

**Synthese unterschiedlich lipidierter Peptide
mit der Sequenz des C-Terminus
im menschlichen H-Ras-Protein**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie
der Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

Dissertation

von
Diplom-Chemiker
Dieter Kadereit
aus Bremen

Dekan: Prof. Dr. Ballauff

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Kazmaier

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	2
2.1. Lipidmodifizierungen von Proteinen	2
2.1.1. Arten und Vorkommen von Lipidmodifizierungen	2
2.1.2. Funktionen der Lipidmodifikationen	4
2.2. Ras-Proteine	4
2.2.1. Regulierung der Aktivität von Ras-Proteinen	5
2.2.2. Intrazelluläre Signaltransduktionswege unter Beteiligung von Ras	6
2.2.3. Struktur und Wechselwirkung mit anderen Proteinen	8
2.3. Chemische Synthese von lipidierten Peptiden	10
2.4. Synthese künstlicher Peptid-Protein-Konjugate	11
2.5. Verwendung lipidmodifizierter Peptide in biophysikalischen und biologischen Studien	14
3. Ziel der Arbeit	15
4. Spezieller Teil	18
4.1 Synthese des charakteristisch lipidmodifizierten H-Ras C-Terminus	18
4.1.1 Syntheseplan	18
4.1.2 Aufbau der N-terminalen Tripeptide	20
4.1.3 Aufbau der mittleren Tripeptide	21
4.1.4 Abschluss der Synthese	23
4.2 Verwendung lipidiertes Peptide in Untersuchungen zur Aktivierung von Raf durch Ras	25
4.2.1 Hintergrund	25
4.2.2 Das Testsystem	26
4.2.3 Reetablierung des Assay-Systems	27
4.3 Einsatz farnesylierter Peptide in der Untersuchung der Wechselwirkung von Ras mit der PI 3-Kinase γ	29

4.3.1 Hintergrund	29
4.3.2 Der Assay	30
4.3.3 Ergebnis und Interpretation	32
4.4 Synthese lipidierter H-Ras-Peptide mit einem Maleinimidocaproyl-Linker	34
4.4.1 Synthesepplan	34
4.4.2 Untersuchungen zur Schutzgruppenstrategie	35
4.4.3 Synthese der Maleinimido-modifizierten Pentapeptide	43
4.5 Herstellung Succinimid-verbrückter Protein-Peptid-Konjugate	49
4.5.1 Hintergrund	49
4.5.2 Konjugatsynthese	50
4.5.3 Ergebnisse	51
5. Zusammenfassung und Ausblick	53
5.1. Zusammenfassung	53
5.2. Ausblick	57
6. Experimenteller Teil	59
6.1 Geräte und Hilfsmittel	59
6.2 Versuche zur Synthese der Oktapeptide	61
6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2	61
6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.3	67
6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.1.4	79
6.3 Versuche zur Raf-Aktivierung durch Ras	92
6.3.1 Herstellung der Proteine	92
6.3.2 Assay	93
6.3.3 Gemessene Daten	95
6.4 Versuche zur Ras-PI3K-Interaktion	97
6.4. 1 Assay	97
6.3.2 Gemessene Daten	98
6.5 Versuche zur Synthese Maleinimido-modifizierter Pentapeptide	99
6.5.1 Herstellung selektiv blockierter Lysinderivate	99
6.5.2 Versuche zu Kapitel 4.4.2.2	100

6.5.3 Versuche zu Kapitel 4.4.2.3	104
6.5.4 Versuche zu Kapitel 4.4.2.4	107
6.5.5 Versuche zu Kapitel 4.4.2.5	109
6.5.6 Versuche zu Kapitel 4.4.3	112
6.5.7 Synthese der Protein-Peptid-Konjugate	135
7. Literaturverzeichnis	137
8. Abkürzungsverzeichnis	142

1. Einleitung

Durch die rasante Entwicklung in der Molekularbiologie, insbesondere durch das Aufkommen neuer biochemischer Methoden und verbesserter analytischer Verfahren, ist es möglich geworden, biochemische Vorgänge im Detail zu untersuchen. Da diese molekularbiologischen Prozesse wiederum auf chemischen Reaktionen basieren, drängt sich an dieser Stelle eine Verknüpfung der Disziplinen Molekularbiologie, Biochemie und Chemie geradezu auf. Durch die Kombination der jeweiligen Methoden dieser Fachrichtungen werden neue Möglichkeiten zur detaillierten Untersuchung biologischer Vorgänge geschaffen, die die einzelnen Disziplinen nicht bieten könnten.

Ein wesentlicher Ansatz dieser „chemischen Biologie“ ist es, durch chemische Synthese definierte Verbindungen zur Verfügung zu stellen. Der Zugang zu den hierfür benötigten Substanzen stellt häufig eine Herausforderung dar, die oftmals auch die Ausarbeitung neuer synthetischer Methoden umfasst. Die Verbindungen werden anschließend in Testsystemen eingesetzt, die von der biologischen Seite entwickelt und mit den benötigten Proteinen versorgt werden. Solche Assays können außer zur Untersuchung der beteiligten Prozesse auch genutzt werden, um für therapeutische Zwecke interessante Verbindungen zu finden, die eben diese Vorgänge beeinflussen, also entweder verstärken oder hemmen. Eine Weiterentwicklung dieser Leitstrukturen kann zu einem Therapieansatz von fehlregulierten Prozessen führen.

Ein wesentlicher Gegenstand solcher Untersuchungen ist die biologische Signaltransduktion. In die dabei ablaufenden Prozesse sind eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine eingebunden, von denen sich einige durch das Vorhandensein kovalent gebundener Lipidreste auszeichnen. Diese Lipidmodifizierungen sind in der Regel essentiell für die Funktionsfähigkeit des jeweiligen Proteins. Prominente Vertreter dieser Substanzklasse sind die Ras-Proteine. Sie sind in Signaltransduktionskaskaden involviert, über die unter anderem die Zellteilung und die Zellentwicklung gesteuert werden. Durch Mutation bestimmter Aminosäuren kann diese Regulation außer Kontrolle geraten. Die Bedeutung der Ras-Proteine zeigt sich gerade daran, dass diese Biomoleküle bei vielen Krebserkrankungen mutiert vorgefunden werden. Eine detaillierte Kenntnis der bei der Signalweiterleitung über Ras ablaufenden Prozesse könnte helfen, den Funktionsstörungen dieser Proteine gezielt entgegen zu wirken.

Die Synthese lipidmodifizierter Teilstrukturen und künstlicher Protein-Konjugate sowie deren Einsatz in biologischen Studien ist Gegenstand dieser Arbeit.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Lipidmodifizierungen an Proteinen

2.1.1. Arten und Vorkommen von Lipidmodifizierungen

Obwohl die kovalente Anknüpfung von Lipidresten an Proteine seit 50 Jahren bekannt ist, wurden Details dieser Anbindungen erst seit den 80er Jahren näher untersucht. Heute unterscheidet man vier Arten von Lipidmodifizierungen: (1) die Acylierung eines N-terminalen Glycins mit einer geradkettigen Fettsäure, überwiegend der Myristinsäure,¹ (2) die *S*-Acylierung von Cysteinen innerhalb eines Proteins mit vornehmlich der Palmitinsäure,^{1,2} (3) die *S*-Prenylierung von Cysteinen am oder in der Nähe des C-Terminus mit Farnesyl- oder Geranylgeranylgruppen^{3,4} und (4) die Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit Cholesterol (Abbildung 1).⁵

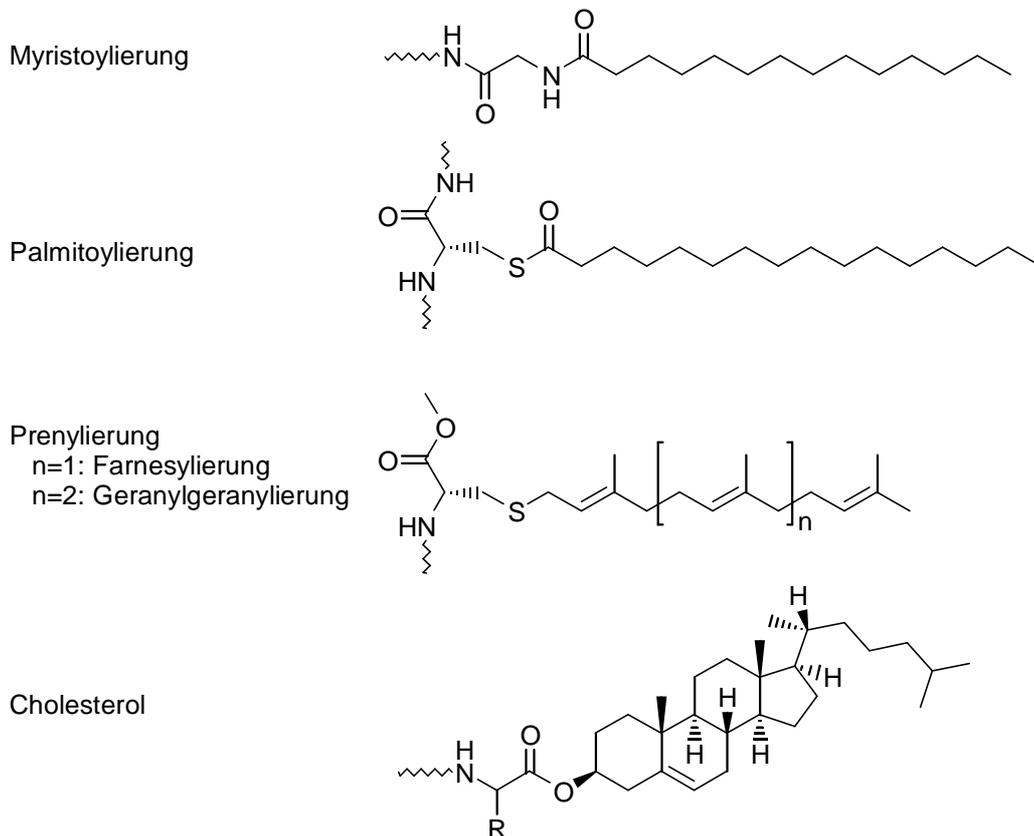


Abbildung 1: Lipidmodifikationen in Proteinen

Die *N*-Myristoylierung erfolgt hochspezifisch durch Myristoylproteintransferasen. Dabei dient die von den Transferasen erkannte Aminosäuresequenz Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr (X: beliebige Aminosäure) als Myristoylierungssignal.¹ Das N-terminale Methionin wird

zunächst durch eine Amino-peptidase entfernt und daraufhin das freigelegte Glycin myristoyliert.

Der Mechanismus der *S*-Palmitoylierung ist im Gegensatz dazu noch ungeklärt. Zwar wurden Proteine beschrieben, die eine Palmitoyltransferase-Aktivität besitzen, doch blieb bisher der Nachweis eines Enzym-katalysierten Palmitoyltransfers auf Proteine in unmodifizierten Zellen aus. Als Beispiel sei die Isolierung der „Ras-Proteinpalmitoyltransferase“⁶ genannt, die sich später als Thiolase herausstellte.⁷ Im Gegensatz dazu sind bisher zwei Thioesterasen beschrieben, die Ras depalmitoylieren können.⁸

Die Problematik der Untersuchungen zur Palmitoylierung von Ras beruht darauf, dass ein unkatalysierter Acyltransfer von Palmitoyl-CoA auf membrangebundene Proteine nachgewiesen ist⁹ und dass die Thioester unter physiologischen Bedingungen hydrolysieren können, wodurch die Isolierung der palmitoylierten Proteine nur unter partiellen Verlust dieser Modifizierung möglich ist. Auch scheint es kein einheitliches Palmitoylierungssignal wie im Falle anderer Lipidmodifikationen zu geben, jedoch weisen neuere Arbeiten auf eine enzymkatalysierte *S*-Acylierung hin. Hierzu zählt die detaillierte Untersuchung des Verlaufs der posttranslationalen Modifikation von Ras¹⁰ und vor allem die Beschreibung eines möglichen Inhibitors für die Palmitoylierung N-terminal myristoylierter Proteine, der auch bei H-Ras schwache Effekte zeigt.¹¹

Die Proteinprenylierung ist eine weitere Lipidmodifikation, die sich deutlich von den anderen unterscheidet, da die Prenylgruppe durch einen Thioether an das Protein angebunden vorliegt. Solche Thioether können im Gegensatz zu allen anderen Lipidmodifikationen nicht hydrolytisch gespalten werden.¹² Die Bedeutung dieser Lipidmodifikation zeigt sich unter anderem daran, dass bis 2 % des zellulären Proteinmaterials prenyliert vorliegen kann.^{12a} Prenylierte Proteine lassen sich auf Grund des Prenylierungssignals und damit auch der beteiligten Proteinprenyltransferase grob in zwei Klassen einteilen.^{3,4} Proteine der einen Klasse weisen als Prenylierungssignal ein CAAX-Motiv am C-Terminus auf, bei dem C das zu prenylierende Cystein und A eine beliebige aliphatische Aminosäure darstellt. Die Aminosäure X bestimmt die Art der Prenylgruppe: Ist A ein Serin, Methionin oder Glutamin, wird das Protein farnesyliert, ist X jedoch ein Leucin, wird eine Geranylgeranylgruppe übertragen. Das CAAX-Signal wird von der Farnesyltransferase¹³ (FTase) und der Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) erkannt. Beide Enzyme bestehen aus zwei Untereinheiten und sind eng miteinander verwandt. Ihre α -Untereinheit ist identisch, die β -Untereinheiten ähnlich. Bei einer Inhibierung der FTase werden einige sonst farnesylierte Proteine, zum Beispiel K-Ras, geranylgeranyliert.¹⁴ Die

Prenylierung steht am Anfang einer posttranslationalen Modifikationskaskade. Nach der Prenylierungsreaktion spaltet eine Protease die AAX-Sequenz ab und das nun C-terminale prenylierte Cystein wird durch eine Methyltransferase¹⁵ zum Methylester umgesetzt. Typische Vertreter dieser Klasse sind die Ras-Proteine, die in den folgenden Kapiteln noch detaillierter diskutiert werden.

Die zweite Klasse von prenylierten Proteinen besitzt CXC-, CC- oder CCXX-Motive als C-terminale Erkennungssequenzen. Diese werden ausschließlich von der Geranylgeranyltransferase II (GGTase II) erkannt und geranylgeranyliert. Eine mögliche Methylierung der CXC-Sequenz im Anschluss an die Prenylierung wird zur Zeit diskutiert.

2.1.2. Funktionen der Lipidmodifikationen

Zur Zeit kennt man zwei Funktionen von Lipidmodifikationen. Einerseits wird die Membranassoziation von Proteinen reguliert, andererseits wird ein direkter Einfluss auf Protein-Protein-Wechselwirkungen diskutiert.

Die Hydrophobie von Proteinen wird durch Anbindung von Lipidresten erhöht. Bereits durch Anknüpfung einer Lipidgruppe ist das Protein in der Lage, sich an eine Membran, sei es nun die Plasmamembran oder eine Membran von Zellorganellen, zu binden. Jedoch ist diese Wechselwirkung bei farnesylierten Proteinen relativ schwach, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen Membran-gebundenem und cytosolischem Protein einstellt. Erst durch die Einführung einer zweiten Lipidgruppe wird dieses Gleichgewicht deutlich auf die Seite des Membran-gebundenen Biopolymers verschoben. Dabei ist möglicherweise die Einführung einer zweiten Ankergruppe für die selektive Membranlokalisierung einiger Proteine verantwortlich (*kinetic trapping modell*).¹⁶

Eine weitere mögliche Funktion der Lipidgruppen ist die Beteiligung an der Wechselwirkung mit Proteinen.⁴ Diese kann einerseits eine direkte Interaktion mit einem Rezeptor-¹⁷ oder Effektorprotein sein oder andererseits auf einer konformativen Änderung des lipid-modifizierten Proteins beruhen, durch die diese Wechselwirkung erst ermöglicht wird. Zwar wird eine Beteiligung der Lipidgruppe an Protein-Protein-Interaktionen in einigen Fällen diskutiert, doch ein eindeutiger Nachweis gelang bislang nicht.^{2,4}

2.2. Ras-Proteine

Ras-Proteine sind Guanin-Nukleotid-bindende Proteine, die an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind und eine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion

spielen. Sie sind an der Regulierung so unterschiedlicher Vorgänge wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, aber auch dem programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt.

Bisher sind vier Arten von Ras-Proteinen bekannt: H-Ras, N-Ras, K-Ras_{4A} und K-Ras_{4B} (letztere sind verschiedene Produkte des gleichen Gens). Sie enden an ihrem C-Terminus mit einem farnesylierten Cysteinmethylester und weisen zusätzlich eine (N-Ras, K-Ras_{4A}) beziehungsweise zwei (H-Ras) S-Palmitoylgruppen oder eine Polylysinsequenz (K-Ras_{4B}) in der Nähe des C-Terminus auf. Bis auf diesen Bereich der C-terminalen 25 Aminosäuren, der sogenannten hypervariablen Domäne, zeigen diese Proteine eine extrem hohe Homologie. Der konservierte Teil ist für die Bindung an Effektoren und das Nukleotid verantwortlich, während der C-Terminus in erster Linie für eine Membranverankerung sorgt.

2.2.1. Regulierung der Aktivität von Ras-Proteinen

Ras-Proteine fungieren als binäre Schalter.¹⁸ Im Guanosin triphosphat (GTP)-gebundenen Zustand binden sie an Effektoren und geben dadurch Signale weiter, während sie im Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Zustand diese Effektorproteine wesentlich schwächer binden und dadurch als Signalmolekül inaktiv sind. Die Regulierung des Anteils aktiven Ras-Proteins und damit die Intensität der Signalweiterleitung ist die Basis der Ras-Funktion.

Die Aktivierung erfolgt durch das Herauslösen des GDP katalysiert durch *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), wie Sos, und Binden eines cytosolischen Nukleotids.¹⁹ Die Bindung von GTP an Ras bewirkt eine Konformationsänderung in dessen Effektorregion. Für die Desaktivierung besitzt Ras eine geringe GTPase-Aktivität, die eine Hydrolyse der γ -Phosphatgruppe im GTP unter Bildung von GDP ermöglicht und die sich durch Wechselwirkung mit einem *GTPase activating protein* (GAP) um mehrere Größenordnungen steigern lässt (Abbildung 2).²⁰

Es gibt auch Hinweise auf physiologisch relevante Rollen der Palmitoylierung/Depalmitoylierung bei der Regulierung zellulärer Signaltransduktion, die jedoch noch nicht genauer verstanden sind.²¹

Detailliertere Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, dass die Ras-Isoformen trotz der ausgeprägten Homologie unterschiedliche Funktionen wahrnehmen können. So sollen die jeweiligen Isoformen durch verschiedene Austauschfaktoren selektiv aktiviert werden können,²² unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeiten zur Aktivierung verschiedener Effektor-

proteine besitzen²³ und auch in unterschiedlichen Bereichen der Plasmamembran lokalisiert sein.¹⁰

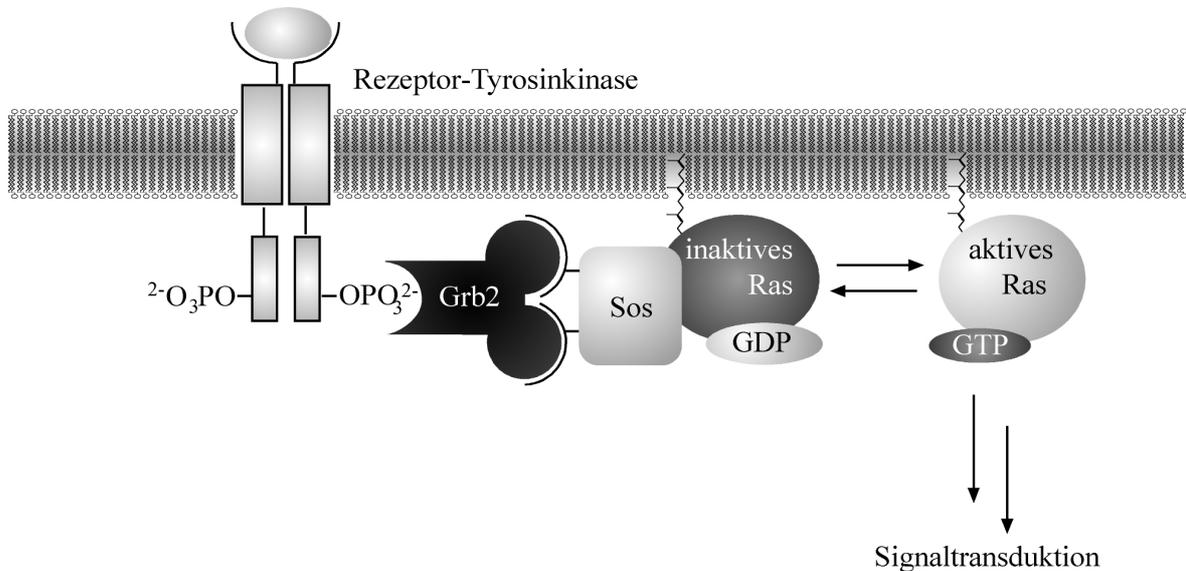


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Ras durch Rezeptor-Tyrosinkinasen. Das Binden eines extrazellulären Signalmoleküls führt zur Dimerisierung und gegenseitigen Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase. Der Grb2/SOS-Komplex bindet an diese Phosphorylierungsstellen und wird so an der Plasmamembran fixiert, wodurch eine Interaktion mit Ras und damit dessen Aktivierung ermöglicht wird. GTP-gebundenes Ras tritt seinerseits in Wechselwirkung mit Effektorproteinen.

Mutationen in Ras-Proteinen können durch zwei Mechanismen zu einer dauerhaften Aktivierung führen. So führt eine schwächere Bindung an das Nukleotid zu schnellerem Austausch und wegen des Überschusses an GTP im Cytosol zu überwiegend mit GTP assoziiertem Ras. Auch Ras-Mutanten mit einer geringeren GTPase-Aktivität oder der Unfähigkeit, an GAP oder andere negative Regulatoren zu binden, sind ebenfalls dauerhaft „angeschaltet“.

2.2.2. Intrazelluläre Signaltransduktionswege unter Beteiligung von Ras

Aktiviertes Ras kann an eine Reihe von Proteinen binden.²⁴ Die wesentlichen Effektorproteine sind Ral-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Ral GEFs), PI 3-Kinase und Raf.²⁵ Am besten untersucht, wenn auch trotzdem noch nicht vollständig geklärt, ist die Wechselwirkung von Ras mit der cytosolischen Kinase Raf. Die Aktivierung von Raf führt zu der Einleitung der *mitogen activated protein* Kinasekaskade (MAP-Kaskade) durch Phosphorylierung von MEK, das seinerseits Erk phosphoryliert und so die

Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Abbildung 3). Dadurch erlangen diese die Fähigkeit, in den Zellkern einzudringen und die Gentranskription zu beeinflussen. Ebenfalls durch direkte Wechselwirkung mit Ras werden die Ral GEFs wie z. B. RalGDS aktiviert, die ihrerseits die GTPase Ral über einen Nukleotidaustausch aktivieren.²⁶ Ral reguliert die GTPase CDC42, die bei der Kontrolle des Actin-Cytoskeletts eine wichtige Rolle spielt. An der Kontrolle des Actin-Cytoskeletts ist die GTPase Rac ebenfalls beteiligt, die infolge der Bildung von PIP₃ aktiviert wird.

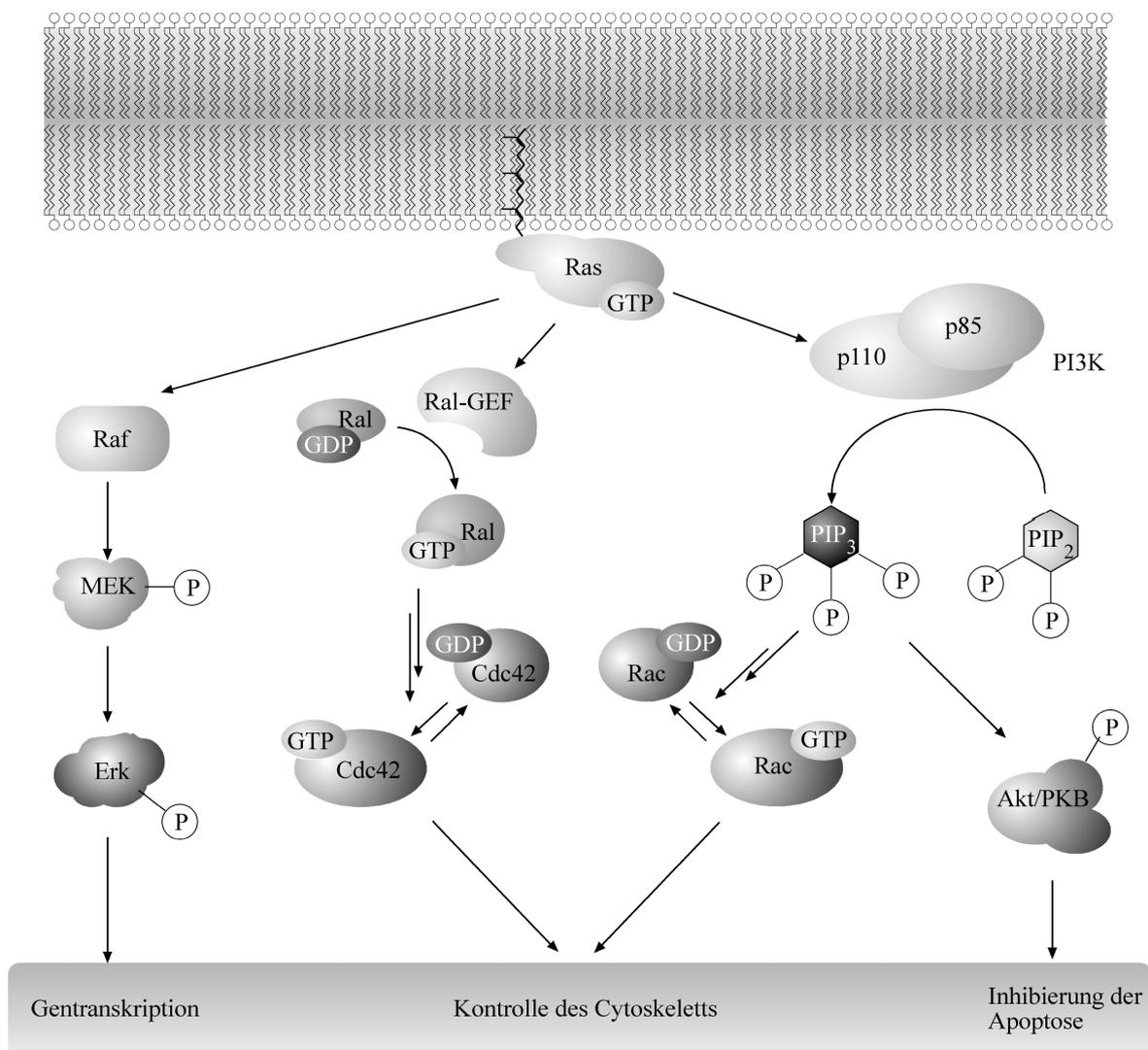


Abbildung 3: Schematische Darstellung der wichtigsten Signaltransduktionswege unter Beteiligung von Ras

GTP-Ras aktiviert auch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), die durch Synthese von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB,

auch als Akt bezeichnet) ermöglicht. Dieser Signalweg ist an der Regulierung des programmierten Zelltods (Apoptose) beteiligt. So ist PKB/Akt in der Lage, die Zelle vor der Apoptose zu schützen und dadurch am Leben zu erhalten.

Diese Signaltransduktionswege sind zur besseren Übersicht stark vereinfacht dargestellt. Viele der kurz beschriebenen Signalproteine können auch unabhängig von Ras aktiviert werden und haben gleichzeitig weitaus mehr Funktionen als hier dargestellt. Dennoch lassen sich einige ungelöste Probleme daraus ablesen. So ist z. B. der Beitrag von Ras bei der Aktivierung der verschiedenen Effektorproteine und die Weiterleitung unterschiedlicher Signale über die Ras-Proteine noch nicht vollständig verstanden.²⁷ Ein Erklärungsansatz für die letztere Fragestellung könnten die unterschiedliche Reaktivität der Ras-Isoformen gegenüber verschiedenen GEFs und Effektoren²³ oder ihre unterschiedlichen Lokalisierung an der Plasmamembran darstellen.²⁴ Weitere Möglichkeiten zur Differenzierung sind seine Intensität und Dauer oder das gezielte Zusammenwirken paralleler Transduktionswege.²⁸

2.2.3. Struktur und Wechselwirkung mit anderen Proteinen

Die Wechselwirkung von Ras mit seinen Effektorproteinen erfolgt in der Regel über die als *Switch 1* bekannte Region in Ras (Aminosäuren 30–38). Die Struktur dieses Bereiches ist abhängig von der Art des gebundenen Guaninnukleotides – eine Grundvoraussetzung für das Funktionieren von Ras als binärer Schalter.

Aktivierung von Raf durch Ras

Die Kinase Raf ist das wichtigste Effektorprotein von Ras, das – einmal aktiviert – die mitogen-aktivierte Protein-Kinase(MAP)-Kaskade einleitet.²⁹ Die genauen Bedingungen, die zu einer Aktivierung von Raf durch Ras führen, sind noch immer Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Die Bindung von Raf an Ras ist notwendig für dessen Aktivierung. Sie erfolgt über eine Sequenz von 81 Aminosäuren (51–131), die zusammengefasst als *Ras binding domain (RBD)* bezeichnet werden, und führt zur Membranlokalisierung der ansonsten cytosolischen Kinase. Möglicherweise gibt es eine sekundäre schwächere Wechselwirkung des Zinkfingers in Raf mit einer weiteren Region von Ras. Es ist jedoch umstritten, ob sich die Beteiligung von Ras allein auf die Verankerung von Raf an der Plasmamembran beschränkt. Hinweise darauf lieferte die Untersuchung einer Raf-Mutante mit einem CAAX-Motiv (K-Ras C-Terminus) am C-Terminus, die auch unabhängig von Ras aktiv

war.³⁰ Andererseits ist eine Mutante von Ras (H-Ras^{V45E}) durchaus in der Lage, Raf zu binden und damit an der Membran zu lokalisieren, ohne dass eine Aktivierung des gebundenen Raf-Proteins beobachtet wird.³¹

Die Aktivierung von Raf erfolgt nach dessen Membranreverankerung wahrscheinlich durch eine dritte Komponente. So wurde kürzlich ein cytosolisches Protein beschrieben, das Raf in Gegenwart von Ras aktivieren kann.³² Möglicherweise ist auch eine Dimerisierung von Ras^{33,34} oder alternativ eine hohe lokale Konzentration eine Voraussetzung für die Aktivierung von Raf.

PI 3-Kinase

Phosphoinosit 3-Kinasen (PI3K) phosphorylieren Inositol-Lipide in der 3-Position des Inositolrings unter Bildung von Phosphatidylinosit-(3)-monophosphat (PIP), Phosphatidylinosit-(3,4)-diphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinosit-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃). PI3Ks sind eine große Familie intrazellulärer Signaltransducer, die auf Grund ihrer Primärstruktur, Regulierung und Substratspezifität in drei Klassen unterteilt wird.³⁵ In dieser Arbeit ist die Klasse I von Interesse, die durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden kann.³⁶ In der Literatur wird diese Nomenklatur uneinheitlich behandelt. So wird in anderen Arbeiten und Übersichten die Klasse I mit „der“ PI 3-Kinase gleichgesetzt.³⁷

Die PI 3-Kinase der Klasse I ist ein Heterodimer aus einer katalytisch aktiven Untereinheit von 110 kDa (p110) und einer 85 kDa (p85) schweren Untereinheit. Sie wird auf Grund der DNA-Sequenz einer Familie von Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen zugeordnet. Die für die Signaltransduktion relevante Funktion der PI 3-Kinasen ist jedoch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositderivaten. Das bei der Phosphorylierung von Phosphatidylinosit-4,5-diphosphat erzeugte PIP₃ spielt eine große Rolle in der Wachstumskontrolle, Chemotaxis und Glykogensynthese der Zelle. In ruhenden Zellen ist PIP₃ nicht nachweisbar. Nach einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren kommt es zu einem raschen Anstieg der PIP₃-Konzentration im Zusammenhang mit einer Anlagerung der PI 3-Kinase an die Membran.

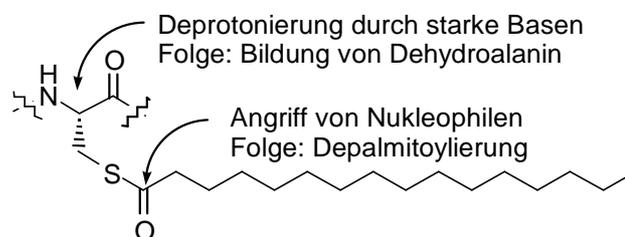
Die Aktivierung der PI 3-Kinase kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, unter anderem durch Ras,³⁸ und resultiert in der Aktivierung mehrerer Signaltransduktionskaskaden, von denen die Regulierung von Akt/PKB die wichtigste zu sein scheint. Die MAP-Kaskade wird von diesem Signalmolekül hingegen nicht beeinflusst (Abbildung 3).

Die seltenere γ -Isoform dieser PI 3-Kinasen unterscheidet sich von den anderen Isoformen dadurch, dass die katalytische p110-Untereinheit nur monomer vorliegt. Außerdem wird keine Aktivierung durch Ras beobachtet. Eine direkte Wechselwirkung mit Ras, deren Bedeutung bisher unklar ist, kann jedoch *in vitro* nachgewiesen werden.

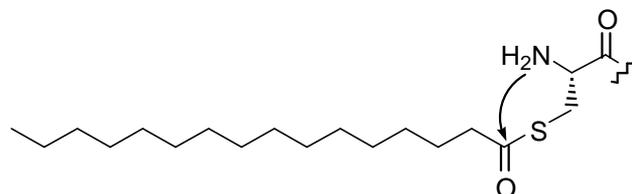
2.3. Chemische Synthese von lipidierten Peptiden

Bei der Herstellung lipidmodifizierter Peptide müssen die jeweiligen Labilitäten dieser Lipidgruppen berücksichtigt werden. Im Falle der Ras-Peptide handelt es sich um Palmitoylthioester und Farnesylthioether. Während in der C16-Fettsäure unter den in der Peptidchemie üblichen Bedingungen keinerlei Nebenreaktionen zu erwarten und deshalb auch keine besonderen Rücksichten zu nehmen sind, bereitet deren Anbindung an das Peptid als Thioester um so größere Probleme. Thioester sind Aktivester, die sehr leicht unter basischen Bedingungen hydrolysiert und von Nucleophilen angegriffen werden können, wodurch die Abspaltung basenlabiler Schutzgruppen wie zum Beispiel der Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) in Gegenwart dieser Lipidmodifikation ausgeschlossen ist (Abbildung 4).

Labilität gegenüber Basen und Nucleophilen



Acylwanderung



Säurelabilität der Prenylreste

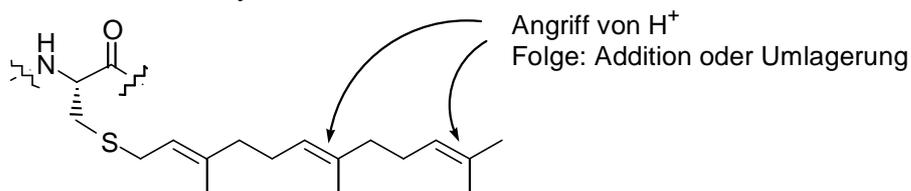


Abbildung 4: Wichtige Nebenreaktionen der Lipidmodifikationen

Befindet sich der Thioester an einem N-terminalen Cystein, ist bei Freisetzung der Amino-Gruppe eine derart rasche *S-N*-Acyloverchiebung zu beobachten,³⁹ dass eine Verlängerung von Peptiden mit einem *S*-acylierten Cystein am N-Terminus zumindest problematisch ist. Infolgedessen sollte die Einführung der Palmitoylgruppe erst auf der Stufe eines Di- oder Oligopeptides erfolgen. Eine solche Acylierung kann unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden. Bestens bewährt hat sich bisher die Palmitoylierung von kleinen Peptiden in Gegenwart von tertiären Aminen als Base, aber auch Umsetzungen unter sauren Bedingungen⁴⁰ und an der festen Phase⁴¹ sind beschrieben.

Der Farnesylthioether ist im Gegensatz zum Thioester in basischen und nukleophilen Medien stabil. Eine mögliche Oxidation zum Sulfoxid ist kein großes Hindernis und lässt sich durch Luftausschluss umgehen. Die Prenylgruppe ist jedoch empfindlich gegenüber mittel bis stark sauren Bedingungen, unter denen es zu Additionsreaktionen oder Umlagerungen kommen kann (Abbildung 4).⁴²

Für die Prenylierung von Peptiden (und Proteinen) sind viele unterschiedliche Verfahren beschrieben. So sind Prenylierungsreaktionen erfolgreich unter basischen (Aminbasen oder KF) und sauren (pH 4, Zinkacetat) Bedingungen sowie enzymkatalysiert durchgeführt worden. Die verschiedenen Methoden haben jeweils Vor- und Nachteile, bei denen es sich insbesondere um die Löslichkeit der Peptide und die unterschiedliche Selektivität handelt. Für eine ausführlichere Diskussion der Prenylierungsvarianten sei auf die aktuelle Literatur verwiesen.^{43,44}

2.4. Synthese von Peptid-Protein-Konjugaten und *neo*-Proteinen

Die Synthese von Protein-Konjugaten aus kürzeren Oligo- oder Polypeptiden hat sich in den letzten Jahren stark weiterentwickelt, wobei dieser Bereich sicherlich von den Fortschritten in der Molekularbiologie (Design und Expression von Proteinen) auf der einen Seite und der chemischen Peptidsynthese, insbesondere der Festphasensynthese auf der anderen Seite profitierte.⁴⁵

Für die Synthese dieser Konjugate sind verschiedene Verknüpfungstechniken in Gebrauch. Neben der Verknüpfung geschützter Polypeptide mit in der Peptidchemie üblichen Kondensationsmethoden sind auch Techniken entwickelt worden, die eine selektive Verknüpfung ungeschützter Komponenten erlauben. Diese Methoden basieren entweder auf einer Additionsreaktion (z. B. einer Michael-Reaktion) oder einer nukleophilen Substitution (in der Regel S_N2). Deshalb weist eines der beiden zu verknüpfenden Polypeptide ein

sehr gutes Nukleophil an seinem Terminus auf, das, um Selektivitätsprobleme auszuschließen, möglichst reaktiver als die Funktionalitäten in den Seitenketten sein sollte. Entsprechend trägt die zweite Kupplungskomponente an ihrem Terminus eine Gruppe, die nukleophil angegriffen werden kann. Nach der Verknüpfung der beiden Kupplungspartner schließt sich bei einigen Methoden noch eine *S-N*-Acylwanderung³⁹ unter Bildung einer Amidbindung an (siehe Tabelle 1).

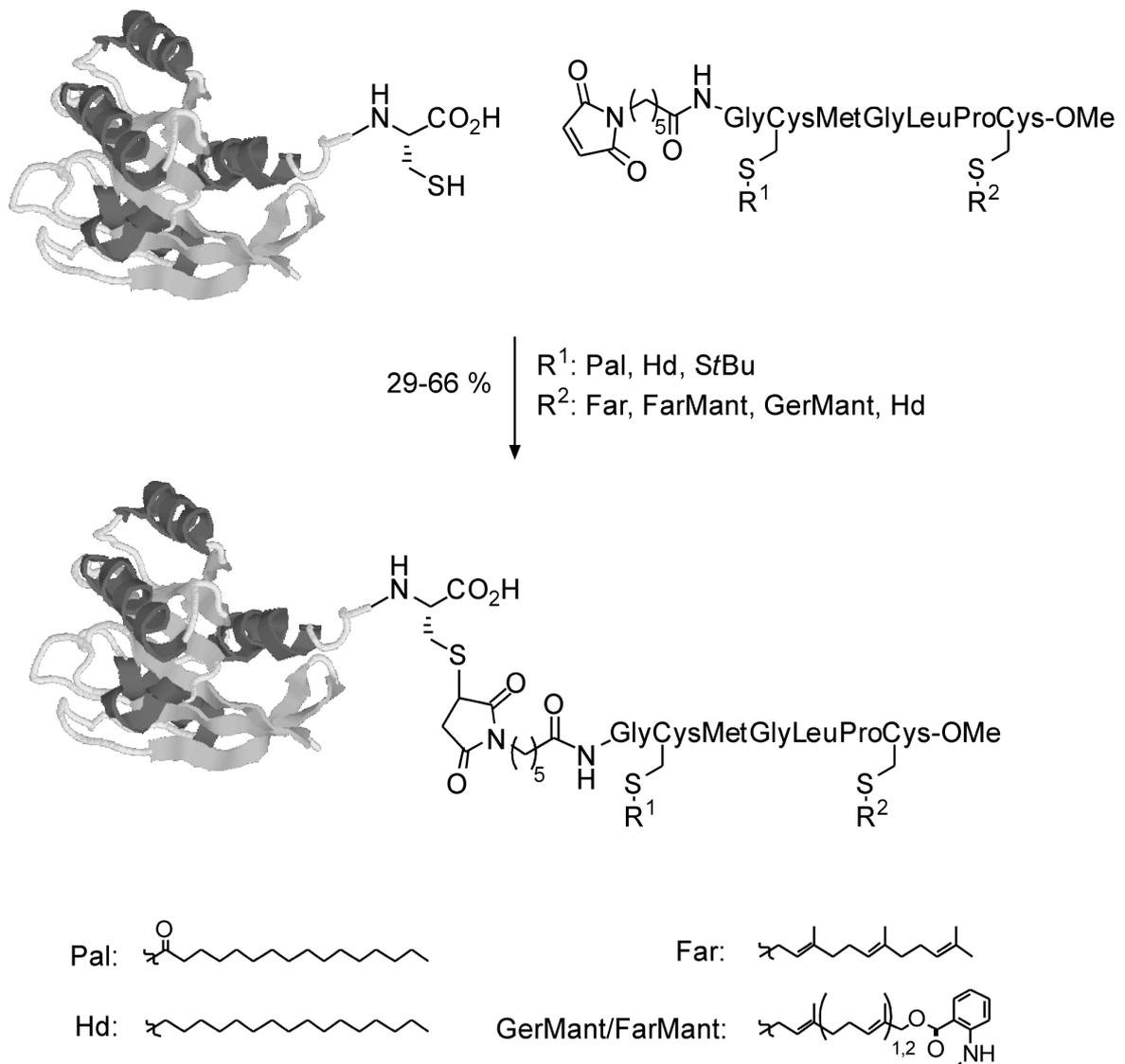
Verknüpfung	Nukleophil	Akzeptor bzw. Elektrophil
Thioester	Thiosäure	Bromacetyl
Amid ^a	Thiosäure	β-Bromalanin
Thioether	Thiol (z.B. im Cystein)	Bromacetyl oder Maleinimid
Thiazolidin	Cystein	Aldehyd
Amid ^a	Cystein	Thioester

Tabelle 1: Auswahl verschiedener Methoden zur Synthese von Polypeptid-Konjugaten.
a: Bildung der Amidbindung erfolgt durch *S-N*-Acylwanderung nach der Kupplungsreaktion

Einige der aufgezählten Methoden zeichnen sich dadurch aus, dass das angreifende Nukleophil die Thiolgruppe eines Cysteins ist, so dass diese Kupplungskomponente nur aus proteinogenen Aminosäuren aufgebaut ist. An dieser Stelle greift die Methodik der Molekularbiologie. Sie kann solche unmodifizierten Peptide und Proteine vergleichsweise leicht durch bakterielle Expression zur Verfügung stellen.

Beim zweiten Kupplungspartner kann die Akzeptorgruppe nur chemisch eingeführt werden. Eine Ausnahme bildet der C-terminale Thioester. Die biotechnologische Erzeugung von Proteinen mit einem Thioester am C-Terminus ist sicherlich eine entscheidende Entwicklung auf dem Gebiet der Peptid-Protein- bzw. Protein-Proteinkupplung in den letzten Jahren. Dieses gelingt durch Stoppen eines Prozesses, der während der Reifung einiger Proteine beobachtet wird: dem Protein-Spleißen.⁴⁶ Beim Spleißen wird ein Abschnitt aus der Aminosäurekette herausgeschnitten und die beiden verbleibenden Enden wieder miteinander verknüpft. Ein wesentlicher Zwischenschritt hierbei ist eine autokatalysierte *N-S*-Acylverschiebung unter Aufbrechen der stabilen Amidbindung und Bildung des entsprechenden Thioesters. Dieser Thioester kann unter geeigneten Voraussetzungen isoliert und für synthetische Zwecke verwendet werden.

In der bisher einzigen beschriebenen Synthese von Protein-Lipopeptid-Konjugaten wurde exprimiertes, C-terminal verkürztes H-Ras Protein eingesetzt, das ein Cystein am C-Terminus trug (Schema 1).⁴⁷ Als zweiter Kupplungspartner wurden chemisch synthetisierte Peptide mit einem Maleinimid am N-Terminus eingesetzt, die unterschiedliche Lipidmodifikationen aufwiesen. Die Verknüpfung erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen durch Angriff des Cysteins im Protein auf eine Maleinimido-Gruppe des Lipopeptides.



Schema 1: Synthese lipidierter Protein-Peptid-Konjugate über einen Maleinimidlinker unter Verwendung eines verkürzten H-Ras-Proteins (H-Ras1-181) und unterschiedlich lipidmodifizierter Peptide mit der Sequenz des N-Ras C-Terminus

2.5. Verwendung lipidmodifizierter Peptide in biophysikalischen und biologischen Studien

Die Lipidmodifikationen haben einen deutlichen Einfluss auf die Eigenschaften modifizierter Proteine bzw. Peptide. Insbesondere steigt die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit hydrophoben Phasen wie Membranen beträchtlich. Eine wichtige Verwendung lipidierter Peptide ist deshalb die Untersuchung der biophysikalischen Relevanz der jeweiligen Lipidmodifikation. Dabei sind mehrere physikochemische Eigenschaften interessant. Hierzu gehört die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten zwischen der Lösung und der Membran sowie die Geschwindigkeitskonstante für das Herauslösen aus der Membran. Als Testsysteme für diese Membranbindungsuntersuchungen kommen Phospholipid-Vesikel⁴⁸ und künstliche Membranen auf Sensor-Chips für Oberflächenplasmonresonanz⁴⁹ (kommerziell als BIAcoreTM-System erhältlich) zum Einsatz.

Zur Aufklärung der Struktur lipidierter Peptide können NMR-Untersuchungen herangezogen werden. Dabei lässt sich bei Verwendung perdeuterierter Lipidgruppen auch die Struktur des Alkylrestes untersuchen.⁵⁰

Die Untersuchung enzymkatalysierter Reaktionen *in vitro* und die Inhibierung beteiligter Proteine ist ein weiteres Einsatzgebiet für lipidierte Peptide. Prominentestes Beispiel hierfür ist sicherlich die Untersuchung der Farnesyltransferase, insbesondere weil sich Inhibitoren, die sowohl das CAAX-Motivanalogon als auch eine Prenylgruppe enthalten, als sehr wirksam erwiesen haben.⁵¹

Durch Mikroinjektion in einzelne Zellen lassen sich modifizierte Peptide auch als Hilfsmittel bei der Aufklärung zellulärer Prozesse einsetzen. So wurden fluoreszenzmarkierte und unterschiedlich lipidierte N-Ras-Peptide zur Untersuchung der Membranlokalisierung von Ras-Proteinen herangezogen.⁵²

3. Ziel der Arbeit

Das Interesse an der Aufklärung der molekularen Prozesse während der Signaltransduktion nimmt stetig zu. Lipopeptide haben sich als wertvolle Hilfsmittel erwiesen, um einige dieser Prozesse verstehen zu können.⁴⁴ Insbesondere unterschiedlich modifizierte Peptide mit der Sequenz des C-Terminus von N-Ras wurden erfolgreich in der Ermittlung biophysikalischer Daten und der Untersuchung über die Lokalisierung dieser Peptide in der Plasmamembran eingesetzt.^{52,53} Durch diese Ergebnisse motiviert, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Zugang zu lipidmodifizierten Peptiden mit der Sequenz des H-Ras C-Terminus ausgearbeitet werden. Das H-Ras Protein spielt im Vergleich zum N-Ras physiologisch eine wichtigere Rolle und wird in Krebsfällen häufiger mutiert vorgefunden. Auch wird ein großer Teil der zellbiologischen Untersuchungen mit dem H-Ras-Protein durchgeführt, so dass ein synthetischer Zugang zu dessen lipidiertem C-Terminus für weitere Studien neue Möglichkeiten eröffnet.

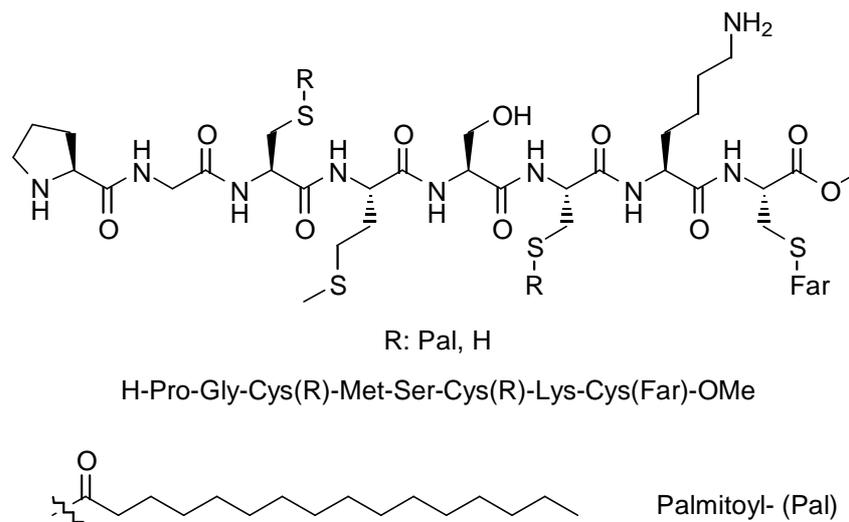
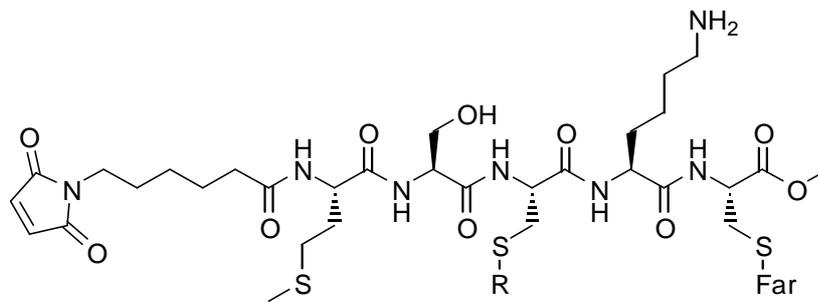


Abbildung 5: Lipidierte H-Ras Oktapeptide

Die Synthese des vollständig modifizierten H-Ras Oktapeptides war unter Verwendung der Allyloxycarbonylschutzgruppe (Aloc) geplant. Für die Herstellung des nur farnesylieren Oktapeptids sollte das *S-tert*-Butyldisulfid als reduktionslabile Thiolschutzgruppe eingesetzt werden.

Die Oktapeptide sollten anschließend in Kooperation mit biologischen und biochemischen Arbeitskreisen in Untersuchungen über die Wechselwirkungen von Ras mit verschiedenen Effektorproteinen eingesetzt werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollten künstliche H-Ras-Lipopeptid-Konjugate synthetisiert werden (vgl. Schema 1 in Abschnitt 2.4). Es war vorgesehen, diese Konjugate durch kovalente Verknüpfung verkürzten H-Ras-Proteins (H-Ras 1-181) mit unterschiedlich lipidierten Peptiden mit der Sequenz des H-Ras C-Terminus zu erzeugen, die ein Maleinimid als Linkergruppe enthielten.⁴⁷



MIC-Met-Ser-Cys(R)-Lys-Cys(Far)-OMe

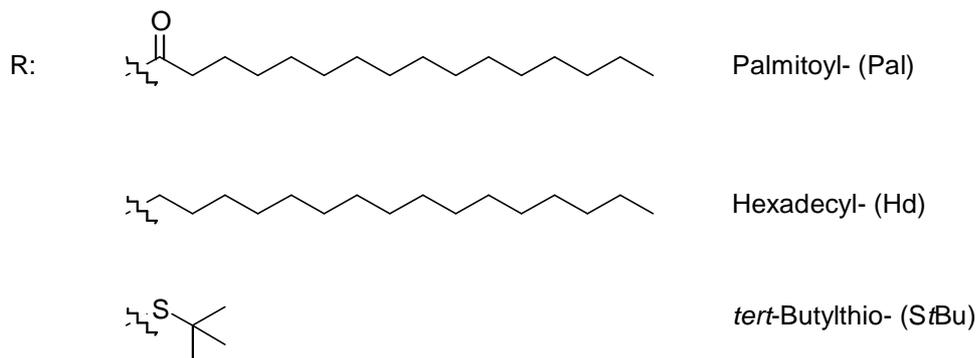


Abbildung 6: Unterschiedlich lipidmodifizierte Zielpeptide

Die bisherigen Untersuchungen mit diesen Konjugaten wiesen darauf hin, dass diese in ihrem physiologischen Verhalten dem vollständig modifizierten H-Ras-Protein entsprechen. Für den eindeutigen Nachweis sollte ein Konjugat aus dem bisher verwendeten H-Ras 1-181 und dem C-terminalen palmitoylierten und farnesylierten H-Ras-Pentapeptid erzeugt werden, um dessen Eigenschaften mit denen des natürlichen H-Ras-Proteins vergleichen zu können. Dieser Vergleich dient in erster Linie dem Nachweis, dass die Protein-Peptid-Konjugate als Werkzeuge in der Untersuchung der physiologischen Rolle der Lipidierung von Ras eingesetzt werden können.

Das Ziel des zweiten Abschnitts war daher die Entwicklung einer Synthese unterschiedlich lipidierten Pentapeptide, die ein Maleinimid als Linker am N-Terminus tragen, sowie deren

kovalente Anknüpfung an das verkürzte Ras-Protein. Neben dem natürlich vorkommenden Lipidmuster sollte der Thioester durch einen unter physiologischen Bedingungen stabilen Thioether und eine nach der Protein-Peptid-Kupplung abspaltbare Schutzgruppe ersetzt werden, die die Synthese eines nur farnesylierten Konjugates ermöglicht.

Durch den Einsatz dieser unterschiedlich lipidmodifizierten Konjugate ließe sich der genaue Einfluss der unterschiedlichen Lipidmodifikationen auf die Membranlokalisierung und auf die biologische Aktivität der Konjugate untersuchen. Interessant ist hierbei auch der Vergleich mit den bereits synthetisierten Konjugaten, welche die C-terminale Sequenz von N-Ras enthalten. Hierdurch können Hinweise auf die Bedeutung der Aminosäuresequenz gefunden werden.

4. Spezieller Teil

4.1 Synthese des charakteristisch lipidmodifizierten H-Ras C-Terminus

4.1.1 Syntheseplan

Die Herstellung palmitoylierter Peptide wird zum Großteil durch die Position des palmitoylierten Cysteins innerhalb der gewünschten Aminosäuresequenz bestimmt, da nukleophile und basische Bedingungen in Gegenwart des Thioesters vermieden werden müssen und eine Freisetzung der Aminogruppe eines *S*-acylierten Cysteins die Gefahr einer Acylwanderung birgt (siehe Abschnitt 2.3). Ein schrittweiser Aufbau mit bereits modifizierten Aminosäuren vom C- zum N-Terminus, wie er wegen der geringeren Racemisierungsgefahr häufig angewendet wird, ist deshalb nicht möglich. Als mögliche Synthesewege stehen deshalb die Verwendung unmodifizierter (und geeignet geschützter) Aminosäurebausteine mit einer späteren Einführung der Seitenkettenmodifikationen oder der blockweise Aufbau aus kleineren, bereits modifizierten Oligopeptiden zur Auswahl.

Das C-terminale H-Ras Oktapeptid enthält neben drei Cysteinen mit Serin und Lysin zwei weitere Aminosäuren mit funktionalisierten Seitenketten. Während des Aufbaus des Oktapeptides muss insbesondere die ϵ -Aminogruppe des Lysins blockiert werden, um Nebenreaktionen an dieser Position zu vermeiden. Eine Blockade der Hydroxygruppe im Serin ist hingegen bei dieser Synthese nicht unbedingt notwendig.

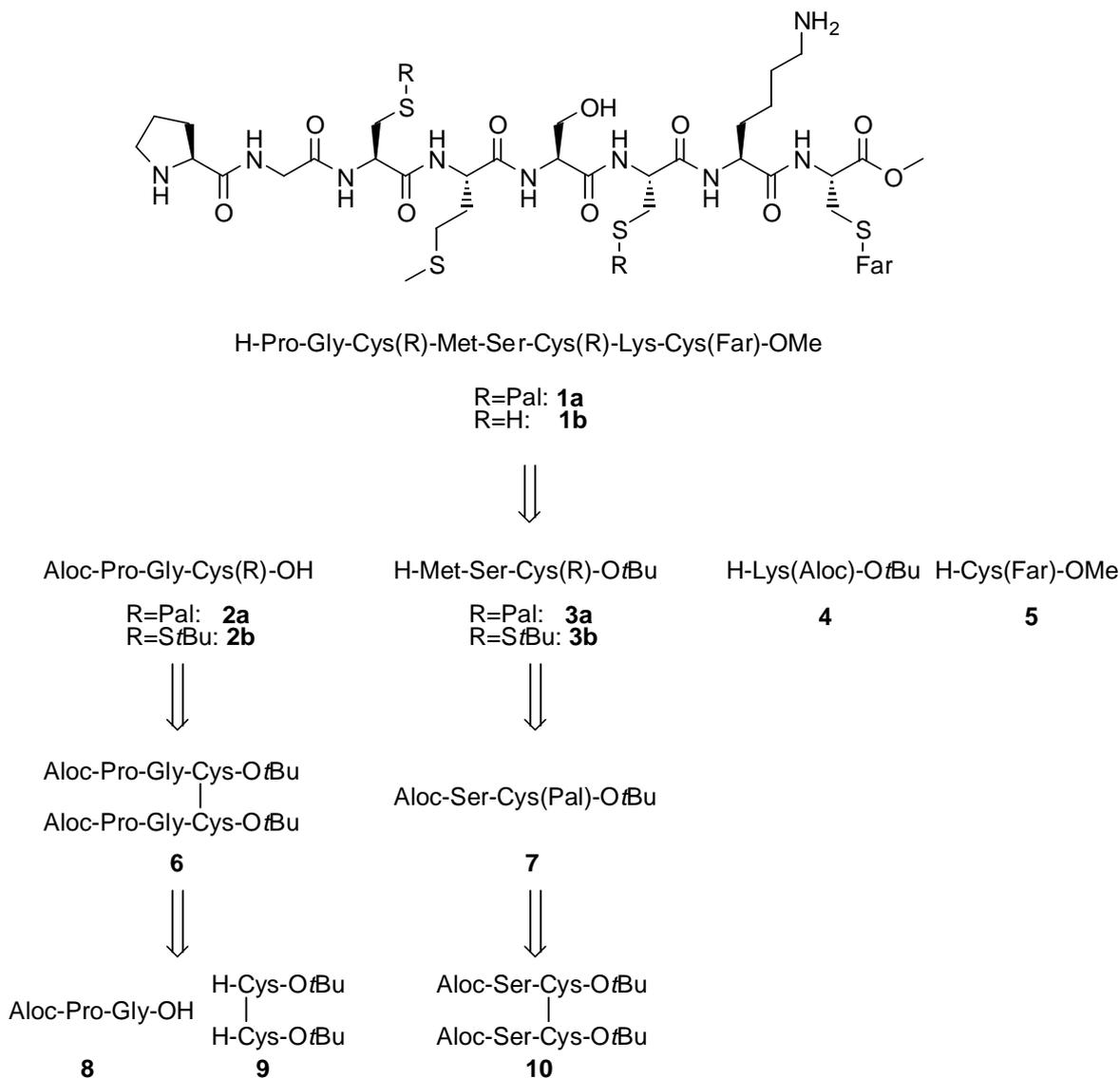
Die Auswahl möglicher Schutzgruppen ist durch die Labilitäten der Lipidmodifikationen stark eingeschränkt. In früheren Synthesen farnesylierter und palmitoylierter Peptide hatten sich auf Schutzgruppen vom Allyltyp (Allylester und Allyloxycarbonylgruppe/Aloc) bewährt,⁴⁴ weshalb die Aloc-Gruppe als Aminoschutzgruppe gewählt wurde. Für die Blockierung der Carboxylgruppen sollte der säurelabile *tert*-Butylester verwendet werden.

Im Falle des nur farnesylierten Oktapeptids **1b** sollten die Thiolgruppen als Disulfide blockiert werden. In den ersten Synthesestufen können symmetrische Disulfide zum Einsatz kommen, die im weiteren Verlauf der Synthese selektiv zu den korrespondierenden *tert*-Butyldisulfiden umgesetzt werden.

Die Synthese der lipidierten Oktapeptide **1a** und **1b** sollte über die bereits modifizierten Tripeptide **2** und **3** erfolgen. Für die anschließende Einführung der zwei C-terminalen Aminosäuren war eine schrittweise Verlängerung mit Lysinderivat **4** und farnesyliertem Cysteinmethylester **5** geplant.

Für die Synthese des doppelt palmitoylierten und farnesylierten Zielpeptids **1a** sind die Tripeptide **2a** und **3a** in wenigen Schritten aus den jeweiligen Aminosäuren zugänglich. Im Falle von **2a** soll die Einführung der Lipidmodifikation auf der Stufe des Tripeptides

erfolgen. Das hierfür nötige Cysteinderivat kann durch Reduktion der Disulfidbrücke im Tripeptid **6** erhalten werden, das seinerseits durch Kondensation von Cystin-bis(*tert*-butylester) **9** mit dem Dipeptid **8** aufgebaut werden kann.

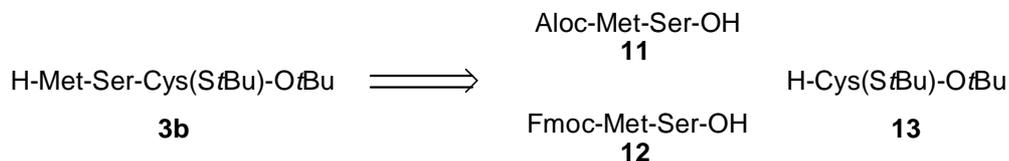


Schema 2: Synthesepfad für die Oktapeptide **1a** und **1b**

Entsprechend kann das mittlere Tripeptid **3a** durch Reduktion des aus den jeweiligen geschützten Aminosäuren zugänglichen Cystinderivates **10**, kontrollierte Acylierung und N-terminale Verlängerung mit Aloc-geschütztem Methionin erhalten werden.

In analoger Weise soll das nur farnesylierte Oktapeptid **1b** aufgebaut werden. Die Einführung der *tert*-Butyldisulfide als Thiolschutzgruppen kann in verschiedenen Stadien der Synthese erfolgen. Im Falle des N-terminalen Tripeptids **2b** werden diese erst relativ

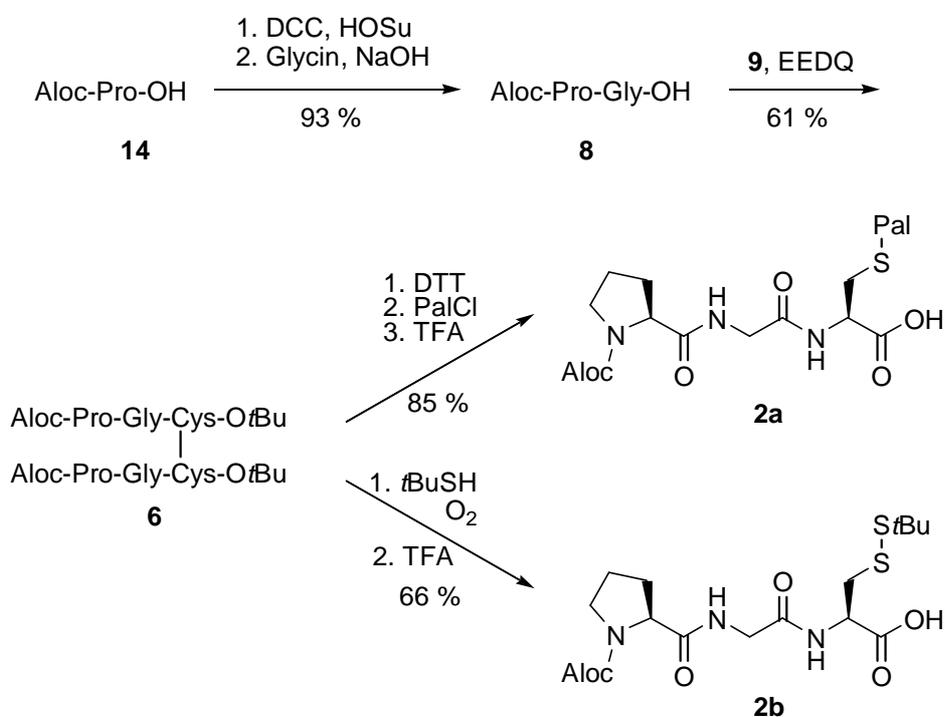
spät durch Umsetzung des Tripeptids **6** erhalten, während bei dem mittleren Tripeptid **3b** eine von der für das palmitoylierte Analogon abweichende Strategie eingesetzt wird. Hier wird von Beginn an ein als tert-Butyldisulfid geschützter Baustein eingesetzt (Schema 3).



Schema 3: Synthesestrategie für das Disulfid **3b**

4.1.2 Aufbau der N-terminalen Tripeptide

Die Synthese der Tripeptide **2a,b** begann mit der Herstellung des C-terminal freien Dipeptides **8** nach der Hydroxysuccinimidmethode.⁵⁴ Die Kondensation von **8** mit (H-Cys-OtBu)₂⁵⁵ **9** in Gegenwart von 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ)⁵⁶ lieferte das Cystinderivat **6** in zufriedenstellender Ausbeute, das als Edukt für die Einführung der gewünschten Seitenkettenmodifikation im Cystein diente.



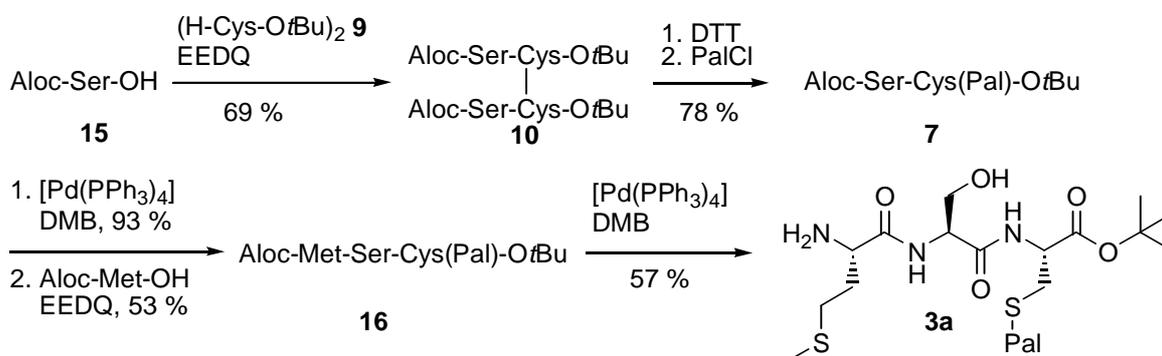
Schema 4: Synthese der C-terminalen Tripeptide **2a** und **2b**

Eine reduktive Spaltung des Disulfides **6** mit Dithiothreitol⁵⁷ (DTT) gefolgt von einer Acylierung mit Palmitoylchlorid lieferte das lipidierte Tripeptid, während eine Umsetzung von **6** mit *tert*-Butanthiol in Gegenwart von Aminbase und Luft zur Bildung des gemischten Disulfids führte. Abschließend führte eine Behandlung mit Trifluoressigsäure (TFA) zur säurekatalysierten Abspaltung des *tert*-Butylesters unter Ausbildung der Synthesebausteine **2a** und **2b**.

4.1.3 Aufbau der mittleren Tripeptide

Die unterschiedlichen Zugänge zu den Tripeptiden **3a** und **3b** veranschaulichen deutlich die durch die Gegenwart des Thioesters limitierten Möglichkeiten zur Synthese palmitoylierter Peptide. Eine Freisetzung der α -Aminogruppe im Cystein nach der *S*-Acylierung ist wegen der schnellen Acylwanderung nicht möglich (vgl. Abbildung 4 im Abschnitt 2.3). Deshalb muss die Palmitoylierung in Gegenwart des Serins erfolgen, was wiederum die Gefahr einer *O*-Acylierung mit sich bringt oder die Verwendung einer weiteren Schutzgruppe erfordert.

Die Kondensation von Aloc-geschütztem Serin **15** mit (H-Cys-*O*tBu)₂ **9** liefert Dipeptid **10**, das nach Reduktion durch DTT mit Palmitoylchlorid acyliert wird. Unter den bei der Synthese von **2a** eingesetzten Bedingungen (Eiskühlung, sofortige Zugabe des Säurechlorides) wurden neben dem gewünschten Produkt auch deutliche Mengen *O,S*-bisacylierten Dipeptides isoliert. Durch langsamere Zugabe des Acylchlorides und Kühlung mit Eis/Kochsalz-Mischung konnte aber die *O*-Acylierung gänzlich zurückgedrängt und selektiv das *S*-acylierte Dipeptid **7** erhalten werden.



Schema 5: Synthese des palmtioylierten Tripeptids **3a**

Ein sich anschließender Palladium(0)-katalysierter Allyltransfer auf Dimethylbarbitursäure⁵⁸ (DMB) als Allyllakzeptor gefolgt von einer Kondensation mit Aloc-Met-OH führte

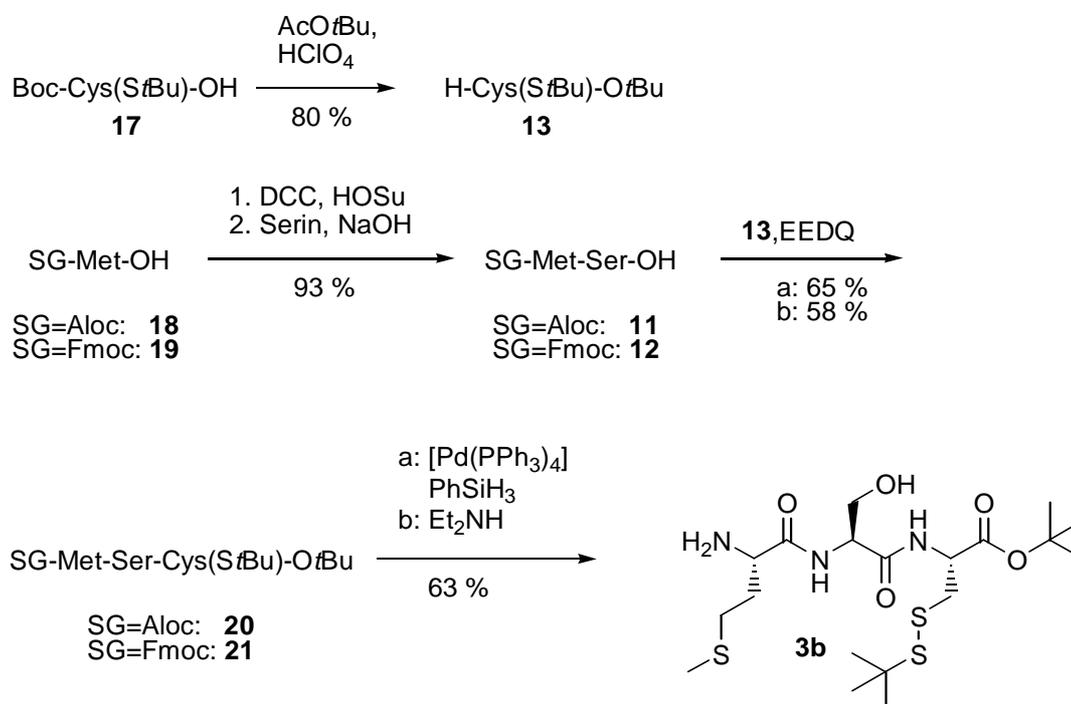
zu der Bildung des vollständig geschützten palmitoylierten Tripeptids, das durch erneute Behandlung mit Pd⁰ und DMB N-terminal deblockiert wurde. Die Dimethylbarbitursäure und deren Reaktionsprodukte lassen sich nach der Reaktion durch Extraktion mit wässrigem Phosphat-Puffer bei pH 6.5 (DMB und monoallylierte DMB) und anschließende Chromatographie (bisallyliertes Produkt) an Kieselgel leicht abtrennen.

Als problematisch erwies sich bei dieser Synthesesequenz vor allem die Durchführung der beiden letzten Stufen. Die Peptidkupplung mit dem Serinderivat als N-terminale Komponente verlief oft unzuverlässig und in schlechten Ausbeuten. Der Einsatz eines *O*-tritylierten Analogons von **7** ergab auf dieser Stufe zwar bessere Ergebnisse, führte jedoch zu schlechteren Ausbeuten bei der *S*-Palmitoylierung – vermutlich wegen zu großer sterischer Hinderung - und späteren sauren Abspaltung der Schutzgruppen, so dass diese Alternative verworfen wurde. Die Aufreinigung von **3a** wurde dadurch erschwert, dass das N-terminal deblockierte Tripeptid nicht chromatographisch an Kieselgel gereinigt werden konnte, da es an diesem Material haften blieb. Im Gegensatz dazu verlief eine Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 problemlos. Die besten Ergebnisse konnten jedoch erzielt werden, wenn bei dieser Stufe nach der wässrigen Extraktion der DMB-Derivate auf eine weitere Aufreinigung verzichtet und das so erhaltene Rohprodukt direkt weiter eingesetzt wurde.

Bei der Synthese des *S-tert*-butylierten Tripeptids **3b** wurde aus diesem Grund eine Strategie verfolgt, die eine Umgehung einer Peptidkupplung mit dem Serinderivat als N-terminale Komponente erlaubte. Dieses war durch eine *N*-Hydroxysuccinimid(HOSu)-vermittelte Kondensation⁵⁴ von N-terminal geschütztem Methionin mit Serin möglich, die auch bei der Synthese der C-terminalen Tripeptide **2a** und **2b** zum Einsatz kam. Eine Kupplung mit dem bereits vollständig modifizierten Cysteinderivat **13**, das durch eine Umesterung und gleichzeitige Boc-Abspaltung ausgehend vom kommerziell erhältlichen Derivat **17** hergestellt wurde, führte zu der Bildung der vollständig geschützten Tripeptide **20** und **21**.

Die Synthese von **3b** wurde durch Entfernung der N-terminalen Schutzgruppe aus **20** und **21** abgeschlossen. Im Falle der Aloc-Strategie wurde Phenylsilan⁵⁹ als Allylakzeptor eingesetzt, da andere getestete Nukleophile nicht zu einem vollständigen Umsatz führten. Die Fmoc-Gruppe in **21** wurde durch Behandlung mit Diethylamin erfolgreich entfernt. Aufgrund seines wesentlich niedrigeren Siedepunkts ermöglicht die Verwendung dieses Amins im Vergleich zu dem standardmäßig eingesetzten Piperidin eine zügigere Abtrennung dieses Reagenzes. Der Vorteil der Fmoc-Strategie liegt darin, dass – falls

gewünscht - das rohe Tripeptid **3b** ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden kann, was in einigen Fällen zu deutlich höheren Gesamtausbeuten führt.



Schema 6: Synthese des als *S*-*tert*-Butyldisulfid geschützten Tripeptids **3b** nach der Aloc- und der Fmoc-Strategie

4.1.4 Abschluss der Synthese

Die Blockkondensation des Bausteins **2a** mit dem Tripeptid **3a** sowie von **2b** mit **3b** gelang unter Verwendung von EEDQ als Kupplungsreagenz in hohen Ausbeuten. Die Einführung der zwei noch fehlenden Aminosäuren erfolgte durch schrittweise C-terminale Verlängerung. Dazu wurde der C-terminale *tert*-Butylester in **22a,b** durch saure Hydrolyse gepalten und das Hexapeptid mit dem Baustein H-Lys(Aloc)-OtBu kondensiert. Eine weitere saure Freisetzung der C-terminalen Carboxylgruppen ermöglichte die Herstellung der Oktapeptide **23a** und **23b** durch Kupplung mit dem literaturbekannten Baustein H-Cys(Far)-OMe⁶⁰ **5**.

4.2 Verwendung lipidierter Peptide in Untersuchungen zur Aktivierung von Raf durch Ras

4.2.1 Hintergrund

Raf ist ein ursprünglich cytosolisches Protein, das durch eine Protein-Protein-Interaktion mit Ras an der Plasmamembran gebunden wird, um dort aktiviert zu werden. Diese Membranlokalisierung ist essentiell für die Signalweiterleitung über Raf. Bei der Suche nach geeigneten, selektiven Möglichkeiten, onkogenes Ras zu neutralisieren tritt die Inhibierung solcher Protein-Protein-Wechselwirkungen zunehmend ins Blickfeld des Interesses. Dieser Ansatz stützt sich auf die Vorstellung, die bindenden Domänen mit spezifischen Liganden abzusättigen und damit zu blockieren. Die hohe Selektivität bei der gegenseitigen Proteinerkennung sollte ein nebenwirkungsarmes Eingreifen ermöglichen.

Aufbauend auf den Arbeiten eines früheren Projekts⁶¹ sollte der Einfluss lipidierter Peptide auf die Aktivierung von Raf durch Ras untersucht werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde Raf in vitro durch Behandlung mit einer Ras-haltigen Membranfraktion aktiviert.⁶² Diese Raf-Aktivierung ließ sich durch die Zugabe lipidierter Peptide mit der Sequenz des N-Ras C-Terminus beeinflussen. Ein interessanter Aspekt der hierbei erhaltenen Ergebnisse war, dass das farnesylierte Peptid eine Verringerung und das doppelt lipidierete Peptid eine Verstärkung der Raf-Aktivität bewirkte.

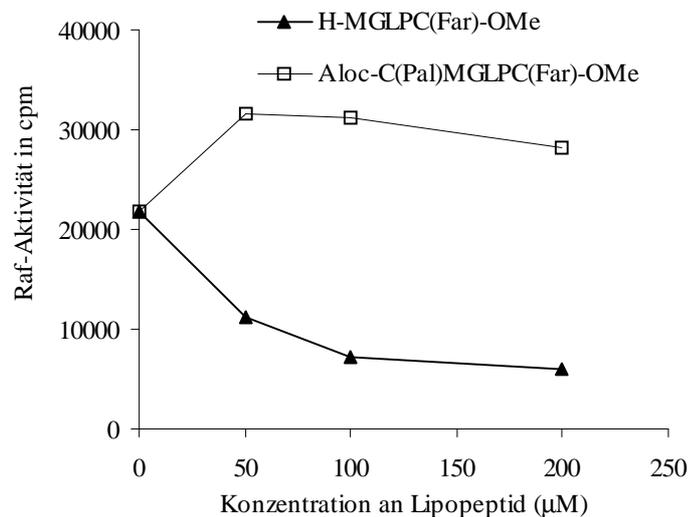


Abbildung 7: Auswirkung der Zugabe lipidierter Peptide mit der Sequenz des N-Ras C-Terminus⁶¹

Dieses Testsystem sollte im Rahmen eines zweimonatigen Aufenthalts in den Labors von Prof. D. Stokoe und Prof. F. McCormick an der University of California in San Francisco (UCSF) zunächst neu aufgebaut und die oben dargestellten Ergebnisse bestätigt werden. Durch den Einsatz weiterer lipidierter Peptide sollte anschließend geprüft werden, unter welchen Bedingungen eine Verstärkung und wann eine Verringerung der Raf-Aktivität erreicht werden kann.

Ähnliche Versuche zur Inhibierung der Ras-Effektor-Bindung wurden nahezu zeitgleich in einer anderen Gruppe mit Peptiden durchgeführt, die Bereichen der Effektorregion von Ras entstammen.⁶³ Allerdings wurden im Gegensatz zu den hier vorgestellten Experimenten wegen der bedeutend einfacheren Handhabung und leichteren Proteinherstellung nur die Bindung zwischen unmodifiziertem Ras und der *Ras Binding Domain* (RBD) von Raf untersucht.

4.2.2 Das Testsystem

Das Kernstück der Untersuchungen war die *in vitro*-Aktivierung von Raf durch Ras, die wegen der schwierigen Handhabung von Raf – nicht ohne Grund wird oft mit verkürztem Raf-Protein gearbeitet – nicht leicht zu erreichen ist. Daran schließt sich die Quantifizierung der Raf-Aktivität an, für die zwei verschiedene Assays untersucht wurden. Die für die Aktivierungsversuche benötigten Proteine wurden jeweils frisch hergestellt, da eine Aufbewahrung von noch nicht aktiviertem Raf bisher nicht gelang. Zur Herstellung wurden onkogenes Ras (H-RasG12V) und Raf in COS1-Zellen überexprimiert, indem die entsprechenden Plasmide in die Zellen durch Transfektion mit Lipofectamin oder durch Elektroporation eingeschleust wurden. Nachdem die Zellen vom Nährgefäß abgelöst (Lyse) und homogenisiert waren, wurde durch Zentrifugation in ungelöste Membranbestandteile und cytosolische Fraktion getrennt.

Raf-Aktivierung

Die *in vitro* Aktivierung von Raf sollte durch das Einwirken von GTP-beladenem Ras auf die Cytosol-Fraktion von Raf-Lysaten und für 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgen. Das hierfür benötigte Ras-Protein wurde in der Regel als Membranfraktion von Ras-überexprimierenden Zellen jeweils frisch hergestellt, aber zu Vergleichszwecken auch in Form von gereinigtem prenylierten K-Ras eingesetzt. Nach der Inkubation wurde erneut in Membran- und Cytosolfraktion getrennt und diesen beiden Fraktionen getrennt weiter behandelt. In allen Proben wurde Raf durch Immunopräzipitation (IP) isoliert und auf seine

Aktivität geprüft. Für die IP war Raf mit einem Glu-Glu-Signal⁶² versehen und ein entsprechender Antikörper an einem polymeren Träger immobilisiert.

Direkter Kinase-Assay

Im direkten Kinase-Assay wurde durch IP ausgefällte Raf mit in der γ -Phosphatgruppe radioaktiv markiertem ATP ($\gamma^{32}\text{P-ATP}$) und einer Kinase-inaktiven MEK-Mutante als Substrat versetzt. Nach einer definierten Zeit wurde die Reaktion durch Denaturierung der Proteine (Zugabe von Natriumdodecylsulfat und DTT) gestoppt. Die Auswertung erfolgte durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Phosphorylierung der MEK-Mutante wurde über einen Phosphor-Image-Screen quantifiziert. Dieser Assay kam vor allem bei der Ausarbeitung der Versuchsbedingungen zum Einsatz, weil er nicht nur Informationen über die Aktivierung von Raf liefern kann, sondern das Anfärben des Gels auch Aufschluss über die Menge des exprimierten Rafs gibt.

Gekoppelter Kinase-Assay

Der Assay bestand aus zwei Teilen. Zunächst wurden die in der Kinasekaskade auf Raf folgenden Proteine MEK und Erk mit dem aktivierten Raf umgesetzt und je zwei Proben entnommen. Diese Proben wurden dann mit $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ und einem Zielprotein (*Myelin Basic Protein*, MBP) versetzt. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der Mischung auf spezielles Papier (Whatman-Papier), Waschen und schließlich Zählen der radioaktiven Zerfälle mit einem Szintillationszähler. Dieser Assay war vorwiegend in den späteren Versuchen verwendet worden, weil er im Vergleich zum direkten Kinase-Assay schneller Ergebnisse lieferte und weil die hierfür benötigten Proteine leichter zugänglich waren.

4.2.3 Reetablierung des Assay-Systems

Bevor mit den geplanten Untersuchungen begonnen werden konnte, musste das in Literatur 62 beschriebene Assay-System neu aufgebaut werden, da wegen des Ortswechsels von Stokoe und McCormick an die UCSF die ursprüngliche Ausrüstung nicht mehr vorhanden war und sich auch die Forschungsinteressen leicht verschoben hatten. Die Optimierung der beiden Quantifizierungsmethoden (direkter und indirekter Kinase-Assay) erfolgte durch Expression einer Raf-Mutante mit dem K-Ras C-Terminus (RafCAAX),⁶⁴ die durch diese Änderung dauerhaft aktiviert ist, und Koexpression von Ras und Raf (also in vivo-Aktivierung von Raf durch Ras). Eine in vitro-Aktivierung von Raf durch Ras konnte trotz umfangreicher Variation der Versuchsbedingungen nicht erreicht werden.

Exemplarisch für die beim gekoppelten Kinase-Assay erhaltenen Ergebnisse ist ein Beispiel in Abbildung 8 gezeigt: Eintrag 11 demonstriert die hohe Aktivität des in vivo aktivierten Raf. Zum Vergleich: in vitro aktiviertes Raf hatte in den früheren Versuchen von Stokoe Messwerte ergeben, die etwa halb so hoch waren wie die dieser Positivkontrolle.⁶⁵

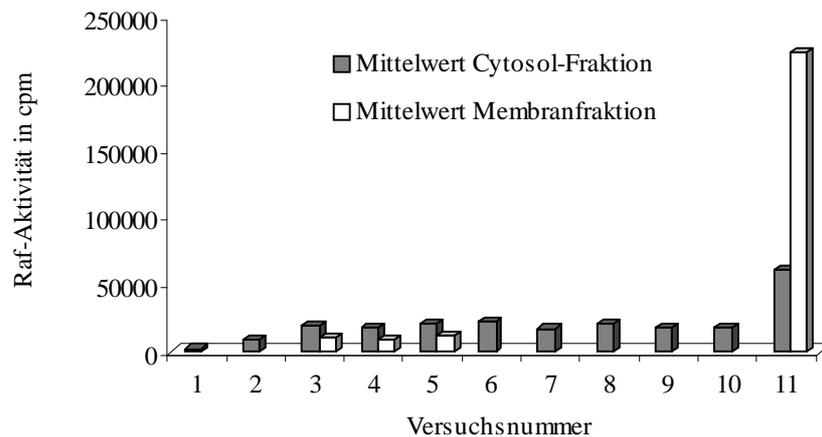


Abbildung 8: Typisches Ergebnis der Raf-Aktivierung. In diesem Fall wurde die in vitro-Aktivierung durch Verwendung von frisch hergestellten Ras-Lysaten (Eintrag 3-5) und der Einsatz gereinigten K-Ras-Proteins (Eintrag 7-10) getestet: (1) Blindprobe, (2) Assay ohne Raf, (3) H-Ras-Membranen und Raf-Cytosol, (4) H-Ras-Membranen und Raf-Cytosol mit DMSO, (5) H-Ras-Membranen und Raf-Cytosol mit H-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe, (6) Raf-Cytosol, (7) Raf-Cytosol und K-Ras, (8) Raf-Cytosol, K-Ras und DMSO, (9) Raf-Cytosol, K-Ras und H-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe, (10) Raf-Cytosol, K-Ras und H-Cys(Far)-OMe, (11) Ras/Raf-Koexpression

In der abgebildeten Messreihe wurde verglichen, ob die Quelle des Ras-Proteins einen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Die ersten beiden Einträge sind die üblichen Blindproben (eine proteinfreie Probe für das Hintergrundrauschen und eine Probe ohne Raf, die die Autophosphorylierung von MEK, die für ein weiteres konstantes Hintergrundsignal verantwortlich ist, demonstriert), Eintrag 11 ist eine positive Kontrolle (in vivo-Aktivierung), die neben dem Funktionieren des Testsystems auch die Aktivität des ³²P, das eine Halbwertszeit von etwa zwei Wochen hat, demonstriert. Ein Vergleich der Einträge 6 und 7 mit der positiven Kontrolle 11 zeigt, dass weder bei Verwendung von H-Ras-Membranfraktionen noch beim Einsatz von isoliertem, aktiven K-Ras eine Aktivierung des Raf-Cytosols erreicht wurde. Stattdessen wurde bestenfalls ein erhöhter

Rauschpegel gefunden. Die hohe Aktivität der positiven Kontrolle zeigte jedoch, dass die Isolierung von aktiven Raf ohne dessen Zerstörung abläuft.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse war anzunehmen, dass die Versuchsdurchführung bis zum ersten Zentrifugieren bei 100000 g und ab der IP von Raf einschließlich der beiden Assay-Varianten einwandfrei funktionierte, da bei diesen Arbeitsschritten alle Proben (also auch das in vivo aktivierte Raf) gleich behandelt wurden. So musste das Problem bei den Vorgängen, die nur für die in vitro-Aktivierung nötig waren, zu suchen sein; es konnte jedoch trotz dieser Eingrenzung nicht behoben werden. Die Tatsache, dass dieses Testsystem trotz seiner Bedeutung in der Untersuchung der Aktivierung von Raf bisher außer von Stokoe und McCormick nur in einer zweiten Gruppe erfolgreich eingesetzt worden ist, mag als Hinweis darauf gelten, dass die Durchführung der Raf-Aktivierung in vitro äußerst kompliziert ist und die dabei wichtigen Faktoren noch nicht vollständig erkannt sind.^{32,33}

Als Alternative zu den hier beschriebenen an der UCSF durchgeführten Versuchen bietet sich eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Y. Kaziro an, die einen sehr ähnlichen Assay zur Untersuchung der Raf-Aktivierung aufgebaut hat und diesen – im Gegensatz zu Stokoe und McCormick⁶² – zur Zeit offensichtlich noch verwendet.³³

4.3 Einsatz farnesylierter Peptide in der Untersuchung der Wechselwirkung von Ras mit der PI 3-Kinase γ

4.3.1 Hintergrund

Die PI 3-Kinase ist ein an mehreren Signaltransduktionswegen beteiligtes Protein, das durch Aktivierung die Fähigkeit gewinnt, Phosphatidylinositderivate (PI) in der 3-Position des Inosittrings zu phosphorylieren. Die γ -Isoform dieser Kinase unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht von anderen Isoformen dieses Proteins. Zum einen koordiniert die katalytisch aktive p110-Untereinheit nicht mit einer p85-Untereinheit, die für die Wechselwirkung mit vielen Signalmolekülen verantwortlich ist. Zum anderen wird p110 γ nicht infolge einer Aktivierung von Ras aktiviert, liegt also in der Signaltransduktionskette nicht abwärts von Ras.

Bei der Immunopräzipitation (IP) von p110 γ wird auch Ras mit ausgefällt.⁶⁶ Die Menge des ausgefallenen Ras-Proteins hängt dabei von einer Aktivierung durch GTP (GTP>GDP) und der posttranslationalen Modifikation (modifiziert>unmodifiziert) ab. Diese sogenannten *Pull Down*-Versuche spiegeln jedoch kein Gleichgewicht der Wechsel-

wirkung Ras-p110 γ wider, das für eine Untersuchung der physiologischen Bedeutung dieser Interaktion eine wichtige Größe ist. Vielmehr wird durch die IP das Komplexgleichgewicht drastisch gestört, wodurch die beobachteten Effekte zum Teil auch auf die unterschiedlich schnelle Gleichgewichtseinstellung zurückzuführen sein könnten und deshalb schwer zu interpretieren sind. So kann die Lipophilie des modifizierten Ras-Proteins, die infolge der Lipidierung im Vergleich zum unmodifizierten Protein deutlich erhöht ist, die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung beeinflussen.

Um eine detailliertere Interpretation zu ermöglichen, wurde ein Assay entwickelt, bei dem das Komplexgleichgewicht nicht gestört wird.⁶⁶ Die Auswertung der hierdurch erhaltenen Ergebnisse weist auf eine von der posttranslationalen Modifikation abhängigen Wechselwirkung von Ras mit p110 γ hin, ohne dass geklärt werden konnte, ob die posttranslationale Modifikation von Ras – insbesondere die Farnesylgruppe, da die gleichen Effekte bei H- und K-Ras gefunden wurden – an einer Interaktion mit der PI 3-Kinase γ beteiligt ist. Alternativ könnten die beobachteten Effekte auch auf eine Konformationsänderung der Ras-Proteine im Laufe oder als Folge der posttranslationalen Modifizierung zurückzuführen sein.

Im Rahmen eines Aufenthaltes in dem Labor von Prof. Dr. R. Wetzker an der Universität Jena sollte geklärt werden, ob farnesylierte Peptide geeignete Werkzeuge zur weiteren Aufklärung der an der Ras-p110 γ -Interaktion beteiligten Prozesse sind. Die im folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden mit dem farnesylierten Oktapeptid **1b** als Testsubstrat durchgeführt.

4.3.2 Der Assay

Die Grundlage für den durchgeführten Assay ist die Beobachtung, das GTP-beladene Ras die p110 γ gut bindet. Diese Bindung findet zumindest auch über die Effektor-domäne von Ras statt, über die Ras mit anderen Proteinen in Wechselwirkung tritt. Durch die Komplexierung ist diese nicht mehr für andere Effektorproteine, wie auch dem *GTPase Activating Protein* GAP, zugänglich bis der Ras-p110 γ -Komplex zerfällt.

Wird das Ras mit am dritten Phosphat radioaktiv markiertem GTP (γ ³²P-GTP) beladen, sollte im Rahmen der GTP-Hydrolyse die radioaktive Phosphatgruppe freigesetzt werden. Nach einer Komplexierung des mit diesem radioaktiven GTP-beladenen Ras mit einem Überschuss p110 γ (15 Minuten auf Eis) wurde ein großer Überschuss GAP zugegeben. Auf diese Weise sollte das gesamte unkomplexierte Ras(GTP) sofort zu Ras(GDP) hydrolysiert werden. In kurzen Abständen wurden Proben entnommen, die den zeitlichen

Verlauf der Reaktion wiedergeben. Diese Proben werden in eine phosphorsaure Aufschlammung von Aktivkohle gegeben, so dass GDP und nicht hydrolysiertes $\gamma^{32}\text{P-GTP}$ zusammen mit allen Proteinen von der Aktivkohle gebunden wird. Nach Zentrifugieren wird eine definierte Menge des Überstandes entnommen und dessen Radioaktivität per Szintillationszähler ermittelt. So erhält man eine zeitlich aufgelöste Dissoziationskurve des Ras($\gamma^{32}\text{P-GTP}$)-p110 γ -Komplexes. Als Vergleichswert wird die identische Messung ohne p110 γ durchgeführt.

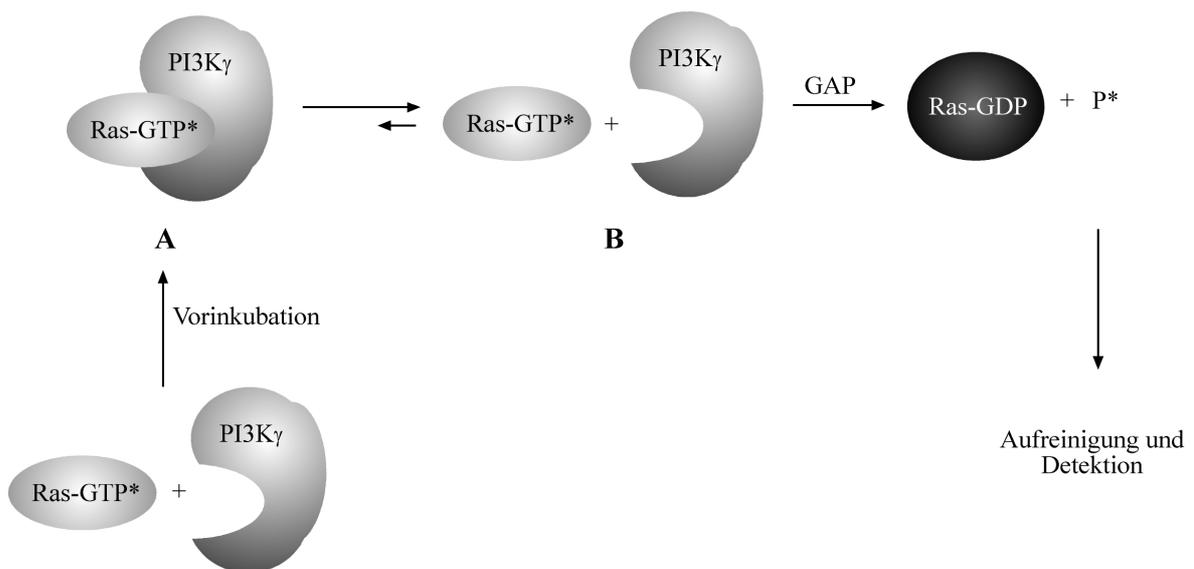


Abbildung 9: Ablauf des Assays zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der PI 3-Kinase γ und Ras. Nach einer Vorkomplexierung von Ras, das mit radioaktiven GTP beakden ist, mit der PI 3-Kinase wird ein Überschuss GAP zu der Lösung gegeben, der eine sofortige Hydrolyse von Ras(GTP) zu Ras(GDP) bewirkt, wobei die radioaktive Phosphatgruppe freigesetzt wird. Nach der Abtrennung der Proteine kann die Menge des freigesetzten markierten Phosphats quantifiziert werden.

Bei dieser Versuchsanordnung sollten die gemessenen Daten zwischen zwei Grenzfällen liegen. Gibt es eine schwache Bindung zwischen Ras und der PI3K γ , so sollte eine zügige Dissoziation des gebildeten Ras-PI3K γ -Komplexes (**A**→**B**) erfolgen. Durch den Überschuss an zugesetzten GAP wird aus diesem Gleichgewicht das freigesetzte Ras(GTP*) durch Hydrolyse zu Ras(GDP) entzogen. Unter diesen Versuchsbedingungen sollte deshalb im Falle einer schwachen Komplexbindung die gemessene Kurve sich den Vergleichswerten, die bei einem Kontrollexperiment ohne PI3K γ ermittelt werden, schnell angleichen. Im anderen Extremfall, einer starken Bindung im Ras(GTP)-PI3K γ -Komplex,

ist eine langsame Annäherung an den im Vergleichsexperiment ohne die PI 3-Kinase ermittelten Plateauwert zu erwarten, da das Ras(GTP*) sehr langsam freigesetzt werden sollte.

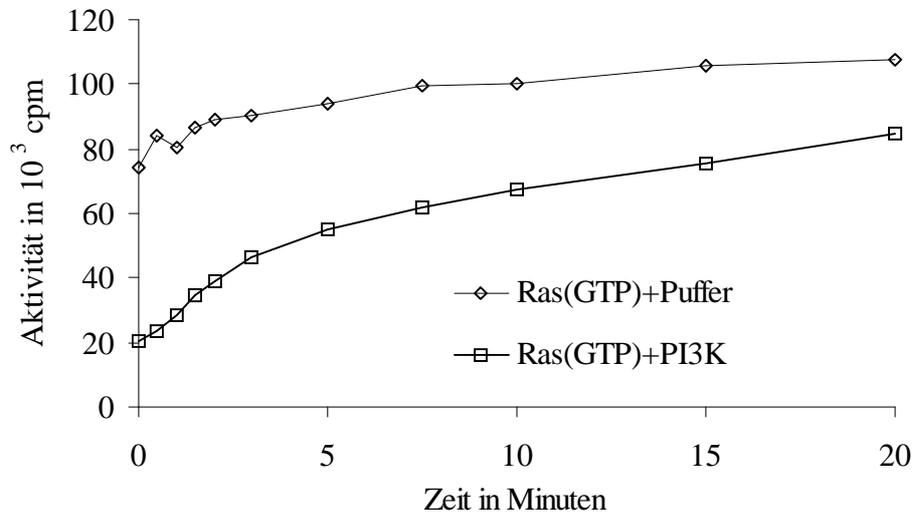


Abbildung 10: Auftragung der ermittelten Radioaktivität der Proben gegen die Zeit.

Das bei den Messungen erhaltene Ergebnis weist jedoch in einer Hinsicht von den Erwartungen ab: im Falle der posttranslational modifizierten Ras-Proteine wird innerhalb der Messzeit keine vollständige Annäherung an das Vergleichsplateau erreicht (Abbildung 10). Stattdessen liegen die erhaltenen Werte deutlich niedriger, wobei die Differenz je nach eingesetzter Ras-Isoform unterschiedlich groß ist. Dieses Ergebnis wurde durch eine sehr stabile Komplexierung und daraus resultierende unvollständige Dekomplexierung erklärt.⁶⁶ Um den Einfluss der Ras-Peptide auf diese Komplexierung zu untersuchen, wurde p110 γ zunächst mit einem großen Überschuss Peptid versetzt (100 μ M finale Konzentration – bei der Vorinkubation beträgt die Peptidkonzentration etwa 200 μ M – für 60 Minuten bei 30 °C in Abwesenheit von Detergens). Unter diesen Bedingungen ist die Lösung deutlich getrübt; es setzt sich jedoch kein Niederschlag ab, so dass die Trübung vermutlich durch die Bildung kleiner Peptidaggregate oder Micellen verursacht wird. Anschließend wird der Assay wie beschrieben durchgeführt.

4.3.3 Ergebnis und Interpretation

Für den Fall, dass das Peptid einen Einfluss auf die Bindung von Ras an p110 γ hat, ist zu erwarten, dass die Peptidkurve zwischen den beiden anderen liegt. Ansonsten sollte sich diese Kurve nicht von der des Ras(GTP)-p110 γ -Komplexes unterscheiden.

Von drei Messreihen zeigten zwei keine Effekte der Zugabe des Peptids **1b**, während in einem Fall ein geringer Einfluss gefunden wurde, der aber auch in der Messungenauigkeit liegen kann, so dass diese Daten in der Interpretation vernachlässigt wurden.

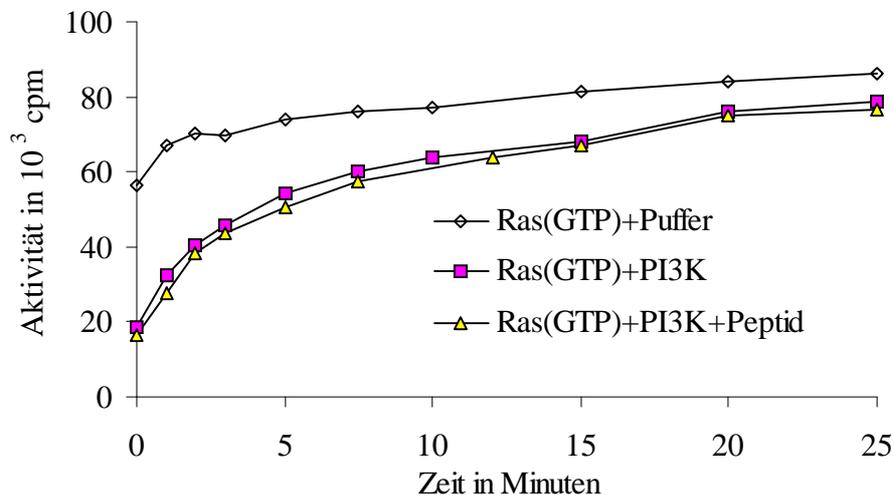


Abbildung 11: Ergebnisse der Ras(GTP)-Hydrolyse in Gegenwart von Peptid **1b**

Dieses Ergebnis lässt sich dahingehend deuten, dass keine Wechselwirkung der Farnesylgruppe oder einer C-terminalen Ras-Teilsequenz mit der PI 3-Kinase γ stattfindet. Eine mögliche Erklärung der beobachteten Differenz der Plateau-Werte ist die weiter oben angesprochene Konformationsänderung der lipidmodifizierten Ras-Proteine im Vergleich zu unmodifiziertem Ras durch oder im Laufe der posttranslationalen Modifizierung. Falls eine so induzierte Konformationsänderung in Ras für die Komplexierung dieser PI 3-Kinase nötig ist, sollte die Zugabe eines lipidierten Peptids keinen Einfluss zeigen.

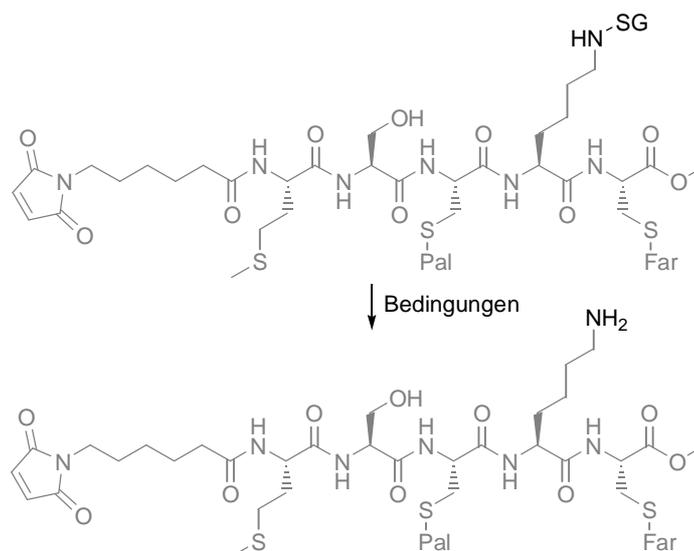
Doch auch eine wesentlich kritischere Interpretation ist möglich, die auf der Diskrepanz zwischen erwartetem Ergebnis (langsames Erreichen des Kontroll-Plateaus bei Komplexierung) und gemessenen Daten (deutlich niedrigeres Plateau bzw. sehr langsame Angleichung) beruht. Wie kann die zur Erklärung herangezogene extreme Stabilität des Ras(GTP)-p110 γ -Komplexes überhaupt verstanden werden? Zur Verdeutlichung: Sobald sich dieser Komplex löst, sollte wegen des großen Überschusses an GAP eine sofortige Hydrolyse von Ras($\gamma^{32}\text{P}$ -GTP) erfolgen, die in einer Freisetzung der radioaktiven Phosphatgruppe resultiert. Da es sich bei der Komplexierung/Dekomplexierung um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, sollte eine vollständige Freisetzung der radioaktiven Phosphatgruppe beobachtet werden, nicht aber das Erreichen eines niedrigeren

Plateauwertes. Die oben gezeigten Messreihen erwecken den Eindruck, dass der größere Teil des zunächst komplexierten H-Ras Proteins relativ schnell, das heißt innerhalb der ersten fünf Minuten, freigesetzt wird und damit eine GTP-Hydrolyse stattfindet, während die zu diesem Zeitpunkt noch vorliegenden Ras(GTP)-p110 γ -Komplexe praktisch kaum noch dissoziieren. Liegt also das in Literatur 66 als komplexiert interpretierte Ras nach Abbruch der Messreihe wirklich noch als Ras(GTP) vor oder hat eine Nebenreaktion stattgefunden, die dieses nur vortäuscht? Letzteres sollte in einem geeigneten Kontrollexperiment geprüft werden, um eine weitergehende Diskussion zu ermöglichen.

4.4 Synthese lipidierter H-Ras-Peptide mit einem Maleinimidocaproyl-Linker

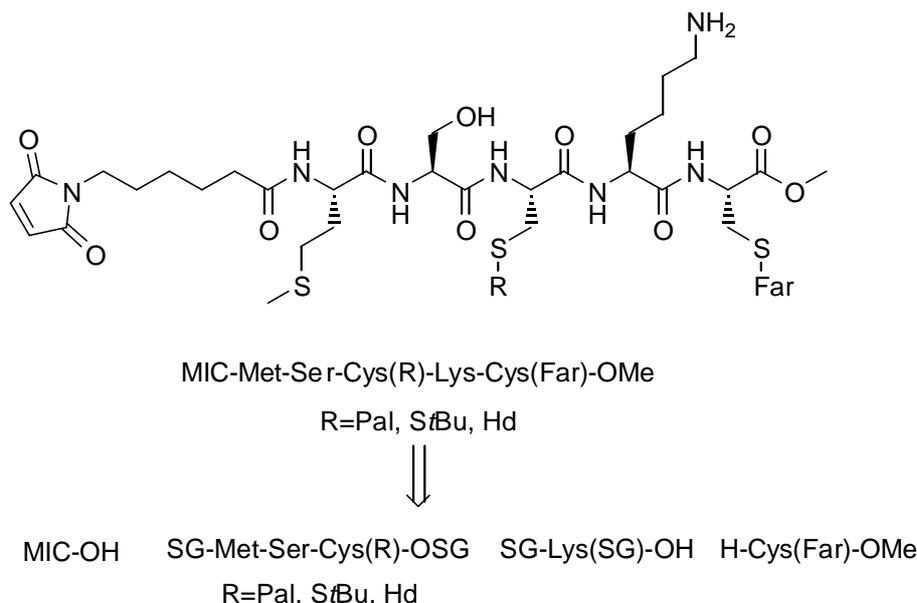
4.4.1 Syntheseplan

Die Synthese dieser Pentapeptide lehnte sich an im Abschnitt 4.1 beschriebenen Peptide an, stellte jedoch durch die Inkompatibilität der Aloc-Abspaltung mit der Maleinimid-Gruppe eine neue Herausforderung dar.⁶⁷ Da sich bisher nur die Allyloxycarbonylgruppe als für eine Abspaltung auf der letzten Stufe geeignete Aminoschutzgruppe für die Synthese dieser mehrfach lipidierten Peptide erwiesen hatte, mussten also entweder Bedingungen gefunden werden, die diesen Anforderungen entsprechen, oder eine alternative Schutzgruppenstrategie entwickelt werden.



Schema 8: Abspaltung der Schutzgruppe in der Lysinseitenkette als letzter Syntheseschritt erfordert extrem milde Bedingungen, die mit dem Palmitoylthioester, der Prenylgruppe und dem Maleinimid kompatibel sein müssen.

Es war zu erwarten, dass die Schutzgruppe, die diesen Anforderungen entspricht, die Strategie zum Aufbau der Maleinimido-modifizierten Pentapeptide aufgrund ihrer mangelnden Kompatibilität mit bisher eingesetzten Schutzgruppen beeinflussen würde. Deshalb sollten die in Abschnitt 4.1 beschriebenen Tripeptide mit der Sequenz Met-Ser-Cys als zentrale Synthesebausteine eingesetzt und das Lysinderivat erst möglichst spät eingeführt werden.



Schema 9: Synthesepfad für die Maleinimido-modifizierten Pentapeptide mit der C-terminalen Sequenz von H-Ras

Ausgehend von diesem zentralen Tripeptid sollten durch Einführung des Maleinimido-caproyl-Linkers am N-terminalen Methionin und C-terminale Verlängerung mit geeigneten Lysin- und Cysteinbausteinen das geschützte Zielpeptid zugänglich sein.

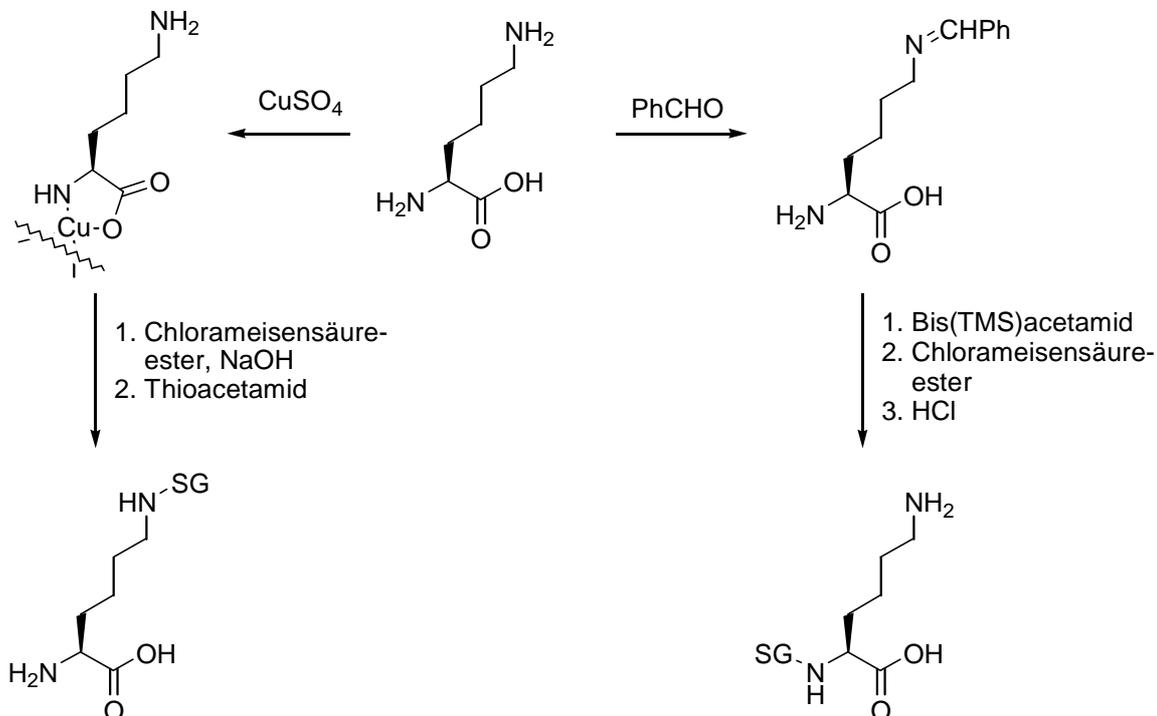
4.4.2 Untersuchungen zur Schutzgruppenstrategie

Vorliegende Arbeiten haben gezeigt, dass es bei einer Aloc-Abspaltung in Gegenwart des Maleinimides zu einer Addition des Allylalkohols oder des Liganden PPh_3 an das Michael-System kommen kann. Als ebenfalls ungeeignet erwies sich die Behandlung mit Piperidin und HCl /Ether, wie sie zur Entfernung der Fmoc bzw. Boc-Gruppe angewendet werden. Keine Reaktion gab es hingegen in Gegenwart von Trifluoressigsäure/Chloroform-Gemischen.⁶⁷ Diese Untersuchungen lieferten somit zwei mögliche Ansatzpunkte für die Lösung des vorliegenden Problems. Einerseits könnte durch Verwendung nicht

nukleophiler Allylakzeptoren und anderer Phosphanliganden Bedingungen zur Aloc-Abspaltung gesucht werden, da sich diese Schutzgruppe als gut verträglich mit den Lipidmodifikationen erwiesen hat. Andererseits könnten auch andere Schutzgruppen gefunden werden, die sich neutral oder mild-sauer abspalten lassen. Dabei müssen die Bedingungen so milde sein, dass es zu keinen Nebenreaktionen in der Farnesylgruppe kommt.

Weitere mögliche Lösungen wären der Einsatz enzymlabiler oder Silylschutzgruppen, die ebenfalls getestet werden sollten, wobei hier zunächst die Verträglichkeit mit den Lipidgruppen im Vordergrund stand.

Für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen wurden eine ganze Reihe unterschiedlich blockierter Lysin-derivate hergestellt. Bei der selektiven Einführung der verschiedenen Schutzgruppen kamen zwei Verfahren zur Anwendung. Zum einen wurde durch Komplexierung mit Kupfer die α -Aminogruppe blockiert, so dass die Behandlung dieses Kupferkomplexes mit Chlorameisensäureestern eine selektive Acylierung der ϵ -Aminogruppe erlaubte.⁶⁸ Mittels Thioacetamid (TAA) als Sulfidquelle wurde anschließend das Lysin freigesetzt und stand für weitere Derivatisierungen zur Verfügung.



Schema 10: Verfahren zur selektiven N-Derivatisierung von Lysin

Alternativ hierzu konnte durch Umsetzen von Lysin mit einem Äquivalent Benzaldehyd selektiv das Imin der ϵ -Aminogruppe erzeugt werden, so dass die α -Aminogruppe für weitere selektive Derivatisierungen zur Verfügung stand.⁶⁹ Die Isolierung des einfach geschützten Lysins erfolgt in dieser Synthese durch Fällen aus einer wässrigen Lösung, weshalb dieses Verfahren bei gut kristallisierenden Derivaten (z. B. Fmoc-Lys-OH) extrem reine Produkte ergab, bei anderen (z. B. den öligen Aloc-Lys-OH) hingegen eine Abtrennung vom Acetamid nicht gelang.

4.4.2.1 Allylschutzgruppen

Die Untersuchung des Pd⁰-katalysierten Allyltransfers auf Akzeptoren begründete sich in dem Umstand, dass bisher nur Nukleophile (DMB, Morpholin) als Akzeptoren und der [Pd(PPh₃)₄] als Katalysator getestet wurden. Da aber auch Allylakzeptoren bekannt sind, die erst in Gegenwart des Palladiumkatalysators Hydrid übertragen (Silane und Stannane), sollte die Verwendung von Silanen weitergehend untersucht werden.

Die Variation des Katalysators bzw. der Liganden beruhte auf dem Mechanismus dieser Reaktion. Beim Einsatz von [Pd(PPh₃)₄] erfolgt zunächst die Abspaltung von zwei Triphenylphosphinliganden unter Bildung der katalytisch aktiven Spezies [Pd(PPh₃)₂]. Von Phosphanen ist jedoch bekannt, dass sie Michael-Systeme zumindest unter Bildung eines Gleichgewichtes angreifen können und so Folgereaktionen ermöglichen (vgl. Baylis-Hillman-Reaktion⁷⁰). Deshalb sollte versucht werden, durch Generierung der aktiven Spezies in situ sowie durch Verwendung chelatisierender Phosphine eine möglichst geringe Konzentration von unkomplexierten Liganden zu erhalten. Als Testsubstrat diente hierfür das Dipeptid MIC-Gly-Cys(Hd)-OAll, das freundlicherweise von K. Kuhn zur Verfügung gestellt wurde. Die Auswertung erfolgte NMR-spektroskopisch (olefinischer Bereich 5-7 ppm).

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
1	PPh ₃ , THF, 15 h	kleineres und verbreitertes olefinisches MIC-Signal
2	[Pd(PPh ₃) ₄], PhSiH ₃ , THF, 2 h	vollständige Allylesterspaltung, olefinische MIC-Signale verschwunden
3	[Pd(dba) ₂], dppp, THF, 2 h	olefinische MIC-Signale intakt

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
4	[Pd(dba) ₂], dppf, THF, 2 h	olefinische MIC-Signale intakt
5	[Pd(dba) ₂], dppp, PhSiH ₃ , THF, 2 h	unvollständige Allylesterspaltung, olefinische MIC-Signale verschwunden
6	[Pd(dba) ₂], dppf, PhSiH ₃ , THF, 2 h	unvollständige Allylesterspaltung, olefinische MIC-Signale verschwunden
7	[Pd(PPh ₃) ₄], NMM, THF, 3.5 h	langsame Allylesterspaltung, olefinische MIC-Signale verkleinert
8	[Pd(dba) ₂], dppp, NMM, THF, 2 h	unvollständige Allylesterspaltung, olefinische MIC-Signale intakt
9	[Pd(dba) ₂], dppf, NMM, THF, 2 h	unvollständige Allylesterspaltung, olefinische MIC-Signale intakt

Tabelle 2: Untersuchungen zur Pd⁰-katalysierten Allylesterspaltung in Gegenwart des Maleinimidsystems. dppp: 1,3-Bis-(diphenylphosphino)-propan, dppf: 1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen, NMM: *N*-Methylmorpholin, dba: Dibenzylidenacetone

Die aufgelisteten Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Silane nicht als Fänger geeignet sind (Einträge 2/5/6), da es offensichtlich zu einer Hydridanlagerung an das Maleinimidosystem kommt. Eventuell wird das Silan Palladium-katalysiert addiert, es wurde jedoch nicht der Versuch unternommen, die gebildeten Produkte näher zu identifizieren. Die Verwendung bidentater Liganden erscheint jedoch als eine sinnvolle Alternative zum Einsatz von [Pd(PPh₃)₄], da die Liganden stabiler ans Metallatom gebunden sind. Dabei scheint die Art des chelatisierenden Liganden weniger relevant zu sein, denn zwischen den beiden getesteten Liganden dppp und dppf waren keine Unterschiede festzustellen (vgl. Einträge 3/4, 5/6, 8/9).

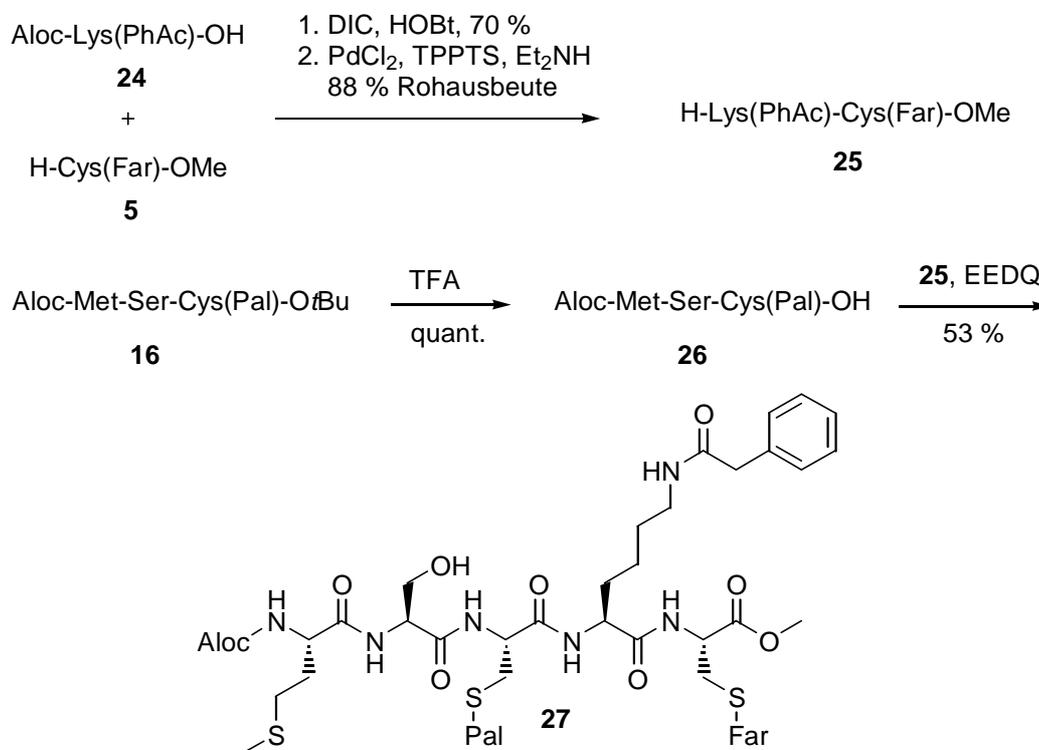
Auch die Verwendung des tertiären Amins *N*-Methylmorpholin (NMM) als Allylakzeptor⁷¹ war nicht erfolgreich. Das tertiäre Amin zeigte schon bei diesem Testsubstrat eine sehr langsame bzw. unvollständige Allylesterspaltung, so dass es für den Einsatz in der Synthese nicht geeignet erscheint.

Demnach ist bis auf weiteres keine Möglichkeit zur Abspaltung von Allyl-basierenden Schutzgruppen in Gegenwart von Maleinimiden bekannt. Ein möglicher Ausweg könnte

darin liegen, ein ähnliches Urethan, die 4-Trimethylsilylbut-2-enoxycarbonyl-Gruppe,⁷² zu untersuchen, das sich durch Pd⁰-Katalyse zu Butadien zersetzt, wodurch kein Allylakzeptor benötigt wird und so kein Konflikt mit dem Maleinimid vorliegen sollte.

4.4.2.2 Die Phenylacetylgruppe

Das Phenylacetamid (PhAc) wurde als enzymlabile Schutzgruppe entwickelt und kann durch das Enzym Penicillin-G-Acylase (PGA) selektiv bei schwach sauren bis neutralen pH-Werten hydrolysiert werden.⁷³ Da Palmitoylthioester in Gegenwart von PGA nicht gespalten werden, wurde das Phenylacetamid auf seine Verwendbarkeit in der Synthese mehrfach lipidiertes Peptide getestet.



Schema 11: Synthese des Phenylacetyl-geschützten Pentapeptids **27**. TPPTS: Triphenylphosphin-3,3',3''-trisulfonsäure Natriumsalz

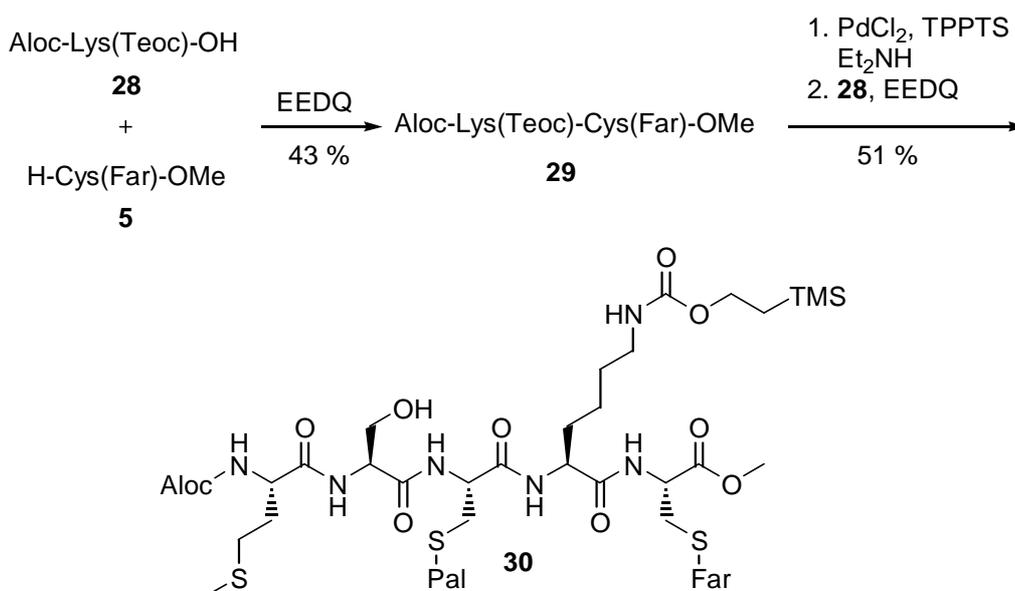
Als Testsubstrat wurde das farnesylierte und palmitoylierte Pentapeptid **27** eingesetzt, das durch Kondensation von Aloc-Lys(PhAc)-OH **24** mit H-Cys(Far)-OMe **5**, vorsichtige Entfernung der Aloc-Gruppe, um eine Cyclisierung von **25** zum Diketopiperazin zu vermeiden, und abschließende Blockkupplung mit dem palmitoylierten Tripeptid **26** zugänglich war. Das N-terminal freie Dipeptid **25** konnte relativ rein hergestellt werden, da

die Reagenzien entweder extrahiert oder im Vakuum entfernt werden konnten.⁷⁴ Weitere Aufreinigungsschritte (Chromatographie, Fällung) dieses Peptides führten zu verstärkter Diketopiperazinbildung.

Die Untersuchungen zur Enzym-katalysierten Abspaltung der Phenylacetylgruppe führten zu negativen Ergebnissen, was in erster Linie auf die extrem schlechte Löslichkeit von Peptid **27** im wässrigen Phosphat-Puffer zurückgeführt wurde, die auch durch Zugabe von Detergentien als Lösungsvermittler nicht behoben werden konnte. Die Beobachtung, dass sehr hydrophobe Lipopeptide bei Enzym-katalysierten Reaktionen dieser Art nur geringen oder keinen Umsatz zeigen, stimmte mit denen bei der Verwendung der Phenylacetoxybenzyloxycarbonylschutzgruppe (PhAcOZ) – einer entsprechenden Urethanschutzgruppe – erhaltenen Ergebnissen überein,⁷⁵ so dass das Phenylacetamid für den in diesem Projekt verfolgten Zweck nicht weiter in Betracht kam.

4.4.2.3 Die Trimethylsilylethoxycarbonylgruppe

Für die Entfernung der Trimethylsilylethoxycarbonylgruppe⁷⁶ (Teoc) sind sowohl saure als auch auf Fluoridreagentien beruhende Verfahren beschrieben. Von Interesse für das hier vorliegende Problem war vor allem die Verwendung von nicht-basischen Fluoridquellen. Als Testsubstrat kamen das farnesylierte Dipeptid **29** und das palmitoylierte und farnesylierte Pentapeptid **30** zum Einsatz.

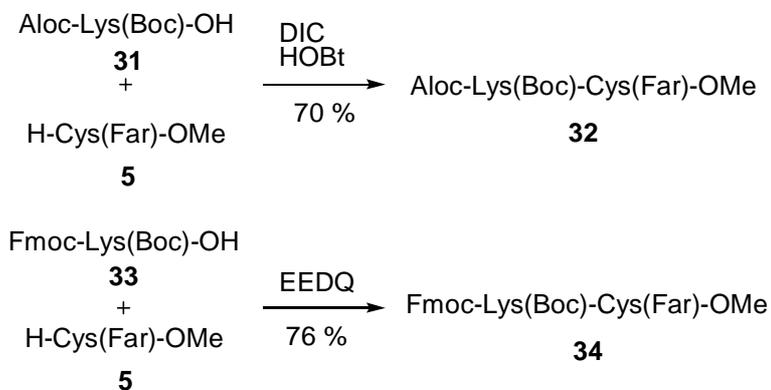


Schema 12: Synthese der Teoc-geschützten Testverbindungen. TPPTS: Triphenylphosphin-3,3',3''-trisulfonsäure Natriumsalz

Die Behandlung von **30** mit TBAF führte auf Grund dessen hohen Basizität auch unter Ausschluss von Wasser erwartungsgemäß zur Zersetzung des Eduktes. Bei der Verwendung von Tris(dimethylamino)sulfonium-difluorsilikat (TAS-F), das bereits in der Teoc-Abspaltung in Gegenwart eines Thioesters erfolgreich verwendet worden war,⁷⁷ konnte allerdings keine Reaktion beobachtet werden. Das durchaus ermutigende Ergebnis, dass dieses Reagenz mit Thioester und Farnesylgruppe keine Nebenreaktionen zeigte, wurde dennoch nicht weiter verfolgt, da andere Schutzgruppenstrategien deutlich bessere Resultate erbrachten.

4.4.2.4 Die *tert*-Butoxycarbonylschutzgruppe

Obwohl die Inkompatibilität der Abspaltungsbedingungen für die Boc-Gruppe mit Prenylresten mehrfach berichtet wurde,^{42,43} sollte eine Verwendbarkeit dieser häufig in der Peptidchemie eingesetzten Schutzgruppe erneut untersucht werden. Hierbei sollten vor allem Verfahren getestet werden, die als besonders milde und verträglich mit säurelabilen Funktionalitäten beschrieben sind. Als Testsubstrate kamen die Dipeptide Aloc-Lys(Boc)-Cys(Far)-OMe **32** und Fmoc-Lys(Boc)-Cys(Far)-OMe **34** zum Einsatz.



Schema 13: Synthese der als Testsubstrat genutzten Boc-geschützten Dipeptide **32** und **34**

Als möglicherweise verwendbar erschienen milde Lewis-saure Verfahren. So war SnCl₄⁷⁸ in Methylchlorid und mit Lutidin gepufferte Silyltriflate interessante Kandidaten. Brönstedt-Säuren wie TFA oder HCl/Ether wurden zu Vergleichszwecken allerdings auch getestet. Die Auswertung erfolgte NMR-spektroskopisch.

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
1	HCl/Ether, 0 °C	Boc-Abspaltung Farnesylsignale zerstört
2	10 % TFA in CH ₂ Cl ₂ Abbruch durch Neutralisieren	Boc-Abspaltung Farnesylsignale zerstört
3	SnCl ₄ in CH ₂ Cl ₂	Boc-Abspaltung Farnesylsignale zerstört
4	TESOTf (1.3 Äquiv.), Lutidin (1.5 Äquiv.), CH ₂ Cl ₂ , 0 °C	keine Reaktion
5	TESOTf (6 Äquiv.), Lutidin (8 Äquiv.), CH ₂ Cl ₂ , 0 °C	keine Reaktion
6	TESOTf (1.3 Äquiv.), CH ₂ Cl ₂ , 0 °C	Boc-Abspaltung Farnesylsignale zerstört
7	TMSOTf (10 Äquiv.), Lutidin (5 Äquiv.), CH ₂ Cl ₂ , RT	Boc-Abspaltung Farnesylsignale intakt

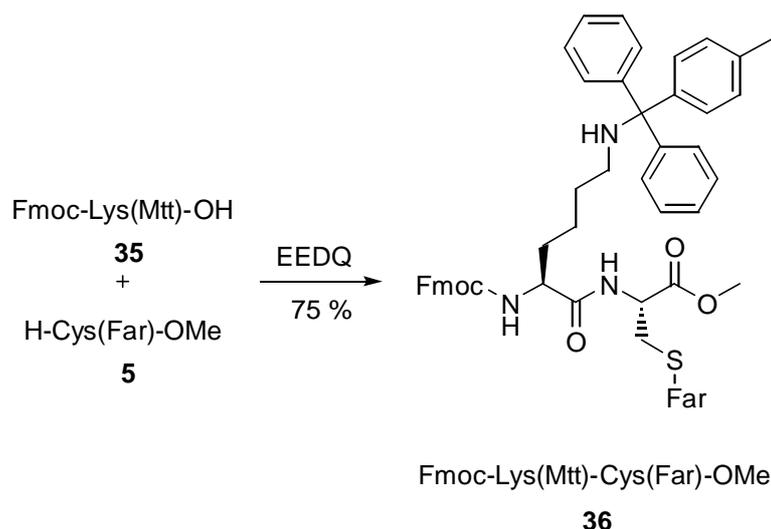
Tabelle 3: Untersuchungen zur Abspaltung der Boc-Gruppe in Gegenwart eines Farnesylrestes

Eine weitere Variation der in Eintrag 7 beschriebenen Bedingungen zeigte, dass die Aminbase breit variiert werden kann. Auch ist ein Abbruch der Reaktion durch Zugabe eines leichten Überschusses, also ca 6 Äquivalenten, eines leichtflüchtigen Amins (z. B. EtMe₂N) möglich, wodurch eine wässrige Aufarbeitung vermieden werden kann.

Diese Ergebnisse erlaubten erstmals die Abspaltung einer Boc-Gruppe in Gegenwart der säureempfindlichen Prenylgruppen.

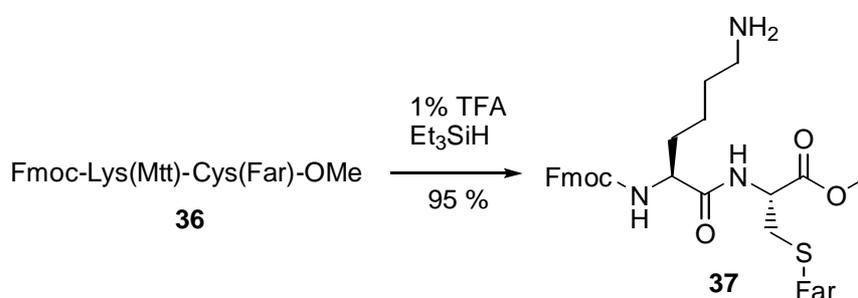
4.4.2.5 Die 4-Methyltritylschutzgruppe

Die 4-Methyltritylgruppe (Mtt) wurde als extrem säurelabile Schutzgruppe für die ε-Aminogruppe im Lysin in die Peptidchemie eingeführt.⁷⁹ Sie lässt sich durch Behandlung mit einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Methylenchlorid oder Essigsäure/Trifluorethanol/Methylenchlorid 1:2:7 abspalten. Diesen Bedingungen unterworfen, wurde eine glatte Abspaltung der Mtt-Gruppe aus **36** beobachtet, ohne dass NMR-spektroskopisch eine Beeinträchtigung der Farnesylgruppe nachzuweisen war.



Schema 14: Synthese des Mtt-geschützten Dipeptids **36**

Als ideale Vorschrift erwies sich die Verwendung einer einprozentigen TFA-Lösung in Methylchlorid in Gegenwart von 10 Äquivalenten Triethylsilan. Um ein Aufkonzentrieren der TFA zu vermeiden, wurde die Reaktion durch Zugabe eines leichten Überschusses eines leichtflüchtigen tertiären Amins wie Ethyldimethylamin abgebrochen.



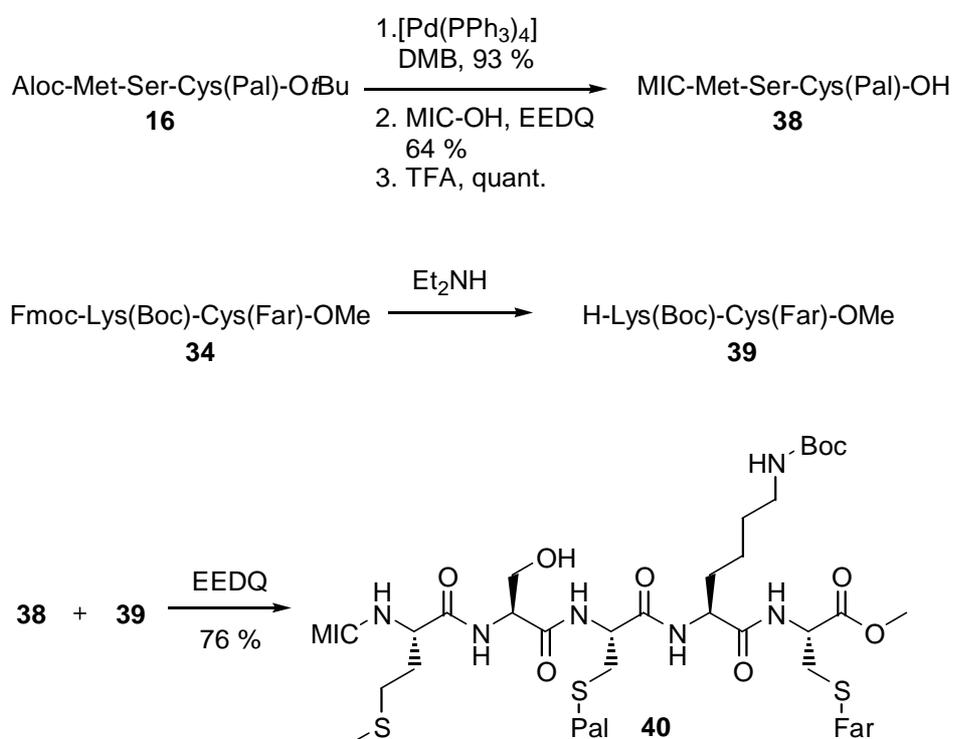
Schema 15: Erfolgreiche Abspaltung der Methyltritylgruppe unter sauren Bedingungen in Gegenwart des Farnesylrestes

Weitergehende Testreaktionen zeigten, dass die maximale Konzentration an TFA, der ein Farnesylrest unbeschadet eine Stunde lang ausgesetzt sein kann, in Methylchlorid zwischen 5 und 10 % liegt.

4.4.3 Synthese der Maleinimido-modifizierten Pentapeptide

Die Untersuchungen zur Schutzgruppenstrategie hatten mit der Boc- und der Mtt-Gruppe gleich zwei Kandidaten für einen erfolgreichen Abschluss der Synthese geliefert. Dieser

erfolgte durch das Austauschen der N-terminalen Aloc-Gruppe gegen den Maleinimido-caproyl-Linker, Freisetzung der Säure und Blockkupplung zum Pentapeptid **40**. Diese Kondensation erwies sich als sehr unzuverlässig, und die Produkte wurden oft in schlechten Ausbeuten isoliert. Der Grund hierfür liegt in der Tendenz der Dipeptide wie **39** zur Bildung von Diketopiperazinen als Konkurrenz zur Blockkondensation. Da sich die Nebenprodukte chromatographisch aber ähnlich verhielten, erwies sich die Isolierung der Produkte als schwierig. Eine Umstellung der Synthesestrategie zur Vermeidung dieser Probleme hätte aber lediglich zu einer Verlagerung dieser Schwierigkeiten geführt, so dass die schlechten Ausbeuten an dieser Stelle in Kauf genommen wurden.



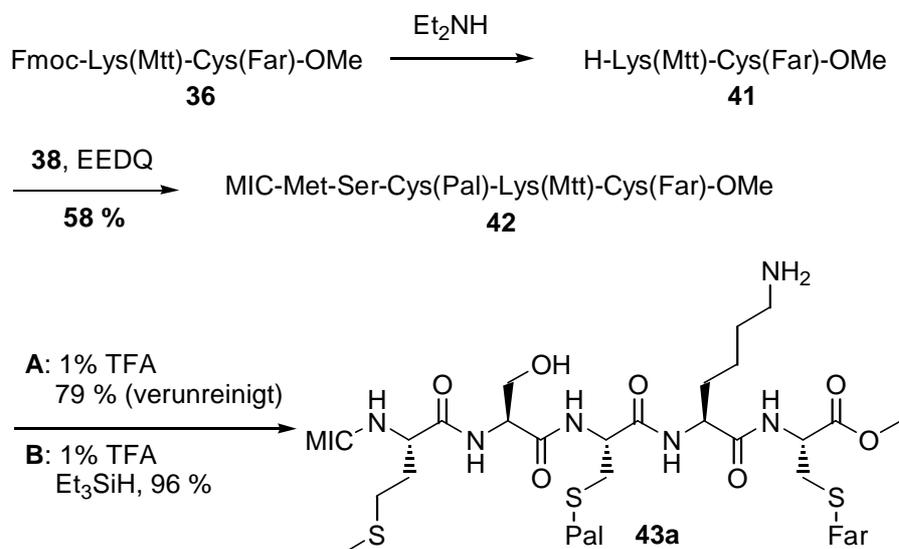
Schema 16: Synthese des palmitoylierten und farnesylierten Pentapeptids **40** mit einer Boc-Schutzgruppe in der Lysinseitenkette

Eine Übertragung der in den Testreaktionen erhaltenen Ergebnisse (Abschnitt 4.4.2.4) auf das Pentapeptid **40** erwies sich als nicht erfolgreich. Je nach Bedingungen färbte sich die Reaktionslösung mehr oder weniger schnell braun und nach dem Abbruch der Reaktion, sei es nun durch Extraktion oder Neutralisieren durch einen Überschuss Amin, wurden Veränderungen in den NMR-Signalen der Farnesylgruppe gefunden, die auf unerwünschte Nebenreaktionen im Prenylsystem hindeuten.

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
1	10 eq. TMSOTf, 5 eq. Lutidin, DCM, 1.5 h, Aufarbeitung durch Extraktion	schwer lösliches Produkt, keine Farnesylnsignale (NMR)
2	10 eq. TMSOTf, 5 eq. EtMe ₂ N, DCM, 3 h Abbruch durch Zugabe von EtMe ₂ N	schnelle Braunfärbung, keine Farnesylnsignale (NMR)
3	Wie Eintrag 2, jedoch langsame Zugabe einer verdünnten Lösung von TMSOTf	langsame Braunfärbung, keine Farnesylnsignale (NMR)

Tabelle 4: Versuche zur Abspaltung der Boc-Gruppe des Peptids **40**

Das Methyltrityl-geschützte Pentapeptid **42** wurde analog zu **40** aufgebaut. Eine alternativ getestete andere Reihenfolge in der Verknüpfung der Komponenten, d. h. die Blockkupplung von Aloc-Met-Ser-Cys(Pal)-OH **26** mit dem Dipeptid **41** gefolgt von der Einführung der Maleinimidocaproylgruppe, führte besonders bei der Blockkondensation zu schlechteren Ergebnissen.



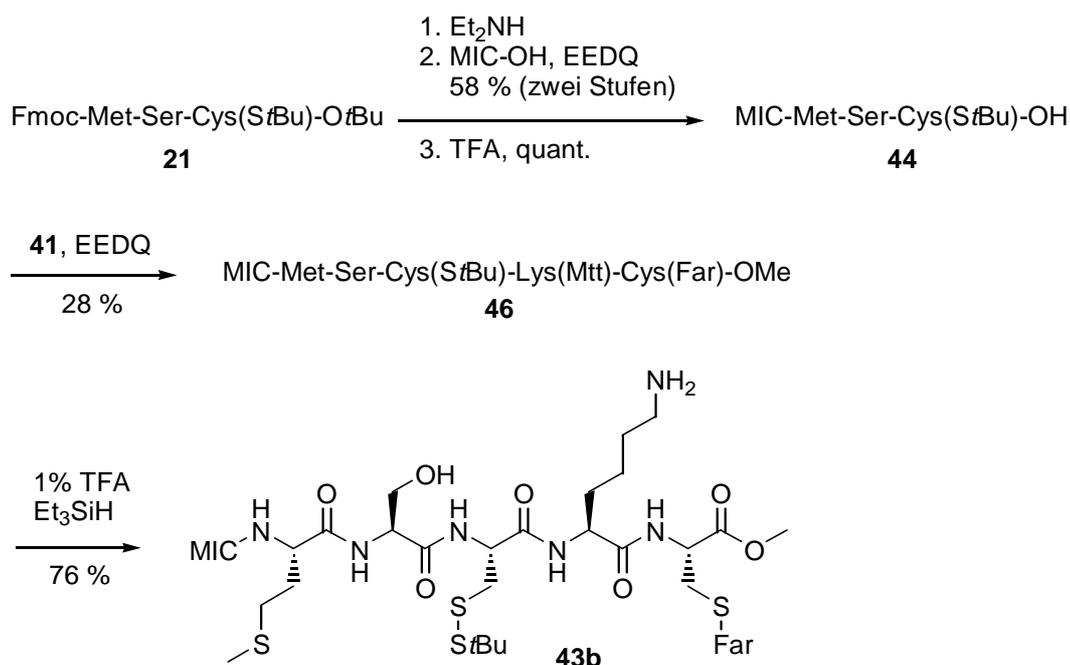
Schema 17: Synthese des palmitoylierten Zielpeptids **43a** unter Verwendung der Methyltritylschutzgruppe

Im Gegensatz zu der Boc-Strategie verlief die Abspaltung der Methyltritylgruppe mit herausragenden Ergebnissen. Dabei zeigte sich die Notwendigkeit der Zugabe eines Fängers für das freigesetzte Tritylkation. Bei der Methode A konnte zwar laut Dünnschichtchromatographie eine vollständige Reaktion beobachtet werden, das

Tritylkation blieb allerdings in der Lösung erhalten, wie an deren orangen Farbe leicht zu erkennen war. Beim Abbrechen der Reaktion durch Zugabe eines Überschusses Amin erfolgte eine sofortige Entfärbung verbunden mit einer teilweisen Rückreaktion. Aus diesem Gemisch konnte das Produkt nur verunreinigt mit dem Edukt isoliert werden. Bei einer alternativen Abspaltung in Gegenwart von Triethylsilan (Methode B) trat innerhalb von ein bis zwei Minuten nach der Zugabe des Silans eine vollständige Entfärbung der Reaktionslösung ein, die das Abreagieren des Tritylkations dokumentiert. Das nach dieser Methode hergestellte Zielpeptid **43a** erwies sich als sehr rein (Schema 17).

Ermutigt durch diese Ergebnisse wurde die Synthese der analogen Zielpeptide **43b** und **43c** nach der gleichen Strategie angestrebt. Dabei wurde im Falle des *S-tert*-Butylthio-disulfid geschützten Derivates **43b** auf das Tripeptid **3b** und dessen Vorläufer **21** zurückgegriffen, das durch Kondensation mit MIC-OH und saurer Abspaltung des *tert*-Butylesters zur Kupplungskomponente **44** umgesetzt wurde. An dieser Stelle zeigte sich der im Abschnitt 4.1.3 angesprochene Vorteil der Fmoc-Strategie zur Synthese von **3b**, da eine Kondensation des Maleinimids mit dem rohen **3b** ohne vorherige Aufreinigung höhere Ausbeuten erbrachte (58 % statt 21 % über beide Stufen).

Die Blockkondensation zum Pentapeptid **45** verlief mit mäßigem Resultat, lieferte aber ausreichend Material für die Synthese des Zielpeptids **43b**, die durch saure Abspaltung der Methyltritylgruppe in 76 % isolierter Ausbeute erfolgreich abgeschlossen wurde.



Schema 18: Synthese des *S-tert*-Butylthio-modifizierten Zielpeptids **43b**

Die Synthese des hexadecylierten Zielpeptids **43c** erwies sich schwieriger als erwartet. Insbesondere stellte sich hier die Einführung des Hexadecylthioethers als problematisch heraus. Bei der Alkylierung auf der Stufe des Dipeptids Aloc-Ser-Cys-*O*tBu zeigte sich, dass ein früher Abbruch der Reaktion sehr schlechte Umsätze erbrachte, andererseits aber längere Reaktionszeiten auch *O*-Alkylierung als Nebenreaktion ermöglichten. Zusätzlich erwies sich die Detektion des Produktes als schwierig. Solche Probleme schienen sich durch Alkylierung des Cysteinderivates Aloc-Cys-*O*tBu umgehen zu lassen, das in 58 % isolierter Ausbeute in zwei Stufen ausgehend vom korrespondierenden Cystin-Derivat gelang. Diese Strategie scheiterte jedoch an der Pd⁰-katalysierten Entfernung der Aloc-Gruppe, die unter keiner der in anderen Fällen erfolgreich angewendeten Bedingungen gelang.

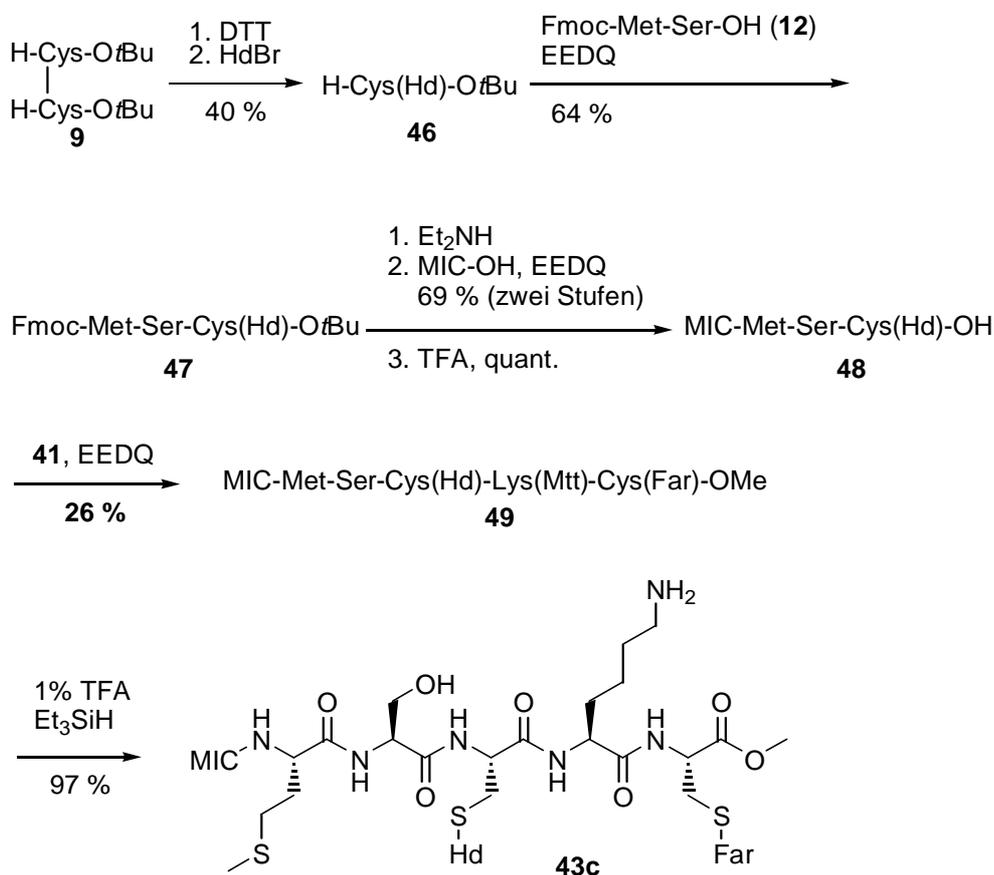
Eintrag	Edukt ^a	Bedingungen	Ergebnis
1	Aloc-Cys- <i>O</i> tBu	1.2 eq. HdBr, 1.2 eq. Et ₃ N, DMF, 2 d	58 % Ausbeute
2	Fmoc-Cys- <i>O</i> tBu	1.5 eq. HdBr, 1.1 eq. Et ₃ N, DMF, 35 h	schwer trennbares Produktgemisch
3	Fmoc-Cys- <i>O</i> tBu	1.5 eq. HdBr, 2 eq. K ₂ CO ₃ , DMF, 4 d	18 % Ausbeute
4	Fmoc-Cys- <i>O</i> tBu	1.5 eq. HdBr, DMF, 3 d	geringer Umsatz
5	Fmoc-Cys- <i>O</i> tBu	1.2 eq. HdBr, 1.2 eq. Et ₃ N, DMF, 2 d	geringer Umsatz
6	H-Cys-OH•HCl	2 eq. HdBr, DMF, 2 Wochen	keine Reaktion
7	H-Cys- <i>O</i> tBu	2 eq. HdBr, DMF, 4 d	10 % Ausbeute
8	H-Cys- <i>O</i> tBu	2 eq. HdBr, 0.5 eq. Et ₃ N, DMF, 4 d	18 % Ausbeute, überwiegend Bisalkylierung
9	H-Cys- <i>O</i> tBu	2 eq. HdBr, 0.5 eq. Et ₃ N, DMF, 2 d	40 % Ausbeute

Tabelle 5: Versuche zur Synthese hexadecylierter Cysteinderivate. a: Alle *tert*-Butylester-substrate wurden jeweils frisch aus den korrespondierenden Cystinderivaten durch Spaltung mit DTT erzeugt.

Auch dieses Hindernis sollte sich durch Variation der Schutzgruppenstrategie umgehen lassen. Beim Einsatz der Fmoc- statt der Aloc-Gruppe stellte sich heraus, dass diese unter den für die Alkylierung notwendigen Bedingungen nicht stabil genug ist, so dass es zur Bildung von unterschiedlich zusammengesetzten Gemischen aus Edukt, Produkt sowie

Abspaltungs- und daraus entstandenen Nebenprodukten kam (Tabelle 5). Daraus konnte das gewünschte Produkt nur in schlechten Ausbeuten isoliert werden. Als erfolgreich erwies sich hingegen die Alkylierung in Gegenwart der ungeschützten Aminogruppe, die nach kürzerer Reaktionszeit abgebrochen wurde, um eine mögliche, aber langsamer verlaufende *N*-Alkylierung zu unterdrücken. Diese Methode lieferte das gewünschte Produkt **46** in 40 % Ausbeute über zwei Stufen (Schema 19).

Die weitere Synthese des Tripeptidbausteins **48** erfolgte entsprechend der weiter oben für das *S*-*tert*-Butyldisulfid beschriebenen Reaktionsfolge. Auch in diesem Fall verlief die Blockkondensation zu **49** in schlechten Ausbeuten, die abschließende Abspaltung der Methyltritylgruppe führte hingegen zu einer nahezu quantitativen Isolierung des hexadecylierten Zielpeptids **43c**.



Schema 19: Synthese des hexadecylierten Zielpeptids **43c**

Die extreme Labilität der Zielpeptide **43a-c** führte gelegentlich zu Misserfolgen bei zuvor erfolgreich durchgeführten Prozessen. Insbesondere die Reinigung über Größenaus-schlusschromatographie resultierte wiederholt in der Isolierung von Verbindungen mit dem

richtigen Molekulargewicht, die aber laut ^1H - und ^{13}C -NMR keine Doppelbindung im Maleinimid aufwiesen. Eine Erneuerung des Säulenmaterials behob dieses Problem.

Insgesamt wurden im Rahmen dieses Projektes drei unterschiedliche lipidmodifizierte Pentapeptide mit der Sequenz des H-Ras C-Terminus hergestellt, die nun für Kopplungsexperimente mit verkürztem H-Ras Protein zur Verfügung standen. Die nachfolgende Tabelle 6 zeigt zusammenfassend die synthetisierten Zielstrukturen, bei deren Herstellung sich die Methyltrityleinheit als Schutzgruppe für die Aminofunktion in der Lysinseitenkette hervorragend bewährt hat.

Sequenz	Nummer
MIC-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys-Cys(Far)-OMe	43a
MIC-Met-Ser-Cys(<i>S</i> tBu)-Lys-Cys(Far)-OMe	43b
MIC-Met-Ser-Cys(Hd)-Lys-Cys(Far)-OMe	43c

Tabelle 6: Maleinimidocaproyl-modifizierte Zielpeptide **43a-c**

4.5 Herstellung Succinimid-verbrückter Protein-Peptid-Konjugate

4.5.1 Hintergrund

Das menschliche H-Ras Protein umfasst direkt nach seiner Biosynthese 189 Aminosäureeinheiten. Nach der Prozessierung ist es am C-terminalen, als Methylester vorliegenden ^{186}Cys farnesyliert, darüber hinaus ist es an ^{181}Cys und ^{184}Cys palmitoyliert.

Für die Kupplungen wurde einerseits eine Mutante verwendet, die um acht Aminosäureeinheiten (bezogen auf das unprozessierte Protein) verkürzt ist. Bei dieser Mutante ist jetzt das ^{181}Cys die C-terminale Aminosäure. Dieses Protein (H-Ras 1-181) wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund nach Standardmethoden hergestellt.⁴⁷ Als zweite Mutante wurde ein H-Ras 1-181 eingesetzt, das in der Position 12 ein Valin statt des natürlich vorkommenden Glycins besitzt (H-RasG12V 1-181). Durch diese Mutation verliert das Ras-Protein seine GTPase-Aktivität, so dass diese Mutante konstant aktiv ist (siehe Abschnitt 2.2.1).

Die Verknüpfung des verkürzten Proteins mit dem lipidierten Peptid sollte durch konjugierte Addition des Thiols von ^{181}Cys des Makromoleküls an den Maleinimidlinker erfolgen. Im pH-Bereich von 6.5-7.5 erfolgt eine selektive Addition von Mercapto-

Gruppen. Erst bei höheren pH-Werten, die aber wegen der Labilität des Palmitoylthioesters ohnehin vermieden werden müssen, kann eine Addition von Aminogruppen als Nebenreaktion eintreten.

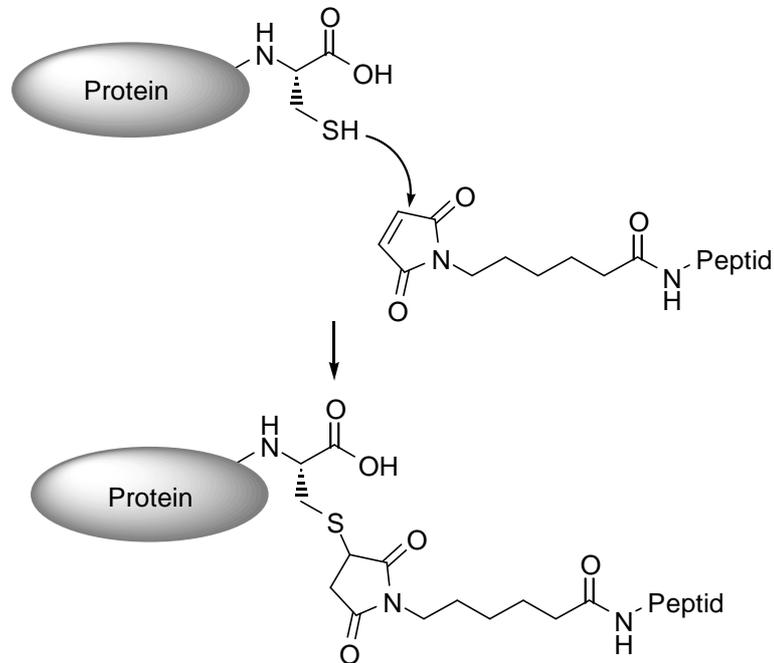


Abbildung 12: Synthese von Succinimid-verbrückten Protein-Peptid-Konjugaten durch Addition eines Thiols im Protein an den Maleinimidlinker des Peptids

Neben dem C-terminalen Cystein enthält das verkürzte H-Ras noch drei weitere Cysteine an den Positionen 51, 80, 118. Wie aus röntgenkristallographischen Daten hervorgeht, sollten diese jedoch durch die Sekundärstruktur des Proteins abgeschirmt und dadurch für die Kupplungsreaktion mit den Maleinimidocaproyl-modifizierten Lipopeptiden schwerer zugänglich sein als das ^{181}Cys . Deshalb konnte eine selektive Reaktion des ^{181}Cys bei der Synthese der Protein-Peptid-Konjugate erwartet werden.

Neben der Addition des Thiols an das Maleinimid besteht aber prinzipiell auch die Möglichkeit, dass dieses unter den Reaktionsbedingungen eine Umesterung mit dem Palmitoylthioester eingeht. Diese Nebenreaktion wurde jedoch in früheren Versuchen nicht beobachtet.

4.5.2 Konjugatsynthese

Dem Problem der geringen Löslichkeit lipidierter Peptide in wässrigen Medien konnte durch Verwendung von Triton X-114 als neutralem Detergens entgegen gewirkt werden.

Dieses Detergens ist bei 4 °C in Wasser gut löslich, während sich oberhalb von 30 °C eine Phasentrennung zwischen der wässrigen Pufferlösung und einer 11 %igen Tritonlösung einstellt. Diese Fähigkeit zur Phasentrennung wurde in der späteren Aufreinigung genutzt.

Die lipidmodifizierten Peptide wurden in wenig Methanol angelöst und anschließend in einer 11 %igen Lösung von Triton X-114 aufgenommen. Nach Zugabe des verkürzten Ras-Proteins in Tris-Puffer (pH 7.4) wurde der Kupplungsansatz 15 Stunden bei 4 °C geschüttelt.

Die Aufreinigung erfolgte durch die schon erwähnte Abtrennung der bei 30 °C gebildeten Tritonphase, die eine Abtrennung der lipidierten Substanzen in der Tritonphase von nicht umgesetzten Ras-Protein im wässrigen Puffer erlaubt. Die Tritonphase, die neben dem Kupplungsprodukt auch nicht umgesetztes Peptid enthielt, wurde zwei weitere Male mit wässrigem Puffer extrahiert und durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose aufgetrennt.

4.5.3 Ergebnisse

Die Ausbeuten der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Protein-Peptid-Konjugate waren deutlich geringer als in vorherigen Versuchen.⁴⁷ Auch die Reinheit der Produkte entspricht noch nicht den Ergebnissen mit N-Ras-Peptiden. Eine Auswertung der von jeder Stufe der Aufarbeitung genommenen Proben durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zeigte, dass ein großer Teil des synthetisierten Konjugats auf der Stufe der Ionenaustauschchromatographie verloren ging. Im Vergleich zu früheren Arbeiten wurde in der Tat eine andere Trennsäule eingesetzt, wobei jedoch die Verwendung lediglich einer anderen Sepharose-Säule mit demselben Material die schlechteren Ergebnisse nicht unbedingt erklärt. Die Untersuchungen zur Synthese der Protein-Peptid-Konjugate dauern noch an.

Die Massenspektren weisen darauf hin, dass unter den Versuchsbedingungen eine teilweise Depalmitoylierung stattgefunden haben könnte, die in früheren Versuchen nicht beobachtet wurde. Eine andere Erklärung für die gefundenen Daten wäre eine Abspaltung der verschiedenen Lipidreste im Massenspektrometer. Da aber die in Tabelle 7 präsentierten Daten aus einer noch nicht abgeschlossenen Untersuchung stammen, ist es an dieser Stelle zu früh, Schlussfolgerungen zu diskutieren.

Peptid	Kupplungs ausbeute	detektierte Massen (Nanospray-MS)
MIC-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys-Cys(Far)-OMe (43a)	10 %	21710 [M] ⁺ 21503 [M-Far] 21469 [M-Pal] ⁺ Hauptsignal
MIC-Met-Ser-Cys(S <i>t</i> Bu)-Lys-Cys(Far)-OMe (43b)		noch nicht charakterisiert
MIC-Met-Ser-Cys(Hd)-Lys-Cys(Far)-OMe (43c)	30 %	20489 [H-Ras 1-181] 21470 [M-Hd] ⁺

Tabelle 7: Ergebnisse der ersten Versuche zur Konjugatsynthese

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Arbeit sollte zunächst eine Synthese für unterschiedlich lipidierte Oktapeptide mit der Sequenz des H-Ras C-Terminus entwickelt werden. Desweiteren galt es, lipidmodifizierte H-Ras Pentapeptide für die Synthese von Protein-Peptid-Konjugaten bereitzustellen, die als Linkergruppe ein Maleinimidocaproyleinheit tragen. Beide Projekte konnten erfolgreich abgeschlossen werden.

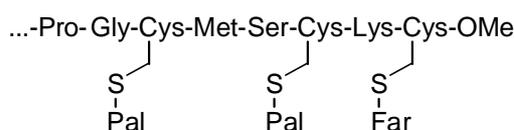
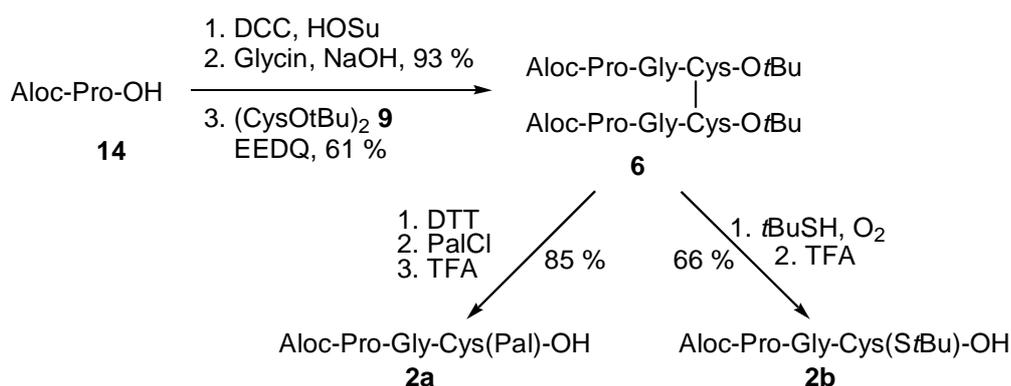


Abbildung 13: C-Terminale, lipidierte Teilsequenz des H-Ras Proteins

Das C-terminale H-Ras Oktapeptid **1a** enthält einen säurelabilen Farnesylthioether und zwei basenlabile Palmitoylthioester. Zusätzlich befinden sich eine Serin-OH-Gruppe und insbesondere eine Lysin- ϵ -Aminogruppe in unmittelbarer Nähe der Thioester, die die Gefahr einer $S \rightarrow O$ und $S \rightarrow N$ Acylwanderung im Laufe der Synthese bergen. Deshalb sollten die Zielpeptide **1a** und **1b** aus den zwei selektiv entschützten und entsprechend modifizierten Tripeptidbausteinen **2a,b** und **3a,b**, einem geeignet geschützten Lysinderivat und dem *S*-farnesyliertem Cysteinmethyl ester **5** synthetisiert werden.

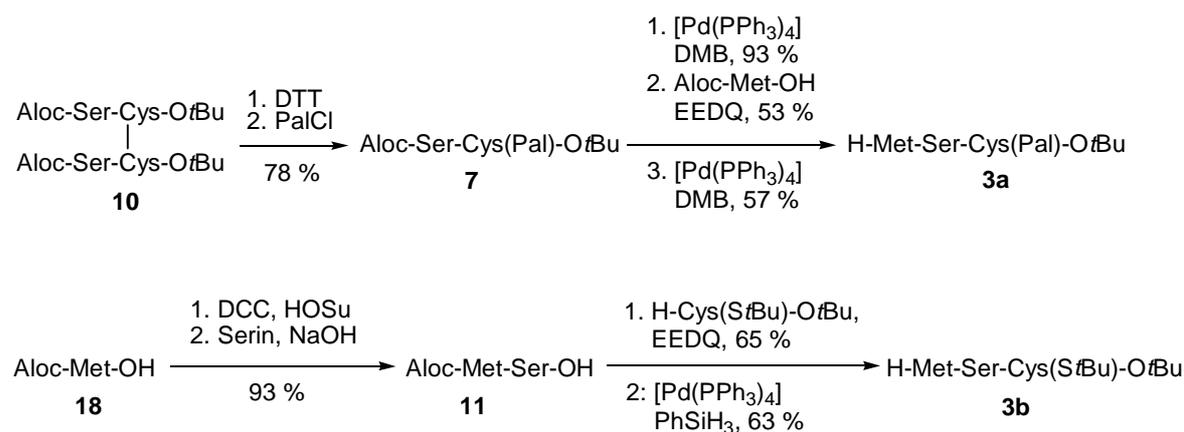


Schema 20: Synthese der selektiv deblockierten Tripeptidbausteine **2a** und **2b**

Die N-terminalen Tripeptide **2a,b** waren ohne weitere Schwierigkeiten aus den entsprechenden Aminosäuren zugänglich. Durch Verwendung einer *N*-Hydroxysuccin-

imid-vermittelten Kupplung im ersten Schritt konnte die hohe Effizienz dieser Synthesesequenz erreicht werden.

Bei der Synthese des palmitoylierten Tripeptids **3a** konnten Bedingungen für eine selektive *S*-Acylierung in Gegenwart der Serin-OH-Gruppe gefunden werden. Die anschließende Aloc-Abspaltung erfolgte durch Palladium(0)-katalysierten Allyltransfer auf Dimethylbarbitursäure (DMB) als Allylakzeptor. Tripeptid **3a** wurde schließlich durch Kondensation mit Aloc-Met-OH und erneute Behandlung mit Pd(PPh₃)₄/DMB erhalten.

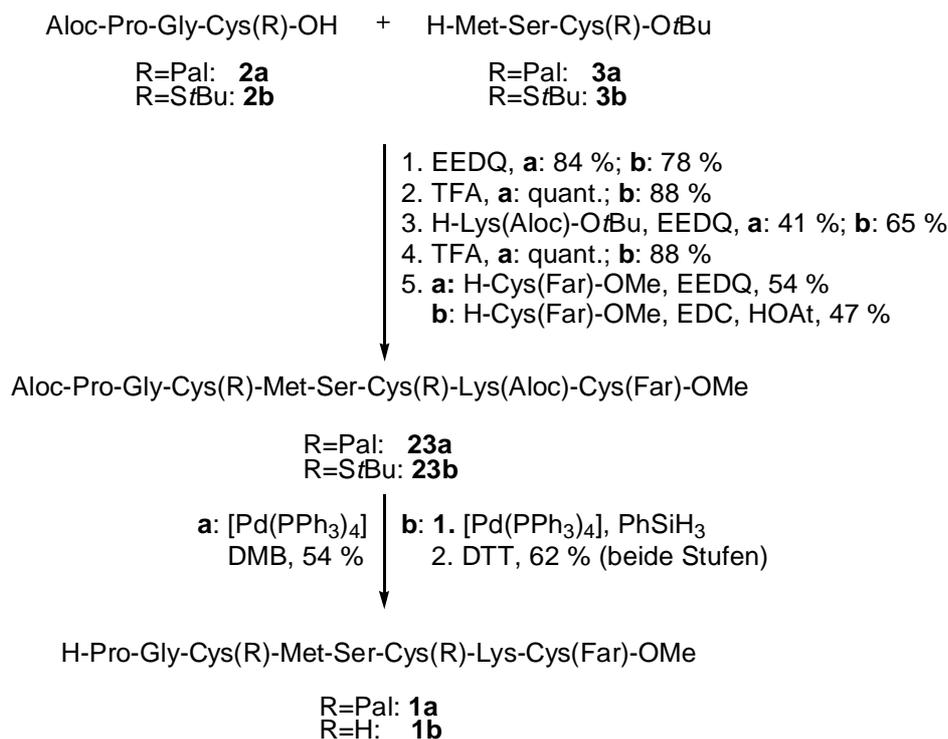


Schema 21: Synthese der N-terminal freien Tripeptidbausteine **3a** und **3b**

Der entsprechende als *S-tert*-Butyldisulfid geschützte Baustein **3b** wurde hingegen durch eine HOSu-vermittelte Kupplung, Kondensation mit H-Cys(*S*t**Bu)-OtBu und Pd⁰-katalysierte Entfernung der N-terminalen Schutzgruppe hergestellt. Alternativ zur Aloc-Gruppe kam hier die Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) ebenfalls zu Einsatz.

Der Aufbau des vollständig modifizierten Oktapeptids **1a** begann mit der Blockkondensation der Tripeptidbausteine **2a** und **3a**. Der C-terminale *tert*-Butylester des erhaltenen Hexapeptids wurde selektiv entfernt, und durch eine Reaktionsfolge bestehend aus Kettenverlängerung mit H-Lys(Aloc)-OtBu, erneute *tert*-Butylesterspaltung und Kondensation mit dem farnesylierten Cysteinmethylester **5** wurde das geschützte Oktapeptid **23a** hergestellt. Ausgehend von dieser Verbindung gelang die Synthese von Zielpeptid **1a** durch selektive Spaltung beider Urethangruppen mit Hilfe von Pd⁰-vermittelten Allyltransfer.

Durch die gleiche Sequenz von Kupplungs- und Entschützungsschritten wurde das Bis-Disulfid geschützte Oktapeptid **23b** ausgehend von der Tripeptiden **2b** und **3b** synthetisiert, das durch Palladium(0)-Katalyse und anschließende Reduktion der Disulfide mit Dithiothreitol in das Zielpeptid **1b** umgewandelt wurde.



Schema 22: Synthese der Zielpeptide **1a** und **1b**

Die in dieser Synthese eingesetzten Schutzgruppenmanipulationen waren vollständig orthogonal zueinander, d. h. die Schutzgruppen konnten selektiv aus dem Molekül entfernt werden, ohne die jeweils anderen zu beeinträchtigen. Zusätzlich blieben während aller Transformationen die basenlabilen Thioester und die säurelabile Farnesylgruppe vollständig erhalten und eine $S \rightarrow O$ oder $S \rightarrow N$ Acylwanderung wurde nicht beobachtet.

Die mit Peptid **1a** und anderen lipidierten Peptiden am *Cancer Center* der UCSF durchgeführten Untersuchungen zur Aktivierung von Raf durch Ras blieben ohne Ergebnis, da eine vormals erfolgreiche in vitro-Aktivierung von Raf nicht gelang.

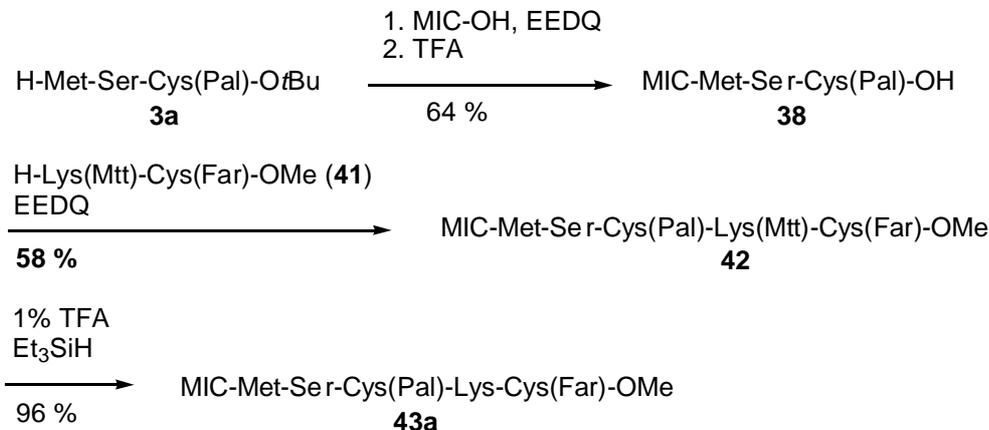
Das in wässrigen Medien besser lösliche Peptid **1b** wurde in der Untersuchung der Bindung zwischen Ras und der PI 3-Kinase γ eingesetzt. Ein Effekt konnte hierbei nicht beobachtet werden, so dass die Art der Wechselwirkung dieser beiden Proteine im molekularen Detail weiterhin ungeklärt ist.

Für die Herstellung der im zweiten Projekt anvisierten Zielstrukturen musste zunächst eine Schutzgruppe gefunden werden, die in Gegenwart von Thioester, Farnesylgruppe und Maleinimid aus dem Molekül entfernt werden konnte. Die detaillierte Suche nach verwendbaren Abspaltungsbedingungen für die im ersten Projekt verwendete Aloc-Gruppe zeigte, dass dieses Urethan wegen einer Unverträglichkeit des Maleinimids mit den im

Rahmen dieser Arbeit und in früheren Untersuchungen⁶⁷ getesteten verschiedenen Arten von Allylaketoren nicht geeignet ist. Auch für die Phenylacetyl- und die Trimethylsilyl-ethoxycarbonylgruppe konnten keine geeigneten Abspaltungsbedingungen gefunden werden.

Erfolgreich verlief die Untersuchung saurer Abspaltungsmethoden. Sowohl die *tert*-Butoxycarbonyl- (Boc) als auch die Methyltritylgruppe (Mtt) konnten selektiv in Gegenwart der säurelabilen Farnesylgruppe abgespalten werden. Im Falle der Abspaltung der Boc-Gruppe ließen sich jedoch die an einem Dipeptid als Testsubstrat ausgearbeiteten Abspaltungsbedingungen nicht auf das vorliegende synthetische Problem übertragen.

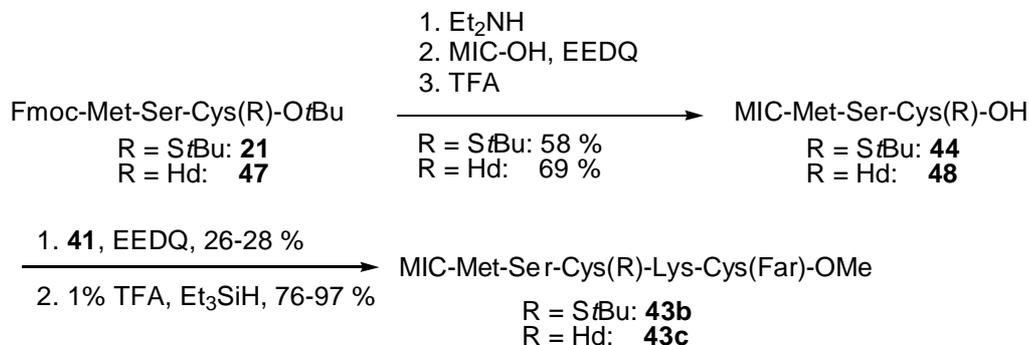
Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die lipidierten und Maleinimidocaproyl-modifizierten Zielseptide unter Verwendung der Mtt-Schutzgruppe synthetisiert. Dazu wurde das Tripeptid **3a** mit dem Maleinimid-Linker modifiziert und durch Behandlung mit TFA in den Baustein **38** umgewandelt. Durch anschließende Blockkondensation mit dem Mtt-geschützten Dipeptid **41** wurde das palmitoylierte Pentapeptid **42** erhalten, das durch Abspaltung der Methyltritylgruppe mit einer hervorragenden Ausbeute von 96 % zu dem Zielseptid **43a** umgesetzt wurde.



Schema 23: Synthese des palmitoylierten Zielseptids **43a**

Die Synthese der analogen Zielseptide **43b** und **43c** erfolgte ebenfalls nach der Mtt-Strategie aus den entsprechend modifizierten MIC-Tripeptiden **44** und **48**. Das als *S-tert*-Butyldisulfid geschützte Peptid **44** war direkt aus **21** zugänglich, und für das hexadecylierte, Maleinimidocaproyl-modifizierte Peptid **48** wurde eine analoge Syntheseroute ausgearbeitet.

Die Abspaltung der Mtt-Gruppe ergab auch im Falle der Pentapeptide **45** und **49** mit 76 bzw. 97 % gute bis hervorragende Ausbeuten, die die Verwendbarkeit dieser Schutzgruppe in der Synthese lipidierter Peptide eindrucksvoll belegen.



Schema 24: Synthese der Zielpeptide **43b** und **43c**

Der Einsatz der Maleinimidocaproyl-modifizierten Pentapeptide **43a-c** in Protein-Peptid-Kupplungsexperimenten hat in ersten Versuchen zu schlechteren Ausbeuten als in einer früheren Untersuchung⁴⁷ geführt. Ob sich dieses Ergebnis jedoch durch Optimierung der Reaktionsbedingungen verbessern lässt, ist noch nicht abzusehen.

5.2. Ausblick

Die Untersuchungen über die Verwendbarkeit verschiedener Arten von Schutzgruppen in der Synthese lipidierter Peptide führten dazu, dass neben der in der Synthese der Maleinimidocaproyl-modifizierten Peptide erfolgreich eingesetzten Methyltritylschutzgruppe weitere Schutzgruppen als „möglicherweise geeignet“ eingeordnet werden konnten. Hierzu zählen unter anderem die Teoc- und die Boc-Gruppe.

Ein sehr wichtiges Ergebnis ist aber vor allem, dass die Farnesylgruppe TFA-Lösungen in Konzentrationen von 5 % unbeschadet für eine Stunde ausgesetzt sein kann. Diese Konzentrationen sollten auch für die Abspaltung von *N*-Tritylgruppen und in der Labilität ähnlichen Tritylderivaten geeignet sein, was auch durch parallele Untersuchungen gestützt wird, in denen die Abspaltung einer *N*-Fluorenylphenyl-⁸⁰ und einer *S*-Methoxymethylgruppe⁸¹ in Gegenwart eines Prenylrestes mit ähnlich erfreulichen Ergebnissen wie bei der Mtt-Gruppe gelang.

Die Synthese lipidierter Protein-Peptid-Konstrukte mit der Maleinimidmethode erlaubt eine wesentlich tiefer gehende Analyse der biologischen Rolle der unterschiedlichen Lipidgruppen und eventuell auch der Aminosäuresequenzen als es lipidmodifizierte

Oligopeptide allein ermöglichen. Doch enthalten diese Konjugate eine Succinimidbrücke, deren Einfluss auf Struktur und Wirkung der Makromoleküle unbekannt ist. Wünschenswert wäre es daher sicherlich für vergleichende Untersuchungen, ein vollständig natives Konjugat herstellen zu können. Hierfür gibt es mehrere Ansätze, die in Abschnitt 2.4 näher erläutert sind.

In den letzten Jahren erfreute sich die als *Native Chemical Ligation* oder auch *Expressed Protein Ligation* bezeichnete Methode besonderer Beliebtheit, weil beide Kupplungskomponenten, ein Thioester und ein Polypeptid mit N-terminalem Cystein, molekularbiologisch zugänglich sind. Die Anwendung dieser Methode auf die in dieser Arbeit untersuchte Kupplungsreaktion bedeutet, dass das verkürzte Ras-Protein C-terminal in einen Thioester enden und dass das Peptid statt des Maleinimidocaproyl-Linkers ein vollständig geschütztes Cystein enthalten muss. Letzteres birgt aber ein Problem in sich: Neben dem freien Cystein befindet sich auch der Palmitoylthioester im Molekül. Bei der Herstellung des Zielpeptids muss also bereits eine mögliche Umesterung dieses Aktivesters verhindert werden. Noch problematischer dürfte die Konjugatsynthese verlaufen. Hier gilt es, selektiv nur den Thioester der Proteinkomponente an einer Umesterung, die den ersten Schritt der Konjugatbildung darstellt, teilnehmen zu lassen, während der Palmitoylthioester weder von dem im Reaktionsmedium in deutlichem Überschuss vorhandenen Thiol noch von dem N-terminalen Cystein angegriffen werden darf. Von daher scheint diese Methode für die Synthese nativer, *S*-acylierter Konjugate nicht geeignet. Für die Konjugatsynthese mit Lipopeptiden ohne eine *S*-Acylgruppe erscheint diese Methode jedoch äußerst vielversprechend.

Eine zweite Methode zur Synthese nativer Konjugate nutzt die Umsetzung einer Thiosäure mit einem Peptid, das N-terminal ein Bromalanin trägt (siehe Abschnitt 2.4). Dieser Ansatz könnte auch für die Synthese *S*-acylierter Konjugate geeignet sein, bringt jedoch den großen Nachteil mit sich, dass die Thiosäure, im Falle der Ras-Konjugate das verkürzte Ras-Protein, nicht molekularbiologisch zugänglich ist. Hier wäre es sicherlich interessant, einen Weg zur Herstellung von Thiosäuren aus Thioestern in Polypeptiden zu finden, zum Beispiel durch Umsetzung mit Hydrogensulfid oder Disulfiden gefolgt von einer Reduktion.

Zur Zeit stellt aber für die Synthese *S*-palmitoylierter Protein-Peptid-Konjugate die in dieser Arbeit angewandte Maleinimidmethode die bessere Methode dar.

6. Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Hilfsmittel

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit folgenden Geräten aufgenommen:

250 MHz (^1H) und 63 MHz (^{13}C):	Bruker AC-250
400 MHz (^1H) und 100 MHz (^{13}C):	Bruker AM-400
500 MHz (^1H) und 125 MHz (^{13}C):	Bruker DRX-500

Die chemischen Verschiebungen δ beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS) als internen Standard und sind im ppm angegeben. Die verwendeten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische sind an den entsprechenden Stellen vermerkt. Signale von Rotameren sind, falls nötig, in eckigen Klammern [] angegeben. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben, wobei die Signalmultiplizitäten wie folgt abgekürzt sind: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, b = verbreitertes Signal.

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ wurden mit dem Polarimeter 241 von Perkin-Elmer ermittelt. Sie sind auf die Natrium-D-Linie bei einer Wellenlänge von 589 nm bezogen. Lösungsmittel und Konzentrationen (in g/100 ml) sind an den entsprechenden Stellen vermerkt.

Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktapparatur 530 der Firma Büchi gemessen und sind nicht korrigiert.

EI- und FAB-Massenspektren wurden mit dem Gerät Mat MS 90 der Firma Finnigan aufgenommen. FAB-Massenspektren wurden in 3-Nitrobenzylalkohol (3-NBA) oder 3-NBA/TFA-Gemischen als Matrix aufgenommen. Angegeben sind die m/z -Werte.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einer Voyager BioSpectrometry Workstation der Firma Perseptive Biosystems in einer Dihydroxybenzoesäurematrix (DHB) bei 22500 Volt Beschleunigungsspannung aufgenommen.

Elementaranalysen wurden mit einem Verbrennungsautomaten der Firma Haeraeus ermittelt.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden UV-markierte Kieselgelplatten (Kieselgel 60_{F254}) der Firmen Merck, Aldrich und Macherey&Nagel verwendet. Zur Detektion wurde

UV-Licht der Wellenlängen 254 bzw. 366 nm und zur Anfärbung folgende Reagentien verwendet:

- A: 2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 1 g Cer(IV)sulfat, 6 ml konz. H₂SO₄, und 94 ml Wasser
- B: 300 mg Ninhydrin, 3 ml Eisessig, 997 ml Ethanol

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten mit Kieselgel (Korngröße 40 – 64 µm) der Firmen Baker, Merck und Macherey&Nagel bei einem Überdruck von 0.5 bar. Größenausschlusschromatographie wurde mit Sephadex LH-20 und Chloroform/Methanol 1:1 als Eluens ohne Überdruck durchgeführt.

Die eingesetzten Aminosäuren sowie einige Edelmetallverbindungen wurden von der DEGUSSA-Hüls AG gespendet. Die übrigen Chemikalien wurden je nach Verfügbarkeit von den Firmen Acros, Avocado, Aldrich, Fluka, Merck, Novabiochem und Riedel de Haën bezogen.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach Standardverfahren getrocknet.

6.2 Versuche zur Synthese der Oktapeptide

6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2

N-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycin

Aloc-Pro-Gly-OH (8)

Zu einer Lösung von 1.00 g *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolin⁸² **14** (5.02 mmol, 1 Äquivalent) und 0.58 g *N*-Hydroxysuccinimid (5.02 mmol, 1 Äquivalent) in 20 ml absolutem THF werden bei 0 °C 1.24 g DCC (6.02 mmol, 1.2 Äquivalente) gegeben. Nach 20 Stunden wird vom ausgefallenen Harnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 5 ml Dioxan aufgenommen und bei 0 °C langsam zu einer Lösung von 0.57 g Glycin (7.53 mmol, 1.5 Äquivalente) und 0.30 g NaOH (7.53 mmol, 1.5 Äquivalente) in 10 ml Wasser getropft. Während der Zugabe wird der ungelöste Harnstoff abfiltriert. Nach 3 Tagen wird der pH-Wert auf etwa 8 eingestellt und die Lösung dreimal mit je 10 ml Essigester gewaschen. Die organische Phase wird verworfen und der pH-Wert der wässrigen Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf 3 abgesenkt. Erneutes dreimaliges Extrahieren mit je 10 ml Essigester, Trocknen über MgSO₄, Filtrieren und Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum liefert das Produkt als viskoses Öl.

Ausbeute 1.19 g (4.65 mmol, 93 %).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -58.9 \text{ (c=1.0, CHCl}_3\text{)}$$

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ= 5.75–5.96 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.10–5.31 (m, 2 H, CH₂=CH), 4.48–4.57 (b, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 4.23–4.34 (m, 1 H, α-CH Pro), 3.81–3.99 (m, 2 H, α-CH₂ Gly), 3.38–3.54 (m, 2 H, δ-CH₂ Pro), 1.81–2.11 (m, 4 H, β-CH₂ Pro, γ-CH₂ Pro) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): δ= 173.0 [173.5] (C=O Pro), 171.4 (C=O Gly), 155.9 [155.3] (C=O Urethan), 132.5 (H₂C=CH), 117.7 (H₂C=CH), 66.4 (CH₂=CH-CH₂O), 60.6 (α-CH Pro), 47.0 [47.4] (CH₂), 41.1 (CH₂), 29.5 [31.2] (CH₂), 24.4 [23.5] (CH₂) ppm

C₁₁H₁₆N₂O₅ (256.26)

MS (EI): 256.1 [M]⁺ (3 %)

HRMS (EI) ber.: 256.1059
gef.: 256.1068.

Bis(*N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl)-*L*-cystin-bis(*tert*-butylester)

(Aloc-Pro-Gly-Cys-OtBu)₂ (**6**)

Zu einer Lösung von 1.21 g *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycin **8** (4.72 mmol, 2.5 Äquivalente) und 665 mg Cystin-*tert*-butylester⁵⁵ **9** (1.89 mmol, 1 Äquivalent) in 35 ml trockenem Methylenchlorid werden 1.4 g EEDQ (5.66 mmol, 3 Äquivalente) gegeben. Nach 15 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in 100 ml Essigester aufgenommen. Es wird je zweimal mit 50 ml 0.5 *N* Salzsäure und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Produkt durch Flash-Chromatographie (Essigester/Ethanol 19:1) als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 949 mg (1.15 mmol, 61 %)

R_f=0.17 (Essigester/Ethanol 19:1)

Smp: 65 °C

[α]_D²⁰ = -40.0 (c=1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ= 5.85–6.01 (m, 2 H, CH₂=CH), 5.32 [5.25] (d, 2 H, *J*=17.2 Hz, CH_{2a}=CH), 5.20 [5.15] (d, 2 H, *J*=10.5 Hz, CH_{2b}=CH), 4.51–4.64 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂, α-CH Cys), 4.23–4.28 [4.32–4.36] (m, 2 H, α-CH Pro), 3.83–3.99 (m, 4 H, α-CH₂ Gly), 3.45–3.62 (m, 4 H, δ-CH₂ Pro), 3.19 (dd, 2 H, *J*=13.9 Hz, *J*=5.3 Hz, β-CH_{2a} Cys), 2.95–3.05 (m, 2 H, β-CH_{2b} Cys), 2.19–2.31 (m, 2 H), 1.82–2.13 (m, 6 H), 1.47 [s, 18 H, CO₂C(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 175.3 [175.6] (C=O Cys), 171.5 [170.9] (C=O Pro), 170.7 (C=O Gly), 156.8 [154.3] (C=O Urethan), 134.1 (H₂C=CH), 117.9 [117.5] (H₂C=CH), 83.5 [83.6] [CO₂C(CH₃)₃], 67.3 [67.0] (CH₂=CH-CH₂O), 62.2 [61.6] (α-CH Pro), 53.9 [54.1, 53.7] (α-CH Cys), 48.1 [48.4] (α-CH₂ Gly), 43.4 [43.1] (CH₂), 40.6 [41.2] (CH₂), 31.3 [32.5], 28.2 [CO₂C(CH₃)₃], 25.5 [24.5] ppm

C₃₆H₅₆N₆O₁₂S₂ (828.99)

MS (FAB, 3-NBA): 867.3 [M+K]⁺, 851.3 [M+Na]⁺, 829.3 [M+H]⁺, 717.2 [M-2tBu]⁺.

Elementaranalyse:

ber.: C: 52.16 % H: 6.81 % N: 10.14 %

gef.: C: 52.26 % H: 6.83 % N: 9.96 %.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Pro-Gly-Cys(Pal)-OtBu

Eine Lösung von 470 mg Bis(*N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl)-*L*-cystin-bis(*tert*-butylester) **6** (0.568 mmol, 1 Äquivalent) und 160 µl Triethylamin (1.14 mmol, 2 Äquivalente) in 5 ml trockenem Methylenchlorid wird unter Argon mit 350 mg Dithiothreitol (2.27 mmol, 4 Äquivalente) versetzt. Nach 30 Minuten wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Reduktionsprodukt durch Flash-Chromatographie isoliert (Hexan/Essigester 1:2, dann Essigester, $R_f=0.32$ in Essigester). Der *N*-Allyloxy-carbonyl-*L*-prolyl-glycyl-cystein-*tert*-butylester (410 mg, 0.988 mmol, 1 Äquivalent) wird in 5 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und bei 0 °C mit 150 µl Triethylamin (1.09 mmol, 1.1 Äquivalente) und 299 mg Palmitoylchlorid (1.09 mmol, 1.1 Äquivalente) versetzt. Nach einer Stunde wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie isoliert (Hexan/Essigester 1:2). Ausbeute 629 mg (0.962 mmol, 85 % über beide Stufen) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.68$ (Essigester)

Smp: 43 °C

$[\alpha]_D^{20} = -15.8$ (c=1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta=7.24$ (b, 1 H, NH), 6.85 (b, 1 H, NH), 5.85–6.0 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.31 (d, 1 H, $J=17.1$ Hz, CH_{2a}=CH), 5.21 (d, 1 H, $J=10.2$ Hz, CH_{2b}=CH), 4.55–4.68 (m, 3 H, 2 CH₂=CH-CH₂, α -CH Cys), 4.30–4.36 (m, 1 H, α -CH Pro), 4.03–4.15 (m, 1 H, α -CH_{2a} Gly), 3.85 (dd, 1 H, $J=16.9$ Hz, $J=5.2$ Hz, α -CH_{2b} Gly), 3.45–3.62 (m, 2 H, δ -CH₂ Pro), 3.42 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=4.6$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 3.22–3.33 (m, 1 H, β -CH_{2b} Cys), 2.54 (t, 2 H, $J=7.6$ Hz, α -CH₂ Pal), 2.15–2.31 (m, 1 H, Pro), 1.82–2.13 (m, 3 H, Pro), 1.59–1.66 (m, 2 H, β -CH₂ Pal), 1.46 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.25 [s, 24 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS], 0.88 (t, 3 H, $J=6.8$ Hz, ω -CH₃ Pal) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 198.5 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COS}$], 172.3 (C=O), 168.9 (2 * C=O), 155.8 (C=O Urethan), 132.6 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 117.6 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 82.7 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 66.3 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 60.7 (α -CH Pro), 52.6 (α -CH Cys), 47.0 (CH_2), 44.0 (CH_2), 42.9 (CH_2), 31.9 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.9 (CH_2), 27.8 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 25.5 (CH_2), 24.6 (CH_2), 22.6 (CH_2), 14.1 (CH_3 Pal) ppm

$\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ (653.92)

MS (EI): 653.4 [M] $^+$ (0.7 %), 597.3 [$\text{M}-t\text{Bu}$] $^+$ (3 %), 358.3 [$\text{M}-t\text{Bu-Pal}$] $^+$ (6 %)

HRMS (EI) ber.: 653.4058

gef.: 653.4073

Elementaranalyse:

ber.: C: 62.45 % H: 9.09 % N: 6.43 %

gef.: C: 62.18 % H: 9.20 % N: 6.69 %.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein**

Aloc-Pro-Gly-Cys(Pal)-OH (**2a**)

Eine Lösung von 36 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester (0.055 mmol) in 0.5 ml Methylenchlorid wird mit 0.5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach drei Stunden werden 5 ml Toluol zugegeben und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

Ausbeute 35 mg (0.055 mmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.54$ (Chloroform/Methanol 2:1)

$[\alpha]_D^{20} = -13.8$ ($c=1.1$, CHCl_3)

^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ =5.85–6.00 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.31 [5.25] (d, 1 H, $J=17.3$ Hz, $\text{CH}_{2a}=\text{CH}$), 5.19 [5.15] (d, 1 H, $J=10.6$ Hz, $\text{CH}_{2b}=\text{CH}$), 4.55–4.66 (m, 3 H, 2 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$, α -CH Cys), 4.22–4.26 [4.30–4.36] (m, 1 H, α -CH Pro), 3.99 [3.88] (d, 1 H, $J=16.9$ Hz, α - CH_{2a} Gly), 3.77 [3.83] (d, 1 H, $J=17.0$ Hz, α - CH_{2b} Gly), 3.45–3.61 (m, 3 H, δ - CH_2 Pro, β - CH_{2a} Cys), 3.12–3.23 (m, 1 H, β - CH_{2b} Cys), 2.55 (t, 2 H, $J=7.3$ Hz, 2 α - CH_2 Pal), 2.18–2.30 (m, 1 H, Pro), 1.98–2.13 (m, 2 H, Pro), 1.88–1.95

(m, 1 H, Pro), 1.59–1.68 (m, 2 H, 2 β -CH₂ Pal), 1.28 [s, 24 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS], 0.90 (t, 3 H, J =6.8 Hz, ω -CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ = 200.2 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 175.5 [175.8] (C=O), 173.2 (C=O), 171.6 [171.0] (C=O), 156.9 [156.4] (C=O Urethan), 134.2 (H₂C=CH), 117.8 [117.6] (H₂C=CH), 67.4 [67.2] (CH₂=CH-CH₂O), 62.2 [61.7] (α -CH Pro), 53.5 (α -CH Cys), 48.1 (CH₂), 44.8 (CH₂), 43.5 [43.3] (CH₂), 33.1 (CH₂), 32.5 (CH₂), 31.3 (CH₂), 31.1 (CH₂), 30.8 (CH₂), 30.8 (CH₂), 30.7 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 30.0 (CH₂), 26.7 (CH₂), 25.6 (CH₂), 24.6 (CH₂), 23.8 (CH₂), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₃₀H₅₁N₃O₇S (597.81)

MS (FAB, 3-NBA): 620.4 [M+Na]⁺, 597.3 [M+H]⁺, 360.2 [M⁺-Pal+H]⁺

Elementaranalyse:

ber.: C: 62.45 % H: 9.09 % N: 6.43 %

gef.: C: 62.18 % H: 9.20 % N: 6.69 %.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Pro-Gly-Cys(*St*Bu)-*Ot*Bu

Eine Lösung von 576 mg Bis(*N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-cystin)-bis(*tert*-butylester) **6** (0.694 mmol, 1 Äquivalent), 313 ml *S*-*tert*-Butanthiol (2.78 mmol, 4 Äquivalente) und 194 μ l Triethylamin (1.39 mmol, 2 Äquivalente) in 5 ml Methylenchlorid wird 3 Wochen bei Raumtemperatur (Luftaustausch muss möglich sein) gerührt. Das zähe Öl wird in 20 ml Essigester aufgenommen und mit 10 ml Wasser sowie je zweimal mit 10 ml 0.5 *N* Salzsäure und 10 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie (Essigester) isoliert.

Ausbeute: 465 mg (0.922 mmol, 66 %) eines farblosen Öles.

R_f=0.56 (Essigester)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -49.8$ (c=1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ =5.88–6.02 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.32 [5.26] (dd, 1 H, J =17.2 Hz, J =1.3 Hz, CH_{2a}=CH), 5.21 [5.16] (d, 1 H, J =10.5 Hz, CH_{2b}=CH), 4.50–4.66

(m, 3 H, 2 CH₂=CH-CH₂, α-CH Cys), 4.24 [4.33] (dd, 1 H, *J*=8.2 Hz, *J*=4.6 Hz, α-CH Pro), 3.85–3.96 (m, 2 H, α-CH₂ Gly), 3.45–3.62 (m, 2 H, δ-CH₂ Pro), 3.16 (dd, 1 H, *J*=13.5 Hz, *J*=5.2 Hz, β-CH_{2a} Cys), 3.02 (dd, 1 H, *J*=13.5 Hz, *J*=8.4 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.18–2.33 (m, 1 H, Pro), 1.85–2.11 (m, 3 H, Pro), 1.47 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.33 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ=175.5 [175.8] (C=O), 171.6 [171.0] (C=O), 170.9 (C=O), 156.9 [156.4] (C=O Urethan), 134.2 (H₂C=CH), 117.9 [117.6] (H₂C=CH), 83.5 [83.6] [CO₂C(CH₃)₃], 67.4 [67.2] (CH₂=CH-CH₂O), 62.3 [61.2] (α-CH Pro), 54.1 (α-CH Cys), 48.8 [SC(CH₃)₃], 48.1 [48.5] (CH₂), 43.4 [43.2] (CH₂), 42.5 [42.9] (CH₂), 31.3 [32.5] (CH₂), 30.3 [SC(CH₃)₃], 28.3 [CO₂C(CH₃)₃], 25.6 [24.5] (CH₂) ppm

C₂₂H₃₇N₃O₆S₂ (503.67)

MS (EI, 130 °C): 503.2 [M]⁺ (0.6 %), 447.2 [M-*t*Bu]⁺ (4 %), 391.1 [M-2*t*Bu]⁺ (45 %)

HRMS (EI) ber.: 503.2124

gef.: 503.2114.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein**

Aloc-Pro-Gly-Cys(*St*Bu)-OH (**2b**)

Eine Lösung von 550 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester (1.09 mmol, 1 Äquivalent) und 257 µl Thioanisol (2.18 mmol, 2 Äquivalente) in 2 ml Methylenchlorid wird mit 2 ml TFA versetzt und nach einer Stunde im Vakuum ohne Heizbad eingengt. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie (10 % Essigsäure in Essigester) isoliert.

Ausbeute: 471 mg (1.05 mmol, 96 %) eines farblosen schaumigen Feststoffes.

R_f=0.11 (5 % Essigsäure in Essigester)

Smp: 61 °C

[α]_D²⁰ = -65.2 (c=1.1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ=8.1–8.5 (b, 1 H, CO₂H), 7.42–7.69 (m, 2 H, NH), 5.88–5.97 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.32 (d, 1 H, *J*=17.3 Hz, CH_{2a}=CH), 5.21 (d, 1 H, *J*=10.3 Hz, CH_{2b}=CH), 4.71–4.79 (m, 1 H, α-CH Cys), 4.52–4.65 (m, 2 H, 2 CH₂=CH-CH₂), 4.27–4.39 (m, 1 H, α-CH Pro), 4.20 (d, 1 H, *J*=16.7 Hz, α-CH_{2a} Gly), 3.84 (d,

1 H, $J=16.7$ Hz, α -CH_{2b} Gly), 3.45–3.62 (m, 2 H, δ -CH₂ Pro), 3.16–3.25 (m, 1 H, β -CH_{2a} Cys), 3.02–3.14 (m, 1 H, β -CH_{2b} Cys), 2.02–2.22 (m, 3 H, Pro), 1.83–1.96 (m, 1 H, Pro), 1.31 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta=173.2$ (C=O), 173.1 (C=O), 170.4 (C=O), 155.8 (C=O Urethan), 132.5 (H₂C=CH), 117.8 (H₂C=CH), 66.5 (CH₂=CH-CH₂O), 60.8 (α -CH), 60.4 (α -CH₂ Gly), 52.4 (α -CH), 48.1 [SC(CH₃)₃], 47.1 (CH₂), 42.9 (CH₂), 42.8 (CH₂), 29.9 [SC(CH₃)₃], 24.7(CH₂) ppm

C₁₈H₂₉N₃O₆S₂ (447.57)

MS (FAB, 3-NBA): 470.1 [M+Na]⁺, 448.1 [M+H]⁺, 391.1 [M-*t*Bu]⁺

HRMS (FAB) für [M+H]⁺ ber.: 448.1576

gef.: 448.1604.

6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.3

Bis-(*N*-Allyloxycarbonyl-*L*-seryl)-bis-(*L*-cystin-*tert*-butylester)

(Aloc-Ser-Cys-*Ot*Bu)₂ (**10**)

Eine Lösung von 600 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-serin⁸³ **15** (3.17 mmol, 2.5 Äquivalente) und 447 mg Cystin-bis(*tert*-butylester)⁵⁵ **9** (1.27 mmol, 1 Äquivalent) 4 ml Methylenchlorid wird auf 0 °C gekühlt und nacheinander mit 343 mg HOBt (2.54 mmol, 2 Äquivalente) und schließlich 491 μ l DIC (3.17 mmol, 2.5 Äquivalente) versetzt. Nach 18 Stunden wird der Harnstoff abfiltriert und das Filtrat je zweimal mit 5 ml 0.5 *N* Salzsäure und 5 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 1:2) isoliert.

Ausbeute: 607 mg (0.87 mmol, 69 %) eines farblosen, schaumigen und stark hygroskopischen Feststoffes.

R_f = 0.18 (Essigester/Hexan 2:1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): $\delta= 5.87$ – 5.99 (m, 2 H, CH₂=CH), 5.32 (dd, 2 H, $J=17.3$ Hz, $J=0.9$ Hz, CH_{2a}=CH), 5.19 (dd, 2 H, $J=10.5$ Hz, $J=1.4$ Hz, CH_{2b}=CH), 4.64 (dd, 2 H, $J=7.8$ Hz, $J=5.2$ Hz, α -CH Cys), 4.56 (d, 4 H, $J=5.2$ Hz, CH₂=CH-CH₂), 4.28 (t, 2 H,

$J=5.2$ Hz, α -CH Ser), 3.73–3.83 (m, 4 H, β -CH₂ Ser), 3.19 (dd, 2 H, $J=13.8$ Hz, $J=5.2$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 3.05 (dd, 2 H, $J=13.9$ Hz, $J=7.8$ Hz, β -CH_{2b} Cys), 1.47 [s, 18 H, CO₂C(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): $\delta=$ 172.8 (C=O), 170.79 (C=O), 158.3 (C=O Urethan), 134.2 (H₂C=CH), 117.8 (H₂C=CH), 83.7 [CO₂C(CH₃)₃], 66.8 (CH₂=CH-CH₂O), 63.3 (β -CH₂ Ser), 58.3 (α -CH Ser), 54.2 (α -CH Cys), 41.0 (β -CH₂ Cys), 28.2 [CO₂C(CH₃)₃] ppm

C₂₈H₄₆N₄O₁₂S₂ (694.81)

MS (FAB, 3-NBA): 733 [M+K]⁺, 717.3 [M+Na]⁺, 695.3 [M+H]⁺, 639.3 [M-*t*Bu+H]⁺, 583.2 [M-2*t*Bu+H]⁺

HRMS (FAB) für [M+H]⁺ ber.: 695.2632
gef.: 695.2706.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Ser-Cys(Pal)-O*t*Bu (**7**)

Eine Lösung von 366 mg Bis(*N*-Allyloxycarbonyl-*L*-seryl)-*L*-cystin-bis(*tert*-butylester) **10** (0.527 mmol, 1 Äquivalent) und 147 μ l Triethylamin (1.05 mmol, 2 Äquivalente) in 3 ml absolutem Methylenchlorid wird unter Argon mit 325 mg Dithiothreitol (2.11 mmol, 4 Äquivalente) versetzt. Nach 2 Stunden wird die Lösung mit weiteren 10 ml Methylenchlorid verdünnt, dreimal mit je 5 ml Wasser ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand (348 mg, 1.00 mmol) wird in 3 ml absolutem Methylenchlorid aufgenommen und mit 153 μ l Triethylamin (1.10 mmol, 1.1 Äquivalente) versetzt wird. Bei – 15 °C wird portionsweise eine Lösung von 302 mg Palmitoylchlorid (1.10 mmol, 1.1 Äquivalente) in 2 ml Methylenchlorid zugegeben (über 40 Minuten). Nach Abschluss der Zugabe wird die Temperatur für 30 Minuten auf 0 °C erhöht und dann das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie isoliert (Hexan/EE 2:1).

Ausbeute: 482 mg (0.822 mmol, 78 %) eines wachsartigen farblosen Feststoffes.

R_f=0.58 (Hexan/Essigester 1:1)

Smp: 53 °C

$[\alpha]_D^{20} = -10.3$ (c=1.1, CHCl₃)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ = 5.91–5.99 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.32 (d, 1 H, $J=17.3$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}=\text{CH}$), 5.18 (dd, 1 H, $J=10.5$ Hz, $J=1.4$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}=\text{CH}$), 4.56 (d, 2 H, $J=5.3$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 4.50 (dd, 1 H, $J=7.3$ Hz, $J=5.0$ Hz, $\alpha\text{-CH Cys}$), 4.21 (t, 1 H, $J=5.5$ Hz, $\alpha\text{-CH Ser}$), 3.71–3.80 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ Ser), 3.77 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=5.0$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2\text{a}}$ Cys), 3.72 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=7.3$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2\text{b}}$ Cys), 2.57 (t, 2 H, $J=7.5$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$ Pal), 1.59–1.66 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ Pal), 1.46 [s, 9 H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.28 [s, 24 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$], 0.90 (t, 3 H, $J=6.8$ Hz, $\omega\text{-CH}_3$ Pal) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): δ = 199.9 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COS}$], 172.7 (C=O), 170.3 (C=O), 158.2 (C=O Urethan), 134.2 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 117.8 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 83.7 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 66.8 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 63.2 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 58.2 ($\alpha\text{-CH}$), 54.3 ($\alpha\text{-CH Cys}$), 44.7 ($\beta\text{-CH}_2$ Cys), 33.0 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.7 (CH_2), 30.6 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.4 (CH_2), 30.0 (CH_2), 28.2 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 26.2 (CH_2), 23.8 (CH_2), 14.5 (CH_3 Pal) ppm.

$\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ (586.83)

MS (FAB, 3-NBA): 609.4 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 587.4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 531.4 [$\text{M-}t\text{Bu}+\text{H}$] $^+$

MS (EI, 165 °C): 586.4 [M] $^+$ (1 %), 556.5 [$\text{M-CH}_2\text{O}$] $^+$ (12 %), 530.4 [$\text{M-}t\text{Bu}$] $^+$ (24 %)

HRMS (EI, 165 °C) ber.: 586.3651

gef.: 586.3670

Elementaranalyse:

ber.: C: 61.40 % H: 9.27 % N: 4.77 %

gef.: C: 61.39 % H: 9.29 % N: 4.51 %.

***L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

H-Ser-Cys(Pal)-*O**t*Bu

Zu einer Lösung von 1.88 g *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **7** (3.21 mmol, 1 Äquivalent) in 20 ml absolutem THF werden 1.00 g Dimethylbarbitursäure (6.42 mmol, 2 Äquivalente) und 184 mg Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (0.16 mmol, 5 Mol%) gegeben. Nach einer Stunde wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der orange Feststoff in 100 ml Essigester aufgenommen. Die Lösung wird zweimal mit je 50 ml einer Phosphat-Pufferlösung (pH 6.5) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie mit Essigester isoliert.

Ausbeute: 1.50 g (2.98 mmol, 93 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

$R_f=0.11$ (Essigester)

Smp: 35 °C

$[\alpha]_D^{20} = +5.1$ (c=1.1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 8.00$ (d, 1 H, $J=7.5$ Hz, NH), 4.71–4.74 (m, 1 H, α -CH Cys), 3.99 (dd, 1 H, $J=11.2$ Hz, $J=4.2$ Hz, β -CH_{2a} Ser), 3.65 (dd, 1 H, $J=11.1$ Hz, $J=5.6$ Hz, β -CH_{2b} Ser), 3.60 (dd, 1 H, $J=14.1$ Hz, $J=4.1$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 3.43 (dd, 1 H, $J=5.5$ Hz, $J=4.3$ Hz, α -CH Ser), 3.25 (dd, 1 H, $J=14.1$ Hz, $J=5.4$ Hz, β -CH_{2b} Cys), 2.56 (t, 2 H, $J=7.5$ Hz, α -CH₂ Pal), 2.07 (b, NH₂, OH), 1.64 (t, 2 H, $J=7.3$ Hz, β -CH₂ Pal), 1.49 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.26 [s, 24 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS], 0.89 (t, 3 H, $J=6.8$ Hz, ω -CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 199.4$ [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 173.9 (C=O Cys), 169.0 (C=O Ser), 83.1 [CO₂C(CH₃)₃], 65.3 (β -CH₂ Ser), 55.9 (α -CH Ser), 52.4 (α -CH Cys), 44.1 (β -CH₂ Cys), 31.9 (CH₂), 30.5 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.0 [CO₂C(CH₃)₃], 25.6 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₂₆H₅₀N₂O₅S (502.75)

MS (FAB, 3-NBA): 503.4 [M+H]⁺, 447.3 [M-*t*Bu+H]⁺, 239.3 [Pal]⁺, 209.1 [SerCys]⁺

Elementaranalyse:

ber.:	C: 62.12 %	H: 10.02 %	N: 5.57 %
gef.:	C: 62.42 %	H: 9.87 %	N: 5.41 %.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Met-Ser-Cys(Pal)-*Ot*Bu (**16**)

Eine Lösung von 34.9 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionin⁸³ **18** (0.149 mmol, 1.1 Äquivalente) und 68.3 mg *L*-Seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester (0.136 mmol, 1 Äquivalent) in 0.5 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 40.3 mg EEDQ (0.163 mmol, 1.2 Äquivalente) versetzt. Nach 40 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 1:1) isoliert.

Ausbeute: 51.5 mg (0.072 mmol, 53 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.22$ (Hexan/Essigester 1:1)

$[\alpha]_D^{20} = -5.4$ (c=1.0, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): $\delta = 5.90\text{--}5.98$ (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.31 (dd, 1 H, $J=17.2$ Hz, $J=1.5$ Hz, $\text{CH}_{2a}=\text{CH}$), 5.19 (dq, 1 H, $J=10.6$ Hz, $J=1.4$ Hz, $\text{CH}_{2b}=\text{CH}$), 4.56 (dd, 2 H, $J=3.4$ Hz, $J=1.5$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 4.50 (dd, 1 H, $J=7.2$ Hz, $J=5.1$ Hz, $\alpha\text{-CH Cys}$), 4.44 (t, 1 H, $J=5.4$ Hz, $\alpha\text{-CH Ser}$), 4.28 (dd, 1 H, $J=8.8$ Hz, $J=5.1$ Hz, $\alpha\text{-CH Met}$), 3.80 (dd, 1 H, $J=11.2$ Hz, $J=5.6$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Ser), 3.76 (dd, 1 H, $J=11.2$ Hz, $J=5.6$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Ser), 3.43 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=5.0$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Cys), 3.23 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=7.3$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Cys), 2.51–2.64 (m, 4 H, $\alpha\text{-CH}_2$ Pal, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.10 (s, 3 H, SCH_3 Met), darunter 2.07–2.15 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Met), 1.90–1.97 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Met), 1.59–1.65 (m, 2 H, 2 $\beta\text{-CH}_2$ Pal), 1.47 [s, 9 H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.28 [s, 24 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$], 0.90 (t, 3 H, $J=6.8$ Hz, $\omega\text{-CH}_3$ Pal) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz): $\delta = 200.0$ [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COS}$], 174.4 (C=O), 172.0 (C=O), 170.4 (C=O Cys), 158.6 (C=O Urethan), 134.3 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 117.8 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 83.8 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 66.8 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 62.9 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 56.5 ($\alpha\text{-CH}$), 55.7 ($\alpha\text{-CH}$), 54.3 ($\alpha\text{-CH Cys}$), 44.8 ($\beta\text{-CH}_2$ Cys), 33.1 (CH_2), 32.8 (CH_2 Met), 31.2 (CH_2 Met), 30.9 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.7 (CH_2), 30.6 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.4 (CH_2), 30.0 (CH_2), 28.2 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 26.9 (CH_2), 23.8 (CH_2), 15.3 (SCH_3 Met), 14.5 (CH_3 Pal) ppm

$\text{C}_{35}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ (718.02)

MS (FAB, 3-NBA): 740.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 718.3 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 662.3 [$\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}$] $^+$

Elementaranalyse:

ber.:	C: 58.55 %	H: 8.84 %	N: 5.85 %
gef.:	C: 58.49 %	H: 8.61 %	N: 5.54 %.

***L*-Methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**H-Met-Ser-Cys(Pal)-*Or*Bu (**3a**)

Eine Lösung von 100 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **16** (0.139 mmol, 1 Äquivalent) in 1 ml absolutem THF wird mit 34 μ l Phenylsilan (0.279 mmol, 2 Äquivalente) und 16 mg Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (0.0139 mmol, 10 Mol%) versetzt. Nach zwei Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 (Chloroform/Methanol 1:1) isoliert.

Ausbeute: 50 mg (0.0789 mmol, 57 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

$R_f=0.12$ (Ethanol/Essigester 1:9)

$[\alpha]_D^{20} = -20.9$ (c=1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta=8.06$ (d, 1 H, $J=7.7$ Hz, NH), 7.27 (d, 1 H, $J=7.3$ Hz, NH), 4.66–4.70 (m, 1 H, α -CH), 4.47–4.50 (m, 1 H, α -CH), 4.07 (dd, 1 H, $J=11.5$ Hz, $J=5.3$ Hz, β -CH_{2a} Ser), 3.60 (dd, 1 H, $J=11.5$ Hz, $J=4.7$ Hz, β -CH_{2b} Ser), 3.59 (dd, 1 H, $J=8.1$ Hz, $J=4.7$ Hz, α -CH Met), 3.47 (dd, 1 H, $J=14.1$ Hz, $J=4.1$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 3.27 (dd, 1 H, $J=14.1$ Hz, $J=6.1$ Hz, β -CH_{2b} Cys), 2.60–2.65 (m, 2 H, γ -CH₂ Met), 2.56 (t, 2 H, $J=7.6$ Hz, α -CH₂ Pal), 2.43 (b, 2 H, NH₂), 2.11–2.19 (m, 1 H, β -CH_{2a} Met), 2.11 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.77–1.84 (m, 1 H, β -CH_{2b} Met), 1.58–1.65 (m, 2 H, β -CH₂ Pal), 1.46 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.25 [s, 24 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS], 0.87 (t, 3 H, $J=6.9$ Hz, ω -CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta=199.4$ [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 175.3 (C=O), 170.7 (C=O Cys), 168.8 (C=O), 83.3 [CO₂C(CH₃)₃], 62.8 (β -CH₂ Ser), 54.2 (α -CH), 54.0 (α -CH), 53.0 (α -CH), 44.1 (β -CH₂ Cys), 33.9 (CH₂), 31.9 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.2 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 27.9 [CO₂C(CH₃)₃], 25.6 (CH₂), 22.7 (CH₂), 15.3 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₃₁H₅₉N₃O₆S₂ (633.95)

MS (FAB, 3-NBA): 674.5 [M+K]⁺, 634.4 [M+H]⁺, 578.4 [M-*t*Bu+H]⁺

Elementaranalyse:

ber.: C: 58.55 % H: 8.84 % N: 5.85 %

gef.: C: 58.49 % H: 8.61 % N: 5.54 %.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-serin**Aloc-Met-Ser-OH (**11**)

Eine Lösung von 1.72 g *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionin⁸³ **18** (7.37 mmol, 1 Äquivalent) und 0.85 g *N*-Hydroxysuccinimid (7.37 mmol, 1 Äquivalent) in 10 ml absolutem THF wird bei 0 °C mit 1.83 g DCC (8.85 mmol, 1.2 Äquivalente) versetzt und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird vom ausgefallenen Harnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 5 ml Dioxan aufgenommen und bei 0 °C zu einer Lösung von 1.17 g *L*-Serin (11.1 mmol, 1.5 Äquivalente) und 0.44 g NaOH (11.1 mmol, 1.5 Äquivalente) in 5 ml Wasser getropft. Die Reaktion wird 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 30 ml Wasser versetzt, der pH-Wert auf 8 eingestellt, und dreimal mit je 10 ml Essigester gewaschen. Mit konzentrierter Salzsäure wird daraufhin der pH-Wert der wässrigen Lösung auf 3 abgesenkt und diese erneut dreimal mit je 10 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, wobei man das Produkt als farblosen Feststoff erhält.

Ausbeute 2.19 g (6.84 mmol, 93 %).

R_f=0.18 (5 % Essigsäure in Essigester)

Smp: 120 °C

[α]_D²⁰ = -5.5 (c=1.1, Methanol)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ=5.88–5.99 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.32 (dd, 1 H, *J*=17.2 Hz, *J*=1.5 Hz, CH_{2a}=CH), 5.18 (dd, 1 H, *J*=10.5 Hz, *J*=1.4 Hz, CH_{2b}=CH), 4.55 (d, 2 H, *J*=5.3 Hz, CH₂=CH-CH₂), 4.49 (t, 1 H, *J*=4.2 Hz, α-CH), 4.31 (dd, 1 H, *J*=8.7 Hz, *J*=5.3 Hz, α-CH), 3.93 (dd, 1 H, *J*=11.3 Hz, *J*=4.6 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.83 (dd, 1 H, *J*=11.3 Hz, *J*=3.7 Hz, β-CH_{2b} Ser), 2.51–2.65 (m, 2 H, γ-CH₂ Met), 2.02–2.13 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), darunter 2.09 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.86–1.98 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 174.4 (C=O), 173.1 (C=O), 158.3 (C=O Urethan), 134.2 (H₂C=CH), 117.7 (H₂C=CH), 66.7 (CH₂=CH-CH₂O), 62.8 (β-CH₂ Ser), 56.1 (α-CH), 55.4 (α-CH), 32.4 (γ-CH₂ Met), 30.1 (β-CH₂ Met), 15.2 [SCH₃ Met] ppm

C₁₂H₂₀N₂O₆S (320.36)MS (EI, 160 °C): 320.2 [M]⁺ (10 %)

HRMS (EI) ber.: 320.1042
gef.: 320.1059.

***S*-tert-Butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester**

H-Cys(*St*Bu)-*Ot*Bu (13)

Eine Lösung von 800 mg *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*L*-cystein **17** (2.59 mmol, 1 Äquivalent) in 0.56 ml 70 %iger Perchlorsäure (6.46 mmol, 2.5 Äquivalente) und 15 ml Essigsäure-*tert*-butylester wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird dreimal mit je 10 ml 0.5 *N* Salzsäure gewaschen, die vereinten wässrigen Phasen sofort mit Na₂CO₃ neutralisiert und viermal mit je 25 ml Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, wobei man das Produkt als dünnflüssiges gelbes Öl erhält.

Ausbeute 550 mg (2.07 mmol, 80 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -79.0$ (c=2.1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ= 3.71 (dd, 1 H, *J*=7.7 Hz, *J*=4.4 Hz, α-CH), 3.11 (dd, 1 H, *J*=13.2 Hz, *J*=4.4 Hz, β-CH_{2a}), 2.90 (dd, 1 H, *J*=13.2 Hz, *J*=7.7 Hz, β-CH_{2b}), 2.30 (b, 2 H, NH₂), 1.48 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.35 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 172.7 [CO₂C(CH₃)₃], 81.9 [CO₂C(CH₃)₃], 54.5 (α-CH), 48.1 [SC(CH₃)₃], 45.6 (β-CH₂), 29.9 [SC(CH₃)₃], 28.0 [CO₂C(CH₃)₃] ppm

C₁₁H₁₃NO₂S₂ (265.43)

MS (FAB, 3-NBA): 288.1 [M+Na]⁺, 266.2 [M+H]⁺, 210.1 [M-*t*Bu+H]⁺, 153.0 [M-2*t*Bu]⁺.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-tert-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-*Ot*Bu (20)

Eine Lösung von 800 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-serin **11** (2.50 mmol, 1.5 Äquivalente) und 442 mg *S*-tert-Butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester **13** (1.67 mmol, 1 Äquivalent) in 10 ml trockenem Methylenchlorid und 3 ml Trifluorethanol wird bei Raumtemperatur mit 659 mg EEDQ (2.66 mmol, 1.6 Äquivalente) versetzt. Nach 16 Stunden wird die Lösung mit 40 ml Methylenchlorid verdünnt und zweimal mit 30 ml

0.5 N Salzsäure gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wird filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 1:2) isoliert. Ausbeute: 619 mg (1.09 mmol, 65 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.3$ (Hexan/Essigester 1:1)

Smp: 98 °C

$[\alpha]_D^{20} = -61.7$ (c=1.1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=7.42$ (d, 1 H, $J=7.4$ Hz, NH), 7.29 (d, 1 H, $J=7.0$ Hz, NH), 5.85–5.96 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, NH), 5.30 (ddd, 1 H, $J=17.2$ Hz, $J=3.0$ Hz, $J=1.5$ Hz, $\text{CH}_{2a}=\text{CH}$), 5.21 (dd, 1 H, $J=10.4$ Hz, $J=1.2$ Hz, $\text{CH}_{2b}=\text{CH}$), 4.73–4.77 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.60–4.69 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.57 (d, 2 H, $J=5.0$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 4.39–4.49 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.03 (dd, 1 H, $J=11.4$ Hz, $J=4.0$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Ser), 3.71 (dd, 1 H, $J=11.3$ Hz, $J=5.5$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Ser), 3.24 (dd, 1 H, $J=13.7$ Hz, $J=4.5$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Cys), 3.11 (dd, 1 H, $J=13.7$ Hz, $J=6.1$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Cys), 2.53–2.63 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.06–2.19 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Met), darunter 2.10 (s, 3 H, Met- CH_3), 1.95–2.04 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Met), 1.49 [s, 9 H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.32 [s, 9 H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$] ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta= 172.1$ (C=O), 170.1 (C=O), 169.2 (C=O), 156.3 (C=O Urethan), 132.7 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 117.8 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 83.2 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 66.0 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 63.1 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 54.6 ($\alpha\text{-CH}$), 54.0 ($\alpha\text{-CH}$), 53.1 ($\alpha\text{-CH}$), 48.2 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 42.6 ($\beta\text{-CH}_2$ Cys), 32.4 ($\gamma\text{-CH}_2$ Met), 30.1 ($\beta\text{-CH}_2$ Met), 29.8 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 28.0 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 15.3 [SCH_3 Met] ppm

$\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_3$ (567.77)

MS (EI, 165 °C): 567.2 $[\text{M}]^+$ (4 %), 511.2 $[\text{M-}t\text{Bu}]^+$ (12 %), 455.1 $[\text{M-}2t\text{Bu}]^+$ (100 %)

HRMS (EI) ber.: 567.2107

gef.: 567.2076

Elementaranalyse:

ber.: C: 48.66 % H: 7.28 % N: 7.40 %

gef.: C: 48.59 % H: 7.12 % N: 7.38 %.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-serin**Fmoc-Met-Ser-OH (**12**)Durchführung entsprechend Aloc-Met-Ser-OH (**11**)

Ausbeute: 82 % eines farblosen Feststoffes

 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10.6$ (c=1.0, Chloroform/Methanol 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ=7.75 (d, 2 H, *J*=7.5 Hz, CH Fmoc), 7.61 (t, 2 H, *J*=6.5 Hz, CH Fmoc), 7.39 (t, 2 H, *J*=7.4 Hz, CH Fmoc), 7.30 (t, 2 H, *J*=7.5 Hz, CH Fmoc), 4.55 (t, 1 H, *J*=3.5 Hz, α-CH Ser), 4.43 (dd, 1 H, *J*=10.5 Hz, *J*=7.2 Hz, α-CH Met), 4.34–4.39 (m, 2 H, CH₂ Fmoc), 4.21 (t, 1 H, *J*=6.9 Hz, CH Fmoc), 3.98 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=3.9 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.86 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=3.4 Hz, β-CH_{2b} Ser), 2.51–2.60 (m, 2 H, γ-CH₂ Met), 2.05–2.14 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), 2.09 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.86–1.98 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): δ= 172.5 (C=O), 172.3 (C=O), 157.0 (C=O Urethan), 144.1 (*quart*, arom., Fmoc), 143.9 (*quart*, arom., Fmoc), 141.5 (*quart*, arom., Fmoc), 128.0 (arom., Fmoc-CH), 127.3 (arom., Fmoc-CH), 125.3 (arom., Fmoc-CH), 120.2 (arom., Fmoc-CH), 67.3 (Fmoc-CH₂), 62.3 (β-CH₂ Ser), 55.0 (α-CH), 54.2 (α-CH), 47.3 (Fmoc-CH), 32.1 (γ-CH₂ Met), 30.2 (β-CH₂ Met), 15.2 [SCH₃ Met] ppm

C₂₃H₂₆N₂O₆S (458.53)MS (FAB, 3-NBA): 481.2 [M+Na]⁺, 459.2 [M+H]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA) ber.: 459.1590

gef.: 459.1564

Elementaranalyse:

ber.: C: 60.25 % H: 5.72 % N: 6.11 %

gef.: C: 60.09 % H: 5.82 % N: 5.63 %.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester**Fmoc-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-*Ot*Bu (**21**)

Zu einer Lösung von 835 mg *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-serin **12** (1.82 mmol, 1.2 Äquivalente) und 403 mg *S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester **13** (1.52 mmol, 1 Äquivalent) in 8 ml absolutem Dimethylformamid werden 488 mg EEDQ (1.97 mmol, 1.3 Äquivalente) gegeben. Nach 15 Stunden wird die Lösung mit 50 ml Essigsäureethylester verdünnt und nacheinander zweimal mit 50 ml 0.5 *N* Salzsäure, zweimal mit 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigsäureethylester 2:1) isoliert.

Ausbeute: 618 mg (0.875 mmol, 58 %) eines farblosen Feststoffes.

R_f=0.20 (Hexan/Essigsäureethylester 2:1)

Smp: 133 °C

[α]_D²⁰ = -49.8 (c=1.1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ=7.75 (d, 2 H, *J*=7.5 Hz, Fmoc-CH), 7.58 (dd, 2 H, *J*=7.4 Hz, *J*=3.7 Hz, Fmoc-CH), 7.39 (t, 2 H, *J*=7.5 Hz, Fmoc-CH), 7.27–7.34 (m, 3 H, *J*=7.4 Hz, 2 * Fmoc-CH, 1 * NH), 7.24 (d, 1 H, *J*=6.9 Hz, NH), 5.50 (d, 1 H, *J*=7.7 Hz, NH), 4.72–4.79 (m, 1 H, α-CH), 4.57–4.63 (m, 1 H, α-CH), 4.35–4.47 (m, 3 H, α-CH, Fmoc-CH₂), 4.21 (t, 1 H, *J*=6.9 Hz, Fmoc-CH), 4.06 (dd, 1 H, *J*=11.3 Hz, *J*=3.0 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.70 (dd, 1 H, *J*=11.0 Hz, *J*=5.1 Hz, β-CH_{2b} Ser), 3.22 (dd, 1 H, *J*=13.6 Hz, *J*=4.1 Hz, β-CH_{2a} Cys), 3.10 (dd, 1 H, *J*=13.6 Hz, *J*=6.1 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.52–2.65 (m, 2 H, γ-CH₂ Met), 2.07–2.18 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), darunter 2.10 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.95–2.05 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met), 1.47 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.30 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 171.6 (C=O), 170.2 (C=O), 169.2 (C=O), 156.2 (Urethan), 143.9 (*quart*, arom., Fmoc), 143.7 (*quart*, arom., Fmoc), 141.3 (*quart*, arom., Fmoc), 127.7 (arom., Fmoc-CH), 127.1 (arom., Fmoc-CH), 125.1 (arom., Fmoc-CH), 120.0 (arom., Fmoc-CH), 83.3 [CO₂C(CH₃)₃], 67.2 (Fmoc-CH₂), 62.7 (β-CH₂ Ser), 54.3 (α-CH), 54.0 (α-CH), 53.1 (α-CH), 48.4 [SC(CH₃)₃], 47.1 (Fmoc-CH), 42.2 (β-CH₂ Cys), 32.0 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.8 [SC(CH₃)₃], 27.9 [CO₂C(CH₃)₃], 15.3 [SCH₃ Met] ppm

$C_{34}H_{47}N_3O_7S_3$ (705.95)

MS (FAB, 3-NBA): 737.1 $[M+K]^+$, 728.2 $[M+Na]^+$, 706.3 $[M+H]^+$, 650.2 $[M-tBu+H]^+$,
593.1 $[M-2tBu+H]^+$

Elementaranalyse:

ber.: C: 57.85 % H: 6.71 % N: 5.95 %

gef.: C: 58.13 % H: 6.77 % N: 6.11 %.

***L*-Methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester**

H-Met-Ser-Cys(*S*tBu)-*O*tBu (**3b**)

Eine Lösung von 5.2 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester **20** (9.16 μ mol, 1 Äquivalent) in 0.5 ml absolutem THF wird mit 2.3 μ l Phenylsilan (18.3 μ mol, 2 Äquivalente) und 1.1 mg Pd(PPh₃)₄ (0.916 μ mol, 10 Mol%) versetzt. Nach einer Stunde wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie isoliert (Chloroform/Methanol 8:1).

Ausbeute: 2.8 mg (5.79 μ mol, 63 %) eines gelblichen Feststoffes.

$R_f=0.13$ (Chloroform/Methanol 8:1)

$[\alpha]_D^{20} = -73.8$ (c=1.1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta=8.10$ (d, 1 H, $J=7.6$ Hz, NH), 7.45 (d, 1 H, $J=7.6$ Hz, NH), 4.70–4.76 (m, 1 H, α -CH Cys), 4.54–4.59 (m, 1 H, α -CH Ser), 4.06 (dd, 1 H, $J=11.4$ Hz, $J=3.9$ Hz, β -CH_{2a} Ser), 3.71 (dd, 1 H, $J=11.4$ Hz, $J=5.6$ Hz, β -CH_{2b} Ser), 3.60 (dd, 1 H, $J=8.1$ Hz, $J=4.7$ Hz, α -CH Met), 3.24 (dd, 1 H, $J=13.6$ Hz, $J=4.4$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 3.11 (dd, 1 H, $J=13.6$ Hz, $J=6.3$ Hz, β -CH_{2b} Cys), 2.59–2.65 (m, 2 H, γ -CH₂ Met), 2.45–2.60 (b, 3 H, OH, NH₂), 2.12–2.22 (m, 1 H, β -CH_{2a} Met), 2.11 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.77–1.86 (m, 1 H, β -CH_{2b} Met), 1.48 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.32 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta=175.5$ (C=O), 170.7 (C=O), 169.2 (C=O), 83.2 [CO₂C(CH₃)₃], 62.8 (β -CH₂ Ser), 54.2 (α -CH), 53.9 (α -CH), 53.0 (α -CH), 48.3 [SC(CH₃)₃], 42.3 (β -CH₂ Cys), 33.9 (γ -CH₂ Met), 30.6 (β -CH₂ Met), 29.8 [SC(CH₃)₃], 28.0 [CO₂C(CH₃)₃], 15.3 (SCH₃) ppm

$C_{19}H_{37}N_3O_5S_3$ (483.71)

MS (EI, 145 °C): 483.2 [M]⁺ (18 %), 427.2 [M-*t*Bu]⁺ (40 %), 371.1 [M-2*t*Bu]⁺ (71 %)

HRMS (EI) ber.: 483.1895

gef.: 483.1912

Elementaranalyse:

ber.: C: 47.18 % H: 7.71 % N: 8.69 %

gef.: C: 47.37 % H: 7.59 % N: 8.47 %.

6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.1.4

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Pro-Gly-Cys(Pal)-Met-Ser-Cys(Pal)-OtBu (**22a**)

Eine Lösung von 48.1 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein **2a** (0.080 mmol, 1 Äquivalent) und 51.0 mg *L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **3a** (0.080 mmol, 1 Äquivalent) in 1 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 25.9 mg EEDQ (0.105 mmol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 16 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1) isoliert.

Ausbeute: 81.6 mg (0.067 mmol, 84 %) eines leicht rötlichen Feststoffes.

$R_f=0.14$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 158 °C

$[\alpha]_D^{20} = -18.4$ (c=1.2, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, Zuordnung durch COSY und CH-Korrelation): $\delta=7.65$ – 7.78 (m, 2 H, NH Gly, NH Met), 7.47 (d, 1 H, $J=4.5$ Hz, NH Cys), 7.18– 7.22 (m, 1 H, NH Cys), 7.12, (d, 1 H, NH Ser), 5.88– 5.98 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.33 (d, 1 H, $J=16.7$ Hz, CH_{2a}=CH), 5.24 (d, 1 H, $J=10.2$ Hz, CH_{2b}=CH), 4.50– 4.68 (m, 5 H, 2 * CH₂=CH-CH₂, 2 * α -CH Cys, 1 * α -CH Pro), 4.44– 4.50 (m, 1 H, α -CH Ser), 4.29– 4.35 (m, 1 H, α -CH Met), 3.92– 4.01 (m, 2 H, β -CH_{2a} Ser, α -CH_{2a} Gly), 3.76– 3.84 (m, 2 H, β -CH_{2b} Ser, α -CH_{2b} Gly), 3.45– 3.59 (m, 2 H, δ -CH₂ Pro), 3.38– 3.45 (m, 2 H, 2 * β -CH₂ Cys),

3.22–3.31 (m, 2 H, 2 * β -CH₂ Cys), 2.51–2.68 (m, 6 H, α -CH₂ Pal, γ -CH₂ Met), 1.88–2.35 (m, 6 H, β -CH₂ Met, β -CH₂ Pro, γ -CH₂ Pro), darunter 2.11 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.56–1.69 (m, 4 H, β -CH₂ Pal), 1.46 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.25 [s, 48 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS Pal], 0.88 (t, 6 H, J =6.9 Hz, 6 ω -CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 199.0 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 173.7 (C=O), 171.3 (C=O), 170.2 (C=O), 169.9 (C=O), 168.8 (C=O), 155.8 (C=O Urethan), 132.5 (H₂C=CH), 117.7 (H₂C=CH), 82.8 [CO₂C(CH₃)₃], 66.5 (CH₂=CH-CH₂O), 62.8 (β -CH₂ Ser), 60.4 (CH), 55.2 (CH), 53.0 (CH), 47.1 (δ -CH₂ Pro), 44.1 (α -CH₂ Pal), 43.9 (CH₂), 31.9 (CH₂ Pal), 30.2 (CH₂), 29.7 (CH₂ Pal), 29.5 (CH₂ Pal), 29.4 (CH₂ Pal), 29.3 (CH₂ Pal), 29.3 (CH₂ Pal), 29.0 (CH₂ Pal), 27.9 [CO₂C(CH₃)₃], 25.6 (β -CH₂ Pal), 25.6 (β -CH₂ Pal), 24.8 (CH₂ Pro), 22.7 (CH₂ Pal), 15.2 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₆₁H₁₀₈N₆O₁₂S₃ (1213.74)

MS (FAB, 3-NBA): 1235.5 [M+Na]⁺, 1213.6 [M+H]⁺, 1157.5 [M-*t*Bu]⁺.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein**

Aloc-Pro-Gly-Cys(Pal)-Met-Ser-Cys(Pal)-OH

Eine Lösung von 23.7 mg *N*-Allyloxycarbonyl-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **22a** (19.5 μ mol) in 0.25 ml Methylenchlorid wird mit 0.25 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach drei Stunden werden 5 ml Chloroform zugegeben und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei das Produkt quantitativ als farbloser Feststoff anfällt.

R_f=0.10 (Chloroform/Methanol 8:1)

Smp: 170 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19.0$ (c=1.1, CHCl₃/CH₃OH 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ =5.88–5.98 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.32 (d, 1 H, J =17.1 Hz, CH_{2a}=CH), 5.23 (d, 1 H, J =10.4 Hz, CH_{2b}=CH), 4.42–4.67 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂, 4 * α -CH), 4.18–4.24 (m, 1 H, α -CH), 4.02–4.08 (m, 1 H, α -CH_{2a} Gly), 3.87–3.92 (m, 1 H, β -CH_{2a} Ser), 3.71–3.86 (m, 2 H, 1 β -CH_{2b} Ser, α -CH_{2b} Gly), 3.52–3.72 (m, 2 H, δ -CH₂ Pro), 3.50 (dd, 1 H, J =14.0 Hz, J =4.7 Hz, β -CH_{2a} Cys), 3.44

(dd, 1 H, $J=14.0$ Hz, $J=4.7$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 3.20–3.32 (m, 2 H, 2 * β -CH_{2b} Cys), 2.50–2.65 (m, 6 H, α -CH₂ Pal, γ -CH₂ Met), 2.20–2.35 (m, 2 H, β -CH₂ Met), 1.99–2.15 (m, 3 H, CH₂ Pro), darunter 2.11 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.91–1.98 (m, 1 H, CH₂ Pro), 1.62–1.65 (m, 4 H, β -CH₂ Pal), 1.25 [s, 48 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS Pal], 0.88 (t, 6 H, $J=6.9$ Hz, 6 ω -CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): $\delta=$ 200.6 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 199.8 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 174.4 (C=O), 172.0 (C=O), 171.1 (C=O), 170.7 (C=O), 156.0 (C=O Urethan), 132.5 (H₂C=CH), 117.8 (H₂C=CH), 66.7 (CH₂=CH-CH₂O), 62.2 (β -CH₂ Ser), 61.2 (CH), 55.5 (CH), 54.8 (CH), 53.2 (CH), 52.7 (CH), 47.3 (δ -CH₂ Pro), 44.1 (CH₂), 43.3 (CH₂), 32.1 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.1 (CH₂), 27.9 (CH₂), 25.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 22.8 (CH₂), 15.2 (SCH₃ Met), 14.2 (CH₃ Pal) ppm

C₅₇H₁₀₀N₆O₁₂S₃ (1157.63)

MS (FAB, 3-NBA): 1195.2 [M+K]⁺, 1179.1 [M+Na]⁺, 1157.3 [M+H]⁺.

N^(e)-Allyloxycarbonyl-L-lysine-tert-butylester

Lys(Aloc)OtBu

Eine Lösung von 2.7 g N^(α)-tert-Butoxycarbonyl-N^(e)-allyloxycarbonyl-L-lysine (8 mmol, 1 Äquivalent) in 3 ml 70 %iger Perchlorsäure (35.2 mmol, 4.4 Äquivalente), 1 ml Wasser und 50 ml Essigsäure-tert-butylester wird drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit 15 ml Diethylether versetzt und dreimal mit je 10 ml 0.5 N Salzsäure gewaschen. Die vereinten wässrigen Phasen werden sofort mit Na₂CO₃ neutralisiert und viermal mit je 25 ml Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Essigester, dann 10 % Ethanol in Essigester) isoliert.

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): $\delta=$ 5.86–5.98 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂O), 5.28 (dd, 1H, $J=17.2$ Hz, $J=1.2$ Hz, CH_{2a}=CH-CH₂O), 5.17 (d, 1 H, $J=10.5$ Hz, CH_{2b}=CH-CH₂O), 4.51 (d, 2 H, $J=5.2$ Hz, CH₂=CH-CH₂O), 3.80 (t, 1 H, $J=6.3$ Hz, α -CH Lys), 3.13 (t, 2 H, $J=6.7$ Hz, ϵ -CH₂ Lys), 1.77–1.92 (m, 2 H, CH₂ Lys), 1.37–1.60 (m, 4 H, CH₂ Lys), darunter 1.51 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃] ppm

^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ = 170.9 (Ester), 158.9 (C=O Urethan), 134.5 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 117.5 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 84.7 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 66.3 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 54.7 (α -CH), 41.2 (ϵ - CH_2), 32.1 (CH_2), 30.4 (CH_2), 28.2 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 23.2 (CH_2) ppm

$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ (286.37)

MS (FAB, 3-NBA): 309.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 287.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 231.2 [$\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}$] $^+$.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N* $^{\epsilon}$ -allyloxycarbonyl-*L*-lysin-*tert*-butylester**

Aloc-Pro-Gly-Cys(Pal)-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-OtBu

Eine Lösung von 41.0 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein (0.035 mmol, 1 Äquivalent) und 10.0 mg *N* $^{\epsilon}$ -Allyloxycarbonyl-*L*-lysin-*tert*-butylester (0.035 mmol, 1 Äquivalent) in 1 ml trockenem Methylenchlorid und 0.2 ml Dimethylformamid werden mit 11.4 mg EEDQ (0.046 mmol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 16 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Ethanol/Hexan/Methylenchlorid 1:15:5, dann 1:10:5) isoliert.

Ausbeute: 20.9 mg (0.015 mmol, 41 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.11$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 164 °C

$[\alpha]_D^{20} = -32.1$ (c=0.6, CHCl_3)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ =7.90–7.98 (m, 1 H, NH), 7.80–7.89 (m, 1 H, NH), 7.61–7.67 (m, 1 H, NH), 7.39 (d, 1 H, $J=6.2$ Hz, NH), 7.13 (d, 1 H, $J=8.7$ Hz, NH), 7.08 (d, 1 H, $J=8.8$ Hz, NH), 5.85–5.98 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.48–5.54 (m, 1 H, NH), 5.16–5.35 (m, 4 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.50–4.68 (m, 6 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$, 2 * α -CH), 4.34–4.48 (m, 4 H, 4 * α -CH), 3.82–4.02 (m, 4 H, β - CH_2 Ser, α - CH_2 Gly), 3.45–3.59 (m, 2 H, δ - CH_2 Pro), 3.28–3.39 (m, 4 H, β - CH_2 Cys), 3.12–3.19 (m, 2 H, ϵ - CH_2 Lys), 2.51–2.68 (m, 6 H, α - CH_2 Pal, γ - CH_2 Met), 1.78–2.28 (m, 8 H, β - CH_2 Met, β - CH_2 Pro, CH_2 Lys, γ - CH_2 Pro), darunter 2.10 (s, 3 H, SCH_3 Met), 1.56–1.69 (m, 5 H, 4 * β - CH_2 Pal, 1 * CH_2 Lys), 1.35–1.43 (m, 3 H, CH_2 Lys), darunter 1.45 [s, 9 H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.25 [s, 48 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS Pal}$], 0.88 (t, 6 H, $J=6.9$ Hz, ω - CH_3 Pal) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 199.8 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COS}$], 174.2 (C=O), 172.1 (C=O), 171.0 (C=O), 170.4 (C=O), 169.5 (C=O), 156.5 (C=O Urethan), 133.2 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 132.3 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 118.1 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 117.4 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 81.7 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 66.7 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 65.3 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 62.3 (β - CH_2 Ser), 60.5 (CH), 56.6 (CH), 54.2 (CH), 53.6 (CH), 52.8 (CH), 47.1 (δ - CH_2 Pro), 44.0 (α - CH_2 Pal), 40.7 (CH_2), 31.9 (CH_2 Pal), 31.6 (CH_2), 30.6 (CH_2), 29.7 (CH_2 Pal), 29.7 (CH_2 Pal), 29.5 (CH_2 Pal), 29.4 (CH_2 Pal), 29.3 (CH_2 Pal), 29.0 (CH_2 Pal), 29.0 (CH_2 Pal), 28.0 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 26.9 (CH_2), 25.7 (CH_2), 25.5 (β - CH_2 Pal), 24.7 (CH_2 Pro), 22.7 (CH_2 Pal), 22.5 (CH_2), 15.2 (SCH_3 Met), 14.1 (CH_3 Pal) ppm

$\text{C}_{71}\text{H}_{124}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{S}_3$ (1425.99)

MS (FAB, 3-NBA): 1447.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-allyloxycarbonyl-*L*-lysin**

Aloc-Pro-Gly-Cys(Pal)-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-OH

Eine Lösung von 13.4 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-allyloxycarbonyl-*L*-lysin-*tert*-butylester (9.40 μmol) in 0.25 ml Methylenchlorid wird mit 0.25 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach drei Stunden wird 1 ml Toluol zugegeben und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei das Produkt quantitativ als farbloser Feststoff anfällt.

$R_f=0.18$ (Chloroform/Methanol 8:1)

Smp: 163 °C

$[\alpha]_D^{20} = +14.1$ (c=0.7, CHCl_3)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): Dieses Peptid zeigt auch in starker Verdünnung extrem breite Signale. Leidglich die Peaks der Palmitoyl- und zum Teil auch die der Aloc-Gruppen sind etwas schärfer. δ =5.85–5.98 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.10–5.33 (m, 4 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 1.49–1.65 (m, 4 H, β - CH_2 Pal), 1.25 [s, 48 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$], 0.80–0.89 (m, 6 H, ω - CH_3 Pal) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): Nur die Signale der Palmitoylgruppen sind scharf, alle anderen Signale sind so breit, dass sie sich kaum vom Grundrauschen abheben.

$\text{C}_{67}\text{H}_{116}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{S}_3$ (1369.88)

MS (FAB, 3-NBA): 1407.8 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1391.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-allyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**
Aloc-Pro-Gly-Cys(Pal)-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe (**23a**)

Eine Lösung von 20.1 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-allyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester (14.7 μmol , 1 Äquivalent) und 5.0 mg *S*-Farnesyl-*L*-cysteinmethylester (14.7 μmol , 1 Äquivalent) in 1 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 4.7 mg EEDQ (19.1 μmol , 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 16 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1, dann 20:1) isoliert.

Ausbeute: 13.5 mg (7.98 μmol , 54 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.30$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 215 °C

$[\alpha]_D^{20} = -18.3$ (c=0.2, CHCl_3)

^1H -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 10:1, 500 MHz): $\delta=5.79\text{--}5.89$ (m, 2 H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 5.09–5.28 (m, 5 H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$, 1 * $\text{CH}=\text{C}$ Far), 4.99–5.06 (m, 2 H, 2 * $\text{CH}=\text{C}$ Far), 4.18–4.9 (m, 11 H, 7 * $\alpha\text{-CH}$, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 3.81–3.90 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Ser, $\alpha\text{-CH}_{2a}$ Gly), 3.65–3.78 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Ser, $\alpha\text{-CH}_{2b}$ Gly), 3.74 (s, 3 H, COOCH_3), 3.45–3.55 (m, 2 H, 2 $\delta\text{-CH}_2$ Pro), 3.33–3.39 (m, 2 H, $\epsilon\text{-CH}_2$ Lys), unter OH-Signal 3.12–3.24 (m, vermutlich 3 H, $\alpha\text{-CH}_{2a}$ Far, 2 * $\beta\text{-CH}_{2a}$ CysPal), 3.02–3.10 (m, 3 H, $\alpha\text{-CH}_{2b}$ Far, 2 * $\beta\text{-CH}_{2b}$ CysPal), 2.82 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=5.2$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2a}$ CysFar), 2.75 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=7.9$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2b}$ CysFar), 2.47–2.59 (m, 6 H, $\alpha\text{-CH}_2$ Pal, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.11–2.18 (m, 2 H), 1.95–2.05 (m, 8 H), darunter 2.05 (s, 3 H, SCH_3 Met), 1.78–1.92 (m, 4 H), 1.52–1.69 (m, 4 H, $\beta\text{-CH}_2$ Pal), darunter 1.61 (s, 6 H, CH_3 Far), 1.54 (s, 6 H, CH_3 Far), 1.28–1.49 (m, 4 H, CH_2 Lys), 1.21 [s, 48 H, $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$ Pal], 0.88 (t, 6 H, $J=6.9$ Hz, $\omega\text{-CH}_3$ Pal) ppm

^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 10:1, 125 MHz): $\delta=200.4$ [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COS}$], 174.5 (C=O), 172.7 (C=O), 171.3 (C=O), 156.9 (C=O Urethan), 156.0 (C=O Urethan), 140.1 (*quart*, Far-C), 135.4 (*quart*, Far-C), 133.1 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 132.4 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 131.4 (*quart*, Far-C), 124.4 (Far-CH), 123.9 (Far-CH), 119.7 (Far-CH), 117.9 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 117.5 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 66.7 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 65.5 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 61.8 (β - CH_2 Ser), 61.2 (CH), 55.6 (CH), 54.4 (CH), 54.1 (CH), 53.6 (COOCH_3), 53.5 (α -CH), 52.6 (CH), 52.1 (α -CH), 47.2 (δ - CH_2 Pro), 44.1 (α - CH_2 Pal), 40.6 (CH_2), 39.8 (CH_2), 32.6 (CH_2), 32.0 (CH_2), 31.1 (CH_2), 30.4 (CH_2), 30.1 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.1 (CH_2), 26.8 (CH_2), 26.6 (CH_2), 25.7 (Far- CH_3), 25.6 (CH_2), 24.8 (CH_2), 22.7 (CH_2), 17.7 (Far- CH_3), 16.1 (Far- CH_3), 16.0 (Far- CH_3), 15.2 (SCH_3 Met), 14.1 (CH_3 Pal) ppm

$\text{C}_{86}\text{H}_{147}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{S}_4$ (1691.40)

MS (FAB, 3-NBA): 1713.4 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 1691.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

***L*-Prolyl-glycyl-(*S*-palmitoyl)-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**

H-Pro-Gly-Cys(Pal)-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys-Cys(Far)-OMe (**1a**)

Zu einer Lösung von 6.5 mg *N*-Allyloxycarbonyl-prolyl-glycyl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-allyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **23a** (3.83 μmol , 1 Äquivalent) und 0.6 mg *N,N*-Dimethylbarbitursäure (3.83 μmol , 1 Äquivalent) in 2 ml absolutem THF werden 0.4 mg Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (0.383 μmol , 10 Mol%) gegeben. Nach 5 Minuten wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Digerieren in Ether und Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1) isoliert.

Ausbeute: 3.2 mg (2.07 μmol , 54 %) eines blassgelben Feststoffes.

^1H -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 500 MHz): Das Spektrum ist extrem schlecht aufgelöst, so dass eine Interpretation nicht möglich ist. Signifikante Signale werden hier dennoch aufgeführt. $\delta=5.17$ – 5.25 (m, $\text{CH}=\text{C}$ Far), 5.02 – 5.11 (m, $\text{CH}=\text{C}$ Far), 3.76 (s, COOCH_3), 1.68 (s, CH_3 Far), 1.60 (s, CH_3 Far), 1.26 [b, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$ Pal], 0.88 (t, $J=6.6$ Hz, ω - CH_3 Pal) ppm

C₇₈H₁₃₉N₉O₁₂S₄ (1523.26)

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Pro-Gly-Cys(*St*Bu)-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-*Ot*Bu (**22b**)

Eine Lösung von 268 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein **2b** (0.60 mmol, 1 Äquivalent) und 290 mg *L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester **3b** (0.60 mmol, 1 Äquivalent) in 10 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 193 mg EEDQ (0.779 mmol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 15 Stunden wird mit 90 ml Methylenchlorid verdünnt und zweimal mit je 50 ml 0.5 *N* Salzsäure gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1) isoliert.

Ausbeute: 426 mg (0.466 mmol, 78 %) eines farblosen Feststoffes.

R_f=0.22 (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 183 °C

[α]_D²⁰ = -92.1 (c=1.0, CHCl₃/CH₃OH 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ=5.90–5.99 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.35 (d, 1 H, *J*=17.2 Hz, CH_{2a}=CH), 5.26 (d, 1 H, *J*=10.4 Hz, CH_{2b}=CH), 4.56–4.71 (m, 4 H, α-CH Met, Ser, 2 * Cys), 4.47–4.52 (m, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 4.19 (dd, 1 H, *J*=7.6 Hz, *J*=5.6 Hz, α-CH Pro), 3.90–4.02 (m, 2 H, α-CH_{2a} Gly, β-CH_{2a} Ser), 3.77–3.87 (m, 2 H, α-CH_{2b} Gly, β-CH_{2b} Ser), 3.54–3.65 (m, 2 H, δ-CH₂ Pro), 3.16–3.26 (m, 2 H, 2 * β-CH_{2a} Cys), 3.00–3.10 (m, 2 H, 2 * β-CH_{2b} Cys), 2.58–2.65 (m, 1 H, γ-CH_{2a} Met), 2.51–2.58 (m, 1 H, γ-CH_{2b} Met), 2.18–2.29 (m, 2 H, β-CH_{2a} Met, β-CH_{2a} Pro), 1.92–2.15 (m, 4 H, β-CH_{2b} Pro, γ-CH₂ Pro, β-CH_{2b} Met), darunter 2.11 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.48 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.35 [s, 9 H, SC(CH₃)₃], 1.34 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, Zuordnung durch COSY und C-H-Korrelation): δ=174.8 (C=O), 172.0 (C=O), 171.8 (C=O), 171.5 (C=O), 170.4 (C=O), 169.6 (C=O), 156.1 (C=O Urethan), 132.5 (H₂C=CH), 118.1 (H₂C=CH), 83.0 [OC(CH₃)₃], 66.9 (CH₂=CH-CH₂O), 62.2 (β-CH₂ Ser), 61.6 (α-CH Pro), 55.7 (α-CH), 54.1 (α-CH Cys), 53.4 (α-CH), 53.1 (α-CH Cys), 48.2 [SC(CH₃)₃], 47.3 (δ-CH₂ Pro), 43.6 (α-CH₂ Gly), 42.0

(β -CH₂ Cys), 40.6 (β -CH₂ Cys), 30.5 (γ -CH₂ Met), 30.4 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.9 [SC(CH₃)₃], 28.0 [OC(CH₃)₃], 24.9 (CH₂ Pro), 15.2 (SCH₃ Met) ppm

C₃₇H₆₄N₆O₁₀S₅ (913.23)

MS (FAB, 3-NBA): 934.9 [M+Na]⁺, 913 [M+H]⁺, 857.0 [M-*t*Bu]⁺, 799.9 [M-2*t*Bu]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA): ber.: 913.3365

gef.: 913.3220.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein**

Aloc-Pro-Gly-Cys(*St*Bu)-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-OH

Eine Lösung von 12.6 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester **22b** (13.8 μ mol, 1 Äquivalent) in 0.25 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 4 μ l Thioanisol (27.6 μ mol, 2 Äquivalente) und 0.25 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 3 Stunden wird das Lösungsmittelgemisch im Vakuum ohne Heizbad abdestilliert und der hierbei erhaltene Feststoff durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1, dann 8:1) gereinigt.

Ausbeute: 10.4 mg (12.1 μ mol, 88 %) eines farblosen Feststoffes.

R_f=0.49 (Chloroform/Methanol 4:1)

Smp: 168 °C

$[\alpha]_D^{20} = -83.4$ (c=0.9, CHCl₃/CH₃OH 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ =5.90–5.99 (m, 1 H, CH₂=CH), 5.35 (dd, 1 H, J =17.2 Hz, J =1.2 Hz, CH_{2a}=CH), 5.26 (d, 1 H, J =10.5 Hz, CH_{2b}=CH), 4.75 (dd, 1 H, J =8.2 Hz, J =4.5 Hz, α -CH), 4.56–4.71 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂, α -CH), 4.90 (dd, 2 H, J =9.7 Hz, J =4.6 Hz, α -CH), 4.19 (dd, 1 H, J =7.8 Hz, J =5.7 Hz, α -CH), 3.98 (d, 1 H, J =16.8 Hz, α -CH_{2a} Gly), 3.94 (dd, 1 H, J =11.6 Hz, J =5.5 Hz, β -CH_{2a} Ser), 3.85 (dd, 1 H, J =11.6 Hz, J =4.7 Hz, β -CH_{2b} Ser), 3.83 (d, 1 H, J =16.8 Hz, α -CH_{2b} Gly), 3.55–3.64 (m, 2 H, δ -CH₂ Pro), 3.20–3.27 (m, 2 H, 2 * β -CH_{2a} Cys), 3.11 (dd, 1 H, J =13.6 Hz, J =8.3 Hz, β -CH_{2b} Cys), 3.04 (dd, 1 H, J =13.5 Hz, J =9.5 Hz, β -CH_{2b} Cys), 2.59–2.67 (m, 1 H, γ -CH_{2a} Met), 2.50–2.59 (m, 1 H, γ -CH_{2b} Met), 2.19–2.30 (m, 2 H),

1.92–2.13 (m, 4 H), darunter 2.11 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.35 [s, 9 H, SC(CH₃)₃], 1.34 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): δ=174.94 (C=O), 172.5 (C=O), 172.3 (C=O), 171.9 (C=O), 171.6 (C=O), 170.8 (C=O), 156.1 (C=O Urethan), 132.6 (H₂C=CH), 118.1 (H₂C=CH), 66.9 (CH₂=CH-CH₂O), 62.3 (β-CH₂ Ser), 61.7 (CH), 55.8 (CH), 54.2 (CH), 53.5 (CH), 52.4 (CH), 48.3 [SC(CH₃)₃], 47.3 [SC(CH₃)₃], 43.6 (CH₂), 41.6 (CH₂), 40.7 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 30.0 [SC(CH₃)₃], 30.0 [SC(CH₃)₃], 24.9 (CH₂ Pro), 15.2 (SCH₃ Met) ppm

C₃₃H₅₆N₆O₁₀S₅ (857.16)

MS (FAB, 3-NBA): 894.9 [M+K]⁺, 879.0 [M+Na]⁺, 857.0 [M+H]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA): ber.: 857.2740
gef.: 857.2897.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-allyloxycarbonyl-*L*-lysin-*tert*-butylester**

Aloc-Pro-Gly-Cys(*St*Bu)-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-Lys(Aloc)-*O**t*Bu

Eine Lösung von 207 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein (0.241 mmol, 1 Äquivalent) und 88.6 mg *N*^(ε)-Allyloxycarbonyl-*L*-lysin-*tert*-butylester (0.314 mmol, 1.3 Äquivalente) in 10 ml trockenem Methylenchlorid und 1 ml TFE wird mit 89.5 mg EEDQ (0.362 mmol, 1.5 Äquivalente) versetzt. Nach 15 Stunden wird mit 20 ml Methylenchlorid und 2 ml Methanol verdünnt und zweimal mit 25 ml 0.5 *N* Salzsäure extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ (vor Zugabe des Trockenmittels wird die Lösung durch Zugabe von 5 ml Methanol geklärt) wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1) isoliert.

Ausbeute: 177 mg (0.157 mmol, 65 %) eines farblosen Feststoffes.

R_f=0.14 (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 152 °C

[α]_D²⁰ = -72.9 (c=0.9, CHCl₃/CH₃OH 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 500 MHz): $\delta=5.86\text{--}5.99$ (m, 2 H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 5.18–5.37 (m, 4 H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 4.49–4.73 (m, 6 H), 4.31–4.42 (m, 3 H), 4.17–4.22 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ Pro), 3.75–3.99 (unter OH-Peak: m, vermutlich $\alpha\text{-CH}_2$ Gly, $\beta\text{-CH}_2$ Ser), 3.53–3.64 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2$ Pro), 3.02–3.33 (m, 6 H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys, $\epsilon\text{-CH}_2$ Lys), 2.52–2.68 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.17–2.33 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Pro, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Met), 1.87–2.14 (m, 5 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Pro, $\gamma\text{-CH}_2$ Pro, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Met, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Lys), 2.09 (s, 3 H, SCH_3 Met), 1.74–1.81 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Lys), 1.36–1.55 (m, 4 H, $\gamma\text{-CH}_2$ Lys, $\delta\text{-CH}_2$ Lys), 1.46 [s, 9 H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.35 [s, 9 H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 1.33 [s, 9 H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$] ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 125 MHz): $\delta=175.0$ (C=O), 172.8 (C=O), 172.4 (C=O), 171.9 (C=O), 171.2 (C=O), 170.7 (C=O), 170.6 (C=O), 157.1 (C=O Urethan), 156.1 (C=O Urethan), 133.2 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 132.4 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 118.2 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 117.5 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 82.0 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_3$], 66.9 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 65.5 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 61.9 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 61.8 ($\alpha\text{-CH}$ Pro), 56.9 ($\alpha\text{-CH}$), 54.4 ($\alpha\text{-CH}$), 54.2 ($\alpha\text{-CH}$), 53.3 ($\alpha\text{-CH}$), 53.2 ($\alpha\text{-CH}$), 53.0 ($\alpha\text{-CH}$), 48.6 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 48.1 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 47.2 ($\delta\text{-CH}_2$ Pro), 43.9 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 40.8 (CH_2), 40.7 (CH_2), 40.1 (CH_2), 31.4 (CH_2), 31.0 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.3 (CH_2), 30.0 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 29.2 (CH_2), 28.0 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_3$], 24.9 (CH_2), 22.7 (CH_2), 15.2 (SCH_3 Met) ppm

$\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{S}_5$ (1125.51)

MS (FAB, 3-NBA): 1147.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 1124.9 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 1069.1 [$\text{M}-t\text{Bu}$] $^+$, 1041.0 [$\text{M}-\text{Aloc}$] $^+$, 1012.0 [$\text{M}-2t\text{Bu}$] $^+$

HRMS (FAB, 3-NBA): ber.: 1125.453

gef.: 1125.478.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(e)-allyloxycarbonyl-*L*-lysine**

Aloc-Pro-Gly-Cys(*St*Bu)-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-Lys(Aloc)-OH

Eine Lösung von 12.6 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(e)-allyloxycarbonyl-*L*-lysine-*tert*-butylester (13.8 μmol , 1 Äquivalent) in 0.25 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 4 μl Thioanisol (27.6 μmol , 2 Äquivalente) und 0.25 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 3 Stunden wird das Lösungsmittelgemisch im Vakuum ohne Heizbad abdestilliert und der hierbei erhaltene Feststoff durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1,

dann 8:1) gereinigt.

Ausbeute: 10.4 mg (12.1 μmol , 88 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.23$ (Chloroform/Methanol 4:1)

Smp: 119 °C

$[\alpha]_D^{20} = -80.6$ (c=0.8, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 500 MHz): $\delta=5.86\text{--}5.99$ (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.19–5.37 (m, 4 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.51–4.67 (m, 6 H), 4.36–4.47 (m, 3 H), 4.17–4.21 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH Pro}$), 3.75–3.99 (unter OH-Peak: m, vermutlich $\alpha\text{-CH}_2$ Gly und $\beta\text{-CH}_2$ Ser), 3.55–3.66 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2$ Pro), 3.02–3.30 (m, 6 H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys, $\epsilon\text{-CH}_2$ Lys), 2.47–2.67 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.17–2.30 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Pro, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Met), 1.87–2.14 (m, 5 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Pro, $\gamma\text{-CH}_2$ Pro, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Met, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Lys), darunter 2.09 (s, 3 H, SCH_3 Met), 1.74–1.81 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Lys), 1.36–1.55 (m, 4 H, $\gamma\text{-CH}_2$ Lys, $\delta\text{-CH}_2$ Lys), 1.34 [s, 9 H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 1.34 [s, 9 H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$] ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 125 MHz): $\delta=175.2$ (C=O), 174.4 (C=O), 173.1 (C=O), 172.6 (C=O), 172.4 (C=O), 171.3 (C=O), 171.2 (C=O), 157.0 (C=O Urethan), 156.1 (C=O Urethan), 133.1 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 132.4 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 118.1 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 117.6 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 66.9 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 65.6 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 61.9 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 61.8 ($\alpha\text{-CH Pro}$), 56.6 ($\alpha\text{-CH}$), 54.7 ($\alpha\text{-CH}$), 54.1 ($\alpha\text{-CH}$), 53.7 ($\alpha\text{-CH}$), 52.6 ($\alpha\text{-CH}$), 48.5 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 48.3 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 47.2 ($\delta\text{-CH}_2$ Pro), 43.9 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 40.7 (CH_2), 40.6 (CH_2), 40.2 (CH_2), 30.9 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.6 (CH_2), 30.3 (CH_2), 29.9 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 29.2 (CH_2), 24.8 (CH_2), 23.0 (CH_2), 15.2 (SCH_3 Met) ppm.

$\text{C}_{43}\text{H}_{72}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{S}_5$ (1069.41)

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-allyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**
Aloc-Pro-Gly-Cys(*StBu*)-Met-Ser-Cys(*StBu*)-Lys(Aloc)-Cys(Far)-OMe (**23b**)

Eine Lösung von 34 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-allyloxycarbonyl-*L*-lysyl (32.0 μmol , 1 Äquivalent) und 14 mg *S*-Farnesyl-*L*-cysteinmethylester (41.3 μmol , 1.3 Äquivalente) in 5 ml trockenem Methylenchlorid wird nacheinander mit 5.2 mg HOAt (38.2 μmol ,

1.2 Äquivalente) und 7.3 mg EDC (38.2 μmol , 1.2 Äquivalente) versetzt. Nach 16 Stunden gerührt wird die Reaktionslösung mit 20 ml Methylenchlorid verdünnt und mit 20 ml 0.5 N Salzsäure gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1) isoliert.

Ausbeute: 21 mg (15.1 μmol , 47 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.25$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 236 °C

$[\alpha]_D^{20} = -87.4$ (c=1.0, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 500 MHz): $\delta=5.76\text{--}5.99$ (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.07–5.39 (m, 7 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$ Alloc, 3 $\text{CR}_2=\text{CH}$ Far), 4.30–4.71 (m, 10 H), 4.17–4.21 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ Pro), 3.71–4.01 (m, 7 H, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly, $\beta\text{-CH}_2$ Ser, CO_2CH_3), 3.55–3.61 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2$ Pro), 2.90–3.32 (teilweise unter OH-Peak: m, vermutlich 9 H, 5 * $\beta\text{-CH}_2$ Cys, $\alpha\text{-CH}_2$ Far, $\epsilon\text{-CH}_2$ Lys), 2.78–2.86 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Cys_{Far}), 2.52–2.66 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 1.85–2.29 (m, 16 H), 1.22–1.79 (m, 5 H), darunter 1.68 (s, 6 H, Far- CH_3), 1.60 (s, 6 H, Far- CH_3), 1.34 [s, 9 H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 1.33 [s, 9 H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$] ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 125 MHz): $\delta=171.3$ (C=O), 170.9 (C=O), 156.8 (C=O Urethan), 156.0 (C=O Urethan), 139.9 (*quart*, Far-C), 135.4 (*quart*, Far-C), 133.2 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 132.3 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 131.4 (*quart*, Far-C), 124.3 (Far-CH), 123.9 (Far-CH), 119.7 (Far-CH), 118.2 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 117.5 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$), 66.9 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 65.4 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 62.2 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 61.7 ($\alpha\text{-CH}$ Pro), 57.4 ($\alpha\text{-CH}$), 54.4 ($\alpha\text{-CH}$), 53.7 ($\alpha\text{-CH}$), 53.5 ($\alpha\text{-CH}$), 52.5 ($\alpha\text{-CH}$), 52.3 ($\alpha\text{-CH}$), 48.75 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 48.2 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 47.2 ($\delta\text{-CH}_2$ Pro), 43.9 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 40.6 (CH_2), 39.8 (CH_2), 32.6 (CH_2), 30.9 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.0 [$\text{SC}(\text{CH}_3)_3$], 29.5 (CH_2), 29.1 (CH_2), 26.7 (CH_2), 26.6 (CH_2), 26.5 (Far- CH_2), 25.7 (Far- CH_3), 24.8 (CH_2), 22.9 (CH_2), 17.7 (Far- CH_3), 16.2 (Far- CH_3), 16.0 (Far- CH_3), 15.1 (SCH_3 Met) ppm

$\text{C}_{62}\text{H}_{103}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_6$ (1390.93)

MS (FAB, 3-NBA): 1412.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1390.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***L*-Prolyl-glycyl-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*L*-cysteyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**

H-Pro-Gly-Cys-Met-Ser-Cys-Lys-Cys(Far)-OMe (**1b**)

Eine Lösung von 4.5 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-prolyl-glycyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-allyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **23b** (3.24 μmol, 1 Äquivalent) in 5 ml absolutem THF wird mit 0.8 μl Phenylsilan (6.47 μmol, 2 Äquivalente) und 0.4 mg Pd(PPh₃)₄ (0.324 μmol, 10 Mol%) versetzt. Nach 15 Stunden wird das Lösungsmittel abdestilliert.

Der Rückstand wird in 5 ml absolutem Methylenchlorid aufgenommen und unter Argon mit 2 μl Triethylamin (12.9 μmol, 4 Äquivalente) und 4 mg Dithiothreitol (25.9 μmol, 8 Äquivalente) versetzt. Nach einer Stunde wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt über Größenausschlusschromatographie (Sephadex LH-20, CHCl₃/MeOH 1:1) isoliert. Die Produktfraktionen werden durch Massenspektroskopie identifiziert (MALDI-TOF).

Ausbeute: 2.1 mg (2.01 μmol, 62 %) eines gelblichen Feststoffes

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): Dieses Peptid zeigt auch in starker Verdünnung extrem breite Signale. Lediglich die Peaks der Farnesylgruppe sind gut aufgelöst. Signifikante Signale: δ=5.05–5.25 (m, 2 H, 3 CR₂=CH Far), 3.78 (s, 3 H, CO₂Me), 1.68 (s, 6 H, Far-CH₃), 1.60 (s, 6 H, Far-CH₃) ppm

C₄₆H₇₉N₉O₁₀S₄ (1046.44)

MALDI-TOF (DHB/TFA-Matrix): 1046 [M+H]⁺.

6.3 Versuche zur Raf-Aktivierung durch Ras

6.3.1 Herstellung der Proteine

6.3.1.1 Transfektion

Hierfür werden 1.5–2 · 10⁵ COS1-Zellen pro Schale (30 mm Durchmesser) benötigt.

Für die Transfektion werden 100 μl Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1 μg Plasmid versetzt. Nach 15 Minuten werden 5 μl Lipofectamin (Life Technologies) und 100 μl DMEM zugegeben und weitere 15 Minuten später wird diese Lösung vorsichtig zu der Zellkultur in 2 ml DMEM getropft. Nach etwa 5 Stunden wird das Medium entfernt und durch DMEM ersetzt, das mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) und Antibiotika

(100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycinsulfat) versetzt ist. Die Zellen werden einen Tag in diesem Medium inkubiert und anschließend das Medium durch DMEM mit Antibiotika, aber ohne FBS ersetzt. Nach weiteren 10 bis 15 Stunden können die Zellkulturen abgebrochen und Lysate hergestellt werden.

6.3.1.2 Elektroporation

Hierfür werden $3 \cdot 10^6$ COS1-Zellen pro Schale (100 mm Durchmesser) benötigt.

In einer Elektroporationsküvette werden 10 µg Plasmid mit $3 \cdot 10^6$ COS1-Zellen in 250 µl HEBS-Puffer (20 mM HEPES, pH=7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM K_2HPO_4 , 6 mM Glucose) und 100 µg Lachsspermien-DNA als Träger-DNA versetzt. Die Elektroporation wird bei 250 V und 125 mF durchgeführt. Anschließend werden die Zellen in Schalen (100 mm Durchmesser) mit 10 ml DMEM (mit 10 % FBS und Antibiotika) gegeben. Nach zwei Tagen wird das Medium durch serumfreies ausgetauscht und weitere 15 Stunden später die Lyse durchgeführt.

6.3.1.3 Zell-Lyse

Das Nährmedium wird entfernt, die Zellen mit 2 ml (3 cm-Schalen) oder 10 ml (10 cm-Schalen) PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 250 bzw. 500 µl Lyse-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH=7.5, 1 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM Natriumvanadat, 10 µg/ml Leupeptin, 10 mM Benzamidin, 10 µg/ml Trypsininhibitor und 10 µg/ml Aprotinin) abgelöst. Die Lysate werden mechanisch homogenisiert und große Bruchstücke durch vorsichtige Zentrifugation bei minimaler Geschwindigkeit abgetrennt (1500 rpm, 5 Minuten, 4 °C). Anschließend werden Membranfragmente durch Zentrifugation bei 100000 g (4 °C, 30 Minuten) von der cytosolischen Fraktion getrennt. Im Falle der Ras-Lysate wird das Pellet weiterverwendet, während bei Raf-Lysaten der Überstand benötigt wird. Bei der positiven Kontrolle (Ras/Raf-Koexpression) werden beide Fraktionen getrennt weiterverwendet.

6.3.2 Assay

6.3.2.1 Raf-Aktivierung

Das Ras-Pellet wird in 50 µl Lyse-Puffer suspendiert und mit 250 µl Raf-Überstand vermischt (10 Minuten bei Raumtemperatur). Anschließend wird bei 100000 g (20 Minuten, 4 °C) zentrifugiert und der Überstand (im folgenden auch als S100 bezeichnet) vom Pellet (P100) getrennt. Das Pellet wird in 100 µl Lyse-Puffer suspendiert

und zu allen Fraktionen NP40 als Detergens zugegeben (1 % finale Konzentration) und die Lösungen 10 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Ungelöste Bestandteile werden durch Zentrifugation (13500 rpm, 4 °C) abgestrennt. Anschließend werden zu allen Fraktionen polymer-gebundene Glu-Glu-Antikörper zugegeben (60 Minuten, 4 °C), um das Raf zu immobilisieren. Die Immunoprecipitate (IP) werden zentrifugiert und insgesamt zweimal mit 1ml Puffer (20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 1mM EDTA, 0.15 M NaCl, 1mM DTT) gewaschen. Die restliche Flüssigkeit wird mit einer Spritze entfernt. Für die Assays wird das Polymer in 10 µl Kinase-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA) aufgeschlemmt.

6.3.2.2 Direkter Kinase-Assay

Zu dem aufgeschlemmten Polymer, mit dem zuvor Raf ausgefällt worden war, werden 5 µl einer Lösung von 0.2 µg MEK, 20 µM ATP, 2.5 µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT in Kinase-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA) gegeben. Die Reaktion wird nach 10 Minuten bei 30 °C durch Denaturierung der Proteine gestoppt. Zur Analyse werden die Proben einer Gelelektrophorese unterworfen (SDS-PAGE) und die Radioaktivität durch Belichten eines speziellen Screens ermittelt.

6.3.2.3 Gekoppelter Kinase-Assay

Zu dem aufgeschlemmten Polymer, mit dem zuvor Raf ausgefällt worden war, werden 2 µg GST-Erk und 0.5 µg MEK in 15 µl Kinase-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA) versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 mM MgCl₂ und 500 µM ATP in 5 µl Wasser gestartet. Nach 30 Minuten bei 30 °C werden zwei Proben von je 2 µl entnommen und zu einer Lösung von 16 µg *Myelin Basic Protein* (MBP) in 38 µl Kinase-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA) auf Eis gegeben. Der Überschuss an EDTA verhindert eine weitere Phosphorylierung.

Der zweite Phosphorylierungsschritt wird durch Zugabe von 10 µl einer Lösung mit 50 mM MgCl₂, 500 µM ATP und 2.5 µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP in Wasser eingeleitet. Nach 10 Minuten bei 30 °C werden 40 µl der Reaktionsmischung auf ein 2· 2 cm großes Stück Phosphocellulose P81-Papier (Whatman-Papier) aufgetragen. Das Papier wird zweimal mit 75 mM Phosphorsäure und abschließend Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen wird die Radioaktivität (in Zerfällen pro Minute, cpm) mit einem Szintillationszähler in Gegenwart von Szintillationsflüssigkeit ermittelt.

6.3.3 Gemessene Daten

Nr.		Mittelwert Cytosol-Fraktion	Mittelwert Membran-Fraktion
1	Blindprobe	1813	-
2	Assay ohne Raf	8263	-
3	Ras-Membranen	19452	9779
4	Ras-Membranen mit DMSO	17152	8706
5	MetGlyLeuProCys(Far)OMe	20437	11583
6	Raf-Cytosol	21815	-
7	Raf-Cytosol und K-Ras	16896	-
8	Raf-Cytosol, K-Ras und DMSO	20415	-
9	MetGlyLeuProCys(Far)OMe	17446	-
10	Cys(Far)OMe	18193	-
11	Ras/Raf Koexpression	61423	224070

Tabelle 8: Messwerte zu Abbildung 8

Trotz der bisher nicht gelungenen Aktivierung des Raf-Cytosols wurde getestet, ob der Einsatz von Peptiden nicht wenigstens einen kleinen Effekt zeigt. Die beiden Messreihen sind im Folgenden aufgelistet.

Experiment	S100	S100	P100	P100
Blindprobe	2974	14036	-	-
Assay ohne Raf	18730	23737	-	-
Kontrollmembranen	35450	30531	14516	15092
Ras-Membranen	32326	27643	22066	21306
Ras-Membranen (Vergleich)	28603	31480	15808	16210
Ras-Membranen mit DMSO	24473	21702	26738	26260
Farnesol	25650	27043	22496	24278
Cys(Far)OMe	31797	31383	21070	23267
MetGlyLeuProCys(Far)OMe	27218	31954	24669	27658

Experiment	S100	S100	P100	P100
BocGlyCys(Pal)MetGlyLeu-ProCys(Far)OMe	26898	26380	19064	23773
AlocProGlyCys(Pal)Met-SerCys(Pal)OtBu	26680	26590	24796	22620
ProGlyCys(Pal)Met-SerCys(Pal)OtBu	19204	19114	23778	16148
ProGlyCys(Pal)Met-SerCys(Pal)OH*TFA	25191	25618	19100	22226
AlocMetSerCys(Pal)-Lys(PhAc)Cys(Far)OMe	27458	23587	19670	20188
K-Ras	29480	30777	27438	25940
Ras/Raf Koexpression	199540	217960	275640	253260

Tabelle 9: Erste Testreihe unter Einsatz ausgewählter lipidiertes Peptide in der Untersuchung der Aktivierung von Raf durch Ras

Experiment	S100	S100	P100	P100
Blindprobe (ohne Proteine)	2370	4642	-	-
Assay ohne Raf	17238	26230	-	-
Kontrollmembranen (ohne Ras)	36720	39286	14772	12776
Ras-Membranen	26145	30443	18898	22064
Ras-Membranen mit DMSO	24756	30369	18704	23958
FmocMetGlyLeu-ProCys(Far)OMe	32623	26718	13928	13282
MetGlyLeuProCys(Far)OMe	27840	27230	21418	21088
FmocLeuProCys(Far)OMe	27660	35043	19996	14974
LeuProCys(Far)OMe	33503	24307	26263	23047
FmocProCys(GerGer)OMe	24087	21802	18962	13644
AlocLys(Aloc)Cys(Far)OMe	28158	25588	17122	16716
ProGlyCys(Pal)OH*TFA	32095	22142	18356	18790
AlocProGlyCys(Pal)OH	30006	35780	20222	16320
Cys(Far)OMe	36800	43984	22778	24371

Experiment	S100	S100	P100	P100
AlocProGlyCys(Pal)MetSer- Cys(Pal)Lys(Aloc)Cys(Far)OMe	44304	40764	29208	33231
Ras/Raf Koexpression	161310	239320	440340	354080

Tabelle 10: Zweite Testreihe unter Einsatz ausgewählter lipidierter Peptide in der Untersuchung der Aktivierung von Raf durch Ras

6.4 Versuche zur Ras-PI3K-Interaktion

6.4.1 Assay

Die Vorinkubation der p110 γ mit dem Peptid erfolgt durch Mischen von 15 μ l GST-p110 γ , 0.5 μ l einer 25mM Lösung von H-Pro-Gly-Cys-Met-Ser-Cys-Lys-Cys(Far)-OMe **1b** in DMSO und 120 μ l Puffer (500mM Hepes 7.5, 50 mM MgCl₂). Als Vergleichswerte werden (a) die gleiche Mischung mit 0.5 μ l DMSO statt der Peptidlösung und (b) 15 μ l Glycerinpuffer (500mM Hepes 7.5, 50 mM MgCl₂, 50 % Glycerin), 0.5 μ l DMSO und 120 μ l Puffer (500mM Hepes 7.5, 50 mM MgCl₂) angesetzt. Die Proben werden 60 Minuten auf 30 °C erwärmt.

Die Aktivierung des K-Ras mit γ^{32} P-GTP erfolgt durch Mischen von 1,5 μ l K-Ras (1.5 μ g) mit 30 μ l Puffer (10 mM EDTA, 500 μ M β -Dodecylmaltosid) und 3 μ l γ^{32} P-GTP (30 μ Ci) für 5 Minuten bei 37 °C. Anschließend werden 0.75 μ l MgCl₂ (1 M), 360 μ l Puffer (500mM Hepes 7.5, 50 mM MgCl₂, 1 mM β -Dodecylmaltosid) und 3 μ l GTP (100 mM) zugegeben.

Die Komplexierung von GST-p110 γ und Ras(γ^{32} P-GTP) erfolgt durch Mischen von 120 μ l vorinkubierter GST-p110 γ -Lösung und 120 μ l Ras(γ^{32} P-GTP)-Lösung (die Referenzmessungen werden analog behandelt). Diese Mischung wird 15 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend werden 30 μ l RasGAP zugegeben und die Reaktion auf 30 °C erwärmt. Nach 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7.5, 10, 15, 20 und 25 Minuten werden je 20 μ l Probe entnommen. Diese Probe wird sofort zu 480 μ l einer kalten Aufschlämmung von 5 % Aktivkohle in 7 mM Phosphorsäure gegeben. Nach Zentrifugieren (4 °C, 14000 rpm, 15 min) werden jeweils 200 μ l des Überstandes entnommen und im Szintillationszähler vermessen.

6.3.2 Gemessene Daten

Die in diesem Abschnitt aufgelisteten Messwerte sind in radioaktiven Zerfällen pro Minute angegeben (*counts per minute*, cpm)

Zeit (min)	Puffer + K-Ras	p110 + K-Ras
0	74405	20280
0.5	84208	23492
1	80701	28379
1.5	86359	34845
2	89205	38773
3	90393	46231
5	94031	55269
7.5	99763	62052
10	99955	67648
15	105987	75379
20	107399	84886

Tabelle 11: Dissoziation des Ras-PI3K-Komplexes in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	Puffer + K-Ras	p110 + K-Ras + DMSO	p110 + K-Ras + Peptid
0	56618	18493	16226
1	66797	32207	27546
2	70392	40683	38356
3	69929	46003	43520
5	73885	54010	50734
7.5	75822	60048	57617
10	77166	63709	
12			63961
15	81404	68272	67163
20	83919	76276	75010
25	86220	78893	76821

Tabelle 12: Dissoziation des Ras-PI3K-Komplexes in Abhängigkeit von der Zeit in Gegenwart von 100 μ M H-Pro-Gly-Cys-Met-Ser-Cys-Lys-Cys(Far)-OMe **1b**

6.5 Versuche zur Synthese Maleinimido-modifizierter Pentapeptide

6.5.1 Herstellung selektiv blockierter Lysinderivate

Selektivität durch Komplexierung mit Kupfer⁶⁸

Eine Lösung von 4 g *L*-Lysin·H₂O (24.4 mmol, 1 Äquivalent) und 6.7 g CuSO₄·5H₂O (26.8 mmol, 1.1 Äquivalente) in 50 ml Wasser wird 30 Minuten zum Rückfluss erhitzt und der dabei entstandene Feststoff heiß abfiltriert. Der pH-Wert wird durch die Zugabe von Na₂CO₃ auf 9 eingestellt und bei 0 °C werden 1.5 Äquivalente Chlorameisensäure-Ester (36.5 mmol) über 60 Minuten zugetropft. Dabei wird der pH-Wert regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls weiteres Na₂CO₃ zugegeben. Zur Vervollständigung der Reaktion wird weitere 13 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Der dabei entstandene blaue Niederschlag wird abfiltriert, in 80 ml Wasser suspendiert und mit 3.7 g Thioacetamid (48.8 mmol, 2 Äquivalente) versetzt. Die Suspension wird 3 Stunden bei 50 °C gerührt, das Kupfersulfid abfiltriert und die Lösung bei Bedarf im Vakuum aufkonzentriert.

Zur Einführung der α -Aminoschutzgruppe werden bei 0 °C 1.5 Äquivalente Chlorameisensäure-Ester (36.5 mmol) über 10 Minuten zugetropft. Nach 12 Stunden wird der pH-Wert durch Zugabe von NaOH auf 10 angehoben und die Lösung zweimal mit je 25 ml Diethylether gewaschen. Anschließend wird der pH-Wert der wässrigen Phase durch Zugabe von halbkonz. Salzsäure auf drei eingestellt und diese viermal mit je 40 ml Essigester gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Selektivität durch Bildung einer Schiffsbasis⁶⁹

Zu einer Lösung von 8.21 g Lysin (50 mmol, 1 Äquivalent) in 20 ml Wasser werden unter Eiskühlung 5.3 ml Benzaldehyd (52.5 mmol, 1.05 Äquivalente) getropft. Innerhalb von 5 Minuten beginnt ein farbloser Feststoff auszufallen. Nach 3 Stunden Lagerung im Kühlschrank wird die inzwischen erstarrte Masse mit 20 ml Ethanol aufgeschlemmt, filtriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Ausbeute: 9.53 g *N*^(e)-Benzyliden-*L*-Lysin als farbloser Feststoff, der nahezu unlöslich in gängigen Lösungsmitteln ist.

Zu einer Aufschlämmung von 0.3 mmol *N*^(e)-Benzyliden-*L*-Lysin (1 Äquivalent) in 3 ml trockenem Acetonitril werden 7.5 mmol *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (2.5 Äquivalente) gegeben. Innerhalb von 10 bis 20 Minuten bildet sich eine klare Lösung, zu der 2.4 mmol Chlorameisensäureester (0.8 Äquivalente) gegeben werden. Nach 18 Stunden werden 3 ml 10%ige Salzsäure zugegeben und 5 Minuten auf 50 °C erhitzt, die Lösung zweimal mit je

10 ml Diethylether extrahiert und der pH-Wert mit 1 N Natronlauge auf 6.2 eingestellt, wobei das Produkt als farbloser Feststoff ausfällt. Nach 3 Stunden bei 4 °C wird der Feststoff abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen.

6.5.2 Versuche zu Kapitel 4.4.2.2

$N^{(\alpha)}$ -Allyloxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -phenylacetyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

Aloc-Lys(PhAc)-Cys(Far)-OMe

Zu einer Lösung von 103 mg $N^{(\alpha)}$ -Allyloxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -phenylacetyl-*L*-lysin **24** (0.295 mmol, 1 Äquivalent) und 100 mg *S*-Farnesyl-*L*-cysteinmethylester **5** (0.295 mmol, 1 Äquivalent) in 2 ml Methylenchlorid werden bei 0 °C nacheinander 48 mg HOBt (0.442 mmol, 1.5 Äquivalente) und 68 µl DIC (0.353 mmol, 1.2 Äquivalente) gegeben. Nach 12 Stunden wird die Lösung mit 8 ml Methylenchlorid verdünnt, je zweimal mit 10 ml 1 N Salzsäure und 10 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in Aceton aufgenommen, wobei der größere Teil des Di-*iso*-propylharnstoffs als farbloser Feststoff zurückbleibt. Die Trennung wird durch Stehen bei – 20 °C über 12 Stunden vervollständigt, der Harnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 1:3) isoliert.

Ausbeute: 139 mg (0.207 mmol, 70 %) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ= 7.20–7.32 (m, 5 H, arom.), 5.89–5.97 (m, 1 H, CH₂=CH–CH₂O), 5.31 (d, 1 H, *J*=17.2 Hz, CH_{2a}=CH–CH₂O), 5.17–5.23 (m, 2 H), 5.08–5.13 (m, 2 H, CH=C Far), 4.61 (dd, 1 H, *J*=8.1 Hz, *J*=5.3 Hz, α-CH Cys), 4.54 (d, 2 H, *J*=5.1 Hz, CH₂=CH–CH₂O), 4.15 (dd, 1 H, *J*=8.1 Hz, *J*=5.7 Hz, α-CH Lys), 3.71 (s, 3 H, COOCH₃), 3.49 (s, 2 H, PhCH₂), 3.11–3.26 (m, 4 H, α-CH₂ Far, ε-CH₂ Lys), 2.94 (dd, 1 H, *J*=13.9 Hz, *J*=5.1 Hz, β-CH_{2a} Cys), 2.76 (dd, 1 H, *J*=13.9 Hz, *J*=8.2 Hz, β-CH_{2b} Cys), 1.95–2.15 (m, 8 H, CH₂ Far), 1.36–1.83 (m, 6 H, CH₂ Lys), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.67 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 3 H, CH₃ Far) ppm

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ= 174.7 (C=O), 173.9 (C=O), 172.5 (C=O), 158.1 (C=O Urethan), 140.6 (*quart*, Far), 137.0 (*quart*, Far), 136.2 (*quart*, arom.), 134.3 (CH₂=CH–CH₂O), 132.1 (*quart*, Far), 130.0 (arom. CH), 129.5 (arom. CH), 127.8 (arom. CH), 125.4 (Far-CH), 125.1 (Far-CH), 121.4 (Far-CH), 117.7 (CH₂=CH–CH₂O), 66.6

(CH₂=CH-CH₂O), 56.1 (α -CH), 53.5 (α -CH), 52.9 (COOCH₃), 43.9 (β -CH₂ Cys), 40.8 (CH₂), 40.7 (CH₂), 40.3 (CH₂), 33.2 (CH₂), 33.0 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.9 (CH₂), 27.8 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.0 (Far-CH₃), 24.0 (CH₂), 17.8 (Far-CH₃), 16.3 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃) ppm

C₃₇H₅₅N₃O₆S (669.92)

MS (EI, 190 °C): 669.4 [M]⁺ (4 %), 464.2 [M-Far]⁺ (13 %)

HRMS (EI) ber.: 669.3812

gef.: 669.3786.

***N*^(ϵ)-Phenylacetyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**

Lys(PhAc)-Cys(Far)-OMe (**25**)

Unter Argon werden 2.8 mg PdCl₂ (0.016 mmol, 10 Mol%) und 17.7 mg Triphenylphosphintrisulfonsäure-trisnatriumsalz (TPPTS, 0.031 mmol, 20 Mol%) in 0.6 ml absolutem Wasser 2 Stunden gerührt. Dazu wird eine Lösung aus 104 mg *N*-Allyloxy-carbonyl-*N*^(ϵ)-phenylacetyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester (0.155 mmol, 1 Äquivalent) und 65 μ l Diethylamin (0.622 mmol, 4 Äquivalente) in 1.2 ml absolutem Acetonitril gegeben. Nach 30 Minuten wird das Produkt durch Zugabe von 5 ml Wasser ausgefällt und abfiltriert. Der Feststoff wird in Methylenchlorid/MeOH (1:1) aufgenommen, die Lösung über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, wobei das Produkt als gelblicher Feststoff anfällt, das geringe Mengen des Diketopiperazines enthält. Eine Abtrennung dieses Nebenproduktes ist nicht möglich.

Ausbeute: 80 mg (0.137 mmol, 88 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.91 (d, 1 H, *J*=8.2 Hz, NH), 7.22–7.35 (m, 5 H, arom.), 5.64 (b, 1 H, NH), 5.18 (t, 1 H, *J*=7.7 Hz, CH Far), 5.05–5.10 (m, 2 H, CH Far), 4.68–4.75 (m, 1 H, α -CH Cys), 3.74 (s, 3 H, COOCH₃), 3.55 (s, 2 H, PhCH₂), 3.34 (dd, 1 H, *J*=7.8 Hz, *J*=4.6 Hz, α -CH Lys), 3.09–3.25 (m, 4 H, α -CH₂ Far, ϵ -CH₂ Lys), 2.94 (dd, 1 H, *J*=13.8 Hz, *J*=4.9 Hz, β -CH_{2a} Cys), 2.81 (dd, 1 H, *J*=13.8 Hz, *J*=6.7 Hz, β -CH_{2b} Cys), 1.92–2.11 (m, 8 H, CH₂ Far), 1.68–1.83 (m, 2 H, β -CH₂ Lys), 1.67 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.66 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.59 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.40–1.55 (m, 2 H, γ -CH₂ Lys), 1.28–1.38 (m, 2 H, δ -CH₂ Lys) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 175.0 (C=O), 171.5 (C=O), 171.0 (C=O), 140.0 (*quart*, Far), 135.4 (*quart*, Far), 135.1 (*quart*, arom.), 131.3 (*quart*, Far), 129.4 (arom. CH), 129.0 (arom. CH), 127.3 (arom. CH), 124.3 (Far-CH), 123.7 (Far-CH), 119.5 (Far-CH), 54.8 (α -CH Cys), 52.5 (COOCH_3), 51.4 (α -CH Lys), 43.8 (β - CH_2 Cys), 39.7 (CH_2), 39.6 (CH_2), 39.2 (CH_2), 34.4 (CH_2), 33.3 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.1 (CH_2), 26.7 (CH_2), 26.4 (CH_2), 25.7 (Far- CH_3), 22.8 (CH_2), 17.7 (Far- CH_3), 16.1 (Far- CH_3), 16.0 (Far- CH_3) ppm.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein**

Aloc-Met-Ser-Cys(Pal)-OH (**26**)

Bei Raumtemperatur werden 52 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **16** (0.072 mmol) in 0.3 ml Methylenchlorid gelöst und mit 0.3 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach drei Stunden werden 5 ml Toluol zugegeben und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

Ausbeute: 47.5 mg (0.072 mmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffs

^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ = 5.90–5.98 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.32 (dd, 1 H, $J=17.2$ Hz, $J=1.5$ Hz, $\text{CH}_{2a}=\text{CH}$), 5.19 (dq, 1 H, $J=10.5$ Hz, $J=1.4$ Hz, $\text{CH}_{2b}=\text{CH}$), 5.17–5.20 (m, 1 H, α -CH Cys), 4.55–4.57 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.44 (t, 1 H, $J=5.4$ Hz, α -CH Ser), 4.30 (dd, 1 H, $J=8.9$ Hz, $J=5.1$ Hz, α -CH Met), 3.74–3.83 (m, 2 H, β - CH_2 Ser), 3.52 (dd, 1 H, $J=14.0$ Hz, $J=4.7$ Hz, β - CH_{2a} Cys), 3.21 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=7.8$ Hz, β - CH_{2b} Cys), 2.53–2.61 (m, 4 H, α - CH_2 Pal, γ - CH_2 Met), 2.10 (s, 3 H, SCH_3 Met), 2.04–2.15 (m, 1 H, β - CH_{2a} Met), 1.90–1.98 (m, 1 H, β - CH_{2b} Met), 1.62–1.65 (m, 2 H, β - CH_2 Pal), 1.28 [s, 24 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$], 0.90 (t, 3 H, $J=6.8$ Hz, ω - CH_3 Pal) ppm

^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ = 200.2 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COS}$], 174.4 (C=O), 172.9 (C=O), 172.0 (C=O), 158.4 (C=O Urethan), 134.2 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 117.8 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 66.8 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$) 62.9 (β - CH_2 Ser), 56.5 (α -CH), 55.6 (α -CH), 53.5 (α -CH Cys), 44.8 (β - CH_2 Cys), 33.1 (CH_2), 32.8 (CH_2 Met), 31.1 (CH_2), 31.1 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.7 (CH_2), 30.6 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.4 (CH_2), 30.0 (CH_2), 26.6 (CH_2), 23.7 (CH_2), 15.3 (SCH_3 Met), 14.5 (CH_3 Pal) ppm.

$\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ (661.91)

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-phenylacetyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**

Aloc-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(PhAc)-Cys(Far)-OMe (**27**)

Eine Lösung von 34.9 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein **26** (0.149 mmol, 1.1 Äquivalente) und 68.3 mg *N*^(ε)-phenylacetyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **25** (0.136 mmol, 1 Äquivalent) in 0.5 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 40.3 mg EEDQ (0.163 mmol, 1.2 Äquivalente) versetzt. Nach 40 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 1:1) isoliert.

Ausbeute: 51.5 mg (0.072 mmol, 53 %) eines farblosen Feststoffes.

R_f=0.13 (Methylenchlorid/Hexan/Ethanol 15:5:1)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ= 7.52 (b, NH), 7.20–7.35 (m, 5 H, arom.), 7.05 (b, NH), 5.86–5.94 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂O), 5.80 (b, NH), 5.68 (b, 2 H, NH), 5.30 (d, *J*=17.1 Hz, 1 H, CH_{2a}=CH-CH₂O), 5.18–5.21 (m, 2 H, CH_{2b}=CH-CH₂O, Far-CH), 5.07–5.11 (m, 2 H, Far-CH), 4.63–4.72 (m, 1 H, α-CH Cys_{Far}), 4.52–4.62 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂O, α-CH Cys_{Pal}), 4.45–4.50 (m, 1 H, α-CH), 4.38–4.45 (m, 1 H, α-CH), 4.21–4.31 (m, 1 H, α-CH), 3.90–3.98 (m, 1 H, β-CH_{2a} Ser), 3.82–3.86 (m, 1 H, β-CH_{2b} Ser), 3.76 (s, 3 H, COOCH₃), 3.59 (s, 2 H, PhCH₂), 3.39 (dd, 1 H, *J*=14.4 Hz, *J*=3.5 Hz, β-CH_{2a} Cys_{Pal}), 3.31 (dd, 1 H, *J*=14.9 Hz, *J*=8.7 Hz, β-CH_{2b} Cys_{Pal}), 3.11–3.24 (m, 4 H, α-CH₂ Far, ε-CH₂ Lys), 2.97 (dd, 1 H, *J*=14.0 Hz, *J*=4.7 Hz, β-CH_{2a} Cys_{Far}), 2.86 (dd, 1 H, *J*=13.9 Hz, *J*=7.6 Hz, β-CH_{2b} Cys_{Far}), 2.52–2.62 (m, 4 H, α-CH₂ Pal, γ-CH₂ Met), 1.70–2.18 (m, 12 H, CH₂ Far, β-CH₂ Met, β-CH₂ Lys), 2.07 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.67 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.59 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.63 (m, 2 H, β-CH₂ Pal), 1.30–1.43 (m, 4 H, γ-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys), 1.24 [s, 24 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS], 0.87 (t, 3 H, *J*=6.8 Hz, ω-CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 202.3 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 172.1 (C=O), 171.4 (C=O), 171.2 (C=O), 170.7 (C=O), 169.4 (C=O), 156.0 (C=O Urethan), 140.3 (*quart*, Far), 135.4 (*quart*, Far), 134.6 (*quart*, arom.), 132.5 (CH₂=CH-CH₂O), 131.3 (*quart*, Far), 129.5 (arom. CH), 129.1 (arom. CH), 127.5 (arom. CH), 124.3 (Far-CH), 123.8 (Far-CH), 119.4 (Far-CH), 118.0 (CH₂=CH-CH₂O), 66.0 (CH₂=CH-CH₂O), 63.2 (β-CH₂ Ser), 55.7 (α-CH Met), 54.8 (α-CH), 54.3 (α-CH), 53.4 (α-CH), 52.7 (COOCH₃), 52.1 (α-CH), 44.1 (β-CH₂ Cys), 43.7 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.0 (CH₂), 32.8

(CH₂), 31.9 (CH₂), 31.0 (CH₂), 30.8 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.7 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 25.7 (CH₂), 22.7 (CH₂), 22.5 (CH₂), 17.7 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃), 15.4 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₆₄H₁₀₄N₆O₁₁S₃ (1229.74)

MS (FAB, 3-NBA): 1251.4 [M+Na]⁺, 1229.4 [M+H]⁺.

6.5.3 Versuche zu Kapitel 4.4.2.3

N^(α)-Allyloxycarbonyl-*N*^(ε)-2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

Aloc-Lys(Teoc)-Cys(Far)-OMe (**29**)

Zu einer Lösung von 682 mg *N*^(α)-Allyloxycarbonyl-*N*^(ε)-2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-*L*-lysine **28** (1.82 mmol, 1 Äquivalent) und 618 mg *S*-Farnesyl-*L*-cysteinmethylester **5** (1.82 mmol, 1 Äquivalent) in 5 ml Methylenchlorid werden 586 mg EEDQ (2.37 mmol, 1.3 Äquivalente) gegeben. Nach 20 Stunden wird die Lösung mit 15 ml Methylenchlorid verdünnt, je zweimal mit 10 ml 1 *N* Salzsäure und 10 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 1.5:1) isoliert.

Ausbeute: 478 mg (0.687 mmol, 38 %) eines gelblichen Feststoffes.

R_f=0.40 (Hexan/Essigester 1.5:1)

[α]_D²⁰ = -7.6 (c=1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ= 6.75 (b, 1 H, NH), 5.86–5.97 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂O), 5.46 (b, 1 H, NH), 5.30 (dd, 1 H, *J*=17.2 Hz, *J*=1.1 Hz, CH_{2a}=CH-CH₂O), 5.17–5.23 (m, 2 H, CH_{2b}=CH-CH₂O, CH=C Far), 5.06–5.13 (m, 2 H, CH=C Far), 4.81 (b, 1 H, NH), 4.76 (dd, 1 H, *J*=12.7 Hz, *J*=6.3 Hz, α-CH Cys), 4.54 (d, 2 H, *J*=5.3 Hz, CH₂=CH-CH₂O), 4.17–4.26 (m, 1 H, α-CH Lys), 4.09–4.18 (m, 2 H, TMS-CH₂-CH₂O), 3.77 (s, 3 H, COOCH₃), 3.08–3.24 (m, 4 H, α-CH₂ Far, ε-CH₂ Lys), 2.95 (dd, 1 H, *J*=13.9 Hz, *J*=4.8 Hz, β-CH_{2a} Cys), 2.86 (dd, 1 H, *J*=13.9 Hz, *J*=6.3 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.01–2.12 (m, 6 H, CH₂ Far), 1.94–1.99 (m, 2 H, CH₂ Far), 1.82–1.91 (m, 1 H,

CH_{2a} Lys), 1.68–1.80 (m, 1 H, CH_{2b} Lys), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.66 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.44–1.55 (m, 2 H, CH₂ Lys), 1.35–1.42 (m, 2 H, CH₂ Lys), 0.96 (t, 2 H, 2 TMS-CH₂-CH₂O), 0.03 (s, 9 H, TMS Teoc) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 171.6 (C=O), 171.1 (C=O), 160.0 (C=O Urethan), 156.0 (C=O Urethan), 140.2 (*quart*, Far), 135.4 (*quart*, Far), 132.6 (CH₂=CH-CH₂O), 131.3 (*quart*, Far), 124.3 (Far-CH), 123.7 (Far-CH), 119.4 (Far-CH), 117.9 (CH₂=CH-CH₂O), 65.9 (CH₂=CH-CH₂O), 62.9 (TMS-CH₂-CH₂O), 54.6 (α-CH), 52.7 (COOCH₃), 51.7 (α-CH), 40.2 (β-CH₂), 39.7 (CH₂), 39.6 (CH₂), 33.1 (CH₂), 32.1 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.7 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 22.1 (CH₂), 17.7 (CH₂), 17.0 (Far-CH₃), 16.1 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃), -1.45 (TMS Teoc) ppm

C₃₅H₆₁N₃O₇SSi (696.03)

MS (EI, 165 °C): 695.4 [M]⁺ (5 %)

HRMS (EI) ber.: 695.3999

gef.: 695.3964.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**

Aloc-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Teoc)-Cys(Far)-OMe (**30**)

Unter Argon werden 1.3 mg PdCl₂ (7.2 μmol, 10 Mol%) und 8.2 mg TPPTS (14.4 μmol, 20 Mol%) in 0.2 ml absolutem Wasser 2 Stunden gerührt. Dazu wird eine Lösung aus 49.9 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*N*^(ε)-2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **29** (72 μmol, 1 Äquivalent) und 14.8 μl Diethylamin (287 μmol, 4 Äquivalente) in 0.4 ml absolutem Acetonitril gegeben. Nach 30 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von je 5 ml Diethylether und gesättigte NaCl-Lösung abgebrochen, die wässrige Phase zweimal mit je 5 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Die Lösung wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, wobei das Produkt als gelbliches Öl anfällt.

Rohausbeute: 32 mg (52 μmol, 73 %)

Eine Lösung von 56.3 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein **26** (0.085 mmol, 1.6 Äquivalente) und 25.9 mg EEDQ (0.105 mmol, 2 Äquivalente) in 2 ml trockenem Methylenchlorid wird nach einer Voraktivierung über 10 Minuten zu einer Lösung des frisch hergestellten *N*^(ε)-2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-

L-cysteinmethylesters (0.052 mmol, 1 Äquivalent) in 1 ml Methylenchlorid gegeben. Das Lösungsmittel wird nach 16 Stunden im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Hexan/Ethanol 15:5:1) isoliert. Ein weiterer Reinigungsschritt (Chloroform/Methanol 30:1) ergibt eine bessere Trennung.

Ausbeute: 33.4 mg (26.6 μ mol, 51 %) eines gelblichen Feststoffes.

$R_f=0.44$ (Methylenchlorid/Hexan/Ethanol 15:5:1)

$R_f=0.24$ (Chloroform/Methanol 30:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, ohne TMS): $\delta=$ 7.52 (b, NH), 7.45 (b, NH), 7.05 (b, NH), 5.85–5.94 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 5.85 (b, NH), 5.64 (b, NH), 5.30 (dd, 1 H, $J=17.2$ Hz, $J=1.4$ Hz, $\text{CH}_{2a}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 5.16–5.23 (m, 2 H, $\text{CH}_{2b}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$, Far-CH), 5.07–5.12 (m, 2 H, Far-CH), 4.91–4.97 (m, 1 H, α -CH), 4.68–4.72 (m, 1 H, α -CH), 4.48–4.66 (m, 4 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$, 2 * α -CH), 4.37–4.44 (m, 1 H, α -CH), 4.08–4.19 (m, 2 H, TMS- $\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}$ Teoc), 3.92–4.02 (m, 1 H, β - CH_{2a} Ser), 3.80–3.88 (m, 1 H, β - CH_{2b} Ser), 3.76 (s, 3 H, COOCH_3), 3.35–3.41 (m, 1 H, β - CH_{2a} CysPal), 3.26–3.34 (m, 1 H, β - CH_{2b} CysPal), 3.07–3.24 (m, 4 H, α - CH_2 Far, ϵ - CH_2 Lys), 2.97 (dd, 1 H, $J=13.8$ Hz, $J=4.8$ Hz, β - CH_{2a} CysFar), 2.86 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=7.3$ Hz, β - CH_{2b} CysFar), 2.53–2.63 (m, 4 H, α - CH_2 Pal, γ - CH_2 Met), 1.85–2.18 (m, 12 H, CH_2 Far, β - CH_2 Met, β - CH_2 Lys), 2.09 (s, 3 H, SCH_3 Met), 1.68 (s, 3 H, CH_3 Far), 1.67 (s, 3 H, CH_3 Far), 1.59 (s, 6 H, CH_3 Far), 1.60–1.75 (m, 2 H, β - CH_2 Pal), 1.31–1.55 (m, 4 H, γ - CH_2 Lys, δ - CH_2 Lys), 1.25 [s, 24 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$], 0.92–1.02 (m, 2 H, TMS- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ Teoc), 0.87 (t, 3 H, $J=6.9$ Hz, ω - CH_3 Pal), 0.03 (s, 9 H, TMS Teoc) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta=$ 171.4 (C=O), 171.2 (C=O), 170.7 (C=O), 169.2 (C=O), 157.2 (C=O Urethan), 156.1 (C=O Urethan), 140.4 (*quart*, Far), 135.4 (*quart*, Far), 132.5 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 131.4 (*quart*, Far), 124.3 (Far-CH), 123.8 (Far-CH), 119.3 (Far-CH), 118.0 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 66.1 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 63.1 (β - CH_2 Ser), 55.6 (α -CH Met), 55.0 (α -CH), 54.3 (α -CH), 53.2 (α -CH), 52.7 (COOCH_3), 52.0 (α -CH), 44.1 (β - CH_2 Cys), 40.5 (CH_2), 39.7 (CH_2), 39.0 (CH_2), 32.8 (CH_2), 31.9 (CH_2), 31.0 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.1 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.3 (CH_2), 26.8 (CH_2), 26.5 (CH_2), 25.7 (Far- CH_3), 22.7 (CH_2), 22.6 (CH_2), 17.8 (TMS- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ Teoc), 17.7 (Far- CH_3), 16.2 (Far- CH_3), 16.0 (Far- CH_3), 15.4 (SCH_3 Met), 14.1 (CH_3 Pal), – 1.4 (TMS Teoc) ppm

C₆₂H₁₁₀N₆O₁₂S₃Si (1255.85)

MS (FAB, 3-NBA): 1251.4 [M+Na]⁺, 1229.4 [M+H]⁺.

6.5.4 Versuche zu Kapitel 4.4.2.4

N^(ω)-Allyloxycarbonyl-*N*^(ϵ)-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

Aloc-Lys(Boc)-Cys(Far)-OMe (**32**)

Eine Lösung von 103 mg *N*^(ω)-Allyloxycarbonyl-*N*^(ϵ)-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-**31** (0.295 mmol, 1 Äquivalent) und 100 mg *S*-Farnesyl-*L*-cysteinmethylester **5** (0.295 mmol, 1 Äquivalent) in 2 ml Methylenchlorid wird auf 0 °C gekühlt und nacheinander mit 48 mg HOBt (0.442 mmol, 1.5 Äquivalente) und schließlich 68 μ l DIC (0.353 mmol, 1.2 Äquivalente) versetzt. Nach 12 Stunden wird die Lösung mit 8 ml Methylenchlorid verdünnt und je zweimal mit 10 ml 1 *N* Salzsäure und 10 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Rohprodukt wird in Aceton aufgenommen, wobei der größere Teil des Di-*iso*-propylharnstoffs als farbloser Feststoff zurückbleibt. Die Trennung wird durch Stehen bei – 20 °C über 12 Stunden vervollständigt und der Harnstoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 1:3) isoliert.

Ausbeute: 139 mg (0.207 mmol, 70 %) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ =6.80 (d, 1 H, J =6.9 Hz, NH), 5.83–5.97 (m, 1 H, CH₂=CH–CH₂O), 5.50 (d, 1 H, J =5.7 Hz, NH), 5.30 (dd, 1 H, J =17.2 Hz, J =1.2 Hz, CH_{2a}=CH–CH₂O), 5.20 (dd, 1 H, J =10.5 Hz, J =1.2 Hz, CH_{2b}=CH–CH₂O), 5.15–5.19 (m, 1 H, CH=C Far), 5.04–5.12 (m, 2 H, CH=C Far), 4.69–4.79 (m, 1 H, α -CH Cys), 4.56 (d, 2 H, J =5.5 Hz, CH₂=CH–CH₂O), 4.17–4.24 (m, 1 H, α -CH Lys), 3.75 (s, 3 H, COOCH₃), 3.06–3.23 (m, 4 H, α -CH₂ Far, ϵ -CH₂ Lys), 2.94 (dd, 1 H, J =13.9 Hz, J =4.9 Hz, β -CH_{2a} Cys), 2.85 (dd, 1 H, J =13.9 Hz, J =6.3 Hz, β -CH_{2b} Cys), 1.93–2.10 (m, 8 H, CH₂ Far), 1.80–1.92 (m, 1 H, CH_{2a} Lys), 1.4–1.74 (m, 5 H, CH₂ Lys), 1.67 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.65 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.59 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.43 (s, 9 H, CH₃ Boc) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 171.6 (C=O), 171.1 (C=O), 156.2 (C=O Urethan), 156.0 (C=O Urethan), 140.1 (*quart*, Far), 135.4 (*quart*, Far), 132.6 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 131.3 (*quart*, Far), 124.3 (Far-CH), 123.7 (Far-CH), 119.4 (Far-CH), 117.9 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 79.1 (*quart*, Boc), 65.9 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 54.6 (α -CH), 52.6 (COOCH_3), 51.7 (α -CH), 39.8 (CH_2), 39.7 (CH_2), 39.6 (CH_2), 33.1 (CH_2), 32.1 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.4 (Boc- CH_3), 26.7 (CH_2), 26.4 (CH_2), 25.7 (Far- CH_3), 22.2 (CH_2), 17.7 (Far- CH_3), 16.1 (Far- CH_3), 16.0 (Far- CH_3) ppm

$\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ (651.90)

MS (EI, 175 °C): 651.4 $[\text{M}]^+$ (2 %), 551.4 $[\text{M-Boc}]^+$ (3 %), 348.2 $[\text{M-Boc-Far}]^+$ (8 %)

HRMS (EI) ber.: 651.3917

gef.: 651.3889.

$N^{(\alpha)}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

Fmoc-Lys(Boc)-Cys(Far)-OMe (**34**)

Eine Lösung von 331 mg $N^{(\alpha)}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysin **33** (0.705 mmol, 1 Äquivalent) und 239 mg *S*-Farnesyl-*L*-cysteinmethylester **5** (0.705 mmol, 1 Äquivalent) in 10 ml Methylenchlorid wird mit 227 mg EEDQ (0.917 mmol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 16 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt in 50 ml Essigester aufgenommen. Anschließend wird je zweimal mit 50 ml 0.5 *N* Salzsäure und 50 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung extrahiert, über MgSO_4 getrocknet, filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 2:1) isoliert.

Ausbeute: 425 mg (0.538 mmol, 76 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.26$ (Hexan/Essigester 2:1)

Smp: 57 °C

$[\alpha]_D^{20} = -8.9$ (c=1.0, CHCl_3)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ =7.76 (d, 2 H, $J=7.5$ Hz, Fmoc-CH), 7.60 (d, 2 H, $J=7.0$ Hz, Fmoc-CH), 7.40 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, Fmoc-CH), 7.31 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, Fmoc-CH), 6.71 (b, 1 H, NH), 5.50 (b, 1 H, NH), 5.15–5.19 (m, 1 H, CH=C Far),

5.04–5.12 (m, 2 H, CH=C Far), 4.72–4.79 (m, 1 H, α -CH Cys), 4.66 (b, 1 H, NH), 4.38–4.45 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 4.20–4.26 (m, 2 H, α -CH Lys, Fmoc-CH), 3.74 (s, 3 H, COOCH₃), 3.06–3.20 (m, 4 H, α -CH₂ Far, ϵ -CH₂ Lys), 2.95 (dd, 1 H, J =13.9 Hz, J =4.8 Hz, β -CH_{2a} Cys), 2.85 (dd, 1 H, J =13.9 Hz, J =6.3 Hz, β -CH_{2b} Cys), 1.93–2.10 (m, 8 H, CH₂ Far), 1.80–1.92 (m, 1 H, CH_{2a} Lys), 1.38–1.74 (m, 5 H, CH₂ Lys), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.62 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.43 (s, 9 H, CH₃ Boc) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 171.7 (C=O), 171.1 (C=O), 156.2 (C=O Urethan), 143.9 (*quart*, Fmoc), 143.7 (*quart*, Fmoc), 141.3 (*quart*, Fmoc), 140.1 (*quart*, Far), 135.3 (*quart*, Far), 131.3 (*quart*, Far), 127.7 (Fmoc-CH), 127.1 (Fmoc-CH), 125.1 (Fmoc-CH), 124.3 (Far-CH), 123.7 (Far-CH), 120.0 (Fmoc-CH), 119.4 (Far-CH), 79.1 (*quart*, Boc), 67.1 (Fmoc-CH₂), 54.6 (α -CH), 52.6 (COOCH₃), 51.8 (α -CH), 47.1 (Fmoc-CH), 39.9 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.6 (CH₂), 33.1 (CH₂), 32.2 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 28.4 (Boc-CH₃), 26.7 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 22.3 (CH₂), 17.7 (Far-CH₃), 16.1 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃) ppm

C₄₅H₆₃N₃O₇S (790.06)

MS (FAB, 3-NBA): 790.4 [M+H]⁺, 690.4 [M-Boc+H]⁺.

6.5.5 Versuche zu Kapitel 4.4.2.5

***N*^(α)-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^(ϵ)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**

Fmoc-Lys(Mtt)-Cys(Far)-OMe (**36**)

Eine Lösung von 276 mg *N*^(α)-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^(ϵ)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysylin **35** (0.442 mmol, 1 Äquivalent) und 150 mg *S*-Farnesyl-*L*-cysteinmethylester **5** (0.442 mmol, 1 Äquivalent) in 5 ml Methylenchlorid wird mit 142 mg EEDQ (0.575 mmol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 20 Stunden wird das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt in 30 ml Essigsäureethylester aufgenommen. Diese Lösung wird dreimal mit je 20 ml 0.5 *N* Salzsäure (Phasentrennung kann durch Zugabe von festem NaCl beschleunigt werden) und dann zweimal mit 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 3:1) isoliert.

Ausbeute: 312 mg (0.330 mmol, 75 %) eines farblosen Öls.

$R_f=0.20$ (Hexan/Essigester 3:1)

$[\alpha]_D^{20} = -10.1$ ($c=1.0$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=7.74$ (d, 2 H, $J=7.1$ Hz, Fmoc-CH), 7.57 (d, 2 H, $J=7.9$ Hz, Fmoc-CH), 7.45 (d, 4 H, $J=7.6$ Hz, Mtt-CH), 7.23–7.38 (m, 10 H, Fmoc-CH, Mtt-CH), 7.15 (t, 2 H, $J=7.3$ Hz, Mtt-CH), 7.06 (d, 2 H, $J=8.1$ Hz, Mtt-CH), 6.59 (b, 1 H, NH), 5.29 (d, 1 H, $J=7.7$ Hz, NH), 5.14–5.17 (m, 1 H, CH=C Far), 5.05–5.10 (t, 2 H, $J=7.7$ Hz, CH=C Far), 4.72–4.79 (m, 1 H, α -CH Cys), 4.37–4.43 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 4.16–4.22 (m, 2 H, α -CH Lys, Fmoc-CH), 3.69 (s, 3 H, COOCH₃), 3.15 (dd, 1 H, $J=13.1$ Hz, $J=8.2$ Hz, α -CH_{2a} Far), 3.06 (dd, 1 H, $J=13.2$ Hz, $J=7.4$ Hz, α -CH_{2b} Far), 2.93 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=4.8$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 2.85 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=5.0$ Hz, β -CH_{2b} Cys), 2.29 (s, 3 H, Mtt-CH₃), 1.93–2.12 (m, 10 H, CH₂ Far, ϵ -CH₂ Lys), 1.78–1.88 (m, 1 H, CH_{2a} Lys), 1.45–1.74 (m, 3 H, CH₂ Lys), 1.67 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.62 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.59 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.58 (s, 3 H, CH₃ Far) 1.41–1.49 (m, 2 H, CH₂ Lys) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta=171.6$ (C=O), 171.0 (C=O), 156.0 (C=O Urethan), 146.4 (*quart*, Mtt), 143.9 (*quart*, Fmoc), 143.7 (*quart*, Fmoc), 143.3 (*quart*, Mtt), 141.3 (*quart*, Fmoc), 140.1 (*quart*, Far), 135.3 (*quart*, Far), 135.4 (*quart*, Mtt), 131.3 (*quart*, Far), 128.6 (Mtt, CH), 128.6 (Mtt, CH), 128.5 (Mtt, CH), 127.7 (Fmoc-CH), 127.1 (Fmoc-CH), 126.1 (Mtt, CH), 125.1 (Fmoc-CH), 124.3 (Far-CH), 123.7 (Far-CH), 120.0 (Fmoc-CH), 119.5 (Far-CH), 70.6 (*quart*, Mtt), 67.1 (Fmoc-CH₂), 54.8 (α -CH), 52.6 (COOCH₃), 51.7 (α -CH), 47.2 (Fmoc-CH), 43.4 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.6 (CH₂), 33.1 (CH₂), 32.9 (CH₂), 30.7 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 23.2 (CH₂), 20.9 (Mtt-CH₃), 17.7 (Far-CH₃), 16.1 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃) ppm

$\text{C}_{60}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ (946.29)

MS (FAB, 3-NBA): 945.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 868.4 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_5]^+$, 854.4 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3]^+$, 257.1 $[\text{Mtt}]^+$.

$N^{(\alpha)}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylesterFmoc-Lys-Cys(Far)-OMe (**37**)

Zu einer Lösung von 8.4 mg $N^{(\alpha)}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **36** (8.88 μmol , 1 Äquivalent) in 0.7 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Methylenchlorid werden 14.1 μl Triethylsilan (88.8 μmol , 10 Äquivalente) gegeben, wobei innerhalb von 5 Minuten ein Farbumschlag von gelb nach farblos eintritt. Nach 60 Minuten werden 0.8 ml einer 1%igen Lösung von Ethyldimethylamin in Methylenchlorid zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1) isoliert.

Ausbeute: 5.8 mg (8.41 μmol , 95 %) eines farblosen Feststoffs.

$R_f=0.08$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1)

Smp: 57 °C

$[\alpha]_D^{20} = -4.3$ (c=0.3, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 500 MHz): $\delta=7.77$ (d, 2 H, $J=7.5$ Hz, Fmoc-CH), 7.60–7.64 (m, 2 H, Fmoc-CH), 7.40 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, Fmoc-CH), 7.30–7.6 (m, 2 H, Fmoc-CH), 5.19 (t, 1 H, $J=7.5$ Hz, CH=C Far), 5.08 (t, 2 H, $J=6.9$ Hz, CH=C Far), 4.67 (dd, 1 H, $J=7.5$ Hz, $J=5.0$ Hz, α -CH Cys), 4.37–4.44 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 4.23 (t, 2 H, $J=6.8$ Hz, α -CH Lys, Fmoc-CH), 3.75 (s, 3 H, COOCH₃), 3.20 (dd, 1 H, $J=12.9$ Hz, $J=8.4$ Hz, α -CH_{2a} Far), 3.10 (dd, 1 H, $J=12.7$ Hz, $J=7.3$ Hz, α -CH_{2b} Far), 2.90–2.97 (m, 3 H, β -CH_{2a} Cys, ϵ -CH₂ Lys), 2.81 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=7.6$ Hz, β -CH_{2b} Cys), 1.93–2.10 (m, 10 H, CH₂ Far, CH₂ Lys), 1.78–1.85 (m, 1 H, CH_{2a} Lys), 1.55–1.74 (m, 1 H, CH_{2b} Lys), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.65 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.59 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.31–1.42 (m, 2 H, CH₂ Lys) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 125 MHz): $\delta= 172.5$ (C=O), 171.5 (C=O), 156.8 (C=O Urethan), 144.0 (*quart*, Fmoc), 143.8 (*quart*, Fmoc), 141.4 (*quart*, Fmoc), 140.2 (*quart*, Far), 135.5 (*quart*, Far), 131.5 (*quart*, Far), 127.9 (Fmoc-CH), 127.2 (Fmoc-CH), 125.2 (Fmoc-CH), 124.4 (Far-CH), 123.8 (Far-CH), 120.0 (Fmoc-CH), 119.6 (Far-CH), 67.2 (Fmoc-CH₂), 54.2 (α -CH), 52.7 (COOCH₃), 52.2 (α -CH), 47.2 (Fmoc-CH), 39.8 (CH₂), 39.8 (CH₂), 39.3 (CH₂), 32.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 26.8 (CH₂), 26.7 (CH₂), 26.6 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 22.0 (CH₂), 17.7 (Far-CH₃), 16.1 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃) ppm

C₄₀H₅₅N₃O₅S (689.95)

MS (FAB, 3-NBA): 690.5 [M+H]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA): ber.: 690.3941
gef.: 690.3954.

6.5.6 Versuche zu Kapitel 4.4.3

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester

MIC-Met-Ser-Cys(Pal)-OtBu

Nach einer Voraktivierungszeit von 5 Minuten wird eine Lösung von 18.3 mg Maleinimidocaprönsäure (86.8 µmol, 1.1 Äquivalente) und 29.3 mg EEDQ (118 µmol, 1.5 Äquivalente) in 1 ml trockenem Methylenchlorid zu einer Lösung aus 50 mg *L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **3a** (78.9 µmol, 1 Äquivalent) in 4 ml Methylenchlorid gegeben. Nach 18 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1, dann 20:1) isoliert.

Ausbeute: 41.5 mg (50.2 µmol, 64 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

R_f=0.37 (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

[α]_D²⁰ = -3.6 (c=1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ=7.37–7.39 (m, 2 H, NH), 6.78 (d, 1 H, *J*=7.9 Hz, NH), 6.69 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 4.63–4.74 (m, 2 H, α-CH Cys, α-CH Met), 4.57–4.62 (m, 1 H, α-CH Ser), 3.99 (dd, 1 H, *J*=11.4 Hz, *J*=4.2 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.69 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=5.6 Hz, β-CH_{2b} Ser), 3.49–3.53 (m, 2 H, MIC-NCH₂), 3.46 (dd, 1 H, *J*=14.0 Hz, *J*=4.4 Hz, β-CH_{2a} Cys), 3.32 (dd, 1 H, *J*=14.0 Hz, *J*=6.1 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.52–2.61 (m, 4 H, γ-CH₂ Met, α-CH₂ Pal), 2.23 (t, 2 H, *J*=7.5 Hz, MIC), 2.08–2.15 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), 2.11 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.95–2.03 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met), 1.56–1.69 (m, 6 H, β-CH₂ Pal, CH₂ MIC), 1.46 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.24–1.36 [m, 26 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3 H, *J*=6.9 Hz, ω-CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 199.0 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 173.2 (C=O), 171.9 (C=O), 170.9 (2 C=O Maleinimid), 170.1 (C=O), 168.9 (C=O), 134.1 (2 CH Maleinimid), 83.3 [CO₂C(CH₃)₃], 62.8 (β-CH₂ Ser), 54.6 (α-CH), 53.1 (α-CH), 52.3

(α -CH), 44.1 (β -CH₂ Cys), 37.6 (CH₂), 36.1 (CH₂), 33.6 (CH₂), 31.9 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.9 [CO₂C(CH₃)₃], 26.3 (CH₂), 26.2 (CH₂), 25.6 (CH₂), 25.0 (CH₂), 22.7 (CH₂), 15.3 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₄₁H₇₀N₄O₉S₂ (827.15)

MS (FAB, 3-NBA): 849 [M+Na]⁺, 827 [M+H]⁺, 771 [M-*t*Bu+H]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA): ber.: 827.4662
gef.: 827.4622.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein

MIC-Met-Ser-Cys(Pal)-OH (**38**)

Eine Lösung von 35.7 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein-*tert*-butylester (43.2 μ mol) in 1 ml Methylenchlorid wird mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach drei Stunden werden 2 ml Toluol zugegeben und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei das Produkt quantitativ als farbloser Feststoff anfällt. Vorsicht: mit Toluol wird eine Gelbildung beobachtet, die das Destillieren erschwert!

Smp: 161 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.5$ (c=1.1, CHCl₃/CH₃OH 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ =6.75 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 4.65 (dd, 1 H, J =7.4 Hz, J =4.6 Hz, α -CH Cys), 4.53 (dd, 1 H, J =8.3 Hz, J =5.6 Hz, α -CH Met), 4.44 (t, 1 H, J =5.1 Hz, α -CH Ser), 3.87 (dd, 1 H, J =11.4 Hz, J =4.8 Hz, β -CH_{2a} Ser), 3.73 (dd, 1 H, J =11.4 Hz, J =5.3 Hz, β -CH_{2b} Ser), 3.50–3.54 (m, 3 H, MIC-NCH₂, β -CH_{2a} Cys), 3.27 (dd, 1 H, J =14.0 Hz, J =7.5 Hz, β -CH_{2b} Cys), 2.52–2.61 (m, 4 H, γ -CH₂ Met, α -CH₂ Pal), 2.25 (t, 2 H, J =7.5 Hz, MIC), 2.09–2.17 (m, 1 H, β -CH₂ Met), 2.12 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.92–1.99 (m, 1 H, β -CH_{2a} Met), 1.57–1.70 (m, 6 H, β -CH₂ Pal, 4 CH₂ MIC), 1.24–1.36 [m, 26 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3 H, J =6.9 Hz, ω -CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): δ = 199.9 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 174.8 (C=O), 172.6 (C=O), 172.1 (C=O), 171.6 (2 * C=O Maleinimid), 170.8 (C=O), 134.5 (2 * CH

Maleinimid), 62.3 (β -CH₂ Ser), 55.3 (α -CH), 52.9 (α -CH), 52.8 (α -CH), 44.3 (β -CH₂ Cys), 37.9 (CH₂), 36.1 (CH₂), 34.1 (CH₂), 32.2 (CH₂), 31.6 (CH₂), 30.4 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.5 (CH₂), 26.6 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.8 (CH₂), 25.4 (CH₂), 22.9 (CH₂), 15.3 (SCH₃ Met), 14.2 (CH₃ Pal) ppm

C₃₇H₆₂N₄O₉S₂ (771.04)

MS (FAB, 3-NBA): 793.4 [M+Na]⁺, 771.4 [M+H]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA) ber.: 771.4036

gef.: 771.4068.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-*tert*-butyloxy-carbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

MIC-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Boc)-Cys(Far)-OMe (**40**)

Zu einer Lösung von 28.8 mg *N*^(ω)-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^(ϵ)-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **36** (36.5 μ mol) in 0.4 ml Methylenchlorid werden 0.1 ml Diethylamin gegeben. Nach 2 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Eine Lösung von 23.4 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein **38** (30.4 μ mol, 1 Äquivalent) und 26.4 mg frisch hergestellten *N*^(ϵ)-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **39** (36.5 μ mol, 1.2 Äquivalente) in 2 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 9.8 mg EEDQ (39.5 μ mol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 18 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1, dann 20:1) isoliert. Diese Sequenz ermöglicht eine schnelle Abtrennung von Verunreinigungen (30:1) gefolgt von dem Eluieren des Produktes (20:1).

Ausbeute: 30.3 mg (22.9 μ mol, 76 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

R_f=0.33 (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 119 °C

$[\alpha]_D^{20} = -24.6$ (c=1.3, CHCl₃)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=7.63$ (b, 1 H, NH), 7.45 (b, 1 H, NH), 7.29 (b, 1 H, NH), 7.15 (b, 1 H, NH), 6.98 (d, 1 H, $J=7.3$ Hz, NH), 6.69 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 5.17–5.27 (m, 1 H, CH=C Far), 5.07–5.15 (m, 2 H, CH=C Far), 4.74–4.86 (m, 1 H, α -CH), 4.63–4.72 (m, 2 H, α -CH), 4.44–4.51 (m, 1 H, α -CH), 4.05–4.10 (m, 1 H, α -CH), 3.95–4.03 (m, 1 H, β -CH_{2a} Ser), 3.78–3.88 (m, 1 H, β -CH_{2b} Ser), 3.76 (s, 3 H, COOCH₃), 3.50 (t, 2 H, $J=7.2$ Hz, MIC-NCH₂), 3.05–3.45 (m, 6 H, 2 α -CH₂ Far, 2 ϵ -CH₂ Lys, β -CH₂ Cys_{SPal}), 2.94–3.04 (m, 1 H, β -CH_{2a} Cys_{Far}), 2.85 (m, 1 H, β -CH₂ Cys_{Far}), 2.49–2.67 (m, 4 H, γ -CH₂ Met, α -CH₂ Pal), 2.21–2.27 (m, 2 H, MIC), 1.88–2.19 (m, 14 H, β -CH₂ Met, SCH₃ Met, CH_{2a} Lys, CH₂ Far), 1.35–1.72 (m, 11 H, β -CH₂ Pal, CH₂ MIC, CH₂ Lys), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.62 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.45 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.22–1.34 [m, 26 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3 H, $J=6.9$ Hz, ω -CH₃ Pal) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta= 173.4$ (C=O), 171.7 (C=O), 170.8 (C=O), 169.4 (C=O), 167.5 (C=O), 166.9 (C=O), 156.3 (C=O Urethan), 140.0 [140.3] (*quart*, Far), 135.3 [135.5] (*quart*, Far), 134.1 (2 * CH Maleinimid), 131.3 [131.3] (*quart*, Far), 124.3 (Far-CH), 123.8 [123.6] (Far-CH), 119.5 [119.4] (Far-CH), 79.1 (*quart*, Boc), 64.2 (β -CH₂ Ser), 54.9 (α -CH), 53.8 (α -CH), 53.4 (α -CH), 52.9 (α -CH), 52.6 (COOCH₃), 44.1 (CH₂), 40.4 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.6 (CH₂), 37.7 (CH₂), 36.0 (CH₂), 35.5 (CH₂), 32.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.4 (Boc-CH₃), 26.8 (CH₂), 26.6 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 25.7 (CH₂), 22.6 (CH₂), 17.7 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃) 15.4 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

$\text{C}_{67}\text{H}_{113}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{S}_3$ (1320.85)

MS (FAB, 3-NBA): 1342.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1322.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1220.8 $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$

HRMS (FAB, 3-NBA) für $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$ ber.: 1220.711

gef.: 1220.719.

***N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester**

Aloc-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Mtt)-Cys(Far)-OMe

Zu einer Lösung von 73.6 mg *N*^(α)-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^(ϵ)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **36** (77.8 μmol) in 0.8 ml Methylenchlorid

werden 0.2 ml Diethylamin gegeben. Nach 2 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Zu einer Lösung von 19.7 mg *N*-Allyloxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein (29.8 μmol , 1.2 Äquivalente) in 0.1 ml DMF und 0.4 ml Methylenchlorid werden 8.0 mg EEDQ (32.3 μmol , 1.3 Äquivalente) und nach 5 Minuten eine Lösung aus 18 mg frisch hergestellten $N^{(\epsilon)}$ -(4-Tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **41** (24.9 μmol , 1 Äquivalent) in 1.5 ml trockenem Methylenchlorid gegeben. Das Lösungsmittel wird nach 18 Stunden im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1, dann 20:1) isoliert. Diese Sequenz ermöglicht eine schnelle Abtrennung von Verunreinigungen (30:1) gefolgt von dem Eluieren des Produktes (20:1).

Ausbeute: 11.4 mg (10.0 μmol , 40 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes (aus Methylenchlorid) bzw eines farblosen Feststoffes (aus alkoholischen Lösungen).

$R_f=0.21$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 119 °C

$[\alpha]_D^{20} = -24.6$ (c=1.3, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=7.51$ (b, 1 H, NH), 7.43 (d, 4 H, $J=7.4$ Hz, Mtt-CH), 7.41 (b, 1 H, NH), 7.31 (d, 2 H, $J=8.2$ Hz, Mtt-CH), 7.25 (t, 4 H, $J=7.3$ Hz, Mtt-CH), 7.16 (t, 2 H, $J=7.3$ Hz, Mtt-CH), 7.07 (d, 2 H, $J=8.1$ Hz, Mtt-CH), 6.91 (b, 1 H, NH), 5.84–5.93 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 5.29 (dd, 1 H, $J=17.2$ Hz, $J=1.5$ Hz, $\text{CH}_{2a}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 5.20 (dd, 1 H, $J=10.5$ Hz, $J=1.2$ Hz, $\text{CH}_{2b}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 5.14–5.18 (m, 1 H, CH=C Far), 5.06–5.12 (m, 2 H, CH=C Far), 4.65–4.72 (m, 1 H, α -CH), 4.47–4.61 (m, 5 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$, 3 * α -CH), 4.34–4.40 (m, 1 H, α -CH), 3.88 (dd, 1 H, $J=11.7$ Hz, $J=3.7$ Hz, β - CH_{2a} Ser), 3.81 (dd, 1 H, $J=11.1$ Hz, $J=3.8$ Hz, β - CH_{2b} Ser), 3.72 (s, 3 H, COOCH_3), 3.37 (dd, 1 H, $J=14.5$ Hz, $J=3.3$ Hz, β - CH_{2a} CysPal), 3.29 (dd, 1 H, $J=14.6$ Hz, $J=8.1$ Hz, β - CH_{2b} CysPal), 3.19 (dd, 1 H, $J=13.2$ Hz, $J=8.2$ Hz, α - CH_{2a} Far), 3.10 (dd, 21 H, $J=13.2$ Hz, $J=7.4$ Hz, α - CH_{2b} Far), 2.99 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=4.7$ Hz, β - CH_{2a} CysFar), 2.87 (dd, 1 H, $J=14.0$ Hz, $J=7.4$ Hz, β - CH_{2b} CysFar), 2.47–2.60 (m, 4 H, γ - CH_2 Met, α - CH_2 Pal), 2.30 (s, 3 H, Mtt- CH_3), 1.86–2.15 (m, 16 H, β - CH_2 Met, SCH_3 Met, β - CH_2 Lys, CH_2 Far, CH_{2a} Lys), 1.33–1.65 (m, 7 H, β - CH_2 Pal, CH_2 Lys), 1.68 (s, 3 H, CH_3 Far), 1.66 (s, 3 H, CH_3 Far), 1.60 (s, 6 H, CH_3 Far), 1.22–1.34 [m, 24 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{COS}$], 0.88 (t, 3 H, $J=6.9$ Hz, ω - CH_3 Pal) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 171.5 (C=O), 171.4 (C=O), 171.0 (C=O), 170.6 (C=O), 168.8 (C=O), 156.0 (C=O Urethan), 146.3 (*quart*, Mtt), 143.2 (*quart*, Mtt), 140.5 (*quart*, Far), 135.7 (*quart*, Far), 135.4 (*quart*, Mtt), 132.4 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 131.3 (*quart*, Far), 128.6 (Mtt, CH), 128.6 (Mtt, CH), 128.5 (Mtt, CH), 126.2 (Mtt, CH), 124.3 (Far-CH), 123.7 (Far-CH), 119.2 (Far-CH), 118.1 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$), 70.7 (*quart*, Mtt), 66.1 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{O}$) 63.4 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 58.5 (CH_2), 55.9 ($\alpha\text{-CH}$), 55.0 ($\alpha\text{-CH}$), 54.3 ($\alpha\text{-CH}$), 53.3 ($\alpha\text{-CH}$), 52.7 (COOCH_3), 51.8 ($\alpha\text{-CH}$), 44.0 (CH_2), 43.5 (CH_2), 39.7 (CH_2), 32.8 (CH_2), 31.9 (CH_2), 31.8 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.1 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.0 (CH_2), 26.7 (CH_2), 26.5 (CH_2), 25.7 (Far- CH_3), 25.7 (CH_2), 23.5 (CH_2), 22.7 (CH_2), 20.9 (Mtt- CH_3), 17.7 (Far- CH_3), 16.2 (Far- CH_3), 16.0 (Far- CH_3) 15.4 (SCH_3 Met), 14.1 (CH_3 Pal) ppm

$\text{C}_{76}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_3$ (1367.95)

MS (FAB, 3-NBA): 1365 $[\text{M}-\text{H}]^+$, 1289.7 $[\text{M}-\text{Ph}]^+$, 1275.6 $[\text{M}-\text{PhMe}]^+$, 1111.7 $[\text{M}-\text{Mtt}]^+$, 257.2 $[\text{Mtt}]^+$.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl- $N^{(\epsilon)}$ -(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

MIC-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys(Mtt)-Cys(Far)-OMe (**42**)

Zu einer Lösung von 50.0 mg $N^{(\alpha)}$ -Fluorenylmethoxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **36** (55.1 μmol) in 0.8 ml Methylenchlorid werden 0.2 ml Diethylamin gegeben. Nach 4 Stunden wird mit 4 ml Essigester verdünnt und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Eine Lösung von 32.7 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cystein **38** (42.4 μmol , 1 Äquivalent) und 39.9 mg frisch hergestelltem $N^{(\epsilon)}$ -(4-Tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **41** (55.1 μmol , 1.3 Äquivalente) in 2 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 13.6 mg EEDQ (55.1 μmol , 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 16.5 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1, dann 20:1) isoliert. Diese Methode ermöglicht eine Abtrennung von Verunreinigungen wie dem Diketopiperazin des $N^{(\epsilon)}$ -(4-Tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylesters **41** ($R_f=0.29$ in Methylenchlorid/Ethanol 20:1).

Ausbeute: 36.5 mg (24.7 μmol , 58 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

$R_f=0.26$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 183 °C

$[\alpha]_D^{20} = -23.8$ (c=1.6, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta=7.65$ (b, 1 H, NH), 7.52 (b, 1 H, NH), 7.49 (d, 4 H, $J=7.6$ Hz, Mtt-CH), 7.41 (d, 2 H, $J=7.2$ Hz, Mtt-CH), 7.34–7.38 (m, 6 H, Mtt-CH), 7.21 (d, 2 H, $J=8.1$ Hz, Mtt-CH), 6.69 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 5.16–5.20 (m, 1 H, CH=C Far), 5.07–5.11 (m, 2 H, CH=C Far), 4.57–4.63 (m, 1 H, α -CH), 4.47–4.53 (m, 1 H, α -CH), 4.38–4.44 (m, 2 H, α -CH), 4.15–4.23 (m, 1 H, α -CH), 3.88–3.95 (m, 1 H, β -CH_{2a} Ser), 3.75–3.80 (m, 1 H, β -CH_{2b} Ser), 3.68 (s, 3 H, COOCH₃), 3.48 (t, 2 H, $J=7.2$ Hz, MIC-NCH₂), 3.39–3.45 (m, 1 H, β -CH_{2a} Cys_{Pal}), 3.13–3.25 (m, 2 H, 1 α -CH_{2a} Far, β -CH₂ Cys_{Pal}), 3.07–3.12 (m, 1 H, 1 α -CH_{2b} Far), 2.81–3.01 (m, 4 H, β -CH₂ Cys_{Far}, ϵ -CH₂ Lys), 2.49–2.62 (m, 4 H, γ -CH₂ Met, α -CH₂ Pal), 2.35 (s, 3 H, Mtt-CH₃), 2.19–2.28 (m, 2 H, MIC), 1.92–2.15 (m, 14 H, β -CH₂ Met, SCH₃ Met, CH_{2a} Lys, CH₂ Far), 1.35–1.72 (m, 11 H, β -CH₂ Pal, CH₂ MIC, CH₂ Lys), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.65 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.19–1.38 [m, 26 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3 H, $J=6.7$ Hz, ω -CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta=173.3$ (C=O), 171.8 (C=O), 170.7 (C=O), 168.9 (C=O), 146.5 (*quart*, Mtt), 143.2 (*quart*, Mtt), 140.0 (*quart*, Far), 135.5 (*quart*, Mtt), 135.3 (*quart*, Far), 134.0 (2 * CH Maleinimid), 131.3 (*quart*, Far), 128.6 (Mtt, 3 CH), 127.1 (Mtt, CH), 126.1 (Mtt, CH), 124.3 (Far-CH), 123.8 (Far-CH), 119.5 (Far-CH), 70.6 (*quart*, Mtt), 54.7 (α -CH), 53.8 (α -CH), 53.2 (α -CH), 52.5 (COOCH₃), 44.0 (CH₂), 40.4 (CH₂), 43.6 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.6 (CH₂), 37.7 (CH₂), 36.0 (CH₂), 35.7 (CH₂), 32.8 (CH₂), 31.9 (CH₂), 30.2 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.4 (CH₂), 27.9 (CH₂), 26.8 (CH₂), 26.6 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 25.6 (CH₂), 25.2 (CH₂), 22.7 (CH₂), 20.9 (Mtt-CH₃), 17.7 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃) 15.3 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₈₂H₁₂₁N₇O₁₁S₃ (1477.08)

MS (FAB, 3-NBA): 1474.5 [M-H]⁺, 1399.6 [M-C₆H₅]⁺, 1385.5 [M-C₆H₄CH₃]⁺, 1220.8 [M-Mtt+H]⁺, 257.3 [Mtt]⁺.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylesterMIC-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys-Cys(Far)-OMe (**43a**)

Eine Lösung von 15.3 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-palmitoyl-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **42** (10.4 μmol, 1 Äquivalent) in 0.5 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Methylenchlorid wird mit 16.5 μl Triethylsilan (104 μmol, 10 Äquivalente) versetzt. Nach 70 Minuten werden 0.6 ml einer 1%igen Lösung von Ethyldimethylamin in Methylenchlorid zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 (CHCl₃/MeOH 1:1) isoliert.

Ausbeute: 12.1 mg (9.91 μmol, 96 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

R_f=0.77 (Chloroform/Methanol 2:1)

Smp: 160 °C

[α]_D²⁰ = -24.0 (c=0.6, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 4:1, 500 MHz): δ=7.99 (d, 1 H, *J*=6.8 Hz, NH), 7.89–7.93 (m, 2 H, NH), 7.85 (d, 1 H, *J*=6.7 Hz, NH), 7.70 (d, 1 H, *J*=8.0 Hz, NH), 6.73 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 5.17–5.23 (m, 1 H, CH=C Far), 5.05–5.14 (m, 2 H, CH=C Far), 4.62–4.67 (m, 1 H, α-CH), 4.38–4.50 (m, 3 H, α-CH), 4.31–4.36 (m, 1 H, α-CH), 3.77–3.81 (m, 2 H, β-CH₂ Ser), 3.76 (s, 3 H, COOCH₃), 3.51 (t, 2 H, *J*=7.2 Hz, 2 MIC-NCH₂), 3.35–3.41 (m, 1 H, β-CH_{2a} Cys_{Pal}), 3.19–3.28 (m, 2 H, α-CH_{2a} Far, β-CH_{2b} Cys_{Pal}), 3.09–3.16 (m, 1 H, α-CH_{2b} Far), 2.92–3.00 (m, 3 H, β-CH_{2a} Cys_{Far}, ε-CH₂ Lys), 2.78–2.84 (m, 1 H, β-CH_{2a} Cys_{Far}), 2.51–2.62 (m, 4 H, γ-CH₂ Met, α-CH₂ Pal), 2.24–2.32 (m, 2 H, MIC), 1.88–2.14 (m, 14 H, β-CH₂ Met, SCH₃ Met, CH_{2a} Lys, CH₂ Far), 1.52–1.76 (m, 9 H, β-CH₂ Pal, CH₂ MIC, CH₂ Lys), 1.68 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.38–1.52 (m, 2 H, CH₂ Lys), 1.21–1.38 [m, 26 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₂COS, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3 H, *J*=6.9 Hz, ω-CH₃ Pal) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 4:1, 125 MHz): δ= 200.6 [CH₃(CH₂)₁₃CH₂COS], 175.2 (C=O), 173.0 (C=O), 172.0 (C=O), 171.4 (C=O), 171.3 (C=O), 170.8 (C=O), 140.3 (*quart*, Far), 135.5 (*quart*, Far), 134.3 (2 * CH Maleinimid), 131.5 (*quart*, Far), 124.5 (Far-CH), 123.9 (Far-CH), 119.7 (Far-CH), 61.8 (β-CH₂ Ser), 55.8 (α-CH), 54.6 (α-CH), 53.1 (α-CH), 52.8 (α-CH), 52.7 (COOCH₃), 52.3 (α-CH), 44.2 (CH₂), 39.8 (CH₂), 39.6 (CH₂), 37.8 (CH₂), 35.9 (CH₂), 32.7 (CH₂), 32.1 (CH₂), 31.0 (CH₂), 30.9

(CH₂), 30.4 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.4 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.6 (CH₂), 26.4 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 25.7 (CH₂), 25.2 (CH₂), 22.8 (CH₂), 22.1 (CH₂), 17.7 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.1 (Far-CH₃), 15.3 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Pal) ppm

C₆₂H₁₀₅N₇O₁₁S₃ (1220.74)

MS (FAB, 3-NBA): 1220.5 [M+H]⁺.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester

MIC-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-*O**t*Bu

Eine Lösung von 15.2 mg Maleinimidocaprönsäure (72.1 µmol, 1.1 Äquivalente) und 31.7 mg *L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester **3b** (65.5 µmol, 1 Äquivalent) in 1 ml trockenem Methylenchlorid wird mit 21.1 mg EEDQ (85.2 µmol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 18 Stunden wird die Lösung mit 9 ml Methylenchlorid verdünnt und je zweimal mit 10 ml 0.5 *N* Salzsäure und gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1, dann 20:1) isoliert.

Ausbeute: 15.1 mg (22.3 µmol, 34 %) eines farblosen Feststoffes.

Alternative Herstellung aus Fmoc-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-*O**t*Bu **21**:

Zu einer Lösung von 100 mg *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester **21** (0.142 mmol, 1 Äquivalent) in 3 ml Methylenchlorid werden 3 ml Diethylamin gegeben. Nach fünf Stunden werden 5 ml Essigsäureethylester zugegeben und die flüchtigen Komponenten im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird 2 ml trockenem Methylenchlorid aufgenommen und mit 32.9 mg Maleinimidocaprönsäure (0.156 mmol, 1.1 Äquivalente) sowie 45.5 mg EEDQ (0.184 mmol, 1.3 Äquivalente) versetzt. Nach 18 Stunden wird die Lösung mit 50 ml Methylenchlorid verdünnt und je zweimal mit 40 ml 0.5 *N* Salzsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und abschließend 40 ml gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1, dann 20:1) isoliert.

Ausbeute: 55.8 mg (82.4 µmol, 58 %) eines farblosen Feststoffes.

R_f=0.28 (Methylenchlorid/Ethanol 30:1)

Smp: 98 °C

$[\alpha]_D^{20} = -41.7$ (c=0.8, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ=7.29 (d, 1 H, *J*=7.8 Hz, NH), 7.23 (d, 1 H, *J*=7.2 Hz, NH), 6.69 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 6.52 (d, 1 H, *J*=7.3 Hz, NH), 4.72–4.77 (m, 1 H, α-CH), 4.62–4.68 (m, 1 H, α-CH), 4.54–4.58 (m, 1 H, α-CH), 4.06 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=3.9 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.71 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=5.4 Hz, β-CH_{2b} Ser), 3.51 (t, 2 H, *J*=7.2 Hz, MIC-NCH₂), 3.23 (dd, 1 H, *J*=13.7 Hz, *J*=4.4 Hz, β-CH_{2a} Cys), 3.12 (dd, 1 H, *J*=13.6 Hz, *J*=6.2 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.53–2.65 (m, 2 H, γ-CH₂ Met), 2.23 (t, 2 H, *J*=7.5 Hz, MIC), 2.09–2.18 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), 2.12 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.96–2.05 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met), 1.64–1.70 (m, 2 H, CH₂ MIC), 1.57–1.63 (m, 2 H, CH₂ MIC), 1.49 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.28–1.36 (m, 2 H, CH₂ MIC), 1.32 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 173.2 (C=O), 171.7 (C=O), 170.9 (2 * C=O Maleinimid), 170.1 (C=O), 169.2 (C=O), 134.1 (2 * CH Maleinimid), 83.3 [CO₂C(CH₃)₃], 62.6 (β-CH₂ Ser), 54.5 (α-CH), 53.1 (α-CH), 52.5 (α-CH), 48.4 [SC(CH₃)₃], 42.2 (β-CH₂ Cys), 37.6 (CH₂), 36.1 (CH₂), 31.5 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.8 [SC(CH₃)₃], 29.7 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.0 [CO₂C(CH₃)₃], 26.3 (CH₂), 24.9 (CH₂), 15.3 [SCH₃ Met] ppm

C₂₉H₄₈N₄O₈S₃ (676.91)

MS (FAB, 3-NBA): 699.3 [M+Na]⁺, 677.3 [M+H]⁺, 621.3 [M-*t*Bu+H]⁺, 564.2 [M-2*t*Bu]⁺

HRMS (FAB) für [M+H]⁺: ber.: 677.2713

gef.: 677.2728.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein

MIC-Met-Ser-Cys(*S**t*Bu)-OH (**44**)

Eine Lösung von 15.1 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein-*tert*-butylester (22.3 μmol) in 0.25 ml Methylenchlorid wird mit 0.25 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach drei Stunden wird 1 ml Toluol zugegeben und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei das Produkt quantitativ als farbloser Feststoff anfällt.

R_f=0.22 (Chloroform/Methanol 4:1)

Smp: 123 °C

$[\alpha]_D^{20} = -48.6$ (c=0.7, CHCl₃/MeOH 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ=7.78 (d, 1 H, *J*=7.6 Hz, NH), 7.71 (d, 1 H, *J*=7.6 Hz, NH), 7.45 (d, 1 H, *J*=7.7 Hz, NH), 6.73 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 4.73–4.79 (m, 1 H, α-CH), 4.47–4.55 (m, 2 H, 2 * α-CH), 3.89 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=4.8 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.75 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=5.3 Hz, β-CH_{2b} Ser), 3.52 (t, 2 H, *J*=7.2 Hz, MIC-NCH₂), 3.26 (dd, 1 H, *J*=13.7 Hz, *J*=4.4 Hz, β-CH_{2a} Cys), 3.11 (dd, 1 H, *J*=13.7 Hz, *J*=7.6 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.52–2.58 (m, 2 H, γ-CH₂ Met), 2.24 (t, 2 H, *J*=7.5 Hz, MIC), 2.07–2.16 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), 2.12 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.90–1.99 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met), 1.56–1.69 (m, 4 H, CH₂ MIC), 1.26–1.35 (m, 2 H, CH₂ MIC), 1.33 [s, 9 H, SC(CH₃)₃] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): δ= 174.5 (C=O), 172.4 (C=O), 171.3 (2 * C=O Maleinimid), 170.6 (C=O), 134.3 (2 * CH Maleinimid), 62.2 (β-CH₂ Ser), 55.0 (α-CH), 52.7 (α-CH), 52.3 (α-CH), 48.3 [SC(CH₃)₃], 41.7 (β-CH₂ Cys), 37.8 (CH₂), 36.0 (CH₂), 31.5 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.9 [SC(CH₃)₃], 28.4 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.2 (CH₂), 15.3 [SCH₃ Met] ppm

C₂₅H₄₀N₄O₈S₃ (620.81)

MS (FAB, 3-NBA): 659.3 [M+K]⁺, 643.2 [M+Na]⁺, 621.2 [M+H]⁺

HRMS (FAB) für [M+H]⁺: ber.: 621.2087

gef.: 621.2094.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-(4-tolyl-diphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

MIC-Met-Ser-Cys(*S*tBu)-Lys(Mtt)-Cys(Far)-OMe (**45**)

Zu einer Lösung von 85.6 mg *N*^(α)-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^(ε)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **36** (90.5 μmol) in 1.6 ml Methylenchlorid werden 0.4 ml Diethylamin gegeben. Nach 4 Stunden wird mit 4 ml Essigester verdünnt und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Zu einer Lösung von 47.1 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein **44** (69.6 μmol, 1 Äquivalent) und dem frisch hergestellten *N*^(ε)-(4-Tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **41** (90.5 μmol, 1.3 Äquivalente) in 2 ml

trockenem Methylenchlorid und 0.1 ml Trifluorethanol werden 24.2 mg EEDQ (90.5 μmol , 1.3 Äquivalente) gegeben. Nach 13 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1) isoliert.

Ausbeute: 25.9 mg (19.5 μmol , 28 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

$R_f=0.24$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 155 °C

$[\alpha]_D^{20} = -47.2$ (c=0.5, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=7.43$ (d, 4 H, $J=7.8$ Hz, Mtt-CH), 7.30 (d, 2 H, $J=8.2$ Hz, Mtt-CH), 7.01–7.26 (m, 8 H, Mtt-CH), 6.68 (s, 1 H, Maleinimid-CH), 6.66 (s, 1 H, Maleinimid-CH), 5.16–5.23 (m, 1 H, CH=C Far), 5.03–5.11 (m, 2 H, CH=C Far), 4.40–4.75 (m, 5 H, 5 * α -CH), 3.91–3.99 (m, 1 H, β -CH_{2a} Ser), 3.60–3.80 (m, 4 H, β -CH_{2b} Ser, COOCH₃), 3.44–3.52 (m, 2 H, MIC-NCH₂), 3.05–3.22 (m, 4 H, β -CH₂ Cys_{S_tBu}, α -CH₂ Far), 2.94 (dd, 1 H, $J=14.8$ Hz, $J=4.9$ Hz, β -CH_{2a} Cys_{Far}), 2.84 (dd, 1 H, $J=14.1$ Hz, $J=7.2$ Hz, β -CH_{2b} Cys_{Far}), 2.48–2.62 (m, 4 H, γ -CH₂ Met, ϵ -CH₂ Lys), 2.29 (b, 3 H, Mtt-CH₃), 2.19–2.28 (m, 2 H, MIC), 1.82–2.15 (m, 14 H, β -CH₂ Met, SCH₃ Met, CH_{2a} Lys, CH₂ Far), 1.45–1.72 (m, 9 H, CH₂ MIC, CH₂ Lys), 1.67 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.65 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.59 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.24–1.41 [m, 11 H, SC(CH₃)₃, CH₂ MIC] ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta=173.4$ (C=O), 171.1 (C=O), 170.9 (C=O), 170.5 (C=O), 146.5 (*quart*, Mtt), 143.2 (*quart*, Mtt), 140.1 (*quart*, Far), 135.5 (*quart*, Mtt), 135.3 (*quart*, Far), 134.1 (2 * CH Maleinimid), 131.3 (*quart*, Far), 128.6 (Mtt, 3 CH), 127.8 (Mtt, CH), 126.2 (Mtt, CH), 124.3 (Far-CH), 123.8 (Far-CH), 119.5 (Far-CH), 70.6 (*quart*, Mtt), 62.3 (β -CH₂ Ser), 54.3 (α -CH), 53.5 (α -CH), 52.8 (α -CH), 52.5 (COOCH₃), 51.8 (α -CH), 48.6 (CH₂), 48.4 [SC(CH₃)₃], 41.0 (CH₂), 39.7 (CH₂), 37.6 (CH₂), 36.2 (CH₂), 36.1 (CH₂), 32.8 (CH₂), 31.0 (CH₂), 30.9 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.8 [SC(CH₃)₃], 29.7 (CH₂), 28.3 (CH₂), 28.2 (CH₂), 26.7 (CH₂), 26.5 (CH₂), 26.4 (CH₂), 26.3 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 24.9 (CH₂), 21.0 (Mtt-CH₃), 17.7 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃) 15.4 (SCH₃ Met) ppm

$\text{C}_{70}\text{H}_{99}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}_4$ (1326.84)

MS (FAB, 3-NBA): 1348.5 [M+Na]⁺, 1326.5 [M+H]⁺, 1248.4 [M-C₆H₅]⁺, 1334.5 [M-C₆H₄CH₃]⁺, 1070.5 [M-Mtt+H]⁺, 257.1 [Mtt]⁺.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

MIC-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-Lys-Cys(Far)-OMe (**43b**)

Eine Lösung von 9.5 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(ε)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **45** (7.16 μmol, 1 Äquivalent) in 0.8 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Methylenchlorid wird mit 11.4 μl Triethylsilan (71.6 μmol, 10 Äquivalente) versetzt. Nach 60 Minuten werden 0.9 ml einer 1%igen Lösung von Ethyldimethylamin in Methylenchlorid zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 (CHCl₃/MeOH 1:1) isoliert.

Ausbeute: 5.8 mg (5.42 μmol, 76 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

Smp: 155 °C

$[\alpha]_D^{20} = -59.0$ (c=0.2, CHCl₃/MeOH 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ=6.74 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 5.21 (t, 1 H, *J*=7.3 Hz, CH=C Far), 5.08–5.14 (m, 2 H, CH=C Far), 4.63 (dd, 1 H, *J*=8.1 Hz, *J*=5.0 Hz, α-CH), 4.60 (dd, 1 H, *J*=8.5 Hz, *J*=5.7 Hz, α-CH), 4.42–4.56 (m, 2 H, 2 * α-CH), 4.38 (t, 1 H, *J*=4.7 Hz, α-CH), 3.92 (dd, 1 H, *J*=11.4 Hz, *J*=4.7 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.81 (dd, 1 H, *J*=11.4 Hz, *J*=5.0 Hz, β-CH_{2b} Ser), 3.76 (s, 3 H, COOCH₃), 3.52 (t, 2 H, *J*=7.2 Hz, 2 MIC-NCH₂), 3.18–3.26 (m, 2 H, α-CH_{2a} Far, β-CH_{2a} Cys_{StBu}), 3.12 (dd, 1 H, *J*=13.5 Hz, *J*=7.5 Hz, α-CH_{2b} Far), 3.08 (dd, 1 H, *J*=13.6 Hz, *J*=8.5 Hz, β-CH_{2b} Cys_{StBu}), 2.93–2.99 (m, 3 H, β-CH_{2a} Cys_{Far}, ε-CH₂ Lys), 2.80 (dd, 1 H, *J*=13.9 Hz, *J*=8.2 Hz, β-CH_{2b} Cys_{Far}), 2.52–2.61 (m, 2 H, γ-CH₂ Met), 2.30 (td, 2 H, *J*=7.5 Hz, *J*=2.3 Hz, MIC), 1.92–2.16 (m, 14 H, β-CH₂ Met, SCH₃ Met, CH_{2a} Lys, CH₂ Far), 1.59–1.79 (m, 7 H, CH₂ MIC, CH₂ Lys), 1.68 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.61 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.41–1.50 (m, 2 H, CH₂ Lys), 1.30–1.39 [m, 11 H, SC(CH₃)₃, CH₂ MIC] ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): δ=175.4 (C=O), 173.1 (C=O), 172.2 (C=O), 171.5 (C=O), 171.4 (C=O Maleinimid), 171.3 (C=O), 140.3 (*quart*, Far), 135.6 (*quart*, Far), 134.4 (2 * CH Maleinimid), 131.5 (*quart*, Far), 124.5 (Far-CH), 124.0 (Far-CH),

119.8 (Far-CH), 61.9 (β -CH₂ Ser), 55.9 (α -CH), 54.0 (α -CH), 53.4 (α -CH), 53.0 (α -CH), 52.7 (COOCH₃), 52.4 (α -CH), 40.7 (CH₂), 39.9 (CH₂), 39.7 (CH₂), 37.8 (CH₂), 36.0 (CH₂), 32.7 (CH₂), 31.0 (CH₂), 30.8 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.0 [SC(CH₃)₃], 29.7 (CH₂), 28.5 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.7 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.8 (Far-CH₃), 25.3 (CH₂), 22.2 (CH₂), 17.8 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.1 (Far-CH₃), 15.4 (SCH₃ Met) ppm

C₅₀H₈₃N₇O₁₀S₄ (1070.50)

MS (FAB, 3-NBA): 1070.5 [M+H]⁺

HRMS (FAB) für [M+H]⁺: ber.: 1070.516

gef.: 1070.519.

***N*-Allyloxycarbonyl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Aloc-Cys(Hd)-OtBu

Eine Lösung von 1.1 g Bis(*N*-Allyloxycarbonyl)-*L*-cystin-bis(*tert*-butylester) (2.11 mmol, 1 Äquivalent) und 587 μ l Triethylamin (4.23 mmol, 2 Äquivalente) in 15 ml absolutem Methylenchlorid wird mit 1.3 g mg Dithiothreitol (8.45 mmol, 4 Äquivalente) versetzt. Nach zwei Stunden wird mit 50 ml Methylenchlorid verdünnt und dreimal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ und Filtrieren der vereinigten organischen Phasen wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Der so erhaltene rohe *N*-Allyloxycarbonyl)-*L*-cystein-*tert*-butylester (4.22 mmol, 1 Äquivalent) wird in 10 ml absolutem DMF gelöst und mit 704 μ l Triethylamin (5.07 mmol, 1.2 Äquivalente) und 1.55 ml Hexadecylbromid (5.07 mmol, 1.2 Äquivalente) versetzt. Nach drei Tagen wird mit 50 ml Essigester verdünnt und die organische Phase nacheinander zweimal mit je 50 ml 0.5 N Salzsäure, zweimal mit je 50 einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und 50 ml einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie isoliert (Hexan/Essigester 5:1).

Ausbeute: 1.19 g (2.46 mmol, 58 % über beide Stufen) eines farblosen Öles, das zu einem Feststoff mit einem Schmelzpunkt unter 30 °C erstarrt.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ =5.87–5.96 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂O), 5.54 (d, 1 H, J =7.5 Hz, NH), 5.32 (d, 1 H, J =17.2 Hz, CH_{2a}=CH-CH₂O), 5.21 (d, 1 H, J =10.5 Hz, CH_{2b}=CH-CH₂O), 4.58 (d, 2 H, J =5.4 Hz, CH₂=CH-CH₂O), 4.43–4.49 (m, 1 H, α -CH

Cys), 2.90–2.99 (m, 2 H, β -CH₂ Cys), 2.53 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, 2 α -CH₂ Hd), 1.50–1.62 (m, 2 H, β -CH₂ Hd), 1.48 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.27–1.38 (m, 2 H, β -CH₂ Hd), 1.25 [s, 24 H, CH₃(CH₂)₁₂(CH₂)₃CS], 0.88 (t, 3 H, $J=6.9$ Hz, ω -CH₃ Hd) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta=$ 169.8 (C=O), 155.6 (C=O Urethan), 132.7 (CH₂=CH-CH₂O), 117.8 (CH₂=CH-CH₂O), 82.7 [CO₂C(CH₃)₃], 65.8 (CH₂=CH-CH₂O), 54.1 (α -CH Cys), 34.7 (SCH₂), 33.0 (SCH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.0 [CO₂C(CH₃)₃], 22.7 (CH₂), 14.1 (CH₃ Hd) ppm

C₂₇H₅₁NO₄S (485.76)

MS (EI, 125 °C): 485.4 [M]⁺ (2 %), 429.3 [M-*t*Bu]⁺ (2 %), 384.3 [M-*t*Bu-CO₂]⁺ (51 %)

HRMS (EI) ber.: 485.3539

gef.: 485.3535.

Bis(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*L*-cystin-bis(*tert*-butylester)

(Fmoc-Cys-*Ot*Bu)₂

Eine Lösung von 800 mg Cystin-bis(*tert*-butylester) (2.27 mmol, 1 Äquivalent) in 50 ml absolutem Methylenchlorid wird mit 788 μ l Triethylamin (5.67 mmol, 2.5 Äquivalente) und 1.47 g Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (5.67 mmol, 2.5 Äquivalente) versetzt. Nach 19 Stunden wird dreimal mit 35 ml 0.5 *N* Salzsäure und anschließend mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Ausbeute: 1.98 g eines farblosen Schaumes

R_f=0.19 (Hexan/Essigester 5:1)

Smp: 75 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.26$ (c=0.99, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta=$ 7.70–7.76 (m, 4 H, Fmoc-CH), 7.55–7.61 (m, 4 H, Fmoc-CH), 7.33–7.40 (m, 4 H, Fmoc-CH), 7.24–7.30 (m, 4 H, Fmoc-CH), 5.76 (d, 2 H, $J=7.5$ Hz, NH), 4.453–4.59 (m, 2 H, α -CH Cys), 4.31–4.39 (m, 4 H, Fmoc-CH₂), 4.16–4.20 (m, 2 H, Fmoc-CH), 3.13–3.25 (m, 4 H, β -CH₂ Cys), 1.43 [s, 18 H, CO₂C(CH₃)₃] ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 169.3 (C=O), 155.7 (C=O Urethan), 143.8 (*quart*, Fmoc), 143.8 (*quart*, Fmoc), 141.3 (*quart*, Fmoc), 127.7 (Fmoc-CH), 127.0 (Fmoc-CH), 125.1 (Fmoc-CH), 119.9 (Fmoc-CH), 83.1 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 67.2 (Fmoc- CH_2), 54.1 (α -CH), 47.1 (Fmoc-CH), 41.9 (β - CH_2), 28.0 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$] ppm

$\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ (796.99)

MS (FAB, 3-NBA): 819.4 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 797.4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 685.3 [$\text{M}-2t\text{Bu}+\text{H}$] $^+$.

S-Hexadecyl-L-cystein-*tert*-butylester

H-Cys(Hd)-*Or*Bu (**46**)

Zu einer Lösung von 500 mg *L*-Cystin-bis(*tert*-butylester) **9** (2.27 mmol, 1 Äquivalent) in 10 ml absolutem Methylenchlorid werden unter Argon 630 μl Triethylamin (4.54 mmol, 2 Äquivalente) und 1.40 g Dithiothreitol (9.08 mmol, 4 Äquivalente) gegeben. Nach 100 Minuten wird die Lösung mit weiteren 40 ml Methylenchlorid verdünnt und dreimal mit je 50 ml Wasser extrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 , Filtrieren und Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man ein farbloses Öl, das in 10 ml absoluten DMF aufgenommen wird. Diese Lösung wird mit 630 μl Triethylamin (4.54 mmol, 2 Äquivalente) und 2.77 ml Hexadecylbromid (9.08 mmol, 4 Äquivalente) versetzt. Nach zwei Tagen werden 50 ml Wasser zugegeben und dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 , Filtrieren und Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Produkt durch Flash-Chromatographie isoliert (Hexan/Essigsäureethylester 2:1).

Ausbeute: 723 mg (1.80 mmol, 40 %) eines farblosen Öls.

$R_f=0.17$ (Hexan/Essigester 2:1)

$[\alpha]_D^{20} = -3.5$ ($c=2.0$, CHCl_3)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ =3.52 (dd, 1 H, $J=7.3$ Hz, $J=4.7$ Hz, α -CH Cys), 2.89 (dd, 1 H, $J=13.3$ Hz, $J=4.6$ Hz, β - CH_{2a} Cys), 2.74 (dd, 1 H, $J=13.3$ Hz, $J=7.3$ Hz, β - CH_{2b} Cys), 2.54 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, α - CH_2 Hd), 2.00 (s, 2 H, NH_2), 1.53–1.61 (m, 2 H, β - CH_2 Hd), 1.48 [s, 9 H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.31–1.39 (m, 2 H, γ - CH_2 Hd), 1.25 [s, 24 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}(\text{CH}_2)_3\text{S}$], 0.88 (t, 3 H, $J=6.8$ Hz, ω - CH_3 Hd) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 173.2 (C=O), 81.6 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 54.7 (α -CH Cys), 37.4 (CH_2), 32.8 (CH_2), 31.9 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.2 (CH_2), 28.8 (CH_2), 28.0 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 22.7 (CH_2), 14.1 (CH_3 Hd) ppm

$\text{C}_{23}\text{H}_{47}\text{NO}_2\text{S}$ (401.69)

MS (FAB, 3-NBA): 402.4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 346.3 [$\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}$] $^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

Fmoc-Met-Ser-Cys(Hd)-OtBu (**47**)

Zu einer Lösung von 600 mg *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-serin **12** (1.31 mmol, 1.1 Äquivalente) und 478 mg *S*-Hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **46** (1.19 mmol, 1 Äquivalent) in 7 ml absolutem Dimethylformamid werden 382 mg EEDQ (1.55 mmol, 1.3 Äquivalente) gegeben. Nach drei Tagen wird die Lösung mit 50 ml Essigsäureethylester verdünnt und nacheinander zweimal mit 50 ml 0.5 *N* Salzsäure, zweimal mit 50 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 wird filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Hexan/Essigsäureethylester 1:1) isoliert.

Ausbeute: 639 mg (0.759 mmol, 64 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.19$ (Methylenchlorid/Ethanol 30:1)

Smp: 114 °C

$[\alpha]_D^{20} = -12.3$ (c=1.5, CHCl_3)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ =7.76 (d, 2 H, $J=7.5$ Hz, Fmoc-CH), 7.59 (dd, 2 H, $J=7.4$ Hz, $J=3.8$ Hz, Fmoc-CH), 7.40 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, Fmoc-CH), 7.32 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, Fmoc-CH), 7.03–7.09 (m, 2 H, NH), 5.50 (d, 1 H, $J=7.4$ Hz, NH), 4.61–4.69 (m, 1 H, α -CH), 4.48–4.54 (m, 1 H, α -CH), 4.38–4.45 (m, 3 H, Fmoc- CH_2 , α -CH), 4.22 (t, 1 H, $J=6.9$ Hz, Fmoc-CH), 4.05–4.12 (m, 1 H, β - CH_{2a} Ser), 3.62–3.71 (m, 1 H, β - CH_{2b} Ser), 2.98 (dd, 1 H, $J=13.8$ Hz, $J=4.5$ Hz, β - CH_{2a} Cys), 2.91 (dd, 1 H, $J=13.6$ Hz, $J=6.1$ Hz, β - CH_{2b} Cys), 2.52–2.61 (m, 2 H, γ - CH_2 Met), 2.50 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, α - CH_2 Hd), 2.11 (s, 3 H, SCH_3 Met), 2.08–2.16 (m, 1 H, β - CH_{2a} Met), 1.95–2.03 (m, 1 H, β - CH_{2b} Met), 1.49–1.58 (m, 2 H, β - CH_2 Hd), 1.47 [s, 9 H,

$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.22–1.38 [m, 26 H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}(\text{CH}_2)_2\text{S}$], 0.88 (t, 3 H, $J=6.9$ Hz, $\omega\text{-CH}_3$ Hd) ppm

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta=171.8$ (C=O), 170.2 (C=O), 169.7 (C=O), 156.2 (C=O Urethan), 143.8 (*quart*, Fmoc), 143.7 (*quart*, Fmoc), 141.3 (*quart*, Fmoc), 127.7 (Fmoc-CH), 127.1 (Fmoc-CH), 125.1 (Fmoc-CH), 120.0 (Fmoc-CH), 83.1 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 67.2 (Fmoc- CH_2), 62.9 ($\beta\text{-CH}_2$ Ser), 54.5 ($\alpha\text{-CH}$), 54.0 ($\alpha\text{-CH}$), 52.6 ($\alpha\text{-CH}$), 47.1 (Fmoc-CH), 34.0 (CH_2), 32.7 (CH_2), 32.0 (CH_2), 31.9 (CH_2), 30.1 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.3 (CH_2), 28.8 (CH_2), 28.0 [$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 22.7 (CH_2), 15.3 (SCH_3 Met), 14.1 (CH_3 Hd) ppm.

$\text{C}_{46}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ (842.20)

MS (FAB, 3-NBA): 864.5 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 842.7 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 786.4 [$\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}$] $^+$.

Elementaranalyse:

ber.: C: 65.60 % H: 8.50 % N: 4.99 %

gef.: C: 65.55 % H: 8.36 % N: 4.97 %.

***L*-Methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester**

H-Met-Ser-Cys(Hd)-OtBu

Zu einer Lösung von 30 mg *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **47** (35.6 μmol) in 2 ml Methylenchlorid werden 2 ml Diethylamin gegeben. Nach zwei Stunden werden 3 ml Chloroform zugegeben und die flüchtigen Komponenten im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1, dann Chloroform/Methanol 8:1) isoliert. Ausbeute: 13 mg (21.0 μmol , 59 %) eines farblosen Feststoffes.

$R_f=0.30$ (Chloroform/Methanol 8:1)

Smp: 48 °C

$[\alpha]_D^{20} = -22.0$ (c=0.6, CHCl_3)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=8.12$ (d, 1 H, $J=7.6$ Hz, NH), 4.61–4.69 (dd, 1 H, $J=13.1$ Hz, $J=5.5$ Hz, $\alpha\text{-CH}$), 4.52–4.58 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.04 (dd, 1H, $J=11.5$ Hz, $J=3.9$ Hz, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Ser), 3.64–3.72 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Ser, $\alpha\text{-CH}$ Met), 2.99 (dd, 1 H,

$J=13.6$ Hz, $J=4.8$ Hz, β -CH_{2a} Cys), 2.90 (dd, 1 H, $J=13.6$ Hz, $J=6.0$ Hz, β -CH_{2b} Cys), 2.76 (b, 2 H, NH₂), 2.63 (t, 2 H, $J=7.2$ Hz, γ -CH₂ Met), 2.51 (t, 2 H, $J=7.4$ Hz, α -CH₂ Hd), 2.13–2.23 (m, 1 H, β -CH_{2a} Met), 2.11 (s, 3 H, SCH₃ Met), 1.82–1.92 (m, 1 H, β -CH_{2b} Met), 1.49–1.58 (m, 2 H, β -CH₂ Hd), 1.47 [s, 1 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.22–1.38 [m, 26 H, CH₃(CH₂)₁₃(CH₂)₂S], 0.87 (t, 3 H, $J=6.9$ Hz, ω -CH₃ Hd) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta=174.7$ (C=O), 170.6 (C=O), 169.7 (C=O), 83.0 [CO₂C(CH₃)₃], 63.0 (β -CH₂ Ser), 54.2 (α -CH), 54.1 (α -CH), 52.6 (α -CH), 34.0 (CH₂), 33.5 (CH₂), 32.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 30.4 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.0 [CO₂C(CH₃)₃], 22.7 (CH₂), 15.3 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Hd) ppm.

C₃₁H₆₁N₃O₅S₂ (619.97)

MS (FAB, 3-NBA): 620.4 [M+H]⁺, 564.4 [M-*t*Bu+H]⁺

HRMS (FAB) für [M+H]⁺: ber.: 620.4131

gef.: 620.4143.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester

MIC-Met-Ser-Cys(Hd)-OtBu

Zu einer Lösung von 203 mg *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester **47** (0.242 mmol) in 4 ml Methylenchlorid werden 4 ml Diethylamin gegeben. Nach 1.5 Stunden werden 3 ml Chloroform zugegeben, die flüchtigen Komponenten im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in 2 ml Methylenchlorid aufgenommen. Zu dieser Lösung werden 56.1 mg Maleinimidocapronsäure (0.266 mmol, 1.1 Äquivalente) und 77.6 mg EEDQ (0.314 mmol, 1.3 Äquivalente) gegeben. Nach 15 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in 40 ml Essigester aufgenommen und je zweimal mit 40 ml 0.5 *N* Salzsäure und gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie einmal mit 40 ml gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 20:1, alternativ: Hexan/Essigester 1:3) isoliert.

Ausbeute: 135 mg (0.166 mmol, 69 %) eines farblosen Feststoffes.

R_f=0.21 (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 88 °C

$[\alpha]_D^{20} = -12.0$ (c=1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ=7.12 (d, 2 H, *J*=7.7 Hz, NH), 6.69 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 6.40 (d, 1 H, *J*=7.5 Hz, NH), 4.60–4.68 (m, 2 H, 2 * α-CH), 4.49–4.54 (m, 1 H, α-CH), 4.54–4.58 (m, 1 H, α-CH), 4.06 (dd, 1 H, *J*=11.4 Hz, *J*=3.6 Hz, β-CH_{2a} Ser), 3.69 (dd, 1 H, *J*=11.5 Hz, *J*=5.5 Hz, β-CH_{2b} Ser), 3.51 (t, 2 H, *J*=7.2 Hz, MIC-NCH₂), 2.99 (dd, 1 H, *J*=13.7 Hz, *J*=4.7 Hz, β-CH_{2a} Cys), 2.91 (dd, 1 H, *J*=13.6 Hz, *J*=6.2 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.53–2.61 (m, 2 H, γ-CH₂ Met), 2.52 (t, 2 H, *J*=7.4 Hz, α-CH₂ Hd), 2.22 (t, 2 H, *J*=7.5 Hz, MIC), 2.08–2.14 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), 2.12 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.96–2.04 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met), 1.50–1.70 (m, 6 H, CH₂ MIC, β-CH₂ Hd), 1.48 [s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃], 1.22–1.37 [m, 28 H, CH₃(CH₂)₁₃(CH₂)₂S, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, ω-CH₃ Hd) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 173.1 (C=O), 171.5 (C=O), 170.9 (2 C=O Maleinimid), 170.1 (C=O), 169.7 (C=O), 134.1 (2 * CH Maleinimid), 83.1 [CO₂C(CH₃)₃], 62.7 (β-CH₂ Ser), 54.5 (α-CH), 52.5 (α-CH), 52.5 (α-CH), 37.6 (NCH₂ in Aminocapronsäure), 36.2 (CH₂), 34.0 (CH₂), 32.6 (CH₂), 31.9 (CH₂), 31.3 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.0 [CO₂C(CH₃)₃], 26.3 (CH₂), 24.9 (CH₂), 22.7 (CH₂), 15.3 (SCH₃ Met), 14.1 (CH₃ Hd) ppm

C₄₁H₇₂N₄O₈S₂ (813.48)

MS (FAB, 3-NBA): 835.5 [M+Na]⁺, 813.5 [M+H]⁺, 757.4 [M-*t*Bu+H]⁺

HRMS (FAB) für [M+Na]⁺: ber.: 835.4689

gef.: 835.4727.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein

MIC-Met-Ser-Cys(Hd)-OH (**48**)

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cystein-*tert*-butylester (61.0 mg, 75.0 μmol) wird in 0.25 ml Methylenchlorid gelöst und mit 0.25 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach drei Stunden werden 4 ml Toluol zugegeben und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei das Produkt quantitativ als farbloser Feststoff anfällt.

Smp: 141 °C

$[\alpha]_D^{20} = -9.6$ (c=1.0, CHCl₃MeOH 2:1)

¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 500 MHz): δ=6.72 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 4.48–4.70 (m, 3 H, 3 * α-CH), 3.88–3.93 (m, 1 H, β-CH_{2a} Ser), 3.73–3.78 (m, 1 H, β-CH_{2b} Ser), 3.52 (t, 2 H, J=7.2 Hz, MIC-NCH₂), 3.04 (dd, 1 H, J=13.8 Hz, J=4.4 Hz, β-CH_{2a} Cys), 2.95 (dd, 1 H, J=13.9 Hz, J=6.8 Hz, β-CH_{2b} Cys), 2.49–2.58 (m, 4 H, γ-CH₂ Met, α-CH₂ Hd), 2.24 (t, 2 H, J=7.3 Hz, MIC), 2.06–2.16 (m, 1 H, β-CH_{2a} Met), 2.11 (s, 3 H, Met-CH₃), 1.90–1.98 (m, 1 H, β-CH_{2b} Met), 1.53–1.69 (m, 6 H, CH₂ MIC, β-CH₂ Hd), 1.22–1.41 [m, 28 H, CH₃(CH₂)₁₃(CH₂)₂S, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3H, J=6.8 Hz, ω-CH₃ Hd) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃/CD₃OD 6:1, 125 MHz): δ= 174.4 (C=O), 172.7 (C=O), 172.4 (C=O), 171.3 (2 * C=O Maleinimid), 170.6 (C=O), 134.3 (2 * CH Maleinimid), 62.4 (β-CH₂ Ser), 55.0 (α-CH), 52.6 (α-CH), 52.3 (α-CH), 37.8 (NCH₂ in Aminocaprinsäure), 36.0 (CH₂), 33.7 (CH₂), 32.6 (CH₂), 32.0 (CH₂), 31.6 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.3 (CH₂), 26.4 (CH₂), 25.1 (CH₂), 22.8 (CH₂), 15.3 (SCH₃ Met), 14.2 (CH₃ Hd) ppm

C₃₇H₆₄N₄O₈S₂ (757.06)

MS (FAB, 3-NBA): 779.5 [M+Na]⁺, 757.4 [M+H]⁺

HRMS (FAB) für [M+Na]⁺: ber.: 779.4063

gef.: 779.3996.

Maleinimidocaproyl-L-methionyl-L-seryl-S-hexadecyl-L-cysteyl-N^(ε)-(4-tolyldiphenylmethyl)-L-lysyl-S-farnesyl-L-cysteinmethylester

MIC-Met-Ser-Cys(Hd)-Lys(Mtt)-Cys(Far)-OMe (**49**)

Zu einer Lösung von 90.0 mg N^(α)-Fluorenylmethoxycarbonyl-N^(ε)-(4-tolyldiphenylmethyl)-L-lysyl-S-farnesyl-L-cysteinmethylester **36** (95.1 μmol) in 1.6 ml Methylenchlorid werden 0.4 ml Diethylamin gegeben. Nach 4 Stunden wird mit 4 ml Essigester verdünnt und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Eine Lösung von 55.9 mg Maleinimidocaproyl-L-methionyl-L-seryl-S-hexadecyl-L-cystein **48** (73.8 μmol, 1 Äquivalent) und dem frisch hergestellten N^(ε)-(4-Tolyldiphenylmethyl)-L-lysyl-S-farnesyl-L-cysteinmethylester **41** (95.9 μmol, 1.3 Äquivalente) in 5 ml trockenem Methylenchlorid und 0.1 ml Trifluorethanol wird mit 23.7 mg EEDQ (959 μmol, 1.3 Äqui-

valente) versetzt. Nach 15 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Methylenchlorid/Ethanol 30:1) isoliert.

Ausbeute: 28.3 mg (19.3 μmol , 26 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

$R_f=0.22$ (Methylenchlorid/Ethanol 20:1)

Smp: 175 °C

$[\alpha]_D^{20} = -21.2$ (c=1.0, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 500 MHz): $\delta=7.42$ (d, 4 H, $J=7.6$ Hz, Mtt-CH), 7.22–7.33 (m, 2 H, Mtt-CH), 7.24–7.34 (m, 6 H, Mtt-CH), 7.13–7.20 (m, 2 H, Mtt-CH), 7.05–7.09 (m, 2 H, Mtt-CH), 6.71 (s, 1 H, Maleinimid-CH), 6.70 (s, 1 H, Maleinimid-CH), 5.15–5.23 (m, 1 H, CH=C Far), 5.05–5.12 (m, 2 H, CH=C Far), 4.34–4.64 (m, 5 H, 5 * α -CH), 3.88–3.95 (m, 1 H, β -CH_{2a} Ser), 3.69–3.78 (m, 1 H, β -CH_{2b} Ser), 3.69 (s, 3 H, COOCH₃), 3.47–3.55 (m, 2 H, MIC-NCH₂), 3.21 (dd, 1 H, $J=13.1$ Hz, $J=8.2$ Hz, α -CH_{2a} Far), 3.09 (dd, 1 H, $J=13.1$ Hz, $J=7.4$ Hz, α -CH_{2b} Far), 2.90–2.98 (m, 4 H, β -CH₂ Cys_{Hd}, β -CH_{2a} Cys_{Far}), 2.79 (dd, 1 H, $J=13.8$ Hz, $J=7.8$ Hz, β -CH_{2b} Cys_{Far}), 2.45–2.58 (m, 6 H, γ -CH₂ Met, α -CH₂ Hd, ϵ -CH₂ Lys), 2.30 (b, 3 H, Mtt-CH₃), 2.18–2.26 (m, 2 H, MIC), 1.82–2.15 (m, 14 H, β -CH₂ Met, SCH₃ Met, CH_{2a} Lys, CH₂ Far), 1.48–1.69 (m, 11 H, CH₂ MIC, CH₂ Lys, β -CH₂ Hd), 1.68 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.67 (s, 3 H, CH₃ Far), 1.60 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.19–1.39 [m, 28 H, CH₃(CH₂)₁₃(CH₂)₂S, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3H, $J=6.8$ Hz, ω -CH₃ Hd) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 125 MHz): $\delta=174.3$ (C=O), 172.2 (C=O), 172.1 (C=O), 171.2 (2 * C=O MIC), 170.6 (C=O), 176.9 (C=O), 169.4 (C=O), 146.4 (*quart*, Mtt), 143.3 (*quart*, Mtt), 140.1 (*quart*, Far), 135.8 (*quart*, Mtt), 135.4 (*quart*, Far), 134.2 (2 * CH Maleinimid), 131.4 (*quart*, Far), 128.7 (Mtt, 3 CH), 127.8 (Mtt, CH), 126.2 (Mtt, CH), 124.4 (Far-CH), 123.9 (Far-CH), 119.6 (Far-CH), 70.7 (*quart*, Mtt), 62.1 (β -CH₂ Ser), 54.9 (α -CH), 53.6 (α -CH), 53.0 (α -CH), 52.8 (α -CH), 52.5 (COOCH₃), 52.1 (α -CH), 43.6 (CH₂), 39.8 (CH₂), 37.7 (CH₂), 35.9 (CH₂), 33.9 (CH₂), 33.5 (CH₂), 32.8 (CH₂), 32.6 (CH₂), 32.4 (CH₂), 32.0 (CH₂), 31.3 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.3 (CH₂), 26.8 (CH₂), 26.6 (CH₂), 26.4 (CH₂), 26.3 (CH₂), 25.7 (Far-CH₃), 25.0 (CH₂), 22.8 (CH₂), 20.9 (Mtt-CH₃), 17.7 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.0 (Far-CH₃) 15.4 (SCH₃ Met) 14.1 (CH₃ Hd) ppm

$C_{82}H_{123}N_7O_{10}S_3$ (1436.09)

MS (FAB, 3-NBA): 1484.6 $[M+Na]^+$, 1462.4 $[M+H]^+$, 1460.4 $[M-H]^+$, 1384.5 $[M-C_6H_5-H]^+$, 1371.5 $[M-C_6H_4CH_3]^+$, 1206.6 $[M-Mtt+H]^+$, 257.2 $[Mtt]^+$.

Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cysteyl-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester

MIC-Met-Ser-Cys(Hd)-Lys-Cys(Far)-OMe (**43c**)

Eine Lösung von 14.9 mg Maleinimidocaproyl-*L*-methionyl-*L*-seryl-*S*-hexadecyl-*L*-cysteyl-*N*^(e)-(4-tolyldiphenylmethyl)-*L*-lysyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteinmethylester **49** (10.2 μ mol, 1 Äquivalent) in 0.8 ml 1%iger TFA-Lösung in Methylenchlorid wird mit 16.2 μ l Triethylsilan (102 μ mol, 10 Äquivalente) versetzt. Nach 50 Minuten werden 0.9 ml einer 1%igen Lösung von Ethyldimethylamin in Methylenchlorid zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Produkt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 ($CHCl_3/MeOH$ 1:1) isoliert.

Ausbeute: 11.9 mg (9.86 μ mol, 97 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffes.

Smp: 193 °C

$[\alpha]_D^{20} = -39.0$ (c=0.3, $CHCl_3/MeOH$ 2:1)

1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 6:1, 500 MHz): δ =6.74 (s, 2 H, Maleinimid-CH), 5.20 (t, 1 H, $J=7.3$ Hz, CH=C Far), 5.06–5.13 (m, 2 H, CH=C Far), 4.63 (dd, 1 H, $J=8.2$ Hz, $J=5.0$ Hz, α -CH), 4.42–4.48 (m, 3 H, 3 * α -CH), 4.38 (t, 1 H, $J=4.6$ Hz, α -CH), 3.92 (dd, 1 H, $J=11.5$ Hz, $J=4.4$ Hz, β -CH_{2a} Ser), 3.79 (dd, 1 H, $J=11.5$ Hz, $J=4.9$ Hz, β -CH_{2b} Ser), 3.75 (s, 3 H, COOCH₃), 3.52 (t, 2 H, $J=7.2$ Hz, MIC-NCH₂), 3.24 (dd, 1 H, $J=13.1$ Hz, $J=8.3$ Hz, α -CH_{2a} Far), 3.12 (dd, 1 H, $J=13.2$ Hz, $J=7.2$ Hz, α -CH_{2b} Far), 3.00 (dd, 1 H, $J=13.6$ Hz, $J=6.5$ Hz, β -CH_{2a} Cys_{Hd}), 2.93–2.99 (m, 3 H, β -CH_{2a} Cys_{Far}, ϵ -CH₂ Lys), 2.89 (dd, 1 H, $J=13.6$ Hz, $J=7.9$ Hz, β -CH_{2b} Cys_{Hd}), 2.80 (dd, 1 H, $J=13.9$ Hz, $J=8.2$ Hz, β -CH_{2b} Cys_{Far}), 2.51–2.61 (m, 4 H, γ -CH₂ Met, α -CH₂ Hd), 2.29 (t, 2 H, $J=7.0$ Hz, MIC), 1.94–2.15 (m, 14 H, β -CH₂ Met, SCH₃ Met, CH_{2a} Lys, CH₂ Far), 1.54–1.78 (m, 9 H, β -CH₂ Hd, CH₂ MIC, CH₂ Lys), 1.68 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.61 (s, 6 H, CH₃ Far), 1.41–1.50 (m, 2 H, CH₂ Lys), 1.21–1.39 [m, 28 H, CH₃(CH₂)₁₃(CH₂)₂S, CH₂ MIC], 0.88 (t, 3 H, $J=7.0$ Hz, ω -CH₃ Hecadecyl) ppm

^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 6:1, 125 MHz): $\delta=175.3$ (C=O), 173.0 (C=O), 172.3 (C=O), 171.7 (C=O), 171.4 (C=O), 171.4 (C=O), 140.3 (*quart*, Far), 135.6 (*quart*, Far), 134.4 (2 * CH Maleinimid), 131.5 (*quart*, Far), 124.5 (Far-CH), 124.0 (Far-CH), 119.8 (Far-CH), 62.0 (β -CH₂ Ser), 55.8 (α -CH), 53.9 (α -CH), 53.3 (α -CH), 52.9 (α -CH), 52.7 (COOCH₃), 52.4 (α -CH), 39.9 (CH₂), 39.7 (CH₂), 37.8 (CH₂), 36.0 (CH₂), 33.0 (CH₂), 32.8 (CH₂), 32.5 (CH₂), 32.1 (CH₂), 31.0 (CH₂), 30.7 (CH₂), 30.5 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.4 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.7 (CH₂), 26.5 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.8 (Far-CH₃), 25.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 22.2 (CH₂), 17.8 (Far-CH₃), 16.2 (Far-CH₃), 16.1 (Far-CH₃), 15.3 (SCH₃ Met), 14.2 (CH₃ Hd) ppm

$\text{C}_{62}\text{H}_{107}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}_3$ (1205.72)

MS (FAB, 3-NBA): 1206.5 [M+H]⁺.

6.5.7 Synthese der Protein-Peptid-Konjugate

Durch Umpuffern über eine HiTrap-Säule (Sephadex G-25 Superfine, 5 ml Säulenvolumen) mit Puffer (20 mmol Tris, 5 mmol MgCl₂, pH 7.4) wird eine Lösung von verkürztem H-Ras 1-181 von Dithioerythrol (DTE) befreit. Der Proteingehalt der erhaltenen Lösung wird nach der Bradford-Methode UV/VIS-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Bis zu ihrer Verwendung wird diese Proteinlösung unter Argon bei 0 °C gelagert.

In 100 μl Methanol wird ein Äquivalent des jeweiligen Peptids mit Hilfe von Ultraschall gelöst. Anschließend wird 1 ml einer wässrigen Lösung von 11 % Triton X-114 zugegeben, die milchige Mischung wird 10 Minuten durch Ultraschall homogenisiert und auf 0 °C abgekühlt. Die obige Proteinlösung wird zugegeben, und mit Hilfe eines Vortex-Mixers wird eine homogene Mischung erzeugt. Diese wird unter Argon bei 4 °C vorsichtig geschüttelt. Nach 15 Stunden wird die Lösung zentrifugiert, der lösliche Überstand mit 3 ml Puffer (20 mmol Tris, 5 mmol MgCl₂, 2 mmol DTE, pH 7.4) verdünnt und zwei Minuten bei 37 °C inkubiert. Die resultierende milchige Suspension wird 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei eine Phasentrennung eintritt. Die obere, wässrige Phase wird abgetrennt. Nach Zugabe von jeweils 1 ml 11 %iger Tritonlösung wird diese Extraktion zweimal wiederholt; die untere Detergensphase wird auf Eis gelagert. Die vereinigten Detergensphasen werden auf die gleiche Weise insgesamt dreimal mit je 5 ml

Puffer gewaschen. Die Detergensphase wird anschließend mit Puffer auf ein Volumen von 30 ml verdünnt und auf eine DEAE-Sepharosesäule aufgegeben. Bei einer Flussrate von 1 ml pro Minute wird die Säule 50 Minuten mit dem gleichen Puffer gespült. In diesem Zeitraum wird das nicht-ionische Detergens abgetrennt. Anschließend wird das Protein-konjugat durch Anlegen eines NaCl-Gradienten (0 – 1 M NaCl) innerhalb von 25 Minuten eluiert. Das Eluat wird in 2 ml-Fraktionen gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen werden durch einen Bradford-Test identifiziert und vereinigt. Mit Hilfe einer Ultrazentrifugationseinheit (10 kDa-Ausschlussmembran) wird die Lösung aufkonzentriert und durch anschließende Zugabe von 10 ml Puffer und erneute Zentrifugation entsalzt. Die resultierende Proteinlösung wird in Portionen aufgeteilt, schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Ergebnisse:

MIC-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys-Cys(Far)-OMe **43a**:

- Ausbeute ca 1.44 mg Produkt aus 16 mg Protein
- Nanospray-Massenspektrum zeigt Signale bei 21719 (Kupplungsprodukt), 21503 (Kupplungsprodukt-Farnesylrest) und 21469 (Hauptsignal, Kupplungsprodukt-Palmitoylrest)

MIC-Met-Ser-Cys(*St*Bu)-Lys-Cys(Far)-OMe **43b**:

Produkt bisher nicht charakterisiert

MIC-Met-Ser-Cys(Hd)-Lys-Cys(Far)-OMe **43c**:

- Ausbeute ca 2.4 mg Produkt aus 8.5 mg Protein
- Nanospray-Massenspektrum zeigt zwei stark veräusserte Signale bei 20489 (H-Ras 1-181) und 21470 (Kupplungsprodukt-Hexadecylrest)

7. Literaturverzeichnis

- [1] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1–16.
- [2] J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 245–261.
- [3] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 241–269.
- [4] M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1484*, 93–106.
- [5] J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy, *Science* **1996**, *274*, 255–259.
- [6] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23269–23276.
- [7] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3252.
- [8] (a) L. A. Camp, S. L. Hofman, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22566–22574;
(b) J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15830–15837.
- [9] (a) J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23594–23600;
(b) M. C. Bano, C. S. Jackson, A. I. Magee, *Biochem. J.* **1998**, *330*, 723–731.
- [10] (a) T. Magee, C. Marshall, *Cell* **1999**, *98*, 9–12; (b) E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, *98*, 69–80; (c) A. Appoloni, I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 2475–2487.
- [11] Y. Webb, L. Hermida-Matsumoto, M. D. Resh, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 261–270.
- [12] (a) L. Zhang, W. R. Tschantz, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23354–23359;
(b) J. C. Otto, E. Kim, S. G. Young, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8379–8382.
- [13] zur Kristallstruktur siehe H.-W. Park, S. R. Boduluri, J. F. Moomaw, P. J. Casey, L. S. Beese, *Science* **1997**, *275*, 1800–1805.
- [14] G. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4454–4458.
- [15] R. R. Desrosiers, Q.-T. Nguyen, R. Béliveau, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 790–797.
- [16] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813–3822.
- [17] (a) A. A. Siddiqui, J. R. Garland, M. B. Dalton, M. Simensky, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3712–3717; (b) R. Haklai, M. Gana-Weisz, G. Elad, A. Paz, D. Marciano, Y. Egozi, G. Ben-Baruch, Y. Kloog, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1306–1314.
- [18] M. Geyer, A. Wittinghofer, *Curr. Op. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 786–792.

- [19] P. A. Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, *Nature* **1998**, 394, 337–343.
- [20] K. A. Maegley, S. J. Admiraal, D. Herschlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 8160–8166.
- [21] S. Cho, G. Dawson, *J. Neurochem.* **2000**, 74, 1478–1488.
- [22] M. K. Jones, J. H. Jackson, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 1782–1787.
- [23] J. K. Voice, R. L. Klemke, A. Le, J. H. Jackson, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 17164–17170.
- [24] (a) A. B. Vojtek, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 19925–19928;
(b) G. W. Reuther, C. J. Der, *Curr. Op. Cell Biol.* **2000**, 12, 157–165.
- [25] F. McCormick, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, M53–M56.
- [26] R. M. F. Wolthuis, J. L. Bos, *Curr. Op. Gen. Dev.* **1999**, 9, 112–117.
- [27] J. M. Shields, K. Pruitt, A. McFall, A. Shaub, C. J. Der, *Trends Cell Biol.* **2000**, 10, 147–154.
- [28] C. Rommel, E. Hafen, *Curr. Op. Gen. Dev.* **1998**, 8, 412–418.
- [29] C. J. Marshall, *Curr. Op. Gen. Dev.* **1994**, 4, 82–89.
- [30] (a) S. J. Leever, H. F. Patterson, C. J. Marshall, *Nature* **1994**, 369, 411–414;
(b) D. Stokoe, S. G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons, J. F. Hancock, *Science* **1994**, 264, 1463–1467.
- [31] M. Tamada, C.-D. Hu, K.-I. Kariya, T. Okada, T. Kataoka, *Oncogene* **1997**, 15, 2959–2964.
- [32] S. Mizutani, H. Koide, Y. Kaziro, *Oncogene* **1998**, 16, 2781–2786.
- [33] K. Inouye, S. Mizutani, H. Koide, Y. Kaziro, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3737–3740.
- [34] B. N. Kholodenko, J. B. Hoeck, H. V. Westerhoff, *Trends Cell Biol.* **2000**, 10, 173–178.
- [35] M. P. Wymann, L. Pirola, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1436, 127–150.
- [36] S. J. Leever, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, *Curr. Op. Cell Biol.* **1999**, 11, 219–225.
- [37] G. Krauss, *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, 1. Auflage, Wiley-VCH 1997.
- [38] I. Rubio, P. Rodriguez-Vician, J. Downward, R. Wetzker, *Biochem. J.* **1997**, 326, 891–895.

- [39] R. G. Hiskey, T. Mizoguchi, T. Inui, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1192–1195.
- [40] E. Yousefi-Salakdeh, J. Johansson, R. Strömberg, *Biochem. J.* **1999**, *343*, 557–562.
- [41] (a) M. Joseph, R. Nagaraj, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1025–1028; (b) M. Joseph, R. Nagaraj, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19439–19445.
- [42] (a) H. Waldmann, E. Nägele, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2425–2428; (b) M. Koppitz, T. Spellig, R. Kahmann, H. Kessler, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *48*, 377–390.
- [43] F. R. Naider, J. M. Becker, *Biopolymers* **1997**, *43*, 3–14.
- [44] D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *1*, im Druck.
- [45] (a) T. W. Muir, *Structure* **1995**, *3*, 649–652; (b) A. Walker, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1113–1115; (c) J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers* **1999**, *51*, 311–332.
- [46] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 458–476.
- [47] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [48] J. R. Silvius, F. l'Heureux, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3014–3022.
- [49] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Curr. Op. Biotechn.* **2000**, *11*, 54–61.
- [50] R. M. Epanand, *Biopolymers* **1997**, *43*, 15–24.
- [51] K. G. Waddick, F. M. Uckun, *Biochemical Pharmacology* **1998**, *56*, 1411–1426.
- [52] (a) H. Waldmann, M. Schelhaas, E. Nägele, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Schroeder, J. R. Silvius, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2334–2337; (b) H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102–13109.
- [53] M. Schelhaas, E. Nägele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1239–1252.
- [54] G. W. Anderson, J. E. Zimmermann, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839–1842.
- [55] M. J. S. A. Amaral, M. A. Macedo, M. I. A. Oliveira, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1977**, 205–206.
- [56] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1651–1652.
- [57] W. W. Cleland, *Biochemistry* **1964**, *3*, 480–482.
- [58] H. Kunz, J. März, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1424–1425.
- [59] M. Dessolin, M.-G. Guillerez, N. Thieriet, F. Guibè, A. Loffet, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5741–5744

- [60] C.-B. Xue, A. Ewenson, J. M. Becker, F. Naider, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 362–373.
- [61] M. Schelhaas, Dissertation, Karlsruhe 1997.
- [62] D. Stokoe, F. McCormick, *EMBO J.* **1997**, *16*, 2384–2396.
- [63] (a) M. Ohnishi, Y. Yamawaki-Kataoka, K.-I. Kariya, M. Tamada, C.-D. Hu, T. Kataoka, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*(17), 10210–10215; (b) D. Barnard, H. Sun, L. Baker, M. S. Marshall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *247*, 176–180.
- [64] (a) D. Stokoe, S. G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons, J. F. Hancock, *Science* **1994**, *264*, 1463–1467; (b) S. J. Leever, H. F. Patterson, C. J. Marshall, *Nature* **1994**, *369*, 411–414.
- [65] D. Stokoe, persönliche Kommunikation.
- [66] I. Rubio, U. Wittig, C. Meyer, R. Heinze, D. Kadereit, H. Waldmann, J. Downward, R. Wetzker, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 70–82.
- [67] K. Kuhn, Dissertation, Karlsruhe 1999.
- [68] (a) R. Ledger, F. H. C. Stewart, *Aust. J. Chem.* **1965**, *18*, 933–935; (b) A. Crivici, G. Lajoie, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 49–53.
- [69] B. Pekelis, A. Hong, Poster 35, 16th American Peptide Symposium, Minneapolis 1999.
- [70] D. Basavaiah, P. D. Rao, R. S. Hyma, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8001–8062.
- [71] G. B. Blomberg, D. Askin, A. R. Gargaro, M. J. A. Tanner, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4709–4712.
- [72] H. Mastalerz, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4092–4094.
- [73] (a) H. Waldmann, A. Reidel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 642–644; (b) S. Flohr, V. Jungmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 669–681.
- [74] (a) J. P. Genêt, E. Blart, M. Savignac, S. Lemeune, S. Lemaire-Audoire, J.-M. Paris, J.-M. Bernard, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 497–503; (b) S. Lemaire-Audoire, M. Savignac, G. Pourcelot, J.-P. Genêt, J.-M. Bernard, *J. Mol. Cat. A* **1997**, *116*, 247–258; (c) S. Lemaire-Audoire, M. Savignac, E. Blart, J.-M. Bernard, J. P. Genêt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2955–2958.
- [75] R. Machauer, Dissertation, Karlsruhe 2000.
- [76] L. A. Carpino, J.-H. Tsao, H. Ringsdorf, E. Fell, G. Hettrich, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 358–359.

- [77] K. A. Scheidt, H. Chen, B. C. Follows, S. R. Chemler, D. S. Coffey, W. R. Roush, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6436–6437.
- [78] R. Frank, M. Schutkovski, *Chem. Commun.* **1996**, 2509–2510.
- [79] A. Aletras, K. Barlos, D. Gatos, S. Koutsogianni, P. Mamos, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *45*, 488–496.
- [80] P. Deck, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [81] I. Heinemann, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [82] O. Dangles, F. Guibe, G. Balavoine, S. Lavielle, A. Marquet, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4983–4993.
- [83] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 426–427.