



Technische Universität München

Fakultät für Chemie



Biosystemchemie

**Entwicklung vereinfachter Coenzym A-Mimetika
zur Erforschung und Anwendung von Biosynthese-Enzymen**

Jana Kundert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Corinna Hess

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Tobias A. M. Gulder
2. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich

Die Dissertation wurde am 08.08.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.10.2018 angenommen.

*I always like to look on the optimistic side of life,
but I am realistic enough to know that life is a complex matter.*

~ Walt Disney ~

Danksgiving

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Tobias A. M. Gulder für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Aufgabenstellung, das entgegengebrachte Vertrauen und die Einladung nach München danken. Vielen Dank für die unterstützende, verständnisvolle und immer motivierende Betreuung und ein offenes Ohr für Fragen, Anregungen, Probleme und Ideen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und Frau Prof. Dr. Corinna Hess für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Der Jürgen-Machot-Stiftung und dem CIPSM-Frauenförderprogramm danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Promotionsprojekts.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die unkomplizierte, freundliche, offene und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, die leckeren Kuchenpausen und die schönen Zeiten außerhalb des Labors.

Besonders hervorzuheben ist der „Bonner Stammkern“ des AK Gulderts (Hülya Aldemir, Hanna Hong, Fritzi Schaefer, René Richarz und Janine Antosch), der, zusammengeschweißt durch den gemeinsamen Umzug und das Einleben in München, mir besonders ans Herz gewachsen ist. Genau so sehr ans Herz gewachsen ist mir die „Anti-Mensa“-Mittags-Runde (Hülya Aldemir, Anna Glöckle, Anna Sib, Bekki Miethaner, Kalina Kusserow und Janine Antosch), die immer mit einer schokoladigen Krönung endete ☺!

Ein ganz, ganz großer und besonders lieber Dank geht an Hanna Hong für ihre offene, positive und hilfsbereite Art und für all die tollen Zeiten, angefangen bei dem „Lajollamid-Projekt“ und unseren Bonner Exil-Labor-Tagen in Gesellschaft der „Engeser Jungs“, über den Umzug nach München und die Erkundung der Stadt, die produktiven „long Mondays“ im Königreich „HaJaKa“ mit Aussicht auf den „sooooo schööööönen“ Sonnenuntergang, die zahlreichen sportlichen, musikalischen, kulinarischen, bergigen und kreativen Aktivitäten.

Çok, çok içten teşekkürler auch an Hülya Aldemir, nicht nur für die Einweisung in zahlreiche Geräte und Methoden und das gemeinsame Grübeln an vielen Fragen sondern auch für „5-Uhr-U-Bahn“-Monate, die „arabische Weiterbildung“, die Teestunden und unzähligen Autofahrten ins Rheinland und unsere schönen Ausflüge rund um München. Tausend lieben Dank für alles!

Kalina Kusserow möchte ich ebenfalls herzlichst danken für unsere tolle Laborgemeinschaft und die gegenseitige Unterstützung an frustrierten Tagen, für die vielen schönen kulturellen, leckeren und gemütlichen Zeiten fernab von Garching ☺!

Nicht zu vergessen ist auch ein Dank an Fritzi Schaefers für die „unglaublich schönen Tage“ im „Gesangs“-Labor und „den Blick“, bei dem ich immer lachen musste ☺. Vielen lieben Dank auch an René Richarz für seine ruhige und geduldige Erklärung und Einarbeitung in die biologischen Arbeiten sowie die Welt der PPTase-Assays.

Allen Biochemie-Kollegen (Christian Greunke, Anna Glöckle, Bekki Miethaner, Elke Duell, Katharina Lamm, René Richarz, Paul D’Agostino, Zhengi Qian) sei dafür gedankt, dass sie mir immer hilfsbereit zur Seite standen, wenn ich versucht habe mich im Bio-Labor zurecht zu finden.

Auch bedanke ich mich bei allen Chemie-Kollegen (Anna Sib, Kalina Kusserow, Mert Malay, Manuel Einsiedler, Julia Evers, Jacky Shu, Michaela Geißler, Tobias Stimpl, Jonas Müller, Hanna Hong, Fritzi Schaefers, Hülya Aldemir) für die gemeinsame - manchmal lustige, manchmal frustrierte, manchmal erfolgreiche und manchmal verrückte – Zeit, die mir dank euch in guter Erinnerung bleiben wird.

Am Ende möchte ich mich noch bei meinen Semester-Kollegen für die schöne gemeinsame Studienzeit in Bonn bedanken, und insbesondere bei Christina Poppel, Kim Hintze und Peter Winterscheid für unsere „spontanen“ Unternehmungen, die unterstützende Motivation und die notwendige Ablenkung.

Und abschließend gilt noch mein ganz besonderer und ganz, ganz herzlicher Dank meiner Familie für die immerwährende Unterstützung. Danke, dass ihr mich auf meinem Weg immer unterstützt, ermutigt und mit neuer Energie versetzt! Dies gilt auch für die Würzburger-Mädels, deren nicht-naturwissenschaftliche Perspektive meinen Gedanken oftmals eine neue Richtung gegeben hat. Ein Glück, dass ich euch alle habe und danke, dass ich immer auf euch zählen darf!

Vielen herzlichen Dank! ☀

Огромное душевное спасибо! ☀

Inhaltsverzeichnis

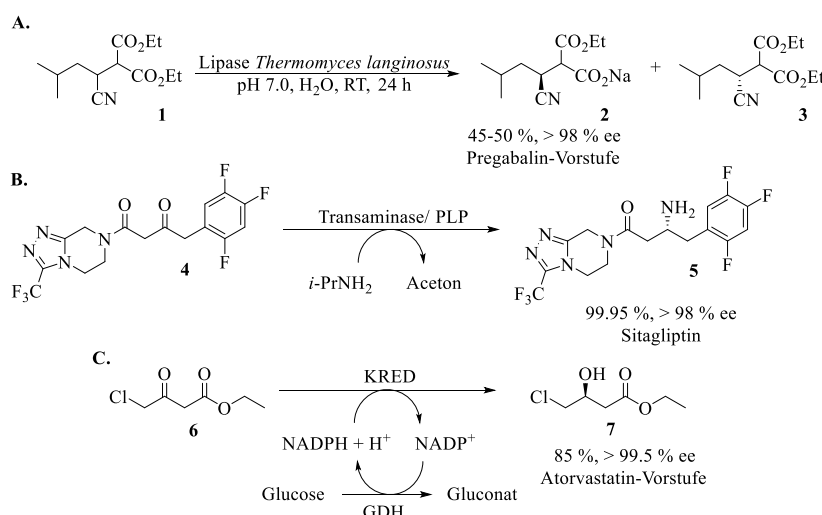
1 Einleitung	1
1.1 Nicht-ribosomal synthetisierte Peptide und deren Biosynthese.....	3
2 Hintergrund und Zielsetzung	8
2.1 Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen)	8
2.2 Coenzym A (11)	11
2.2.1 Struktur und Biosynthese	11
2.2.2 Totalsynthesen von CoA (11).....	13
2.2.2.1 Chemische Synthese von CoA (11).....	13
2.2.2.2 Chemo-enzymatische Synthese von CoA (11).....	14
2.3 Zielsetzung	16
3 Ergebnisse & Diskussion	21
3.1 Synthese von Phosphopantethein-Derivaten und Diphosphat-Bausteinen auf Basis von Diphenylphosphat	21
3.2 Synthese von Phosphopantethein-Derivaten und Diphosphat-Bausteinen auf Basis von Dimethylphosphat	26
3.3 Versuche zur Diphosphat-Substitutionsreaktion	33
3.3.1 Experimente in flüssiger Phase	34
3.3.2 Experimente an der Festphase	36
3.4 Diphosphat-Kupplung	40
3.5 Heterologe Produktion der Enzyme für die CP-Beladungsassays.....	43
3.6 CP-Beladungsassay mit CoA-Derivaten der ersten Generation	44
3.7 Synthese & CP-Beladungsassays der zweiten Generation an CoA-Derivaten	48
3.8 Synthese weiterer CoA-Derivate auf Basis der optimierten Struktur.....	54
3.9 Versuche zur Synthese von Phosphopantethein-Derivaten mit freier Thiol-Gruppe	58
3.10 Arbeiten zur Untersuchung der SalD-Reaktion	64
3.10.1 Synthese der für die SalD-Reaktion relevanten CoA-Derivate.....	66

3.10.2 Synthese der SNAC- und CoA-Substrate für die SalD-Reaktion	68
3.10.3 Heterologe Produktion der Enzyme für die SalD-Reaktion.....	70
3.10.4 Erste SalD-Hydroxylierungsassays	73
4 Zusammenfassung	77
5 Summary	83
6 Experimenteller Teil	88
6.1 Verwendete Apparaturen und Messgeräte	88
6.2 Vektoren & Organismen	90
6.3 Medien, Puffer & Zusätze	91
6.4 Mikro- und molekularbiologische Techniken.....	94
6.5 Proteinproduktion & Proteinreinigung	96
6.6 Enzym-Assays	101
6.7 Chromatographie	101
6.8 Allgemeine Synthesevorschriften	104
6.9 Synthesen.....	111
7 Literaturverzeichnis.....	242
8 Anhang	251
8.1 HPLC-MS-Spuren der durchgeführten CP-Beladungsassays.....	251
8.1.1 Keine Beladung im CP-Beladungsassay	251
8.1.2 Erfolgreiche Beladung im CP-Beladungsassay.....	252
8.2 Abkürzungsverzeichnis.....	261
8.3 Abbildungsverzeichnis	263
8.4 Schemataverzeichnis	265
8.5 Tabellenverzeichnis	267

1 Einleitung

„By applying the ideas of biochemistry, chemical science may solve the energy crisis, make industrial production infinitely more efficient, and provide mankind with wings.” – so sah der russische Physikochemiker und Nobelpreisträger N. N. Semjonov im Jahr 1974 die Zukunft der Chemie.^[1,2] Obwohl seine Vision sehr utopisch formuliert war, trifft sie heute, mehr als vier Jahrzehnte später, in ihrer Kernaussage doch den Trend der Zeit, denn es wird immer mehr versucht biochemische Ideen und Prinzipien in die Chemie zu integrieren. Die Entwicklung wichtiger molekularbiologischer Methoden, rekombinanter DNA-Technologien und Protein-Engineerig-Techniken führte seit dem Ende des 20. Jahrhunderts zu einem tieferen und umfassenderen Verständnis der Biosynthesewege von komplexen Naturstoffen und erlaubte es somit die chemische Synthese durch biochemische Ideen und Methoden zu ergänzen. So hat in den letzten Jahren zum Beispiel der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren zur Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen aber auch zur chemo- und regioselektiven Reaktionsführung in der organischen Synthese an Bedeutung gewonnen. Die hohe Selektivität und Effizienz der enzymatischen Umwandlungen in Kombination mit milden Reaktionsbedingungen und der damit oftmals besseren Umweltverträglichkeit macht die Biokatalyse auch für die Industrie attraktiv. Zunehmend werden biokatalytische Reaktionen auch in industrielle Prozesse integriert.^[2–7] Enzymatische Racematspaltungen sind schon seit Längerem in der Industrie etabliert, wobei hier häufig Lipasen Verwendung finden. Ein Beispiel ist der von *Pfizer* entwickelte Prozess zur Verseifung von **1** zu einer Vorstufe **2** des Antikonvulsivums Pregabalin (s. Schema 1.A), wobei das entsprechend andere Enantiomer **3** durch die in diesem Prozess eingesetzte Lipase nicht umgesetzt wird.^[3,8,9] Transaminasen bilden eine weitere Enzymklasse, die oft in der Industrie eingesetzt wird. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel hierfür ist der von *Codexis* und *Merck* entwickelte biokatalytische Prozess zur Synthese des Antidiabetikums Sitagliptin (**5**) ausgehend von Keton **4** (s. Schema 1.B).^[10,11] Im Vergleich zur herkömmlichen chemo-katalytischen Synthese basierend auf einem Rhodium-Katalysator lieferte die neuentwickelte biokatalytische Route nicht nur eine um 13 % höhere Ausbeute und einen höheren Enantiomeren-Überschuss, sondern zudem auch eine um 53 % erhöhte Produktivität.^[3,12] Ein drittes Beispiel zum industriellen Einsatz von Enzymen sind Ketoreduktasen, die beispielsweise von *Codexis* in Kombination mit einem Cofaktor-Regenerierungssystem zur Synthese der Vorstufe des Cholesterol-senkenden Arzneistoffs Atorvastatin eingesetzt werden. Hierbei katalysiert eine Ketoreduktase die stereoselektive Reduktion von β -Ketoester **6** zu **7** (s. Schema 1.C).^[13,14] Neben den erwähnten Beispielen existiert jedoch eine breite Palette an chemischen Reaktionen, für die eine

biokatalytische Reaktionsführung von Interesse wäre. Hierzu gehören neben der selektiven aromatischen Halogenierung auch die stereo- und regioselektiven *C-C*-, *C-N*- und *C-O*-Bindungsknüpfungen,^[7] die über die klassische organische Synthese häufig nur über mehrere Stufen unter Einsatz von Schutzgruppen-Strategien und Metallkatalysatoren zugänglich sind und oft nicht zufriedenstellende Ausbeuten liefern.



Schema 1. Beispiele für industrielle enzymatische Prozesse.^[3] **A.** Racematspaltung mit Hilfe von Lipasen zur Synthese einer Vorstufe **2** von Pregabalin (Pfizer, 2006). **B.** Einsatz einer Transaminase mit dem zugehörigen Cofaktor Pyridoxalphosphat (PLP) zur Synthese des Antidiabetikums Sitagliptin (**5**) (Codexis, Merck, 2010). **C.** Synthese einer Vorstufe **7** von Atorvastatin mit Hilfe einer Ketoreduktase (KRED) in Kombination mit einem Cofaktor-Regenerierungssystem basierend auf dem Enzym Glucosedehydrogenase (GDH) (Codexis, 2006).

Ein interessantes Feld zur Identifizierung potentieller Biokatalysatoren stellt die Naturstoffklasse der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide (NRP) dar, die durch ihre strukturelle Vielfalt gekennzeichnet ist. Die strukturelle Diversität dieser Naturstoffklasse beruht auf deren besonderem Biosyntheseweg, der neben der Kupplung einzelner Aminosäuren zu Peptiden auch zusätzliche Modifizierungen der Aminosäuren sowie Zyklisierungsreaktionen zwischen einzelnen Bausteinen beinhaltet.^[15–19]

Zu den für die Biokatalyse besonders interessanten Reaktionen gehören hierbei Biaryl- bzw. Biaryletherkupplungen, die stereoselektive β -Hydroxylierung von L-Aminosäuren sowie die regioselektive Halogenierung aromatischer Aminosäuren. Die resultierenden Struktur motive finden sich zum Beispiel alle in dem nicht-ribosomal produzierten Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin (**8**), das in Abbildung 1 zu sehen ist.

Soll das Potential der Biosynthese-Enzyme nicht-ribosomal synthetisierter Peptide in der Biokatalyse genutzt werden, müssen zunächst die grundlegenden Mechanismen der Biosynthese dieser Moleküle gut untersucht und verstanden sein.

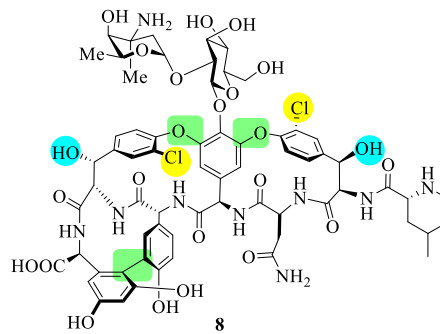


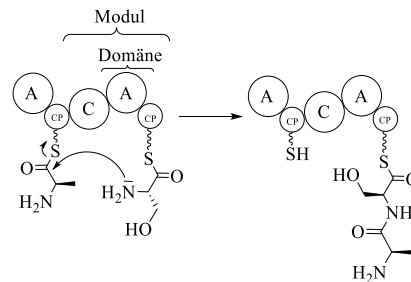
Abbildung 1. Struktur des nicht-ribosomal produzierten Glycopeptid-Antibiotikums Vancomycin (**8**). Interessante Strukturmodule für die Biokatalyse sind Biaryl-/ Biaryletherbindungen (grün), β -Hydroxylgruppen von Aminosäuren (türkis), regioselektiv halogenierte aromatische Aminosäuren (gelb).

1.1 Nicht-ribosomal synthetisierte Peptide und deren Biosynthese

Nicht-ribosomal synthetisierte Peptide werden von Organismen, hauptsächlich Bakterien und Pilzen, als Sekundärmetabolite produziert. Sekundärmetabolite sind im Gegensatz zu Primärmetaboliten Substanzen, die für das Überleben und das Wachstum eines Lebewesens nicht essentiell sind. Vielmehr dienen sie den Produzenten oftmals als chemische Abwehr- oder Signalstoffe^[20,21] und weisen daher oft interessante biologische Aktivitäten auf, wodurch sie auch als potentielle Wirkstoffe oder Leitstrukturen für Wirkstoffe in der Pharmaforschung auf großes Interesse stoßen. Das bereits in Abbildung 1 vorgestellte Vancomycin (**8**), zum Beispiel, zeigt sehr gute Wirksamkeit gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, weswegen es lange Zeit als Reserveantibiotikum eingesetzt wurde.^[22] Eine weitere Besonderheit der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide stellt ihre strukturelle Vielfalt dar, die auf den besonderen Biosyntheseweg dieser Naturstoffklasse zurückzuführen ist.

Die Biosynthese erfolgt an großen multifunktionalen Enzymkomplexen, den nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS).^[15–19] Diese Enzymsysteme können iterativ oder linear aufgebaut sein. Bei einer iterativen Syntheseroute werden die einzelnen katalytischen Zentren während des Produktaufbaus mehrmals durchlaufen. Im Gegensatz dazu bietet die lineare Syntheseroute für jeden einzelnen Biosyntheseschritt ein spezielles katalytisches Zentrum, das während der Biosynthese nur einmal durchlaufen wird.^[15,23] Im Rahmen dieser Arbeit sollen die linear aufgebauten Systeme im Mittelpunkt stehen. Diese Multienzymkomplexe sind nach einem modularen Prinzip aufgebaut, wobei jedes Modul für die selektive Erkennung und Aktivierung einer Elongationseinheit verantwortlich ist. Somit entsteht ein kollinearer Zusammenhang zwischen der Modulabfolge und der Abfolge der einzelnen Bausteine im NRPS-Produkt. Die einzelnen Module sind außerdem in Domänen unterteilt, die die katalytischen Zentren der einzelnen Biosyntheseschritte darstellen (vgl. Schema 2). Um die

elementaren Biosyntheseschritte katalysieren zu können, muss jedes Modul einen minimalen Satz an Domänen aufweisen. Hierzu gehört die Adenylierungsdomäne (A), die den Enzymkomplex mit Starter- oder Elongationseinheiten belädt, die Kondensationsdomäne (C), die für die Bindungsknüpfung zwischen den einzelnen Elongationseinheiten verantwortlich ist, und das Carrier-Protein (CP), an deren aktive *holo*-Form alle Elongationseinheiten und Intermediate kovalent über eine Thioester-Bindung gebunden sind.

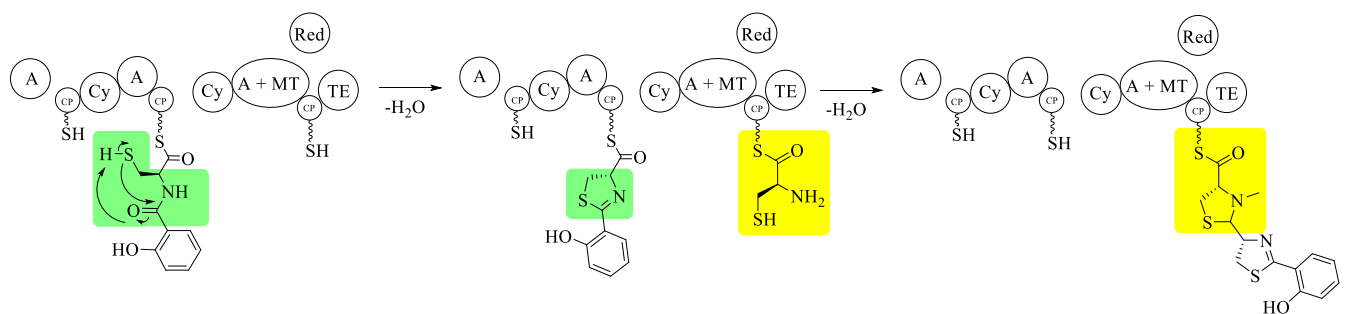


Schema 2. Schematische Darstellung eines NRPS-Moduls, das einen minimalen Satz an Domänen enthält. Die Kondensationsdomäne (C) ist für die Bindungsknüpfung zuständig. Die Peptidbindung wird in diesem Beispiel zwischen der Startereinheit D-Alanin und der Elongationseinheit L-Serin geknüpft. Die Adenylierungsdomäne (A) ist für die Beladung des Enzymkomplexes mit einzelnen Bausteinen und deren Transfer auf die Carrier-Proteine (CP) verantwortlich.^[24]

Als Starter- und Elongationseinheiten dienen neben den aus dem Primärmetabolismus stammenden proteinogenen Aminosäuren bis zu ca. 500 nicht-proteinogene Aminosäuren, die außerdem durch NRPS-Enzyme weiter modifiziert werden können, wodurch sich das enorme strukturelle Reichtum der NRPS-Produkte ergibt.^[19,25,26]

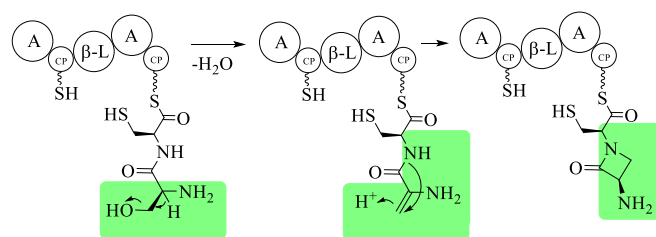
Eine der Modifikationsmöglichkeiten von Aminosäuren kann mit Hilfe von Epimerisierungs-Domänen (E) umgesetzt werden. Hierbei werden an ein Carrier-Protein gebundene proteinogene L-Aminosäuren in D-Aminosäuren konvertiert. Weiterhin können S-Adenosylmethionin (SAM) abhängige Methyltransferase-Domänen (MT) Methylierungen in die Elongationsbausteine einführen. Am häufigsten finden dabei N-Methylierungen statt, doch es existieren auch Beispiele für O-, S-, und sogar C-Methylierungen.^[15] In der Regel sind die Methyltransferasen ein Bestandteil des linear-modularen Enzymsystems, wo sie entweder als separate Domänen auftauchen oder in andere Domänen, wie z. B. die Adenylierungsdomäne, integriert sind (vgl. Beispiel in Schema 3). Vor allem die O-, S- und C-Methylierungen finden aber auch oftmals an allein-stehenden NRPS-Modulen statt, die dann *in trans* die modifizierte Aminosäure auf die jeweilige Domäne innerhalb des linearen Enzymsystems übertragen.^[15,27] Ein anderes Beispiel der Modifikation stellen Zyklisierungs-Domänen (Cy) dar, die, wie in Schema 3 gezeigt, unter Dehydratisierung die Bildung von Heterozyklen ausgehend von Serin-, Threonin- oder Cystein-Einheiten katalysieren.^[15,24,28] Die so gebildeten Heterozyklen können im Anschluss mit Hilfe von Flavoprotein-abhängigen

Oxidasen (Ox) in einem zwei-Elektronen-Oxidations-Prozess oxidiert werden, sodass entsprechend Oxazole bzw. Thiazole als Produkte erhalten werden. Die entsprechend andere Option ist die Reduktion der Heterozyklen, die durch allein-stehende NADPH-abhängige Reduktasen (Red), die *in trans* agieren, vollzogen wird, und entsprechend Oxazolidine bzw. Thiazolidine als Produkte ergibt. Ein eindrucksvolles Beispiel für die bereits vorgestellten Modifizierungsenzyme bietet die in Schema 3 gezeigte NRPS-Maschinerie von Pyochelin.^[27,29,30] Die Startereinheit dieser NRPS ist die Salicylsäure, die mit L-Cystein verknüpft wird. Die für die Bindungsknüpfung verantwortliche Kondensationsdomäne (Cy) ist in diesem Fall auch für die anschließende Zyklisierung der Cystein-Einheit zum Thiazol und deren Epimerisierung verantwortlich. Diese Reaktionen werden auch von der zweiten Kondensationsdomäne (Cy) vollführt. Zusätzlich wird der zweite Thiazol-Ring jedoch noch durch eine separat stehende Reduktase (Red) zum Thiazolidin reduziert und der Ring im Anschluss durch eine in die Adenylierungsdomäne (A+MT) integrierte Methyltransferase N-methyliert.



Schema 3. NRPS des Siderophors Pyochelin. Die NRPS beinhaltet zwei interessante Kondensationsdomänen (Cy), die nicht nur die Bindungsknüpfung zwischen den einzelnen Bausteinen katalysieren, sondern auch für die Epimerisierung und Zyklisierung der L-Cystein-Bausteine verantwortlich sind. Die erste eingeführte Cystein-Einheit (grün) wird dabei nur zum Thiazol zyklisiert. Die zweite Cystein-Einheit (gelb) wird zusätzlich durch eine *in trans*-wirkende Reduktase (Red) zum Thiazolidin reduziert und durch eine Methyltransferase (A+MT) N-methyliert.

Desweiteren können die Aminosäuren zusätzlich durch die Einführung von Sauerstoff- oder Halogenatomen modifiziert werden, was durch Cofaktoren-abhängige Oxidasen (Ox) bzw. Halogenasen vollzogen wird.^[15,23] Erwähnenswert ist außerdem die Bildung der β -Lactam-Struktur, die ein charakteristisches Merkmal der β -Lactam-Antibiotika ist, zu denen unter anderem auch Penicillin gehört. Der postulierte Mechanismus hierfür ist in Schema 4 gezeigt und geht von einer Dehydratisierung von Serin zu Dehydroalanin aus, an welches im Anschluss unter Inversion der Konfiguration ein Amin addieren kann, um so das β -Lactam-Gerüst aufzubauen.^[31]

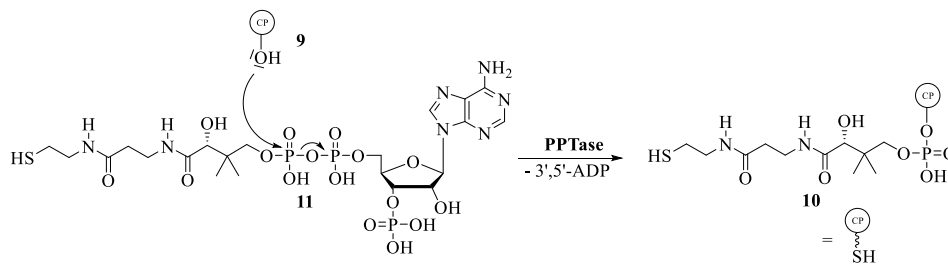


Schema 4. Postulierter Mechanismus zur Bildung der β -Lactam-Struktur. Die Kondensationsdomäne (β -L) katalysiert nach der Bindungsknüpfung die Dehydratisierung von Serin zu Dehydroalanin und im Anschluss die Amin-Addition an die neugebildete Doppelbindung und somit den Aufbau der β -Lactam-Struktur (grün).

Die Freisetzung des fertigen Peptidprodukts erfolgt durch Hydrolyse bzw. Macrolactonisierung oder Macrolactamisierung, die durch eine Thioesterase-Domäne (TE) katalysiert werden. Alternativ kann es in seltenen Fällen auch zu einer reduktiven Abspaltung vom Enzymkomplex kommen. Diese Reaktion wird durch eine NAD(P)H abhängige Reduktasedomäne (R) vermittelt und führt zum Aldehyd, der durch eine *in trans* agierende Reduktase zum Alkohol reduziert werden kann, oder mit der endständigen Aminogruppe zu einem makrozyklischen Imin reagiert.^[15]

Schließlich kann das Primärprodukt der Multienzymsynthese durch *post*-NRPS-Tailoring-Enzyme, die z. B. Glykosylierungen, Alkylierungen, Halogenierungen, Reduktionen oder Oxidationen katalysieren können,^[32] zum eigentlichen Naturstoff vervollständigt werden. Es lassen sich zwei Arten von *post*-Synthase-Tailoring-Enzymen unterscheiden: für einige Enzyme ist die Bindung der Substrate an CPs nicht mehr erforderlich, andere *post*-Synthase-Tailoring-Enzyme modifizieren das Substrat jedoch während es noch über ein CP an den Enzymkomplex gebunden ist. Beide Arten von Enzymen finden sich in der NRPS des bereits vorgestellten Glycopeptid-Antibiotikums Vancomycin (**8**, Abbildung 1). Cytochrom P450 Oxidasen (Cyp) vernetzen die Peptidkette oxidativ durch Biarylbindungen und Aryl-Ether-Bindungen (grün markiert in Abbildung 1) zwischen den Seitenketten der beteiligten Aminosäuren während das NRPS-Produkt noch an ein CP des Enzymkomplexes gebunden ist.^[24,28] Die Glykosylierung des Peptidgerüsts findet jedoch bereits am freien Primärprodukt statt.

Im Gegensatz zu den *post*-Synthase-Tailoring-Enzymen können nahezu alle Domänen der Multienzymkomplexe nur Substrate umsetzen, die an CPs über Thioesterbindungen gebunden sind. Diese Thioesterbindung zwischen Substrat und CP kann jedoch nur ausgebildet werden, wenn die CPs aus ihrer inaktiven *apo*-Form **9** in die aktive *holo*-Form **10** überführt werden.^[24,25,33] Dies geschieht durch sogenannte Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen),^[34] die den Transfer einer Phosphopantetheinyl-Gruppe vom Coenzym A (**11**, CoA) auf die Hydroxyl-Funktion einer Serinkette in der katalytisch aktiven Stelle der CPs katalysieren (vgl. Schema 5).



Schema 5. Aktivierung der Carrier-Proteine (CP) aus ihrer *apo*-Form **9** in ihre *holo*-Form **10** durch das Enzym Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase).

Die terminale Thiol-Funktion der so *post*-translational in die CP-Domäne eingeführten Phosphopantetheinyl-Gruppe ist dabei von besonderer Bedeutung, denn sie erlaubt die kovalente Bindung der Intermediate an den Enzymkomplex über Thioesterbindungen. Auf diese Weise können die Substrate und Intermediate konkurrierenden zellulären Prozessen entzogen werden und Interaktionen zwischen Solvens und Intermediaten umgangen werden.^[35] Gleichzeitig werden die Carboxy-Substrate auf diese Weise zu guten Acylierungsmitteln, die für nukleophile Substitutionsreaktionen aktiviert sind, was die Peptidbindungsknüpfungen begünstigt. Der flexible, 20 Å lange Phosphopantetheinyl-Arm ermöglicht zusätzlich den Transport der als Thioester gebundenen Intermediate von einem Reaktionszentrum zum nächsten und sorgt somit für einen schnellen und effizienten Substrat-Umsatz.^[35,36] Die Aktivierung der CPs durch das Enzym PPTase ist daher essentiell für die Aktivität der Multienzymkomplexe. Die PPTasen spielen somit eine bedeutende Rolle für die Funktionalität der NRPS-Systeme.

Bemerkenswert ist außerdem, dass die Naturstoffklasse der Polyketide ebenfalls an modular zusammengesetzten Multienzymkomplexen, den Polyketidsynthetasen (PKS), aufgebaut wird. Die Biosynthese der Polyketide funktioniert somit nach einem ähnlichen Mechanismus wie die Biosynthese der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide und erfordert daher auch die kovalente Bindung der Substrate und Intermediate an CPs. Auch in den PKS-Systemen müssen die CPs vorher mit Hilfe von PPTasen aktiviert werden. Die bedeutende Rolle der PPTasen erstreckt sich somit auch auf die Naturstoffklasse der Polyketide.

2 Hintergrund und Zielsetzung

2.1 Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen)

Phosphopantetheinyl-Transferasen bilden eine eigene Enzymfamilie, die sich gemäß der Homologien in ihren Sequenzen in folgende drei Klassen unterteilen lässt:^[36,37]

- 1.) AcpS-Typ-PPTasen sind nach der ersten bekannten PPTase benannt, die von J. Elovson und P. R. Vagelos aus *E. coli* isoliert wurde^[38] und den prokaryotischen Fettsäuresynthasen (FAS) zugeordnet werden kann. Diese PPTasen sind aus ca. 120 Aminosäuren zusammengesetzt und weisen eine *homo*-trimere Struktur auf. Sie dienen ausschließlich der Aktivierung von CPs von FAS im primären Metabolismus fast aller Mikroorganismen.
- 2.) PPTasen, die als Domänen in den Multienzymkomplex integriert sind, stellen die zweite Klasse der PPTasen dar. Diese PPTasen umfassen ebenfalls ca. 120 Aminosäuren und sind für die Aktivierung von CPs der eukaryotischen FAS verantwortlich.^[39]
- 3.) Sfp-Typ-PPTasen sind nach der Sfp-PPTase aus *B. subtilis* benannt, die CPs einer NRPS aktiviert, die für die Produktion des Peptidantibiotikums Surfactin verantwortlich ist.^[40] Diese Enzyme bestehen aus ca. 240 Aminosäuren und treten hauptsächlich in Assoziation mit NRPS auf. Die Besonderheit der Sfp-PPTase besteht in ihrem großen Substratspektrum: es konnte gezeigt werden, dass die Sfp-PPTase neben dem natürlichen *apo*-CP auch *apo*-CPs anderer NRPS sowie *apo*-CPs aus Polyketidsynthasen (PKS) und FAS effizient aktivieren kann.^[41] Desweiteren ist die Sfp-PPTase in der Lage, nicht nur das natürliche Substrat CoA (**11**) umzusetzen, sondern auch analoge, im Phosphopantetheinyl-Arm modifizierte Strukturen, wie zum Beispiel Acetyl-CoA, Benzoyl-CoA, Desulfo-CoA, Homocysteamin-CoA oder Acetonyldethio-CoA.^[40]

Aufgrund ihres weiten CP- und Substratspektrums, ist die Sfp-PPTase von besonderem Interesse für Studien an PKS und NRPS, wo sie zur heterologen Co-Expression mit PKS- und NRPS-Genclustern eingesetzt wird, um auf diese Weise funktionierende Enzyme für *in vivo* oder *in vitro* Untersuchungen zu erhalten.^[37,40]

Zum besseren Verständnis der Funktion dieses Enzyms ist es K. Reuter *et al.* gelungen, die Kristallstruktur des Komplexes aus Sfp-PPTase und dessen Substrat Coenzym A (**11**) in einer Auflösung von 1.8 Å zu erhalten.^[42] Die 3D-Struktur dieses Komplexes, gezeigt in Abbildung

2, besteht aus zwei etwa gleich großen Hälften, die ähnliche Faltungsmotive aufweisen. Jede Hälfte wird durch ein drei-strängiges, antiparalleles β -Faltblatt dominiert, dessen zwei ersten Stränge vom dritten Strang durch eine Abfolge aus zwei kleinen β -Faltblättern, einer langen α -Helix, gefolgt von zwei kleineren α -Helices getrennt werden. An der Grenzfläche zwischen den beiden Hälften ist das aktive Zentrum des Enzyms lokalisiert, in dem Coenzym A (**11**) gebunden wird.

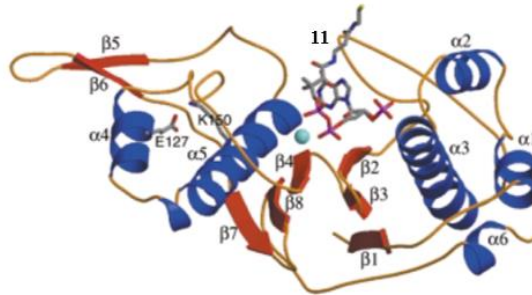


Abbildung 2. 3D-Struktur des Komplexes zwischen Sfp-PPTase und CoA (**11**). Charakteristische Elemente der Sekundärstruktur sind explizit gekennzeichnet: α -Helices (blau), β -Faltblätter (rot). CoA (**11**) ist als Stabmodell dargestellt. Das im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisierte Magnesium-Ion ist hellblau dargestellt.^[42]

In Abbildung 3 sind die wichtigen Wechselwirkungen der Aminosäure-Reste im katalytischen Zentrum der PPTase mit dem Substrat CoA (**11**) schematisch dargestellt. Das CoA-Molekül nimmt dabei eine gewinkelte Konformation in der Bindungstasche der PPTase ein, wobei der Pantetheinrest aus der Enzymtasche herausragt und keine Wechselwirkungen mit der PPTase zeigt. Somit kann die Thiol-Einheit des CoA (**11**) modifiziert werden, ohne die katalytische Aktivität der PPTase zu beeinflussen, was bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte.^[40] Auch der Adenosin-Rest interagiert nur über schwache Van-der-Waals-Wechselwirkungen und zwei Wasserstoffbrücken mit der PPTase. Zu den stärksten Wechselwirkungen gehören ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäure-Resten der PPTase und den Phosphatgruppen des Coenzym A (**11**). Beide Phosphatgruppen der Pyrophosphatereinheit des CoA-Moleküls (**11**) dienen dabei als Liganden für die Komplexierung eines Magnesium(II)-Ions, das für die katalytische Aktivität von PPTasen essentiell ist.^[38,39,43,44] Auch die 3'-Phosphatgruppe am Zuckergerüst interagiert ebenfalls über starke Wechselwirkungen (zwei Wasserstoffbrücken und zwei ionische Wechselwirkungen) mit der PPTase und ist aus diesem Grund auch essentiell für die Funktion der PPTase. Die bereits bei der Charakterisierung der Sfp-PPTase durchgeführten Studien mit 3'-Dephospho-CoA als Substrat der Sfp-PPTase belegen ebenfalls die Notwendigkeit dieser Phosphatgruppe für den enzymatischen Umsatz.^[40] Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, komplexiert das Magnesium(II)-Ion im katalytischen Zentrum der Sfp-PPTase außerdem noch ein Wasser-Molekül. Reuter *et al.* vermuteten, dass dieses Wasser-Molekül während der Katalysereaktion durch die

Hydroxyl-Gruppe einer Serinkette des CPs ersetzt wird, die dann in der Lage ist mit dem β -Phosphat der Pyrophosphateinheit nukleophil zu reagieren.^[42] Mofid *et al.* postulierten jedoch, dass die Serinkette eines CPs zwischen Glutamat E151 (s. Abbildung 3), dem Magnesium(II)-Ion und der Pyrophosphateinheit lokalisiert ist, sodass die Hydroxyl-Gruppe der Serinkette zunächst durch Glutamat deprotoniert wird, um anschließend nukleophil mit dem β -Phosphat der Pyrophosphateinheit zu reagieren.^[39]

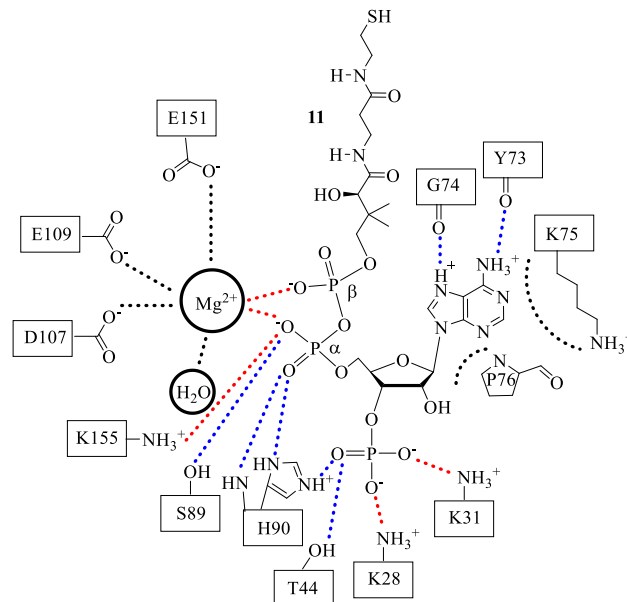


Abbildung 3. Das Katalysezentrum der Sfp-PPTase bei Anwesenheit von Coenzym A (**11**).^[42] Die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäure-Resten der PPTase und des Coenzym A (**11**) sind farblich markiert: Ionische Wechselwirkungen (rot), Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (blau), Van-der-Waals-Wechselwirkungen (schwarz).

Zum besseren Verständnis des Reaktionsmechanismus und der Wechselwirkungen zwischen PPTase und CP konnten P. Tufar *et al.* eine Kristallstruktur eines Komplexes bestehend aus der Sfp-PPTase, CoA (**11**) und CP in einer Auflösung von 2 Å erhalten. Es wurde dabei die dritte CP-Domäne aus der Tyrocidin-A-Synthetase verwendet, deren Serin aus dem aktiven Zentrum durch ein Alanin ersetzt wurde, um so den Transfer der Phosphopantethein-Einheit auf das CP zu verhindern und eine Co-Kristallisation mit CoA (**11**) und Sfp zu ermöglichen.^[45] In diesen Studien konnten die von Reuter *et al.* gefundenen Struktur motive größtenteils bestätigt werden. Im Gegensatz zu Reuter *et al.* wurde in der neuen Kristallstruktur jedoch eine um ca. 5 Å geweitete Sfp-Bindungstasche beobachtet, was die Bindung des CPs über hydrophobe Wechselwirkungen und eine Wasserstoffbrücke erlaubt. Zusätzlich wurde eine andere Koordinationssphäre für das Magnesium(II)-Ion gefunden, in dem die Stelle des Glutamats E109 ein zweites Wassermolekül einnimmt (vgl. Abbildung 3 und Abbildung 4, in der die Wassermoleküle als rote Kugeln und das Magnesium(II)-Ion als gelbe Kugel dargestellt sind). *In-silico*-Modellierungsstudien der aktiven Serin-Gruppe des CPs in der neuen

Kristallstruktur ergaben eine Lokalisation dieser Serin-Gruppe in der Nähe des Glutamats E151, was den von Mofid *et al.* postulierten Reaktionsmechanismus für den Phosphopantetheinyl-Transfer unterstützen würde.^[39,45]

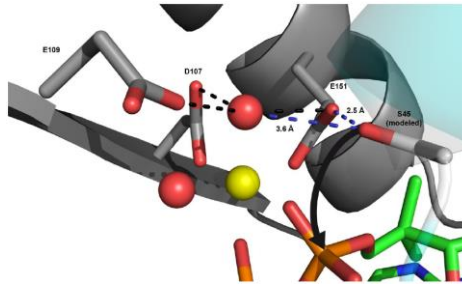


Abbildung 4. *In-silico*-Modellierungsstudien der aktiven Serin-Gruppe (S45) des CPs. Die Lage des modellierten Serins (S45), in der Nähe des Glutamats (E151) aus der Bindungstasche der Sfp-PPtase, lässt vermuten, dass die Hydroxyl-Gruppe des Serins (S45) durch das Glutamat (E151) deprotoniert wird (blaue Linien), um nukleophil mit dem β -Phosphat der Pyrophosphateinheit (orange-rotes Stabmodell) zu reagieren (schwarzer Pfeil).^[45] Das Glutamat (E151) bildet zusammen mit zwei Wassermolekülen (rote Kugeln) und weiteren Aminosäuren aus der Bindungstasche des Sfp einen Komplex mit einem Magnesium(II)-Ion (gelbe Kugel).

2.2 Coenzym A (11)

2.2.1 Struktur und Biosynthese

Das Coenzym A (**11**) ist ein in der Natur häufig vorkommender Cofaktor, der unter anderem eine zentrale Rolle im Energie- und Fettsäurestoffwechsel einnimmt, da er als universeller Träger für Acylgruppen dient.^[37] Wichtige Beispiele hierfür sind die Fettsäure-Biosynthese, die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat, die die Glykolyse mit dem Citratzyklus verbindet, und die Biosynthese von Sekundärmetaboliten an PKS und NRPS. Zum ersten Mal wurde Coenzym A (**11**) als neuer, Acetyl-übertragender Cofaktor im Jahr 1945 bei Untersuchungen von Acetylierungsreaktionen an Leber- und Gehirnpräparaten beobachtet.^[46,47] In den 50er Jahren konnte der neue Cofaktor, der Coenzym A (**11**) genannt wurde, in relativ reiner Form isoliert und die chemische Zusammensetzung bestimmt werden.^[48–53] Wichtige Arbeiten zur Strukturaufklärung wurden dabei von J. Baddiley und E. M. Thain durchgeführt, die grundlegende Synthesewege zu Phosphopantethein (**12**) und 3',5'-Adenosyl-Diphosphat (**13**) etablierten.^[48,54–56] Die synthetisch hergestellten Bausteine erlaubten einen Vergleich mit den Hydrolyseprodukten des CoA (**11**) und somit einen Rückschluss auf die chemische Zusammensetzung des Moleküls.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, setzt sich CoA (**11**) aus Phosphopantethein (**12**) und 3',5'-Adenosyl-Diphosphat (**13**) zusammen, die über eine Pyrophosphatbindung verbunden

sind. Phosphopantethein (**12**) besteht aus drei Einheiten, die über zwei Peptidbindungen wie folgt miteinander verknüpft sind: Cysteamin (**14**), β -Alanin (**15**), Phosphopantoinsäure (**16**).

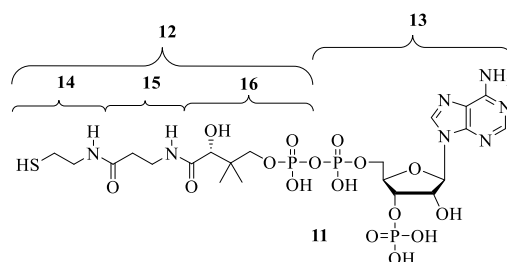
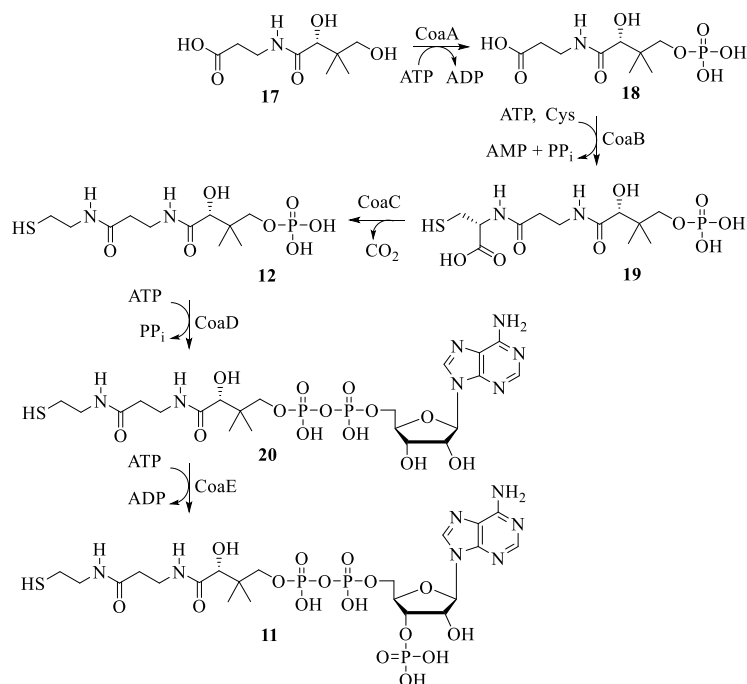


Abbildung 5. Struktur des Coenzym A (**11**): Cysteamin (**14**), β -Alanin (**15**), Phosphopantoinsäure (**16**) sind über zwei Peptidbindungen zu Phosphopantethein (**12**) verbunden, das mit 3',5'-Adenosyl-Diphosphat (**13**) über eine Phosphorsäure-Anhydrid-Bindung zum Coenzym A (**11**) verknüpft ist.

Parallel zur Strukturaufklärung wurden auch einige an der Biosynthese von CoA (**11**) beteiligten Enzyme von G. M. Brown gefunden.^[57] Mittlerweile ist der Biosyntheseweg des CoA (**11**) komplett aufgeklärt und erfolgt in allen Organismen ausgehend von Pantothenat (Vitamin B, **17**), das durch fünf Enzyme zum CoA (**11**) umgesetzt wird. Bakterien sind dabei im Gegensatz zu Eukaryoten in der Lage, das Pantothenat (**17**) aus Aspartat und α -Ketoisovaleriansäure herzustellen.^[58–62]



Schema 6. Biosynthese von CoA (**11**). Pantothenat (**17**) wird durch die drei Enzyme CoaA, CoaB und CoaC zu Phosphopantethein (**12**) umgesetzt. Die Enzyme CoaD und CoaE katalysieren dann eine Adenylierung und eine Phosphorylierung des Phosphopantetheins (**12**) zum CoA (**11**).

Wie in Schema 6 gezeigt, wird Pantothenat (**17**) durch das Enzym CoaA, das zu den Phosphokinasen gehört, ins Phosphopantothenat (**18**) umgewandelt, das im Anschluss durch das Enzym CoaB mit Cystein zu **19** gekuppelt wird. Eine Decarboxylierung der Cystein-

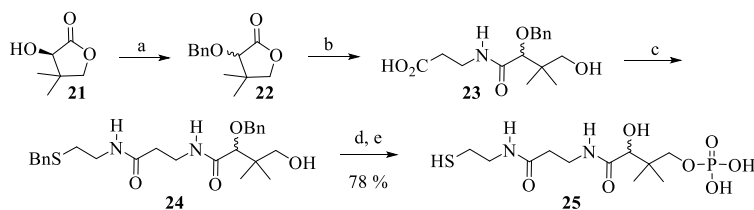
Einheit durch die Decarboxylase CoaC führt schließlich zum Phosphopantethein (**12**). Es folgen eine Adenylierung zu **20** und eine Phosphorylierung, katalysiert durch die Enzyme CoaD und CoaE, um so das CoA-Molekül (**11**) zu erhalten.

2.2.2 Totalsynthesen von CoA (**11**)

2.2.2.1 Chemische Synthese von CoA (**11**)

Die erste Totalsynthese von CoA (**11**) gelang J.G. Moffatt und H. G. Khorana im Jahr 1961. Als Grundlage für ihre Synthese dienten dabei die von J. Baddiley und E. M. Thain durchgeführten synthetischen Arbeiten zur Strukturaufklärung des CoAs (**11**).^[63]

Wie in Schema 7 gezeigt, ging die Synthese von D-Pantolacton (**21**) aus, dessen Hydroxylgruppe zunächst als Benzylether geschützt wurde. Das *O*-Benzylpantolacton (**22**) wurde dann durch Aminolyse mit β -Alanin (**15**) zu 2'-*O*-Benzylpantothensäure (**23**) geöffnet und mit *S*-Benzylcysteamin zu 2'-*O,S*-Dibenzylpantethein (**24**) gekuppelt. Die Phosphatgruppe wurde mit Hilfe des Reagenzes Dibenzylphosphorochloridat eingeführt und alle Benzylschutzgruppen in einer anschließenden Birch-Reduktion entfernt, sodass Pantethein-4'-phosphat (**25**) in racemischer Form mit einer Gesamtausbeute von 30 % erhalten werden konnte. Das enantiomerenreine D-Pantethein-4'-phosphat konnte nur durch direkte Phosphorylierung von D-Pantethin, dem Disulfid des D-Pantetheins, und anschließende Reduktion mit einer maximalen Gesamtausbeute von 40-44 % erhalten werden.



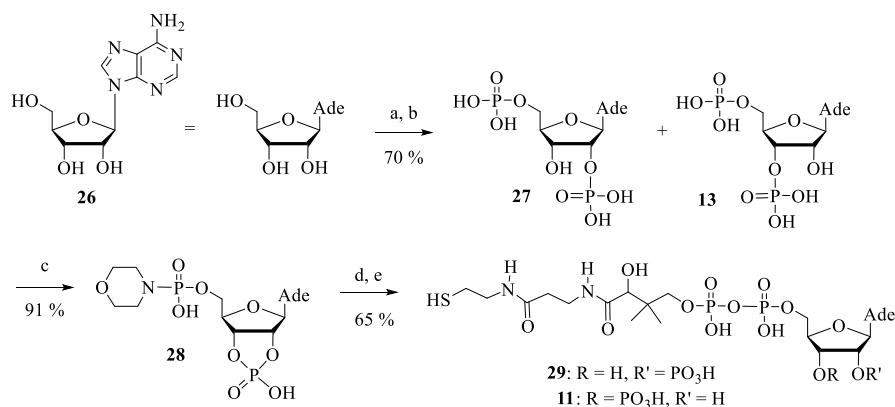
Schema 7. Darstellung des Pantethein-4'-phosphats (**25**) nach J. G. Moffatt und H. G. Khorana.^[63]

Reaktionsbedingungen: a) NaOEt, BnCl; b) β -Alanin, Me₂NH, MeOH, reflux, 4 h; c) Ethylchloroformat, *S*-Benzylcysteamin, 4-Methylmorpholin, DMF, 5 °C → RT, 12 h; d) Dibenzylphosphorochloridat, Pyridin, -20 °C, 24 h; e) Na, fl. NH₃, MeOH.

Das für die Knüpfung der Diphosphat-Einheit notwendige 3',5'-Adenosyl-Diphosphat (**13**) konnte ausgehend von Adenosin (**26**) dargestellt werden. Das Adenosin (**26**) wurde dabei zunächst mit Dibenzylphosphorochloridat phosphoryliert, wobei neben dem gewünschten Produkt **13** auch das Nebenprodukt 2',5'-Adenosyl-Diphosphat (**27**, vgl. Schema 8) entstand. Die entstandenen Produkte wurden nicht weiter aufgetrennt, sondern direkt für die Diphosphatknüpfung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Morpholin aktiviert. Das so

2 Hintergrund und Zielsetzung

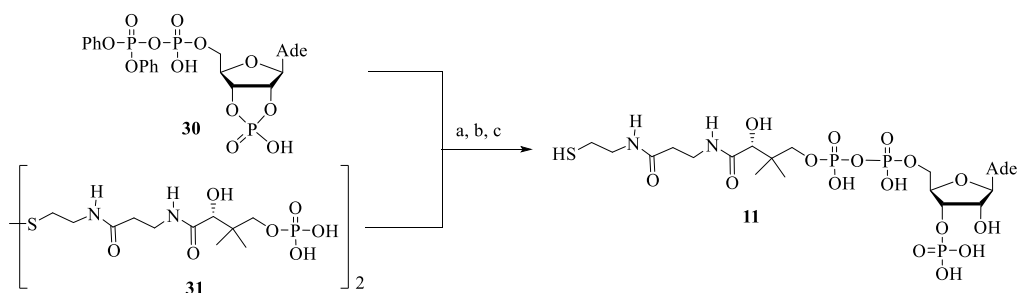
erhaltene Adenosin-2',3'-cyclophosphat-5'-phosphormorpholidat (**28**) wurde dann mit **25** in Pyridin bei Raumtemperatur 15 Stunden gerührt.



Schema 8. Darstellung des Coenzym A (**11**) nach J. G. Moffatt und H. G. Khorana.^[63]

Reaktionsbedingungen: a) Dibenzylphosphorochloridat, Pyridin, -20 °C, 24 h; b) H₂/ Pd; c) DCC, Morpholin, dH₂O, *t*-BuOH, reflux, 3 h; d) **25**, Pyridin, RT, 15 h; e) 0.1 N HCl.

Im Anschluss führte eine Hydrolyse der 2',3'-Cyclophosphat-Gruppe zum gewünschten Produkt **11** und dessen Isomer 2',5'-Phospho-CoA (**29**), die chromatographisch aufgetrennt werden konnten. Die Gesamtausbeute von CoA (**11**) und dessen Isomer **29**, die in einem 1:1 Verhältnis erhalten wurden, lag ausgehend von Adenosin bei 41 %. Die Ausbeute konnte kurz darauf durch A. M. Michelson verbessert werden.^[64,65] Es wurde dabei eine andere Methode für die Diphosphatknüpfung entwickelt, bei der ein Adenosin-2',3'-cyclophosphat-5'-diphenylpyrophosphat (**30**) mit einem Pantethin-4',4'-bisphosphat (**31**) umgesetzt wurde (vgl. Schema 9).



Schema 9. Diphosphatkupplung in der von Michelson entwickelten Totalsynthese von CoA (**11**).^[64,65]

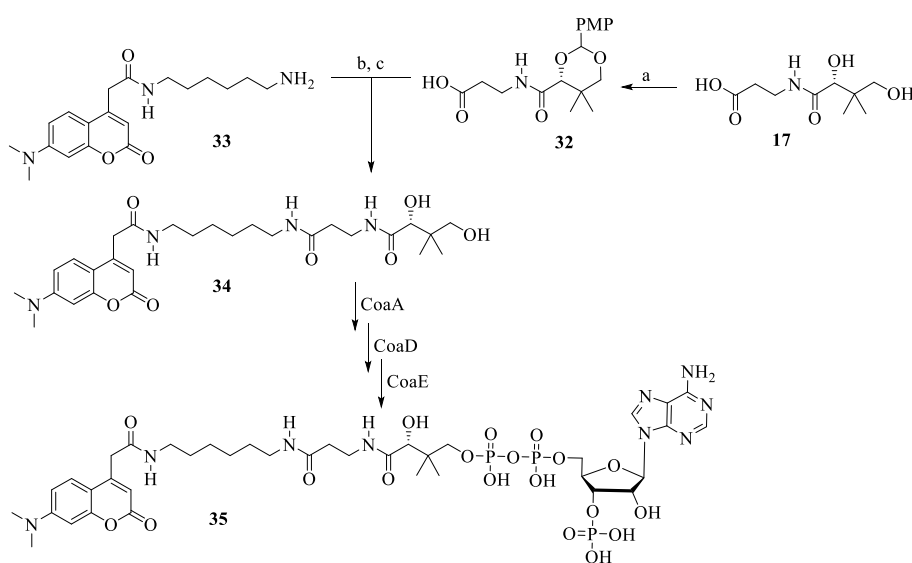
Reaktionsbedingungen: a) Pyridin, RT, 18 h; b) Ribonuclease T2, pH = 4.6, 37 °C, 2.5 h c) Mercaptoethanol, 37 °C, 1h → RT, 18 h.

2.2.2.2 Chemo-enzymatische Synthese von CoA (**11**)

Bereits seit Ende der 60er Jahre werden die Enzyme der CoA-Biosynthese (vgl. Schema 6) zur Synthese von CoA (**11**) und analogen Strukturen genutzt.^[66-72] Das Phosphopantethin (**12**) und dessen analoge Strukturen werden dabei zunächst chemisch aufgebaut und anschließend

die letzten beiden Enzyme der CoA-Biosynthese (CoaD und CoaE aus Schema 6) genutzt, um CoA (**11**) und entsprechende Derivate darzustellen. Zunächst wurden dabei für die enzymatische Synthese die Rohextrakte von Bakterienkulturen eingesetzt, doch wurde schnell dazu übergegangen, die Reaktionen mit aufgereinigten Enzymen durchzuführen und schließlich sogar versucht, durch Einführen einer Cellulose-bindenden Domäne in die entsprechenden Enzyme, diese auf Cellulose zu immobilisieren.^[68,69,72–74] In früheren Studien konnten auch schon erste Hinweise darauf gefunden werden, dass das erste Enzym der CoA-Biosynthese CoaA ein recht breites Substraterkennungsspektrum besitzt.^[75,76] Neben dem natürlichen Substrat Pantothenat (**17**), konnte das Enzym CoaA zum Beispiel auch Pantothenoylcystein, Pantethein und Pantethin phosphorylieren. E. Strauss und T. P. Begley konnten desweiteren in ihren Studien zur CoA-Biosynthese beobachten, dass auch das chemisch hergestellte Pantothen-Derivat *N*-Pentylpantothenamid ein Substrat des phosphorylierenden Enzyms CoaA im ersten Schritt der CoA-Biosynthese ist.^[77] Kurz darauf gelang es I. Nazi *et al.* die drei CoA-Biosynthese-Enzyme CoaA, CoaD und CoaE in aufgereinigter Form und in einem Reaktionsschritt („one-pot“) für den Aufbau von CoA (**11**) und CoA-analogen Strukturen einzusetzen.^[74]

Seitdem wird diese in Schema 10 gezeigte chemoenzymatische Route genutzt um CoA-analoge Strukturen mit einem modifizierten Pantethein-Gerüst und unterschiedlichen Gruppen am *S*-Terminus herzustellen.^[78–84] Beispielhaft ist in Schema 10 der Aufbau eines mit einem Fluoreszenz-Marker versehenen CoA-Derivats **35** gezeigt. Zur Synthese dieses Derivats wurden die Hydroxylgruppen der Pantothersäure (**17**) zunächst als *p*-Methoxybenzylacetal geschützt.



Schema 10. Beispiel einer chemoenzymatischen Synthese eines Derivats von **11**.^[82]

Reaktionsbedingungen: a) PMPCH(OMe)₂, CSA, CH₂Cl₂, RT, 18 h; b) EDC, HOBt, NEt₃, DMF, RT, 18 h
c) 1 M HCl, THF, RT, 2 h.

Das so erhaltene Acetal **32** wurde dann an das fluoreszierende Amin **33** gekuppelt, sodass nach saurer Abspaltung der Schutzgruppe Pantethein-Derivat **34** erhalten wurde. Dieses konnte im Anschluss mit Hilfe der drei CoA-Biosynthese-Enzyme CoaA, CoaD und CoaE zum CoA-Derivat **35** umgesetzt werden. Erwähnenswert ist auch, dass das hier als Beispiel gewählte CoA-Derivat **35** trotz der Modifikation am *S*-Terminus ebenfalls als effizientes Substrat in der PPTase-Reaktion (s. Schema 5) unter Einsatz der Sfp-PPTase eingesetzt wurde.

2.3 Zielsetzung

In den Kapiteln 1.1 und 2.1 ist bereits deutlich geworden, dass das Coenzym A (**11**) und die PPTasen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Carrier-Proteine von NRPS- und PKS-Megasyntasen spielen und somit auch essentiell für die Aktivität der Multienzymkomplexe sind. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den in der PPTase-Reaktion aktivierten Carrier-Proteinen zu, die während der Biosynthese nicht nur für die Bindungsknüpfung zwischen den einzelnen Baueinheiten durch Kondensationsdomänen wichtig sind, sondern auch für zahlreiche Tailoring-Enzyme, die nur dann in der Lage sind, die wachsende Peptidkette im Zuge der Biosynthese zu modifizieren, wenn diese an CPs gebunden ist. Somit sind die *holo*-Carrier-Proteine, insbesondere deren Phosphopantethein-Gruppe, nicht nur ein Substratanker für die einzelnen Bausteine der NRPS-Biosynthese, sondern bilden auch ein wichtiges Element in der Substraterkennung im Zusammenspiel aller an der NRP-Biosynthese beteiligten Enzyme. Aus diesem Grund ist besonders bei *In-vitro*-Untersuchungen der einzelnen Domänen oder Module, wie z. B. Untersuchungen auf Substratspezifität, der Einsatz von *holo*-CP-analogen Strukturen notwendig. Hierfür haben sich die folgenden drei Methoden etabliert:

- a.) Einsatz von stark vereinfachten Pantethein-Strukturen, wie z. B. *N*-Acetylcysteamin (SNAC)-Thioester **36** (vgl. Abbildung 6) als Substrate.

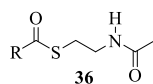


Abbildung 6. Struktur des SNAC-Thioesters **36**, das als stark vereinfachtes *holo*-CP-Analogon Verwendung findet.

- b.) Knüpfung der Substrate an Coenzym A (**11**) und Einsatz dieser Coenzym-A-Thioester als Substrate in den zu untersuchenden Enzymreaktionen. Zwar ist die Ähnlichkeit der Coenzym-A-Thioester zum natürlichen Substrat sehr viel stärker ausgeprägt als die der unter a.) erwähnten SNAC-Thioester, jedoch ist im Vergleich die Synthese der Coenzym-A-Thioester auch sehr viel komplexer und auf Grund der hohen Kosten des CoA (**11**) preisintensiver.

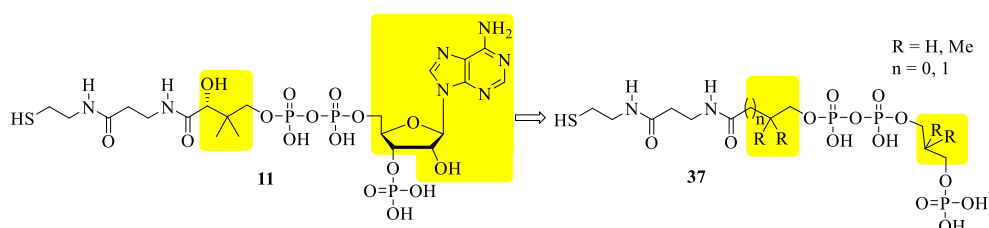
c.) Im Falle, dass die unter a.) und b.) beschriebenen CP-Mimetika nicht als Substrate von den zu untersuchenden Enzymen erkannt werden, müssen die unter b.) beschriebenen Coenzym-A-Thioester in der PPTase Reaktion, in der Regel unter Einsatz der PPTase Sfp, auf Carrier-Proteine der zu untersuchenden Enzymsysteme übertragen werden, um somit die mit dem gewünschten Substrat beladene *holo*-Carrier-Proteine zu erhalten. Doch auch diese Variante ist aufgrund der hohen Kosten des Coenzym A (**11**) sehr preisintensiv.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher vereinfachte Derivate des Coenzym A (**11**) synthetisiert werden, die sowohl von PPTasen erkannt, als auch durch Kupplung an ein Substrat als CP-Analoga eingesetzt werden können. Die Grundlage für die Strukturvereinfachung bilden die in Kapitel 2.1 vorgestellten Arbeiten von Reuter *et al.*, in denen die Kristallstruktur des Sfp-CoA-Komplexes aufgeklärt wurde. Die Strukturdaten zeigen, dass in erster Linie die Phosphatgruppen des CoA (**11**) für die Bindung in der katalytisch aktiven Stelle des Sfp verantwortlich sind. Sowohl die Diphosphatgruppe als auch die 3'-Phosphatgruppe weisen starke ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit den Aminosäure-Resten der Sfp-PPTase auf. Diese Struktur motive des CoA (**11**) sind somit essentiell für die Interaktion und den Umsatz mit der Sfp-PPTase. Dies konnte auch schon in früheren Sfp-Substrat-Studien gezeigt werden, in denen bei Einsatz von 3'-Diphospho-CoA in der PPTase-Reaktion kein Umsatz zu *holo*-CP zu beobachten war.^[40]

Im Gegensatz dazu zeigt der Pantethein-Rest in der Kristallstruktur keinerlei Wechselwirkungen mit Sfp, sodass Modifikationen an diesem Strukturelement denkbar sind. Aufgrund der Notwendigkeit ein *holo*-CP-Analogon für Substratspezifizität-Studien an NRP-Domänen einzusetzen, existieren bereits zahlreiche Beispiele für CoA-Derivate, in denen die terminale Thiol-Einheit an gewünschte Substrate, wie zum Beispiel Aminosäuren, Peptidketten oder andere Intermediate und Bausteine, gekuppelt ist. Desweiteren existieren auch Beispiele für Derivate, in denen die Cysteamin-Einheit modifiziert oder durch eine andere Gruppe ersetzt ist, wie zum Beispiel einen PEG-Linker, an den ein Fluorophor gekuppelt ist.^[74,81,82,85] Alle erwähnten CoA-Derivate konnten im Anschluss erfolgreich durch Sfp umgesetzt werden und führten zu einem entsprechend modifizierten *holo*-CP. Auch der Ersatz der β -Alanin-Einheit (**15**) durch ein Glycin führte zu keiner Einschränkung in der Sfp-Reaktion.^[83] Die beschriebenen modifizierten CoA-Strukturen wurden alle über die chemo-enzymatische Route aus Kapitel 2.2.2.2 dargestellt. Der chemo-enzymatische Syntheseweg erlaubt jedoch keine Modifizierungen in der Pantoinsäure-Einheit und der Nucleosid-Gruppe. Die Kristallstrukturdaten von Reuter *et al.* allerdings lassen vermuten, dass

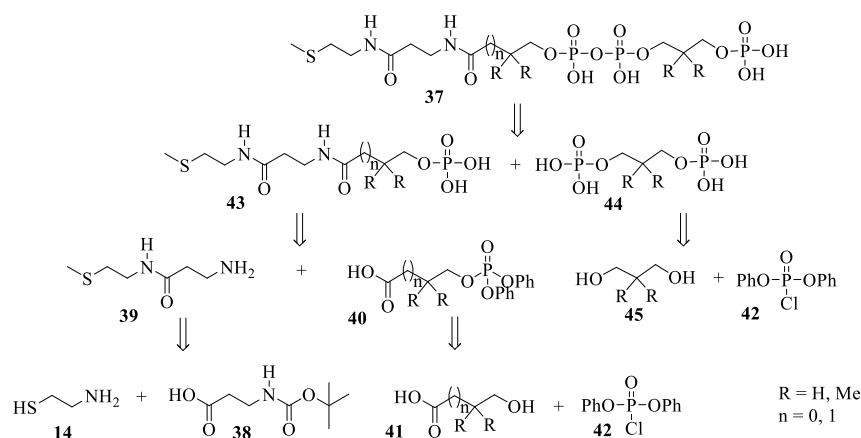
Modifikationen in der Nucleosid-Einheit keine bedeutenden Auswirkungen auf die Interaktion zwischen CoA (**11**) und Sfp haben werden, da die Nucleosid-Einheit nur über zwei Wasserstoffbrücken und schwache Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Sfp-Bindungstasche interagiert.

Somit soll der Fokus dieser Arbeit auf der Synthese vereinfachter CoA-Derivate mit Modifikationen in der Pantoinsäure und der Nucleosid-Gruppe liegen. Die so erhaltenen Strukturen sollen als Substrate in der PPTase-Reaktion eingesetzt werden und somit erstmalig ein systematisches Screening der PPTase-Substrattoleranz in Abhängigkeit von Modifikationen in der Pantoinsäure und der Nucleosid-Gruppe des CoA-Moeküls erlauben. Die Struktur des CoA-Moleküls **11** soll wie in Schema 11 gezeigt vereinfacht werden. Da die vereinfachten Derivate **37** keinen Zuckerrest, keine Nukleobase und keine Chiralitätszentren mehr aufweisen, besteht die Möglichkeit einer schnellen Synthese aus kommerziell erhältlichen Startmaterialien.



Schema 11. Die geplanten Vereinfachungen der CoA-Struktur (**11**) zur Verbindung des Typs **37**.

In Anlehnung an meine Masterarbeit, in der bereits erste synthetische Studien auf dem Weg zu vereinfachten CoA-Molekülen unternommen wurden,^[86] soll in dieser Arbeit die in Schema 12 gezeigte Retrosynthese-Strategie verfolgt werden. Zur Etablierung der Syntheseroute soll Cysteamin (**14**) zunächst an der Thiolfunktion durch eine Methylgruppe blockiert werden, um im Anschluss mit am *N*-Terminus geschützten β -Alanin (**38**) gekuppelt zu werden. Nach *N*-terminaler Entschützung soll das Dipeptid **39** erhalten werden, das in einer weiteren Peptidkupplungsreaktion mit C-3- bzw. C-4-phosphorylierten Carbonsäuren **40**, die auf mit **42** funktionalisierten 3- bzw. 4-Hydroxycarbonsäuren **41** zurückzuführen sind, umgesetzt wird. In einer anschließenden Hydrierung der Phenylgruppen am Phosphat soll das Phosphopantethein-Derivat **43** erhalten werden. Parallel wird Molekülteil **44** durch Phosphorylierung beider Hydroxyl-Funktionen von Propandiol bzw. dessen Derivat **45** mit dem Phosphatreagenz **42** und anschließende Hydrierung der Phenylgruppen dargestellt. Den Schlüsselschritt der Synthese bildet am Ende die Ausbildung der Phosphorsäureanhydrid-Bindung zwischen Phosphopantethein-Derivat **43** und Molekülteil **44**, um auf diese Weise vereinfachte CoA-Derivate **37** zu erhalten.



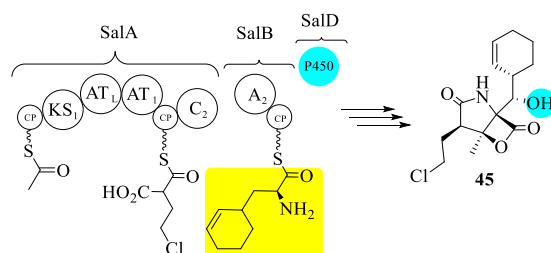
Schema 12. Retrosynthese-Strategie zur Darstellung vereinfachter CoA-Derivate **37**.

Nach Etablierung eines passenden Synthesewegs soll die komplette Synthese mit einer Thiol-Schutzgruppe durchgeführt werden, die am Ende der Synthese möglichst problemlos und unter sehr milden Bedingungen entfernt werden kann und somit die Anbindung unterschiedlichster Substrate an die Mimetika ermöglicht. Ein vielversprechender Ansatz hierfür konnte bereits in der Masterarbeit in der Synthese des Cysteamin-Disulfids gefunden werden.^[86] Der Einsatz des Cysteamin-Disulfids hätte den großen Vorteil einer Schutzgruppen-freien Synthese. Durch Reduktion der Disulfid-Brücke am Ende der Synthese wäre neben einer freien Thiolfunktion auch der Zugang zu gleich zwei Äquivalenten des CoA-Derivats möglich.

Alle synthetisierten Derivate sollen in Enzymassays als mögliche Substrate zur enzymatischen Übertragung von modifizierten Pantethein-Seitenketten an unterschiedliche, im Arbeitskreis bereits in Verwendung stehende CP-Domänen mittels Sfp getestet werden. Die hierfür notwendigen Enzyme (CPs, Sfp) sollen dabei heterolog in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch gereinigt werden.

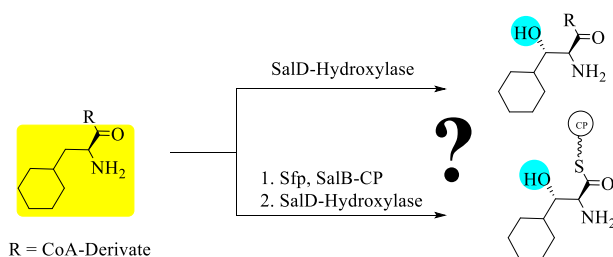
Auf diese Weise soll zum ersten Mal systematisch untersucht werden, inwieweit der Nucleosid-Teil der CoA-Struktur für die Substraterkennung durch die PPTase Sfp von Bedeutung ist. Sollten die synthetischen CoA-Derivate als Substrate von der Sfp-PPTase erkannt werden, können weitere Studien zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung zwischen CoA-Derivaten und Sfp durchgeführt werden und daraus Schlussfolgerungen auf mögliche weitere Strukturoptimierungen gezogen werden. Nach eingehender Optimierung der Substratstruktur soll das Potential der entwickelten Derivate bei der Untersuchung interessanter biokatalytischer Prozesse unter Beweis gestellt werden. Hierfür wurde die stereoselektive β -Hydroxylierung von L-Aminosäuren durch die Cytochrom-P450-Hydroxylase SalD gewählt. Diese Hydroxylase ist Teil einer NRPS, die in *Salinispora tropica* den cytotoxischen β -Lacton- γ -Lactam-Naturstoff Salinosporamid A (**45**, Schema 13) synthetisiert.^[87,88] Im Zuge der Biosynthese oxidiert die SalD-Hydroxylase die ungewöhnliche Aminosäure L-Cyclohexenylalanin (gelb in Schema 13) an der β -Position durch Einführung einer

Hydroxylgruppe. Die Aminosäure ist dabei mit großer Wahrscheinlichkeit an das Carrier-Protein im Modul SalB gebunden.^[88]



Schema 13. Die PKS-NRPS-Maschinerie, die für die Synthese des Naturstoffs Salinosporamid A (**45**) in *Salinispora tropica* verantwortlich ist. Die Cytochrom-P450-Hydroxylase SalD (türkis) ist für die stereoselektive β -Hydroxylierung (türkis) der ungewöhnlichen L-Aminosäure Cyclohexenylalanin (gelb) verantwortlich.^[89,90]

Mutasynthetische Untersuchungen zur Generierung neuer Salinosporamid-Derivate mit alternativen Aminosäurebausteinen haben bereits gezeigt, dass die SalD-Hydroxylase *in vivo* in der Lage ist, eine Vielfalt unterschiedlicher L-Aminosäuren stereoselektiv zu hydroxylieren.^[91] In Anlehnung an die Resultate dieser *In-vivo*-Experimente sollen nun *In-vitro*-Studien mit unterschiedlichen Aminosäuren als potentielle Substrate der SalD-Hydroxylase durchgeführt werden. Dabei sollen zunächst solche Aminosäuren Verwendung finden, die bereits *in vivo* hydroxyliert werden konnten, insbesondere das dem natürlichen Substrat sehr ähnliche 3-Cyclohexyl-L-Alanin (gelb in Schema 14), das kommerziell erhältlich ist. Für diese Studien sollen die Aminosäuren an die entwickelten CoA-Derivate gekuppelt werden und entweder direkt oder nach Sfp-vermitteltem Transfer, CP-gebunden mit der SalD-Hydroxylase umgesetzt werden.



Schema 14. Zu untersuchende Reaktion der SalD-Hydroxylase am Beispiel der L-Aminosäure Cyclohexylalanin (gelb). Die durch das Enzym eingeführte Hydroxylgruppe ist im Produkt blau markiert.

Auf diese Weise können nicht nur die entwickelten CoA-Derivate als Werkzeuge zur Untersuchung CP-abhängiger Enzymsysteme unter Beweis gestellt werden, sondern auch eindeutig geklärt werden, ob die Aminosäuresubstrate für den Umsatz mit der SalD-Hydroxylase in CP-gebundener Form vorliegen müssen. Desweiteren kann mit Hilfe der synthetisierten CoA-Derivate das Substratspektrum der SalD-Hydroxylase weiter ergründet und somit ein potentieller biokatalytischer Zugang zur stereoselektiven β -Hydroxylierung strukturell diverser L-Aminosäuren eröffnet werden.

3 Ergebnisse & Diskussion

Zur Darstellung der geplanten CoA-Derivate wurde eine modulare Syntheseroute gewählt. Das Prinzip der modularen Zusammensetzung der CoA-Derivate ist in Abbildung 7 gezeigt.

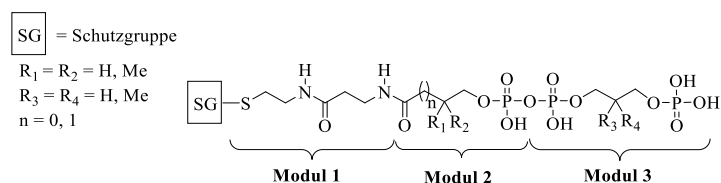
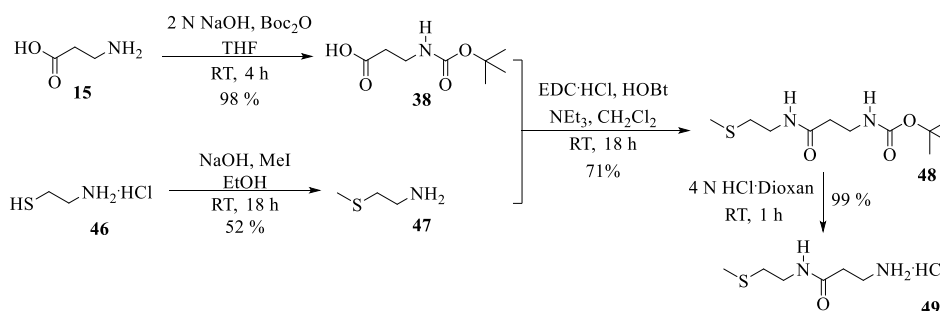


Abbildung 7. Modularer Aufbau der CoA-Derivate.

Modul 1 bildet dabei ein Dipeptid, das aus einem am Thiol geschützten Cysteamin (**14**) und β -Alanin (**15**) besteht. Als Modul 2 dienen Phosphatsäuren unterschiedlicher Länge und Verzweigung und als Modul 3 schließlich unterschiedlich modifizierte Diphosphat-Bausteine. Der Vorteil des modularen Zugangs besteht in dessen Flexibilität, wodurch die Einführung von Modifikationen in Modul 2 und Modul 3 möglich sind, ohne Modul 1 zu verändern.

3.1 Synthese von Phosphopantethein-Derivaten und Diphosphat-Bausteinen auf Basis von Diphenylphosphat

Zur Etablierung der Synthese fand zunächst in Anlehnung an die Masterarbeit^[86] das aus **46** gewonnene *S*-methylierte Cysteamin (**47**) Verwendung, das mit *N*-Boc- β -Alanin (**38**, aus **15**) zum Dipeptid **48** unter Einsatz der Standardkupplungsreagenzien 1-Ethyl-3(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und der Base Triethylamin mit einer Ausbeute von 71 % umgesetzt wurde (vgl. Schema 15).

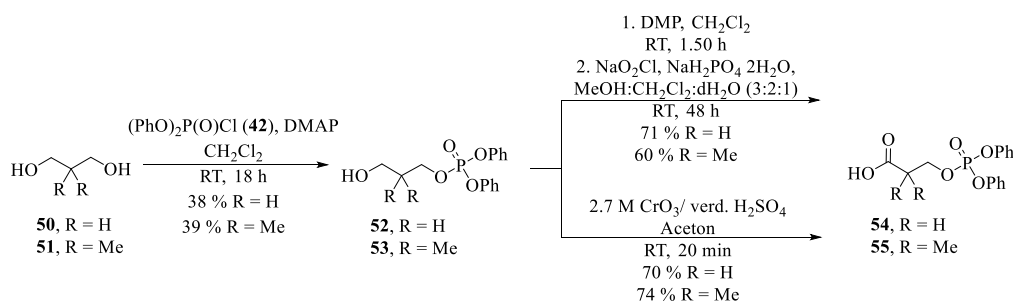


Schema 15. Synthese des Dipeptids **49**.

Dieses Dipeptid **48** konnte im Anschluss durch eine Reaktion mit 4 N Salzsäure in Dioxan quantitativ entschützt werden, um so das Dipeptid **49** mit einer freien Aminofunktion zu erhalten, das bereits als Modul 1 auf der modularen Syntheseroute dienen konnte. Die Gesamtausbeute dieser Reaktionssequenz betrug ausgehend von β -Alanin (**15**) 69 %.

Zur Synthese von Modul 2 und Modul 3 wurde zunächst Diphenylphosphorochloridat (**42**) als Phosphorylierungsreagenz gewählt, da angenommen wurde, dass die Phenylgruppen

anschließend in einer Hydrierungsreaktion unter milden Bedingungen entfernt werden können. Die Synthese von Modul 2 erfolgte dabei zuerst ausgehend von den kommerziell erhältlichen Diolen 1,3-Propandiol (**50**) und 2,2-Dimethyl-1,3-propandiol (**51**). Wie in Schema 16 gezeigt ist, wurden die Diole **50** und **51** an einer Hydroxylfunktion zu **52** bzw. **53** phosphoryliert und dann die andere, freie Hydroxylgruppe zur Säure **54** bzw. **55** oxidiert.

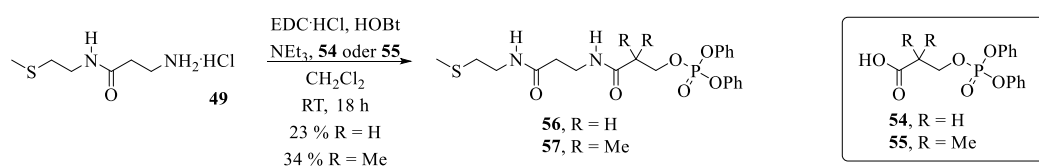


Schema 16. Synthese der Phosphatsäuren **54** und **55**.

Die Phosphorylierung konnte unter Einsatz einer in der Masterarbeit^[86] getesteten Syntheseroute unter Verwendung von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) und Diphenylphosphorochloridat (**42**) in Dichlormethan mit Ausbeuten von ca. 40 % erreicht werden. Die geringe Ausbeute in diesem Schritt ist damit zu erklären, dass neben der Monophosphorylierung auch das diphosphorylierte Produkt entstand. Diese Nebenreaktion hätte durch die selektive Einführung einer Hydroxyl-Schutzgruppe vor der Phosphorylierung verhindert werden können. Zur Etablierung der Syntheseroute wurde darauf jedoch zuerst verzichtet. Zunächst wurde die anschließende Oxidation über zwei Stufen durchgeführt, um die Reaktionsbedingungen möglichst mild zu gestalten. Somit wurden die Moleküle **52** und **53** zuerst zum Aldehyd oxidiert. Da die Swern-Oxidation in diesem Fall nicht zum gewünschten Produkt führte, wurde die Dess-Martin-Oxidation unter Einsatz des Dess-Martin-Periodinans (DMP) verwendet. Auf diese Weise konnten die beiden Aldehyde in guten Ausbeuten von 70-98 % erhalten werden. Allerdings wurde beobachtet, dass die Aldehyde bei Lagerung nicht stabil waren, sodass sie direkt nach Herstellung weiter umgesetzt werden mussten. Für den zweiten Oxidationsschritt wurde die sehr milde und mit vielen funktionellen Gruppen verträgliche Pinnick-Oxidation gewählt. Auch die zweite Oxidationsstufe verlief erfolgreich, sodass die Gesamtausbeute für beide Oxidationsstufen 71 % für die Phosphatsäure **54** und 60 % für die Phosphatsäure **55** betrug. Da die zweite Reaktionsfolge jedoch über 48 Stunden verlief, wurde gleichzeitig die viel schnellere Jones-Oxidation für den direkten Umsatz der Moleküle **52** und **53** zu den jeweiligen Säuren getestet. Trotz der im Vergleich zur Pinnick-Oxidation harschen Reaktionsbedingungen, konnten auch im Falle der Jones-Oxidation die Produkte **54** und **55** mit Ausbeuten von 70 % bzw. 74 % erhalten werden. Da diese Oxidation

nur über eine Stufe verlief, bereits nach 20-30 Minuten einen guten Umsatz und gute Ausbeuten lieferte, wurde diese Variante für die weiteren Synthesen gewählt.

Die so erhaltenen Phosphatsäuren konnten nun in der modularen Syntheseroute als Modul 2 dienen und entsprechend mit Modul 1 gekuppelt werden, um so bereits erste Phosphopantethein-Derivate zu erhalten. Als Modul 1 diente zunächst das in Schema 15 gezeigte Dipeptid **49**. Die Kupplung zwischen Modul 1 und Modul 2 erfolgte wie bereits auch die Synthese des Dipeptids **49** unter Verwendung von EDC·HCl und HOBT (vgl. Schema 17). Die Ausbeuten dieser Kupplungen betragen für das Phosphopantethein-Derivat **56** 23 % und für das Phosphopantethein-Derivat **57** 34 %.



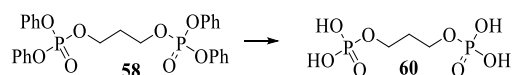
Schema 17. Synthese der Phosphopantethein-Derivate **56** und **57**.

Die Moleküle **58** und **59** (Abbildung 8), die zunächst als Modul 3 dienen sollten, wurden bereits während der Masterarbeit^[86] produziert und standen daher schon für die weitere Synthese zur Verfügung.



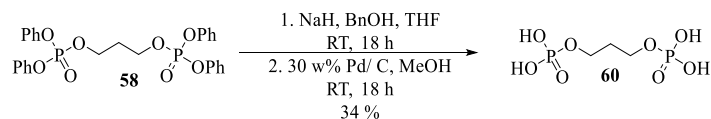
Abbildung 8. Diphosphorylierte Derivate **58** und **59**, die als Modul 3 dienen.

Bevor Modul 2 und Modul 3 in einer Diphosphatkupplungsreaktion zusammengebracht werden konnten, musste in beiden Modulen zunächst die Phosphatgruppe geschützt werden. Es wurde angenommen, dass für beide Module die gleichen Reaktionsbedingungen verwendet werden können, da in beiden die Phosphatgruppe durch jeweils zwei Phenylgruppen geschützt ist. Da die Moleküle **58** und **59** synthetisch schneller zugänglich waren als die Phosphopantethein-Derivate **56** und **57**, sollte die Phosphatentschützung anhand des Moleküls **58** getestet werden. Hierfür wurden unterschiedliche Methoden untersucht, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Erstaunlicherweise lieferte keine der getesteten Methoden das gewünschte Produkt **60**. Die Phenylphosphatester waren somit sowohl gegenüber basischer Hydrolyse (Nr. 1 und 2 in Tabelle 1) als auch gegenüber saurer Hydrolyse (Nr. 3 in Tabelle 1) genau so wie gegenüber Hydrogenolyse bei Normaldruck oder erhöhtem Druck (Nr. 4-6 in Tabelle 1) stabil.

Tabelle 1. Zusammenfassung der getesteten Methoden zur Phosphatentschätzung.

Nr.	Reaktionsbedingungen	Ergebnis
1	1 M NaOH, THF, RT, 48 h	kein Umsatz
2	1 M LiOH, Dioxan, RT, 48 h	kein Umsatz
3	Eisessig/ konz. HCl, 120 °C, 7 h	kein Umsatz
4	10 w% Pd/ C, MeOH, RT, 18 h	kein Umsatz
5	30 w% Pd/ C, MeOH, RT, 18 h	kein Umsatz
6	30 w% Pd/ C, MeOH, RT, 2 bar, 7 d	kein Umsatz
7	Na, Naphthalin, THF, -25 °C, 2 h	Mono-Entschätzung im Roh-NMR

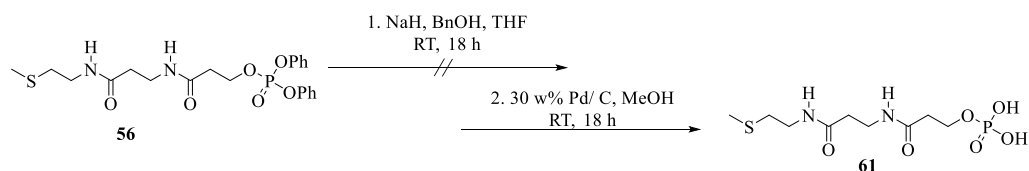
Nur die Birch-ähnliche Reduktion (Nr. 7 in Tabelle 1), wie sie z. B. auch schon von M. D. Burkart *et al.*^[92] bei der Synthese von CoA-Derivaten Verwendung fand, lieferte im Roh-NMR Anzeichen einer Mono-Phosphat-Entschätzung. Da jedoch kein komplett entschütztes Produkt beobachtet werden konnte und zusätzlich das mono-entschätzte Produkt in Form des Natriumsalzes entstand und aus dem Wässrigen isoliert werden musste, war die Aufreinigung des Produkts nicht einfach durchführbar. Aufgrund der Löslichkeit des Natriumsalzes im Wässrigen gestalteten sich die weiteren Synthesen in organischen Lösungsmitteln als unmöglich. Aus diesem Grund wurde in Anlehnung an J. Schulz *et al.*^[93] eine Umesterung des Phenylphosphatesters zu einem Benzylphosphatester versucht, um die Benzyl-Schutzgruppen im Anschluss, so wie bei J.G. Moffatt und H. G. Khorana^[63] in der ersten Totalsynthese von CoA, hydrogenolytisch zu entfernen.



Schema 18. Umesterung von **58** zum Benzylphosphatester und anschließende Hydrogenolyse.

Wie in Schema 18 zu sehen, konnte dieser Ansatz ausgehend vom diphosphorylierten Molekül **58** mit einer Ausbeute von 34 % erfolgreich durchgeführt werden.

Im Anschluss wurde versucht, die Umesterungs-Methode auch für die Phosphatentschätzung des Phosphopantethein-Derivats **56** anzuwenden. Allerdings konnte in diesem Fall kein Umsatz zum gewünschten Produkt **61** erzielt werden (s. Schema 19). Es ist anzunehmen, dass die Umesterung im Falle des Phosphopantethein-Derivats nicht erfolgreich verläuft, weil in der Reaktion Natriumhydrid, das eine sehr starke Base darstellt, eingesetzt wird. Somit kann es zu unerwünschten Deprotonierungen an methylenaktiven Stellen des Substrats **56** kommen.



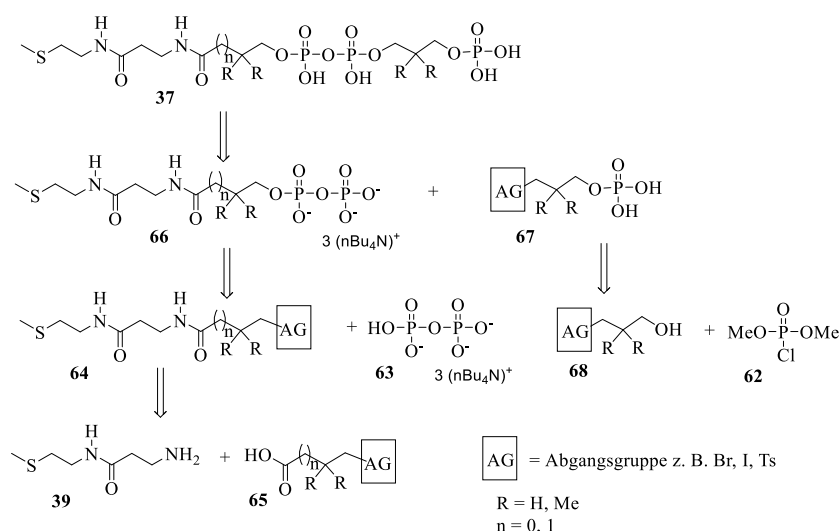
Schema 19. Test der Umesterungs-Methode am Phosphopantethein-Derivat **56**.

Es wurde in diesem Fall auch nicht versucht diese Methodik zu optimieren, da Grund zur Annahme bestand, dass die anschließende Hydrierung im Fall der Phosphopantethein-Derivate **56** und **57** zu keinem Umsatz führen würde. Diese Annahme stützt sich auf die in der Masterarbeit^[86] festgestellte Problematik der hydrogenolytischen Debenzylierung Benzylhaltiger Pantethein-Derivate. Es wurde vermutet, dass das im Pantethein-Derivat enthaltene Schwefel-Atom die Hydrierung stört, indem es den Katalysator inaktiviert. Dieser Effekt von schwefelhaltigen Verbindungen auf Palladium-basierte Katalysatoren ist auch in einigen anderen Studien dokumentiert.^[94–96]

Zusammenfassend war es nun zwar möglich, Phosphopantethein-Derivate mit Diphenylphosphatgruppen darzustellen, allerdings konnten keine passenden Bedingungen zur Entfernung der Phenylschutzgruppen gefunden werden. Für die weiteren Arbeiten wurden daher zwei alternative Syntheserouten entworfen:

1. Gestützt auf die in Kapitel 2.3 vorgestellte Retrosynthese-Strategie sollte nun an Stelle des Diphenylphosphorochloridats (**42**) das Dimethylphosphorochloridat (**62**, Schema 20) als Phosphorylierungsreagenz eingesetzt werden. Die modulare Syntheseroute aus Abbildung 7 sollte dabei beibehalten werden.
2. In Anlehnung an die in Schema 9 vorgestellte, verbesserte Totalsynthese von A. M. Michelson^[64,65] sollte ein Pyrophosphat als Phosphorylierungsreagenz dienen, sodass die für das CoA-Molekül wichtige Diphosphat-Bindung bereits durch das kommerziell erhältliche Tris(tetrabutylammonium)hydrogen-pyrophosphat (**63**, Schema 20) in die herzustellenden CoA-Derivate **37** eingeführt wird. Der Schlüsselschritt sollte in dieser Syntheseroute daher in der Diphosphat-Substitutionsreaktion, die eine gute Abgangsgruppe in dem Molekülteil erfordert, in dem das Diphosphat eingeführt werden soll, bestehen (s. Schema 20). Somit sollten in diesem Syntheseansatz statt Pantethein-Derivaten mit einer terminalen Phosphatgruppe, Pantethein-Derivate **64**, die eine terminale Abgangsgruppe (z. B. eine Iodid-, Bromid- oder Tosylgruppe) tragen, dargestellt werden. Zur Synthese solcher Pantethein-Derivate **64** sollte das Dipeptid **39** mit Carbonsäuren **65**, die über eine terminale Abgangsgruppe verfügen, gekuppelt werden. In einer ersten Diphosphat-

Substitutionsreaktion sollte dann die Abgangsgruppe im Pantethein-Derivat **64** unter Einsatz von **63** durch ein Diphosphat ersetzt und somit Molekül **66** erhalten werden. Die Kupplung von **66** mit dem Adenosin-Mimetikum **67** sollte dann in einer zweiten Diphosphat-Substitutionsreaktion erfolgen. Auch das Adenosin-Mimetikum **67** erfordert für diesen Syntheseansatz eine terminale Abgangsgruppe und sollte daher ausgehend von durch eine terminale Abgangsgruppe funktionalisierten Hydroxyalkanen **68** hergestellt werden. Das im Adenosin vorhandene 3'-Phosphat sollte in das Adenosin-Mimetikum **67** mit Hilfe des bereits erwähnten Phosphorylierungsreagenzes Dimethylphosphorochloridat (**62**) eingeführt werden.



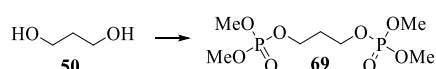
Schema 20. Alternative Retrosynthese-Strategie mit einer Diphosphat-Substitutionsreaktion als Schlüsselschritt.

3.2 Synthese von Phosphopantethein-Derivaten und Diphosphat-Bausteinen auf Basis von Dimethylphosphat

Der Einsatz des neuen Phosphatreagenzes Dimethylphosphorochloridat (**62**) erforderte zunächst die Etablierung geeigneter Reaktionsbedingungen. Hierfür wurde zunächst 1,3-Propandiol (**50**) benutzt und die Phosphorylierung analog zur Phosphorylierung unter Einsatz von Diphenylphosphorochloridat (**42**) durchgeführt (Nr. 1 in Tabelle 2). Allerdings lieferte diese Reaktion nicht das gewünschte Produkt **69**. Aus diesem Grund wurden diverse weitere Reaktionsbedingungen für diese Phosphorylierung getestet, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Neben dem Einsatz von anderen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Tetrahydrofuran oder Acetonitril (Nr. 2 und 3 in Tabelle 2), wurden auch in der Literatur bekannte Methoden unter Einsatz von metallorganischen Verbindungen getestet (Nr. 4 und 5 in Tabelle 2). Nach Aufarbeitung konnten jedoch außer bei Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel weder Produkt noch Edukt im Roh-NMR detektiert werden. Der Einsatz von

Imidazol an Stelle des 4-(Dimethylamino)pyridins (DMAP) (Nr. 6 in Tabelle 2) als Hilfsreagenz der Phosphorylierung führte zwar zur Produktbildung, allerdings wurde auch das Phosphorylierungsreagenz in einem hohem Überschuss re-isoliert. Schließlich wurde die Reaktion noch in Pyridin durchgeführt, wobei das Pyridin nicht nur als Lösungsmittel diente, sondern gleichzeitig auch als Hilfsreagenz der Phosphorylierung. In diesem Fall konnte das gewünschte Produkt **69** mit einer guten Ausbeute von 65 % isoliert werden. Eine Verlängerung der Reaktionszeit von 18 Stunden auf 48 Stunden führte sogar zu einer Ausbeute von 78 % (Nr. 7 und 8 in Tabelle 2).

Tabelle 2. Zusammenfassung der getesteten Reaktionsbedingungen zur Phosphorylierung mit Dimethylphosphorochloridat. Die für alle weiteren Synthesen eingesetzten Reaktionsbedingungen sind farblich unterlegt.



Nr.	Reaktionsbedingungen	Ergebnis
1	DMAP, (MeO) ₂ P(O)Cl, CH ₂ Cl ₂ , RT, 18 h	Zersetzung
2	(MeO) ₂ P(O)Cl, NEt ₃ , THF, RT, 18 h	Zersetzung
3	DMAP, (MeO) ₂ P(O)Cl, MeCN, RT, 18 h	Produkt in Spuren
4	(MeO) ₂ P(O)Cl, NEt ₃ , TiCl ₄ , THF, RT, 1.5 h ^[97]	Zersetzung
5	(MeO) ₂ P(O)Cl, 2.5 M nBuLi, THF, -78 °C → -18 °C, 2 h ^[98]	Zersetzung
6	Imidazol, (MeO) ₂ P(O)Cl, CH ₂ Cl ₂ , RT, 18 h	Produkt:(MeO) ₂ P(O)Cl 1:7
7	(MeO) ₂ P(O)Cl, Pyridin, 0 °C → RT, 18 h	65 % Ausbeute
8	(MeO) ₂ P(O)Cl, Pyridin, 0 °C → RT, 48 h	78 % Ausbeute
9	(MeO) ₂ P(O)Cl, Pyridin, -20 °C → RT, 18 h	52 % Ausbeute

Die Reaktionsbedingungen mit Einsatz von Pyridin wurden schließlich gewählt, um das Produkt **69** in größerem Maßstab darzustellen. Da die Aufarbeitung der Reaktion eine gründliche Extraktion und Neutralisation des Pyridins mit Hilfe von verdünnter Salzsäure erfordert, wurde bei der Maßstabvergrößerung die Menge an Pyridin zunächst möglichst gering gehalten. Dies erwies sich als ungünstig, denn die Ausbeuten sanken dabei enorm (bis auf 7 %). Die Konzentration des Phosphatreagenzes in Pyridin war somit bedeutend für den Reaktionsumsatz. Die besten Ausbeuten wurden beobachtet, wenn das Phosphatreagenz mit maximal einer 0.45 M Endkonzentration eingesetzt wurde. Desweiteren konnte durch eine Durchführung der Reaktion bei -20 °C und anschließendes Rühren bei Raumtemperatur das gewünschte Produkt **69** schon nach 18 Stunden mit akzeptablen Ausbeuten von 52 % (Nr. 9 in Tabelle 2) erhalten werden. Bevor die Synthese der entsprechenden Phosphopantethein-Derivate auf Basis des Dimethylphosphorochloridats durchgeführt wurde, wurde zunächst untersucht, ob die Etnschützung der Phosphatgruppe möglich ist. Hierfür wurde eine in der

Literatur^[99–103] beschriebene Vorschrift unter Einsatz von Bromotrimethylsilan (TMSBr) verwendet. Die Reaktionszeit dieser Entschützung betrug zunächst 18 Stunden, wobei neben dem gewünschten Produkt **60** auch das entsprechende Monophosphat **70** via Massenspektrometrie nachgewiesen wurde (s. Abbildung 9). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass das eingesetzte Reagenz Bromotrimethylsilan auch in der Lage ist, neben einfachen Methylphosphateestern auch langkettige Phosphatester zu spalten.

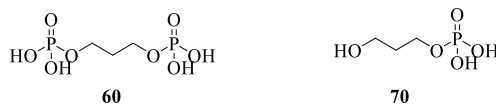
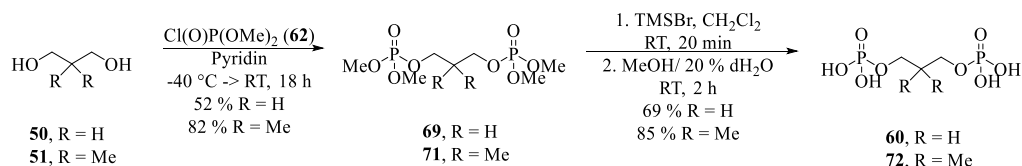


Abbildung 9. Produkt **60** und Nebenprodukt **70** der Dimethylphosphat-Entschützung unter Einsatz von Bromotrimethylsilan.

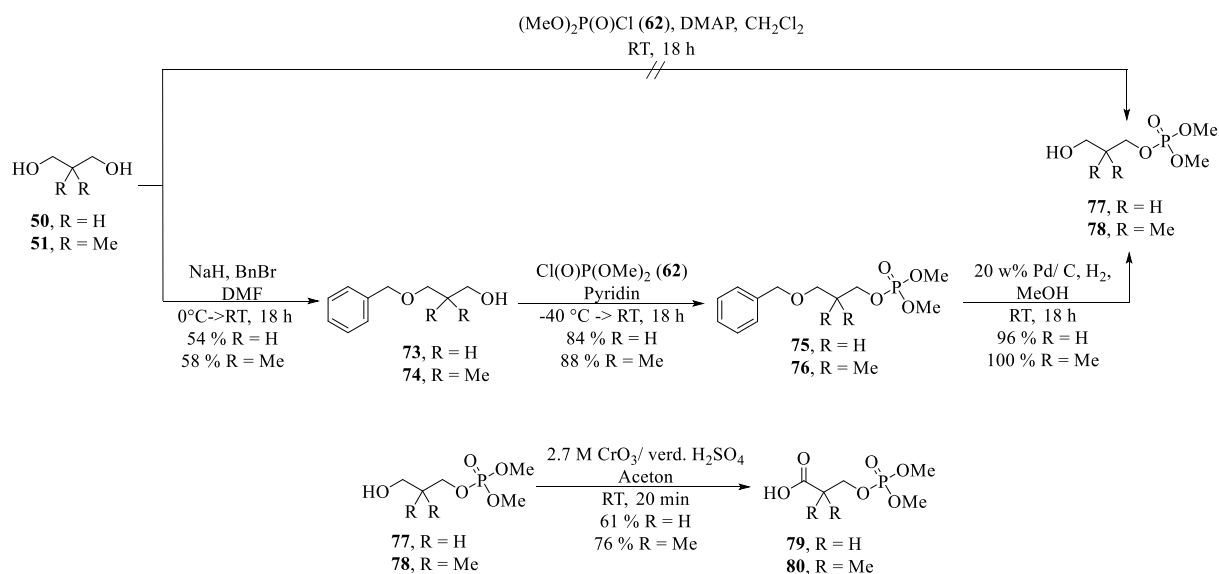
In weiteren Versuchen wurde daher die Reaktionsdauer dieser Entschützung verkürzt, sodass schließlich nach einer Zeit von nur 20 Minuten kein Nebenprodukt **70** mehr zu beobachten war. Die Entschützung des als Dimethylester geschützten Diphosphats **69** (s. Schema 21) und eine anschließende Aufreinigung des Rohprodukts via MPLC lieferte somit das freie Diphosphat **60** mit einer guten Ausbeute von 69 %. Die gefundenen Reaktionsbedingungen konnten auch erfolgreich auf die Synthese eines weiteren Diphosphat-Moleküls **72** ausgehend von 2,2-Dimethyl-1,3-propandiol (**51**) über **71** übertragen werden. Die Ausbeute für die gesamte Reaktionssequenz betrug in diesem Fall 70 % (Schema 21). Somit waren erste Moleküle zugänglich, die als Modul 3 auf der modularen Syntheseroute dienen konnten.



Schema 21. Synthese der Diphosphat-Derivate **60** und **72**, die als Modul 3 dienen.

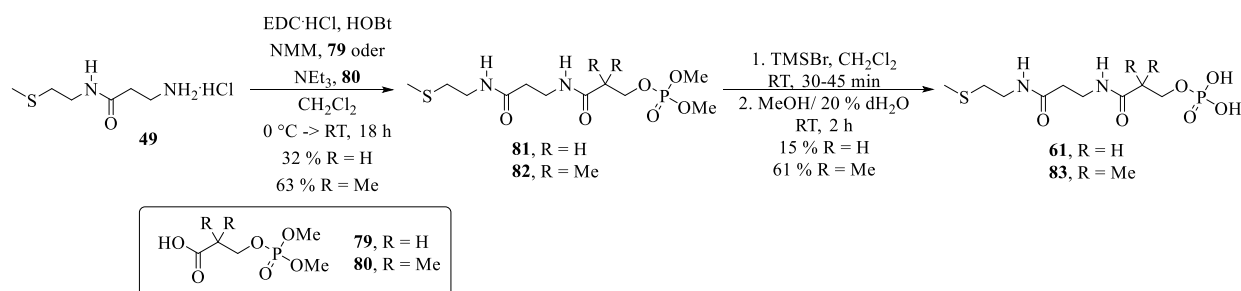
Nun konnten die gefundenen Reaktionsbedingungen auch zur Darstellung von Phosphopantethein-Derivaten eingesetzt werden. Analog zur Synthese auf Basis von Diphenylphosphorochloridat (**42**, Schema 17) mussten zuerst die Diole **50** und **51** monophosphoryliert werden. Erstaunlicherweise gelang die Monophosphorylierung unter Einsatz von Dimethylphosphorochloridat (**62**) nicht ausgehend von den freien Diolen, denn es wurde immer das bisphosphorylierte Produkt **69** bzw. **71** erhalten. Aus diesem Grund wurde eine der Hydroxylgruppen der Diole zunächst als Benzylether geschützt (Schema 22). Die monobenzylierten Diole **73** und **74** bildeten dabei die Hauptprodukte, als Nebenprodukte wurden die dibenzylierten Diole erhalten, die säulenchromatographisch getrennt wurden. Durch die Schützung einer Hydroxylgruppe, konnte die freie Hydroxylgruppe nun mit Dimethylphosphorochloridat (**62**) phosphoryliert werden, was mit sehr guten Ausbeuten von

84 % für Molekül **75** und 88 % für Molekül **76** möglich war. Nach hydrogenolytischer Entfernung der Benzylgruppen konnten schließlich die gewünschten monophosphorylierten Diole **77** und **78** erhalten werden. In einer anschließenden Jones-Oxidation wurde die freigewordene Hydroxylgruppe zur Säure oxidiert. Die Jones-Oxidation zu Molekül **79** bzw. **80** konnte dabei mit Ausbeuten von 61 % bzw. 76 % durchgeführt werden. Auf diese Weise waren die als Modul 2 dienenden Bausteine **79** und **80** ausgehend von den jeweiligen Diolen **50** und **51** mit Gesamtausbeuten von 27 % bzw. 39 % zugänglich (s. Schema 22).



Schema 22. Synthese der Phosphatsäuren **79** und **80**, die als Modul 2 dienen.

Die synthetisierten Phosphatsäuren **79** und **80** konnten nun zur Darstellung von Phosphopantethein-Derivaten genutzt werden. Als Modul 1 diente hier das am *S*-Terminus methylierte Dipeptid **49**, dessen Synthese bereits in Schema 15 vorgestellt wurde. Die Kupplung zwischen Modul 1 und Modul 2 erfolgte auch in diesem Fall unter Verwendung von EDC·HCl und HOBT. Als Base diente bei der Synthese von Phosphopantethein-Derivat **81** *N*-Methylmorpholin (NMM) und bei der Synthese von Phosphopantethein-Derivat **82** Triethylamin (vgl. Schema 23).

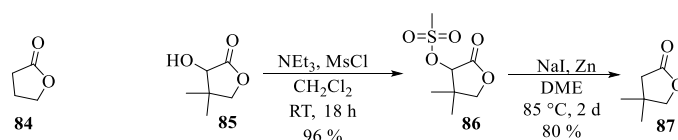


Schema 23. Synthese der Phosphopantethein-Derivate **61** und **83** mit freier Phosphatgruppe.

Die anschließende Phosphatentschützung verlief ebenfalls erfolgreich, sodass letztendlich die Phosphopantethein-Derivate **61** und **83** mit freier Phosphatgruppe erhalten werden konnten. Es

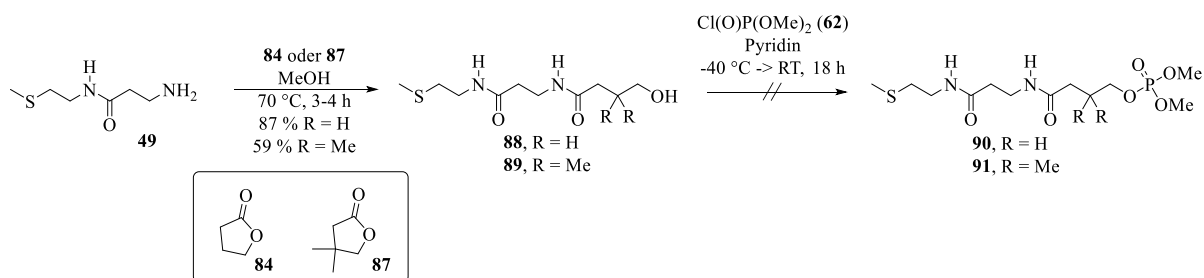
ist anzumerken, dass die Synthese ausgehend von der Phosphatsäure **80** in der gesamten Reaktionssequenz viel bessere Ausbeuten lieferte als die entsprechende Synthese ausgehend von der Phosphatsäure **79**. Möglicherweise üben die in der Phosphatsäure **80** zusätzlich vorhandenen geminalen Methylgruppen einen stabilisierenden Effekt auf die während der Reaktionssequenz durchlaufenden Produkte aus.

Zusätzlich zu den synthetisierten Phosphopanatethein-Derivaten **61** und **83** sollten noch weitere Derivate hergestellt werden, deren Modul 2 statt auf Propandiole, auf Butandiole zurückzuführen sein sollte. Um die Oxidation einer der Hydroxylgruppen der Diole zu umgehen, sollten dabei direkt 4-Hydroxybutansäurederivate Einsatz finden. Es wurden hierfür die jeweiligen Lactone γ -Butyrolacton (**84**) und Pantolacton (**85**) kommerziell erworben. Die für die geplante Synthese nicht benötigte Hydroxylgruppe des Pantolactons (**85**) sollte durch Mesylierung zu **86** und anschließende Reduktion zu β,β -Dimethyl- γ -butyrolacton (**87**) nach einer Vorschrift von T. Ueki und T. Kinoshita^[104] entfernt werden (Schema 24).



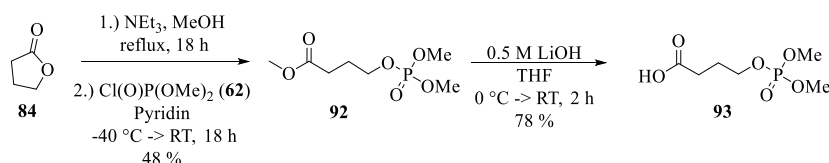
Schema 24. Die kommerziell erworbenen Lactone **84** und **85** sowie die Entfernung der Hydroxylgruppe aus Lacton **85**.

Erste Versuche hierfür fanden bereits während der Masterarbeit^[86] statt, wobei Pantolacton (**85**) mit guten Gesamtausbeuten von 77 % zum β,β -Dimethyl- γ -butyrolacton (**87**) umgesetzt werden konnte. Um eine reduktive Öffnung der Lactone zu umgehen, sollten die Lactone **84** und **87** zunächst nukleophil unter Einsatz des Dipeptids **49** geöffnet werden. Um die Nukleophilie des Dipeptids **49**, das bei der Synthese als Hydrochlorid erhalten wurde, zu erhöhen, wurde es durch basische Extraktion mit 1 M Natronlauge vom Hydrochlorid-Salz in das freie Amin überführt. Die in Anlehnung an die bei der ersten Totalsynthese von Coenzym A (**11**) durch J. G. Moffatt und H. G. Khorana^[63] durchgeführte nukleophile Lactonöffnung zu **88** bzw. **89** gelang mit guten Ausbeuten von 87 % ausgehend von γ -Butyrolacton (**84**) bzw. 59 % ausgehend von β,β -Dimethyl- γ -butyrolacton (**87**, Schema 25).



Schema 25. Nukleophile Lactonöffnung und anschließende Phosphorylierung zu **90** bzw. **91**.

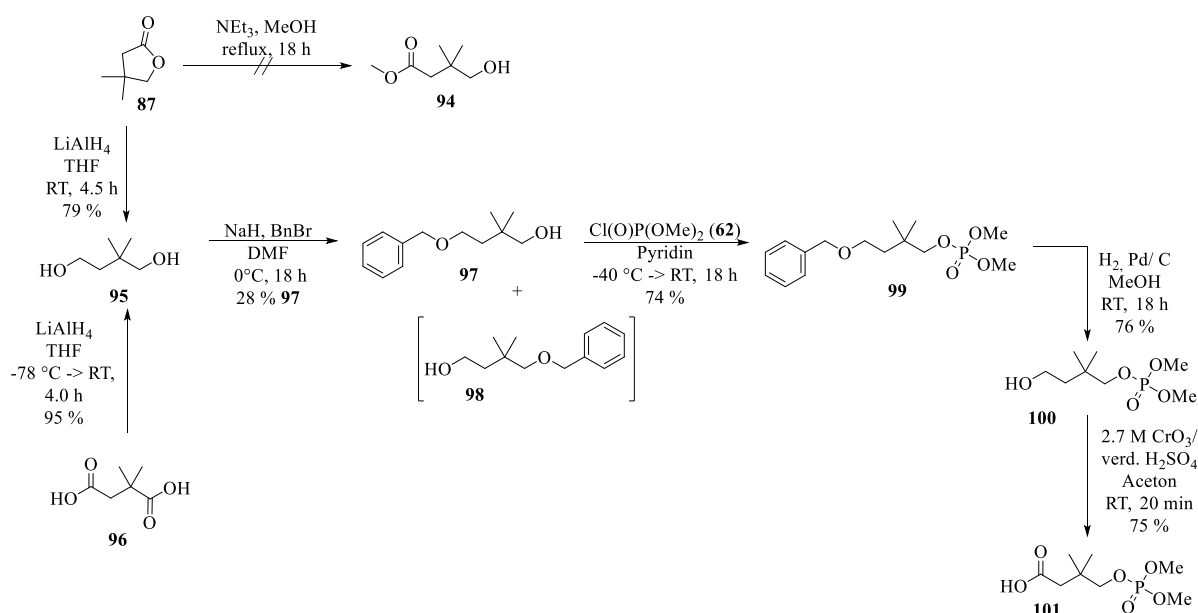
Bedauerlicherweise führte die anschließende Phosphorylierung entweder zu keinem Umsatz oder zu einer maximalen Ausbeute der phosphorylierten Produkte **90** bzw. **91** von 8 %, was nicht akzeptabel war, vor allem da bis zum gewünschten Endmolekül noch eine Entschützung der Phosphatgruppe sowie die Einführung einer Diphosphatbrücke durchgeführt werden mussten. Das Problem der Phosphorylierung in diesem Fall bestand wahrscheinlich darin, dass die Reaktion in basischem Milieu stattfand und daher Pyridin als Lösungsmittel diente. Für die Aufarbeitung musste das Pyridin mit sehr viel verdünnter Salzsäure neutralisiert werden, sodass die Reaktionslösung schließlich einen sauren pH-Wert aufwies. Es besteht die Möglichkeit, dass das entstandene phosphorylierte Produkt **90** bzw. **91** in sehr stark saurem Milieu nicht lange genug stabil und daher nicht isolierbar ist. Desweiteren wäre es möglich, dass das phosphorylierte Produkt **90** bzw. **91** aufgrund der hohen Polarität nicht ohne Weiteres aus der wässrigen Phase isolierbar ist. Somit war dieser Syntheseweg für die Darstellung von Phosphopantethein-Derivaten nicht effizient. Das Lacton sollte stattdessen unter basischen Bedingungen mit Methanol geöffnet werden (s. Schema 26). γ -Butyrolacton (**84**) reagierte unter diesen Bedingungen zwar zum 4-Hydroxybutansäuremethylester, doch war der Umsatz dieser Reaktion nicht vollständig und das nicht reagierte Lacton **84** konnte weder säulenchromatographisch noch via MPLC vom Produkt getrennt werden. Aus diesem Grund wurde die Lactonöffnung auch unter Einsatz anderer Alkohole getestet. Es wurden hierfür Ethanol und *iso*-Propanol gewählt. Die Reaktion unter Einsatz von Ethanol führte wie auch schon die Reaktion mit Methanol zu einem Gemisch aus Produkt und Lacton, wobei das Lacton in einem ca. fünffachen Überschuss vorlag. Die Reaktion unter Einsatz von *iso*-Propanol hingegen führte zu keinem Umsatz. Da die Lactonöffnung mit anderen Alkoholen noch schlechtere Ergebnisse lieferte als mit Methanol, wurde diese Reaktion weiterhin mit Methanol durchgeführt und im Anschluss an die Lactonöffnung das Rohprodukt direkt in der Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. Das gewünschte Produkt **92** konnte so mit Ausbeuten von 48 % erhalten werden. Eine anschließende basische Esterhydrolyse führte dann mit Ausbeuten von 78 % zur Phosphatsäure **93**, die analog zu den Phosphatsäuren **79** und **80** als Modul 2 in der modularen Syntheseroute verwendet werden konnte.



Schema 26. Lactonöffnung mit Methanol unter basischen Bedingungen und anschließender Umsatz zur Phosphatsäure **93**.

Im Gegensatz dazu konnte Lacton **87** nicht mit Methanol zu **94** geöffnet werden (s. Schema 27). In diesem Fall wurde auf die Reduktion des Lactons zum entsprechenden Diol

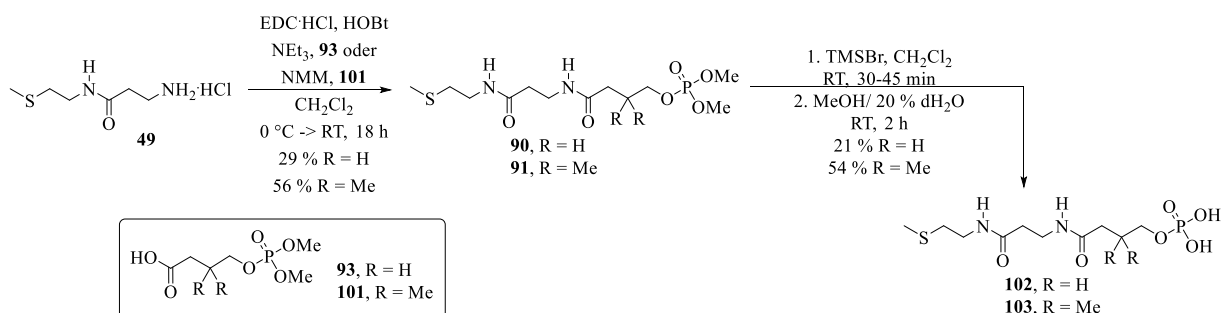
zurückgegriffen. Es wurde hierfür eine Reduktion unter Einsatz von Lithiumaluminumhydrid eingesetzt, sodass 2,2-Dimethylbutan-1,4-diol (**95**) mit einer Ausbeute von 79 % erhalten wurde. Bei der erneuten Wiederholung der Syntheseroute angefangen bei Pantolacton (**85**, vgl. Schema 24) sanken die Ausbeuten zur Darstellung des β,β -Dimethyl- γ -butyrolactons (**87**) jedoch erheblich. Auch in mehreren weiteren Versuchen konnte β,β -Dimethyl- γ -butyrolacton (**87**) aus unbekanntem Gründen nur noch mit Gesamtausbeuten von 17 % erhalten werden. Da zudem die Entfernung der Hydroxylgruppe aus dem Pantolacton (**85**) vor der Reduktion die Syntheseroute unnötig verlängerte, wurde dieser Weg verworfen und stattdessen die kommerziell erhältliche 2,2-Dimethylsuccinylsäure (**96**) zur Reduktion verwendet (s. Schema 27). Diese Reduktion wurde ebenfalls unter Einsatz von Lithiumaluminumhydrid durchgeführt und lieferte gute Ausbeuten von 95 %. Das so erhaltene 2,2-Dimethylbutan-1,4-diol (**95**) konnte analog zu Propandiol zur entsprechenden Phosphatsäure **101** umgesetzt werden.



Schema 27. Synthese der Phosphatsäure **101**.

Es erfolgte somit zuerst die Maskierung einer Hydroxylgruppe in **95** als Benzylether. Hierbei entstanden neben dem dibenzylierten Nebenprodukt auch die beiden monobenzylierten Regioisomere **97** und **98**, wobei nur Regioisomer **97** säulenchromatographisch in reiner Form mit einer Ausbeute von 28 % isoliert werden konnte. Da das andere Regioisomer **98** nicht in reiner Form erhalten wurde, wurde die Synthese nur mit Regioisomer **97** fortgeführt. Es wurde zu **99** phosphoryliert, die Benzylgruppe hydrogenolytisch zu **100** entfernt und die so freigewordene Hydroxylgruppe in einer Jones-Oxidation zur Säure **101** oxidiert. Auf diese Weise konnte eine weitere Phosphatsäure **101** erhalten werden, die als Modul 2 in der modularen Syntheseroute verwendet werden konnte. Die Gesamtausbeute dieser Synthesesequenz betrug ausgehend von 2,2-Dimethylsuccinylsäure (**96**) 11 %.

Die neu hergestellten Phosphatsäuren **93** und **101** konnten nun ebenfalls mit Molekül **49** als Modul 1 zu den Phosphopantethein-Derivaten **90** und **91** unter Einsatz der bereits erwähnten Kupplungsreagenzien EDC·HCl und HOBT gekuppelt werden (Schema 28). Die anschließende Phosphatentschützung ergab zwei weitere Phosphopantethein-Derivate **102** und **103** mit freier Phosphatgruppe.



Schema 28. Synthese der Phosphopantethein-Derivate **102** und **103** mit freier Phosphatgruppe.

Somit konnte auf Basis des neu gewählten Phosphorylierungsreagenzes Dimethylphosphorochloridat (**62**) eine erfolgreiche Syntheseroute zur Darstellung von Phosphopantethein-Derivaten und Diphosphat-Bausteinen mit freien Phosphatgruppen etabliert werden. Auf diese Weise waren vier unterschiedliche Phosphopantethein-Derivate und zwei verschiedene Diphosphat-Bausteine, die in Abbildung 10 dargestellt sind, zugänglich.

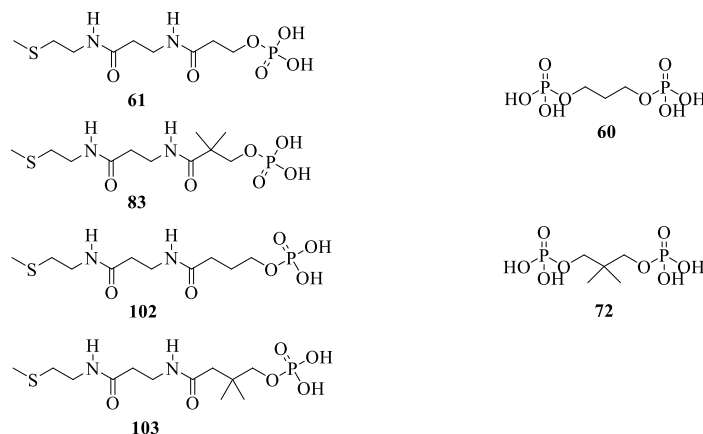


Abbildung 10. Mit der erarbeiteten Synthesemethode zugängliche Phosphopantethein-Derivate (links) und Diphosphat-Bausteine (rechts).

Im Weiteren musste nun eine Methode erarbeitet werden, um die Diphosphatbrücke zwischen den Phosphopantethein-Derivaten und den Diphosphat-Bausteinen aufzubauen.

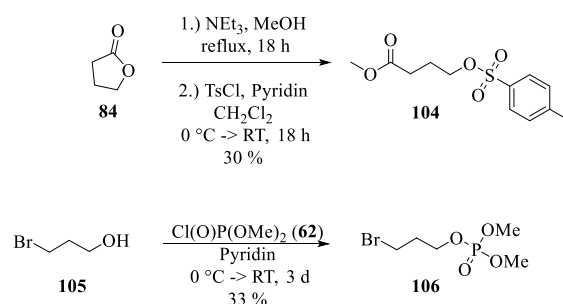
3.3 Versuche zur Diphosphat-Substitutionsreaktion

Parallel zu den in Kapitel 3.2 beschriebenen Arbeiten zur Etablierung einer Syntheseroute zur Darstellung von Phosphopantethein-Derivaten auf Basis des Phosphorylierungsreagenzes

Dimethylphosphorochloridat (**62**), wurden auch Versuche zur Einführung der Diphosphat-Einheit in die herzustellenden CoA-Derivate unter Einsatz des kommerziell erhältlichen Tris(tetrabutylammonium)hydrogenpyrophosphats (**63**) durchgeführt.

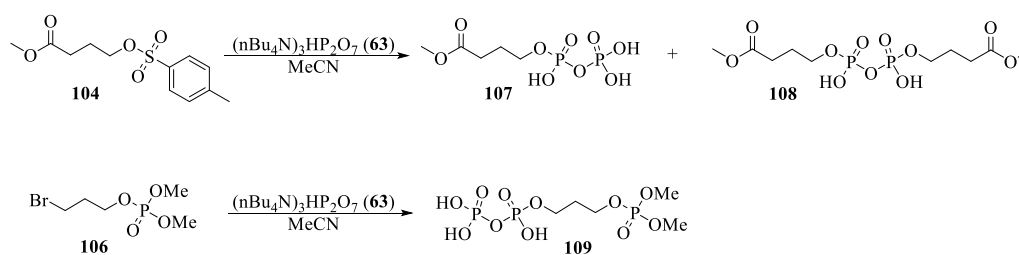
3.3.1 Experimente in flüssiger Phase

Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, basiert dieser Ansatz auf einer Diphosphat-Substitutionsreaktion, die einer Abgangsgruppe bedarf. Es wurden zunächst einfache Moleküle hergestellt, um die Umsetzbarkeit und die Anwendung dieser Reaktion zu testen. Zum einen wurde γ -Butyrolacton (**84**), wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, unter basischen Bedingungen mit Methanol geöffnet und die freie Hydroxylgruppe im Anschluss tosyliert, sodass Molekül **104** erhalten wurde (s. Schema 29). Zum anderen wurde 1-Bromo-1-propanol (**105**) unter Einsatz von Dimethylphosphorochloridat (**62**) zu **106** phosphoryliert (s. Schema 29).



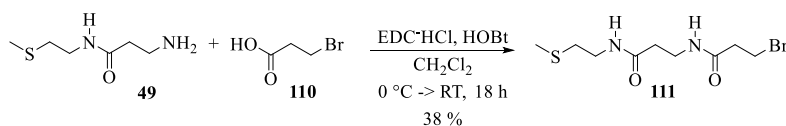
Schema 29. Synthese der einfachen Moleküle **104** und **106** zum Testen der Diphosphat-Substitutionsreaktion.

Als Erstes wurde Molekül **104** in der Diphosphat-Substitutionsreaktion eingesetzt. Dabei wurde, wie in Schema 30 gezeigt, **104** unter Argonschutzgasatmosphäre in trockenem Acetonitril gelöst und mit Tris(tetrabutylammonium)hydrogenpyrophosphat (**63**) versetzt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels Massenspektrometrie verfolgt. Neben der gewünschten Substitutionsreaktion zu Produkt **107** konnte zusätzlich jedoch bereits nach einigen Stunden die Bildung des dimeren Nebenprodukts **108** massenspektrometrisch detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Einsatz von Molekül **106** unter gleichen Reaktionsbedingungen keine derartige Nebenreaktion beobachtet werden (s. Schema 30). Daraus wurde geschlussfolgert, dass der Einsatz der Tosylgruppe als Abgangsgruppe das Molekül in der Diphosphat-Substitutionsreaktion besonders reaktiv macht, sodass die Substitution sehr schnell verläuft, was zur Bildung von dimeren Nebenprodukten führt.



Schema 30. Test der Diphosphat-Substitutionsreaktion anhand der Moleküle **104** und **106**.

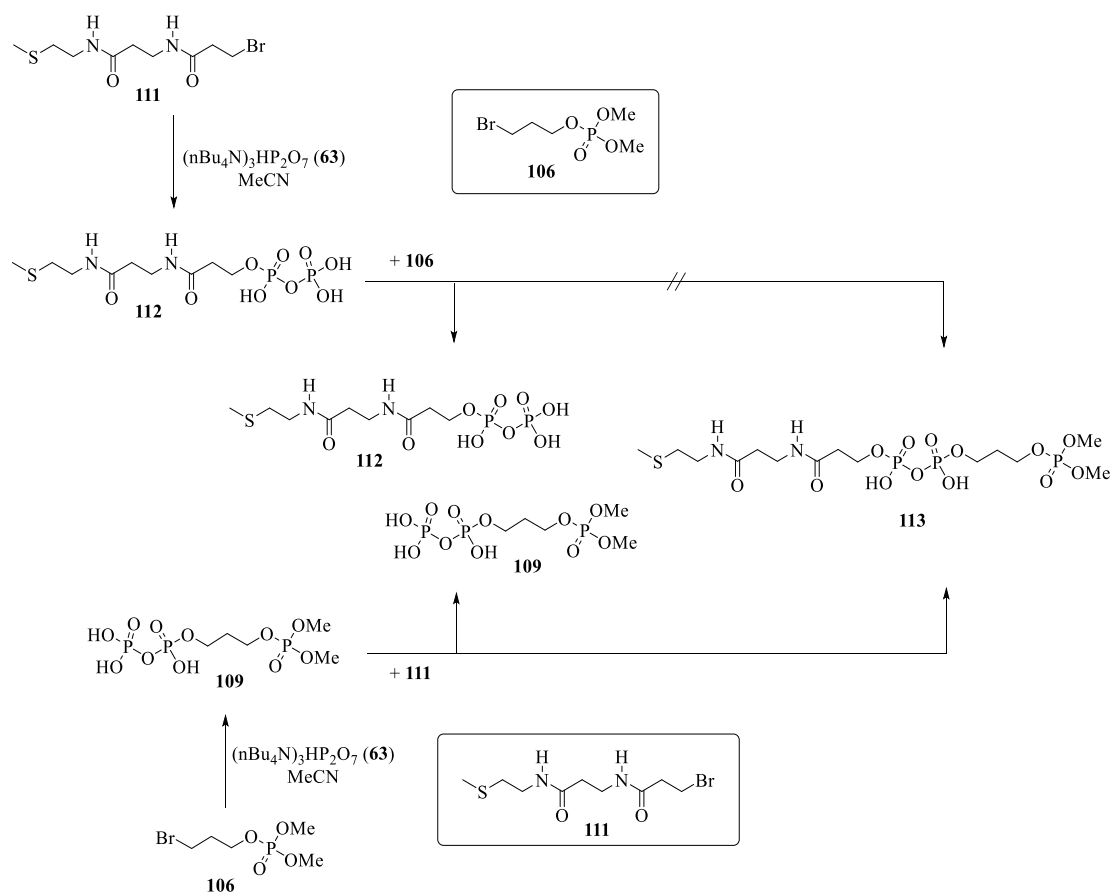
Da solchartige Nebenreaktionen jedoch bei der geplanten Synthese vermieden werden sollten, wurde Bromid als Abgangsgruppe für weitere Untersuchungen gewählt. Somit wurde für diesen Synthesansatz exemplarisch ein Pantethein-Derivat mit terminaler Bromidgruppe hergestellt. Hierfür wurde das bereits vorgestellte Dipeptid **49** mit der kommerziell erworbenen 3-Brompropansäure (**110**) unter Einsatz der Kupplungsreagenzien EDC·HCl und HOBt zum Tripeptid **111** gekuppelt (s. Schema 31).



Schema 31. Synthese eines Pantethein-Derivats **111** mit terminaler Bromidgruppe.

Wie in Schema 32 gezeigt, wurde dieses Tripeptid **111** in der Diphosphat-Substitutionsreaktion eingesetzt. Nachdem das Edukt nicht mehr massenspektrometrisch detektierbar war, jedoch die Masse des Substitutionsprodukts **112** zu beobachten war, wurde Molekül **106** zur Reaktion zugefügt. Nach 18-stündigem Rühren bei Raumtemperatur konnte neben dem Substitutionsprodukt **112** des Tripeptids **111** auch das Substitutionsprodukt **109** des Moleküls **106** detektiert werden. Die Masse des gewünschten Produkts **113** konnte jedoch nicht gefunden werden.

Bei der Durchführung der gleichen Reaktionssequenz, jedoch bei Einführung des Pyrophosphats zunächst in Molekül **106** und anschließender Zugabe des Tripeptids **111** (untere Reaktionssequenz in Schema 32), konnte neben den bereits erwähnten Substitutionsprodukten **109** und **112** auch ein minimaler Anteil des gewünschten Produkts **113** massenspektrometrisch detektiert werden. Da die Produktbildung jedoch sehr gering war und die Reaktionslösung zudem in hohem Anteil die aus dem Pyrophosphat-Reagenz stammenden Tris(tetrabutylammonium)-Kationen enthielt, was die Aufreinigung der stark polaren Substitutionsprodukte zusätzlich erschwerte, wurde entschieden, die Diphosphat-Substitutionsreaktion an der Festphase zu testen. Da das Edukt bei der Festphasen-Synthese an ein Harz gebunden ist, besteht die Möglichkeit, nach jedem Reaktionsschritt das Harz zu waschen und somit alle überschüssigen Reaktanden und Nebenprodukte, die nicht an das Harz gebunden sind, sehr einfach vom Produkt zu trennen.

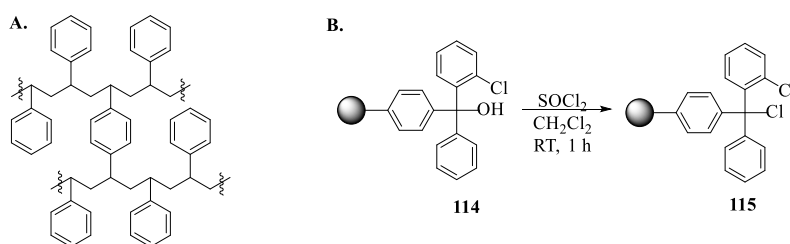


Schema 32. Test der Diphosphat-Substitutionsreaktion anhand des Pantethein-Derivats **111**.

3.3.2 Experimente an der Festphase

Die im Jahr 1963 von R. B. Merrifield eingeführte Festphasen-Synthese dient in der Regel der sequentiellen Synthese von Peptiden definierter Kettenlänge, wobei das wachsende Peptid meistens an seinem C-Terminus über einen Linker kovalent an ein unlösliches Polymer-Harz gebunden ist.^[105] Der Aufbau der Peptidkette erfolgt dabei vom C- zum N-Terminus, wobei die zu kuppelnde Aminosäure erst am N-Terminus geschützt wird, um dann am C-Terminus aktiviert zu werden und so die Reaktion mit der freien Aminofunktion der am Harz gebundenen Peptidsequenz zu ermöglichen. Ein großer Vorteil dieser Methodik besteht darin, dass überschüssige Edukte, Kupplungsreagenzien und mögliche Nebenprodukte durch einfaches Waschen des Harzes mit organischen Lösungsmitteln entfernt werden können, da diese im Gegensatz zum gewünschten Peptidprodukt nicht an das Harz gebunden sind. Als Harzmaterial wird dabei in der Regel Polystyrol eingesetzt, das mit Divinylbenzol quervernetzt ist (Schema 33.A). Als Linker können unterschiedlichste funktionelle Einheiten dienen, wobei im Laufe dieser Arbeit ein Harz mit einem 2-Chlorotriethylchlorid-Linker benutzt wurde. Da dieser Linker empfindlich auf Feuchtigkeit reagiert und somit durch Hydrolyse in seine unreaktive Form **114**

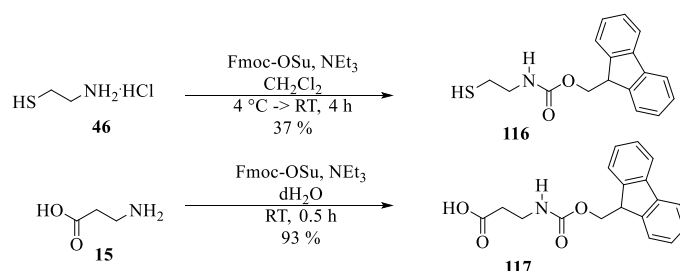
(Schema 33.B) übergeht, muss das Harz vor Benutzung durch Chlorierung mit Thionylchlorid zu **115** aktiviert werden.



Schema 33. A. Mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol als Harzmaterial. B. Harz-Aktivierung.

Wie bereits erwähnt, erfolgt in der Festphasen-Peptidsynthese die Kupplung der Aminosäuren an das Harz in der Regel über den *C*-Terminus. Bei der hier vorliegenden Synthese sollte jedoch Cysteamin (**14**) als Starteinheit dienen. Da dieses Molekül keine Carboxyl-Funktion enthält, sollte es über seine Thiol-Funktion an das 2-Chlorotritylchlorid-Harz gebunden werden, so wie es in einigen Beispielen in der Literatur bereits erwähnt wird.^[106–109] Die Abspaltung des gewünschten Produkts von diesem Harz erfolgt unter sauren Bedingungen und erfordert somit die Maskierung des *N*-Terminus der zu kuppelnden Aminosäuren durch eine orthogonale Schutzgruppe. Hierfür wurde die konventionell verwendete, basisch labile Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Gruppe eingesetzt.

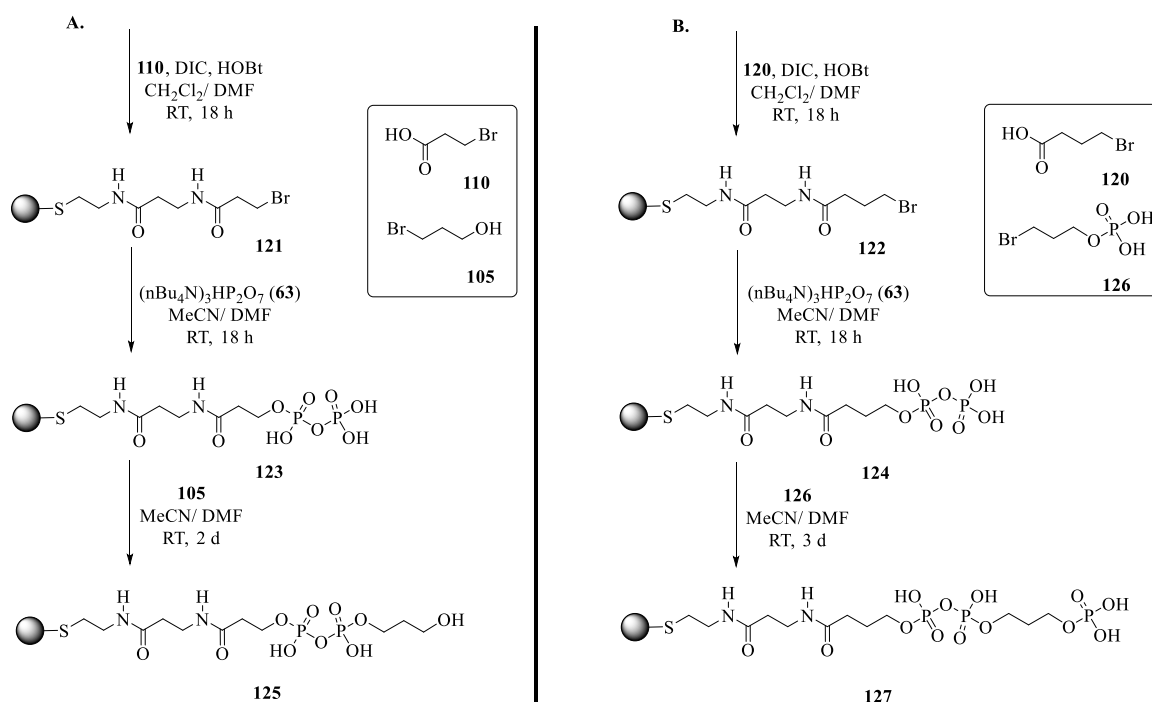
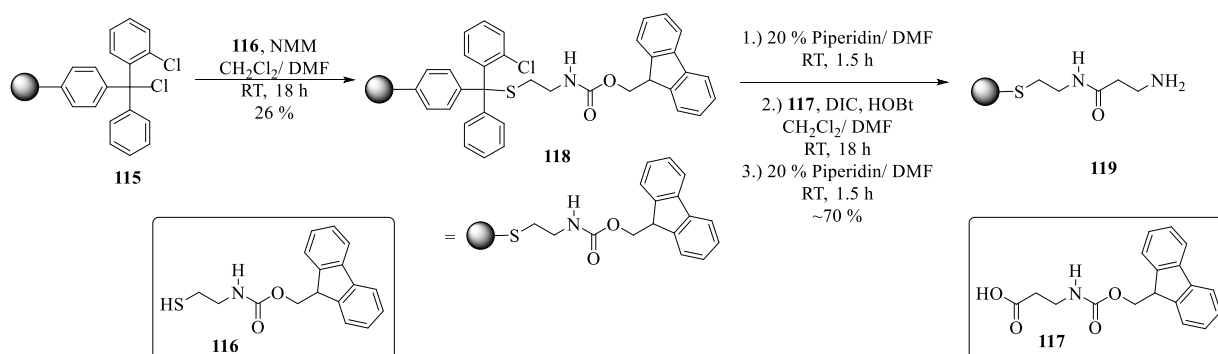
Zur Vorbereitung der Festphasen-Synthese wurden daher zunächst die beiden notwendigen Aminosäuren Cysteamin Hydrochlorid (**46**) und β -Alanin (**15**) in ihre *N*-Fmoc-Varianten **116** bzw. **117** durch Reaktion mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid überführt (Schema 34).



Schema 34. Synthese von *N*-Fmoc-Cysteamin (**116**) und *N*-Fmoc- β -Alanin (**117**).

Alle durchgeführten Synthesen an der Festphase wurden zunächst nach einem in der Arbeitsgruppe bereits bestehendem Protokoll durchgeführt, das in Abschnitt 6.8.9 im Detail beschrieben ist. Zu Beginn wurde das aktivierte 2-Chlorotritylchlorid-Harz unter Einsatz von *N*-Methylmorpholin als Base mit *N*-Fmoc-Cysteamin (**116**) beladen und der Substitutionsgrad des entstehenden **118** mit Hilfe des Fmoc-Tests (s. Kapitel 6.8.9.5) zu 26 % bestimmt (vgl. Schema 35). Die Fmoc-Schutzgruppe am Cysteamin wurde mit Piperidin abgespalten und der Umsatz dieser Reaktion durch den Fmoc-Test und den Kaiser-Test (s. Kapitel 6.8.9.7), der spezifisch für freie Aminogruppen ist, überprüft. Es folgte die Kupplung mit dem zweiten

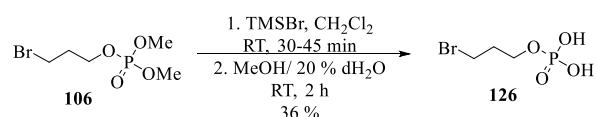
Baustein *N*-Fmoc- β -Alanin (**117**), sodass nach erneuter Absplattung der Fmoc-Schutzgruppe das Produkt **119** erhalten wurde.



Schema 35. Festphasen-Synthesen unter Einsatz der Diphosphat-Substitutionsreaktion zur Darstellung von zwei unterschiedlichen CoA-Derivaten **125** (Syntheseroute A.) und **127** (Syntheseroute B.).

Als dritter Synthesebaustein diente eine Carbonsäure mit einem terminalen Bromsubstituenten, wobei zwei unterschiedliche Bausteine eingesetzt wurden: 3-Brompropansäure (**110**) (Syntheseroute A. in Schema 35) und 4-Brombutansäure (**120**) (Syntheseroute B. in Schema 35). Zur Reaktionskontrolle sollte nach den individuellen Reaktionsschritten eine geringe Menge des Produkts vom Harz abgespalten werden und das Produkt massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die massenspektrometrische Analyse lieferte jedoch in beiden Fällen keinen Hinweis auf die jeweiligen Produkte **121** bzw. **122**. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das synthetisierte Molekül schlecht ionisierbar war und somit schwer massenspektrometrisch zu detektieren war, was auch schon bei anderen mit Brom substituierten Molekülen wie z. B. **106** und **111** aus Schema 32 beobachtet wurde. Zusätzlich

wurde die Detektion in diesem Fall durch die geringe Probenmenge erschwert, da die Abspaltung vom Harz nur in einem kleinen Maßstab erfolgte. Einen Hinweis auf einen erfolgreichen Reaktionsumsatz gab in diesem Fall der Kaiser-Test, der die Abwesenheit von freien Aminogruppen in beiden Fällen bestätigte. Somit wurde im Anschluss die Diphosphat-Substitutionsreaktion am Harz durchgeführt. Für die Reaktionskontrolle wurde nun jedes Mal eine geringe Menge des Produkts vom Harz abgespalten und mittels Massenspektrometrie untersucht, wobei die Abspaltung vom Harz unter Einsatz von 95 % Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan realisiert wurde. Auf diese Weise konnte sowohl das Produkt **123** als auch das Produkt **124** nachgewiesen werden. Im Anschluss sollte zunächst getestet werden, ob auch die zweite Diphosphat-Substitutionsreaktion am Harz funktioniert und somit ein Zugang zu CoA-Derivaten über diese Synthesestrategie möglich ist. Hierfür wurde das am Harz gebundene Diphosphat-Derivat **123** zunächst mit dem kommerziell erhältlichen 1-Bromo-1-propanol (**105**) umgesetzt. Die anschließende massenspektrometrische Analyse lieferte jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf die Bildung des Produkts, wohingegen die Masse des entsprechenden Edukts **123** detektiert werden konnte. Möglicherweise war das hier eingesetzte Edukt **105** für diese Substitutionsreaktion nicht reaktiv genug, sodass bei der Diphosphat-Substitutionsreaktion ausgehend vom Diphosphat-Derivat **124** stattdessen die bereits in der flüssigen Phase untersuchte phosphorylierte Variante **106** des 1-Bromo-1-propanols (**105**) eingesetzt werden sollte. Bevor Molekül **106** jedoch in dieser Reaktion verwendet wurde, wurden die Phosphatschutzgruppen mit Hilfe der bereits in Kapitel 3.2 beschriebenen Methode zu **126** entfernt (Schema 36).



Schema 36. Entschützung der Phosphatgruppe am Synthesebaustein **106**.

Der Einsatz des so hergestellten Moleküls **126** würde in der Diphosphat-Substitutionsreaktion mit Molekül **124** direkt zu einem gewünschten CoA-Derivat **127** führen (vgl. Schema 35.B). Auch in diesem Fall konnte aus der massenspektrometrischen Analyse nicht eindeutig auf die Produktbildung geschlossen werden, da die dem Produkt und dessen Methansäure- und TFA-Addukten entsprechenden Massen nur mit sehr geringer Intensität im Rauschen des Massenspektrums detektiert wurden. Es wurde vermutet, dass die Abspaltungsbedingungen (95 % TFA in Dichlormethan) für das zu synthetisierende Molekül zu harsch sein könnten. Es wäre zudem auch möglich, dass die an das Harz gekuppelten, die Pyrophosphat-Einheit tragenden Moleküle **123** und **124** aufgrund ihrer Länge und Zusammensetzung zu träge für die Diphosphat-Substitutionsreaktion waren. Da zudem bereits ab der Kupplung der Carbonsäuren

110 bzw. **120** an das Harz eine Reaktionsverfolgung mittels gängiger HPLC-Methoden, in denen die Moleküle mittels UV-Absorption detektiert werden, nicht möglich war, da die zu untersuchenden Moleküle keine UV-aktiven Substituenten mehr enthielten, wurde dieser Syntheseweg nicht weiterverfolgt.

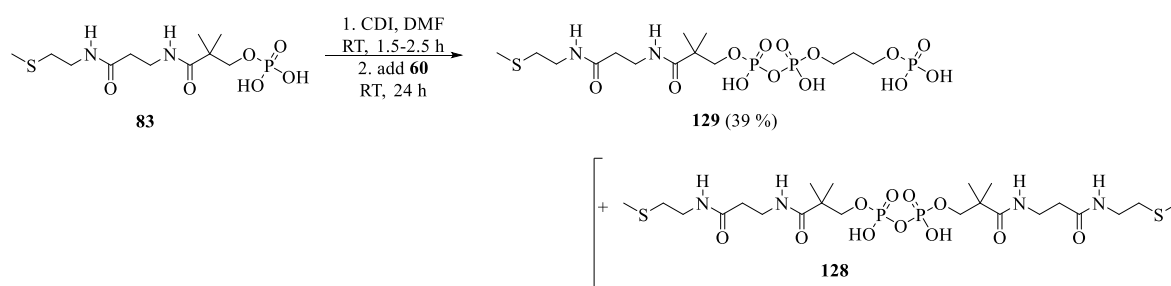
Stattdessen sollte die Diphosphatbrücke in den gewünschten CoA-Derivaten über eine Kupplungsreaktion zwischen den in Kapitel 3.2 vorgestellten Phosphopantethein-Derivaten und Diphosphat-Bausteinen aufgebaut werden.

3.4 Diphosphat-Kupplung

In der Literatur existiert eine Vielzahl an Beispielen, in denen eine Diphosphat-Brücke zwischen zwei freien Phosphat-Einheiten geknüpft wird. Allerdings werden diese Reaktionen meist zur Synthese von Zuckerphosphaten oder Dinukleotiden verwendet.^[110–123] Grundsätzlich wird dabei ein Phosphatbaustein mit Hilfe eines Aktivierungsreagenzes für die Kupplung aktiviert und so die Reaktion mit einem zweiten Phosphatbaustein ermöglicht. Häufig werden die Phosphate dabei als Phosphoramidate aktiviert, so z. B. als Phosphormorpholide, -piperidate, -pyridate oder -imidazolide.

Im vorliegenden Fall wurde die Aktivierung zum Phosphoroimidazolidat unter Einsatz von 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) aufgrund der in der Literatur^[121,124] dokumentierten Zeiteffizienz der Reaktion und guten Kupplungsergebnissen gewählt. In Anlehnung an die Reaktionsvorschriften von G. Gebeyehu *et al.* und M. Kadokura *et al.*^[119,121] wurde zunächst ein Phosphopantethein-Derivat, z. B. **83**, mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol aktiviert, wobei sich hier im Vergleich zu Acetonitril Dimethylformamid als das bessere Lösungsmittel erwies. Im Anschluss wurde das im Überschuss eingesetzte CDI durch Hydrolyse mittels Methanol inaktiviert. Nachdem überschüssiges Methanol am Vakuum entfernt wurde, erfolgte der Zusatz eines Diphosphat-Bausteins, z. B. **60**. Zu Beginn wurde hier noch wasserfreies Zink(II)chlorid zugesetzt, das laut Literatur nicht nur die Löslichkeit der Edukte verbessern sollte, sondern auch als Lewis-Säure die Imidazol-Abgangsgruppe aktivieren und so einen Komplex mit den beiden Edukten eingehen sollte, um auf diese Weise die Diphosphat-Kupplung zu erleichtern. Da die Zinksalze unter den verwendeten Reaktionsbedingungen jedoch kaum löslich waren und zudem die Aufreinigung der gewünschten, stark polaren Produkte zusätzlich erschwert hätten, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf diese verzichtet. Mittels Massenspektrometrie konnte jeder Reaktionsschritt kontrolliert werden. Auf diese Weise konnte ein kompletter Umsatz im Aktivierungsschritt bereits nach 1.5-2.5 Stunden festgestellt werden. Die massenspektrometrische Analyse der Diphosphat-Kupplung zeigte jedoch, dass neben einer

minimalen Produktbildung zu **129** hauptsächlich eine Dimerbildung, wie z. B. zu Dimer **128** in Schema 37, stattfand, die auf eine Diphosphat-Kupplung zwischen zwei Phosphopantethein-Derivaten **83** zurückzuführen war. Zusätzlich konnte neben der Masse des Diphosphat-Edukts **60** auch die Masse des Phosphopantethein-Edukts **83** nachgewiesen werden, obwohl im Schritt zuvor die Reaktionskontrolle der Aktivierung einen kompletten Umsatz des Phosphopantethein-Edukts angezeigt hatte. Es wurde daher vermutet, dass das gewünschte Produkt **129** hydrolyseempfindlich ist und daher evtl. der Zwischenschritt der 1,1'-Carbonyldiimidazol-Hydrolyse mittels Methanol, trotz anschließender Entfernung des Lösungsmittels am Vakuum, zur Hydrolyse des gebildeten Produkts führt. Somit wurde dieser Zwischenschritt für alle weiteren Reaktionen nicht mehr verwendet, sodass die Aktivierung und anschließende Diphosphat-Kupplung nun *in-situ* durchgeführt werden konnten. Um die Dimerbildung weiterhin zu reduzieren, wurde bei der Aufreinigung der eingesetzten Edukte (Phosphopantethein-Derivat und Diphosphat-Baustein) an einem Reversed-Phase-MPLC System auf einen TFA-Zusatz zu den Laufmitteln verzichtet und jegliche Feuchtigkeitsreste aus den Edukten am Feinvakuum entfernt. Da zudem festgestellt wurde, dass die aktivierte Zwischenstufe bei Zusatz von 3 Å Molekularsieb in der Reaktionslösung länger stabil war und das Molekularsieb zudem noch vorhandene Feuchtigkeitsreste binden sollte, wurde die Diphosphat-Kupplungsreaktion unter Einsatz von 3 Å Molekularsieb und unter inerter Atmosphäre durchgeführt. Außerdem wurde die Reaktionszeit der Diphosphat-Kupplung von 3-5 Tagen auf 18 Stunden verkürzt, damit das entstandene Produkt nicht so lange in der Reaktionslösung verblieb und möglichst schnell isoliert werden konnte. Die so optimierte Reaktionsführung (s. Schema 37) führte schließlich zu einer deutlichen Reduktion der Dimerbildung, sodass in der massenspektrometrischen Reaktionskontrolle nun das gewünschte Coenzym A-Derivat deutlich als Produkt detektiert wurde.



Schema 37. Optimierte Synthese der Diphosphat-Kupplung am Beispiel von Phosphopantethein-Derivat **83** und dem Diphosphat-Baustein **60**. Das Hauptprodukt bildet das gewünschte Produkt **129**, zu einem geringeren Anteil entstand weiterhin das Dimer **128**.

Die Dimerbildung konnte auch unter den optimierten Bedingungen nicht komplett unterdrückt, sondern nur in einem deutlichen Maßstab minimiert werden. So erlaubte diese

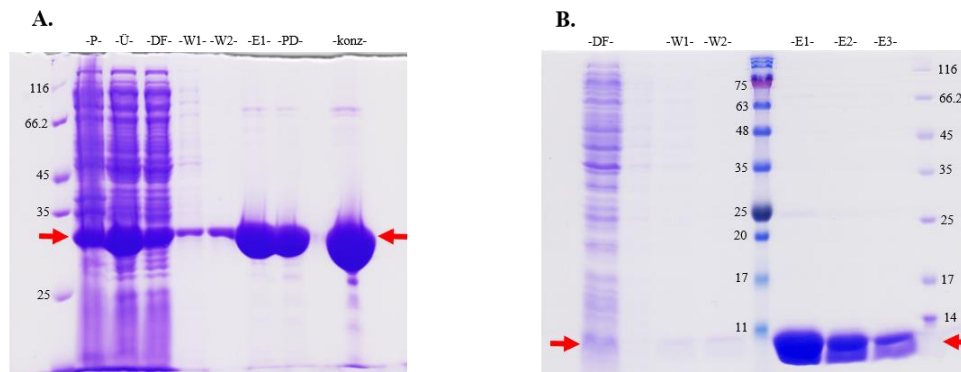


Abbildung 13. SDS-PAGE-Gele einer erfolgreichen Proteinaufreinigung **A.** der PPTase Sfp (27.20 kDa) und **B.** der CP-Domäne ComC-CP-1 (11.12 kDa). Es wurde der Protein-Standard Pierce™ Unstained Protein MW Marker (14.4-115 kDa) [Thermo Scientific] bzw. der Triple Color Protein Standard III (5-245 kDa) [SERVA] verwendet und folgende Proben der Proteinaufreinigung aufgetragen: Pellet (-P-), Überstand (-Ü-), Durchfluss (-DF-), Waschfraktionen 1-2 (-W1/2-), Elutionsfraktionen 1-3 (-E1/2/3-), entsalztes Protein (-PD-), aufkonzentriertes Protein (-konz-). Die Bande des gewünschten Proteins ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

3.6 CP-Beladungsassay mit CoA-Derivaten der ersten Generation

Die CP-Beladungsassays wurden in Anlehnung an die im Arbeitskreis unter Einsatz von CoA (**11**) bereits erfolgreich etablierten CP-Beladungsassays durchgeführt. Als Puffer diente dabei 50 mM Tris HCl mit Zusatz von 50 mM Magnesiumchlorid und mit einem pH-Wert von 7.5. Um eine optimale Temperatur für die Assays zu bestimmen, wurden zwei der synthetisierten CoA-Derivate (**134** und **136**) in destilliertem Wasser gelöst und 20 Minuten bei drei unterschiedlichen Temperaturen (25 °C, 30 °C und 37 °C) inkubiert. Im Anschluss wurden Massenspektren der Proben aufgenommen. Es wurde festgestellt, dass mit höherer Inkubationstemperatur das Hintergrundrauschen der massenspektrometrischen Analyse zunahm und dass nach einer Inkubation bei 37 °C die Masse des jeweiligen Substrats nicht mehr detektierbar war. Dies ließ darauf schließen, dass die hergestellten CoA-Derivate bei erhöhten Temperaturen weniger stabil waren. Da jedoch bei Einsatz der CoA-Derivate als unnatürlicher Substrate in der PPTase-Reaktion davon ausgegangen werden konnte, dass sich die Reaktionszeit im Vergleich zum nativen Substrat (CoA (**11**)) verlängern würde, musste eine möglichst lange Stabilität der CoA-Derivate in Lösung gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurden die CP-Beladungsassays bei einer Temperatur von 25 °C und einer Inkubationszeit von 15 Stunden durchgeführt. Die zu testenden CoA-Derivate wurden zum Assay-Ansatz als 2 mM oder 4 mM Lösungen in destilliertem Wasser mit einer Assaykonzentration von 100 µM zugesetzt. Der enzymatische Umsatz wurde mittels HPLC-MS verfolgt, wobei die mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ der Proteine detektiert wurden, da deren molare Massen für eine direkte Detektion mit dem verwendeten Massenspektrometer zu groß waren.

Neben den Assays mit den synthetisierten CoA-Derivaten wurde jeweils in Negativ-Kontrollen kein Substrat eingesetzt und so das *apo*-CP detektiert. In Positiv-Kontrollen fand das natürliche Substrat CoA (**11**) Verwendung.

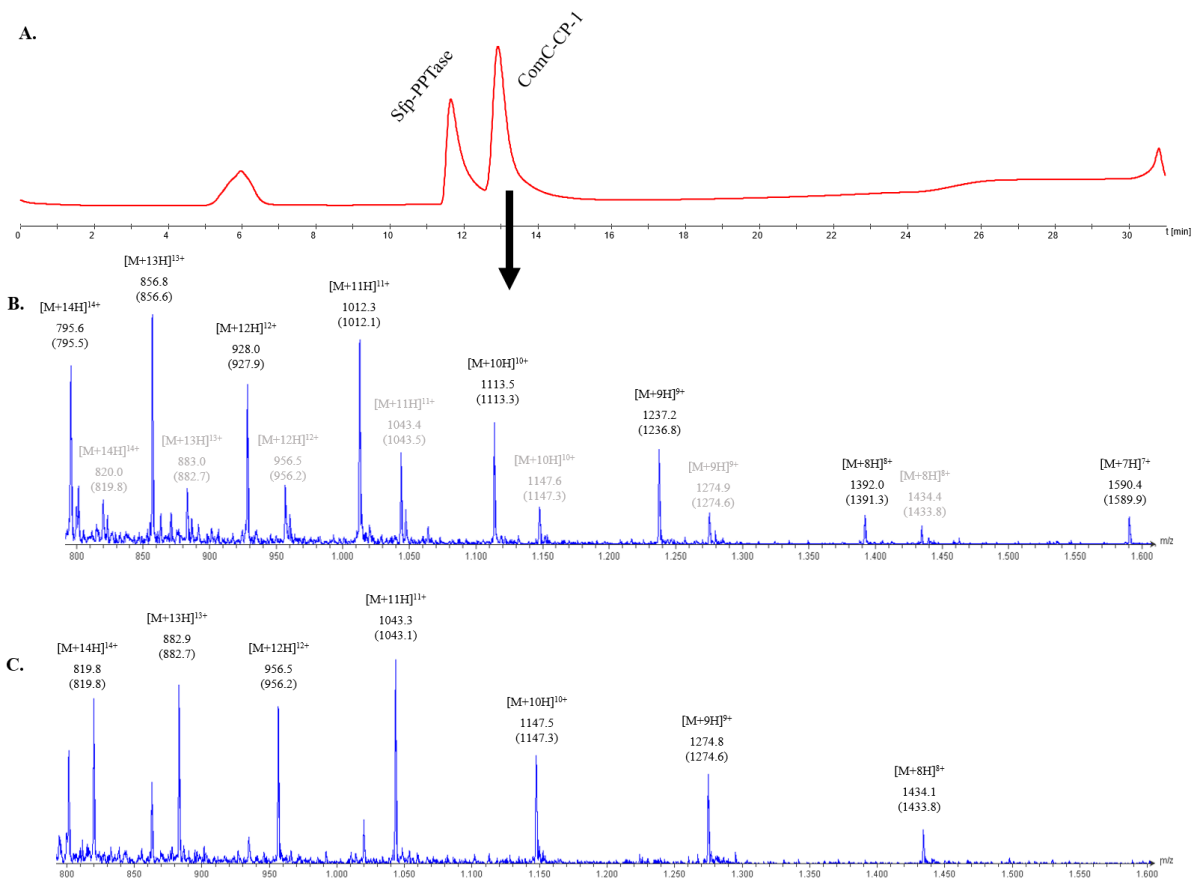


Abbildung 14. A. HPLC-Spur einer Negativkontrolle des CP-Beladungsassays. B. MS-Spur des HPLC-CP-Signals der Negativkontrolle. C. MS-Spur des HPLC-CP-Signals der Positivkontrolle mit CoA (**11**).

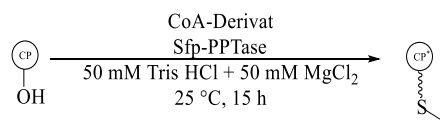
Die Negativkontrolle enthielt kein Substrat und die Positivkontrolle enthielt CoA (**11**) als Substrat. Die dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) bzw. dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind explizit beschriftet. Die grau beschrifteten Ionenpeaks in der Negativkontrolle entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

Während die HPLC-Spuren der Negativ- und Positiv-Kontrollen keinen Unterschied zeigten, war in der Massenspektrometrie des zum CP gehörenden HPLC-Signals eine deutliche Massenverschiebung zu detektieren, die einer Beladung des ComC-Carrier-Proteins mit der Phosphopanthetin-Gruppe des CoA (**11**) entsprach (vgl. Abbildung 14). Die detektierten mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ stimmten sehr gut mit den entsprechend berechneten Massen des *holo*-ComC-CP-1 überein. Bemerkenswert ist auch, dass die Negativkontrolle bereits einen geringen Anteil an *holo*-CP aufwies. Dieses entstand wahrscheinlich bereits bei der heterologen Enzymproduktion, wobei hier das CoA zu geringen Anteilen vermutlich durch die PPTase aus dem Fettsäuremetabolismus der *E. coli* Bakterien

auf das CP geladen wurde. Da die Beladungsexperimente unter Einsatz des natürlichen Substrats CoA (**11**) positiv verliefen, konnten im Folgenden die neu hergestellten CoA-Derivate untersucht werden.

Tabelle 3 zeigt zusammenfassend die Assay-Ergebnisse der getesteten CoA-Derivate.

Tabelle 3. Zusammenfassung der CP-Beladungsassay-Ergebnisse mit der ersten Generation von CoA-Derivaten. Bei erfolgter Beladung, ist der auf das CP übertragende Molkülteil farblich hervorgehoben.



Nr.	CoA-Derivat	Assay-Ergebnis
1	 128	keine Beladung
2	 129	keine Beladung
3	 131	keine Beladung
4	 132	keine Beladung
5	 133	keine Beladung
6	 136	falsche Beladung!
7	 137	falsche Beladung!
8	 134	minimale Beladung!
9	 130	Beladung!

Stellvertretend für alle Dimere, die in jeder Diphosphat-Kupplung als Nebenprodukte gebildet werden, wurde an dieser Stelle außerdem das Dimer **128** getestet. Dieses Molekül zeigte im CP-Beladungsassay (s. Anhang) erwartungsgemäß keinen Umsatz, was als möglicher Hinweis auf die essentielle Bedeutung der 3'-Phosphatgruppe im CoA-Molekül für die

Substraterkennung durch die Sfp-PPTase aufgefasst werden kann. Ebenso konnte für die Derivate **129**, **131**, **132** und **133** keine CP-Beladung (s. Anhang) nachgewiesen werden.

Interessanterweise wurde in CP-Beladungsassays mit den CoA-Derivaten **136** und **137** trotz des Fehlens einer freien terminalen Phosphatgruppe ein effektiver, Sfp-katalysierter Transfer beobachtet (s. Anhang). Überraschenderweise wurde jedoch nicht die gewünschte Phosphopantethein-Einheit übertragen, sondern die andere Diphosphat-Hälfte, die Modul 3 aus der Syntheseroute entspricht. Diese Reaktivität ist evtl. damit zu erklären, dass die Substratbindungskavität der Sfp-PPTase zu polar und zu klein ist für die recht apolaren und aromatischen Endbausteine der synthetisierten CoA-Derivate **136** und **137**. Aus diesem Grund wird der aromatische Endbaustein dieser Moleküle wahrscheinlich aus der Substratbindungskavität herausgedrängt, was zu einer falschen Orientierung der Diphosphat-Bindung in der Bindungstasche führt. Auch wenn somit nicht die gewünschten *holo*-CP-Derivate erhalten werden konnten, gaben die Experimente doch deutliche Hinweise, dass die Sfp-PPTase auch andere Substrate als das native CoA (**11**) umsetzen kann.

Erfreulicherweise konnte im Falle des CoA-Derivats **134** ein minimaler Umsatz (s. Anhang) detektiert werden. Der Einsatz von Molekül **130** als CoA-Derivat führte sogar, wie in Abbildung 15 gezeigt, zu einem kompletten Umsatz des *apo*-CPs zu einem *holo*-CP-Derivat. Da diese zwei Moleküle, **134** und **130**, jedoch aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt waren, konnten keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehung und eine sich daraus ableitende, zielgerichtete Strukturoptimierung gezogen werden.

Somit sollte im Folgenden eine zweite Generation an CoA-Derivaten zur Untersuchung in CP-Beladungsassays hergestellt werden. Hierbei sollten die gleichen Syntheseeinheiten als Modul 2 und 3 verwendet werden. In Modul 1 jedoch sollte eine andere Thiol-Schutzgruppe eingesetzt werden. Da die CP-Beladungsreaktion in Zukunft zur Generierung von bereits mit einem Substrat beladenen *holo*-CPs genutzt werden sollte, sollten nun in erster Linie größere, sperrige und aromatische Thiol-Schutzgruppen Verwendung finden. Solch eine Schutzgruppe sollte ein an das Thiol-Ende gebundenes Substrat imitieren und somit die angestrebte zukünftige Verwendungssituation simulieren. Zu diesem Zweck schien die Trityl-Schutzgruppe sehr gut geeignet.

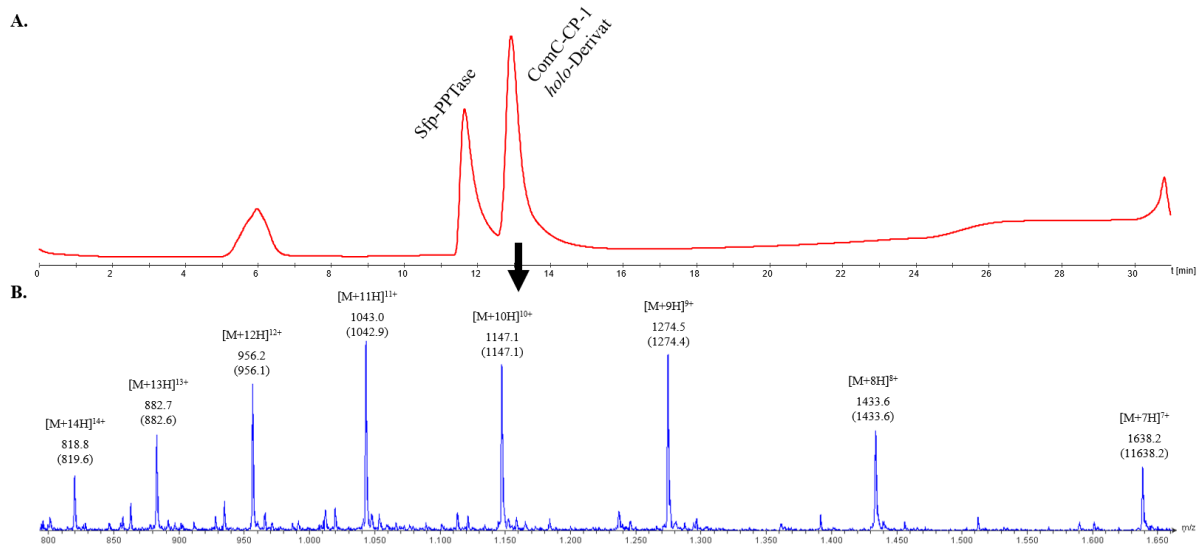


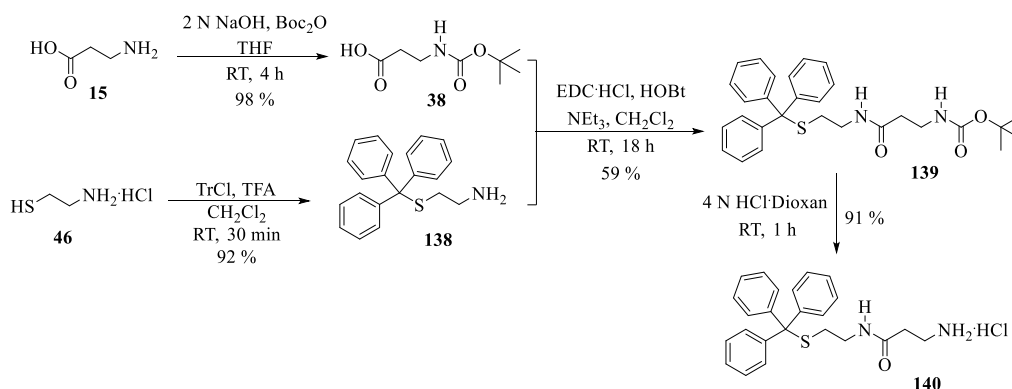
Abbildung 15.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **130** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-holo-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.46$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind explizit beschriftet. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

Im Folgenden sollte auch die Flexibilität des 3'-Phosphat-Mimetikums der CoA-Derivate eingeschränkt werden, um somit die Wechselwirkung dieser Einheit mit den entsprechenden Aminosäure-Resten innerhalb der Bindungstasche zu erleichtern und so eine möglichst effiziente CP-Beladung zu erzielen. Für diesen Zweck sollten als Modul 3 zusätzlich solche Substanzen Einsatz finden, deren Phosphat-Gruppen über ein Ringsystem verknüpft sind bzw. einen sperrigen Rest zwischen den Phosphat-Gruppen tragen und somit konformativ eingeschränkt sind.

3.7 Synthese & CP-Beladungsassays der zweiten Generation an CoA-Derivaten

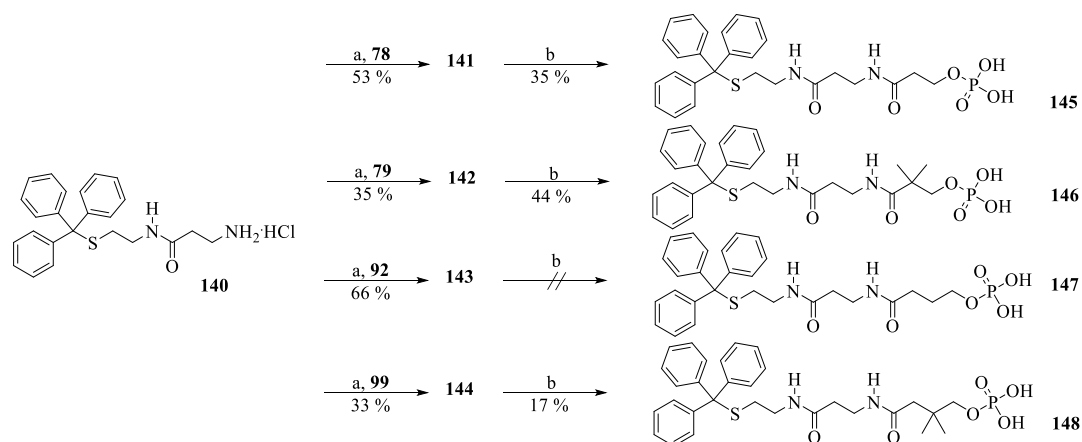
Als zweite Generation an CoA-Derivaten wurden Moleküle mit einer Trityl-Schutzgruppe an der terminalen Thiol-Einheit produziert. Es wurde hierzu die vorher erarbeitete modulare Syntheseroute verwendet, wodurch für die Module 2 und 3 auf die in Kapitel 3.2 beschriebenen Synthesebausteine zurückgegriffen werden konnte. Es ergab sich somit nur eine Modifizierung in Modul 1, wo statt des *S*-methylierten Cysteamins (**47**) nun *S*-Trityl-Cysteamin (**138**) in der Peptidkupplung eingesetzt werden sollte. Die Synthese von *S*-Trityl-Cysteamin (**138**) erfolgte in Anlehnung an A. L. Mandel *et al.*^[92] und konnte mit einer Ausbeute von 92 % durchgeführt werden.



Schema 39. Synthese des *S*-tritylierten Dipeptids **140**.

Die anschließende Kupplung mit *N*-Boc- β -Alanin (**38**) zum Dipeptid **139** sowie die darauffolgende Entschützung am *N*-Terminus zu **140** wurden analog zur Synthese von Dipeptid **49** aus Schema 15 durchgeführt (vgl. Schema 39). Auf diese Weise war bereits das für die modulare Syntheseroute notwendige Modul 1 ausgehend von β -Alanin (**15**) mit einer Gesamtausbeute von 53 % zugänglich.

Nun konnte dieses Dipeptid **140** mit den unterschiedlichen Phosphorsäuren aus Kapitel 3.2, die als Modul 2 auf der Syntheseroute dienen, in einer Peptidkupplungsreaktion unter Einsatz von EDC·HCl und HOBt zu den Molekülen **141-144** gekuppelt werden. Eine anschließende Entschützung der terminalen Phosphat-Einheiten ergab dann die gewünschten *S*-tritylierten Phosphopantethein-Derivate **145-148** (vgl. Schema 40), aus denen bereits durch Kupplung mit den Diphosphat-Bausteinen **60** und **72** CoA-Derivate der zweiten Generation generiert werden konnten. Da die Phosphat-Entschützung im Fall von Molekül **143** nicht zum gewünschten Produkt **147** führte, sondern zum Zerfall des Moleküls durch Trityl- oder *S*-Trityl-Cysteamin-Abspaltung, standen für die Darstellung der CoA-Derivate drei unterschiedliche Phosphopantethein-Derivate (**145**, **146** und **148**) zur Verfügung.

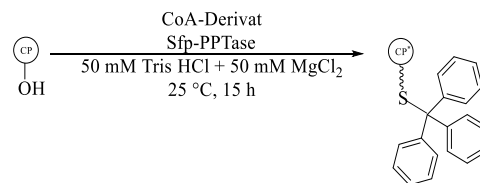


Schema 40. Synthese der *S*-tritylierten Phosphopantethein-Derivate **145-148**.

Reaktionsbedingungen: a) EDC·HCl, HOBt, NEt₃, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 18 h; b) 1. TMSBr, CH₂Cl₂, RT, 20 min; 2. MeOH/ 20 % dH₂O, RT, 2 h.

In Kombination mit den Diphosphat-Bausteinen **60** und **72** wurden zunächst die vier in Tabelle 4 gezeigten CoA-Derivate **149-152** hergestellt und in CP-Beladungsassays, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, untersucht.

Tabelle 4. Zusammenfassung der CP-Beladungsassay-Ergebnisse mit der zweiten Generation von CoA-Derivaten **149-152**. Das CoA-Derivat, das die besten Beladungsergebnisse lieferte, ist rot unterlegt. Bei erfolgter Beladung, ist der auf das CP übertragende Molkülteil farblich hervorgehoben. In Klammern ist die Ausbeute der Diphosphat-Kupplung verzeichnet.



Nr.	CoA-Derivat	Assay-Ergebnis
1	 152 (5 %)	keine Beladung
2	 150 (11 %)	anteilige Beladung!
3	 149 (36 %)	Beladung!
4	 151 (19 %)	Beladung!

Alle Derivate – ausser **152** – führten dabei im Assay zur Beladung der CP-Domäne (s. Anhang). Die besten Beladungsergebnisse wurden bei Einsatz von CoA-Derivat **151** erzielt, dessen Chromatogramm (Abbildung 16.A) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (vgl. Abbildung 14.A) nun drei Signale zeigte, wobei das neue Signal bei ca. 14 Minuten anhand seines Massenspektrums (Abbildung 16.C) dem mit dem gewünschten Phosphopantethein-Derivat beladenen *holo*-ComC-CP-1 (M = 11.67 kDa) zugeordnet werden konnte.

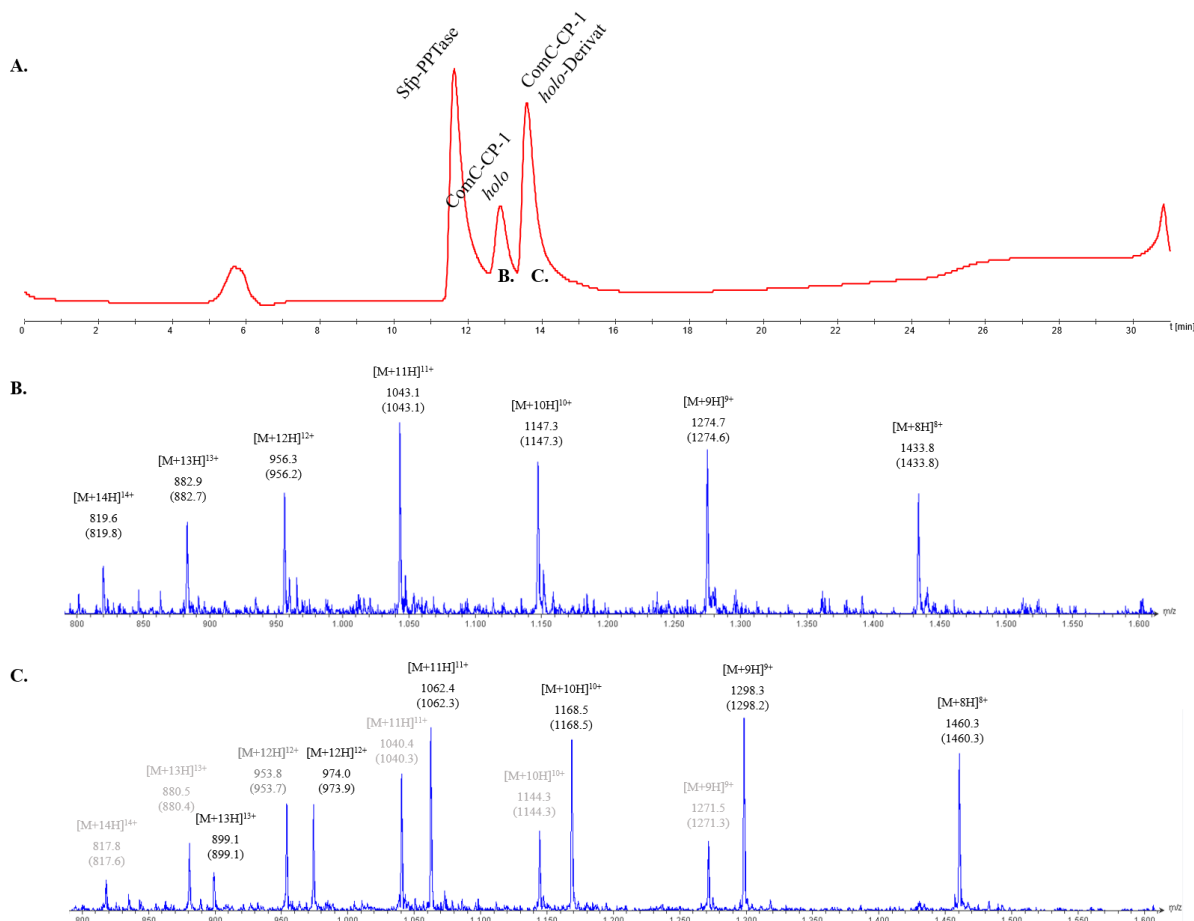


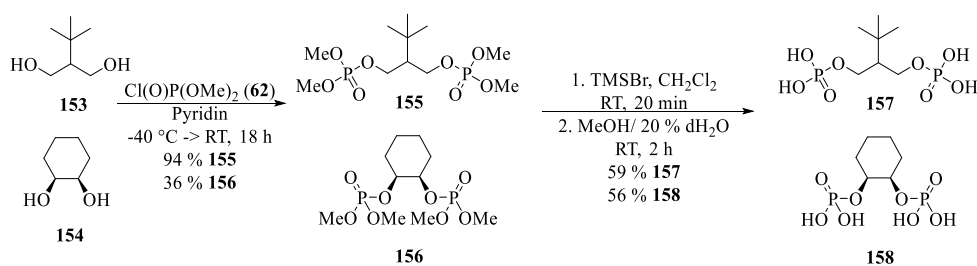
Abbildung 16. A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **151** als Substrat. B. MS-Spur des HPLC-holo-CP-Signals. C. MS-Spur des HPLC-holo-Derivat-CP-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa) bzw. dem *holo*-Derivat-ComC-CP-1 ($M = 11.67$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind explizit beschriftet. Die grau beschrifteten Ionenpeaks entstehen durch Abspaltung der Tritylgruppe und entsprechen dem *holo*-Derivat-ComC-CP-1 mit freier Thiolgruppe ($M = 11.43$ kDa). Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

Dieses Massenspektrum zeigte zusätzlich Ionenpeaks geringerer Intensität, die einem *holo*-Derivat-ComC-CP-1 mit freier Thiolgruppe ($M = 11.43$ kDa) zugeordnet werden konnten. Da die Tritylgruppe säurelabil ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass es im Laufe der HPLC-MS-Analytik, dessen Lösungsmittelsysteme mit TFA versetzt sind, zu einer Abspaltung der Tritylgruppe kam. Desweiteren konnte bei ca. 13 Minuten ein Signal im Chromatogramm detektiert werden, dessen Ionenpeaks auf ein mit dem nativen Phosphopantethin beladenen *holo*-ComC-CP-1 entsprach. Da Coenzym A (**11**) eine wichtige Rolle als Acyl-Träger im Fettsäuremetabolismus fast aller Organismen spielt, ist es wahrscheinlich, dass das hier detektierte *holo*-ComC-CP-1 bereits im geringen Maßstab bei der heterologen Enzymproduktion mit der aus dem Fettsäuremetabolismus der *E. coli* Bakterien stammenden PPTase mit Coenzym A (**11**) beladen wurde.

Da, wie bereits erwähnt, alle Derivate ausser Derivat **152** im Assay zur Beladung der CP-Domäne führten, und nur dieses Derivat einen C4-Baustein als Modul 2 enthielt, wurde der Schluss gezogen, dass ein C3-Baustein in Modul 2 die CoA-Derivate zu besseren Substraten in der PPTase-Reaktion macht. Ein Vergleich der Struktur der anderen CoA-Derivate (**149-151**) gab weitere Hinweise für eine Strukturoptimierung. Der strukturelle Unterschied zwischen den Derivaten **150** und **151** basierte ebenfalls auf unterschiedlichen Bausteinen in Modul 2, die zwar beide ein C3-Gerüst enthielten, jedoch wies Modul 2 von CoA-Derivat **151** noch eine Verzweigung in Form von zwei geminalen Methylgruppen auf. Dieses Strukturmotiv schien dafür verantwortlich zu sein, dass das CoA-Derivat **151** ein viel besseres Substrat in der PPTase-Reaktion darstellte als CoA-Derivat **150**. Dieser Schluss wurde auch durch die Struktur des CoA-Derivats **149** bestätigt, das ebenfalls die geminalen Methylgruppen im C3-Gerüst des Modul 2 enthielt und im Assay auch zu einer guten Beladung der CP-Domäne führte. Die beiden CoA-Derivate **149** und **151**, die sich in dieser Studie als die besten Substrate in der PPTase-Reaktion erwiesen, unterschieden sich in Modul 3, dem Diphosphat-Baustein. Während Modul 3 des CoA-Derivats **149** aus einem C3-Gerüst ohne Verzweigung bestand, enthielt das CoA-Derivat **151** ein C3-Gerüst mit geminalen Methylgruppen. Ein Vergleich der massenspektrometrischen Daten (s. Anhang) der beiden Assay-Ansätze zeigte, dass im Fall von CoA-Derivat **149** noch ein geringer Anteil an unbeladener CP-Domäne detektiert wurde, während dies bei CoA-Derivat **151** nicht der Fall war. Dies wurde als Hinweis gedeutet, dass auch eine Verzweigung in Modul 3 die CoA-Derivate zu geeigneteren Substraten in der PPTase-Reaktion machte.

An dieser Stelle sollten daher, wie bereits in Kapitel 3.6 beschrieben, noch weitere konformativ eingeschränkte Diphosphat-Bausteine in Modul 3 Verwendung finden und so der Einfluss der räumlichen Flexibilität der beiden Phosphatgruppen von Modul 3 auf die Substratbindung untersucht werden. Zur Synthese dieser Diphosphat-Bausteine wurden 2-(*tert*-Butyl)propan-1,3-diol (**153**) und (1*R*,2*S*)-Cyclohexan-1,2-diol (**154**) als Startmoleküle gewählt. Die beiden Hydroxylgruppen dieser Moleküle wurden zu **155** bzw. **156** phosphoryliert, die Phosphat-Schutzgruppen im Anschluss entfernt und so die gewünschten Diphosphat-Bausteine **157** und **158** erhalten (Schema 41).



Schema 41. Synthese der konformativ eingeschränkten Diphosphat-Bausteine **157** und **158**.

Unter Einsatz dieser Diphosphat-Bausteine wurden nun weitere CoA-Derivate (**159**, **160**) mit einer terminalen *S*-Trityl-Gruppe hergestellt (Abbildung 17). Hierfür wurde nur das Phosphopantethein-Derivat **146** verwendet, da die Assays aus Tabelle 4 zu dem Ergebnis führten, dass ein C3-Gerüst mit geminalen Methylgruppen als Modul 3 in der Struktur vorteilhaft für die PPTase-Reaktion ist.

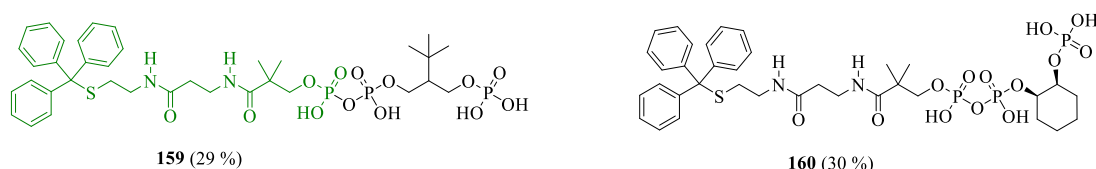


Abbildung 17. CoA-Derivate **159** und **160** mit konformativ eingeschränkten Diphosphat-Bausteinen. In Klammern sind die jeweiligen Ausbeuten in der Diphosphat-Kupplung verzeichnet. Bei erfolgter Beladung, ist der auf das CP übertragende Molekülteil farblich hervorgehoben.

Anschließend durchgeführte CP-Beladungsassays führten im Fall von CoA-Derivat **159** (s. Anhang) zu einer guten CP-Beladung, während im Fall von CoA-Derivat **160** keine Beladung stattfand. Möglicherweise ist im Fall von CoA-Derivat **160** die Flexibilität des Diphosphat-Bausteins zu stark eingeschränkt, sodass eine optimale Wechselwirkung mit den Aminosäure-Resten der Bindungstasche nicht gegeben ist.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der durchgeführten Assays eine Abstufung der Diphosphat-Bausteine nach ihrem Potential als mögliches Mimetikum in CoA-Derivaten zu dienen aufstellen (Abbildung 18). Es zeigt sich, dass sich sowohl eine zu starke konformative Einschränkung (Diphosphat **158**) als auch eine hohe konformative Flexibilität (Diphosphat **60**) der Diphosphat-Einheit negativ auf den Umsatz in der PPTase-Reaktion auswirken. Somit scheinen die beiden Diphosphat-Einheiten **157** und **72** die besten Strukturen für eine gute Wechselwirkung mit der Substratbindungstasche der PPTase aufzuweisen.

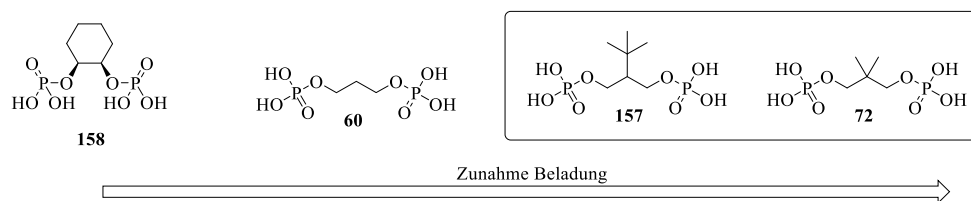


Abbildung 18. Abstufung der Diphosphat-Bausteine nach ihrem Potential als Mimetikum in CoA-Derivaten zu dienen. Die für die PPTase-Reaktion günstigsten Strukturmodule sind hervorgehoben.

Insgesamt lieferten die Untersuchungen der zweiten Generation an CoA-Derivaten, die alle durch ein *S*-trityliertes Cysteamin gekennzeichnet waren, gute Hinweise für eine möglichst optimale Struktur der CoA-Derivate. Somit wurde als Modul 2 die Phosphorsäure **80** priorisiert und als Modul 3 die beiden Diphosphat-Bausteine **157** und **72**, die beide eine Verzweigung zwischen den Phosphatgruppen tragen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten nun auf Basis der gefundenen optimalen Struktur motive weitere CoA-Derivate mit unterschiedlichen *S*-terminalen Substituenten hergestellt werden und in CP-Beladungsassays Anwendung finden, um so die gefundene optimale Struktur unter Beweis zu stellen.

3.8 Synthese weiterer CoA-Derivate auf Basis der optimierten Struktur

Um das in Kapitel 3.7 gefundene Konzept des Strukturaufbaus der CoA-Derivate auch mit anderen *S*-terminalen Substituenten verifizieren zu können, sollten mit jedem *S*-terminalen Substituenten zwei unterschiedliche CoA-Derivate hergestellt werden. Variante 1 sollte die optimal gefundene Struktur in der Diphosphat-Einheit tragen und somit zu einer guten CP-Beladung im Assay führen. Obwohl hierfür die zwei Diphosphat-Bausteine **72** und **157** gleich gut geeignet waren, wurde für die Synthesen Diphosphat-Baustein **72** gewählt, da dieses als Feststoff vorlag und somit leichter in der Diphosphat-Kupplung zu handhaben war. Variante 2 der neu zu synthetisierenden Derivate sollte einen Diphosphat-Baustein tragen, der die Struktur ungünstig für die CP-Beladung macht, daher wurde an dieser Stelle Diphosphat-Baustein **158** eingesetzt.

Als *S*-terminale Gruppen wurden unterschiedliche Schutzgruppen oder Substratmimetika verwendet, die in Abbildung 19 zusammengefasst sind. Neben großen aromatischen Gruppen wie 9-Fluorenylmethyl (Fm, **161**), wurden auch kleinere Substituenten wie Benzoyl (Bz, **162**) und Benzyl (Bn, **163**) gewählt. Da die CoA-Derivate im Anschluss zur Untersuchung von Aminosäuren in Enzymreaktionen dienen sollten, wurde an dieser Stelle auch die Aminosäure L-Phenylalanin (**164**) als *S*-terminale Gruppe gewählt, deren *N*-Terminus zunächst durch eine Acetyl-Schutzgruppe (**165**) maskiert wurde.

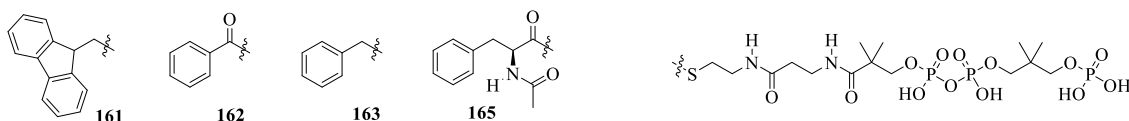
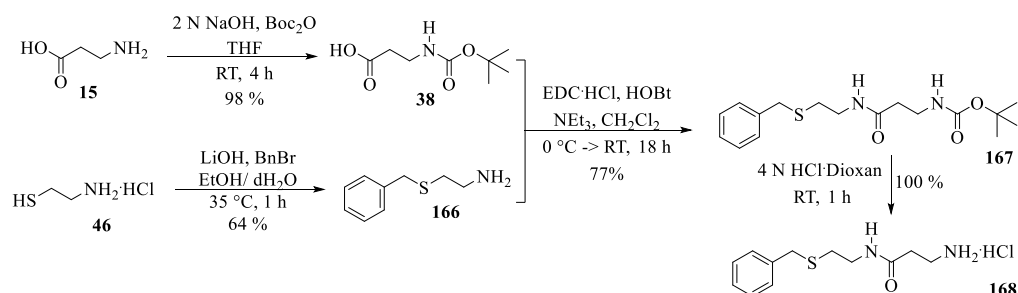


Abbildung 19. Unterschiedliche aromatische Substituenten für den *S*-Terminus.

Die Synthese dieser CoA-Derivate erfolgte erneut über die modulare Syntheseroute, wofür lediglich die mit den Substituenten **161-163** bzw. **165** modifizierten Cysteamin-Bausteine synthetisiert wurden, um in Modul 1 Verwendung zu finden.

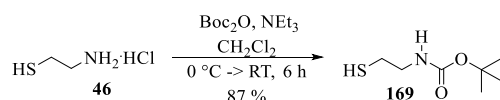
Die Benzylierung des Cysteamins (**46**) zu **166** konnte direkt in einer nukleophilen Substitutionsreaktion unter basischen Bedingungen erfolgen (Schema 42), sodass durch die anschließende Kupplung mit *N*-Boc- β -Alanin (**38**) zum Dipeptid **167** sowie die darauffolgende

Entschützung am *N*-Terminus das als *S*-Benzyl modifizierte Modul 1 **168** ausgehend von β -Alanin (**15**) mit einer Ausbeute von 75 % erhalten werden konnte.



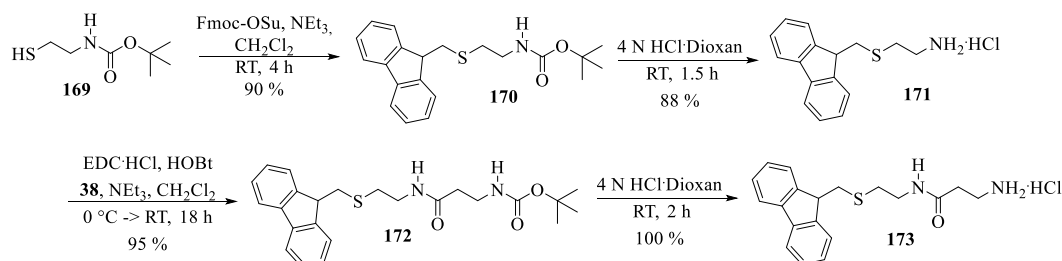
Schema 42. Synthese des Dipeptids **168**.

Die Einführung der anderen Substituenten hingegen bedurfte einer Maskierung der Aminofunktion am Cysteamin (**46**), um eine gerichtete Reaktion am *S*-Terminus zu ermöglichen. Zur Maskierung der Aminofunktion wurde die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) gewählt und die Reaktion zu **169** mit einer guten Ausbeute von 87 % durchgeführt (vgl. Schema 43).



Schema 43. Synthese von *N*-Boc-Cysteamin (**169**).

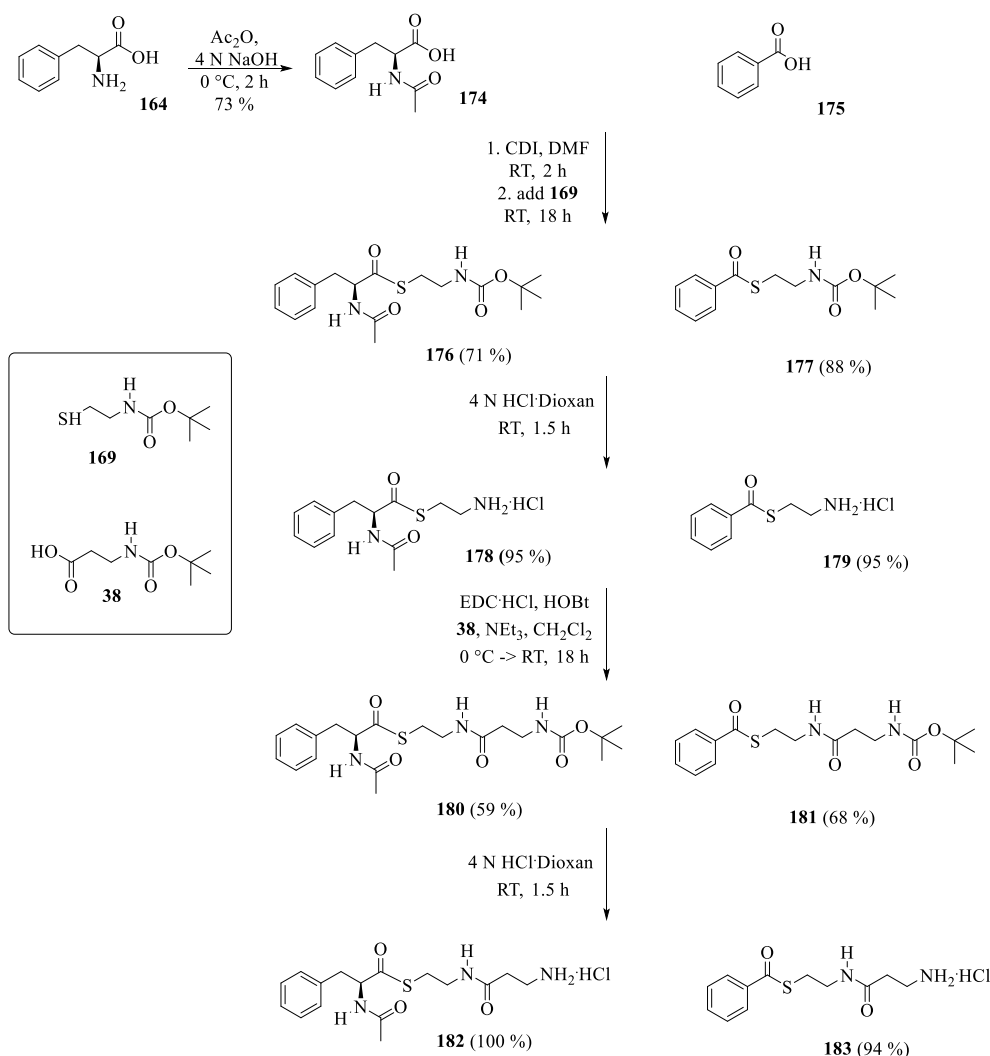
Die Synthese des *S*-Fm-Derivats erfolgte durch Reaktion von *N*-Boc-Cysteamin (**169**) mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid unter Einsatz von Triethylamin. Diese Reaktionsbedingungen führten zunächst zum *S*-Fmoc-Cysteamin, das nach einer Decarboxylierung^[125] das gewünschte *S*-Fm-*N*-Boc-Cysteamin (**170**) ergab (Schema 44). Nach einer anschließenden Entschützung des *N*-Terminus unter sauren Reaktionsbedingungen konnte das Produkt **171** mit *N*-Boc- β -Alanin (**38**) zum Dipeptid **172** gekuppelt werden. Nach einer erneuten *N*-terminalen Entschützung wurde das erhaltene Dipeptid **173** ausgehend von Cysteamin Hydrochlorid (**46**) mit einer Gesamtausbeute von 66 % erhalten und konnte nun ebenfalls als Modul 1 auf der modularen Syntheseroute eingesetzt werden.



Schema 44. Synthese des Dipeptids **173**.

Zur Einführung der Aminosäure L-Phenylalanin (**164**) als *S*-terminale Gruppe, sollte der *N*-Terminus dieser Aminosäure zunächst maskiert werden. Hierbei erfolgte die Einführung der

Acetyl-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen und führte zum gewünschten Produkt **174** (Schema 45).

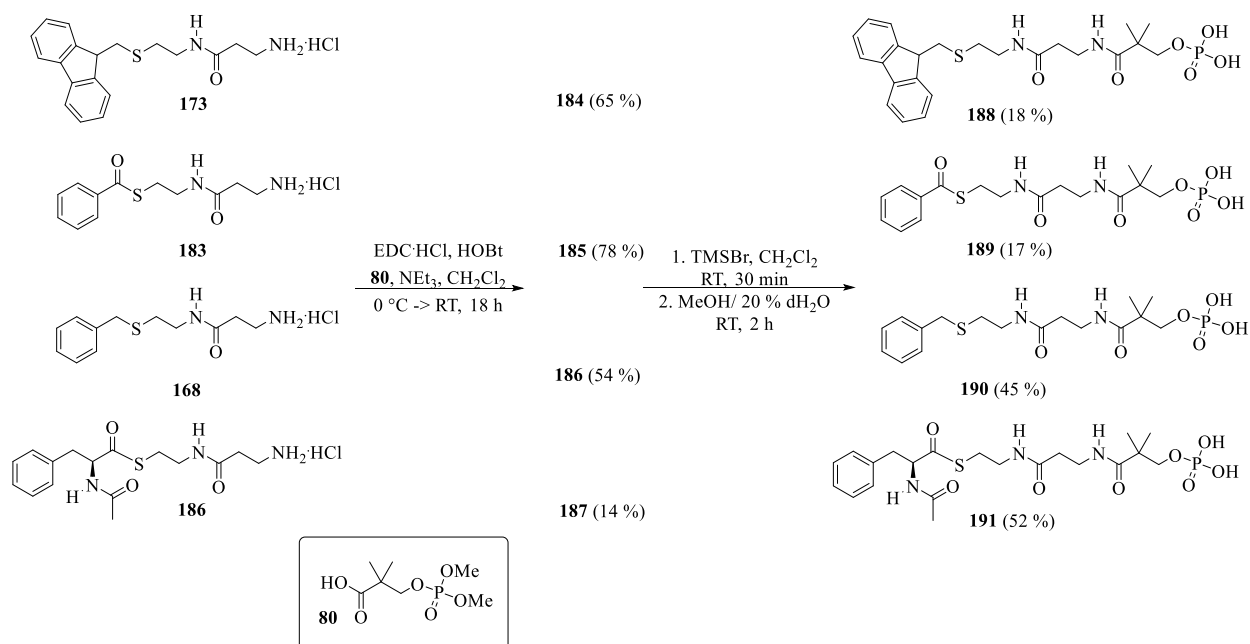


Schema 45. Synthese der Dipeptide **185-187**. In Klammern sind die Ausbeuten der jeweiligen Reaktion angegeben.

Wie in Schema 45 gezeigt, wurden nun sowohl der L-Phenylalanin-Baustein **174** als auch die Benzoesäure (**175**), die als Starteinheit zur Synthese des S-terminalen Benzoyl-Substituenten notwendig war, mit 1,1'-Carbonyldiimidazol aktiviert, um im Anschluss mit N-Boc-Cysteamin (**169**) gekuppelt zu werden. Die erhaltenen Produkte **176** bzw. **177** wurden dann am N-Terminus zu **178** bzw. **179** entschützt und, wie auch die anderen Derivate zuvor, mit N-Boc- β -Alanin (**38**) unter Einsatz von EDC-HCl und HOBT zu **180** bzw. **181** gekuppelt. Somit konnten nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe zwei weitere Dipeptide **182** und **183** erhalten werden, die als Modul 1 dienen konnten.

Nachdem schließlich vier unterschiedliche Dipeptide (**168**, **173**, **182** und **183**) synthetisiert wurden, konnten diese als Modul 1 mit Modul 2, in diesem Fall der Phosphorsäure **80**, unter Einsatz von EDC-HCl zu **184-187** gekuppelt werden. Die anschließende Phosphat-entschützung ergab dann Phosphopantethein-Derivate **188-191** mit vier unterschiedlichen

S-terminalen Substituenten (vgl. Schema 46), die für die Synthese von CoA-Derivaten mit den Diphosphat-Bausteinen **72** und **158** zur Verfügung standen.



Schema 46. Synthese der Phosphoantethin-Derivate **188-191**. In Klammern sind die Ausbeuten der jeweiligen Reaktion angegeben.

Alle gewünschten CoA-Derivate **192-199** waren über die Diphosphat-Kupplungsreaktion aus Kapitel 3.4 zugänglich und sind in Abbildung 20 zusammengestellt. In CP-Beladungsassays konnte das in Kapitel 3.7 gefundene Konzept des Strukturaufbaus der CoA-Derivate anhand aller dieser CoA-Derivate belegt werden. So war mit CoA-Derivaten, die den strukturell günstigeren Diphosphat-Baustein **72** beinhalteten (Abbildung 20.A), in allen Fällen ein enzymatischer Umsatz zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnten solche CoA-Derivate, die den strukturell ungünstigeren Diphosphat-Baustein **158** trugen (Abbildung 20.B), erwartungsgemäß nicht als Substrate in der PPTase-Reaktion dienen.

Mit der Synthese der in Abbildung 20 gezeigten CoA-Derivate konnte die gefundene, für eine erfolgreiche Beladung notwendige Teilstruktur der Derivate unter Beweis gestellt werden. Auf diese Weise konnte an dieser Stelle gleichzeitig gezeigt werden, dass die in den Enzymassays eingesetzte PPTase Sfp in der Lage ist, auch Moleküle, denen die Nucleosid-Struktur fehlt, als Substrate zu erkennen. Somit war es möglich, zum ersten Mal die Substraterkennung der Sfp-PPTase nicht nur anhand einer Modifizierung des Phosphoantethin-Arms sondern durch eine Modifizierung der Nucleosid-Struktur zu ergründen.

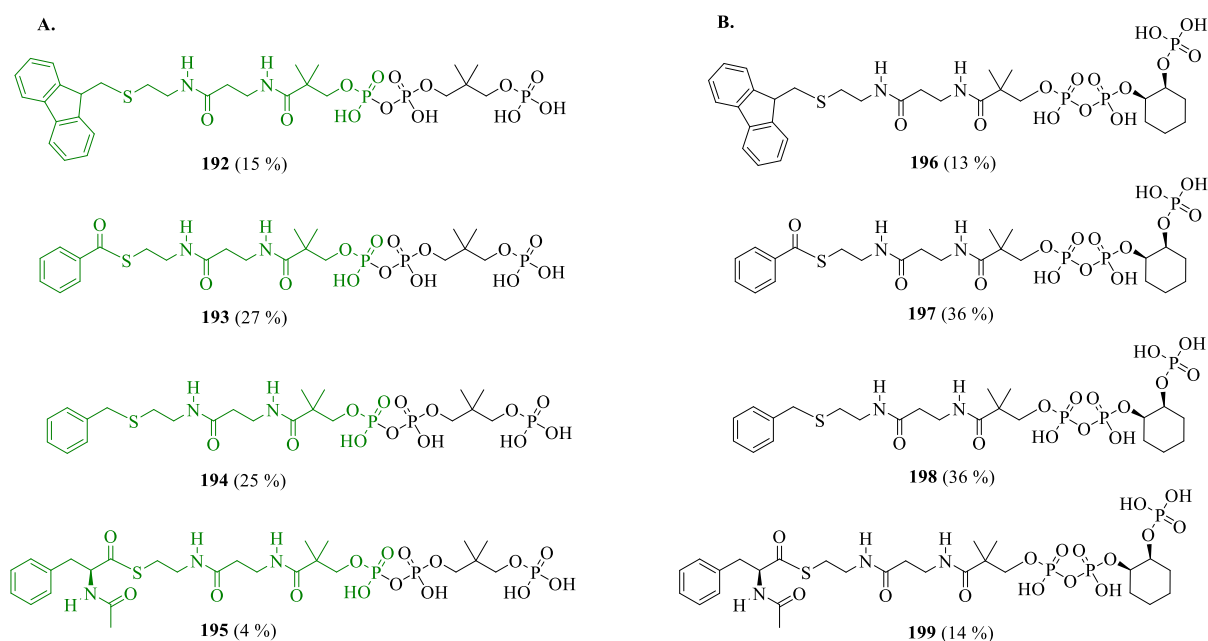


Abbildung 20. Überblick über die Derivate **192-199** mit modifizierter Thiol-Einheit. CoA-Derivate mit gleicher *S*-terminaler Modifikation aber unterschiedlichen Diphosphat-Bausteinen sind gegenübergestellt: **A.** CoA-Derivate mit dem strukturell günstigen Diphosphat-Baustein **72**. **B.** CoA-Derivate mit dem strukturell ungünstigen Diphosphat-Baustein **158**.

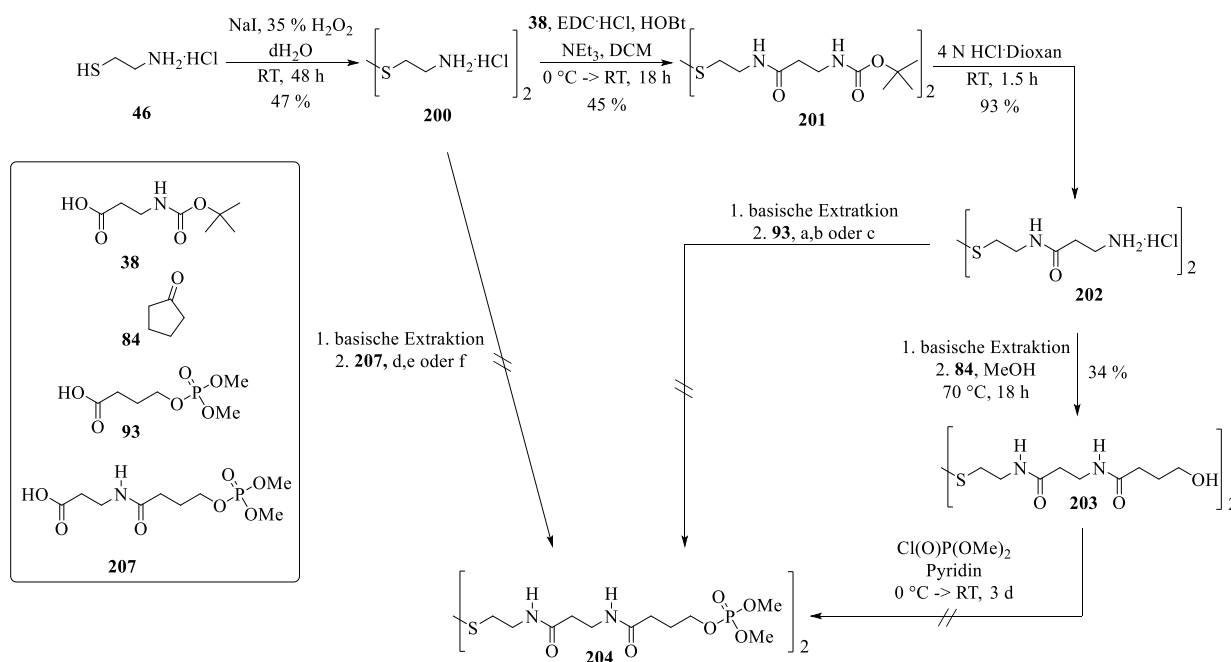
In Klammern sind die jeweiligen Ausbeuten in der Diphosphat-Kupplung verzeichnet. Bei erfolgter Beladung, ist der auf das CP übertragende Molkülteil farblich hervorgehoben.

Um jedoch eine reale Alternative für die native CoA-Struktur bieten zu können, ist der Zugang zu einer Struktur notwendig, die über eine freie Thiol-Gruppe verfügt. Aus diesem Grund wurden bereits parallel zur Etablierung der modularen Syntheseroute Experimente zur Einführung einer freien Thiol-Gruppe in die Phosphopantethein-Derivate durchgeführt.

3.9 Versuche zur Synthese von Phosphopantethein-Derivaten mit freier Thiol-Gruppe

Ein möglicher Ansatz zur Synthese von Phosphopantethein-Derivaten mit freier Thiol-Gruppe bestand in der Oxidation der Thioleinheit zum Disulfid. Diese Strategie hatte den Vorteil, dass bei erfolgreicher Durchführung der Synthese mit abschließender Reduktion des Disulfids zum Thiol nicht nur der Zugang zur freien Thiofunktion möglich wäre, sondern gleichzeitig auch zwei Äquivalente des gewünschten CoA-Derivats erhalten werden könnten.

Zur Verfolgung dieser Strategie wurde die Thiofunktion des Cysteamin Hydrochlorids (**46**) mit Wasserstoffperoxid zum Cystamin (**200**) oxidiert, es folgten eine Peptidkupplung mit *N*-Boc- β -Alanin (**38**) zu **201** und die saure Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zu **202** (Schema 47).



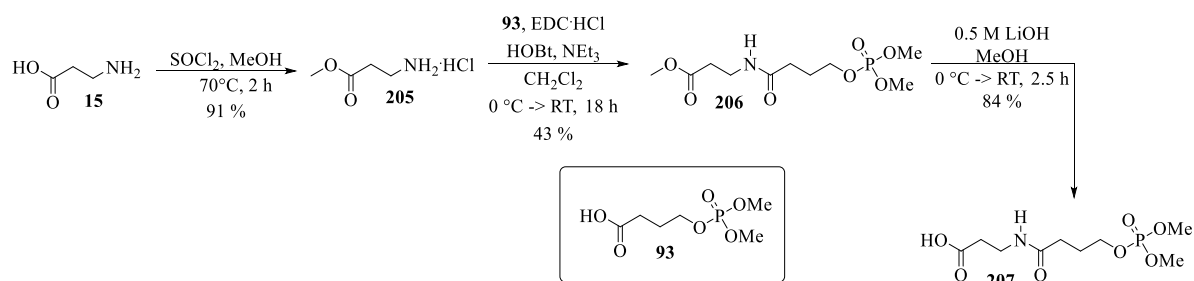
Schema 47. Synthese des Disulfids **212**.

Reaktionsbedingungen: a) EDC·HCl, HOBT, CH₂Cl₂/DMF, 0 °C → RT, 18 h; b) EDC·HCl, HOBT, NMM, CH₂Cl₂/DMF, 0 °C → RT, 18 h; c) 1. CDI, CH₃CN, RT, 2.5 h; 2. add **202**, RT, 18 h; d) EDC·HCl, HOBT, NEt₃, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 18 h; e) 1. CDI, NMM, CH₃CN, RT, 2.5 h; 2. add **200**, RT, 18 h; f) 1. CDI, DMF, RT, 2 h; 2. add **200**, RT, 18 h.

Das so erhaltene Disulfid **202** wurde zunächst durch basische Extraktion mit 1 M Natronlauge vom Hydrochlorid-Salz in das freie Amin überführt, um mit Lacton **84** zum Tripeptid **203** umgesetzt zu werden (Schema 47). Diese Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 34 % durchgeführt werden, allerdings gelang die anschließende Phosphorylierung der freien Hydroxylgruppe nicht, denn die massenspektrometrische Reaktionskontrolle zeigte an dieser Stelle nur die Masse des entsprechenden Edukts **203**. Aus diesem Grund wurde das Disulfid **202** direkt in einer Kupplungsreaktion mit der Säure **93** umgesetzt, wobei zunächst EDC·HCl und HOBT als Kupplungsreagenzien genutzt wurden. Da die Löslichkeit des Disulfids **202** in Dichlormethan, was als Lösungsmittel in der Kupplungsreaktion diente, eingeschränkt war, wurde die Reaktion in einem 1:1-Gemisch aus Dichlormethan und Dimethylformamid und dabei sowohl mit als auch ohne Zusatz der Base *N*-Methylmorpholin durchgeführt. Der Zugang zum gewünschten Produkt **204** war jedoch auch über diesen Weg nicht möglich. Hierbei wurde in den Ansätzen ohne Basen-Zusatz die Produktbildung in der Reaktionslösung zwar mittels Massenspektrometrie festgestellt, in der nachfolgenden Aufarbeitung und Aufreinigung mittels klassischer Säulenchromatographie oder MPLC konnte das Produkt jedoch nicht isoliert werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das gewünschte Produkt bei der wässrigen Extraktion der Reaktionslösung aufgrund seiner hohen Polarität ebenfalls in der wässrigen Phase verbleibt. In diesem Fall wären Reaktionsbedingungen von

Vorteil, bei denen möglichst wenig andere Reagenzien Einsatz finden und somit die Isolierung des Produkts direkt aus der Reaktionslösung, ohne weitere Extraktionsschritte, möglich wäre. Hierfür wurde als Aktivierungsreagenz 1,1'-Carbonyldiimidazol gewählt, was jedoch auch nicht das gewünschte Ergebnis lieferte. Problematisch an dieser Kupplungsreaktion war außerdem, dass aufgrund des dimeren Charakters des Disulfids **202** gleichzeitig zwei Peptidbindungen in einem Molekül aufgebaut werden mussten. Zusätzlich könnte die Kupplung dadurch erschwert gewesen sein, dass die bereits aus vier Einheiten bestehende Peptidkette des Disulfids **202** möglicherweise in Konformationen vorliegt, aus denen die beiden terminalen Amine nicht zugänglich sind.

Um dieses Problem zu umgehen, sollte auf das kleinere Disulfid **200** ausgewichen werden. Um dieses Disulfid in einer Kupplungsreaktion einsetzen zu können, musste zunächst das entsprechende zweite Edukt dieser Reaktion hergestellt werden. Hierfür wurde β -Alanin (**15**) zum Methylester **205** umgesetzt und unter Standardbedingungen mit der Säure **93** zu Molekül **206** gekuppelt (Schema 48). Nachdem der Methylester basisch hydrolysiert wurde, konnte die so frei gewordene Säurefunktion des Moleküls **207** mit den Aminogruppen des Cystamins (**200**) zur Reaktion gebracht werden (vgl. Schema 47). Um die Nukleophilie des Cystamins (**200**) zu erhöhen und das Molekül somit für die Kupplungsreaktion zu aktivieren, wurde auch **200** durch basische Extraktion aus dessen Hydrochlorid zum freien Amin überführt.



Schema 48. Synthese des Molekülteils **207**.

Die anschließende Peptidkupplung (Schema 47) sowohl unter Standardbedingungen als auch bei Einsatz des Aktivierungsreagenzes 1,1'-Carbonyldiimidazol in Dimethylformamid oder in Kombination mit der Base *N*-Methylmorpholin in Acetonitril, zeigte in der massenspektrometrischen Reaktionskontrolle die Masse des gewünschten Disulfid-Produkts **204**. Zusätzlich konnte jedoch auch die Masse des nur an einer Seite gekuppelten Disulfids **208** (s. Abbildung 21) detektiert werden, was erneut auf die Problematik der Peptidkupplung an zwei Stellen innerhalb eines Moleküls hindeutete.

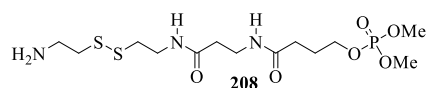
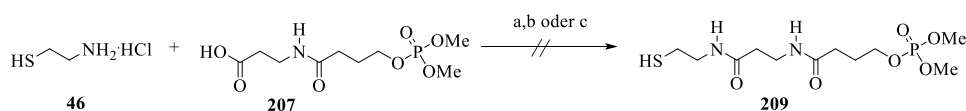


Abbildung 21. Nebenprodukt **208** der Peptidkupplung zwischen Disulfid **200** und Molekül **207**.

Da zudem anschließende Versuche das gewünschte Disulfid-Produkt **204** via Chromatographie zu isolieren nicht erfolgreich verliefen, sollte versucht werden, Phosphopantethein-Derivate mit freier Thiol-Gruppe ausgehend vom Cysteamin Hydrochlorid (**46**) herzustellen. Hierbei wurde Cysteamin Hydrochlorid (**46**) direkt mit Molekül **207** aus Schema 48 unter Einsatz von 1,1'-Carbonyldiimidazol in Dimethylformamid gekuppelt (Schema 49). In der massenspektrometrischen Reaktionskontrolle konnte dabei neben der Masse des gewünschten Reaktionsprodukts **209** auch das entsprechende Disulfid **204** detektiert werden, was darauf zurückzuführen war, dass entweder das Cysteamin (**46**) oder das Produkt **209** während der Reaktion zum entsprechenden Disulfid oxidiert wird. Zusätzlich war wieder das Nebenprodukt aus Abbildung 21 in der massenspektrometrischen Reaktionskontrolle zu beobachten. Um die Disulfidbildung in dieser Reaktion zu unterdrücken, wurde die Reaktion unter inerter Argon-Schutzgasatmosphäre durchgeführt und ein Reduktionsmittel in Form von Tributylphosphan^[126,127] zugesetzt. Auf diese Weise zeigte die anschließende massenspektrometrische Reaktionskontrolle nur noch die Masse des gewünschten Produkts **209**. Allerdings konnte die Isolierung des Produkts via unterschiedlicher Chromatographie-Methoden im Anschluss nicht erzielt werden, was möglicherweise daran lag, dass sich an Luft erneut Disulfide bildeten, deren Isolierung sich bereits im vorherigen Ansatz (Schema 47) als problematisch erwies.

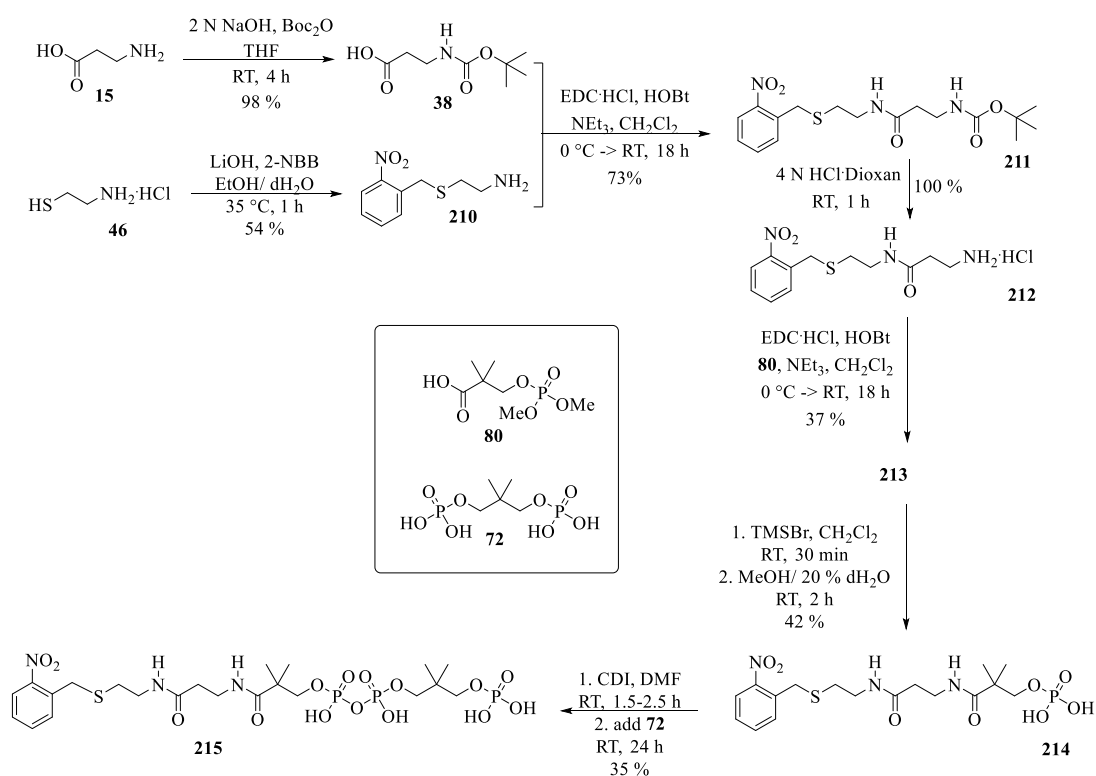


Schema 49. Synthese des Phosphopantethein-Derivats **209**.

Reaktionsbedingungen: a) 1. CDI, DMF, RT, 2 h; 2. add **46**, RT, 18 h; b) 1. CDI, CH₃CN, RT, 2 h; 2. add **46**, RT, 18 h; c) 1. CDI, DMF, RT, 2 h; 2. add **46**, *n*Bu₃P, DMF, RT, Argon, 18 h.

Die oben beschriebenen Versuche zeigten, dass eine Einführung einer freien Thiol-Gruppe zu Beginn der Synthese der CoA-Derivate mit Schwierigkeiten verbunden war, sodass nun ein weiterer Syntheseansatz getestet werden sollte, bei dem eine Thiol-Schutzgruppe eingeführt werden sollte, die erst am Ende der kompletten Syntheseroute der CoA-Derivate entfernt werden sollte. Die Spaltung solch einer Schutzgruppe sollte unter möglichst milden Bedingungen stattfinden, die kompatibel mit der in den CoA-Derivaten enthaltenen Diphosphat-Bindung wären. Eine interessante Möglichkeit wäre zum Beispiel eine photolabile Schutzgruppe.^[128–131] Es wurde die 2-Nitrobenzyl-Gruppe gewählt, die laut Literatur mit Licht

der Wellenlänge 300-400 nm abgespalten werden kann. Die Synthese eines CoA-Derivats mit solch einer *S*-terminalen 2-Nitrobenzyl-Gruppe wurde analog zur Synthese des CoA-Derivats mit einer *S*-terminalen Benzylgruppe (vgl. Schema 42) realisiert. Hierfür wurde in einer nukleophilen Substitution unter Einsatz von 2-Nitrobenzylbromid (2-NBB) die 2-Nitrobenzyl-Gruppe ins Cysteamin Hydrochlorid (**46**) eingeführt, sodass Molekül **210** entstand (Schema 50). Es folgte die Kupplung von **210** mit *N*-Boc- β -Alanin (**38**) zu **211** und die Entfernung der Boc-Schutzgruppe. Das resultierende Dipeptid **212** mit *S*-terminaler 2-Nitrobenzyl-Gruppe wurde ausgehend von Cysteamin Hydrochlorid (**46**) mit einer Ausbeute von 39 % erhalten. Im Weiteren wurde **212** mit der Säure **80** gekuppelt und die Phosphatgruppe im entstehenden **213** entschützt um so das Phosphopantethein-Derivat **214** zu erhalten. Eine Diphosphat-Kupplung mit dem Diphosphat-Baustein **72** führte schließlich zum gewünschten CoA-Derivat **215** mit *S*-terminaler 2-Nitrobenzyl-Gruppe. Im anschließenden CP-Beladungsassay konnte dieses Derivat erfolgreich als CoA-Ersatz dienen (s. Anhang), sodass nun die Photoreaktion zur Entfernung der Thiol-Schutzgruppe getestet werden konnte.



Schema 50. Synthese des CoA-Derivats **215**.

Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen verfolgt:

1. Das CoA-Derivat sollte zunächst in dem PPTase-Assay eingesetzt werden und zu erfolgreicher CP-Beladung führen. Im Anschluss sollte die Assay-Reaktionslösung 15 Minuten mit Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt werden.

2. Das CoA-Derivat sollte zuerst mit Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt werden, um so ein CoA-Derivat mit freier Thiol-Gruppe zu generieren, das ohne weitere Aufreinigung direkt im PPTase-Assay verwendet werden sollte.

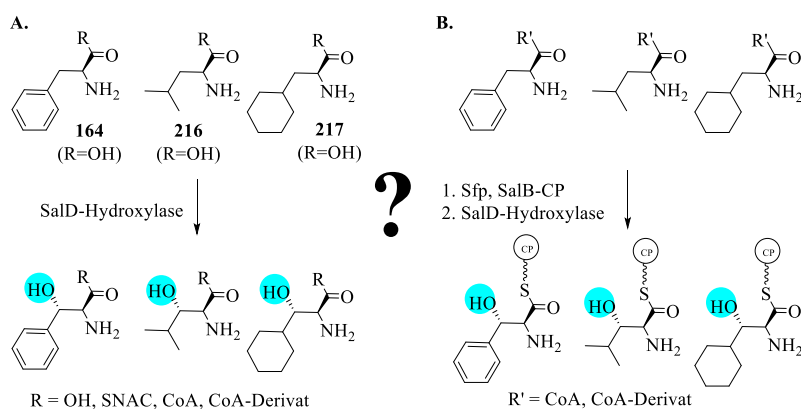
Zusätzlich zum hergestellten photolabilen CoA-Derivat **215** sollte auch das *S*-tritylierte CoA-Derivat **151** auf ähnliche Weise untersucht werden. Die Abspaltung der Trityl-Gruppe sollte dabei unter Zugabe von 5 % Trifluoressigsäure erfolgen.

Bei Einsatz des photolabilen CoA-Derivats **215** führte sowohl Methode 1 als auch Methode 2 zur Detektion des mit dem entsprechenden Phosphopantethein-Derivat beladenen CPs. Die Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe 2-Nitrobenzyl konnte also weder vor der CP-Beladung noch nach der CP-Beladung realisiert werden. Möglicherweise müsste für die Abspaltung der Schutzgruppe eine andere Lichtquelle mit anderer Leistung und anderem Lichtfilter gewählt werden. In dieser Arbeit wurde eine UV-Lampe mit der Wellenlänge 365 nm und einer Leistung von 4 W verwendet. In der Literatur wird oft eine leistungsstärkere UV-Quelle verwendet, z. B. mit 30 W in Kombination mit Wellenlängen von 290-380 nm.^[129,130] Desweiteren könnten auch andere Lösungsmittelsysteme wie z. B. verschiedene Puffer in dieser Reaktion untersucht werden.

Bei Einsatz des *S*-tritylierten CoA-Derivats **151** konnte mittels Methode 1 eine teilweise Abspaltung der Trityl-Gruppe detektiert werden. Dieses Ergebnis war ein guter Nachweis dafür, dass die Abspaltung der Trityl-Gruppe aus dem Molekül unter den gewählten Bedingungen möglich ist. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit TFA könnte möglicherweise zu einer kompletten Abspaltung der Trityl-Gruppe führen. Im Gegensatz dazu war die Reaktionsführung nach Methode 2 nicht erfolgreich. Die anschließende Analytik zeigte sogar, dass eine Beladung mit dem entsprechenden *S*-tritylierten Phosphopantethein-Derivat komplett ausblieb. Sehr wahrscheinlich denaturiert das nach Methode 2 in der Assay-Lösung vorhandene TFA die im Assay eingesetzten Proteine, wodurch diese inaktiv werden und nicht mehr katalytisch aktiv sind. Um jedoch das Derivat als reales CoA-Mimetikum einsetzen zu können, wäre Methode 2 besser geeignet, da hier zuerst eine freie terminale Thiol-Gruppe generiert wird, die dann mit gewünschten Aminosäuren oder Peptidketten aus unterschiedlichen NRPS-Systemen beladen werden kann, um im Anschluss in entsprechenden Assays untersucht zu werden. Da solch ein Zugang zu CoA-Derivaten mit freier Thiol-Gruppe zunächst nicht möglich war, die gefundene, alternative CoA-Struktur jedoch auch zur Untersuchung der SalD-Reaktion genutzt werden sollte, wurden CoA-Derivate hergestellt, die direkt mit den für die SalD-Reaktion relevanten Aminosäuren am terminale Thiol substituiert waren.

3.10 Arbeiten zur Untersuchung der SalD-Reaktion

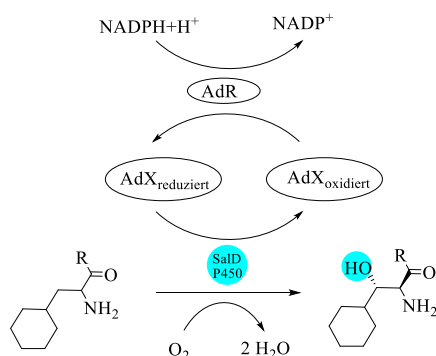
Wie bereits in Kapitel 2.3 erwähnt, ist das Enzym SalD eine Cytochrom-P450-Hydroxylase, die im Zuge der Biosynthese des Naturstoffs Salinosporamid A (**45**) die ungewöhnliche Aminosäure L-Cyclohexenylalanin an der β -Position stereoselektiv hydroxyliert.^[87,88] Mutasynthetische Untersuchungen zur Generierung neuer Salinosporamid-Derivate mit alternativen Aminosäurebausteinen haben bereits gezeigt, dass die SalD-Hydroxylase *in-vivo* in der Lage ist eine Vielfalt unterschiedlicher L-Aminosäuren stereoselektiv zu hydroxylieren.^[91] In Anlehnung an die Resultate dieser *In-vivo*-Experimente, sollten nun *In-vitro*-Studien mit unterschiedlichen Aminosäuren als potentielle Substrate der SalD-Hydroxylase durchgeführt werden. Es wurden hierfür die kommerziell erhältlichen Aminosäuren L-Phenylalanin (**164**), L-Leucin (**216**) und das dem natürlichen Substrat sehr ähnliche 3-Cyclohexyl-L-Alanin (**217**) gewählt. Alle diese Aminosäuren konnten bereits in den durchgeführten *In-vivo*-Experimenten zu entsprechend hydroxylierten Salinosporamid-Derivaten führen.^[91] Da bislang jedoch nicht bekannt ist, ob die Aminosäuresubstrate für den Umsatz mit der SalD-Hydroxylase in CP-gebundener Form vorliegen müssen, sollen nicht nur die nach PPTase-vermitteltem Transfer an CP gebundenen Aminosäuren (Schema 51.B) als Substrate in der SalD-Reaktion untersucht werden, sondern auch die freien, ebenso wie die als SNAC-Ester und CoA-Ester modifizierten Aminosäuren und die an das entwickelte CoA-Derivat gekoppelten Substrate (Schema 51.A).



Schema 51. Geplante Studien der SalD-Reaktion.

Zur Untersuchung der SalD-Reaktion sollen einerseits **A.** die freien Aminosäuren (L-Phenylalanin (**164**), L-Leucin (**216**) und 3-Cyclohexyl-L-Alanin (**217**)), deren SNAC-Ester, CoA-Ester und CoA-Derivat-Ester als Substrate eingesetzt werden. Andererseits sollen auch **B.** die CoA-Ester und CoA-Derivat-Ester der jeweiligen Aminosäuren zunächst in der PPTase-Reaktion eingesetzt werden, um entsprechende CP-gebundene Aminosäuren zu generieren, die im Anschluss als Substrate in der SalD-Reaktion untersucht werden sollen.

Um diese Studien durchführen zu können, mussten einerseits die SNAC-Ester, CoA-Ester und CoA-Derivat-Ester der entsprechenden Aminosäuren dargestellt werden. Desweiteren mussten auch die für die Studien notwendigen Enzyme heterolog produziert und aufgereinigt werden. Da die SalD-Hydroxylase zur Klasse der Cytochrom-P450-Enzyme gehört, besitzt dieses Enzym einen Häm-Komplex mit einem aktiven Eisen(III)-Zentrum als prosthetische Gruppe, an der die reduktive Spaltung von molekularem Sauerstoff stattfindet. Als Reduktionsmittel dient dabei das Coenzym $\text{NADPH}+\text{H}^+$, das über eine Flavoprotein-abhängige $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Oxidoreduktase und ein Eisen-Schwefel-Protein an das Cytochrom-P450-Enzym gekoppelt ist und somit das Cytochrom-P450-Enzym mit Reduktionsäquivalenten versorgt. Für die Studien der SalD-Reaktion mussten daher neben der Cytochrom-P450-SalD-Hydroxylase auch eine Flavoprotein-abhängige $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Oxidoreduktase und ein Eisen-Schwefel-Protein heterolog produziert und aufgereinigt werden. Es sollte hierfür das in der Arbeitsgruppe standardmäßig genutzte Elektronendonator-System bestehend aus den Proteinen Adrenodoxin-Reduktase (AdR) und Adrenodoxin (AdX) verwendet werden.^[132] Wie in Schema 52 zu sehen ist, soll dabei AdR Elektronen vom Coenzym $\text{NADPH}+\text{H}^+$ an das Eisen-Schwefel-Protein AdX weitergeben. AdX wiederum kann die Elektronen an das Cytochrom-P450-Enzym übertragen, sodass dessen aktives Eisen(III)-Zentrum innerhalb des Häm-Komplexes zu Eisen(II) reduziert wird und somit die Bindung und reduktive Spaltung von molekularem Sauerstoff möglich wird.



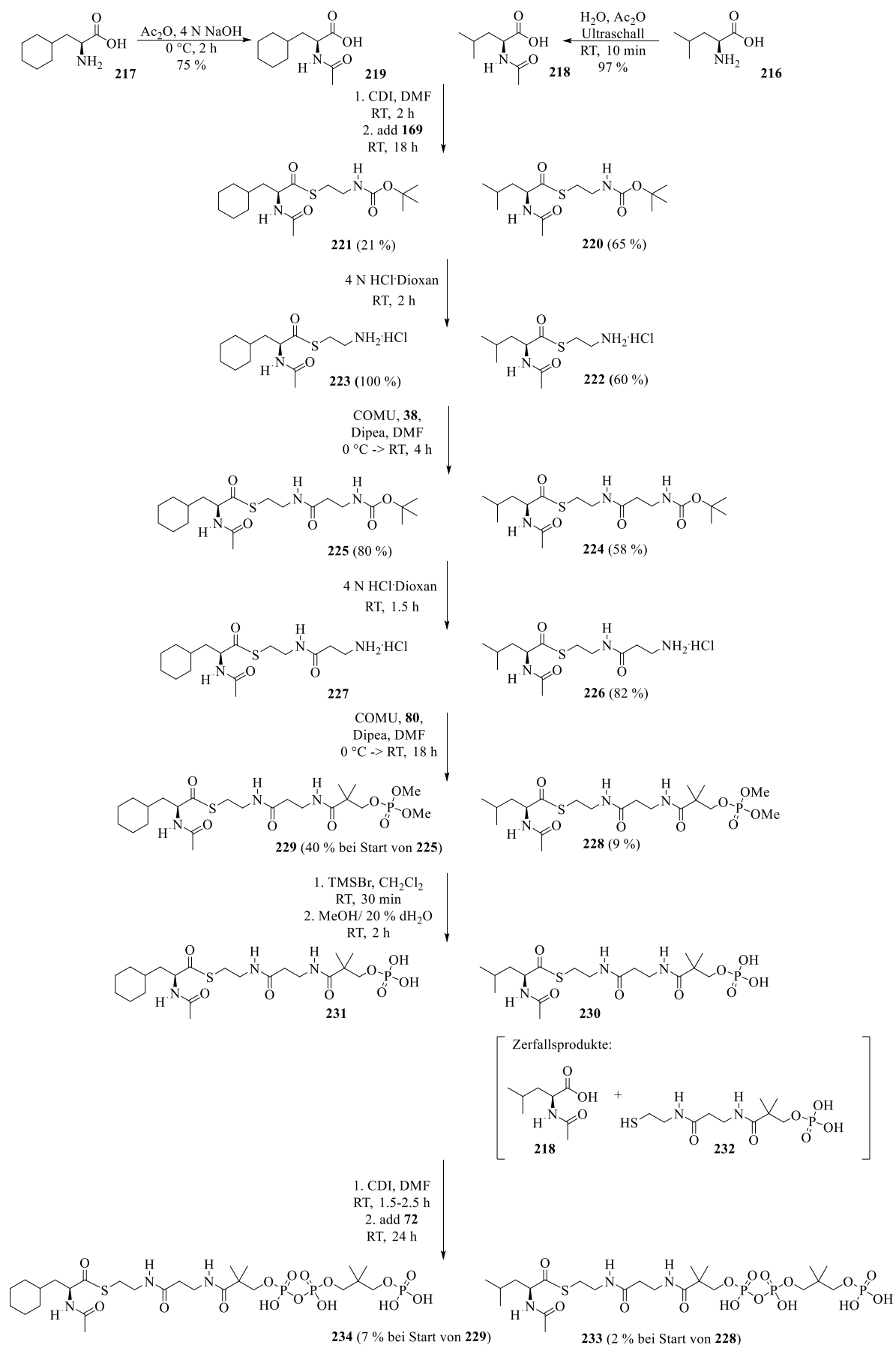
Schema 52. Für die SalD-Reaktion notwendiges Elektronendonator-System.

Zur Durchführung der geplanten Untersuchungen der SalD-Reaktion mit CP-geladenen Aminosäuren, war es auch von Vorteil, das aus dem nativen NRPS-System stammende Carrier-Protein SalB-CP einzusetzen. Aus diesem Grund sollte auch dieses Protein heterolog produziert und aufgereinigt werden.

3.10.1 Synthese der für die SalD-Reaktion relevanten CoA-Derivate

Zur Synthese der für die SalD-Reaktion relevanten CoA-Derivate sollten zunächst am *N*-Terminus acetylierte Aminosäuren Verwendung finden. Das CoA-Derivat mit einem *N*-acetylierten *L*-Phenylalanin am Thiol-Terminus (**195**) lag bereits vor (s. Kapitel 3.8) und der hierfür verwendete Syntheseweg sollte auf die gewünschten CoA-Derivate, die durch *N*-acetyliertes *L*-Leucin (**218**) bzw. 3-Cyclohexyl-*L*-Alanin (**219**) am Thiol-Terminus substituiert sind, übertragen werden.

Es erfolgte somit zunächst in beiden Aminosäuren die Einführung der Acetyl-Gruppe am *N*-Terminus (vgl. Schema 53). Die so erhaltenen *N*-acetylierten Aminosäuren **218** und **219** wurden dann mit 1,1'-Carbonyldiimidazol aktiviert und mit *N*-Boc-Cysteamin (**169**) zu **220** bzw. **221** gekuppelt. Es folgte die Abspaltung der Boc-Gruppe zu **222** bzw. **223** und die Kupplung mit *N*-Boc- β -Alanin (**38**) zu **224** bzw. **225**. Da die hier verwendeten Synthesebausteine im Vergleich zu bisherigen Synthesen über ein Stereozentrum verfügten, wurde an dieser Stelle statt der bisher verwendeten EDC·HCl und HOBt, COMU als Kupplungsreagenz in Kombination mit Diisopropylethylamin (Dipea) als Base in Dimethylformamid eingesetzt, wodurch einer möglichen Racemisierung am Stereozentrum entgegengewirkt werden sollte.^[133] Auch die neuen Kupplungsbedingungen führten zu den gewünschten Produkten **224** und **225** mit Ausbeuten von 58 % bzw. 80 %. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zu **226** bzw. **227**, wurden die neuen Kupplungsbedingungen auch für die Synthese der Phosphopantethein-Derivate **228** und **229** angewandt. Aus unbekanntem Gründen war der Zugang zu Molekül **228** an dieser Stelle nur mit einer sehr niedrigen Ausbeute von 9 % möglich, während die Synthese des mit *N*-acetyliertem 3-Cyclohexyl-*L*-Alanin substituierten Derivats **229** mit einer akzeptablen Ausbeute von 40 % verlief. Bei der anschließenden Entschützung der Phosphatgruppen zu **230** bzw. **231** unter Einsatz von Bromotrimethylsilan ergaben sich unerwartete Schwierigkeiten, da im Falle des mit *N*-Ac-*L*-Leucin substituierten Derivats **228** neben der Abspaltung der Phosphat-Schutzgruppen auch ein Zerfall des Produkts beobachtet wurde. Da diese Zerfallsprodukte jedoch nicht vom gewünschten Produkt **230** getrennt werden konnten, konnten diese nicht eindeutig identifiziert werden. Die NMR-Analytik des Produktgemisches ließ jedoch die Vermutung zu, dass es zur Abspaltung der *N*-acetylierten Aminosäure **218** kam, sodass sich als zweites Zerfallsprodukt das in Schema 53 gezeigte Molekül **232** ergeben würde. Da eine Auftrennung des Produktgemisches an dieser Stelle nicht möglich war, wurde beschlossen, direkt die Diphosphat-Reaktion durchzuführen, um im Anschluss eine Isolierung des gewünschten CoA-Derivats mittels semi-präparativer HPLC zu erzielen.



Schema 53. Synthese der für die SaLD-Reaktion relevanten CoA-Derivate **233** und **234**.

In Klammern sind die Ausbeuten der jeweiligen Reaktion angegeben.

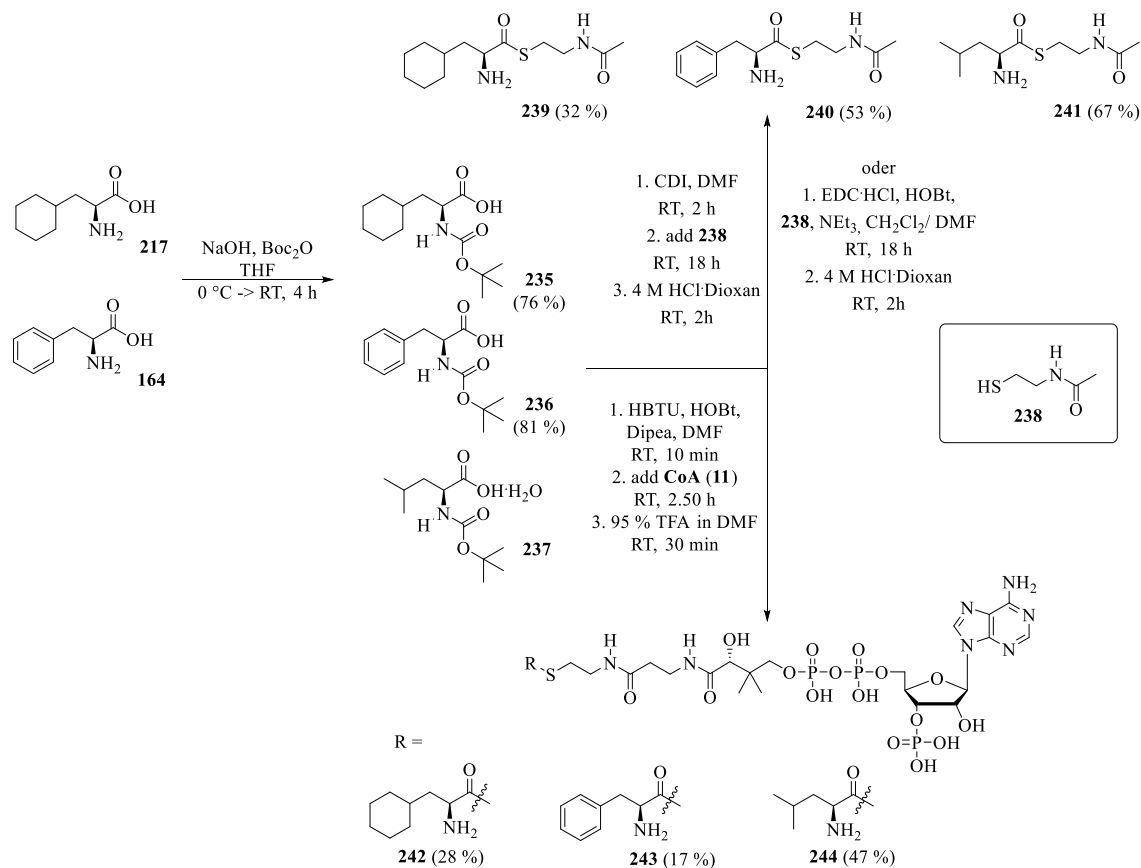
Die Diphosphat-Reaktion wurde unter Einsatz des Diphosphat-Bausteins **72** durchgeführt und die Produkte **233** und **234** konnten erfolgreich isoliert werden. Im Anschluss konnte auch mit diesen neu erhaltenen CoA-Derivaten **233** und **234** eine erfolgreiche CP-Beladung auf das ComC-CP-1 mittels der PPTase Sfp durchgeführt werden (s. Anhang). Zusammen mit dem bereits vorhandenen CoA-Derivat **195** standen nun die drei für die Untersuchung der SalD-Reaktion notwendigen CoA-Derivat-Substrate zur Verfügung.

3.10.2 Synthese der SNAC- und CoA-Substrate für die SalD-Reaktion

Die Synthese der SNAC- und CoA-Substrate sollte auf Basis der gleichen drei Aminosäuren erfolgen, die auch für die Synthese der entsprechenden CoA-Derivate (s. Kapitel 3.10.1) Verwendung fanden. Die Durchführung der Synthesen erfolgte in Anlehnung an in der Literatur dargestellte Reaktionen von D. E. Ehmann *et al.* für die SNAC-Substrate und M. Strieker *et al.* für die CoA-Substrate.^[134,135]

Zu Beginn wurden, wie in Schema 54 gezeigt, die beiden Aminosäuren 3-Cyclohexyl-L-Alanin (**217**) und L-Phenylalanin (**164**) am *N*-Terminus mit einer Boc-Schutzgruppe versehen, sodass die Moleküle **235** bzw. **236** entstanden. Die dritte Aminosäure *N*-Boc-L-Leucin (**237**) konnte kommerziell erworben werden und war somit für weitere Synthesen bereits verfügbar. Zur Kupplung der Aminosäuren an *N*-Acetyl-Cysteamin (SNAC, **238**) wurden zwei unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet: zum einen wurde diese Kupplung unter Einsatz der Standardkupplungsreagenzien (EDC·HCl, HOBT, NEt₃) durchgeführt, zum anderen wurde die Reaktion auch unter Aktivierung der Aminosäure mit 1,1'-Carbonyldiimidazol und anschließender Zugabe von *N*-Acetyl-Cysteamin (**238**) durchgeführt. Am Beispiel von *N*-Boc-L-Leucin (**237**) als Startmolekül führten beide Syntheserouten zum gewünschten Produkt und ergaben ähnliche Ausbeuten von 62 % bei Einsatz von EDC·HCl, HOBT und Triethylamin bzw. 57 % bei Einsatz von CDI. Da an dieser Stelle beide Syntheserouten für die Darstellung der SNAC-Substrate Verwendung finden konnten, erfolgte die Kupplung der Aminosäuren **235** und **236** mit *N*-Acetyl-Cysteamin (**238**) durch Aktivierung mit CDI, sodass nach anschließender Entschützung der Aminosäuren am *N*-Terminus die SNAC-Substrate **240** und **241** mit Ausbeuten von 53 % bzw. 67 % zugänglich waren. Die Kupplung der dritten Aminosäure *N*-Boc-3-Cyclohexyl-L-Alanin **235** erfolgte unter Einsatz von EDC·HCl und HOBT als Kupplungsreagenzien und führte nach Entschützung am *N*-Terminus ebenfalls zum gewünschten SNAC-Substrat **239**. Die Ausbeute dieser Reaktionssequenz lag allerdings bei 32 %. Die vergleichsweise geringe Ausbeute lässt sich damit erklären, dass die Kupplung der Aminosäure mit SNAC entweder nicht vollständig verlief oder dass es nach erfolgreicher

Kupplung zu erneutem Zerfall des Produkts in die beiden Edukte kam, denn nach der ersten Aufreinigung des Rohprodukts konnte im NMR immer noch ein bedeutender Anteil an freier Aminosäure **235** detektiert werden, der im Anschluss durch Aufreinigung mittels MPLC und schließlich sogar durch semi-präparative HPLC entfernt werden musste.



Scheme 54. Synthese der SNAC- und CoA-Derivate (**239-241** und **242-244**) für die SalD-Reaktion.

In Klammern sind die Ausbeuten der jeweiligen Reaktion angegeben.

Der zweite Teil von Schema 54 zeigt die Umsetzung der am *N*-Terminus geschützten Aminosäuren zu den jeweiligen CoA-Substraten **242-244**. Dafür wurden diese Aminosäuren zunächst mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat (HBTU) und Diisopropylethylamin aktiviert und im Anschluss mit Coenzym A (**11**) versetzt. Die anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte an dieser Stelle gemäß der Literatur^[135] unter Einsatz von 95 % Trifluoressigsäure in Dimethylformamid. Auch in diesem Fall konnten die drei gewünschten CoA-Substrate **242-244** erfolgreich synthetisiert werden. Somit standen nun sowohl die notwendigen SNAC-Substrate **239-241** als auch die CoA-Substrate **242-244** der drei Aminosäuren 3-Cyclohexyl-L-Alanin (**217**), L-Leucin (**216**) und L-Phenylalanin (**164**) für weitere Studien in den SalD-Hydroxylierungsassays zur Verfügung.

3.10.3 Heterologe Produktion der Enzyme für die SalD-Reaktion

Die Klonierungsarbeiten zur heterologen Produktion der Enzyme wurden durch Mitarbeiter des Arbeitskreises durchgeführt, sodass in dieser Arbeit die bereits vorhandenen Expressionskonstrukte genutzt werden konnten.

Zunächst sollte die Hydroxylase SalD heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert werden. Unter Einsatz der dokumentierten Expressionsbedingungen (Proteinproduktion in TB-Medium bei 37 °C und 200 rpm für 4.5 Stunden nach Induktion mittels IPTG bei $OD_{600} = 0.6$) konnte jedoch kein lösliches Protein erhalten werden. Wie das SDS-PAGE-Gel in Abbildung 22.A zeigt, war eine Bande, die der Größe der SalD-Hydroxylase ($M = 46.08$ kDa) entspricht, nur im Pellett zu beobachten. Die Expressionsbedingungen mussten somit durch Variation der Expressionstemperatur, der Medienzusammensetzung, des Expressionsstamms sowie der Expressionsdauer optimiert werden. In Tabelle 5 sind alle getesteten Expressionsbedingungen zusammengefasst.

Zunächst wurde die Proteinproduktion im kleinen Maßstab im Autoinduktionsmedium ZYM bei vier unterschiedlichen Temperaturen getestet, wobei bei niedrigerer Temperatur eine längere Expressionsdauer gewählt wurde (s. Tabelle 5). Nach der Zellyse zeigte die anschließende SDS-PAGE-Analytik (vgl. Abbildung 22.B), dass eine Proteinproduktion im Autoinduktionsmedium ZYM bei allen getesteten Temperaturen einen Anteil an löslichem Protein ergab. Allerdings ergab die Probe, bei der die Proteinproduktion bei 20 °C für 18 Stunden erfolgt war, die intensivste Bande bei der gewünschten Proteingröße, sodass diese Bedingungen am besten für die Proteinproduktion von SalD geeignet wären.

Tabelle 5. Zusammenfassung der getesteten Expressionsbedingungen zur Produktion der SalD-Hydroxylase.

Expressionsstamm	Medium	Temperatur	Dauer	Ergebnis
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	TB-Medium	37 °C	4.5 h	unlösliches Protein
		37 °C	5 h	wenig lösliches Protein
	ZYM-Medium	28 °C	8.5 h	wenig lösliches Protein
		20 °C	18 h	anteilig lösliches Protein
<i>E. coli</i> SoluBL21 TM	LB-Medium	16 °C	18 h	anteilig lösliches Protein
		25 °C	5 h	wenig lösliches Protein
			18 h	anteilig lösliches Protein

Parallel hierzu wurde für die Proteinproduktion von SalD auch der Expressionsstamm *E. coli* SoluBL21TM getestet, der speziell für die Produktion von in *E. coli* BL21(DE3) als nicht löslich erhaltene Proteine optimiert wurde. In diesem Fall wurde LB-Medium verwendet, die Proteinproduktion mittels IPTG bei $OD_{600} = 0.6$ induziert und bei 25 °C für 5 bzw. 18 Stunden

inkubiert. Wie das SDS-PAGE-Gel in Abbildung 22.C zeigt, konnte dabei nach 5 Stunden nur sehr wenig lösliches Protein erhalten werden. Im Vergleich dazu, war der Anteil an löslichem Protein nach 18 Stunden deutlich größer.

Die Proteinproduktion von SalD in großem Maßstab mit anschließender Proteinaufreinigung (s. Kapitel 6.5) wurde schließlich im Autoinduktionsmedium ZYM bei 20 °C und 18 Stunden durchgeführt. Wie bereits erwähnt, gehört die SalD-Hydroxylase zu den Cytochrom-P450-Enzymen, die im aktiven Zentrum einen Häm-Komplex mit einem Eisen(III)-Zentrum besitzen. Um nach der Proteinaufreinigung ein aktives Protein zu erhalten, wurde daher im Laufe der Aufreinigung eine Rekonstitution der SalD-Hydroxylase durch Inkubation in einer Haeminchlorid-Lösung durchgeführt (vgl. Kapitel 6.5.5). Eine anschließende SDS-PAGE-Analytik zeigte den Erfolg der durchgeführten Proteinaufreinigung (s. Abbildung 22.D). Die Hydroxylase SalD wurde dabei als rötliche Lösung mit einer Konzentration von 0.25 mM erhalten.

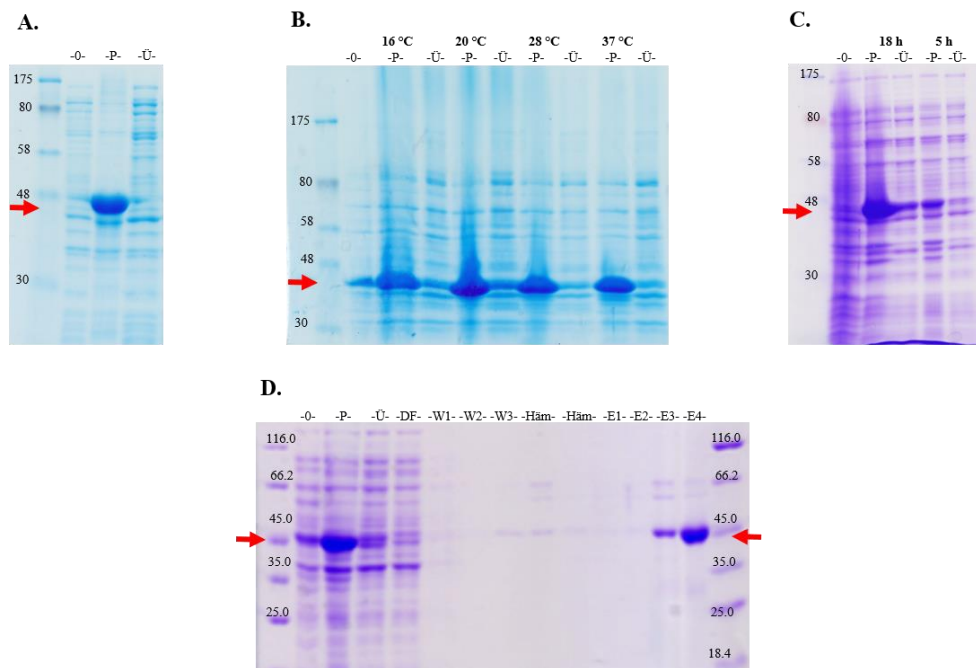


Abbildung 22. SDS-PAGE-Gel der SalD-Proteinproduktion in **A.** *E. coli* BL21(DE3) in TB-Medium bei 37 °C, für 4,5 Stunden nach Induktion mittels IPTG, sowie **B.** *E. coli* BL21(DE3) im Autoinduktionsmedium ZYM bei vier unterschiedlichen Temperaturen und **C.** *E. coli* SoluBL21™ in LB-Medium bei 25 °C für 5 bzw. 18 Stunden nach Induktion mittels IPTG und **D.** *E. coli* BL21(DE3) im Autoinduktionsmedium ZYM bei 20 °C für 18 Stunden. Es wurde der Protein-Standard ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) [New England Biolabs] und der Protein-Standard Pierce™ Unstained Protein MW Marker (14.4-115 kDa) [Thermo Scientific] verwendet und folgende Proben aufgetragen: vor Induktion (-0-), Pellet (-P-), Überstand (-Ü-), Durchfluss (-DF-), Waschfraktionen 1-3 (-W1/2/3-), Rekonstitution mit Haeminchlorid (-Häm-), Elutionsfraktionen 1-4 (-E1/2/3/4-). Die Bande des gewünschten Proteins SalD (M = 46,08 kDa) ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Schließlich wurden auch die beiden zum Elektronendonator-System gehörenden Proteine Adrenodoxin-Reduktase (AdR) und Adrenodoxin (AdX) aus bereits durch Mitarbeiter des Arbeitskreises zur Verfügung gestellten Bakterienpellets nach Standardprotokoll (s. Kapitel 6.5) aufgereinigt. Die Adrenodoxin-Reduktase AdR konnte dabei als leicht gelbe Lösung mit einer Konzentration von 0.31 mM und Adrenodoxin AdX als rötliche Lösung mit einer Konzentration von 1.34 mM erhalten werden. Wie die SDS-PAGE-Gele der Proteinaufreinigung zeigen, konnte Adrenodoxin AdX ($M = 14.07$ kDa) in guter Qualität erhalten werden (Abbildung 23.B), während die Adrenodoxin-Reduktase AdR ($M = 52.99$ kDa) nach der Proteinaufreinigung noch Verunreinigungen bei ca. 25 kDa enthielt (vgl. Abbildung 23.A), die evtl. auf Zerfallsprodukte des Zielproteins zurückzuführen sind. Nichtsdestotrotz wurde dieses Protein in der hier erhaltenen Qualität in den ersten SalD-Hydroxylase-Assays (vgl. Kapitel 3.10.4) eingesetzt.

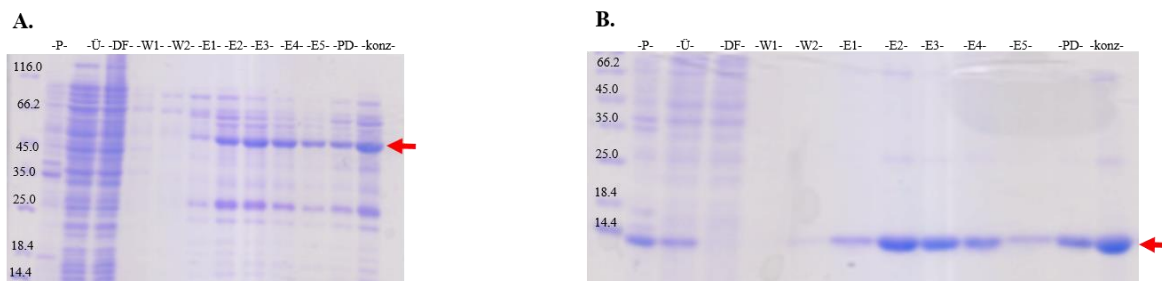


Abbildung 23. SDS-PAGE-Gel der Proteinaufreinigung der **A.** Adrenodoxin-Reduktase AdR ($M = 52.99$ kDa) und **B.** Adrenodoxin AdX ($M = 14.07$ kDa). Es wurde der Protein-Standard Pierce™ Unstained Protein MW Marker (14.4-115 kDa) [Thermo Scientific] verwendet und folgende Proben der Proteinaufreinigung aufgetragen: Pellet (-P-), Überstand (-Ü-), Durchfluss (-DF-), Waschfraktionen 1-2 (-W1/2-), Elutionsfraktionen 1-5 (-E1/2/3/4/5-), entsalztes Protein (-PD-), aufkonzentriertes Protein (-konz-). Die Bande des gewünschten Proteins ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Auch das Carrier-Protein SalB-CP ($M = 44.37$ kDa) konnte unter Einsatz von bereits dokumentierten Bedingungen (Autoinduktionsmedium ZYM bei 20 °C für 18 Stunden) erfolgreich produziert und aufgereinigt werden (Abbildung 24). Da dieses Carrier-Protein aus einem pGS-21a-Vektor exprimiert wurde, erfolgte die Aufreinigung zwar ebenfalls über Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose, jedoch enthielt das aufgereinigte Protein zusätzlich noch einen *N*-terminalen Glutathion S-Transferase (GST) -Tag, der ca. 26 kDa groß ist und durch Fusion mit dem Zielprotein zu dessen Expression und Löslichkeit beiträgt.

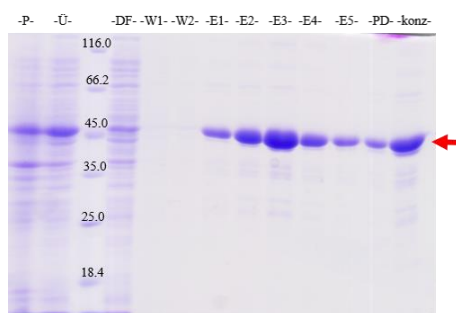
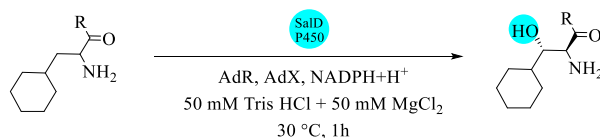


Abbildung 24. SDS-PAGE-Gel der Proteinaufreinigung des SalB-CPs ($M = 44.37$ kDa). Es wurde der Protein-Standard Pierce™ Unstained Protein MW Marker (14.4-115 kDa) [Thermo Scientific] verwendet und folgende Proben der Proteinaufreinigung aufgetragen: Pellet (-P-), Überstand (-Ü-), Durchfluss (-DF-), Waschfraktionen 1-2 (-W1/2-), Elutionsfraktionen 1-5 (-E1/2/3/4/5-), entsalztes Protein (-PD-), aufkonzentriertes Protein (-konz-). Die Bande des gewünschten Proteins ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

3.10.4 Erste SalD-Hydroxylierungsassays

Die ersten SalD-Hydroxylierungsexperimente fanden in Anlehnung an die in der Literatur von S. Uhlmann *et al.* beschriebenen Hydroxylierungsassays statt.^[136] Als Puffer diente dabei 50 mM Tris HCl mit Zusatz von 50 mM Magnesiumchlorid und mit einem pH-Wert von 7.5. Die Ansätze wurden bei einer Temperatur von 30 °C für eine Stunde inkubiert. Als Referenz dienten die jeweiligen Substrate und als Negativ-Kontrolle wurde eine Probe eingesetzt, die zwar alle beteiligten Enzyme, jedoch kein Substrat enthielt.

Zunächst wurden die Assays mit den freien L-Aminosäuren (**164**, **216**, **217**), den SNAC-gekoppelten (**239-241**) und CoA-gekoppelten (**242-244**) Aminosäuren sowie den als CoA-Derivate vorliegenden *N*-acetylierten Aminosäuren (**195**, **233**, **234**) durchgeführt (vgl. Tabelle 6). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proteine durch Zugabe von 15 % TFA gefällt und der Überstand via HPLC-MS analysiert. Die freien Aminosäuren waren dabei sowohl in den Referenzproben als auch in den Assay-Experimenten weder im Chromatogramm noch in den Massenspektren zu erkennen. Dies wäre zum einen auf die relativ geringen molekularen Massen der Aminosäuren und der somit erschwerten Detektion mit dem hier eingesetzten Massenspektrometer zurückzuführen. Zum anderen wurde die Detektion dieser Moleküle durch die geringe im Assay eingesetzte Substratkonzentration und das Fehlen von UV-aktiven Gruppen und der daraus resultierenden geringen Signalintensität zusätzlich erschwert, sodass in diesem Fall keine Aussage über das Resultat des Assays getroffen werden konnte. Detektionsprobleme ergaben sich auch bei den SNAC-Substraten **240** und **241**, sodass auch in diesen Fällen keine Aussagen über das Resultat der Assays erfolgen konnte.

Tabelle 6. Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten SalD-Hydroxylierungsassays.

Nr.	Substrat	Assay-Ergebnis
1	 239	kein Umsatz
2	 243	kein Umsatz
3	 244	kein Umsatz
4	 242	kein Umsatz
5	 195	kein Umsatz
6	 233	kein Umsatz
7	 234	kein Umsatz

Im Experiment unter Einsatz von 3-Cyclohexyl-L-Alanin-SNAC (**239**) als Substrat konnte jedoch nur die Masse des nicht umgesetzten Substrats detektiert werden. Auch in den Assays der CoA-gekoppelten Aminosäuren (**242-244**) und der als CoA-Derivate vorliegenden *N*-acetylierten Aminosäuren (**195**, **233**, **234**) konnten keine hydroxylierten Produkte beobachtet werden, da auch in diesen Experimenten die Massenspur nur die Massen der nicht umgesetzten Substrate enthielt. Diese Resultate lassen die Vermutung zu, dass die Hydroxylierung durch die SalD-Hydroxylase wahrscheinlich nur an CP-gebundenem Substrat

erfolgen kann. Auch in der Literatur sind einige Beispiele zu finden, in denen eine Hydroxylierung durch Cytochrome nur an CP-gebundenem Substrat durchgeführt werden konnte.^[135–141]

Um diese Hypothese experimentell zu belegen, sollten die an CoA sowie an das CoA-Derivat gekoppelten Aminosäuren in einer PPTase-Reaktion unter Einsatz der Sfp-PPTase und des nativen SalB-CPs Verwendung finden. Auf diese Weise sollten CP-gebundene Aminosäure-Substrate generiert werden, die in SalD-Hydroxylierungsassays eingesetzt werden konnten.

Zu Beginn wurde jedoch eine Negativ-Kontrolle, bestehend aus SalB-CP in Assay-Puffer, und eine Positiv-Kontrolle, bestehend aus SalB-CP, Sfp-PPTase und CoA (**11**), des SalB-CP-Beladungsassays durchgeführt. Die Massenspur der Negativ-Kontrolle ergab bereits Signale von sehr schwacher Intensität, jedoch konnten die mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ des *apo*-SalB-CPs ($M = 44.37$ kDa) gerade noch detektiert werden (Abbildung 25).

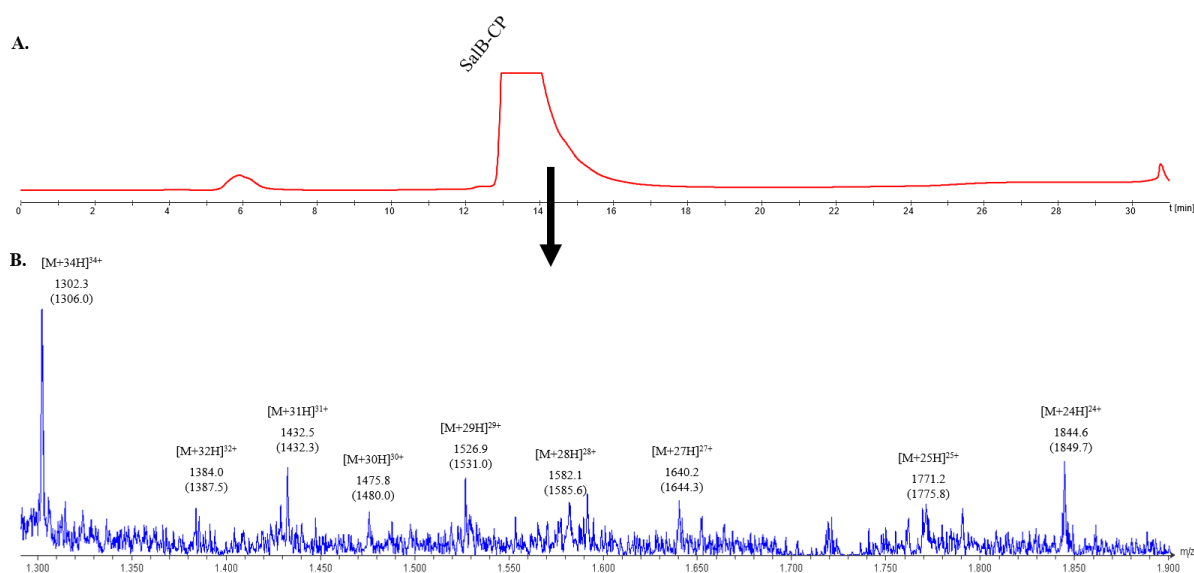


Abbildung 25. A. HPLC-Spur von *apo*-SalB-CP in Assaypuffer. B. MS-Spur des HPLC-*apo*-SalB-CP-Signals. Die dem *apo*-SalB-CP ($M = 44.37$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind explizit beschriftet. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

Im Gegensatz dazu zeigte das Massenspektrum der Positiv-Kontrolle keine deutlichen Signale mehr. Es wurde vermutet, dass das Problem im Detektionsbereich ($m/z = 0-2000$) des verwendeten Massenspektrometers lag, denn um SalB-CP in diesem Massenbereich zu detektieren, muss es eine relativ hohe Ladung tragen ($z \geq 23$). Wenn im Massenspektrometer jedoch Ionen mit einer geringeren Ladung generiert werden, liegen die mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ dann außerhalb des Detektionsbereichs. Um dieses Problem zu lösen, wäre es möglich, den GST-Tag des SalB-CPs mit Hilfe einer passenden Protease abzuspalten und auf diese Weise die molekulare Masse des SalB-CPs von 44 kDa auf ca. 18 kDa zu

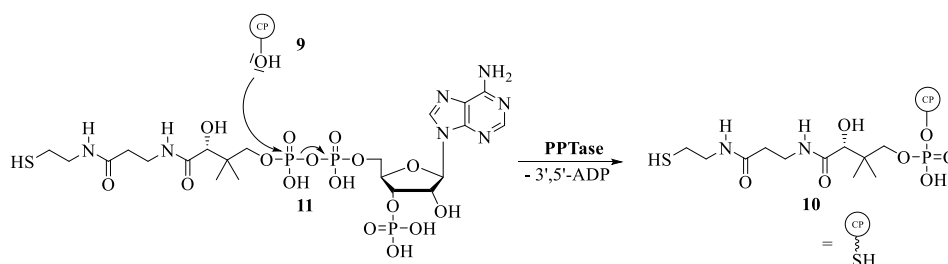
reduzieren, sodass die mehrfach geladenen Ionenpeaks bereits ab einer Ladungszahl von $z = 10$ detektierbar wären.

Da jedoch alle notwendigen Enzyme und Substrate für das Hydroxylierungsassay bereitstanden, wurde beschlossen, in einem ersten Versuch statt des nativen Carrier-Proteins SalB, das aus dem Complestatin-Biosyntheseweg stammenden ComC-CP-1 (vgl. Kapitel 3.5) einzusetzen. In der Literatur existieren einige Beispiele, in denen enzymatische Hydroxylierungsexperimente auch an nicht-nativen Carrier-Proteinen erfolgreich durchgeführt werden konnten.^[135,136]

Im ersten Versuch wurde daher zuerst das CP-Beladungsassay wie in Kapitel 3.6 beschrieben durchgeführt, wobei ComC-CP-1 als Carrier-Protein eingesetzt wurde. Als Substrate dienten die als CoA-Derivate vorliegenden *N*-acetylierten Aminosäuren (**195**, **233**, **234**). Im Anschluss an die CP-Beladung wurden die jeweiligen Proben mit den Enzymen des Hydroxylierungsexperiments versetzt und bei 30 °C für eine Stunde inkubiert. Da das Substrat nun über den Phosphopanthetin-Arm an das CP gebunden war, konnten die Proteine nicht mit TFA gefällt werden. Daher erfolgte die HPLC-MS-Analytik mit der gesamten Assay-Lösung. Dies erwies sich jedoch als unvorteilhaft, da die Anwesenheit vieler Proteine in der Probe zu zahlreichen Ionenpeaks in der Massenspur führte, deren eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Protein nicht möglich war. Um eine möglichst eindeutige und saubere HPLC-MS-Analytik der Hydroxylierungsassays durchführen zu können, wäre es von Vorteil, die Proteine aus der Analytenlösung zu entfernen. Diese Vorgehensweise erfordert jedoch zunächst die Abspaltung des Aminosäure-Substrats von der CP-Domäne. In Anlehnung an in der Literatur dargestellte Methoden wäre solch eine Abspaltung zum Beispiel durch Reduktion mit Natriumborhydrid^[136], Reaktion mit Methylhydrazin^[142] oder basische Hydrolyse unter Einsatz einer Hydroxid-Lösung^[137,138,140,141] möglich. Da die Substrate im vorliegenden Fall Aminosäuren bzw. bei erfolgreichem Assay-Umsatz hydroxylierte Aminosäuren sind, ist hier mit der gleichen HPLC-MS-Detektionsproblematik, wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, zu rechnen. Um die chromatographische Detektion zu erleichtern und somit Aussagen über den Assay-Umsatz treffen zu können, müssten diese Aminosäuren nach Abspaltung vom CP derivatisiert werden. Es wäre z. B. denkbar, die abgespaltenen Aminosäuren durch Umsatz mit Dansylchlorid bzw. Dabsylchlorid^[143–146], *o*-Phthalaldehyd^[147] oder 9-Fluorenylmethylchloroformat^[148–151] zu derivatisieren und so deren Identifikation und Detektion mittels HPLC-MS zu erleichtern. Die hierfür notwendigen Optimierungsarbeiten zu den Reaktionsbedingungen der Abspaltung und Derivatisierung sowie der anschließenden chromatographischen Methoden konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr eingehend durchgeführt werden.

4 Zusammenfassung

Der Biosynthese der drei wichtigen Naturstoff-Klassen (Fettsäuren, Polyketide und nicht-ribosomal synthetisierte Peptide) liegt ein ähnlicher Mechanismus zugrunde: der Aufbau dieser Naturstoffe erfolgt an multifunktionalen Enzymsystemen, unter Nutzung sogenannter Carrier-Proteine (CPs), an denen alle Intermediate und Elongationseinheiten der Biosynthese über eine Thioester-Bindung kovalent gebunden sind. Bevor die Substrate jedoch an die CPs gebunden werden können, müssen sie durch eine sogenannte Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) *post*-translational aktiviert werden. Die PPTase überträgt dabei eine Phosphopantetheinyl-Gruppe vom Coenzym A (**11**) auf das CP (**9**, s. Schema 55), wo diese Seitenkette als Substratanker dient und ein wichtiges Element in der Substraterkennung bildet. Die Aktivierung der CPs durch das Enzym PPTase ist daher essentiell für die Aktivität der kompletten Enzymsysteme. Die PPTasen spielen somit eine zentrale Rolle für die Funktionalität dieser Enzymsysteme.



Schema 55. Aktivierung der Carrier-Proteine (CP) durch das Enzym Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase).

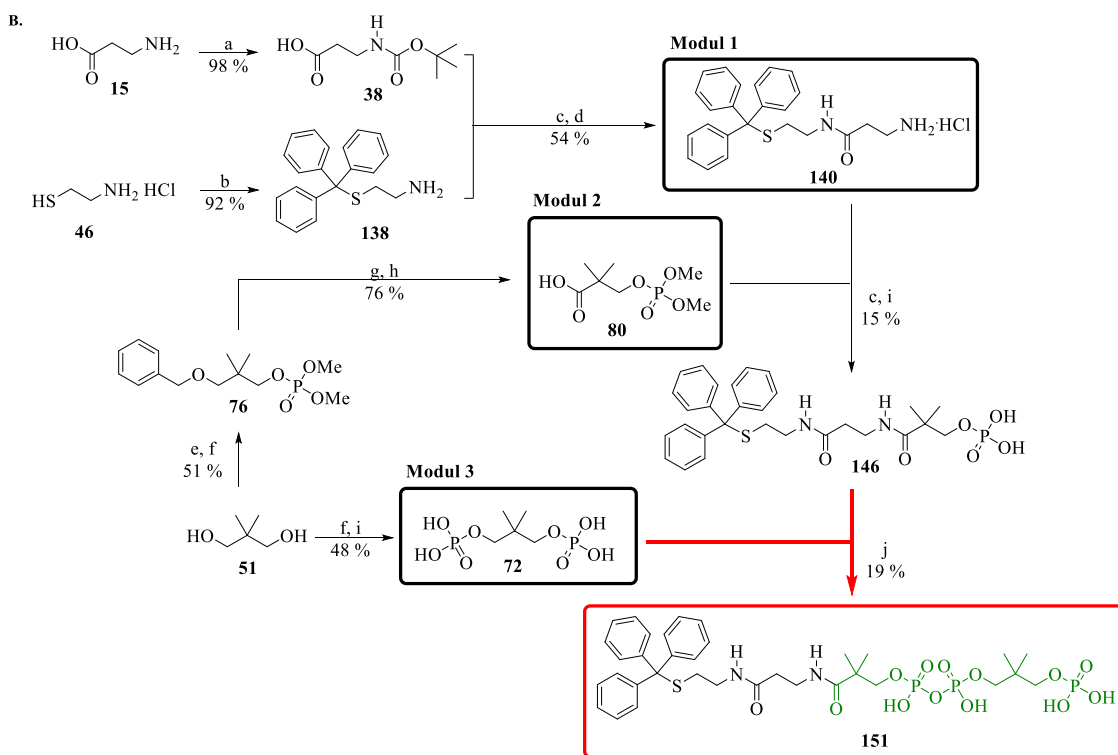
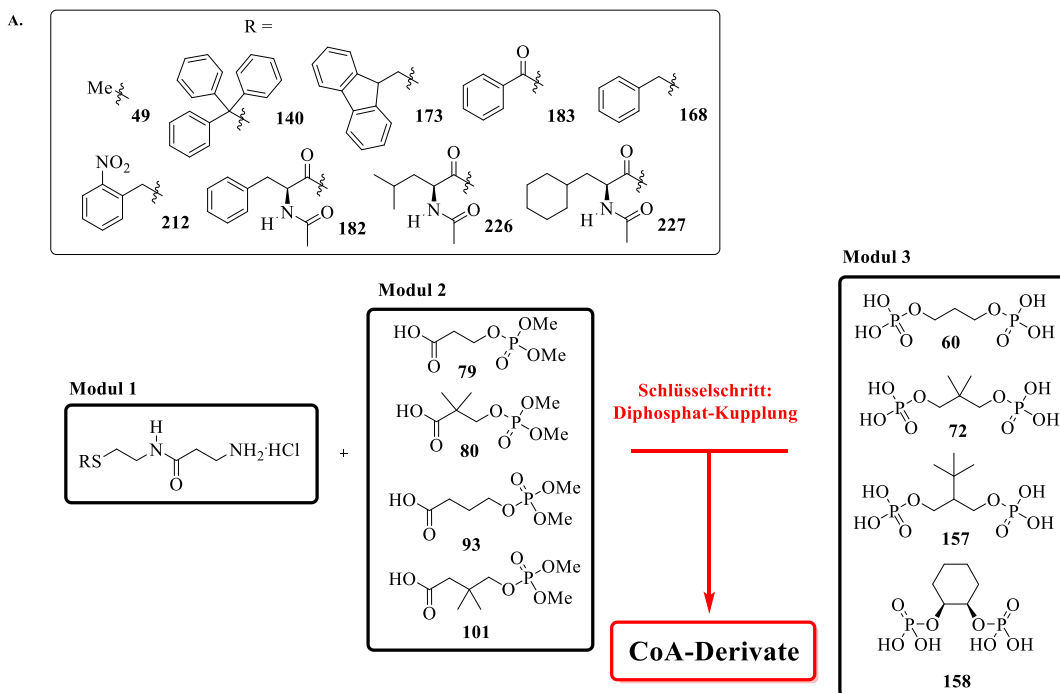
Insbesondere die Sfp-PPTase aus *B. subtilis* ist aufgrund ihres breiten CP- und Substratspektrums von besonderem Interesse für Studien an Biosynthese-Enzymen von Fettsäuren, Polyketiden und nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden. Das Substratspektrum der Sfp-PPTase erstreckt sich dabei in erster Linie auf am Thiol-Terminus modifizierte CoA-Derivate, deren Umsatz in der Sfp-PPTase-Reaktion durch zahlreiche Beispiele belegt ist.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Substraterkennung der Sfp-PPTase weiter zu ergründen und erstmalig ein systematisches Screening der PPTase-Substrattoleranz in Abhängigkeit von Modifikationen in der Pantoinsäure und der Nucleosid-Gruppe des CoA-Moelküls (**11**) durchzuführen. Zielführend sollte somit die Erarbeitung eines chemischen Synthesewegs zu vereinfachten Derivaten des Coenzym A (**11**) sein. Die Strukturvereinfachung sollte insbesondere Modifikationen in der Pantoinsäure und der Nucleosid-Gruppe enthalten und auf der von Reuter *et al.* aufgeklärten Kristallstruktur des Sfp-CoA-Komplexes basieren. Diese Strukturdaten zeigen, dass in erster Linie die Phosphatgruppen des CoA (**11**) für dessen

Bindung in der katalytisch aktiven Stelle der Sfp-PPTase verantwortlich sind, während die Pantoinsäure- und die Nucleosid-Einheit nur über vergleichsweise schwache Wechselwirkungen mit der Sfp-Bindungstasche interagieren.

Zur Darstellung solcher vereinfachten CoA-Derivate konnte im Laufe dieser Arbeit eine modulare Syntheseroute entwickelt werden, deren Schlüsselschritt im Aufbau der Diphosphat-Brücke lag (s. Schema 56.A). Der Vorteil des modularen Synthesezugangs lag in dessen Flexibilität und somit der Möglichkeit, Modifikationen in ein Modul einzuführen, ohne die Synthese der anderen Module verändern zu müssen. Modul 1 (**49, 140, 168, 173, 182, 183, 212, 226, 227** in Schema 56.A) auf dieser Syntheseroute bestand aus einem Dipeptid, welches sich aus einem am Thiolterminus durch eine Schutzgruppe oder eine Aminosäure modifizierten Cysteamin und einem β -Alanin zusammensetzte. Strukturell unterschiedliche Phosphatsäuren (**79, 80, 93, 101**) bildeten Modul 2 und konnten in einer Peptidkupplungsreaktion mit Modul 1 zur Darstellung unterschiedlicher Phosphopantethein-Derivate umgesetzt werden. Modul 3 schließlich bildeten verschiedene Diphosphat-Bausteine (**60, 72, 157, 158**), die aus entsprechend modifizierten Diolen generiert wurden.

Die Synthese der CoA-Mimetika ist in Schema 56.B exemplarisch für Verbindung **151** gezeigt. Als Startbausteine der modularen Syntheseroute dienten immer Cysteamin Hydrochlorid (**46**) und β -Alanin (**15**). Cysteamin Hydrochlorid wurde am Thiolterminus durch eine Schutzgruppe oder eine Aminosäure modifiziert (z. B. zu **138**) und mit am *N*-Terminus durch eine Boc-Gruppe geschütztes β -Alanin (**38**) verknüpft. Nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurde Modul 1 erhalten. Die Phosphatsäuren (Modul 2), wurden aus einfachen Diolen (z. B. **51**) dargestellt, welche zuerst monobenzyliert und dann phosphoryliert wurden (z. B. zu **76**), um dann die Benzylgruppe hydrogenolytisch zu entfernen und die so gewonnene Hydroxylgruppe zur Carbonsäure (z. B. **80**) zu oxidieren. Die so erhaltenen Phosphatsäuren (Modul 2) wurden dann in einer Peptidkupplungsreaktion mit Modul 1 umgesetzt. Durch eine Entschützung der Phosphatgruppen waren schließlich Phosphopantethein-Derivate (wie z. B. **146** in Schema 56.B) zugänglich. Auch die als Modul 3 dienenden Diphosphat-Bausteine wurden aus einfachen Diolen (z. B. **51**) mittels Bisphosphorylierung und anschließender Phosphatentschützung (zu z. B. **72**) generiert. Die gewünschten CoA-Derivate (z. B. **151**) waren schließlich durch Umsatz der Phosphopantethein-Derivate (z. B. **146**) mit Diphosphat-Bausteinen (Modul 3, z. B. **72**) in einer Diphosphat-Kupplung, dem Schlüsselschritt der Syntheseroute, zugänglich.



Schema 56. A. Entwickelte modulare Synthesroute zur Darstellung von CoA-Derivaten. **B.** Synthese der besten Derivatstruktur **151** mit der optimalen Substruktur (grün).

Reaktionsbedingungen: a) 2 N NaOH, Boc₂O, THF, RT, 4 h; b) TrCl, TFA, CH₂Cl₂, RT, 30 min; c) EDC·HCl, HOBT, NEt₃, CH₂Cl₂, RT, 18 h; d) 4 N HCl·Dioxan, RT, 1h; e) NaH, BnBr, DMF, 0 °C → RT, 18 h; f) Cl(O)P(OMe)₂ (**62**), Pyridin, -40 °C → RT, 18 h; g) 20 w% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 18 h; h) 2.7 M CrO₃/verd. H₂SO₄, Aceton, RT, 20 min; i) 1. TMSBr, CH₂Cl₂, RT, 20 min; 2. MeOH/ 20 % dH₂O, RT, 2h; j) 1. CDI, DMF, 3 Å MS, RT, 1.5-2.5 h; 2. add **72**, RT, 24 h.

Die so synthetisierten CoA-Derivate wurden als Substrate in CP-Beladungsassays mit heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) produzierten Enzymen untersucht. Als CP wurde dabei das aus der Complestatin-Biosynthese in *Streptomyces lavendulae* stammende ComC-CP-1 eingesetzt und als PPTase diente Sfp aus *B. subtilis*. Diese CP-Beladungsexperimente zeigten, dass die Struktur motive (grün in Schema 56.B) des CoA-Derivats **151** am günstigsten für eine erfolgreiche CP-Beladung waren.

Zur Verifizierung des gefundenen Konzepts des Strukturaufbaus der CoA-Derivate, wurden weitere Derivate, die das gefundene Strukturmotiv enthielten, jedoch unterschiedliche S-terminale Schutzgruppen aufwiesen, hergestellt. Auch diese Derivate konnten anschließend durch die Sfp-PPTase erfolgreich auf das ComC-CP-1 geladen werden. Auf diese Weise konnte die gefundene, für eine Beladung notwendige Teilstruktur der Derivate unter Beweis gestellt werden. Gleichzeitig wurde so auch gezeigt, dass die in den Enzymassays eingesetzte PPTase Sfp in der Lage ist, auch Moleküle, denen die Nucleosid-Struktur fehlt, als Substrate zu erkennen. Die Nucleosid-Struktur konnte dabei durch einfache Diphosphat-Bausteine imitiert werden, wobei sogar zwei Diphosphat-Bausteine (**157** und **72** in Abbildung 26) als optimale Nucleosid-Mimetika identifiziert werden konnten.

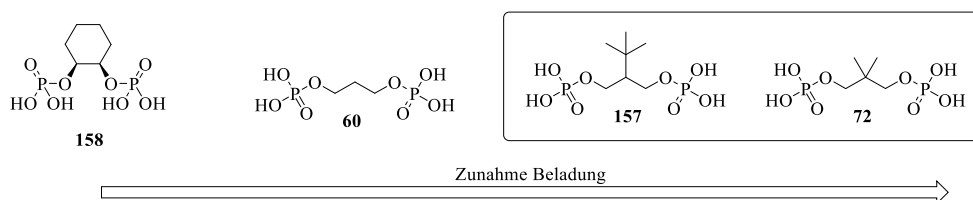
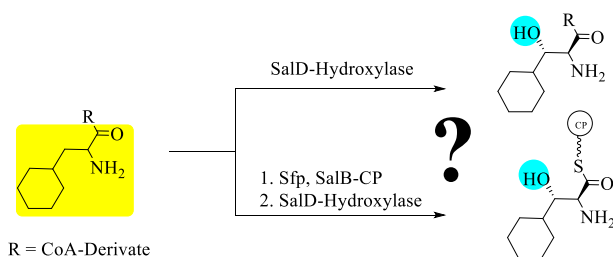


Abbildung 26. Abstufung der Diphosphat-Bausteine (Modul 3) nach ihrem Potential als Nucleosid-Mimetika in CoA-Derivaten zu dienen.

Somit war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, erstmals einen Beitrag zur Ergründung der Substraterkennung der Sfp-PPTase, nicht nur anhand einer Modifizierung des Phosphopantethein-Arms, sondern durch eine Modifizierung der Nucleosid-Struktur zu leisten. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das Potential der gefundenen CoA-Derivate bei Untersuchungen zur stereoselektiven β -Hydroxylierung von L-Aminosäuren unter Einsatz der Hydroxylase SalD aus dem Salinisporamid-A-Biosyntheseweg unter Beweis gestellt werden. Hierfür sollten *In-vitro*-Studien mit unterschiedlichen Aminosäuren als potentielle Substrate der SalD-Hydroxylase durchgeführt werden. Die Aminosäuren sollten dabei an das entwickelte CoA-Derivat gekuppelt werden.



Schema 57. Zu untersuchende Reaktion der SalD-Hydroxylase am Beispiel der L-Aminosäure Cyclohexylalanin (gelb). Die durch das Enzym eingeführte Hydroxylgruppe ist im Produkt blau markiert.

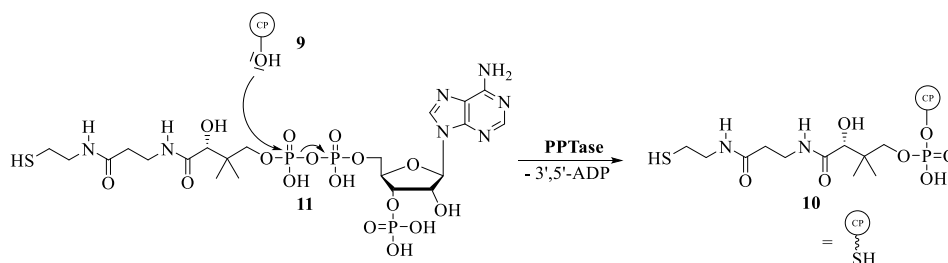
Da es im Verlauf der Arbeit jedoch nicht möglich war, einen passenden synthetischen Zugang zu CoA-Derivaten mit freiem Thiolterminus zu finden, wurde die entwickelte Syntheseroute aus Schema 56 verwendet, um CoA-Derivate herzustellen, die mit den für die SalD-Reaktion relevanten Aminosäuren am terminalen Thiol substituiert waren. Zusätzlich wurden auch SNAC- und CoA-Ester dieser Aminosäuren synthetisiert. Alle für die Hydroxylierungs-Experimente notwendigen Enzyme (Hydroxylase SalD, SalB-CP, Elektronendonator-Proteine AdR/ AdX) konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich heterolog in *E. coli* produziert und aufgereinigt werden. Die ersten durchgeführten SalD-Hydroxylierungsassays lieferten erste Hinweise darauf, dass die SalD-Hydroxylase die Aminosäuren wahrscheinlich nur als CP-gebundene Substrate hydroxylieren kann. Aussagekräftige, weiterführende und abschließende Experimente mit CP-gebundenen Aminosäuren, die sowohl durch Aminosäure-CoA-Ester als auch durch Aminosäure-CoA-Derivate generiert wurden, stehen jedoch noch aus.

Zusammenfassend war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, eine modulare Synthesestrategie zur Darstellung von vereinfachten CoA-Derivaten zu erarbeiten, die in der Literatur nicht bekannte Modifikationen in den Pantoinsäure- und Nucleosid-Bausteinen enthielten. Die modulare Syntheseroute ermöglichte den Austausch einzelner Module ohne die Synthese der anderen Module zu ändern und eröffnete somit einen schnellen synthetischen Zugang zu zahlreichen CoA-Derivaten. Der Einsatz der so generierten CoA-Derivate in CP-Beladungsassays diente der Untersuchung des Substratspektrums der Sfp-PPTase. Erstmals erfolgte in dieser Arbeit ein systematisches Screening der Sfp-PPTase-Substrattoleranz in Abhängigkeit von Modifikationen in der Pantoinsäure und der Nucleosid-Struktur des CoA-Moleküls (**11**). Das Screening resultierte in der Identifizierung einer für eine erfolgreiche CP-Beladung optimalen Substruktur der CoA-Derivate. Die gefundene Substruktur führte auch in Kombination mit unterschiedlichen S-terminalen Schutzgruppen zu erfolgreicher CP-Beladung. Hierdurch wurde zum einen die gefundene Substruktur bestätigt und zum anderen die Option eröffnet die identifizierte Struktur in Zukunft als CoA-Mimetikum zu verwenden.

Zusätzlich war es im Rahmen dieser Arbeit möglich Aminosäure-Substrate der SalD-Hydroxylase als deren SNAC-, CoA- und CoA-Derivat-Ester darzustellen. Der Einsatz dieser Moleküle als CP-Mimetika zur Untersuchung des Substratspektrums der SalD-Hydroxylase, ergab erste Hinweise auf die Notwendigkeit eines CP-gebundenen Substrats für eine Hydroxylierung durch dieses Enzym.

5 Summary

The biosynthesis of three important natural product classes (fatty acids, polyketides and non-ribosomally produced peptides) is based on similar principles: the biosynthesis occurs on multifunctional proteins featuring carrier proteins (CP) as important substrate tethers. Every precursor, intermediate and elongation building block of the biosynthesis is bound covalently via a thioester to CPs that previously are activated by the enzyme phosphopantetheinyl-transferase (PPTase). The PPTase transfers a phosphopantetheinyl-moiety from coenzyme A (**11**) to CP (**9**, cf. scheme 55) where this side chain plays an important role in substrate recognition and helps to transport the intermediates from one catalytic center to the next. Thus, CP-activation by the action of PPTase is essential for the activity of the complete biosynthetic machinery. Consequently, the PPTases play an essential role in the functionality of these multifunctional enzymes.



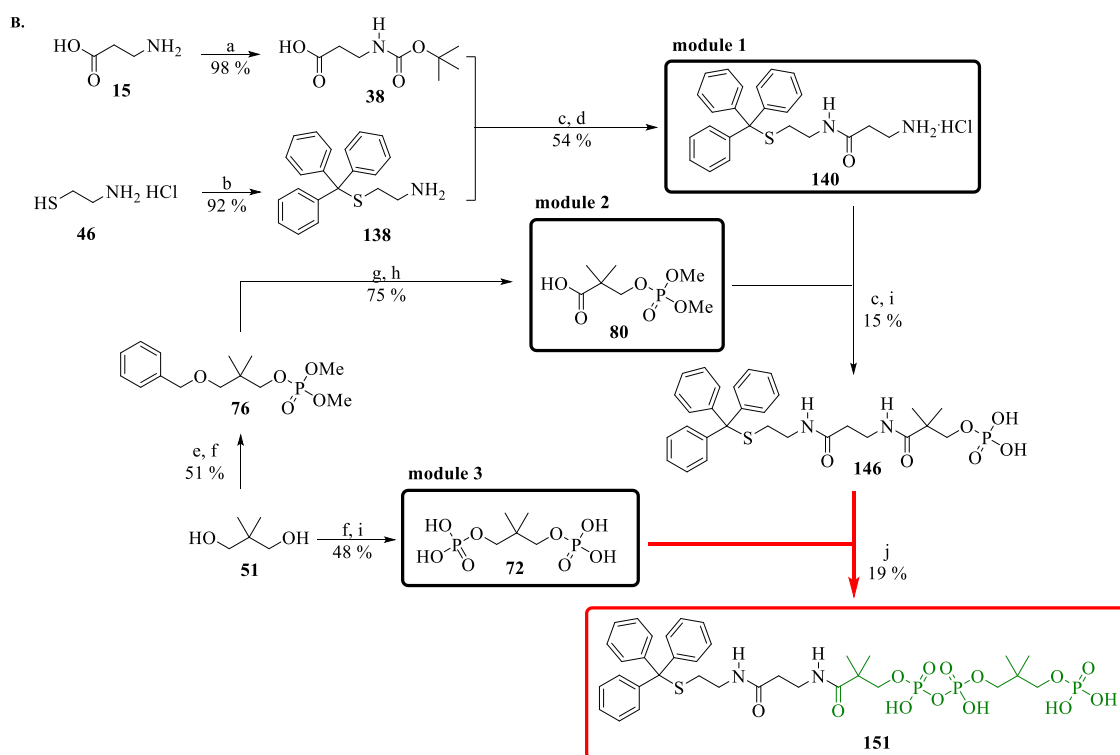
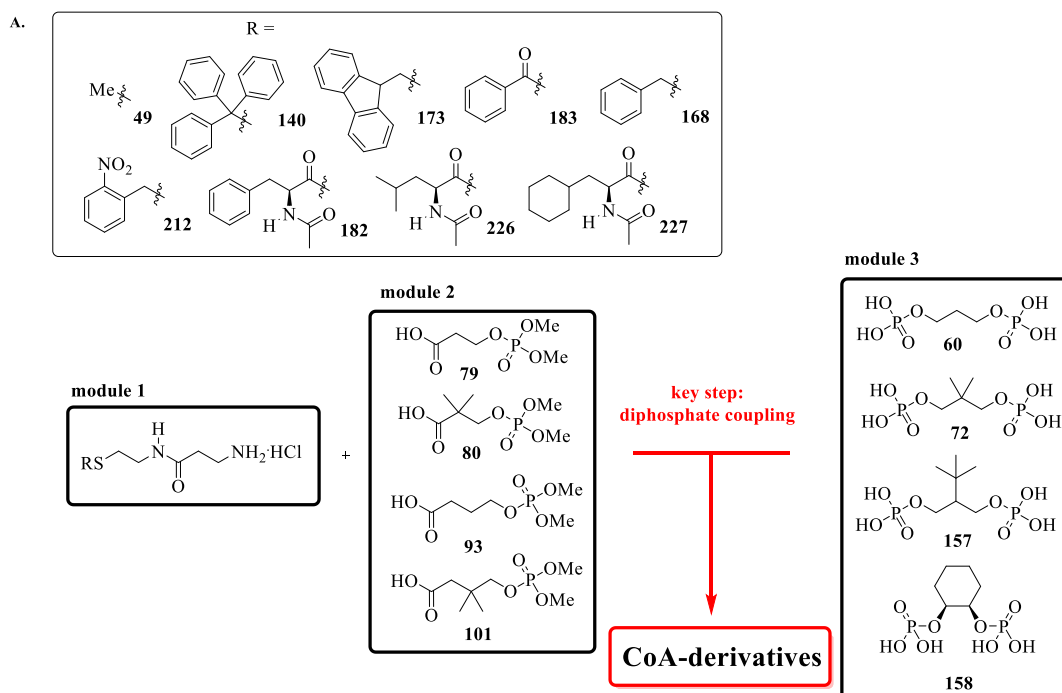
Scheme 55. Activation of a carrier-protein (CP) by the action of the enzyme phosphopantetheinyl-transferase (PPTase).

Due to its wide CP- and substrate recognition scope, the *sfp*-PPTase from *B. subtilis* is particularly interesting for studies on enzymes from biosynthetic pathways of fatty acids, polyketides and non-ribosomally produced peptides. The substrate recognition scope of the *sfp*-PPTase is documented in numerous examples and covers predominantly CoA-derivatives modified on their thiol-end.

Hence, the aim of this work was to investigate the substrate recognition scope of the *sfp*-PPTase by providing for the first time a systematic substrate recognition screening of the *sfp*-PPTase based on modifications in the pantoic acid as well as the nucleoside moiety of the CoA-structure. For this purpose, it was necessary to establish a chemical synthesis of simple CoA-derivatives. The structure simplification should be focused on modifications of the pantoic acid as well as the nucleoside moiety and should be based on the crystal structure of the *sfp*-CoA-complex published by Reuter *et al.*. These structure data show that the CoA-molecule interacts primarily via its phosphate groups with the catalytically active site of the *sfp*-PPTase. Neither the pantoic acid nor the nucleoside moiety show comparatively strong interactions with the *sfp*-binding site.

The preparation of simplified CoA-derivatives could be accomplished during this work via a modular route involving as a key step the synthesis of the diphosphate bridge (cf. scheme 56.A). The important advantage of the modular synthesis is its flexibility, allowing the exchange of individual modules without changing the synthetic approach of the other modules. In this synthetic approach, module 1 (**49**, **140**, **168**, **173**, **182**, **183**, **212**, **226**, **227** in scheme 56.A) was represented by a dipeptide synthesized from β -alanine and cysteamine modified on its thiol terminus with a protecting group or an amino acid. Structurally diverse phosphate acids (**79**, **80**, **93**, **101**) were used as module 2 and coupled in a peptide coupling reaction to module 1 resulting in various phosphopantetheine derivatives. Finally, module 3 was represented by different diphosphate building blocks (**60**, **72**, **157**, **158**) that were accessed from diversely modified diols.

The synthesis of CoA-mimetics is exemplified with molecule **151** in scheme 56.B. For the modular synthesis, cysteamine hydrochloride (**46**) and β -alanine (**15**) were used as starting building blocks. Cysteamine hydrochloride (**46**) was first modified on its thiol terminus by a protecting group or an amino acid (e. g. to **138**) and then coupled to *N*-Boc-protected β -alanine (**38**). Module 1 (e. g. **140**) was accessed by removing the Boc-protecting group. The phosphate acids (module 2) were synthesized from simple diols (e. g. **51**) that were first monobenzylated and then phosphorylated (e. g. to **76**). The benzylic group was then removed hydrogenolytically and the free hydroxyl group was oxidized to a carboxylic acid (e. g. **80**). The obtained phosphate acids (module 2) were used in a peptide coupling reaction with module 1. Finally, the deprotection of the phosphate groups resulted in various phosphopantetheine derivatives (like e. g. **146** in scheme 56.B). The diphosphate building blocks, that were used as module 3, were again synthesized from simple diols (e. g. **51**) by bisphosphorylation and subsequent deprotection of the phosphate groups (to e. g. **72**). The desired CoA-derivatives (e. g. **151**) were finally accessible by assembling the phosphopantetheine derivatives (like e. g. **146** in scheme 56.B) with a diphosphate (e. g. **72**) in a diphosphate coupling reaction, the key step of the synthesis.



Scheme 56.A. Modular synthesis of CoA-derivatives. **B.** Synthesis of the best CoA-derivative **151** with the optimal substructure presented in green.

Reaction conditions: a) 2 N NaOH, Boc_2O , THF, rt, 4 h; b) TrCl, TFA, CH_2Cl_2 , rt, 30 min; c) EDC·HCl, HOBT, NEt_3 , CH_2Cl_2 , rt, 18 h; d) 4 N HCl/dioxane, RT, 1h; e) NaH, BnBr, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 18 h; f) Cl(O)P(OMe)_2 (**62**), pyridine, $-40^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 18 h; g) 20 w% Pd/C, H_2 , MeOH, rt, 18 h; h) 2.7 M $\text{CrO}_3/\text{diluted H}_2\text{SO}_4$, acetone, rt, 20 min; i) 1. TMSBr, CH_2Cl_2 , rt, 20 min; 2. MeOH/ 20 % dH₂O, rt, 2h; j) 1. CDI, DMF, 3 Å MS, rt, 1.5-2.5 h; 2. add **72**, rt, 24 h.

The prepared CoA-derivatives served as substrates in CP-loading assays with enzymes heterologously produced in *E. coli* BL21 (DE3). ComC-CP-1 from the complestatin-biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* as well as sfp-PPTase from *B. subtilis* were used as enzymes for this assay. The CP-loading experiments showed that CoA-derivative **151** (cf. scheme 56.B) features the best substructure (green in scheme 56.B) for a successful CP-loading. To verify the observed substructure concept, other CoA-derivatives featuring the identified substructure but bearing different *S*-terminal protecting groups were synthesized and subsequently successfully loaded on ComC-CP-1. Thus, it was possible to provide proof of the observed substructure that was necessary for an efficient CP-loading. At the same time, these results demonstrate the ability of the Sfp-PPTase to accept molecules without a nucleoside moiety as substrates. The nucleoside structure was imitated by simple diphosphate building blocks and even two of these diphosphate building blocks (**72** and **157** in figure 26) could be identified to serve as optimal nucleoside mimetics.

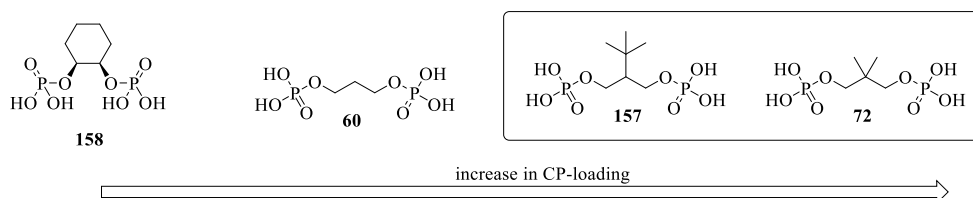
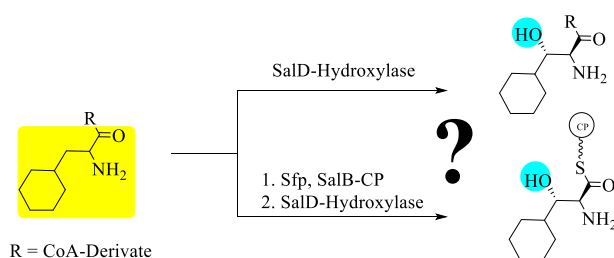


Figure 26. Diphosphate building blocks (module 3) arranged according to their potential to serve as nucleoside mimetics in CoA-derivatives.

Hence, it was possible within this work to take a first step towards the investigation of sfp-PPTase substrate recognition not only based on modifications in the phosphopantetheine-arm, but also in the nucleoside moiety

In the second part of this thesis, the most efficient CoA-derivative should be used as CP-mimetic to investigate the stereoselective β -hydroxylation of L-amino acids by the hydroxylase SalD from the biosynthesis of salinisporamide A. Therefore, *in vitro* studies with different amino acids as potential SalD hydroxylase substrates should be performed. The amino acids should then be coupled to the developed CoA-derivative.



Scheme 57. SalD-hydroxylation reaction to be analyzed with different substrates, exemplified here with the L-amino acid cyclohexylalanine (yellow). The hydroxy group introduced by the enzyme is marked in blue.

As it was not possible to find a convenient route for the synthesis of CoA-derivatives with a free thiol group, the developed modular synthesis was applied to produce CoA-derivatives substituted on their thiol terminus with amino acids that should be investigated in the SalD-reaction. In addition, SNAC and CoA esters of these amino acids were synthesized. The necessary enzymes (hydroxylase SalD, SalB-CP, electron donor proteins AdR/ AdX) for the hydroxylation experiments were heterologously produced in *E. coli* and successfully purified. The first SalD-hydroxylation assays indicated that most likely the SalD hydroxylase is only able to hydroxylate CP-bound amino acids. Valid subsequent and final experiments with CP-bound amino acids deriving from their CoA esters as well as CoA-derivative esters are yet to come.

In summary, it was possible to establish a modular synthetic strategy of simplified CoA-derivatives featuring modifications in the pantoic acid as well as the nucleoside modules not investigated so far. The modular synthesis facilitates the exchange of individual modules without changing the synthesis of other modules. In this way, numerous CoA-derivatives were prepared for application in subsequent CP-loading assays, enabling an investigation of the substrate scope of sfp-PPTase. With this work, systematic screening studies of the sfp-PPTase substrate scope with substrates modified on their pantoic acid and nucleoside moiety were achieved for the first time. The screening resulted in the identification of an optimal substructure necessary for successful CP-loading. Furthermore, different CoA-derivatives with the identified substructure were successfully used in CP-loading experiments in combination with different *S*-terminal protecting groups. In this way, the identified substructure was verified and at the same time its future potential application as CoA-mimetic was validated.

Moreover, it was possible within this work to prepare amino acid substrates for the SalD-hydroxylase reaction as their SNAC-, CoA- and CoA-derivatives esters. The synthesized substrates were applied as CP-mimetics for the investigation of the substrate scope of SalD-hydroxylase giving a first hint that hydroxylation would occur on CP-bound substrate.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Apparaturen und Messgeräte

Autoklav: Medien und Verbrauchsmaterialien wurden mit einem Autoklav 3170 ELV der Firma *Biomedis* sterilisiert.

Druckreaktor: Die unter Wasserstoffdruck durchgeführte Hydrogenolyse fand in dem Druckreaktor Cyclone 075 der Firma *Büchiglasuster* statt.

Elektrophorese: Die Gelelektrophorese wurde mit Hilfe eines Electrophoresis Power Supply EV243 der Firma *Consort* durchgeführt und für die SDS-PAGE wurden Mini-PROTEAN® Tetra System Gelkammern der Firma *Bio-Rad* benutzt.

Elektroporator: Die Elektroporation von elektrokompetenten Zellen wurde mit einem MicroPulser der Firma *Bio-Rad* durchgeführt.

Gefriertrocknung: Lyophilisation wurde mit dem Gerät Alpha 2-4 der Firma *Christ*, das an eine Chemistry-Hybrid-Pump-RC6-Pumpe der Firma *Vacuubrand* angeschlossen war, durchgeführt.

Heizblock/ Wasserbad: Kleine Probenvolumina wurden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, im ThermoMixer C der Firma *Eppendorf* oder im Wasserbad FBH 604 der Firma *Fischerbrand* erwärmt.

Inkubationsschüttler: Es wurden die Modelle Multitron Standard und Ecotron der Firma *Infors HT* verwendet.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): An der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* wurden die ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren an den Geräten DP300 (300 MHz bzw. 75 MHz), DP400 (400 MHz bzw. 100 MHz) und DRX 500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur gemessen. An der *Technischen Universität München (TUM)* wurden die ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren an den Geräten AV200 (200 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren), AV360 (360 MHz), AV500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren), AVHD300 (300 MHz bzw. 75 MHz), AVHD400 (400 MHz bzw. 100 MHz) bzw. AVHD500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur gemessen. Als interner Standard diente bei den ^{13}C -Messungen das deuterierte Lösungsmittel, bei den ^1H -Messungen das entsprechende undeuterierte Lösungsmittel, das stets in geringen Mengen im deuterierten Lösungsmittel zu finden ist.^[152] Die NMR-Spektren wurden auf die Resonanzsignale der Restprotonen bzw. der entsprechenden ^{13}C -Resonanzsignale kalibriert [$\delta_{\text{H/C}}(\text{CDCl}_3) = 7.26/$

77.16, $\delta_{H/C}$ (CD₃OD) = 3.31/ 49.00, $\delta_{H/C}$ ((CD₃)₂SO) = 2.50/ 39.52, δ_H (D₂O) = 4.79]. Bei den ³¹P-Messungen diente 85 %ige Phosphorsäure als Standard. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) und die chemischen Verschiebungen δ in ppm angegeben und beziehen sich auf δ (TMS) = 0. Die Auswertung der ¹H-NMR-Spektren erfolgte mittels MestReNova (*Mestrelab Research S. L.*) nach erster Ordnung und mit Übereinstimmung der Signalzuordnung und den jeweiligen Integralen. Bei der Zuordnung der Signale und für die Signalmultiplizitäten wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, p = Quintett, dd = Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplett, pd = Quintett von Dublett, ddd = Dublett von Dublett von Dublett, td = Triplett von Dublett, m = Multiplett.

Massenspektrometrie (MS): Die Massenspektren, die an der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* gemessen wurden, wurden von den Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektrometrie am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* unter der Leitung von Frau Dr. Engeser aufgenommen. Die Aufnahme der Elektrosprayionisations-Massenspektren (ESI-MS) und der High-Resolution-Massenspektren (HRMS) erfolgte an einem Time-of-Flight-Massenspektrometer (microTOF-Q, *Bruker Daltonics*). Für die Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) wurde das Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95 XL der Firma *ThermoFinnigan* mit einer Beschleunigungsspannung von 70 eV verwendet. An der *TUM* wurden die ESI-MS entweder an einem *Advion* ExpressionL CMS-Gerät mit single-quadrupole mass analyzer, das zusammen mit einem *Peak Scientific* N118LA Stickstoffgenerator, einer *Edwards* RV12 Hochvakuumpumpe, einer *Camag* TLC-MS Interface und einer *Jasco* PU-1580 Intelligent HPLC-Pumpe betrieben wurde, oder an einem LCQ Fleet Ion Trap Massenspektrometer gekoppelt an ein UltiMate 3000 HPLC System (beides von *Thermo Scientific*) aufgenommen. Das Letztere wurde mittels Xcalibur Software gesteuert und die Ergebnisse der Messungen wurden mittels *Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48* Software ausgewertet. Das *Advion*-MS-System wurde mit Hilfe von Mass Express Software gesteuert und die Auswertungen mittels Data Express Software (beides von *Advion*) durchgeführt. Die Aufnahme von ESI-HRMS erfolgte an dem Massenspektrometer *Thermo* LTQ FT Ultra und die Auswertung dieser Spektren mittels *Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48* Software.

Die Angabe der Molekülfragmente erfolgt als Verhältnis der Masse zu ihrer Ladung *m/z*.

Photometer: Die Bestimmung der optischen Dichte bei $\lambda = 600$ nm erfolgte an einem Photometer der Firma *Eppendorf*.

Protein- und DNA-Konzentrationsbestimmung: Protein- und DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Nanophotometers P330 der Firma *Implen* bestimmt.

UV-Lampe: Die Detektion der Substanzen bei der Dünnschichtchromatographie erfolgte unter UV-Licht bei Verwendung einer UV-Lampe der Firma *Vilber Lourmat* (4 W – 254 nm bzw. 4 W – 365 nm).

Zellaufschluss: Bakterienzellen wurden mit dem Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD2070 der Firma *Bandelin* aufgeschlossen.

Zentrifugation: Es wurden die Zentrifugen Heraeus Multifuge X3R Centrifuge der Firma *Thermo Scientific*, 24/6 der Firma *VWR* und Centrifuge 5418R der Firma *Eppendorf* verwendet.

6.2 Vektoren & Organismen

6.2.1 Vektoren

Tabelle 7. Verwendete Vektoren.

Name	Eigenschaften	Herkunft
pHis8	<i>N</i> -terminaler His ₈ -Tag, T7-Promoter, Kanamycin-Resistenz	[153]
pGS21a	<i>N</i> -terminaler His ₈ -Tag, <i>N</i> -terminaler GST-Tag, T7-Promoter, Ampicillin-Resistenz	Firma <i>Genescript</i>

6.2.2 Organismen

Tabelle 8. Verwendete Organismen.

Name	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F-ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3)	Firma <i>Invitrogen</i>
<i>E. coli</i> SoluBL21™	-	Firma <i>Genlantis</i>

6.3 Medien, Puffer & Zusätze

6.3.1 Nährmedien

6.3.1.1 LB-Agar-Kulturplatten

Das Medium wurde als fertig zusammengesetztes Pulver von der Firma *Roth* bezogen. Für die Kulturplatten wurden 40 g Medium-Pulver in 1 L destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C wurde zur Selektion von resistenten Mutanten das entsprechende Antibiotikum (Endkonzentration = 100 µg/ mL für Ampicillin bzw. 50 µg/ mL für Kanamycin) zugefügt und die Platten sofort gegossen.

6.3.1.2 LB-Medium (**L**uria **B**ertani)

Das Medium wurde als fertig zusammengesetztes Pulver von der Firma *Roth* bezogen und gemäß den Herstellerangaben 25 g Medium-Pulver in 1 L destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

6.3.1.3 TB-Medium (**T**errific **B**roth)

Das Medium wurde als fertig zusammengesetztes Pulver von der Firma *Roth* bezogen und gemäß den Herstellerangaben 47.60 g Medium-Pulver mit 4.00 mL Glycerol in 1 L destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

6.3.1.4 ZYM-5052 Autoinduktionsmedium^[154]

Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten des ZYM-5052 Autoinduktionsmediums ist in Tabelle 9 gezeigt. Die einzelnen Lösungen wurden in destilliertem Wasser hergestellt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten des ZYM-5052 Autoinduktionsmediums ist in Tabelle 10 zu sehen.

Zur Herstellung der Spurenelementen-Lösung wurde zunächst eine 0.1 M-FeCl₃ 6H₂O-Lösung (2.70 g/ 100 mL) in 50.00 mL 100 x verdünnter Salzsäure gelöst. Im Anschluss wurden die restlichen Bestandteile wie in Tabelle 11 gezeigt zugegeben und schließlich sterilfiltriert.

Tabelle 9. Zusammensetzung des ZYM-5052 Autoinduktionsmediums.

Bestandteil	Menge
ZY	958.00 mL
50 x M	20.00 mL
50 x 5052	20.00 mL
1 M MgSO ₄ (sterilfiltriert)	2.00 mL
1000 x Spurenelemente	0.20 mL

Tabelle 10. Autoklavierte Komponenten des ZYM-5052 Autoinduktionsmediums.

Name	Bestandteil	Menge
ZY	Trypton	10 g / L
	Hefeextrakt	5 g / L
	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	335 g / L
50 x M	KH ₂ PO ₄	170 g / L
	NH ₄ Cl	134 g / L
	Na ₂ SO ₄	35.50 g / L
50 x 5052	Glycerol	250 g / L
	Glukose	25 g / L
	α-Lactose	100 g / L

Tabelle 11. Restlichen Bestandteile der 1000 x Spurenelementen-Lösung für das ZYM-5052 Autoinduktionsmedium.

Bestandteil	Menge
1.0 M CaCl ₂ 2H ₂ O (15.90 g / 100 mL)	2.00 mL
1.0 M MnCl ₂ 4H ₂ O (19.80 g / 100 mL)	1.00 mL
1.0 M ZnSO ₄ 7H ₂ O (28.80 g / 100 mL)	1.00 mL
0.2 M CoCl ₂ 6H ₂ O (4.76 g / 100 mL)	1.00 mL
0.1 M CuCl ₂ 2H ₂ O (1.70 g / 100 mL)	2.00 mL
0.2 M NiCl ₂ 6H ₂ O (4.76 g / 100 mL)	1.00 mL
0.1 M Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (2.42 g / 100 mL)	2.00 mL
0.1 M H ₃ BO ₃ 6H ₂ O (0.62 g / 100 mL)	2.00 mL

6.3.1.5 SOC-Medium (Super Optimal broth with Catabolite repression)

Das SOC-Medium wurde für die Transformation von DNA in elektrokompente *E. coli* SoluBL21 Zellen benutzt. Die Zusammensetzung des SOC-Mediums ist in Tabelle 12 gezeigt. MgSO₄, MgCl₂ und Glucose wurden nach dem Autoklavieren über einen Sterilfilter zugegeben.

Tabelle 12. Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Bestandteil	Menge
Trypton	20.00 g
Hefeextrakt	5.00 g
NaCl	0.58 g
KCl	0.19 g
1 M MgSO ₄ 7H ₂ O	10.00 mL
1 M MgCl ₂ 6H ₂ O	10.00 mL
40 % D-Glucose	9.00 mL
dH ₂ O	auf 1 L

6.3.2 Puffer

6.3.2.1 Puffer für die Proteinaufreinigung

Die Puffer für die Proteinaufreinigung waren wie in Tabelle 13 gezeigt zusammengesetzt und wurden in Reinstwasser hergestellt. Der pH-Wert wurde bei allen Puffern auf 7.5 (HCl) eingestellt.

Tabelle 13. Zusammensetzung des Lysispuffer, der Waschpuffer und des Elutionspuffers.

Bestandteil	Imidazol	NaH ₂ PO ₄	NaCl	Glycerol
Konzentration in				
Lysispuffer	10 mM	50 mM	300 mM	10 %
Waschpuffer 1	20 mM	50 mM	300 mM	10 %
Waschpuffer 2	40 mM	50 mM	300 mM	10 %
Waschpuffer 3	80 mM	50 mM	300 mM	10 %
Elutionspuffer	250 mM	50 mM	300 mM	10 %

6.3.2.2 Enzym-Assay-Puffer

Für alle enzymatischen Umsetzungen dieser Arbeit wurde als Puffer 50 mM Tris HCl mit 50 mM MgCl₂ verwendet.

6.3.2.3 Puffer für die SDS-PAGE

Tabelle 14. Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE.

Konzentration in Bestandteil	SDS-Ladepuffer (5x)	Trenngel-Puffer (4x), pH = 8.8	Sammelgel-Puffer (4x), pH = 6.8
Tris HCl	220 mM	1.50 mM	0.50 M
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)	-	-
SDS	10 % (w/v)	0.80 % (w/v)	0.80 % (w/v)
Bromphenolblau	0.20 % (w/v)	-	-
Glycerol	50 % (v/v)	-	-

6.3.3 Zusätze

Tabelle 15. Konzentrationen der verwendeten Antibiotika und Zusätze.

Zusatz	Stockkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg / mL	100 µg/ mL
Kanamycin	50 mg/ mL	50 µg/ mL
IPTG	1.0 M	0.5 mM

Das Antibiotikum Ampicillin wurde in einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und destilliertem Wasser, das Antibiotikum Kanamycin wurde in destilliertem Wasser gelöst. IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), das zur Induktion der Proteinexpression verwendet wurde, wurde ebenfalls in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und die Aliquots bei -20 °C gelagert.

6.4 Mikro- und molekularbiologische Techniken

6.4.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in flüssigem Medium oder auf Kulturplatten. Für die Kultivierung in flüssigem Medium wurde das Medium mit einem entsprechenden Antibiotikum in einer in Tabelle 15, Kapitel 6.3.3 beschriebenen Endkonzentration versetzt.

Die Animpfung des Flüssigmediums aus bakteriellen Cryokulturen erfolgte mit einer Pipettenspitze. Die Animpfung des Flüssigmediums mit Vorkulturen erfolgte mit einer 1:100 oder 1:50 Verdünnung, wobei die Vorkulturen in der Regel in einem Volumen von 5 mL kultiviert wurden. Die Kultivierung erfolgte dann in einem Schüttelinkubator. Die spezifischen Parameter der Kultivierung sind explizit in den einzelnen Experimenten aufgeführt.

Für die Kultivierung auf Kulturplatten wurde eine Pipettenspitze aus der bakteriellen Cryokultur in 80-100 μL sterilem Wasser gelöst bzw. 80-100 μL einer frischen Flüssigkultur entnommen und mit einer Impföse gleichmäßig auf den Kulturplatten verteilt. Die Kultivierung erfolgte in der Regel in einem Inkubationsschrank bei 37 °C über Nacht.

6.4.2 Anlegen von bakteriellen Cryokulturen

Zum Anlegen von bakteriellen Cryokulturen wurde der entsprechende Bakterienstamm in einer frischen Flüssigkultur über Nacht kultiviert. Unter sterilen Bedingungen wurden 700 μL dieser Bakterienkultur in einem Cryoröhrchen mit 300 μL einer 50 %igen Glycerin-Lösung vermischt, sodass der finale Glycerin-Anteil 15 % betrug. Die so hergestellten Cryokulturen wurden bei -78 °C gelagert.

6.4.3 Bestimmung der optischen Zelldichte von flüssigen Bakterienkulturen

Die Bestimmung der Zelldichte von flüssigen Bakterienkulturen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}). Als Referenz diente das entsprechende sterile Medium. Die photometrische Messung erfolgte in Einwegküvetten mit einer optischen Weglänge von einem Zentimeter. Der Bestimmung liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} = Extinktion bei der Wellenlänge λ

ε_{λ} = spezifischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c = Konzentration

d = optische Weglänge

Da die Parameter ε_{λ} und d konstant sind, verhält sich die Konzentration linear proportional zur gemessenen Extinktion.

6.4.4 Transformation in elektrokompetente Zellen

Ein Aliquot (40 µL) elektokompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit ca. 100 ng eines in sterilem Wasser gelösten DNA-Plasmids vermischt. Die Mischung wurde in eine gekühlte, sterile Elektroporationsküvette überführt, sodass die Mischung gleichmäßig auf dem Boden der Küvette verteilt war. Mit einem Elektroporator wurde das Gemisch über das Programm EC2 Bacteria einer kurzzeitigen Spannung von 2.50 kV ausgesetzt und sofort mit 1 mL SOC-Medium versetzt, gemischt und in ein steriles 1.50 mL Reaktionsgefäß überführt, das bei 37 °C und 200 rpm eine Stunde inkubiert wurde. Dann wurde der Ansatz resuspendiert, 100 µL auf einer Kulturplatte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

6.4.5 Plasmidisolierung

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I der Firma *Peqlab*. Die Durchführung folgte dem vom Hersteller angegebenen Kurzprotokoll.

6.5 Proteinproduktion & Proteinreinigung

6.5.1 Heterologe Proteinproduktion in *E.coli*

Zunächst wurde eine Vorkultur in mit entsprechendem Antibiotikum versetzten LB-Medium angesetzt. Die Vorkultur wurde bei 37 °C über Nacht bei 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst 1 mL der Vorkultur für die SDS-PAGE-Analytik entnommen. Hierfür wurden die Zellen pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 80 µL sterilem Wasser resuspendiert und bis zur Verwendung bei -4 °C bzw. -20 °C gelagert. Des Weiteren wurde das gewünschte Volumen des entsprechenden Kulturmediums in einer 1:100 Verdünnung mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und in einer 1:100 oder 1:50 Verdünnung mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zum Erreichen eines OD₆₀₀-Wertes von 0.6-0.8 inkubiert. Im Anschluss wurde die angewachsene Kultur kurz auf Eis gekühlt, die Proteinproduktion durch die Zugabe von IPTG in einer 0.5 mM-Endkonzentration induziert und die Kultur über Nacht bei einer spezifischen Temperatur (vgl. Tabelle 16) und 200 rpm inkubiert. Bei Einsatz des ZYM-5052 Autoinduktionsmediums wurde die Kultur bei Erreichen des gewünschten OD₆₀₀-Wertes direkt in einen Schüttelinkubator mit der spezifischen Temperatur (vgl. Tabelle 16) überführt und über Nacht bei 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien durch mehrfaches Zentrifugieren (5000 x g, 5 min) pelletiert, die

Überstände wurden verworfen und die Pelletes entweder bei -78 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

Tabelle 16. Übersicht der spezifischen Parameter für die heterologe Proteinproduktion

der in dieser Arbeit produzierten Proteine.

Protein	Vektor	Bakterienstamm	Medium	Induktion	Temperatur
Sfp	pHis8	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	TB	IPTG	16 °C
ComC-CP-1	pHis8	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	TB	IPTG	20 °C
SalD	pHis8	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	ZYM-5052	auto	20 °C
SalB-CP	pGS-21a	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	ZYM-5052	auto	20 °C

6.5.2 Zellaufschluss

Nach der heterologen Proteinproduktion in *E. coli* (vgl. Kapitel 6.5.1) wurden zu je 1 g Zellpellet 5 mL Lysispuffer (vgl. Tabelle 13, Kapitel 6.3.2.3) zugesetzt und die Zellen resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung auf Eis. Die Zellen wurden hierbei 10 Mal im Wechsel 10 Sekunden beschallt und 10 Sekunden auf Eis geschwenkt. Dann wurde bei 10000 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert, die Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt. Für die SDS-PAGE-Analytik wurde eine Pipettenspitze vom Pellet entnommen, in 200 μ L sterilem Wasser resuspendiert und bis zur Verwendung bei -4 °C bzw. -20 °C gelagert.

6.5.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der überproduzierten His₈-Tag-Fusionsproteine wurde die Überstandsfraktion des Zellaufschlusses (vgl. Kapitel 6.5.2) mit einer Ni-NTA-Agarose-Lösung der Firma *Jena Bioscience* (1mL/ L Zellkultur) versetzt und für mindestens eine Stunde auf Eis liegend inkubiert. Die Suspension wurde anschließend komplett auf eine Ni-NTA-Säule gegeben. Der Durchfluss wurde in einem neuen Gefäß gesammelt. Das Protein-bindende Harz wurde mit Waschpuffern unterschiedlicher Imidazolkonzentration (20-80 mM, vgl. Kapitel 6.3.2.1) gewaschen und die Durchflüsse jeweils in einem neuen Gefäß gesammelt. Zum Schluss wurde das Protein mit einem Elutionspuffer (Kapitel 6.3.2.1) vom Harz eluiert. Von jeder Waschfraktion und der Elutionsfraktion wurden je 20 μ L für die SDS-PAGE-Analytik entnommen und bis zur Verwendung bei -4 °C bzw. -20 °C gelagert.

6.5.4 Entsalzung und Aufkonzentrieren der Proteine

Die Elutionsfraktionen der Proteinaufreinigung (vgl. Kapitel 6.5.3) wurden mit Hilfe einer äquilibrierten PD-10-Säule der Firma *GE Healthcare* gemäß dem „Gravity protocol“ des Herstellers entsalzt und umpuffert. Alternativ erfolgte die Entsalzung und Umpufferung via Dialyse mit Hilfe eines SnakeSkin-Dialysis Tubing-Systems der Firma *Thermo Scientific*. Zum Aufkonzentrieren der Proteine wurden Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren der Firma *Sartorius Stedim Biotech* benutzt. Diese Zentrifugalkonzentratoren besitzen eine semipermeable Membran, die nur für Moleküle bestimmter Größe passierbar ist (MWCO, engl. **m**olecular **w**eight **c**ut **o**ff). Die Porengröße des Konzentrators sollte daher mindestens halb so groß sein wie die Molekülgröße des aufzukonzentrierenden Proteins. Das Aufkonzentrieren wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.5.5 Rekonstitution von SalD

Zur Rekonstitution des Hämiproteins SalD wurde eine Häminchloridlösung hergestellt. Hierfür wurde eine Spatelspitze Haeminchlorid in 1 mL 0.1 M Natronlauge gelöst und über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 385 nm die Konzentration dieser Lösung bestimmt. Der Bestimmung lag das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde:

$$E_{385} = \epsilon_{385} \cdot c \cdot d$$

E_{385} = Extinktion bei der Wellenlänge 385 nm

ϵ_{385} = spezifischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge 385 = 58.44 1/(mM·cm)

c = Konzentration

d = optische Weglänge = 1 cm

Zur Rekonstitution des Proteins wurde während der Proteinreinigung (vgl. Kapitel 6.5.3) nach dem Waschen des Harzes mit unterschiedlichen Waschpuffern, das Harz in 10-15 mL 50 mM Tris HCl Puffer, der mit der Haeminchlorid-Lösung zu einer Endkonzentration von 20 μ M versetzt wurde, bei 4 °C schüttelnd 1.5-2 Stunden inkubiert. Dann wurde die Suspension wieder in die Ni-NTA-Säule überführt, der Durchfluss separat gesammelt und mit der Elution wie in Kapitel 6.8.3 beschrieben fortgeführt.

6.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

In der Regel wurde die Proteinkonzentration über die Messung der Absorption mit Hilfe eines Nanodrop-Photometers bestimmt. Die hierfür notwendigen spezifischen Extinktions-

koeffizienten ε_{280} der einzelnen Proteine wurden mit Hilfe der online-Software *ProteinCalculator v3.4* berechnet.

Im Falle des Proteins ComC-PCP wurde die Konzentration mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt. Hierfür wurde zunächst mit BSA als Standardprotein und destilliertem Wasser als Referenz eine Eichgerade erstellt, wobei das Reagenz Roti[®]-Nanoquant (5x) der Firma *Roth* gemäß den Herstellerangaben verwendet wurde. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen des Standard-Proteins hergestellt und mit dem Reagenz gemischt. Dann wurde das Absorptionsverhältnis E_{590}/E_{450} mit Hilfe des Photometers bestimmt und gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Im Anschluss konnte mit Hilfe der Eichgeraden und dem gemessenen Absorptionsverhältnis E_{590}/E_{450} des heterolog produzierten Proteins dessen Konzentration bestimmt werden.

Im Falle der Flavoprotein-abhängigen Adrenodoxin-Reduktase (AdR) und des Eisen-Schwefel-Proteins Adrenodoxin (AdX) wurde die Konzentration des aktiven Proteins über die Absorption der entsprechenden Cofaktoren (Riboflavin bei AdR und Eisen (III) bei AdX) bestimmt. Es erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Fall von AdR und bei einer Wellenlänge von 414 nm im Fall von AdX. Der Konzentrationsbestimmung lag das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} = Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda = 450$ nm bzw. 414 nm

ε_{λ} = spezifischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

für AdR $\varepsilon_{450} = 10900$ 1/(M·cm)

für AdX $\varepsilon_{414} = 11000$ 1/(M·cm)

c = Konzentration

d = optische Weglänge = 0.02 cm

6.5.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analytik der heterolog produzierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulphat Polyacrylamidgelelektrophorese, engl. sodiumdodecylsulfate polyacrylamidegelelectrophoresis) in einem vertikalen Multigel-Elektrophoresesystem, wobei die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden.

Das Polyacrylamidgel bestand im oberen Teil aus einem Sammelgel (s. Tabelle 18) und im unteren Teil aus einem Trenngel. Für kleinere Proteine wurde dabei ein 15 %iges Trenngel verwendet und für größere Proteine ein 12 %iges Trenngel (s. Tabelle 17). Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde es in einer Elektrophoresekammer positioniert und mit 1 x

SDS-Laufpuffer der Firma *Roth* befüllt. Die Proben wurden vor der Auftragung mit einem SDS-Ladepuffer (5x) (für 20 µL Probe wurden 5 µL SDS-Ladepuffer verwendet) ersetzt und bei 95 °C 5-10 Minuten denaturiert. Als Referenz diente der PierceTM Unstained Protein MW marker (14.4-116 kDa) der Firma *Thermo Scientific*, der ColorPlusTM Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) der Firma *New England Biolabs* oder der Triple Color Protein Standard III (5-245 kDa) der Firma *SERVA* (vgl. Abbildung 27). Die Färbung der Gele erfolgte mit einem Coomassie Brilliant Blue Färber (0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 10 % (v/v) Eisessig, 25 % (v/v) Isopropanol), der vorher kurz aufgeköcht wurde. Die Gele wurden für 30-60 Minuten gefärbt, dann zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit dem Entfärber (10 % (v/v) Eisessig) über Nacht entfärbt, wobei der Entfärber vor Zugabe ebenfalls kurz aufgeköcht wurde. Nach Bedarf wurde der Entfärbungsprozess wiederholt.

Tabelle 17. Zusammensetzung eines SDS-PAGE-Trenngels.

Bestandteil	Menge	Menge
Trenngel	(12 %)	(15 %)
Trenngel-Puffer (4x)	1.40 mL	1.40 mL
dH₂O	2.50 mL	2.10 mL
Acrylamid (40 %)	1.70 mL	2.10 mL
APS (10 %, w/v)	37.50 µL	37.50 µL
TEMED	5.60 µL	5.60 µL

Tabelle 18. Zusammensetzung eines SDS-PAGE-Sammelgels.

Bestandteil	Menge
Sammelgel	
Sammelgel-Puffer (4x)	0.50 mL
dH₂O	1.30 mL
Acrylamid (40 %)	0.20 mL
APS (10 %, w/v)	20.00 µL
TEMED	2.00 µL

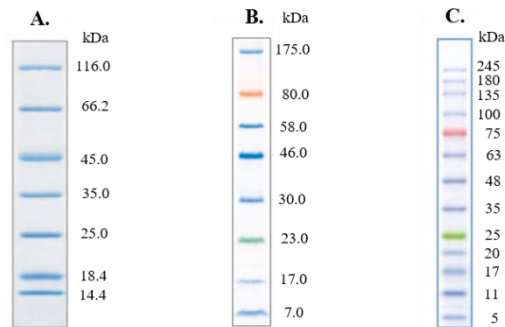


Abbildung 27. Referenz-Marker für die SDS-PAGE.

A. Pierce™ Unstained Protein MW marker (14.4-116 kDa) der Firma *Thermo Scientific*. **B.** ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) der Firma *New England Biolabs*. **C.** Triple Color Protein Standard III (5-245 kDa) der Firma *SERVA*.

6.6 Enzym-Assays

6.6.1 CP-Beladungsassay

Das CoA-Derivat bzw. CoA wurden in destilliertem Wasser gelöst und mit einer Endkonzentration von 100 μM zum Enzym-Assay-Puffer (s. 6.3.2.2) zugesetzt. Es wurden 120 μM CP-Domäne und 5 μM Sfp-PPTase bei 4 °C zugegeben. Der Ansatz wurde bei Einsatz von CoA 40-60 Minuten bei 37 °C inkubiert und bei Einsatz der CoA-Derivate 15 Stunden bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 90 μL der Assaylösung mittels HPLC-MS analysiert.

6.6.2 SalD-Hydroxylierungsassay

Das Substrat wurde mit einer Endkonzentration von 100 μM zum Enzym-Assay-Puffer (s. 6.3.2.2) gegeben. Es wurden 1 mM NADPH+H⁺, 1 μM AdR-Oxidoreduktase, 5 μM AdX und 2 μM SalD-Hydroxylase bei 4 °C zugegeben. Es wurde eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteine durch Zugabe von 15 % TFA gefällt, die einzelnen Proben bei 4°C und 14000 rpm zehn Minuten zentrifugiert und 90 μL des Überstandes mittels HPLC-MS analysiert.

6.7 Chromatographie

6.7.1 Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie

Die zur Umsatzkontrolle durchgeführte Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel-beschichteten Aluminiumplatten (DC Kieselgel 60 F₂₄) der Firma *Merck*. Die Detektion

erfolgte entweder unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm oder durch Anfärben mit Ninhydrin-Reagenz (0.53 g Ninhydrin, 150 mL Ethanol) bzw. Seebach-Reagenz (12.50 g Molybdätophosphorsäure, 5.00 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 16.00 mL konzentrierte Schwefelsäure, 450 mL destilliertes Wasser) und Entwicklung unter einem Heißluftstrom. Die säulenchromatographische Aufreinigung wurde mit Silicagel 60 Geduran[®] Si 60 (40-63 µm) der Firma *Merck* unter Druck durchgeführt. Die Eluenten werden jeweils im Syntheseteil (Kapitel 6.9) angegeben.

6.7.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

6.7.2.1 Analytische HPLC

Die HPLC-Analytik wurde anhand eines computergesteuerten Jasco Systems betrieben (System 1: MD-2010 Plus Multiwavelength Detector, DG-2080-53 3-Line Degaser, zwei PU-2086 Plus Intelligent Prep. Pumps, AS-2055 Plus Intelligent Sampler, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL *Portmann Instruments AG* Biel-Benken Probenschleife, LC-NetII/ADC; System 2: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, DG-2080-53 3-Line Degaser, zwei PU-1580 Intelligent HPLC Pumps, AS-1550 Intelligent Sampler, HG-1580-32 Dynamic Mixer, LC-NetII/ADC). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ChromPass Chromatography Data System-Software bzw. Galaxie-Chromatography-Software der Firma *Jasco*. Es wurde eine Eurospher II 100-3 C18 A (150x4.6 mm) Säule mit integrierter Vorsäule der Firma *Knauer* verwendet. Als Laufmittel dienten HPLC-reine Lösungsmittel: A = Wasser (HPLC-rein) + 0.05 % TFA und B = Acetonitril (HPLC-rein) + 0.05 % TFA. In der Regel wurde die folgende HPLC-Methode mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet: 0-2 min 5 % B, 2-25 min 5 % → 95 % B, 25-30 min 95 % B, 30-31 min 5 % B.

6.7.2.2 Semi-präparative HPLC

Zur Reinigung und Isolierung kleiner Produktmengen wurde ein PC-gesteuertes HPLC-System der Firma *Jasco* eingesetzt: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, zwei PU-1580 Intelligent HPLC Pumps, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL *Portmann Instruments AG* Biel-Benken, LC-NetII/ ADC, *Rheodyne* Injektionsventil. Das Programm wurde über eine Galaxie-Software gesteuert. Je nach Produktmenge wurde entweder die kleinere Eurospher II 100-5 C18 (250x8 mm) Säule mit der entsprechenden Eurospher II 100-5 C18 Vorsäule oder die größere Eurospher II 100-5 C18 A (250x16 mm) Säule mit der entsprechenden Eurospher II 100-5 C18 A Vorsäule der Firma *Knauer* verwendet. Das Lösungsmittelsystem

bestand aus A = Wasser (HPLC-rein) + 0.05 % TFA und B = Acetonitril (HPLC-rein) + 0.05 % TFA. Die Flussrate betrug für die kleinere Säule 5 mL/ min und für die größere Säule 9 oder 10 mL/ min.

Folgende Methoden wurden verwendet:

Methode P-I: Detektion bei 200 nm, 0-2 min 5 % B, 2-25 min 5 % → 95 % B, 25-26 min 95 % B, 26-26.10 min 5 % → 95 % B, 26.10-28 min 95 % B.

Methode P-II: Detektion bei 200 nm, 0-7 min 0 % → 10 % B, 7-10 min 10 % → 20 % B, 10-11 min 20 % → 40 % B, 11-15 min 40 % B, 15-16 min 40 % → 60 % B, 16-20 min 60 % B, 20-20.10 60 % → 0 %, 20.10-32 0 % B.

Methode P-III: Detektion bei 254 nm, 0-1 min 5 % B, 1-3 min 5 % B, 3-15 min 5 % → 50 % B, 15-18 min 50 % → 70 % B, 18-20 min 70 % B, 20-22 min 70 % → 5 % B, 22-27 5 % B.

6.7.2.3 HPLC-MS-Analytik

Für die gekoppelte HPLC-MS-Analytik wurden die in Kapitel 6.1 unter Massenspektrometrie und in Kapitel 6.7.2.1 vorgestellten Geräte verwendet.

Für die Umsatzkontrolle chemischer Reaktionen wurden dabei die in Kapitel 6.7.2.1 vorgestellten HPLC-Säule und HPLC-Methode verwendet.

Für die Umsatzkontrolle der CP-Beladungsassays wurde eine Eurosil Bioselect 300-3 C4 (250x4 mm) Säule mit integrierter Vorsäule der Firma *Knauer* verwendet. Das Lösungsmittelsystem bestand aus A = Wasser (HPLC-rein) + 0.05 % TFA und B = Acetonitril (HPLC-rein) + 0.05 % TFA. Die Detektion erfolgte bei 200 nm und die Flussrate betrug 0.5 mL/min. Die Methode setzte sich wie folgt zusammen: 0-2 min 20 % B, 2-17 min 20 % → 80 % B, 17-18 min 80 % → 95 % B, 18-23 min 95 % B, 23-24 min 95 % → 20 % B, 24-31 20 % B.

Für die Umsatzkontrolle der SalD-Hydroxylierungsassays wurde die HPLC-Säule und HPLC-Methode aus Kapitel 6.7.2.1 verwendet. Bei Einsatz der CoA-Ester als Substrate wurde folgende HPLC-Methode mit einer Flussrate von 1.0 mL/min und einer Detektion bei 254 nm verwendet: 0-1 min 5 % B, 1-3 min 5 % B, 3-15 min 5 % → 50 % B, 15-18 min 50 % → 70 % B, 18-20 min 70 % B, 20-22 min 70 % → 5 % B, 22-24 5 % B.

6.7.3 Medium pressure liquid chromatography (MPLC)

Zur Reinigung von Produkten wurde ein Reveleris[®] X2 MPLC-System in Kombination mit unterschiedlich großen Reverse Phase (RP) C18 Fertigsäulen der Firma *Grace* verwendet. Das

System wurde mit der Reveleris® Navigator™ Software der Firma *Grace* gesteuert und die UV-Detektion erfolgte bei 200 nm, 220 nm und 254 nm. Das Lösungsmittelsystem bestand aus A = Wasser (HPLC-rein) + 0.05 % TFA und B = Acetonitril (HPLC-rein) + 0.05 % TFA. Bei säureempfindlichen Substanzen wurde auf den Zusatz von TFA zu den Lösungsmitteln verzichtet, wobei dies in den jeweiligen Synthesevorschriften explizit erwähnt wird.

Folgende Methoden wurden verwendet:

Methode M-I: 12 g Säule, 15 mL/ min Flussrate, 0-2.5 min 5 % B, 2.5-5.0 min 5 % B → 20 % B, 5.0-5.5 min 20 % → 40 % B, 5.5-7.5 min 40 % B. 7.5-8.0 min 40 % → 60 % B, 8.0-10.0 min 60 % B.

Methode M-II: 12 g Säule, 30 mL/ min Flussrate, 0-3.5 min 0 → 10 % B, 3.5-5.0 min 10 % → 20 % B, 5.0-5.5 min 20 % → 40 % B, 5.5-7.0 min 40 % B. 7.0-8.0 min 40 % → 60 % B, 8.0-10.0 min 60 % B.

Methode M-III: 4 g Säule, 15 mL/ min Flussrate, 0-9.2 min 5 % → 95 % B, 9.2-12 min 95 % B.

Methode M-IV: 12 g Säule, 15 mL/ min Flussrate, 0-8.3 min 5 % → 95 % B, 8.3-12 min 95 % B.

Methode M-V: 40 g Säule, 40 mL/ min Flussrate, 0-7.3 min 5 % B, 7.3-14.6 min 5 % B → 20 % B, 14.6-16.1 min 20 % → 40 % B, 16.1-21.9 min 40 % B. 21.9-23.4 min 40 % → 60 % B, 23.4-29 min 60 % B.

Methode M-VI: 40 g Säule, 40 mL/ min Flussrate, 0-10.2 min 0 → 10 % B, 10.2-14.6 min 10 % → 20 % B, 14.6-16.1 min 20 % → 40 % B, 16.1-21.9 min 40 % B. 21.9-23.4 min 40 % → 60 % B, 23.4-29 min 60 % B.

Methode M-VII: 40 g Säule, 40 mL/ min Flussrate, 0-2.1 min 5 % B, 2.1-23.8 min 5 % B → 95 % B, 25.9-29.0 min 95 % B.

Methode M-VIII: 4 g Säule, 30 mL/ min Flussrate, 0-3.8 min 0 → 10 % B, 3.8-7.6 min 10 % → 20 % B, 7.6-8.6 min 20 % → 40 % B, 8.6-11.8 min 40 % B. 11.8-12.8 min 40 % → 60 % B, 12.8-16.0 min 60 % B.

Methode M-IX: 4 g Säule, 15 mL/ min Flussrate, 0-1.2 min 5 % B, 1.2-2.4 min 5 % B → 20 % B, 2.4-2.7 min 20 % → 40 % B, 2.7-3.7 min 40 % B. 3.7-4.0 min 40 % → 60 % B, 4.0-5.0 min 60 % B.

6.8 Allgemeine Synthesevorschriften

Luft- bzw. feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden unter Argon-Schutzgas und in trockenen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Glasapparaturen wurden vor Verwendung

unter Vakuum ausgeheizt und mit Argon gespült. Die absolutierten Lösungsmittel und flüssige Substanzen wurden über Spritzen zugegeben.

6.8.1 Peptidkupplung

Ein am *N*-Terminus entschütztes Peptid bzw. eine entschützte Aminosäure (1.05 eq) sowie ein am *C*-Terminus entschütztes Peptid bzw. eine entschützte Aminosäure (1.00 eq) wurden zusammen mit den Kupplungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl, 1.25 eq) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt, 1.07 eq) in Dichlormethan gelöst. Nachdem die Lösung auf 0 °C abgekühlt war, wurde langsam eine Base (2.50-3.50 eq) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Dann wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und die wässrige Phase drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

6.8.2 Phosphorylierung^[152] mit Diphenylphosphorochloridat

Das Substrat (1.00 eq) wurde mit 4-(Dimethylamino)-pyridin (1.75 eq) in trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argon-Schutzgasatmosphäre wurde Diphenylphosphorochloridat (1.70 eq) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt und zuerst mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung, dann mit destilliertem Wasser und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

6.8.3 Debenzylierung^[155]

Das Substrat (1.00 eq) wurde in Methanol gelöst und mit Palladium auf Kohle (10-25 w%) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde entgast und unter Wasserstoff-Atmosphäre gebracht (3x). Anschließend wurde 18 Stunden unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Dann wurde über Celite filtriert und der Filtrerrückstand mit Methanol und Ethylacetat nachgespült. Das Lösungsmittel wurde aus dem Filtrat unter vermindertem Druck entfernt.

6.8.4 Entschützung mit 4 N Salzsäure in Dioxan

Das Substrat (1.00 eq) wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit (mindestens 20.00 eq) einer 4 N Salzsäure-Dioxan-Lösung versetzt und 1.50-2.00 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und das Produkt unter Vakuum getrocknet.

6.8.5 Jones-Oxidation^[156]

Der Alkohol (1.00 eq) wurde in Aceton vorgelegt und bei Raumtemperatur mit 2.70 M CrO₃-Lösung in verdünnter Schwefelsäure versetzt bis die Reaktionslösung orange blieb. Dann wurde 20 Minuten gerührt und der grüne Niederschlag anschließend abfiltriert. Das Filtrat wurde eingengt und mit wenig destilliertem Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde noch zwei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Alle organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

6.8.6 Diphosphat-Kupplung^[119–121]

Unter Argonschutzgas-Atmosphäre wurde das Tripeptidphosphat (1.00 eq) in trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 3 Å Molsieb sowie 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI, 2.00 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt bis kein Substrat mehr durch Massenspektrometrie zu beobachten war (ca. 1.50-2.00 Stunden). Dann wurde das Diphosphat (2.50-5.00 eq) unter Argonschutzgas-Atmosphäre zugefügt und die Reaktionslösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Bildung des Produkts mittels Massenspektrometrie nachgewiesen wurde, wurde die Reaktionslösung über eine Spritze mit Filtervorsatz filtriert, mit viel HPLC-reinem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Das Produkt wurde aus dem Lyophilisat mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2) isoliert, Acetonitril wurde aus den Produktfraktionen unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mittels Lyophilisation getrocknet.

6.8.7 Phosphat-Entschützung mit Bromotrimethylsilan^[100–102,157,158]

Unter Argon-Schutzgasatmosphäre wurde das Substrat (1.00 eq) in trockenem Dichlormethan gelöst und mit 10 vol% Bromotrimethylsilan (3.00 eq) versetzt und unter Argon-Schutzgasatmosphäre 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einer Mischung aus

Methanol und destilliertem Wasser (20 %) bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und via MPLC (vgl. Kapitel 6.7.3) aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert.

6.8.8 Phosphorylierung mit Dimethylchlorophosphat^[158,159]

Unter Argon-Schutzgasatmosphäre wurde das Diol (1.00 eq) in trockenem Pyridin gelöst und bei -40 °C mit Dimethylchlorophosphat (3.00 eq) versetzt und unter Argon-Schutzgasatmosphäre 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde der entstandene weiße Niederschlag durch Zufügen von 1 N Salzsäure gelöst und das Reaktionsgemisch wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden zuerst drei Mal mit viel verdünnter Salzsäure, dann mit destilliertem Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

6.8.9 Festphasen-Synthese

6.8.9.1 Aktivieren des 2-Chlortritylchlorid-Harzes

Für Experimente an der Festphase wurde das 2-Chlortritylchlorid-Harz (0.84 mmol/g; 100-200 mesh) der Firma *aapptec* verwendet. Vor dem Beladen des Harzes mit der ersten Aminosäure wurde es unter Argon-Schutzgasatmosphäre aktiviert. Zu Beginn wurde es mit trockenem Dimethylformamid (10 mL/g Harz) und anschließend drei Mal mit trockenem Dichlormethan (je 10 mL/g Harz) in einem Glasreaktor mit Hahn und Fritte gewaschen. Die Aktivierung erfolgte anschließend unter Argon-Schutzgasatmosphäre durch Zugabe von frisch destilliertem Thionylchlorid (1.50 eq) in trockenem Dichlormethan (10 mL/g Harz) und einstündigem Schütteln bei Raumtemperatur. Die Farbe des Harzes änderte sich dabei von gelb zu dunkelbraun. Nach der Filtration der Reaktionslösung wurde das Harz noch zwei Mal mit trockenem Dimethylformamid (je 10 mL/g Harz) und drei Mal mit trockenem Dichlormethan (je 10 mL/g Harz) gewaschen.

6.8.9.2 Aufschwellen des Harzes

Vor jeder Reaktion am Harz, wurde das Harz aufgeschwollen, indem es 20-30 Minuten in trockenem Dichlormethan (10 mL/g Harz) bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Durch

Filtration wurde das Lösungsmittel dann entfernt und das Harz, falls notwendig, am Vakuum getrocknet.

6.8.9.3 Waschen des Harzes

Nach jeder Reaktion wurde das Harz gewaschen, indem der Reaktor mit Harz erst drei Mal mit absolutem Dimethylformamid gefüllt, jeweils zehn Sekunden geschüttelt und das Lösungsmittel durch Filtration entfernt wurde. Dann wurde der Reaktor mit absolutem Methanol gefüllt und erneut zehn Sekunden geschüttelt. Da sich das Harz in Methanol zusammenzieht, werden überschüssige Reaktanden, die sich in den Poren des Harzes gesammelt haben, verdrängt. Nach der Entfernung des Methanols aus dem Reaktor mittels Filtration wurde absolutes Dichlormethan zugegeben, wieder zehn Sekunden geschüttelt und filtriert. Dann wurde wieder absolutes Dimethylformamid zugegeben, zehn Sekunden geschüttelt und filtriert. Die letzten drei Waschvorgänge erfolgten wieder mit Dichlormethan. Im Anschluss wurde das Harz am Vakuum getrocknet.

6.8.9.4 Beladen des Harzes

Die zu ladende *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure (1.20 eq) und *N*-Methylmorpholin (3.20 eq) wurden in einer 10:1-Mischung aus Dichlormethan und Dimethylformamid (max. 15 mL/mmol) gelöst und in einen mit Harz (1.00 eq) gefüllten Festphasen-Reaktor aufgenommen. Es wurde bei Raumtemperatur 18 Stunden geschüttelt, dann wurde filtriert, der Reaktor mit HPLC-reinem Methanol gefüllt und zehn Minuten geschüttelt. Das Methanol wurde durch Filtration entfernt und das Harz wie unter 6.8.9.3 beschrieben gewaschen.

Um die freien Bindungsstellen des Harzes zu deaktivieren („Capping“) wurde in den Reaktor eine Lösung aus Dichlormethan/Methanol/Diisopropylethylamin in einem Verhältnis von 8:1.5:0.5 aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde filtriert und das Harz wie unter 6.8.9.3 beschrieben gewaschen.

Um den Substitutionsgrad des Harzes S_{Harz} zu bestimmen, wurde nach gründlicher Trocknung des Harzes am Vakuum der Fmoc-Test wie unter 6.8.9.5 beschrieben durchgeführt.

6.8.9.5 Fmoc-Test

Beim Fmoc-Test wird durch Einsatz von Piperidin die *N*-terminale Fmoc-Gruppe des an das Harz gebundenen Peptids abgespalten. Es entsteht dadurch ein Dibenzofulven-Piperidin-Addukt, das ein Absorptionsmaximum bei 301 nm besitzt. Die Absorption bei 301 nm gibt somit Aufschluss über die Konzentration der mit Piperidin abgespaltenen Fmoc-Gruppe, was

widerum einen Rückschluss auf die Konzentration der am Harz gebundene Aminosäure erlaubt.

Für den Fmoc-Test wurden 5-10 mg des beladenen und vollständig getrockneten Harzes mit 1 mL einer 20 %igen Piperidin-Lösung in Dimethylformamid versetzt und 20 Minuten geschüttelt. Das Harz wurde über Glaswolle filtriert und 100 μ L des Filtrats mit 10 mL Dimethylformamid verdünnt. Es wurde die Absorption dieser Lösung bei 301 nm gemessen, wobei Dimethylformamid als Referenz diente. Zur Berechnung des Substitutionsgrades S_{Harz} wurde der Durchschnittswert aus drei Absorptionsmessungen verwendet und die vom Hersteller angegebene Formel zugrunde gelegt:

$$S_{\text{Harz}} = \frac{101 \cdot A_{301}}{7.8 \cdot m_{\text{Harz}}}$$

S_{Harz} = Substitutionsgrad des Harzes in mmol/g Harz

A_{301} = Absorption bei einer Wellenlänge von 301 nm

m_{Harz} = Masse des eingewogenen Harzes in mg

6.8.9.6 Peptidkupplung

Die zu kuppelnde, am *N*-Terminus Fmoc-geschützte Aminosäure (4.00 eq) wurde mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (4.00 eq) und 1-Hydroxybenzotriazol (8.00 eq) in einem Gemisch aus Dichlormethan und Dimethylformamid (1:3 – 1:7) gelöst und in einen Reaktor mit am Harz gebundener Aminosäure (1.00 eq) aufgenommen. Der Festphasen-Reaktor wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und die Reaktionslösung filtriert. Das Harz wurde wie unter 6.8.9.3 beschrieben gewaschen und der Reaktionsumsatz mit Hilfe des Kaiser-Tests, wie unter 6.8.9.7 beschrieben, untersucht. Bei vollständigem Umsatz wurde am *N*-Terminus entschützt und mit der nächsten Aminosäure gekuppelt. Bei unvollständigem Umsatz wurde die Kupplungsreaktion wiederholt.

6.8.9.7 Kaiser-Test

Der Kaiser-Test basiert auf einer Reaktion von zwei Ninhydrin-Molekülen mit einem primären Amin zu einer stark violetten Imin-Verbindung, auch Ruhemanns Purpur genannt.

Zur Durchführung des sensitiven Tests wurden wenige Harzkügelchen mit absolutem Ethanol mehrmals gewaschen und dann mit 100 μ L einer Lösung aus 0.50 g Ninhydrin in 10 mL absolutem Ethanol und 100 μ L einer Lösung aus 0.40 mL einer 1 mM KCN_{aq}-Lösung in 20 mL Pyridin versetzt und in einem Heißluftstrom vorsichtig erwärmt. Eine Violett-Färbung der Lösung war nur in Anwesenheit von freien Aminogruppen möglich, sodass diese Farbänderung

als Hinweis einer unvollständigen Peptidkupplung galt. Das Ausbleiben der Farbänderung hingegen war auf einen kompletten Reaktionsumsatz bei der Peptidkupplung zurückzuführen.

6.8.9.8 Fmoc-Entschützung

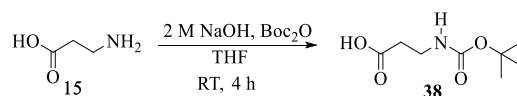
Zur Fmoc-Entschützung wurde das Harz mit 20 % Piperidin (2.10 eq) in Dimethylformamid versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, filtriert und wie in 6.8.9.3 beschrieben gewaschen. Die vollständige Entschützung wurde mit Hilfe des Fmoc-Tests bzw. des Kaiser-Tests überprüft und die Reaktion ggf. wiederholt.

6.8.9.9 Abspaltung vom Harz

Im Falle einer über ein Thiol an das Harz gebundenen Peptidkette erfolgte die Abspaltung vom Harz mit 50-95 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur. Im Falle einer über eine Hydroxygruppe gebundene Peptidkette, erfolgte die Abspaltung vom Harz mit 2 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan für zwei Mal 30 Minuten bei Raumtemperatur. In beiden Fällen wurde im Anschluss filtriert und das Harz noch vier Mal mit absolutem Methanol gewaschen. Alle gesammelten Filtrate wurden vereint und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in HPLC-reinem Wasser oder Methanol gelöst und mittels Massenspektrometrie analysiert.

6.9 Synthesen

6.9.1 *N*-Boc- β -Alanin^[160] (**38**)



Zu einer Lösung aus 1.50 g (16.84 mmol, 1.00 eq) β -Alanin (**15**) in 17 mL 2 M Natronlauge wurde bei 0 °C eine Lösung aus 5.51 g (25.26 mmol, 1.50 eq) Di-*tert*-Butyldicarbonat in 34 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und vier Stunden gerührt. Dann wurde Tetrahydrofuran unter vermindertem Druck aus der Reaktionslösung entfernt und die wässrige Phase mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH 2-3). Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 3.13 g (16.54 mmol, 98 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₈H₁₅NO₄

Molekulargewicht: 189.21 g/mol

Exakte Masse: 189.1001 au

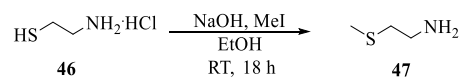
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT) δ 5.12-4.96 (bs, 1H, NH), 3.45-3.31 (m, 2H, CH₂-NH), 2.64-2.49 (m, 2H, HO₂C -CH₂), 1.45 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 177.5 (HO₂C), 146.9 (NH-C(O)), 85.3 (*tert*-Bu-C_q), 36.0 (CH₂-NH), 34.6 (HO₂C -CH₂), 28.5 (*tert*-Bu-CH₃).

MS (ESI): m/z 212.1 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 212.0898 [M+Na]⁺ (m/z 212.0899 [M+Na]⁺ ber. für C₈H₁₅NO₄Na).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[86,161]

6.9.2 S-Methylcysteamin^[162] (**47**)

Zu einer Lösung aus 11.50 g (101.20 mmol, 1.00 eq) Cysteamin Hydrochlorid (**46**) und 6.33 mL (101.20 mmol, 1.00 eq) Methyljodid in 30 mL Ethanol wurde eine Lösung aus 11.36 g (202.40 mmol, 2.00 eq) Kaliumhydroxid in 200 mL Ethanol zugetropft. Die entstandene Suspension wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel aus dem Filtrat unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde über eine fraktionierte Vakuumdestillation (25-30 mbar, 25-32 °C) aufgereinigt. Als Produkt konnten 4.84 g (53.08 mmol, 52 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten werden.

Summenformel: C₃H₉NS

Molekulargewicht: 91.18 g/mol

Exakte Masse: 91.0456 au

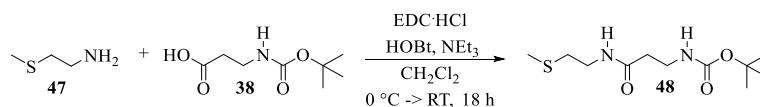
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 2.81 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.59 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, S-CH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃-S).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 40.9 (CH₂-NH₂), 37.8 (S-CH₂), 14.9 (CH₃-S).

MS (ESI): m/z 92.1 [M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 92.0527 [M+H]⁺ (m/z 92.0528 [M+H]⁺ ber. für C₈H₁₆NO₄).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[85,91]

6.9.3 *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-Methylcysteamin^[85] (**48**)

0.95 g (10.42 mmol, 1.00 eq) *S*-Methylcysteamin (**47**), 2.56 g (13.54 mmol, 1.30 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**), 1.76 g (13.02 mmol, 1.25 eq) HOBt und 2.50 g (13.02 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 110 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 2.9 mL (20.84 mmol, 2.00 eq) Triethylamin versetzt. Es wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung eingeeengt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden erst mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann mit 40%-iger Zitronensäure-Lösung und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 1:10, $R_f = 0.53$, Ninhydrin-Färbereagenz) gereinigt. Es wurden als Produkt 1.93 g (7.36 mmol, 71 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₁₁H₂₂N₂O₃S

Molekulargewicht: 262.34 g/mol

Exakte Masse: 262.1351 au

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT) δ 6.05 (bs, 1H, NH), 5.14 (bs, 1H, NH), 3.47 (q, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.41 (t, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH₂-NH), 2.67-2.59 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.41 (t, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.11 (s, 3H, CH₃-S), 1.43 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 171.5 (C(O)), 156.2 (C(O)O-*tert*-Bu), 79.5 (*tert*-Bu-C_q), 37.7 (CH₂), 36.9 (CH₂), 36.5 (CH₂), 33.9 (S-CH₂), 28.6 (*tert*-Bu-CH₃), 15.1 (CH₃-S).

MS (ESI): m/z 263.1 [M+H]⁺, 285.1 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 285.1244 [M+Na]⁺ (m/z 285.1243 [M+Na]⁺ ber. für C₁₁H₂₂N₂O₃SNa).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[86]

6.9.4 β -Alanyl-*S*-Methylcysteamin Hydrochlorid^[163] (**49**)

0.76 g (2.90 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-Methylcysteamin (**48**) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.4 mit 5 mL (144.85 mmol, 50.00 eq) einer 4 N Salzsäure-Dioxan-Lösung zur Reaktion gebracht. Es wurden 0.57 g (2.87 mmol, 99 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₆H₁₅N₂OSCl

Molekulargewicht: 198.71 g/mol

Exakte Masse: 198.0594 au

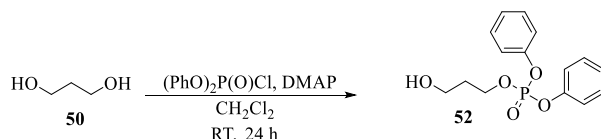
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT,) δ 3.40 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.19 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.64-2.59 (m, 4H, CH₂-CH₂-NH), 2.11 (s, 3H, CH₃-S).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 172.2 (C(O)), 39.4 (CH₂-N), 37.1 (CH₂-N), 34.2 (C(O)-CH₂), 32.7 (S-CH₂), 15.1 (CH₃-S).

MS (ESI): m/z 163.1 [M-HCl+H]⁺, 185.1 [M-HCl+Na]⁺, 199.1 [M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 163.0895 [M-HCl+H]⁺ (m/z 163.0900 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₆H₁₅N₂OS).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[86]

6.9.5 (3-Hydroxypropyl)diphenylphosphat^[164] (**52**)

1.00 g (13.14 mmol, 1.00 eq) 1,3-Propandiol (**50**) wurden mit 2.00 g (16.43 mmol, 1.25 eq) 4-(Dimethylamino)pyridin in 65 mL trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit 4.24 mL (20.46 mmol, 1.56 eq) Diphenylphosphorochloridat (**42**) gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.2 zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 1:10, $R_f = 0.42$, Seebach-Färbereagenz) wurden als Produkt 1.54 g (5.00 mmol, 38 %) einer farblosen, viskosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $C_{15}H_{17}O_5P$

Molekulargewicht: 308.27 g/mol

Exakte Masse: 308.0814 au

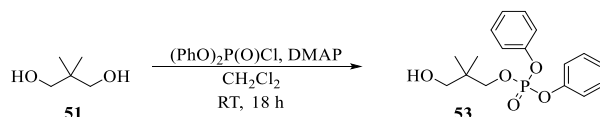
¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 7.36 – 7.30 (m, 4H, Ar-H), 7.23 – 7.16 (m, 6H, Ar-H), 4.39 (dt, $^3J_{H,P} = 8.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.65 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 2H, HO-CH₂), 2.62 (s, 1H, OH), 1.89 (pd, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, $^4J_{H,P} = 1.3$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 150.5 (d, Ar-C), 129.9 (d, Ar-C), 125.5 (d, Ar-C), 120.1 (d, Ar-C), 66.2 (d, CH₂-OP), 58.0 (HO-CH₂), 33.0 (d, CH₂-CH₂-CH₂).

³¹P-NMR (122 MHz, $CDCl_3$, RT) δ -11.06 (t, $^3J_{P,H} = 8.9$ Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 309.1 $[M+H]^+$, 331.1 $[M+Na]^+$, 639.2 $[2M+Na]^+$, 947.2 $[3M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 309.0885 $[M+H]^+$ (m/z 309.0892 $[M+Na]^+$ ber. für $C_{15}H_{18}O_5P$).

6.9.6 (3-Hydroxy-2,2-dimethylpropyl)diphenylphosphat^[164] (**53**)

2.00 g (19.20 mmol, 1.00 eq) 2,2-Dimethyl-1,3-propanediol (**51**) wurden mit 2.93 g (24.00 mmol, 1.25 eq) 4-(Dimethylamino)pyridin in 100 mL trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit 6.19 mL (23.04 mmol, 1.20 eq) Diphenylphosphorochloridat (**42**) gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.2 zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1, $R_f = 0.45$, Seebach-Färbereagens) wurden als Produkt 2.50 g (7.43 mmol, 39 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $C_{17}H_{21}O_5P$

Molekulargewicht: 336.32 g/mol

Exakte Masse: 336.1127 au

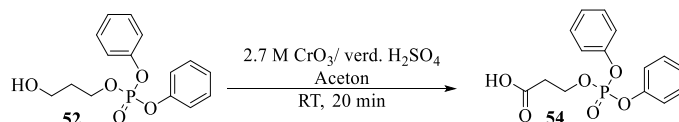
¹H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 7.42-7.35 (m, 4H, Ar-H), 7.30-7.19 (m, 6H, Ar-H), 4.06 (d, $^3J_{H,P} = 8.4$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.30 (s, 2H, HO-CH₂), 0.90 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 150.4 (d, Ar-C), 129.7 (d, Ar-C), 125.4 (d, Ar-C), 120.0 (d, Ar-C), 73.7 (d, CH₂-OP), 67.0 (HO-CH₂), 36.9 (d, C_q-CH₃), 20.8 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (122 MHz, $CDCl_3$, RT) δ -10.36 (t, $^3J_{P,H} = 8.3$ Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 337.1 $[M+H]^+$, 359.1 $[M+Na]^+$, 673.2 $[2M+H]^+$, 695.2 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 337.1198 $[M+H]^+$ (m/z 337.1205 $[M+H]^+$ ber. für $C_{17}H_{22}O_5P$).

6.9.7 3-((Diphenoxyphosphoryl)oxy)propansäure (**54**)

0.11 g (0.36 mmol, 1.00 eq) des Substrats **52** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.5 mit 2.7 M CrO₃-Lösung in Aceton zur Reaktion gebracht. 81.0 mg (0.25 mmol, 70 %) einer braunen Flüssigkeit wurden als Produkt erhalten.

Summenformel: C₁₅H₁₅O₆P

Molekulargewicht: 322.25 g/mol

Exakte Masse: 322.0606 au

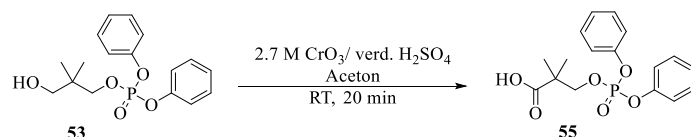
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.37-7.28 (m, 4H, Ar-H), 7.26-7.12 (m, 6H, Ar-H), 4.52 (q, ³J_{H,H} = ³J_{H,P} = 7.2 Hz, 2H, CH₂-OP), 2.74 (t, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, HO₂C-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 174.5 (CO₂H), 150.5 (d, Ar-C), 130.0 (Ar-C), 125.6 (Ar-C), 120.2 (d, Ar-C), 64.4 (d, CH₂-OP), 35.2 (d, HO₂C-CH₂).

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃, RT) δ -12.30 (t, ³J_{P,H} = 7.8 Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 323.1 [M+H]⁺, 345.0 [M+Na]⁺, 667.1 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 323.0678 [M+H]⁺ (m/z 323.0684 [M+H]⁺ ber. für C₁₅H₁₆O₆P).

6.9.8 3-((Diphenoxyphosphoryl)oxy)-2,2-dimethylpropansäure (**55**)

0.10 g (0.30 mmol, 1.00 eq) des Substrats **53** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.5 mit 2.7 M CrO₃-Lösung in Aceton zur Reaktion gebracht. 78.0 mg (0.22 mmol, 74 %) einer leicht grünen Flüssigkeit wurden als Produkt erhalten.

Summenformel: C₁₇H₁₉O₆P

Molekulargewicht: 350.31 g/mol

Exakte Masse: 350.0919 au

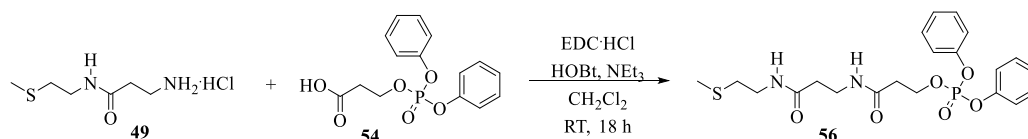
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT,) δ 7.37-7.29 (m, 4H, Ar-H), 7.25-7.12 (m, 6H, Ar-H), 4.27 (d, ³J_{H,P} = 4.9 Hz, 2H, CH₂-OP), 1.24 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 180.6 (CO₂H), 150.5 (d, Ar-C), 129.9 (Ar-C), 125.6 (Ar-C), 120.2 (d, Ar-C), 74.3 (d, CH₂-OP), 43.6 (d, C_q-CH₃), 21.8 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃, RT) δ -12.54 (t, ³J_{P,H} = 4.9 Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 351.1[M+H]⁺, 373.1[M+Na]⁺, 701.2 [2M+H]⁺, 723.2 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 351.0991 [M+H]⁺ (m/z 351.0997 [M+H]⁺ ber. für C₁₇H₂₀O₆P).

6.9.9 Phosphopantethein-Derivat **56**

52.0 mg (0.26 mmol, 1.05 eq) des Dipeptids **49**, 81.0 mg (0.25 mmol, 1.00 eq) der Säure **54**, 36.0 mg (0.27 mmol, 1.07 eq) HOBT und 60.0 mg (0.31 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.1 bei 0 °C mit 87.00 µL (0.63 mmol, 2.50 eq) Triethylamin zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel (Methanol:Ethylacetat 1:3, $R_f = 0.52$, Seebach-Färbereagens) und anschließend mittels MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-III) gereinigt und 27.0 mg (0.06 mmol, 23 %) einer viskosen Flüssigkeit als Produkt erhalten.

Summenformel: $C_{21}H_{27}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 466.49 g/mol

Exakte Masse: 466.1327 au

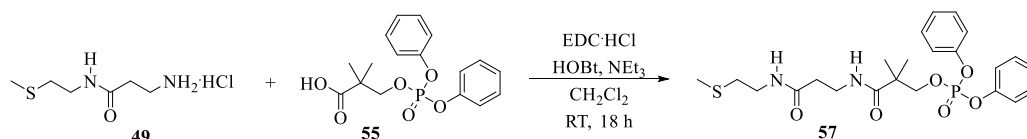
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , RT,) δ 7.44-7.36 (m, 4H, Ar-H), 7.28-7.19 (m, 6H, Ar-H), 4.56 (q, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,P} = 6.7$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.42 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.36 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, CH₂-NH), 2.65-2.55 (m, 4H, CH₂-CH₂-NH), 2.37 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, C(O)-CH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃-S).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 173.6 (C(O)), 171.8 (C(O)), 151.8 (d, Ar-C), 131.1 (Ar-C), 126.9 (Ar-C), 121.2 (d, Ar-C), 67.0 (d, CH₂-OP), 39.4 (CH₂-NH), 37.6 (d, CH₂-CH₂-OP), 37.1 (CH₂), 36.6 (CH₂), 34.2 (S-CH₂), 15.1 (CH₃-S).

^{31}P -NMR (122 MHz, CD_3OD , RT) δ -12.37 (t, $^3J_{P,H} = 7.1$ Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 467.1 $[M+H]^+$, 489.1 $[M+Na]^+$, 933.3 $[2M+H]^+$.

HRMS (ESI): m/z 467.1398 $[M+H]^+$ (m/z 467.1405 $[M+H]^+$ ber. für $C_{21}H_{28}N_2O_6PS$).

6.9.10 Phosphopantethein-Derivat **57**

46.0 mg (0.23 mmol, 1.05 eq) des Dipeptids **49**, 78.0 mg (0.22 mmol, 1.00 eq) der Säure **55**, 32.0 mg (0.24 mmol, 1.07 eq) HOBT und 53.0 mg (0.28 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.1 bei 0 °C mit 76.00 µL (0.55 mmol, 2.50 eq) Triethylamin zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel (Methanol:Ethylacetat 1:3, $R_f = 0.64$, Seebach-Färbereagenz) und anschließend mittels MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-III) gereinigt und 37.0 mg (0.07 mmol, 34 %) einer viskosen Flüssigkeit als Produkt erhalten.

Summenformel: $C_{23}H_{31}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 494.54 g/mol

Exakte Masse: 494.1640 au

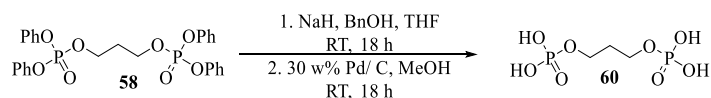
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.44-7.36 (m, 4H, Ar-H), 7.28-7.19 (m, 6H, Ar-H), 4.27 (d, $^3J_{H,P} = 4.7$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.43-3.33 (m, 4H, CH₂-NH), 2.58 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.36 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.08 (s, 3H, CH₃-S), 1.19 (s, 6H, C_q-CH₃).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 177.2 (C(O)), 173.8 (C(O)), 151.8 (d, Ar-C), 131.1 (Ar-C), 126.9 (Ar-C), 121.2 (d, Ar-C), 76.5 (d, CH₂-OP), 44.5 (d, C_q-CH₃) 39.4 (CH₂-NH), 37.4 (CH₂), 36.5 (CH₂), 34.2 (S-CH₂), 22.2 (C_q-CH₃), 15.1 (CH₃-S).

^{31}P -NMR (122 MHz, CD_3OD , RT) δ -12.44-(-12.64) (m, 1P).

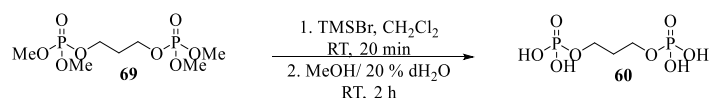
MS (ESI): m/z 495.2 $[M+H]^+$, 517.2 $[M+Na]^+$, 989.4 $[2M+H]^+$.

HRMS (ESI): m/z 495.1710 $[M+H]^+$ (m/z 495.1718 $[M+H]^+$ ber. für $C_{23}H_{31}N_2O_6PS$).

6.9.11 Propan-1,3-diylbis(dihydrogenphosphat) (**60**)A. Durchführung in Anlehnung an J. Schulz *et al.* [93]

0.77 mL (7.40 mmol, 4.00 eq) Benzylalkohol wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 80 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und bei 0 °C mit 0.35 g (8.79 mmol, 4.75 eq) einer 60 %igen Mineralöl-Dispersion von Natriumhydrid versetzt. Es wurde einige Zeit gerührt und dann 1.00 g (1.85 mmol, 1.00 eq) des Edukts **58** zugefügt und bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Im Anschluss wurde überschüssiges Natriumhydrid durch langsames Zutropfen von 30 mL destilliertem Wasser hydrolysiert und die Reaktionslösung dann mit jeweils 40 mL Diethylether zwei Mal extrahiert. Die organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulphat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1, $R_f = 0.14$, Seebach-Färbereagenz) gereinigt und 0.38 g (0.64 mmol, 34 %) einer gelben Flüssigkeit als Produkt erhalten. Das Produkt wurde in 15.00 mL Methanol gelöst und mit 114.0 mg (30 w%) Palladium auf Kohle gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.3 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.15 g (0.64 mmol, 100 %) einer leicht gelben, viskosen Flüssigkeit erhalten.

B. Durchführung unter Einsatz von Bromotrimethylsilan [99–103]



0.36 g (1.23 mmol, 1.00 eq) des Edukts **69** wurden unter Argon in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.65 mL (4.92 mmol, 4.00 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-I) aufgereinigt. Als Produkt wurden 0.20 g (0.85 mmol, 69 %) einer viskosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $C_3H_{10}O_8P_2$

Molekulargewicht: 236.05 g/mol

Exakte Masse: 235.9851 au

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , RT) δ 4.10 (q, $^3J_{H,P} = ^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 4H, \underline{CH}_2 -OP), 2.02 (p, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -OP).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 62.5 (\underline{CH}_2 -OP), 30.9 (\underline{CH}_2 - CH_2 -OP).

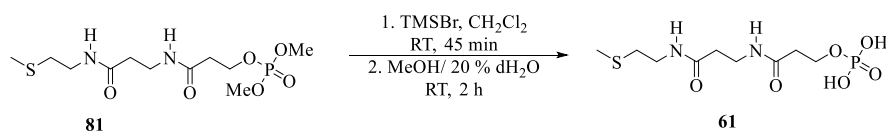
^{31}P -NMR (121 MHz, CD_3OD , RT) δ 0.08 (t, $^3J_{P,H} = 7.0$ Hz, 2P).

MS (ESI): m/z 237.0 $[M+H]^+$, 473.0 $[2M+H]^+$, 495.0 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 236.9922 $[M+H]^+$ (m/z 236.9924 $[M+Na]^+$ ber. für $C_3H_{11}O_8P_2$).

HRMS (ESI): m/z 234.9779 $[M-H]^-$ (m/z 234.9773 $[M-H]^-$ ber. für $C_3H_9O_8P_2$).

6.9.12 Phosphopantethein-Derivat **61**



73.0 mg (0.21 mmol, 1.00 eq) des Substrats **81** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 6.60 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.7 mL (0.53 mmol, 2.50 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Der gelbe Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert, um als Produkt 10.0 mg (0.032 mmol, 15 %) einer viskosen Flüssigkeit zu erhalten.

Summenformel: $C_9H_{19}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 314.29 g/mol

Exakte Masse: 314.0701 au

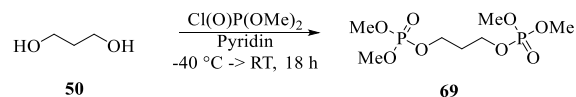
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , RT,) δ 4.21 (dt, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, $^3J_{H,P} = 7.1$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -OP), 3.45 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 3.38 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 2.61 (t, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 2.55 (t, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -OP), 2.40 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 2.11 (s, 3H, \underline{CH}_3 -S).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 173.7 ($\underline{C}(O)$), 172.8 ($\underline{C}(O)$), 64.0 (d, \underline{CH}_2 -OP), 39.5 (\underline{CH}_2 -NH), 38.1 (d, \underline{CH}_2 - CH_2 -OP), 37.2 (\underline{CH}_2), 36.7 (\underline{CH}_2), 34.1 (S- \underline{CH}_2), 15.0 (\underline{CH}_3 -S).

^{31}P -NMR (121 MHz, CD_3OD , RT) δ -0.22 (t, $^3J_{P,H} = 7.0$ Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 313.0 $[M-H]^-$, 627.0 $[2M-H]^-$.

HRMS (ESI): m/z 313.0628 $[M-H]^-$ (m/z 313.0623 $[M-H]^-$ ber. für $C_9H_{18}N_2O_6PS$).

6.9.13 Propan-1,3-diylbis(dimethylphosphat) (**69**)

0.35 mL (4.83 mmol, 1.00 eq) des 1,3-Propandiols (**50**) wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 36 mL trockenem Pyridin gelöst und bei -40 °C mit 3.12 mL (28.98 mmol, 3.00 eq) Dimethylchlorophosphat gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.56$, Seebach-Färbereagenz), sodass als Produkt 0.73 g (2.50 mmol, 52 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten wurden.

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_{18}\text{O}_8\text{P}_2$

Molekulargewicht: 292.16 g/mol

Exakte Masse: 292.0477 au

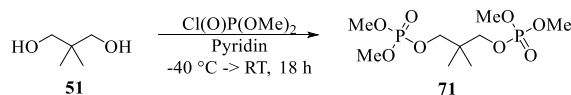
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , RT,) δ 4.19 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 7.0$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.79 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.1$ Hz, 12H, PO-CH_3), 2.08 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 65.2 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 55.1 (d, PO-CH_3), 31.9 (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CD_3OD , RT) δ 1.29-0.89 (m, 2P).

MS (ESI): m/z 293.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 315.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 607.2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 293.0540 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 293.0550 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_7\text{H}_{19}\text{O}_8\text{P}_2$).

6.9.14 2,2-Dimethylpropan-1,3-diylbis(dimethylphosphat) (**71**)

0.50 g (0.48 mmol, 1.00 eq) des 2,2-Dimethyl-1,3-propandiols (**51**) wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 5.00 mL trockenem Pyridin gelöst und bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ mit 0.16 mL (1.44 mmol, 3.00 eq) Dimethylchlorophosphat gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, sodass als Produkt 0.13 g (0.41 mmol, 85 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten wurden.

Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{O}_8\text{P}_2$

Molekulargewicht: 320.21 g/mol

Exakte Masse: 320.0790 au

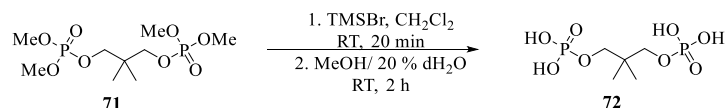
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ 3.84 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 4.5$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.78 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.1$ Hz, 12H, PO-CH_3), 0.99 (s, 6H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , RT) δ 71.8 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 54.5 (d, PO-CH_3), 36.4 (t, C_q), 20.9 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3 , RT) δ 1.50-0.74 (m, 2P).

MS (ESI): m/z 321.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 343.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 663.2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 343.0673 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (m/z 343.0682 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. für $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{O}_8\text{P}_2\text{Na}$).

6.9.15 2,2-Dimethylpropan-1,3-diylbis(dihydrogenphosphat) (**72**)

0.69 g (2.14 mmol, 1.00 eq) des Substrats **71** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 17 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 1.13 mL (8.56 mmol, 4.00 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde in Wasser aufgenommen und via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-I) aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert, um als Produkt 0.46 g (1.74 mmol, 81 %) eines weißen Feststoffs zu erhalten.

Summenformel: C₅H₁₄O₈P₂

Molekulargewicht: 264.11 g/mol

Exakte Masse: 264.0164 au

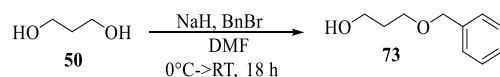
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT,) δ 3.78 (d, ³J_{H,P} = 4.8 Hz, 4H, CH₂-OP), 0.99 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 72.1 (d, CH₂-OP), 37.0 (t, C_q), 21.2 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.00 (t, ³J_{P,H} = 4.7 Hz, 2P).

MS (ESI): m/z 263.0 [M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 263.0081 [M-H]⁻ (m/z 263.0091 [M-H]⁻ ber. für C₅H₁₃O₈P₂).

6.9.16 3-(Benzyloxy)propan-1-ol (**73**)

Unter Kühlung auf 0 °C wurden 0.50 g (6.57 mmol, 1.00 eq) des 1,3-Propandiols (**50**) zu einer Suspension aus 0.26 g (6.57 mmol, 1.00 eq) einer 60 %igen Mineralöl-Dispersion von Natriumhydrid in 12 mL Dimethylformamid getropft und zehn Minuten bei 0 °C gerührt. Dann wurden 0.78 mL (6.57 mmol, 1.00 eq) Benzylbromid zugetropft und die Reaktionslösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktion mit destilliertem Wasser und unter Kühlung auf 0 °C gequencht wurde, wurde fünf Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Pentan:Ethylacetat 3:1, $R_f = 0.22$, Seebach-Färbereagenz), wurden als Produkt 0.59 g (3.55 mmol, 54 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₁₀H₁₄O₂

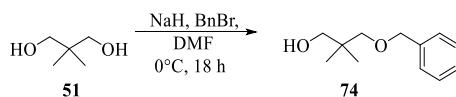
Molekulargewicht: 166.22 g/mol

Exakte Masse: 166.0994 au

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT,) δ 7.33-7.19 (m, 5H, Ar-H), 4.45 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.68 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, HO-CH₂), 3.58 (t, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H, CH₂-OBn), 2.76 (bs, 1H, OH), 1.79 (p, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 138.1 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 73.1 (CH₂-Ph), 68.8 (CH₂-OBn), 61.0 (HO-CH₂), 32.2 (CH₂-CH₂-CH₂).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[165]

6.9.17 3-(Benzyloxy)-2,2-dimethylpropan-1-ol (**74**)

Unter Kühlung auf 0 °C wurden 0.68 g (6.57 mmol, 1.00 eq) des 2,2-Dimethyl-1,3-Propandiols (**51**) zu einer Suspension aus 0.26 g (6.57 mmol, 1.00 eq) einer 60 %igen Mineralöl-Dispersion von Natriumhydrid in 12 mL Dimethylformamid getropft und zehn Minuten bei 0 °C gerührt. Dann wurden 0.78 mL (6.57 mmol, 1.00 eq) Benzylbromid zugegeben und die Reaktionslösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktion mit destilliertem Wasser und unter Kühlung auf 0 °C gequenchet wurde, wurde fünf Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Pentan:Ethylacetat 6:1, $R_f = 0.40$, Seebach-Färbereagenz), wurden als Produkt 0.74 g (3.81 mmol, ca. 58 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_2$

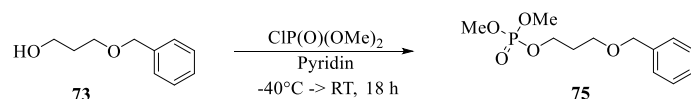
Molekulargewicht: 194.27 g/mol

Exakte Masse: 194.1307 au

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ 7.39-7.27 (m, 5H, Ar-H), 4.52 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.47 (s, 2H, CH₂-OBn), 3.33 (s, 2H, HO-CH₂), 2.49 (bs, 1H, OH), 0.94 (s, 6H, C_q-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 138.2 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 79.6 (CH₂-OBn), 73.6 (CH₂), 71.9 (CH₂), 36.3 (C_q), 22.0 (C_q-CH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[166]

6.9.18 3-(Benzyloxy)propyldimethylphosphat (**75**)

1.84 g (11.07 mmol, 1.00 eq) des Substrats **73** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 85 mL trockenem Pyridin gelöst und bei -40°C mit 1.79 mL (16.61 mmol, 1.50 eq) Dimethylchlorophosphat gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, sodass als Produkt 2.54 g (9.26 mmol, 84 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten wurden.

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{P}$

Molekulargewicht: 274.25 g/mol

Exakte Masse: 274.0970 au

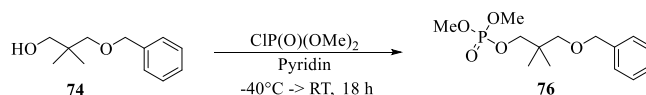
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ 7.38-7.27 (m, 5H, Ar-H), 4.51 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.18 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,P}} = 6.3 \text{ Hz}$, 2H, PO-CH₂), 3.75 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.1 \text{ Hz}$, 6H, CH₃-OP), 3.59 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1 \text{ Hz}$, 2H, CH₂-OBn), 1.99 (p, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 138.3 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 73.2 (CH₂-Ph), 66.1 (CH₂-OBn), 65.2 (d, PO-CH₂), 54.4 (d, CH₃-OP), 30.8 (d, CH₂-CH₂-CH₂).

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CDCl_3 , RT) δ 1.69-1.05 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 275.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 549.2 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 571.2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 275.1042 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 275.1048 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{P}$).

6.9.19 3-(Benzyloxy)-2,2-dimethylpropyldimethylphosphat (**76**)

4.86 g (25.00 mmol, 1.00 eq) des Substrats **74** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 85 mL trockenem Pyridin gelöst und bei -40 °C mit 4.04 mL (37.50 mmol, 1.50 eq) Dimethylchlorophosphat gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, sodass als Produkt 6.63 g (21.93 mmol, 88 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten wurden.

Summenformel: C₁₄H₂₃O₅P

Molekulargewicht: 302.31 g/mol

Exakte Masse: 302.1283 au

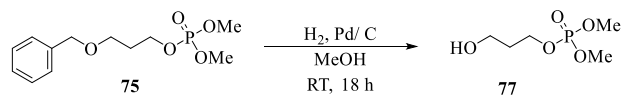
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.38-7.24 (m, 5H, Ar-H), 4.50 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.87 (d, ³J_{H,P} = 4.5 Hz, 2H, PO-CH₂), 3.74 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, CH₃-OP), 3.24 (s, 2H, CH₂-OBn), 0.96 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 138.8 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 127.6 (2 x Ar-C), 75.4 (CH₂), 73.3 (CH₂), 73.1 (d, PO-CH₂), 54.5 (d, CH₃-OP), 36.6 (d, C_q), 21.7 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃, RT) δ 1.52-1.00 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 303.1 [M+H]⁺, 325.1 [M+Na]⁺, 627.2 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 303.1359 [M+H]⁺ (m/z 303.1361 [M+H]⁺ ber. für C₁₄H₂₄O₅P).

6.9.20 3-Hydroxypropyldimethylphosphat (**77**)

2.10 g (7.66 mmol, 1.00 eq) des Substrats **75** wurden mit 210.0 mg (10 w%) Palladium auf Kohle gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.3 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 1.35 g (7.33 mmol, 96 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₅H₁₃O₅P

Molekulargewicht: 184.13 g/mol

Exakte Masse: 184.0501 au

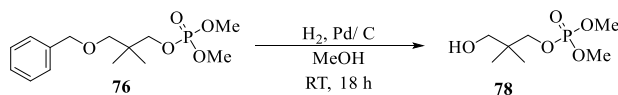
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT,) δ 4.17 (dt, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,P} = 7.2 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.78 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.67 (t, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, HO-CH₂), 1.89 (p, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 66.4 (d, CH₂-OP), 58.7 (HO-CH₂), 55.1 (d, PO-CH₃), 34.1 (d, CH₂-CH₂-CH₂).

³¹P-NMR (121 MHz, CD₃OD, RT) δ 1.34-0.85 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 185.1 [M+H]⁺, 207.0 [M+Na]⁺, 369.1 [2M+H]⁺, 391.1 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 185.0574 [M+H]⁺ (m/z 185.0579 [M+H]⁺ ber. für C₅H₁₄O₅P).

6.9.21 3-Hydroxy-2,2-dimethylpropyldimethylphosphat (**78**)

6.63 g (21.94 mmol, 1.00 eq) des Substrats **76** wurden mit 1.66 g (25 w%) Palladium auf Kohle gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.3 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 4.65 g (21.92 mmol, 100 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₇H₁₇O₅P

Molekulargewicht: 212.18 g/mol

Exakte Masse: 212.0814 au

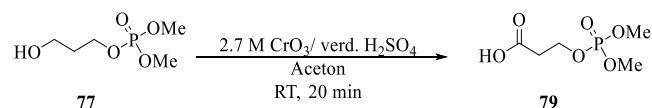
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT,) δ 3.84 (d, ³J_{H,P} = 4.8 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.78 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.34 (s, 2H, HO-CH₂), 0.92 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 74.2 (d, CH₂-OP), 68.0 (HO-CH₂), 55.1 (d, PO-CH₃), 37.8 (d, C_q-CH₃), 21.3 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD, RT) δ 1.36-0.83 (m, 1P, P-6).

MS (ESI): m/z 213.1 [M+H]⁺, 235.1 [M+Na]⁺, 425.2 [2M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 213.0884 [M+H]⁺ (m/z 213.0892 [M+H]⁺ ber. für C₇H₁₈O₅P).

6.9.22 3-((Dimethoxyphosphoryl)oxy)propansäure (**79**)

1.07 g (5.79 mmol, 1.00 eq) des Substrats **77** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.5 mit 2.7 M CrO₃-Lösung in verdünnter Schwefelsäure zur Reaktion gebracht. Nach einer Aufreinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-V) wurden 0.70 g (3.53 mmol, 61 %) einer farblosen Flüssigkeit als Produkt erhalten.

Summenformel: C₅H₁₁O₆P

Molekulargewicht: 198.11 g/mol

Exakte Masse: 198.0293 au

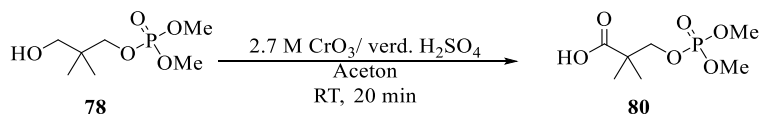
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT,) δ 4.30 (dt, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,P} = 6.0 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.78 (d, ³J_{H,P} = 11.2 Hz, 6H, PO-CH₃), 2.69 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, HO₂C-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 174.1 (CO₂H), 63.2 (d, CH₂-OP), 54.7 (d, PO-CH₃), 35.2 (d, HO₂C-CH₂).

³¹P-NMR (121 MHz, CDCl₃, RT) δ 0.95-0.39 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 199.0 [M+H]⁺, 221.0 [M+Na]⁺, 317.0 [3M+Ca]²⁺, 397.1 [2M+H]⁺, 419.0 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 199.0367 [M+H]⁺ (m/z 199.0371 [M+H]⁺ ber. für C₅H₁₂O₆P).

6.9.23 3-((Dimethoxyphosphoryl)oxy)-2,2-dimethylpropansäure (**80**)

0.57 g (2.68 mmol, 1.00 eq) des Substrats **78** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.5 mit 2.7 M CrO₃-Lösung in verdünnter Schwefelsäure zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.46 g (2.03 mmol, 76 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₇H₁₅O₆P

Molekulargewicht: 226.16 g/mol

Exakte Masse: 226.0606 au

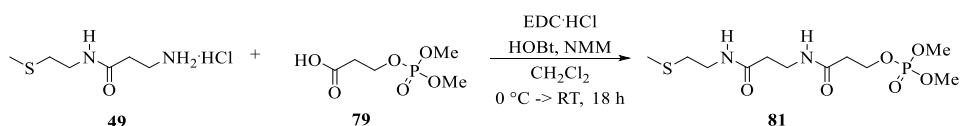
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT) δ 8.32 (bs, 1H, CO₂H), 4.06 (d, ³J_{H,P} = 4.7 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.77 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 1.25 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, RT) δ 179.8 (C=O), 73.3 (d, CH₂-OP), 54.6 (d, PO-CH₃), 43.5 (d, C_q), 21.8 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, RT) δ 0.82-0.40 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 227.1 [M+H]⁺, 249.1 [M+Na]⁺, 453.1 [2M+H]⁺, 475.1 [2M+Na]⁺, 701.2 [3M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 227.0676 [M+H]⁺ (m/z 227.0685 [M+H]⁺ ber. für C₇H₁₆O₆P).

6.9.24 Phosphopantethein-Derivat **81**

0.13 g (0.67 mmol, 1.00 eq) der Säure **79**, 0.14 g (0.70 mmol, 1.05 eq) des Dipeptids **49**, 0.10 g (0.72 mmol, 1.07 eq) HOBT und 0.16 g (0.84 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 0.18 mL (1.68 mmol, 2.50 eq) *N*-Methylmorpholin als Base gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II) aufgereinigt. Als Produkt wurden 73.0 mg (0.21 mmol, 32 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₁₁H₂₃N₂O₆PS

Molekulargewicht: 342.35 g/mol

Exakte Masse: 342.1014 au

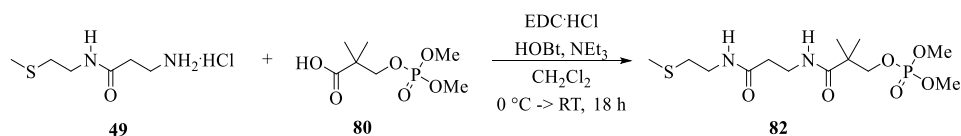
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT,) δ 4.30 (dt, ³J_{H,P} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.77 (d, ³J_{H,P} = 11.2 Hz, 2H, PO-CH₃), 3.45 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.38 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.64-2.53 (m, 4H, CH₂-CH₂-NH), 2.40 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, C(O)-CH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃-S).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 173.6 (C(O)), 172.1 (C(O)), 65.4 (d, CH₂-OP), 55.2 (d, PO-CH₃), 39.4 (CH₂-NH), 37.8 (d, CH₂-CH₂-OP), 37.1 (CH₂), 36.6 (CH₂), 34.2 (S-CH₂), 15.1 (CH₃-S).

³¹P-NMR (121 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.86-0.43 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 343.1 [M+H]⁺, 365.1 [M+Na]⁺, 533.1 [3M+Ca]²⁺, 685.2 [2M+H]⁺, 707.2 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 343.1088 [M+H]⁺ (m/z 343.1092 [M+H]⁺ ber. für C₁₁H₂₄N₂O₆PS).

6.9.25 Phosphopantethein-Derivat **82**

0.54 g (2.40 mmol, 1.00 eq) der Carbonsäure **80**, 0.50 g (2.52 mmol, 1.05 eq) des Dipeptids **49**, 0.35 g (2.57 mmol, 1.07 eq) HOBt und 0.58 g (3.00 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 120 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 0.83 mL (6.00 mmol, 2.50 eq) Triethylamin gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.56$, Seebach-Färbereagenz). Als Produkt wurden 0.56 g (1.51 mmol, 63 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $C_{13}H_{27}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 370.40 g/mol

Exakte Masse: 370.1327 au

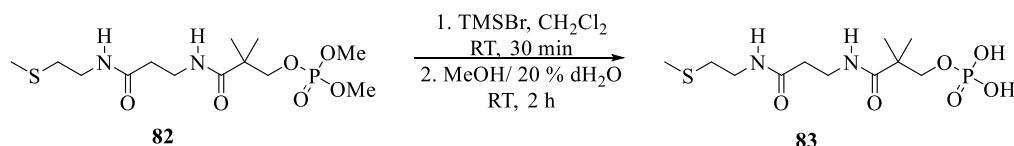
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 4.02 (d, $^3J_{H,P} = 4.6$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -OP), 3.77 (d, $^3J_{H,P} = 11.1$ Hz, 2H, PO- \underline{CH}_3), 3.44 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 3.38 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 2.60 (t, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 2.41 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, CH_2 - CH_2 -NH), 2.11 (s, 3H, \underline{CH}_3 -S), 1.21 (s, 6H, C_q - \underline{CH}_3).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 177.5 ($\underline{C}(O)$), 173.8 ($\underline{C}(O)$), 75.1 (d, \underline{CH}_2 -OP), 55.2 (d, PO- \underline{CH}_3), 44.4 (d, \underline{C}_q), 39.4 (\underline{CH}_2 -NH), 37.4 (\underline{CH}_2), 36.5 (\underline{CH}_2), 34.3 (S- \underline{CH}_2), 22.2 (C_q - \underline{CH}_3), 15.1 (\underline{CH}_3 -S).

^{31}P -NMR (121 MHz, CD_3OD , RT) δ 0.67-0.20 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 393.1 $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 371.1395 $[M+H]^+$ (m/z 371.1405 $[M+H]^+$ ber. für $C_{14}H_{28}N_2O_6PS$).

6.9.26 Phosphopantethein-Derivat **83**

0.56 g (1.52 mmol, 1.00 eq) des Substrats **82** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 6 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.60 mL (4.55 mmol, 3.00 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV ohne TFA-Zusatz) aufgereinigt. Nach Lyophilisation der Produktfraktionen, konnten als Produkt 0.32 g (0.93 mmol, 61 %) einer farblosen, viskosen Flüssigkeit erhalten werden.

Summenformel: C₁₁H₂₃N₂O₆PS

Molekulargewicht: 342.35 g/mol

Exakte Masse: 342.1014 au

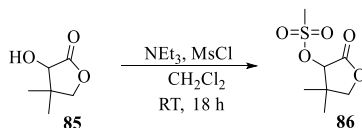
¹H-NMR (430 MHz, CD₃OD, RT) δ 3.94 (d, ³J_{H,P} = 4.8 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.45 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.39 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.62 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.43 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.11 (s, 3H, CH₃-S), 1.20 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 178.1 (C(O)), 174.1 (C(O)), 73.7 (d, CH₂-OP), 44.3 (d, C_q), 39.5 (CH₂-NH), 37.4 (CH₂), 36.6 (CH₂), 34.3 (S-CH₂), 22.4 (C_q-CH₃), 15.1 (CH₃-S).

³¹P-NMR (121 MHz, CD₃OD, RT) δ -0.32 (t, ³J_{P,H} = 4.7 Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 341.0 [M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 341.0941 [M-H]⁻ (m/z 341.0936 [M-H]⁻ ber. für C₁₁H₂₂N₂O₆PS).

6.9.27 2-*O*-Methansulfonyl-pantolacton ^[104] (**86**)

0.50 g (3.84 mmol, 1.00 eq) Pantolacton (**85**) wurden in 45 mL Dichlormethan gelöst. Unter Kühlung auf 0 °C wurden nacheinander 2.7 mL (19.21 mmol, 5.00 eq) Triethylamin und 0.6 mL (7.68 mmol, 2.00 eq) Mesylchlorid zugetropft und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit destilliertem Wasser gequenchet und solange mit Dichlormethan extrahiert bis die Dichlormethan-Phase farblos war. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit destilliertem Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1, $R_f = 0.53$, Seebach-Färbereagenz), wurden als Produkt 0.77 g (3.70 mmol, 96 %) einer gelben, viskosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₇H₁₂O₅S

Molekulargewicht: 208.23 g/mol

Exakte Masse: 208.0405 au

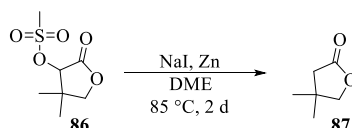
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT) δ 4.98 (s, 1H, (MeSO₃-CH)), 4.08 (d, ² $J_{H,H} = 4.0$ Hz, 1H, C(O)O-CH₂), 4.06 (d, ² $J_{H,H} = 4.0$ Hz, 1H, C(O)O-CH₂), 3.28 (s, 3H, CH₃-SO₃), 1.27 (s, 3H, C_q-CH₃), 1.17 (s, 3H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 171.5 (C(O)), 81.5 (MeSO₃-CH), 76.3 (C(O)O-CH₂), 40.4 (C_q), 39.8 (CH₃-SO₃), 22.3 (C_q-CH₃), 19.7 (C_q-CH₃).

MS (ESI): m/z 231.1 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 231.0296 [M+Na]⁺ (m/z 231.0298 [M+Na]⁺ ber. für C₇H₁₂O₅SNa).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[86]

6.9.28 β,β -Dimethyl- γ -butyrolacton^[104] (**87**)

Unter Argon-Schutzgasatmosphäre wurden 4.45 g (21.37 mmol, 1.00 eq) des Substrats **86** in 35 mL trockenem 1,2-Dimethoxyethan gelöst und 7.37 g (49.15 mmol, 2.30 eq) Natriumiodid zugefügt. 10 μm feines Zinkpulver wurde durch Waschen mit 10 %iger Salzsäure und anschließendes mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser, Methanol und Diethylether aktiviert. Das aktivierte Zinkpulver wurde unter Vakuum getrocknet und zur Reaktionslösung zugefügt. Die Reaktionslösung wurde unter Rückfluss zwei Tage gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und das mit verdünnter Salzsäure angesäuerte Filtrat (pH 2-3) fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das saure Filtrat wurde mit destilliertem Wasser verdünnt und so lange mit Diethylether extrahiert bis die wässrige Phase farblos war. Die vereinigten organischen Phasen wurden zuerst mit wässriger Natriumthiosulfat-Lösung, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und über Magnesium-sulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Als Produkt wurden 1.96 g (17.17 mmol, 80 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$

Molekulargewicht: 114.14 g/mol

Exakte Masse: 114.0681 au

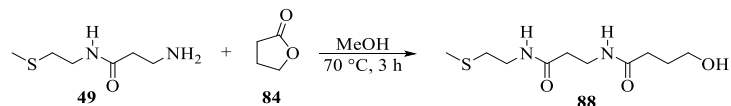
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ 3.97 (s, 2H, C(O)O-CH_2), 2.32 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C(O)}$), 1.19 (s, 6H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 177.2 (C(O)), 79.7 (C(O)O-CH_2), 43.2 ($\text{CH}_2\text{-C(O)}$), 36.8 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$), 26.0 (C_q).

MS (ESI): m/z 115.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 137.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 115.0755 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 115.0754 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[86,167]

6.9.29 Pantethein-Derivat^[168] **88**

0.46 g (5.36 mmol, 1.00 eq) des γ -Butyrolactons (**84**) wurden mit 0.87 g (5.36 mmol, 1.00 eq) des Dipeptids **49** in 12 mL Methanol unter Rückfluss drei Stunden erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt war, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Methanol:Ethylacetat 1:3, $R_f = 0.42$, Ninhydrin-Färbereagenz) gereinigt. Es konnten 1.16 g (4.67 mmol, 87 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten werden.

Summenformel: $C_{10}H_{20}N_2O_3S$

Molekulargewicht: 248.34 g/mol

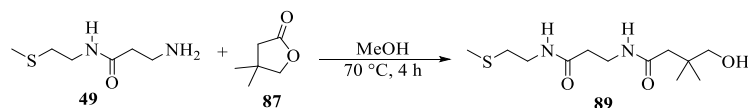
Exakte Masse: 248.1195 au

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 3.55 (t, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 3.42 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 3.38 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -OH), 2.60 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -CH₂-NH), 2.39 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -CH₂-NH), 2.25 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, C(O)- \underline{CH}_2), 2.10 (s, 3H, \underline{CH}_3 -S), 1.86-1.74 (m, 2H, \underline{CH}_2 -CH₂-OH).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 176.0 ($\underline{C}(O)$), 173.8 ($\underline{C}(O)$), 62.3 (\underline{CH}_2 -OH), 39.4 (\underline{CH}_2 -NH), 37.0 (\underline{CH}_2), 36.7 (\underline{CH}_2), 34.2 (\underline{CH}_2), 33.6 (\underline{CH}_2), 29.7 (\underline{CH}_2 -CH₂-OH), 15.1 (\underline{CH}_3 -S).

MS (ESI): m/z 271.1 $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 271.1082 $[M+Na]^+$ (m/z 271.1087 $[M+Na]^+$ ber. für $C_{10}H_{20}N_2O_3SNa$).

6.9.30 Pantethein-Derivat^[168] **89**

0.61 g (3.77 mmol, 1.00 eq) des Substrats **49** und 0.43 g (3.77 mmol, 1.0 eq) des Lactons **87** wurden in 9 mL Methanol vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der braune, ölige Rückstand an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.53$, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 0.62 g (2.24 mmol, 59 %) einer gelben, viskosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $C_{12}H_{24}N_2O_3S$

Molekulargewicht: 276.40 g/mol

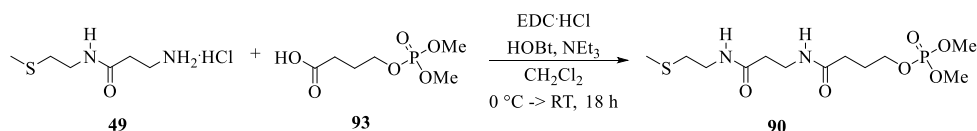
Exakte Masse: 276.3956 au

¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 3.42 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 3.37 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 3.31 (s, 2H, \underline{CH}_2 -OH), 2.60 (t, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 2.40 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 2.12 (s, 2H, C(O)- \underline{CH}_2), 2.10 (s, 3H, \underline{CH}_3 -S), 0.95 (s, 6H, C_q - \underline{CH}_3).

¹³C-NMR (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 174.8 ($\underline{C}(O)$), 173.7 ($\underline{C}(O)$), 72.1 (\underline{CH}_2 -OH), 46.2 (\underline{CH}_2 - C_q), 39.5 (\underline{CH}_2 -NH), 36.9 (\underline{CH}_2), 36.6 (\underline{CH}_2), 36.5 (\underline{CH}_2), 34.2 (S- \underline{CH}_2), 24.8 (C_q - \underline{CH}_3), 15.1 (\underline{CH}_3 -S).

MS (ESI): m/z 299.2 $[M+Na]^+$, 575.4 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 299.1402 $[M+Na]^+$ (m/z 299.1400 $[M+Na]^+$ ber. für $C_{12}H_{24}N_2O_3SNa$).

6.9.31 Phosphopantethein-Derivat **90**

0.44 g (2.07 mmol, 1.00 eq) der Phosphatsäure **93**, 0.43 g (2.17 mmol, 1.05 eq) des Dipeptids **49**, 0.30 g (2.21 mmol, 1.07 eq) HOBt und 0.52 g (2.71 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 28 mL Dichlormethan gelöst und mit 0.57 mL (5.18 mmol, 2.50 eq) *N*-Methylmorpholin als Base gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Methanol:Ethylacetat 1:3, $R_f = 0.43$, Ninhydrin-Färbereagenz) gereinigt. Es wurden als Produkt 0.22 g (0.60 mmol, 29 %) eines gelben Feststoffs erhalten

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$

Molekulargewicht: 356.37 g/mol

Exakte Masse: 356.1171 au

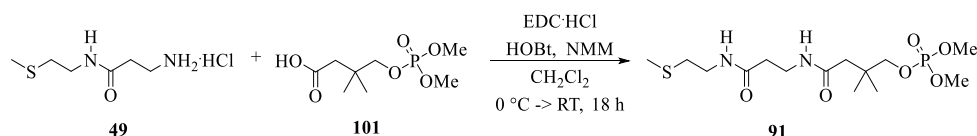
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , RT,) δ 6.63 (bs, 2H, NH), 4.07 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.75 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.1$ Hz, 6H, PO-CH_3), 3.53 (q, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.45 (q, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H}_3\text{H}_2} = 6.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.64 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.40 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, C(O)-CH_2), 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$), 2.06-1.93 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (91 MHz, CDCl_3 , RT) δ 172.2 (C(O)), 171.9 (C(O)), 67.2 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 54.6 (d, PO-CH_3), 37.8 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 36.2 (CH_2), 35.8 (CH_2), 33.9 (S-CH_2), 32.3 (C(O)-CH_2), 26.3 (d, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 15.1 ($\text{CH}_3\text{-S}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , RT) δ 1.46-0.89 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 357.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 379.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 357.1236 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 357.1249 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$).

6.9.32 Phosphopantethein-Derivat **91**

37.0 mg (155.00 μmol , 1.00 eq) der Phosphatsäure **101**, 32.2 mg (162.00 μmol , 1.05 eq) des Dipeptids **49**, 22.3 mg (165.00 μmol , 1.07 eq) HOBt und 37.0 mg (193.00 μmol , 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 2 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 42.50 μL (386.00 μmol , 2.50 eq) *N*-Methylmorpholin als Base gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.53$, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 33.1 mg (86.10 μmol , 56 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$

Molekulargewicht: 384.43 g/mol

Exakte Masse: 384.1484 au

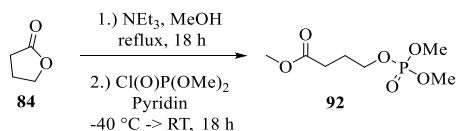
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ 6.92 (bs, 1H, NH), 6.75 (bs, 1H, NH), 3.89 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 4.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.79 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.2$ Hz, 6H, PO-CH_3), 3.42 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.46 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.64 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.46 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.18 (s, 2H, $\text{C(O)-CH}_2\text{-C}_q$), 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$), 1.04 (s, 6H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 173.0 (C(O)), 171.9 (C(O)), 74.6 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 54.8 (d, PO-CH_3), 43.8 ($\text{C(O)-CH}_2\text{-C}_q$), 38.6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 36.2 (CH_2), 35.6 (CH_2), 35.2 (d, C_q), 33.4 (S-CH_2), 24.6 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$), 15.1 ($\text{CH}_3\text{-S}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (121 MHz, CDCl_3 , RT) δ 1.27-1.17 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 407.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 385.1559 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 385.1562 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$).

6.9.33 4-((Dimethoxyphosphoryl)oxy)butansäuremethylester (**92**)

6 mL (78.75 mmol, 1.00 eq) γ -Butyrolacton (**84**) wurden mit 63 mL (454.49 mmol, 6.00 eq) Triethylamin in 150 mL Methanol 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels aus der Reaktionslösung, blieben 8.78 g einer gelben Flüssigkeit als Rückstand. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte eine 1:3 Zusammensetzung aus Edukt und Produkt. Da eine Trennung des Produkts vom Edukt nicht möglich war, wurde das Gemisch weiter umgesetzt, indem es in 190 mL trockenem Pyridin gelöst und bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ mit 8.3 mL (76.95 mmol, 1.50 eq) Dimethylchlorophosphat gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 zur Reaktion gebracht wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 10:1, $R_f = 0.37$, Seebach-Färbereagenz), wurden als Produkt 8.48 g (37.50 mmol, 48 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_6\text{P}$

Molekulargewicht: 226.16 g/mol

Exakte Masse: 226.0606 au

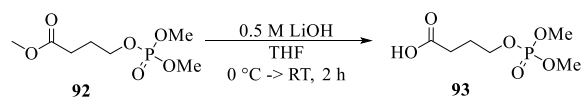
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , RT) δ 4.09 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,P}} = 6.2\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.76 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.1\text{ Hz}$, 6H, PO-CH_3), 3.68 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O(O)C}$), 2.45 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3\text{ Hz}$, 2H, C(O)-CH_2), 2.01, (p, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 6.7\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3 , RT) δ 173.3 (C(O)), 66.9 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 54.4 (d, PO-CH_3), 51.8 ($\text{CH}_3\text{-O(O)C}$), 30.0 (C(O)-CH_2), 25.7 (d, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , RT) δ 1.52-0.94 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 227.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 453.1 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 475.1 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 227.0680 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 227.0684 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_6\text{P}$).

6.9.34 4-((Dimethoxyphosphoryl)oxy)butansäure (**93**)

5.26 g (23.26 mmol, 1.00 eq) des Substrats **92** wurden in 25 mL Tetrahydrofuran vorgelegt und bei 0 °C mit 120 mL einer 0.5 M Lithiumhydroxid-Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH ~ 2-3). Die saure Lösung wurde je zwei Mal mit Ethylacetat und Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Als Produkt wurden 3.84 g (18.10 mmol, 78 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₆H₁₃O₆P

Molekulargewicht: 212.14 g/mol

Exakte Masse: 212.0450 au

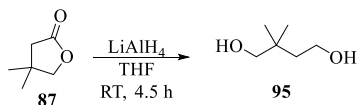
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, RT) δ 4.12 (dt, ³J_{H,P} = 6.2 Hz, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.77 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 2.48 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, HO₂C-CH₂), 2.08-1.95 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, RT) δ 177.0 (C=O₂H), 67.0 (d, CH₂-OP), 54.6 (d, PO-CH₃), 29.9 (HO₂C-CH₂), 25.6 (d, CH₂-CH₂-CH₂).

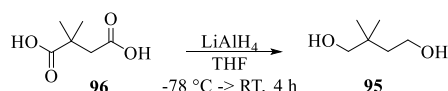
³¹P-NMR (101 MHz, CDCl₃, RT) δ 1.46-0.69 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 213.1 [M+H]⁺, 235.0 [M+Na]⁺, 425.1 [2M+H]⁺, 447.1 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 213.0524 [M+H]⁺ (m/z 213.0523 [M+H]⁺ ber. für C₆H₁₄O₆P).

6.9.35 2,2-Dimethylbutan-1,4-diol (**95**)A. Durchführung nach I. Shiina *et al.* [169]

0.49 g (4.29 mmol, 1.00 eq) des β,β -Dimethyl- γ -butyrolactons (**87**) wurden in 20 mL trockenem Tetrahydrofuran vorgelegt und unter Argon-Schutzgasatmosphäre portionsweise mit insgesamt 0.36 g (9.44 mmol, 2.20 eq) Lithiumaluminiumhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion bei 0 °C vorsichtig mit destilliertem Wasser gequencht und mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert (pH 3), dann mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und über Celite filtriert. Der Filtrückstand wurde mit viel Ethylacetat gewaschen und im Anschluss das Lösungsmittel unter vermindertem Druck aus dem Filtrat entfernt. Es konnten 0.40 g (3.38 mmol, 79 %) einer leicht gelben Flüssigkeit als Produkt erhalten werden.

B. Durchführung nach D. M. Hodgson *et al.* [170]

2.34 g (61.60 mmol, 6.00 eq) Lithiumaluminiumhydrid wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre bei -78 °C in 45 mL trockenem Tetrahydrofuran suspendiert und portionsweise mit insgesamt 1.5 g (10.30 mmol, 1.00 eq) 2,2-Dimethylsuccinylsäure (**96**) versetzt. Es wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion bei 0 °C vorsichtig mit 2.4 mL destilliertem Wasser, 2.4 mL 2 M Natriumhydroxid-Lösung und erneut mit 7.1 mL destilliertem Wasser gequencht und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.16 g (9.82 mmol, 95 %) einer farblosen, viskosen Flüssigkeit als Produkt erhalten.

Summenformel: C₆H₁₄O₂

Molekulargewicht: 118.18 g/mol

Exakte Masse: 118.0994 au

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT) δ 3.94 – 3.73 (bs, 2H, OH), 3.66 (t, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH), 3.30 (d, ³J_{H,H} = 1.3 Hz, 2H, HO-CH₂), 1.52 (t, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH), 0.89 (s, 6H, C_q-CH₃).

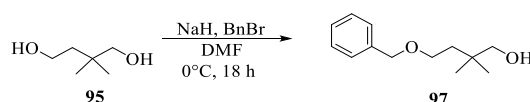
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 71.5 (HO-CH₂), 59.0 (CH₂-CH₂-OH), 42.9 (CH₂-CH₂-OH), 35.0 (C_q), 25.1 (C_q-CH₃).

MS (ESI): m/z 119.1 $[M+H]^+$, 141.1 $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 141.0885 $[M+Na]^+$ (m/z 141.0886 $[M+Na]^+$ ber. für $C_6H_{14}O_2Na$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[171]

6.9.36 4-(Benzyloxy)-2,2-dimethylbutan-1-ol (**97**)



Unter Kühlung auf 0 °C wurden 0.12 g (1.00 mmol, 1.00 eq) des 2,2-Dimethylbutan-1,4-diols (**95**) zu einer Suspension aus 0.04 g (1.00 mmol, 1.00 eq) einer 60 %igen Mineralöl-Dispersion von Natriumhydrid in 2 mL Dimethylformamid getropft und zehn Minuten bei 0 °C gerührt. Dann wurden 0.17 mL (1.00 mmol, 1.00 eq) Benzylbromid zugetropft und die Reaktionslösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktion mit destilliertem Wasser bei 0 °C gequenchet wurde, wurde fünf Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Pentan:Ethylacetat 1:1, $R_f = 0.77$, Seebach-Färbereagenz), wurden als Produkt 58.0 mg (0.28 mmol, 28 %) einer gelblichen Flüssigkeit erhalten. Zusätzlich wurden 48.0 mg (0.23 mmol, 23 %) einer Mischfraktion erhalten, die neben dem Produkt **97** auch das andere Regioisomer im Überschuss enthielt. Diese Mischfraktion konnte nicht säulenchromatographisch aufgetrennt werden.

Summenformel: $C_{13}H_{20}O_2$

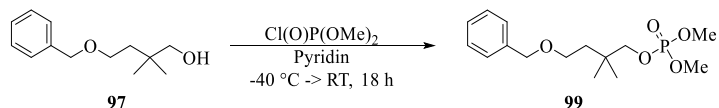
Molekulargewicht: 208.30 g/mol

Exakte Masse: 208.1463 au

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ 7.39-7.28 (m, 5H, Ar-H), 4.52 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 2H, BnO-CH₂), 3.29 (s, 2H, CH₂-OH), 1.59 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 2H, BnO-CH₂-CH₂), 0.90 (s, 6H, C_q-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 137.8 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 128.0 (2 x Ar-C), 73.5 (Ph-CH₂), 71.5 (CH₂-OH), 67.2 (BnO-CH₂), 39.5 (BnO-CH₂-CH₂), 35.1 (C_q), 25.2 (C_q-CH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[172]

6.9.37 4-(Benzyloxy)-2,2-dimethylbutyldimethylphosphat (**99**)

Unter Argon-Schutzgasatmosphäre wurden 0.65 g (3.12 mmol, 1.00 eq) des Edukts **97** in 20 mL trockenem Pyridin gelöst und bei -40 °C mit 0.51 mL (4.71 mmol, 1.50 eq) Dimethylchlorophosphat gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.73 g (2.31 mmol, 74 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten wurden.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{P}$

Molekulargewicht: 316.33 g/mol

Exakte Masse: 316.1440 au

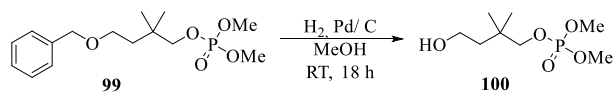
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ 7.37-7.24 (m, 5H, Ar-H), 4.49 (s, 2H, Ph- CH_2), 3.80 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 4.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.76 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.2$ Hz, 2H, PO- CH_3), 3.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, BnO- CH_2), 1.65 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, BnO- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 0.97 (s, 6H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 138.5 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 128.5 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 127.8 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 127.7 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 76.5 (d, $\underline{\text{CH}}_2\text{-OP}$), 73.2 (Ph- $\underline{\text{CH}}_2$), 67.0 (BnO- $\underline{\text{CH}}_2$), 54.8 (d, PO- $\underline{\text{CH}}_3$), 37.9 (BnO- $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}_2$), 34.3 (d, $\underline{\text{C}}_q$), 24.2 ($\text{C}_q\text{-}\underline{\text{CH}}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (121 MHz, CDCl_3 , RT) δ 0.68-0.09 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 317.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 339.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 655.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 317.1509 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 317.1518 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{P}$).

6.9.38 4-Hydroxy-2,2-dimethylbutyldimethylphosphat (**100**)

1.24 g (3.92 mmol, 1.00 eq) des Substrats **99** wurden mit 310.0 mg (25 w%) Palladium auf Kohle in 12 mL Methanol gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.3 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.67 g (2.96 mmol, 76 %) eines farblosen Öls erhalten.

Summenformel: C₈H₁₉O₅P

Molekulargewicht: 226.21 g/mol

Exakte Masse: 226.0970 au

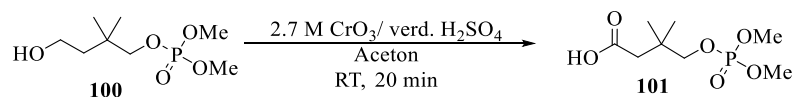
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, RT) δ 3.78 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.78 (d, ³J_{H,P} = 4.5 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.64 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, HO-CH₂), 1.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, HO-CH₂-CH₂), 0.98 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 77.1 (d, CH₂-OP), 59.2 (HO-CH₂), 55.1 (d, PO-CH₃), 41.9 (HO-CH₂-CH₂), 34.9 (d, C_q), 24.4 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (121 MHz, CD₃OD, RT) δ 1.25-0.67 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 227.1 [M+H]⁺, 249.1 [M+Na]⁺, 453.2 [2M+H]⁺, 475.2 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 227.1040 [M+H]⁺ (m/z 227.1048 [M+H]⁺ ber. für C₈H₂₀O₅P).

6.9.39 4-((Dimethoxyphosphoryl)oxy)-3,3-dimethylbutansäure (**101**)

0.67 g (2.95 mmol, 1.00 eq) des Substrats **100** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.5 mit 2.7 M CrO₃-Lösung in verdünnter Schwefelsäure zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.53 g (2.21 mmol, 75 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₈H₁₇O₆P

Molekulargewicht: 240.19 g/mol

Exakte Masse: 240.0763 au

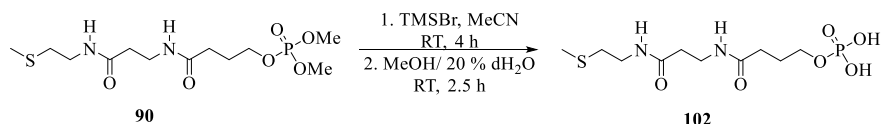
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 3.90 (d, ³J_{H,P} = 4.8 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.78 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 2.35 (s, 2H, HO₂C-CH₂), 1.08 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 175.8 (CO₂H), 74.9 (d, CH₂-OP), 54.6 (d, PO-CH₃), 42.3 (HO₂C-CH₂), 34.6 (d, C_q), 24.2 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (121 MHz, CDCl₃, RT) δ 1.28-0.84 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 241.1 [M+H]⁺, 263.1 [M+Na]⁺, 481.2 [2M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 241.0836 [M+H]⁺ (m/z 241.0841 [M+H]⁺ ber. für C₈H₁₈O₆P).

6.9.40 Phosphopantethein-Derivat **102**

0.45 g (1.26 mmol, 1.00 eq) des Substrats **90** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 5 mL trockenem Acetonitril gelöst und mit 0.5 mL (3.78 mmol, 3.00 eq) Bromotrimethyl-silan versetzt und unter Argon-Schutzgasatmosphäre vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL einer Mischung aus Methanol und destilliertem Wasser (20 %) bei Raumtemperatur 2.5 Stunden gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der orange Rückstand in Wasser aufgenommen und via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert, um als Produkt 87.0 mg (0.26 mmol, 21 %) eines weißen Feststoffs zu erhalten.

Summenformel: C₁₀H₂₁N₂O₆PS

Molekulargewicht: 328.32 g/mol

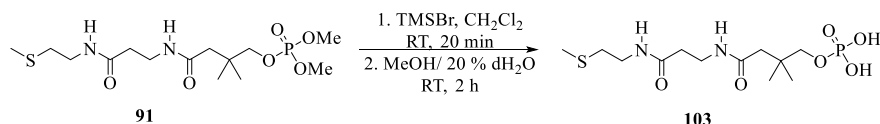
Exakte Masse: 328.0858 au

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT,) δ 3.95 (q, ³J_{H,H} = ³J_{H,P} = 6.4 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.43 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.38 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.61 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.40 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.31 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, C(O)-CH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃-S), 1.93 (p, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 175.6 (C(O)), 173.8 (C(O)), 66.5 (d, CH₂-OP), 39.4 (CH₂-NH), 37.1 (CH₂), 36.8 (CH₂), 34.2 (CH₂), 33.3 (CH₂), 27.9 (d, CH₂-CH₂-CH₂), 15.2 (CH₃-S).

³¹P-NMR (121 MHz, CD₃OD, RT) δ 2.39-(-1.65) (m, 1P).

MS (ESI): m/z 326.9 [M-H]⁻, 654.9 [2M-H]⁻.

6.9.41 Phosphopantethein-Derivat **103**

0.32 g (0.83 mmol, 1.00 eq) des Substrats **91** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 32 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.27 mL (2.08 mmol, 2.50 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-I) aufgereinigt. Nach Lyophylylation der Produktfraktionen konnten als Produkt 0.16 g (0.45 mmol, 54 %) einer leicht gelben, viskosen Flüssigkeit erhalten werden.

Summenformel: C₁₂H₂₅N₂O₆PS

Molekulargewicht: 356.37 g/mol

Exakte Masse: 356.1171 au

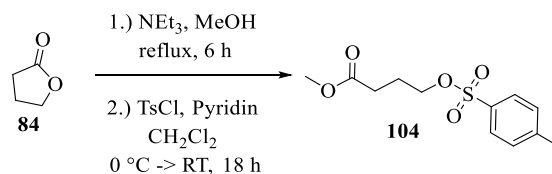
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT,) δ 3.78 (d, ³J_{H,P} = 5.4 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.45 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.39 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.62 (t, ³J_{H,H3} = 7.2 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.43 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.19 (s, 2H, C(O)-CH₂), 2.12 (s, 3H, CH₃-S), 1.04 (s, 1H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 174.1 (C(O)), 173.7 (C(O)), 75.2 (d, CH₂-OP), 45.1 (C(O)-CH₂-C_q), 39.5 (CH₂-NH), 37.0 (CH₂), 36.6 (CH₂), 35.7 (d, C_q), 34.2 (S-CH₂), 24.6 (C_q-CH₃), 15.1 (CH₃-S).

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.79-0.33 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 355.1 [M-H]⁻, 711.3 [2M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 355.1098 [M-H]⁻ (m/z 355.1093 [M-H]⁻ ber. für C₁₂H₂₄N₂O₆PS).

6.9.42 4-(Tosyloxy)butansäuremethylester (**104**)

2 mL (26.25 mmol, 1.00 eq) γ -Butyrolacton (**84**) wurden mit 21 mL (157.51 mmol, 6.00 eq) Triethylamin in 50 mL Methanol 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels aus der Reaktionslösung, blieben 3.27 g einer gelben Flüssigkeit als Rückstand. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte eine 1:2 Zusammensetzung aus Edukt und Produkt. Da eine Trennung des Produkts vom Edukt nicht möglich war, wurde das Gemisch weiter umgesetzt, indem es in 20 mL Dichlormethan gelöst wurde und bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ mit 3.86 g (20.27 mmol, 1.10 eq) Tosylchlorid und 1.64 mL (20.27 mmol, 1.10 eq) Pyridin versetzt wurde. Die Reaktionslösung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde destilliertes Wasser und gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung zugesetzt und drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 1:2, $R_f = 0.65$, Seebach-Färbereagens), wurden als Produkt 2.16 g (7.93 mmol, 30 %) einer farblosen, viskosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{S}$

Molekulargewicht: 272.32 g/mol

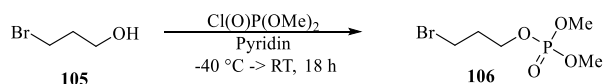
Exakte Masse: 272.0718 au

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , RT) δ 7.78 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 2H, Ar-H), 7.3 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, Ar-H), 4.08 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OTs}$), 3.63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O(O)C}$), 2.45 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.38 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 2H, C(O)- CH_2), 1.98 (p, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3 , RT) δ 172.9 (C(O)), 145.0 (Ar-C), 133.2 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 69.4 ($\text{CH}_2\text{-OTs}$), 51.8 ($\text{CH}_3\text{-O(O)C}$), 29.9 (C(O)- CH_2), 24.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 21.8 (Ar- CH_3).

MS (ESI): m/z 295.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Da der Syntheseweg, in dem dieses Molekül Einsatz fand, nicht zum gewünschten Ziel führte, wurde für dieses Molekül kein HR-Massenspektrum aufgenommen.

6.9.43 3-Bromopropyldimethylphosphat (**106**)

1 mL (11.08 mmol, 1.00 eq) 3-Bromo-1-propanol (**105**) wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 40 mL trockenem Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 1.79 mL (16.62 mmol, 1.50 eq) Dimethylchlorophosphat versetzt. Die Reaktionslösung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss erfolgte die Aufarbeitung gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.76$, Seebach-Färbereagenz), wurden als Produkt 0.91 g (3.68 mmol, 33 %) einer braun-orangen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{BrO}_4\text{P}$

Molekulargewicht: 247.02 g/mol

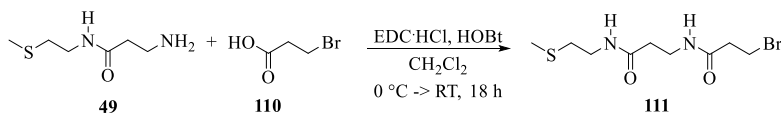
Exakte Masse: 245.9657 au

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 4.22 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 5.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.79 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.2$ Hz, 6H, PO-CH_3), 3.70 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 2H, Br-CH_2), 2.14 (pd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 1.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 66.0 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 55.2 (d, PO-CH_3), 41.4 (Br-CH_2), 34.0 (d, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 1.58-0.86 (m, 1P).

Da der Syntheseweg, in dem dieses Molekül Einsatz fand, nicht zum gewünschten Ziel führte, wurde für dieses Molekül kein Massenspektrum aufgenommen.

6.9.44 Pantethein-Derivat **111**

0.5 g (3.27 mmol, 1.00 eq) 3-Brompropansäure (**110**), 0.6 g (3.60 mmol, 1.10 eq) des Dipeptids **49**, 0.44 g (3.27 mmol, 1.00 eq) HOBt und 0.78 g (4.07 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 30 mL Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat:Methanol 6:1, $R_f = 0.59$, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 0.37 g (1.24 mmol, 38 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $C_9H_{17}N_2O_2SBr$

Molekulargewicht: 297.21 g/mol

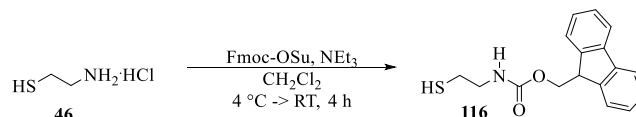
Exakte Masse: 296.0194 au

1H -NMR (360 MHz, CD_3OD , RT,) δ 3.62 (t, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -Br), 3.45 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 3.37 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 2.76 (t, $^3J_{H,H3} = 6.5$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 2.60 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -Br), 2.41 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 2.10 (s, 3H, \underline{CH}_3 -S).

^{13}C -NMR (91 MHz, CD_3OD , RT,) δ 173.6 ($\underline{C}(O)$), 172.7 ($\underline{C}(O)$), 40.1 (\underline{CH}_2 -NH), 39.5 (\underline{CH}_2 -NH), 37.1 (\underline{CH}_2), 36.6 (\underline{CH}_2), 34.3 (S- \underline{CH}_2), 28.3 (\underline{CH}_2 -Br), 15.1 (\underline{CH}_3 -S).

MS (ESI): m/z 239.0 $[M-Br+Na]^+$, 319 $[M+Na]^+$.

Da der Syntheseweg, in dem dieses Molekül Einsatz fand, nicht zum gewünschten Ziel führte, wurde für dieses Molekül kein HR-Massenspektrum aufgenommen.

6.9.45 *N*-Fmoc-Cysteamin^[173] (**116**)

0.30 g (0.88 mmol, 1.00 eq) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid wurden in 3 mL Dichlormethan gelöst. Zuerst wurden 0.10 g (0.88 mmol, 1.00 eq) Cysteamin Hydrochlorid (**46**) zugefügt und dann bei 4 °C 0.25 mL (1.76 mmol, 2.00 eq) Triethylamin zutropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und vier Stunden gerührt. Im Anschluss wurde zuerst mit 0.1 M Salzsäure-Lösung, dann mit destilliertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Pentan 1:3, $R_f = 0.39$, Ninhydrin-Färbereagenz), sodass 97.4 mg (0.33 mmol, 37 %) des Produkts als weißer Feststoff erhalten wurden.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{S}$

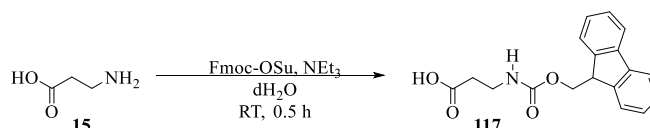
Molekulargewicht: 299.39 g/mol

Exakte Masse: 299.0980 au

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , RT,) δ 7.75 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2H, Ar-H), 7.58 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.32-7.28 (m, 2H, Ar-H), 5.31 (bs, 1H, NH), 4.41 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, C(O)O-CH₂), 4.20 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 1H, C(O)O-CH₂-CH), 3.52 (q, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH₂-NH), 2.81 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 2H, HS-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 144.1 (Ar-C), 141.6 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 125.3 (Ar-C), 120.1 (Ar-C), 66.8 (C(O)O-CH₂), 47.7 (C(O)O-CH₂-CH), 38.0 (CH₂-NH), 29.7 (HS-CH₂).
C(O) fehlt

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[173,174]

6.9.46 *N*-Fmoc- β -Alanin^[175] (**117**)

0.5 g (5.60 mmol, 2.00 eq) β -Alanin (**15**) wurden in 11 mL destilliertem Wasser gelöst und mit 0.76 mL (5.50 mmol, 2.00 eq) Triethylamin versetzt. Langsam wurden unter Rühren 0.95 g (2.80 mmol, 1.00 eq) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid zugefügt. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel dann unter vermindertem Druck entfernt. Zum Rückstand wurde 1 N Salzsäure-Lösung gegeben. Der weiße, in 1 N Salzsäure-Lösung nicht lösliche Feststoff wurde filtriert, zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Als Produkt wurden 0.81 g (2.60 mmol, 93 %) eines leicht gelben Pulvers isoliert.

Summenformel: C₁₈H₁₇NO₄

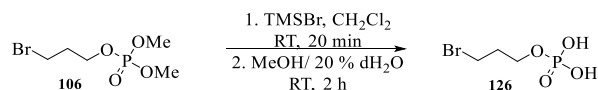
Molekulargewicht: 311.34 g/mol

Exakte Masse: 311.1158 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT,) 7.76 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.58 (d, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (t, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.31 (t, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 5.28 (bs, 1H, NH) 4.41 (d, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, C(O)O-CH₂), 4.22 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 1H, C(O)O-CH₂-CH), 3.53-3.43 (m, 2H, CH₂-NH), 2.65-2.56 (m, 2H, HO₂C-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 177.1 (CO₂H), 144.0 (Ar-C), 141.5 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 125.2 (Ar-C), 120.2 (Ar-C), 67.0 (C(O)O-CH₂), 47.4 (C(O)O-CH₂-CH), 36.5 (CH₂-NH), 34.2 (HO₂C-CH₂). C(O) fehlt

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[176]

6.9.47 3-Bromopropyldihydrogenphosphat (**126**)

0.31 g (1.27 mmol, 1.00 eq) des Substrats **106** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.37 mL (2.80 mmol, 2.20 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IX) aufgereinigt. Nach Lyophilisation der Produktfraktionen konnten als Produkt 0.10 g (0.46 mmol, 36 %) einer farblosen, viskosen Flüssigkeit erhalten werden.

Summenformel: C₃H₈BrO₄P

Molekulargewicht: 218.97 g/mol

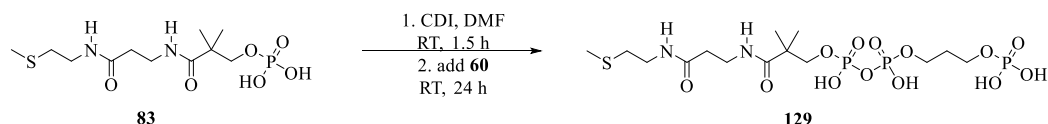
Exakte Masse: 217.9344 au

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, RT,) δ 4.04 (dt, ³J_{H,2} = 5.9 Hz, ³J_{H,P} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.66 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, Br-CH₂), 2.05 (p, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, RT) δ 63.1 (d, CH₂-OP), 41.2 (Br-CH₂), 32.4 (d, CH₂-CH₂-CH₂).

³¹P-NMR (101 MHz, D₂O, RT) δ 0.02 (m, 1P).

Da der Syntheseweg, in dem dieses Molekül Einsatz fand, nicht zum gewünschten Ziel führte, wurde für dieses Molekül kein Massenspektrum aufgenommen.

6.9.48 CoA-Derivat **129**

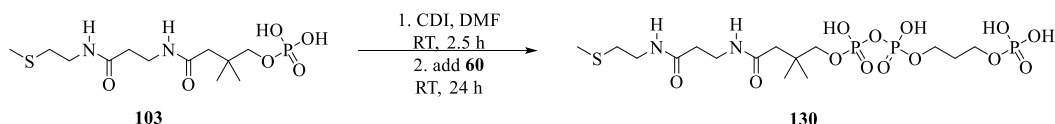
14.0 mg (40.89 μmol , 1.00 eq) des Substrats **83** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit 13.0 mg (80.12 μmol , 1.96 eq) CDI und 28.0 mg (118.62 μmol , 2.90 eq) des Diphosphats **60** in 1.5 mL trockenem Dimethylformamid gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) und ergab nach Lyophilisation der Produktfraktionen 9.0 mg (16.06 μmol , 39 %) eines glasigen Feststoffs als Produkt.

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 560.38 g/mol

Exakte Masse: 560.0760 au

MS (ESI): m/z 559.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.49 CoA-Derivat **130**

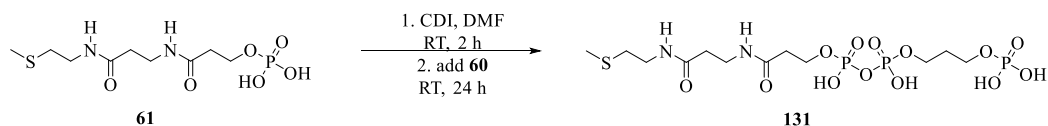
10.0 mg (28.00 μmol , 1.00 eq) des Substrats **103** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 14.0 mg (84.00 μmol , 3.00 eq) CDI versetzt und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zunächst wurde überschüssiges CDI durch Zugabe von 3.4 μL (84.00 μmol , 3.00 eq) Methanol gequench und dann 17.0 mg (70.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **60** zugefügt und die Reaktionslösung 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon-Schutzgasatmosphäre gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte nach der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.6. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) und ergab nach Lyophilisation der Produktfraktionen 3.8 mg (6.62 μmol , 24 %) eines weißen Feststoffs als Produkt.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 574.41 g/mol

Exakte Masse: 574.0916 au

MS (ESI): m/z 572.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 1146.5 $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.50 CoA-Derivat **131**

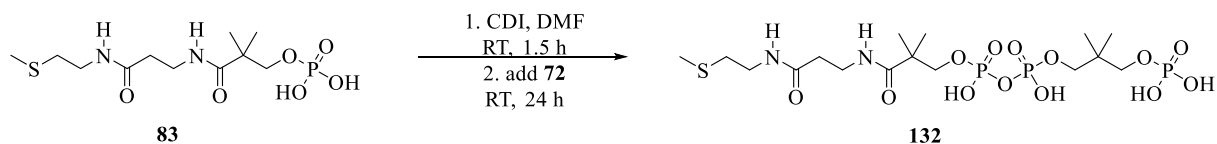
2.4 mg (8.00 μmol , 1.00 eq) des Substrats **61** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit 2.5 mg (16.00 μmol , 2.00 eq) CDI und 5.0 mg (20.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **60** in 0.5 mL trockenem Dimethylformamid gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-II) und ergab nach Lyophilisation der Produktfraktionen 1.8 mg (3.38 μmol , 42 %) eines farblosen Feststoffs als Produkt, der jedoch nicht in ganz reiner Form erhalten werden konnte.

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 532.33 g/mol

Exakte Masse: 532.0447 au

MS (ESI): m/z 531.0 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.51 CoA-Derivat **132**

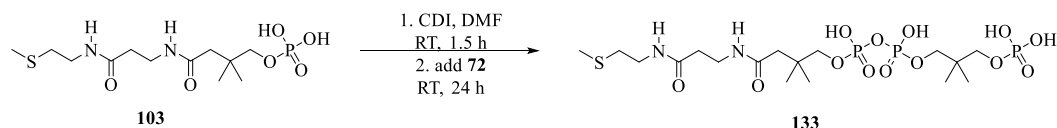
25.0 mg (73.00 μmol , 1.00 eq) des Substrats **83** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit 24.0 mg (146 μmol , 2.00 eq) CDI und 32.0 mg (121 μmol , 3.70 eq) des Diphosphats **72** in 1 mL trockenem Dichlormethan gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) und ergab nach Lyophilisation der Produktfraktionen 3.5 mg (5.95 μmol , 8 %) eines weißen Feststoffs als Produkt.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 588.44 g/mol

Exakte Masse: 588.1073 au

MS (ESI): m/z 587.0 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.52 CoA-Derivat **133**

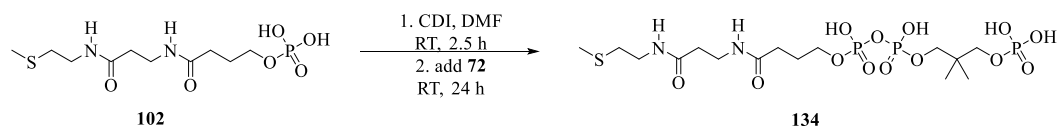
9.0 mg (25.00 μmol , 1.00 eq) des Substrats **103** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 7.0 mg (43.00 μmol , 1.70 eq) CDI und im Anschluss mit 18.0 mg (68.00 μmol , 2.70 eq) des Diphosphats **72** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-II) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 0.5 mg (0.83 μmol , 3 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 602.47 g/mol

Exakte Masse: 602.1229 au

MS (ESI): m/z 601.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.53 CoA-Derivat **134**

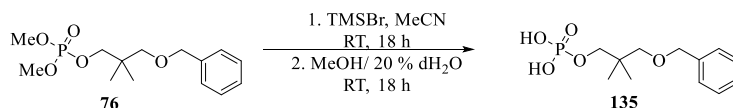
9.0 mg (27.00 μmol , 1.00 eq) des Substrats **102** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.5 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 8.9 mg (55.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 18.0 mg (68.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **72** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-II) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 1.3 mg (2.26 μmol , 8 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 574.41 g/mol

Exakte Masse: 574.0916 au

MS (ESI): m/z 573.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 595.1 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$.

6.9.54 3-(Benzyloxy)-2,2-dimethylpropyldihydrogenphosphat (**135**)

1.50 g (4.96 mmol, 1.00 eq) des Substrats **76** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 19 mL trockenem Acetonitril gelöst und mit 1.96 mL (14.88 mmol, 3.00 eq) Bromotrimethylsilan versetzt und unter Argon-Schutzgasatmosphäre 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 mL einer Mischung aus Methanol und destilliertem Wasser (20 %) bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert, um als Produkt 1.22 g (4.45 mmol, 90 %) einer leicht gelben Flüssigkeit zu erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₉O₅P

Molekulargewicht: 274.25 g/mol

Exakte Masse: 274.0970 au

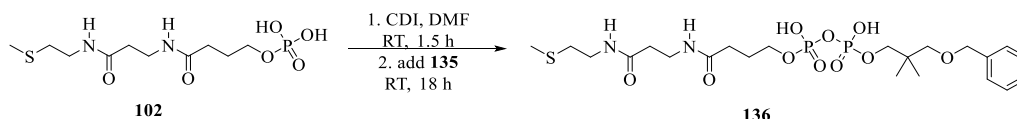
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, RT,) δ 7.37-7.31 (m, 4H, Ar-H), 7.29-7.26 (m, 1H, Ar-H), 4.52 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.82 (d, ³J_{H,P} = 4.6 Hz, 2H, PO-CH₂), 3.29 (s, 2H, CH₂-OBn), 0.98 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 140.1 (Ar-C), 129.3 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 76.8 (CH₂-OBn), 74.4 (CH₂-Ph), 73.1 (d, PO-CH₂), 37.1 (d, C_q), 22.0 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (121 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.12 (t, ³J_{P,H} = 4.9 Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 273.1 [M-H]⁻, 319.1 [M+HCOO]⁻, 547.2 [2M-H]⁻, 821.3 [3M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 273.0898 [M-H]⁻ (m/z 273.0892 [M-H]⁻ ber. für C₁₂H₁₈O₅P).

6.9.55 CoA-Derivat **136**

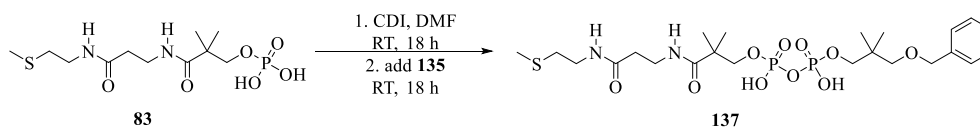
15.0 mg (46.00 μmol , 1.00 eq) des Substrats **102** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.8 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 15.0 mg (91.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 21.0 mg (78.00 μmol , 1.70 eq) des Monophosphats **135** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-II) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 4.9 mg (8.38 μmol , 18 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}$

Molekulargewicht: 584.56 g/mol

Exakte Masse: 584.1722 au

MS (ESI): m/z 583.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.56 CoA-Derivat **137**

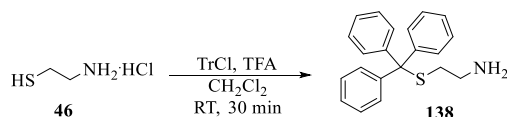
50.0 mg (146.05 μmol , 1.00 eq) des Substrats **83** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit 47.0 mg (292.00 μmol , 2.00 eq) CDI und 89.0 mg (325.00 μmol , 2.20 eq) des Monophosphats **135** in 0.8 mL trockenem Dimethylformamid gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) und ergab nach Lyophilisation der Produktfraktionen 43.0 mg (71.84 μmol , 49 %) eines weißen Feststoffs als Produkt.

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}$

Molekulargewicht: 598.58 g/mol

Exakte Masse: 598.1879 au

MS (ESI): m/z 597.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.57 S-Tritylcysteamin^[92] (**138**)

0.52 g (4.40 mmol, 1.00 eq) Cysteamin Hydrochlorid (**46**) wurden mit 0.74 mL (9.61 mmol, 2.20 eq) in 15 mL Dichlormethan gelöst und mit 1.4 g (5.03 mmol, 1.14 eq) Tritylchlorid versetzt, sodass die Reaktionslösung gelb wurde. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mL 1 N Natronlauge gequencht (Entfärbung der Reaktionslösung) und mit 35 mL Dichlormethan verdünnt. Es wurden zusätzliche 7 mL 1 N Natronlauge zugefügt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Meoethanol 4:1 → Ethylacetat:Methanol 1:1, $R_f = 0.42$, Ninhydrin-Färbereagenz) wurden 1.30 g (4.07 mmol, 92 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten.

Summenformel: C₂₁H₂₁NS

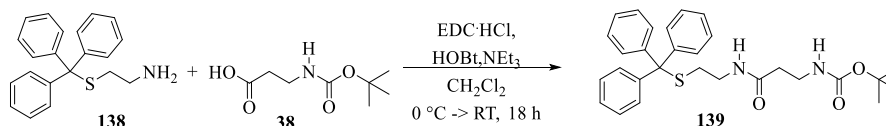
Molekulargewicht: 319.47 g/mol

Exakte Masse: 319.1395 au

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.42-7.38 (m, 6H, Ar-H), 7.28-7.23 (m, 6H, Ar-H), 7.21-7.16 (m, 3H, Ar-H), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.32 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, S-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 145.0 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 126.8 (Ar-C), 66.7 (Ph₃-C_q), 41.0 (CH₂-NH₂), 36.0 (S-CH₂).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[92]

6.9.58 *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-tritylcysteamin (**139**)

1.30 g (4.07 mmol, 1.05 eq) *S*-Tritylcysteamin (**138**) und 0.74 g (3.91 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 0.93 g (4.85 mmol, 1.24 eq) EDC·HCl, 0.56 g (4.14 mmol, 1.06 eq) HOBt und 1.35 mL (9.74 mmol, 2.49 eq) Triethylamin in 80 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 1:1, R_f = 0.39, Seebach-Färbereagenz) wurden 1.14 g (2.32 mmol, 59 %) eines leicht gelben Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: C₂₉H₃₅N₂O₆PS

Molekulargewicht: 490.66 g/mol

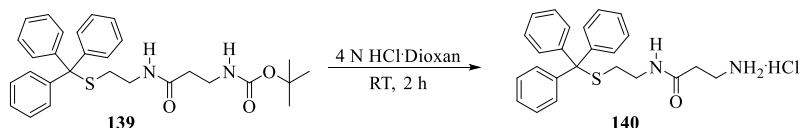
Exakte Masse: 490.2290 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.42-7.36 (m, 6H, Ar-H), 7.29-7.16 (m, 9H, Ar-H), 5.64 (bs, 1H, NH), 5.08 (bs, 1H, NH), 3.32 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.4 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.04 (q, ³ $J_{H,H}$ = ³ $J_{H,H}$ = 5.2 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.39 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.26 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.39 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 171.4 (C(O)), 156.2 (C(O)O-*tert*-Bu), 144.7 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 127.0 (Ar-C), 79.5 (C_q), 67.0 (Ph₃-C_q), 38.3 (CH₂-NH), 36.3 (CH₂-NH), 31.9 (CH₂-CH₂-NH), 29.8 (S-CH₂), 28.5 (*tert*-Bu-CH₃).

MS (ESI): m/z 243.1 [M-C₁₀H₁₉N₂O₃S]⁺, 491.2 [M+H]⁺, 981.5 [2M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 491.2355 [M+H]⁺ (m/z 491.2368 [M+H]⁺ ber. für C₂₉H₃₅N₂O₃S).

6.9.59 β -Alanyl-S-tritylcysteamin Hydrochlorid (**140**)

0.80 g (1.63 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanyl-S-tritylcysteamin (**140**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitvorschrift 6.8.4 mit 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.63 g (1.48 mmol, 91 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₂₄H₂₇N₂OSCl

Molekulargewicht: 427.00 g/mol

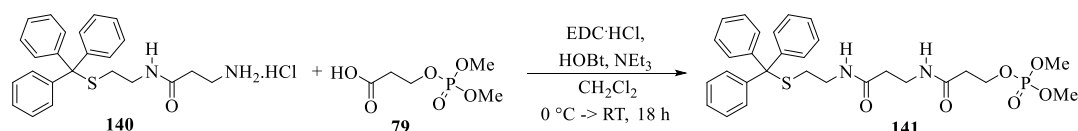
Exakte Masse: 426.1533 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.43-7.36 (m, 6H, Ar-H), 7.33-7.18 (m, 9H, Ar-H), 3.13 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.08 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, S-CH₂), 2.36 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 172.0 (C(O)), 146.2 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 67.8 (Ph₃-C_q), 39.4 (CH₂-NH), 37.1 (CH₂-NH₂), 32.6 (CH₂), 32.6 (CH₂).

MS (ESI): m/z 243.1 [M-HCl-C₅H₁₁N₂OS]⁺, 391.2 [M-HCl+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 391.1832 [M-HCl+H]⁺ (m/z 391.1844 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₂₄H₂₇N₂OS).

6.9.60 Phosphopantethein-Derivat **141**

0.31 g (0.73 mmol, 1.03 eq) des Substrats **140** und 0.14 g (0.71 mmol, 1.00 eq) der Phosphorsäure **79** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 0.16 g (0.83 mmol, 1.17 eq) EDC·HCl, 0.10 g (0.74 mmol, 1.04 eq) HOBt und 0.24 mL (1.73 mmol, 2.40 eq) Triethylamin in 33 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.52$, Seebach-Färbereagenz) wurden 0.21 g (0.37 mmol, 52 %) eines leicht gelben Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: $C_{29}H_{35}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 570.64 g/mol

Exakte Masse: 570.1953 au

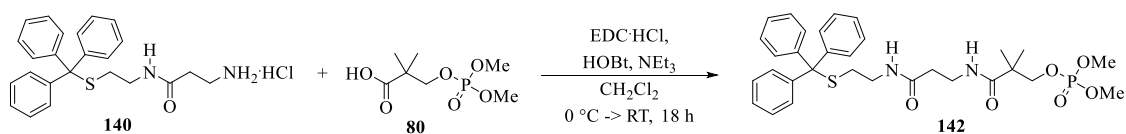
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 7.48-7.41 (m, 6H, Ar-H), 7.36-7.22 (m, 9H, Ar-H), 6.58 (t, $^3J_{H,H} = 5.2$ Hz, 1H, NH), 6.10 (t, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, 1H, NH), 4.32 (dt, $^3J_{H,P} = 8.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH_2 -OP), 3.79 (d, $^3J_{H,P} = 11.1$ Hz, 6H, PO- CH_3), 3.54 (q, $^3J_{H,H} = 3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH_2 -NH), 3.15 (q, $^3J_{H,H} = 3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 2H, CH_2 -NH), 2.51-2.46 (m, 4H, CH_2 - CH_2 -NH), 2.34 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 2H, C(O)- CH_2).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 171.6 (C(O)), 169.5 (C(O)), 144.7 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 127.0 (Ar-C), 67.0 (Ph₃-C_q), 64.2 (d, CH_2 -OP), 54.6 (PO- CH_3), 38.4 (CH_2 -NH₂), 37.5 (d, C(O)- CH_2), 35.8 (2 x CH_2), 31.9 (S- CH_2).

^{31}P -NMR (122 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 1.03-0.38 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 243.1 [$M-C_{10}H_{20}N_2O_6PS^+$]⁺, 571.2 [$M+H$]⁺, 593.2 [$M+Na$]⁺.

HRMS (ESI): m/z 571.2015 [$M+H$]⁺ (m/z 571.2031 [$M+H$]⁺ ber. für $C_{29}H_{36}N_2O_6PS$).

6.9.61 Phosphopantethein-Derivat **142**

0.51 g (1.19 mmol, 1.03 eq) des Substrats **140** und 0.26 g (1.15 mmol, 1.00 eq) der Phosphorsäure **80** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 0.27 g (1.41 mmol, 1.23 eq) EDC·HCl, 0.16 g (1.18 mmol, 1.03 eq) HOBt und 0.39 mL (2.81 mmol,

2.44 eq) Triethylamin in 23 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 6:1, $R_f = 0.35$, Ninhydrin-Färbereagenz) wurden 0.24 g (0.40 mmol, 35 %) eines weißen Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: $C_{31}H_{39}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 598.69 g/mol

Exakte Masse: 598.2266 au

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.41-7.36 (m, 6H, Ar-H), 7.31-7.26 (m, 6H, Ar-H), 7.25-7.19 (m, 3H, Ar-H), 4.00 (d, $^3J_{H,P} = 4.6$ Hz, 2H, CH_2-OP), 3.74 (d, $^3J_{H,P} = 11.1$ Hz, 6H, $PO-CH_3$), 3.39 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, CH_2-NH), 3.05 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 2H, CH_2-NH), 2.36-2.32 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.17 (s, 6H, C_q-CH_3).

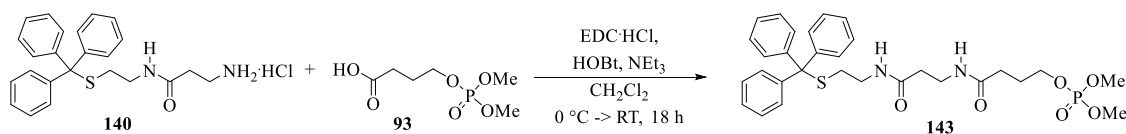
^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 177.5 ($C(O)$), 173.7 ($C(O)$), 146.2 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 75.1 (d, CH_2-OP), 67.8 (Ph_3-C_q), 55.2 (d, $PO-CH_3$), 44.3 (d, C_q-CH_3), 39.4 (CH_2-NH), 37.3 (CH_2), 36.3 (CH_2), 32.7 (S- CH_2), 22.3 (C_q-CH_3).

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD , RT) δ 0.60-0.30 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 243.1 $[M-C_{12}H_{24}N_2O_6PS]^+$, 355.1 $[M-C_{19}H_{15}]^+$, 599.2 $[M+H]^+$, 621.2 $[M+Na]^+$, 1197.5 $[2M+H]^+$, 1219.4 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 599.2326 $[M+H]^+$ (m/z 599.2344 $[M+H]^+$ ber. für $C_{31}H_{40}N_2O_6PS$).

6.9.62 Phosphopantethein-Derivat **143**



0.43 g (1.00 mmol, 1.06 eq) des Substrats **140** und 0.20 g (0.94 mmol, 1.00 eq) der Phosphatsäure **93** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 0.23 g (1.20 mmol, 1.28 eq) EDC·HCl, 0.14 g (1.04 mmol, 1.10 eq) HOBt und 0.33 mL (2.38 mmol, 2.53 eq) Triethylamin in 20 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 6:1, $R_f = 0.23$, Ninhydrin-Färbereagenz) wurden 0.36 g (0.62 mmol, 66 %) einer leicht gelben Flüssigkeit als Produkt isoliert.

Summenformel: $C_{30}H_{37}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 584.67 g/mol

Exakte Masse: 584.2110 au

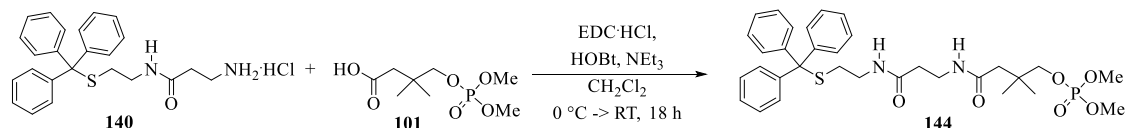
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.44-7.34 (m, 6H, Ar-H), 7.35-7.15 (m, 9H, Ar-H), 4.04 (dt, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, ³J_{H,P} = 6.3 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.75 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.38 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.05 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.37-2.31 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.26 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 1.93 (p, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 173.4 (C(O)), 172.2 (C(O)), 144.8 (Ar-C), 129.3 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 67.2 (d, CH₂-OP), 66.4 (Ph₃-C), 53.6 (d, PO-CH₃), 38.1 (CH₂-NH), 35.5 (2 x CH₂), 35.1 (CH₂), 31.3 (d, CH₂-CH₂-CH₂), 25.9 (d, CH₂-CH₂-CH₂).

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.69-01.21 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 243.1 [M-C₁₁H₂₂N₂O₆PS]⁺, 585.2 [M+H]⁺, 607.2 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 585.2177 [M+H]⁺ (m/z 585.2188 [M+H]⁺ ber. für C₃₀H₃₈N₂O₆PS).

6.9.63 Phosphopantethein-Derivat **144**

65.0 mg (0.15 mmol, 1.00 eq) des Substrats **140** und 35.0 mg (0.15 mmol, 1.00 eq) der Phosphat Säure **101** wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 34.0 mg (0.18 mmol, 1.20 eq) EDC·HCl, 20.0 mg (0.15 mmol, 1.00 eq) HOBt und 49.00 μ L (0.35 mmol, 2.36 eq) Triethylamin als Base in 10 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 3:1, R_f = 0.71, Ninhydrin-Färbereagenz) und anschließend mittels MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV) wurden 30.0 mg (0.05 mmol, 33 %) einer leicht gelben Flüssigkeit als Produkt isoliert.

Summenformel: $C_{32}H_{41}N_2O_6PS$

Molekulargewicht: 612.72 g/mol

Exakte Masse: 612.2423 au

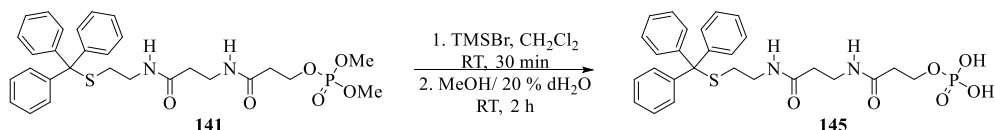
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.41-7.36 (m, 6H, Ar-H), 7.35-7.17 (m, 9H, Ar-H), 3.86 (d, $^3J_{H,P}$ = 4.6 Hz, 2H, $\underline{CH_2}$ -OP), 3.77 (d, $^3J_{H,P}$ = 11.1 Hz, 6H, PO- $\underline{CH_3}$), 3.37 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.7 Hz, 2H, $\underline{CH_2}$ -NH), 3.05 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.7 Hz, 2H, $\underline{CH_2}$ -NH), 2.38-2.30 (m, 4H, 2 x $\underline{CH_2}$), 2.12 (s, 2H, $\underline{CH_2}$ - C_q), 1.00 (s, 6H, C_q - $\underline{CH_3}$).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 173.5 ($\underline{C(O)}$), 173.4 ($\underline{C(O)}$), 146.2 (Ar- \underline{C}), 130.7 (Ar- \underline{C}), 128.9 (Ar- \underline{C}), 127.8 (Ar- \underline{C}), 76.6 (d, $\underline{CH_2}$ -OP), 67.8 (Ph $_3$ - \underline{C}), 55.2 (d, PO- $\underline{CH_3}$), 45.1 ($\underline{CH_2}$ - C_q), 39.4 ($\underline{CH_2}$ -NH), 36.8 ($\underline{CH_2}$), 36.5 ($\underline{CH_2}$), 35.8 (d, $\underline{C_q}$ - $\underline{CH_3}$), 32.7 (S- $\underline{CH_2}$), 24.5 ($\underline{C_q}$ - $\underline{CH_3}$).

^{31}P -NMR (122 MHz, CD_3OD , RT) δ 1.23-0.62 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 243.1 [$M-C_{13}H_{26}N_2O_6PS^*$] $^+$, 613.2 [$M+H$] $^+$, 635.2 [$M+Na$] $^+$.

HRMS (ESI): m/z 613.2491 [$M+H$] $^+$ (m/z 613.2501 [$M+H$] $^+$ ber. für $C_{32}H_{42}N_2O_6PS$).

6.9.64 Phosphopantethein-Derivat **145**

205.0 mg (0.36 mmol, 1.00 eq) des Substrats **141** wurden in 1.43 mL trockenem Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 mit 143.00 μL (1.08 mmol, 3.00 eq) Bromotrimethylsilan zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV ohne TFA-Zusatz) wurden 67.4 mg (0.12 mmol, 35 %) eines weißen Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$

Molekulargewicht: 542.59 g/mol

Exakte Masse: 542.1640 au

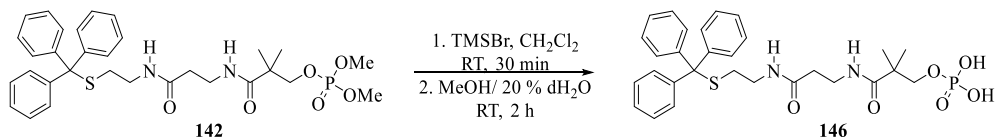
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.40-7.37 (m, 6H, Ar-H), 7.32-7.25 (m, 6H, Ar-H), 7.24-7.18 (m, 3H, Ar-H), 4.17 (q, $^3J_{\text{H,P}} = ^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.40 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.06 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.49 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OP}$), 2.36-2.32 (m, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 173.5 ($\text{C}(\text{O})$), 172.6 ($\text{C}(\text{O})$), 146.2 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 67.8 ($\text{Ph}_3\text{-C}$), 63.8 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 39.4 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 38.0 (d, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OP}$), 37.1 (CH_2), 36.5 (CH_2), 32.7 (S- CH_2).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD , RT) δ -0.18 (t, $^3J_{\text{P,H}} = 7.6$ Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 541.2 [M-H] $^-$, 1083.3 [2M-H] $^-$.

HRMS (ESI): m/z 541.1551 [M-H] $^-$ (m/z 541.1562 [M-H] $^-$ ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$).

6.9.65 Phosphopantethein-Derivat **146**

114.0 mg (0.19 mmol, 1.00 eq) des Substrats **142** wurden in 880.00 μL trockenem Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 mit 88.00 μL (0.67 mmol, 1.00 eq) Bromotrimethylsilan zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV ohne TFA-Zusatz) wurden 48.4 mg (0.08 mmol, 45 %) eines weißen Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: C₂₉H₃₅N₂O₆PS

Molekulargewicht: 570.64 g/mol

Exakte Masse: 570.1953 au

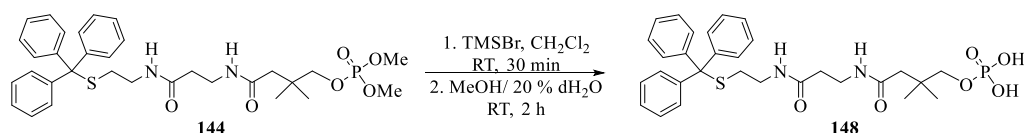
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.41-7.37 (m, 6H, Ar-H), 7.31-7.26 (m, 6H, Ar-H), 7.24-7.19 (m, 3H, Ar-H), 3.89 (d, ³J_{H,P} = 4.7 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.39 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.05 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.36-2.33 (m, 4H, 2 x CH₂-CH₂-NH), 1.15 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 178.3 (C(O)), 173.8 (C(O)), 146.2 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 73.4 (d, CCH₂-OP), 67.8 (Ph₃-C), 44.2 (d, C_q-CH₃), 39.5 (CH₂-NH), 37.3 (CH₂), 36.5 (CH₂), 32.7 (S-CH₂), 22.6 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD, RT) δ -0.21 (t, ³J_{P,H} = 4.2 Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 569.2 [M+H]⁺, 1139.4 [2M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 569.1863 [M+H]⁺ (m/z 569.1875 [M+H]⁺ ber. für C₂₉H₃₆N₂O₆PS).

6.9.66 Phosphopantethein-Derivat **148**

54.0 mg (0.09 mmol, 1.00 eq) des Substrats **144** wurden in 170.00 μL trockenem Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 mit 17.00 μL (0.13 mmol, 1.50 eq) Bromotrimethylsilan zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV ohne TFA-Zusatz) wurden 9.0 mg (15.39 μmol , 17 %) einer farblosen Flüssigkeit als Produkt isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$

Molekulargewicht: 584.67 g/mol

Exakte Masse: 584.2110 au

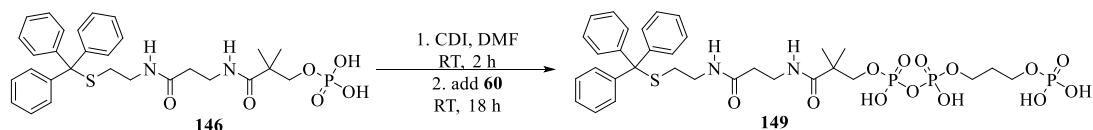
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.41-7.37 (m, 6H, Ar-H), 7.32-7.27 (m, 6H, Ar-H), 7.25-7.20 (m, 3H, Ar-H), 3.74 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 5.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.04 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.37-2.33 (m, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.15 (s, 2H, $\text{C(O)-CH}_2\text{-C}_q$), 0.98 (s, 6H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 146.2 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 75.1 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 67.8 ($\text{Ph}_3\text{-C}$), 48.0 ($\text{C(O)-CH}_2\text{-C}_q$), 45.1 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$), 39.5 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 37.0 (CH_2), 36.4 (CH_2), 32.6 (S-CH_2), 24.7 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$). 2 x C(O) fehlt

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD , RT) δ 0.15(-0.04) (m, 1P, P-18).

MS (ESI): m/z 583.2 $[\text{M-H}]^-$, 1167.4 $[2\text{M-H}]^-$.

HRMS (ESI): m/z 583.2020 $[\text{M-H}]^-$ (m/z 583.2032 $[\text{M-H}]^-$ ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$).

6.9.67 CoA-Derivat **149**

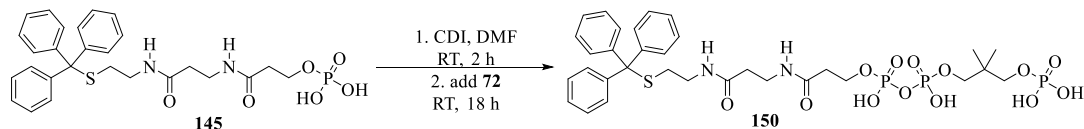
10.0 mg (17.52 μmol , 1.00 eq) des Substrats **146** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.75 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 6.0 mg (35.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 10.4 mg (44.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **60** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 0.5 mg (0.63 μmol , 36 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 788.68 g/mol

Exakte Masse: 788.1699 au

MS (ESI): m/z 787.0 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.68 CoA-Derivat **150**

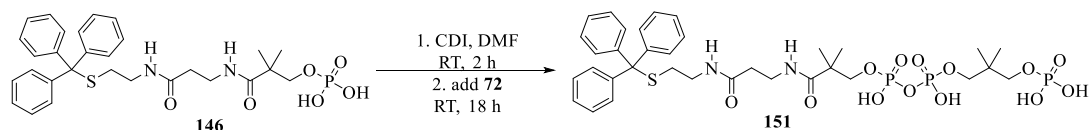
15.0 mg (27.65 μmol , 1.00 eq) des Substrats **145** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 9.0 mg (55.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 18.0 mg (69.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **72** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 2.5 mg (3.17 μmol , 11 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 788.68 g/mol

Exakte Masse: 788.1699 au

MS (ESI): m/z 787.0 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.69 CoA-Derivat **151**

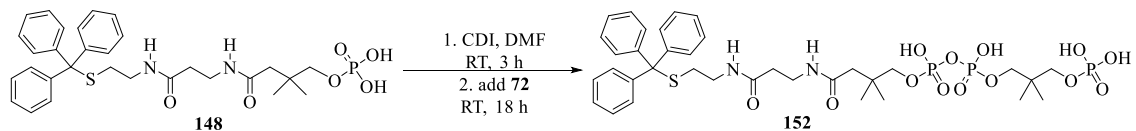
10.0 mg (17.52 μmol , 1.00 eq) des Substrats **146** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.70 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 6.0 mg (35.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 11.6 mg (44.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **72** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 2.8 mg (3.43 μmol , 20 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 816.73 g/mol

Exakte Masse: 816.2012 au

MS (ESI): m/z 815.0 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.70 CoA-Derivat **152**

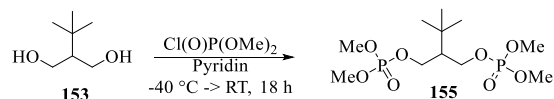
9.0 mg (15.39 μmol , 1.00 eq) des Substrats **148** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.50 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 4.9 mg (30.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 9.9 mg (38.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **72** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 0.6 mg (0.72 μmol , 5 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 830.76 g/mol

Exakte Masse: 830.2168 au

MS (ESI): m/z 829.1 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.71 2-(*tert*-Butyl)propan-1,3-diylbis(dimethylphosphat) (**155**)

0.10 g (0.76 mmol, 1.00 eq) 2-(*tert*-Butyl)propan-1,3-diol (**153**) wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 8 mL trockenem Pyridin gelöst und gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 mit 0.25 mL (2.27 mmol, 3.00 eq) Dimethylchlorophosphat zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.25 g (0.72 mmol, 94 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₁₁H₂₆O₈P₂

Molekulargewicht: 348.27 g/mol

Exakte Masse: 348.1103 au

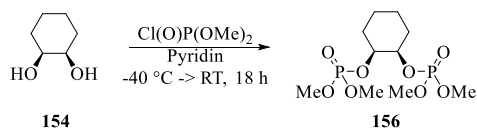
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT,) δ 4.28-4.12 (m, 4H, CH₂-OP), 3.77 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 12H, PO-OCH₃), 1.72-1.69 (m, 1H, CH-*tert*-Bu), 0.99 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 65.1 (d, CH₂-OP), 55.5 (d, PO-OCH₃), 49.0 (t, CH-*tert*-Bu), 32.0 (*tert*-Bu-C_q), 28.6 (*tert*-Bu-CH₃).

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃OD, RT) δ 1.36-0.95 (m, 2P).

MS (ESI): m/z 349.1 [M+H]⁺, 315.1 [M+Na]⁺, 697.1 [2M+H]⁺, 719.2 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 349.1170 [M+H]⁺ (m/z 349.1181 [M+H]⁺ ber. für C₁₁H₂₇O₈P₂).

6.9.72 (1*R*,2*S*)-Cyclohexan-1,2-diylbis(dimethylphosphat) (**156**)

0.10 g (0.86 mmol, 1.00 eq) (1*R*,2*S*)-Cyclohexan-1,2-diol (**154**) wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 8 mL trockenem Pyridin gelöst und gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.8 mit 0.28 mL (2.58 mmol, 3.00 eq) Dimethylchlorophosphat zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 102.0 mg (0.31 mmol, 36 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₁₀H₂₂O₈P₂

Molekulargewicht: 332.23 g/mol

Exakte Masse: 332.0790 au

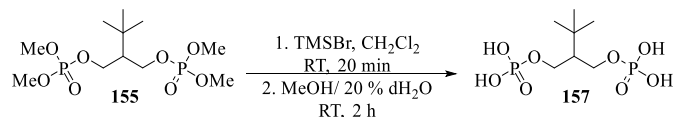
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT,) δ 4.55 (t, ³J_{H,H} = ³J_{H,P} = 7.9 Hz, 2H, CH-OP), 3.79 (d, ³J_{H,P} = 11.2 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.76 (d, ³J_{H,P} = 11.2 Hz, 6H, PO-CH₃), 2.04-1.92 (m, 2H, CH₂-CH-OP), 1.74-1.61 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH-OP, CH₂-CH-OP), 1.47-1.43 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH-OP).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 76.5 (t, CH-OP), 54.4 (d, PO-CH₃), 54.2 (d, PO-CH₃), 28.9 (CH₂-CH-OP), 21.2 (CH₂-CH₂-CH-OP).

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃, RT) δ 0.91-0.22 (m, 2P).

MS (ESI): m/z 333.1 [M+H]⁺, 355.1 [M+Na]⁺, 665.1 [2M+H]⁺, 687.1 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 333.0864 [M+H]⁺ (m/z 333.0868 [M+H]⁺ ber. für C₁₀H₂₃O₈P₂).

6.9.73 2-(*tert*-Butyl)propan-1,3-diylbis(dihydrogenphosphat) (**157**)

0.25 g (0.72 mmol, 1.00 eq) des Substrats **155** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 3.7 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.37 mL (2.80 mmol, 4.00 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Nach Aufreinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-VIII ohne TFA-Zusatz) wurden die Produktfraktionen lyophilisiert, sodass als Produkt 124.0 mg (0.42 mmol, 59 %) einer farblosen, viskosen Flüssigkeit isoliert werden konnten.

Summenformel: C₇H₁₈O₈P₂

Molekulargewicht: 292.16 g/mol

Exakte Masse: 292.0477 au

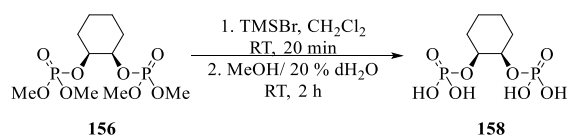
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 4.24-4.10 (m, 4H, CH-OP), 1.69-1.67 (m, 1H, CH-*tert*-Bu), 1.03 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 64.9 (d, CH₂-OP), 50.3 (t, CH-*tert*-Bu), 32.8 (*tert*-Bu-C_q), 28.9 (*tert*-Bu-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.06-(-0.23) (m, 2P).

MS (ESI): m/z 291.0 [M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 291.0398 [M-H]⁻ (m/z 291.0399 [M-H]⁻ ber. für C₇H₁₇O₈P₂).

6.9.74 (1*R*,2*S*)-Cyclohexan-1,2-diylbis(dihydrogenphosphat) (**158**)

102.0 mg (0.31 mmol, 1.00 eq) des Substrats **156** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1.64 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 164.00 μ L (1.24 mmol, 4.00 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Nach Aufreinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) wurden die Produktfraktionen lyophilisiert, sodass als Produkt 48.0 mg (0.17 mmol, 56 %) einer leicht gelben Flüssigkeit isoliert werden konnten.

Summenformel: C₆H₁₄O₈P₂

Molekulargewicht: 276.12 g/mol

Exakte Masse: 276.0164 au

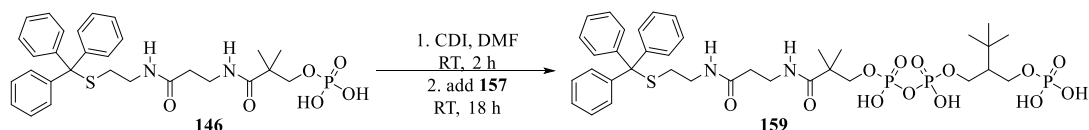
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 4.44 (t, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,P}} = 8.0$ Hz, 2H, CH-OP), 2.04-1.96 (m, 2H, CH₂-CH-OP), 1.74-1.63 (m, 4H, CH₂-CH-OP, CH₂-CH₂-CH-OP), 1.46-1.33 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH-OP).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 76.8 (t, CH-OP), 29.8 (CH₂-CH-OP), 22.3 (CH₂-CH₂-CH-OP).

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃OD, RT) δ -0.35 (d, $^3J_{\text{P,H}} = 8.0$ Hz, 2P).

MS (ESI): m/z 275.0 [M-H]⁻, 551.0 [2M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 275.0087 [M-H]⁻ (m/z 2275.086 [M-H]⁻ ber. für C₆H₁₃O₈P₂).

6.9.75 CoA-Derivat **159**

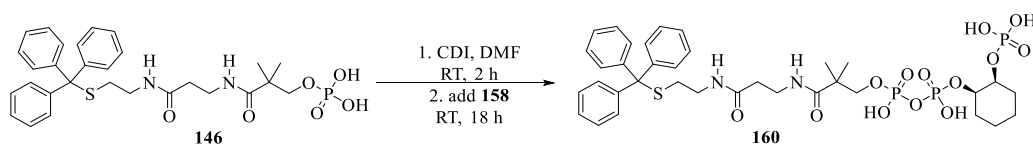
10.0 mg (17.52 μmol , 1.00 eq) des Substrats **146** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.75 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 6.0 mg (35.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 13.0 mg (45.00 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **157** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 4.3 mg (5.09 μmol , 29 %) eines leicht gelben Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 844.79 g/mol

Exakte Masse: 844.2325 au

MS (ESI): m/z 843.2 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.76 CoA-Derivat **160**

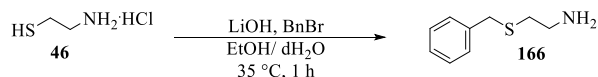
10.0 mg (17.52 μmol , 1.00 eq) des Substrats **146** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.80 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 6.0 mg (35.00 μmol , 2.00 eq) CDI und im Anschluss mit 302 μL (44.00 μmol , 2.50 eq) einer 0.145 μM -Lösung des Diphosphats **158** in trockenem Dimethylformamid unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 4.5 mg (5.43 μmol , 31 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 828.74 g/mol

Exakte Masse: 828.2012 au

MS (ESI): m/z 826.8 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.77 *S*-Benzylcysteamin^[177] (**166**)

0.63 g (26.40 mmol, 2.00 eq) Lithiumhydroxid wurden in 13.50 mL destilliertem Wasser gelöst und mit 40.50 mL absoluten Ethanols zugefügt. Zu dieser Lösung wurden zunächst 1.50 g (13.20 mmol, 1.00 eq) Cysteamin Hydrochlorid (**46**) zugegeben und anschließend langsam 1.57 mL (13.20 mmol, 1.00 eq) Benzylbromid zugetropft. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei 35 °C gerührt. Dann wurde das Ethanol unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der farblose flüssige Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Cyclohexan 1:1 → Dichlormethan:Methanol 4:1, $R_f = 0.63$ in Dichlormethan:Methanol 4:1, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 1.42 g (8.49 mmol, 64 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₉H₁₃NS

Molekulargewicht: 167.27 g/mol

Exakte Masse: 167.0769 au

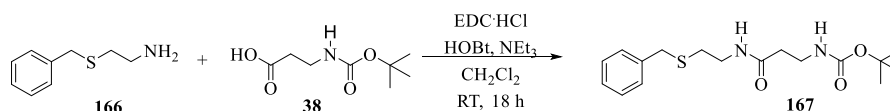
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.29 (d, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 4.4$ Hz, 4H, Ar-H), 7.25-7.19 (m, 1H, Ar-H), 3.68 (s, 2H, Ph-CH₂), 2.80 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.51 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, S-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 138.4 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 127.1 (Ar-C), 40.7 (Ph-CH₂), 36.0 (CH₂), 35.3 (CH₂).

MS (ESI): m/z 168.1 [M+H]⁺, 190.1 [M+Na]⁺, 226.1 [M+HCl+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 168.0831 [M+H]⁺ (m/z 168.0841 [M+H]⁺ ber. für C₉H₁₄NS).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[177]

6.9.78 *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-Benzylcysteamin (**168**)

1.25 g (7.46 mmol, 1.10 eq) *S*-Benzylcysteamin (**166**), 1.28 g (6.78 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**), 0.92 g (6.78 mmol, 1.00 eq) HOBt und 1.62 g (8.48 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 60 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 1.88 mL (13.56 mmol, 2.0 eq) Triethylamin versetzt. Es wurde bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung eingeeengt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung und dann mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan:Ethylacetat 1:10, R_f = 0.61, Ninhydrin-Färbereagenz) gereinigt. Es wurden als Produkt 1.77 g (5.23 mmol, 77 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₁₇H₂₆N₂O₃S

Molekulargewicht: 338.47 g/mol

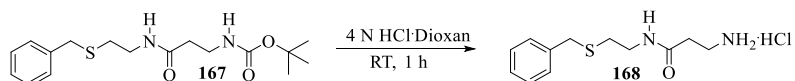
Exakte Masse: 338.1664 au

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.31 – 7.28 (m, 5H, Ar-H), 6.06 (bs, 1H, NH), 5.21 (bs, 1H, NH), 3.70 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.36 (q, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 4H, 2 x CH₂-NH), 2.54 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 2.33 (t, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 2H, CH₂), 1.41 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 171.5 (C(O)), 156.2 (C(O)-O-*tert*-Bu), 138.1 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 127.3 (Ar-C), 79.4 (*tert*-Bu-C_q), 38.1 (CH₂-NH), 36.8 (CH₂), 36.3 (CH₂), 35.9 (CH₂), 31.1 (S-CH₂), 28.5 (*tert*-Bu-CH₃).

MS (ESI): m/z 261.1 [M-C₆H₅]⁺, 361.2 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 361.1563 [M+Na]⁺ (m/z 361.1556 [M+Na]⁺ ber. für C₁₇H₂₆N₂O₃SNa).

6.9.79 β -Alanyl-*S*-Benzylcysteamin Hydrochlorid (**168**)

2.71 g (7.99 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-Benzylcysteamin (**167**) wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 mit 12 mL (159.80 mmol, 20.00 eq) einer 4 N Salzsäure-Dioxan-Lösung zur Reaktion gebracht. Es wurden 2.20 g (8.01 mmol, 100 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₉N₂OSCl

Molekulargewicht: 274.81 g/mol

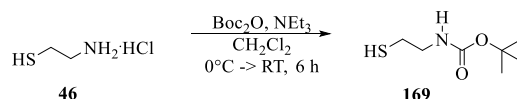
Exakte Masse: 274.0907 au

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT,) δ 7.25-7.20 (m, 4H, Ar-H), 7.25-7.20 (m, 1H, Ar-H), 3.75 (s, 2H, PH-CH₂), 3.35 (t, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.17 (t, ³*J*_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.59 (t, ³*J*_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂), 2.54 (t, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, S-CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 172.1 (C(O)), 139.8 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 39.7 (CH₂-NH), 37.1 (CH₂), 36.5 (CH₂), 32.7 (CH₂), 31.4 (CH₂).

MS (ESI): *m/z* 91.1 [M-HCl-C₅H₁₁N₂OS⁺]⁺, 185.1 239.1[M-HCl+H]⁺, 261.1 [M-HCl+Na]⁺.

HRMS (ESI): *m/z* 239.1209 [M-HCl+H]⁺ (*m/z* 239.1213 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₁₂H₁₉N₂OS).

6.9.80 *N*-Boc-Cysteamin^[178] (**169**)

Zu einer Lösung aus 0.50 g (4.40 mmol, 1.00 eq) Cysteamin Hydrochlorid (**46**) und 0.96 g (4.40 mmol, 1.00 eq) Di-*tert*-butyldicarbonat in 20 mL Dichlormethan wurden bei 0 °C 1.22 mL (8.80 mmol, 2.00 eq) Triethylamin zugetropft und anschließend sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung zuerst mit verdünnter Salzsäure, dann mit destilliertem Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Pentan 1:6, $R_f = 0.47$, Ninhydrin-Färbereagenz), sodass 0.68 g (3.84 mmol, 87 %) des Produkts als farblose Flüssigkeit erhalten wurden.

Summenformel: C₇H₁₅NO₂S

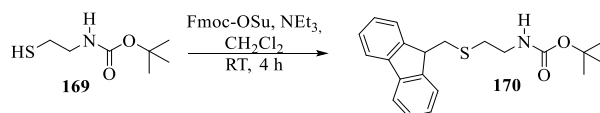
Molekulargewicht: 177.26 g/mol

Exakte Masse: 177.0823 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 4.91 (bs, 1H, NH), 3.30 (q, ³*J*_{H,H} = ³*J*_{H,H} = 6.3 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.64 (dt, ³*J*_{H,H} = 6.5 Hz, ³*J*_{H,H} = 8.5 Hz, 2H, S-CH₂), 1.44 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃), 1.34 (t, ³*J*_{H,H} = 8.5 Hz, 1H, SH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 156.1 (C(O)-O-*tert*-Bu), 79.8 (C_q-tert-Bu), 43.7 (CH₂-NH), 28.5 (tert-Bu-CH₃), 25.2 (S-CH₂).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[178]

6.9.81 *S*-Fm-*N*-Boc-Cysteamin^[125] (**170**)

Zu einer Lösung aus 0.15 g (0.85 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc-Cysteamin (**169**) in 9 mL Dichlormethan wurden zuerst 0.31 g (0.92 mmol, 1.09 eq) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)succinimid und dann 0.12 mL (0.90 mmol, 1.06 eq) Triethylamin zugesetzt und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Pentan 1:8, $R_f = 0.32$, Ninhydrin-Färbereagenz), sodass 0.27 g (0.76 mmol, 89 %) des Produkts als weißer Feststoff erhalten wurden.

Summenformel: C₂₁H₂₅NO₂S

Molekulargewicht: 355.50 g/mol

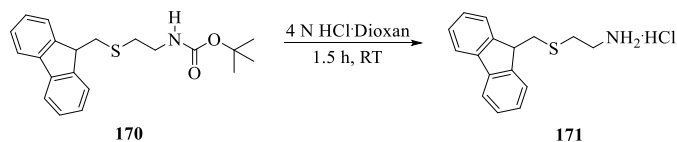
Exakte Masse: 355.1606 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.76 (d, ³ $J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.68 (d, ³ $J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (t, ³ $J_{H,H} = 3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.32 (td, ³ $J_{H,H} = 3J_{H,H} = 7.4$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1.3$ Hz, 2H, Ar-H), 4.12 (t, ³ $J_{H,H} = 6.3$ Hz, 1H, CH-CH₂-S), 3.28 (t, ³ $J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.11 (d, ³ $J_{H,H} = 6.4$ Hz, 2H, CH₂-S), 2.63 (t, ³ $J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, S-CH₂), 1.44 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 155.9 (C(O)-O-*tert*-Bu), 146.0 (Ar-C), 141.2 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 120.1 (Ar-C), 79.7 (C_q-*tert*-Bu), 47.1 (CH-CH₂-S), 39.9 (CH₂-S), 36.3 (CH₂-NH), 33.5 (S-CH₂), 28.5 (*tert*-Bu-CH₃).

MS (ESI): m/z 356.2 [M+H]⁺, 711.3 [2M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 356.1674 [M+H]⁺ (m/z 356.1684[M+H]⁺ ber. für C₂₁H₂₆NO₂S).

6.9.82 *S*-Fm-Cysteamin Hydrochlorid (**171**)

0.27 g (0.76 mmol, 1.00 eq) *S*-Fm-*N*-Boc-Cysteamin (**170**) wurden nach der allgemeinen Arbeitvorschrift 6.8.4 mit 0.79 mL (22.80 mmol, 30.0 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.20 g (0.69 mmol, 90 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₁₆H₁₈NSCl

Molekulargewicht: 291.84 g/mol

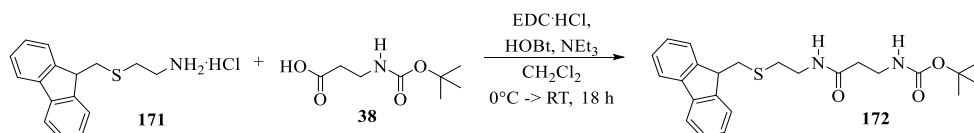
Exakte Masse: 291.0848 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.80 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.70 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.39 (t, ³J_{H,H} = ³J_{H3,H4} = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.31 (td, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 2H, Ar-H), 4.20 (t, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2H, CH-CH₂-S), 3.25 (d, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2H, CH-CH₂-S), 3.01 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.72 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, S-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 147.3 (Ar-C), 142.3 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 125.8 (Ar-C), 120.7 (Ar-C), 48.2 (CH-CH₂-S), 39.9 (CH-CH₂-S), 37.0 (CH₂-NH₂), 31.3 (S-CH₂).

MS (ESI): m/z 256.1 [M-HCl+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 256.1150 [M+H]⁺ (m/z 256.1160 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₁₆H₁₈NS).

6.9.83 *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-Fm-Cysteamin (**172**)

0.20 g (0.67 mmol, 1.05 eq) *S*-Fm-Cysteamin (**171**) wurden zusammen mit 0.12 g (0.64 mmol 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**), 0.15 g (0.80 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl, 0.09 g (0.69 mmol, 1.07 eq) HOBT und 0.22 mL (1.60 mmol, 2.50 eq) Triethylamin in 25 mL Dichlormethan bei 0 °C gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.38$, Ninhydrin-Färbereagenz), sodass 0.26 g (0.61 mmol, 95 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten wurden.

Summenformel: C₂₄H₃₀N₂O₃S

Molekulargewicht: 426.58 g/mol

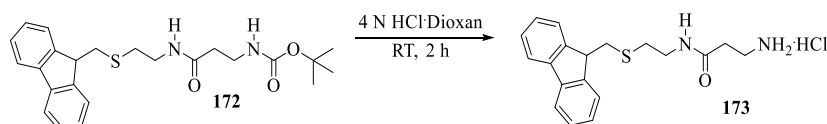
Exakte Masse: 426.5750 au

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.76 (d, ³ $J_{H,H} = 7.6$ Hz, 2H, Ar-H), 7.66 (d, ³ $J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (t, ³ $J_{H,H} =$ ³ $J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.33 (td, ³ $J_{H,H} =$ ³ $J_{H,H} = 7.5$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1.2$ Hz, 2H, Ar-H), 5.80 (bs, 1H, NH), 5.13 (bs, 1H, NH), 4.14 (t, ³ $J_{H,H} = 6.5$ Hz, 1H, CH-CH₂-S), 3.39-3.36 (m, 4H, 2 x CH-NH), 3.14 (d, ³ $J_{H,H} = 6.1$ Hz, 2H, CH-CH₂-S), 2.60 (t, ³ $J_{H,H} = 6.4$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.32 (t, ³ $J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.43 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 171.5 (C(O)), 156.2 (C(O)-O-*tert*-Bu), 145.9 (Ar-C), 141.4 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 127.3 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 120.2 (Ar-C), 79.5 (C_q-*tert*-Bu), 47.0 (CH-CH₂-S), 38.1 (2 x CH₂), 36.4 (CH₂), 35.9 (CH₂), 33.0 (S-CH₂), 28.6 (*tert*-Bu-CH₃).

MS (ESI): m/z 427.2 [M+H]⁺, 449.2 [M+Na]⁺, 853.4 [2M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 427.2044 [M+H]⁺ (m/z 427.5828 [M+H]⁺ ber. für C₂₄H₃₁N₂O₃S).

6.9.84 β -Alanyl-S-Fm-Cysteamin Hydrochlorid (**173**)

58.0 mg (0.14 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanyl-S-Fm-Cysteamin (**172**) wurden nach der allgemeinen Arbeitvorschrift 6.8.4 mit 0.14 mL (4.08 mmol, 30.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 49.0 mg (0.14 mmol, 100 %) einer gelblichen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₁₉H₂₃N₂OSCl

Molekulargewicht: 362.92 g/mol

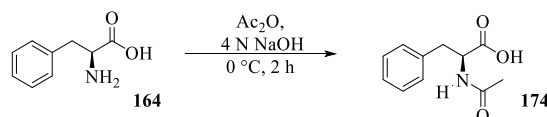
Exakte Masse: 362.1220 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.77 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.71 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, Ar-H), 7.37 (t, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, Ar-H), 7.30 (td, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 2H, Ar-H), 4.14 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 1H, Ar-H), 3.36 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.18-3.14 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.64 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 172.1 (C(O)), 147.5 (Ar-C), 142.4 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 125.9 Ar-C), 120.8 (Ar-C), 48.2 (CH-CH₂-S), 40.0 (CH-CH₂-S), 37.1 (CH₂), 37.0 (CH₂), 33.2 (CH₂), 32.7 (CH₂).

MS (ESI): m/z 327.2 [M-HCl+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 327.1521 [M+H]⁺ (m/z 327.1531 [M+H]⁺ ber. für C₁₉H₂₃N₂OS).

6.9.85 *N*-Ac-L-Phenylalanin^[179] (**174**)

0.80 g (4.84 mmol, 1.00 eq) L-Phenylalanin (**164**) wurden in 3.60 mL 4 N Natronlauge gelöst und unter starkem Rühren bei 0 °C mit 0.92 mL (0.99 mmol, 1.00 eq) Essigsäureanhydrid versetzt, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung mit 4 N Natronlauge stets stark basisch gehalten wurde. Es wurde zwei Stunden bei 0 °C gerührt, dann wurden bei 0 °C weitere 0.92 mL (0.99 mmol, 1.00 eq) Essigsäureanhydrid zugesetzt und der pH-Wert der Reaktionslösung erneut mit 4 N Natronlauge basisch gehalten. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 6 N Salzsäure angesäuert bis ein weißer Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde filtriert, mit destilliertem Wasser, gesättigter Natriumchlorid-Lösung und erneut mit destilliertem Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Als Produkt konnten 0.73 g (3.52 mmol, 73 %) eines weißen Feststoffs erhalten werden.

Summenformel: C₁₁H₁₃NO₃

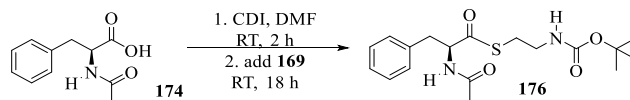
Molekulargewicht: 207.23 g/mol

Exakte Masse: 207.0895 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.36-7.25 (m, 4H, Ar-H), 7.20-7.16 (m, 1H, Ar-H), 6.41 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.89 (dt, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, C_α-H), 3.26 (dd, ²J_{H,H5} = 14.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, Ph-CH₂), 3.15 (dd, ²J_{H,H} = 14.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 1H, Ph-CH₂), 2.04 (s, 3H, C(O)-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 174.3 (CO₂H), 172.2 (C(O)), 135.6 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 53.7 (C_α), 37.3 (Ph-CH₂), 22.7 (C(O)-CH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[180]

6.9.86 *N*-Ac-L-Phenylalanyl-*N*-Boc-Cysteamin (**176**)

0.72 g (3.47 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-L-Phenylalanin (**174**) wurden mit 0.73 g (4.52 mmol, 1.30 eq) CDI in 25 mL Dimethylformamid bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Dann wurden 1.17 g (6.59 mmol, 1.90 eq) *N*-Boc-Cysteamin (**169**) zugesetzt und bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit viel Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.32$, Ninhydrin-Färbereagenz), sodass 0.90 g (2.46 mmol, 71 %) eines gelben Feststoffs als Produkt erhalten wurden.

Summenformel: $C_{18}H_{26}N_2O_4S$

Molekulargewicht: 366.48 g/mol

Exakte Masse: 366.1613 au

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 7.33-7.27 (m, 4H, Ar-H), 7.14 (d, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 1H, Ar-H), 5.87 (bs, 1H, C_α -NH), 4.97 (q, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 1H, C_α -H), 4.76 (bs, 1H, NH), 3.30-3.20 (m, 2H, CH_2 -NH), 3.12 (t, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 3.05-2.95 (m, 2H, CH_2), 1.98 (s, 3H, C(O)- CH_3), 1.45 (s, 9H, *tert*-Bu- CH_3).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 199.9 (\underline{C} (O)-S), 170.1 (\underline{C} (O)- CH_3), 155.9 (\underline{C} (O)-O-*tert*-Bu), 135.6 (Ar- \underline{C}), 129.4 (Ar- \underline{C}), 128.9 (Ar- \underline{C}), 127.5 (Ar- \underline{C}), 79.8 (\underline{C}_q -*tert*-Bu), 59.8 (\underline{C}_α), 38.4 (2 x \underline{CH}_2), 29.4 (S- \underline{CH}_2), 28.5 (*tert*-Bu- \underline{CH}_3), 23.3 (C(O)- \underline{CH}_3).

MS (ESI): m/z 367.2 $[M+H]^+$, 389.2 $[M+Na]^+$, 733.3 $[2M+H]^+$, 755.3 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 367.1681 $[M+H]^+$ (m/z 367.1691 $[M+H]^+$ ber. für $C_{18}H_{27}N_2O_4S$).

6.9.87 *S*-Bz-*N*-Boc-Cysteamin (**177**)

0.60 g (4.91 mmol, 1.00 eq) Benzoesäure (**175**) wurden mit 1.04 g (6.39 mmol, 1.30 eq) CDI in 35 mL Dimethylformamid bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Dann wurden 0.96 g (5.40 mmol, 1.10 eq) *N*-Boc-Cysteamin (**169**) zugesetzt und bei Raumtemperatur zwölf Stunden gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit viel Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Pentan 1:8, $R_f = 0.32$, Ninhydrin-Färbereagenz), sodass 1.21 g (4.30 mmol, 88 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten wurden.

Summenformel: $C_{14}H_{19}NO_3S$

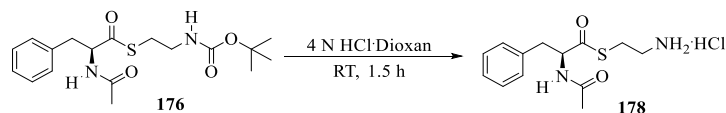
Molekulargewicht: 281.37 g/mol

Exakte Masse: 281.1086 au

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ 7.99-7.94 (m, 2H, Ar-H), 7.62-7.54 (m, 1H, Ar-H), 7.49-7.41 (m, 2H, Ar-H), 4.87 (bs, 1H, NH), 3.40 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.21 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.43 (s, 9H, *tert*-Bu- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 191.8 ($\text{C}(\text{O})\text{-S}$), 156.0 ($\text{C}(\text{O})\text{-O-tert-Bu}$), 137.0 (Ar-C), 133.7 (Ar-C), 128.8 (Ar-C), 127.4 (Ar-C), 79.8 ($\text{C}_q\text{-tert-Bu}$), 40.5 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 29.3 (S- CH_2), 28.5 (*tert*-Bu- CH_3).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[181]

6.9.88 *N*-Ac-L-Phenylalanyl-Cysteamin Hydrochlorid (**178**)

0.90 g (2.47 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-L-Phenylalanyl-*N*-Boc-Cysteamin (**176**) wurden mit 2.14 mL (61.75 mmol, 25.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.71 g (2.34 mmol, 95 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₁₃H₁₉N₂O₂SCl

Molekulargewicht: 302.82 g/mol

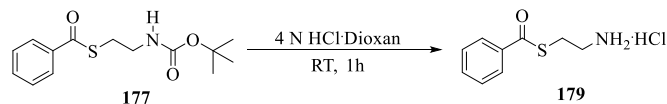
Exakte Masse: 302.0856 au

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.33-7.17 (m, 5H, Ar-H), 4.74 (dd, ³J_{H,H} = 10.4 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, C_α-H), 3.25 (dd, ²J_{H,H} = 14.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, Ph-CH₂), 3.20-3.08 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.91 (dd, ²J_{H,H} = 14.1 Hz, ³J_{H,H} = 10.4 Hz, 1H, Ph-CH₂), 1.94 (s, 3H, C(O)-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 201.1 (C(O)-S), 173.9 (C(O)-CH₃), 138.0 (Ar-C), 130.1 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 62.5 (C_α), 40.4 (CH₂), 38.1 (CH₂), 26.8 (CH₂-NH₂), 22.3 (C(O)-CH₃).

MS (ESI): m/z 267.1 [M-HCl+H]⁺, 533.2 [M-HCl+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 267.1157 [M-HCl+H]⁺ (m/z 267.1167 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₁₃H₁₈N₂O₂S).

6.9.89 *S*-Bz-Cysteamin Hydrochlorid (**179**)

0.22 g (0.77 mmol, 1.00 eq) *S*-Bz-*N*-Boc-Cysteamin (**177**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 mit 0.55 mL (21.06 mmol, 27.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.16 g (0.73 mmol, 95 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: C₉H₁₂NOSCl

Molekulargewicht: 217.71 g/mol

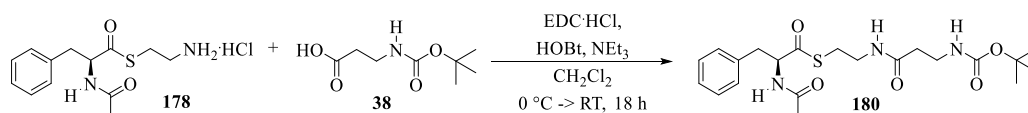
Exakte Masse: 217.0328 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 8.02-7.97 (m, 2H, Ar-H), 7.74-7.60 (m, 1H, Ar-H), 7.60-7.47 (m, 2H, Ar-H), 3.41-3.34 (m, 2H, CH₂-NH₂), 3.23 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 192.3 (C(O)), 137.7 (Ar-C), 135.3 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 40.7 (S-CH₂), 27.0 (CH₂-NH₂).

MS (ESI): m/z 182.1 [M-HCl+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 182.0641 [M-HCl+H]⁺ (m/z 182.0639 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₉H₁₂NOS).

6.9.90 *N*-Ac-L-Phenylalanyl-Cysteaminy-N-Boc- β -Alanin (**180**)

0.12 g (0.39 mmol, 1.05 eq) *N*-Ac-L-Phenylalanyl-Cysteamine Hydrochlorid (**178**) und 0.07 g (0.37 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 0.09 g (0.46 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl, 0.05 g (0.40 mmol, 1.07 eq) HOBt und 0.13 mL (0.93 mmol, 2.50 eq) Triethylamin in 9 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 1:1 \rightarrow 10:1, R_f = 0.18 in Ethylacetat:Pentan 10:1, Ninhydrin-Färbereagenz) wurden 96.0 mg (0.22 mmol, 59 %) eines weißen Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: C₂₁H₃₁N₃O₅S

Molekulargewicht: 437.56 g/mol

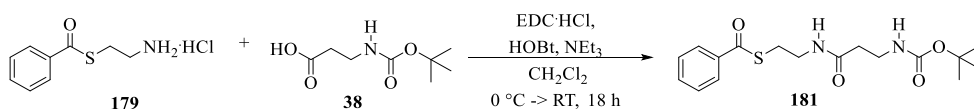
Exakte Masse: 437.1984 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.32-7.16 (m, 5H, Ar-H), 4.75 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 10.3 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 4.8 Hz, 1H, C α -H), 3.39-3.25 (m, 4H, 2 x CH₂-NH), 3.25 (dd, ² $J_{H,H}$ = 14.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 4.8 Hz, 1H, Ph-CH₂), 3.02 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.86 (dd, ² $J_{H,H}$ = 14.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 10.3 Hz, 1H, Ph-CH₂), 2.35 (t, ³ $J_{H15,H16}$ = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.92 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.44 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 201.4 (C(O)-S), 174.1 (C(O)), 173.5 (C(O)), 158.2 (C(O)-O-*tert*-Bu), 138.2 (Ar-C), 130.1 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 80.2 (C α -*tert*-Bu), 62.3 (C α), 39.9 (Ph-CH₂), 38.5 (CH₂-NH), 38.0 (CH₂-NH), 37.3 (S-CH₂), 29.1 (CH₂-CH₂-NH), 28.8 (*tert*-Bu-CH₃), 22.3 (C(O)-CH₃).

MS (ESI): m/z 438.2 [M+H]⁺, 460.2 [M+Na]⁺, 897.4 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 438.2056 [M+H]⁺ (m/z 438.2062 [M+H]⁺ ber. für C₂₁H₃₂N₃O₅S).

6.9.91 *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-Bz-Cysteamin (**181**)

0.93 g (4.29 mmol, 1.05 eq) *S*-Bz-Cysteamin Hydrochlorid (**179**) und 0.77 g (4.09 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 0.98 g (5.11 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl, 0.59 g (4.38 mmol, 1.07 eq) HOBt und 1.42 mL (10.23 mmol, 2.50 eq) Triethylamin in 120 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.21$, Ninhydrin-Färbereagenz) wurden 0.98 g (2.78 mmol, 68 %) eines weißen Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: $C_{17}H_{24}N_2O_4S$

Molekulargewicht: 352.45 g/mol

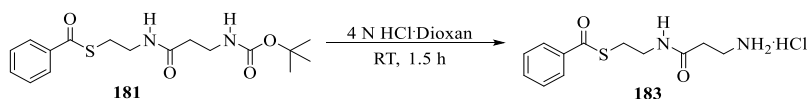
Exakte Masse: 352.1457 au

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 8.01-7.94 (m, 2H, Ar-H), 7.64-7.57 (m, 1H, Ar-H), 7.51-7.43 (m, 2H, Ar-H), 6.15 (bs, 1H, NH), 5.08 (bs, 1H, NH), 3.55 (q, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, 2H, CH_2 -NH), 3.40 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 2H, CH_2 -NH), 3.24 (t, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -NH), 2.40 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -NH), 1.42 (s, 9H, *tert*-Bu- CH_3).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 192.2 ($\underline{C}(O)$ -S), 171.9 ($\underline{C}(O)$), 156.3 ($\underline{C}(O)$ -O-*tert*-Bu), 136.8 (Ar- \underline{C}), 133.9 (Ar- \underline{C}), 128.9 (Ar- \underline{C}), 127.5 (Ar- \underline{C}), 79.6 (\underline{C}_q -*tert*-Bu), 39.8 (2 x \underline{CH}_2 -NH), 36.4 (\underline{CH}_2 - CH_2 -NH), 28.7 (S- \underline{CH}), 28.6 (*tert*-Bu- \underline{CH}_3).

MS (ESI): m/z 353.2 $[M+H]^+$, 375.1 $[M+Na]^+$, 705.3 $[2M+H]^+$, 727.3 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 353.1525 $[M+H]^+$ (m/z 353.1535 $[M+H]^+$ ber. für $C_{17}H_{25}N_2O_4S$).

6.9.92 β -Alanyl-*S*-Bz-Cysteamin Hydrochlorid (**183**)

0.13 g (0.37 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-Bz-Cysteamin (**181**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 mit 0.39 mL (11.10 mmol, 30.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.10 g (0.35 mmol, 94 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: C₁₂H₁₇N₂O₂SCl

Molekulargewicht: 288.79 g/mol

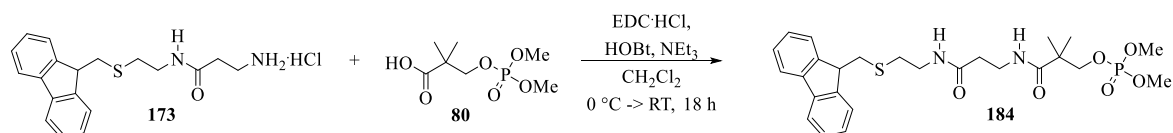
Exakte Masse: 288.0699 au

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.98-7.95 (m, 2H, Ar-H), 7.67-7.61 (m, 1H, Ar-H), 7.53-7.48 (m, 2H, Ar-H), 3.47 (t, ³*J*_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.24 (t, ³*J*_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 3.19 (t, ³*J*_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.59 (t, ³*J*_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 192.9 (C(O)-S), 173.4 (C(O)), 138.2 (Ar-C), 134.9 (Ar-C), 132.9 (Ar-C), 128.2 (Ar-C), 40.2 (CH₂-NH₂), 37.1 (CH₂-NH), 32.7 (CH₂-CH₂-NH₂), 29.2 (S-CH₂).

MS (ESI): *m/z* 253.1 [M-HCl+H]⁺.

HRMS (ESI): *m/z* 253.1000 [M-HCl+H]⁺ (*m/z* 253.1010 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₁₂H₁₆N₂O₂S).

6.9.93 Phosphopantethein-Derivat **184**

29.0 mg (0.13 mmol, 1.00 eq) der Carbonsäure **80**, 49.0 mg (0.14 mmol, 1.05 eq) β -Alanyl-S-Fm-Cysteamin Hydrochlorid (**172**), 19.0 mg (0.14 mmol, 1.07 eq) HOBt und 31.0 mg (0.16 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 6 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 45.00 μ L (0.32 mmol, 2.50 eq) Triethylamin gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol 4:1, R_f = 0.77, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 45.0 mg (84.17 μ mol, 65 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₂₆H₃₅N₂O₆PS

Molekulargewicht: 534.61 g/mol

Exakte Masse: 534.1953 au

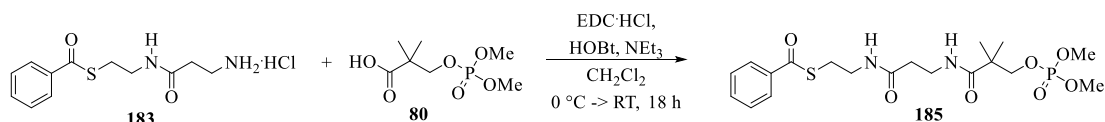
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.76 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (dd, $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.36 (td, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.29 (td, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1.2 Hz, 2H, Ar-H), 4.13 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.2 Hz, 1H, CH-CH₂-S), 4.00 (d, $^3J_{H,P}$ = 4.6 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.74 (d, $^3J_{H,P}$ = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.42 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.35 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.6 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.13 (d, $^3J_{H,H}$ = 6.2 Hz, 2H, CH-CH₂-S), 2.62 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.37 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.18 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 177.5 (C(O)), 173.8 (C(O)), 147.5 (Ar-C), 142.4 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 126.0 (Ar-C), 120.8 (Ar-C), 75.1 (d, CH₂-OP), 55.2 (d, PO-CH₃), 48.2 (CH-CH₂-S), 44.4 (d, C_q), 40.0 (CH-CH₂-S), 37.4 (CH₂), 37.0 (CH₂), 36.5 (CH₂), 33.2 (S-CH₂), 22.3 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.72-0.20 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 535.2 [M+H]⁺, 557.2 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 535.2023 [M+H]⁺ (m/z 535.2031 [M+H]⁺ ber. für C₂₆H₃₆N₂O₆PS).

6.9.94 Phosphopantethein-Derivat **185**

75.0 mg (0.33 mmol, 1.00 eq) Carbonsäure **80**, 100.0 mg (0.35 mmol, 1.05 eq) β -Alanyl-*S*-Bz-Cysteamine Hydrochlorid (**183**), 48.0 mg (0.35 mmol, 1.07 eq) HOBt und 79.0 mg (0.41 mmol, 1.25 eq) EDC·HCl wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 114.00 μ L (0.83 mmol, 2.50 eq) Triethylamin gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol 4:1, $R_f = 0.83$, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 118.0 mg (0.26 mmol, 78 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_7\text{PS}$

Molekulargewicht: 460.48 g/mol

Exakte Masse: 460.1433 au

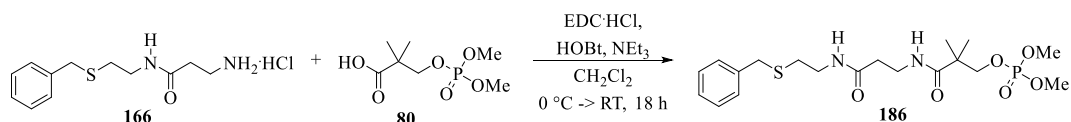
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 8.01-7.91 (m, 2H, Ar-H), 7.70-7.57 (m, 1H, Ar-H), 7.55-7.46 (m, 2H, Ar-H), 4.02 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 5.0$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.76 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.1$ Hz, 6H, PO-CH₃), 3.47-3.20 (m, 4H, 2 x CH₂-NH), 3.22 (t, $^3J_{\text{H,P}} = 6.5$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.40 (t, $^3J_{\text{H,P}} = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.20 (s, 6H, C_q-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 192.9 (C(O)-S), 177.5 (C(O)), 174.0 (C(O)), 138.3 (Ar-C), 134.8 (Ar-C), 129.9 (Ar-C), 128.2 (Ar-C), 75.1 (d, CH₂-OP), 55.2 (d, PO-CH₃), 44.4 (d, C_q), 40.1 (CH₂), 37.3 (CH₂), 36.4 (CH₂), 29.3 (S-CH₂), 22.3 (C_q-CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CD_3OD , RT) δ 0.77-0.21 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 461.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 483.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 921.3 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 461.1499 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 461.1511 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{PS}$).

6.9.95 Phosphopantethein-Derivat **186**

0.27 g (1.21 mmol, 1.00 eq) der Carbonsäure **80**, 0.36 g (1.29 mmol, 1.07 eq) β -Alanyl-S-Benzylcysteamine Hydrochlorid (**166**), 0.18 g (1.32 mmol, 1.09 eq) HOBt und 0.30 g (1.54 mmol, 1.27 eq) EDC·HCl wurden in 60 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 0.43 mL (3.08 mmol, 2.55 eq) Triethylamin gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat:Methanol 3:1, R_f = 0.68, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 0.29 g (0.65 mmol, 54 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₁₉H₃₁N₂O₆PS

Molekulargewicht: 446.50 g/mol

Exakte Masse: 446.1640 au

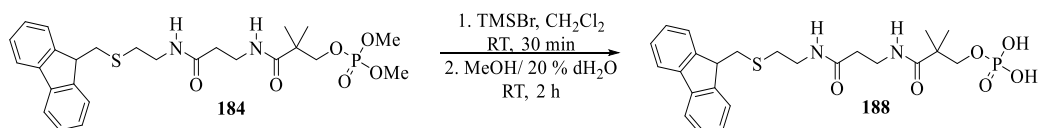
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.31-7.30 (m, 5H, Ar-H), 6.73 (bs, 2H, 2 x NH), 3.98 (d, ³J_{H,P} = 5.0 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.77-3.73 (m, 8H, Ph-CH₂, PO-CH₃), 3.55-3.48 (m, 2H, CH₂-NH), 3.40 (q, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.36 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.18 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 175.0 (C(O)), 172.1 (C(O)), 138.0 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 74.2 (d, CH₂-OP), 54.5 (d, PO-CH₃), 43.3 (C_q), 38.0 (CH₂-NH), 36.1 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.7 (CH₂), 30.9 (S-CH₂), 22.0 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃, RT) δ 0.69-0.27 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 447.2 [M+H]⁺, 469.2 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 447.1701 [M+H]⁺ (m/z 447.1718 [M+H]⁺ ber. für C₁₉H₃₂N₂O₆PS).

6.9.96 Phosphopantethein-Derivat **188**

45.0 mg (84.17 μmol , 1.00 eq) des Substrats **184** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 330.00 μL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 33.00 μL (252.00 μmol , 3.00 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) aufgereinigt. Nach Lyophilisation der Produktfraktionen, konnten als Produkt 7.5 mg (14.81 μmol , 18 %) eines weißen Feststoffs erhalten werden.

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$

Molekulargewicht: 506.55 g/mol

Exakte Masse: 506.1640 au

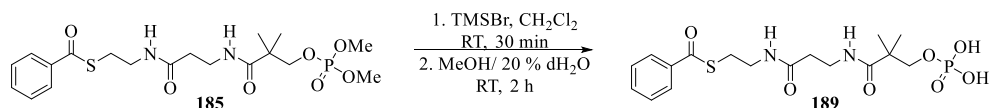
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.77 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$ Hz, 2H, Ar-H), 7.36 (td, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.29 (td, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, 2H, Ar-H), 4.13 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1H, CH-CH₂-S), 3.90 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 4.6$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.42 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.34 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-S), 3.14 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 2H, CH-CH₂-S), 2.63 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.37 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.17 (s, 6H, C_q-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 178.2 (C(O)), 174.0 (C(O)), 147.5 (Ar-C), 142.4 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 126.0 (Ar-C), 120.7 (Ar-C), 73.5 (d, CH₂-OP), 48.3 (CH-CH₂-S), 44.3 (d, C_q), 40.0 (CH-CH₂-S), 37.4 (CH₂), 37.0 (CH₂), 36.7 (CH₂), 33.1 (S-CH₂), 22.5 (C_q-CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD , RT) δ -0.23 (s, 1P).

MS (ESI): m/z 505.2 [M-H]⁻, 1011.3 [2M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 505.1553 [M-H]⁻ (m/z 505.1562 [M-H]⁻ ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$).

6.9.97 Phosphopantethein-Derivat **189**

118.0 mg (0.26 mmol, 1.00 eq) des Substrats **185** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 103.00 μ L (0.78 mmol, 3.00 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) aufgereinigt. Nach Lyophilisation der Produktfraktionen, konnten als Produkt 19.0 mg (0.04 mmol, 17 %) eines weißen Feststoffs erhalten werden.

Summenformel: C₁₇H₂₅N₂O₇PS

Molekulargewicht: 432.43 g/mol

Exakte Masse: 432.1120 au

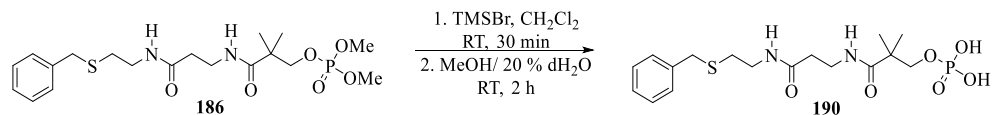
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.96 (d, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.63 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.50 (t, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 7.8 Hz, 2H, Ar-H), 3.93 (d, ³J_{H,P} = 4.7 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.44 (m, 4H, 2 x CH₂-NH), 3.22 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.40 (t, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, CH₂-CH₂-NH), 1.19 (s, 6H, C_q-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 192.9 (C(O)-S), 178.1 (C(O)), 174.2 (C(O)), 138.4 (Ar-C), 134.8 (Ar-C), 129.9 (Ar-C), 128.2 (Ar-C), 73.7 (d, CH₂-OP), 44.3 (d, C_q), 40.1 (CH₂), 37.3 (CH₂), 36.5 (CH₂), 29.3 (S-CH₂), 22.5 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD, RT) δ -0.34 (s, 1P).

MS (ESI): m/z 431.1 [M-H]⁻, 863.2 [2M-H]⁻.

HRMS (ESI): m/z 431.1037 [M-H]⁻ (m/z 431.1042 [M-H]⁻ ber. für C₁₇H₂₄N₂O₇PS).

6.9.98 Phosphopantethein-Derivat **190**

0.29 g (0.65 mmol, 1.00 eq) des Substrats **186** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 3 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.30 mL (2.27 mmol, 3.40 eq) Bromotrimethylsilan gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV ohne TFA-Zusatz) aufgereinigt. Nach Lyophilisation der Produktfraktionen, konnten als Produkt 0.12 g (0.29 mmol, 45 %) einer farblosen, viskosen Flüssigkeit erhalten werden.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$

Molekulargewicht: 418.44 g/mol

Exakte Masse: 418.1327 au

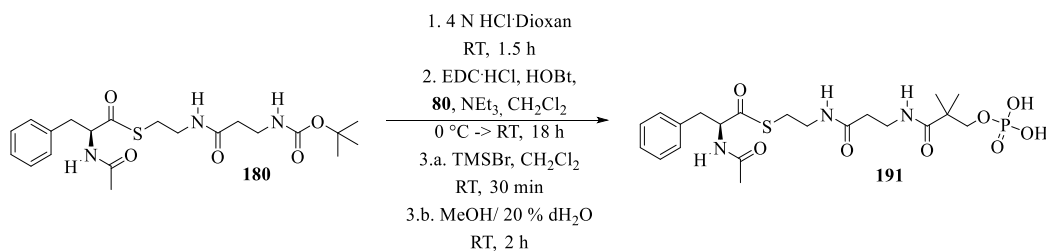
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.37-7.18 (m, 5H, Ar-H), 3.93 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 4.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.75 (s, 2H, Ph- CH_2), 3.43 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.34 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.53 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.18 (s, 6H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 178.1 ($\text{C}(\text{O})$), 174.0 ($\text{C}(\text{O})$), 139.9 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 73.7 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 44.3 (d, $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 39.7 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 37.4 (CH_2), 36.6 (CH_2), 36.5 (CH_2), 31.4 (S- CH_2), 22.4 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CD_3OD , RT) δ -0.30-0.57 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 417.1 $[\text{M-H}]^-$, 835.3 $[2\text{M-H}]^-$.

HRMS (ESI): m/z 417.1244 $[\text{M-H}]^-$ (m/z 417.1249 $[\text{M-H}]^-$ ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$).

6.9.99 Phosphopantethein-Derivat **191**

96.0 mg (0.22 mmol, 1.00 eq) des Substrats **180** wurden zuerst mit 1 mL (28.80 mmol, 130.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 zur Reaktion gebracht. Es wurden 82.0 mg (0.22 mmol, 100 %) des Produkts **182** in Form eines weißen Feststoffs erhalten, der mit 47.0 mg (0.21 mmol, 0.95 eq) der Säure **80**, 50.0 mg (0.26 mmol, 1.18 eq) EDC·HCl, 30.0 mg (0.22 mmol, 1.00 eq) HOBT und 73.00 µL mL (0.53 mmol, 2.41 eq) Triethylamin in 7 mL Dichlormethan nach der allgemeinen Vorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht wurde. Nach Reinigung des Rohprodukts erst an Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 4:1, $R_f = 0.89$, Ninhydrin-Färbereagenz), dann via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV) wurden 16.0 mg (29.35 µmol, 13 %) des Produkts **187** als weißer Feststoff erhalten. Dieser wurde mit 20.00 µL (0.15 mmol, 0.68 eq) Bromotrimethylsilan in 300.00 µL trockenem Dichlormethan unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.7 zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-III ohne TFA-Zusatz) gereinigt um 8.0 mg (15.46 µmol, 53 %) eines weißen Feststoffs als Produkt zu erhalten.

Summenformel: C₂₁H₃₂N₃O₈PS

Molekulargewicht: 517.53 g/mol

Exakte Masse: 517.1648 au

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.29-7.19 (m, 5H, Ar-H), 4.73 (dd, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, C_α-H), 3.92 (d, ³J_{H,P} = 4.6 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.44 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.35-3.30 (m, 2H, CH₂-NH), 3.23 (dd, ²J_{H,H} = 14.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, Ph-CH₂), 3.02 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.85 (dd, ²J_{H,H} = 14.1 Hz, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, 1H, Ph-CH₂), 2.39 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.91 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.20 (s, 6H, C_q-CH₃).

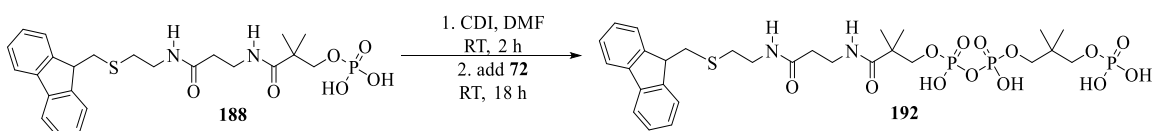
¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 201.4 (C(O)-S), 178.2 (C(O)), 174.2 (C(O)), 173.5 (C(O)), 138.2 (Ar-C), 130.1 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 73.6 (d, CH₂-OP), 62.3 (C_α), 44.3 (d, C_q-CH₃), 39.9 (CH₂), 38.5 (CH₂), 37.3 (CH₂), 36.5 (CH₂), 29.1 (S-CH₂), 22.5 (CH₃), 22.3 (CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD , RT) δ -0.23-(-0.39) (m, 1P).

MS (ESI): m/z 516.2 $[\text{M-H}]^-$.

HRMS (ESI): m/z 516.1562 $[\text{M-H}]^-$ (m/z 516.1570 $[\text{M-H}]^-$ ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{PS}$).

6.9.100 CoA-Derivat **192**



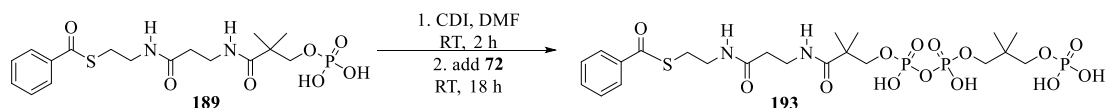
4.0 mg (7.90 μmol , 1.00 eq) Phosphopantethein-Derivats **188** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.60 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 2.6 mg (16.02 μmol , 2.03 eq) CDI und im Anschluss mit 5.3 mg (20.07 μmol , 2.54 eq) des Diphosphats **72** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 0.9 mg (1.20 μmol , 15 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 752.65 g/mol

Exakte Masse: 752.1699 au

MS (ESI): m/z 750.8 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.101 CoA-Derivat **193**

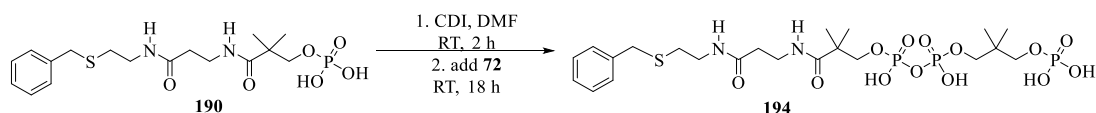
9.7 mg (22.43 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **189** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 7.4 mg (45.61 μmol , 2.03 eq) CDI und im Anschluss mit 15.0 mg (56.79 μmol , 2.53 eq) des Diphosphats **72** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 4.2 mg (6.19 μmol , 28 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 678.52 g/mol

Exakte Masse: 678.1178 au

MS (ESI): m/z 677.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.102 CoA-Derivat **194**

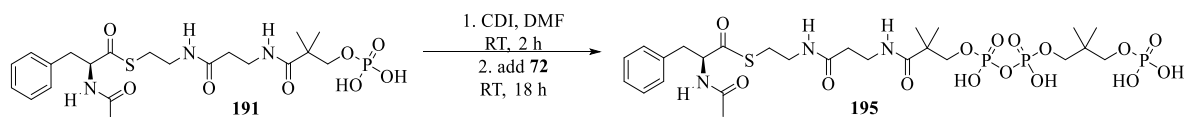
13.5 mg (32.26 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **190** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 10.5 mg (64.71 μmol , 2.01 eq) CDI und im Anschluss mit 21.3 mg (80.65 μmol , 2.50 eq) des Diphosphats **72** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 5.3 mg (7.98 μmol , 25 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 664.54 g/mol

Exakte Masse: 664.1386 au

MS (ESI): m/z 662.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.103 CoA-Derivat **195**

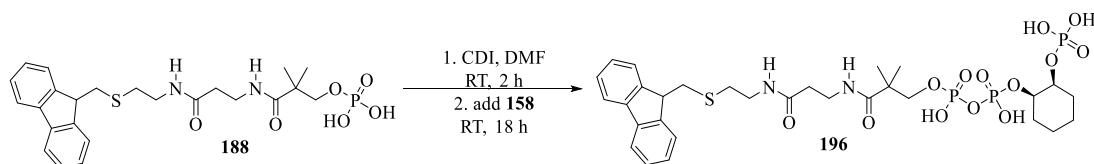
10.0 mg (19.32 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **191** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 6.3 mg (38.83 μmol , 2.01 eq) CDI und im Anschluss mit 12.8 mg (48.46 μmol , 2.51 eq) des Diphosphats **72** unter Argon-Schutzgasatmosphäre gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 0.6 mg (0.79 μmol , 4 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 763.63 g/mol

Exakte Masse: 763.1706 au

MS (ESI): m/z 761.9 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.104 CoA-Derivat **196**

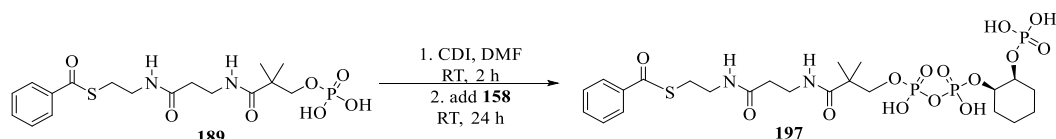
4.0 mg (7.90 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **188** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.60 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 2.6 mg (16.02 μmol , 2.03 eq) CDI und im Anschluss mit 136 μL (19.72 μmol , 2.50 eq) einer 0.145 μM -Lösung des Diphosphats **158** in trockenem Dimethylformamid gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 0.8 mg (1.05 μmol , 13 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 764.66 g/mol

Exakte Masse: 764.1699 au

MS (ESI): m/z 762.9 $[\text{M-H}]^-$.

6.9.105 CoA-Derivat **197**

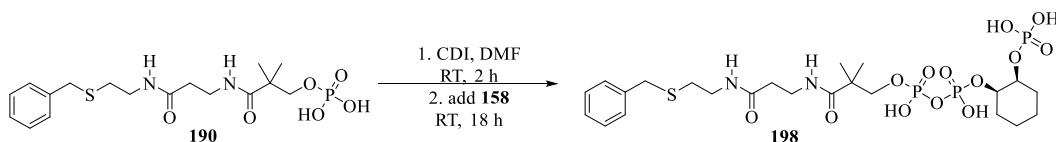
10.0 mg (23.13 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **189** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 7.8 mg (48.07 μmol , 2.08 eq) CDI und im Anschluss mit 139.00 μL (57.69 μmol , 2.49 eq) einer 0.415 μM Lösung des Diphosphats **158** in trockenem Dimethylformamid gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 5.7 mg (8.25 μmol , 36 %) eines beigeen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 690.53 g/mol

Exakte Masse: 690.1178 au

MS (ESI): m/z 689.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.106 CoA-Derivat **198**

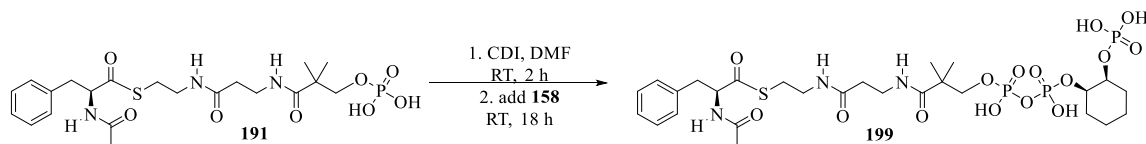
13.5 mg (32.26 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **190** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.80 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 10.5 mg (64.71 μmol , 2.01 eq) CDI und im Anschluss mit 195.00 μL (80.93 μmol , 2.51 eq) einer 0.415 μM Lösung des Diphosphats **158** in trockenem Dimethylformamid gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 7.9 mg (11.68 μmol , 36 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 676.55 g/mol

Exakte Masse: 676.1386 au

MS (ESI): m/z 674.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.107 CoA-Derivat **199**

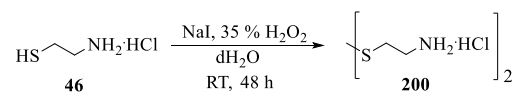
8.0 mg (15.46 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **191** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.50 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 4.9 mg (30.20 μmol , 1.95 eq) CDI und im Anschluss mit 10.5 mg (38.02 μmol , 2.46 eq) des Diphosphats **158** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 1.7 mg (2.19 μmol , 14 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 775.64 g/mol

Exakte Masse: 775.17 au

MS (ESI): m/z 774.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.108 Cystamin Dihydrochlorid^[182] (**200**)

1.00 g (8.80 mmol, 1.00 eq) Cystamin (**46**) wurden mit 0.01 g (0.088 mmol, 0.01 eq) Natriumiodid in 18 mL destilliertem Wasser gelöst und anschließend 0.27 mL (8.80 mmol, 1.00 eq) einer 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur zwei Tage gerührt und dann das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 0.93 g (4.13 mmol, 47 %) des Produkts erhalten.

Summenformel: C₄H₁₄N₂S₂Cl₂

Molekulargewicht: 225.20 g/mol

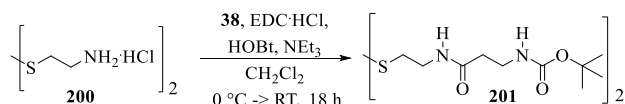
Exakte Masse: 223.9975 au

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 3.33 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 4H, CH₂-NH₂), 3.03 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 4H, S-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz CD₃OD, RT) δ 39.3 (S-CH₂), 34.9 (CH₂-NH₂).

MS (ESI): m/z 153.1 [M-2HCl+H]⁺, 175.1 [M-2HCl+Na]⁺, 225.2 [M+H]⁺, 305.1 [2M-4HCl+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[86,183]

6.9.109 Disulfid **201**

0.93 g (4.15 mmol, 1.00 eq) Cystamin Dihydrochlorid (**200**) wurden mit 3.00 g (15.86 mmol, 3.80 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**), 1.64 g (12.20 mmol, 2.90 eq) HOBT, 2.92 g (15.25 mmol, 3.60 eq) EDC·HCl und 3.38 mL (24.40 mmol, 5.90 eq) Triethylamin in 120 mL Dichlormethan gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 1:10, $R_f = 0.20$, Ninhydrin-Färbereagenz) wurden als Produkt 0.93 g (1.88 mmol, 45 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$

Molekulargewicht: 494.67 g/mol

Exakte Masse: 494.2233 au

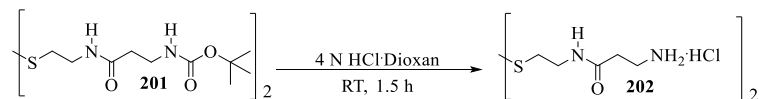
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ 6.57 (bs, 2H, NH), 5.13 (s, 2H, NH), 3.51 (q, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.35 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.76 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.37 (s, 18H, *tert*-Bu- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 172.1 ($\text{C}(\text{O})$), 156.4 ($\text{C}(\text{O})\text{-O-tert-Bu}$), 77.4 ($\text{C}_q\text{-tert-Bu}$), 38.6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 38.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 36.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 36.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 28.6 (C-10).

MS (ESI): m/z 517.3 [M+Na].

HRMS (ESI): m/z 517.2116 [M+Na] $^+$ (m/z 517.2125 [M+Na] $^+$ ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6\text{NS}_2\text{Na}$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[86]

6.9.110 Disulfid Dihydrochlorid **202**

1.16 g (2.34 mmol, 1.00 eq) Disulfids **201** wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift 6.8.4 mit 6.50 mL (187.19 mmol, 80.00 eq) einer 4 N Salzsäure-Dioxan-Lösung zur Reaktion gebracht. Es wurden 0.80 g (2.18 mmol, 93 %) eines weiß-gelben Feststoffs als Produkt erhalten.

Summenformel: C₁₀H₂₄N₄O₂S₂Cl₂

Molekulargewicht: 367.36 g/mol

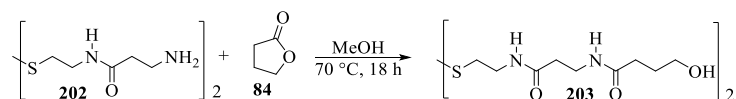
Exakte Masse: 366.0718 au

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, RT) δ 3.57 (t, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 4H, CH₂-NH), 3.29 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 4H, CH₂-NH₂), 2.89 (t, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 4H, CH₂-CH₂-NH), 2.71 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 4H, CH₂-CH₂-NH).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, RT) δ 174.1 (C(O)), 39.9 (CH₂-NH), 38.3 (CH₂), 37.6 (CH₂), 33.8 (S-CH₂).

MS (ESI): m/z 295.1 [M-2HCl+H]⁺, 317.1 [M-2HCl+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 317.1063 [M-2HCl+Na]⁺ (m/z 317.1076 [M-2HCl+Na]⁺ ber. für C₁₀H₂₂N₄O₂S₂Na).

6.9.111 Tripeptid **203**

0.40 mL (5.25 mmol, 2.00 eq) des γ -Butyrolactons (**84**) wurden mit 0.77 g (2.62 mmol, 1.00 eq) des Disulfids **202** in 6 mL Methanol unter Rückfluss 18 Stunden erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt war, entstand ein weißer Niederschlag, der nicht in Methanol löslich war. Der weiße Feststoff wurde durch Filtration isoliert und somit 0.41 g (0.88 mmol, 34 %) als Produkt erhalten.

Summenformel: C₁₈H₃₄N₄O₆S₂

Molekulargewicht: 466.61 g/mol

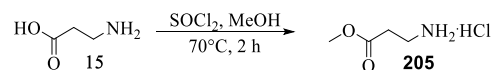
Exakte Masse: 466.1920 au

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO, RT) δ 8.08 (t, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 2H, NH), 7.81 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, NH), 4.45 (t, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 2H, OH), 3.34-3.27 (m, 8H, 2 x CH₂-NH), 3.21 (td, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 4H, CH₂-OH), 2.76 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 4H, CH₂-CH₂-NH), 2.22 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 4H, CH₂-CH₂-NH), 2.07 (t, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 4H, CH₂-CH₂-CH₂), 1.66-1.54 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂SO, RT) δ 172.2 (C(O)), 170.6 (C(O)), 60.4 (CH₂-OH), 38.0 (CH₂-NH), 37.2 (CH₂), 35.5 (CH₂), 35.3 (CH₂), 32.1 (CH₂-CH₂-CH₂), 28.6 (CH₂-CH₂-CH₂).

MS (ESI): m/z 467.2 [M+H]⁺, 489.2 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 467.1991 [M+H]⁺ (m/z 467.1998 [M+H]⁺ ber. für C₁₈H₃₅N₄O₆S₂).

6.9.112 β -Alaninmethylester Hydrochlorid (**205**)

5 g (56.12 mmol, 1.00 eq) β -Alanin (**15**) wurden in 45 mL trockenem Methanol vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur und unter Argon-Schutzgasatmosphäre wurden 4.50 mL (61.74 mmol, 1.10 eq) frisch destilliertes Thionylchlorid zugetropft und einige Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Trocknen unter Vakuum blieben 7.12 g (51.01 mmol, 91 %) eines weißen Feststoffs als Produkt zurück.

Summenformel: C₄H₁₀NO₂Cl

Molekulargewicht: 139.58 g/mol

Exakte Masse: 139.04 au

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT) δ 3.76 (s, 3H, CH₃-O-C(O)), 3.23 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.77 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂).

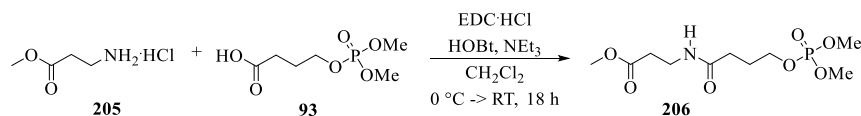
¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 172.5 (C(O)), 52.7 (CCH₃-O-C(O)), 36.5 (CCH₂-NH₂), 32.1 (CCH₂-CH₂-NH₂).

MS (ESI): m/z 104.1 [M-HCl+H]⁺, 126.1 [M-HCl+Na]⁺, 207.2 [2M-2HCl+H]⁺, 229.1 [2M-2HCl+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 104.0719 [M-HCl+H]⁺ (m/z 104.0706 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₄H₁₀NO₂).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[86,184]

6.9.113 3-(4-((dimethoxyphosphoryl)oxy)butanamido)propansäuremethylester (**206**)



0.14 g (1.00 mmol, 1.06 eq) β -Alaninmethylester Hydrochlorid (**205**) wurden zusammen mit 0.20 g (0.94 mmol, 1.00 eq) der Carbonsäure **93**, 0.23 g (1.20 mmol, 1.28 eq) EDC·HCl und 0.14 g (1.04 mmol, 1.11 eq) HOBT in 45 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 0.34 mL (2.45 mmol, 2.61 eq) Triethylamin gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol 4:1, $R_f = 0.90$, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 0.12 g (0.40 mmol, 43 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $C_{10}H_{20}NO_7P$

Molekulargewicht: 297.24 g/mol

Exakte Masse: 297.0977 au

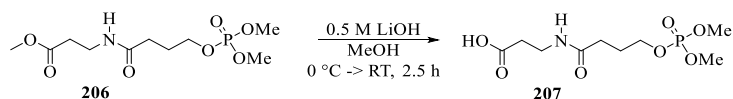
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 6.37 (bs, 1H, NH), 4.08 (dt, $^3J_{H,H} = 7.7$ Hz, $^3J_{H,P} = 5.8$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -OP), 3.76 (d, $^3J_{H,P} = 11.1$ Hz, 6H, PO- \underline{CH}_3), 3.70 (s, 3H, \underline{CH}_3 -O-C(O)), 3.52 (q, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -NH), 2.54 (t, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -CH $_2$ -NH), 2.29 (t, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, 2H, \underline{CH}_2 -CH $_2$ -CH $_2$), 2.02 (p, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, CH $_2$ - \underline{CH}_2 -CH $_2$).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 173.2 (\underline{C} (O)), 172.0 (\underline{C} (O)), 67.0 (d, \underline{CH}_2 -OP), 54.51 (d, PO- \underline{CH}_3), 52.0 (\underline{CH}_3 -O-C(O)), 35.1 (\underline{CH}_2 -NH), 33.9 (\underline{CH}_2), 32.2 (\underline{CH}_2), 26.4 (d, CH $_2$ - \underline{CH}_2 -CH $_2$).

^{31}P -NMR (122 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 1.46 (hept, $^3J_{P,H} = 10.0$ Hz, 1P).

MS (ESI): m/z 298.1 $[M+H]^+$, 320.1 $[M+Na]^+$, 338.3 $[M+H_2O+Na]^+$, 617.2 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 298.1046 $[M+H]^+$ (m/z 298.1055 $[M+H]^+$ ber. für $C_{10}H_{21}NO_7P$).

6.9.114 3-(4-((Dimethoxyphosphoryl)oxy)butanamido)propansäure (**207**)

0.75 g (2.52 mmol, 1.00 eq) des Substrats **206** wurden in 17 mL Methanol gelöst und bei 0 °C langsam mit 15 mL einer 0.5 M Lithiumhydroxid-Lösung versetzt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur 2.5 Stunden gerührt. Dann wurde mit wenig verdünnter Salzsäure angesäuert und die saure Reaktionslösung je zwei Mal mit Dichlormethan und Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Als Produkt wurden 0.60 g (2.12 mmol, 84 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₉H₁₈NO₇P

Molekulargewicht: 283.22 g/mol

Exakte Masse: 283.0821 au

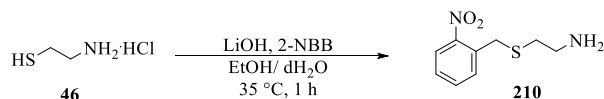
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 6.83 (bs, 1H, NH), 4.09 (dt, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,P} = 5.9 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.78 (d, ³J_{H,P} = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.53 (q, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.58 (t, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.34 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.01 (p, ³J_{H,H} = ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 176.3 (C(O)), 175.9 (C(O)), 67.3 (d, CH₂-OP), 54.7 (d, PO-CH₃), 35.2 (CH₂), 34.0 (CH₂), 32.2 (CH₂-CH₂-CH₂), 26.3 (d, CH₂-CH₂-CH₂).

³¹P-NMR (121 MHz, CDCl₃, RT) δ 1.26-0.68 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 284.1 [M+H]⁺, 306.2 [M+Na]⁺, 567.2 [2M+H]⁺, 589.2 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 284.0893 [M+H]⁺ (m/z 284.0899 [M+H]⁺ ber. für C₉H₁₉NO₇P).

6.9.115 *S*-(2-Nitrobenzyl)cysteamin^[185] (**210**)

63.0 mg (2.63 mmol, 1.99 eq) Lithiumhydroxid wurden in 1.30 mL destilliertem Wasser gelöst und 4 mL absoluten Ethanols zugefügt. Zu dieser Lösung wurden zunächst 150.0 mg (1.32 mmol, 1.00 eq) Cysteamin Hydrochlorid (**46**) zugegeben und anschließend langsam 285.0 mg (1.32 mmol, 1.00 eq) 2-Nitrobenzylbromid (2-NBB) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei 35 °C gerührt. Dann wurde Ethanol unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbe flüssige Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Cyclohexan 1:1 → Dichlormethan:Methanol 4:1, $R_f = 0.33$ in Dichlormethan:Methanol 4:1, Ninhydrin-Färbereagenz). Als Produkt wurden 150.0 mg (0.71 mmol, 54 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₉H₁₂N₂O₂S

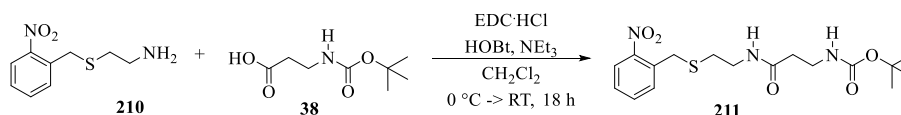
Molekulargewicht: 212.28 g/mol

Exakte Masse: 212.0619 au

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.96 (dd, ³ $J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, ⁴ $J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 1H, Ar-H), 7.56 (td, ³ $J_{\text{H,H}} = 3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, ⁴ $J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 1H, Ar-H), 7.48 (dd, ³ $J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, ⁴ $J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 1H, Ar-H) 7.42 (td, ³ $J_{\text{H,H}} = 3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, ⁴ $J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 1H, Ar-H), 4.07 (s, 2H, CH₂-S), 2.85 (t, ³ $J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.57 (t, ³ $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 2H, S-CH₂), 1.75 (bs, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 134.3 (Ar-C), 133.2 (Ar-C), 132.1 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 125.4 (Ar-C), 41.0 (CH₂-NH₂), 36.2 (S-CH₂), 33.3 (CH₂-S). 1 x Ar-C fehlt

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[185]

6.9.116 *N*-Boc- β -Alanyl-*S*-(2-Nitrobenzyl)cysteamin (**211**)

150.0 mg (0.71 mmol, 1.11 eq) *S*-(2-Nitrobenzyl)cysteamin (**210**) und 122.0 mg (0.64 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.1 mit 156.0 mg (0.81 mmol, 1.27 eq) EDC·HCl, 87.0 mg (0.64 mmol, 1.00 eq) HOBT und 0.18 mL (1.30 mmol, 2.03 eq) Triethylamin in 6 mL Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 10:1, R_f = 0.37, Ninhydrin-Färbereagenz) wurden 180 mg (0.47 mmol, 73 %) einer gelben Flüssigkeit als Produkt isoliert.

Summenformel: C₁₇H₂₅N₃O₅S

Molekulargewicht: 383.46 g/mol

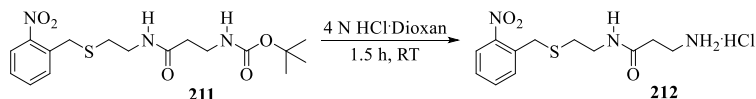
Exakte Masse: 383.1515 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.95 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 8.1 Hz, ⁴ $J_{H,H}$ = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.55 (td, ³ $J_{H,H}$ = ³ $J_{H,H}$ = 7.5 Hz, ⁴ $J_{H,H}$ = 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.47-7.37 (m, 2H, H-1, Ar-H), 6.25 (bs, 1H, NH), 5.18 (bs, 1H, NH), 4.06 (s, 2H, CH₂-S), 3.43-3.33 (m, 4H, 2 x CH₂-NH), 2.58 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.37 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.1 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.40 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 171.6 (C(O)), 156.3 (C(O)-O-*tert*-Bu), 148.8 (Ar-C), 133.8 (Ar-C), 133.3 (Ar-C), 132.1 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 125.5 (Ar-C), 79.4 (C_q-*tert*-Bu), 38.3 (CH₂-NH), 36.7 (CH₂), 36.3 (CH₂), 33.2 (CH₂), 31.8 (CH₂), 28.5 (*tert*-Bu-CH₃).

MS (ESI): m/z 384.2 [M+H]⁺, 406.1 [M+Na]⁺, 767.3 [2M+H]⁺, 789.3 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 384.1582 [M+H]⁺ (m/z 384.1593 [M+H]⁺ ber. für C₁₇H₂₅N₃O₅S).

6.9.117 β -Alanyl-S-(2-Nitrobenzyl)cysteamin (**212**)

0.18 g (0.47 mmol, 1.00 eq) des Substrats **211** wurden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 mit 0.50 mL (14.40 mmol, 30.64 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.15 g (0.47 mmol, 100 %) eines leicht gelben Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₈N₃O₃SCl

Molekulargewicht: 319.80 g/mol

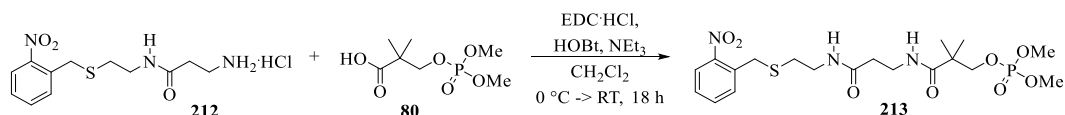
Exakte Masse: 319.0757 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 7.97 (dd, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.67-7.45 (m, 3H, Ar-H), 4.11 (s, 2H, CH₂-S), 3.34 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.18 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 2.63-2.54 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 172.2 (C(O)), 150.2 (Ar-C), 135.3 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 133.3 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 126.3 (Ar-C), 39.7 (CH₂-NH), 37.2 (CH₂-NH₂), 33.8 (CH₂), 32.7 (CH₂), 32.1 (CH₂).

MS (ESI): m/z 284.1 [M-HCl+H]⁺, 306.1 [M-HCl+Na]⁺, 567.2 [2M-2HCl+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z 284.1058 [M+H]⁺ (m/z 284.1069 [M-HCl+H]⁺ ber. für C₁₂H₁₈N₃O₃S).

6.9.118 Phosphopantethein-Derivat **213**

105.0 mg (0.46 mmol, 1.00 eq) der Säure **80**, 156.0 mg (0.49 mmol, 1.07 eq) β -Alanyl-S-(2-Nitrobenzyl)cysteamin (**212**), 67.0 g (0.50 mmol, 1.09 eq) HOBt und 111.0 mg (0.58 mmol, 1.26 eq) EDC·HCl wurden in 6 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 0.16 mL (1.16 mmol, 2.50 eq) Triethylamin gemäß der allgemeinen Reaktionsvorschrift 6.8.1 zur Reaktion gebracht. Der Rückstand wurde an Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.53$, Seebach-Färbereagenz). Als Produkt wurden 82.0 mg (0.17 mmol, 37 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $C_{19}H_{30}N_3O_8PS$

Molekulargewicht: 491.50 g/mol

Exakte Masse: 491.1490 au

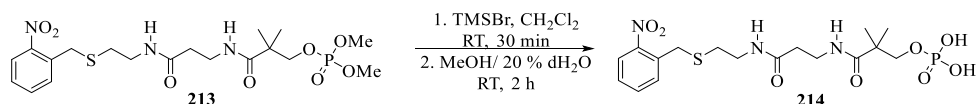
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 7.91 (dd, $^3J_{H,H} = 8.1$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.50 (td, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (dd, $^3J_{H,H} = 7.7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.41-7.32 (m, 1H, Ar-H), 7.16 (bs, 1H, NH), 6.80 (bs, 1H, NH), 4.03 (s, 2H, CH₂-S), 3.94 (d, $^3J_{H,P} = 5.3$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.71 (d, $^3J_{H,P} = 11.2$ Hz, 6H, PO-CH₃), 3.49 (q, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.36 (q, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 2H, CH₂-NH), 2.56 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.39 (t, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.14 (s, 6H, C_q-CH₃).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 175.8 (C(O)), 173.1 (C(O)), 148.8 (Ar-C), 133.8 (Ar-C), 133.3 (Ar-C), 132.2 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 125.6 (Ar-C), 74.4 (d, CH₂-OP), 54.8 (d, PO-CH₃), 43.4 (d, C_q-CH₃), 38.7 (CH₂-NH), 36.3 (CH₂), 35.9 (CH₂), 33.3 (CH₂), 31.5 (CH₂), 22.0 (C_q-CH₃).

^{31}P -NMR (122 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 0.17-(-0.23) (m, 1P).

MS (ESI): m/z 492.2 $[M+H]^+$, 514.1 $[M+Na]^+$, 983.3 $[2M+H]^+$.

HRMS (ESI): m/z 492.1555 $[M+H]^+$ (m/z 492.1568 $[M+H]^+$ ber. für $C_{19}H_{31}N_3O_8PS$).

6.9.119 Phosphopantethein-Derivat **214**

120.0 mg (0.24 mmol, 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **213** wurden in 1.10 mL trockenem Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 mit 97.00 μL (0.73 mmol, 3.04 eq) Bromotrimethylsilan zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV ohne TFA-Zusatz) und Lyophilisation der Produktfraktionen wurden 46.0 mg (0.10 mmol, 42 %) eines leicht gelben Feststoffs als Produkt isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_8\text{PS}$

Molekulargewicht: 463.44 g/mol

Exakte Masse: 463.1178 au

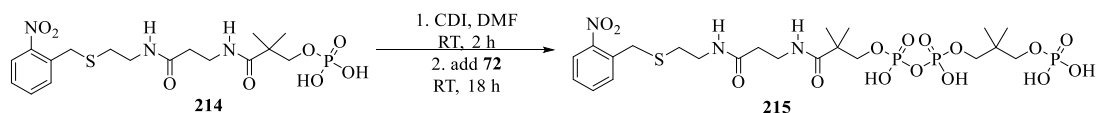
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.97 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 1H, Ar-H), 7.62 (td, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 1H, Ar-H), 7.56 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, $^4J_{\text{H}_1, \text{H}_3} = 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.51-7.45 (m, 1H, Ar-H), 4.10 (s, 2H, CH₂-S), 3.91 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 4.7$ Hz, 2H, CH₂-OP), 3.43 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-NH), 3.35-3.28 (m, 2H, CH₂-NH), 2.54 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.18 (s, 6H, C_q-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 178.2 (C(O)), 174.0 (C(O)), 150.1 (Ar-C), 135.4 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 133.3 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 126.4 (Ar-C), 73.4 (d, CH₂-OP), 44.2 (d, C_q-CH₃), 39.8 (CH₂-NH), 37.3 (CH₂), 36.6 (CH₂), 33.8 (CH₂), 31.9 (CH₂), 22.5 (C_q-CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD , RT) δ -0.01-(-0.60) (m, 1P).

MS (ESI): m/z 462.1 $[\text{M-H}]^-$, 925.2 $[2\text{M-H}]^-$.

HRMS (ESI): m/z 462.1102 $[\text{M-H}]^-$ (m/z 462.1100 $[\text{M-H}]^-$ ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8\text{PS}$).

6.9.120 CoA-Derivat **215**

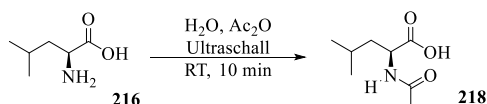
15.0 mg (32.37 μmol , 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **214** wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 11.0 mg (67.80 μmol , 2.09 eq) CDI und im Anschluss mit 21.0 mg (79.51 μmol , 2.46 eq) des Diphosphats **72** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 8.0 mg (11.28 μmol , 35 %) einer farblosen Substanz erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 709.53 g/mol

Exakte Masse: 709.1236 au

MS (ESI): m/z 708.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.9.121 *N*-Ac-L-Leucin^[186] (**218**)

0.53 g (4.04 mmol, 1.00 eq) L-Leucin (**216**) wurden in 10 mL destilliertem Wasser vorgelegt und unter Rühren ins Ultraschallbad getaucht. Es wurden in Abständen von zwei Minuten drei Portionen von jeweils 0.75 mL (7.93 mmol, 1.96 eq) Essigsäureanhydrid versetzt und im Anschluss noch weitere fünf Minuten im Ultraschallbad gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. In Methanol unlösliche Bestandteile wurden abfiltriert und das Lösungsmittel aus dem Filtrat entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde am Vakuum getrocknet. Als Produkt konnten 0.68 g (3.93 mmol, 97 %) erhalten werden.

Summenformel: C₈H₁₅NO₃

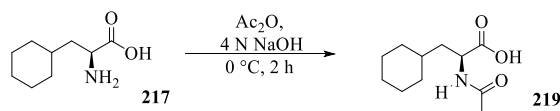
Molekulargewicht: 173.21 g/mol

Exakte Masse: 173.1052 au

¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, RT,) δ 4.41 (dd, ³J_{H,H} = 9.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 1H, C_α-H), 1.98 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.64-1.58 (m, 3H, CH-CH₂-C_α, CH₂-C_α), 0.96 (d, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 3H, CH₃-CH), 0.93 (d, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 3H, CH₃-CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 176.5 (C(O)), 173.2 (C(O)), 52.3 (C_α), 41.8 (CH₂-C_α), 26.1(C(O)-CH₃), 23.4 (CH-CH₂-C_α), 22.3 (CH₃-CH), 21.8 (CH₃-CH).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[187]

6.9.122 *N*-Ac-3-Cyclohexyl-L-Alanin^[179] (**219**)

0.30 g (1.75 mmol, 1.00 eq) 3-Cyclohexyl-L-Alanin (**217**) wurden in 2.20 mL 4 N Natronlauge gelöst und unter starkem Rühren bei 0 °C mit 0.30 mL (3.17 mmol, 1.81 eq) Essigsäureanhydrid versetzt, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung mit 4 N Natronlauge stets stark basisch gehalten wurde. Es wurde zwei Stunden bei 0 °C gerührt, dann wurden bei 0 °C weitere 0.30 mL (3.17 mmol, 1.81 eq) Essigsäureanhydrid zugesetzt und der pH-Wert der Reaktionslösung erneut mit 4 N Natronlauge basisch gehalten. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 6 N Salzsäure angesäuert bis ein weißer Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde filtriert, mit destilliertem Wasser, gesättigter Natriumchlorid-Lösung und erneut mit destilliertem Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Als Produkt konnten 0.28 g (1.31 mmol, 75 %) eines weißen Feststoffs erhalten werden.

Summenformel: C₁₁H₁₉NO₃

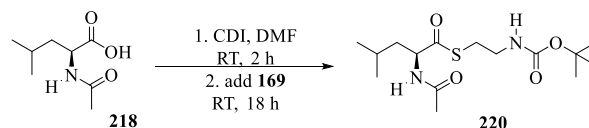
Molekulargewicht: 213.28 g/mol

Exakte Masse: 213.1365 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT) δ 4.43 (dd, ²J_{H,H} = 10.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, C_α-H), 1.98 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.83-1.49 (m, 7H, CH₂-C_α, Cyclohexyl-H), 1.44-1.13 (m, 4H, H-1, Cyclohexyl-H), 1.08-0.79 (m, 2H, Cyclohexyl-H).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 176.3 (C(O)), 173.4 (C(O)), 51.4 (C_α), 40.2 (CH₂-C_α), 35.5 (Cyclohexyl-C), 34.8 (Cyclohexyl-C), 33.3 (Cyclohexyl-C), 27.6 (Cyclohexyl-C), 27.4 (Cyclohexyl-C), 27.2 (Cyclohexyl-C), 22.3 (C(O)-CH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[188,189]

6.9.123 *N*-Ac-L-Leucyl-*N*-Boc-Cysteamin (**220**)

0.25 g (1.44 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-L-Leucin (**218**) wurden in 10 mL Dimethylformamid gelöst und mit 0.30 g (1.85 mmol, 1.28 eq) CDI bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Im Anschluss wurden 0.49 g (2.76 mmol, 1.92 eq) *N*-Boc-Cysteamin (**169**) zugesetzt und bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit viel Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.32$, Ninhydrin-Färbereagenz) und anschließend via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV) aufgereinigt, sodass 0.31 g (0.93 mmol, 65 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten wurden.

Summenformel: $C_{15}H_{28}N_2O_4S$

Molekulargewicht: 332.46 g/mol

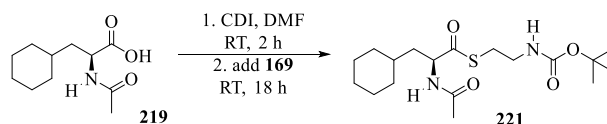
Exakte Masse: 332.1770 au

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 6.07 (bs, 1H, \underline{NH}), 4.71 (td, $^3J_{H,H} = ^3J_{H,H} = 9.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.8$ Hz, 1H, $C_\alpha\text{-}\underline{H}$), 3.28 (t, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, $\underline{CH_2}$ -NH), 3.00 (t, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 2H, $\underline{CH_2}$ - CH_2 -NH), 2.06 (s, 3H, C(O)- $\underline{CH_3}$), 1.72-1.62 (m, 2H, $\underline{CH_2}$ - C_α), 1.52-1.43 (m, 1H, \underline{CH} - CH_2 - C_α), 1.43 (s, 9H, *tert*-Bu- $\underline{CH_3}$), 0.95 (d, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 3H, $\underline{CH_3}$ -CH), 0.93 (d, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 3H, $\underline{CH_3}$ -CH).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, RT) δ 201.0 ($\underline{C(O)}$ -S), 170.5 ($\underline{C(O)}$), 156.0 ($\underline{C(O)}$ -O-*tert*-Bu), 78.8 ($\underline{C_q}$ -*tert*-Bu), 58.1 ($\underline{C_\alpha}$), 41.8 ($\underline{CH_2}$ -NH), 29.2 ($\underline{CH_2}$ - CH_2 -NH), 28.5 (*tert*-Bu- $\underline{CH_3}$), 25.0 (\underline{CH} - CH_2 - C_α), 23.2 ($\underline{CH_3}$ -CH), 23.2 ($\underline{CH_3}$ -CH), 21.8 (C(O)- $\underline{CH_3}$).

MS (ESI): m/z 333.2 $[M+H]^+$, 355.2 $[M+Na]^+$, 665.4 $[2M+H]^+$, 687.3 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI): m/z 333.1837 $[M+H]^+$ (m/z 333.1848 $[M+H]^+$ ber. für $C_{15}H_{29}N_2O_4S$).

6.9.124 *N*-Ac-3-Cyclohexyl-L-Alanyl-*N*-Boc-Cysteamin (**221**)

0.10 g (0.47 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-3-Cyclohexyl-L-Alanin (**219**) wurden mit 0.10 g (0.61 mmol, 1.30 eq) CDI in 4 mL Dimethylformamid bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Dann wurden 0.16 g (0.89 mmol, 1.90 eq) *N*-Boc-Cysteamin (**169**) zugesetzt und bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit viel Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.38$, Ninhydrin-Färbereagenz), sodass 38.0 mg (0.10 mmol, 21 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten wurden.

Summenformel: $C_{18}H_{32}N_2O_4S$

Molekulargewicht: 372.52 g/mol

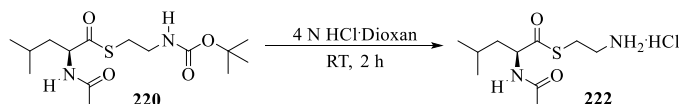
Exakte Masse: 372.2083 au

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ 6.22 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH), 4.90 (bs, 1H, NH), 4.70 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 1H, C α -H), 3.26 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH $_2$ -NH), 2.98 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 2H, CH $_2$ -CH $_2$ -NH), 2.04 (s, 3H, C(O)-CH $_3$), 1.82-1.57 (m, 7H, Cyclohexyl-H, CH $_2$ -C α), 1.48 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 10.0$ Hz 1H, CH $_2$ -C α), 1.42 (s, 9H, *tert*-Bu-CH $_3$), 1.36-1.06 (m, 3H, Cyclohexyl-H), 1.03-0.76 (m, 2H, Cyclohexyl-H). 1 x Cyclohexyl-C fehlt

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , RT) δ 201.2 (C(O)-S), 170.4 (C(O)), 155.9 (C(O)-O-*tert*-Bu), 79.7 (C $_q$ -*tert*-Bu), 57.4 (C α), 40.2 (CH $_2$ -NH), 34.2 (CH $_2$), 33.8 (CH $_2$), 32.3 (Cyclohexyl-C), 29.1 (Cyclohexyl-C), 28.5 (*tert*-Bu-CH $_3$), 26.4 (Cyclohexyl-C), 26.3 (Cyclohexyl-C), 26.0 (Cyclohexyl-C), 23.2 (C(O)-CH $_3$). 1 x Cyclohexyl-C ??

MS (ESI): m/z 373.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 395.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 745.4 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 767.4 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 373.2154 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 373.2161 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$).

6.9.125 *N*-Ac-L-Leucyl-Cysteamin Hydrochlorid^[190] (**222**)

0.31 g (0.93 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-L-Leucyl-*N*-Boc-Cysteamin (**220**) wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 mit 0.64 mL (18.40 mmol, 20.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 0.15 g (0.56 mmol, 60 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: C₁₀H₂₁N₂O₂SCl

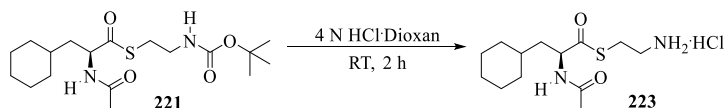
Molekulargewicht: 268.80 g/mol

Exakte Masse: 268.1012 au

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, RT,) δ 4.52 (dd, ³J_{H,H} 8.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, C_α-H), 3.20-3.06 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.04 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.78-1.64 (m, 1H, CH-CH₂-C_α), 1.65-1.58 (m, 2H, CH₂-C_α), 0.97 (d, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 3H, CH₃-CH), 0.91 (d, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 3H, CH₃-CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 202.4 (C(O)-S), 174.1 (C(O)), 59.6 (C_α), 41.3 (CH₂), 40.4 (CH₂), 26.7 (CH₂-NH₂), 25.9 (CH-CH₂-C_α), 23.4 (C(O)-CH₃), 22.4 (CH₃-CH), 21.5 (CH₃-CH).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[190]

6.9.126 *N*-Ac-3-Cyclohexyl-L-Alanyl-Cysteamin Hydrochlorid (**223**)

38.0 mg (0.10 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-3-Cyclohexyl-L-Alanyl-*N*-Boc-Cysteamin (**221**) wurden mit 0.50 mL (14.40 mmol, 144.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift 6.8.4 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 32.0 mg (0.10 mmol, 100 %) eines weißen Feststoffs erhalten

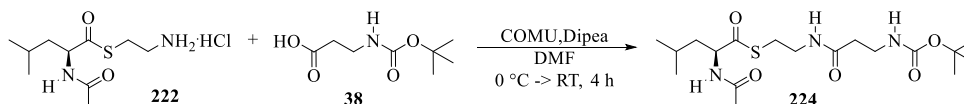
Summenformel: C₁₃H₂₅N₂O₃SCl

Molekulargewicht: 308.87 g/mol

Exakte Masse: 308.1325 au

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, RT,) δ 4.54 (dd, ³J_{H,H} = 10.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, C_α-H), 3.20-3.04 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.04 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.79-1.52 (m, 8H, Cyclohexyl-H, CH₂-C_α), 1.46-1.13 (m, 5H, Cyclohexyl-H).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, RT) δ 202.5 (C(O)-S), 174.1 (C(O)), 58.6 (C_α), 40.5 (CH₂), 39.9 (CH₂), 35.3 (CH₂-NH₂), 34.8 (Cyclohexyl-C), 33.0 (Cyclohexyl-C), 27.5 (Cyclohexyl-C), 27.3 (Cyclohexyl-C), 27.1 (Cyclohexyl-C), 26.6 (Cyclohexyl-C), 22.4 (C(O)-CH₃).

6.9.127 *N*-Ac-L-Leucyl-Cysteaminyl-*N*-Boc- β -Alanin (**224**)

37.0 mg (0.19 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-L-Leucyl-Cysteamin Hydrochlorid (**222**) wurden in 1 mL Dimethylformamid mit 67.00 μ L (0.39 mmol, 2.00 eq) Diisopropylethylamin versetzt und bei 0 °C 83.0 mg (0.19 mmol, 1.00 eq) COMU zugefügt. Die rötliche Lösung wurde zehn Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend mit 52.0 mg (0.19 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**) versetzt und bei Raumtemperatur vier Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden noch zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, mit 1 N Salzsäure und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt erst säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 20:1, R_f = 0.34, Ninhydrin-Färbereagenz) und im Anschluss via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV) aufgereinigt. Als Produkt wurden 44.0 mg (0.11 mmol, 58 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₁₈H₃₃N₃O₅S

Molekulargewicht: 403.54 g/mol

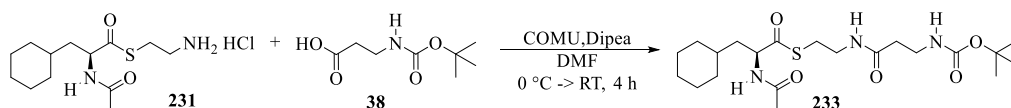
Exakte Masse: 403.2141 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 6.55 (bs, 1H, NH), 6.44 (bs, 1H, NH), 4.64 (dd, ³*J*_{H,H} = 14.1 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.3 Hz, 1H, C α -H), 3.48-3.42 (m, 2H, CH₂-NH), 3.39 (t, ³*J*_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.12-2.95 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.40 (t, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.06 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.79-1.57 (m, 2H, CH₂-C α), 1.59-1.46 (m, 1H, CH-CH₂-C α), 1.43 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃), 0.94 (d, ³*J*_{H,H} = 6.1 Hz, 3H, CH₃-CH), 0.91 (d, ³*J*_{H,H} = 6.1 Hz, 3H, CH₃-CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 201.4 (C(O)-S), 172.4 (C(O)), 171.1 (C(O)), 156.5 (C(O)-O-*tert*-Bu), 79.9 (C_q-*tert*-Bu), 58.4 (C α), 41.2 (CH₂), 39.4 (CH₂-NH), 37.1 (CH₂), 36.3 (CH₂), 28.5 (*tert*-Bu-CH₃), 28.4 (S-CH₂), 25.0 (CH-CH₂-C α), 23.1 (2 x CH₃-CH), 21.7 (C(O)-CH₃).

MS (ESI): *m/z* 404.2 [M+H]⁺, 426.2 [M+Na]⁺, 807.4 [2M+H]⁺, 829.4 [2M+Na]⁺.

HRMS (ESI): *m/z* 404.2213 [M+H]⁺ (*m/z* 404.2219 [M+H]⁺ ber. für C₁₈H₃₃N₃O₅S).

6.9.128 *N*-Ac-3-Cyclohexyl-L-Alanyl-Cysteaminyl-*N*-Boc- β -Alanin (**225**)

32.0 mg (0.10 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-3-Cyclohexyl-L-Alanyl-Cysteamin Hydrochlorid (**223**) wurden zu einer bei 0 °C hergestellten Lösung aus 19.0 mg (0.10 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc- β -Alanin (**38**), 35.00 μ L (0.20 mmol, 2.00 eq) Diisopropylethylamin und 43.0 mg (0.10 mmol, 1.00 eq) COMU in 1 mL Dimethylformamid zugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur vier Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden noch zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, mit 1 N Salzsäure und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 20:1, R_f = 0.41, Ninhydrin-Färbereagenz) aufgereinigt. Als Produkt wurden 35.0 mg (0.08 mmol, 80 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₂₁H₃₇N₃O₅S

Molekulargewicht: 443.60 g/mol

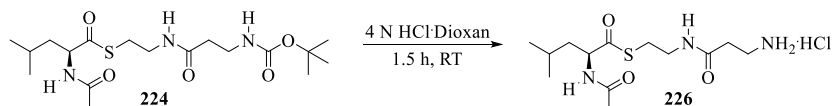
Exakte Masse: 443.2454 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 6.81 (bs, 1H, NH), 6.52 (bs, 1H, NH), 5.18 (bs, 1H, NH), 4.75-4.63 (m, 1H, C α -H), 3.52-3.33 (m, 4H, 2 x CH₂-NH), 3.17-2.96 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.50-2.39 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.10 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.76-1.62 (m, 6H, Cyclohexyl-H, CH₂-C α), 1.56-1.48 (m, 1H, CH₂-C α), 1.44 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃), 1.25-1.14 (m, 3H, Cyclohexyl-H), 1.02-0.82 (m, 3H, Cyclohexyl-H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 201.0 (C(O)-S), 172.2 (C(O)), 171.1 (C(O)), 156.8 (C(O)-O-*tert*-Bu), 80.0 (C α -*tert*-Bu), 57.8 (C α), 39.9 (CH₂-NH), 37.1 (CH₂-NH), 36.3 (CH₂-C α), 34.3 (CH₂-CH₂-NH), 33.8 (CH₂-CH₂-NH), 32.4 (Cyclohexyl-C), 28.6 (*tert*-Bu-CH₃), 28.4 (Cyclohexyl-C), 26.4 (Cyclohexyl-C), 26.3 (Cyclohexyl-C), 26.1 (Cyclohexyl-C), 23.1 (C(O)-CH₃).
1x Cyclohexyl-C fehlt

MS (ESI): m/z 444.3 [M+H]⁺, 466.2 [M+Na]⁺, 887.5 [2M+H]⁺, 909.5 [2M+Na]⁺,

HRMS (ESI): m/z 444.2526 [M+H]⁺ (m/z 444.2532 [M+H]⁺ ber. für C₂₁H₃₈N₃O₅S).

6.9.129 *N*-Ac-L-Leucyl-Cysteaminyl- β -Alanin Hydrochlorid (**226**)

44.0 mg (0.11 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-L-Leucyl-Cysteaminyl-*N*-Boc- β -Alanin (**224**) wurden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.4 mit 0.30 mL (8.64 mmol, 78.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 32.0 mg (0.09 mmol, 82 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $C_{13}H_{26}N_3O_3S$ Cl

Molekulargewicht: 339.88 g/mol

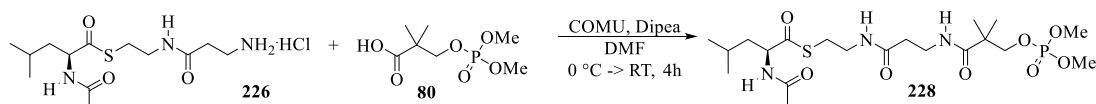
Exakte Masse: 339.1383 au

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 4.48 (dd, $^3J_{H,H} = 8.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 1H, C_{α} -H), 3.39-3.34 (m, 2H, CH_2 -NH), 3.18 (t, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 2H, CH_2 -NH₂), 3.20-2.92 (m, 2H, H-9), 2.57 (t, $^3J_{H13,H14} = 6.4$ Hz, 2H, H-13), 2.02 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.80-1.55 (m, 1H, CH -CH₂-C $_{\alpha}$, CH_2 -C $_{\alpha}$), 0.96 (d, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 3H, CH_3 -CH), 0.91 (d, $^3J_{H16,H2} = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -CH).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 202.9 (C(O)-S), 173.9 (C(O)), 172.3 (C(O)), 59.6 (C $_{\alpha}$), 41.6 (CH_2 -C $_{\alpha}$), 39.9 (CH_2 -NH₂), 37.1 (CH_2 -NH), 32.7 (CH_2 -CH₂-NH₂), 28.8 (S-CH₂), 26.0 (CH -CH₂-C $_{\alpha}$), 23.4 (C(O)-CH₃), 22.4 (CH_3 -CH), 21.5 (CH_3 -CH).

MS (ESI): m/z 304.2 [M-HCl+H]⁺, 326.2 [M-HCl+Na]⁺, 607.3 [2M-2HCl+H]⁺, 629.3 [2M-2HCl+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 304.1688 [M-HCl+H]⁺ (m/z 304.1694 [M-HCl+H]⁺ ber. für $C_{13}H_{26}O_3S$).

6.9.130 Phosphopantethein-Derivat **228**

29.0 mg (128.23 μmol , 1.00 eq) der Carbonsäure **80** wurden in 2 mL Dimethylformamid mit 45.00 μL (258.34 μmol , 2.01 eq) Diisopropylethylamin versetzt und bei 0 °C 57.0 mg (133.09 μmol , 1.04 eq) COMU zugefügt. Die rötliche Lösung wurde zehn Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend mit 45.0 mg (132.40 μmol , 1.00 eq) *N*-Ac-L-Leucyl-Cysteaminyl- β -Alanin Hydrochlorid (**226**) versetzt und bei Raumtemperatur vier Stunden gerührt. Dann wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen noch zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 N Salzsäure und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung des Rohprodukts zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 3:1, $R_f = 0.43$, Ninhydrin-Färbereagenz) und im Anschluss via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-III) wurden 6.2 mg (12.00 μmol , 9 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_8\text{PS}$

Molekulargewicht: 511.57 g/mol

Exakte Masse: 511.2117 au

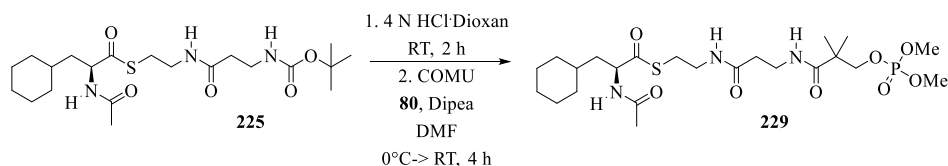
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 4.33 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 4.02 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 4.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 3.77 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.1$ Hz, 2H, PO-CH_3), 3.48 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.42-3.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.02 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.79 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.99 (s, 3H, C(O)-CH_3), 1.73-1.59 (m, 3H, $\text{CH-CH}_2\text{-C}_\alpha$), 1.59-1.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_\alpha$), 1.21 (s, 6H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 0.96 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 0.92 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 202.7 (C(O)-S), 177.5 (C(O)), 174.0 (C(O)), 173.7 (C(O)), 75.1 (d, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 59.5 (C_α), 55.3 (d, PO-CH_3), 44.4 (d, $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 41.7 ($\text{CH}_2\text{-C}_\alpha$), 40.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 37.3 (CH_2), 36.4 (CH_2), 28.9 (S-CH_2), 26.0 ($\text{CH-CH}_2\text{-C}_\alpha$), 23.4 (C(O)-CH_3), 22.4 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 22.3 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 21.6 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD , RT) δ 0.74-0.25 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 512.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 534.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 512.2180 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 512.2195 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{PS}$).

6.9.131 Phosphopanthetein-Derivat **229**

35.0 mg (0.08 mmol, 1.00 eq) *N*-Ac-3-Cyclohexyl-*L*-Alanyl-Cysteaminyl-*N*-Boc- β -Alanin (**225**) wurden mit 0.30 mL (8.64 mmol, 107.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift 6.8.4 zur Reaktion gebracht. Als Produkt wurden 30.0 mg (0.08 mmol, 100 %) eines weißen Feststoffs erhalten, der zu einer bei 0 °C hergestellten Lösung aus 18.0 mg (0.08 mmol, 1.00 eq) Säure **80**, 28.00 μ L (0.16 mmol, 2.00 eq) Diisopropylethylamin und 34.0 mg (0.08 mmol, 1.00 eq) COMU in 1 mL Dimethylformamid zugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur vier Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden noch zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 N Salzsäure und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat:Methanol 3:1, R_f = 0.65, Ninhydrin-Färbereagenz) und anschließend via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-III) aufgereinigt. Als Produkt wurden 17.5 mg (0.03 mmol, 40 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₂₃H₄₂N₃O₈PS

Molekulargewicht: 551.64 g/mol

Exakte Masse: 551.2430 au

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, RT) δ 4.53 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 10.8 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 4.5 Hz, 1H, C α -H), 4.02 (d, ³ $J_{H,P}$ = 4.5 Hz, 2H, CH₂-OP), 3.77 (d, ³ $J_{H,P}$ = 11.1 Hz, 6H, PO-CH₃), 3.43 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.9 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.32-3.29 (m, 2H, CH₂-NH), 2.99 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.6 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.38 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.01 (s, 3H, C(O)-CH₃), 1.78-1.62 (m, 6H, Cyclohexyl-H, CH₂-C α), 1.55 (ddd, ² $J_{H,H}$ = 13.9 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 10.7 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 4.7 Hz 1H, CH₂-C α), 1.42-1.23 (m, 3H, Cyclohexyl-H), 1.21 (s, 6H, C $_q$ -CH₃), 1.20-1.16 (m, 1H, Cyclohexyl-H), 1.04-0.84 (m, 2H, Cyclohexyl-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, RT) δ 202.8 (C(O)-S), 177.5 (C(O)), 174.0 (C(O)), 173.7 (C(O)), 75.1 (d, CH₂-OP), 58.8 (C α), 55.3 (d, PO-CH₃), 44.4 (d, C $_q$ -CH₃), 40.3 (CH₂), 40.0 (CH₂), 37.3 (CH₂), 36.4 (CH₂), 35.4 (CH₂), 34.9 (Cyclohexyl-C), 33.1 (Cyclohexyl-C), 28.9

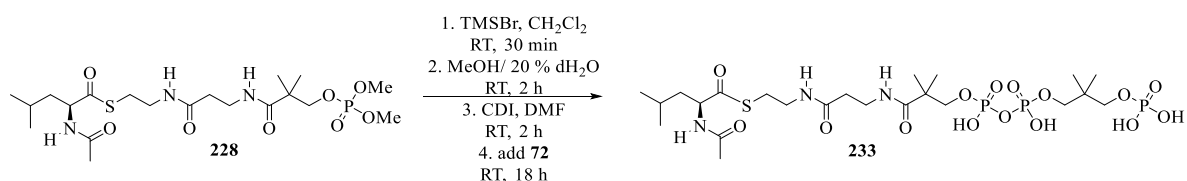
(Cyclohexyl-C), 27.5 (Cyclohexyl-C), 27.3 (Cyclohexyl-C), 27.1 (Cyclohexyl-C), 22.4 (C(O)-CH₃), 22.3 (C_q-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD, RT) δ 0.71-0.19 (m, 1P).

MS (ESI): m/z 552.2 [M+H]⁺, 574.2 [M+Na]⁺.

HRMS (ESI): m/z 552.2492 [M+H]⁺ (m/z 552.2508 [M+H]⁺ ber. für C₂₃H₄₃N₃O₈PS).

6.9.132 CoA-Derivat **233**



20.0 mg (39.10 μmol, 1.00 eq) des Phosphopanthethein-Derivats **228** wurden in 0.50 mL trockenem Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 mit 26.00 μL (197.01 μmol, 5.04 eq) Bromotrimethylsilan zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) und Lyophilisation wurde ein weißer Feststoff erhalten, der neben dem Produkt auch zu ca. 35-40 % die Zerfallsprodukte *N*-Ac-L-Leucin (**218**) und das dazu entsprechende Abspaltungsprodukt enthielt, die nicht vom gewünschten Produkt getrennt werden konnten.

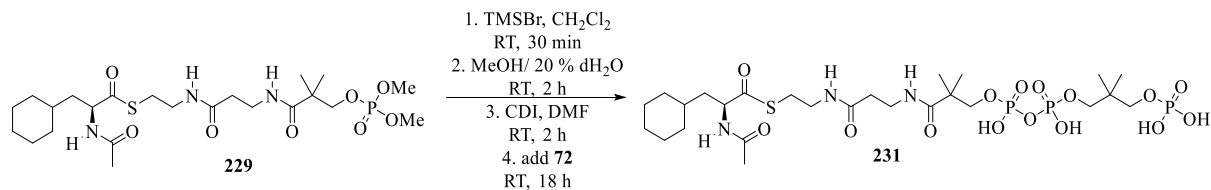
Ohne weitere Aufreinigung wurde der erhaltene Feststoff unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.70 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 3.6 mg (22.19 μmol) CDI und im Anschluss mit 7.4 mg (28.02 μmol) des Diphosphats **72** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-II) isoliert und mittels Lyophilisation getrocknet. Als Produkt wurden 0.5 mg (0.69 μmol, 2 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₂₃H₄₆N₃O₁₅P₃S

Molekulargewicht: 729.61 g/mol

Exakte Masse: 729.1862 au

MS (ESI): m/z 728.2 [M-H]⁻.

6.9.133 CoA-Derivat **234**

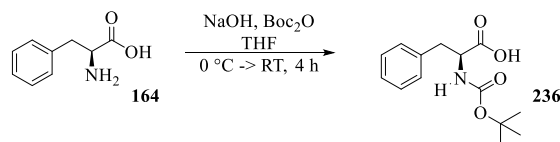
41.0 mg (74.32 μ mol, 1.00 eq) des Phosphopantethein-Derivats **229** wurden in 0.23 mL trockenem Dichlormethan gelöst und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.7 mit 46.00 μ L (348.55 μ mol, 4.69 eq) Bromotrimethylsilan zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung des Rohprodukts via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-II ohne TFA-Zusatz) und Lyophylisation der Produktfraktionen wurde ein weißer Feststoff erhalten, der direkt weiter umgesetzt wurde. Der erhaltene Feststoff wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 1 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 6.4 mg (39.44 μ mol) CDI und im Anschluss mit 13.0 mg (49.22 μ mol,) des Diphosphats **72** gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 6.8.6 zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Hilfe der semi-präparativen HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-II) isoliert und mittels Lyophylisation getrocknet. Als Produkt wurden 4.0 mg (5.20 μ mol, 7 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: C₂₆H₅₀N₃O₁₅P₃S

Molekulargewicht: 769.67 g/mol

Exakte Masse: 769.2175 au

MS (ESI): m/z 768.3 [M-H]⁻.

6.9.134 *N*-Boc-L-Phenylalanin (**236**)

Zu einer Lösung aus 0.30 g (1.82 mmol, 1.00 eq) L-Phenylalanin (**164**) in 1.82 mL 2 M Natronlauge wurde bei 0 °C eine Lösung aus 0.60 g (2.75 mmol, 1.51 eq) Di-*tert*-Butyldicarbonat in 4 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und vier Stunden gerührt. Dann wurde Tetrahydrofuran unter vermindertem Druck aus der Reaktionslösung entfernt und die wässrige Phase mit Diethylether gewaschen und dann mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH 2-3). Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurden 0.39 g (1.47 mmol, 81 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten.

Summenformel: C₁₄H₁₉NO₄

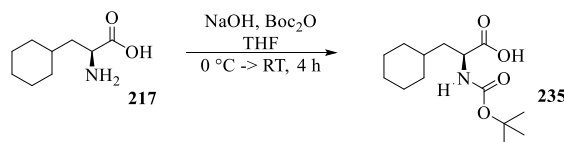
Molekulargewicht: 265.31 g/mol

Exakte Masse: 265.3090 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 7.35-7.27 (m, 3H, Ar-H), 7.24-7.14 (m, 2H, Ar-H), 4.93 (d, ³J_{H,H} = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.66-4.57 (m, 1H, C_α-H), 3.20 (dd, ²J_{H,H} = 13.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, CH₂-C_α), 3.08 (dd, ²J_{H,H} = 13.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 1H, CH₂-C_α), 1.42 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 176.5 (CO₂H), 155.5 (C(O)-O-*tert*-Bu), 136.0 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 80.4 (C_q-*tert*-Bu), 54.4 (C_α), 38.0 (CH₂-C_α), 28.4 (*tert*-Bu-CH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[191]

6.9.135 *N*-Boc-3-Cyclohexyl-L-Alanin (**235**)

Zu einer Lösung aus 0.30 g (1.75 mmol, 1.00 eq) 3-Cyclohexyl-L-Alanin (**217**) in 1.75 mL 2 M Natronlauge wurde bei 0 °C eine Lösung aus 0.57 g (2.61 mmol, 1.49 eq) Di-*tert*-Butyldicarbonat in 3.50 mL Tetrahydrofuran zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und vier Stunden gerührt. Dann wurde Tetrahydrofuran unter vermindertem Druck aus der Reaktionslösung entfernt und die wässrige Phase erst mit Diethylether gewaschen und dann mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH 2-3). Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurden 0.36 g (1.33 mmol, 76 %) eines weißen Feststoffs als Produkt erhalten.

Summenformel: C₁₄H₂₅NO₄

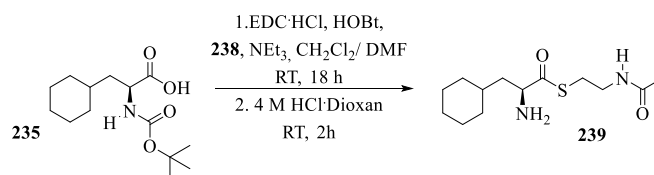
Molekulargewicht: 271.36 g/mol

Exakte Masse: 271.1784 au

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT) δ 10.05 (bs, 1H, OH), 4.90 (d, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 1H, NH), 4.41 (m, 1H, C_α-H), 1.85-1.60 (m, 7H, Cyclohexyl-H, CH₂-C_α), 1.55-1.48 (m, Cyclohexyl-H), 1.44 (s, 9H, *tert*-Bu-CH₃), 1.29-1.13 (m, 3H, Cyclohexyl-H), 1.04-0.81 (m, 2H, Cyclohexyl-H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT) δ 178.6 (C=O), 155.8 (C(O)-O-*tert*-Bu), 80.3 (C_q-*tert*-Bu), 51.5 (C_α), 40.2 (CH₂-C_α), 34.2 (Cyclohexyl-C), 33.7 (Cyclohexyl-C), 32.5 (Cyclohexyl-C), 28.4 (*tert*-Bu-CH₃), 26.5 (Cyclohexyl-C), 26.3 (Cyclohexyl-C), 26.1 (Cyclohexyl-C).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[192]

6.9.136 3-Cyclohexyl-L-Alanin-SNAC (**239**)

60.0 mg (221.24 μmol , 1.00 eq) *N*-Boc-3-Cyclohexyl-L-Alanin (**235**) wurden in 4 mL aus einem 1:1 Gemisch aus Dimethylformamid und Dichlormethan gelöst und mit 33.0 mg (244.23 μmol , 1.10 eq) HOBT, 51.0 mg (266.04 μmol , 1.20 eq) EDC·HCl und 31.00 μL (291.30 μmol , 1.32 eq) *N*-Acetyl-Cysteamin (**238**) versetzt. Bei 0 °C wurden 46.00 μL (331.82 μmol , 1.50 eq) Triethylamin zugetropft und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Dann wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und die wässrige Phase noch drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.21$, Ninhydrin-Färbereagenz) und anschließend via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV) aufgereinigt. Als Produkt wurden 43.0 mg (115.53 μmol) eines weißen Feststoffs erhalten, die mit 0.58 mL (16.70 mmol, 145.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift 6.8.4 umgesetzt wurden. Das Rohprodukt wurde mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-I) aufgereinigt und als Produkt wurden 19.0 mg (69.81 μmol , 32 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

Molekulargewicht: 272.41 g/mol

Exakte Masse: 272.1558 au

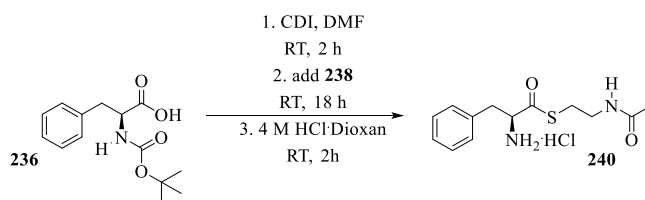
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , RT) δ 4.24 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}7} = 5.9$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 3.40 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.16 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.94 (s, 3H, C(O)-CH_3), 1.89-1.62 (m, 7H, Cyclohexyl- H , $\text{CH}_2\text{-C}_\alpha$), 1.60-1.41 (m, 1H, Cyclohexyl- H), 1.40-1.18 (m, 3H, Cyclohexyl- H), 1.12-0.93 (m, 2H, Cyclohexyl- H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , RT) δ 198.1 (C(O)-S), 173.5 (C(O)), 58.3 (C_α), 40.5 ($\text{CH}_2\text{-C}_\alpha$), 39.5 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 34.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 34.4 (Cyclohexyl- C), 33.5 (Cyclohexyl- C), 29.8 (Cyclohexyl- C), 27.2 (Cyclohexyl- C), 27.0 (Cyclohexyl- C), 26.8 (Cyclohexyl- C), 22.5 (C(O)-CH_3).

MS (ESI): m/z 273.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 295.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 545.3 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 567.3 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): m/z 273.1630 $[M+H]^+$ (m/z 273.1636 $[M+H]^+$ ber. für $C_{13}H_{25}N_2O_2S$).

6.9.137 L-Phenylalanin-SNAC (**240**)



150.0 mg (565.76 μmol , 1.00 eq) der *N*-Boc-L-Phenylalanin (**236**) wurden in 1 mL Dimethylformamid gelöst und mit 120.0 mg (739.60 μmol , 1.31 eq) CDI bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Im Anschluss wurden 90.00 μL (845.71 μmol , 1.49 eq) *N*-Acetylcysteamin (**238**) zugesetzt und bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit viel Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.09$, Ninhydrin-Färbereagens) und anschließend via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV) aufgereinigt. Als Produkt wurden 112.0 mg (305.88 μmol) eines weißen Feststoffs erhalten, die mit 1.50 mL (43.20 mmol, 141.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift 6.8.4 umgesetzt wurden. Als Produkt wurden 91.0 mg (300.51 μmol , 53 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $C_{13}H_{19}N_2O_2S$

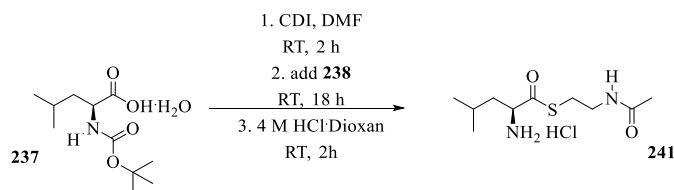
Molekulargewicht: 302.82 g/mol

Exakte Masse: 302.0856 au

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 7.40-7.29 (m, 5H, Ar-H), 4.51 (t, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 3.42-3.39 (m, 3H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-C}_\alpha$), 3.21-3.07 (m, 3H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-C}_\alpha$), 1.97 (s, 3H, C(O)-CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 197.1 (C(O)-S), 173.8 (C(O)), 134.9 (Ar-C), 130.6 (Ar-C), 130.2 (Ar-C), 129.0 (Ar-C), 61.4 (C_α), 39.6 (CH_2), 38.6 (CH_2), 29.7 (S- CH_2), 22.4 (C(O)-CH_3).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[134]

6.9.138 L-Leucin-SNAC (**241**)

150.0 mg (0.60 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc-L-Leucin (**237**) wurden in 1 mL Dimethylformamid gelöst und mit 127.0 mg (0.78 mmol, 1.25 eq) CDI bei Raumtemperatur zwei Stunden gerührt. Im Anschluss wurden 96.00 μ L (0.90 mmol, 1.50 eq) *N*-Acetylcysteamin (**238**) zugesetzt und bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit viel Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat:Pentan 1:1, $R_f = 0.39$, Ninhydrin-Färbereagens) und anschließend via MPLC (s. Kapitel 6.7.3 Methode M-IV) aufgereinigt. Als Produkt wurden 119.4 mg (0.36 mmol) eines weißen Feststoffs erhalten, die mit 1.80 mL (51.84 mmol, 144.00 eq) 4 N Salzsäure in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift 6.8.4 umgesetzt wurden. Als Produkt wurden 108.2 mg (0.40 mmol, 67 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Summenformel: $C_{13}H_{21}N_2O_2SCl$

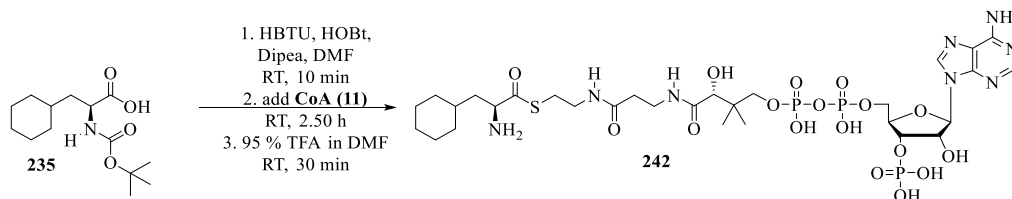
Molekulargewicht: 268.80 g/mol

Exakte Masse: 268.1012 au

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , RT) δ 4.21 (dd, $^3J_{H,H} = 8.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.2$ Hz, 1H, C_α -H), 3.40 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 -NH), 3.23-3.10 (m, 2H, CH_2 - CH_2 -NH), 1.94 (s, 3H, $C(O)$ - CH_3), 1.97-1.65 (m, 3H, CH - CH_2 - C_α , CH - CH_2 - C_α), 1.03 (d, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 3H, CH_3 -CH), 1.02 (d, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 3H, CH_3 -CH).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD , RT) δ 197.9 ($C(O)$ -S), 173.6 ($C(O)$), 58.9 (C_α), 41.9 (CH_2 - C_α), 39.5 (CH_2 -NH), 29.8 (CH_2 - CH_2 -NH), 25.7 (CH - CH_2 - C_α), 22.9 (CH_3), 22.5 (CH_3), 22.06 (CH_3).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[134]

6.9.139 3-Cyclohexyl-L-Alanin-CoA (**242**)

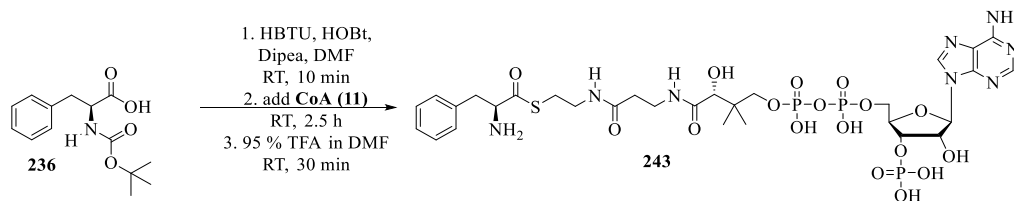
4.9 mg (18.07 μmol , 1.51 eq) *N*-Boc-3-Cyclohexyl-L-Alanine (**235**) wurden in 0.90 mL Dimethylformamid gelöst und mit 4.9 mg (36.26 μmol , 3.03 eq) HOBt und 13.7 mg (36.12 μmol , 3.02 eq) 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) versetzt. Es wurden 20.40 μL (120.00 μmol , 10.03 eq) Diisopropylethylamin zugesetzt und die Reaktionslösung 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden 9.4 mg (11.97 μmol , 1.00 eq) des Trilithium-Salzes des Coenzym A (**11**) zugefügt und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsumsatz via Massenspektrometrie kontrolliert. Im Anschluss wurden 1.5 mL einer 95 % TFA-Lösung in DMF zugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung auf 30 mL eiskalten Diethylether gegeben und zur Präzipitatbildung für 18 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das gebildete Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 Minuten, 4000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet unter Luftstrom getrocknet und mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-III) aufgereinigt. Als Produkt wurden 3.1 mg (3.37 μmol , 28 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 920.76 g/mol

Exakte Masse: 920.2306 au

MS (ESI): m/z 921.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 943.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.9.140 L-Phenylalanin-CoA (**243**)

4.8 mg (18.09 μmol , 1.50 eq) *N*-Boc-L-Phenylalanin (**236**) wurden in 0.90 mL Dimethylformamid gelöst und mit 4.9 mg (36.26 μmol , 3.00 eq) HOBt und 13.7 mg (36.12 μmol , 3.00 eq) 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) versetzt. Es wurden 20.60 μL (121.08 μmol , 10.00 eq) Diisopropylethylamin zugesetzt und die Reaktionslösung 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden 9.5 mg (12.10 μmol , 1.00 eq) des Trilithium-Salzes des Coenzym A (**11**) zugefügt und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsumsatz via Massenspektrometrie kontrolliert. Im Anschluss wurden 1.5 mL einer 95 % TFA-Lösung in DMF zugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung auf 30 mL eiskalten Diethylether gegeben und zur Präzipitatbildung für 18 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das gebildete Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 Minuten, 4000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet unter Luftstrom getrocknet und mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-III) aufgereinigt. Als Produkt wurden 1.9 mg (2.08 μmol , 17 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

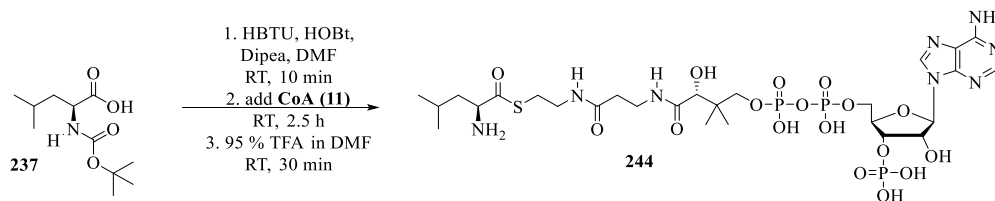
Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 914.71 g/mol

Exakte Masse: 914.1836 au

MS (ESI): m/z 915.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 937.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[135]

6.9.141 L-Leucin-CoA (**244**)

3.0 mg (12.03 μmol , 1.50 eq) *N*-Boc-L-Leucin (**237**) wurden in 0.60 mL Dimethylformamid gelöst und mit 4.0 mg (29.61 μmol , 3.69 eq) HOBt und 9.2 mg (24.23 μmol , 3.02 eq) 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphat (HBTU) versetzt. Es wurden 13.60 μL (79.94 μmol , 9.97 eq) Diisopropylethylamin zugesetzt und die Reaktionslösung 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden 6.3 mg (8.02 μmol , 1.00 eq) des Trilithium-Salzes des Coenzym A (**11**) zugefügt und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsumsatz via Massenspektrometrie kontrolliert. Im Anschluss wurden 1.5 mL einer 95 % TFA-Lösung in DMF zugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung auf 30 mL eiskalten Diethylether gegeben und zur Präzipitatbildung für 18 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das gebildete Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 Minuten, 4000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet unter Luftstrom getrocknet und mittels semi-präparativer HPLC (s. Kapitel 6.7.2.2 Methode P-III) aufgereinigt. Als Produkt wurden 3.3 mg (3.75 μmol , 47 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$

Molekulargewicht: 880.69 g/mol

Exakte Masse: 880.1993 au

MS (ESI): m/z 881.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[135]

7 Literaturverzeichnis

- [1] N. Semenov, *Chem. Br.* **1974**, *10*, 471–475.
- [2] R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2017**, DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00203.
- [3] R. A. Sheldon, P. C. Pereira, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2678–2691.
- [4] B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187–193.
- [5] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [6] M. D. Truppo, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 476–480.
- [7] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095.
- [8] C. A. Martinez, S. Hu, Y. Dumond, J. Tao, P. Kelleher, L. Tully, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 392–398.
- [9] S. Hu, C. Martinez, J. Tao, W. Tully, P. Kelleher, Y. Dumond, *Preparation of Pregabalin and Related Compounds*, **2006**, WO/2006/000904.
- [10] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Kriebber, F. J. Fleitz, J. Brands, et al., *Science* **2010**, *329*, 305–309.
- [11] C. Savile, E. Mundorff, J. Moore, P. Devine, J. Janey, *Transaminase Biocatalysts*, **2010**, WO/2010/099501.
- [12] A. A. Desai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1974–1976.
- [13] S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2010**, *12*, 81–86.
- [14] S. C. Davis, J. H. Grate, D. R. Gray, J. M. Gruber, G. W. Huisman, S. K. Ma, L. M. Newman, R. Sheldon, L. A. Wang, *Enzymatic Processes for the Production of 4-Substituted 3-Hydroxybutyric Acid Derivatives*, **2006**, US7125693 B2.
- [15] R. D. Süssmuth, A. Mainz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3770–3821.
- [16] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 7036–7043.
- [17] J. A. E. Payne, M. Schoppet, M. Henning Hansen, M. J. Cryle, *Mol. Biosyst.* **2017**, *13*, 9–22.
- [18] K. J. Weissman, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *11*, 660–670.
- [19] C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 127–135.
- [20] E. Haslam, *Nat. Prod. Rep.* **1986**, *3*, 217–249.
- [21] D. H. Williams, M. J. Stone, P. R. Hauck, S. K. Rahman, *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1189–1208.
- [22] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 730–765.

- [23] J. Grünewald, M. A. Marahiel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 121–146.
- [24] E. S. Sattely, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 757–793.
- [25] D. E. Cane, C. T. Walsh, C. Khosla, *Science* **1998**, *282*, 63–68.
- [26] C. T. Walsh, R. V. O'Brien, C. Khosla, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7098–7124.
- [27] K. J. Labby, S. G. Watsula, S. Garneau-Tsodikova, *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 641–653.
- [28] C. T. Walsh, H. Chen, T. A. Keating, B. K. Hubbard, H. C. Losey, L. Luo, C. G. Marshall, D. A. Miller, H. M. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 525–534.
- [29] H. M. Patel, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9023–9031.
- [30] H. M. Patel, J. Tao, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2003**, *42*, 10514–10527.
- [31] N. M. Gaudelli, D. H. Long, C. A. Townsend, *Nature* **2015**, *520*, 383–387.
- [32] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
- [33] L. Du, C. Sánchez, B. Shen, *Metab. Eng.* **2001**, *3*, 78–95.
- [34] H. von Döhren, U. Keller, J. Vater, R. Zocher, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2675–2706.
- [35] K. J. Weissman, R. Müller, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 826–848.
- [36] H. D. Mootz, R. Finking, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37289–37298.
- [37] J. Beld, E. C. Sonnenschein, C. R. Vickery, J. P. Noel, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 61.
- [38] J. Elovson, P. R. Vagelos, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3603–3611.
- [39] M. R. Mofid, R. Finking, L. O. Essen, M. A. Marahiel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 4128–4136.
- [40] L. E. N. Quadri, P. H. Weinreb, M. Lei, M. M. Nakano, P. Zuber, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1585–1595.
- [41] R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923–936.
- [42] K. Reuter, M. R. Mofid, M. A. Marahiel, R. Ficner, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6823–6831.
- [43] R. H. Lambalot, C. T. Walsh, *Methods Enzymol.* **1997**, *279*, 254–262.
- [44] H.-P. Stuible, S. Meier, E. Schweizer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248*, 481–487.
- [45] P. Tufar, S. Rahighi, F. I. Kraas, D. K. Kirchner, F. Löhr, E. Henrich, J. Köpke, I. Dikic, P. Güntert, M. A. Marahiel, et al., *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 552–562.
- [46] F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* **1945**, *160*, 173–190.
- [47] F. Lipmann, N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1946**, *162*, 743–744.
- [48] J. Baddiley, E. M. Thain, G. D. Novelli, F. Lipmann, *Nature (London)* **1953**, *171*, 76.
- [49] J. D. Gregory, G. D. Novelli, F. Lipmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 854–854.
- [50] F. Lynen, E. Reichert, *Angew. Chem.* **1951**, *63*, 47–48.

- [51] F. Lipmann, N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle, B. M. Guirard, *J. Biol. Chem.* **1947**, *167*, 869–870.
- [52] T. P. Wang, L. Shuster, N. O. Kaplan, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3204–3205.
- [53] E. E. Snell, G. M. Brown, V. J. Peters, J. A. Craig, E. L. Wittle, J. A. Moore, V. M. McGlohon, O. D. Bird, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5349–5350.
- [54] J. Baddiley, E. M. Thain, *J. Chem. Soc.* **1952**, 800–803.
- [55] J. Baddiley, E. M. Thain, *J. Chem. Soc.* **1953**, 1610–1615.
- [56] J. Baddiley, E. M. Thain, *J. Chem. Soc.* **1951**, 246–251.
- [57] G. M. Brown, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 370–378.
- [58] T. P. Begley, C. Kinsland, E. Strauss, *Vitam. Horm.* **2001**, *61*, 157–171.
- [59] E. Strauss, C. Kinsland, Y. Ge, F. W. McLafferty, T. P. Begley, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13513–13516.
- [60] U. Genschel, *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 1242–1251.
- [61] M. Daugherty, B. Polanuyer, M. Farrell, M. Scholle, A. Lykidis, V. de Crécy-Lagard, A. Osterman, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21431–21439.
- [62] P. K. Mishra, D. G. Drueckhammer, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3283–3310.
- [63] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 663–675.
- [64] A. M. Michelson, *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, *50*, 605–607.
- [65] A. M. Michelson, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *93*, 71–77.
- [66] C. J. Stewart, W. J. Ball Jr, *Biochemistry* **1966**, *5*, 3883–3886.
- [67] C. J. Stewart, J. O. Thomas, W. J. Ball Jr, A. R. Aguirre, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5000–5004.
- [68] S. Shimizu, R. Komaki, Y. Tani, H. Yamada, *FEBS Lett.* **1983**, *151*, 303–306.
- [69] D. P. Martin, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7287–7288.
- [70] D. P. Martin, R. T. Bibart, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4660–4668.
- [71] K. W. Vogel, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3275–3283.
- [72] R. T. Bibart, K. W. Vogel, D. G. Drueckhammer, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2903–2909.
- [73] I. Rootman, M. de Villiers, L. A. Brand, E. Strauss, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 1239–1251.
- [74] I. Nazi, K. P. Koteva, G. D. Wright, *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 100–105.
- [75] Y. Abiko, *J. Biochem.* **1967**, *61*, 290–299.
- [76] S. Shimizu, K. Kubo, Y. Tani, K. Ogata, *Agr. Biol. Chem. Tokyo* **1973**, *37*, 2863–2870.
- [77] E. Strauss, T. P. Begley, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48205–48209.
- [78] M. van Wyk, E. Strauss, *Chem. Commun.* **2007**, 398–400.

- [79] L. M. M. Mouterde, J. D. Stewart, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 954–959.
- [80] V. Agarwal, S. Diethelm, L. Ray, N. Garg, T. Awakawa, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4452–4455.
- [81] M. D. Burkart, K. Clarke, A. C. Mercer, J. J. LaClair, J. Meier, *Methods for Generating Analogs of Coenzyme A*, **2012**, 8119364.
- [82] K. M. Clarke, A. C. Mercer, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11234–11235.
- [83] M. Rothmann, M. Kang, R. Villa, I. Ntai, J. J. La Clair, N. L. Kelleher, E. Chapman, M. D. Burkart, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5962–5965.
- [84] A. S. Worthington, M. D. Burkart, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 44.
- [85] F. Ishikawa, R. W. Haushalter, D. J. Lee, K. Finzel, M. D. Burkart, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8846–8849.
- [86] J. Kundert, Synthese Vereinfachter CP-Mimetika Basierend Auf Der Struktur Des Coenzym A, Rheinische Friedrichs-Wilhelms-Universität Bonn, **2012**.
- [87] D. W. Udvary, L. Zeigler, R. N. Asolkar, V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical, P. R. Jensen, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 10376–10381.
- [88] T. A. M. Gulder, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9346–9367.
- [89] A. S. Eustáquio, R. P. McGlinchey, Y. Liu, C. Hazzard, L. L. Beer, G. Florova, M. M. Alhamadsheh, A. Lechner, A. J. Kale, Y. Kobayashi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 12295–12300.
- [90] R. P. McGlinchey, M. Nett, A. S. Eustáquio, R. N. Asolkar, W. Fenical, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7822–7828.
- [91] M. Nett, T. A. M. Gulder, A. J. Kale, C. C. Hughes, B. S. Moore, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6163–6167.
- [92] A. L. Mandel, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4801–4803.
- [93] J. Schulz, M. W. Beaton, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 943–954.
- [94] P. A. Gravil, H. Toulhoat, *Surf. Sci.* **1999**, *430*, 176–191.
- [95] J. Oudar, *Catal. Rev. Sci. Eng.* **1980**, *22*, 171–195.
- [96] L. J. Hoyos, M. Primet, H. Praliaud, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1992**, *88*, 3367–3373.
- [97] S. Jones, D. Selitsianos, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3671–3673.
- [98] S. Jones, D. Selitsianos, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3128–3138.
- [99] Z. M. Szulc, Y. A. Hannun, A. Bielawska, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7821–7824.
- [100] C. E. McKenna, J. Schmidhuser, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 739–739.
- [101] H. Gross, C. Böck, B. Costisella, J. Gloede, *J. Prakt. Chem.* **1978**, *320*, 344–350.

- [102] E. A. Kitas, J. W. Perich, G. W. Tregear, R. B. Johns, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4181–4187.
- [103] C. E. McKenna, M. T. Higa, N. H. Cheung, M.-C. McKenna, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 155–158.
- [104] T. Ueki, T. Kinoshita, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2777.
- [105] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [106] A. Bernhardt, M. Drewello, M. Schutkowski, *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 143–152.
- [107] S. Mourtas, D. Gatos, K. Barlos, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2201–2204.
- [108] V. Diaz-Rodriguez, E. Ganusova, T. M. Rappe, J. M. Becker, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 11266–11274.
- [109] K. Barlos, D. Gatos, S. Eleftheriou, S. Mourtas, C. Tzavara, P. Athanasopoulos, *Bioactive Peptides in Drug Discovery and Design: Medical Aspects*, IOS Press, US, **1999**.
- [110] Q. Sun, X. Li, J. Sun, S. Gong, G. Liu, G. Liu, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 294–300.
- [111] Q. Sun, S. Gong, J. Sun, S. Liu, Q. Xiao, S. Pu, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8417–8426.
- [112] P. Dabrowski-Tumanski, J. Kowalska, J. Jemielity, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 2147–2154.
- [113] S. Warnecke, C. Meier, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024–3030.
- [114] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500–1502.
- [115] F. Cramer, *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 236–249.
- [116] F. Cramer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 173–184.
- [117] F. Cramer, H. Schaller, H. A. Staab, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 1612–1621.
- [118] D. E. Hoard, D. G. Ott, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785–1788.
- [119] G. Gebeyehu, V. E. Marquez, A. Van Cott, D. A. Cooney, J. A. Kelley, H. N. Jayaram, G. S. Ahluwalia, R. L. Dion, Y. A. Wilson, D. G. Johns, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 99–105.
- [120] A. Zatorski, B. M. Goldstein, T. D. Colby, J. P. Jones, K. W. Pankiewicz, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1098–1105.
- [121] M. Kadokura, T. Wada, C. Urashima, M. Sekine, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8359–8362.
- [122] B. K. Feld, G. A. Weiss, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1665–1667.
- [123] H. Tanaka, Y. Yoshimura, M. R. Jørgensen, J. A. Cuesta-Seijo, O. Hindsgaul, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11531–11534.
- [124] J. Jemielity, J. Kowalska, A. M. Rydzik, E. Darzynkiewicz, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 829.

- [125] C. W. West, M. A. Estiarte, D. H. Rich, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1205–1208.
- [126] J. T. Ayers, S. R. Anderson, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 351–358.
- [127] U. T. Rüegg, J. Rudinger, *Methods Enzymol.* **1977**, *47*, 111–116.
- [128] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- [129] P. Pan, H. Bayley, *FEBS Lett* **1997**, *405*, 81–85.
- [130] A. B. Smith, S. N. Savinov, U. V. Manjappara, I. M. Chaiken, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4041–4044.
- [131] M. S. Kim, S. L. Diamond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4007–4010.
- [132] K. M. Ewen, M. Ringle, R. Bernhardt, *IUBMB Life* **2012**, *64*, 506–512.
- [133] A. El-Faham, R. S. Funosas, R. Prohens, F. Albericio, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404–9416.
- [134] D. E. Ehmann, J. W. Trauger, T. Stachelhaus, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 765–772.
- [135] M. Strieker, E. M. Nolan, C. T. Walsh, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13523–13530.
- [136] S. Uhlmann, R. D. Süßmuth, M. J. Cryle, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2586–2596.
- [137] H. Chen, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 301–312.
- [138] H. Chen, B. K. Hubbard, S. E. O'Connor, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 103–112.
- [139] M. J. Cryle, A. Meinhart, I. Schlichting, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 24562–24574.
- [140] C. Zhang, L. Kong, Q. Liu, X. Lei, T. Zhu, J. Yin, B. Lin, Z. Deng, D. You, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56772.
- [141] G. M. Singh, P. D. Fortin, A. Koglin, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11310–11320.
- [142] M. Peschke, C. Brieke, M. J. Cryle, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, DOI 10.1038/srep35584.
- [143] Y. Tapuhi, D. E. Schmidt, W. Lindner, B. L. Karger, *Anal. Biochem.* **1981**, *115*, 123–129.
- [144] C. I. G. Tuberoso, F. Congiu, G. Serreli, S. Mameli, *Food Chem.* **2015**, *175*, 29–35.
- [145] A. Bockhardt, I. Krause, H. Klostermeyer, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 65–70.
- [146] I. Krause, A. Bockhardt, H. Neckermann, T. Henle, H. Klostermeyer, *J. Chromatogr. A* **1995**, *715*, 67–79.
- [147] K. Mopper, D. Delmas, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2557–2560.
- [148] A. Jámbo, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3064–3077.
- [149] S. Einarsson, *J. Chromatogr. A* **1985**, *348*, 213–220.
- [150] J. Kirschbaum, B. Luckas, W.-D. Beinert, *J. Chromatogr. A* **1994**, *661*, 193–199.

- [151] S. Einarsson, B. Josefsson, S. Lagerkvist, *J. Chromatogr. A* **1983**, *282*, 609–618.
- [152] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.
- [153] J. M. Jez, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 890–902.
- [154] F. W. Studier, *Protein Expr. Purif* **2005**, *41*, 207–234.
- [155] S. Fu, X. Fu, S. Zhang, X. Zou, X. Wu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2390–2396.
- [156] P. Friedrich, D. J. Darley, B. T. Golding, W. Buckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3254–3257.
- [157] R. Rabinowitz, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2975–2978.
- [158] J. Juntunen, J. Vepsäläinen, R. Niemi, K. Laine, T. Järvinen, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5083–5086.
- [159] H. Zhao, A. C. Donnelly, B. R. Kusuma, G. E. L. Brandt, D. Brown, R. A. Rajewski, G. Vielhauer, J. Holzbeierlein, M. S. Cohen, B. S. J. Blagg, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3839–3853.
- [160] J. Dufour, L. Neuville, J. Zhu, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10523–10534.
- [161] M. Weitman, K. Lerman, A. Nudelman, D. T. Major, A. Hizi, A. Herschhorn, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 447–467.
- [162] T. Fushimi, H. R. Allcock, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 5349–5355.
- [163] P. Desai, S. S. Pfeiffer, D. L. Boger, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 5047–5050.
- [164] D. Crich, K. Ranganathan, S. Neelamkavil, X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7942–7947.
- [165] T. A. Targel, J. N. Kumar, O. S. Shneider, S. Bar, N. Fridman, S. Maximenko, A. M. Szpilman, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2546–2549.
- [166] J. de Vicente, P. Tivitmahaisoon, P. Berry, D. R. Bolin, D. Carvajal, W. He, K.-S. Huang, C. Janson, L. Liang, C. Lukacs, et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1019–1024.
- [167] M. P. Doyle, R. L. Dow, *Synth. Commun.* **1980**, *10*, 881–888.
- [168] J. L. Meier, A. C. Mercer, H. Rivera, M. D. Burkart, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12174–12184.
- [169] I. Shiina, J. Shibata, R. Ibuka, Y. Imai, T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 113–122.
- [170] D. M. Hodgson, Y. K. Chung, I. Nuzzo, G. Freixas, K. K. Kulikiewicz, E. Cleator, J.-M. Paris, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4456–4462.

- [171] C. Oger, Z. Marton, Y. Brinkmann, V. Bultel-Poncé, T. Durand, M. Graber, J.-M. Galano, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1892–1897.
- [172] J.-M. Cloarec, A. B. Charette, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4731–4734.
- [173] Y. Miura, T. Arai, T. Yamagata, *Carbohydr. Res.* **1996**, *289*, 193–199.
- [174] S. Dixon, X. Wang, K. S. Lam, M. J. Kurth, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7443–7446.
- [175] S. I. Antsyrovich, T. S. Oretskaya, E. M. Volkov, E. A. Romanova, V. N. Tashlitsky, M. Blumenfeld, Z. A. Shabarova, *Nucleos. Nucleot.* **1996**, *15*, 923–936.
- [176] M. Waliczek, M. Kijewska, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Amino Acids* **2015**, *47*, 1353–1365.
- [177] S. Ghosh, G. P. Tochtrop, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1723–1726.
- [178] Y. Wang, J. Fan, D. J. Darensbourg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10206–10210.
- [179] N. A. Pinchukova, A. Y. Voloshko, O. V. Shyshkin, V. A. Chebanov, B. H. P. Van de Kruijs, J. C. L. Arts, M. H. C. L. Dressen, J. Meuldijk, J. A. J. M. Vekemans, L. A. Hulshof, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 1130–1139.
- [180] G. Naturale, M. Lamblin, C. Commandeur, F.-X. Felpin, J. Dessolin, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 5774–5788.
- [181] L. Guo-ping, C. Chun, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1271–1276.
- [182] M. Kirihara, Y. Asai, S. Ogawa, T. Noguchi, A. Hatano, Y. Hirai, *Synthesis* **2007**, *2007*, 3286–3289.
- [183] M. Oba, K. Tanaka, K. Nishiyama, W. Ando, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4173–4177.
- [184] J. Li, Y. Sha, *Molecules* **2008**, *13*, 1111–1119.
- [185] G. Delaittre, T. Pauloehrl, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Macromolecules* **2012**, *45*, 1792–1802.
- [186] M. Erdélyi, V. Langer, A. Karlén, A. Gogoll, *New J. Chem.* **2002**, *26*, 834–843.
- [187] B. J. W. Barratt, C. J. Easton, D. J. Henry, I. H. W. Li, L. Radom, J. S. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13306–13311.
- [188] Y. Wei, B. Rao, X. Cong, X. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9250–9253.
- [189] M. Tsuda, Y. Muraoka, M. Nagai, T. Aoyagi, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 909–920.
- [190] S. G. J. Postma, I. N. Vialshin, C. Y. Gerritsen, M. Bao, W. T. S. Huck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1794–1798.
- [191] A. Paikar, M. Debnath, D. Podder, S. Sasmal, D. Haldar, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4218–4225.
- [192] G. Echue, G. C. Lloyd-Jones, C. F. Faul, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 5118–5128.

8 Anhang

8.1 HPLC-MS-Spuren der durchgeführten CP-Beladungsassays

8.1.1 Keine Beladung im CP-Beladungsassay

Folgende Moleküle führten im CP-Beladungsassay unter Einsatz von ComC-CP-1 und der Sfp-PPTase zu keiner Beladung: **128, 129, 131, 132, 133, 152, 160, 196, 197, 198, 199**. Da die HPLC-MS-Spuren für die mit diesen Molekülen durchgeführten CP-Beladungsassays alle gleich aussahen, wird in Abbildung 28 stellvertretend für diese Moleküle nur die HPLC-MS-Spur von Molekül **198** gezeigt.

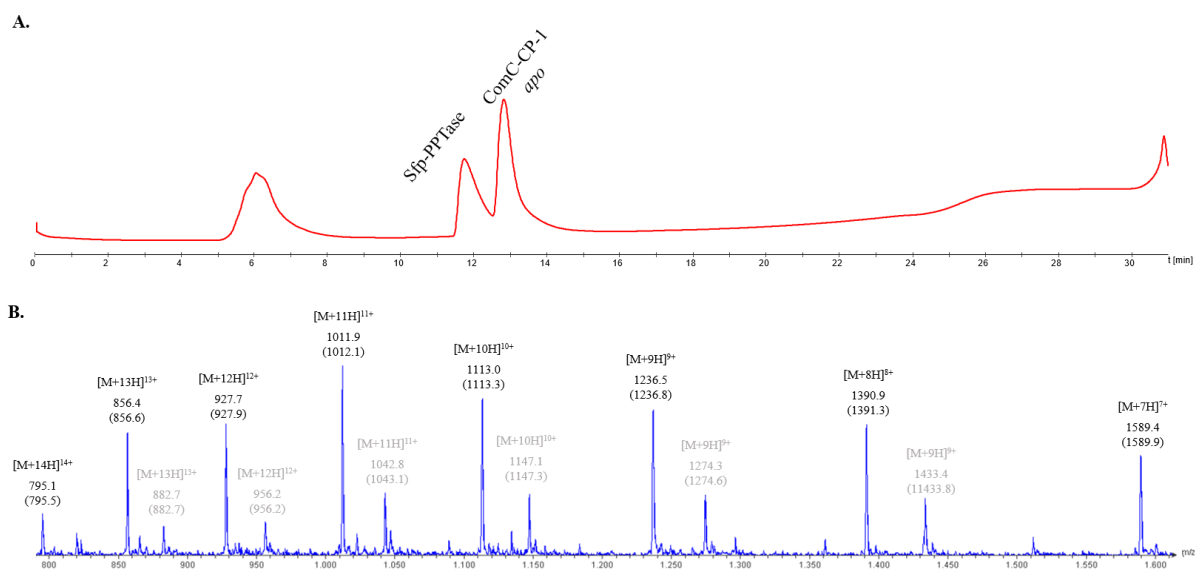


Abbildung 28.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **198** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*apo*-CP-Signals.

Die dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind explizit beschriftet. Die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

8.1.2 Erfolgreiche Beladung im CP-Beladungsassay

Nachfolgend sind die HPLC-MS-Spuren bei erfolgreicher Beladung im CP-Beladungsassay dargestellt. Der Strukturteil der CoA-Derivate, der im CP-Beladungsassay übertragen wurde, ist farblich gekennzeichnet.

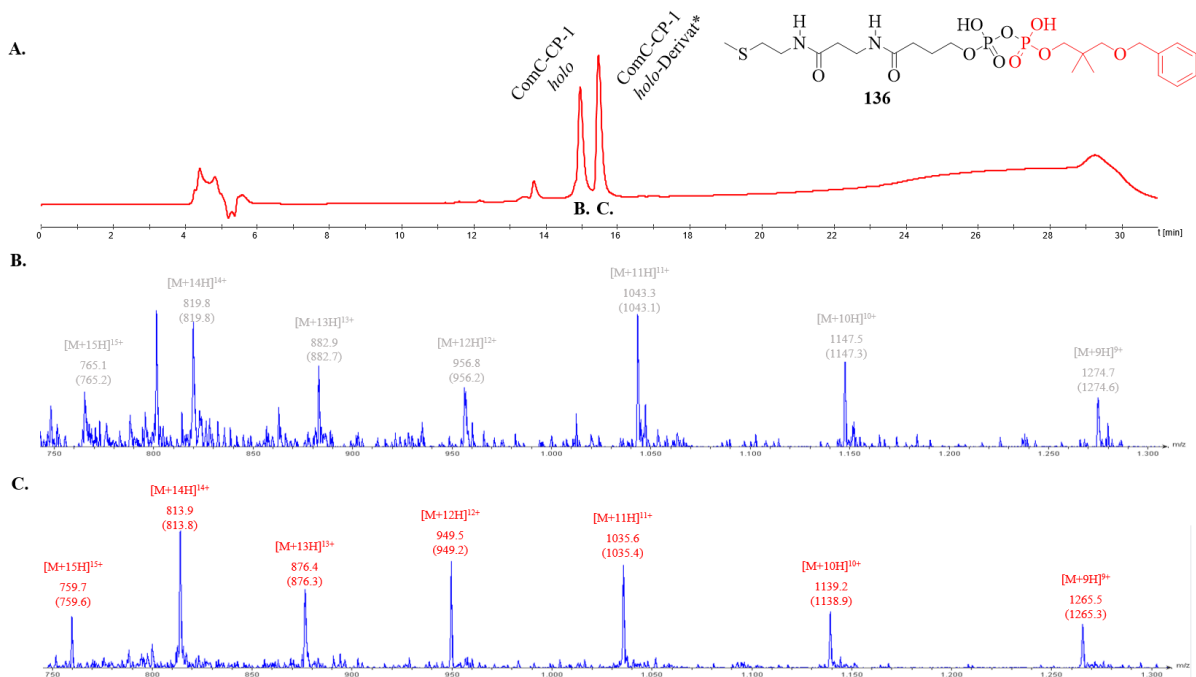


Abbildung 29.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **136** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Signals. **C.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat*-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat* ($M = 11.38$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind rot beschriftet. Die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

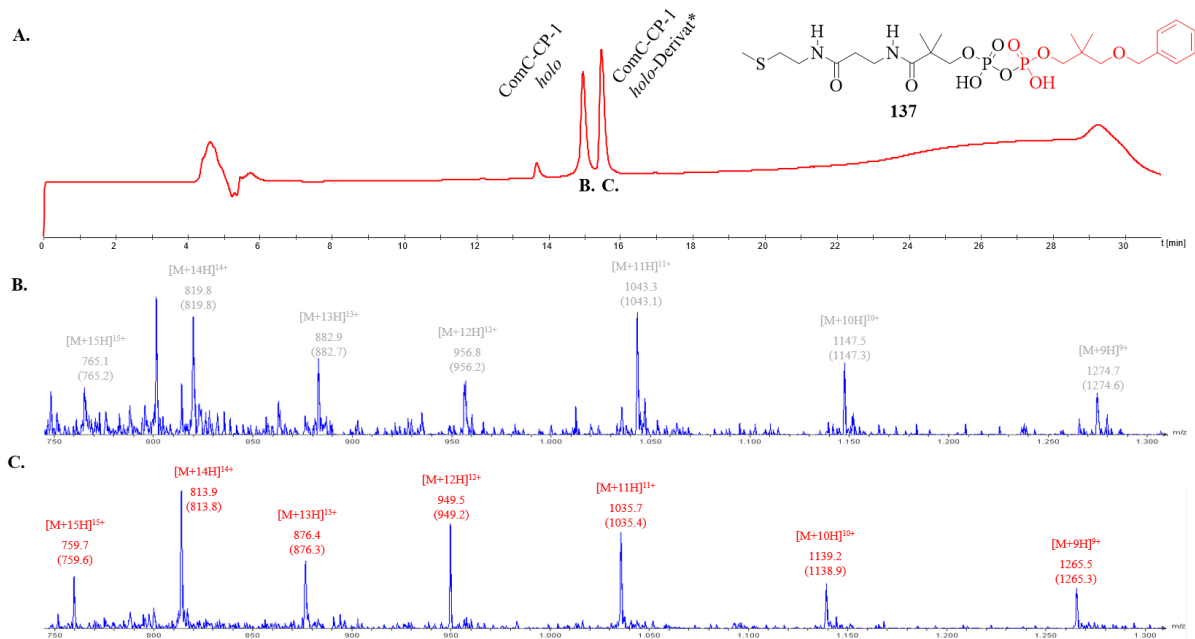


Abbildung 30.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **137** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Signals. **C.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat*-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat* ($M = 11.38$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind rot beschriftet. Die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

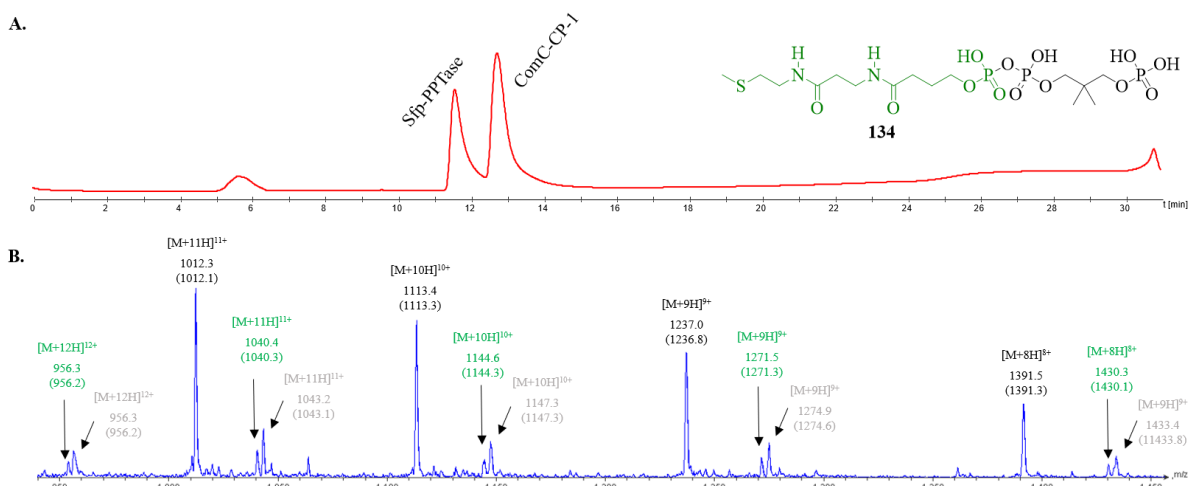


Abbildung 31.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **134** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-CP-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.43$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die schwarz beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) und die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

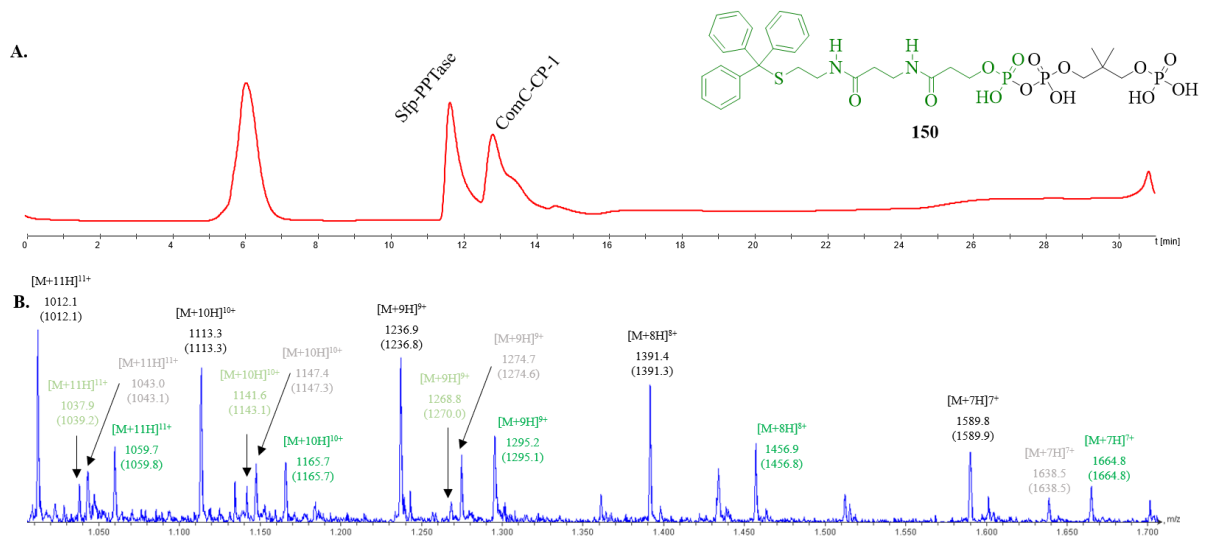


Abbildung 32.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **150** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC CP-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.65$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die hellgrün beschrifteten Ionenpeaks entstehen durch Abspaltung der Tritylgruppe und entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat mit freier Thiolgruppe ($M = 11.42$ kDa). Die schwarz beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) und die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

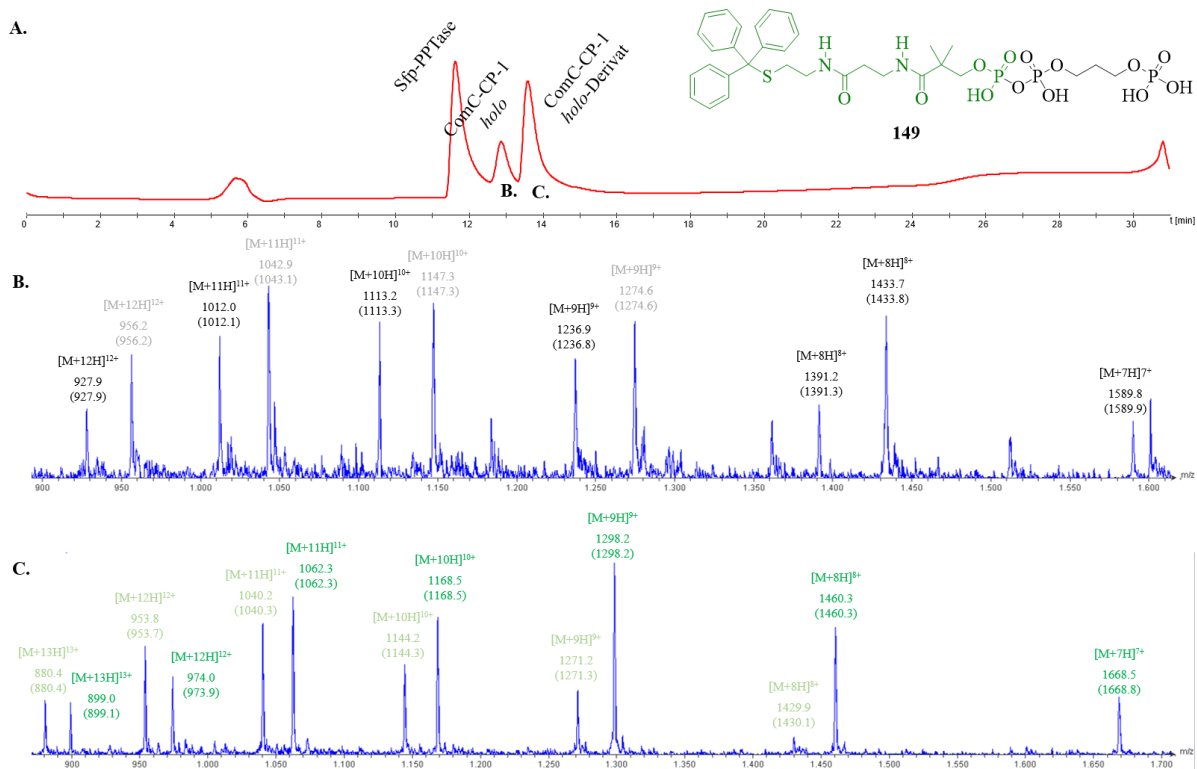


Abbildung 33.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **149** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Signals. **C.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.67$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die hellgrün beschrifteten Ionenpeaks entstehen durch Abspaltung der Tritylgruppe und entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat mit freier Thiolgruppe ($M = 11.43$ kDa). Die schwarz beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) und die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

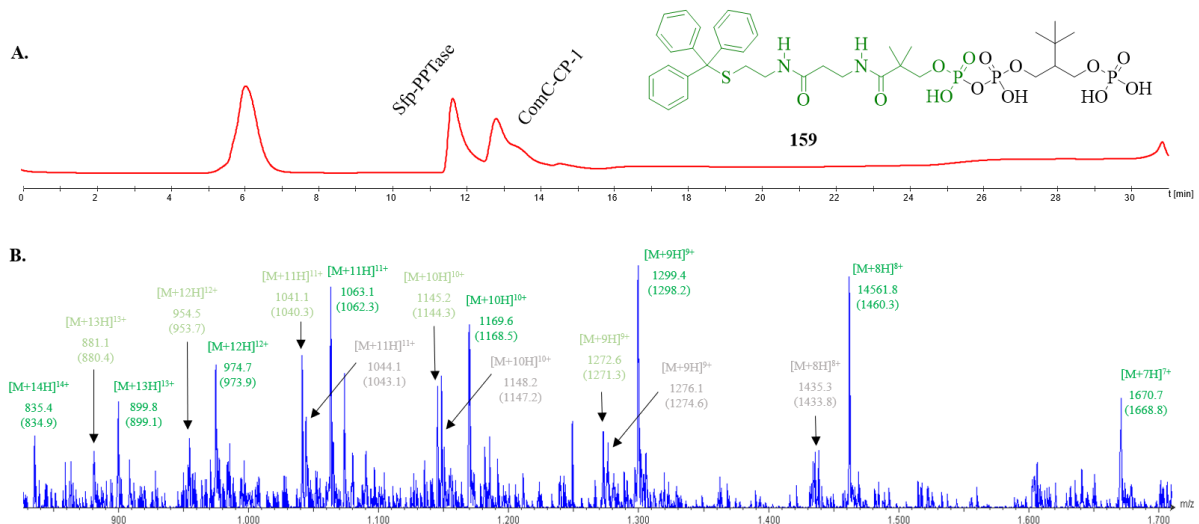


Abbildung 34.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **159** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-CP-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.67$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die hellgrün beschrifteten Ionenpeaks entstehen durch Abspaltung der Tritylgruppe und entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat mit freier Thiolgruppe ($M = 11.43$ kDa). Die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

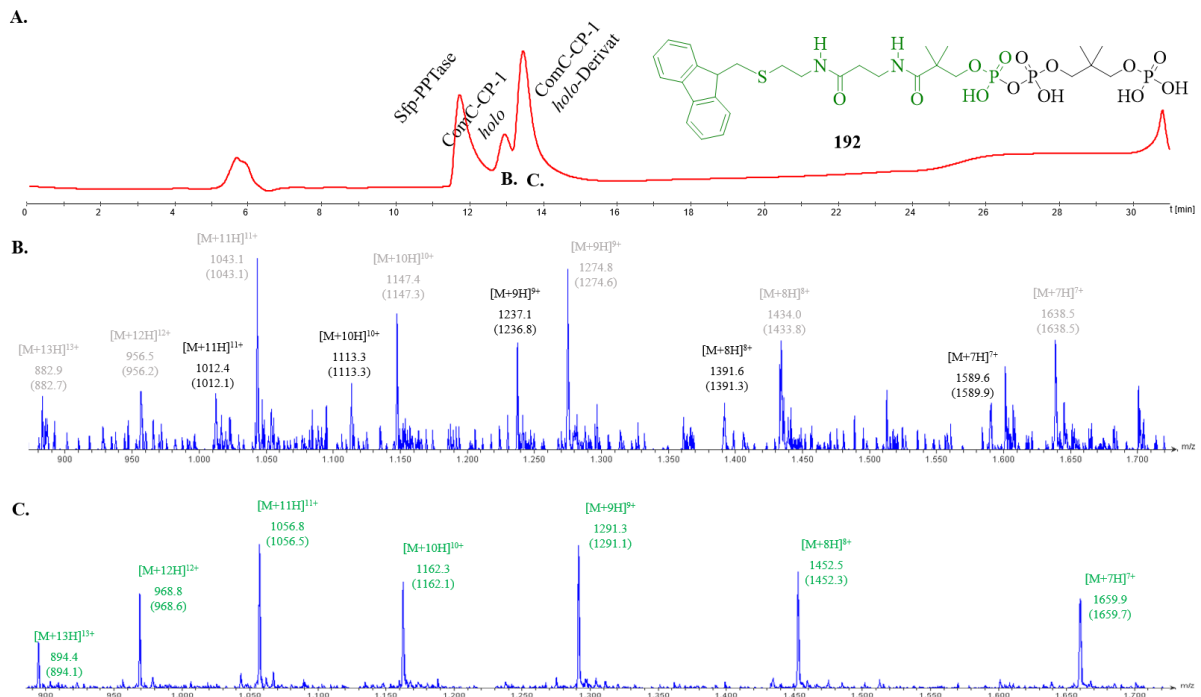


Abbildung 35.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **192** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Signals. **C.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.61$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die schwarz beschrifteten Ionenpeaks entstprechen dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) und die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

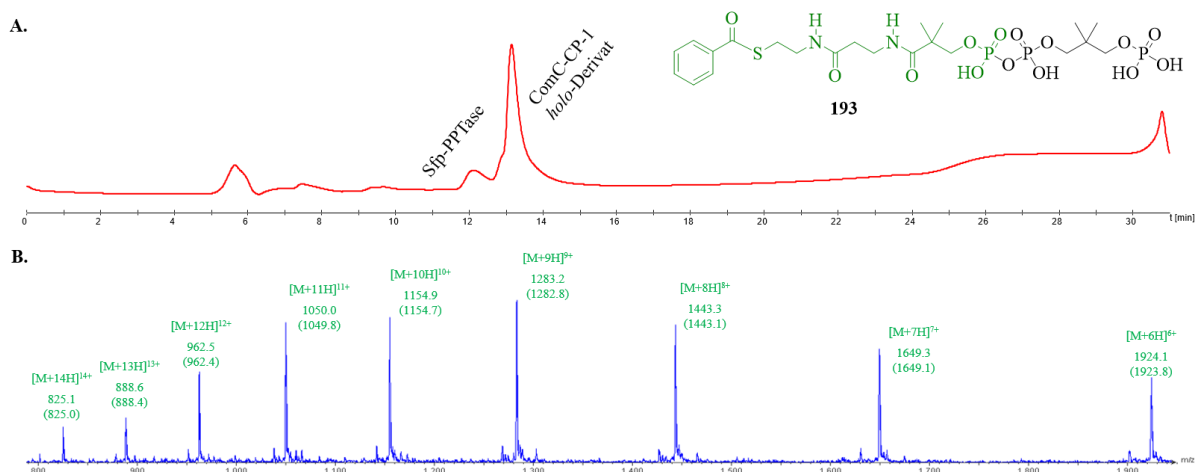


Abbildung 36.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **193** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.54$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

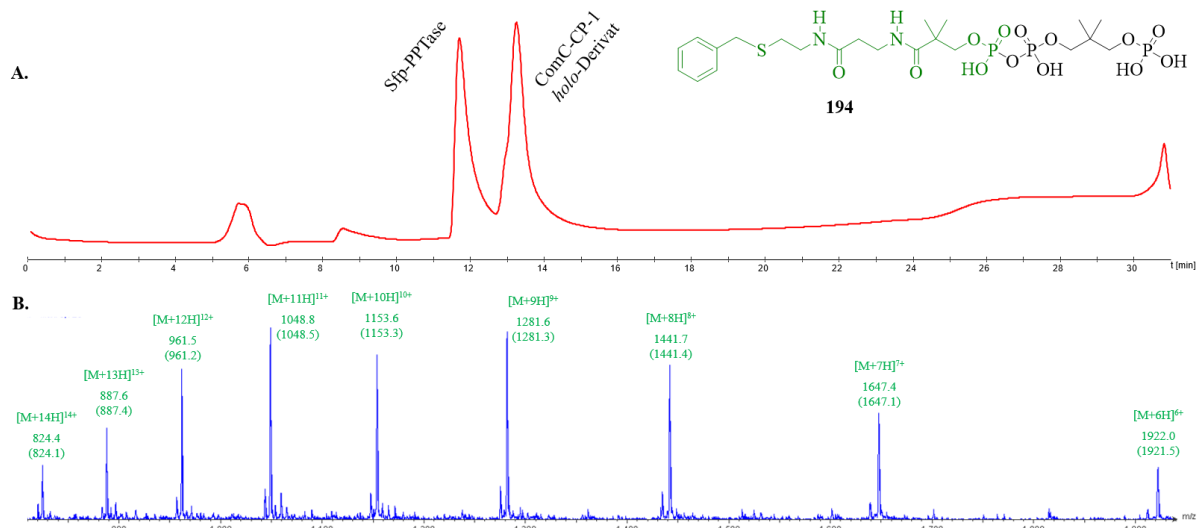


Abbildung 37.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **194** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.52$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

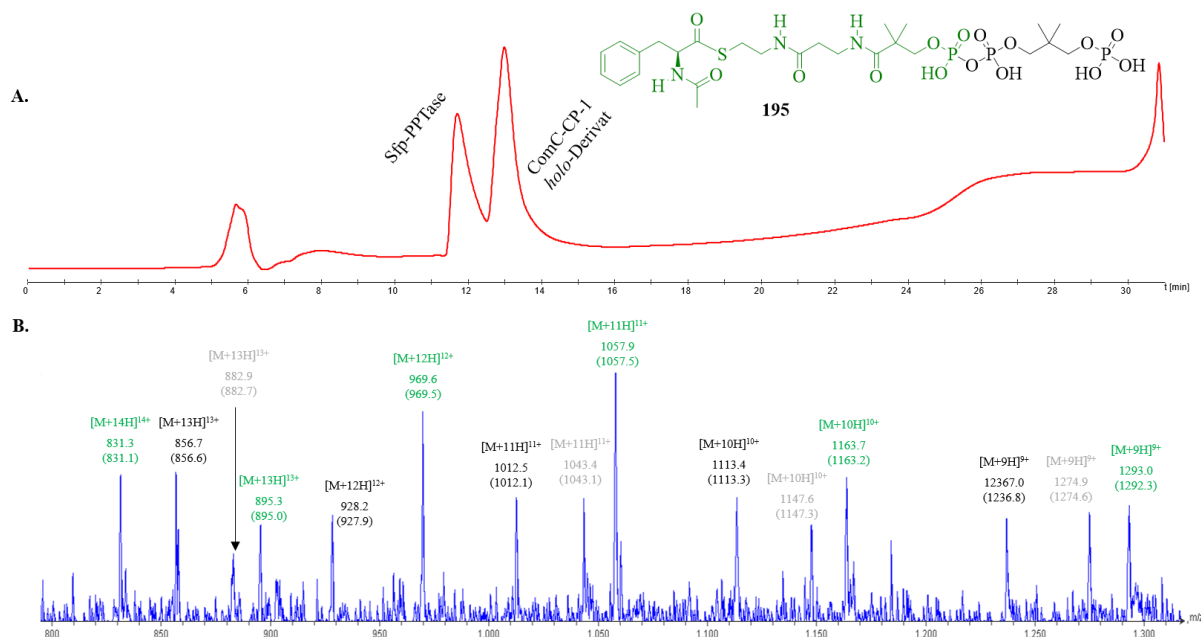


Abbildung 38.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **195** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.62$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die schwarz beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) und die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

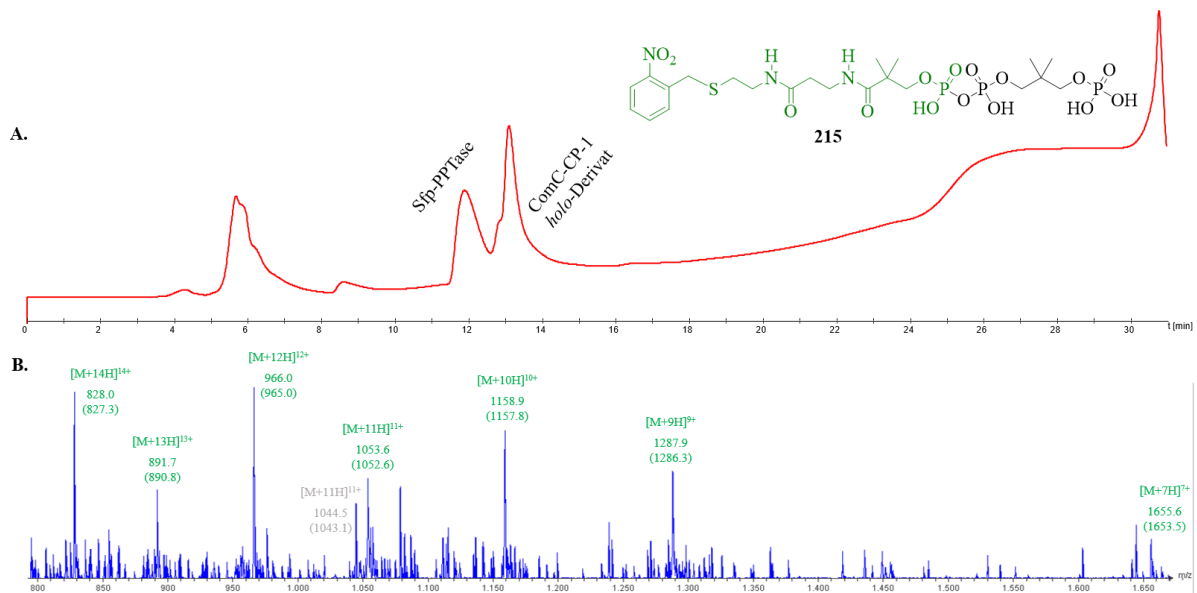


Abbildung 39.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **215** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.57$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

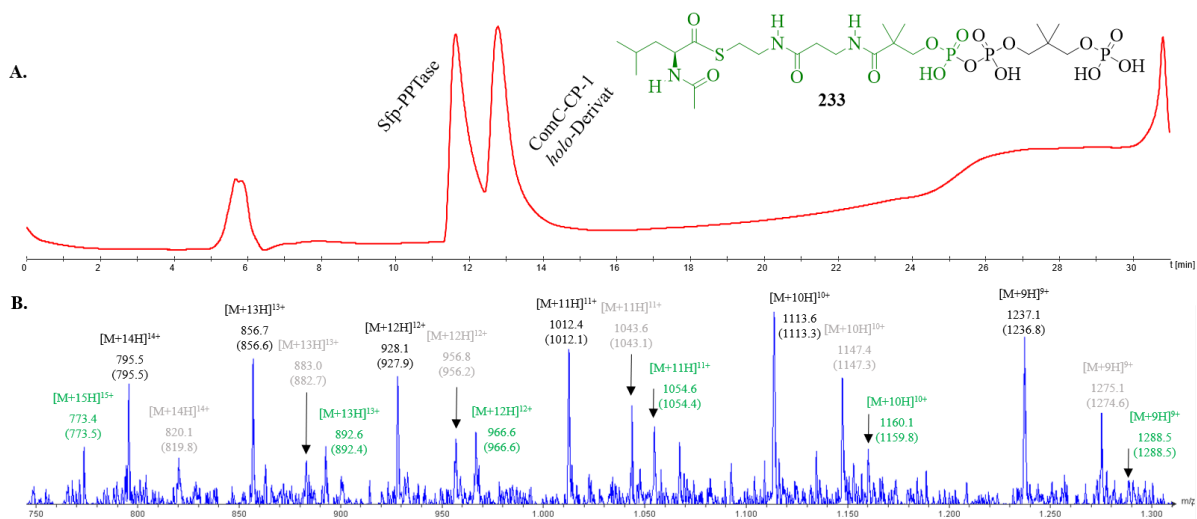


Abbildung 40.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **233** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.59$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die schwarz beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *apo*-ComC-CP-1 ($M = 11.12$ kDa) und die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

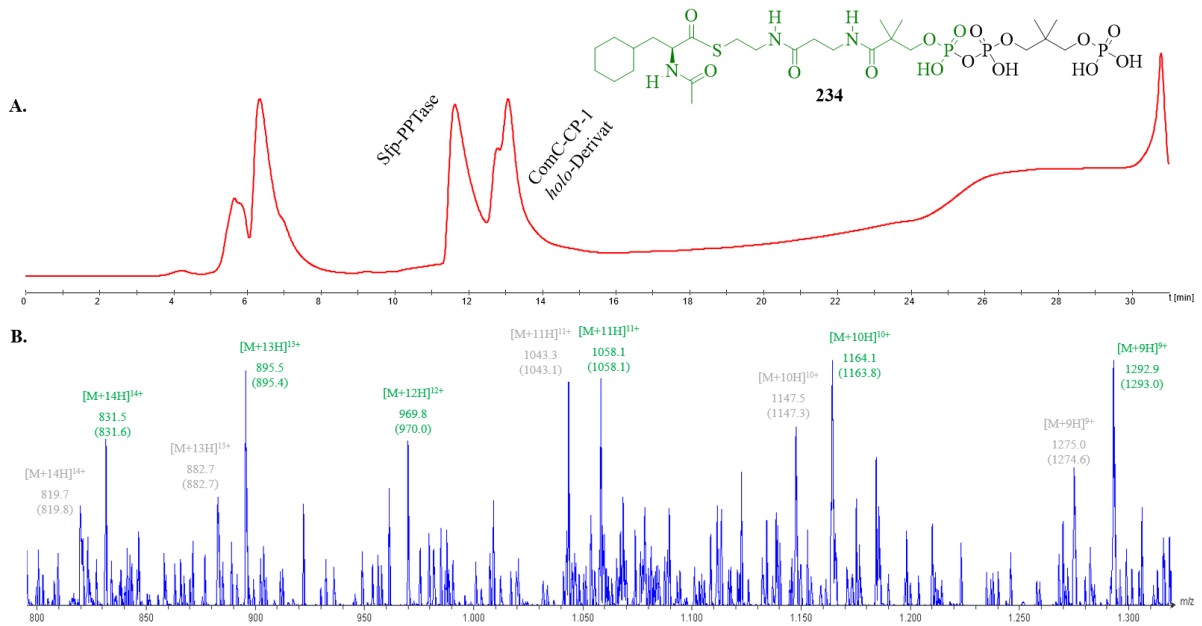


Abbildung 41.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat **234** als Substrat. **B.** MS-Spur des HPLC-*holo*-CP-Derivat-Signals.

Die dem *holo*-ComC-CP-1-Derivat ($M = 11.63$ kDa) entsprechenden mehrfach geladenen Ionenpeaks $[M+nH]^{n+}$ sind grün beschriftet. Die grau beschrifteten Ionenpeaks entsprechen dem *holo*-ComC-CP-1 ($M = 11.46$ kDa), das in geringem Anteil bereits bei der Produktion der Enzyme entsteht. Unter den jeweiligen Ionenpeaks ist die detektierte Masse m/z angegeben und in Klammern die entsprechend berechnete Masse m/z .

8.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenylierungsdomäne
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AT	Acyltransferase
au	atomic units
BnBr	Benzylbromid
BnCl	Benzylchlorid
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
bs	breites Singulett
C	Kondensationsdomäne (engl. condensation-domain)
CoA	Coenzym A
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CD ₃ OD	deutertes Methanol
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbeniumhexafluorophosphat
CP	Carrier-Protein
CSA	Capmpersulphonsäure
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
Dipea	Diisopropylethylamin
dd	Dublett von Dublett
ddd	Dublett von Dublett von Dublett
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO-d ₆	deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
D ₂ O	deutertes Wasser
dq	Dublett von Quartett
dt	Dublett von Triplett
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EI	Elektroenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
Fmoc	Fluorenylmethylenoxy
GDH	Glucosedehydrogenase

HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	H igh p erformance liquid chromatography
HPLC-MS	H igh p erformance liquid chromatography gekoppelt mit M assenspektro-metrie
HRMS	Hochauflösende (h igh resolution) M assenspektrometrie
Hz	Hertz
<i>i</i> -PrNH ₂	Isoproylamin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Kopplungskonstante
KRED	Ketoreduktase
λ	Wellenlänge
m	Multipllett
MPLC	M edium p ressure liquid chromatography
MS	M assenspektrometrie
2-NBB	2-Nitrobenzylbromid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. Nuclear M agnetic R esonance)
NTA	Nitrilotriessigsäure (engl. nitrilotriacetic acid)
p	Quintett
PLP	Pyridoxalphosphat
ppm	parts per million
q	Quartett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium d odecyl sulfate p olyacrylamide g el e lectrophoresis)
t	Tripllett
td	Tripllett von Dublett
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Triflouressigsäure (engl. trifluoro a cetic acid)
THF	T etrahydrofuran
TLC	Dünnschichtchromatographie (engl. t hin l ayer chromatography)
TMS	T etramethylsilan
TMSBr	Bromotrimethylsilan

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Struktur des nicht-ribosomal produzierten Glycopeptid-Antibiotikums Vancomycin (8).....	3
Abbildung 2. 3D-Struktur des Komplexes zwischen Sfp-PPTase und CoA (11).....	9
Abbildung 3. Das Katalysezentrum der Sfp-PPTase bei Anwesenheit von Coenzym A (11)	10
Abbildung 4. <i>In-silico</i> -Modellierungsstudien der aktiven Serin-Gruppe (S45) des CPs	11
Abbildung 5. Struktur des Coenzym A (11)	12
Abbildung 6. Struktur des SNAC-Thioesters 36.....	16
Abbildung 7. Modularer Aufbau der CoA-Derivate.	21
Abbildung 8. Diphosphorylierte Derivate 58 und 59	23
Abbildung 9. Produkt 60 und Nebenprodukt 70 der Dimethylphosphat-Entschützung	28
Abbildung 10. Mit der erarbeiteten Synthesemethode zugängliche Phosphopantethein-Derivate	33
Abbildung 11. Erste Generation an Coenzym A-Derivaten 129-134.	42
Abbildung 12. CoA-Derivate 136 und 137 mit terminaler aromatischer Gruppe.....	43
Abbildung 13. SDS-PAGE-Gele einer erfolgreichen Proteinaufreinigung A. der PPTase Sfp (27.20 kDa) und B. der CP-Domäne ComC-CP-1 (11.12 kDa).....	44
Abbildung 14. A. HPLC-Spur einer Negativ-Kontrolle des CP-Beladungsassays. B. MS-Spur des HPLC-CP-Signals der Negativ-Kontrolle. C. MS-Spur des HPLC-CP-Signals der Positiv-Kontrolle mit CoA (11).	45
Abbildung 15.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 130 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals.....	48
Abbildung 16. A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 151 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Signals. C. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -Derivat-CP-Signals.	51
Abbildung 17. CoA-Derivate 159 und 160 mit konformativ eingeschränkten Diphosphat-Bausteinen.	53
Abbildung 18. Abstufung der Diphosphat-Bausteine nach ihrem Potential als Mimetikum in CoA-Derivaten zu dienen.	53
Abbildung 19. Unterschiedliche aromatische Substituenten für den S-Terminus.....	54
Abbildung 20. Überblick über die Derivate 192-199 mit modifizierter Thiol-Einheit.	58
Abbildung 21. Nebenprodukt 208 der Peptidkupplung zwischen Disulfid 200 und Molekül 207.....	61
Abbildung 22. SDS-PAGE-Gel der SalD-Proteinproduktion	71
Abbildung 23. SDS-PAGE-Gel der Proteinaufreinigung der A. Adrenodoxin-Reduktase AdR (M = 52.99 kDa) und B. Adrenodoxin AdX (M = 14.07 kDa).	72

Abbildung 24. SDS-PAGE-Gel der Proteinaufreinigung des SalB-CPs (M = 44.37 kDa). ...	73
Abbildung 25. A. HPLC-Spur von <i>apo</i> -SalB-CP in Assaypuffer. B. MS-Spur des HPLC- <i>apo</i> -SalB-CP-Signals.....	75
Abbildung 26. Abstufung der Diphosphat-Bausteine (Modul 3) nach ihrem Potential als Nucleosid-Mimetika in CoA-Derivaten zu dienen.....	80
Abbildung 27. Referenz-Marker für die SDS-PAGE.....	101
Abbildung 28.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 198 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>apo</i> -CP-Signals.	251
Abbildung 29.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 136 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Signals. C. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat*-Signals.	252
Abbildung 30.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 137 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Signals. C. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat*-Signals.	253
Abbildung 31.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 134 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC-CP-Signals.	253
Abbildung 32.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 150 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC CP-Signals.....	254
Abbildung 33.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 149 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Signals. C. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals... ..	255
Abbildung 34.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 159 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC-CP-Signals.	256
Abbildung 35.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 192 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Signals. C. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals... ..	257
Abbildung 36.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 193 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals.....	257
Abbildung 37.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 194 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals.....	258
Abbildung 38.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 195 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals.....	258
Abbildung 39.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 215 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals.....	259
Abbildung 40.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 233 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals.....	259
Abbildung 41.A. HPLC-Spur des CP-Beladungsassays mit CoA-Derivat 234 als Substrat. B. MS-Spur des HPLC- <i>holo</i> -CP-Derivat-Signals.....	260

8.4 Schemataverzeichnis

Schema 1. Beispiele für industrielle enzymatische Prozesse.....	2
Schema 2. Schematische Darstellung eines NRPS-Moduls.....	4
Schema 3. NRPS des Siderophors Pyochelin.....	5
Schema 4. Postulierter Mechanismus zur Bildung der β -Lactam-Struktur.....	6
Schema 5. Aktivierung der Carrier-Proteine.....	7
Schema 6. Biosynthese von CoA (11).....	12
Schema 7. Darstellung des Pantethein-4'-phosphats (25).....	13
Schema 8. Darstellung des Coenzym A (11) nach J. G. Moffatt und H. G. Khorana.	14
Schema 9. Diphosphatkupplung.....	14
Schema 10. Beispiel einer chemoenzymatischen Synthese.....	15
Schema 11. Die geplanten Vereinfachungen der CoA-Struktur (11).....	18
Schema 12. Retrosynthese-Strategie zur Darstellung vereinfachter CoA-Derivate 37.....	19
Schema 13. Die PKS-NRPS-Maschinerie, die für die Synthese des Naturstoffs Salinosporamid A (45) in <i>Salinispora tropica</i> verantwortlich ist.	20
Schema 14. Zu untersuchende Reaktion der SalD-Hydroxylase.....	20
Schema 15. Synthese des Dipeptids 49.....	21
Schema 16. Synthese der Phosphatsäuren 54 und 55.....	22
Schema 17. Synthese der Phosphopantethein-Derivate 56 und 57.	23
Schema 18. Umesterung von 58 zum Benzylphosphatester.....	24
Schema 19. Test der Umesterungs-Methode am Phosphopantethein-Derivat 56.....	25
Schema 20. Alternative Retrosynthese-Strategie mit einer Diphosphat-Substitutionsreaktion als Schlüsselschritt.	26
Schema 21. Synthese der Diophosphat-Derivate 60 und 72.....	28
Schema 22. Synthese der Phosphatsäuren 79 und 80.....	29
Schema 23. Synthese der Phosphopantethein-Derivate 61 und 83.....	29
Schema 24. Die kommerziell erworbenen Lactone 84 und 85 sowie die Entfernung der Hydroxylgruppe aus Lacton 85.	30
Schema 25. Nukleophile Lactonöffnung und anschließende Phosphorylierung.....	30
Schema 26. Lactonöffnung mit Methanol.....	31
Schema 27. Synthese der Phosphatsäure 101.....	32
Schema 28. Synthese der Phosphopantethein-Derivate 102 und 103.....	33
Schema 29. Synthese der einfachen Moleküle 104 und 106 zum Testen der Diphosphat-Substitutionsreaktion.....	34
Schema 30. Test der Diphosphat-Substitutionsreaktion anhand der Moleküle 104 und 106..	35

Schema 31. Synthese eines Panethein-Derivats 111 mit terminaler Bromidgruppe.....	35
Schema 32. Test der Diphosphat-Substitutionsreaktion	36
Schema 33. A. Mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol als Harzmaterial. B. Harz- Aktivierung.....	37
Schema 34. Synthese von <i>N</i> -Fmoc-Cysteamin (116) und <i>N</i> -Fmoc- β -Alanin (117).	37
Schema 35. Festphasen-Synthesen unter Einsatz der Diphosphat-Substitutionsreaktion.....	38
Schema 36. Entschützung der Phosphaatgruppe am Synthesebaustein 106.....	39
Schema 37. Optimierte Synthese der Diphosphat-Kupplung.....	41
Schema 38. Synthese des Monphosphat-Bausteins 135.....	42
Schema 39. Synthese des <i>S</i> -tritylierten Dipeptids 140.	49
Schema 40. Synthese der <i>S</i> -tritylierten Phosphopantethein-Derivate 145-148.....	49
Schema 41. Synthese der konformativ eingeschränkten Diphosphat-Bausteine	52
Schema 42. Synthese des Dipeptids 168.....	55
Schema 43. Synthese von <i>N</i> -Boc-Cysteamin (169).	55
Schema 44. Synthese des Dipeptids 173.....	55
Schema 45. Synthese der Dipeptide 185-187.....	56
Schema 46. Synthese der Phosphoantethein-Derivate 188-191.....	57
Schema 47. Synthese des Disulfids 212.....	59
Schema 48. Synthese des Molekülteils 207.	60
Schema 49. Synthese des Phosphopantethein-Derivats 209.....	61
Schema 50. Synthese des CoA-Derivats 215.	62
Schema 51. Geplante Studien der SalD-Reaktion.....	64
Schema 52. Für die SalD-Reaktion notwendiges Elektronendonator-System.....	65
Schema 53. Synthese der für die SalD-Reaktion relevanten CoA-Derivate 233 und 234.	67
Schema 54. Synthese der SNAC- und CoA-Derivate (239-241 und 242-244).....	69
Schema 55. Aktivierung der Carrier-Proteine.....	77
Schema 56. A. Entwickelte modulare Synthesroute zur Darstellung von CoA-Derivaten. B. Synthese der besten Derivatstruktur 151 mit der optimalen Substruktur (grün).....	79
Schema 57. Zu untersuchende Reaktion der SalD-Hydroxylase am Beispiel der L-Aminosäure Cyclohexylalanin.....	81

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Zusammenfassung der getesteten Methoden zur Phosphatentschützung.....	24
Tabelle 2. Zusammenfassung der getesteten Reaktionsbedingungen zur Phosphorylierung mit Dimthethylphosphorochloridat.....	27
Tabelle 3. Zusammenfassung der CP-Beladungsassay-Ergebnisse mit der ersten Generation von CoA-Derivaten.	46
Tabelle 4. Zusammenfassung der CP-Beladungsassay-Ergebnisse mit der zweiten Generation von CoA-Derivaten 149-152.....	50
Tabelle 5. Zusammenfassung der getesteten Expresssionsbedingungen zur Produktiono der SalD-Hydroxylase.	70
Tabelle 6. Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten SalD-Hydroxylierungsassays.	74
Tabelle 7. Verwendete Vektoren.....	90
Tabelle 8. Verwendete Organismen.	90
Tabelle 9. Zusammensetzung des ZYM-5052 Autoinduktionsmediums.....	92
Tabelle 10. Autoklavierte Komponenten des ZYM-5052 Autoinduktionsmediums.	92
Tabelle 11. Restlichen Bestandteile der 1000 x Spurenelementen-Lösung für das ZYM-5052 Autoinduktionsmedium.....	92
Tabelle 12. Zusammensetzung des SOC-Mediums.	93
Tabelle 13. Zusammensetzung des Lysispuffer, der Waschpuffer und des Elutionspuffers. .	93
Tabelle 14. Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE.	94
Tabelle 15. Konzentrationen der verwendeten Antibiotika und Zusätze.	94
Tabelle 16. Übersicht der spezifischen Parameter für die heterologe Proteinproduktion.....	97
Tabelle 17. Zusammensetzung eiens SDS-PAGE-Trenngels.	100
Tabelle 18. Zusammensetzung eines SDS-PAGE-Sammelgels.....	100