entstandene Substanz mit **47A** bezeichnet. Lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit ist, abhängig von den verwendeten pH-Werten, unterschiedlich. Durch Integration der einzelnen Peaks und Berechnung des daraus resultierenden noch verbliebenen Anteils an **47** kann gezeigt werden, dass die Reaktion bei pH = 8 am schnellsten ist (siehe Diagramm 3-1).

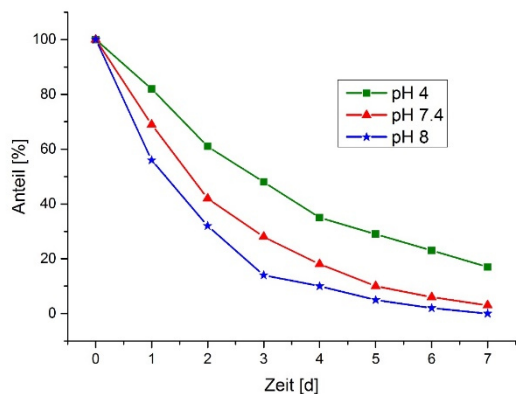
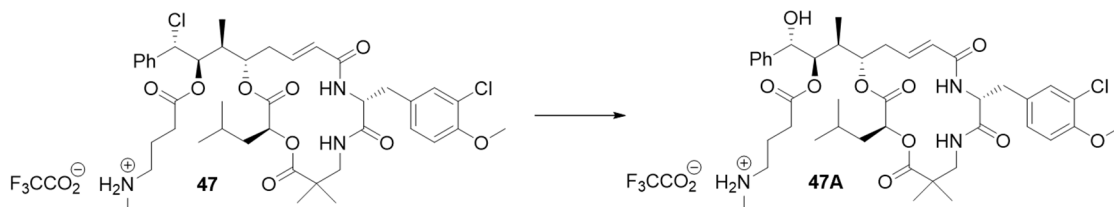


Diagramm 3-1: Das Diagramm zeigt die Abnahme des Anteils an **47** in den verschiedenen Puffersystemen über die Dauer von einer Woche.

jedoch kein großes Elektronendefizit auf und bisher ist noch keine Substitution des Chlorids am B-Fragment beobachtet worden. Sie ist daher sehr unwahrscheinlich. Mögliche Reaktionen am sekundären Chlorid des A-Fragments wären eine S_N1 oder eine S_N2 -Reaktion.

Mittels HRMS (Abbildung 3-5) konnte geklärt werden, dass es sich bei **47A** um ein durch Substitution entstandenes Derivat von **47** handelt. Eines der beiden Chloride von **47** wurde durch eine Hydroxyfunktion ersetzt. Hierbei ist eine Substitution des aromatischen Chlorids am Fragment B auszuschließen, welche als nukleophile aromatische Substitution (S_NAr) möglich wäre. Sie läuft allerdings bevorzugt an elektronenarmen Aromaten ab. Der Aromat des B-Fragments weist



HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$m \cdot z^{-1}$] = 804.33832 [$C_{41}H_{55}Cl_2N_3O_9 + H^+$] **47**

berechnet [$m \cdot z^{-1}$] = 804.33881 [$C_{41}H_{55}Cl_2N_3O_9 + H^+$] **47**

experimentell [$m \cdot z^{-1}$] = 786.37286 [$C_{41}H_{56}ClN_3O_{10} + H^+$] **47A**

berechnet [$m \cdot z^{-1}$] = 786.37270 [$C_{41}H_{56}ClN_3O_{10} + H^+$] **47A**

Abbildung 3-5: Struktur von **47** und dessen Substitutionsprodukt **47A** mit den zugehörigen Werten der HRMS.

Obwohl eine S_N1 oder S_N2 -Reaktion am Chlorid des A-Fragments bisher noch nicht beobachtet wurde, scheint sie durch eine steigende Kettenlänge des Substituenten an der Hydroxyfunktion des Chlorhydrins **36** begünstigt zu werden. So sind das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) und das

Cryptophycin-55-glycolat (**43**) beide im pH-Bereich von 4 - 8 über die Dauer von einer Woche stabil. Auch in anderen Quellen konnten keine Aussagen über eine Instabilität des Glycinats **39** oder der von ELI LILLY patentieren Cryptophycin-55- γ -aminobuttersäure in wässrigen gepufferten Systemen gefunden werden. ^[102,127] Ebenfalls wurde von ihnen keine spontane Zyklisierung der an das Cryptophycin-55 (**36**) gebundenen γ -Aminobuttersäure beobachtet, wie sie von DEWIT und GILLIES für phenolische γ -Aminobuttersäure publiziert wurde. ^[128] Die analoge Zyklisierung der *N*-Methylaminobuttersäure und anschließende Eliminierung von Cryptophycin-55 (**36**) aus **47** erfolgte genausowenig.

3.2.3.2 Zytotoxizitäten der Cryptophycin-55-Derivate

Für den möglichen Einsatz in ADCs müssen die Wirkstoffe hohe Zytotoxizitätswerte aufweisen, die als IC₅₀-Werte angegeben werden. Sie bezeichnen die Konzentration eines Wirkstoffs, die zur 50%-igen Inhibierung des Zellwachstums *in vitro* führt. Für Cryptophycin-52 (**3**) und Cryptophycin-55 (**36**) liegen diese Werte im picomolaren Bereich (an Zellen der Zelllinien KB-3-1 und KB-V1 bestimmt), was sie zu ADC-geeigneten Wirkstoffen macht. ^[96,129] Es ist daher nötig auch die synthetisierten Cryptophycine **39**, **43** und **47** auf ihre biologische Aktivität zu testen. Hierfür müssen die gleichen Zelllinien wie für **3** und **36** gewählt werden, da nur so vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

Bei der Zelllinie KB-3-1 handelt es sich um humane Gebärmutterhalszellen, die ein Subtyp der HELA-Zellen sind. ^[130] KB-V1-Zellen sind wiederum die mehrfach medikamentenresistenten Subklon-Zellen der KB-3-1-Zellen, welche durch langjährigen Selektionsdruck mit Vinblastin vermehrt das MDR1-Gen exprimieren. ^[129,131]

Die Bestimmung der Zytotoxizitäten der Cryptophycine erfolgt durch MICHALEK nach einem von BOGNER entwickelten Protokoll über Fluoreszenzmessung. Hierbei wird blaues Resazurin zu den Zellen gegeben und nachdem es in die Zellen hineindiffundiert ist, von mitochondrialen Enzymen zum rosafarbenen Resorufin reduziert. Da nur lebendige Zellen in der Lage sind Resazurin zu Resorufin zu reduzieren, kann das Auftreten des fluoreszenten Resorufins in Verhältnis zu abgestorbenen Zellen gesetzt werden. In dem von uns verwendeten Zytotoxizitätsassay ist demnach der IC₅₀-Wert mit der Konzentration gleichzusetzen, bei der 50% des eingesetzten Resazurins umgesetzt wurden, was gleichbedeutend ist mit dem Tod von 50% der verwendeten Zellen. ^[129,132] Um ein Maß für die Aktivitätsabnahme der Substanzen gegenüber mehrfach resistenten Krebszelllinien zu besitzen, wurde der Resistenzfaktor F_R nach unten stehender Gleichung

berechnet. Er ergibt sich aus dem Quotient aus dem IC₅₀-Wert gegenüber einer resistenten Zelllinie zum IC₅₀-Wert gegenüber einer nicht-resistenten Zelllinie.

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

Hierbei kann ein niedriger Resistenzfaktor mit einer geringen Aktivitätsabnahme der Substanz bezogen auf mehrfach-resistente Zellen gleichgesetzt werden. Durch die Öffnung des Epoxids **3** zum Chlorhydrin **36** bleibt zwar die Aktivität (Tabelle 3-1) des Cryptophycins gegenüber nicht-resistenten Zelllinien fast gleich, nimmt aber gegenüber resistenten Zelllinien um ungefähr das 3-fache ab. Dies spiegelt sich auch im höheren Resistenzfaktor von 51.0 wieder. Obwohl für das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) bereits IC₅₀-Werte gegenüber CCRF-CEM-Zellen publiziert sind, und es eine vergleichbare Aktivität wie das Epoxid **3** und das Chlorhydrin **36** aufweist, [75,102] wurden noch keine IC₅₀-Werte gegenüber KB-V1 und KB-3-1 Zellen veröffentlicht. Die im Rahmen dieser Arbeit von MICHALEK ermittelten Werte (IC₅₀ KB-3-1 = 243 pM; IC₅₀ KB-V1 = 11.5 nM) zeigen, dass die Aktivität um das 16-fache (KB-3-1) bzw. 44-fache (KB-V1) gegenüber Cryptophycin-52 (**3**) abnimmt. Der direkte Vergleich des Cryptophycin-55-glycolats (**43**) mit dem Glycinat **39** zeigt, dass der Austausch der Aminofunktion durch eine Hydroxyfunktion zu einer Verschlechterung der Aktivität um das 2-fache (KB-3-1) bzw. um das 3-fache (KB-V1) führt. Dadurch erhöht sich auch der Resistenzfaktor um 41.7. Hydrolyse des Glycinatesters **39** durch Esterasen im Plasma von Mäusen, Hunden und Menschen führt direkt zum Chlorhydrin **36** und dadurch auch zum Epoxid **3**. [102] Das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) wird daher auch als *Prodrug* von Cryptophycin-52 (**3**) gesehen. Vermutlich könnte auch das Cryptophycin-55-glycolat (**39**) durch Esterasen hydrolysiert werden und damit als *Prodrug* zum Epoxid **3** agieren. Eine Überprüfung dieser These wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Die Bestimmung der biologischen Aktivität von **47** gegenüber den beiden verwendeten Zelllinien konnte nicht durchgeführt werden, da das Cryptophycin schon während der Zeitspanne des Tests zu **47A** hydrolysierte.

Tabelle 3-1: Aktivitäten der synthetisierten Cryptophycine **39**, **43** und **47** gegenüber zwei humanen Zelllinien sowie deren Resistenzfaktoren im Vergleich zu Cryptophycin-52 (**3**) und Cryptophycin-55 (**36**). (* = entnommen aus [96]; † = experimentell bestimmt von MICHALEK)

Verbindung	IC ₅₀ (KB-3-1)	IC ₅₀ (KB-V1)	F _R
3	15.5 pM*	0.26 nM*	16.7
36	14.5 pM†	0.74 nM†	51.0
39	243 pM†	11.5 nM†	47.3
43	420 pM†	37.4 nM†	89.0
47	n. b.	n. b.	-

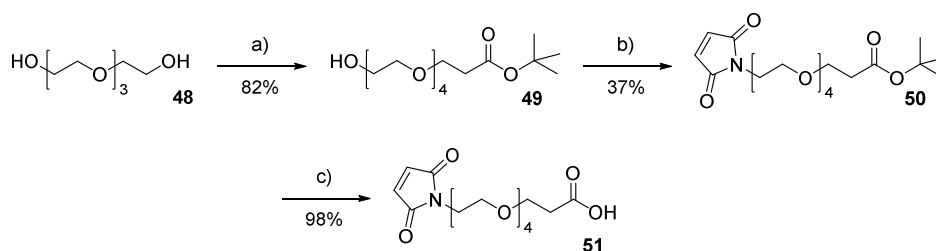
Cryptophycin-55-*N*-methylaminobutyrat (**47**) wurde als *Prodrug* konzipiert und beruht auf dem Ziel, dass die *N*-Methylaminobuttersäure sich später, noch bevor eine Substitution des Chlorids zu **47A** stattfinden würde, durch Zyklisierung selbst eliminiert. Dadurch würde das Chlorhydrin **36** wieder freigesetzt werden. **47** kann daher, genauso wie **39** und **43**, als *Prodrug* des Chlorhydrins **36** und des Epoxids **3** gesehen werden.

3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

Alle Linker setzen sich aus drei verschiedenen Teilen zusammen. Dabei handelt es sich um den PEG-Teil, den enzymatisch-spaltbaren Teil und das selbst-eliminiierende Fragment. Der PEG-Teil beruht in allen Linkersystemen auf dem Tetraethylenglykol (**48**). Dieses ist auf beiden Seiten unterschiedlich substituiert. Auf der einen Seite ist eine Carboxyfunktion für die Konjugation an den enzymatisch-spaltbaren Teil. Die andere Seite ist mit einem Maleimid-Rest zur Konjugation an den Antikörper ausgestattet.

Die Synthese des PEG-Linkers (Schema 3-9) geht vom Tetraethylenglykol (**48**) aus und folgt einer Route von WARNECKE.^[133] Dieser synthetisierte während seiner Promotion mehrere Maleinimid-funktionalisierte PEG-Linker zur Synthese wasserlöslicher Derivate klinisch etablierter Zytostatika. Zur Einführung des Maleinimids orientierte er sich dabei an WALKER, der die MITSUNOBU-Reaktion^[134] erstmalig auf Maleinimide anwendete^[135] und auch optimierte^[136]. Zuerst wurde das Glykol **48** in einer unsymmetrischen Alkylierung in die geschützte hydroxy-funktionalisierte Carbonsäure **49** überführt. Hierfür wurde laut WARNECKE als basischer Katalysator Kalium-*tert*-butylat für die Kettenverlängerung mit *tert*-Butylacrylat gewählt.^[133] Allerdings war die Ausbeute dieser Reaktion nicht zufriedenstellend, weshalb in einem zweiten Versuch elementares Natrium als Basenkatalysator verwendet wurde. Die so erhaltene Ausbeute von 82% ist mit der Literaturausbeute (Lit.: 86% für Triethylenglykol) vergleichbar.^[137] Die geschützte hydroxy-funktionalisierte Carbonsäure **49** wurde weiterhin in einer MITSUNOBU-Reaktion mit Maleinimid zur *tert*-Butyl-geschützten Säure **50** umgesetzt.^[133] Die mäßige Ausbeute von 36% in der MITSUNOBU-Reaktion, welche schon nach für erfolglose MITSUNOBU-Reaktionen optimierten Bedingungen^[136] durchgeführt wurde, konnte trotz mehrfacher Optimierungsversuche bezüglich der Reaktionszeit, Ersetzen des DIAD durch DEAD, Entfernen des *neo*-Pentanol aus der Reaktion oder einer Variation in der Reaktionstemperatur nicht verbessert werden. Im nächsten Schritt wurde die *tert*-Butyl-geschützte Carbonsäure **50** mit TFA zu der freien Carbonsäure **51** entschützt, wobei die im Überschuss eingesetzte Trifluoressigsäure durch das anschließende Rühren über dem schwach basischen Ionenaustauscher Amberlyst A-21® vollständig entfernt werden konnte.

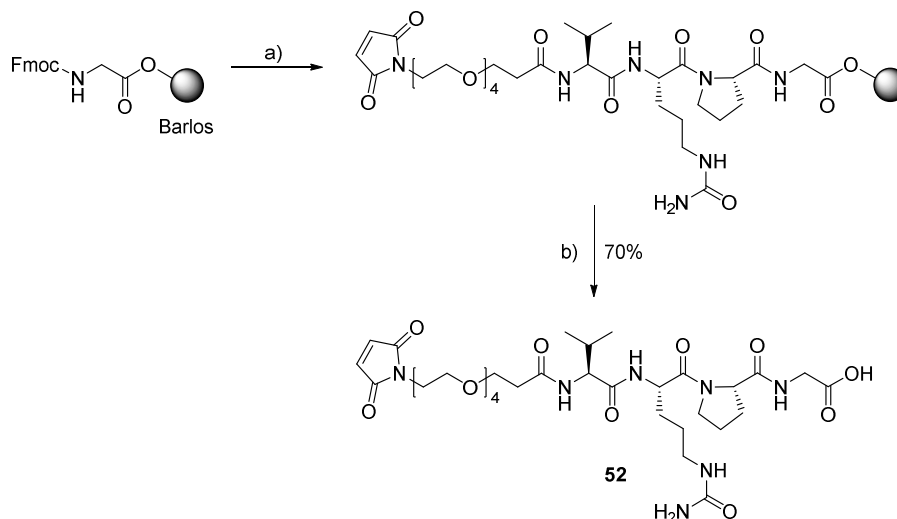
3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate



Schema 3-9: Synthese des Maleimid-funktionalisierten PEG-Linkers **51**. a) Na, *tert*-Butylacrylat, abs. THF, RT, ü. N.; b) PPh₃, DIAD, Maleimid, *neo*-Pentanol, abs. THF, RT, 21 h; c) 1. TFA, abs. DCM, RT, 1 h, 2. Amberlyst A-21, DCM, RT, 1 h.

3.3.1 Festphasensynthese des Tetrapeptid-Linkers

Für den aus einem Tetrapeptid bestehenden Linker eignet sich die Festphasensynthese nach MERRIFIELD am besten.^[108] Sie wurde mit der Immobilisierung der Fmoc-geschützten Aminosäure Glycin begonnen. Als polymerer Träger wurde das säurelabile Barlos-Harz verwendet. Es enthält einen sterisch anspruchsvollen Chlortrityl-Linker, wodurch die Bildung von Diketopiperazinen während der Festphasensynthese verhindert wird. Daher sind Trityl-basierte Harze für Glycin und Prolin als C-terminale Aminosäuren geeignet.^[138]



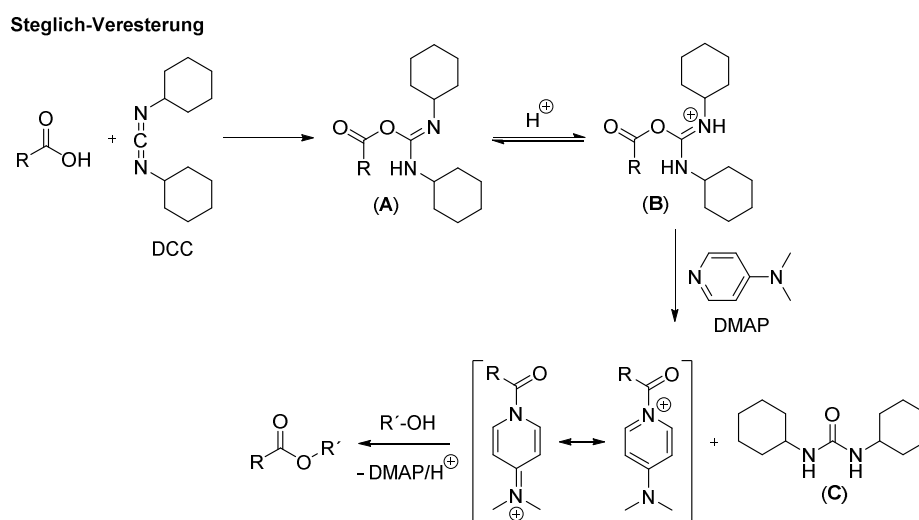
Schema 3-10: Schema der Festphasenpeptidsynthese des Tetrapeptid-Linkers. a) 1. Piperidin/DMF 1:4; 2. Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**51**, TBTU, HOBT·H₂O, DIPEA, DMF; b) 1% TFA in DCM.

Auch ist die vollständige Peptidsequenz mit einer 1%-igen TFA-Lösung in Dichlormethan leicht vom Harz abspaltbar, was weder die Seitenkette des Citrullins, noch die Maleimidgruppe des PEG-Linkers zerstört. Nach der Harzbeladung mit Fmoc-Glycin wurde der Beladungsgrad UV-Vis-spektroskopisch bestimmt und nachfolgend die Fmoc-Schutzgruppe mit einer 20%-igen Lösung aus Piperidin in DMF abgespalten. Danach wurden alle weiteren Aminosäuren, beziehungsweise der

PEG-Linker, angekuppelt. Als Kupplungsreagenzien wurden TBTU und HOBt·H₂O, mit Zusatz der Base Diethylamin verwendet. Auf diese Weise konnte der Tetrapeptid-Linker **52** (siehe Schema 3-10) erfolgreich mit einer guten Ausbeute von 70% hergestellt werden.

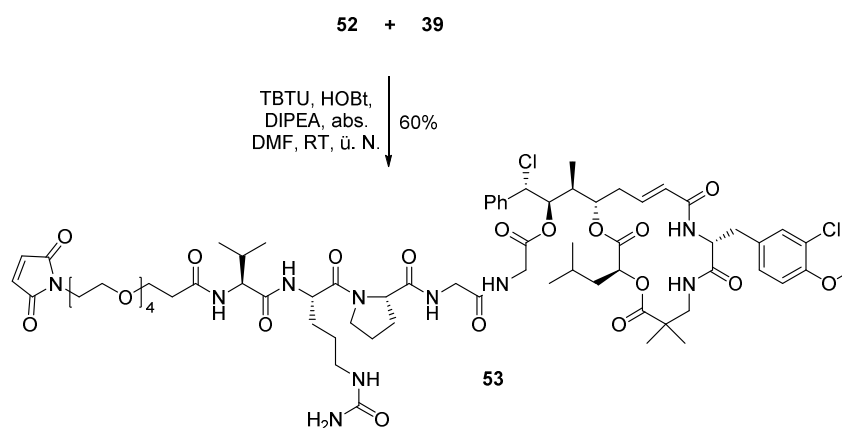
3.3.2 Synthese des Tetrapeptid-Linker-Cryptophycin-Konjugats

Da die Reaktion von Maleimid-Resten mit Thiol-Funktionen von Cysteinen im Allgemeinen schnell und mit guten Ausbeuten durchzuführen ist, sollte der Tetrapeptid-Linker **52** zuerst mit dem Cryptophycin-55 (**36**) umgesetzt werden. Am vorteilhaftesten wäre hierfür die STEGLICH-Veresterung (Schema 3-11) geeignet, die auch schon bei der Synthese der Cryptophycin-Derivate **39**, **43** und **47** verwendet wurde und zu guten Ausbeuten führte. Sie beruht auf dem Einsatz von DCC, welches mit der Carbonsäure zu einem *O*-Acylisoharnstoff (**A**) reagiert. Da die nachfolgende Reaktion mit einem Alkohol allerdings nur sehr langsam zum korrespondierenden Ester abläuft und zu unerwünschten Nebenprodukten führen kann, wird DMAP als Katalysator eingesetzt.^[139] Es ist verglichen mit dem Alkohol das stärkere Nukleophil und bildet mit dem *O*-Acylisoharnstoff einen Aktivester (**B**), wobei Dicyclohexylharnstoff (**C**) frei wird. Der Aktivester reagiert danach mit dem Alkohol zum erwarteten Ester ab.



Schema 3-11: Mechanismus der STEGLICH-Veresterung.

Eine STEGLICH-Veresterung wurde aber nicht vorgenommen, weil WARNECKE während seiner Synthesen beobachtet hatte, dass beim Einsatz von DMAP das Maleimid zerstört wird und es zu nicht näher beschriebenen Nebenreaktionen kommt.^[133]

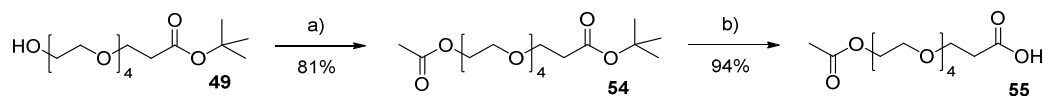


Schema 3-12: Amidierung des Tetrapeptid-Linkers **52** mit Cryptophycin-55-glycinat (**39**).

Es wurde daher ein alternativer Katalysator getestet. Hierbei handelte es sich um Scandium(III)triflat ($\text{Sc}(\text{OTf})_3$), das ein aktiver Acylierungs-Katalysator ist.^[140] In Vorversuchen, die mit dem Tetrapeptid-Linker **52** und dem AB-Fragment **30** als Modellverbindung anstelle des Cryptophycin-55 (**36**) durchgeführt wurden, stellte sich jedoch heraus, dass keine Veresterung stattfand. Weitere Veresterungsmöglichkeiten wurden aufgrund der aufwendigen Synthese und der daher geringen, zur Verfügung stehenden Menge des Linkers **52** nicht mehr getestet. Stattdessen wurde das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) mit TBTU/HOBT aktiviert und mit dem Linker **52** zum Amid **53** umgesetzt. Das Tetrapeptid-Linker-Cryptophycin-Konjugat **53** (Schema 3-12) konnte so mit einer zufriedenstellenden Ausbeute von 60% erhalten werden.

3.3.2.1 Synthese von Modellsubstraten zur Cathepsin B-Spaltung

Weil die Prolin-Glycin-Sequenz bisher noch nicht als selbst-eliminierende Spaltsequenz bekannt ist, sollte die Cathepsin B-vermittelte Spaltung des Tetrapeptid-Linkers **52** untersucht werden. Hierfür würde sich die Verfolgung der Spaltung mittels NMR-Spektroskopie, UV-Vis Spektroskopie oder HPLC eignen. Mit Blick auf das ^1H -NMR-Spektrum des Konjugats **53**, in dem sich viele Signale überlagern, wurde der HPLC jedoch der Vorzug gegeben. Bestenfalls würde in der HPLC zu Anfang nur ein Peak sichtbar sein, der mit der Zeit durch das Zersetzen des Substrats verschwinden würde. Gleichzeitig würden drei weitere Peaks auftauchen, bei denen es sich um die zu erwartenden Spaltprodukte handeln könnte. Von Nachteil des direkten Einsatzes des Tetrapeptid-Linker-Cryptophycin-Konjugats **53** in Untersuchungen zur Spaltung durch Cathepsin B ist die enthaltene freie Maleimid-Funktion. Sie würde mit einem freien Thiol des Cathepsins einen Thioether bilden, wodurch das Enzym deaktiviert werden könnte. Um dies zu verhindern wurde ein chemisch inertes Analogon **55** zum Maleimid-funktionalisierten PEG-Linker **51** synthetisiert. In diesem wurde das Maleimid durch eine inaktive Gruppe, einen Essigsäureester, ersetzt.

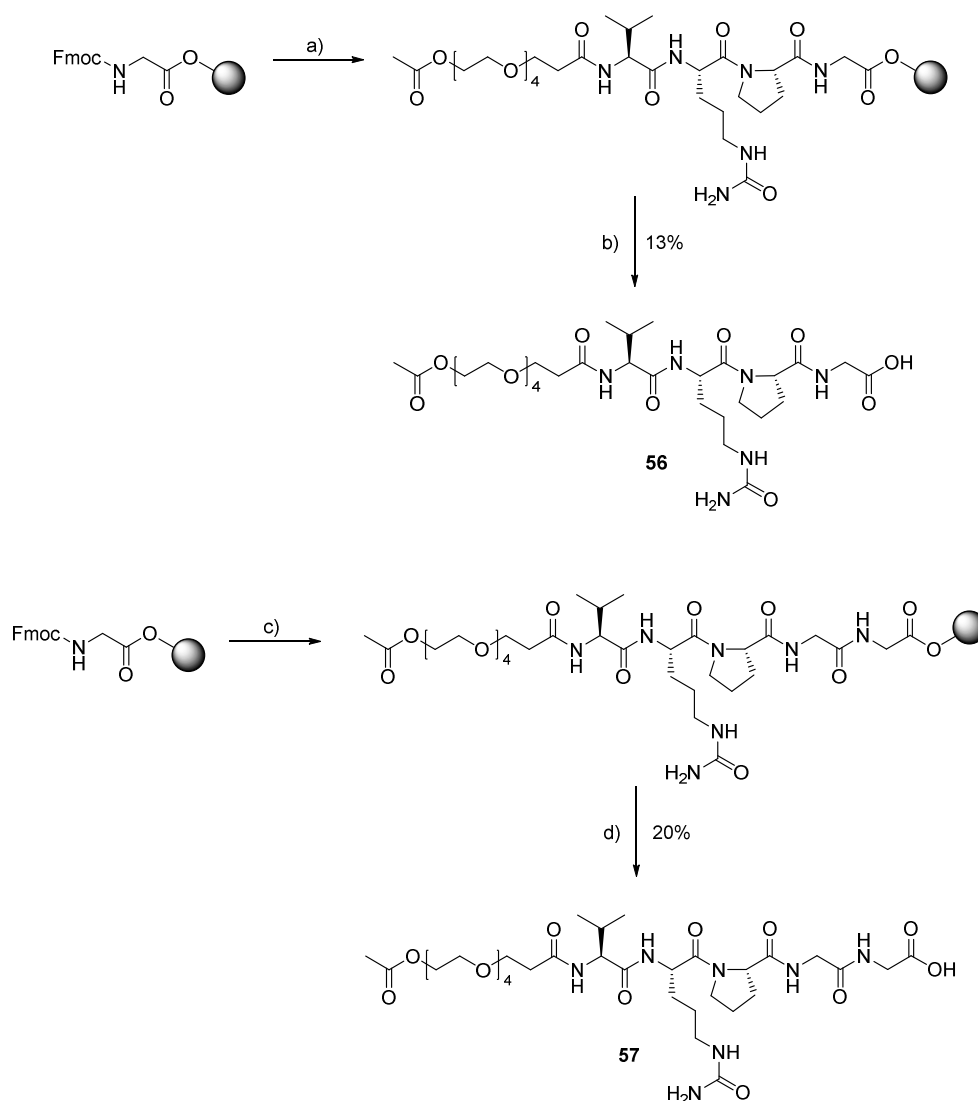


Schema 3-13: Synthese des Acetyl-funktionalisierten PEG-Linkers **55**. a) NEt_3 , Ac_2O , RT, 50 min; b) HCOOH , RT, 22 h.

Die Synthese (siehe Schema 3-13) beruhte auf dem ω -Hydroxyester **49**, der mit Essigsäureanhydrid zu **54** umgesetzt wurde. Selektives Entschützen des *tert*-Butylesters **54** mit Essigsäure in Anlehnung an eine Vorschrift von MIKATA *et al.* ^[141] lieferte die freie Carbonsäure **55** mit einer guten Ausbeute von 94%.

Der Tetrapeptid-Linker wurde im Anschluss wieder an der festen Phase aufgebaut (Schema 3-14). Erneut kam hierbei das Barlos-Harz zum Einsatz, welches zunächst mit Fmoc-Glycin beladen wurde. Danach erfolgte die UV-Vis-spektroskopische Beladungsbestimmung, woran sich die Fmoc-Entschützung und weitere Kuppelung mit den Aminosäuren beziehungsweise dem Acetyl-funktionalisierten PEG-Linker **55** anschlossen.

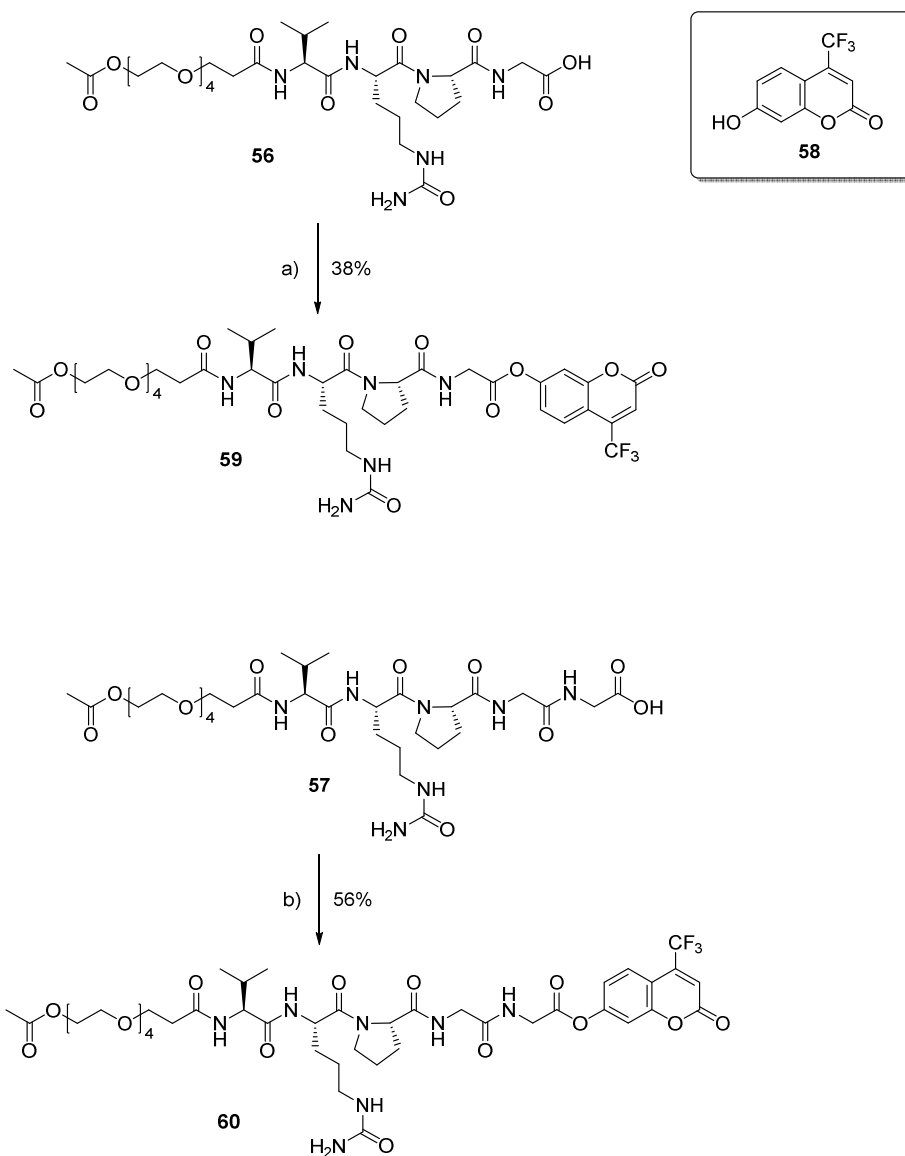
3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate



Schema 3-14: Synthese der Tetrapeptid-Linker für die Farbstoff-Konjugate. a) 1. Piperidin/DMF 1:4; 2. Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**55**, TBTU, HOBT-H₂O, DIPEA, DMF; b) 1% TFA in DCM; c) 1. Piperidin/DMF 1:4; 2. Fmoc-Gly/Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**55**, TBTU, HOBT-H₂O, DIPEA, DMF; d) 1% TFA in DCM.

Auf diese Weise wurde auch der Pentapeptid-Linker **57** synthetisiert. Er stellt durch die zusätzliche Aminosäure Glycin das eigentliche Analogon des Linkers zu Konjugat **53** dar. Da Cryptophycine sehr teuer und nur über langwierige Synthese (siehe 3.2 Synthese der Cryptophycin-55-Derivate) zugänglich sind, wurde das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) gegen einen Farbstoff ausgetauscht. Hierfür wurde der Farbstoff 7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)cumarin (**58**) gewählt. Er besitzt eine freie Hydroxy-Funktion, durch die es möglich ist die Esterbindung zwischen Cryptophycin-55 (**36**) und Glycin im Cryptophycin-Konjugat **39** zu simulieren. Gleichzeitig verändert sich auch seine Fluoreszenz durch Veresterung der beiden Linker mit der Hydroxyfunktion von Cumarin **58**, was photospektrometrisch verfolgbar ist. ^[142] Durch Veresterung der beiden Linker **56** und **57** unter STEGLICH-Bedingungen mit dem Farbstoff **58** waren die Linker-Farbstoff-Konjugate **59** und **60** leicht zugänglich. Obwohl die Ausbeuten von 38% und 56% nicht zufriedenstellend waren, wurde

auf eine Optimierung der Reaktion verzichtet, da die Masse der erhaltenen Linker-Farbstoff-Konjugate **59** und **60** für die nachfolgenden Spaltungstests ausreichend war.



Schema 3-15: Synthese der Linker-Farbstoff-Konjugate. a) **58**, DCC, DMAP, abs. DMF, RT, ü. N.; b) **58**, DCC, DMAP, abs. DMF, RT, ü. N.

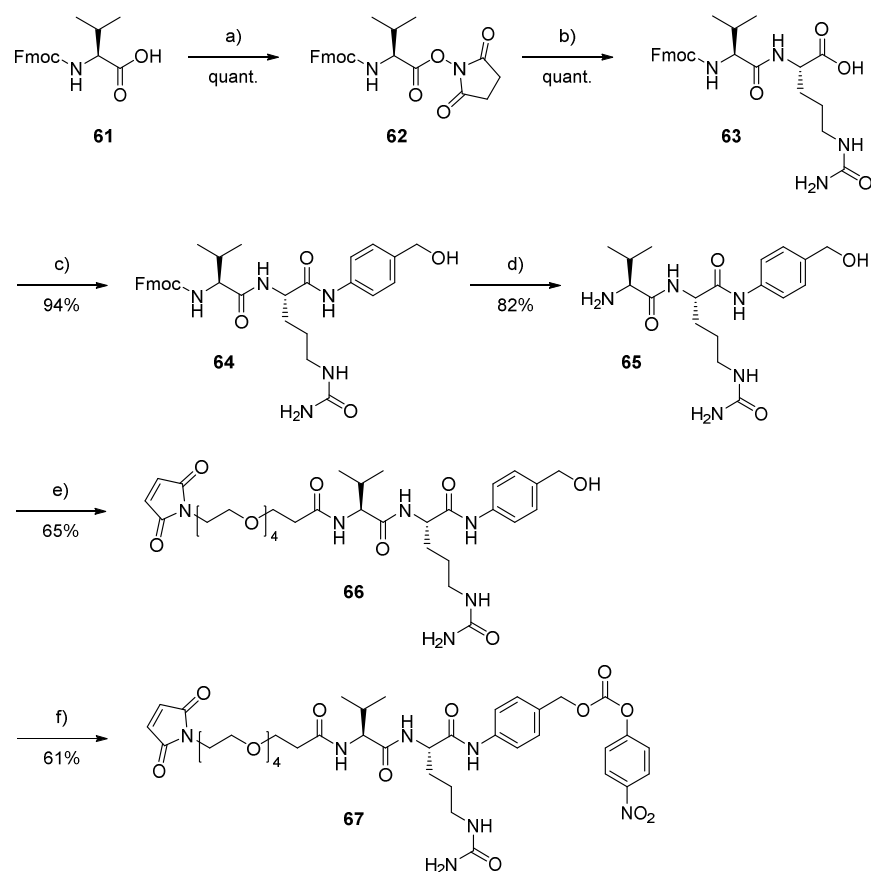
Die Identitäten der beiden Linker-Farbstoff-Konjugate konnten durch NMR-Spektroskopie und hochauflösende Masse eindeutig bestätigt werden.

3.3.2.2 Spaltungsversuche mit Cathepsin B

Bedingt durch das Substituieren des Cryptophycins durch den Farbstoff konnte die Spaltung durch Cathepsin B, anders als eigentlich gewollt, mittels UV-Vis Spektroskopie verfolgt werden. Dieser Methode wurde der Vorzug gegeben, weil es durch den Einsatz des Farbstoffs möglich war, die Spaltung über mehrere Stunden kontinuierlich durch Aufzeichnen der Fluoreszenz zu verfolgen. Dazu wurde ein Protokoll von SIGMA-ALDRICH gewählt, ^[143] das zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Cathepsin B verwendet wird. Dessen Modellsubstrat Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcumarin wird darin in einer Pufferlösung bei einem pH-Wert von 6.0 mit dem Enzym versetzt und die Freisetzung des Farbstoffs 7-Amino-4-methylcumarin fluorometrisch verfolgt. Die gleichen Bedingungen wurden auch auf die Linker-Farbstoff-Konjugate **59** und **60** angewandt. Dabei stellte sich heraus, dass schon in den Blank-Proben (ohne Zusatz von Cathepsin B) der freie Farbstoff gebildet wird. Grund hierfür ist scheinbar eine Umesterung des Linker-Teils mit dem zur Emulgierung des Cathepsin B verwendeten Polyethylenglykolethers Brij® 35. Dies wird gestützt durch das einzelne Entfernen anderer Reaktionslösungs-Bestandteile (L-Cystein-Lösung, Cathepsin B-Lösung und Puffer-Lösung). Daher wurde entschieden die Spaltungsversuche mit den Linker-Farbstoff-Konjugaten nicht mehr weiter zu verfolgen sondern die Spaltung an einem finalen Linker-Cryptophycin-Konjugat zu untersuchen.

3.3.3 Synthese des PABA-basierten Linkersystems

Das auf PABA-basierende Linkersystem wurde nach den Vorschriften von FIRESTONE und DUBOWCHIK synthetisiert. ^[109] Hierfür wurde zunächst Fmoc-L-Valin (**61**) mit NHS zum *N*-Hydroxysuccinimidester **62** aktiviert, was in quantitativer Ausbeute gelang. Vorteil der Säureaktivierung des Valins als NHS-Ester gegenüber anderen Möglichkeiten ist, dass der NHS-Ester besser wasserlöslich ist und daher in der Folgereaktion mit dem ungeschützten L-Citrullin im wässrigen Medium umgesetzt werden kann. Gleichzeitig kann auch die Razemisierungsneigung der nachfolgenden Peptidsynthese unterdrückt werden, die zu einer unerwünschten Epimerisierung am stereogenen Zentrum des L-Valins führen würde. ^[144] Das entstandene Fmoc-geschützte Dipeptid **63** wird mit EEDQ aktiviert und das daraus folgende gemischte Anhydrid als aktives Acylübertragungs-Reagens mit PABA umgesetzt. Dies ist in einer Ein-Topf-Reaktion möglich und gelingt dank der größeren Nucleophilie der benzylischen Aminofunktion gegenüber der Hydroxyfunktion des PABA in einer guten Ausbeute von 94%.



Schema 3-16: Synthese des PABA-basierten Linkersystems. a) NHS, DCC, abs. THF, 0°C → RT, 20 h; b) L-Cit, NaHCO₃, DME/THF/H₂O, RT, 21 h; c) PABA, EEDQ, DCM/MeOH, RT, 23 h; d) Diethylamin, NMP, RT, ü. N.; e) **51**, HATU, HOAt, DIPEA, DMF, RT, 2 h; f) Bis-NPC, DIPEA, abs. DMF, RT, 3 h.

Im Anschluss wird die Aminofunktion des quasi-Tripeptids **64** mit Diethylamin Fmoc-entschützt. Die Reaktion wird in NMP durchgeführt, welches nach Verschwinden des Eduktpots auf der DC unter vermindertem Druck entfernt wird. Das freie Amin **65** lässt sich in hinreichender Reinheit mit DCM aus dem Rückstand ausfällen. Vor der Synthese des aktivierten Carbonats des Aminobenzylalkohols mit Bis(4-nitrophenyl)carbonat (Bis-NPC) muss zunächst die freie Aminofunktion von **65** derivatisiert werden. Dies geschieht durch direktes Umsetzen des Amins **65** mit dem Maleimid-funktionalisierten PEG-Linker **51**. Als Kupplungsreagenzien werden HATU und HOAt verwendet, wodurch die Reaktion schon nach zwei Stunden Reaktionszeit aufgearbeitet werden konnte. Das Maleimid-PEG-Val-Cit-PABA-Fragment **66** wurde in einer zufriedenstellenden Ausbeute von 61% erhalten. Der Versuch, den Benzylalkohol **66** in Anlehnung an FIRESTONE und DUBOWCHIK^[109] mit NPC zu aktivieren scheiterte. Daher wurde ein alternativer Ansatz, der die Aktivierung mit Bis-NPC verfolgt^[145], durchgeführt. Carbonat **67** konnte so in einer akzeptablen Ausbeute von 61% isoliert werden.

3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

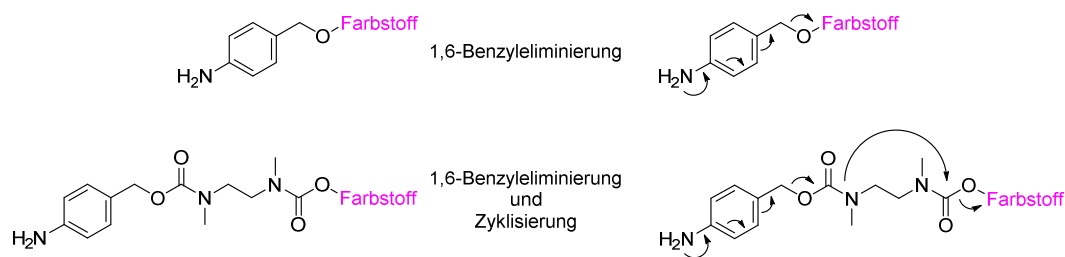
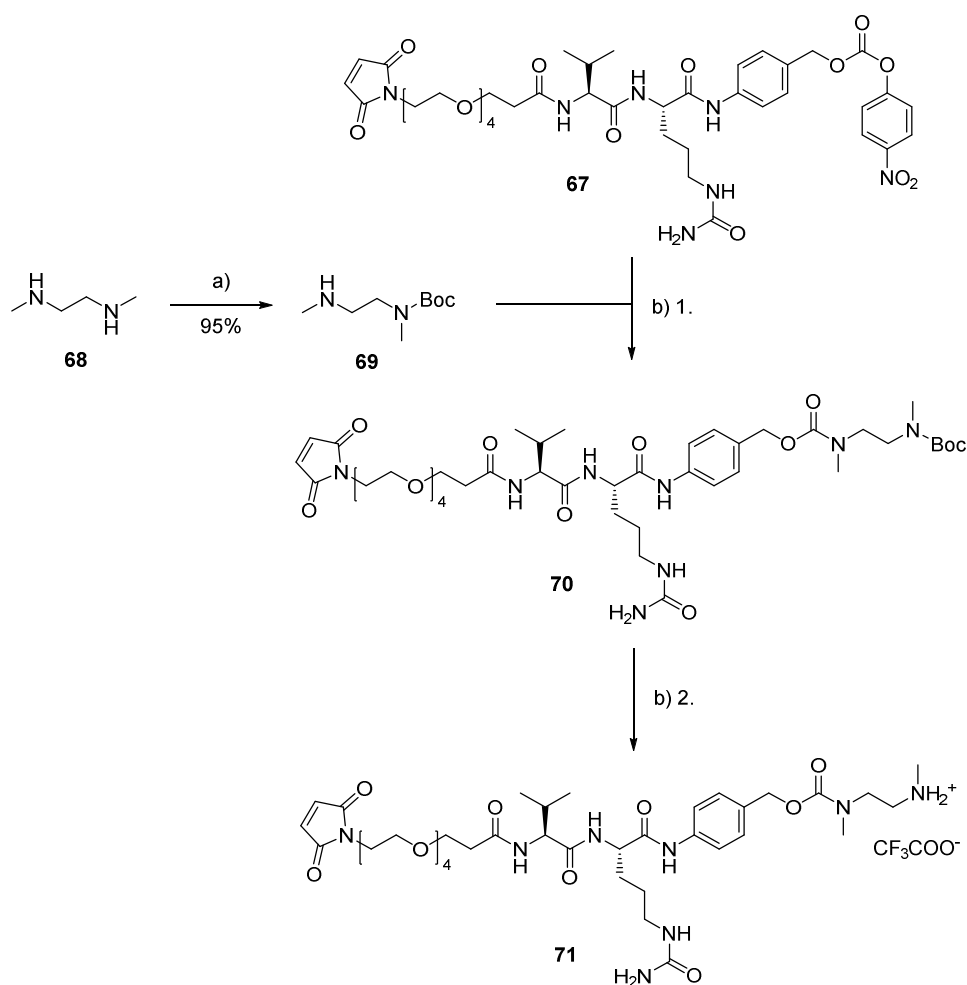


Abbildung 3-6: Selbsteliminierungskaskade des PABA-Spacers und des PABA-Spacers in Kombination mit einem Diamin.

In einer Vergleichsstudie verschiedener selbst-eliminierender Linker (vgl. Abbildung 3-6) wurde festgestellt, dass die Eliminierung der Linkersequenz bestehend aus einem *p*-Aminobenzylalkohol und einem *N,N'*-Dimethylethylenediamin-Linker, die über eine Carbamatfunktion verbunden sind, schneller ist als die Eliminierung des PABA-Spacers allein.^[106] Daher sollte diese Kombination auch für die Cryptophycin-Freisetzung getestet werden. Hierfür wurde *N,N'*-Dimethylethylenediamin (**68**) zunächst an einer Aminofunktion mit der Boc-Schutzgruppe geschützt (Schema 3-17). Dies wurde in Anlehnung an Vorschriften von SAARI *et al.*^[146] und KLEEMANN *et al.*^[147] mit einem Drittel Äquivalent Boc-Anhydrid in THF durchgeführt und gelang mit einer guten Ausbeute von 95%. In der Folgereaktion wurde **69** direkt mit dem aktivierten **67** zur Reaktion gebracht. Der entstandene Boc-geschützte Linker **70** wurde nicht isoliert sondern direkt mit TFA zum freien Amin **71** entschützt.



Schema 3-17: Verknüpfung des Maleimid-PEG-Val-Cit-PAB-Fragments **65** mit dem selbst-eliminierenden Diamin **69**. a) Boc_2O , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18 h; b) 1. DIPEA, abs. DMF, RT, 18 h, 2. TFA, DCM, RT, 2 h.

Die so vorbereiteten Linker-Fragmente **67** und **71** wurden dann im Folgenden weiter mit den Cryptophycin-Derivaten verknüpft.

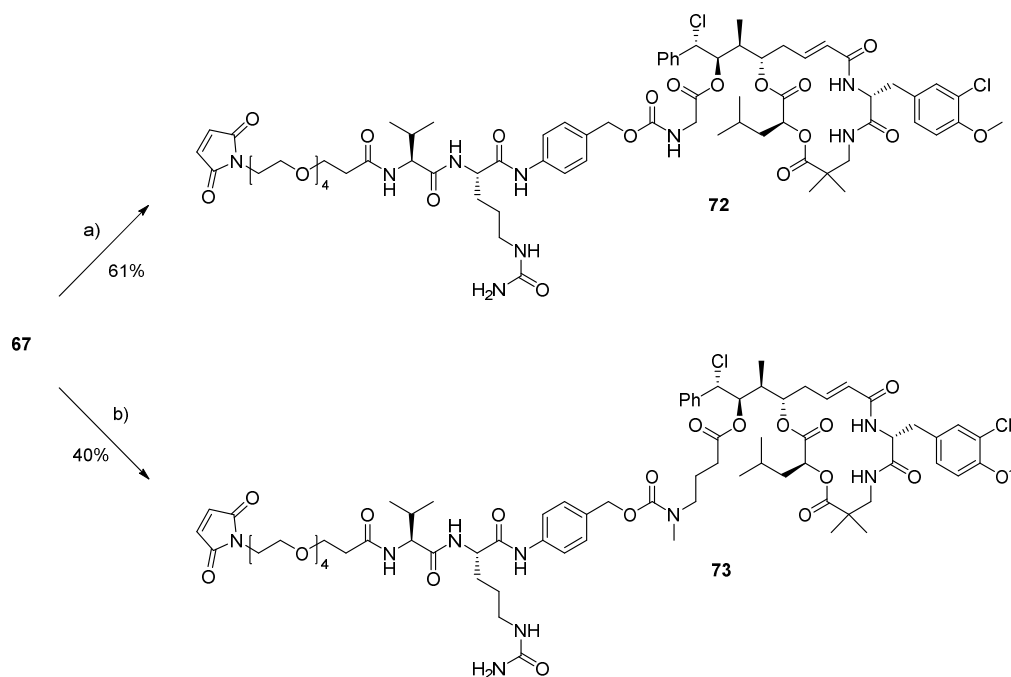
3.3.4 Synthese der PABA-Linker-Cryptophycin-Konjugate

Durch die beiden Linker-Fragmente **67** und **71** ergibt sich die Möglichkeit ein Hydroxy-funktionalisiertes Cryptophycin oder ein Amino-funktionalisiertes Cryptophycin zu verwenden. Optimal für den Linker **67**, welcher ein endständiges PABA für die Konjugation an den Wirkstoff aufweist, ist eine Verbrückung über ein Carbamat.^[53] Diese haben den Vorteil, dass sie stabiler sind als Ester- und Carbonatbindungen. Eine Ausnahme bildet hierbei das Paclitaxel, dessen Carbonatbindung zu einem auf *p*-Aminobenzylalkohol basierenden Linker vergleichbar stabil ist wie dessen Carbamatbindung zu einem auf substituierten Ethylendiaminen beruhenden Linker. Als

3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

Grund hierfür wird jedoch eine Schützung des Carbonats durch den verwendeten Tetrapeptid-Linker gegenüber Esterasen vermutet. [65]

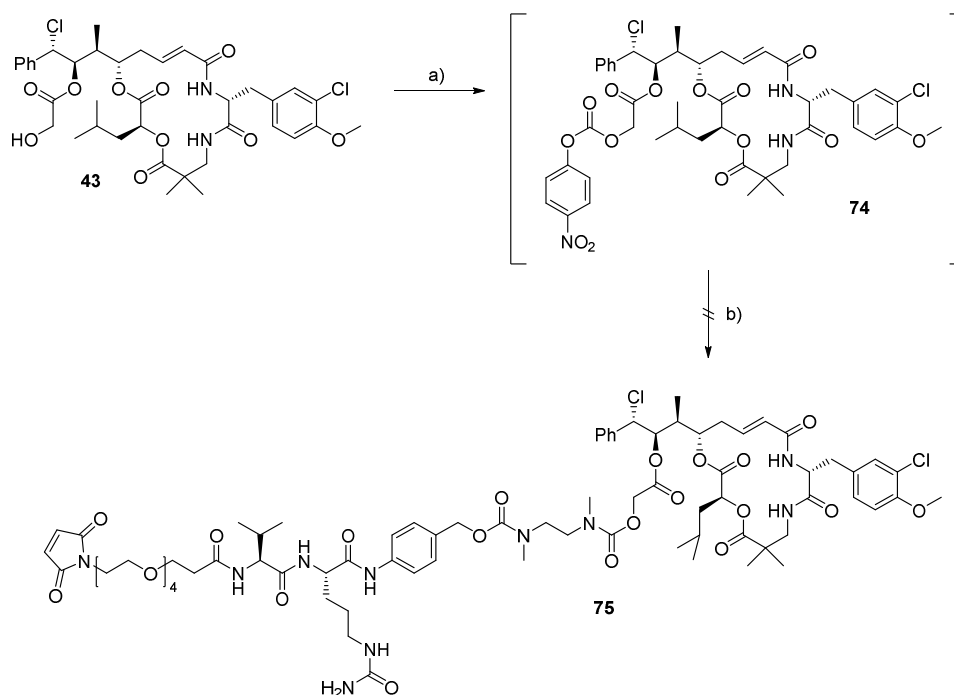
Die beiden Amino-funktionalisierten Cryptophycine **39** und **47** wurden daher mit dem aktivierten PABA-Linker **67** verknüpft (Schema 3-18).



Schema 3-18: Verknüpfung des PABA-funktionalisierten Linkers **67** mit den Amino-funktionalisierten Cryptophycin-Derivaten **39** und **47**. a) **39**, DIPEA, abs. DMF, RT, 3 h; b) **47**, DIPEA, abs. DMF, RT, ü. N.

Hierfür wurden die Amine **39** und **47** durch DIPEA aktiviert und greifen das Carbonat **67** nucleophil an. Nach Reinigung durch präparative HPLC konnten die beiden Carbamate **72** und **73** in Ausbeuten von 40 und 61% erhalten werden.

Durch die Verlängerung der selbst-eliminierenden Sequenz des PABA-Linkers **67** zum PABA-Dimethylethylendiamin-Linker **71** ist auch die Verwendung eines Hydroxy-funktionalisierten Cryptophycins möglich. Hierfür würden sich das Cryptophycin-55 (**36**) und das Cryptophycin-55-glycolat (**43**) eignen. Beide müssten jedoch als Carbonat aktiviert werden, um sie über ein Carbamat an den Linker **71** binden zu können. Die Aktivierung des Cryptophycin-55 (**36**) mit NPC verlief schon bei WEISS erfolglos. [96] Daher wurde sie auch in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.



Schema 3-19: Verknüpfung des Dimethylethylendiamin-Linkers **71** mit dem Cryptophycin-55-glycolat (**43**). a) Bis-NPC, DIPEA, abs. DMF, RT, 24 h; b) **71**, DIPEA, abs. DMF, RT, ü. N.

Stattdessen wurde versucht das Cryptophycin-55-glycolat (**43**) mit Bis-NPC (Schema 3-19) in das Carbonat **74** zu überführen. *In situ* sollte es dann mit dem Diamin-Linker **71** umgesetzt werden, was jedoch misslang. Weitere Optimierungsversuche wurden nicht durchgeführt.

3.3.5 Stabilitätsassays

Die Stabilität der ADCs ist eine wichtige Voraussetzung für ihren Einsatz *in vivo*. Sie dürfen den Wirkstoff nicht vor Erreichen ihres Bestimmungsortes freisetzen, da sonst die Gefahr von ungewollten Nebenwirkungen besteht. Ein wichtiges Kriterium, das bei der Formulierung eines Chemotherapeutikums beachtet werden muss ist der Weg, auf dem es später in den Körper aufgenommen werden soll. Sowohl Adcetris[®] [148] und Kadcylla[®] [149], als auch die meisten anderen Chemotherapeutika werden intravenös appliziert, da sie oral nur schlecht verfügbar sind. Zusätzlich können so auch kleine Metastasen oder einzelne verstreute Krebszellen erreicht und unschädlich gemacht werden. Weil dieser Ansatz nicht nur auf einen bestimmten Tumor beschränkt ist, wird er als systemisch bezeichnet. [150] Der regionale Therapieansatz hingegen ist nur auf eine Körperregion beziehungsweise ein Organ beschränkt. Hierbei wird das Zytostatikum der den Tumor oder die Tumorregion versorgenden Arterie injiziert. So kann eine größere Menge des Wirkstoffs schon im Gewebe durch den Tumor aufgenommen werden. Dieser Ansatz ermöglicht die Administration relativ hoher Chemotherapeutikamengen, da durch die direkt im Anschluss erfolgende

Chemofiltration des Blutes des Patienten das überschüssige Medikament entfernt werden kann. ^[151] Weitere Ansätze sind die Gabe von Zytostatika als Tablette oder Salbe. Bei der oralen Zufuhr ist es jedoch von Nachteil, dass die Wirkstoffe den Magen passieren müssen und die Wahrscheinlichkeit einer Zersetzung, unter Anderem aufgrund des niedrigen pH-Wertes, dort sehr hoch ist. Um dies zu umgehen können Vorstufen dieser Wirkstoffe eingesetzt werden, welche erst in der Leber in den eigentlichen Wirkstoff umgewandelt werden. Ein weiterer Nachteil ist die Dosierung. Im Vergleich zu einer Infusion sind orale Chemotherapeutika nur schwer dosierbar, da die Schnelligkeit mit der diese Substanz vom Körper aufgenommen wird vom individuellen Stoffwechsel der Patienten abhängig ist. Salben wirken nur oberflächlich und werden daher hauptsächlich bei kleinen Hauttumoren oder Metastasen angewendet. ^[150]

Die synthetisierten Linker-Cryptophycin-Konjugate wurden bei drei verschiedenen pH-Werten auf ihre Stabilität getestet. Es sollten so die Bedingungen simuliert werden, auf die ein ADC treffen würde, welches intravenös appliziert und anschließend endozytotisch in die Tumorzelle aufgenommen wird. Hierfür wurde der physiologische pH-Wert des Blutes (pH = 7.4), der eventuell mögliche pH-Wert beim Vorliegen einer Alkalose (pH = 8), sowie ein relativ saurer pH-Wert (pH = 4), wie er in den Lysosomen zu finden ist, mit Puffersystemen nachgestellt. Die Zersetzung der Substanzen **53**, **72** und **73** bei Raumtemperatur wurde über die Dauer von einer Woche durch analytische HPLC verfolgt.

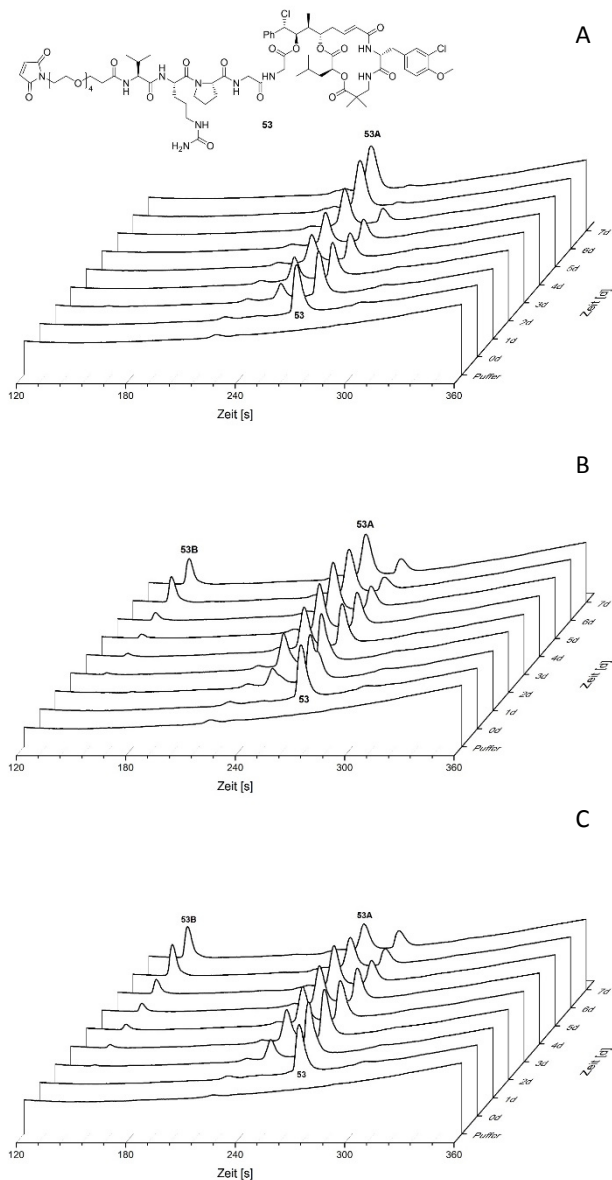


Abbildung 3-7: HPLC-Chromatogramme von **53**, inkubiert bei (A) pH = 4, (B) pH = 7.4 und (C) pH = 8, gemessen bei 220 nm über die Dauer von 1 Woche. Der Bereich von 2 – 6 Minuten wurde vergrößert dargestellt, da sich nur dort relevante Signale befanden.

Bei einem pH-Wert von 8 ist ebenfalls eine Zersetzung von **53** zu beobachten (Abbildung 3-7 C). Die neu entstandenen Substanzen werden, aufgrund ihrer Retentionszeiten, wieder als **53A** und **53B**, bezeichnet. Der Versuch die Signale auf der analytischen HPLC zu trennen und einzeln auf ihre Massen zu untersuchen scheiterte aufgrund zu geringer Konzentrationen, ebenso konnte die Analyse der Proben via LC/MS in der Massenspektrometrieabteilung in Bielefeld an einem ZQ 2000 von WATERS, vermutlich wegen unzureichender Sensitivität, keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern. Mit Hilfe von PETRAS aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. SÜSSMUTH in Berlin gelang es, die Proben an einem HPLC 1200 high pressure System der Firma AGILENT, welches mit einem Orbitrap XL FTMS von THERMO SCIENTIFIC verbunden war, zu vermessen. Da sie alle drei

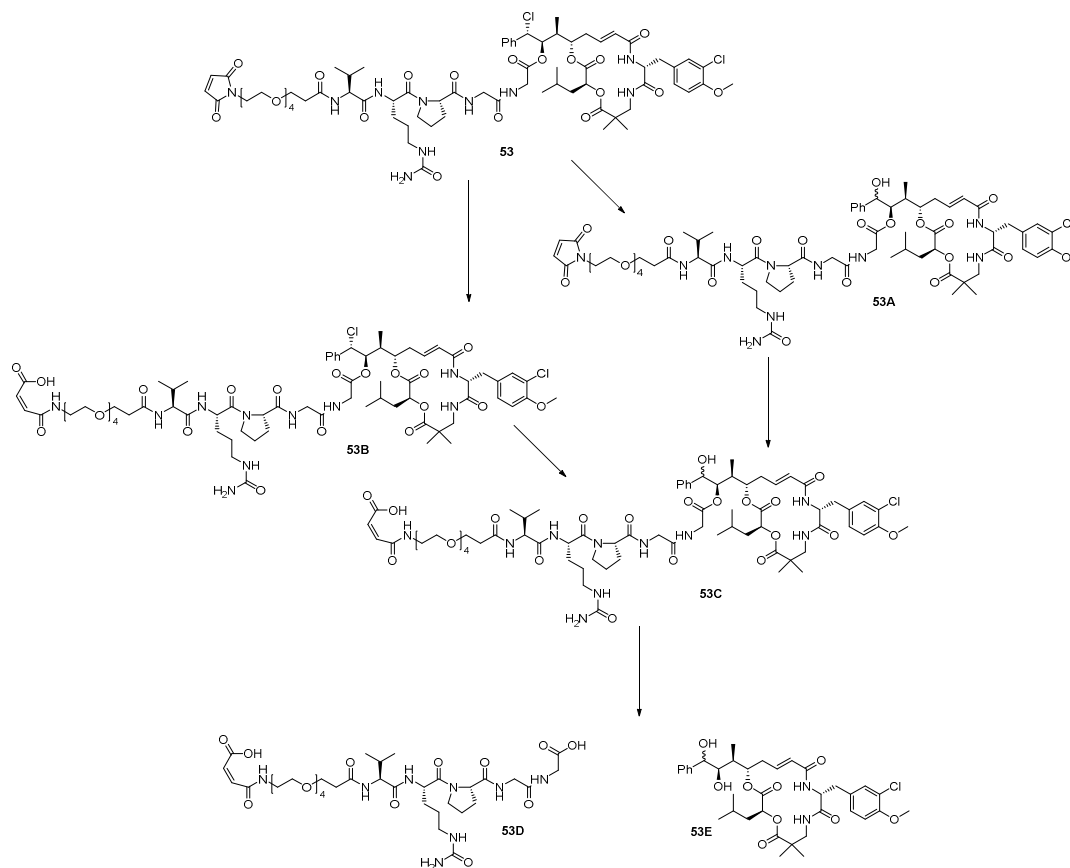
Bei einem pH-Wert von 4 (siehe Abbildung 3-7 A) zeigt sich für die auf einem Tetrapeptid beruhende Verbindung **53**, dass sie nach 7 Tagen bereits vollständig zu einer anderen Substanz (hier **53A** genannt) umgesetzt wurde. Diese neue Substanz muss aufgrund ihrer geringeren Retentionszeit von 4.03 min im Vergleich zu vorher 4.35 min polarer geworden sein.

Inkubation des Linker-Cryptophycin-Konjugats **53** über die Dauer von einer Woche bei physiologischem pH-Wert von 7.4 zeigte, dass nicht nur eine weitere Substanz entstand, sondern gleich zwei (Abbildung 3-7 B). Die Retentionszeit der zweiten neu entstandenen Substanz **53B** liegt bei 2.37 min, was beweist, dass diese noch polarer ist als **53**. Durch Übereinanderlegen der Chromatogramme kann gefolgert werden, dass es sich bei der anderen neu entstanden Substanz ebenfalls um **53A** handelt, da beide Retentionszeiten identisch sind.

Substanzen (**53**, **53A** und **53B**) nebeneinander aufweist und beruhend auf einer Übereinstimmung der Retentionszeiten der neu entstandenen Substanzen bei allen verwendeten pH-Werten, wurde nur die Lösung des Stabilitätstest bei pH = 8 für die Messungen in Berlin verwendet. Obwohl es sich bei beiden HPLC-Systemen um eine ähnliche RP-Säule handelte, gelang es aufgrund verschiedener Elutionsgemische und unterschiedlicher Flussgeschwindigkeit nicht die Retentionszeiten der HPLC in Bielefeld zu reproduzieren. Aus den produzierten Daten (siehe Anhang: 8.1 Stabilitätsassay) sowie den HPLC-Chromatogrammen kann geschlossen werden, dass **53** relativ instabil ist. Schon nach einem Tag ist es, in allen verwendeten wässrigen Puffersystemen, teilweise zu der weiteren Substanz **53A** umgesetzt worden. Ausserdem entsteht die neue Substanz **53B**, je basischer der Puffer wird. Im TIC-Chromatogramm des LC/MS-Laufs (Abbildung 8-1) zeigen sich zu sechs Retentionszeiten Bereiche mit erhöhter Anzahl detektierter Ionen. Die dazugehörigen Massen sind unter 8.1.1 Stabilitätsassay von **53** abgebildet und zusätzlich mit den dazugehörigen Summenformeln sowie Substanznummern in Tabelle 8-1 zusammengefasst.

In Schema 3-20 ist dargestellt, zu welchen Substanzen **53** in wässrigem basischem Puffer laut der gefundenen Massen reagiert beziehungsweise zerfällt. Es zeigt sich, dass sowohl das Chlorid am A-Fragment hydrolysiert wird, als auch das Maleimid in **53B**. Gleichzeitig wird auch die Esterbindung des zweifachen Hydrolyseproduktes **53C** verseift und so das hydrolysierte Linkerfragment **53D** und der Cryptophycin-Diol **53E** freigesetzt. Korrelation der Retentionszeiten mit der Polarität der gefundenen Substanzen zeigt, dass das polare Linkerfragment **53D** als erstes eluiert und erst zum Schluss der unpolare Cryptophycin-Diol **53E**. Das Entstehen von **53E** ist somit auch ein indirekter Beweis für die am Chlorid des A-Fragments stattfindende Hydrolyse. Für die Existenz von **53A** gibt es laut der LC/MS-Daten keinen Beweis, jedoch wurde am Ende der Inkubationszeit auch ein ESI/MS von **53** in basischem Puffer gemacht, welches deutlich ein m/z-Verhältnis von 1481.77820 Da mit der passenden Isotopenaufspaltung von **53A** zeigt. Die Abweichung um 62.68 ppm vom berechneten Wert 1481.68532 Da ist auf die geringere Massengenauigkeit der verwendeten ESI/MS-Methode im Vergleich zur in Berlin verwendeten LC/MS-Methode zurückzuführen.

Die Hydrolyse von Maleimiden in basischem Medium ist schon lange bekannt.^[152] Mit steigendem pH-Wert läuft diese schneller ab,^[153] was auch schon an mit Thiolen abreagierten Maleimiden beobachtet wurde.^[154,155] Auch in den Stabilitätstests von **53** konnte dieses Verhalten an Hand der gefundenen Massen nachgewiesen werden.



Schema 3-20: Zerfallsprodukte von **53** in wässrigem basischem Puffer bei pH = 8.

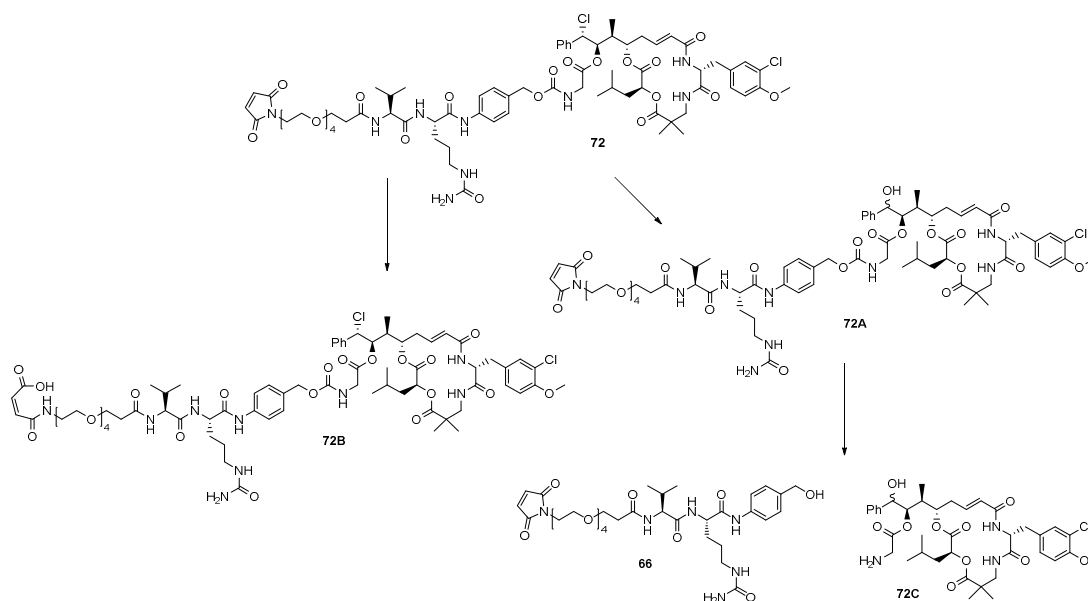
Die Inkubation der anderen beiden Linker-Cryptophycin Konjugate **72** und **73** in den verschiedenen Puffersystemen zeigt, dass diese beiden Substanzen scheinbar wegen des unpolaren *Spacers* weniger gut löslich sind in wässrigen Systemen als **53**. Dies zeigt sich am Verschwinden der Substanzpeaks in den HPLC-Chromatogrammen (Abbildung 8-9 und Abbildung 8-16) und an einer leichten Trübung des Inkubationsgefäßes. Nach sieben Tagen wurde von den Inkubationslösungen mit pH = 4 der Puffer abdekantiert und der Rückstand in geringen Mengen DMSO gelöst. Die Analyse der Feststoffe mittels HPLC zeigt, dass dieser aus zwei verschiedenen Substanzen besteht (siehe zugehörige Chromatogramme der Feststoffe in den oben genannten Abbildungen). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Ausgangssubstanzen **72** und **73** noch vorhanden sind. Die zusätzlich entstandenen Substanzen sind polarer als ihre Ausgangssubstanzen, was sich in ihren geringeren Retentionszeiten ($t_R = 4.13$ min für **72A**; $t_R = 4.33$ min für **73A**) zeigt. Die Inkubation von **72** und **73** bei physiologischem pH-Wert und bei basischem pH-Wert führt dazu, dass, verifiziert durch einen Vergleich der Retentionszeiten, ebenfalls **72A** und **73A** (dessen Signal ein Doppelsignal ist) gebildet werden. Zusätzlich bildet sich bei beiden pH-Werten die als **72B** bezeichnete Substanz, welche mit $t_R = 2.63$ min deutlich polarer ist als ihre Ausgangssubstanz **72**.

Auch an den Inkubationslösungen von **72** und **73** bei pH = 8 wurden nach einer Woche Inkubationszeit massenspektroskopische Messungen in Berlin vorgenommen (8.1.2 Stabilitätsassay

3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

von **72** und 8.1.3 Stabilitätsassay von **73**). Die Auswertung dieser Messungen ist mit den gefundenen Massen und zugehörigen Substanzen in Tabelle 8-2 und Schema 3-21 zusammengefasst.

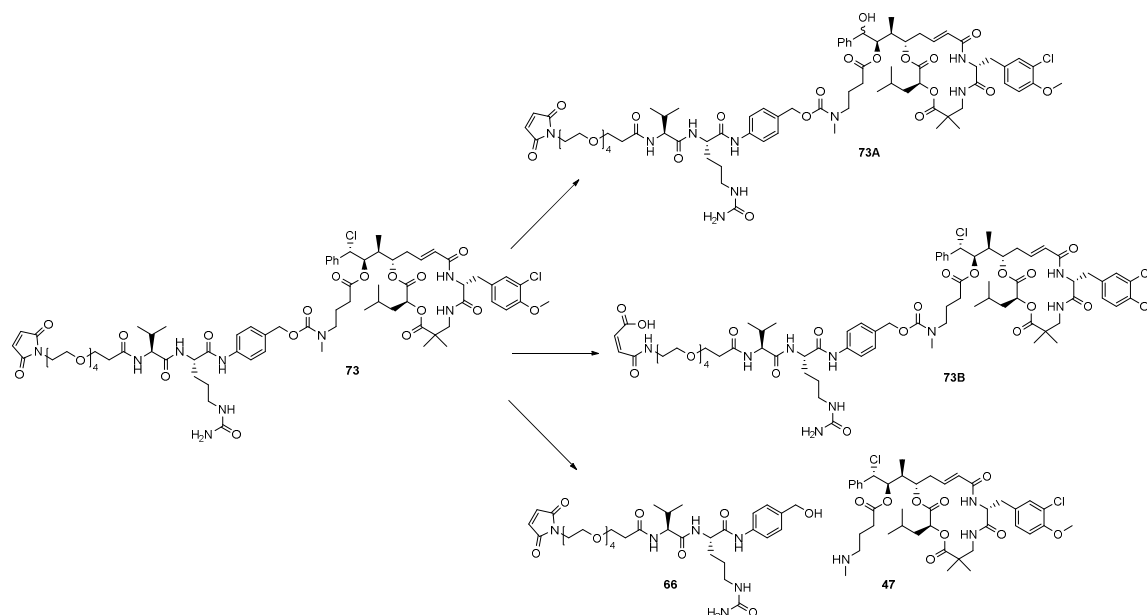
Die LC/MS-Messungen zeigen deutlich, dass nach einer Woche noch immer **72** vorhanden ist, aber, wie auch schon für **53** festgestellt, das Hydrolyseprodukt des Maleimids **72B** gebildet wurde. Für die Existenz des Hydrolyseprodukts des Chlorids am A-Fragment des Cryptophycins **72A** gibt es mit dieser Methode keinen Beweis. Dies ist aber deutlich im, am Ende der Inkubationszeit gemessenen, ESI/MS-Spektrum (siehe Abbildung 8-14) zu erkennen ($m/z_{\text{gemessen}} = 1476.73334$ Da; $m/z_{\text{berechnet}} = 1476.65877$ Da; Differenz = 50.50 ppm; Summenformel: $[\text{C}_{72}\text{H}_{98}\text{Cl}^{35}\text{N}_9\text{O}_{22} + \text{H}]^+$).



Schema 3-21: Zerfallsprodukte von **72** in wässrigem basischem Puffer bei pH = 8.

Weiterhin lässt sich bei einer Retentionszeit von 6.89 min das Masse-Ladungs-Verhältnis von 707.36141 Da dem Linkerfragment **66** zuordnen. Die korrespondierenden Masse-Ladungs-Verhältnisse für **72C** oder **39**, welches nach Hydrolyse des Carbamats **72** zu erwarten wäre, sind nicht im Spektrum enthalten.

Für das Linker-Cryptophycin-Konjugat **73** sind massenspektroskopisch ebenfalls Hydrolyse- und Zersetzungsprodukte identifizierbar (siehe Tabelle 8-3 und Schema 3-22). Es handelt sich dabei um das Produkt der Maleimidhydrolyse **73B** und die Produkte der Hydrolyse des Carbamats **66** und **47**. Für das Substitutionsprodukt des Chlorids am A-Fragment **73A** gibt es diesmal auch in den ESI/MS-Daten keinen klaren Beweis. Es wird jedoch angenommen, dass es trotzdem entstanden ist, auch weil schon Cryptophycin-55-*N*-methylaminobutyrat (**47**) selbst einer schnellen Hydrolyse des Chlorids am A-Fragment unterliegt, und möglicherweise nur nicht ionisiert werden konnte.



Schema 3-22: Zerfallsprodukte von **73** in wässrigem basischem Puffer.

Um zu überprüfen, ob die Linker-Cryptophycin-Konjugate **72** und **73** ein anderes Stabilitätsverhalten aufweisen, wenn sie besser im wässrigen Medium gelöst sind, wurden erneut Stabilitätstests in den verschiedenen Puffersystemen (pH = 4, 7.4 und 8) durchgeführt. Der DMSO-Anteil wurde dabei jedoch von 5% auf 30% erhöht. Auch dabei zeigte sich, dass beide Substanzen mit steigendem pH-Wert löslicher werden. Ebenfalls hydrolysierten die Konjugate wieder zu **72A**, **72B** und **73A**. Allerdings entstand bei physiologischem und basischem pH-Wert ein weiteres Signal, welches sich fast vollständig mit dem Signal von **72** und **73** überlagert (siehe Abbildung 8-15 und Abbildung 8-22). Da bisher keine massenspektroskopischen Ergebnisse vorliegen wird vermutet, dass es sich bei den Substanzen, die diese Signale verursachen, um Epimere der jeweiligen Ausgangssubstanz handelt.

3.3.6 Spaltungsassay der Linker-Cryptophycin-Konjugate mit Cathepsin B

Ausschlaggebend für die Zytotoxizität des gesamten ADC ist die Freisetzung der Wirkstoffe (Cryptophycine) in der Zelle. Hierfür muss nach einer erfolgten Spaltung am Dipeptid durch Cathepsin B ebenfalls der selbst-eliminierende Linker vollständig freigesetzt werden.

Die Spaltung der Cryptophycin-Derivate wurde in Anlehnung an ein Protokoll von DUBOWCHIK *et al.* durchgeführt.^[61] Um zu verhindern, dass die enthaltenen Maleimid-Reste mit Cathepsin B reagieren, wurden sie vorher mit L-Cystein abgesättigt (siehe Abbildung 3-8). Dies war innerhalb einer halben Stunde bei 37°C mit komplettem Umsatz möglich. Gleichzeitig wurde das Cathepsin B,

3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

welches in NaOAc-Puffer (pH = 5) gelöst war, mit einer DTT-enthaltenden Aktivierungslösung für 15 min bei RT aktiviert. Nachdem die mit L-Cystein abgesättigten Linker-Cryptophycin-Konjugate **74**, **75** und **76** in NaOAc-Puffer aufgenommen worden waren, wurden sie mit der Enzymlösung versetzt und über eine Dauer von 6 Stunden bei RT HPLC-Messungen durchgeführt, was bei einer niedrigen und einer hohen Enzymkonzentration geschah, um die erwarteten Zersetzungsprodukte schneller detektieren zu können. Allerdings wurde keine Umsetzung der Substanzen beobachtet. Daher wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Professor Dr. GÜTSCHOW von der Universität Bonn der Spaltungsassay weiterentwickelt.

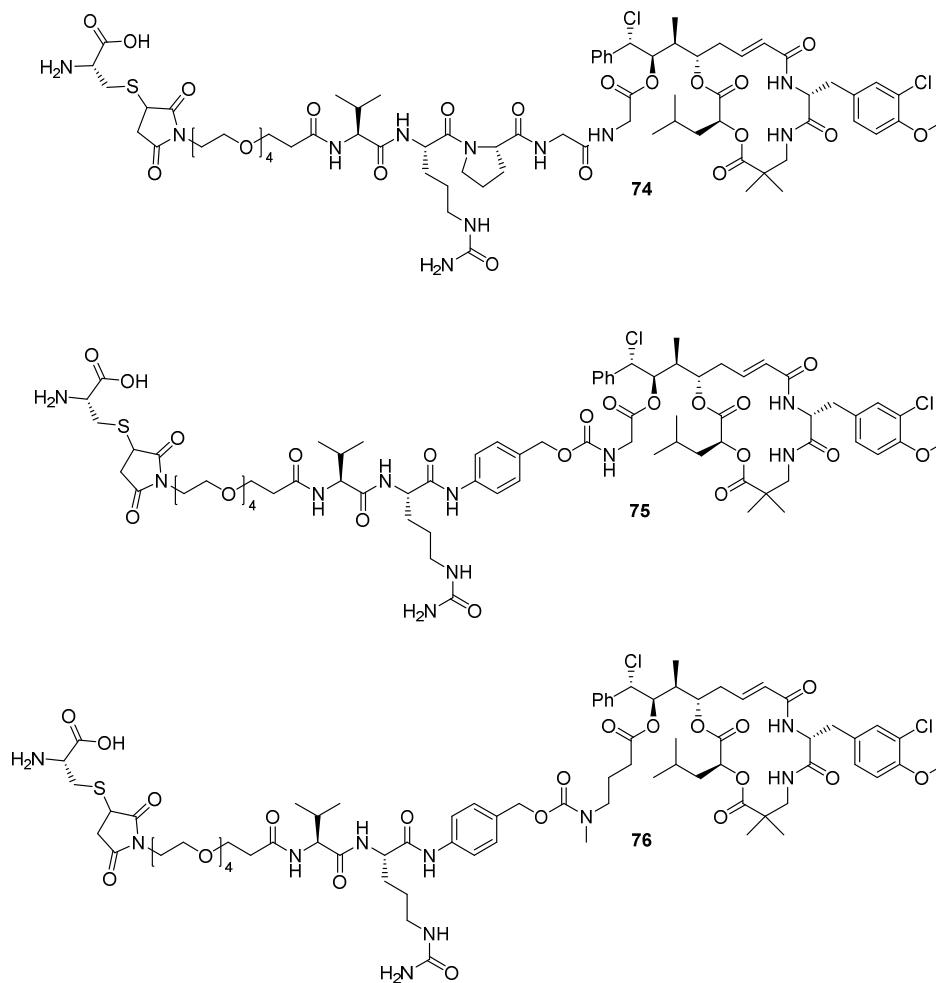


Abbildung 3-8: Mit Cystein abgesättigte Cryptophycin-Linker-Konjugate.

In Bonn konnte durch das Verwenden eines Substrats von Cathepsin B gezeigt werden, dass die Aktivierung des Enzyms mit der von DUBOWCHIK und FIRESTONE verwendeten

Aktivierungslösung [61] nicht gelang. Die Verwendung eines Aktivierungspuffers [156]

(geringere DTT-Konzentration, pH = 6, geringere

EDTA-Konzentration, Verwendung von Salzen)

hingegen führte zu aktiviertem Enzym. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Enzymkonzentration des verwendeten Assays zu gering war, weswegen sie in den folgenden Tests stark erhöht wurde. In den erneut durchgeführten

Spaltungsassays wurde gleichzeitig zu optimierter Aktivierung und erhöhter Enzymmenge auch ein Standardsubstrat des Cathepsin B (Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcumarin) als Positivkontrolle mit verwendet.

Um eine bessere Löslichkeit der Konjugate gewährleisten zu können wurde die DMSO-

Konzentration auf 5% erhöht. Die Inkubation aller Linker-Cryptophycin-Derivate und der Positivkontrolle erfolgte bei 37°C für 6 h und der Verlauf der Reaktion wurde stündlich mittels HPLC untersucht. Danach wurden die Reaktionslösungen eingefroren und in Berlin per LC/MS

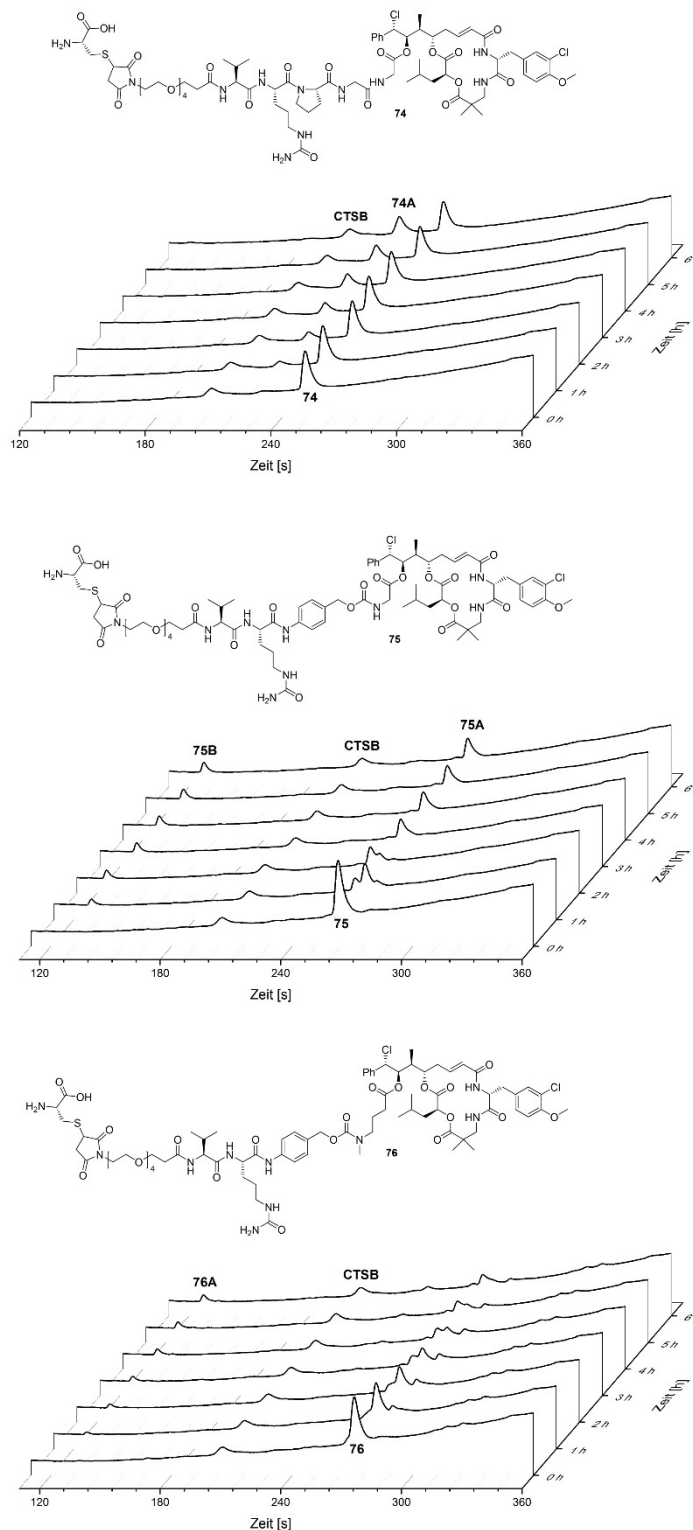
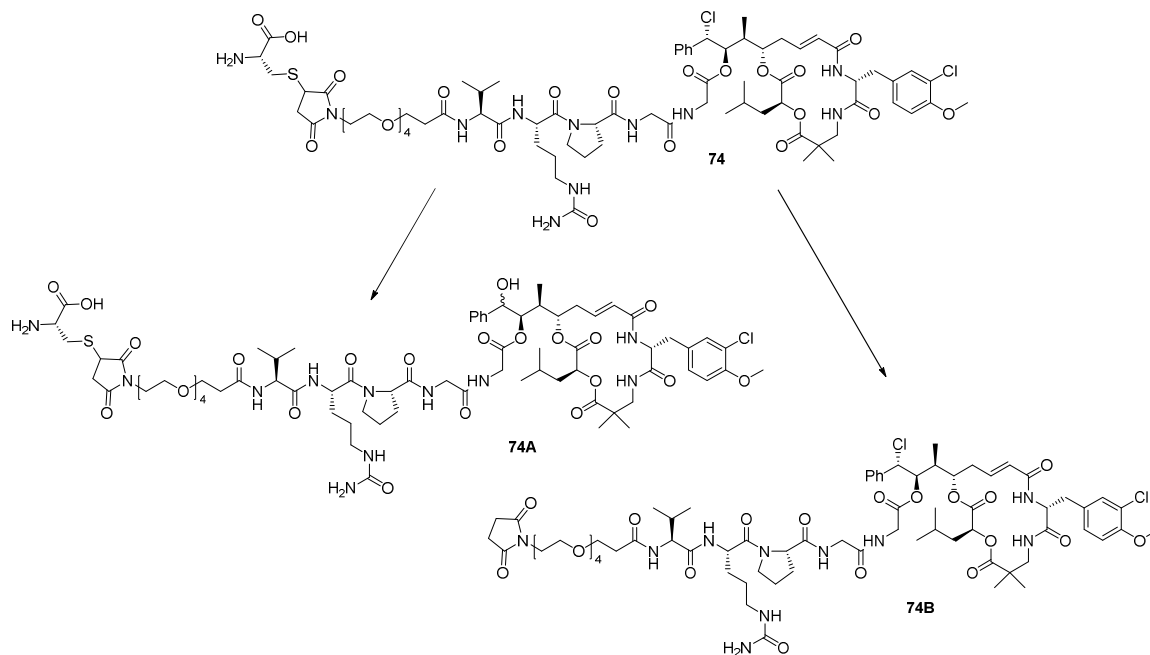


Abbildung 3-9: HPLC-Chromatogramme der enzymatischen Spaltung von **74**, **75** und **76** mittels Cathepsin B über die Dauer von 6 Stunden, gemessen bei 220 nm. Der Bereich von 1.8 – 6 min wurde vergrößert dargestellt, da sich nur hier relevante Signale befinden.

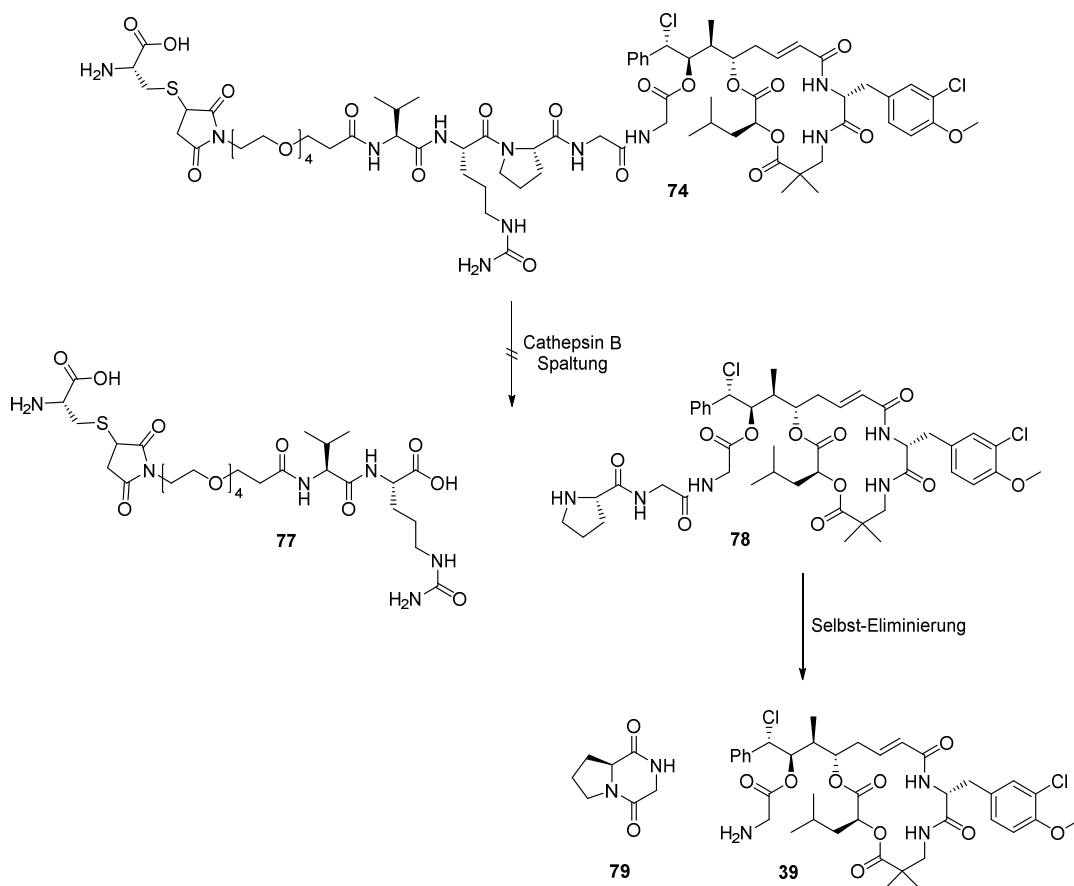
3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

vermessen. In Abbildung 3-9 sind die HPLC-Chromatogramme der Spaltungstests von **74**, **75** und **76** mit Cathepsin B mit einer Enzymkonzentration von 750 nM zu sehen. Die Enzymkonzentration ist hierbei um das 25-fache höher als in dem ursprünglichen Assay von DUBOWCHIK und FIRESTONE und wurde so von Prof. Dr. GÜTSCHOW empfohlen. ^[61] Für **74** zeigt sich in den HPLC-Chromatogrammen, dass mit der Zeit eine weitere Substanz **74A** gebildet wird, welche bei einer Retentionszeit von $t_R = 3.83$ min eluiert.



Schema 3-23: Produkte des Spaltungsversuches von **74** mit Cathepsin B.

Im TIC-Chromatogramm (Abbildung 8-23) des LC/MS-Laufs von **74** sind jedoch sieben Bereiche erhöhten Ionenaufkommens zu sehen, welche in Tabelle 8-4 mit ihren m/z -Werten und den zugehörigen Summenformeln und Substanzen aufgelistet sind. Der Erwartung nach (Schema 3-24), sollte Cathepsin B **74** nach der Spaltsequenz Val-Cit in das Linkerfragment **77** und das Cryptophycin-enhaltende-Fragment **78** spalten und so die Selbst-Eliminierung des Diketopiperazins **79** initiieren. Dabei würde Cryptophycin-55-glycinat (**39**) als Wirkstoffkomponente freigesetzt werden.



Schema 3-24: Erwartete Spaltprodukte der enzymatischen Spaltung von **74**.

Die Massen der erwarteten Spaltprodukte konnten jedoch nicht in den Ergebnissen der LC/MS-Analyse gefunden werden. Stattdessen wurden nur die Hydrolyseprodukte **74A** (als Diastereomere **74A-1** und **74A-2**) und **74B** sowie das Ausgangsprodukt **74** selbst detektiert. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Spaltung des Tetrapeptidlinkers mit Cathepsin B nicht möglich ist, was an der Verwendung von Prolin als mit der Spaltsequenz Val-Cit verknüpfte Aminosäure liegen könnte. Vielleicht ist die vorliegende Amidbindung in **74** aufgrund des tertiären Amids kein Substrat für das Enzym.

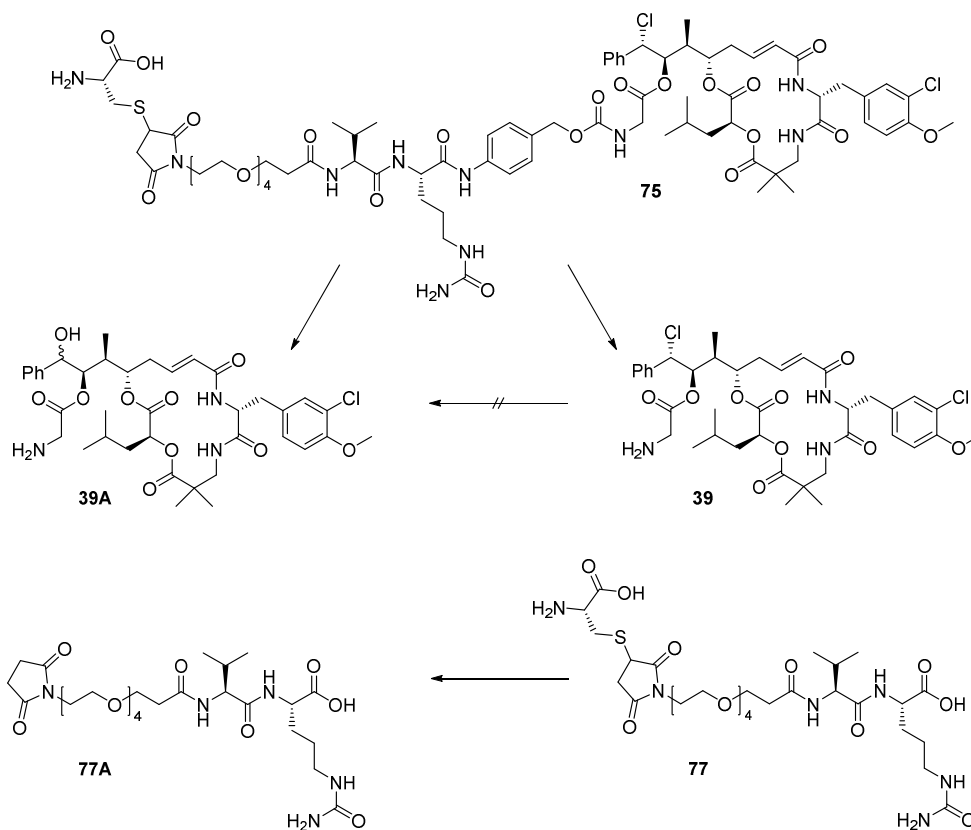
Für die anderen beiden mit Cystein abgesättigten Linker-Cryptophycin-Konjugate **75** und **76** war die Spaltung mit Cathepsin B erfolgreich. Schon in den HPLC-Chromatogrammen (Abbildung 3-9) ist bei den Retentionszeiten von **39** und **47** ein schwacher Peak zu sehen. Zusätzlich entsteht bei beiden Spaltungen ein Peak bei einer Retentionszeit von 2.12 min (als **75B** und **76A** bezeichnet) und ein schwaches Signal ist für die Spaltung von **76** auch bei der Retentionszeit von **47A** ($t_R = 3.99$ min) zu erkennen.

Der Erfolg der enzymatischen Spaltung wird auch durch die Auswertung der LC/MS-Messungen belegt. Das TIC-Chromatogramm (Abbildung 8-31) der Spaltung von **75** zeigt deutlich fünf

3.3 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

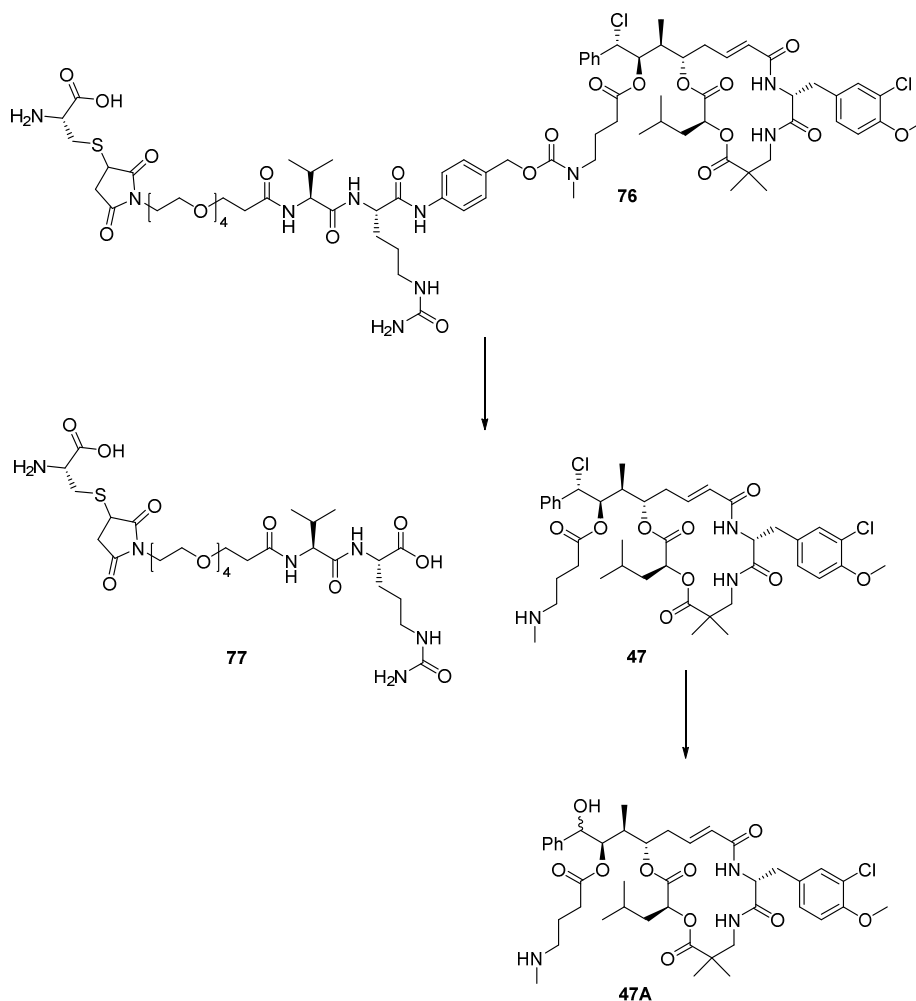
Bereiche erhöhten Ionenaufkommens, wovon vier mit ihren zugehörigen Massen (Tabelle 8-5) eindeutig zugeordnet werden können.

Bei den entstandenen Substanzen handelt es sich um **39**, **39A**, **77** und **77A** (Schema 3-25). Nach erfolgter Spaltung der Amidbindung zwischen Citrullin und dem *p*-Aminobenzylalkohol muss über die spontane 1,6-Benzyleliminierung das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) und dessen Hydrolyseprodukt **39A** freigesetzt werden sein. Hierbei wird jedoch davon ausgegangen, dass **39A** nicht der direkten Hydrolyse von **39** entspringt, da dies auch bei den Stabilitätstests hätte beobachtet werden müssen, sondern zuerst das Chlorid am A-Fragment von **75** hydrolysiert wird und die entstandene Verbindung direkt vom Cathepsin B umgesetzt wurde. Gleichzeitig entstehen auch das zugehörige Linkerfragment **77**, sowie das Linkerfragment **77A**, welches ein gesättigtes Maleimid aufweist.



Schema 3-25: Produkte der Spaltung von **75** mit Cathepsin B.

Ähnlich sieht es im TIC-Chromatogramm (Abbildung 8-37) der LC/MS-Messung der Cathepsin B-vermittelten Spaltung von **76** aus. Es lassen sich den einzelnen Retentionszeiten im TIC-Chromatogramm wieder die Massen der erwarteten Spaltprodukte (Schema 3-26) zuordnen. Das Linkerfragment **77** entsteht auch hier nachweislich.



Schema 3-26: Produkte der Spaltung von **76** mit Cathepsin B.

Weiterhin wird nach der initiierten 1,6-Benzyleliminierung des *p*-Aminobenzylalkohols das Cryptophycin-55-*N*-methylaminobutyrat (**47**) frei, welches auch wieder zu **47A** hydrolysiert. Eine Zyklisierung des *N*-Methylaminobutyrat, wie sie auch von DEWIT und GILLIES beschrieben wurde,^[128] mit nachfolgender Freisetzung von Cryptophycin-55 (**36**) konnte nicht nachgewiesen werden.

Ebenfalls ist die Umsetzung von **76** nach sechs Stunden Inkubation mit dem Enzym nicht vollständig, was das Vorhandensein des mit Cystein gesättigten Linker-Cryptophycin-Konjugats im LC/MS-Lauf beweist.

3.4 Antikörperkonjugation

Für die Wirksamkeit eines ADC ist es wichtig, dass Wirkstoff, Linker und Antikörper genau aufeinander abgestimmt werden und ihre Wirkziele einander entsprechen. Dies bedeutet, dass durch die Verwendung des Mitosehemmers Cryptophycin schon eine Vorauswahl bezüglich des Antikörpers getroffen wurde. Brust- und Eierstockkrebs sind beispielsweise sensitiv gegenüber Mitosehemmern (Spindelgiften).^[47] Daher empfiehlt es sich auf einen zugelassenen Antikörper zurückzugreifen, der gegen ein von diesen beiden Tumorarten überexprimiertes Antigen gerichtet ist. Trastuzumab (Herceptin®) stellt einen geeigneten Kandidaten dar. Er ist gegen den *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu, HER2 oder c-erbB-2) gerichtet, welcher ein Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFR) ist.^[157,158] Die epidermalen Wachstumsfaktoren gehören zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und umfassen vier Rezeptoren (Her1-4 bzw. ERBB1-4) und mehrere extrazelluläre polypeptid-Liganden.^[159] Die Rezeptoren sind überwiegend gleich aufgebaut und bestehen aus einer intrazellulären Domäne, einer transmembran- und einer extrazellulären Domäne. Mit Ausnahme von HER3 ist die intrazelluläre Domäne bei allen Rezeptoren die Kinase-aktive Stelle.^[160] Die extrazelluläre Domäne beinhaltet die Liganden-bindende Stelle, wobei die Liganden in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden können. Es handelt sich dabei um die EGF-ähnlichen Liganden, die Heregulin-ähnlichen Liganden und die Heparin-bindenden-EGF Liganden. Jeder der HER-Rezeptoren bevorzugt die Bindung mit einer speziellen Ligandenklasse; für HER1 sind es die EGF-Liganden, für HER3 und HER4 sind es die Heregulin-Liganden. Lediglich der HER2-Rezeptor besitzt keinen Liganden für seine extrazelluläre Domäne.^[161,162] Durch die Bindung verschiedener Liganden wird die Bildung von Homo- und Heterodimeren der HER-Rezeptoren angeregt, woraufhin diese aktiviert werden.^[163] Allerdings scheint der HER2-Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der Heterodimerisation zu spielen und auch der bevorzugte Dimerisationspartner der anderen HER-Rezeptoren zu sein.^[163,164]

Alle Mitglieder der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren Familie sind an der Verarbeitung und Weiterleitung von extrazellulären Signalen beteiligt und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Proliferation und des Überlebens von Epithelzellen.^[163,165] Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Überexpression des HER2-Rezeptors, die in 20 – 25% der invasiven Brustkrebstumoren festgestellt wird, mit einer schlechteren Prognose für Brustkrebspatientinnen zusammenhängt.^[26,166]

Bei Trastuzumab handelt es sich um ein Immunglobulin (IgG) der Unterklasse 1. Das bedeutet, dass es 12 Disulfidbindungen besitzt, die innerhalb einer Kette vorkommen (siehe Abbildung 3-10). Zusätzlich sind die *heavy chains* über jeweils eine Disulfidbrücke mit den *light chains* verbunden.

In der *Hinge*-Region, welche beide Antikörperhälften miteinander verbindet, befinden sich zwei Disulfidbrücken. ^[167]

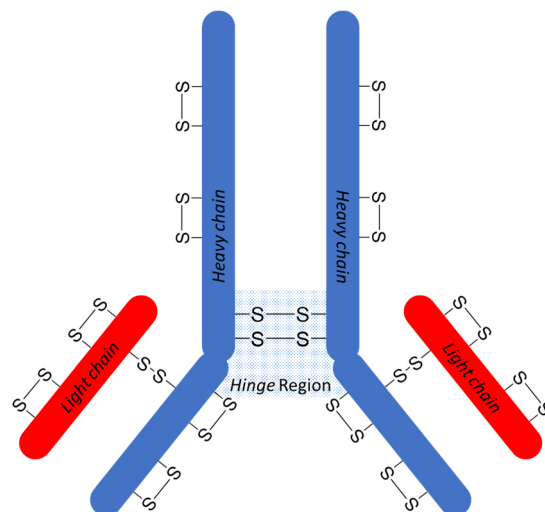


Abbildung 3-10: Einteilung eines Antikörpers (IgG₁) in die verschiedenen Ketten sowie die klassische Disulfidbrückenstruktur.

Durch die endständige Maleimid-Funktionalisierung der synthetisierten Linker-Cryptophycin-Konjugate **53**, **72** und **73** bietet sich eine Konjugation an den Antikörper über eine Thioetherbindung an. Vorteil dieser Bindung ist, dass sie sich nicht mehr reduzieren lässt und somit stabil ist. Als Reduktionsmittel für die Disulfidbrücken des Antikörpers wurden TCEP und 2-MEA gewählt. Der Vorteil in der Nutzung von TCEP liegt darin, dass es sich dabei um ein Reduktionsmittel handelt, das selbst keine Thiofunktionen besitzt. Somit kann es nach der Reduktion in der Reaktionsmischung verbleiben, da es selbst nicht mit dem Maleimid reagiert und dementsprechend ein Reinigungsschritt wegfällt. ^[168] Allerdings ist die Reduktion nicht regiospezifisch und auch Spaltprodukte wie einzelne *Heavy*- oder auch *Light chains* entstehen, die später nicht mehr in der Lage sind, das Antigen zu erkennen und zu binden. 2-Mercaptoethylamin Hydrochlorid (2-MEA) hingegen soll den Antikörper selektiv in der Hinge-Region reduzieren, wobei zwei identische Antikörperhälften (rIgG) mit jeweils zwei freien konjugierbaren Thiolgruppen entstehen. ^[169] Beide Hälften wären auch noch in der Lage, das zugehörige Antigen über die intakten variablen Bereiche zu erkennen. Allerdings muss das 2-MEA nach der Reduktion aus der Lösung durch Entsalzen entfernt werden, da es sonst über seine Thiolgruppe auch an den Maleimid-Rest binden könnte und zu schlechteren Konjugations-Ausbeuten führt.

Die Reduktion des Antikörpers mit TCEP wurde von der Firma EXIRIS unter der Leitung von GALLINARI in PBS-Puffer bei pH = 7.2 durchgeführt. Anschließend wurde der reduzierte Antikörper mit dem in DMSO gelösten Linker-Cryptophycin-Konjugat **53** versetzt und inkubiert. Hierbei wurde versucht eine möglichst gute Konjugations-Ausbeute zu erzielen, indem einmal 2 h bei 4 °C inkubiert wurde, einmal 4 h bei 4°C und einmal 1 h bei RT mit anschließender Inkubation bei 4°C über eine Dauer von 4 h. Nach Ende der Inkubation wurden die Proben entsalzt und mit dem BRADFORD-Test auf Proteingehalt, sowie mit dem ELLMAN-Test auf freien Thiolgehalt getestet. Trotz Variation der Reaktionszeit und Reaktionstemperatur gelang es nur ~ 50% des für die Konjugation an den Antikörper verwendeten **53** zu konjugieren. ^[170]

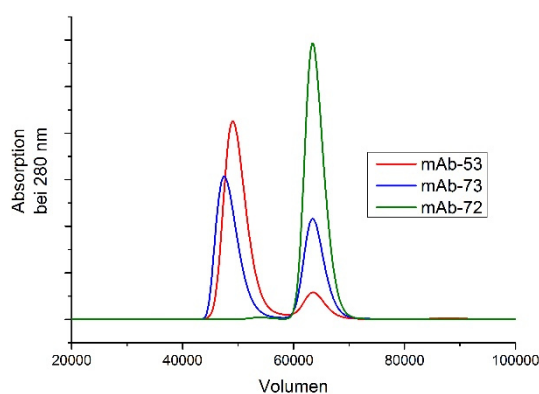


Abbildung 3-11: Dargestellt sind die Absorptionen (bei 280 nm) der verschiedenen bei den Äkta-Läufen aufgefangenen Fraktionen der Antikörperkonjugatreinigung.

Elutionsfraktionen wurden vereinigt und sofort mit den in DMSO gelösten Substanzen **53**, **72** oder **73** inkubiert. Der Versuch einer anschließenden auf Größenausschluss beruhenden Aufreinigung der Reaktionsmischung in die einzelnen Fragmente mittels Äkta gelang nicht (siehe Abbildung 3-11). Es konnten jeweils nur zwei (mAb-**53** und mAb-**73**) Fraktionen bzw. eine (mAb-**72**) Fraktion isoliert werden.

Die Überprüfung der Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass die durch die Reduktion mit 2-MEA und die anschließende Konjugation entstandenen Fragmente nicht getrennt werden konnten (Abbildung 3-12). Mit Hilfe des Molmassenstandards ist es möglich die Banden auf dem Gel verschiedenen Bereichen (Bereich 1 – 4) zuzuordnen. In Bereich 1 befinden sich die Banden der Fragmente mit einem Molekulargewicht um 150 kDa. Es scheint sich demnach um nicht-reduzierten Antikörper (~ 150 kDa) zu handeln. Im 3. Bereich befinden sich die Banden der Antikörperfragmente mit einem Molekulargewicht von ~ 50 kDa, welche daher den *heavy chain*-Fragmenten zugeordnet werden. Bereich 4 beinhaltet die Fragmente mit dem geringsten Molekulargewicht (~ 25 kDa), dabei handelt es sich um die *light chain*-Fragmente des reduzierten Antikörpers. Die Banden im 2. Bereich besitzen ein ungefähres Molekulargewicht von 75 kDa und werden daher auf den halbierten Antikörper zurückgeführt. Der Vergleich der Bandenzahl im 2.

Als Vergleich dazu wurde der Antikörper Trastuzumab auch mit 2-MEA nach einem Protokoll von THERMO SCIENTIFIC reduziert. ^[169] Hierzu wurde in einem Vortest das beste Verhältnis mAb:2-MEA bestimmt. Danach wurde der mAb nach dem Protokoll mit dem besten Verhältnis mAb:2-MEA reduziert und direkt im Anschluss mittels Größenausschlusschromatographie entsalzt. Die Protein enthaltenden

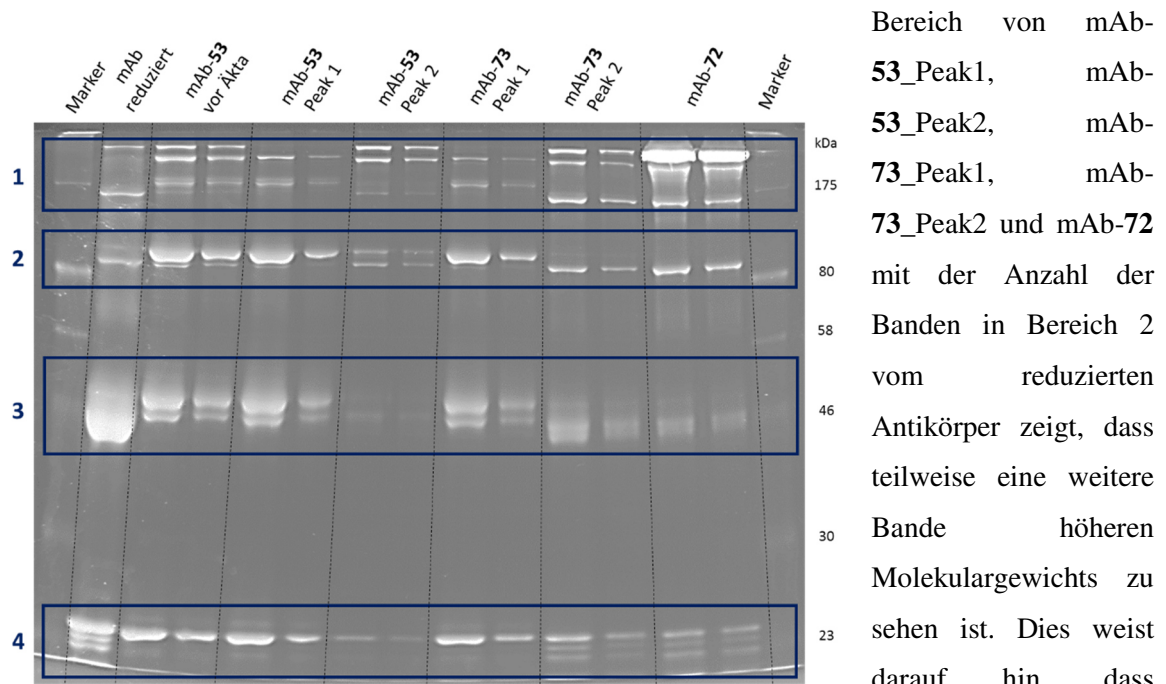


Abbildung 3-12: SDS-PAGE-Analyse der einzelnen nach Größenausschlusschromatographie aufgetrennten Fraktionen der mAb-Konjugate. Mit Ausnahme des unkonjugierten Antikörpers wurden alle Proben in hoher (links) und niedriger (rechts) Konzentration aufgetragen.

Bereich von mAb-**53_Peak1**, mAb-**53_Peak2**, mAb-**73_Peak1**, mAb-**73_Peak2** und mAb-**72** mit der Anzahl der Banden in Bereich 2 vom reduzierten Antikörper zeigt, dass teilweise eine weitere Bande höheren Molekulargewichts zu sehen ist. Dies weist darauf hin, dass zumindest die Konjugation von **53** (siehe mAb-**53_Peak1**

und mAb-**53_Peak2**) und **73** (siehe mAb-**73_Peak1**) an den halbierten Antikörper gelungen ist. Es kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich um eine einfache- oder eine zweifache Konjugation handelt. Das Vorliegen von vollständigem Antikörper, sowie *heavy chain*- und *light chain*-Fragmenten zeigt, dass die Reduktion mit 2-MEA weder sehr selektiv noch vollständig gewesen ist.

Bei EXIRIS wurden die gesammelten Fraktionen auf ihre Zytotoxizität gegenüber Zelllinien der Typen SKBR-3, MCF7 und HCT116 getestet. SKBR3-Zellen entstammen einem Adenokarzinom der Brustdrüsen und überexprimieren das HER2-Antigen. Sie wurden daher als Positivprobe für die Wirksamkeit der ADCs eingesetzt. Als Negativproben dienten die Zelllinien MCF7 und HCT116, die das HER2-Antigen nur auf einem geringen Level exprimieren.^[171] Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 3-2 und Tabelle 3-3 zusammengefasst. Sie zeigen, dass die unkonjugierten Substanzen **39**, **53**, **72**, **47** und **73** gegenüber den drei getesteten Zelllinien aktiv sind, wobei, den Erwartungen entsprechend, die freien Cryptophycine **39** und **47** aktiver sind als die Linker-Cryptophycin-Konjugate **53**, **72** und **73**. Die an den Antikörper konjugierten Proben, sowie der reduzierte Antikörper beweisen ihre Selektivität gegenüber der HER2-positiven Zelllinie (SKBR-3), da sie nur gegenüber dieser Zelllinie aktiv sind.

3.4 Antikörperkonjugation

Tabelle 3-2: Aktivitäten der Cryptophycine, der Linker-Cryptophycin-Konjugate, des reduzierten Trastuzumab und der konjugierten Linker-Cryptophycin-Konjugate gegenüber der SKBR-3-Zelllinie.

Verbindung	CC ₅₀ ¹	Restviabilität bei max. Konz. [%]
39	0.09 nM	4.8
53	2.6 nM	5.2
72	2.5 nM	5.1
47	4.8 nM	-
73	244 nM	-
Trastuzumab (reduziert)	0.08 µg/ml	73.7
mAb- 53 _Peak1	0.01 µg/ml	12.6
mAb- 53 _Peak2	0.05 µg/ml	13.0
mAb- 72	0.07 µg/ml	68.7
mAb- 73 _Peak1	4.5 µg/ml	-
mAb- 73 _Peak2	0.09 µg/ml	73.0

Gleichzeitig zeigt sich, dass mAb-**53**_Peak1 und mAb-**53**_Peak2 verglichen mit dem reduzierten Antikörper aktiver sind. Dies deutet darauf hin, dass in den Lysosomen vermutlich doch **39** aus dem an den rIgG konjugierten **53** freigesetzt wird. Da in 3.3.6 gezeigt werden konnte, dass **74** mit der Val-Cit-Pro-Gly-Sequenz nicht als Substrat von Cathepsin B dient, wären als Grund für die dennoch erhöhte Zytotoxizität eine Spaltung des Linkers von **53** durch andere in den Lysosomen vorliegende Enzyme oder aber eine Esterhydrolyse der Bindung zwischen dem Cryptophycin-55-Teil und dem ersten Glycin durch Esterasen denkbar. mAb-**72** und mAb-**73**_Peak2 sind genauso aktiv wie der reduzierte Antikörper, dies bestätigt die Erwartungen, da auch schon auf dem SDS-PAGE-Gel in Bereich 2 dieser beiden Fraktionen nur die untere Bande, die den unkonjugierten halbierten Antikörper repräsentiert, zu sehen ist. mAb-**73**_Peak1 ist weniger aktiv als der reduzierte Antikörper. Dies könnte daran liegen, dass **47** und **73** selbst schon weniger aktiv sind als **39**, **53** und **72**. Um eine Bestätigung für diese Vermutung zu erbringen muss das DAR der reduzierten konjugierten Antikörper bestimmt werden.

¹ Der CC₅₀-Wert gibt die halbmaximale Konzentration der Zytotoxizität an.

Tabelle 3-3: Aktivitäten der Cryptophycine, der Linker-Cryptophycin-Konjugate, des reduzierten Trastuzumab und der konjugierten Linker-Cryptophycin-Konjugate gegenüber den Zelllinien MCF7 und HCT116.

Verbindung	MCF7		HCT116	
	CC ₅₀ [nM]	Restviabilität bei max. Konz. [%]	CC ₅₀ [nM]	Restviabilität bei max. Konz. [%]
39	0.25	25	0.19	5.6
53	6.1	25	4.4	6.6
72	7.3	27	4.2	8.0
47	14.0	25	13.2	-
73	283	-	141	-
Trastuzumab (reduz.)	inaktiv	100	inaktiv	100
mAb- 53 _Peak1	inaktiv	100	inaktiv	100
mAb- 53 _Peak2	inaktiv	100	inaktiv	100
mAb- 72	inaktiv	100	inaktiv	100
mAb- 73 _Peak1	inaktiv	100	inaktiv	100
mAb- 73 _Peak2	inaktiv	100	inaktiv	100

4 Ausblick

Die beiden Linker-Cryptophycin-Konjugate **72** und **73** besitzen ein hohes Potential, in einem ADC zur Krebstherapie verwendet werden zu können. Allerdings sind dazu weitere Untersuchungen zur enzymatischen Spaltbarkeit von Nöten. Hierbei müsste darauf geachtet werden, wieder geringere Enzymkonzentrationen zu verwenden, sowie mit einem genügend langen Gradienten für die HPLC beziehungsweise LC/MS zu arbeiten, um alle entstehenden Substanzen zweifelsfrei voneinander trennen und anhand ihrer Retentionszeiten voneinander unterscheiden zu können. Dann wäre auch eine Quantifizierung der Substanzen möglich sowie eine Aussage über die Geschwindigkeit der Spaltungs- bzw. Eliminierungsreaktion.

Um zu prüfen, ob die Pro-Gly-Sequenz als selbst-eliminierende *Spacereinheit* in Verbindung mit einer vorherigen Spaltung der Peptidbindung zwischen Citrullin und Prolin funktioniert, könnte die Stabilität von **53** gegenüber weiteren lysosomalen Enzymen getestet werden. Zusätzlich wäre es interessant ein Linker-Cryptophycin-Konjugat **80** mit inverser Reihenfolge der Aminosäuren (Val-Cit-Gly-Pro) im *Spacer* zu synthetisieren und dieses auf seine Spaltbarkeit durch Cathepsin B zu testen (Abbildung 4-1).

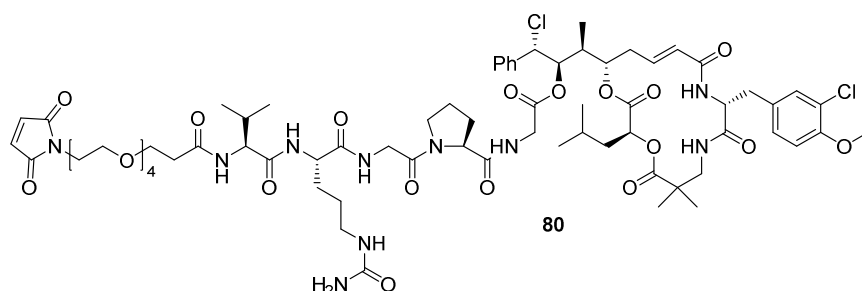


Abbildung 4-1: Linker-Cryptophycin-Konjugat **80** mit inverser Reihenfolge der selbst-eliminierenden Sequenz Pro-Gly zu **53**.

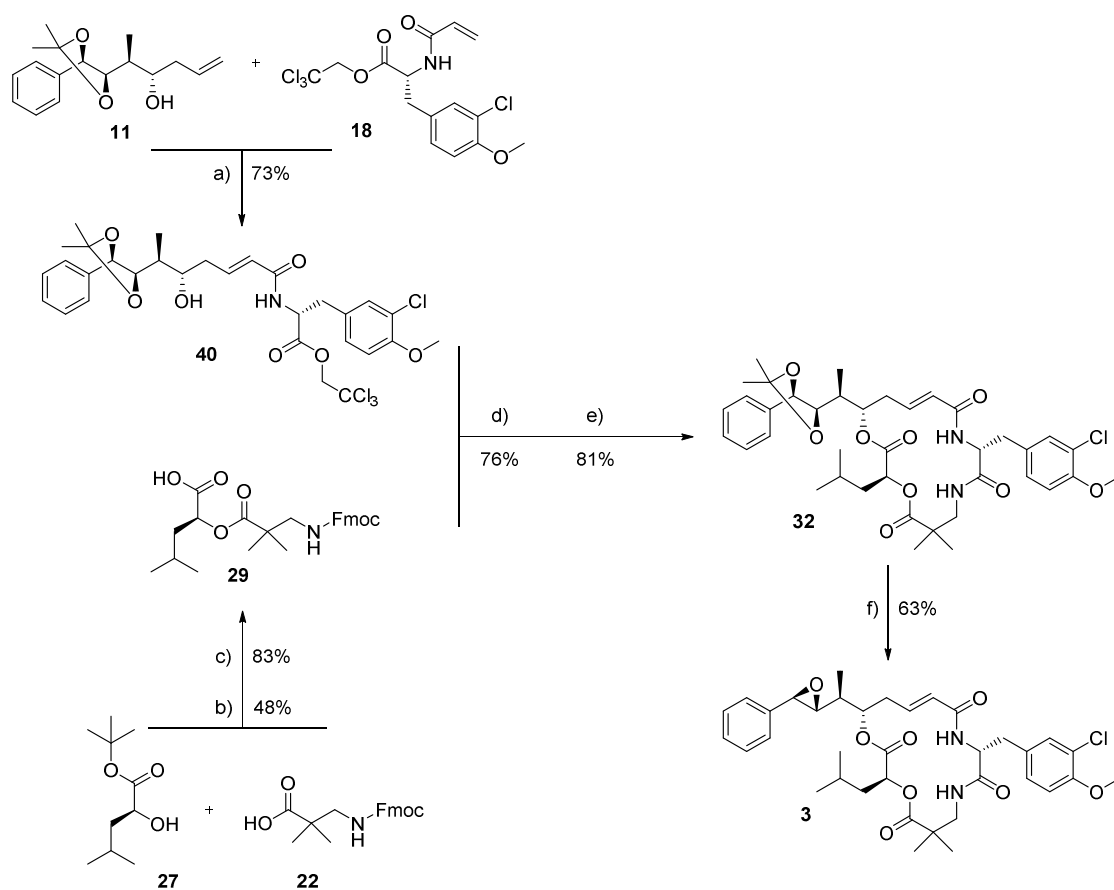
Auch die nicht erfolgte Zyklisierung des, eigentlich vielversprechenden,^[128] *N*-Methylaminobuttersäure-*Spacers* in Cryptophycin-Derivat **47** und dem Linker-Cryptophycin-Konjugat **73** ist näher zu untersuchen, um weitere Aussagen über die Verwendbarkeit des Konjugats **73** in potentiellen ADCs treffen zu können. Sofern eine Zyklisierung unmöglich ist, kann auch die enzymatische Hydrolyse der Esterbindung zwischen *N*-Methylaminobuttersäure und Cryptophycin-55 (**36**) geprüft werden, die auch schon für das Cryptophycin-55-glycinat (**39**) beobachtet wurde.^[75]

Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit der Konjugate könnte zukünftig ein verlängerter PEG-Linker verwendet werden, oder stattdessen ein komplett peptidischer Linker verwendet werden, wie er auch schon von ENDOCYTE patentiert ist.^[99]

5 Zusammenfassung

In der Krebstherapie stellen Antikörper-Wirkstoff-Konjugate eine gute Möglichkeit dar, die Selektivität von Chemotherapeutika zu erhöhen. So lässt sich durch die Wahl eines geeigneten Antikörpers selektiv ein von Krebszellen überexprimiertes Antigen adressieren und ein an den Antikörper gebundener Wirkstoff so ortsspezifisch ausliefern. Cryptophycine könnten durch ihre gute Aktivität, die sie sogar gegenüber mehrfach medikamentenresistenten Zellen besitzen, für einen Einsatz in der Krebstherapie von Vorteil sein. ^[72,75]

Die Synthese der Cryptophycin-ADCs erfolgte stufenweise, wobei zunächst die Cryptophycin-Derivate synthetisiert wurden und danach die passenden Linker, welche am Ende über eine Carbamat-Bindung an die Cryptophycine gebunden wurden. Retrosynthetisch betrachtet lassen sich Cryptophycine in vier verschiedene Fragmente (A - D) gliedern. Diese Fragmente werden, je nach Endziel, miteinander verknüpft und danach der Makrozyklus aufgebaut. Da in dieser Arbeit keine Variation der einzelnen Fragmente durchgeführt wurde, sondern lediglich das Cryptophycin-55 (**36**) aufgebaut werden musste, um es mit den Linkerfragmenten verknüpfen zu können, wurde nach einer gut funktionierenden konvergenten Syntheseroute aus der Dissertation von WEISS gearbeitet. ^[96] Hierfür wurden zunächst die einzelnen Fragmente synthetisiert (Schema 5-1). Danach wurden das A- und das B-Fragment in einer Metathesereaktion zum AB-Fragment **40** verknüpft. Parallel wurde das C- mit dem D-Fragment in einer STEGLICH-Veresterung zum CD-Fragment **29** kondensiert. Der Makrozyklus **32** wurde in zwei Schritten aufgebaut. Hierfür wurde zuerst das AB-Fragment mit dem CD-Fragment verestert und danach der Ringschluss mittels Makrolactamisierung vorgenommen. Im Anschluss folgte die vierstufige Diol-Epoxid-Transformation zum Cryptophycin-52 (**3**).

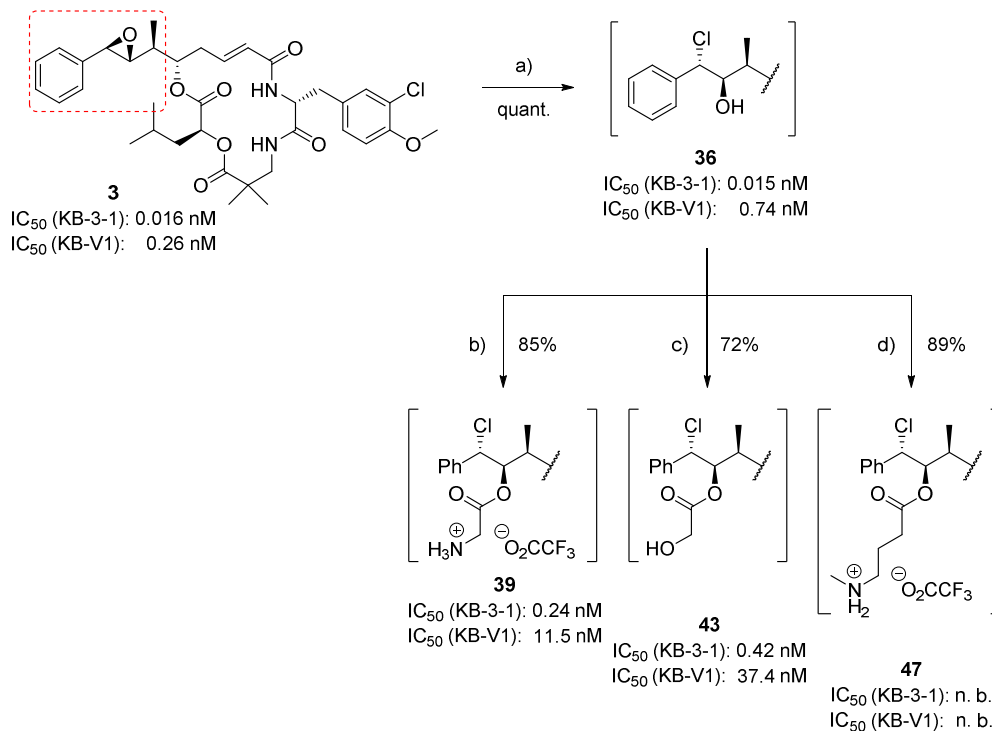


Schema 5-1: Konvergente Syntheseroute zum Aufbau des Cryptophycin-52 (**3**) nach WEISS. ^[96] a) Grubbs-II-Kat., abs. DCM, RT, ü. N.; b) DCC, DMAP, abs. DCM, 0°C → RT, 17 h; c) TFA, DCM, 0°C → RT, 5 h; d) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, DMAP, NEt₃, abs. THF, 0°C, 3 h; e) Piperidin, abs. DMF, RT, 2 h; f) 1.: TFA, abs. DCM, H₂O, RT, 1.5 h; 2.: PPTS, abs. (CH₃O)₃CH, abs. DCM, RT, 2.5 h; 3.: AcBr, abs. DCM, RT, 4.5 h; 4.: K₂CO₃, DME/Glykol (2:1 v/v), RT, 2.5 min.

Nach der Öffnung des Epoxids **3** zum Chlorhydrin **36** konnte die Hydroxyfunktion mit drei geschützten kurzkettigen Amino- bzw. Hydroxysäuren verestert werden und nach zwei Stufen konnten das Cryptophycin-55-glycinat (**39**), das Cryptophycin-55-glycolat (**43**) und das Cryptophycin-55-*N*-Me-Aminobutyrat (**47**) erhalten werden (Schema 5-2). In einem auf drei verschiedenen Puffersystemen (pH = 4, 7.4 und 8) basierenden Stabilitätsassay wurden die Cryptophycin-Derivate auf ihre Stabilität über die Dauer einer Woche getestet. Cryptophycin-55-glycolat (**43**) ist demnach ebenso stabil wie Cryptophycin-52 (**3**) und Cryptophycin-55-glycinat (**39**). Gleichzeitig wurde die auch schon von anderen Gruppen festgestellte Hydrolyse von Cryptophycin-55 (**36**) zu **3** beobachtet. ^[101,102] Sie konnte jedoch mit der verwendeten Methode nicht quantifiziert werden. Eine bisher nicht publizierte Substitution des Chlorids am A-Fragment wurde für **47** festgestellt.

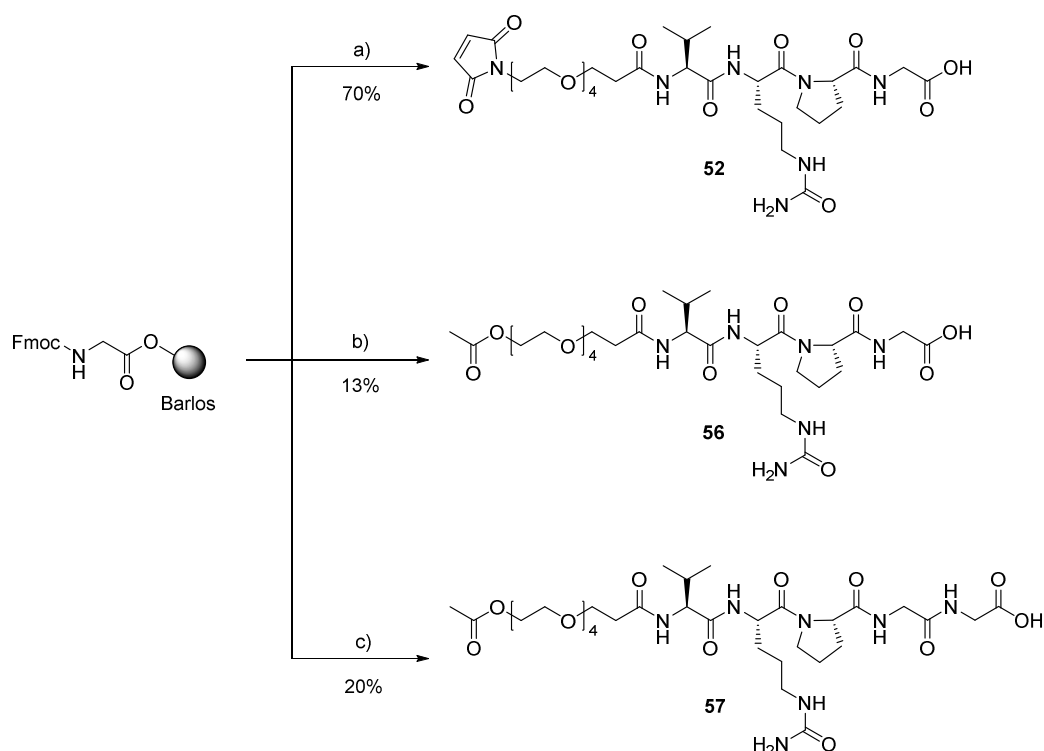
Mit Hilfe eines zellbasierten Zytotoxizitätsassays wurden die drei literaturbekannten Cryptophycine **3**, **36** und **39** sowie die zwei neu synthetisierten Cryptophycin-Derivate **43** und **47** auf ihre Bioaktivität gegenüber einer nicht-resistenten (KB-3-1) und einer resistenten (KB-V1) Zelllinie

getestet. Hierbei zeigte sich, dass **47** nicht ausreichend lange stabil war, um die Tests durchführen zu können. Der direkte Vergleich des Cryptophycin-55-glycinats (**39**) mit dem Cryptophycin-55-glycolat (**43**) zeigt, dass die Aktivität von Letzterem um das 2-fache geringer ist gegenüber KB-3-1-Zellen und um das 3-fache gegenüber KB-V1-Zellen.



Schema 5-2: Synthese der Cryptophycin-Derivate **39**, **43** und **47** aus Cryptophycin-52 (**3**) mit den jeweiligen IC_{50} -Werten. a) HCl in Dioxan, abs. DCM, $-50^{\circ}C$, 2 h; b) 1.: **37**, DCC, DMAP, abs. DCM, RT, 2 h; 2.: HCl in Dioxan, abs. DCM, RT, 24 h; c) 1.: **41**, DCC, DMAP, abs. DCM, RT, 3 h; 2.: TFA/TIS/DCM, RT, 1 h; d) 1.: **45**, DCC, DMAP, abs. DCM, RT, 2 h; 2.: TFA, DCM, RT, 1 h.

Die Synthese der Tetrapeptid-Linker erfolgte an der festen Phase. Nach Immobilisierung der ersten Aminosäure, Fmoc-Glycin, am Harz wurden die weiteren Aminosäuren, der Maleimid-funktionalisierte PEG-Linker **51** oder der Acetyl-funktionalisierte PEG-Linker **55** unter Verwendung von Standard-Kopplungsreagenzien hinzugefügt (Schema 5-3).



Schema 5-3: Synthese der Linker **52**, **56** und **57** an der festen Phase. a) 1. Piperidin/DMF 1:4; 2. Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**51**, TBTU, HOBT-H₂O, DIPEA, DMF; 3. 1% TFA in DCM; b) 1. Piperidin/DMF 1:4; 2. Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**55**, TBTU, HOBT-H₂O, DIPEA, DMF; 3. 1% TFA in DCM; c) 1. Piperidin/DMF 1:4; 2. Fmoc-Gly/Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**55**, TBTU, HOBT-H₂O, DIPEA, DMF; 3. 1% TFA in DCM.

Die entstandenen drei Linker wurden daraufhin mit Cryptophycin-55-glycinat (**39**), beziehungsweise dem Farbstoff 7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)cumarin zu Linker-Cryptophycin-Konjugat **53** sowie zwei Modellsubstraten zur Cathepsin B-Spaltung umgesetzt. Aufgrund der Instabilität der Modellsubstrate schon in dem zur Cathepsin B-Spaltung verwendeten Puffersystem wurde die Spaltung an ihnen nicht weiter verfolgt.

Das PABA-basierte Linkersystem wurde in Lösung synthetisiert. Fmoc-L-Valin wurde mit NHS aktiviert und danach mit L-Citrullin zum Fmoc-geschützten Dipeptid umgesetzt. Nach Aktivierung der Carboxyfunktion mit EEDQ wurde der *p*-Aminobenzylalkohol eingeführt und der entstandene Alkohol mit Diethylamin entschützt. Mit HATU und HOAt konnte der Maleimid-funktionalisierte PEG-Linker an das freie Amin geknüpft werden. Die freie Hydroxyfunktion des *p*-Aminobenzylalkohols wurde mit Bis-NPC derivatisiert zu **67**. Weiteres Umsetzen von **67** mit Boc-geschütztem *N,N'*-Dimethylethylendiamin und anschließendes Entschützen lieferte den Linker **71** (siehe Abbildung 5-1).

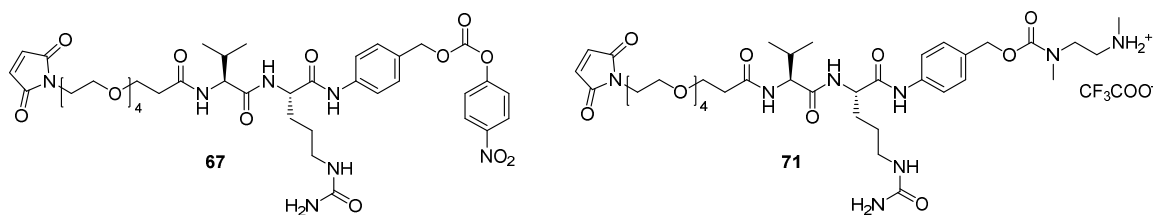


Abbildung 5-1: Auf PABA beruhende synthetisierte Linkersysteme **67** und **71**.

Mit den drei synthetisierten Linkersystemen **52**, **67** und **71** gelang die Synthese von drei Linker-Cryptophycin-Konjugaten **53**, **72** und **73** (Abbildung 5-2). Im Hinblick auf eine spätere intravenöse Applikation der Cryptophycin-ADCs wurden diese erfolgreich auf ihre Stabilität in drei verschiedenen Puffersystemen (pH = 4, 7.4 und 8), sowie ihre Spaltbarkeit durch die lysosomale Protease Cathepsin B getestet. Es zeigte sich, dass die Linker-Cryptophycin-Konjugate unterschiedlich stabil in wässrigen gepufferten Systemen sind und sowohl einer Hydrolyse des Maleimid-Rests als auch des Chlorids am A-Fragment unterliegen. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass **53** die beste Wasserlöslichkeit besitzt, hingegen aber auch relativ zügig der Hydrolyse des Chlorids am A-Fragment unterliegt. **72** und **73** sind im Gegensatz dazu weniger gut wasserlöslich und präzipitieren schon nach kurzer Zeit in wässrigen Lösungen, unterliegen aber auch einer Hydrolyse.

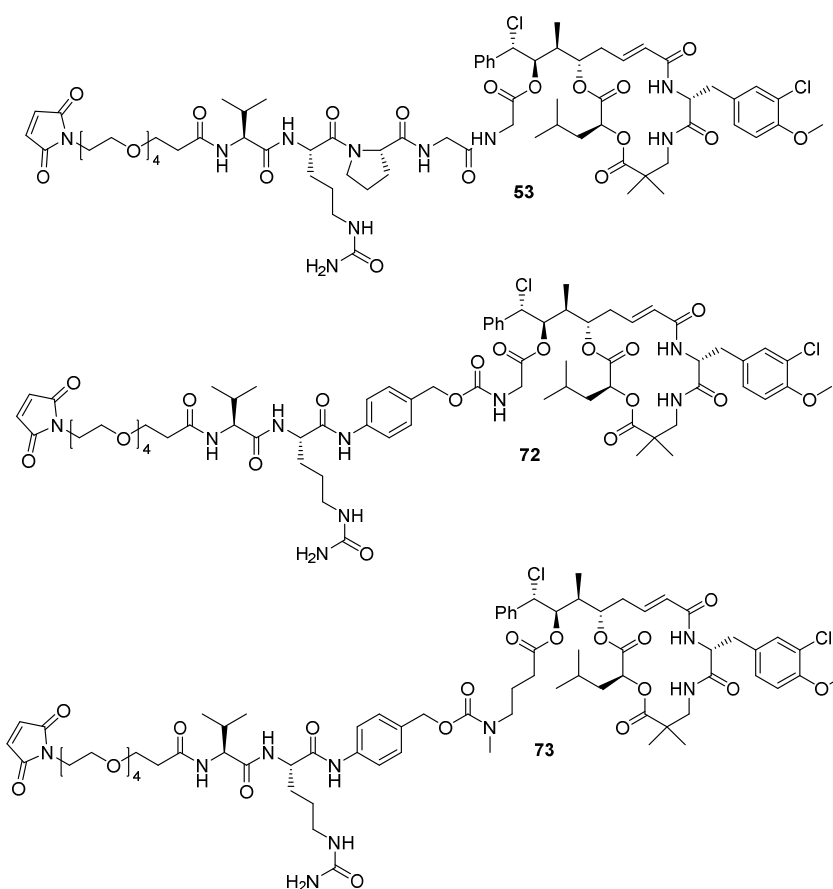


Abbildung 5-2: Vollständig und erfolgreich synthetisierte Linker-Cryptophycin-Konjugate **53**, **72** und **73**.

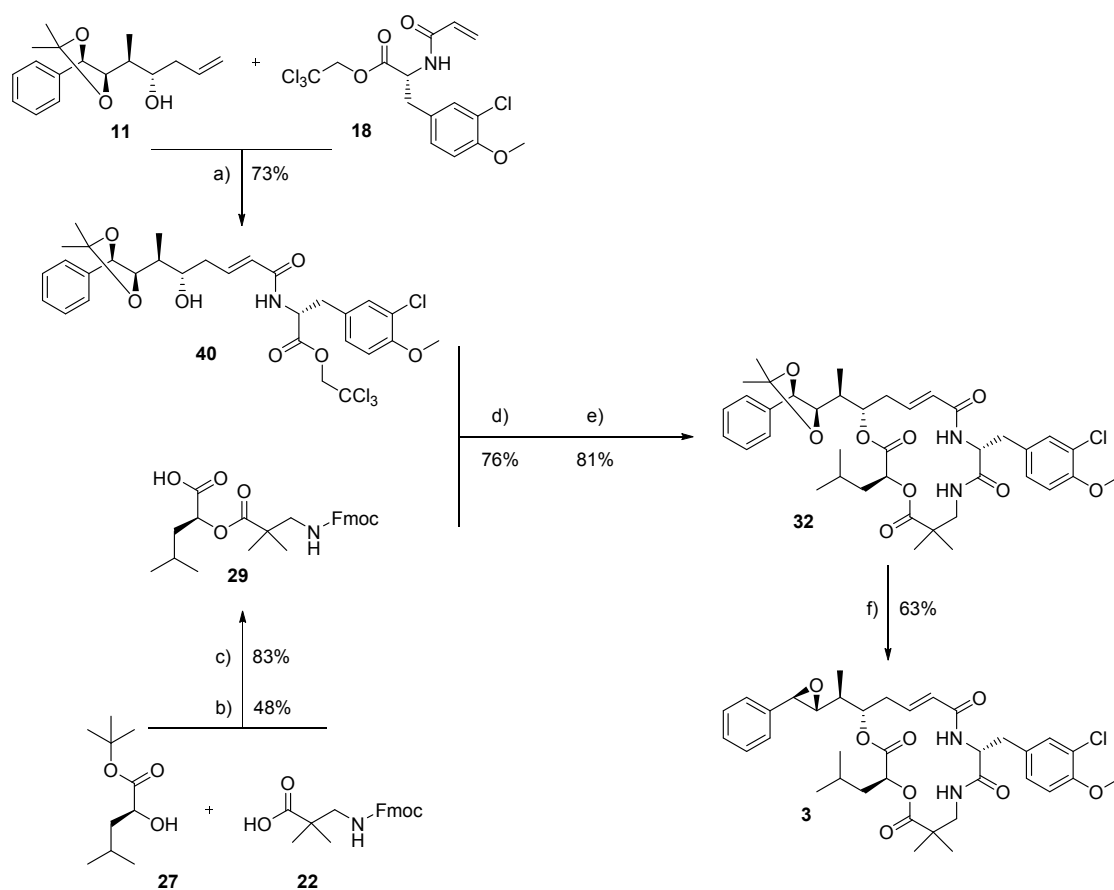
Die Spaltung mit dem Enzym Cathepsin B war nur bei den mit Cystein abgesättigten Linker-Cryptophycin-Konjugaten erfolgreich, die auf **72** und **73** beruhten.

Eine Konjugation von **53** und **73** an das rIgG-Fragment des Antikörpers Herceptin® gelang. Erste Zytotoxizitätstests sehen vielversprechend aus und zeigen, dass Proben, in denen **53** an den reduzierten Antikörper Trastuzumab konjugiert ist deutlich aktiver sind, als der reduzierte Antikörper selbst.

6 Summary

Antibody-drug conjugates show enhanced selectivity of chemotherapeutics in the therapy of cancer. The selection of an appropriate antibody allows to selectively target an antigen that is overexpressed by tumor cells and hence deliver an antibody-bound drug site specifically. It has been shown that cryptophycins can target multidrug-resistant cells. Linking cryptophycins to an antibody could be beneficial in the therapy of cancer. ^[72,75]

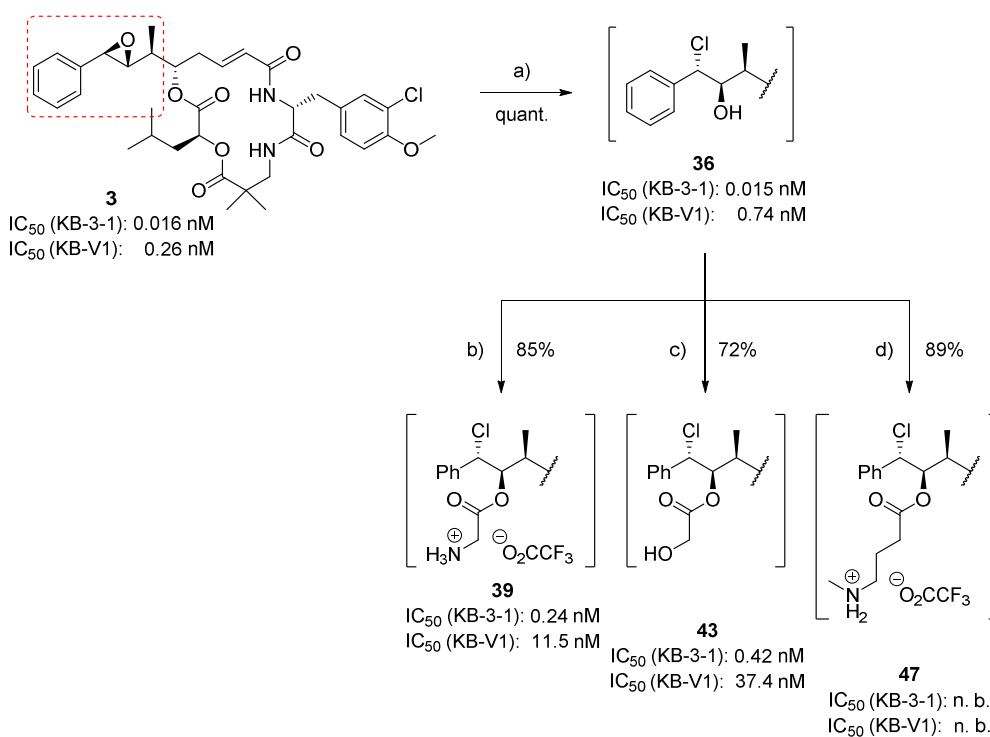
Synthesis of the cryptophycin-ADCs was conducted in a stepwise manner, starting with the build-up of the cryptophycin-derivatives. Afterwards the suitable linkers were synthesized which were attached to the cryptophycin-derivatives *via* a carbamate linkage. Retrosynthetically the cryptophycins can be partitioned into four fragments (A – D). Depending on the final target, those fragments are linked before the macrocycle is established. Cryptophycin-55 (**36**) was synthesized according to a previously published procedure by WEISS. ^[96] The fragments (A and B) were synthesized individually (Scheme 6-1) and coupled *via* metathesis to the AB-fragment **40**. Fragment C was condensed with fragment D to yield the CD-fragment **29** in a STEGLICH esterification. Final assembly of fragments AB and CD to yield the macrocycle **32** was achieved in two steps. In the first step an esterification between the fragments AB and CD was performed, followed by a macrolactamisation to yield the desired product. Diol-epoxide-transformation over four steps lead to cryptophycin-52 (**3**).



Scheme 6-1: Convergent synthetic route towards Cryptophycin-52 (**3**) following WEISS. a) Grubbs-II catalyst, abs. DCM, rt, o. n.; b) DCC, DMAP, abs. DCM, 0°C → rt, 17 h; c) TFA, DCM, 0°C → rt, 5 h; d) 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, DMAP, NEt₃, abs. THF, 0°C, 3 h; e) piperidine, abs. DMF, rt, 2 h; f) 1.: TFA, abs. DCM, H₂O, rt, 1.5 h; 2.: PPTS, abs. (CH₃O)₃CH, abs. DCM, rt, 2.5 h; 3.: AcBr, abs. DCM, rt, 4.5 h; 4.: K₂CO₃, DME/glycole (2:1 v/v), rt, 2.5 min.

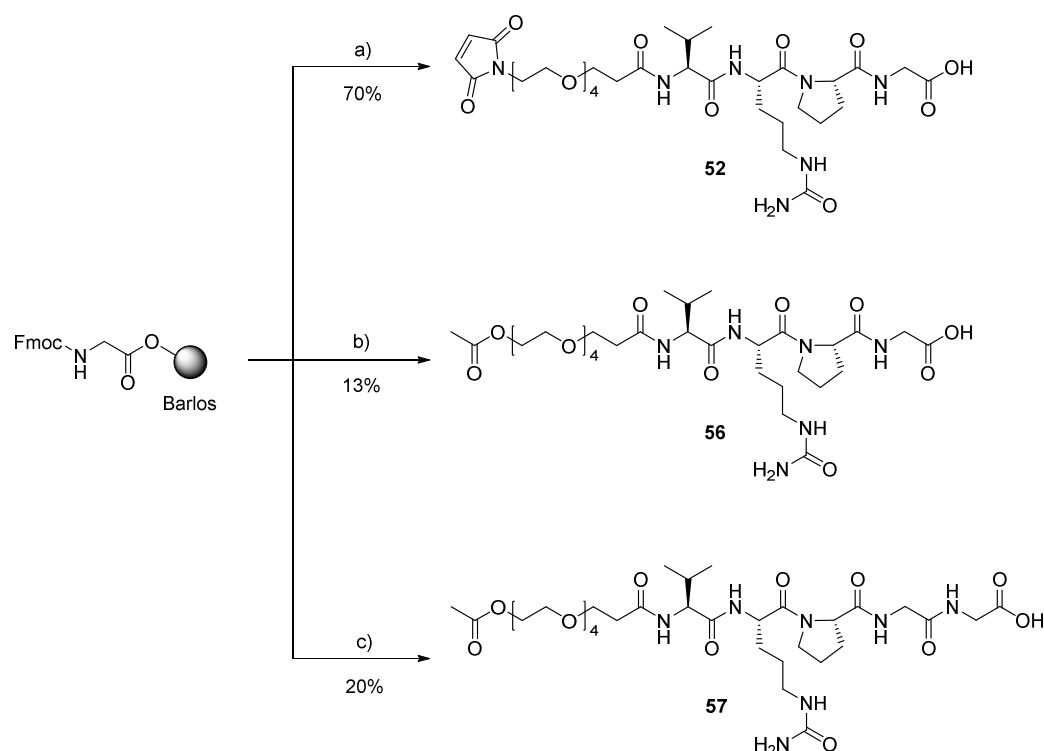
Opening of the epoxide **3** lead to chlorohydrin **36** which was esterified with three different protected short-chain amino- and hydroxyacids. Within two steps cryptophycin-55-glycinate (**39**), cryptophycin-55-glycolate (**43**) and cryptophycin-55-*N*-methylaminobutyrate (**47**) were obtained (Scheme 6-2). Stability of these compounds was tested in three different buffers with different pH (4, 7.4 and 8) over one week. It was found that cryptophycin-55-glycolate (**43**) is as stable as cryptophycin-52 (**3**) and cryptophycin-55-glycinate (**39**). Hydrolysis of cryptophycin-55 (**36**) to epoxide **3** was observed as previously reported by GEORG *et al.* and LIANG *et al.* [101,102] A quantification was not possible with the utilized method. Interestingly, **47** showed an unpublished substitution of the chloride of fragment A.

In a cell-based cytotoxicity assay the bioactivities of the known cryptophycins **3**, **36** and **39** as well as the new derivatives **43** and **47** towards a non-resistant (KB-3-1) and a resistant (KB-V1) cellline were tested. The results showed that **47** does not show sufficient stability for the duration of the test. Direct comparison of cryptophycin-55-glycinate (**39**) and cryptophycin-55-glycolate (**43**) shows that **43** is twofold less active towards KB-3-1-cells and threefold less active towards KB-V1-cells than **39**.



Scheme 6-2: Synthesis of Cryptophycin-derivatives **39**, **43** and **47** from Cryptophycin-52 (**3**) and their respective IC_{50} -values. a) HCl in dioxane, abs. DCM, $-50^{\circ}C$, 2 h; b) 1.: **37**, DCC, DMAP, abs. DCM, rt, 2 h; 2.: HCl in dioxane, abs. DCM, rt, 24 h; c) 1.: **41**, DCC, DMAP, abs. DCM, rt, 3 h; 2.: TFA/TIS/DCM, rt, 1 h; d) 1.: **45**, DCC, DMAP, abs. DCM, rt, 2 h; 2.: TFA, DCM, rt, 1 h.

With solid phase peptide synthesis the tetrapeptide-linkers were synthesized. After immobilization of the first amino acid, fmoc-glycine, the other amino acids and the maleimide-functionalized PEG-linker **51** or the acetyl-functionalized PEG-linker **55** were added with the use of standard coupling reagents (Scheme 6-3).



Scheme 6-3: Solid phase peptide synthesis of linkers **52**, **56** and **57**. a) 1.: piperidine/DMF 1:4; 2.: Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**51**, TBTU, HOBT·H₂O, DIPEA, DMF; 3.: 1%TFA in DCM; b) 1.: piperidine/DMF 1:4; 2.: Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**55**, TBTU, HOBT·H₂O, DIPEA, DMF; 3.: 1%TFA in DCM; c) 1.: piperidine/DMF 1:4; 2.: Fmoc-Gly/Fmoc-Pro/Fmoc-Cit/Fmoc-Val/**55**, TBTU, HOBT·H₂O, DIPEA, DMF; 3.: 1%TFA in DCM.

The resulting linkers were consecutively reacted with cryptophycin-55-glycinate (**39**) or 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarine which resulted in linker-cryptophycine-conjugate **53** and two modelsubstrates for cathepsin b cleavage tests. Due to the instability of those modelsubstrates the cathepsin b cleavage was not further examined with them.

PABA-based linkersystem **71** was synthesized in solution. After NHS-activation of fmoc-L-Val it was converted to the fmoc-protected dipeptide with L-Citrulline. Further activation of the carboxy-function with EEDQ and subsequent reaction with *p*-aminobenzyl alcohol lead to an alcohol which was deprotected with diethylamine. With the reagents HATU and HOAt it was possible to attach the maleimid-functionalized PEG-linker **51** to the free amine. The free hydroxyl-function of the *p*-aminobenzyl alcohol was derivatized with Bis-NPC to **67**. Further reaction with boc-protected *N,N'*-dimethylethylenediamine and consecutive deprotection resulted in **71** (see Figure 6-1).

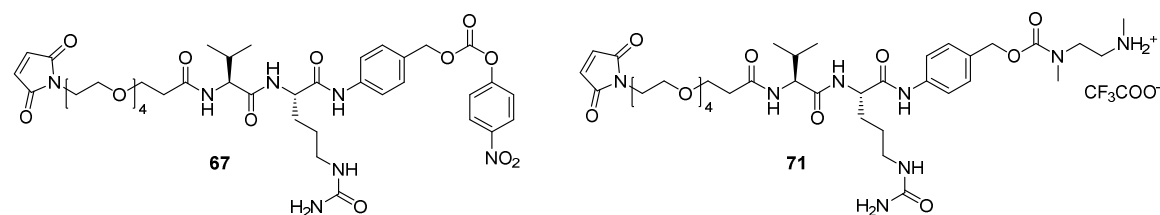


Figure 6-1: PABA based linkersystems **67** and **71**.

The synthesis of three linker-cryptophycine-conjugates **53**, **72** and **73** (Figure 6-2) was achieved with the synthesized linkersystems **52**, **67** and **71**. In regard to the potential intravenous application of the cryptophycin-ADCs, they were successfully tested for their stability in three different buffer systems (pH = 4, 7.4 and 8) as well as for their ability to be cleaved by the lysosomal cysteine protease cathepsin B. It became obvious that the linker-cryptophycin-conjugates show various stabilities in buffered systems and additionally underlie hydrolysis of the maleimide and the A-fragments chloride. At the same time it was determined that **53** possesses the best solubility in aqueous systems but additionally the A-fragments chloride hydrolyses very fast. Contrary to that, **72** and **73** are less water-soluble and precipitate very fast in aqueous solutions. They underlie hydrolysis as well.

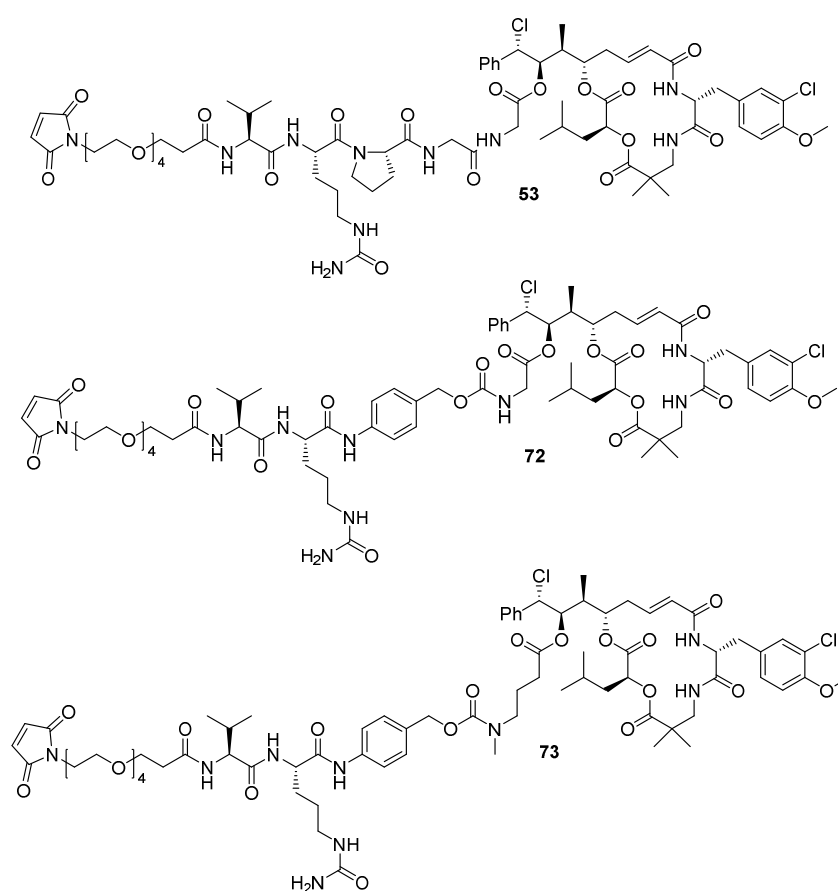


Figure 6-2: Successful synthesized linker-cryptophycin-conjugates **53**, **72** and **73**.

Enzymatically cleavage with cathepsin B only proceeded with cysteine-saturated linker-cryptophycin-conjugates based on **72** and **73**.

Conjugation of **53** and **73** to the rIgG-fragment of the mAb Herceptin® worked. First cytotoxic assays seem promising and show that samples which contain **53** conjugated to the reduced monoclonal antibody Trastuzumab offer superior activities than the unconjugated reduced antibody.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien und Methoden

7.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien und Lösungsmittel wurden in angemessener Reinheit bezogen und soweit nicht weiter vermerkt, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die von der Firma ACROS ORGANICS bezogene *n*-BuLi-Lösung (1.6 M in Hexan) wurde, wie unter 7.1.3 beschrieben, vor Gebrauch titriert. Lösungsmittel, die nur in technischer Qualität bezogen wurden, wurden vor Gebrauch in der Reaktion, Extraktion, Chromatographie oder Kristallisation destillativ gereinigt. Das Absolutieren verschiedener Reagenzien und Lösungsmittel wurde, wie nachfolgend beschrieben, unter Schutzgas (Argon) und teilweise mit vermindertem Druck durchgeführt und die Destillate anschließend unter Argon und, wo nötig, im Dunkeln aufbewahrt.

Acetondimethylacetal: Destillation über CaH₂;

tert-Butanol: Destillation über CaH₂;

Dichlormethan: Destillation über CaH₂;

1,2-Dimethoxyethan: Destillation über Na/Benzophenon;

***N,N*-Dimethylformamid:** Destillation über CaH₂;

Ethylenglykol: Destillation über Na;

Piperidin: Destillation über CaH₂;

Tetrahydrofuran: Vortrocknung über KOH, Destillation über Na/Benzophenon;

Triethylamin: Destillation über CaH₂;

Trimethylorthoformiat: Destillation über CaH₂;

7.1.2 Allgemeine Arbeitstechniken

Experimente, die es erforderten unter Feuchtigkeits- oder Sauerstoffausschluss zu arbeiten, wurden unter Verwendung der Schlenktechnik unter Schutzgas (Argon mit einer Reinheit von $\geq 99.996\%$, welches zusätzlich über Sicapent[®] getrocknet wurde) durchgeführt. In einigen Fällen wurden die Apparaturen vorher im Vakuum mehrfach bei ca. 0.01 mbar ausgeheizt und anschließend mit Argon befüllt.

Am Rotationsverdampfer wurden unter vermindertem Druck und, soweit nicht anders beschrieben, bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C, Lösungsmittel und andere flüchtige Bestandteile aus Reaktionsgemischen und Extrakten abgetrennt. Hochsiedende Rückstände und Lösungsmittel genauso wie Restlösemittel die noch in aufgereinigte Verbindungen enthalten waren, wurden im Drehschieberpumpenvakuum (ca. 0.01 mbar) möglichst vollständig entfernt. Teilweise wurde dies durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff oder Erwärmen auf bis zu 60°C unterstützt.

7.1.3 Titration der kommerziell erhältlichen *n*-BuLi-Lösung

Die kommerziell erhältliche *n*-BuLi-Lösung wurde zur Bestimmung ihrer genauen Konzentration (Berechnung siehe Gleichung 1) mit einer Mischung aus Menthol (300 mg) und 1,10-Phenanthrolin (eine kleine Spatelspitze) in abs. THF (4 mL) titriert. 1,10-Phenanthrolin dient hierbei als Farbindikator und die Titration ist beendet, sobald ein Farbwechsel von lindgrün nach rosa erfolgt.

$$c_{n\text{-BuLi}} = \frac{m_{\text{Menthol}}}{M_{\text{Menthol}} \cdot V_{n\text{-BuLi}}} \quad \text{Gleichung 1}$$

$c_{n\text{-BuLi}}$ = Konzentration der *n*-BuLi-Lösung [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]; m_{Menthol} = eingewogene Masse an Menthol [g]; M_{Menthol} = Molare Masse von Menthol [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]; $V_{n\text{-BuLi}}$ = Volumen der verbrauchten *n*-BuLi-Lösung [L]

7.1.4 Säulenchromatographie

Zur präparativen säulenchromatographischen Trennung wurde von der Firma MACHEREY-NAGEL Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40 – 63 μm (230 – 400 mesh) als stationäre Phase verwendet.

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Aluminium-Kieselgelkarten 60 mit dem Fluoreszenzindikator F₂₅₄ der Firma MERCK durchgeführt. Danach wurde durch Fluoreszenzlöschung mit Hilfe des Fluoreszenzindikators bei einer Wellenlänge von 254 nm und/oder durch Eintauchen in eine der nachfolgend aufgeführten Färbereagenzien und anschließendes Erwärmen mit einem Heißluftgebläse detektiert. Verwendete Laufmittelgemische sind bei jedem Versuch angegeben.

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

H ₂ O	180 mL
------------------	--------

Ninhydrin-Lösung:

Ninhydrin	0.3 g
2-Propanol	100 mL
Essigsäure (99.9%)	3.0 mL

7.1.5 NMR-Spektroskopie

Die Messung der NMR-Spektren erfolgte an drei verschiedenen Geräten der Firma BRUKER. Hierbei handelte es sich dabei um ein AV – 300 (¹H-NMR: 300 MHz; ¹³C-NMR: 75 MHz), ein DRX – 500 (¹H-NMR: 500 MHz; ¹³C-NMR: 126 MHz) und ein AV – 600 (¹H-NMR: 600 MHz; ¹³C-NMR: 151 MHz). Alle Proben wurden in deuterierten Lösungsmitteln gemessen und die chemischen Verschiebungen als δ -Werte in ppm angegeben, bezogen auf den internen Standard Tetramethylsilan ($\delta = 0.00$) oder auf die Restlösungsmittelsignale.^[172] Die Signale wurden aus den eindimensionalen Spektren so eindeutig wie möglich zugeordnet. Zur vollständigen Zuordnung wurden zusätzlich zweidimensionale Spektren (COSY, HMQC und HMBC) sowie DEPT-135-Spektren zur Hilfe genommen.

Um die Zuordnung der Signale in den Cryptophycinen übersichtlicher zu machen, wurden die Signale für die verschiedenen Fragmente mit den Vorsätzen uA, uB, uC und uD gekennzeichnet. Die Kohlenstoffatome wurden, jeweils ausgehend vom höchst oxidierten Kohlenstoffatom, mit griechischen Buchstaben (C^α , C^β , C^γ , ...) versehen (siehe Abbildung 7-1). Bei den Peptidfragmenten wird jeweils der Dreibuchstabencode der jeweiligen Aminosäure oder der Kurzname des Fragmentes vor oder hinten angestellt.

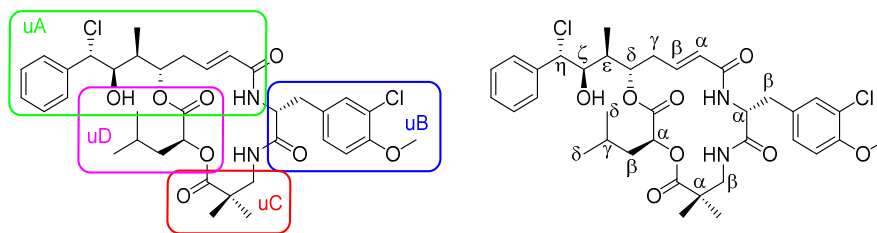


Abbildung 7-1: Zuordnung der Signale in der NMR-Spektroskopie am Beispiel des Cryptophycin-55 (36). Links: Einteilung in die Fragmente; Rechts: die jeweiligen Positionen in der Kette.

7.1.6 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Messungen wurden an vier verschiedenen Geräten durchgeführt. Es handelte sich dabei um:

1. MALDI-ToF Voyager DE (PE BIOSYSTEMS) mit 1.2 m Flugrohrlänge. Dabei wurde die Ionisierung der Probe durch eine N₂-Laser (λ -337 nm, Pulsbreite 3 ns, Wiederholungsrate 3 Hz) durchgeführt und 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix verwendet. (Gerät für MALDI-ToF-Spektren; Bielefeld)
2. ESI Esquire 3000 Ionenfallen-Massenspektrometer von BRUKER DALTONIK. Die Probeneinführung wurde in Lösung direkt über eine Spritzenpumpe vorgenommen. Stickstoff diente als Zerstäubungs- und Trockengas, Helium als Kollisionsgas. (Gerät für ESI-MS-Spektren; Bielefeld)
3. APEX III (FT-ICR MS) der Firma BRUKER DALTONIK. Das Gerät ist mit einer externen (Nano-)ESI-Ionenquelle ausgestattet und auch hier dient Stickstoff als Zerstäubungs- und Trockengas. (Gerät zur Feinmassenbestimmung; Bielefeld)
4. LTQ-Orbitap XL hybrid Instrument der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC, welches mit einem analytischen HPLC 1200 System der Firma AGILENT verknüpft ist. Es wurde eine Hypersil-Gold-Säule (5 μ m; 50 x 2.1 mm; THERMO FISHER SCIENTIFIC) verwendet, für die A: H₂O (100% + 0.1% HCOOH) und B: MeCN (100% + 0.1% HCOOH) als mobile Phase dienten. Die Proben wurden mit einem linearen Gradienten von 5% - 100% MeCN analysiert mit einer Flussrate von 0.4 mL/min. (Gerät für HPLC-HR-MS-Spektren; Arbeitsgruppe SÜßMUTH in Berlin)

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
5	5	95
8	5	95
8.1	95	5
11	95	5

7.1.7 Analytische RP-HPLC

Verwendet wurde eine HPLC-Anlage der Firma THERMO SCIENTIFIC (Pumpe: Accela 600, Autosampler: Accela; Diodenarray-Detektor: Accela PDA; Vorsäule: PHENOMENEX Vydac High Performance Protein Peptide C18; Säule: THERMO SCIENTIFIC Hypersil Gold, Korngröße 3 μm , 2.1 (D) x 150 mm). Der Eluent war eine Mischung aus Eluent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ 5:95:0.1 v:v:v) und Eluent B ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ 95:5:0.1 v:v:v).

Methode 1 (220 und 254 nm):

Flussrate = 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100
10	100	0
12	0	100

Methode 2 (220 und 254 nm):

Flussrate = 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100
5	100	0
6	0	100
6.5	0	100

7.1.8 Präparative RP-HPLC

Es wurden zwei verschiedene HPLC-Anlagen verwendet.

Anlage 1: Präparative HPLC-Anlage LaChrom der Firma MERCK-HITACHI (Interface Modul: D-7000; Pumpe: L-7150; UV-Vis-Detektor: L-7420; Säule: THERMO SCIENTIFIC Hypersil Gold, Korngröße 8 μm , 21.2 (ID) x 250 mm). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Methode 3 (Eluenten A und B s.o.):

Flussrate = 10 mL·min⁻¹

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100
5	0	100
35	100	0
40	100	0
45	0	100

Anlage 2: Präparative HPLC-Anlage SpectraSYSTEM der Firma THERMO SCIENTIFIC (Interface Modul: SN-4000; Pumpe: P-4000; UV-Vis-Detektor: UV1000; Säule: THERMO SCIENTIFIC Hypersil Gold, Korngröße 8 µm, 21.2 (ID) x 250 mm). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 220 bzw. 254 nm.

Methode 4 (Eluenten A und B s.o.; $\lambda = 254$ nm):

Flussrate = 10 mL·min⁻¹

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100
5	0	100
35	100	0
40	100	0
45	0	100

Methode 5 (Eluenten A und B, Gradient und Flussrate siehe Methode 4; $\lambda = 220$ nm).

7.1.9 Polarimetrie

Zur Bestimmung der spezifischen Drehwerte wurde ein Digitalpolarimeter des Typs DIP-360 von der Firma JASCO verwendet. Es wurde jeweils bei Raumtemperatur gemessen und die bei den entsprechenden Substanzen angegebenen Konzentrationen und Lösungsmittel verwendet. Als Küvette wurde eine Quarzglasküvette verwendet und bei einer Wellenlänge von 589 nm (Natrium

D-Linie, Monochromator) gemessen. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_{RT}^D$ wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[\alpha]_{RT}^D = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c} \quad \text{Gleichung 2}$$

mit $[\alpha]_{RT}^D$ = spezifischer Drehwert [$10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$]; α = gemessener Drehwert [deg]; l = Länge der Küvette [dm]; c = Konzentration [$\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$].

7.1.10 Stabilitätsassays

Die Stabilität der synthetisierten Cryptophycine und Cryptophycin-Derivate wurde mittels analytischer HPLC (siehe 7.1.7 Analytische RP-HPLC) verfolgt. Hierfür wurden von jeder Substanz Stammlösungen mit 1 mg/mL in deuteriertem DMSO hergestellt.

5% DMSO-Anteil: 50 μL der Stammlösungen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ d in 950 μL eines Puffers gegeben und über eine Woche alle 24 h eine HPLC-Messung vorgenommen.

30% DMSO-Anteil: 50 μL der Stammlösungen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ d in eine Lösung aus 250 μL DMSO und 700 μL Puffer gegeben und über eine Woche alle 24 h eine HPLC-Messung vorgenommen.

Die verwendeten Puffer sind:

Acetat-Puffer **pH = 4**

25 mM NaOAc

75 mM NaCl

Phosphat-Puffer **pH = 7.4**

25 mM Na_2HPO_4

75 mM NaCl

HEPES-Puffer **pH = 8**

25 mM HEPES

75 mM NaCl

Speziell für die Stabilitätsassays wurde folgende Methode für die analytische HPLC programmiert und angewendet:

Methode 6 (Eluenten A und B siehe oben; $\lambda = 220/254 \text{ nm}$)

Flussrate: $700 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100
5	100	0
6	100	0
7	0	100
8	0	100

Um Verunreinigungen durch den normalen täglichen Betrieb der HPLC zu minimieren beziehungsweise ganz ausschließen zu können, wurden mindestens fünf Waschläufe sowohl mit Millipore-Wasser als auch mit den Puffersystemen durchgeführt. Um Verschiebungen in den Retentionszeiten durch erneutes Ansetzen der Laufmittelgemische innerhalb der Dauer einer Messreihe zu vermeiden, wurde nur ein frisch hergestelltes Eluentenpaar verwendet.

7.1.11 Antikörperreduktion

Der Antikörper wurde nach zwei verschiedenen Protokollen (siehe AAV – 6 und 7.5.2.1) reduziert. Bei den dafür verwendeten Puffersystemen und Lösungen, die alle mit MPW angesetzt wurden, handelt es sich um die Folgenden:

PBS-Puffer **pH = 7.2**

137 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
10 mM	Na_2HPO_4
2 mM	KH_2PO_4

TCEP-Lösung

2.9 mM	TCEP
in PBS-Puffer	

PBS-EDTA-Puffer **pH = 7.2**

137 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
10 mM	EDTA

2-MEA-Lösung

528 mM	2-MEA
in PBS-EDTA-Puffer	

7.1.12 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) des Antikörpers und der ADCs

Die SDS-PAGE wurde mit der *Electrophoresis Power Supply* – EPS 601 Einheit und einer Hoefer SE 600 Ruby *standard vertical electrophoresis* Einheit der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES durchgeführt. Die Proben wurden erst im Sammelgel durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 25 mA aufkonzentriert, danach wurde die Stromstärke auf 50 mA erhöht und die Proben im Trenngel nach ihren Molekulargewichten aufgespalten. Als Protein-Massenmarker diente der ColorPlus™ Prestained Protein Marker für den Bereich von 7 – 175 kDa.

Lösungen	10% Trenngel	4% Sammelgel
MPW	15.38 mL	4.81 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	9.37 mL	-
Tris 0.5 M pH 6.8	-	2.1 mL
10% SDS	375 µL	83.5 µL
40% Acrylamid	9.38 mL	0.84 mL
TEMED	18.7 µL	8.35 µL
1.5% APS	3 mL	0.5 mL

Bei den verwendeten Puffern sowie Färbe- und Entfärbelösungen, die alle mit MPW angesetzt wurden, handelt es sich um:

Sammelgelpuffer **pH = 6.8**

0.5 M	Tris
-------	------

Trenngelpuffer	pH = 8.8
1.5 M	Tris
3x SDS-Ladepuffer	(reduzierend)
3.75 mL	0.5 M Tris (Sammelgelpuffer)
0.6 g	SDS
3 mL	Glycerin
1.5 mL	β -Mercaptoethanol
~ 0.3 mg	Bromphenolblau
3x SDS-Ladepuffer	(nicht reduzierend)
3.75 mL	0.5 M Tris (Sammelgelpuffer)
0.6 g	SDS
3 mL	Glycerin
~ 0.3 mg	Bromphenolblau
3.25 mL	MPW
10x Elektrophoresepuffer	
1.92 M	Glycin
250 mM	Tris
1% (w/v)	SDS
Coomassie-Färbelösung	
0.02% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
5% (w/v)	Aluminiumsulfat-18-Hydrat
10% (w/v)	Ethanol
2% (w/v)	<i>o</i> -Phosphorsäure
Entfärbelösung	
10% (v/v)	Ethanol
2% (v/v)	<i>o</i> -Phosphorsäure

7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV – 1 Harzbeladung

2-Chlortritylchloridharz (1 eq; 1 g Harz/1.6 mmol AS) und Fmoc-AS (3 eq) werden unter Schutzgasatmosphäre in einer Mischung aus DIPEA (5 eq) und abs. DCM (5 mL/1 g Harz) suspendiert und für 3 - 20.5 h geschüttelt. Anschließend wird die Suspension über eine Spritze mit Membran filtriert und das Harz mit DMF und DCM (jeweils 3x) gewaschen. Das Harz wird mit MeOH für 10 min deaktiviert und erneut mit DMF und DCM (jeweils 3x) gewaschen. Es wird danach bis zur Bestimmung der Beladung im Exsikkator getrocknet.

AAV – 2 Bestimmung der Harzbeladung

Zur Bestimmung der Harzbeladung wird das beladene Harz (ca. 1 mg) in eine UV-Quarzküvette eingewogen und die Fmoc-Schutzgruppe durch Zugabe einer Lösung (3 mL) von Piperidin in DMF (20 Vol.-%) abgespalten. Es wird das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt gebildet, welches eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 290 nm besitzt. Diese Absorption (A_{290}) wird im UV-Vis-Spektrometer bestimmt. Hierzu wird die Küvette über mehrere Stunden mehrmals invertiert und nach Absinken des Harzes die Absorption gemessen. Der erhaltene Maximalwert wird zur Berechnung der Harzbeladung (siehe Gleichung 3) verwendet. Als Referenz dient die reine Abspaltungslösung.

$$\text{Beladung} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{A_{290}}{(1.65 \cdot m_{\text{Harz}}[\text{mg}])} \quad \text{Gleichung 3}$$

AAV – 3 Fmoc – Abspaltung

Das trockene Harz wird für circa 10 min mit DMF gequollen, welches danach abgelassen wird. Sodann wird eine Lösung aus Piperidin (20 Vol.-%) in DMF ($V_{\text{ges.}} = 10 - 20 \text{ mL}$, abhängig von der Ansatzgröße) auf das Harz gegeben und gelegentlich umgerührt. Nach 30 min wird die Lösung entfernt und der Vorgang (ohne Quellen) noch zweimal wiederholt. Danach wird das Harz mit DMF und DCM (jeweils 3x) gewaschen und der Erfolg der Fmoc-Abspaltung mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie überprüft. Hierfür werden wenige der Harzpellets in DCM/TFA (99/1; v/v) gegeben, um das Peptid vom Harz abzuspalten, und der Überstand als Probe in der massenspektrometrischen Analyse verwendet.

Sollte die Spaltung nicht vollständig sein, so kann die Lösung aus Piperidin (20 Vol.-%) in DMF gegen eine Lösung aus Piperidin (20 Vol.-%) und DBU (2 Vol.-%) in DMF ersetzt werden. Der Ablauf wird wie oben beschrieben beibehalten. Die verwendeten Mengen sind bei den jeweiligen Versuchen in tabellarischer Form angegeben.

AAV – 4 Kupplung mit weiteren Aminosäuren oder PEG-Linkern

Das trockene, beladene Harz wird für 10 min in DMF gequollen, welches dann wieder abgelassen wird. Die Fmoc-Aminosäure beziehungsweise der PEG-Linker wird mit DIPEA in DMF gelöst und dann auf das Harz gegeben. Danach werden die Kupplungsreagenzien (HOBt und TBTU oder HOAt und HATU) in DMF aufgenommen und auf das Harz gegeben. Es wird für mehrere Stunden bei RT gerührt, dann wird die Suspension filtriert und das Harz mit DMF (3x) und DCM (3x) gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wird über MALDI-ToF-MS überprüft und gegebenenfalls wiederholt.

AAV – 5 Abspaltung vom Harz

Die Linker werden mit TFA in DCM (1%; v/v; bis zu 10 mL) abgespalten. Dies erfolgte mehrfach für 5 min. Die vereinigten Abspalllösungen werden unter Verwendung von *i*-Propanol - um einen Anstieg der TFA-Konzentration während des Aufkonzentrierens zu vermeiden - im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die erhaltenen Rückstände werden durch präparative HPLC gereinigt.

AAV – 6 Reduktion mit TCEP

Zur Reduktion der Disulfidbindungen wird der Antikörper mit 9 mg/mL in dem hergestellten PBS-Puffer (pH = 7.2) gelöst. Von dieser Lösung werden 800 μ L mit 89 μ L der TCEP-Lösung versetzt und für 60 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Kühlung mit Eis verlangsamt und über eine HiTap™ Sephadex G-25 5 mL Säule von GE HEALTHCARE entsalzt. Dazu wird die Säule zunächst mit PBS-Puffer equilibriert. Dann wird die Probe (890 μ L) aufgetragen und bei einer Geschwindigkeit von 5 mL·min⁻¹ in kleinen Fraktionen eluiert. Jede der gesammelten Fraktionen wird mit Bradford-Lösung (bezogen von APPLICHEM) auf den Gehalt an Proteinen getestet. Dies geschieht indem 200 μ L der Bradford-Lösung mit 2 μ L der jeweiligen Fraktion versetzt werden. Eine Blaufärbung der Lösung zeigt an, dass Proteine enthalten sind. Von allen Fraktionen, die demnach Proteine enthalten, wird mit einem NanoDrop Spektrophotometer der Firma PEQLAB photometrisch der quantitative Proteingehalt bestimmt. Dabei wird die Absorption bei 280 nm

gemessen. Eine Absorption (A_{280}) von 1 entspricht hierbei einer Konzentration von 1 mg/mL Protein.

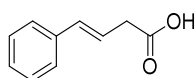
AAV – 7 **Bradford-Assay**

Zum Bestimmen der Proteinkonzentration der Antikörperproben wurden 10 μ L der jeweiligen Probe (oder einer Verdünnung davon) in einer 96-well Platte mit 200 μ L Bradford-Reagens versetzt und nach Mischen für 10 min bei RT inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm. Mit Hilfe einer Eichgerade wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Hierfür wurden jeweils 10 μ L der BSA-Standards mit den Konzentrationen 2000, 1500, 1000, 750, 250, 125, 25 und 0 μ g/mL mit 200 μ L Bradford-Reagens versetzt, ebenfalls nach Mischen 10 min bei RT inkubiert und danach bei 595 nm die Absorption der Lösung gemessen.

7.3 Synthese der Cryptophycine

7.3.1 Synthese des A-Fragments

7.3.1.1 *trans*-1-Phenylcrotonsäure (5) ^[173]



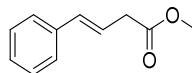
$$M = 162.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$$

Malonsäure (70.97 g; 682 mmol; 2.2 eq) wird in DMSO p.A. (250 mL) gelöst und mit einer Lösung aus Essigsäure p.A. (0.37 mL; 0.39 g; 6.64 mmol; 0.02 eq) und Piperidin (0.64 mL; 0.55 g; 6.47 mmol; 0.02 eq) in DMSO p.A. (15 mL) versetzt. Anschließend wird die Lösung auf 65°C erwärmt, wobei mit Anfang des Erwärmens Phenylacetaldehyd (36.1 mL; 38.8 g; 309 mmol; 1 eq) über eine Dauer von 90 min zugetropft wird. Dabei kommt es zu einer Gasentwicklung (CO_2). Nach Ende der Zugabe wird noch weitere 1.5 h bei 65-70°C gerührt. Danach wird abgekühlt und in H_2O dest. (750 mL) aufgenommen. Es wird mit Et_2O (1x 250 mL; 3x 200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit 5%iger KHSO_4 -Lösung und ges. NaCl -Lösung (je 50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Anschluss im Vakuum entfernt. Der entstandene gelbe Feststoff wird aus Toluol/Hexan 10:1 umkristallisiert. *Trans*-1-Phenylcrotonsäure (5) (18.96 g; 116.9 mmol; 38 %) wird als kristalliner, leicht gelblicher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 11.41 (s, 1H, COOH); 7.41 – 7.35 (m, 2H, $\text{C}^{\text{ortho}}\text{H}$ ortho); 7.34 – 7.27 (m, 2H, $\text{C}^{\text{meta}}\text{H}$ meta); 7.24 (m, 1H, $\text{C}^{\text{para}}\text{H}$ para); 6.52 (dm, 1H, $J = 15.9$ Hz, C^{β}H); 6.28 (dt, 1H, $J = 15.9/7.1$ Hz, C^{β}H); 3.30 (dd, 2H, $J = 7.1/1.4$ Hz, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 178.0 (COOH); 136.6 (C^{ar}); 134.0 ($\text{C}'\text{H}$); 128.6 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H meta}$); 127.7 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H para}$); 126.3 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H ortho}$); 120.8 (C^{β}H); 38.0 ($\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$).

7.3.1.2 *trans*-1-Phenylcrotonsäuremethylester (**6**) ^[173]



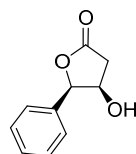
$$M = 176.21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$$

Zu einer Lösung von **5** (18.96 g; 116.9 mmol; 1 eq) in MeOH p.A. (140 mL) wird unter Eiskühlung innerhalb von 30 min Thionylchlorid (12.72 mL; 20.86 g; 175.4 mmol; 1.5 eq) zugetropft. Die Reaktionslösung wird unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit 1h bei RT gerührt. Nach erneuter Kühlung im Eisbad wird die Lösung mit H₂O dest. (100 mL) versetzt und anschließend mit Et₂O (5x75 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit H₂O dest. (5x50 mL) und ges. NaHCO₃-Lsg. (2x50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Ester **6** (20.54 g; 116.6 mmol; 99%) wird als leicht verunreinigte, gelbe Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Reinigung im folgenden Reaktionsschritt verwendet.

^1H -NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.40 – 7.34 (m, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H ortho}$); 7.34 – 7.27 (m, 2H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H meta}$); 7.23 (m, 1H, $\text{C}^{\text{ar}}\text{H para}$); 6.49 (dm, 1H, $J = 16.0$ Hz, $\text{C}'\text{H}$); 6.29 (dt, 1H, $J = 15.9/7.0$ Hz, C^{β}H); 3.71 (s, 3H, CH₃); 3.26 (dd, 2H, $J = 7.0/1.4$ Hz, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (75 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 172.1 (COO); 136.9 (C^{ar}); 133.6 ($\text{C}'\text{H}$); 128.7 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H meta}$); 127.7 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H para}$); 126.4 ($\text{C}^{\text{ar}}\text{H ortho}$); 121.8 (C^{β}H); 52.1 (CH₃); 38.4 ($\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$).

7.3.1.3 (4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-phenyldihydrofuran-2-on (**7**) ^[173]



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

Unter kräftigem Durchmischen mittels KPG-Rührer werden nacheinander K₂OsO₄·2H₂O (0.43 g; 1.17 mmol; 1 mol%), K₃[Fe(CN)₆] (95.96 g; 291.43 mmol; 2.5 eq) und K₂CO₃ (48.33 g; 349.71 mmol; 3.0 eq) in H₂O dest. (510 mL) aufgenommen. Zu der wässrigen Mischung werden nacheinander (DHQD)₂-PHAL (0.91 g; 1.17 mmol; 1 mol%) und Methansulfonamid (11.09 g; 116.57 mmol; 1.0 eq) unter portionsweiser Zugabe von *tert*-BuOH (490 mL) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird auf 0°C abgekühlt und daraufhin **6** (20.54 g; 116.57 mmol) zusammen mit *tert*-BuOH (20 mL) hinzugegeben. Bei 0°C - RT wird die Mischung 48 h lebhaft gerührt und die Reaktion danach durch Zugabe von Na₂SO₃·7H₂O (295.02 g; 1.17 mol; 10 eq) abgebrochen. Das

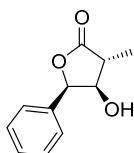
dunkle Reaktionsgemisch wird mit H₂O dest. (330 mL) versetzt wobei sämtliche Feststoffe in Lösung gehen. Nach erfolgter Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Et₂O (4x170 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O dest. und ges. NaCl-Lösung (je 170 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Das verbleibende orangene Öl wird in EtOAc (170 mL) aufgenommen und über eine 3x3 cm dünne Kieselgelschicht filtriert. Es wird mit EtOAc (260 mL) nachgewaschen. Die orangenen Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingeeengt und der Rückstand aus EtOAc/Hexan (170 mL; 9:1 v/v) versucht umzukristallisieren. Da dies nicht möglich ist, wird über eine Kieselgelschicht (3x12 cm) filtriert und mit EtOAc (200 mL) nachgespült. Das Lösungsmittel wird entfernt und das erhaltene Öl im HV getrocknet bis ein gelber, kristalliner Feststoff erhalten wird. Dieser wird aus EtOAc/Hexan (56 mL; 9:1 v/v) umkristallisiert. (4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-phenyldihydrofuran-2-on (**7**) (6.38 g; 35.81 mmol; 31%) wird als leicht gelber, kristalliner Feststoff erhalten.

$$[\alpha]_D^{RT} = -35.8 \text{ (c = 0.91 g/100 mL MeOH)} \quad \text{Lit.: } -37.7 \text{ (c = 0.92 g/100 mL MeOH)}^{[174]}$$

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.46 – 7.40 (m, 2H, C^{ar}H); 7.40 – 7.35 (m, 3H, C^{ar}H); 5.50 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, C^γH); 4.60 (m, 1H, C^βH); 2.88 (dd, 1H, *J* = 17.5/5.1 Hz, C^αH^AH^B); 2.70 (d, 1H, *J* = 17.5 Hz, C^αH^AH^B);

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 175.6 (COO); 133.2 (C^{ar}); 129.13/129.06/126.4 (C^{ar}H); 85.2 (C^γH); 70.3 (C^βH); 38.6 (C^αH₂).

7.3.1.4 (3*R*,4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-3-methyl-5-phenyldihydrofuran-2-on (**8**)^[173]



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

Eine auf -78°C gekühlte Lösung aus Diisopropylamin (15.64 mL; 11.26 g; 111.28 mmol; 2.5 eq) in abs. THF (340 mL) wird tropfenweise mit einer Lösung aus *n*-Butyllithium in Hexan (1.3 M; 85.6 mL; 111.28 mmol; 2.5 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wird 15 min bei -78°C und 30 min ohne Kältebad gerührt. Nach erneuter Abkühlung auf -78°C wird eine Lösung von **7** (7.93 g; 44.51 mmol; 1.0 eq) in abs. THF (113 mL) innerhalb von 60 min zugetropft. Anschließend wird die Lösung innerhalb von 60 min mit Methyljodid (8.32 mL; 18.95 g; 133.53 mmol; 3 eq) versetzt und 18 h bei -78°C gerührt. Nach Zugabe von AcOH (12 mL) wird die Mischung auf RT erwärmt und nach Zugabe von H₂O dest. (90 mL) werden die organischen Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der wässrige Rückstand wird mit H₂O dest. (280 mL) verdünnt und mit Et₂O (4x250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit 5%iger KHSO₄-Lösung und ges. NaCl-Lösung

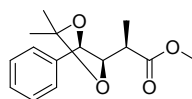
(je 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Reinigung über Kieselgel (PE/EtOAc 2:1) liefert **8** (6.16 g; 32.05 mmol; 72%) als orangenen Feststoff.

R_f (PE/EtOAc 2:1) = 0.20;

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.53 – 7.29 (m, 5H, C^{ar}H); 5.60 (d, 1H, J = 4.5 Hz, C^γH); 4.28 (m, 1H, C^βH); 2.74 (dq, 1H, J = 7.7/2.9 Hz, C^αH); 1.63 (m, 1H, OH); 1.39 (d, 3H, J = 7.7 Hz, CH₃);

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 178.4 (COO); 133.2 (C^{ar}); 129.1/129.0/126.4 (C^{ar}H); 82.6 (C^γH); 76.0 (C^βH); 43.6 (C^αH); 13.1 (CH₃).

7.3.1.5 (*R*)-2-((4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-propionsäuremethylester (**9**) ^[173]



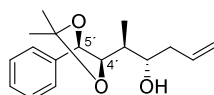
$M = 264.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ C₁₅H₂₀O₄

Eine Lösung von **8** (5.71 g; 29.71 mmol) in abs. 2,2-Dimethoxypropan (36 mL) und MeOH p.A. (10 mL) wird mit Amberlyst-15[®] (0.60 g, getrocknet im HV) versetzt und die Reaktionsmischung 4 Tage bei RT gerührt. Die dunkle Mischung wird filtriert und der Filtrerrückstand mit Hexan (500 mL) gewaschen. Das Filtrat wird mit ges. NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Reinigung über Kieselgel (PE/EtOAc 8:1) liefert **9** (5.98 g; 22.62 mmol; 76%) als leicht orangene, nadelförmige Kristalle.

R_f (PE/EtOAc 8:1) = 0.40;

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.44 – 7.28 (m, 5H, C^{ar}H); 4.74 (d, 1H, J = 8.5 Hz, C^γH); 4.11 (dd, 1H, J = 8.4/6.1 Hz, C^βH); 3.40 (s, 3H, COOCH₃); 2.67 (m, 1H, C^αH); 1.57 (s, 3H, C(CH₃)₂); 1.48 (s, 3H, C(CH₃)₂); 1.28 (d, 3H, J = 7.0 Hz, C^αHCH₃);

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 173.9 (COO); 137.3 (C^{ar}); 128.7/128.6/127.5 (C^{ar}H); 109.1 C(CH₃)₂; 83.3 (C^γH); 81.4 (C^βH); 51.7 (COOCH₃); 41.5 (C^αH); 27.4 (C(CH₃)₂); 27.1 (C(CH₃)₂); 13.0 (C^αHCH₃).

7.3.1.6 (2*S*,3*S*)-2-((4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-hex-5-en-3-ol (**11**)^[173]

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

Zu einer auf -78°C gekühlten Lösung aus **9** (5.04 g; 19.07 mmol) in abs. DCM (90 mL) wird innerhalb von 30 min DIBAL-H in Toluol (1.2 M; 39.73 mL; 47.68 mmol; 2.5 eq) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei -78°C gerührt. Durch tropfenweise, vorsichtige Zugabe von MeOH p.A. (18 mL) innerhalb von 20 min wird die Reaktion beendet. Die Lösung wird auf RT erwärmt und anschließend in 1M AcOH und Hexan (je 400 mL) aufgenommen. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase wiederholt mit Hexan (5x100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und über eine dünne Schicht Celite[®] filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockene eingeeengt und der so hergestellte Aldehyd am nächsten Tag in der Folgereaktion eingesetzt.

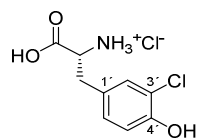
Zu einer auf -78°C gekühlten Suspension aus $\text{MgBr}_2\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (7.39 g; 28.61 mmol; 1.5 eq) in abs. DCM (36 mL) wird der frisch hergestellte Aldehyd als Lösung in abs. DCM (18 mL) innerhalb von 10 min zugetropft. Die Mischung wird weitere 10 min gerührt und danach Allyl-tri-*n*-butylzinn (8.78 mL; 9.47 g; 28.61 mmol; 1.5 eq) innerhalb von 15 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 21.5 h bei -78°C gerührt, in ges. NaHCO_3 -Lösung (125 mL) gegeben und noch 1 h bei RT gerührt. Die wässrige Mischung wird mit Et_2O (1x200 mL; 3x75 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Das gelbe Öl wird über Kieselgel (PE/EtOAc 4:1) gereinigt. **11** (2.91 g; 10.53 mmol; 55%) wird als leicht gelbes Öl erhalten.

$$R_f(\text{PE/EtOAc 4:1}) = 0.44$$

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.42 – 7.27 (m, 5H, C^{ar}H); 5.71 (dddd, 1H, $J = 17.1/10.3/7.1/7.1$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.06 – 4.92 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.79 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, C⁵H); 4.11 (dd, 1H, $J = 9.0/2.2$ Hz, C⁴H); 3.59 (m, 1H, CHOH); 2.27 (m, 1H, OH); 2.26 (m, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CH}=\text{CH}_2$); 2.16 (m, 1H, $\text{CH}^A\text{H}^B\text{CH}=\text{CH}_2$); 1.78 (ddq, 1H, $J = 7.0/6.4/2.2$ Hz, CHCH_3); 1.57 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1.50 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1.07 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz, CHCH_3);

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 137.7 (C^{ar}); 135.0 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 128.7/128.5/126.9 (C^{ar}H); 117.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 108.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 82.8 (C⁵H); 80.1 (C⁴H); 73.7 (CHOH); 39.6 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 36.3 (CHCH_3); 27.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 27.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 10.9 (CHCH_3).

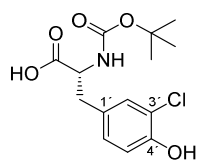
7.3.2 Synthese des B-Fragments

7.3.2.1 3-Chlor-D-Tyrosinhydrochlorid (**13**)^[173]

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

Eine Suspension aus D-Tyrosin (5.00 g; 27.60 mmol) in Essigsäure p.A. (50 mL) wird im Ultraschallbad behandelt (10 min). Danach wird die Suspension mit einem stark rührenden KPG-Rührer durchmischt und im Wasserbad (ca. 15 min) gekühlt. Innerhalb von 3 min wird Sulfurylchlorid (2.70 mL; 4.50 g; 33.36 mmol; 1.2 eq) gelöst in AcOH p.A. (15 mL) zutropft. Die Reaktionsmischung erwärmt sich leicht und wird gegen Ende des Zutropfens kurzzeitig zu einer klaren Lösung. Nach wenigen Minuten fällt ein farbloser Feststoff aus und eine Suspension entsteht, welche weitere 90 min gerührt wird. Diese wird dann mit Et₂O (50 mL) versetzt und weitere 15 min gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mit AcOH/Et₂O (1:2 v/v) und Et₂O (je 100 mL) gewaschen und am Rotationsverdampfer vorgetrocknet. Danach wird im HV bis zur Massenkonstanz getrocknet. Es werden 6.33 g eines weißen Feststoffes erhalten, welcher **13** (4.43 g; 17.57 mmol; 64%), das dichlorierte Produkt **13a** (0.22 g; 0.78 mmol) und AcOH (1.68 g; 27.98 mmol; 1.6 eq) enthält. Das Produktgemisch kann ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt werden.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ [ppm] = 7.29 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, C²H); 7.08 (dd, 1H, *J* = 8.4/2.2 Hz, C⁶H); 6.96 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, C⁵H); 4.23 (dd, 1H, *J* = 7.6/5.6 Hz, C^αH); 3.23 (dd, 1H, *J* = 14.8/5.6 Hz, C^βH^AH^B); 3.10 (dd, 1H, *J* = 14.7/7.6 Hz, C^βH^AH^B).

7.3.2.2 (*R*)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-hydroxyphenyl)-propionsäure (**14**)^[173]

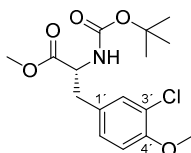
$$M = 315.75 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClNO}_5$$

In Anlehnung an eine Literaturvorschrift von NAHRWOLD wird eine Lösung aus **13** (4.38 g; 17.37 mmol), vorliegend als Mischung mit dem dichlorierten Produkt **13a** (0.22 g; 0.78 mmol) und AcOH (1.66 g; 27.64 mmol), in 1M NaOH_(aq) (78.75 mL) hergestellt. Die Lösung wird mit *tert*-Butanol (38 mL) und Boc₂O (4.41 g; 20.19 mmol; 1.1 eq) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach 17.5 h wird der pH-Wert der Lösung mit festem NaOH auf ≥10 eingestellt und mit Hexan (3x30 mL) extrahiert. Danach wird die wässrige Phase mit festem KHSO₄ und 5%iger KHSO₄-Lösung angesäuert (pH 2-3) wobei schon bei pH 5 ein farbloser Feststoff ausfällt. Die saure

wässrige Lösung wird mit EtOAc (5x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Danach wird im HV bis zur Massenkonstanz getrocknet. Das Rohprodukt bestehend aus **14** (4.34 g; 13.75 mmol; 79%), dem dichlorierten Produkt (0.22 g; 0.78 mmol), AcOH (0.43 g; 7.16 mmol) und EtOAc (1.22 g; 13.85 mmol) wird als beiger erstarrter Schaum erhalten und ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt verwendet.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS, Rotamere) δ [ppm] = 7.14 (m, 1H, C^{2'}H); 6.98 (dd, 1H, *J* = 8.3/2.0 Hz, C^{6'}H); 6.91 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, C^{5'}H); 6.38 (m, 0.3H, NH); 5.05 (m, 0.7H, NH); 4.53 (m, 1H, C^αH); 3.10 (m, 1H, C^βH^AH^B); 2.89 (m, 1H, C^βH^AH^B); 1.42/1.34 (2s, 9H, C(CH₃)₃).

7.3.2.3 (*R*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäuremethylester (**15**)^[173]



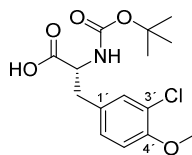
$$M = 343.80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClNO}_5$$

Eine Lösung aus **14** (bestehend aus: **14** (4.34 g; 13.75 mmol), dichloriertem Produkt (0.22 g; 0.78 mmol), Essigsäure (0.43 g; 7.16 mmol) und EtOAc (1.22 g; 13.85 mmol) in Aceton (165 mL) wird mit K₂CO₃ (8.84 g; 63.93 mmol; 4.4 eq) und Dimethylsulfat (3.44 mL; 4.58 g; 36.33 mmol; 2.5 eq) versetzt und die Mischung 4 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und in H₂O dest. (250 mL) aufgenommen. Es wird mit EtOAc (1x 250 mL; 2x 120 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit 0.5%iger KOH-Lösung (50 mL) gewaschen. Die organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung des leicht gelblichen Öls über Kieselgel (PE/EtOAc 5:1 -> 3:1) liefert **15** (4.80 g; 13.97 mmol; quant.).

R_f (PE/EtOAc 5:1) = 0.20

R_f (PE/EtOAc 3:1) = 0.38

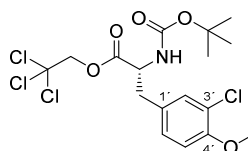
¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.14 – 7.10 (m, 1H, C^{2'}H); 6.98 (dd, 1H, *J* = 8.4/2.2 Hz, C^{6'}H); 6.84 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, C^{5'}H); 4.99 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH); 4.53 (dt, 1H, *J* = 8.3/6.1 Hz, C^αH); 3.87 (s, 3H, OCH₃); 3.72 (s, 3H, COOCH₃); 3.05 (dd, 1H, *J* = 13.9/5.7 Hz, C^βH^AH^B); 2.95 (dd, 1H, *J* = 14.0/6.1 Hz, C^βH^AH^B); 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

7.3.2.4 (*R*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäure (**16**)^[173]

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

Zu einer Lösung aus **15** (4.80 g; 13.97 mmol) in THF/MeOH 1:1 (70 mL) wird langsam eine Lösung aus LiOH·H₂O (0.88 g; 20.96 mmol) in H₂O dest. (35 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wird für eine ¾ h bei RT gerührt und die organischen Lösungsmittel im Anschluss im Vakuum entfernt. Der wässrige Rückstand wird mit H₂O dest. (35 mL) verdünnt und mit DCM (2x20 mL) extrahiert. Danach wird die wässrige Phase mit 5%iger KHSO₄-Lsg. angesäuert (pH 2-3) und erneut mit DCM (3x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte der sauren Lösung werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel daraufhin im Vakuum entfernt. Weitere Trocknung im HV liefert **16** (4.55 g; 13.79 mmol; quant.) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS, Rotamere) δ [ppm] = 7.21 – 7.16 (m, 1H, C²H); 7.05 (dd, 1H, *J* = 8.4/2.2 Hz, C⁶H); 6.86 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, C⁵H); 6.64 (d, 0.3H, *J* = 7.3 Hz, NH); 4.97 (d, 0.7H, *J* = 7.9 Hz, NH); 4.56 (q, 0.6H, *J* = 6.5 Hz, C^αH); 4.36 (q, 0.4H, *J* = 6.9 Hz, C^αH); 3.88 (s, 3H, OCH₃); 3.17 – 3.08 (m, 1H, C^βH^AH^B); 2.99 (dd, 0.6H, *J* = 14.1/6.5 Hz, C^βH^AH^B); 2.84 (dd, 0.4H, *J* = 14.0/8.5 Hz, C^βH^AH^B); 1.43/1.31 (2s, 9H, C(CH₃)₃).

7.3.2.5 (*R*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäure-2,2,2-trichlorethylester (**17**)^[173]

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

Eine Lösung aus **16** (4.55 g; 13.80 mmol; 1 eq) in abs. DCM (66 mL) wird mit Pyridin (2.22 mL; 2.18 g; 27.59 mmol; 2.0 eq) und 2,2,2-Trichlorethanol (1.98 mL; 3.09 g; 20.7 mmol; 1.5 eq) versetzt und die Lösung im Eisbad gekühlt. Eine Lösung von DCC (2.99 g; 14.49 mmol; 1.05 eq) in abs. DCM (10 mL) wird langsam zugetropft und die Lösung anschließend über Nacht bei 0°C gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit DCM (4x30 mL) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Reinigung über Kieselgel (PE/EtOAc 2:1) liefert **17** (5.67 g; 12.31 mmol; 89%) als farblosen Feststoff.

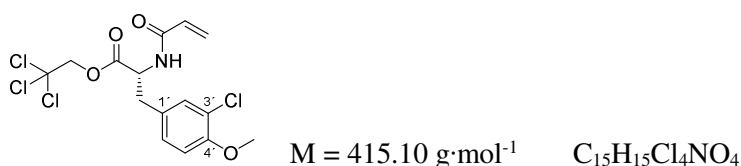
R_f (PE/EtOAc 2:1) = 0.61

$[\alpha]_D = -10.5$ ($c = 1.04$ g/100 mL CHCl_3) Lit.: -11 ($c = 1.58$ g/100 mL CHCl_3)^[69]

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.20 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, $\text{C}^{2'}\text{H}$); 7.05 (dd, 1H, $J = 8.4/2.2$ Hz, $\text{C}^{6'}\text{H}$); 6.86 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, $\text{C}^{5'}\text{H}$); 4.94 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, NH); 4.82 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CCl}_3$); 4.70 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CCl}_3$); 4.66 (m, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 3.88 (s, 3H, OCH_3); 3.15 (ddm, 1H, $J = 14.2/5.6$ Hz, $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3.01 (ddm, 1H, $J = 14.3/6.6$ Hz, $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

7.3.2.6 (*R*)-2-Acryloylamino-3-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-propionsäure-2,2,2-trichlorethylester (**18**)

[173]

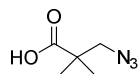


17 (1.5 g; 3.25 mmol; 1 eq) wird in TFA (3.5 mL) aufgenommen und 4 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Toluol (25 mL) wird die Mischung im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in DCM (44 mL) gelöst und mit ges. NaHCO_3 -Lösung (2x20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand im HV weiter getrocknet. Das so erhaltene farblose Öl wird in abs. DCM (20 mL) aufgenommen und auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von abs. NEt_3 (1.35 mL; 0.99 g; 9.75 mmol; 3 eq) wird Acryloylchlorid (0.40 mL; 0.44 g; 4.88 mmol; 1.5 eq) hinzugegeben und die Reaktionslösung unter Ausschluss von Licht bei 0°C über Nacht gerührt. Die Lösung wird in EtOAc (100 mL) und 5%iger KHSO_4 -Lösung (20 mL) aufgenommen, die Phasen getrennt und die organische Phase mit ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung (je 20 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung über Kieselgel (PE/EtOAc 2:1) führt zu **18** (0.69 g; 1.66 mmol; 51%) als leicht gelbes, zähes Öl.

R_f (PE/EtOAc 2:1) = 0.29

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.18 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, $\text{C}^{2'}\text{H}$); 7.03 (dd, 1H, $J = 8.4/2.2$ Hz, $\text{C}^{6'}\text{H}$); 6.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, $\text{C}^{5'}\text{H}$); 6.31 (dd, 1H, $J = 16.9/1.3$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2^{\text{cis}}$); 6.11 (dd, 1H, $J = 17.0/10.3$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.97 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, NH); 5.71 (dd, 1H, $J = 10.3/1.3$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2^{\text{trans}}$); 5.08 (ddd, 1H, $J = 7.7/5.9/5.8$ Hz, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 4.80 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CCl}_3$); 4.74 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}\text{CCl}_3$); 3.88 (s, 3H, OCH_3); 3.22 (dd, 1H, $J = 14.2/5.9$ Hz, $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3.13 (dd, 1H, $J = 14.3/5.9$ Hz, $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$).

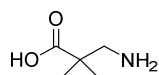
7.3.3 Synthese des C-Fragments

7.3.3.1 3-Azido-2,2-dimethylpropionsäure (**20**) ^[173]

$$M = 143.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$$

In H₂O (25 mL) wird 3-Chlor-2,2-dimethylpropionsäure (**19**) (5.00 g; 36.61 mmol; 1 eq) vorgelegt und mit NaN₃ (7.58 g; 120.81 mmol; 3.3 eq) versetzt. Es wird 3 Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird mit konz. HCl angesäuert und die wässrige Phase mit Et₂O (3x25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **20** (4.72 g; 32.97 mmol; 90%) wird als gelbes Öl erhalten.

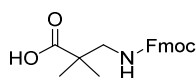
¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 3.44 (s, 2H, CH₂); 1.26 (s, 6H, CH₃).

7.3.3.2 3-Amino-2,2-dimethylpropionsäure (**21**) ^[175]

$$M = 117.15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$$

Analog zu einer Vorschrift von MA *et al.* wird **20** (4.72 g; 32.97 mmol) in MeOH (250 mL) vorgelegt. Pd/C (1.10 g; 10%ig) wird in MeOH (10 mL) suspendiert und zu der vorher hergestellten MeOH-Lösung gegeben. Der Reaktionskolben wird im Wasserstrahlvakuum evakuiert und mit H₂ belüftet. Dieser Vorgang wird drei Mal durchgeführt. Dann wird unter H₂-Atmosphäre über Nacht gerührt und die Suspension, nach DC-Kontrolle (PE/EtOAc/MeOH 2:1:1), mit H₂O (250 mL) versetzt. Es wird weitere 15 min gerührt. Dann wird der Katalysator über Celite[®] filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Die Lyophilisation des wässrigen Rückstands liefert **21** (3.60 g; 30.78 mmol; 93%) als leicht beigen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] = 3.01 (s, 2H, CH₂); 1.19 (s, 6H, CH₃).

7.3.3.3 3-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-2,2-dimethylpropionsäure (**22**)

$$M = 339.39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$$

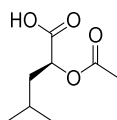
21 (3.59 g; 30.64 mmol; 1 eq) wird in H₂O (300 mL) gelöst und mit NaHCO₃ (7.72 g; 91.92 mmol; 3 eq) versetzt. Daraufhin wird 5 min bei RT gerührt und Aceton (300 mL) sowie FmocOSu (11.37 g; 33.7 mmol; 1.1 eq) zugegeben. Die leicht milchige Suspension wird über Nacht gerührt, wobei eine klare Lösung entsteht. Das Aceton wird im Vakuum entfernt und der wässrige Rückstand mit ges. NaHCO₃-Lösung auf pH = 9 gebracht. Es wird mit Et₂O (3x200 mL) gewaschen und danach die wässrige Phase mit KHSO₄ auf pH = 3 eingestellt. Erneut wird mit Et₂O (3x200 mL) extrahiert. Die

vereinigten organischen Extrakte werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über Kieselgel (DCM/MeOH 95:5) gereinigt. **22** (7.95 g; 23.42 mmol; 76%) wird als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, Rotamere) δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, C^{ar}H); 7.59 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, C^{ar}H); 7.42 – 7.37 (m, 2H, C^{ar}H); 7.34 – 7.28 (m, 2H, C^{ar}H); 6.22 (t, 0.3H, *J* = 6.3 Hz, NH); 5.30 (t, 0.7H, *J* = 6.7 Hz, NH); 4.52 (d, 0.5H, *J* = 6.0 Hz, CHCH₂); 4.41 (d, 1.5H, *J* = 7.0 Hz, CHCH₂); 4.22 (m, 1H, CHCH₂); 3.35 (d, 1.5H, *J* = 6.6 Hz, CH₂NH); 3.12 (d, 0.5H, *J* = 6.7 Hz, CH₂NH); 1.25/1.05 (2s, 6H, C(CH₃)₂).

7.3.4 Synthese des D-Fragments

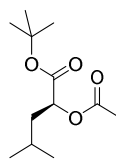
7.3.4.1 (*S*)-2-Acetoxy-4-methylpentansäure (**24**)^[110]



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

In Anlehnung an eine Vorschrift aus der Dissertation von EIBLER wird L-Leucin (**23**) (13.12 g; 100 mmol) in AcOH (300 mL) suspendiert und so gut es geht mit Eis gekühlt. Dann wird NaNO₂ (13.80 g; 200 mmol) portionsweise zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Im Anschluss wird mit Na₂SO₃ (15.76 g; 130 mmol) gequench und das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur: 50°C) eingeengt. Der Rückstand wird in H₂O dest. (200 mL) aufgenommen und mit festem KHSO₄ und 2N HCl-Lösung auf pH = 3 gebracht. Es wird mit Et₂O (3x200 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger KHSO₄-Lösung (2x50 mL) und ges. NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließende Destillation im Rotationverdampfervakuum liefert **24** (4.34 g; 24.89 mmol; 25%) als leicht gelbe Flüssigkeit.

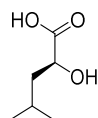
¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 8.61 (bs, 1H, COOH); 5.04 (dd, 1H, *J* = 9.6/4.0 Hz, C^αH); 2.14 (s, 3H, COOCH₃); 1.88 – 1.61 (m, 3H, C^βH₂ und C^γH); 0.97 (d, 3H, *J* = 6.2 Hz, C^γH(CH₃)₂); 0.94 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz, C^γH(CH₃)₂).

7.3.4.2 (*S*)-*tert*-Butoxy-2-acetoxy-4-methylpentanoat (**25**) ^[110]

$$M = 230.30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_4$$

In Anlehnung an eine Vorschrift aus der Dissertation von EIBLER werden **24** (4.34 g; 25.89 mmol) und 4-DMAP (0.79 g; 6.43 mmol) in einer Mischung aus *tert*-BuOH (4 mL) und abs. DCM (48 mL) gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und im Anschluss DCC (6.85 g; 33.19 mmol), gelöst in abs. DCM (22 mL), über eine Dauer von 45 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird danach unter Erwärmen 18.5 h bei RT gerührt, bevor es durch Celite® filtriert wird. Das Filtrat wird mit H₂O dest. (22 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung über Kieselgel (PE 100% -> PE/EtOAc 8:2) liefert **25** (3.55 g; 15.41 mmol; 62%) als leicht gelbes Öl.

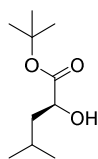
¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 4.88 (dd, 1H, *J* = 9.4/4.3 Hz, C^αH); 2.11 (s, 3H, COOCH₃); 1.81 – 1.53 (m, 3H, C^βH₂ und C^γH); 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 0.95 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, C^δH(CH₃)₂); 0.92 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, C^εH(CH₃)₂).

7.3.4.3 (2*S*)-2-Hydroxy-4-methylpentansäure (L-Leucinsäure) (**26**) ^[176]

$$M = 132.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$$

In Anlehnung an eine Vorschrift von FRANZ *et al.* wird L-Leucin (**23**) (3.94 g; 30 mmol) in 0.5 M H₂SO₄-Lösung (120 mL) aufgenommen und auf 0°C gekühlt. Dann wird tropfenweise eine Lösung aus NaNO₂ (12.42 g; 180 mmol) in H₂O dest. (45 mL) über eine Dauer von 3 h hinzugegeben. Die Lösung darf auf RT erwärmen und wird nach 23.5 h Rühren mit Na₂SO₃ (21.43 g; 170 mmol) gequenchet. Die Reaktionsmischung wird mit Et₂O (1x75 mL; 2x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit ges. NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Da in dem so gewonnenen Etherextrakt kein Produkt enthalten wird, wird die wässrige Phase mit konz. H₂SO₄ von pH 8 auf pH 3 gebracht und mit Et₂O (4x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Das so gewonnene farblose Öl **26** (3.37 g; 25.53 mmol; 85%) kristallisiert in der Kälte.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 4.29 (dd, 1H, *J* = 7.8/5.6 Hz, C^αH); 1.92 (m, 1H, C^βH); 1.71 – 1.55 (m, 2H, C^βH₂); 0.97 (d, 6H, *J* = 6.6 Hz, C^γH(CH₃)₂).

7.3.4.4 (*S*)-*tert*-Butyl-2-hydroxy-4-methylpentanoat (**27**)

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

Route 1 ^[110]: **25** (3.42 g; 14.85 mmol) wird in einer Lösung aus K_2CO_3 (6.41 g; 46.41 mmol) in MeOH p.A. (19 mL) und H_2O dest. (26 mL) aufgenommen. Die Reaktionsmischung wird 20 h bei RT gerührt. Das MeOH wird im Vakuum weitestgehend entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit DCM (3x40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **27** (2.03 g; 10.78 mmol; 73%) wird als farbloses Öl erhalten.

$$[\alpha]_D^{RT} = -5.43 \text{ (c = 0.7 g/100 mL CHCl}_3\text{)} \quad \text{Lit: -8.6}^{[177]}$$

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 4.06 (dd, 1H, $J = 7.9/5.4$ Hz, C ^{α} H); 2.72 (bs, 1H, OH); 1.88 (m, 1H, C ^{β} H^AH^B oder C ^{γ} H); 1.56 – 1.42 (m, 2H, C ^{β} H^AH^B oder C ^{γ} H und C ^{β} H^AH^B); 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃); 0.96 (d, 3H, $J = 1.7$ Hz, C ^{γ} H(CH₃)₂); 0.94 (d, 3H, $J = 1.8$ Hz, C ^{γ} H(CH₃)₂).

Route 2 ^[177]: Eine Lösung aus DIC (10.02 mL; 8.16 g; 64.69 mmol; 2.53 eq) und CuCl (126.3 mg; 1.28 mmol; 0.05 eq) in abs. *tert*-BuOH (6.3 mL; 4.92 g; 66.38 mmol; 2.6 eq) wird unter Ar 6 Tage bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit abs. DCM (20 mL) verdünnt und tropfenweise zu einer Lösung aus **26** (3.37 g; 25.53 mmol; 1 eq) in abs. DCM (30 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 4.5 h bei RT gerührt und im Anschluss über Celite[®] filtriert. Das Filtrat wird direkt mit ges. NaHCO_3 -Lösung (80 mL) und ges. NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbe, ölige Rückstand wird über Kieselgel (PE/EtOAc 6:1) gereinigt. **27** (2.94 g; 15.62 mmol; 61%) wird als farbloses Öl erhalten.

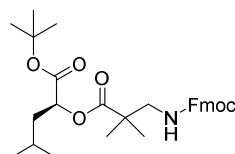
$$R_f \text{ (PE/EtOAc 6:1)} = 0.48$$

$$[\alpha]_D^{RT} = -7.60 \text{ (c = 0.695 g/100 mL CHCl}_3\text{)} \quad \text{Lit: -8.6}^{[177]}$$

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 4.05 (dt, 1H, $J = 7.8/5.7$ Hz, C ^{α} H); 2.71 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, OH); 1.88 (m, 1H, C ^{β} H^AH^B oder C ^{γ} H); 1.55 – 1.42 (m, 2H, C ^{β} H^AH^B oder C ^{γ} H und C ^{β} H^AH^B); 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃); 0.96 (d, 3H, $J = 1.7$ Hz, C ^{γ} HCH₃); 0.93 (d, 3H, $J = 1.8$ Hz, C ^{γ} HCH₃).

7.3.5 Fragmentkondensation und Diol-Epoxid-Transformation mit Öffnung des Epoxids zum Chlorhydrin

7.3.5.1 Fmoc-uC-uD-O^tBu (**28**)^[96]



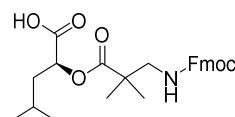
$$M = 509.63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_6$$

22 (1.08 g; 3.19 mmol) wird 1 h im HV getrocknet. Dann werden **27** (500 mg; 2.66 mmol) und 4-DMAP (130 mg; 1.06 mmol) hinzugegeben und in abs. DCM (14 mL) gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und dann innerhalb einer halben Stunde tropfenweise mit DCC (823 mg; 3.99 mmol) gelöst in abs. DCM (8 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung darf über Nacht auf RT erwärmen. Danach wird das Gemisch in ges. NaHCO₃-Lösung (30 mL) filtriert und der Filter mit EtOAc (55 mL) und Et₂O (55 mL) gewaschen. Die Lösungen werden gemischt und nach erfolgter Phasentrennung wird die wässrige Phase mit EtOAc/Et₂O (1:1; 3x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Reinigung über Kieselgel (PE/EtOAc 8:1) liefert **28** (0.65 g; 1.28 mmol; 48%) als zähes, farbloses Öl.

$$R_f \text{ (PE/EtOAc 8:1)} = 0.42$$

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, Fmoc-C^{ar}H); 7.69 – 7.62 (m, 2H, Fmoc-C^{ar}H); 7.43 – 7.35 (m, 2H, Fmoc-C^{ar}H); 7.32 – 7.24 (m, 2H, Fmoc-C^{ar}H); 6.31 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz, NH); 5.01 (dd, 1H, *J* = 9.5/3.8 Hz, uD-C^αH); 4.42 – 4.18 (m, 3H, Fmoc-CHCH₂ und Fmoc-CHCH^AH^B und Fmoc-CHCH^AH^B); 3.42 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz, uC-C^βH₂); 1.88 – 1.62 (m, 3H, uD-C^γH, uD-C^βH^AH^B und uD-C^βH^AH^B); 1.51 (s, 9H, uD-C(CH₃)₃); 1.26 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.24 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 0.98 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz, uD-C^δH₃); 0.95 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz, uD-C^δH₃).

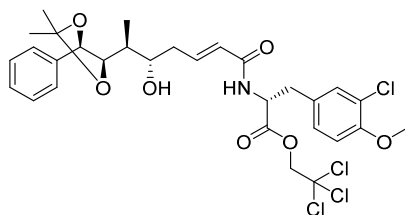
7.3.5.2 Fmoc-uC-uD-OH (**29**)^[96]



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

28 (0.65 g; 1.28 mmol) wird in DCM (10.5 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird TFA (5.5 mL; 8.46 g; 74.24 mmol; 58 eq) über 15 min zugetropft. Danach darf die Reaktionsmischung auf RT erwärmen und wird 5 h gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und mit Toluol (3x) coevaporiert. Das braune Öl wird im HV getrocknet. **29** (0.48 g; 1.06 mmol; 83%) wird als leicht brauner Film erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 8.49 (bs, 1H, COOH); 7.75 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc-C^{ar}H); 7.60 – 7.55 (m, 2H, Fmoc-C^{ar}H); 7.41 – 7.35 (m, 2H, Fmoc-C^{ar}H); 7.32 – 7.26 (m, 2H, Fmoc-C^{ar}H); 5.88 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, NH); 5.11 (dd, 1H, $J = 10.0/3.6$ Hz, uD-C ^{α} H); 4.35 (dd, 1H, $J = 10.5/7.4$ Hz, Fmoc-CHCH^AH^B); 4.29 (dd, 1H, $J = 10.5/7.4$ Hz, Fmoc-CHCH^AH^B); 4.21 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc-CH₂CH₂); 3.38 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz, uC-CH₂NH); 1.86 – 1.63 (m, 3H, uD-C ^{β} H^AH^B, uD-C ^{β} H^AH^B und uD-C ^{γ} H); 1.23 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.22 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 0.93 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, uD-C ^{δ} H₃); 0.88 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, uD-C ^{δ} H₃).

7.3.5.3 H-uA[Acetonid]-uB-OTce (**30**) ^[173]

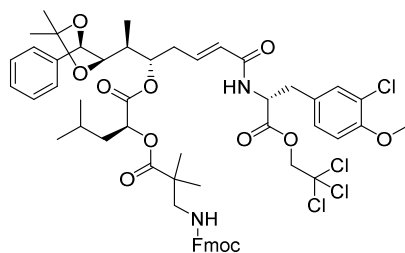
$M = 663.41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{Cl}_4\text{NO}_7$

Zu einer Lösung aus **18** (0.69 g; 1.66 mmol) in abs. DCM (11 mL) werden unter Argonatmosphäre nacheinander Grubbs-II-Katalysator (68 mg; 83 μmol ; 5mol%) und **11** (0.55 g; 1.99 mmol; 1.2 eq) als Lösung in abs. DCM (je 3 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht im abgedunkelten Kolben unter Rückfluss erhitzt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingengt (Badtemperatur $\leq 30^\circ\text{C}$). Der Rückstand wird direkt im Anschluss über Kieselgel (PE/EtOAc 2:1) gereinigt. **30** (0.80 g; 1.20 mmol; 73%) wird als leicht brauner Schaum erhalten.

R_f (PE/EtOAc 2:1) = 0.15

$[\alpha]_D^{RT} = -41.3$ (c = 0.99 g/100 mL CHCl₃) Lit.: -43.5 (c = 1.03 g/100 mL CHCl₃) ^[173]

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.37 – 7.29 (m, 5H, uA-C^{ar}H); 7.16 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, uB-C²H); 7.02 (dd, 1H, $J = 8.4/2.2$ Hz, uB-C⁶H); 6.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, uB-C⁵H); 6.78 (ddd, 1H, $J = 15.0/7.3/7.3$ Hz, uA-C ^{β} H); 5.81 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, uB-NH); 5.62 (dm, 1H, $J = 15.4$ Hz, uA-C ^{α} H); 5.01 (ddd, 1H, $J = 7.5/5.9/5.9$ Hz, uB-C ^{α} H); 4.78 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, uB-CH^AH^BCCl₃); 4.77 (d, 1H, $J = 9.04$ Hz, uA-C ^{γ} H); 4.72 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, uB-CH^AH^BCCl₃); 4.05 (dd, 1H, $J = 9.0/2.3$ Hz, uA-C ^{ζ} H); 3.87 (s, 3H, uB-OCH₃); 3.70 (m, 1H, uA-C ^{δ} H); 3.18 (dd, 1H, $J = 14.2/5.9$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 3.09 (dd, 1H, $J = 14.3/6.0$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 2.35 – 2.24 (m, 2H, uA-C ^{η} H₂); 1.79 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H); 1.56 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂); 1.49 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂); 1.07 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz, uA-C ^{ϵ} HCH₃).

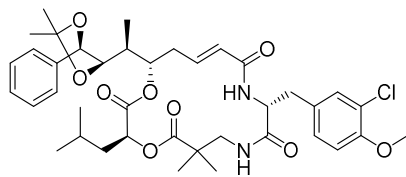
7.3.5.4 *seco*-uA[Acetonid]-Cryptophycin-52 (**31**)^[173]

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

29 (0.48 g; 1.06 mmol; 1 eq), **30** (0.70 g; 1.06 mmol; 1 eq), 4-DMAP (29.7 mg; 0.27 mmol; 0.25 eq) und ein Rührfisch werden über Nacht im HV getrocknet. Dann wird abs. THF (11 mL) und abs. Triethylamin (0.30 mL; 214.5 mg; 2.12 mmol; 2 eq) zugegeben und die leicht braune Lösung auf 0°C gekühlt. 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid (0.33 mL; 517.1 mg; 2.12 mmol; 2 eq) wird langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 3 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von Zitronensäurelösung (10%ig; 18 mL) wird auf RT erwärmt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit ges. NaHCO₃-Lösung (20 mL) und ges. NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Reinigung über Kieselgel (PE/EtOAc 2:1) liefert **31** (0.88 g; 0.81 mmol; 76%).

R_f (PE/EtOAc 2:1) = 0.22;

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.75 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc-C^{ar}H); 7.62 (dd, 2H, $J = 7.0/5.1$ Hz, Fmoc-C^{ar}H); 7.34 – 7.23 (m, 9H, uA-C^{ar}H und Fmoc-C^{ar}H); 7.14 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, uB-C²H); 7.01 (dd, 1H, $J = 8.4/2.2$ Hz, uB-C⁶H); 6.79 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, uB-C⁵H); 6.63 (ddd, 1H, $J = 15.6/6.5/6.5$ Hz, uA-C ^{β} H); 6.37 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NH); 6.06 (m, 1H, NH); 5.62 (dm, 1H, $J = 15.6$ Hz, uA-C ^{α} H); 5.08 (ddm, 1H, $J = 5.8/5.5$ Hz, uA-C ^{δ} H); 5.01 (m, 1H, uB-C ^{α} H); 4.94 (dd, 1H, $J = 9.9/3.5$ Hz, uD-C ^{α} H); 4.74 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, uB-CH^AH^BCCl₃); 4.69 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, uA-C ^{γ} H); 4.65 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, uB-CH^AH^BCCl₃); 4.36 – 4.31 (m, 2H, Fmoc-CH₂); 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH); 3.86 – 3.80 (m, 4H, uA-C ^{ζ} H und uB-OCH₃); 3.38 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz, uC-CH₂); 3.16 (dd, 1H, $J = 14.2/5.8$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 3.04 (dd, 1H, $J = 14.1/6.5$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 2.46 – 2.39 (m, 2H, uA-C ^{γ} H₂); 1.94 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H); 1.83 – 1.71 (m, 2H, uD-C ^{β} H₂); 1.60 (m, 1H, uD-C ^{γ} H); 1.51 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂); 1.45 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂); 1.23 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.15 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.11 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz, uA-C ^{ϵ} HCH₃); 0.96 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, uD-C ^{δ} H₃); 0.92 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, uD-C ^{δ} H₃).

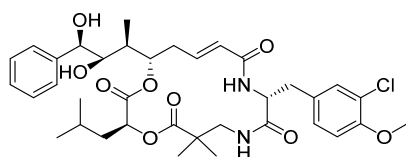
7.3.5.5 uA[Acetonid]-Cryptophycin-52 (**32**)

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

31 (554 mg; 0.50 mmol; 1 eq) wird in abs. DMF (6.5 mL) gelöst und langsam mit abs. Piperidin (250 μL ; 2.5 mmol; 5 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wird im abgedunkelten Kolben 2 h gerührt, dann werden die flüchtigen Bestandteile im HV entfernt und der Rückstand über Kieselgel (PE/EtOAc 2:3) gereinigt. **32** (293 mg; 0.40 mmol; 81%) wird als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE/EtOAc 2:3) = 0.30;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.41 – 7.29 (m, 5H, uA-C^{ar}H); 7.22 – 7.16 (m, 2H, NH/uB-C¹H); 7.05 (dd, 1H, $J = 8.4/2.0$ Hz, uB-C⁶H); 6.83 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, uB-C⁵H); 6.62 (ddd, 1H, $J = 15.1/10.6/4.3$ Hz, uA-C ^{β} H); 5.66 (dm, 1H, $J = 16.1$ Hz, uA-C ^{α} H); 5.59 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NH); 5.04 (m, 1H, uA-C ^{δ} H); 4.78 (dd, 1H, $J = 10.3/3.6$ Hz, uD-C ^{α} H); 4.71 (dm, 1H, $J = 7.6$ Hz, uB-C ^{α} H); 4.69 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, uA-C ^{γ} H); 3.87 (s, 3H, uB-C⁴OCH₃); 3.78 (dd, 1H, $J = 8.8/2.1$ Hz, uA-C ^{ξ} H); 3.37 (dd, 1H, $J = 13.5/8.3$ Hz, uC-C ^{β} H^AH^B); 3.14 (dd, 1H, $J = 10.3/4.1$ Hz, uC-C ^{β} H^AH^B); 3.10 (m, 1H, uB-C ^{β} H^AH^B); 3.03 (dd, 1H, $J = 14.5/7.6$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 2.47 (dm, 1H, $J = 14.5$ Hz, uA-C ^{γ} H^AH^B); 2.21 (ddd, 1H, $J = 14.5/11.1/11.1$ Hz, uA-C ^{γ} H^AH^B); 1.83 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H); 1.74 (ddd, 1H, $J = 13.7/10.4/5.1$ Hz, uD-C ^{β} H^AH^B); 1.64 (m, 1H, uD-C ^{γ} H); 1.49 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂); 1.45 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂); 1.35 (ddd, 1H, $J = 13.2/8.8/3.7$ Hz, uD-C ^{β} H^AH^B); 1.21 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃); 1.15 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃); 1.12 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, uA-C ^{ϵ} H₃); 0.91 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, uD-C ^{δ} H₃); 0.82 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, uD-C ^{δ} H₃).

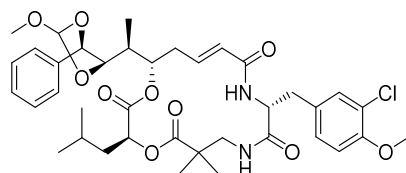
7.3.5.6 uA[Diol]-Cryptophycin-52 (**33**) ^[96]

$$M = 687.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{ClN}_2\text{O}_9$$

32 (293 mg; 0.40 mmol) wird mit einem Rührfisch über Nacht im HV getrocknet. Unter Argon wird es in abs. DCM (3 mL) gelöst und die Lösung mit TFA (3 mL) und H₂O dest. (15 Tropfen) versetzt. Es wird 1.5 h bei RT gerührt (Kontrolle per HPLC) und danach die Reaktionslösung im Vakuum eingengt (Badtemperatur = RT). Der Rückstand wird in EtOAc (75 mL) und sat. NaHCO₃-Lösung (100 mL) aufgenommen. Nach Durchmischung und Trennung der Phasen wird die wässrige Phase mit EtOAc (3x50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und

im Vakuum zur Trockene eingeengt. Der erhaltene gelbliche Rückstand (309 mg) wird ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

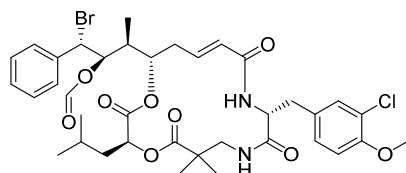
7.3.5.7 uA[cyclisches Orthoformiat]-Cryptophycin-52 (**34**) ^[173]



$$M = 729.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{ClN}_2\text{O}_{10}$$

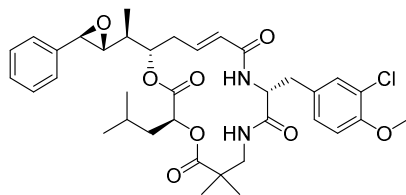
33 (308 mg; 0.40 mmol; 1 eq.), PPTS (251 mg; 1 mmol; 2.5 eq) und ein Rührfisch werden im HV getrocknet. Nach Belüftung mit Argon wird abs. DCM (12 mL; 30 mL/mmol) und abs. Trimethylorthoformiat (4 mL; 10 mL/mmol) gleichzeitig unter Rühren zugespritzt. Bei RT wird 2.5 h gerührt und das Reaktionsgemisch dann über eine Kieselgelschicht (2.5x5 cm) filtriert. Die Filtermasse wird mit EtOAc/DCM (1:1; 300 mL) nachgewaschen und die vereinigten Filtrate im Rotationsverdampfervakuum zur Trockene eingeengt (Belüftung mit Argon). Der farblose Rückstand wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

7.3.5.8 uA[Bromhydrinformiat]-Cryptophycin-52 (**35**) ^[173]



$$M = 778.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{BrClN}_2\text{O}_9$$

34 und ein Rührfisch werden im HV getrocknet, mit Argon belüftet und in abs. DCM (6 mL; 15 mL/mmol) gelöst. Bei RT wird langsam Acetylbromidlösung (0.5 M in DCM; 2.08 mL; 2.5 eq) zugespritzt und die bräunliche Lösung 4.5 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit abs. DCM (10 mL) verdünnt, gekühlt und auf eine eiskalte Mischung aus sat. NaHCO₃-Lösung und H₂O dest. (1:1; 50 mL; mit festem Eis) gegeben. Der Kolben wird mit abs. DCM (12 mL) portionsweise nachgewaschen. Nach erfolgter Phasentrennung wird die org. Phase direkt über MgSO₄ gesammelt und die wässrige Phase mit DCM (3x20 mL) gewaschen. Die vereinigten org. Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Das erhaltene Bromhydrinformiat **35** wird ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

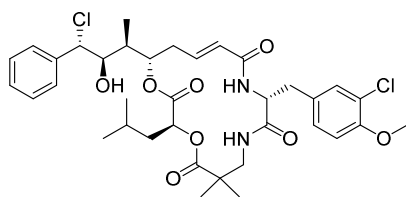
7.3.5.9 Cryptophycin-52 (**3**)^[173]

$$M = 669.20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{ClN}_2\text{O}_8$$

35 wird zusammen mit einem Rührfisch im HV getrocknet und im Anschluss in einer, durch kräftiges Rühren homogenisierten, 0.2 M K_2CO_3 /Ethylenglykol/DME-Emulsion (25 mmol/mL; 5 eq K_2CO_3) aufgenommen. Die Reaktionsmischung wird 2.5 min bei RT lebhaft gerührt, dann rasch durch Zugabe von abs. DCM (20 mL) verdünnt und sofort in eine, im Scheidetrichter vorliegende, eiskalte (mit kleinen Eisstücken versetzt) 0.5% ige KHSO_4 -Lösung (20 mL) gegossen. Der Reaktionskolben wird zusätzlich mit abs. DCM (20 mL) nachgespült. Nach Durchmischung und Trennung der Phasen wird die wässrige Phase wiederholt mit DCM (2x20 mL) extrahiert. Die organische Phase wird jeweils nach Ausbildung einer scharfen Phasengrenze sofort entnommen und unmittelbar nach der Extraktion über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Reinigung über Kieselgel (PE/EtOAc 1:3) liefert **3** (168.6 mg; 0.25 mmol; 63% über 4 Stufen) als erstarrten Schaum.

R_f (PE/EtOAc 1:3) = 0.45;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.40 – 7.31 (m, 3H, uA-C^{ar}H); 7.25 (dd, 2H, $J = 7.7/1.4$ Hz, uA-C^{ar}H); 7.22 (dd, 1H, $J = 8.7/3.4$ Hz, uC-NH); 7.19 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, uB-C²H); 7.05 (dd, 1H, $J = 8.4/2.1$ Hz, uB-C⁶H); 6.84 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, uB-C⁵H); 6.77 (ddd, 1H, $J = 15.0/10.6/4.3$ Hz, uA-C ^{β} H); 5.72 (dm, 1H, $J = 15.1$ Hz, uA-C ^{α} H); 5.49 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, uB-NH); 5.21 (ddd, 1H, $J = 11.3/4.9/1.7$ Hz, uA-C ^{δ} H); 4.83 (dd, 1H, $J = 10.2/3.5$ Hz, uD-C ^{α} H); 4.74 (m, 1H, uB-C ^{α} H); 3.88 (s, 3H, uB-C⁴OCH₃); 3.68 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, uA-C ^{η} H); 3.42 (dd, 1H, $J = 13.5/8.7$ Hz, uC-C ^{β} H^AH^B); 3.14 – 3.02 (m, 3H, uB-C ^{β} H^AH^B/uB-C ^{β} H^AH^B/uC-C ^{β} H^AH^B); 2.92 (dd, 1H, $J = 7.6/1.9$ Hz, uA-C⁵H); 2.58 (ddd, 1H, $J = 14.1/1.9/1.9$ Hz, uA-C ^{γ} H^AH^B); 2.46 (ddd, 1H, $J = 14.5/11.0/11.0$ Hz, uA-C ^{γ} H^AH^B); 1.83 – 1.61 (m, 3H, uD-C ^{γ} H/uD-C ^{β} H^AH^B/uA-C ^{ϵ} H); 1.31 (ddd, 1H, $J = 13.1/8.7/3.3$ Hz, uD-C ^{β} H^AH^B); 1.22 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃); 1.16 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃); 1.15 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz, uA-C ^{ϵ} CH₃); 0.85 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, uD-C ^{δ} H₃); 0.83 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, uD-C ^{δ} H₃).

7.3.5.10 Cryptophycin-55 (**36**)^[96]

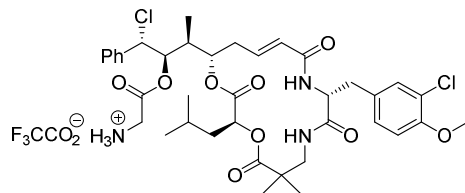
$$M = 705.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8$$

3 (40 mg; 0.06 mmol; 1 eq) wird zusammen mit einem Rührfisch 1.5 h im HV getrocknet und danach unter Schutzgasatmosphäre in abs. DCM (1 mL) gelöst. Die Lösung wird auf -50°C gekühlt und bei dieser Temperatur mit HCl (4 M in Dioxan; 74.7 μL ; 0.30 mmol; 5 eq) versetzt. Bei -50°C wird noch 2 h gerührt (Kontrolle per DC), dann darf die Lösung auf RT erwärmen und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Flashchromatographie über Kieselgel (PE/EtOAc 1:3) liefert **36** (43 mg; 0.06 mmol; quant.) als farblosen Feststoff.

R_f (PE/EtOAc 1:3) = 0.27;

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.41 – 7.34 (m, 5H, uA-C^{ar}H); 7.21 (m, 1H, uC-NH); 7.22 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, uB-C²H); 7.08 (dd, 1H, $J = 8.3/2.1$ Hz, uB-C⁶H); 6.86 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, uB-C⁵H); 6.78 (ddd, 1H, $J = 15.1/10.6/4.4$ Hz, uA-C ^{β} H); 5.78 (dd, 1H, $J = 15.1/1.8$ Hz, uA-C ^{α} H); 5.52 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, uB-NH); 5.16 (ddd, 1H, $J = 10.6/8.2/2.0$ Hz, uA-C ^{δ} H); 4.93 (dd, 1H, $J = 10.2/3.5$ Hz, uD-C ^{α} H); 4.75 (ddd, 1H, $J = 7.9/7.7/5.2$ Hz, uB-C ^{α} H); 4.65 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, uA-C ^{γ} H); 4.01 (dd, 1H, $J = 9.7/1.9$ Hz, uA-C ^{ζ} H); 3.88 (s, 3H, uB-OCH₃); 3.38 (dd, 1H, $J = 13.4/8.2$ Hz, uC-CH^AH^BNH); 3.18 (dd, 1H, $J = 13.5/3.8$ Hz, uC-CH^AH^BNH); 3.14 (dd, 1H, $J = 14.5/5.2$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 3.06 (dd, 1H, $J = 14.4/7.6$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 2.70 (m, 1H, uA-C ^{γ} H^AH^B); 2.49 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H); 2.38 (ddd, 1H, $J = 14.5/10.9/10.9$ Hz, uA-C ^{γ} H^AH^B); 1.78 (ddd, 1H, $J = 14.0/4.5/4.0$ Hz, uD-C ^{β} H^AH^B); 1.72 (m, 1H, uD-C ^{γ} H); 1.43 (ddd, 1H, $J = 14.0/8.7/3.5$ Hz, uD-C ^{β} H^AH^B); 1.23 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.17 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.04 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, uA-C ^{ϵ} HCH₃); 0.93 (d, 3H, $J = 1.4$ Hz, uD-C ^{δ} H₃); 0.92 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, uD-C ^{δ} H₃).

7.3.6 Synthese der modifizierten Cryptophycine

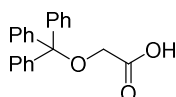
7.3.6.1 Cryptophycin-55-glycinat-trifluoroacetat (**39**)^[102]

$$M = 875.28 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{Cl}_3\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{11}$$

36 (30 mg; 43 μmol ; 1 eq), DCC (13.2 mg; 64 μmol ; 1.5 eq), Boc-Glycin (11.2 mg; 64 μmol ; 1.5 eq) und DMAP (0.5 mg; 4.3 μmol ; 10^{-1} eq) werden zusammen in abs. DCM (500 μL) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Es wird mit EtOAc/Hexan (1 mL; 3:1) verdünnt und weitere 10 min gerührt. Die Suspension wird über Celite[®] filtriert und mit EtOAc/Hexan (100 mL; 3:1) nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingeeengt und der Rückstand in abs. DCM (2 mL) gelöst. Es wird HCl in Dioxan (4M; 54 μL , 215 μmol ; 5 eq) zugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Zur Vervollständigung der Entschützung wird TFA (0.5 mL) zugegeben und nochmals 10 min gerührt. Dann werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand über präparative HPLC (Methode 4) gereinigt. **39** (27.8 mg; 31.8 μmol ; 74%) wird als farbloses Lyophilisat erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.37 – 7.32 (m, 3H, uA-C^{ar}H); 7.29 (dd, 2H, $J = 7.3/2.3$ Hz, uA-C^{ar}H); 7.22 (m, 1H, uC-NH); 7.20 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, uB-C^{2'}H); 7.06 (dd, 1H, $J = 8.4/2.2$ Hz, uB-C^{6'}H); 6.84 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, uB-C^{5'}H); 6.60 (bs, 1H, uB-NH); 6.53 (ddd, 1H, $J = 15.2/10.9/4.2$ Hz, uA-C ^{β} H); 5.74 (dd, 1H, $J = 15.3/1.8$ Hz, uA-C ^{α} H); 5.45 (dm, 1H, $J = 10.1$ Hz, uA-C ^{ζ} H); 4.94 (dd, 1H, $J = 10.4/2.9$ Hz, uD-C ^{α} H); 4.85 – 4.79 (m, 2H, uA-C ^{δ} H/uA-C ^{η} H); 4.54 (ddd, 1H, $J = 8.1/8.1/5.3$ Hz, uB-C ^{α} H); 3.87 (s, 3H, uB-OCH₃); 3.63 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz, Gly-CH^AH^B); 3.30 (m, 1H, uC-C ^{β} H^A); 3.20 (m, 1H, uC-C ^{β} H^B); 3.16 – 3.06 (m, 2H, Gly-CH^AH^B/uB-C ^{β} H^A); 2.91 (dd, 1H, $J = 14.5/8.6$ Hz, uB-C ^{β} H^B); 2.64 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H); 2.53 (m, 1H, uA-C ^{γ} H^A); 2.22 (m, 1H, uA-C ^{γ} H^B); 1.93 (m, 1H, uD-C ^{β} H^A); 1.70 (m, 1H, uD-C ^{γ} H); 1.65 (m, 1H, uD-C ^{β} H^B); 1.18 (s, 3H, uC-CH₃); 1.12 (s, 3H, uC-CH₃); 1.00 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz, uA-C ^{η} HCH₃); 0.98 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, CH₃); 0.93 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH₃);

HPLC: $t_R = 33.23$ min (Methode 4)

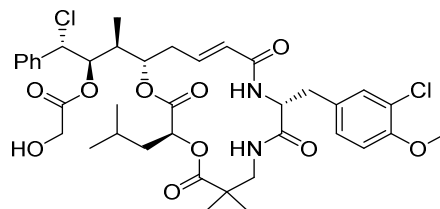
7.3.6.2 *O*-Tritylglycolsäure (**41**)

$$M = 318.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_3$$

In Anlehnung an eine Vorschrift von LISKAMP^[125] wird Glycolsäure (500 mg; 6.57 mmol; 1 eq) und Triethylamin (3.28 mL; 2.40 g; 23.7 mmol; 3.6 eq) in abs. DCM (15 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Tritylchlorid (3.66 g; 13.14 mmol; 2 eq) wird in abs. DCM (15 mL) gelöst und über die Dauer von 1 Stunde zu der vorher hergestellten Lösung getropft. Nach 15 min Rühren wird das Eisbad entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Es wird mit KHSO₄-Lösung (5%ig) auf pH = 3 gebracht, dann wird die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (3x20 mL) gewaschen und im Anschluss über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird über Kieselgel (DCM/MeOH 9:1) gereinigt und liefert **41** (0.82 g; 2.57 mmol; 39%) als farblosen Feststoff.

R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.65

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.45 – 7.41 (m, 6H, Trt); 7.34 – 7.29 (m, 6H, Trt); 7.29 – 7.24 (m, 3H, Trt); 3.87 (s, 2H, CH₂).

7.3.6.3 Cryptophycin-55-glycolat-trifluoroacetat (**43**)

$$M = 726.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_{10}$$

41 (8.9 mg; 28 μ mol; 2 eq), **36** (10 mg; 14 μ mol; 1 eq), 4-DMAP (0.2 mg; 1.4 μ mol; 0.1 eq) und DCC (4.3 mg; 21 μ mol; 1.5 eq) werden zusammen eingewogen, kurz im HV getrocknet und dann in abs. DCM (1 mL) gelöst. Bei RT wird 3 h gerührt, dann wird EtOAc/PE (3:1; 1 mL) hinzugegeben und weitere 10 min gerührt. Es wird über Celite[®] filtriert und mit EtOAc/PE (3:1; 100 mL) nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockene eingengt und ohne weitere Reinigung in TFA/TIS/DCM (1:5:94; 10 mL) gelöst. Es wird 15 min bei RT gerührt, dann mit *i*-Propanol (5 mL) verdünnt und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Reinigung des Rückstands durch präparative HPLC (Methode 4) liefert **43** (7.8 mg; 11 μ mol; 76%) als farbloses Lyophilisat.

¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.33 – 7.29 (m, 6H, uA-C^{ar}H/uC-NH); 7.21 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, uB-C²H); 7.07 (dd, 1H, $J = 8.4/2.2$ Hz, uB-C⁶H); 6.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, uB-C⁵H); 6.70 (ddd, 1H, $J = 15.1/10.6/4.3$ Hz, uA-C ^{β} H); 5.79 – 5.72 (m, 2H, uA-C ^{α} H/uB-NH); 5.51 (dd, 1H,

$J = 9.9/1.4$ Hz, uA-C^δH); 4.93 (dd, 1H, $J = 10.8/3.1$ Hz, uD-C^αH); 4.86 (ddd, 1H, $J = 10.8/8.4/2.1$ Hz, uA-C^δH); 4.80 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, uA-C^γH); 4.71 (ddd, 1H, $J = 7.9/7.9/5.0$ Hz, uB-C^αH); 3.91 (d, 1H, $J = 17.2$ Hz, GlyA-C^αH^A); 3.88 (s, 3H, uB-OCH₃); 3.52 (d, 1H, $J = 17.2$ Hz, GlyA-C^αH^B); 3.38 (dd, 1H, $J = 13.5/8.3$ Hz, uC-C^βH^A); 3.20 – 3.13 (m, 2H, uB-C^βH^A/uC-C^βH^B); 3.03 – 2.96 (m, 2H, OH/uB-C^βH^B); 2.64 (m, 1H, uA-C^εH); 2.58 (ddd, 1H, $J = 14.6/4.3/2.1$ Hz, uA-C^γH^A); 2.41 (ddd, 1H, $J = 14.3/10.9/10.9$ Hz, uA-C^γH^B); 1.94 (ddd, 1H, $J = 14.2/10.8/4.7$ Hz, uD-C^βH^A); 1.79 (m, 1H, uD-C^γH); 1.66 (ddd, 1H, $J = 14.3/9.1/3.1$ Hz, uD-C^βH^B); 1.23 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.18 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.05 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, uA-C^εHCH₃); 1.01 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, uD-C^δH₃); 0.95 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, uD-C^δH₃);

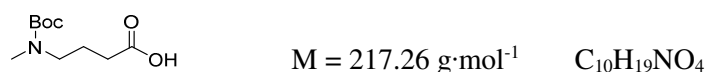
¹³C{¹H}-NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 178.0 (uC-C=O); 171.9 (GlyA-C=O); 170.9 (uB-C=O); 170.5 (uD-C=O); 165.5 (uA-C=O); 154.3 (uB-C⁴); 142.4 (uA-C^βH); 137.3 (uA-C^{ar}); 131.0 (uB-C²H); 129.6 (uB-C¹); 129.4/128.7 (uA-C^{ar}H); 128.4 (uB-C⁶H); 128.0 (uA-C^{ar}H); 124.5 (uA-C^αH); 122.7 (uB-C³Cl); 112.5 (uB-C⁵H); 75.2 (uA-C^δH); 75.0 (uA-C^εH); 71.4 (uD-C^αH); 60.5 (uA-C^γH); 60.1 (GlyA-C^αH₂); 56.3 (uB-OCH₃); 54.7 (uB-C^αH); 46.7 (uC-C^βH₂); 43.0 (uC-C^α); 39.7 (uD-C^βH₂); 38.2 (uA-C^εH); 36.9 (uA-C^γH₂); 35.4 (uB-C^βH₂); 25.1 (uD-C^γH); 23.4 (uD-C^δH₃); 23.1 (uC-C(CH₃)₂); 22.9 (uC-C(CH₃)₂); 21.6 (uD-C^δH₃); 10.2 (uA-C^εHCH₃);

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [m·z ⁻¹] =	785.25758	[C ₃₈ H ₄₈ Cl ₂ N ₂ O ₁₀ +Na] ⁺
berechnet [m·z ⁻¹] =	785.25782	[C ₃₈ H ₄₈ Cl ₂ N ₂ O ₁₀ +Na] ⁺

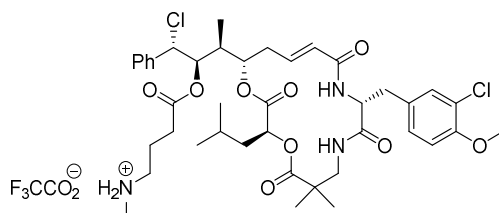
HPLC: $t_R = 37.73$ min (Methode 4)

7.3.6.4 4-(*tert*-Butoxycarbonyl-methylamino)buttersäure (**45**)^[178]



4-(Methylamino)-buttersäurehydrochlorid (1.00 g; 6.51 mmol) wird in H₂O dest. (2 mL) gelöst und mit NaOH (781 mg; 19.53 mmol; 3 eq) versetzt. Nachdem alles NaOH gelöst ist, wird (Boc)₂O (1.42 g; 6.51 mmol; 1 eq) gelöst in DCM (10 mL) hinzugefügt. Es wird 24 h bei RT gerührt, dann wird das Gemisch mit HCl (1 N) auf pH = 5 gebracht und mit DCM (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **45** (quant.) wird als farbloser kristalliner Stoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 3.28 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, C^γH₂); 2.84 (s, 3H, CH₃); 2.35 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, C^αH₂); 1.85 (tt, 2H, $J = 7.2$ Hz, C^βH₂); 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃).

7.3.6.5 Cryptophycin-55-*N*-Me-aminobutyrat-trifluoroacetat (**47**)

$$M = 918.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{11}$$

36 (20 mg; 28 μmol ; 1 eq), **45** (9.2 mg; 42 μmol ; 1.5 eq), DCC (8.6 mg; 42 μmol ; 1.5 eq) und 4-DMAP (0.4 mg; 2.8 μmol ; 1/10 eq) werden in einen Kolben eingewogen und dann in abs. DCM (400 μL) gelöst. Es wird 2 h bei RT gerührt. Danach wird die Reaktionslösung mit einem Gemisch aus EtOAc und Hexan (1 mL; 3:1) versetzt und weitere 10 min gerührt. Die Lösung wird über Celite[®] filtriert und mit EtOAc/Hexan (100 mL; 3:1) nachgespült. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockene eingengt und der erhaltene Rückstand erneut in DCM (800 μL) gelöst. Nach Zugabe von TFA (400 μL) wird eine Stunde bei RT gerührt, dann wird die Lösung mit *i*-Propanol (5 mL) versetzt und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in H₂O/DMSO aufgenommen, filtriert und über präparative HPLC (Methode 4) gereinigt. **47** (20.1 mg; 25 μmol ; 89%) wird als farbloses Lyophilisat erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, protoniertes Amin) δ [ppm] = 9.09 (bs, 1H, ABA-NH₂); 8.96 (bs, 1H, ABA-NH₂); 7.34 – 7.27 (m, 6H, uA-C^{ar}H/uC-NH); 7.19 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, uB-C²H); 7.06 (dd, 1H, $J = 8.5/2.2$ Hz, uB-C⁶H); 6.84 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, uB-C⁵H); 6.64 (ddd, 1H, $J = 14.6/10.1/3.5$ Hz, uA-C ^{β} H); 6.32 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, uB-NH); 5.81 (d, 1H, $J = 14.5$ Hz, uA-C ^{α} H); 5.43 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, uA-C ^{ζ} H); 4.95 (dd, 1H, $J = 10.7/3.1$ Hz, uD-C ^{α} H); 4.82 – 4.75 (m, 2H, uA-C ^{δ} H/uA-C ^{η} H); 4.57 (m, 1H, uB-C ^{α} H); 3.87 (s, 3H, uB-CH₃); 3.35 (dd, 1H, $J = 13.5/8.0$ Hz, uC-C ^{β} H^AH^B); 3.21 (dd, 1H, $J = 13.5/4.1$ Hz, uC-C ^{β} H^AH^B); 3.15 (dd, 1H, $J = 14.6/4.9$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 2.94 (dd, 1H, $J = 14.6/8.5$ Hz, uB-C ^{β} H^AH^B); 2.82 – 2.70 (m, 2H, ABA-C ^{η} H₂); 2.68 – 2.56 (m, 5H, uA-C ^{η} H^AH^B/uA-C ^{ϵ} H/ABA-CH₃); 2.38 (m, 1H, uA-C ^{η} H^AH^B); 2.25 (ddd, 1H, $J = 14.9/6.7/6.7$ Hz, ABA-C ^{α} H^AH^B); 1.94 – 1.83 (m, 2H, uD-C ^{β} H^AH^B/ABA-C ^{α} H^AH^B); 1.79 (m, 1H, uD-C ^{η} H); 1.75 – 1.65 (m, 3H, uD-C ^{β} H^AH^B/ABA-C ^{β} H₂); 1.21 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.19 (s, 3H, uC-C(CH₃)₂); 1.07 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz, uA-C ^{ϵ} HCH₃); 1.02 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, uD-C ^{δ} H₃); 0.97 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, uD-C ^{δ} H₃);

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 177.7 (uC-C=O); 170.9 (uB-C=O); 170.74 (ABA-C=O); 170.72 (uD-C=O); 166.2 (uA-C=O); 154.2 (uB-C⁴); 142.6 (uA-C ^{β}); 137.6 (uA-C^{ar}); 130.9 (uB-C²); 129.8 (uB-C¹); 129.2 (uA-C^{ar}H); 128.6 (uA-C^{ar}H); 128.4 (uB-C⁶); 128.2 (uA-C^{ar}H); 124.6 (uA-C ^{α}); 122.6 (uB-C³); 112.5 (uB-C⁵); 75.4 (uA-C ^{δ}); 74.4 (uA-C ^{ζ}); 71.3 (uD-C ^{α}); 60.2 (uA-C ^{η}); 56.3 (uB-CH₃); 55.2 (uB-C ^{α}); 48.3 (ABA-C ^{η}); 46.6 (uC-C ^{β}); 43.1 (uC-C ^{α}); 39.8 (uD-

C^β); 37.9 (uA- C^ϵ); 36.5 (uA- C^γ); 35.4 (uB- C^β); 33.2 (ABA- CH_3); 30.2 (ABA- C^α); 25.1 (uD- C^γ); 23.3 (uD- C^δ); 23.2 (uC- CH_3); 22.9 (uC- CH_3); 21.6 (uD- C^δ); 20.7 (ABA- C^β); 9.7 (uA- $C^\epsilon HCH_3$);

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$m \cdot z^{-1}$] = 804.33832 $[C_{41}H_{55}Cl_2N_3O_9+H]^+$

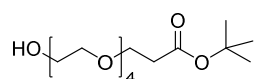
berechnet [$m \cdot z^{-1}$] = 804.33881 $[C_{41}H_{55}Cl_2N_3O_9+H]^+$

HPLC: t_R = 33.24 min (Methode 4)

t_R = 4.402 min (Methode 2).

7.4 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

7.4.1 *tert*-Butyl-15-hydroxy-4,7,10,13-tetroxapentadecanoat (49) ^[137]



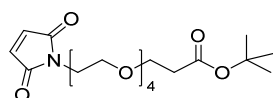
$M = 322.39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $C_{15}H_{30}O_7$

Zu einer Lösung aus Tetraethylenglykol (40.61 mL; 45.64 g; 235 mmol) in abs. THF (125 mL) wird ein 1/4cm-großes Stück Natrium gegeben. Es wird gewartet, bis das Natrium abreagiert ist. Dann wird über eine Dauer von 20 min *tert*-Butylacrylat (11.98 mL; 10.57 g; 82.5 mmol) hinzu getropft und über Nacht bei RT gerührt. Im Anschluss wird der pH mit 1N NaOH-Lösung auf pH = 7-8 gebracht und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ges. NaCl-Lösung (75 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3x100 mL) extrahiert. Die vereinigten org. Extrakte werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. **49** (21.87 g; 67.8 mmol; 82%²) wird als farbloses Öl erhalten.

1H -NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 3.77 – 3.57 (m, 18H; OCH_2); 3.01 (bs, 1H, OH); 2.51 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH_2COO^tBu); 1.45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$);

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (126 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 171.1 (COO); 80.7 ($C(CH_3)_3$); 72.6/70.8/70.7/70.6/70.5/67.0 (OCH_2); 61.9 ($HOCH_2$); 36.4 (CH_2CO); 28.2 ($C(CH_3)_3$).

² Bezogen auf *tert*-Butylacrylat.

7.4.2 *tert*-Butyl-15-maleimido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoat (**50**) ^[133]

$$M = 401.45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{NO}_8$$

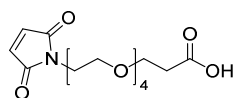
PPh_3 (1.09 g; 4.14 mmol; 1 eq) wird unter Argon in abs. THF (25 mL) gelöst und die entstandene klare Lösung auf -70°C gekühlt. DIAD (0.8 mL; 4.14 mmol; 1 eq) wird über 1 min zugegeben und die gelbe Lösung 5 min bei -70°C gerührt. Dann wird über 1 min **49** (2.00 g; 6.20 mmol; 1.5 eq) zugegeben und erneut 5 min gerührt, bevor Maleimid (401 mg; 4.14 mmol; 1 eq) zugefügt wird. Nach 5 min Rühren wird das Kältebad entfernt und die Reaktion 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand über Kieselgel (PE/EtOAc 1:3) gereinigt. **50** (0.61 g; 1.51 mmol; 36%) wird als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE/EtOAc 1:3) = 0.27;

R_f (PE/EtOAc 1:1) = 0.19;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 6.70 (s, 2H, CH=CH); 3.71 (m, 4H, CH₂); 3.66 – 3.53 (m, 14H, CH₂); 2.49 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH₂COO'Bu); 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 171.0 (CH₂C=O); 170.8 (C=O); 134.3 (CH=CH); 80.6 (C(CH₃)₃); 70.8/70.73/70.70/70.65/70.5/70.2/68.0/67.1 (OCH₂); 37.3 (NCH₂); 36.4 (CH₂COO'Bu); 28.3 (C(CH₃)₃).

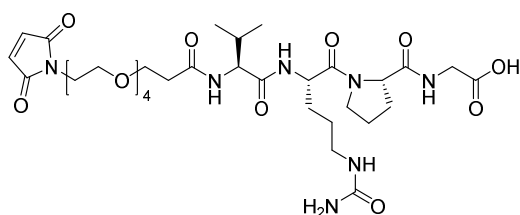
7.4.3 15-Maleimido-4,7,10,13-tetraoxapentadecansäure (**51**) ^[133]

$$M = 345.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_8$$

50 (1.74 g; 4.33 mmol) wird in abs. DCM (8 mL) gelöst und mit TFA (8 mL) versetzt. Bei RT wird 1 h gerührt. Dann wird das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand erneut in DCM (20 mL) aufgenommen. Die Lösung wird mit Amberlyst A-21 (6 g) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingengt. **51** (1.46 g; 4.23 mmol; 98%) wird als gelb-oranges Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 9.38 (bs, 1H, COOH); 6.71 (s, 2H, CH=CH); 3.75 (dt, 4H, $J = 21.6/5.8$ Hz, NCH₂/CH₂); 3.68 – 3.58 (m, 14H, CH₂); 2.63 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂COOH).

7.4.4 Maleimid-PEG-Val-Cit-Pro-Gly (52)



$$M = 755.81 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_{13}$$

Die Synthese von **52** erfolgt nach AAV 1 – 5.

Schritt	Substanz	Volumen	Masse	Stoffmenge	Äquivalente	Reaktionsdauer
1	Barlos-Harz		1.0 g			
	Fmoc-Gly		1.43 g	4.8 mmol	3 eq	
	DIPEA	1.22 mL	0.93 g	7.2 mmol	4.5 eq	
	abs. DCM	5 mL				3 h
2	Fmoc-L-Pro		1.18 g	3.48 mmol	3 eq	
	DIPEA	0.79 mL	0.60 g	4.64 mmol	4 eq	
	TBTU		1.12 g	3.48 mmol	3 eq	
	HOBt·H ₂ O		0.47 g	3.48 mmol	3 eq	
	DMF	7 mL				3 h
3	Fmoc-L-Cit		1.38 g	3.48 mmol	3 eq	
	DIPEA	0.79 mL	0.60 g	4.64 mmol	4 eq	
	TBTU		1.12 g	3.48 mmol	3 eq	
	HOBt·H ₂ O		0.47 g	3.48 mmol	3 eq	
	DMF	10 mL				3 h
4	Fmoc-L-Cit		0.92 g	2.32 mmol	2 eq	
	DIPEA	0.53 mL	0.41 g	3.13 mmol	2.7 eq	
	TBTU		0.75 g	2.32 mmol	2 eq	
	HOBt·H ₂ O		0.31 g	2.32 mmol	2 eq	
	DMF	7 mL				ii. N.
5	Fmoc-L-Val		1.18 g	3.48 mmol	3 eq	
	DIPEA	0.79 mL	0.60 g	4.64 mmol	4 eq	
	TBTU		1.12 g	3.48 mmol	3 eq	
	HOBt·H ₂ O		0.47 g	3.48 mmol	3 eq	
	DMF	7 mL				2 h
5	51		0.80 g	2.32 mmol	2 eq	
	DIPEA	0.79 mL	0.60 g	4.64 mmol	4 eq	
	TBTU		0.75 g	2.32 mmol	2 eq	

HOBt·H ₂ O	0.31 g	2.32 mmol	2 eq
DMF	7 mL		ü. N.

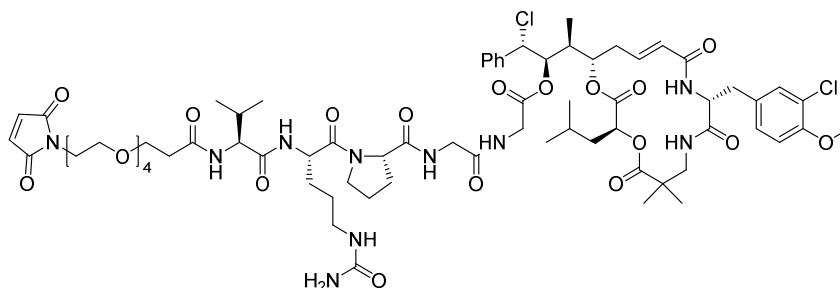
Nach Abspaltung vom Harz wird das Rohprodukt durch präparative HPLC (Methode 3) gereinigt. **52** (0.61 g; 0.81 mmol; 70%) wird als farbloses Lyophilisat erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶) δ [ppm] = 12.24 (bs, 1H, COOH); 8.10 (dd, 1H, $J = 6.1/5.8$ Hz, Gly-NH); 8.06 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, Cit-NHCO); 7.81 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, Val-NHCO); 7.02 (s, 2H, CH Maleimid); 6.02 (bm, 1H, Cit-NH); 4.43 (dd, 1H, $J = 13.4/7.5$ Hz, Cit-C ^{α} H); 4.31 (dd, 1H, $J = 8.3/3.9$ Hz, Pro-C ^{α} H); 4.20 (dd, 1H, $J = 8.8/6.7$ Hz, Val-C ^{α} H); 3.78 (dd, 1H, $J = 17.5/6.1$ Hz, Gly-CH^A); 3.69 (m, 1H, Pro-C ^{γ} H^A); 3.68 (dd, 1H, $J = 17.5/5.8$ Hz, Gly-CH^B); 3.62 – 3.53 (m, 5H, PEG-CH₂/Pro-C ^{γ} H^B); 3.53 – 3.41 (m, 16H, PEG-CH₂); 3.00 – 2.90 (m, 2H, Cit-CH₂NH); 2.45 (m, 1H, PEG-CH^AH^BCONH); 2.34 (m, 1H, PEG-CH^AH^BCONH); 2.01 (m, 1H, Pro-C ^{β} H^A); 1.97 – 1.87 (m, 2H, Val-C ^{β} H/Pro-C ^{δ} H^A); 1.87 – 1.79 (m, 2H, Pro-C ^{β} H^B/Pro-C ^{γ} H^B); 1.67 (m, 1H, Cit-C ^{β} H^A); 1.49 (m, 1H, Cit-C ^{β} H^B); 1.44 – 1.36 (m, 2H, Cit-C ^{γ} H₂); 0.81 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, Val-CH₃); 0.79 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, Val-CH₃);

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, DMSO-*d*⁶) δ [ppm] = 172.0 (Pro-CO); 171.3 (COOH); 171.0 (Val-CO); 170.9 (Maleimid-CO); 170.1 (Cit-CONH); 170.0 (PEG-CONH); 158.9 (Cit-CONH₂); 134.6 (Maleimid-CH); 69.8/69.77/69.72/69.66/69.5/69.4/67.0 (PEG-CH₂); 59.3 (Pro-C ^{α}); 57.1 (Val-C ^{α}); 50.2 (Cit-C ^{α}); 46.8 (Pro-C ^{γ}); 40.6 (Gly-CH₂); 30.7 (Val-C ^{β}); 29.2 (Pro-C ^{β}); 28.3 (Cit-C ^{β}); 26.1 (Cit-C ^{γ}); 24.4 (Pro-C ^{δ}); 19.2 (Val-C ^{γ}); 18.1 (Val-C ^{γ});

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [m·z ⁻¹] =	778.35962	[C ₃₃ H ₅₃ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺
berechnet [m·z ⁻¹] =	778.35936	[C ₃₃ H ₅₃ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ .

7.4.5 Maleimid-PEG-Val-Cit-Pro-Gly-Cryptophycin-55-glycinat (**53**)

$$M = 1500.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{71}\text{H}_{100}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{21}$$

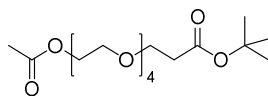
39 (10 mg; 13.1 μmol ; 1 eq) und **52** (29.7 mg; 39.3 μmol ; 3 eq) werden in abs. DMF (0.5 mL) gelöst und langsam mit einer Lösung aus DIPEA (10 μL ; 52.4 μmol ; 4 eq), TBTU (12.6 mg; 39.3 μmol ; 3 eq) und HOBt·H₂O (5.3 mg; 39.3 μmol ; 3 eq) in abs. DMF (0.5 mL) versetzt. Bei RT wird über Nacht gerührt. Nach Kontrolle durch analytische HPLC werden nochmals die gleichen Mengen DIPEA, TBTU und HOBt·H₂O wie oben hinzugegeben und weitere zwei Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird direkt durch präparative HPLC gereinigt. **53** (11.8 mg; 8 μmol ; 60%) wird als farbloses Lyophilisat erhalten.

HRMS (ESI-FT-ICR):

$$\text{experimentell [m}\cdot\text{z}^{-1}] = 1521.63460 \quad [\text{C}_{71}\text{H}_{100}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{21}+\text{Na}]^+$$

$$\text{berechnet [m}\cdot\text{z}^{-1}] = 1521.63338 \quad [\text{C}_{71}\text{H}_{100}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{21}+\text{Na}]^+;$$

HPLC: $t_R = 4.348 \text{ min}$ (Methode 6)

7.4.6 *tert*-Butyl-1-acetoxy-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-olat (**54**)

$$M = 364.43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_8$$

49 (500 mg; 1.55 mmol) wird in NEt₃ (10 mL) gelöst und mit Ac₂O (5 mL) versetzt. Bei RT wird 50 min gerührt, dann werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand mit H₂O (ca. 20 mL) verdünnt. Es wird mit Et₂O (3x20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. **54** (457 mg; 1.25 mmol; 81%) wird als leicht braune, klare Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 4.21 (dt, 2H, $J = 4.8/2.2 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$); 3.72 – 3.67 (m, 4H, CH₂); 3.66 – 3.59 (m, 12H, CH₂); 2.49 (t, 2H, $J = 6.6 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 2.07 (s, 3H, CH₃); 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃);

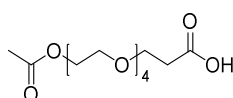
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 171.2 (C=O); 171.0 (C=O); 80.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 70.77/70.74/70.72/70.65/70.5/69.3/67.0 (CH_2); 63.8 ($\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$); 36.4 ($\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 21.1 (CH_3);

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$] = 387.19829 [$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_8+\text{Na}$] $^+$

berechnet [$\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$] = 387.19894 [$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_8+\text{Na}$] $^+$

7.4.6.1 2-oxo-3,6,9,12,15-Pentaoxaoctadecan-18-oic acid (55)

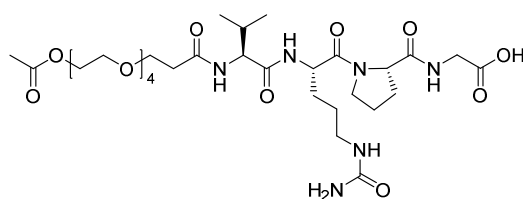


$M = 308.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_8$

In Anlehnung an eine Vorschrift von MIKATA *et al.* ^[141] wird **54** (71 mg; 0.19 mmol) in Ameisensäure (0.1 mL) aufgenommen und die Lösung 22 h bei RT gerührt. Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und **55** (55.2 mg; 0.18 mmol; 94%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 9.85 (bs, 1H, COOH); 4.21 – 4.17 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{COOCH}_2$); 3.73 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, CH_2); 3.69 – 3.65 (m, 2H, CH_2); 3.65 – 3.58 (m, 14H, CH_2); 2.59 (td, 2H, $J = 6.2/3.6$ Hz, CH_2COOH), 2.05 (s, 3H, CH_3).

7.4.6.2 Acetyl-PEG-Val-Cit-Pro-Gly (56)



$M = 718.79 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_{13}$

Die Synthese von **56** erfolgte nach AAV 1 – 5.

Schritt	Substanz	Volumen	Masse	Stoffmenge	Äquivalente	Reaktionsdauer
1	Barlos-Harz		2.0 g			
	Fmoc-Gly		2.86 g	9.6 mmol		
	DIPEA	2.44 mL	1.86 g	14.4 mmol		
	abs. DCM	10 mL				17.5 h
2	Fmoc-L-Pro		1.30 g	3.84 mmol	2 eq	
	DIPEA	0.98 mL	0.74 g	5.76 mmol	3 eq	

7.4 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

	TBTU		1.23 g	3.84 mmol	2 eq	
	HOBt·H ₂ O		0.52 g	3.84 mmol	2 eq	
	DMF	10 mL				ü. N.
3	Fmoc-L-Cit		1.53 g	3.84 mmol	2 eq	
	DIPEA	0.98 mL	0.74 g	5.76 mmol	3 eq	
	TBTU		1.23 g	3.84 mmol	2 eq	
	HOBt·H ₂ O		0.52 g	3.84 mmol	2 eq	
	DMF	10 mL				ü. N.
4	Fmoc-L-Val		1.95 g	5.76 mmol	3 eq	
	DIPEA	1.31 mL	0.99 g	7.68 mmol	4 eq	
	TBTU		1.85 g	5.76 mmol	3 eq	
	DMF	10 mL				ü. N.
5 ³	55		444 mg	1.44 mmol	3 eq	
	DIPEA	328 µL		1.92 mmol	4 eq	
	TBTU		462 mg	1.44 mmol	3 eq	
	HOBt·H ₂ O		195 mg	1.44 mmol	3 eq	
	DMF	7 mL				ü. N.

Nach Abspaltung vom Harz wurde das Rohprodukt durch präparative HPLC gereinigt. **56** (44 mg; 61 µmol; 13%) wurde als farbloses Lyophilisat erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 8.48 (m, 1H, Cit-NH); 8.04 (m, 1H, Gly-NH); 7.21 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Val-NH); 4.90 (m, 1H, Cit-C^αH); 4.77 (m, 1H, Val-C^αH); 4.68 (m, 1H, Pro-C^αH); 4.21 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, PEG-CH₂OAc); 4.00 (dd, 1H, *J* = 17.6/6.6 Hz, Gly-CH^AH^B); 3.79 – 3.70 (m, 4H, Pro-C^δH₂/PEG-CH₂); 3.68 (m, 1H, Gly-CH^AH^B); 3.67 – 3.59 (m, 14H, PEG-CH₂); 3.11 (m, 1H, Cit-C^δH^AH^B); 3.01 (m, 1H, Cit-C^δH^AH^B); 2.52 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz, PEG-CH₂CONH); 2.22 (m, 1H, Pro-C^βH^AH^B); 2.13 (m, 1H, Pro-C^γH^AH^B); 2.07 (s, 3H, Acetyl-CH₃); 2.04 (m, 1H, Pro-C^βH^AH^B); 2.00 – 1.92 (m, 2H, Pro-C^γH^AH^B/Val-C^βH); 1.79 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.64 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.53 – 1.41 (m, 2H, Cit-C^γH₂); 0.83 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz, Val-C^γH₃); 0.79 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, Val-C^γH₃);

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 173.2 (CO); 172.6 (CO); 171.8 (CO); 171.28 (CO); 171.25 (CO); 170.8 (CO); 161.4 (Cit-NHCONH₂); 70.64/70.60/70.59/70.56/70.54/70.4/69.2 (PEG-CH₂); 67.3 (Pro-C^δH₂); 63.7 (PEG-CH₂OOCCH₃);

³ Hier wurden nur noch mit 500 mg des Harzes weitergearbeitet. Daher verringert sich auch der gesamte Ansatz.

60.2 (Pro-C^αH); 57.3 (Val-C^αH); 50.3 (Cit-C^αH); 47.9 (PEG-CH₂); 41.5 (Gly-CH₂); 39.5 (Cit-C^δH₂); 37.0 (PEG-CH₂CONH); 32.5 (Val-C^βH); 29.5 (Pro-C^βH₂); 29.2 (Cit-C^βH₂); 25.3 (Cit-C^γH₂/Pro-C^γH₂); 21.1 (Acetyl-CH₃); 19.7 (Val-C^δH₃); 17.4 (Val-C^δH₃);

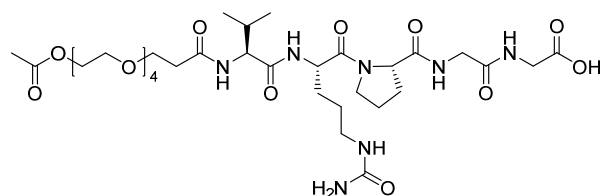
HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [m·z⁻¹] = 741.36190 [C₃₁H₅₄N₆O₁₃+Na]⁺
 berechnet [m·z⁻¹] = 741.36411 [C₃₁H₅₄N₆O₁₃+Na]⁺;

HPLC: t_R = 21.5 min (Methode 5)

t_R = 2.41 min (Methode 2).

7.4.6.3 Acetyl-PEG-Val-Cit-Pro-Gly-Gly (57)



M = 775.84 g·mol⁻¹

C₃₃H₅₇N₇O₁₄

Die Synthese von **57** erfolgte nach AAV 1 – 5.

Schritt	Substanz	Volumen	Masse	Stoffmenge	Äquivalente	Reaktionsdauer
1	Barlos-Harz		2.0 g			
	Fmoc-Gly		2.86 g	9.6 mmol		
	DIPEA	2.44 mL	1.86 g	14.4 mmol		
	abs. DCM	10 mL				20.5 h
2	Fmoc-Gly		1.52 g	5.1 mmol	3 eq	
	DIPEA	1.16 mL		6.8 mmol	4 eq	
	TBTU		1.64 g	5.1 mmol	3 eq	
	DMF	15 mL				ü. N.
3	Fmoc-L-Pro		1.72 g	5.1 mmol	3 eq	
	DIPEA	1.16 mL		6.8 mmol	4 eq	
	TBTU		1.64 g	5.1 mmol	3 eq	
	DMF	10 mL				ü. N.
4	Fmoc-L-Cit		1.55 g	3.9 mmol	2.3 eq	
	DIPEA	1.16 mL		6.8 mmol	4 eq	
	TBTU		1.25 g	3.9 mmol	2.3 eq	
	HOBt·H ₂ O		0.53 g	3.9 mmol	2.3 eq	

7.4 Synthese der Linker-Cryptophycin-Konjugate

	DMF	10 mL			ii. N.
5	Fmoc-L-Val		1.73 g	5.1 mmol	3 eq
	DIPEA	1.16 mL		6.8 mmol	4 eq
	HOBt·H ₂ O		1.64 g	5.1 mmol	3 eq
	DMF	10 mL			ii. N.
6 ⁴	55		393 mg	1.3 mmol	3 eq
	DIPEA	290 µL		1.7 mmol	4 eq
	TBTU		409 mg	1.3 mmol	3 eq
	HOBt·H ₂ O		172 mg	1.3 mmol	3 eq
	DMF	5 mL			ii. N.

Nach Abspaltung vom Harz wurde das Rohprodukt durch präparative HPLC gereinigt. **57** (66 mg; 85 µmol; 20%) wurde als farbloses Lyophilisat erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 8.15 – 7.97 (m, 2H, Cit-NH/Gly-NH); 7.78 (m, 1H, Gly-NH); 7.22 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, Val-NH); 4.80 (m, 1H, Cit-C^αH); 4.57 – 4.46 (m, 2H, Val-C^αH/Pro-C^αH); 4.22 – 4.19 (m, 2H, PEG-CH₂); 4.00 – 3.75 (m, 6H, Gly¹⁺²-CH₂/Pro-C^δH₂); 3.76 – 3.70 (m, 2H, PEG-CH₂); 3.70 – 3.67 (m, 2H, PEG-CH₂); 3.67 – 3.60 (m, 12H, PEG-CH₂); 3.14 – 3.00 (m, 2H, Cit-C^δH₂); 2.59 – 2.46 (m, 2H, PEG-C^αH₂); 2.22 (m, 1H, Pro-C^βH^AH^B); 2.12 (m, 1H, Pro-C^γH^AH^B); 2.07 (s, 3H, Acetyl-CH₃); 2.05 – 1.91 (m, 3H, Pro-C^βH^AH^B/Pro-C^γH^AH^B/Val-C^βH); 1.79 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.62 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.54 – 1.38 (m, 2H, Cit-C^γH₂); 0.84 (2d, 6H, *J* = 8.9/6.4 Hz, Val-C^γH₃);

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 173.3 (C=O); 172.6 (C=O); 172.6 (C=O); 171.3 (C=O); 171.3 (C=O); 171.2 (C=O); 170.2 (C=O); 161.3 (Cit-NHCONH₂); 70.64/70.62/70.60/70.57/70.49/70.45/69.2 (PEG-CH₂); 67.3 (Pro-C^δH₂); 63.7 (PEG-CH₂); 60.9 (Pro-C^αH); 57.9 (Val-C^αH); 50.6 (Cit-C^αH); 48.0 (Gly-CH₂); 42.9 (Gly-CH₂); 41.5 (Cit-C^δH₂); 36.9 (PEG-C^αH₂); 31.7 (Val-C^βH); 29.4 (Pro-C^βH₂); 28.9 (Cit-C^βH₂); 25.4 (Cit-C^γH₂); 25.2 (Pro-C^γH₂); 21.1 (Acetyl-CH₃); 19.5 (Val-C^γH₃); 17.7 (Val-C^γH₃).

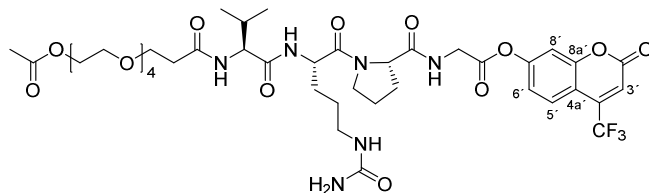
HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [m·z ⁻¹] =	798.38392	[C ₃₃ H ₅₇ N ₇ O ₁₄ +Na] ⁺
berechnet [m·z ⁻¹] =	798.38557	[C ₃₃ H ₅₇ N ₇ O ₁₄ +Na] ⁺ ;

⁴ Hier wurden nur noch mit 500 mg des Harzes weitergearbeitet. Daher verringert sich auch der gesamte Ansatz.

HPLC: $t_R = 2.38$ min (Methode 2).

7.4.7 Acetyl-PEG-Val-Cit-Pro-Gly-7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)Cumarin (59)



$M = 930.92 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{15}$

56 (15 mg; 20.8 μmol ; 1 eq), DCC (12.9 mg; 62.4 μmol ; 3 eq), DMAP (0.63 mg; 5.2 μmol ; 0.25 eq) und 7-Hydroxy-4(trifluoromethyl)cumarin (7.18 mg; 31.2 μmol ; 1.5 eq) werden in abs. DMF (0.7 mL) gelöst und im Dunkeln über Nacht bei RT gerührt. Reinigung über präparative HPLC (Methode 4) liefert **59** (7.3 mg; 7.8 μmol ; 38%) als farbloses Lyophilisat.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 8.46 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, Cit-NH); 8.17 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, Gly-NH); 7.73 (dd, 1H, $J = 9.1/2.0$ Hz, $\text{C}^{5\prime}\text{H}$); 7.24 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, $\text{C}^{8\prime}\text{H}$); 7.16 (dd, 1H, $J = 8.9/2.3$ Hz, $\text{C}^{6\prime}\text{H}$); 7.09 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, Val-NH); 6.77 (s, 1H, $\text{C}^{3\prime}\text{H}$); 4.87 (ddd, 1H, $J = 8.0/8.0/3.9$ Hz, Cit- $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 4.79 (dd, 1H, $J = 9.2/4.9$ Hz, Val- $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 4.64 (dd, 1H, $J = 8.1/5.0$ Hz, Pro- $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 4.23 – 4.18 (m, 2H, PEG- $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$); 4.16 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, Gly- $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 4.14 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, Gly- $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3.81 – 3.70 (m, 3H, PEG- $\text{CH}_2/\text{Pro-}\text{C}^{\gamma}\text{H}^{\text{A}}$); 3.70 – 3.66 (m, 2H, PEG- $\text{CH}_2/\text{Pro-}\text{C}^{\gamma}\text{H}^{\text{B}}$); 3.66 – 3.60 (m, 13H, PEG- CH_2); 3.19 (m, 1H, Cit- $\text{C}^{\delta}\text{H}^{\text{A}}$); 2.87 (m, 1H, Cit- $\text{C}^{\delta}\text{H}^{\text{B}}$); 2.53 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, PEG- $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$); 2.25 (m, 1H, Pro- $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}$); 2.17 (m, 1H, Pro- $\text{C}^{\delta}\text{H}^{\text{A}}$); 2.06 (s, 3H, Acetyl- CH_3); 2.06 – 1.95 (m, 3H, Val- $\text{C}^{\beta}\text{H}/\text{Pro-}\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{B}}/\text{Pro-}\text{C}^{\delta}\text{H}^{\text{B}}$); 1.76 (m, 1H, Cit- $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{A}}$); 1.59 (m, 1H, Cit- $\text{C}^{\beta}\text{H}^{\text{B}}$); 1.48 (m, 1H, Cit- $\text{C}^{\gamma}\text{H}^{\text{A}}$); 1.39 (m, 1H, Cit- $\text{C}^{\gamma}\text{H}^{\text{B}}$); 0.85 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, Val- $\text{C}^{\gamma}\text{H}_3$); 0.80 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, Val- $\text{C}^{\gamma}\text{H}_3$);

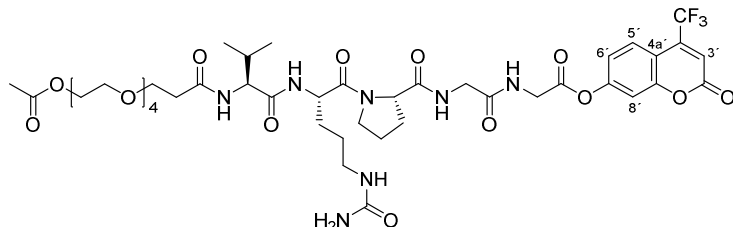
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (126 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 173.4 (CO); 172.4 (CO); 171.2 (CO); 171.0 (CO); 167.6 (Gly-CO); 160.4 (Cit-NHCO); 158.6 ($\text{C}^{2\prime}$); 155.1 ($\text{C}^{8\text{a}\prime}$); 153.7 ($\text{C}^{7\prime}$); 141.2 (q, 1C, $J = 33.4$ Hz, $\text{C}^{4\prime}$); 126.6 ($\text{C}^{5\prime}\text{H}$); 121.5 (q, 1C, $J = 275.5$ Hz, CF_3); 118.9 ($\text{C}^{6\prime}\text{H}$); 115.6 (m, 1C, $\text{C}^{3\prime}\text{H}$); 111.7 ($\text{C}^{4\text{a}\prime}$); 111.0 ($\text{C}^{8\prime}\text{H}$); 70.66/70.62/70.60/70.53/70.50/69.2/67.3 (PEG- CH_2); 63.7 (PEG- $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$); 60.3 (Pro- $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 57.2 (Val- $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 50.2 (Cit- $\text{C}^{\alpha}\text{H}$); 47.8 (Pro- $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$); 41.5 (Gly- CH_2); 39.8 (Cit- $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$); 37.2 (PEG- $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$); 32.6 (Val- C^{β}H); 29.6/29.4 (Cit- $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ und Pro- $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$); 25.3/25.1 (Cit- $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ und Pro- $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$); 21.1 (Acetyl- CH_3); 19.9 (Val- $\text{C}^{\gamma}\text{H}_3$); 17.2 (Val- $\text{C}^{\gamma}\text{H}_3$);

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$] =	953.37530	$[\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{15}+\text{Na}]^+$
berechnet [$\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$] =	953.37262	$[\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{15}+\text{Na}]^+$

HPLC: $t_R = 24.8$ min (Methode 4)

7.4.8 Acetyl-PEG-Val-Cit-Pro-Gly-Gly-7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)Cumarin (60)



$M = 987.97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ C}_{43}\text{H}_{60}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_{16}$

57 (15 mg; 19.3 μmol ; 1 eq), DCC (11.8 mg; 57.3 μmol ; 3 eq), DMAP (0.6 mg; 4.8 μmol ; 0.25 eq) und 7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)cumarin (6.7 mg; 29 μmol ; 1.5 eq) werden in abs. DMF (0.7 mL) gelöst und über Nacht im Dunkeln bei RT gerührt. Reinigung über präparative HPLC (Methode 5) liefert **60** (10.6 mg; 10.7 μmol ; 56%) als farbloses Lyophilisat.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 8.16 (m, 1H, Cit-NH); 7.84 (m, 2H, Gly-NH); 7.74 (dd, 1H, $J = 8.8/1.8$ Hz, C^5H); 7.28 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, C^8H); 7.18 (dd, 1H, $J = 8.9/2.3$ Hz, C^6H); 7.13 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, Val-NH); 6.77 (s, 1H, C^3H); 4.86 (m, 1H, Cit- C^αH); 4.61 – 4.53 (m, 2H, Val- C^αH /Pro- C^αH); 4.27 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, Gly- $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 4.25 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, Gly- $\text{CH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 4.23 – 4.17 (m, 2H, PEG- $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$); 3.93 – 3.88 (m, 2H, Gly- CH_2); 3.83 – 3.72/3.70 – 3.66/3.65 – 3.60 (3m, 18H, Pro- $\text{C}^\delta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$ /Pro- $\text{C}^\delta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$ /PEG- CH_2); 3.15(m, 1H, Cit- $\text{C}^\delta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3.06 (m, 1H, Cit- $\text{C}^\delta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 2.62 – 2.49 (m, 2H, PEG- $\text{C}^\alpha\text{H}_2$); 2.28 (m, 1H, Pro- $\text{C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 2.14 (m, 1H, Pro- $\text{C}^\gamma\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 2.06 (s, 3H, Acetyl- CH_3); 2.06 – 1.93 (m, 3H, Pro- $\text{C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$ /Pro- $\text{C}^\gamma\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$ /Val- C^βH); 1.85 (m, 1H, Cit- $\text{C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 1.64 (m, 1H, Cit- $\text{C}^\beta\text{H}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 1.56 – 1.42 (m, 2H, Cit- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$); 0.86 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, Val- $\text{C}^\gamma\text{H}_3$), 0.83 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, Val- $\text{C}^\gamma\text{H}_3$);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (151 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 173.3 (C=O); 172.8 (C=O); 172.7 (C=O); 171.33 (C=O); 171.29 (C=O); 171.23 (C=O); 170.8 (C=O); 170.0 (C=O); 168.0 (C=O); 158.6 (C^2); 155.1 ($\text{C}^{8\text{a}}$); 153.7(C^7); 141.3 (q, 1C, $J = 33.3$ Hz, C^4); 126.5 (C^5); 121.5 (q, 1C, $J = 275.4$ Hz, CF_3); 119.0 (C^6); 115.6 (C^3); 111.7 ($\text{C}^{4\text{a}}$); 111.1 (C^8); 70.6/70.5/70.4/69.2/67.1 (PEG- CH_2); 63.6 (PEG- $\text{CH}_3\text{COOCH}_2$); 60.8 (Pro- C^αH); 57.9 (Val- C^αH); 50.5 (Cit- C^αH); 47.9 (Pro- $\text{C}^\delta\text{H}_2$); 42.7 (Gly- CH_2); 41.5 (Gly- CH_2); 39.9 (Cit- $\text{C}^\delta\text{H}_2$); 36.8 (PEG- CH_2CONH); 31.9 (Val- C^βH); 29.6 (Pro- C^βH_2); 28.8 (Cit- C^βH_2); 25.5 (Pro- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$); 24.6 (Cit- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$); 21.1 (Acetyl- CH_3); 19.7 (Val- $\text{C}^\gamma\text{H}_3$); 17.6 (Val- $\text{C}^\gamma\text{H}_3$).

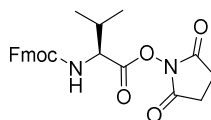
HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$] = 1010.39658 [$\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_{16}+\text{Na}$] $^+$

berechnet [$m \cdot z^{-1}$] = 1010.39408 $[C_{43}H_{60}F_3N_7O_{16}+Na]^+$

HPLC: $t_R = 24.4 - 25.2$ min (Methode 5)

7.4.9 Fmoc-Val-NHS (62) ^[109]

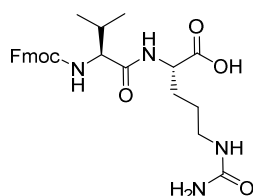


$M = 436.46 \text{ g mol}^{-1}$ $C_{24}H_{24}N_2O_6$

Fmoc-L-Val-OH (5.69 g; 16.77 mmol; 1 eq) und HOSu (1.93 g; 16.77 mmol; 1 eq) werden in abs. THF (44 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Es wird DCC (3.46 g; 16.77 mmol; 1 eq), gelöst in abs. THF (6 mL), langsam zugegeben und 19.5 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle). Der entstandene farblose Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt. **62** (7.66 g; 16.77 mmol; quant.) wird als farbloser glasartiger Schaum erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*, TMS) δ [ppm] = 7.78 (dd, 2H, $J = 7.5/1.3$ Hz, C^{ar}H); 7.65 – 7.58 (m, 2H, C^{ar}H); 7.48 – 7.35 (m, 2H, C^{ar}H); 7.34 (td, 2H, $J = 7.4/1.3$ Hz, C^{ar}H); 5.34 (m, 1H, NH); 4.71 (dd, 1H, $J = 9.3/4.8$ Hz, C^αH); 4.50 – 4.43 (m, 2H, Fmoc-CH₂); 4.26 (m, 1H, Fmoc-CH); 2.85 (s, 4H, NHS-CH₂); 2.36 (m, 1H, C^βH); 1.13 – 1.02 (m, 6H, C^γH₃).

7.4.10 Fmoc-Val-Cit (63) ^[109]

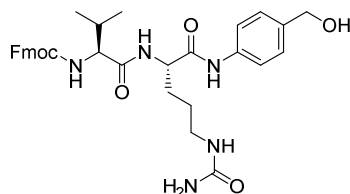


$M = 496.56 \text{ g mol}^{-1}$ $C_{26}H_{32}N_4O_6$

L-Cit-OH (2.30 g; 13.11 mmol; 1.05 eq) und NaHCO₃ (1.10 g; 13.11 mmol; 1.05 eq) werden in H₂O dest. (30 mL) gelöst und mit **62** (5.45 g; 12.49 mmol; 1 eq) gelöst in DME (30 mL) versetzt. Zur besseren Löslichkeit wird THF (15 mL) zugegeben und die Emulsion 21 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Zitronensäure (15%ig; 75 mL) versetzt und mit EtOAc (insges. ca. 500 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit H₂O dest. (2x50 mL) gewaschen und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in Et₂O verrieben, im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Der Feststoff wird im Vakuum getrocknet und lyophilisiert. **63** (quant.) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 7.83 – 7.77 (m, 2H, C^{ar}H); 7.73 – 7.62 (m, 2H, C^{ar}H); 7.43 – 7.35 (m, 2H, C^{ar}H); 7.35 – 7.27 (m, 2H, $J = 7.4/1.3$ Hz, C^{ar}H); 4.44 – 4.32 (m, 3H, Fmoc-CH₂)

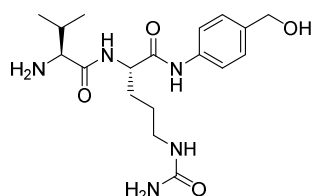
/Cit-C^αH); 4.23 (m, 1H, Val-C^αH); 3.96 (m, 1H, Fmoc-CH); 3.15 – 3.05 (m, 2H, Cit-C^βH₂); 2.05 (m, 1H, Val-C^βH); 1.89 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.71 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.62 – 1.48 (m, 2H, Cit-C^γH₂); 0.98 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, Val-C^γH₃); 0.95 (d, 3H, *J* = 7.4 Hz, Val-C^γH₃).

7.4.11 Fmoc-Val-Cit-PABA (**64**) [109]

M = 601.69 g mol⁻¹ C₃₃H₃₉N₅O₆

63 (500 mg; 1.01 mmol) und PABA (248 mg; 2.02 mmol; 2 eq) werden in DCM/MeOH (2:1; 17 mL) gelöst und mit EEDQ (500 mg; 2.02 mmol; 2 eq) versetzt. Bei RT wird 23 h im Dunkeln gerührt. Die Lösemittel werden im Vakuum entfernt und der Rückstand in Et₂O trituriert, 1 h im Ultraschallbad behandelt und danach filtriert. **64** (0.57 g; 0.95 mmol; 94%) wird als beiger Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.00 (s, 1H, PAB-NH); 8.12 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH); 7.89 (dm, 2H, *J* = 7.5 Hz, C^{ar}H); 7.78 – 7.70 (m, 2H, C^{ar}H); 7.58 – 7.49 (m, 2H, C^{ar}H); 7.45 – 7.37 (m, 2H, C^{ar}H); 7.36 – 7.28 (m, 2H, C^{ar}H); 7.26 – 7.19 (m, 2H, C^{ar}H); 6.00 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz, Cit-NH); 5.42 (s, 2H, Cit-NH₂); 5.11 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, PAB-OH); 4.46 – 4.39 (m, 2H, PAB-CH₂); 4.32 – 4.19 (m, 4H, Val-C^αH / Cit-C^αH / Fmoc-CH₂); 3.93 (dd, 1H, *J* = 8.9/7.0 Hz, Fmoc-CH); 3.11 – 2.85 (m, 2H, Cit-NHCH₂); 1.98 (m, 1H, Val-C^βH); 1.78 – 1.51 (m, 2H, Cit-CH₂); 1.52 – 1.29 (m, 2H, Cit-CH₂); 0.93 – 0.81 (m, 6H, Val-C^γH₃).

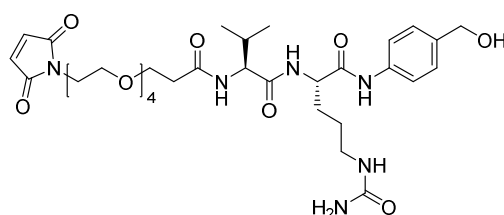
7.4.12 Val-Cit-PABA (**65**) [109]

M = 379.45 g mol⁻¹ C₁₈H₂₉N₅O₄

64 (500 mg; 0.83 mmol) wird in NMP (10 mL) gelöst und mit Diethylamin (2 mL) versetzt. Bei RT wird über Nacht gerührt, dann wird das Lösungsmittel im HV entfernt und das entstandene Öl mit DCM versetzt. Nach Behandlung im Ultraschallbad (10 min) wird der Feststoff abfiltriert und mit DCM nachgewaschen. Trocknung im HV liefert **65** (258 mg; 0.68 mmol; 82%) als beigen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.05 (s, 1H, PAB-NH); 8.13 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, Cit-NH); 7.54 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, C^{ar}H); 7.23 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, C^{ar}H); 5.98 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, Cit-CH₂NH); 5.41 (s, 2H, Cit-NH₂); 5.11 (m, 1H, OH); 4.57 – 4.33 (m, 3H, Cit-C^αH/CH₂OH); 3.01 (d, 2H, *J* = 4.9 Hz, Val-NH₂); 2.97 (m, 1H, Val-C^αH); 1.90 (m, 1H, C^βH Val); 1.77 – 1.63 (m, 2H, Cit-CH₂); 1.63 – 1.51 (m, 2H, Cit-CH₂); 1.50 – 1.25 (m, 2H, Cit-CH₂); 0.88 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, C^γH₃); 0.78 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, C^γH₃).

7.4.13 Maleimid-PEG-Val-Cit-PABA (66)



$M = 706.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{11}$

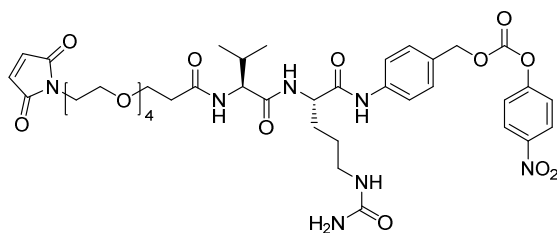
51 (191 mg; 0.55 mmol; 1.2 eq) und DIPEA (314 μL ; 1.84 mmol; 4 eq) werden in DMF (6.53 mL) vorgemischt und zu **65** (175 mg; 0.46 mmol; 1 eq) gegeben. HATU (209 mg; 0.55 mmol; 1.2 eq) und HOAt (75 mg; 0.55 mmol; 1.2 eq) werden in DMF (6.53 mL) gelöst und zu den anderen Reagenzien gegeben. Nach 2 h Rühren bei RT wird die Reaktionslösung im HV eingengt und in MeOH aufgenommen und erwärmt. Der nicht gelöste Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt. Reinigung über Kieselgel (DCM/MeOH 8:2) liefert **66** (212 mg; 0.3 mmol; 65%) als gelbes Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.01 (s, 1H, PAB-NH); 8.15 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, Cit-NH); 7.93 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, Val-NH); 7.57 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, PAB-C^{ar}H); 7.22 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, PAB-C^{ar}H); 7.02 (s, 2H, CH=CH); 6.15 (m, 1H, Cit-NHCO); 5.47 (s, 2H, Cit-NH₂); 4.42 (s, 2H, PAB-CH₂); 4.38 (m, 1H, Cit-C^αH); 4.22 (dd, 1H, *J* = 8.7/6.6 Hz, Val-C^αH); 3.65 – 3.53 (m, 4H, PEG-CH₂); 3.53 – 3.39 (m, 14H, PEG-CH₂); 3.05 – 2.90 (m, 2H, Cit-C^δH₂); 2.51 – 2.44 (m, 1H, PEG-C^αH^AH^B); 2.38 (dt, 1H, *J* = 14.4/6.2 Hz, PEG-C^αH^AH^B); 1.98 (m, 1H, Val-C^βH); 1.71 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.60 (m, 1H, Cit-C^βH^AH^B); 1.44 (m, 1H, Cit-C^γH^AH^B); 1.35 (m, 1H, Cit-C^γH^AH^B); 0.86 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, Val-C^γH₃); 0.83 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, Val-C^γH₃);

¹³C{¹H}-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.1 (Val-CO); 170.9 (Maleimid-CO); 170.4 (Cit-CO); 170.3 (PEG-CO); 159.0 (Cit-H₂NCO); 137.6 (PAB-C^{ar}); 137.4 (PAB-C^{ar}); 134.6 (HC=CH); 126.9 (PAB-C^{ar}H); 118.8 (PAB-C^{ar}H); 69.79/69.76/69.71/69.65/69.5/69.4/67.0 (PEG-CH₂); 62.6 (PAB-CH₂); 57.6 (Val-C^αH); 53.1 (Cit-C^αH); 38.5 (Cit-C^δH₂); 36.0 (PEG-C^αH₂); 30.6 (Val-C^βH); 29.3 (Cit-C^βH₂); 26.8 (Cit-C^γH₂); 19.2 (Val-C^γH₃); 18.2 (Val-C^γH₃);

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$m \cdot z^{-1}$] =	729.34446	$[C_{33}H_{50}N_6O_{11}+Na]^+$
berechnet [$m \cdot z^{-1}$] =	729.34298	$[C_{33}H_{50}N_6O_{11}+Na]^+$

7.4.14 Maleimid-PEG-Val-Cit-PAB-PNP (67) ^[145]

$M = 871.89 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $C_{40}H_{53}N_7O_{15}$

66 (116.9 mg; 0.17 mmol; 1 eq) wird in abs. DMF (1.5 mL) gelöst und mit Bis(*p*-nitrophenyl)carbonat (100.6 mg; 0.33 mmol; 2 q) versetzt. Direkt im Anschluss wird DIPEA (43 μ L; 32.3 mg; 0.25 mmol; 1.5 eq) zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Die flüchtigen Bestandteile werden im HV entfernt und der feste Rückstand über Kieselgel (DCM/MeOH 9:1) gereinigt. **67** (94.3 mg; 0.11 mmol; 64%) wird als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.49;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.04 (s, 1H, PAB-NH); 8.35 – 8.27 (m, 2H, PNP- $C^{ar}H$); 8.11 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, Cit-NH); 7.85 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, Val-NH); 7.68 – 7.63 (m, 2H, PAB- $C^{ar}H$); 7.59 – 7.53 (m, 2H, PNP- $C^{ar}H$); 7.44 – 7.38 (m, 2H, PAB- $C^{ar}H$); 7.02 (s, 2H, CH=CH); 5.97 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, Cit-NHCO); 5.40 (s, 2H, Cit-NH $_2$); 5.24 (s, 2H, PAB-CH $_2$); 4.39 (m, 1H, Cit- $C^\alpha H$); 4.23 (dd, 1H, $J = 8.6/6.6$ Hz, Val- $C^\alpha H$); 3.63 – 3.53 (m, 4H, PEG- $C^\beta H_2/CH_2$); 3.52 – 3.42 (m, 14H, PEG-CH $_2$); 3.03 (m, 1H, Cit- $C^\delta H^A$); 2.95 (m, 1H, Cit- $C^\delta H^B$); 2.47 (m, 1H, PEG- $C^\alpha H^A$); 2.38 (dt, 1H, $J = 14.5/6.3$ Hz, PEG- $C^\alpha H^B$); 1.97 (m, 1H, Val- $C^\beta H$); 1.70 (m, 1H, Cit- $C^\beta H^A$); 1.60 (m, 1H, Cit- $C^\beta H^B$); 1.44 (m, 1H, Cit- $C^\gamma H^A$); 1.37 (m, 1H, Cit- $C^\gamma H^B$); 0.87 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, Val- $C^\gamma H_3$); 0.83 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, Val- $C^\gamma H_3$);

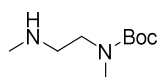
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 171.2 (Val-CO); 170.9 (Maleimid-CO); 170.7 (Cit-CO); 170.3 (PEG-CO); 158.9 (Cit-NH $_2$ CONH); 155.3 (PNP- $C^{ar}O$); 152.0 (OCOO); 145.2 (PNP- $C^{ar}NO_2$); 139.4 (PAB- $C^{ar}NH$); 134.6 (Maleimid-CH=CH); 129.5 (PAB- $C^{ar}H$); 129.3 (PAB- $C^{ar}CH_2$); 125.4 (PNP- $C^{ar}H$); 122.6 (PNP- $C^{ar}H$); 119.0 (PAB- $C^{ar}H$); 70.3 PAB-CH $_2$; 69.78/69.75/69.69/69.63/69.5/69.4 (PEG-CH $_2$); 66.9 (PEG- $C^\beta H_2$); 57.5 (Val- $C^\alpha H$); 53.2 (Cit- $C^\alpha H$); 38.6 (Cit- $C^\delta H_2$); 36.8 (PEG- $C^\alpha H_2$); 30.6 (Val- $C^\beta H$); 29.2 (Cit- $C^\beta H_2$); 26.9 (Cit- $C^\gamma H_2$); 19.2 (Val-CH $_3$); 18.1 (Val-CH $_3$);

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$m \cdot z^{-1}$] =	894.34885	$[C_{40}H_{53}N_7O_{15}+Na]^+$
berechnet [$m \cdot z^{-1}$] =	894.34919	$[C_{40}H_{53}N_7O_{15}+Na]^+$

HPLC: $t_R = 3.723$ min (Methode 2)

7.4.15 *tert*-Butylmethyl-(2-(methylamino)ethyl)carbonat (**69**) ^[146]

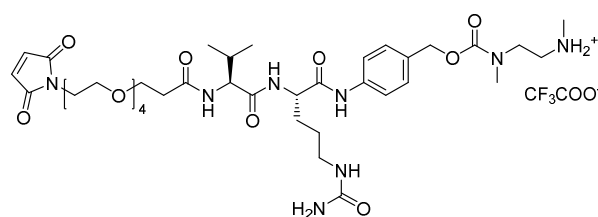


$$M = 188.27 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad C_9H_{20}N_2O_2$$

Gemäß der Literaturvorschrift von SAARI *et al.* wird Boc_2O (1.65 g; 7.56 mmol) gelöst in THF (15 mL) über 30 min bei 0°C zu *N,N'*-Dimethylethylendiamin (2.44 mL; 2.00 g; 22.96 mmol) in THF (50 mL) getropft. Das Eisbad wird danach entfernt und die Mischung über Nacht (18 h) bei RT gerührt. Gemäß einer Literaturvorschrift von KLEEMANN *et al.* wird EtOAc (100 mL) zugesetzt und mit ges. K_2CO_3 -Lsg. (50 mL) und ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird **69** (1.35 g; 71.7 mmol; 95%) als leicht gelbes, niedrig viskoses Öl erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) δ [ppm] = 1.48 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 2.47 (s, 3H, $NHCH_3$); 2.74 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $NHCH_2$); 2.90 (s, 3H, NCH_3); 3.35 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, NCH_2).

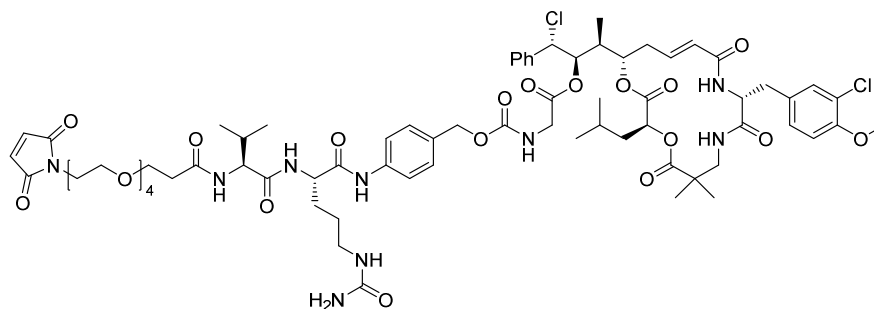
7.4.16 Maleimid-PEG-Val-Cit-PABC-*N,N'*-Dimethylethylendiamin-Trifluoroacetat (**70**)



$$M = 934.97 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad C_{40}H_{61}F_3N_8O_{14}$$

67 (37.4 mg; 43 μmol ; 1 eq) wird in abs. DMF (500 μL) gelöst und mit **69** (16.8 mg; 86 μmol ; 2 eq) versetzt. Anschließend wird DIPEA (22 μL ; 129 μmol ; 3 eq) hinzugegeben und 18 h bei RT gerührt. Im HV werden die flüchtigen Bestandteile entfernt und der erhaltene Rückstand direkt wieder in DCM (2 mL) gelöst und mit TFA (0.1 mL) versetzt. Es wird 2 h bei RT gerührt und danach zur Trockene eingengt. **70** wird ohne weitere Reinigung direkt in der Folgereaktion verwendet.

7.4.17 Maleimid-PEG-Val-Cit-PAB-Cry-55-Glycinat (72)



$$M = 1495.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{72}\text{H}_{97}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{21}$$

39 (17.8 mg; 22.3 μmol ; 1 eq) und **67** (28.1 mg; 24.5 μmol ; 1.1 eq) werden zusammen eingewogen und in abs. DMF (0.8 mL) gelöst. Bei RT wird DIPEA (11.6 μL ; 66.8 μmol ; 3 eq) zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Die komplette Reaktionslösung wird direkt über präparative HPLC (Methode 4) gereinigt. **72** (20.2 mg; 13.5 μmol ; 61%) wird als farbloses Lyophilisat erhalten.

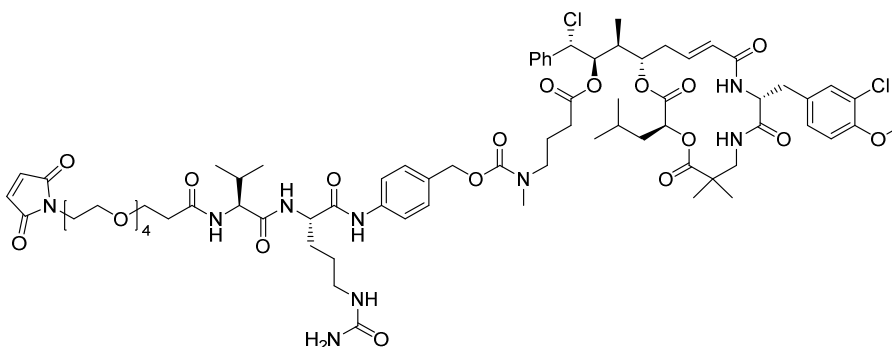
HRMS (ESI-FT-ICR):

$$\text{experimentell } [m\cdot z^{-1}] = 1516.60694 \quad [\text{C}_{72}\text{H}_{97}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{21}+\text{Na}]^+$$

$$\text{berechnet } [m\cdot z^{-1}] = 1516.60683 \quad [\text{C}_{72}\text{H}_{97}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{21}+\text{Na}]^+$$

HPLC: $t_R = 4.637 \text{ min}$ (Methode 6)

7.4.18 Maleimid-PEG-Val-Cit-PAB-Cry-55-N-Me-aminobutyrat (73)



$$M = 1537.59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{75}\text{H}_{103}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{21}$$

67 (9.5 mg; 10.9 μmol ; 1 eq) und **47** (8.8 mg; 10.9 μmol ; 1 eq) werden in abs. DMF (1000 μL) gelöst und mit DIPEA (1.9 μL ; 10.9 μmol ; 1 eq) versetzt. Bei RT wird im abgedunkelten Kolben über Nacht gerührt. Nach erneuter Zugabe von DIPEA (1.9 μL ; 10.9 μmol ; 1 eq) und weiterem Rühren bei RT (1 h), werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Reinigung des

Rückstands durch präparative HPLC (Methode 4) liefert **73** (6.7 mg; 4.4 μmol ; 40%) als farbloses Lyophilisat.

HRMS (ESI-FT-ICR):

experimentell [$\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$] = 1558.65256 $[\text{C}_{75}\text{H}_{103}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{21}+\text{Na}]^+$

berechnet [$\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$] = 1558.65378 $[\text{C}_{75}\text{H}_{103}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{21}+\text{Na}]^+$

HPLC: $t_R = 4.752$ min (Methode 2)

$t_R = 4.730$ min (Methode 6)

7.5 Biochemische Tests

7.5.1 Spaltungsassay

Der Spaltungsassay der Substanzen **53**, **72** und **73** wird in Anlehnung an ein Protokoll von DUBOWCHIK *et al.* durchgeführt.^[61] Folgende Lösungen werden für den Assay verwendet:

NaOAc-Puffer **pH = 5.0 (bei 37°C)**

25 mM NaOAc

1 mM EDTA

Aktivierungslösung

30 mM DTT

15 mM EDTA

Aktivierungspuffer **pH = 6.0 (bei 37°C)**

5 mM DTT

5 mM EDTA

100 mM NaCl

100 mM Na_2HPO_4

L-Cystein-Lösung

10 mM L-Cystein

in NaOAc-Puffer

53-Stammlösung

10 mM **53**

in DMSO-d⁶

72-Stammlösung

10 mM **72**

in DMSO-d⁶

73-Stammlösung

10 mM **73**

in DMSO-d⁶

Z-Arg-Arg-AMC-Stammlösung

10 mM Z-Arg-Arg-AMC

in DMSO-d⁶

Es wird eine CTSB-Stammlösung hergestellt mit 1.2 mg CTSB pro 1000 µL NaOAc-Puffer. Diese wird aliquotiert und die Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Pro Assay werden 25 µL der Enzymstammlösung mit 50 µL des Aktivierungspuffers 30 min bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig werden jeweils 2 µL der Substanzstammlösungen (**53**, **72**, **73** und Z-Arg-Arg-AMC) mit 2 µL der L-Cys-Lösung (nicht bei Z-Arg-Arg-AMC) 30 min bei 37°C inkubiert. Die Substanz-Cystein-Lösungen werden mit DMSO (46 µL bei **53**, **72** und **73**; 48 µL bei Z-Arg-Arg-AMC) und 875 µL NaOAc-Puffer (pH = 5) auf ein Gesamtvolumen von 925 µL verdünnt und im Anschluss direkt mit den 75 µL aktivierter Enzymlösung versetzt. Es wird über die Dauer von 6 h jeweils stündlich ein HPLC-Chromatogramm gemessen. Bei der dafür verwendeten HPLC-Methode handelt es sich um Methode 6, allerdings wird hierbei der Rack, in dem sich die Proben befanden auf 37°C geheizt. Nach sechs Stunden werden die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Protein wird dann mit MeCN gefällt, zentrifugiert und der Überstand vom Pellet abpipettiert. Der Überstand wird daraufhin zur Trockene eingeeengt und der erhaltene Rückstand mit einer Konzentration von 0.1 mg Substanz pro mL Lösungsmittel in MeCN/H₂O (52:48; v/v; 200 µL) aufgenommen und in der LC/MS verwendet.

7.5.2 Antikörperkonjugation

7.5.2.1 Vorversuch zur Reduktion des Antikörpers in der Hinge-Region

Um festzustellen, welches Verhältnis Antikörper/2-MEA zur besten Ausbeute an rIgG führt, werden folgende Stammlösungen (Verwendet wird die Pufferlösung von 7.1.11) hergestellt:

mAb-PBS-EDTA	10 mg Trastuzumab pro 1 mL PBS-EDTA-Puffer (68.7 μ M in Bezug auf Trastuzumab)
2-MEA-PBS-EDTA	6 mg 2-MEA pro 100 μ L PBS-EDTA-Puffer
Maleimid-PBS-EDTA-DMSO	1.2 mmol Maleimid pro 400 μ L Lösungsmittel (PBS-EDTA-Puffer/DMSO 1:1)

Die partielle Reduktion des Antikörpers Trastuzumab wird mit 2-MEA (2-Mercaptoethylamin Hydrochlorid) nach einem abgewandelten Protokoll der Firma THERMO SCIENTIFIC ^[169] durchgeführt. Zur Reduktion der Disulfidbindungen in der Hinge-Region des Antikörpers Trastuzumab wird dieser mit 10 mg/mL in dem hergestellten PBS-EDTA-Puffer (pH = 7.2) gelöst. Die Antikörperlösung wird mit der 2-MEA-Lösung (1 μ L/2 μ L/3 μ L/4 μ L/6 μ L/10 μ L 2-MEA-Lösung pro 10 μ L Antikörperlösung) versetzt und bei 37°C für 90 min mit 700 rpm inkubiert. Anschließend wird Maleimid-PBS-EDTA-Lösung (2 μ L pro 10 μ L Antikörperlösung) zugegeben und über Nacht bei RT mit 700 rpm inkubiert.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
mAb-PBS-EDTA-Lsg.	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
2-MEA-PBS-EDTA-Lsg.	5 μ L	10 μ L	15 μ L	20 μ L	30 μ L	50 μ L
Maleimid-PBS-EDTA-Lsg.	10 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	60 μ L	100 μ L

Jede Probe wird 10 min mit nicht-reduzierendem Puffer bei 99°C und 700 rpm aufgekocht und danach mit zwei verschiedenen Volumina auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgegeben, wobei versucht wird, möglichst konstante Antikörperkonzentrationen zu verwenden. Als Vergleich dient der nicht-reduzierte Antikörper. Nach Färben des Gels mit Coomassie-Färbelösung scheint Probe 3 das beste Reduktionsverhältnis mAb/2-MEA zu besitzen.

7.5.2.2 Konjugation von 73, 74 und 76 an den Antikörper

Zur Reduktion des Antikörpers werden Lösungen wie unter 7.5.2.1 hergestellt. Die mAb-PBS-EDTA-Lösung (1 mL) wird mit 3 µL frisch hergestellter 2-MEA-PBS-EDTA-Lösung pro 10 µL mAb-PBS-EDTA-Lösung versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird danach über eine HiTrap Desalting Sephadex G25 5 cm Säule entsalzt (PBS-EDTA-Puffer) und Fraktionen mit einem Volumen von 0.5 mL aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen werden mit Bradford-Lösung (200 µL pro 2 µL der Fraktionen) auf ihren Proteingehalt überprüft und die Fraktionen, die Protein enthalten, sofort vereinigt. Daraufhin werden die vereinigten Fraktionen mit 150 µL einer Lösung aus **53**, **72** oder **73** in DMSO (1.82 mM) versetzt und bei 6°C inkubiert.

Inkubationszeiten mit **53**, **72** oder **73**:

53	2 h
72	4 h
73	26 h

Nach der Inkubation werden die Proben auf ein Volumen von circa 1.5 mL aufkonzentriert und über eine Superdex 200 highload 16/60 Säule an einer Äkta Purifier mit PBS-EDTA-Puffer als Laufmittel aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen werden pro Peak vereinigt und aufkonzentriert:

53_Peak1	1.54 µg/µL
53_Peak2	0.32 µg/µL
72_Peak1	2.25 µg/µL
73_Peak1	0.82 µg/µL
73_Peak2	0.84 µg/µL

8 Anhang

8.1 Stabilitätsassay

8.1.1 Stabilitätsassay von 53

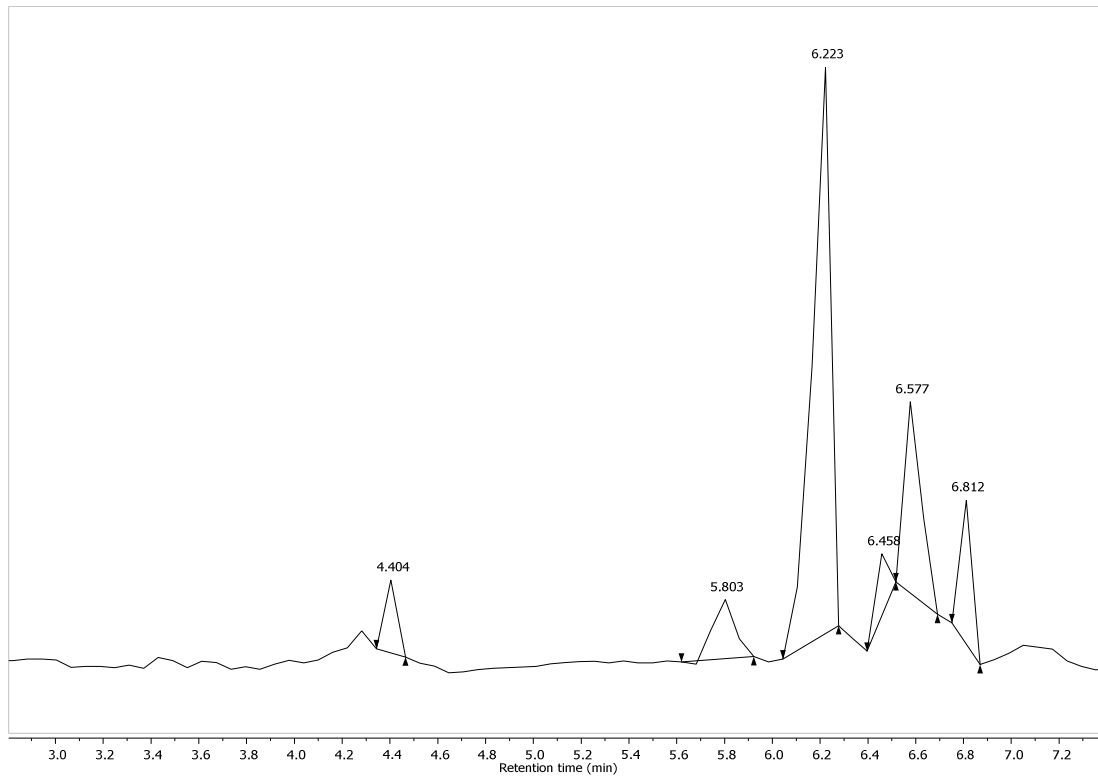


Abbildung 8-1: TIC-Chromatogramm der LC/MS-Analyse von 53.

8.1 Stabilitätsassay

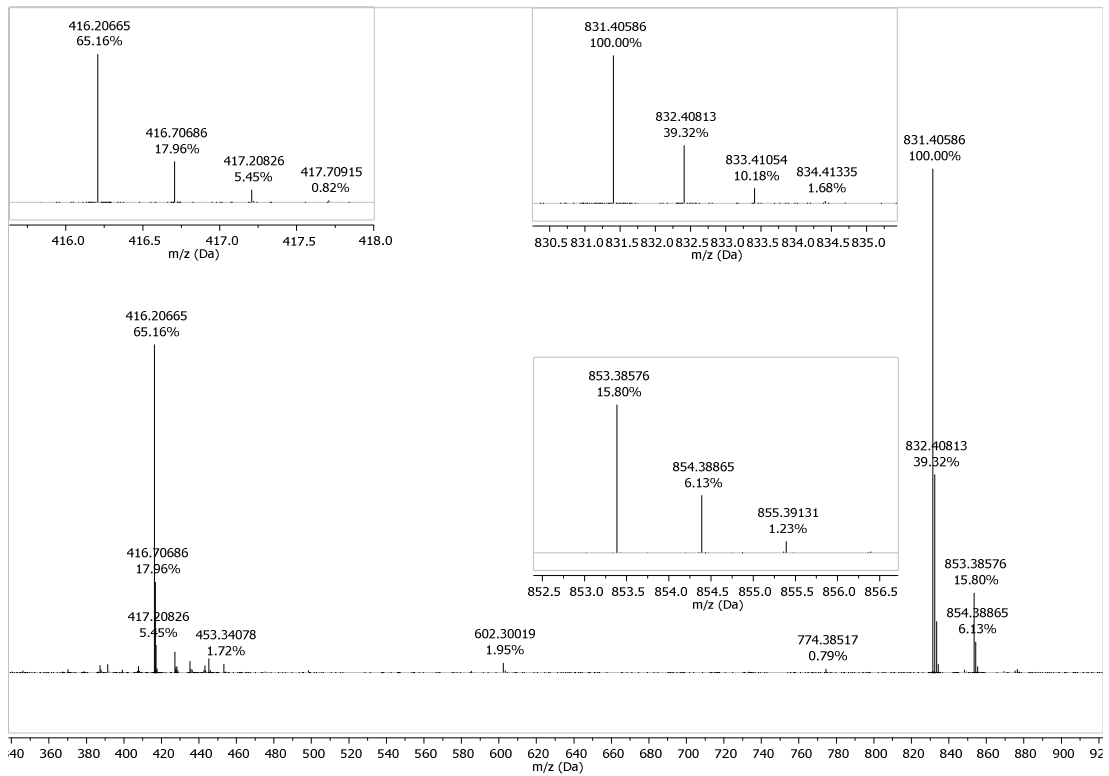


Abbildung 8-2: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von 53 bei einer Retentionszeit von 4.04 min.

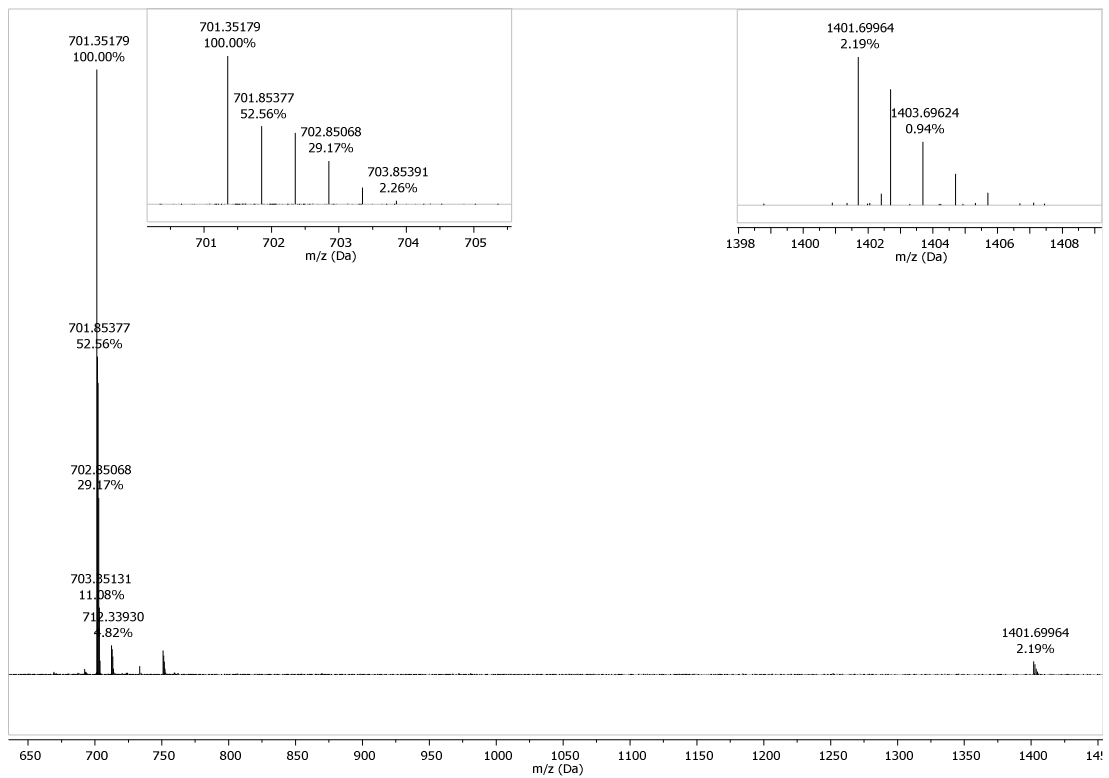


Abbildung 8-3: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von 53 bei einer Retentionszeit von 5.80 min.

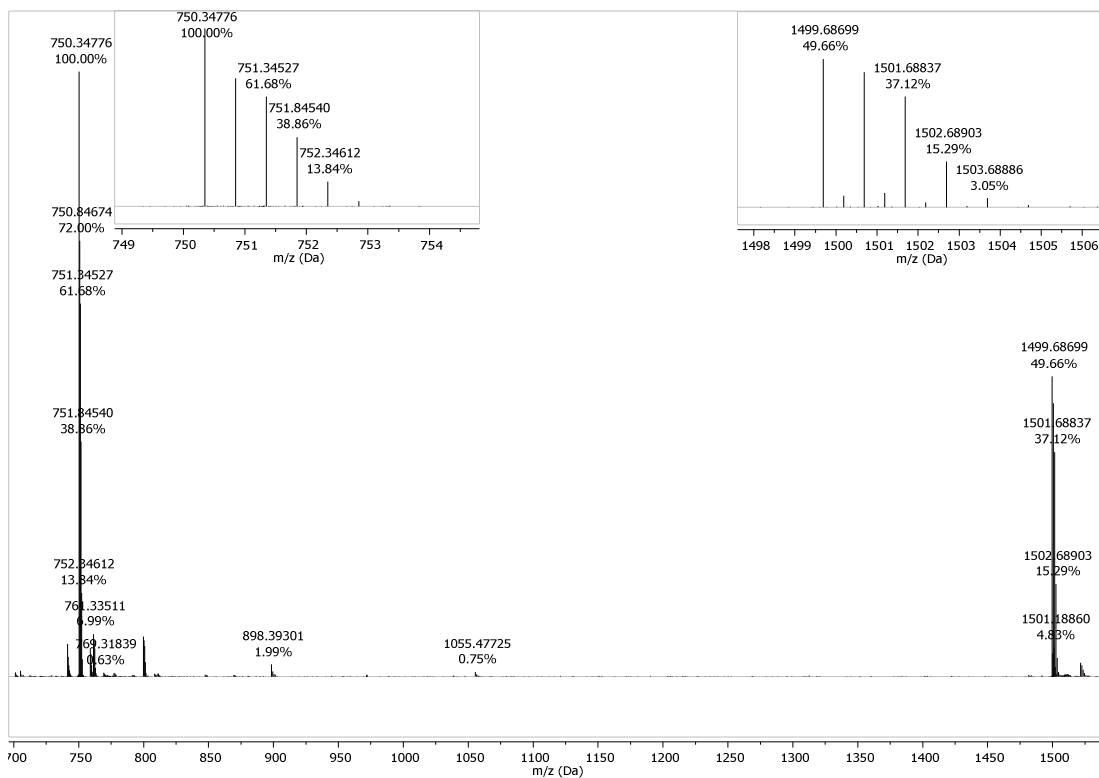


Abbildung 8-4: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **53** bei einer Retentionszeit von 6.22 min.

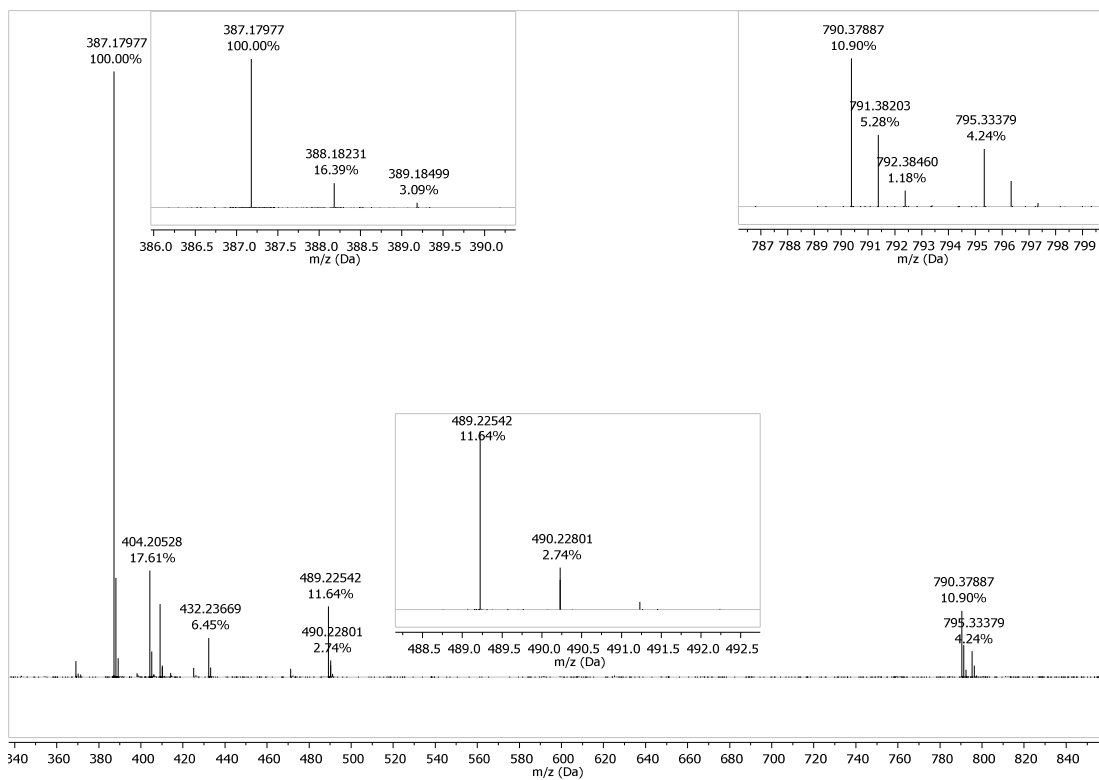


Abbildung 8-5: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **53** bei einer Retentionszeit von 6.46 min.

8.1 Stabilitätsassay

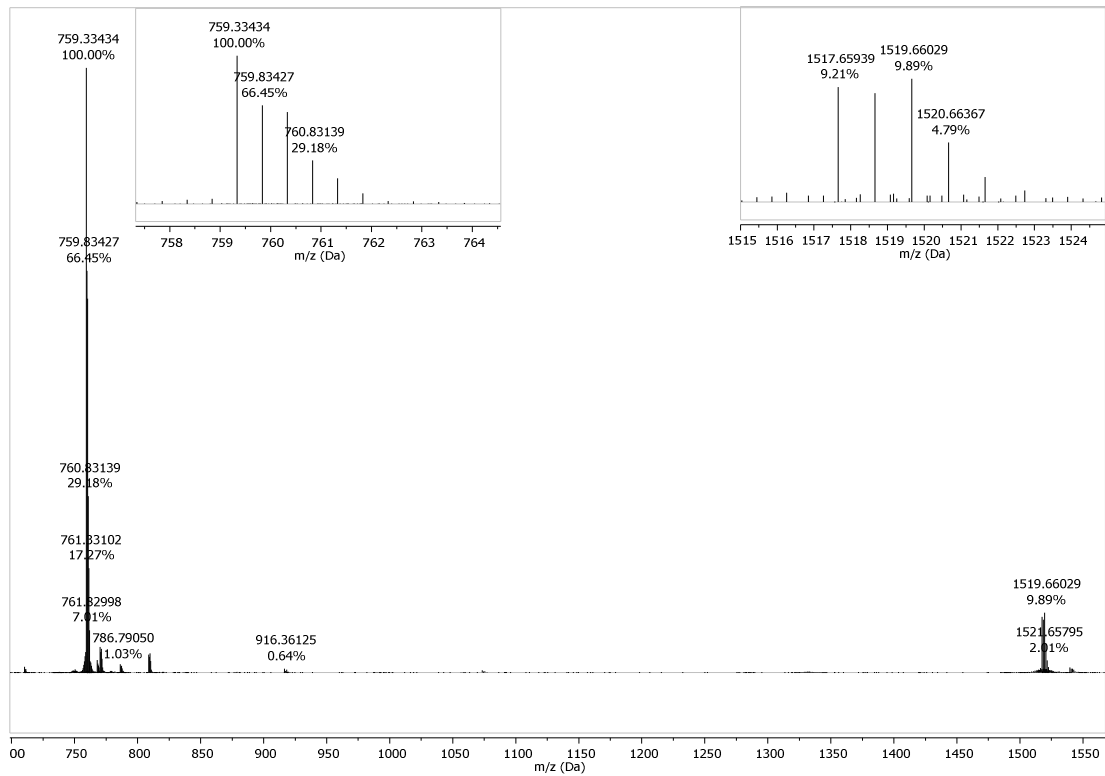


Abbildung 8-6: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **53** bei einer Retentionszeit von 6.58 min.

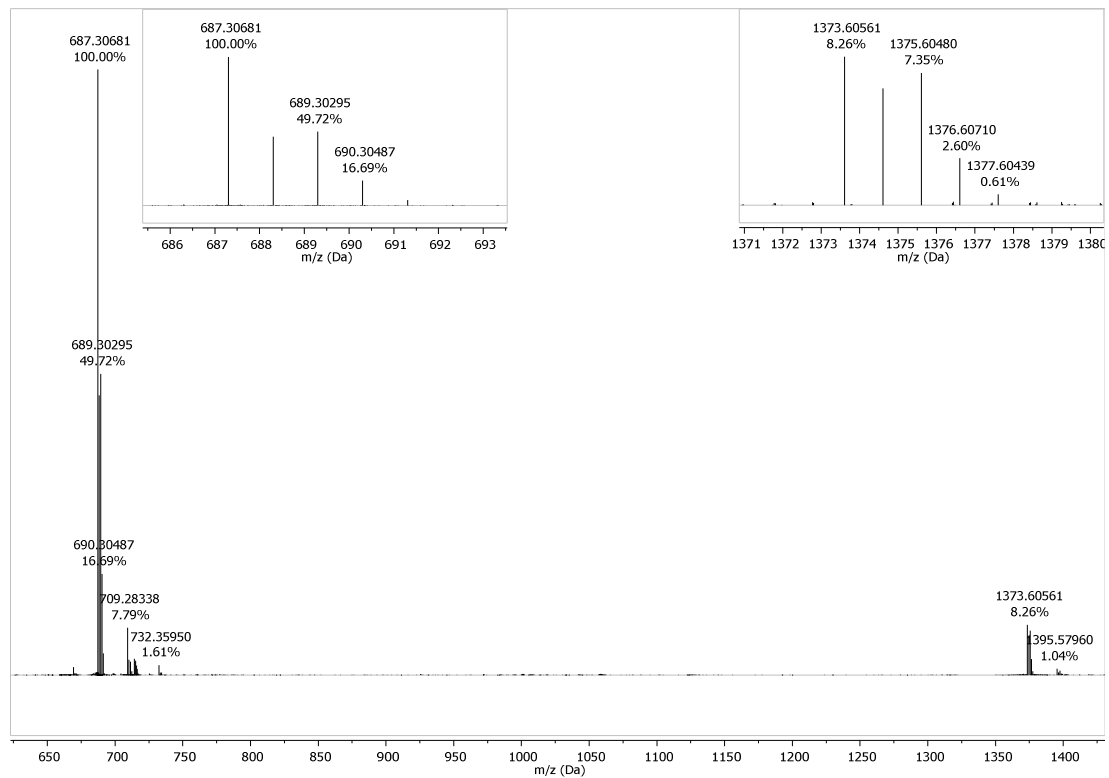


Abbildung 8-7: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **53** bei einer Retentionszeit von 6.81 min.

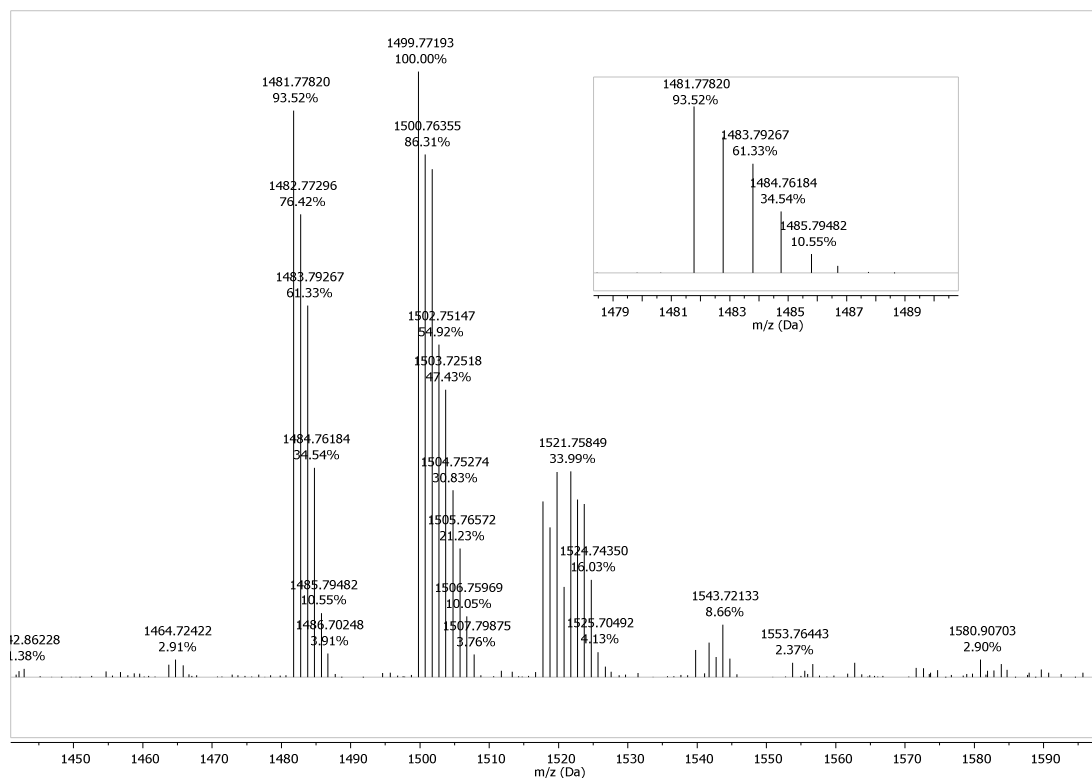


Abbildung 8-8: ESI/MS Spektrum von **53** in basischem Puffer bei pH = 8 inkubiert, gemessen nach einer Woche.

Tabelle 8-1: Retentionszeiten des TIC-Chromatogramms von **53**, inkubiert in Puffer bei pH = 8 nach einer Woche mit den zugehörigen m/z-Werten sowie der Auswertung der Massen.

t_R [min]	m/z _{gemessen} [Da]	m/z _{berechnet} [Da]	Differenz [ppm]	Summenformel	Substanz
4.40	416.20665	416.20836	4.10	$[C_{35}H_{58}N_8O_{15} + 2H]^{2+}$	
	831.40586	831.40944	4.31	$[C_{35}H_{58}N_8O_{15} + H]^+$	53D
	853.38576	853.39138	6.59	$[C_{35}H_{58}N_8O_{15} + Na]^+$	
5.80	701.35179				
	1401.69964			Nicht zuzuordnen	
6.22	750.34776	750.35158	5.09	$[C_{71}H_{103}Cl^{35}N_{10}O_{23} + 2H]^{2+}$	
	1499.68699	1499.69588	5.93	$[C_{71}H_{103}Cl^{35}N_{10}O_{23} + H]^+$	53C
6.46	387.17977				
	489.22542			Nicht zuzuordnen	
	790.37887				
6.58	759.33434	759.33464	0.39	$[C_{71}H_{102}Cl^{35}N_{10}O_{22} + 2H]^{2+}$	
	1517.65939	1517.66200	1.72	$[C_{71}H_{102}Cl^{35}N_{10}O_{22} + H]^+$	53B
6.81	687.30681	687.30429	3.67	$[C_{36}H_{47}Cl^{35}N_2O_9 + H]^+$	
	1373.60561	1373.60129	3.14	$[2(C_{36}H_{47}Cl^{35}N_2O_9) + H]^+$	53E

8.1.2 Stabilitätsassay von 72

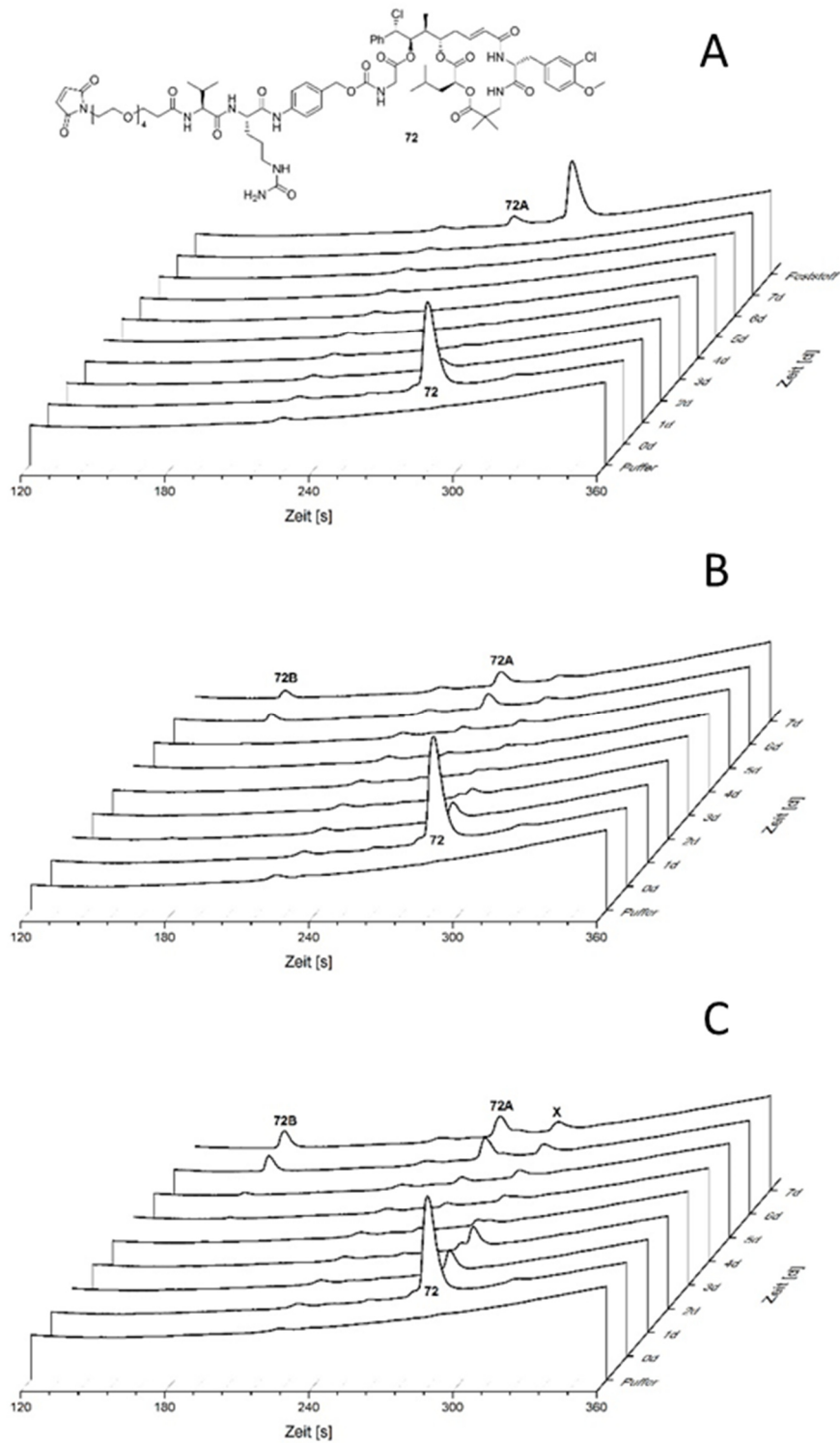


Abbildung 8-9: HPLC-Chromatogramme von **72**, inkubiert bei (A) pH = 4, (B) pH = 7.4 und (C) pH = 8, gemessen bei 220 nm über die Dauer von 1 Woche. Der Bereich von 2 – 6 Minuten wurde vergrößert dargestellt, da sich nur dort relevante Signale befanden.

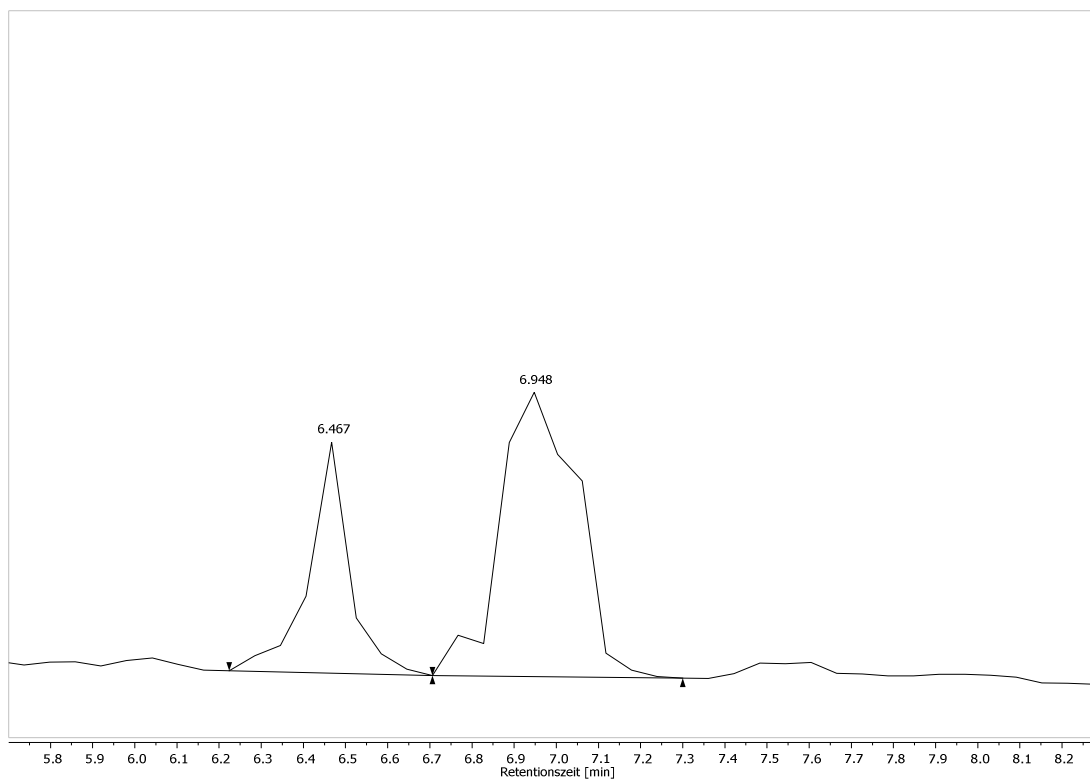


Abbildung 8-10: TIC-Chromatogramm der LC/MS-Analyse von 72.

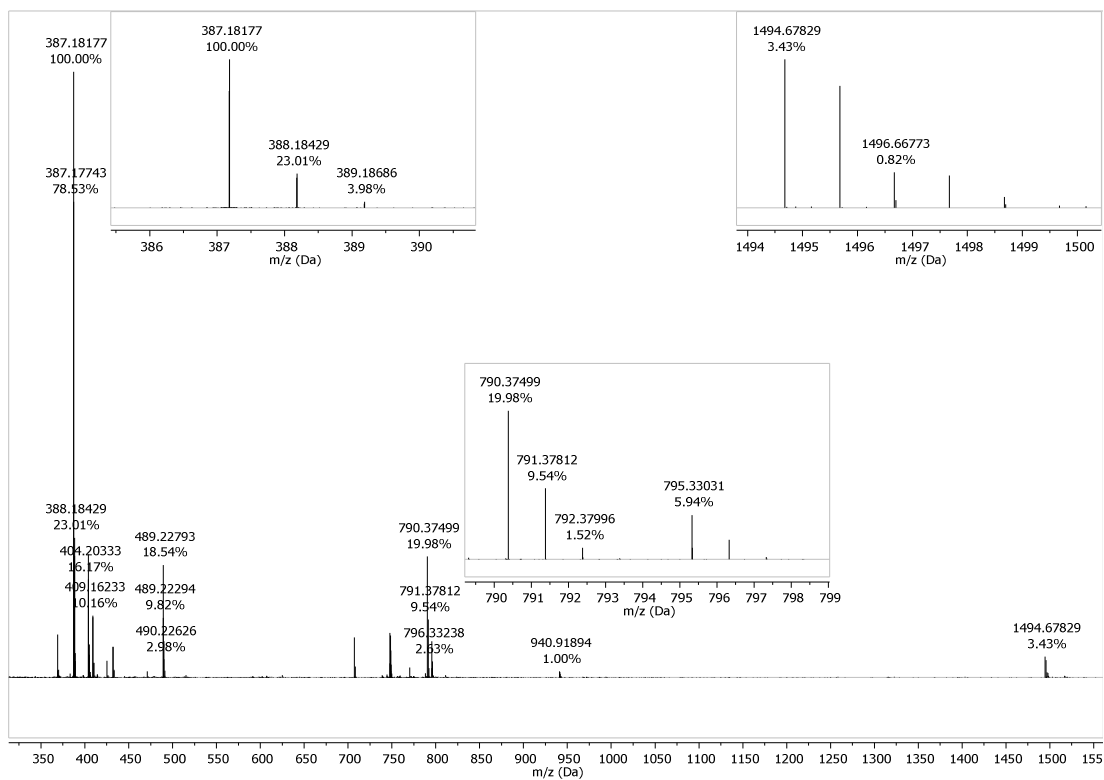


Abbildung 8-11: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von 72 bei einer Retentionszeit von 6.47 min.

8.1 Stabilitätsassay

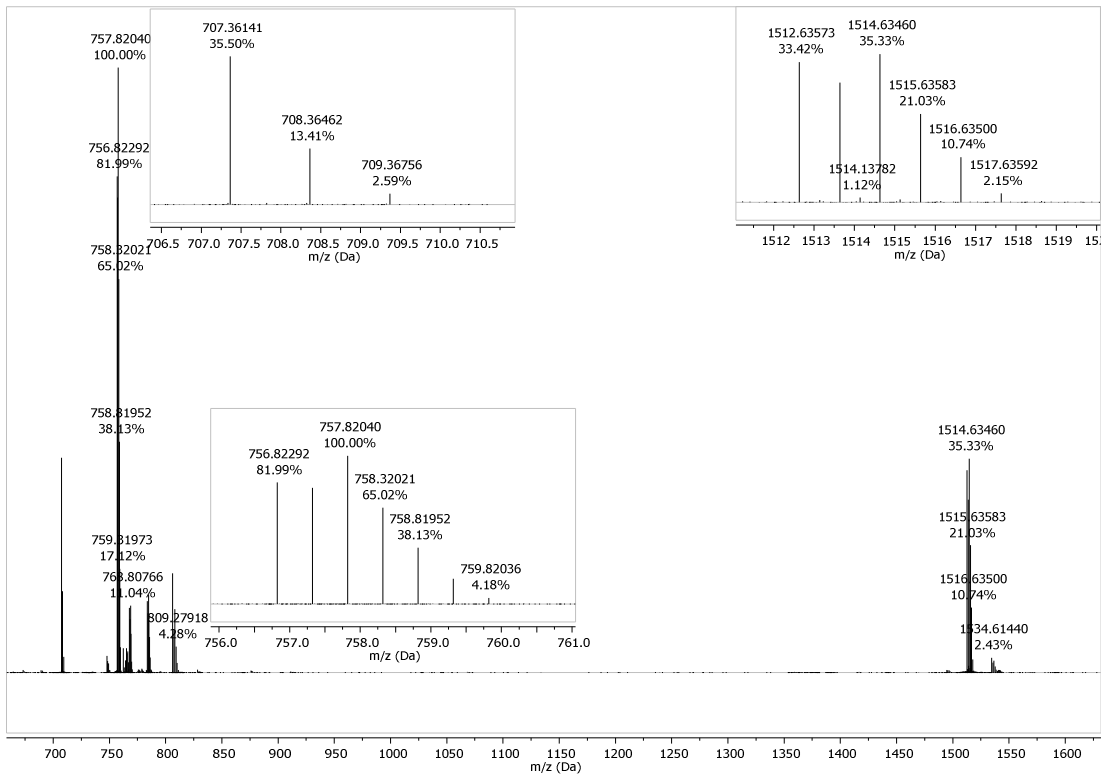


Abbildung 8-12: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von 72 bei einer Retentionszeit von 6.89 min.

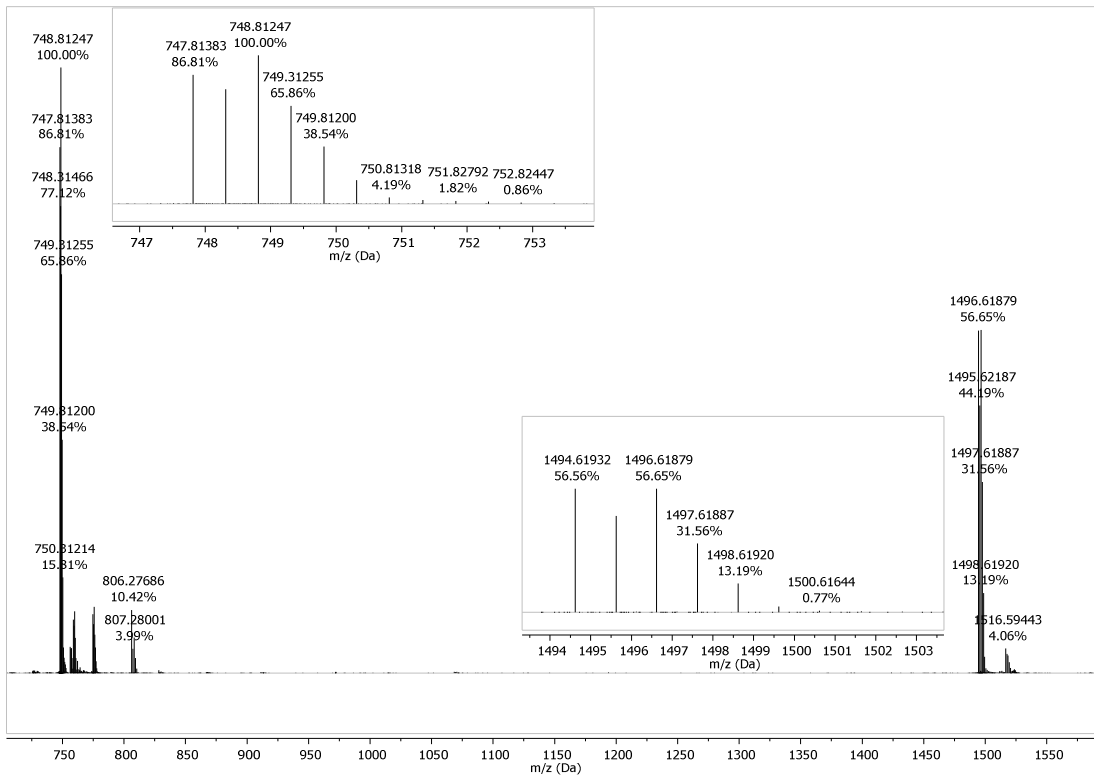


Abbildung 8-13: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von 72 bei einer Retentionszeit von 7.00 min.

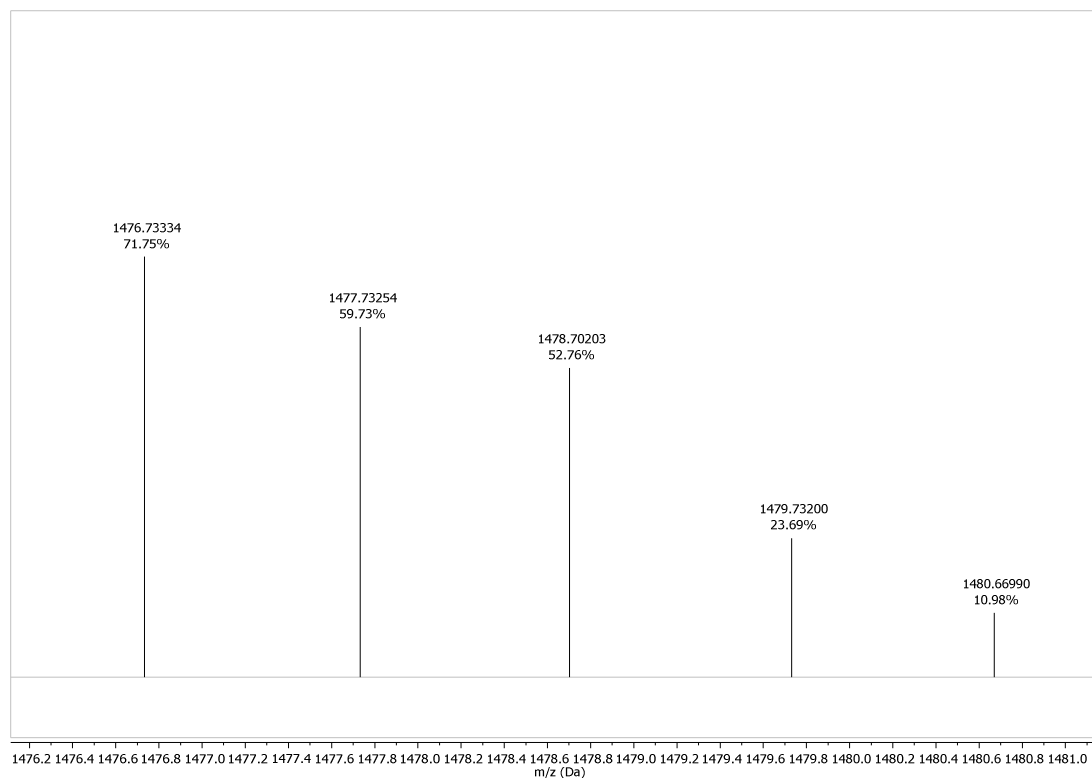


Abbildung 8-14: ESI/MS Spektrum von **72** in basischem Puffer bei pH = 8, gemessen nach einer Woche.

Tabelle 8-2: Retentionszeiten im TIC-Chromatogramm von **72**, inkubiert in Puffer bei pH = 8 nach einer Woche mit den zugehörigen m/z-Werten sowie der Auswertung der Massen.

t_R [min]	m/z _{gemessen} [Da]	m/z _{berechnet} [Da]	Differenz [ppm]	Summenformel	Substanz
6.47	387.18177				
	790.37499			Nicht zuzuordnen	
	1494.67829				
6.89	707.36141	707.36103	0.53	$[C_{33}H_{50}N_6O_{11} + H]^+$	66
	756.82292	756.82136	2.06	$[C_{72}H_{99}Cl^{35}_2N_9O_{22} + 2H]^{2+}$	72B
	1512.63573	1512.63545	0.19	$[C_{72}H_{99}Cl^{35}_2N_9O_{22} + H]^+$	
7.00	747.81383	747.81608	3.01	$[C_{72}H_{97}Cl^{35}_2N_9O_{21} + 2H]^{2+}$	72
	1494.61932	1494.62488	3.72	$[C_{72}H_{97}Cl^{35}_2N_9O_{21} + H]^+$	

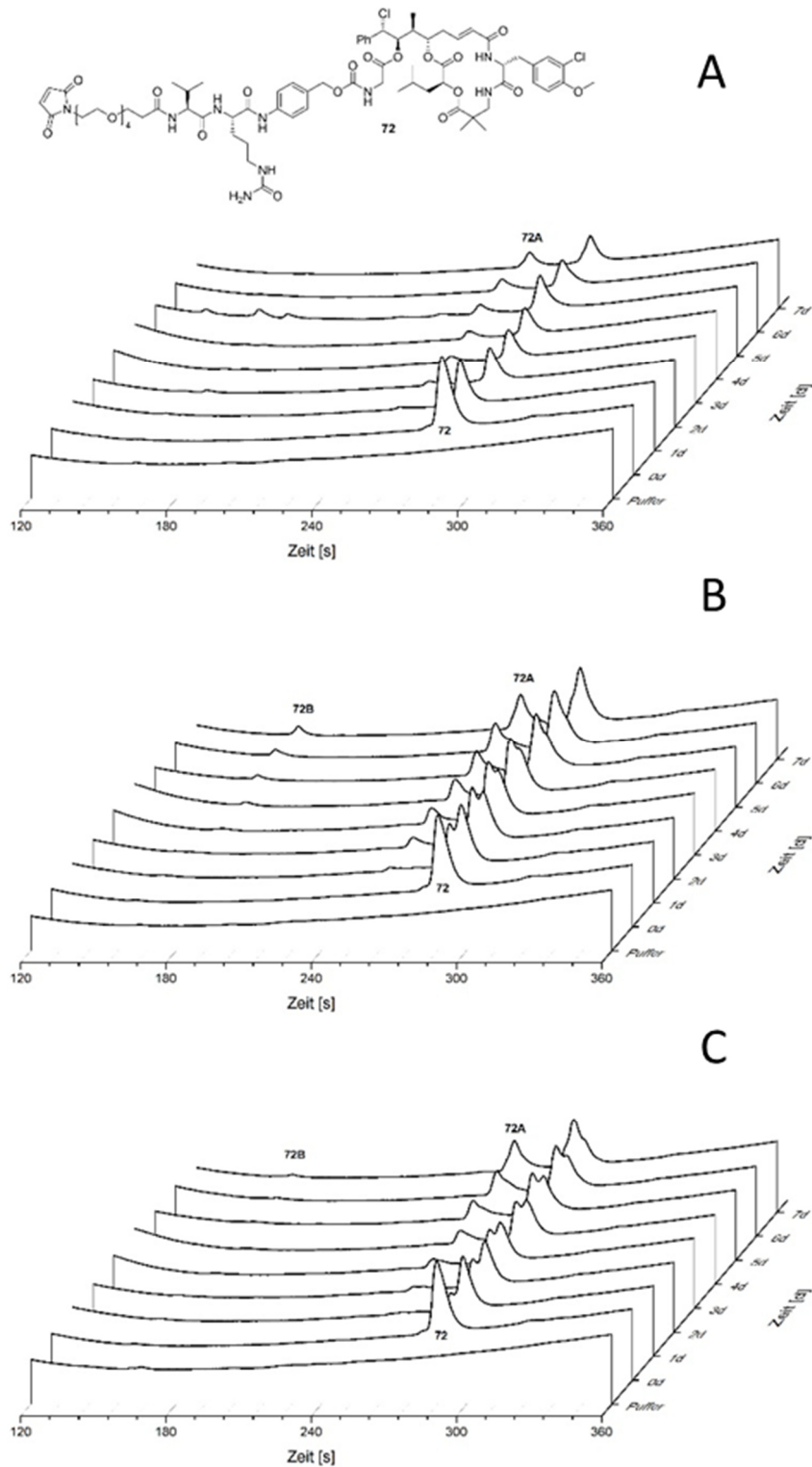


Abbildung 8-15: HPLC-Chromatogramme von **72**, inkubiert mit einem DMSO-Anteil von 30% bei (A) pH = 4, (B) pH = 7.4 und (C) pH = 8, gemessen bei 220 nm über die Dauer von 1 Woche. Der Bereich von 2 – 6 Minuten wurde vergrößert dargestellt, da sich nur dort relevante Signale befanden.

8.1.3 Stabilitätsassay von 73

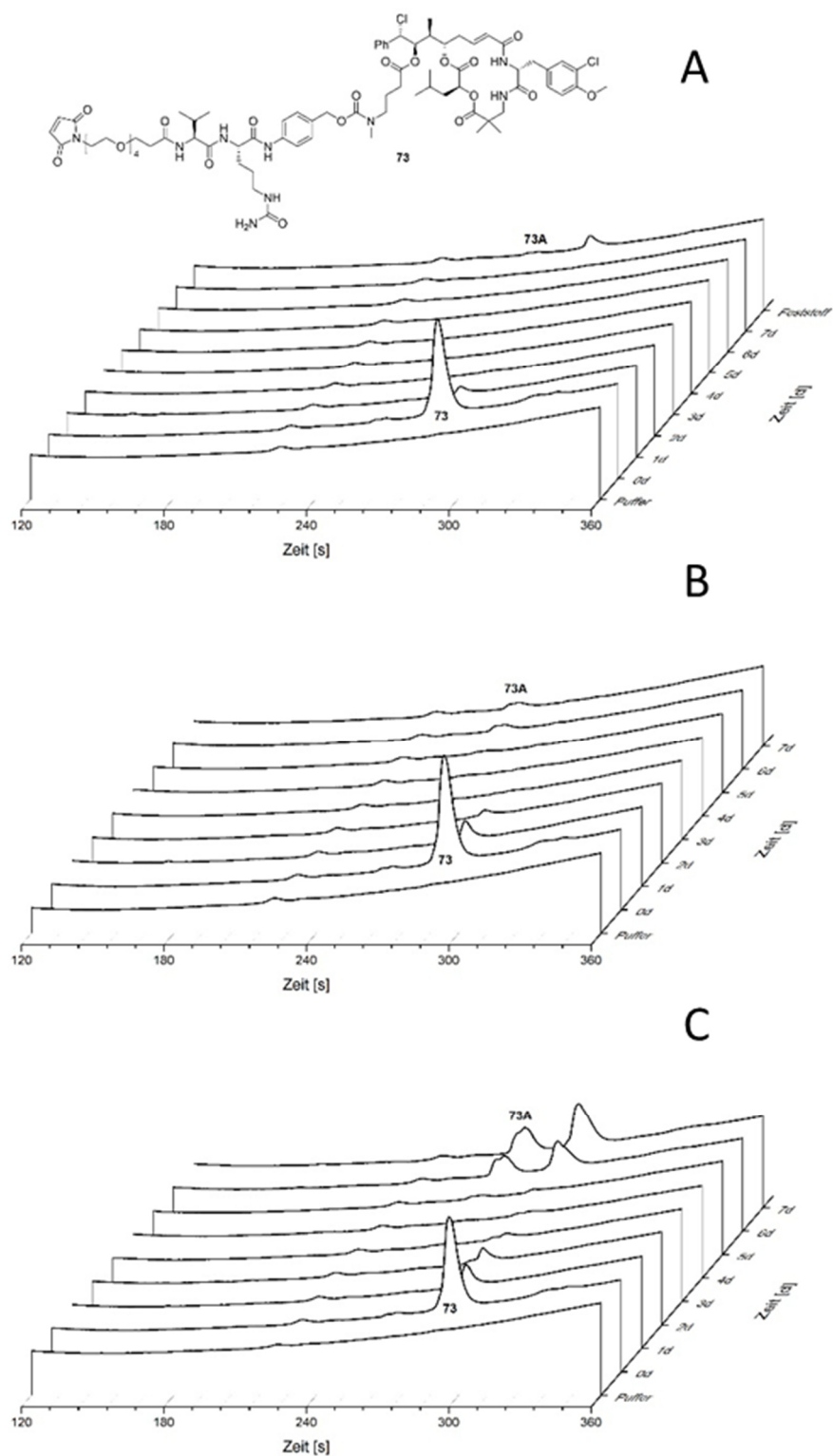


Abbildung 8-16: HPLC-Chromatogramme von **73**, inkubiert bei (A) pH = 4, (B) pH = 7.4 und (C) pH = 8, gemessen bei 220 nm über die Dauer von 1 Woche. Der Bereich von 2 – 6 Minuten wurde vergrößert dargestellt, da sich nur dort relevante Signale befanden.

8.1 Stabilitätsassay

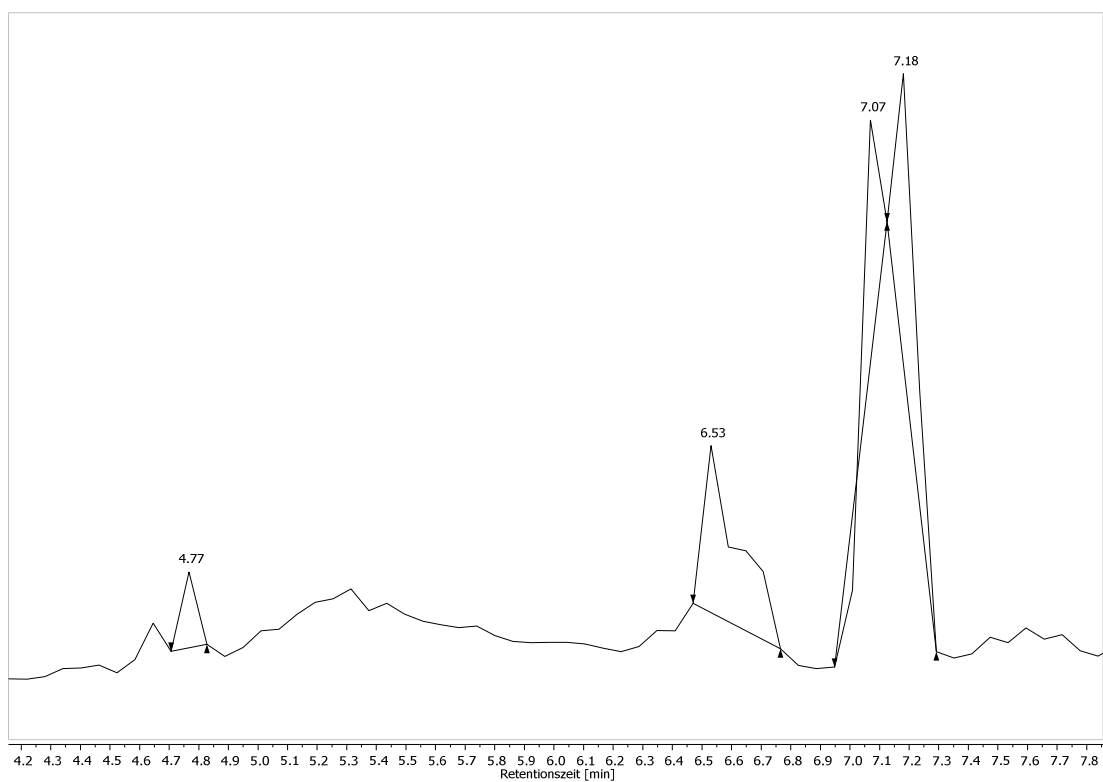


Abbildung 8-17: TIC-Chromatogramm der LC/MS-Analyse von 73.

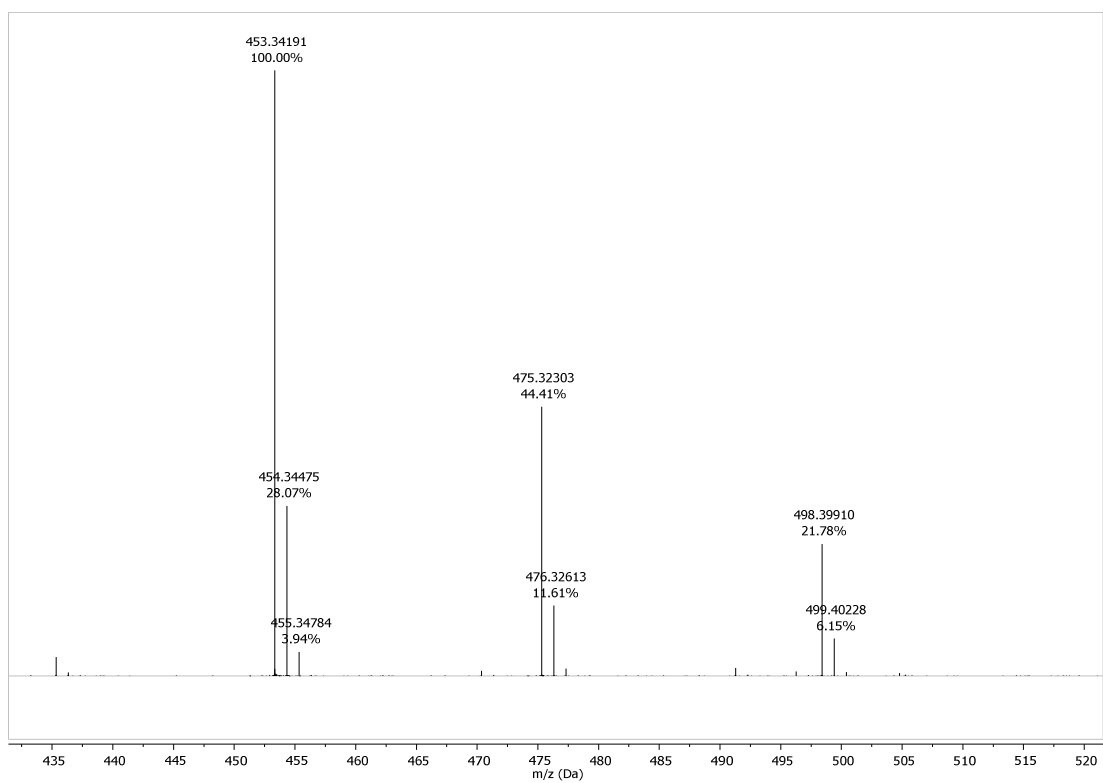


Abbildung 8-18: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von 73 bei einer Retentionszeit von 4.77 min.

8.1 Stabilitätsassay

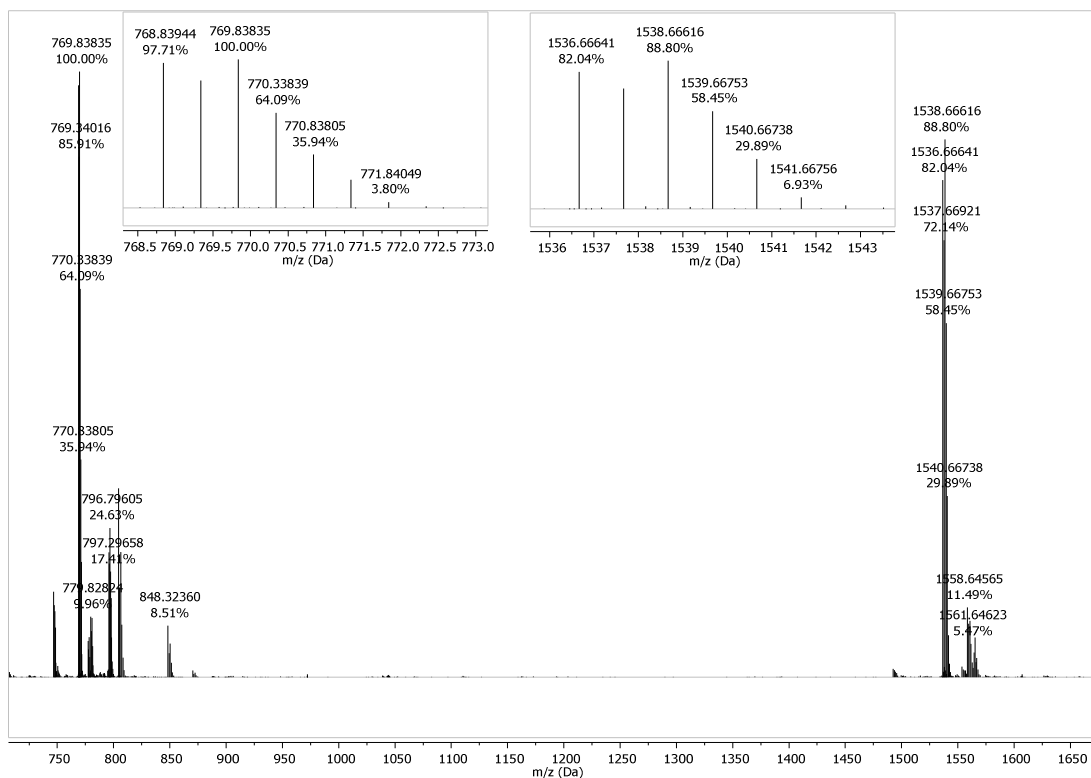


Abbildung 8-21: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **73** bei einer Retentionszeit von 7.18 min.

Tabelle 8-3: Retentionszeiten im TIC-Chromatogramm von **73**, inkubiert in Puffer bei pH = 8 nach einer Woche mit den zugehörigen m/z-Werten sowie der Auswertung der Massen.

t_R [min]	m/z _{gemessen} [Da]	m/z _{berechnet} [Da]	Differenz [ppm]	Summenformel	Substanz
4.77	453.34191				
	475.32303				Nicht zuzuordnen
	498.39910				
6.53	387.18165				Nicht zuzuordnen
-	707.36057	707.36103	0.65	$[C_{33}H_{50}N_6O_{11} + H]^+$	66
6.77	768.86206				Nicht zuzuordnen
7.07	707.35888	707.36103	3.04	$[C_{33}H_{50}N_6O_{11} + H]^+$	66
	777.84354	777.84484	1.67	$[C_{75}H_{105}Cl^{35}_2N_9O_{22} + 2H]^{2+}$	73B
	804.33391	804.33881	6.09	$[C_{41}H_{55}Cl^{35}_2N_3O_9 + H]^+$	47
	1554.67746	1554.68240	3.18	$[C_{75}H_{105}Cl^{35}_2N_9O_{22} + H]^+$	73B
7.18	768.83944	768.83955	0.15	$[C_{75}H_{103}Cl^{35}_2N_9O_{21} + 2H]^{2+}$	73
	1536.66641	1536.67183	3.78	$[C_{75}H_{103}Cl^{35}_2N_9O_{21} + H]^+$	

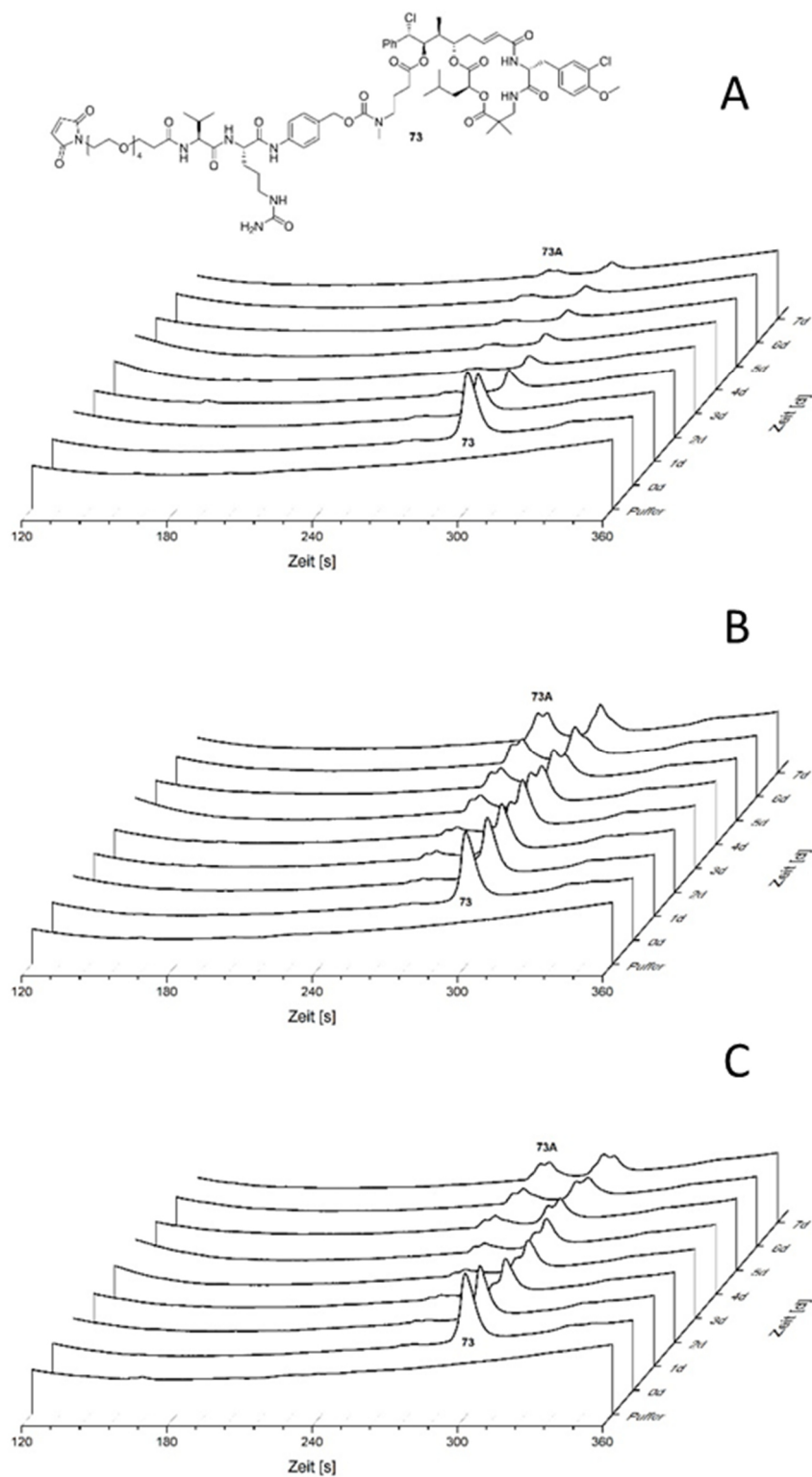


Abbildung 8-22: HPLC-Chromatogramme von **73**, inkubiert mit einem DMSO-Anteil von 30% bei (A) pH = 4, (B) pH = 7.4 und (C) pH = 8, gemessen bei 220 nm über die Dauer von 1 Woche. Der Bereich von 2 – 6 Minuten wurde vergrößert dargestellt, da sich nur dort relevante Signale befanden.

8.2 Spaltungsassay

8.2.1 Spaltungsassay von 74

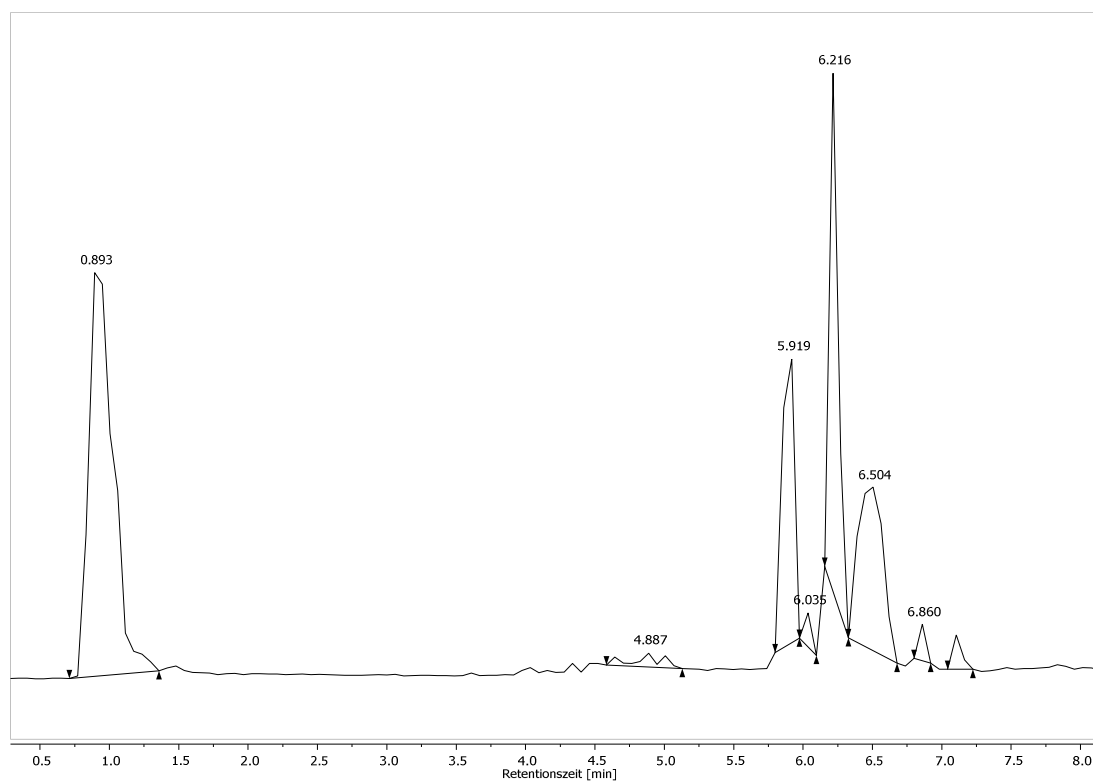


Abbildung 8-23: TIC-Chromatogramm der LC/MS-Analyse von **74** nach Spaltung mit Cathepsin B.

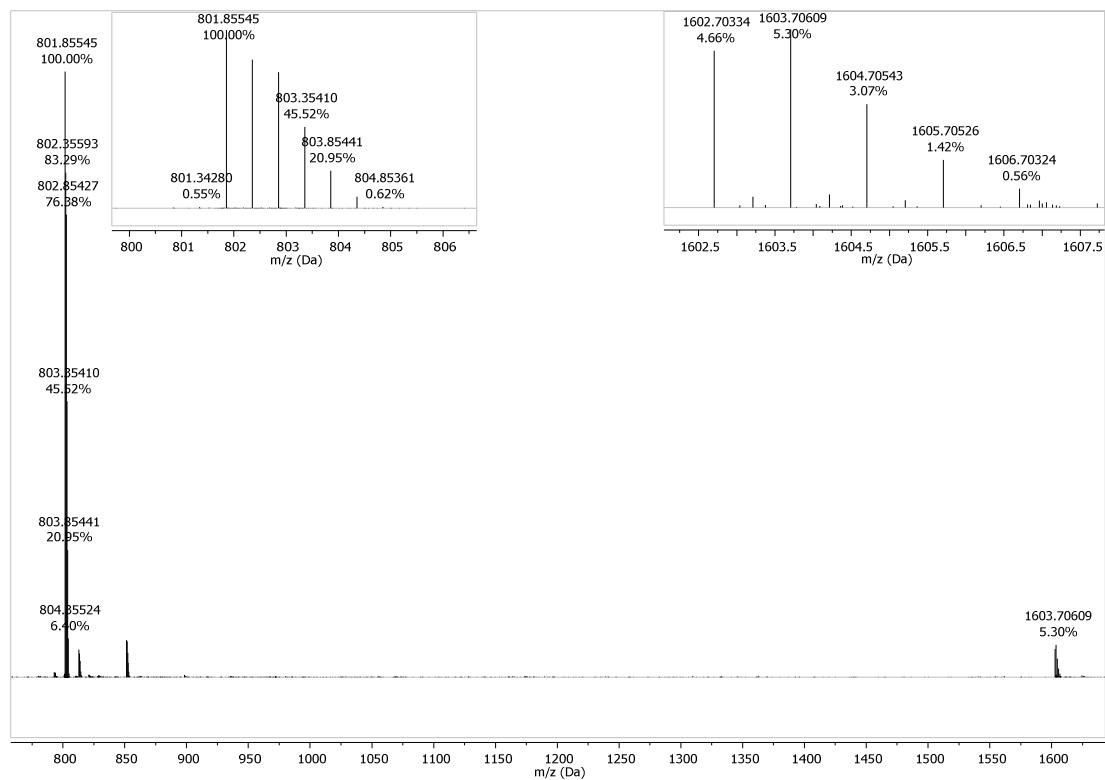


Abbildung 8-24: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **74** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 5.86 – 5.82 min.

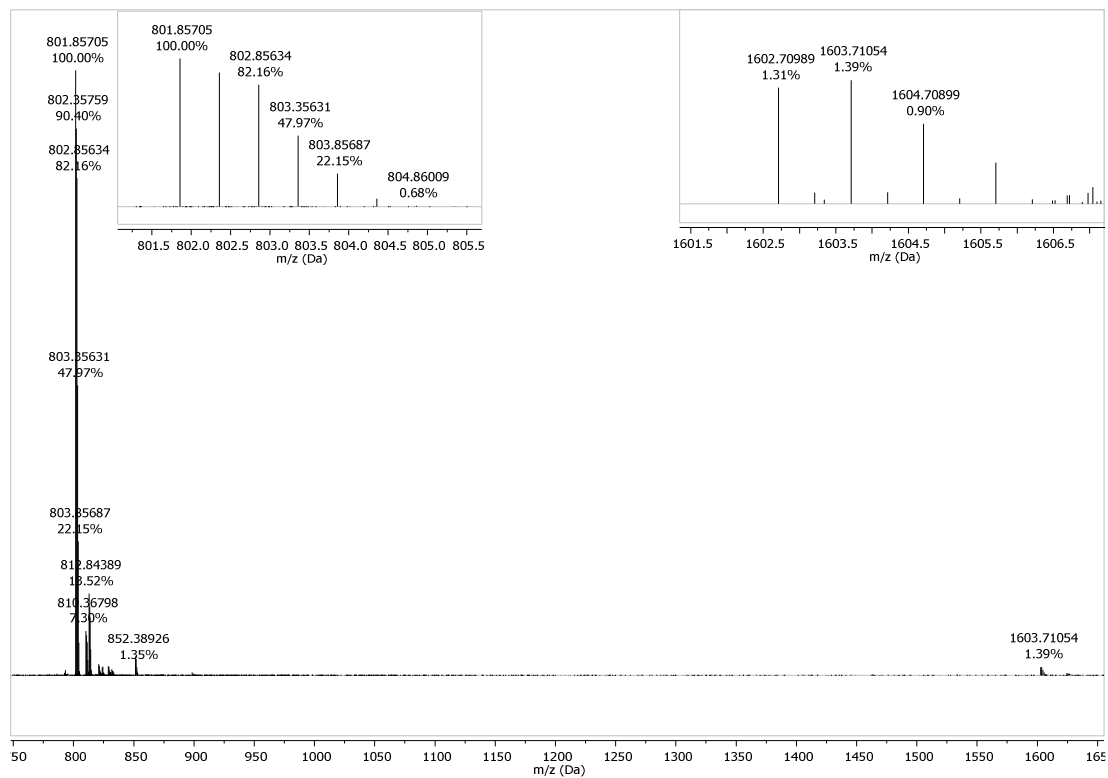


Abbildung 8-25: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **74** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.04 min.

8.2 Spaltungsassay

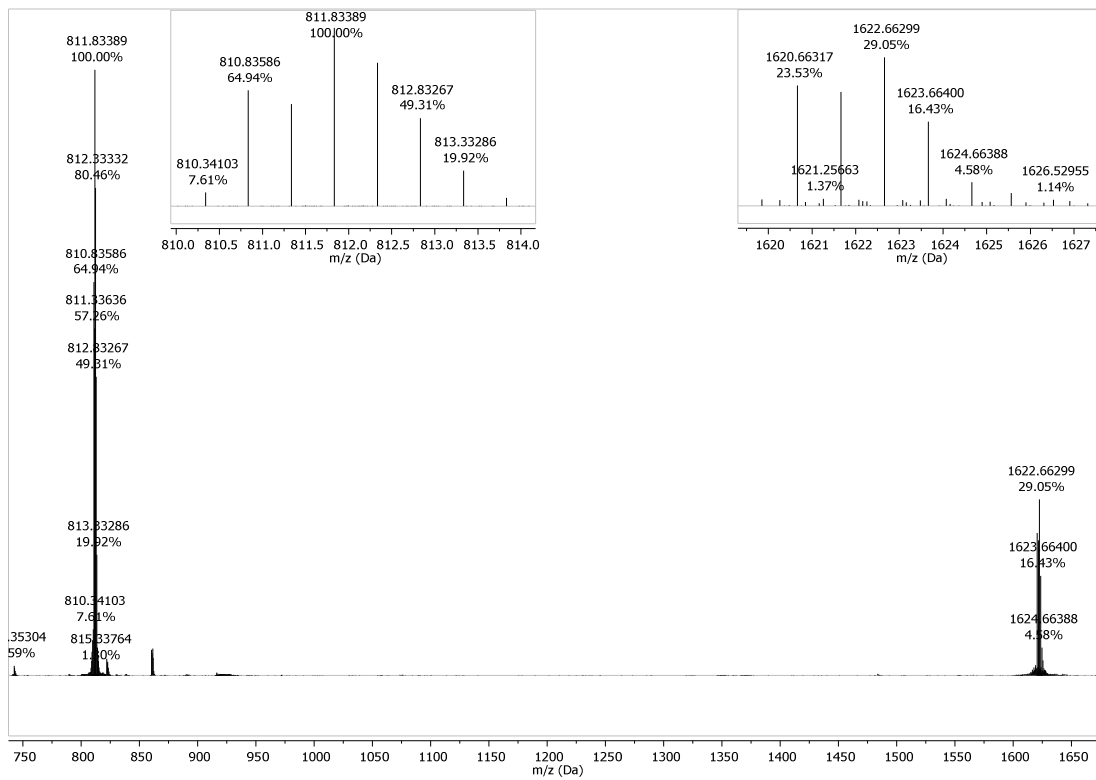


Abbildung 8-26: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **74** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.22 min.

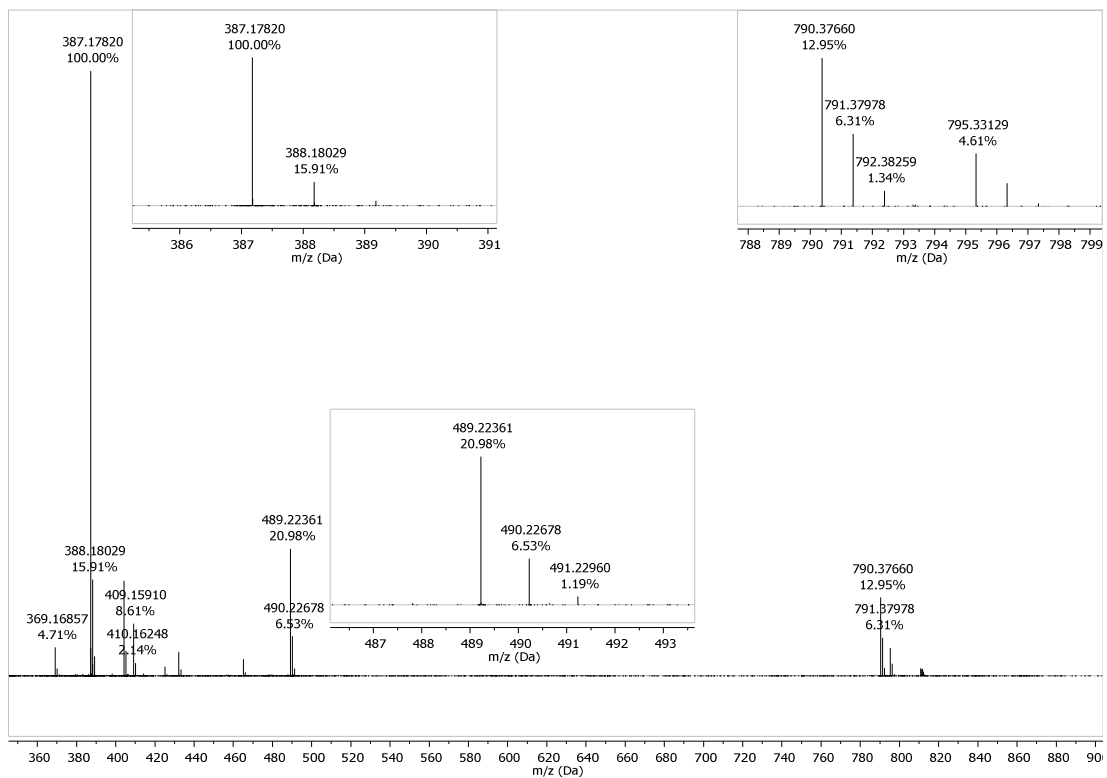


Abbildung 8-27: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **74** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.45 min.

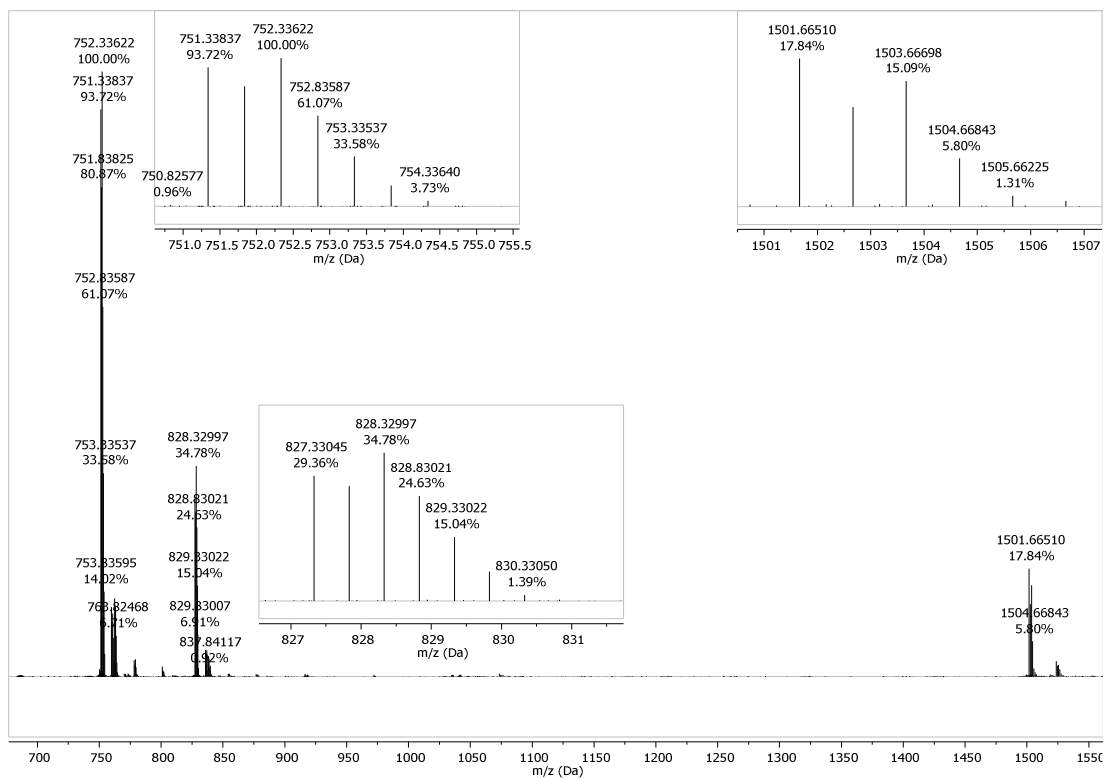


Abbildung 8-28: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **74** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.56 min.

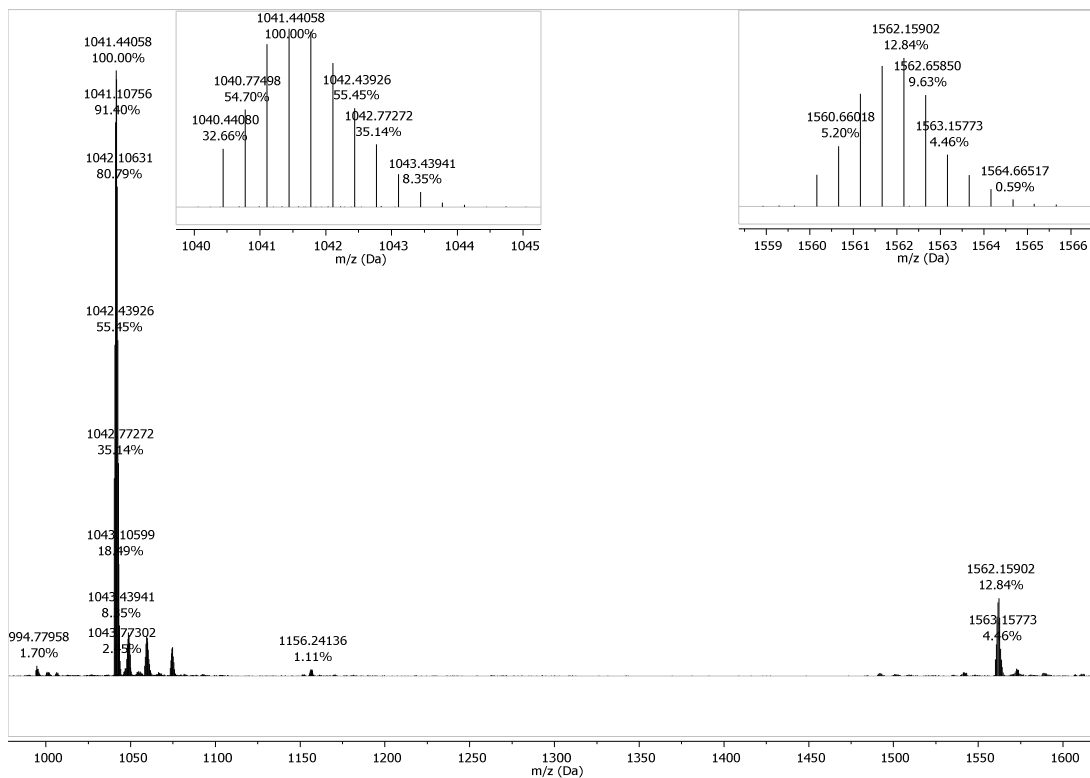


Abbildung 8-29: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **74** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.86 min.

8.2 Spaltungsassay

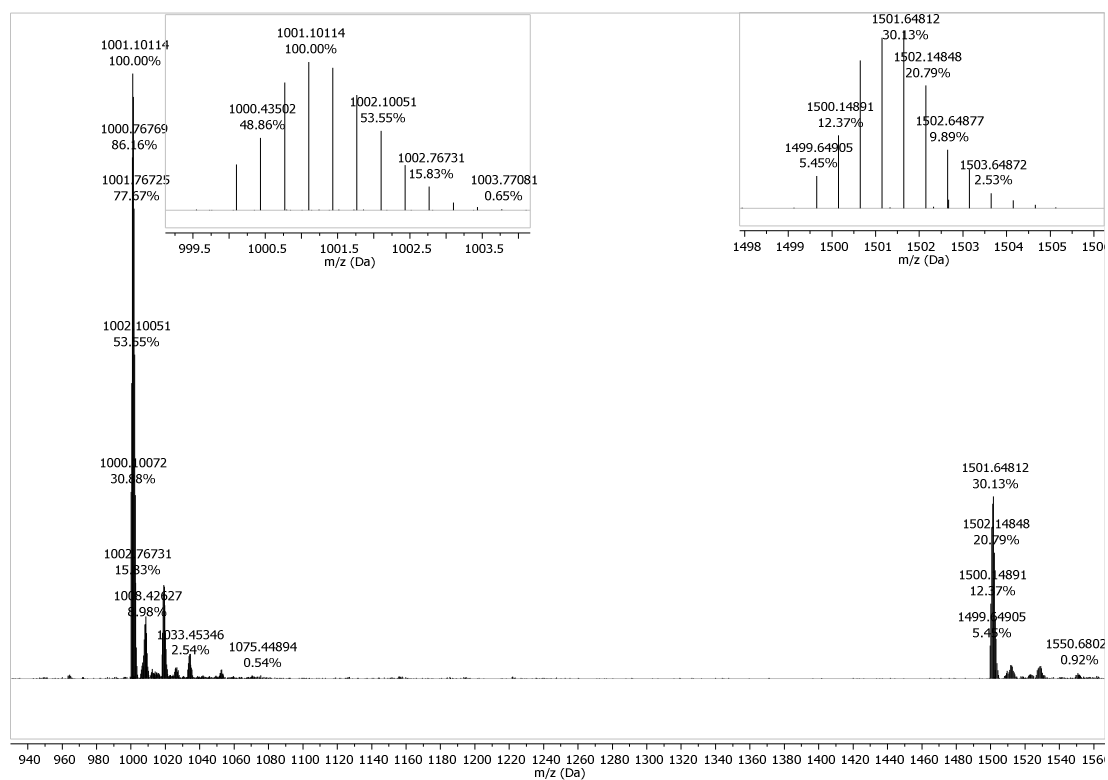


Abbildung 8-30: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **74** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 7.10 min.

Tabelle 8-4: Retentionszeiten im TIC-Chromatogramm der enzymatischen Spaltung von **74** mit den zugehörigen m/z-Werten sowie der Auswertung der Massen.

t_R [min]	m/z _{gemessen} [Da]	m/z _{berechnet} [Da]	Differenz [ppm]	Summenformel	Substanz
5.92	801.85545	801.85617	0.90	$[C_{74}H_{108}Cl^{35}N_{11}O_{24}S + 2H]^{2+}$	74A-1
	1602.70334	1602.70507	1.08	$[C_{74}H_{108}Cl^{35}N_{11}O_{24}S + H]^+$	
6.04	801.85705	801.85617	1.09	$[C_{74}H_{108}Cl^{35}N_{11}O_{24}S + 2H]^{2+}$	74A-2
	1602.70989	1602.70507	3.01	$[C_{74}H_{108}Cl^{35}N_{11}O_{24}S + H]^+$	
6.22	810.83586	810.83923	4.15	$[C_{74}H_{107}Cl^{35}_2N_{11}O_{23}S + 2H]^{2+}$	74
	1620.66317	1620.67118	4.94	$[C_{74}H_{107}Cl^{35}_2N_{11}O_{23}S + H]^+$	
6.45	387.17820				
	489.22361			Nicht zuzuordnen	
	790.37660				
6.56	751.33837	751.33718	1.58	$[C_{71}H_{102}Cl^{35}_2N_{10}O_{21} + 2H]^{2+}$	74B
	827.33045			Nicht zuzuordnen	
	1501.66510	1501.66708	1.32	$[C_{71}H_{102}Cl^{35}_2N_{10}O_{21} + H]^+$	
6.86	1040.44080			Nicht zuzuordnen	
	1560.15969				
7.10	1000.10072			Nicht zuzuordnen	
	1499.64905				

8.2.2 Spaltungsassay von 75

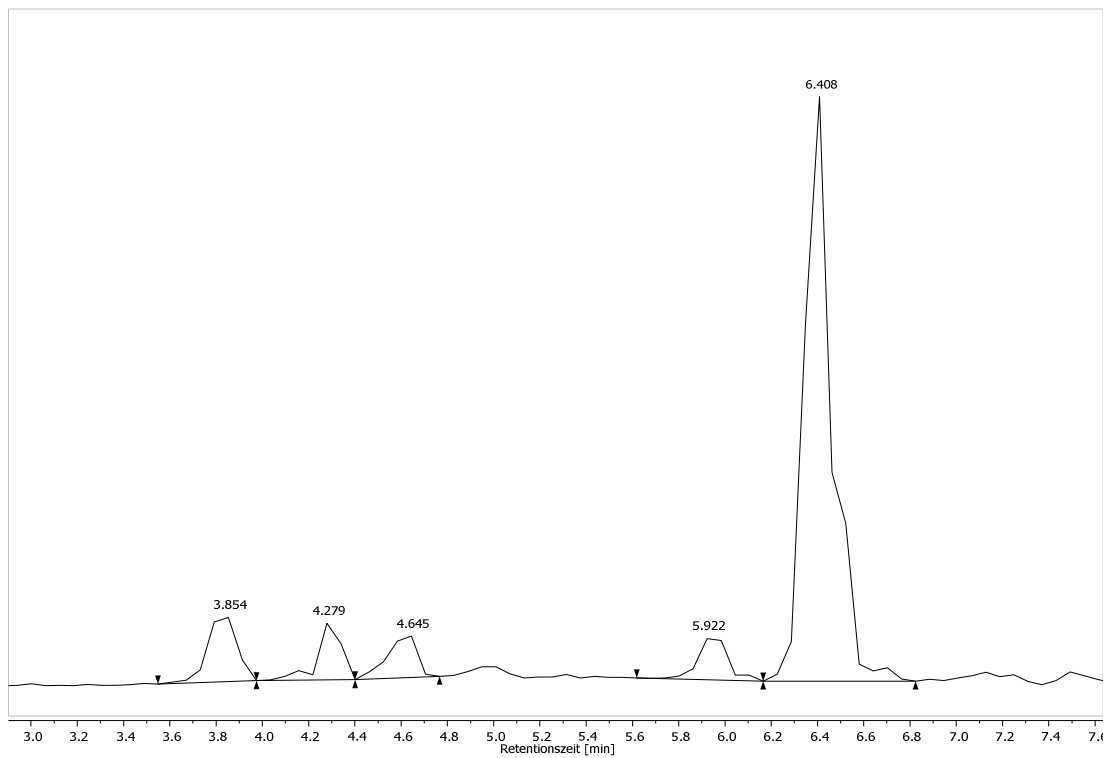


Abbildung 8-31: TIC-Chromatogramm der LC/MS-Analyse von 75 nach der Spaltung mit Cathepsin B.

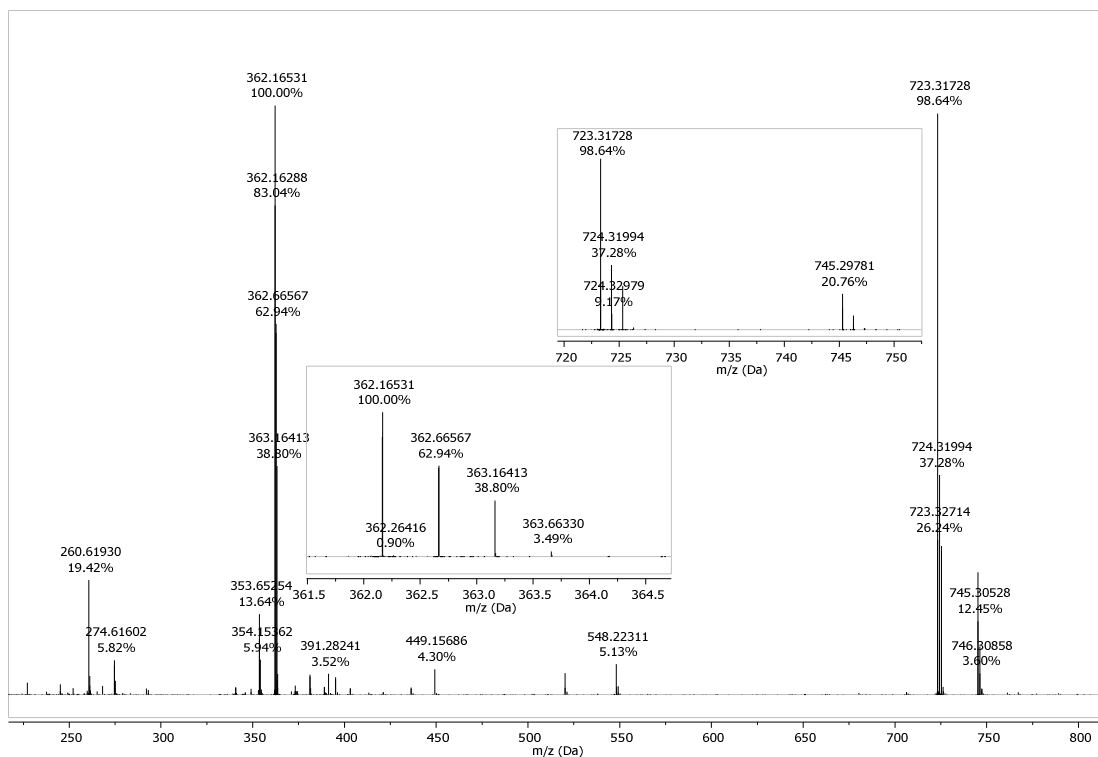


Abbildung 8-32: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von 75 nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 3.85 min.

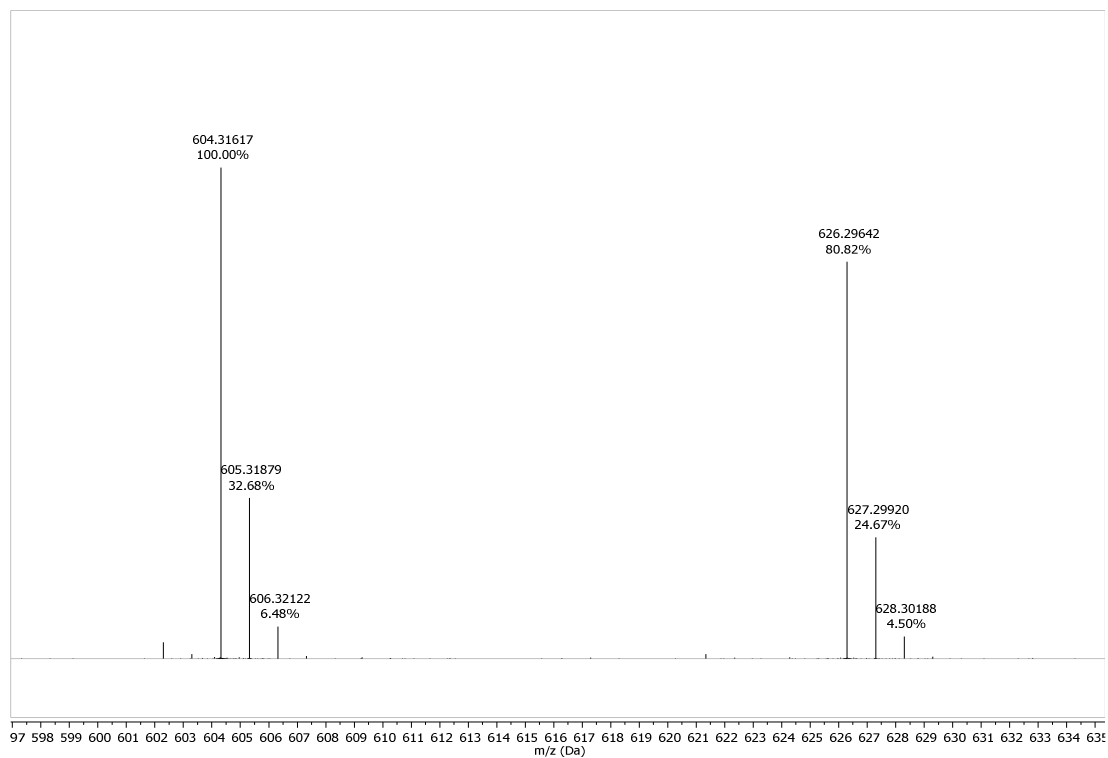


Abbildung 8-33: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **75** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 4.28 min.

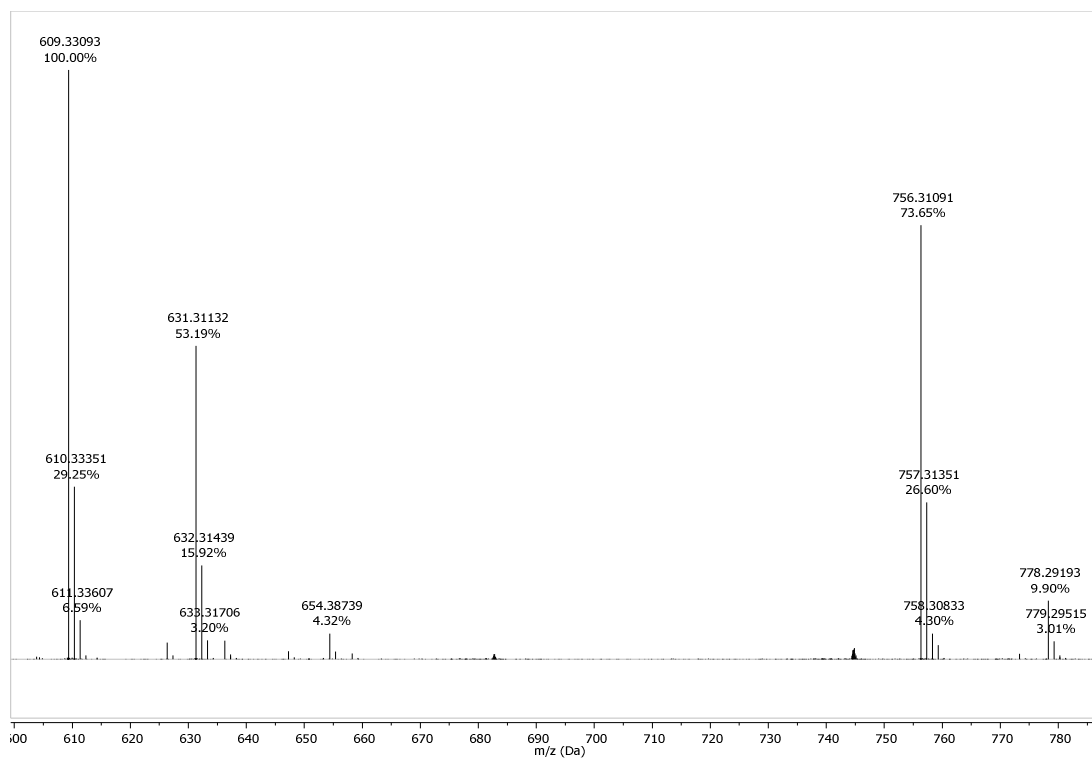


Abbildung 8-34: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **75** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.65 min.

8.2 Spaltungsassay

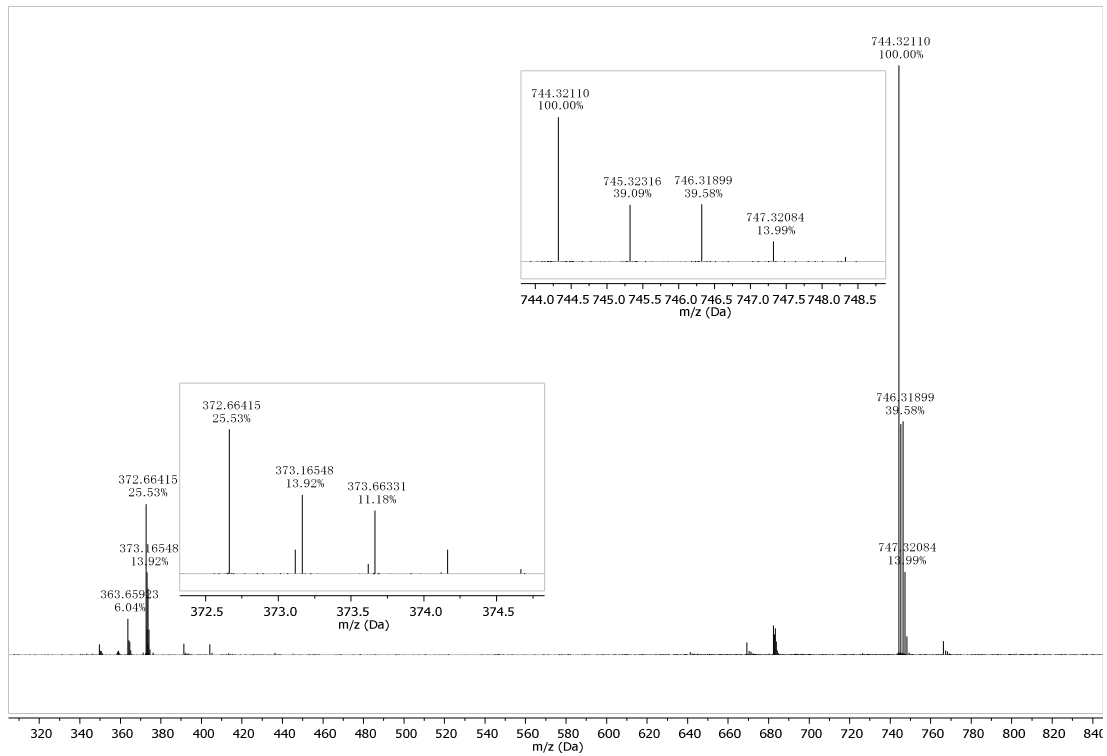


Abbildung 8-35: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **75** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 5.92 min.

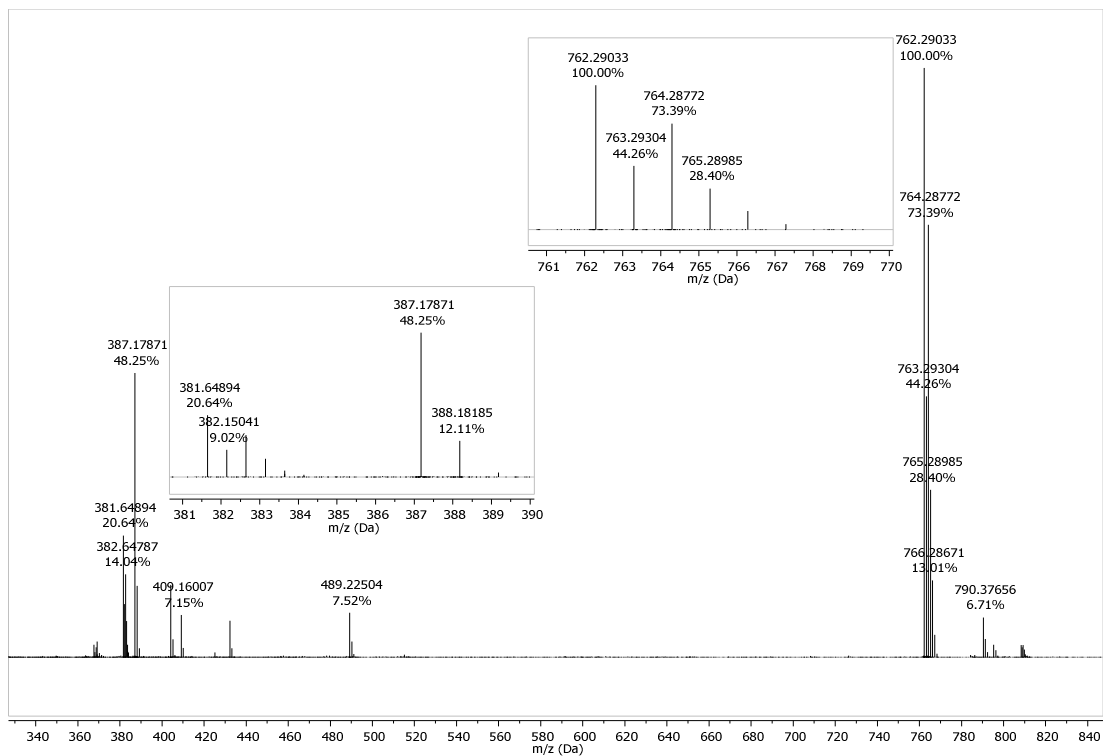


Abbildung 8-36: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **75** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.41 min.

Tabelle 8-5: Retentionszeiten im TIC-Chromatogramm der enzymatischen Spaltung von **75** mit den zugehörigen m/z-Werten sowie der Auswertung der Massen.

t_R [min]	m/z_{gemessen} [Da]	$m/z_{\text{berechnet}}$ [Da]	Differenz [ppm]	Summenformel	Substanz
3.85	362.16531	362.16510	0.57	$[\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S} + 2\text{H}]^{2+}$	
	723.31728	723.32293	7.82	$[\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S} + \text{H}]^+$	77
	745.29781	745.30488	9.48	$[\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S} + \text{Na}]^+$	
4.28	604.31617	604.31883	4.41	$[\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{11} + \text{H}]^+$	77A
	626.29642	626.30078	6.96	$[\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{11} + \text{Na}]^+$	
4.64	609.33093				
	631.31132				
	756.31091			Nicht zuzuordnen	
	778.29193				
5.98	372.66415	372.66651	6.34	$[\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{Cl}^{35}\text{N}_3\text{O}_{10} + 2\text{H}]^{2+}$	39A
	744.32110	744.32575	6.25	$[\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{Cl}^{35}\text{N}_3\text{O}_{10} + \text{H}]^+$	
6.41	381.64894	381.64957	1.65	$[\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{Cl}^{35}_2\text{N}_3\text{O}_9 + 2\text{H}]^{2+}$	39
	387.17871			Nicht zuzuordnen	
	762.29033	762.29186	2.01	$[\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{Cl}^{35}_2\text{N}_3\text{O}_9 + \text{H}]^+$	

8.2 Spaltungsassay

8.2.3 Spaltungsassay von 76

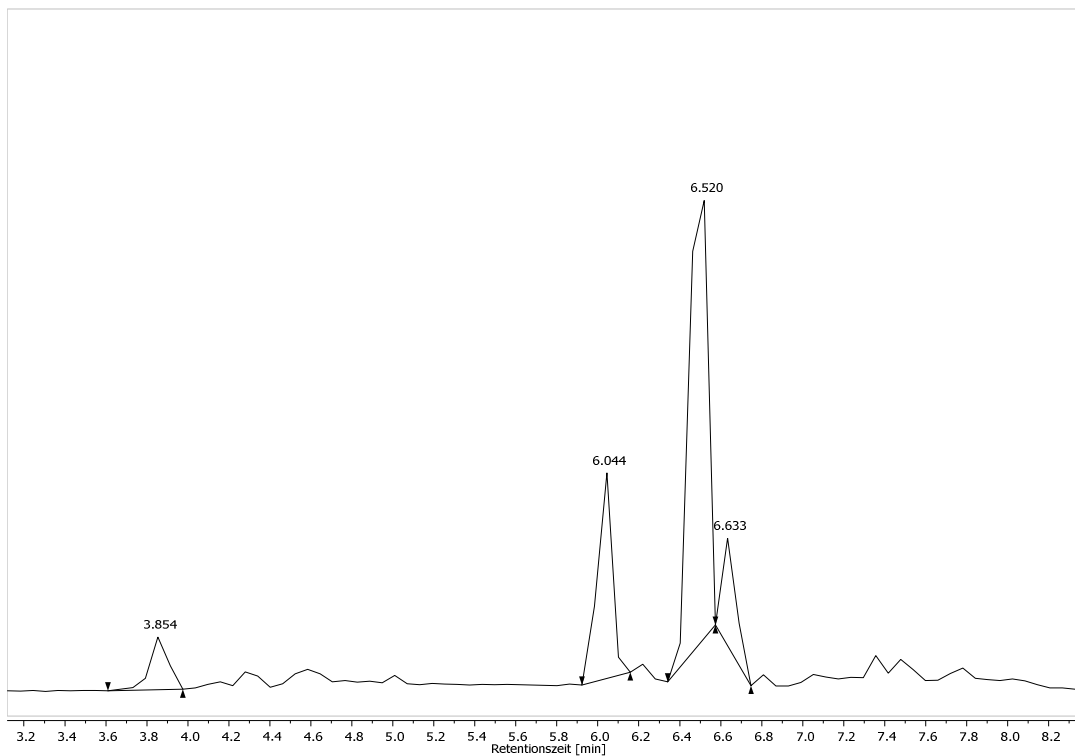


Abbildung 8-37: TIC-Chromatogramm der LC/MS-Analyse von **76** nach Spaltung mit Cathepsin B.

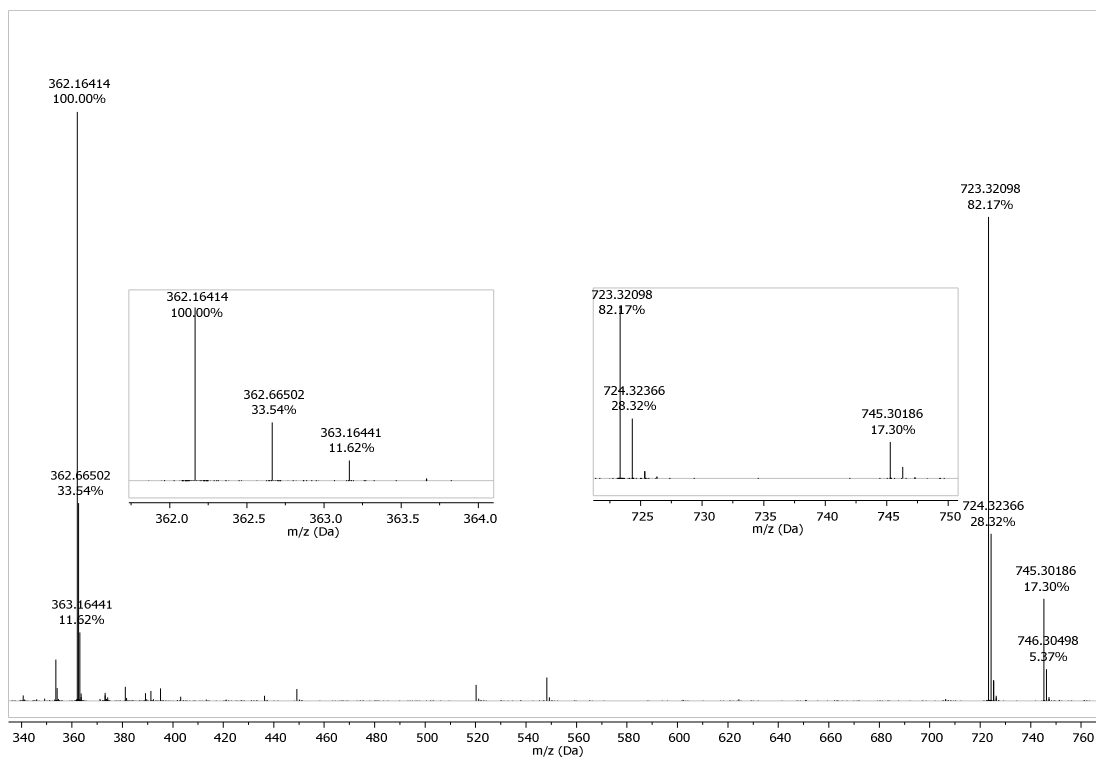


Abbildung 8-38: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **76** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 3.85 min.

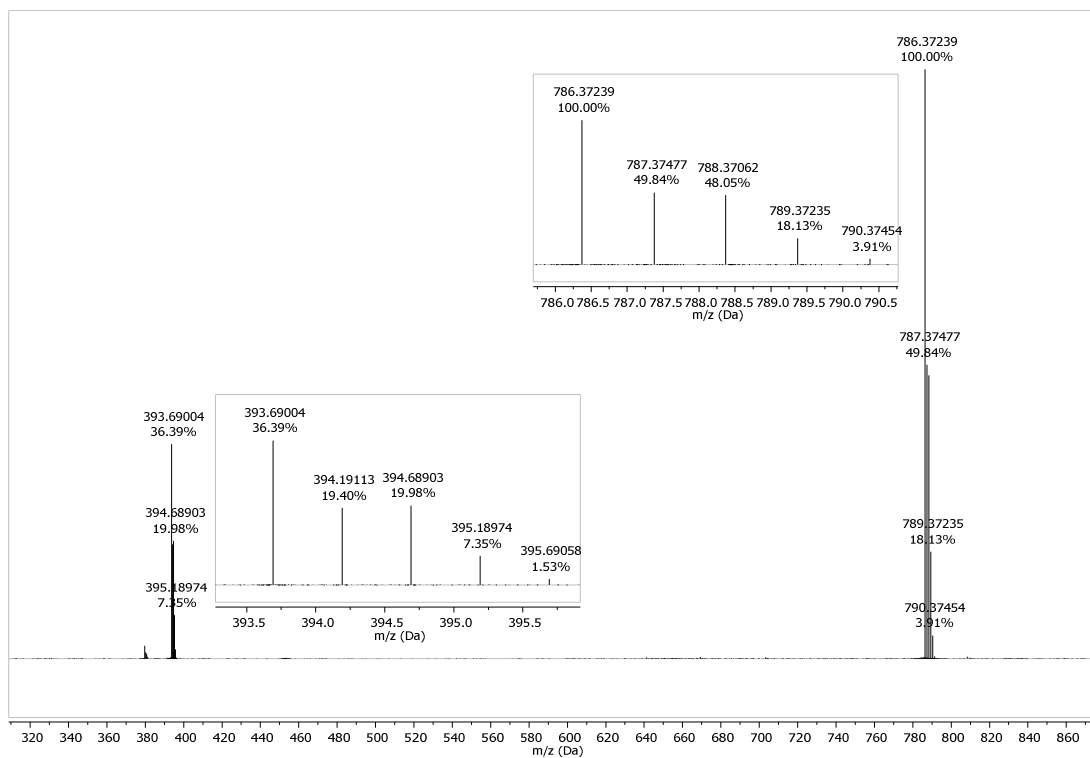


Abbildung 8-39: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **76** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.04 min.

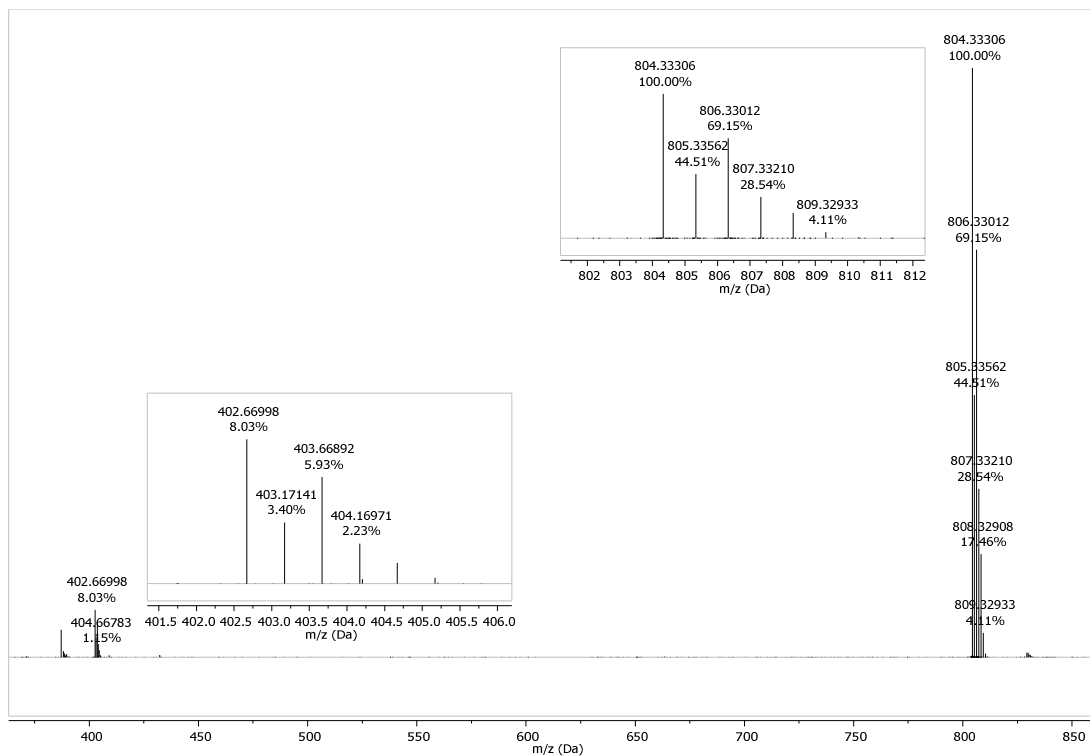


Abbildung 8-40: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **76** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.52 min.

8.2 Spaltungsassay

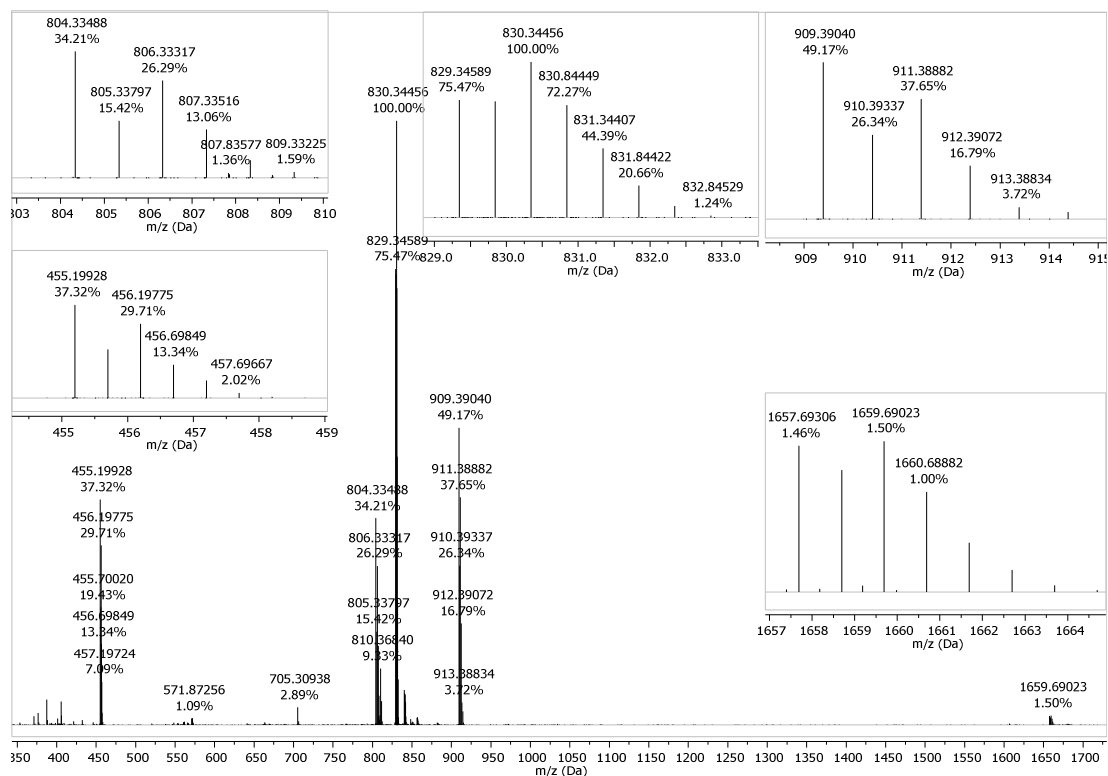


Abbildung 8-41: Massenspektrum der LC/MS-Analyse von **76** nach der Spaltung mit Cathepsin B mit einer Retentionszeit von 6.63 min.

Tabelle 8-6: Retentionszeiten im TIC-Chromatogramm der enzymatischen Spaltung von **76** mit den zugehörigen m/z-Werten sowie der Auswertung der Massen.

t_R [min]	m/z _{gemessen} [Da]	m/z _{berechnet} [Da]	Differenz [ppm]	Summenformel	Substanz
3.85	362.16414	362.16510	2.66	$[C_{29}H_{50}N_6O_{13}S + 2H]^{2+}$	
	723.32098	723.32293	2.70	$[C_{29}H_{50}N_6O_{13}S + H]^+$	77
	745.30186	745.30488	4.05	$[C_{29}H_{50}N_6O_{13}S + Na]^+$	
6.04	393.69004	393.68999	0.13	$[C_{41}H_{56}Cl^{35}N_3O_{10} + 2H]^{2+}$	47A
	786.37239	786.37270	0.39	$[C_{41}H_{56}Cl^{35}N_3O_{10} + H]^+$	
6.52	402.66998	402.67304	7.61	$[C_{41}H_{55}Cl^{35}_2N_3O_9 + 2H]^{2+}$	47
	804.33306	804.33881	7.15	$[C_{41}H_{55}Cl^{35}_2N_3O_9 + H]^+$	
6.63	455.19928			Nicht zuzuordnen	
	804.33488	804.33881	4.89	$[C_{41}H_{55}Cl^{35}_2N_3O_9 + H]^+$	47
	829.34589	829.34943	4.27	$[C_{78}H_{110}Cl^{35}_2N_{10}O_{23}S + 2H]^{2+}$	76
	909.39040			Nicht zuzuordnen	
	1657.69306	1657.69158	0.89	$[C_{78}H_{110}Cl^{35}_2N_{10}O_{23}S + H]^+$	76

9 Literaturverzeichnis

- [1] B. W. Stewart, C. Wild, *World cancer report 2014*, International Agency for Research on Cancer; Distributed by WHO Press, Lyon, Geneva, **2014**.
- [2] "Todesursachen", zu finden unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.
- [3] A. Löser, *Onkologie*, W. Kohlhammer, Stuttgart, **1992**.
- [4] R. Airley, *Cancer Chemotherapy. Basic Science to the Clinic*, Wiley-Blackwell, **2009**.
- [5] S. Seeber, J. Schütte, *Therapiekonzepte Onkologie*, 5. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2007**.
- [6] S. Jaracz, J. Chen, L. V. Kuznetsova, I. Ojima, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 5043–5054.
- [7] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [8] N. Bodor, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987**, *507*, 289–306.
- [9] J. K. Mills, D. Needham, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **1999**, *9*, 1499–1513.
- [10] N. Weidner, J. P. Semple, W. R. Welch, J. Folkman, *The New England Journal of Medicine* **1991**, *324*, 1–8.
- [11] J. Folkman, M. Klagsbrun, *Science* **1987**, *235*, 442–447.
- [12] N. Almog, *Cancer Lett.* **2010**, *294*, 139–146.
- [13] D. W. Leung, G. Cachianes, W.-J. Kuang, D. V. Goeddel, N. Ferrara, *Science* **1989**, *246*, 1306–1309.
- [14] 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 et al., *Nat Med* **2004**, *10*, 145–147.
- [15] R. K. Jain, *Science* **2005**, *307*, 58–62.
- [16] M. R. Mancuso, R. Davis, S. M. Norberg, S. O'Brien, B. Sennino, T. Nakahara, V. J. Yao, T. Inai, P. Brooks, B. Freimark et al., *Journal of Clinical Investigation* **2006**, *116*, 2610–2621.
- [17] H. Maeda, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 169–185.
- [18] H. Maeda, *Advances in Enzyme Regulation* **2001**, *41*, 189–207.
- [19] Y. Matsumara, H. Maeda, *Cancer Research* **1986**, *46*, 637–6392.
- [20] H. Maeda, G. Y. Bharate, J. Daruwalla, *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, *71*, 409–419.
- [21] Lila, Amr Selim Abu, H. Kiwada, T. Ishida, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *37*, 206–211.
- [22] A. M. Wu, P. D. Senter, *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 1137–1146.

- [23] J. G. Drachman, P. D. Senter, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2013**, 2013, 306–310.
- [24] M. J. Glennie, R. R. French, M. S. Cragg, R. P. Taylor, *Molecular Immunology* **2007**, 44, 3823–3837.
- [25] P. McLaughlin, A. J. Grillo-López, B. K. Link, R. Levy, M. S. Czuczman, M. E. Williams, M. R. Heyman, I. Bence-Bruckler, C. A. White, F. Cabanillas et al., *Journal of Clinical Oncology* **1998**, 16, 2825–2833.
- [26] R. Nahta, F. J. Esteva, *Cancer Letters* **2006**, 232, 123–138.
- [27] R. Colomer, L. A. Shamon, M. S. Tsai, R. Lupu, *Cancer Investigation* **2001**, 19, 49–56.
- [28] A. Albert, *Nature* **1958**, 182, 421–423.
- [29] V. J. Stella, K. J. Himmelstein, *Journal of Medicinal Chemistry* **1980**, 23, 1275–1282.
- [30] K. D. Bagshawe, *British Journal of Cancer* **1987**, 56, 531–532.
- [31] P. D. Senter, M. G. Saulnier, G. J. Schreiber, D. L. Hirschberg, J. P. Brown, I. Hellström, K. E. Hellström, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1988**, 85, 4842–4846.
- [32] K. D. Bagshawe, R. H. J. Begent, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, 22, 365–367.
- [33] S. K. Sharma, J. A. Boden, C. J. Springer, P. J. Burke, K. D. Bagshawe, *Cell Biophysics* **1994**, 24/25, 219–228.
- [34] K. D. Bagshawe, *Journal of Controlled Release* **1994**, 28, 187–193.
- [35] G. Xu, H. L. McLeod, *Clinical Cancer Research* **2001**, 7, 3314–3324.
- [36] M. P. Napier, S. K. Sharma, C. J. Springer, K. D. Bagshawe, A. J. Green, J. Martin, S. M. Stribbling, N. Cushen, D. O'Malley, R. H. J. Begent, *Clinical Cancer Research* **2000**, 6, 765–772.
- [37] X. Zhou, P. Shi, H. Wang, A. Meng, *OTT* **2014**, 7, 535–541.
- [38] U. K. Marelli, F. Rechenmacher, T. R. A. Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, *Front. Oncol.* **2013**, 3, 1–12.
- [39] "USA: Mylotarg vom Markt", zu finden unter <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=34364>, **2010**.
- [40] P. F. Bross, J. Beitz, G. Chen, X. H. Chen, E. Duffy, L. Kieffer, S. Roy, R. Sridhara, A. Rahman, G. Williams et al., *Clinical Cancer Research* **2001**, 7, 1490–1496.
- [41] F. J. Giles, H. M. Kantarjian, S. M. Kornblau, D. A. Thomas, G. Garcia-Manero, T. A. Waddelow, C. L. David, A. T. Phan, D. E. Colburn, A. Rashid et al., *Cancer* **2001**, 92, 406–413.
- [42] M. A. Fire, G. Gellermann, *Journal of Hematology and Oncology* **2012**, 5.
- [43] P. D. Senter, E. L. Sievers, *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 631–637.

- [44] A. Younes, N. L. Bartlett, J. P. Leonard, D. A. Kennedy, C. M. Lynch, E. L. Sievers, A. Forero-Torres, *The New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 1812–1821.
- [45] K. Haddley, *Drugs of Today* **2013**, *49*, 701–715.
- [46] A. Beck, J. M. Reichert, *mAbs* **2014**, *6*, 15–17.
- [47] R. V. J. Chari, *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 98–107.
- [48] C.-L. Law, C. G. Cervený, K. A. Gordon, K. Klussman, B. J. Mixan, D. F. Chace, D. L. Meyer, S. O. Doronina, C. B. Siegall, J. A. Francisco et al., *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7842–7851.
- [49] E. L. Sievers, P. D. Senter, *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 15–29.
- [50] Y. V. Kovtun, V. S. Goldmacher, *Cancer Letters* **2007**, *255*, 232–240.
- [51] G. Li, S. Wang, X. Xue, X. Qu, H. Liu, *Drug Discoveries & Therapeutics* **2013**, *7*, 178–184.
- [52] S. Panowski, S. Bhakta, H. Raab, P. Polakis, J. R. Junutula, *mAbs* **2014**, *6*, 34–45.
- [53] J. A. Flygare, T. H. Pillow, P. Aristoff, *Chemical Biology & Drug Design* **2013**, *81*, 113–121.
- [54] J. Y. Axup, K. M. Bajjuri, M. Ritland, B. M. Hutchins, C. H. Kim, S. A. Kazane, R. Halder, J. S. Forsyth, A. F. Santidrian, K. Stafin et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 16101–16106.
- [55] R. Y. Zhao, S. D. Wilhelm, C. Audette, G. Jones, B. A. Leece, A. C. Lazar, V. S. Goldmacher, R. Singh, Y. Kovtun, W. C. Widdison et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3606–3623.
- [56] R. Patil, J. Portilla-Arias, H. Ding, B. Konda, A. Rekechenetskiy, S. Inoue, K. L. Black, E. Holler, J. Y. Ljubimova, *Int J Mol Sci* **2012**, *13*, 11681–11693.
- [57] W. C. Widdison, S. D. Wilhelm, E. E. Cavanagh, K. R. Whiteman, B. A. Leece, Y. Kovtun, V. S. Goldmacher, H. Xie, R. M. Steeves, R. J. Lutz et al., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4392–4408.
- [58] H. Xie, C. Audette, M. Hoffee, J. M. Lambert, W. A. Blättler, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 1073–1082.
- [59] B. F. Sloane, J. R. Dunn, K. V. Honn, *Science* **1981**, *212*, 1151–1153.
- [60] G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 3341–3346.
- [61] 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.
- [62] G. M. Dubowchik, K. Mosure, J. O. Knipe, R. A. Firestone, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 3347–3352.
- [63] P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, *Journal of Medicinal Chemistry* **1981**, *24*, 479–480.
- [64] I. A. Müller, *Inaugural-Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Freiburg im Breisgau, **2010**.

- [65] de Groot, Franciscus M. H., van Berkomp, Leon W. A., H. W. Scheeren, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3093–3102.
- [66] R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, H. Zhao, Y. H. Choe, A. Martinez, K. Shum, S. Guan, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3657–3667.
- [67] 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, *Journal of Industrial Biology* **1990**, *5*, 113–124.
- [68] G. Trimurtulu, I. Ohtani, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, L. Demchik, *The Journal of American Chemical Society* **1994**, *116*, 4729–4737.
- [69] R. A. Barrow, T. Hemscheidt, J. Liang, S. Paik, R. E. Moore, M. A. Tius, *The Journal of American Chemical Society* **1995**, *117*, 2479–2490.
- [70] G. Trimurtulu, J. Ogino, C. E. Heltzel, T. Le Husebo, C. M. Jensen, L. K. Larsen, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, S. L. Mooberry, T. H. Corbett et al., *The Journal of American Chemical Society* **1995**, *117*, 12030–12049.
- [71] M. Kobayashi, M. Kurosu, W. Wang, I. Kitagawa, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1994**, *42*, 2394–2396.
- [72] S. Eißler, A. Stoncius, M. Nahrwold, N. Sewald, *Synthesis* **2006**, *22*, 3747–3789.
- [73] S. Chaganty, T. Golakoti, C. Heltzel, R. E. Moore, W. Y. Yoshida, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1403–1406.
- [74] S. V. Gottumukkala, T. Golakoti, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 302–305.
- [75] G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman (Hrsg.) *Anticancer Agents from Natural Products*. Second Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, **2011**.
- [76] 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, *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2985–3007.
- [77] R. E. Moore, M. A. Tius, R. A. Barrow, J. Liang, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, T. K. Hemscheidt, WO 96/40184, **1996**.
- [78] M. M. Wagner, D. C. Paul, C. Shih, M. A. Jordan, L. Wilson, D. C. Williams, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *43*, 115–125.
- [79] M. J. Edelman, D. R. Gandara, P. Hausner, V. Israel, D. Thornton, J. DeSanto, L. A. Doyle, *Lung Cancer* **2003**, *39*, 197–199.
- [80] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York, London, **1994**.
- [81] V. I. Gelfand, A. D. Bershadsky, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1991**, *7*, 93–116.

- [82] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, 1. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1994**.
- [83] Y. Ding, W. H. Seufert, Z. Q. Beck, D. H. Sherman, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5492–5498.
- [84] B. Lemmer, K. Brune, D. Palm, G. Fülgraff, *Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie*, Springer, **2010**.
- [85] Q.-X. Yue, X. Liu, D.-A. Guo, *Planta Med.* **2010**, *76*, 1037–1043.
- [86] S. Gupta, B. Bhattacharyya, *Molecular and Cellular Biochemistry* **2003**, *253*, 41–47.
- [87] D. Panda, R. H. Himes, R. E. Moore, L. Wilson, M. A. Jordan, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12948–12953.
- [88] H. Boukari, D. L. Sackett, R. Nossal, *Macromol. Symp.* **2005**, *227*, 211–220.
- [89] A. Mitra, D. Sept, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13955–13962.
- [90] R. Bai, R. E. Schwartz, J. A. Kepler, G. R. Pettit, E. Hamel, *Cancer Research* **1996**, *56*, 4398–4406.
- [91] 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.
- [92] R. S. Al-Awar, T. H. Corbett, J. E. Ray, L. Polin, J. H. Kennedy, M. M. Wagner, D. C. Williams, *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, *3*, 1061–1067.
- [93] K. Lu, J. Dempsey, R. M. Schultz, C. Shih, B. A. Teicher, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2001**, *47*, 170–178.
- [94] 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 et al., WO 98/08505, **1997**.
- [95] K. L. Bolduc, S. D. Larsen, D. H. Sherman, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 6414–6416.
- [96] C. Weiß, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2012**.
- [97] H. Bouchard, M.-P. Brun, A. Commercon, J. Zhang, PCT/FR2010/050986, **2011**.
- [98] A. Commercon, H. Bouchard, J. Zhang, M. P. Brun, 2947269, **2009**.
- [99] C. P. Leamon, Y. Wang, I. R. Vlahov, F. You, P. J. Kleindl, H. K. R. Santhapuram, PCT/US2008/068093, **2008**.
- [100] T. Dingermann, I. Zündorf, *Pharmazeutische Zeitung* **2014**, *18*.
- [101] G. I. Georg, S. M. Ali, V. J. Stella, W. N. Waugh, R. H. Himes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 1959–1962.
- [102] J. Liang, R. E. Moore, E. D. Moher, J. E. Munroe, R. S. Al-Awar, D. A. Hay, D. L. Varie, T. Y. Zhang, J. A. Aikins, M. J. Martinelli et al., *Investigational New Drugs* **2005**, 213–224.
- [103] G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman (Hrsg.) *Anticancer agents from natural products*, Taylor & Francis, Boca Raton, Fla., **2005**.

- [104] I. E. Krop, M. Beeram, S. Modi, S. F. Jones, S. N. Holden, W. Yu, S. Girish, J. Tibbitts, J.-H. Yi, M. X. Sliwkowski et al., *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2698–2704.
- [105] V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, D. Turk, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824*, 68–88.
- [106] Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1777–1780.
- [107] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, Amsterdam, **2008**.
- [108] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [109] R. A. Firestone, G. M. Dubowchik, O 624 377 A2.
- [110] S. Eißler, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2008**.
- [111] N. Ragoussis, V. Ragoussis, *Journal of the American Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, 3529–3533.
- [112] Z.-M. Wang, X.-L. Zhang, K. B. Sharpless, S. C. Sinha, A. Sinha-Bagchi, E. Keinan, *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 6407–6410.
- [113] G. E. Keck, E. P. Boden, *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 265–268.
- [114] J. A. McCubbin, M. L. Maddess, M. Lautens, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2993–2996.
- [115] B. Neises, W. Steglich, *Angewandte Chemie International Edition* **1978**, *17*, 522–524.
- [116] I. Dhimitruka, J. Santalucia, *Organic letters* **2006**, *8*, 47–50.
- [117] A. K. Ghosh, L. Swanson, *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 9823–9826.
- [118] T. Nagamitsu, D. Takano, T. Fukuda, K. Otaguro, I. Kuwajima, Y. Harigaya, S. Omura, *Organic letters* **2004**, *6*, 1865–1867.
- [119] D. W. Hoard, E. D. Moher, M. J. Martinelli, B. H. Norman, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1813–1815.
- [120] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10515–10530.
- [121] J. Liang, E. D. Moher, R. E. Moore, D. W. Hoard, *Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 3143–3147.
- [122] C. A. Mast, S. Eißler, A. Stoncius, H.-G. Stammer, B. Neumann, N. Sewald, *Chemistry a European Journal* **2005**, *11*, 4667–4677.
- [123] K. Miller, R. Erez, E. Segal, D. Shabat, R. Satchi-Fainaro, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2993–2998.
- [124] B. Sammet, *Synlett* **2009**, *18*, 3050–3051.
- [125] D. T. S. Rijkers, J. W. M. Höppener, G. Posthuma, C. J. M. Lips, R. M. J. Liskamp, *Chemistry a European Journal* **2002**, *8*, 4285–4291.
- [126] J. A. Mindell, *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 69–86.

- [127] 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, J. E. Ray et al., WO98/08505.
- [128] M. A. DeWit, E. R. Gillies, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1846–1854.
- [129] T. Bogner, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2011**.
- [130] "Details zur Zelllinie. KB-3-1", zu finden unter http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-158.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192.
- [131] "Details zur Zelllinie. KB-V1", zu finden unter http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-149.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192p=null.
- [132] S. D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, *Methods* **2007**, *42*, 321–324.
- [133] A. Warnecke, *Inaugural-Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Freiburg im Breisgau, **2002**.
- [134] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1–28.
- [135] M. A. Walker, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 665–668.
- [136] M. A. Walker, *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 5352–5355.
- [137] O. Seitz, H. Kunz, *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 813–826.
- [138] J. Howl, *Peptide Synthesis and Applications*, Humana Press, **2005**.
- [139] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556–557.
- [140] K. Ishihara, M. Kubota, H. Kurihara, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4413–4414.
- [141] Y. Mikata, K. Takahashi, Y. Noguchi, M. Naemura, A. Ugai, S. Itami, K. Yasuda, S. Tamotsu, T. Matsuo, T. Storr, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 217–225.
- [142] Q. Sun, J. Li, W.-N. Liu, Q.-J. Dong, W.-C. Yang, G.-F. Yang, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 11304–11311.
- [143] "Enzymatic Assay of Cathepsin B", zu finden unter <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-cathepsin-b.html>.
- [144] C. A. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- [145] P. D. Senter, S. Doronina, B. E. Toki, WO 2004/010957 A2, **2003**.
- [146] W. S. Saari, J. E. Schwering, P. A. Lyle, S. J. Smith, E. L. Engelhardt, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 97–101.
- [147] H. W. Kleemann, H. Heitsch, R. Henning, W. Kramer, W. Kocher, U. Lerch, W. Linz, W. U. Nickel, D. Ruppert, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 559–567.

- [148] "ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS", zu finden unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002455/WC500135055.pdf, **2013**.
- [149] "Neue Arzneimittel Information der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ). Kadcyla® (Trastuzumab Emtansin)", zu finden unter <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/201404-Kadcyla.pdf>.
- [150] "Chemotherapie", zu finden unter <http://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/chemotherapie-durchfuehrung.php>, **2012**.
- [151] "Regionale Chemotherapie", zu finden unter <http://www.medias-klinikum.de/therapien/regionale-chemotherapie.html>.
- [152] J. D. Gregory, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3922–3923.
- [153] S. Matsui, H. Aida, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1978**, 1277.
- [154] R. P. Lyon, J. R. Setter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H. Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li et al., *Nature Biotechnology* **2014**, *32*, 1059–1062.
- [155] Palanki, Moorthy S S, A. Bhat, R. W. Lappe, B. Liu, B. Oates, J. Rizzo, N. Stankovic, C. Bradshaw, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 4249–4253.
- [156] M. Frizler, F. Löhr, N. Furtmann, J. Kläs, M. Gütschow, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 396–400.
- [157] L. Coussens, T. L. Yang-Feng, Y.-C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. H. Seeburg, T. A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke et al., *Science* **1985**, *230*, 1132–1139.
- [158] D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, W. L. McGuire, *Science* **1987**, 177–182.
- [159] A. Citri, Y. Yarden, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 505–516.
- [160] P. M. Guy, J. V. Platko, L. C. Cantley, R. A. Cerione, K. L. Carraway, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, 8132–8136.
- [161] L. N. Klapper, S. Glathe, N. Vaisman, N. E. Hynes, G. C. Andrews, M. Sela, Y. Yarden, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 4995–5000.
- [162] P. Nagy, A. Jenei, S. Damjanovich, T. M. Jovin, J. Szöllois, *Pathology Oncology Research* **1999**, *5*, 255–271.
- [163] M. A. Olayioye, R. M. Neve, H. A. Lane, N. E. Hynes, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3159–3167.
- [164] R. R. Beerli, D. Graus-Porta, K. Woods-Cook, X. Chen, Y. Yarden, N. E. Hynes, *Molecular and Cellular Biology* **1995**, *15*, 6496–6505.

- [165] I. Kümler, M. K. Tuxen, D. L. Nielsen, *Cancer Treatment Reviews* **2014**, *40*, 259–270.
- [166] C. J. Witton, J. R. Reeves, J. J. Going, T. G. Cooke, Bartlett, John M S, *J. Pathol.* **2003**, *200*, 290–297.
- [167] H. Liu, K. May, *MAbs* **2012**, *4*, 17–23.
- [168] D. Hayworth, "Sulfhydryl-reactive Crosslinker Chemistry", zu finden unter <http://www.piercenet.com/method/sulfhydryl-reactive-crosslinker-chemistry>.
- [169] "INSTRUCTIONS. 2-Mercaptoethylamine•HCl", zu finden unter <https://www.piercenet.com/instructions/2160131.pdf>.
- [170] Paola Gallinari, *Antikörperreduktion mit TCEP und anschließende Konjugation an* **53**. E-Mail, **2014**.
- [171] R. Roskoski, *Pharmacol. Res.* **2014**, *79*, 34–74.
- [172] H. E. Gottlieb, V. Kotylar, A. Nudelman, *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [173] M. Nahrwold, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2009**.
- [174] S. Eissler, T. Bogner, M. Nahrwold, N. Sewald, *Chemistry* **2009**, *15*, 11273–11287.
- [175] D.-Y. Ma, D.-X. Wang, Q.-Y. Zheng, M.-X. Wang, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2366–2376.
- [176] N. Franz, L. Menin, H.-A. Klok, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5390–5405.
- [177] T. Conroy, J. T. Guo, N. H. Hunt, R. J. Payne, *Organic letters* **2010**, *12*, 5576–5579.
- [178] F. M. Menger, H. Zhang, *Langmuir* **2005**, *21*, 10428–10438.