



# **Synthese amöbischer Lipidantigene zur T-Zell-Immunistimulation**

**Dissertation**

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

**Frederic Ting**

aus Coesfeld

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

**Hamburg 2018**



Die Druckfreigabe für diese Arbeit wurde am 23.11.2018 durch das Studienbüro des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg erteilt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von Juli 2013 bis August 2018 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Datum der Disputation: 23.11.2018



# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
4	Kenntnisstand	8
4.1	Infektionskrankheiten	8
4.1.1	Amöbiasis	8
4.1.2	Leishmaniose	8
4.1.3	Tuberkulose	10
4.2	Antigenpräsentation	11
4.3	Stimulation von iNKT-Zellen	12
4.4	Lipidantigene von der Oberfläche von <i>Entamoeba histolytica</i>	14
4.5	Stereochemie von Inositolen	17
4.6	Nomenklatur von <i>myo</i> -Inositolen	18
4.7	Synthese von Phosphatidylinositolen	19
5	Aufgabenstellung	26
6	Resultate und Diskussion	28
6.1	Synthese der Generation I-EhPI-Analoga	29
6.1.1	Synthese des racemischen Diols ( <i>rac</i> )- <b>23</b>	30
6.1.2	Synthese der Bausteine D- <b>22</b> und L- <b>22</b>	33
6.1.3	Synthese der Glycerinderivate ( <i>R</i> )- <b>21</b> und ( <i>S</i> )- <b>21</b>	45
6.1.4	Kupplung zum Phosphatidylinositol	47
6.1.5	Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen	74
6.1.6	Synthese über PMB-geschützte <i>myo</i> -Inositole	86
6.2	Synthese von Generation-II-EhPIb-Analoga	90
6.2.1	Synthese von Generation-II-EhPIb-Analoga mit zwei C <sub>16</sub> -Ketten	90
6.2.2	Synthese von Generation-II-EhPIb-Derivaten mit anderen Kettenlängen	96
6.3	Synthese von Generation-III-EhPIb-Analoga	106
6.3.1	Synthese der Vorläufer <b>100</b> und <b>101</b> und Kupplung zum Dialkyl-EhPI <b>102</b>	107

6.3.2	Evaluierung der Hydrolysestabilität von Generation-III-EhPIb-Analoga	112
6.3.3	Versuch der Synthese wasserlöslicher EhPIb-Analoga	113
6.4	Biologische Evaluierung	118
6.4.1	Hämolyse-Assay	120
6.4.2	Zytotoxizität	121
6.4.3	Zytokinexpressionsassays	127
6.4.4	Anti- <i>Leishmania-major</i> -Aktivitätsassays	132
6.4.5	Anti- <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Aktivitätsassay	134
7	Experimenteller Teil	137
7.1	Allgemeines	137
7.1.1	Edukte und Reagenzien	137
7.1.2	Lösungsmittel	137
7.1.3	Deuterierte Lösungsmittel	137
7.1.4	Absolute Lösungsmittel	138
7.1.5	Chromatographie	139
7.1.6	Spektroskopie und Massenspektrometrie	140
7.1.7	Weitere Geräte	141
7.1.8	Immunbiologische Arbeiten	141
7.2	Immunbiologische Assays	144
7.2.1	Zellbiologische Methoden	144
7.2.2	Zellbiologische Assays und Pathogen-Testssysteme	146
7.3	Synthesen	150
7.3.1	Allgemeine Versuchsvorschriften	150
7.3.2	Synthese der Generation-I-PIs	151
7.3.3	Synthese der Generation-II-PIs	190
7.3.4	Synthese der Generation-III-PIs	205
8	Literatur	217
9	Anhang	226

## Abkürzungsverzeichnis

9AA	9-Aminoacridin
abs.	absolut/absolutiert
add.	aufgefüllt auf
ALA	Amöbischer Leberabszess
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: <i>antigen presenting cell</i> )
ber.	berechnet
bidest	zweifach destilliert
BMM	Knochenmarksmakrophagen (engl.: <i>bone marrow microenvironment</i> )
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	Albumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i> )
BTT	5-(Benzylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol
ca.	circa
camph	camphanoyl-
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CFU	koloniebildende Einheit (engl.: <i>colony forming unit</i> )
d	Dublett
DAN	1,5-Diaminonaphthalen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
Dhept	Dublett von Heptetts
DIPA	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid

dq	Dublett von Quartetts
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EhLPPG	Lipopeptidophosphoglykan von <i>E. histolytica</i>
EhPI	Phosphatidylinositol von <i>E. histolytica</i>
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
f.	folgende
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: <i>Fluorescent activated cell sorting</i> )
<i>fast</i>	während der chromatographischen Reinigung zuerst eluiertes Isomer
FCS	Durchflusszytometrie-Standard (engl.: <i>flow cytometry standard</i> )
gDNA	genomische DNA
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
gew-%	Gewichtsprozent, Massenanteil
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl.: <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iNKT	invariante Natürliche Killer-T-Zelle (engl.: <i>invariant natural killer T cell</i> )
Kap.	Kapitel
Kat	Kation
konz.	Konzentriert
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>

M	molar
m	meta
MACS®	Magnetische Zellseparation (engl.: <i>magnet-activated cell sorting</i> )
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl.: <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute(n)
<i>mix</i>	Gemisch (von Diastereomeren)
MOI	Multiplizität der Infektion (engl.: <i>multiplicity of infection</i> )
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
neg.	negative Quellenspannung
NTD	vernachlässigte Tropenkrankheit (engl.: <i>neglected tropical disease</i> )
o	ortho
p	para
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert (engl.: <i>probability value</i> )
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )
PEG	Polyethylenglykol
pent	Pentett
PI	Phosphatidylinositol
Piv	Pivaloyl
PMB	<i>para</i> -methoxybenzyl
pos.	positive Quellenspannung
PRR	Mustererkennungsrezeptor (engl.: <i>pattern recognition receptor</i> )

q	Quartett
quint	Quintett
<i>rac</i>	Racemat/racemisch
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rt	Raumtemperatur
s	Singlett
sept	Septett
sext	Sextett
<i>slow</i>	während der chromatographischen Reinigung zuletzt eluiertes Isomer
SG	Schutzgruppe
spp.	Spezies (Mehrzahl)
t	Triplett
Tb	Tuberkulose
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor (engl.: <i>T cell receptor</i> )
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl.: <i>toll like receptor</i> )
TMB	3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor (engl.: <i>tumor necrosis factor</i> )
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween®	Diamond Vitamin Tween 80 Lösung
UV	Ultraviolettstrahlung
vgl.	vergleiche
wässr.	wässrig(e)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World Health Organization</i> )

## 1 Zusammenfassung

Das Immunsystem nimmt bei der Bekämpfung von Krankheiten aller Art eine Schlüsselrolle ein. Immunstimulanzien ermöglichen dabei in vielen Fällen breite Behandlungsmöglichkeiten. Insbesondere Infektionskrankheiten lassen sich so therapieren, indem entweder das Immunsystem zur Bekämpfung des Erregers aktiviert oder im Zuge einer Impfung Immunstimulanzien als Adjuvans-Hilfsstoffe eingesetzt werden. Letztere bieten neben dem therapeutischen auch einen wirtschaftlichen Vorteil.

Phosphatidylinositole sind Bausteine verschiedener Makromoleküle, die sich auf der Oberfläche von Fremdkörper- und Eigenzellen befinden. Sie bestehen aus einem *myo*-Inositol- und einem Glycerin-Grundbaustein. Nach Erkennung durch Immunzellen, wie den iNKT-Zellen, werden sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunabwehr aktiviert und der Erreger daraufhin bekämpft. Im Fall der Phosphatidylinositole EhPIa und EhPIb, welche auf der Oberfläche des protozoischen Parasiten *E. histolytica* gefunden wurden, konnten bereits iNKT-Zell-vermittelte immunstimulatorische Aktivitäten nachgewiesen werden.<sup>[1]</sup> Allerdings konnten dabei keine Aussagen über die Absolutkonfigurationen der sieben im Molekül befindlichen Stereozentren beider Verbindungen gemacht werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Methode zu entwickeln, verschiedenartige enantiomerenreine Derivate von EhPIb totalsynthetisch zugänglich zu machen. Dafür wurden verschiedene Derivate synthetisiert und hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität bei der Stimulierung von iNKT-Zellen und zur Bekämpfung von mit *L. major* sowie *M. tuberculosis* infizierten Zellen charakterisiert.

Zunächst erfolgte die Darstellung der sog. „Generation-I-EhPIb-Analoga“ über eine konvergente Syntheseroute, bei der zunächst zwei *myo*-Inositol-Enantiomere zugänglich gemacht wurden. Die beiden Glycerin-Bausteine wurden durch einen synthetischen Trick *ex-chiral-pool* aus einem einzigen chiralen Naturstoff synthetisiert. Die so hergestellten Vorläufer konnten dann in Phosphoramiditchemie-vermittelten Kupplungsschritten miteinander verknüpft werden. Aus der Kombination der zwei Glycerin- und der zwei *myo*-Inositol-Bausteine konnten so vier Stereoisomere synthetisiert werden, die zwei diastereomere Enantiomerenpaare bilden.

Darauf aufbauend sollten in einem zweiten Ansatz stereochemisch vereinfachte Phosphatidylinositole dargestellt werden. Bei diesen „Generation-II-EhPI-Analoga“ wurde die *sn*-2-OH-Gruppe des Glycerin-Bausteins durch ein H-Atom ersetzt, wodurch sich durch die Entfernung des Stereozentrums am Glycerin-Bausteins eine Vereinfachung der Synthese ergab. Sowohl die Analoga der Generation I, als auch der Generation II wurden daraufhin hinsichtlich ihrer immunbiologischen Aktivität getestet. Insbesondere das Generation-I-Stereoisomer mit

einem 1D-konfigurierten *myo*-Inositol-Teil und einem (2'R)-konfigurierten Glycerinbaustein, also der in der Natur am häufigsten vorkommenden Konfiguration, zeigte hierbei eine besondere Aktivität in der Stimulation von iNKT-Zellen. Ein weiteres Stereoisomer zeigte bei der Unterdrückung von mykobakteriellem Wachstum von *M. Tuberculosis* ein signifikantes Ergebnis.

Um die Flexibilität der Syntheseroute zu erproben, wurden auch Generation-II-EhPI-Analoga mit unterschiedlich langen Acylketten synthetisiert. Im Zuge dessen wurden Verbindungen mit den Kettenlängen C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>16</sub> und C<sub>28</sub> hergestellt.

In einer dritten Phase sollten Derivate mit einer höheren metabolischen und hydrolytischen Stabilität hergestellt werden. Dies konnte durch den Austausch der Esterfunktionen an den Positionen 2 und 3' durch Etherfunktionen erreicht werden. Eine Verbesserung der Hydrolysestabilität dieser als „Generation-III-EhPI-Analoga“ bezeichneten Verbindungen konnte daraufhin untersucht und bestätigt werden.

In einer vierten Phase sollte die Wasserlöslichkeit der Generation-III-EhPI-Analoga erhöht werden. Dies wurde durch die Einbringung geschützter hydrophiler Gruppen in den *myo*-Inositolbaustein erreicht. Allerdings konnte dieser Ansatz aufgrund der starken Veränderung der Hydrophilie synthetisch nicht beendet werden.

Wie oben beschrieben, konnte im Zuge dieser Arbeit eine allgemeine und flexible Totalsyntheseroute für unterschiedliche EhPIb-Analoga entwickelt werden. Weiterhin wurde die immunbiologische Aktivität aller synthetisierten Verbindungen bestätigt, wobei insbesondere zwei Stereoisomere besonders signifikante Ergebnisse lieferten. Eine Verwendung als immunstimulierendes Therapeutikum, beispielsweise als Adjuvans, ist also möglich und erfordert weitere klinische Tests und Bewertungen.

## 2 Summary

The immune system has a key role in fighting any kind of disease. Immune stimulants therefore give the opportunity to act as broad therapeutics. Infectious diseases in particular profit from being treated by immunostimulatory drugs through fighting the pathogen itself or acting as vaccine adjuvants. The latter are therapeutically advantageous as well as economically.

Phosphatidylinositols are parts of macromolecules located on the surface of foreign or self cells. They consist of a *myo*-inositol and a glycerol part. After being recognized by immune cells like iNKT cells the innate and adapted immune response will be activated and the pathogen will be combatted. In the case of the phosphatidylinositols EhPIa and EhPIb, which can be extracted from the surface of the protozoon parasite *E. histolytica*, the immunestimulatory activity could already been proven.<sup>[1]</sup> Unfortunately the stereochemistry of the seven stereo centres of each of the found natural products could not be determined.

The objective of this thesis from there was to develop a method for the total synthesis of various enantiomeric pure derivatives of EhPIb. For this reason, different derivatives were synthesized and immunobiologically evaluated in terms of cell toxicity, their ability to activate iNKT cells and to fight infections of *L. major* and *M. tuberculosis*.

First, in order to prepare the so-called generation-I-analogs two *myo*-inositol enantiomers were synthesized following a convergent route. Then two enantiomeric glycerol precursors were synthesized *ex-chiral-pool* from a single chiral natural product taking advantage of a trick based on the symmetry of glycerol. These precursors were then coupled using phosphoramidite chemistry. Thus, four stereo isomers could be synthesized combining the two *myo*-inositol and the two glycerol precursors.

Based on that stereochemically simplified phosphatidylinositols called generation-II-analogs were synthesized in a second approach. These generation-II-analogs lack the oxygen atom of the *sn*-2-OH group which simplifies the synthesis of the glycerol precursor drastically. The generation-I-analogs as well as the generation-II-analogs were then tested for their immunobiological activity. The stereoisomer with a 1D-configured *myo*-inositol moiety combined with a (2'*R*)-configured glycerol part (which are the most common configurations among phosphatidylinositols in nature) showed especially significant activation in the stimulation of iNKT cells. Another stereoisomer showed activity against *L. major* and *M. tuberculosis* infected cells.

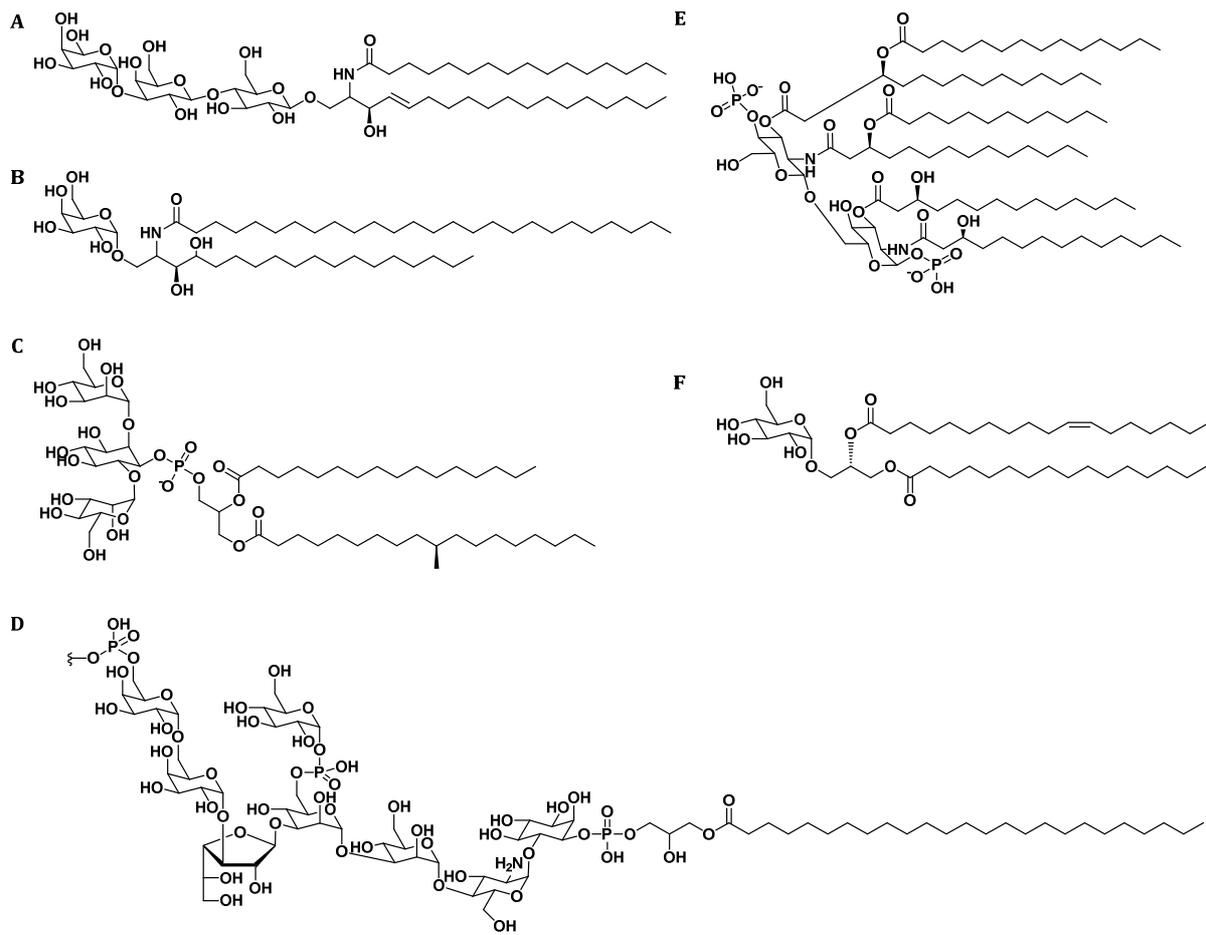
To show the versatility of the developed synthetic route generation-II-EhPI-analogs were also synthesized with different acyl chains lengths.

In a third phase derivatives with higher hydrolytic and metabolic stability were prepared. By changing the ester functions at the positions 2 and 3' into ethers a higher stability could be achieved which could be shown in a hydrolysis study.

In a fourth phase the generation-III-EhPIb-analogs were intended to be improved in their water solubility. This was achieved through an addition of hydrophilic phosphate groups into the *myo*-inositol precursor. Due to the very high hydrophilicity of the gained compounds further syntheses could not be facilitated in organic solvents. As outlined above, a versatile and general total synthetic route for the synthesis of different EhPIb derivatives could be developed. Further on the immunobiological activity of some compounds could be confirmed with two compounds in particular showing significantly good results.

### 3 Einleitung

Das Immunsystem übt einen maßgeblichen Einfluss auf beinahe alle Erkrankungen aus, darunter Infektionskrankheiten, Krebs, Autoimmunkrankheiten und Allergien.<sup>[2]</sup> Durch gezielte Immunmodulation kann es gelingen, entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf auszuüben und so im besten Fall eine Genesung herbeizuführen. Die natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) stellen ein Bindeglied zwischen der erworbenen und der angeborenen Immunabwehr dar, da sie auf ihrer Oberfläche sowohl den für NK-Zellen typischen Rezeptor NK1.1 als auch T-Zellrezeptoren (TCR) exprimieren.<sup>[3]</sup> Durch die Möglichkeit schnell eine große Anzahl immunregulierender Zytokine zu produzieren und damit andere Immunzellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr aktivieren zu können, besitzen sie eine starke immunregulatorische Fähigkeit.<sup>[2, 4]</sup> Der Einfluss von NKT-Zellen auf Infektionskrankheiten wie AIDS, vernachlässigte Tropenkrankheiten (*neglected tropical diseases* - NTDs), Krebs, Autoimmunerkrankungen und Allergien wurde bereits belegt.<sup>[2, 3, 5-9]</sup> Dies macht sie zu einem potenten Ziel in der Wirkstoffforschung. Eine weitere Besonderheit der NKT-Zellen ist ihre Aktivierung. Diese geschieht durch Bindung des NKT-T-Zellrezeptors an einen Liganden, welcher zuvor von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) durch das Protein CD1 präsentiert wird.<sup>[10]</sup> Die CD1-Familie bindet im Gegensatz zu den verwandten MHC-I oder MHC-II-Molekülen keine Peptide, sondern Fremd- und Eigenlipidantigene.<sup>[11]</sup> Die Stärke der Aktivierung und die damit einhergehende Produktion von Zytokinen hängt dabei unmittelbar mit der Stabilität des CD1-Ligand-TCR-Komplexes zusammen.<sup>[12, 13]</sup> Passende Liganden können neben Selbstantigenen auch Fremdantigene wie Pollen, Hausstaub, Sporen, virale und mikrobielle Oberflächenmoleküle oder deren Fragmente sein.<sup>[6]</sup> Meist besitzen sie einen unpolaren Molekülteil mit mehreren langen Alkyl- oder Alkenylketten, welcher aufgrund seiner starken Hydrophobizität mit der Zellmembran interagieren kann und auf diese Weise als Anker dient. Bekannt sind hier beispielsweise die Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker). Viele GPI-Anker-Strukturen erwiesen sich schon in der Vergangenheit als potente CD1-Liganden und sind daher schon lange im Blick der Wissenschaft.<sup>[8, 14]</sup> Meist reichen aber auch Fragmente von GPI-Ankern aus, um eine Immunantwort zu induzieren.<sup>[1]</sup> Diese entstehen in der Regel durch molekularen Abbau in Endolysosomen. Das von Bakterien auf der Oberfläche des Schwammes *Agelas mauritanus* produzierte kleine Molekül  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer **1**, **Abb. 1**) bildet beispielsweise einen sehr stabilen Komplex mit CD1 und dem T-Zellrezeptor.<sup>[6]</sup> Die etwas größeren Phosphatidylinositolmannoside (PIMs), welche auf der Oberfläche von Mykobakterien vorkommen,<sup>[15, 16]</sup> tragen am Inositol ein bis sechs weitere Mannoseeinheiten und haben daher eine größere Ähnlichkeit mit dem kompletten GPI-Anker und sind teilweise vielversprechende Immunstimulanzien (PIM3, **Abb. 1**).<sup>[15-21]</sup>



**Abb. 1:** Lipidantigene für CD1: **A:** Das Selbstantigen iGb3<sup>[7]</sup>, **B:**  $\alpha$ -GalCer 1 (*A. mauritanicus*)<sup>[7]</sup>, **C:** PIM3 (*M. tuberculosis*)<sup>[22]</sup>, **D:** LPG (*L. donovani*).<sup>[23]</sup> **E:** Lipid A (*E. coli*)<sup>[24]</sup> und **F:** GlcDAG-s2 (*Shingomonas spp.*)<sup>[7]</sup>.

Weitere Liganden für CD1 sind das Lipopolysaccharid (LPS), das häufigste Strukturmolekül in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und dessen Fragment Lipid A (**Abb. 1**) sowie das Selbstantigen iGb3.<sup>[24]</sup>

Ähnlich wie bei Impfstoffen kann ein Oberflächenmolekül dazu genutzt werden eine Immunantwort zu induzieren, ohne dass der Krankheitserreger überhaupt appliziert wird. Auf der einen Seite können so Pathogene wie Leishmanien, Amöben, Mykobakterien, Borrelien, Trypanosomen oder Plasmodien gezielt durch Immunstimulation bekämpft sowie Antikörper und T-Gedächtniszellen für eine langfristige Immunabwehr gebildet werden. Auf der anderen Seite können diese Lipidantigene durch unspezifische Immunstimulation die Wirkung von Impfungen erhöhen. Diese als Adjuvantien bezeichneten Stoffe sind Hilfsstoffe, die einen pharmazeutischen Wirkstoff wie z.B. einen Impfstoff verstärken oder gar erst aktiv machen. Neben Stoffen, die die Aufnahme oder Löslichkeit des Impfstoffes verbessern, gibt es auch Adjuvantien, die die Aktivität eines Arzneistoffes durch lokale Stimulation des Immunsystems erhöhen. Durch den Einsatz von vergleichsweise günstigen Adjuvantien kann die Menge an

vergleichsweise teurem Impfstoff bei gleicher Wirkung drastisch verringert werden, sodass den Adjuvantien auch eine große ökonomische Bedeutung zukommen kann.<sup>[15, 16, 25]</sup> Einige Lipidantigene wurden auch bereits auf ihre Eignung als Adjuvans überprüft und ihre Wirksamkeit bestätigt.<sup>[7, 15, 16]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Syntheseroute gefunden werden, um die Synthese solcher Lipidantigene ermöglichen zu können. Hierfür werden kleine Moleküle vorgestellt, die Derivate des immunaktiven Oberflächenmoleküls EhLPPG 2 der Amöbe *Entamoeba histolytica* sind (Kap. 4.4). Die immunbiologische Aktivität dieser Verbindungen wird mithilfe von Zytokinexpressionsassays sowie zweier *in-vitro*-anti-Pathogen-Assays zur Bestimmung der Bekämpfung von Leishmanien- und Mykobakterieninfektionen evaluiert, da diese Erreger ähnliche Oberflächenmoleküle wie *E. histolytica* besitzen.

## 4 Kenntnisstand

### 4.1 Infektionskrankheiten

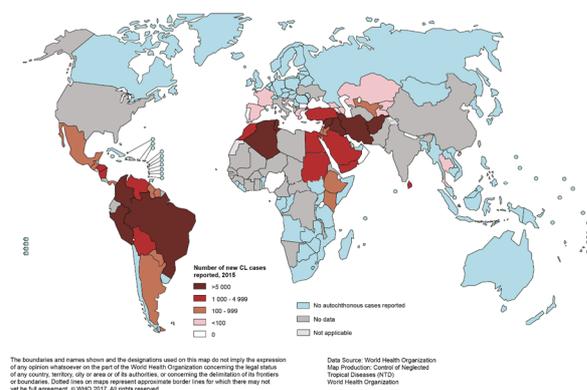
#### 4.1.1 Amöbiasis

Die vom protozoischen Parasiten *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) übertragene und verursachte Tropenkrankheit Amöbiasis gehört zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten (NTDs) und kommt hauptsächlich in Schwellen- und Entwicklungsländern mit schlechter sanitärer Versorgung vor.<sup>[26]</sup> Jährlich sterben etwa 40.000 bis 110.000 Menschen weltweit an den Folgen der Erkrankung.<sup>[27]</sup> Nach einer Infektion kann es zu einem invasiven Krankheitsverlauf kommen, infolgedessen amöbische Leberabszesse (ALAs) entstehen können, die häufig tödliche Auswirkungen haben.<sup>[28, 29]</sup> Studien haben gezeigt, dass die Größe der entstandenen Leberabszesse unmittelbar von der lokalen Konzentration an IFN- $\gamma$  abhängt, welche durch iNKT-Zellen emittiert werden.

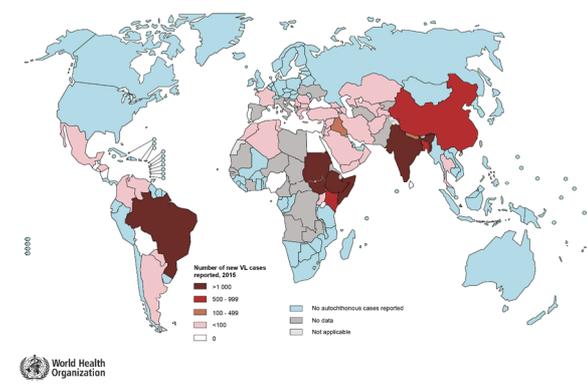
#### 4.1.2 Leishmaniose

Die Leishmaniose ist eine Infektionskrankheit, welche durch Vertreter der Gattung *Leishmania* spp. ausgelöst wird und als Vektor die Sandmücke (*Phlebotomus*) nutzt. *Leishmaniae* sind geißeltragende Protozoen und können drei Varianten der Leishmaniose übertragen. Dies ist zum einen die viszerale Leishmaniose, welche systemische Symptome wie Fieber, Husten, Gewichtsverlust, Schweißausbrüche und starke Vergrößerung von Leber und Milz zur Folge hat. Aufgrund des geschwächten Immunsystems kann es dabei häufig zu weiteren Erkrankungen kommen. Zum anderen kommen zwei Formen der kutanen Leishmaniose vor. Dies sind die mukokutane Leishmaniose und die kutane Leishmaniose, wobei sich die kutane Form auf die Haut und die mukokutanen Leishmaniose auf Schleimhäute bezieht.

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2015

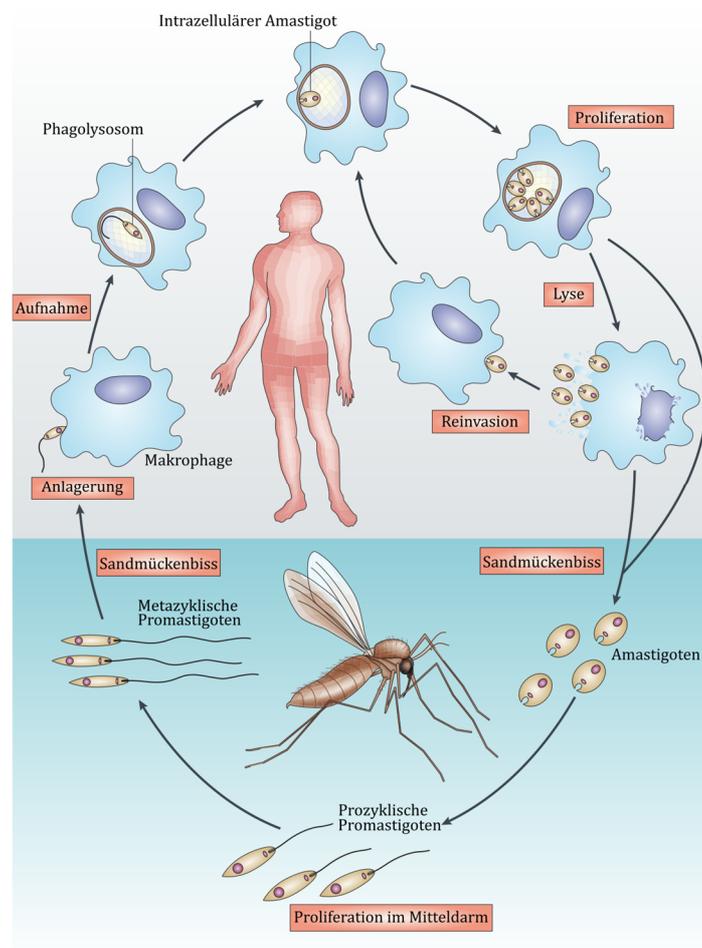


Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015



**Abb. 2:** Die globale Endemizität von kutaner und viszeraler Leishmaniose, verändert, Stand: 2015.<sup>[30, 31]</sup>

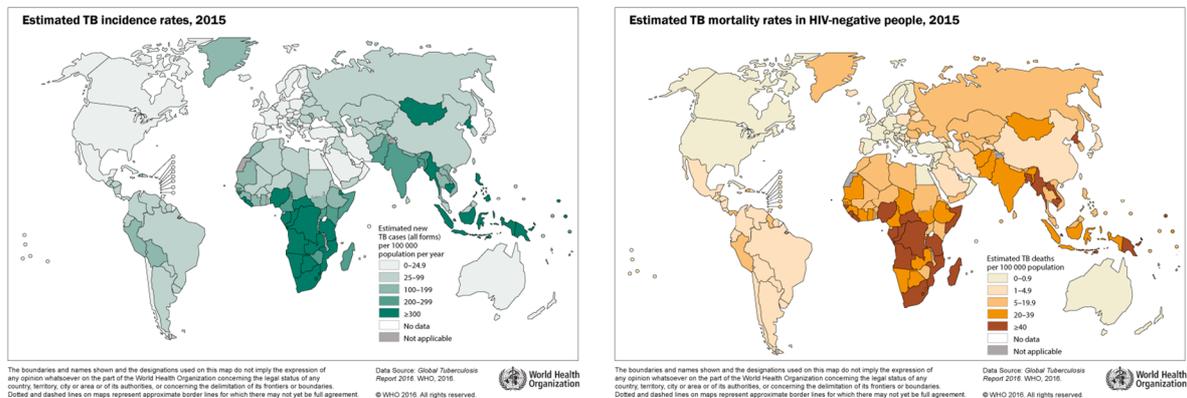
Symptome können gerötete, juckende und nicht abheilende Entzündungen der Haut sein. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt die Zahl der jährlichen Neuinfektionen auf etwa 700.000 - 1.000.000 Menschen.<sup>[32]</sup> Die Anzahl der Todesfälle durch Leishmaniose wird auf ca. 20.000 - 30.000 pro Jahr geschätzt. Leishmaniose zählt der WHO zufolge zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten (NTDs) und betrifft viele der ärmsten Menschen auf der Erde, da sie mit den Faktoren Unterernährung, Vertreibung, schlechten Wohnbedingungen, einem schwachen Immunsystem und schlechten finanziellen Mitteln zusammenhängt.<sup>[32]</sup> Die kutane Leishmaniose ist die häufigste auftretende Form, wobei über zwei Drittel der Neuinfektionen aus lediglich sechs Staaten gemeldet werden: Afghanistan, Algerien, Brasilien, Kolumbien, Iran und Syrien (**Abb. 2**).<sup>[32]</sup> Die Leishmanien durchlaufen im Wirtskörper zwei Stadien (**Abb. 3**). Die Promastigoten im Mitteldarm des Vektors infiltrieren nach dem Insektenbiss zunächst den Wirtskörper, wo sie von Makrophagen oder Dendritischen Zellen endozytiert werden. Sie überleben die zytotoxischen Bedingungen des Phagolysosoms und entwickeln sich dort nach Verlust der Flagella zu intrazellulären Amastigoten. Dort vermehren sie sich so lange, bis es zur Lyse der Zelle kommt, wodurch sich die Amastigoten im Gewebe verteilen und erneut von anderen Phagozyten aufgenommen werden können (Reinvasion, **Abb. 3**).<sup>[33]</sup>



**Abb. 3:** Lebenszyklus von *Leishmania donovani*, übersetzt.<sup>[33]</sup>

### 4.1.3 Tuberkulose

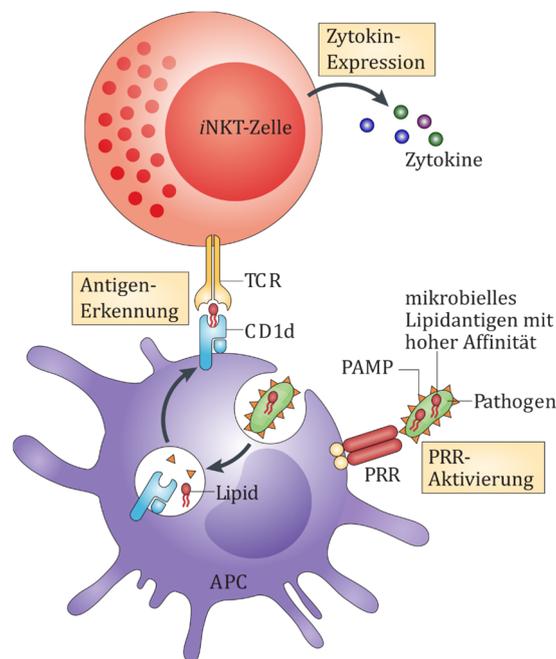
Bei der Tuberkulose (Tb) handelt es sich um eine Infektionskrankheit, die vom bakteriellen Erreger *Mycobacterium tuberculosis* ausgelöst wird. Sie ist eine der zehn häufigsten Todesursachen weltweit mit 1.8 Mio Todesfällen im Jahr 2015<sup>[34]</sup> und damit die momentan tödlichste Infektionskrankheit.<sup>[35]</sup> Ähnlich wie die Leishmaniose kommt Tb zu über 95% nur in Ländern mit geringem oder mittlerem Bruttonationaleinkommen vor (**Abb. 4**).<sup>[34]</sup> Besonders immunschwache Menschen, wie HIV-Infizierte, sterben an den Folgen der Tb. So waren 2015 78% aller Tb-Patienten auch HIV-positiv und 35% aller HIV-Todesfälle auf Tb zurückzuführen.<sup>[34]</sup> Weiterhin hat die Zahl der multiresistenten Tb-Keime zugenommen. Nach einer Schätzung der WHO haben 2015 weltweit etwa 480.000 Patienten eine multiresistente Tb entwickelt.<sup>[34]</sup> Die hohe Zahl der Erkrankten geht mit einer sehr hohen Infektiosität einher. Die Ansteckung erfolgt über den Luftweg und befällt Lunge und Bronchien. Die Symptome sind Husten, Fieber, Atemnot und Gewichtsverlust. Unbehandelt führt die Erkrankung in 45% der Fälle bei HIV-negativen und in fast 100% der Fälle bei HIV-positiven Menschen zum Tode.<sup>[34]</sup> Nach einer Behandlung, die mindestens sechs Monate dauert und die tägliche Einnahme von verschiedenen Medikamenten erfordert, tritt bei 60% der Patienten eine Heilung ein.<sup>[35]</sup>



**Abb. 4:** Links: global geschätzte Fälle von Tuberkulose. Rechts: geschätzte Mortalität von HIV-negativen Erkrankten, Stand: 2015.<sup>[36, 37]</sup>

## 4.2 Antigenpräsentation

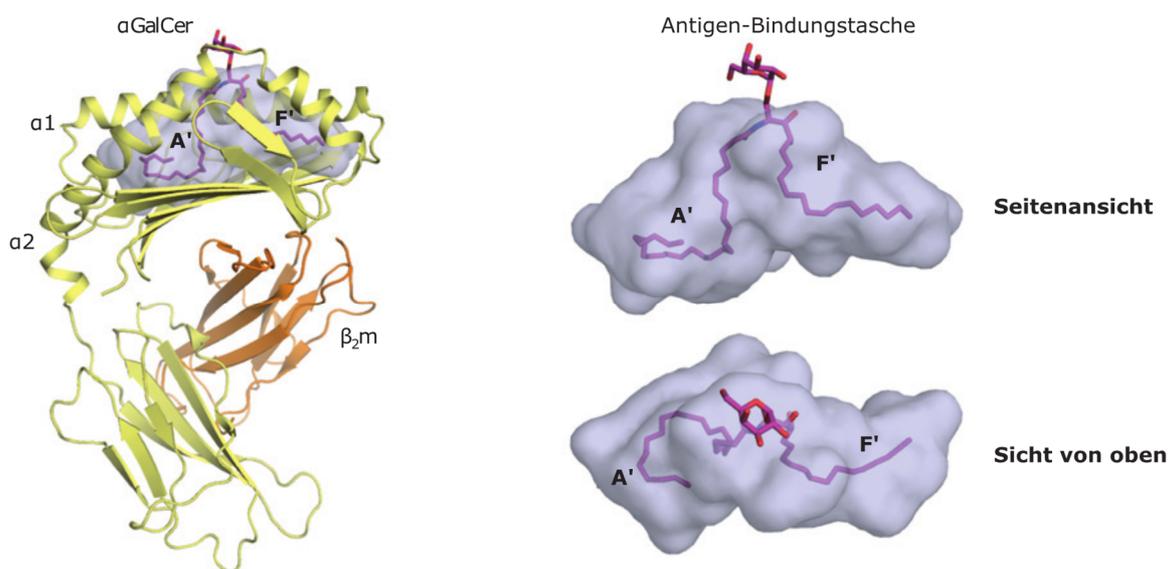
Trifft ein Erreger (Pathogen) im Wirtskörper auf eine antigenpräsentierende Immunzelle (APC, z.B. Makrophagen oder eine Dendritische Zelle), so werden zunächst seine membrangebundenen Oberflächenmolekülmuster (PAMP) durch Mustererkennungsrezeptoren (PRR) überprüft (**Abb. 5**). Wird der Erreger daraufhin als Fremdkörper durch erfolgreiche Bindung erkannt, wird das Pathogen in der Folge endozytiert. Dabei verbindet sich das Endosom mit dem Lysosom zum Endolysosom, in welchem das Pathogen durch lysosomale Enzyme verdaut wird. Dabei entstandene Fragmente (PAMPs) werden daraufhin an Präsentiermoleküle wie CD1-Moleküle gebunden, welche sich auf der Innenseite des Endolysosoms befinden. Nach Wanderung des Endolysosoms an die Zelloberfläche und Ausstülpung wird dann das PAMP an der Zelloberfläche präsentiert. Trifft nun ein Lymphozyt mit passendem Rezeptor (z.B. B- oder T-Zellrezeptor, BCR, TCR) auf die APC, kann es bei Komplementarität zu der Bildung eines CD1-Ligand-TCR-Komplexes kommen, wobei eine Bindung des TCR sowohl an den präsentierten Liganden als auch Teile des präsentierenden Moleküls zustande kommt. Je nach Bindungsaffinität (*induced-fit*-Prinzip) wird auf diese Weise der Lymphozyt unterschiedlich stark aktiviert, welcher daraufhin mit der Produktion einer großen Menge an Zytokinen oder Antikörpern beginnt. Dies bildet die Immunantwort.



**Abb. 5:** Erkennung, Endozytose, Präsentation und Bildung des CD1d-Ligand-TCR-Komplexes (verändert nach Brennan et al.<sup>[7]</sup>).

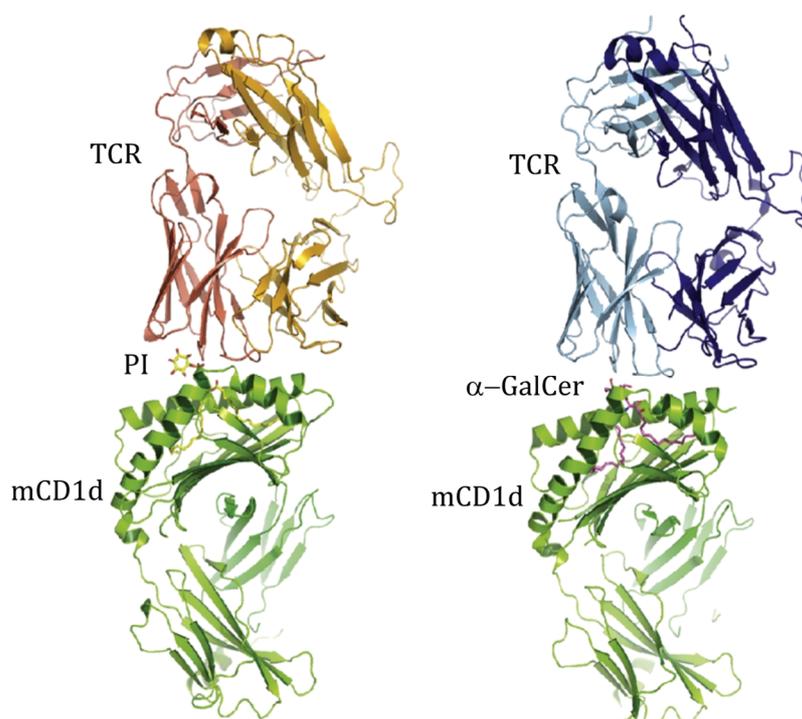
### 4.3 Stimulation von iNKT-Zellen

CD1, als entfernter Verwandter von den bekannten MHC-Molekülen, wurde 1997 von Zeng et al. entdeckt und bindet Selbst- und Fremdlipidantigene zur Präsentation an T-Lymphozyten.<sup>[11]</sup> Die fünf Isoformen der CD1-Familie lassen sich in zwei Gruppen gliedern. CD1a, CD1b und CD1c gehören der Gruppe I an, CD1d bildet Gruppe II, während CD1e ein Hybrid beider Gruppen darstellt.<sup>[11]</sup> Die Unterschiede sind im Genotyp und Phänotyp begründet.<sup>[10]</sup> Während im Menschen alle fünf Formen vorkommen, bilden Mäuse lediglich CD1d. CD1d ist hochgradig konserviert und nicht polymorph.<sup>[38]</sup> Die Einzigartigkeit dieses Proteins liegt darin, dass CD1d Lipide und Glycolipide exklusiv nur für einen bestimmten invarianten T-Zellrezeptor präsentiert, der auf der Zelloberfläche von iNKT-Zellen (i steht für invariant) vorkommt. Die zwei langen, engen und hydrophoben Bindungstaschen A' und F' binden lange Alkyl- und Alkenylketten sowie hydrophobe Peptide (**Abb. 6**).<sup>[6, 7, 10-13, 39]</sup> Während die Länge des A'-Kanals für Alkylketten bis zu einer Länge von ca. 26 bis 28 C-Atomen ausreicht, hat sich für den F'-Kanal eine Länge von 16-18 C-Atomen als besonders vorteilhaft herausgestellt.<sup>[12, 13, 17]</sup> Während die Alkylketten des Glykolipids in den Bindungstaschen gebunden werden, schaut der polare Rest des Moleküls (im Folgenden als Kopfgruppe bezeichnet) am Rand des Proteins aus der Bindungstasche heraus (**Abb. 6**).<sup>[3, 6, 7]</sup> Da der A'-Kanal in CD1d eine Biege macht, passen besonders gesättigte Ketten in die Bindetasche.<sup>[12]</sup> Allgemein spielt der Sättigungsgrad der Alkylreste eine untergeordnete Rolle.<sup>[13]</sup> Zu lange Alkylketten wiederum haben einen schlechten Einfluss auf die Energetik, da sie einen Teil der freien Energie durch unvorteilhafte Sterik und die Wechselwirkungen mit Wasser verlieren.<sup>[39]</sup>



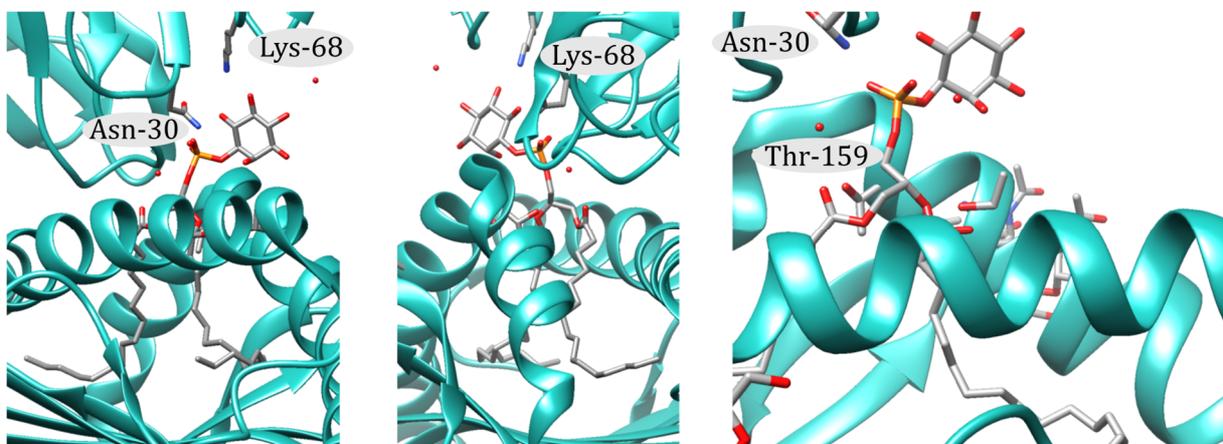
**Abb. 6:** Bindung von  $\alpha$ -GalCer an CD1d, verändert nach Rossjohn et al.<sup>[6]</sup>

Sowohl die Bindungsaffinität des Liganden an CD1d, als auch die Bindung zwischen TCR und der Kopfgruppe des Liganden sind maßgeblich entscheidend für die Stabilität des sich bildenden CD1d-Ligand-TCR-Komplexes (**Abb. 5, Abb. 7**).<sup>[13]</sup> Dabei werden auch Teile von CD1d durch den TCR gebunden. Je nach Bindungsaffinität wird daraufhin die iNKT-Zelle unterschiedlich stark aktiviert und beginnt mit der Produktion von Zytokinen. Der T-Zellrezeptor ist wie CD1d hoch konserviert. Wie die CD1-Familie können auch NKT-Zellen in zwei Gruppen unterteilt werden. Typ-I NKT-Zellen werden auch als iNKT-Zellen bezeichnet.<sup>[6]</sup> Ihr TCR besteht aus einer invarianten  $\alpha$ -Kette, gepaart mit einem variierenden Satz von  $\beta$ -Ketten.<sup>[40]</sup> Daher werden iNKT-Zellen in neueren Publikationen „semi-invariante“ NKT-Zellen genannt. Den Typ-II-NKT-Zellen fällt weniger wissenschaftliche Aufmerksamkeit zu. Sie sind zwar auch auf Präsentation durch CD1d angewiesen, exprimieren aber im Gegensatz zu den Typ-I-NKT-Zellen verschiedenartige T-Zellrezeptoren.<sup>[41]</sup>  $\alpha$ -GalCer ist wegen seiner hohen Aktivität das bei Weitem am intensivsten untersuchte Lipidantigen für die Aktivierung von iNKT-Zellen. Mit seinen Alkylketten von  $C_{26}$  und  $C_{18}$  passt es hervorragend in die Bindungstaschen von CD1d und bildet einen sehr stabilen Komplex mit dem TCR. Aufgrund dieser Tatsache gibt es eine große Anzahl von  $\alpha$ -GalCer-Analoga, mit denen Forschungsgruppen die Aktivität von iNKT-Zellen zu modellieren und besser zu verstehen versuchen. Untersuchung der Aktivität anderer Verbindungsklassen wie beispielsweise die Phosphatidylinositole (PIs) sind weniger zahlreich.



**Abb. 7:** Kristallstrukturen zweier mCD1d-Ligand-TCR-Komplexe mit den Liganden PI und  $\alpha$ -GalCer.<sup>[2]</sup>

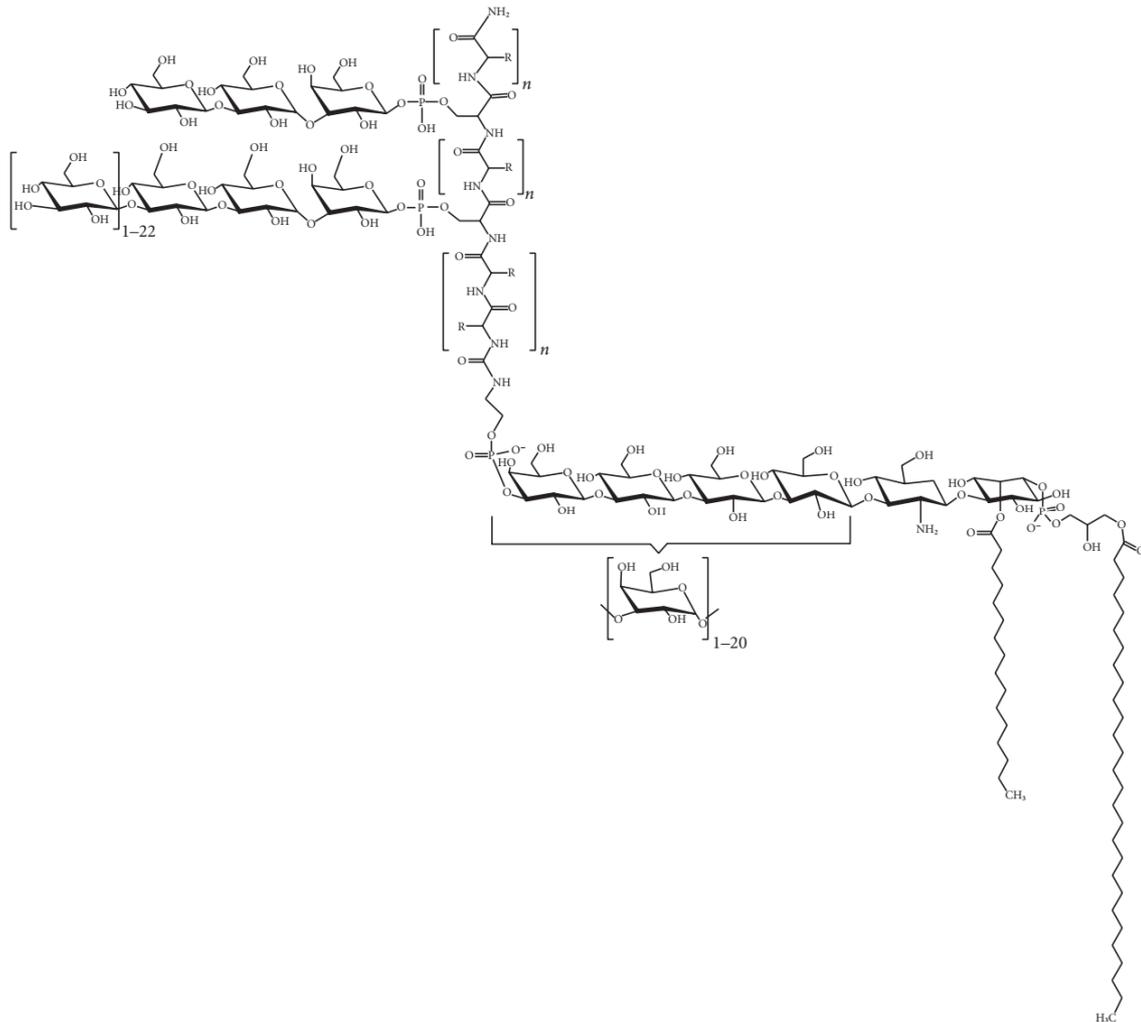
Dennoch gelang es Wun, Rossjohn et al.<sup>[5]</sup> eine entsprechende Kristallstruktur des CD1d-PI-TCR-Komplexes zu bestimmen. Anhand deren ist erkennbar, dass die Reste Asparagin-30, Lysin-68 und Threonin-159 mit dem PI-Liganden wechselwirken (**Abb. 8**). Während die beiden erstgenannten mit dem *myo*-Inositolkörper wechselwirken, kommt Thr-159 der *sn*-2-OH-Gruppe des Glycerinbausteins nahe. Die starke Aktivität von  $\alpha$ -GalCer und seinen Derivaten hat jedoch nicht nur Vorteile. Durch die heftige Aktivierung von iNKT-Zellen und die damit einhergehende massive Ausschüttung von Zytokinen kann zu einem sog. „Zytokinsturm“ führen, welcher schädlich für den Organismus ist.<sup>[42]</sup> Auch kann es bei einer Überaktivierung zu einem anergischen Zustand der T-Zelle kommen, durch welchen sie auf Dauer inaktiv wird.<sup>[12]</sup>



**Abb. 8:** Drei Ausschnitte von CD1d-PI-TCR-Komplex betrachtet aus drei verschiedenen Perspektiven, zu sehen Asparagin-30, Lysin-68, und Threonin-159 aus: RCSB, PDB ID: 3QI9.

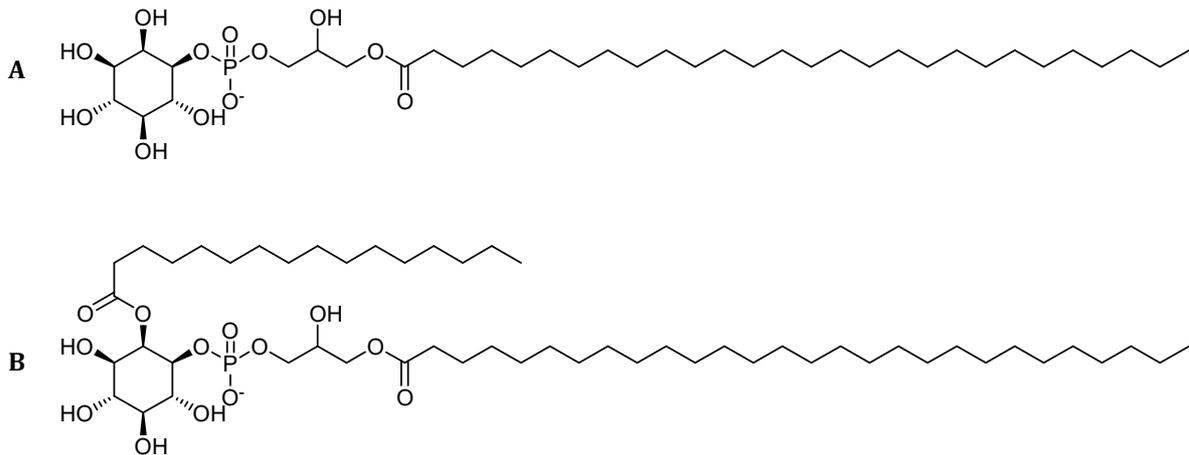
#### 4.4 Lipidantigene von der Oberfläche von *Entamoeba histolytica*

Auf der Suche nach neuen Lipidantigenen zur Stimulierung von iNKT-Zellen gelang Lotter et al. 2009 mithilfe von wässriger Phenollösung im kleinen Maßstab die Extraktion des Moleküls EhLPPG 2 (*E. histolytica* Lipopeptidophosphoglykan, **Abb. 9**) aus der Oberfläche von Trophozoiten von *E. histolytica*. Sie fanden heraus, dass es in der Lage war, iNKT-Zellen zu aktivieren und somit immunstimulierende Eigenschaften besaß, was durch Zytokinexpressionsassays nachgewiesen werden konnte (**Abb. 11**).<sup>[1, 43-46]</sup> Weiterhin konnte eine Reduktion der Leishmanienlast in Makrophagen und eine Verringerung des Wachstums malignen Brustgewebes bei Mäusen nach Behandlung mit EhLPPG 2 beobachtet werden.<sup>[46]</sup> Beide Beobachtungen sind auf die Aktivierung von iNKT-Zellen zurückzuführen.



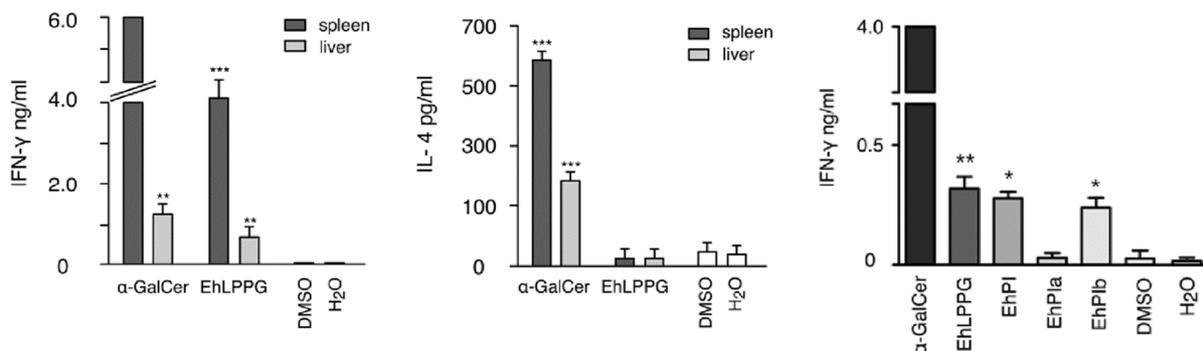
**Abb. 9:** Strukturformel der EhLPPG-Kernstruktur.<sup>[45]</sup>

Glykanstrukturen und Glykolipide sind aufgrund ihrer Größe im Labormaßstab schwer synthetisierbar. Häufig haben jedoch Fragmente großer immunogener Makromoleküle eine ähnliche immunmodulierende Wirkung wie das Ausgangsmolekül selbst. Dies kann mit der Degradierung während der Endozytose in der APC zu tun haben. Im Fall von GPI-Ankern kann dies eine Abspaltung des Phosphatidylinositols sein. Lotter et al. erreichten dies nach Diazotierung des Glucosamins mittels salpetriger Säure. Dabei wird unter Eliminierung von Stickstoff und Bildung einer Doppelbindung auch das PI eliminiert. Auf diese Weise konnte nach der Reinigung des Rohprodukts ein Gemisch aus PIs erhalten werden, welches sie mithilfe von MS-MS-Massenspektrometrie untersuchten. Aufgrund der Fragmentierungsmuster postulierten sie daraufhin Strukturformeln.<sup>[1]</sup>



**Abb. 10:** Strukturformeln von **A:** EhPIa und **B:** EhPIb; hier als 1D-Derivat dargestellt.

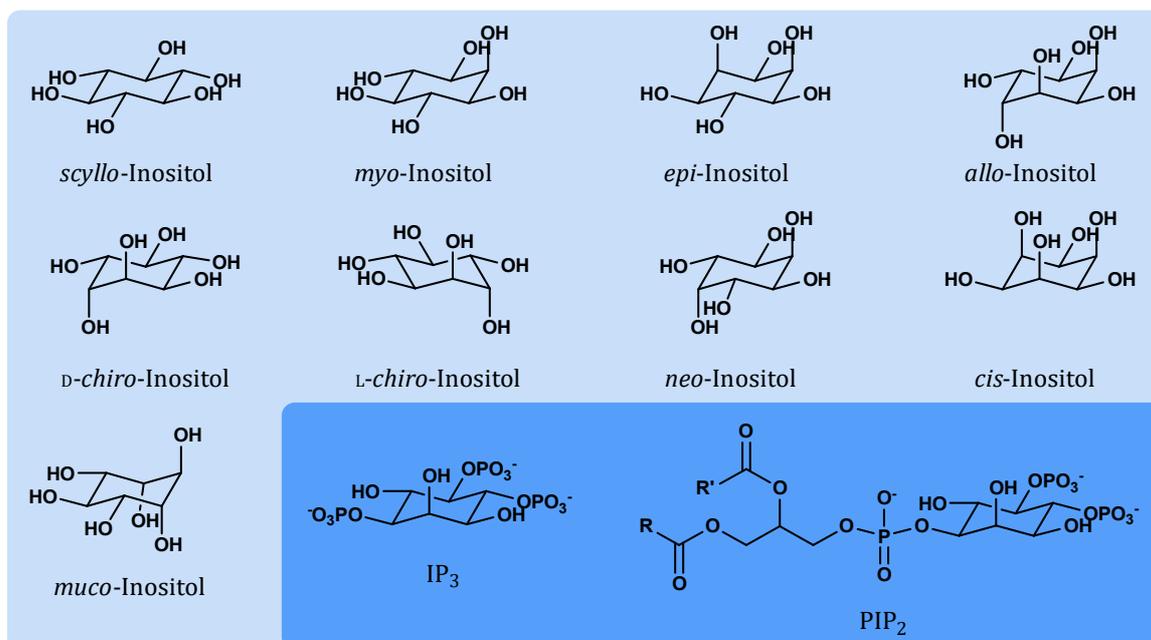
Der Unterschied der beiden Verbindungen liegt in den Alkylketten. Während EhPIa (**Abb. 10, A**) nur eine C<sub>28</sub>-Alkylkette besitzt, weist EhPIb (**Abb. 10, B**) zwei Alkylketten der Längen C<sub>28</sub> am Glycerinbaustein und C<sub>16</sub> am Inositolbaustein auf. Die erhaltenen Verbindungen wurden daraufhin auf ihre Eignung als Antigen für iNKT-Zellen getestet. Als Marker diente hierbei das proinflammatorische Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), welches unter anderem von iNKT-Zellen produziert wird. Während EhPIa kaum stimulierende Eigenschaften zeigte, erreichten die für EhPIb erhaltenen Werte fast das Niveau des extrahierten Naturstoffes (**Abb. 11**). Die schwache Aktivität von EhPIa wird auf eine niedrige Bindeaffinität durch die fehlende zweite Alkylkette zurückgeführt.<sup>[13]</sup> Zur Stereochemie der Moleküle mit ihren sieben stereogenen Zentren konnte aufgrund massenspektrometrischer Strukturaufklärungsmethoden keine Aussage getroffen werden.



**Abb. 11:** Aktivierung von iNKT-Zellen durch Oberflächenmoleküle von *E. histolytica*, beispielhaft durch Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-4.<sup>[1]</sup>

## 4.5 Stereochemie von Inositolen

Inositole (moderner: Inosite) sind stereochemisch überaus interessante und komplizierte Moleküle. Allen Inositolen gemein ist, dass sie 1,2,3,4,5,6-Cyclohexanhexole sind und entsprechend sechs Stereozentren besitzen, was in der Folge durch Kombination 64 Stereoisomere erlaubt. Viele dieser Stereoisomere lassen sich aber durch die hohe Symmetrie im Molekül ineinander überführen, sodass schließlich noch neun verschiedene Stereoisomere verbleiben (**Abb. 12**). Davon sind sechs Mesoverbindungen (*scyllo*-, *epi*-, *myo*-, *neo*-, *cis*- und *muco*-) mit jeweils einer Symmetrieebene und ein chirales Enantiomerenpaar (L- und D-*chiro*) ohne Symmetrieebene. *allo*-Inositol nimmt eine Sonderstellung ein, da es zwar chiral ist, aber keine optische Aktivität besitzt. Die beiden Konformere, die sich durch Ringinversion ergeben, sind zueinander enantiomer und wandeln sich aufgrund einer geringen Energiebarriere unablässig bei Raumtemperatur ineinander um.<sup>[47]</sup> Inositole haben aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Zuckern ähnliche chemische Eigenschaften. Dazu gehört eine hohe Polarität und eine gute Wasserlöslichkeit. Nur sechs der o.g. Inositolisomere kommen in der Natur vor. Das bei Weitem am häufigsten vorkommende Inositol ist das *myo*-Inositol.<sup>[47]</sup> Zu seinen Hauptaufgaben gehören die Signaltransduktion und ihre Funktion als Baustein in GPI-Ankern. Diese Phosphatidylinositoldiacylglyceride (PIDAG) üben die Funktion eines Ankers für membrangebundene Proteine aus. Durch ihre langen, hydrophoben Alkyl- oder Alkenylketten werden diese aufgrund des hydrophoben Effekts in der Phospholipid-Doppelschicht der Membran gehalten.

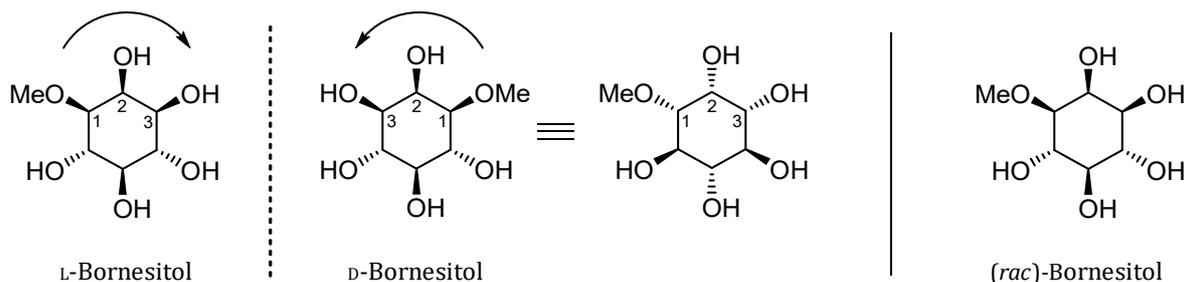


**Abb. 12: Hellblau:** Die neun Stereoisomere von *myo*-Inositol. **Dunkelblau:** die natürlich vorkommenden *myo*-Inositolverbindungen PIP<sub>2</sub> und IP<sub>3</sub>.

Mehrfach phosphorylierte PIDAGs wie z.B. das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>, **Abb. 12**) sind Teil des Signaltransduktionsapparates. Durch die Phospholipase C wird es in die sekundären Botenstoffe (second messenger) *myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) gespalten. Diese werden daraufhin in die Zelle geschleust und induzieren dort die Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen.<sup>[48]</sup> *myo*-Inositol-1-Phosphat wird biosynthetisch aus D-Glucose-6-phosphat hergestellt.<sup>[49, 50]</sup> Aufgrund der Tatsache, dass sich Racemate von Inositolderivaten nur schwer in einer einzelnen Strukturformel darstellen lassen, wird in dieser Arbeit hauptsächlich nur ein Enantiomer gezeichnet und mit (*rac*) untertitelt.

#### 4.6 Nomenklatur von *myo*-Inositolen

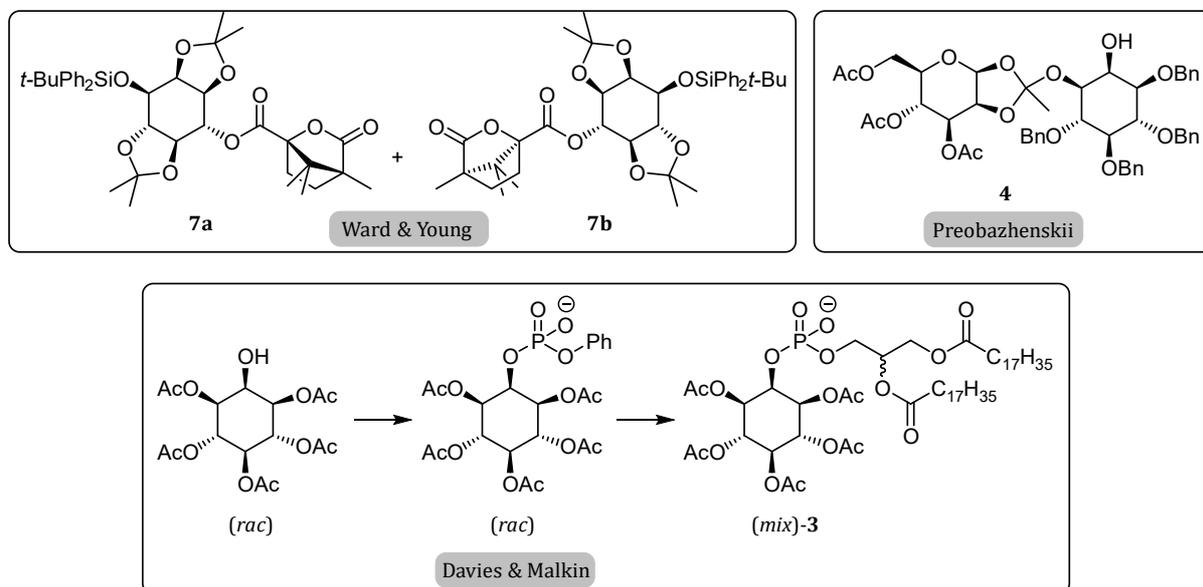
Aufgrund der komplizierten Stereochemie und zweier Änderungen in der Nomenklatur von Inositolen durch IUPAC und IUB kam es in der Vergangenheit zu Unstimmigkeiten.<sup>[47]</sup> Zur Klärung der D- und L-Nomenklatur von chiralen *myo*-Inositol-Derivaten hat sich vor allem eine Regel etabliert: Ein *myo*-Inositol-Derivat wird als D-konfiguriert bezeichnet, wenn die Kohlenstoffnummerierung von C-1 beginnend gegen den Uhrzeigersinn zunimmt, während die immer mit C-2 nummerierte axiale OH-Gruppe in Richtung des Betrachters gerichtet ist (**Abb. 13**).<sup>[51, 52]</sup> In Kap. 6.1.4 kommt es in Folge der Einführung eines Phosphoratoms an die C-1-Hydroxyfunktion zu einer Umkehr der Zählreihenfolge im *myo*-Inositol, wodurch sich definitionsgemäß die stereochemischen Bezeichnungen der Derivate von D nach L und bei dem entsprechenden Enantiomer andersherum umkehren. Dies kann als Schwäche der häufig verwendeten D,L-Nomenklatur für *myo*-Inositol-Derivate bezeichnet werden.



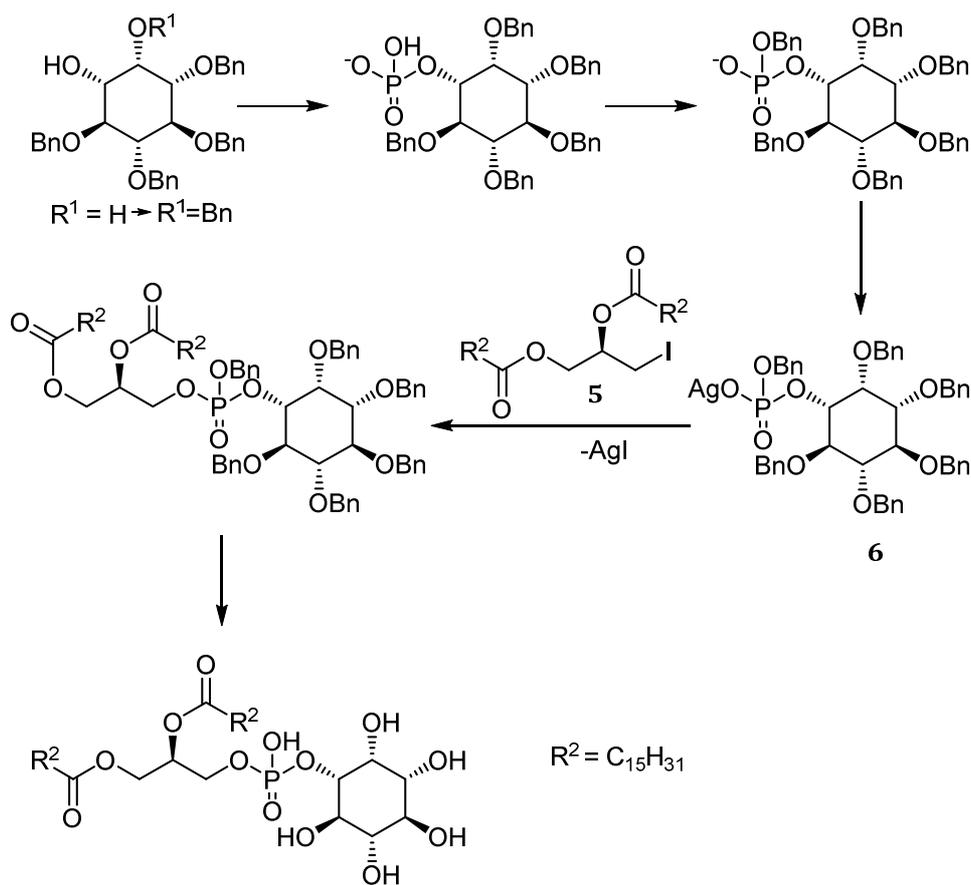
**Abb. 13: Links:** Nummerierung, Nomenklatur und Darstellungsformen chiraler *myo*-Inositol-Derivate. **Rechts:** vereinfachte Darstellung eines Racemats von (*rac*)-Bornesitol.

## 4.7 Synthese von Phosphatidylinositolen

In der Vergangenheit wurden schon einige Syntheserouten zur Herstellung von GPI-Ankern und Phosphatidylinositolen (PIs) veröffentlicht.<sup>[18, 50, 53-56]</sup> Die Synthese des synthetischen Phosphatidylinositols (*mix*)-3 gelang jedoch zuerst Davies und Malkin 1959 (**Schema 1**).<sup>[57]</sup> Dabei verwendeten sie sowohl racemische Inositolderivate als auch racemische Glycerinvorläufer. Der Distearoylglycerin-Teil war dabei über einen Phosphatdiester am C-2-Kohlenstoffatom des *myo*-Inositols gebunden, was jedoch nicht dem natürlichen Vorbild des PIs entspricht.<sup>[58]</sup> Der Grund für diese Notlösung war, dass sie nicht über eine geeignete Schutzgruppenstrategie verfügten, um die C-1-Hydroxyfunktion selektiv umsetzen zu können. Warren und Gigg gelang dies 1969 mithilfe einer Schützung durch zueinander orthogonalen Benzyl- und Allylgruppen.<sup>[59]</sup> Im gleichen Jahr entwickelten Preobazhenskii et al. eine Enantiomerentrennung eines Inositolvorläufers **4**. Mithilfe der Einführung eines Mannoseorthoacetat-Rests wandelten sie das racemische Gemisch in ein Diastereomerengemisch um, das sie daraufhin präparativ trennen konnten (**Schema 1**). Sowohl Preobazhenskii als auch Gigg et al. gelangten 1970 die Synthesen von C-1-verbrückten Phosphatidylinositolen.<sup>[56, 60]</sup> Bei Gigg handelte es sich um ein Diastereomerengemisch, da ein enantiomerenreiner Dipalmitoylglycerinbaustein **5** und ein Racemat des *myo*-Inositolvorläufers **6** verwendet wurden (**Schema 2**).<sup>[56]</sup>

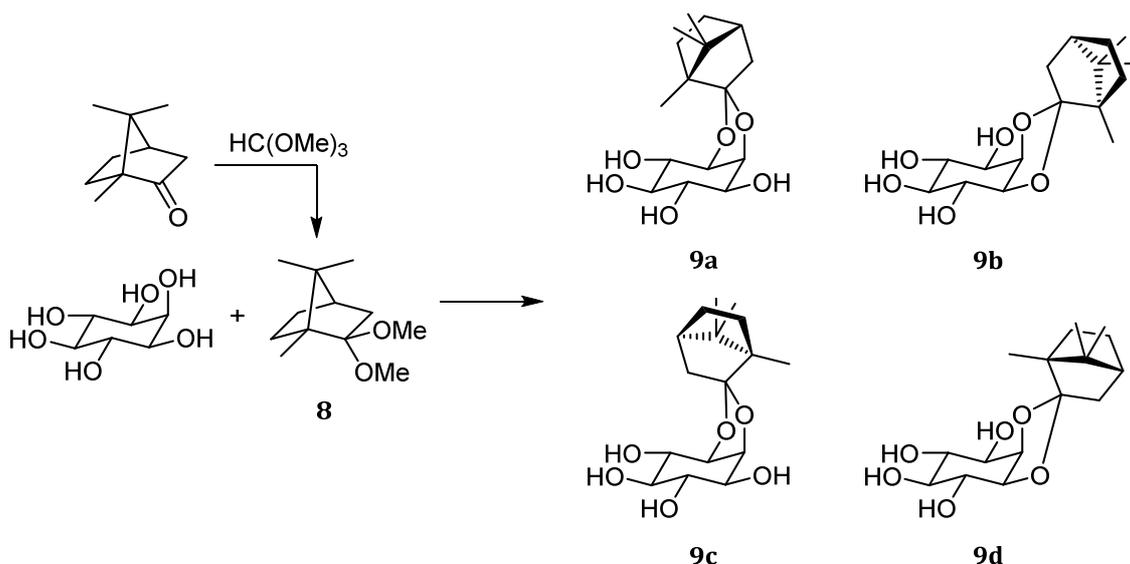


**Schema 1: Oben:** Trennung von Inositolderivat-Racematen nach Preobrazhenskii<sup>[60]</sup> und Ward und Young.<sup>[61]</sup> **Unten:** Synthese eines Diastereomerengemisches von PI nach Davies und Malkin.<sup>[57]</sup>



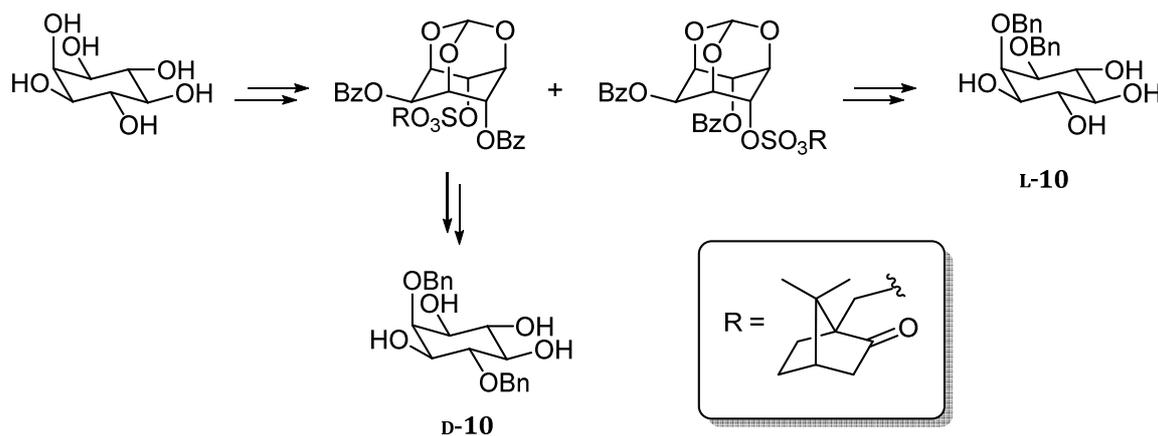
**Schema 2:** PI-Synthese nach P. Gent und R. Gigg.<sup>[56]</sup>

Auf ihrem Weg zu einem enantiomerenreinen Phosphatidylinositol verwendeten Ward und Young 1988 zur Trennung der Enantiomere ihrer zweifach acetonidgeschützten *myo*-Inositol-Derivate **7a** und **7b** das Derivatisierungsreagenz (-)-Camphansäurechlorid, woraufhin sie die entstandenen Diastereomere chromatographisch mittels HPLC trennen konnten (**Schema 1**).<sup>[61]</sup> 1989 unternahmen Bruzik und Salamonczyk den Versuch einer Trennung mithilfe von Campheracetalen (**Schema 3**).<sup>[62]</sup> Sie stellten aus D-Campher das entsprechende Dimethylketal **8** her und kuppelten es in einer wasserfreien Umacetalisierungsreaktion an *myo*-Inositol. Durch die Bildung des Vollacetals ergeben sich dabei vier Diastereomere **9a-d**, die sich jedoch nicht durch Kristallisation oder Chromatographie trennen ließen, sodass sie zunächst eine Benzylierung der vier freien Hydroxy-Funktionen vornahmen. Die nun unpolareren *myo*-Inositolderivate ließen sich daraufhin chromatographisch trennen.

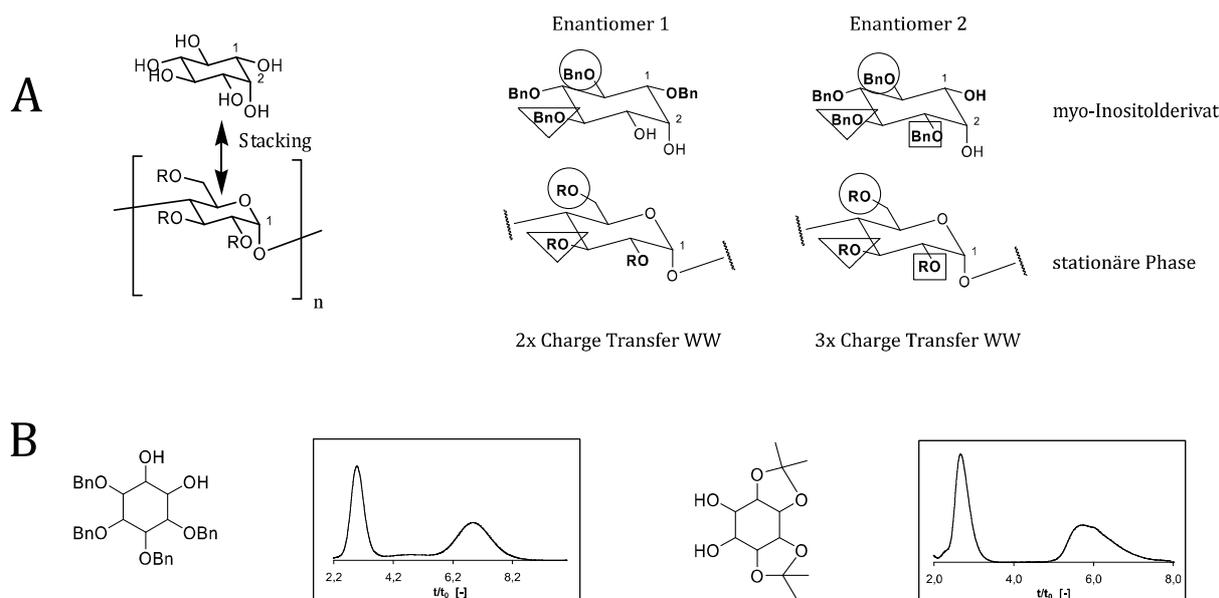


**Schema 3:** Enantiomerentrennung nach Bruzik et al.<sup>[62]</sup>

Sureshan et al. zeigten 2003 eine erfolgreiche Enantiomerentrennung durch Überführung der Inositolen in Camphersulfonate (**Schema 4**), wodurch die Enantiomere **D-10** und **L-10** erhalten werden konnten.<sup>[63]</sup> In meiner 2012 verfassten Masterarbeit zeigte ich, dass die Überführung der dort verwendeten Inositolderivate in Camphersulfonate zwar in guter chromatographischer Trennbarkeit resultierte, sich die Abspaltung aber aufgrund von auftretenden Eliminierungsreaktionen nicht bewerkstelligen ließ.<sup>[64]</sup>



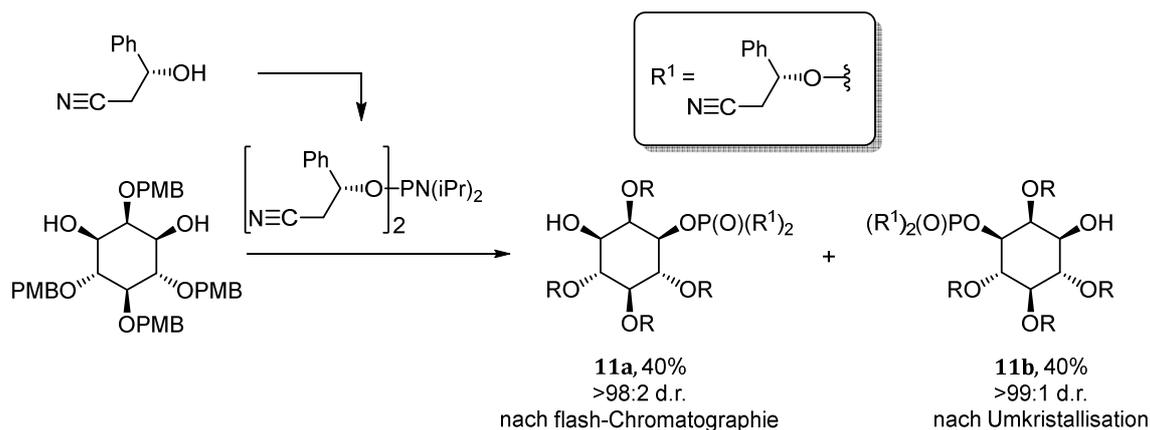
**Schema 4:** Enantiomerentrennung nach Sureshan über ein Camphersulfonat<sup>[63]</sup>



**Abb. 14:** Enantiomertrennung nach Gillandt per präparativer HPLC.<sup>[65]</sup> **A:** Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Polyamylose-Phase bei der chromatographischen Trennung von *myo*-Inositol-Derivaten. **B:** Ausschnitte von Chromatogrammen erfolgreicher Trennungen.

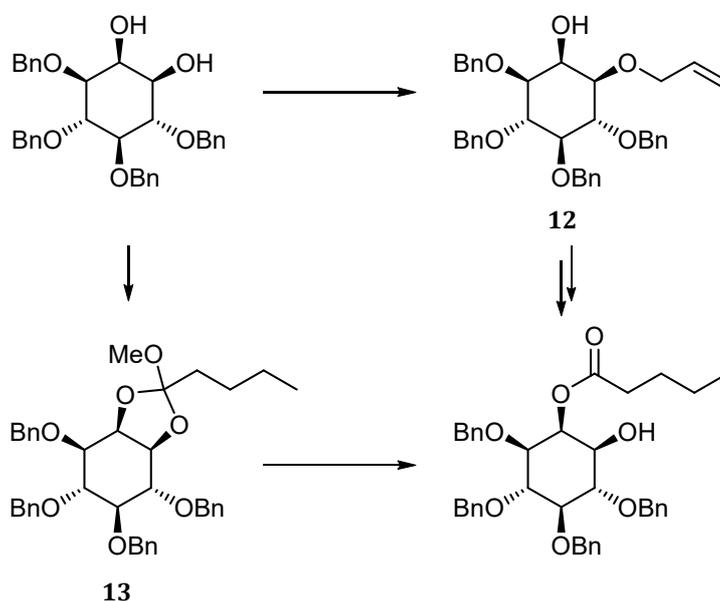
Neben der Trennung durch vorherige Überführung in Diastereomere finden auch andere Methoden Anwendung bei der Synthese von enantiomerenreinen *myo*-Inositolen. Gillandt zeigte in seiner Dissertation 2005 Möglichkeiten zur Trennung racemischer Gemische chiraler Inositolderivate durch HPLC mithilfe von chiralen stationären Phasen auf präparativen Säulen (**Abb. 14**).<sup>[65]</sup> Statt der meist üblichen Cyclodextrin-Phasen verwendete Gillandt eine Polyamylose-Phase. Er konnte dadurch die Trennleistung erhöhen, was er mit der strukturellen Ähnlichkeit von Inositol und Amylose erklärte. Aufbauend auf dieser Arbeit gründete Gillandt das Unternehmen *SiChem*, in welchem er unter anderem enantiomerenreine *myo*-Inositolderivate kommerziell anbietet.

Zur Synthese enantiomerenreiner *myo*-Inositolphosphate führten Jessen et al. 2013 eine Trennung der Diastereomere auf der Stufe des Phosphatriesters **11** durch (**Schema 5**). Dabei verwendeten sie eine 2-Cyano-1-phenyl-ethyl-Schutzgruppe am Phosphat. Infolgedessen konnten sie ein Enantiomer kristallisieren, während das zweite in Lösung verblieb.<sup>[66]</sup> Ein großer Vorteil dieser Herangehensweise war, dass die Trennung auf einer späten Stufe der Syntheseroute erfolgte, wodurch der Syntheseaufwand geringer war.

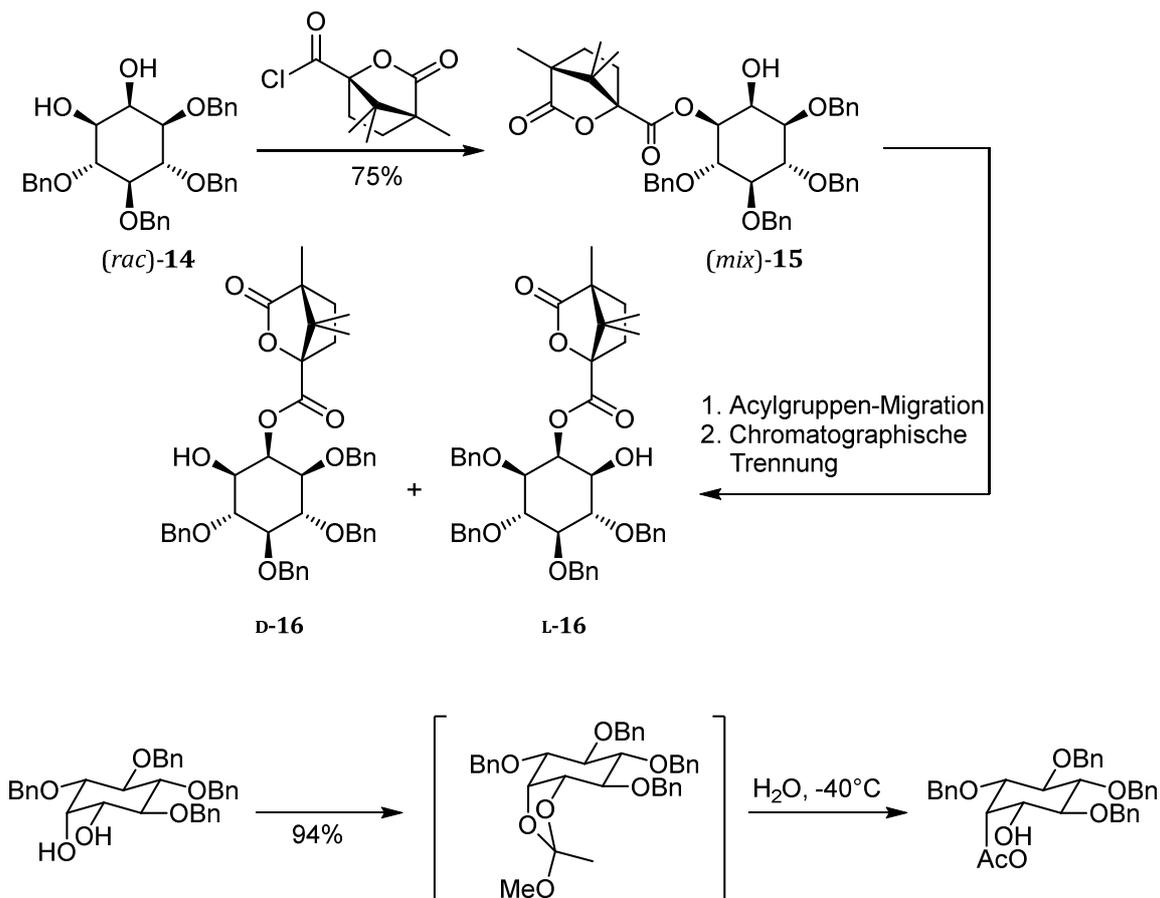


**Schema 5:** Enantiomerentrennung nach Jessen et al.<sup>[66]</sup> durch Überführung in Diastereomere mit anschließender chromatographischer Trennung.

Die Synthese von 2-*O*-acylierten *myo*-Inositolen in PIs ist bis zum heutigen Zeitpunkt nur selten durchgeführt worden. 2003 entwickelten Schlüter et al. zwei entsprechende Syntheserouten durch Blockierung der C1-Hydroxyfunktion mithilfe des Allylethers **12** sowie über die Bildung des Orthoesters **13** mit anschließender regioselektiver Öffnung (**Schema 6**).<sup>[50]</sup>

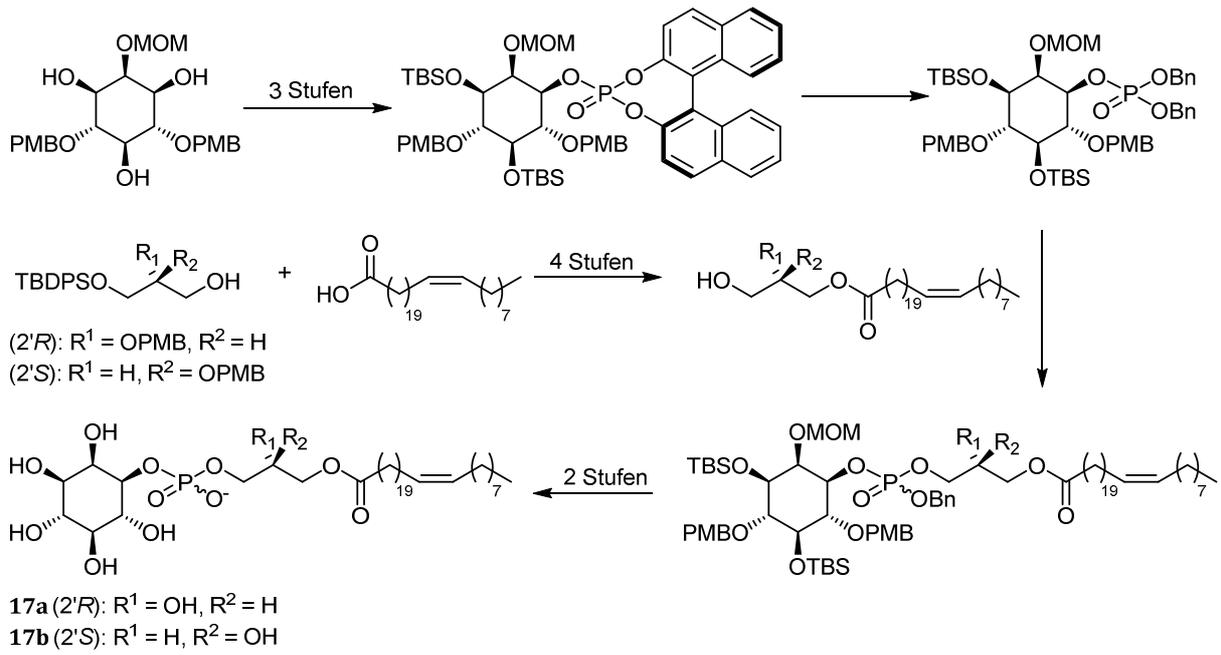


**Schema 6:** Regioselektive Acylierung der *O*-2-Position nach Schlüter et al.



**Schema 7:** Enantiomerentrennung und regioselektive 2-*O*-Acylierung nach Nkambule et al.

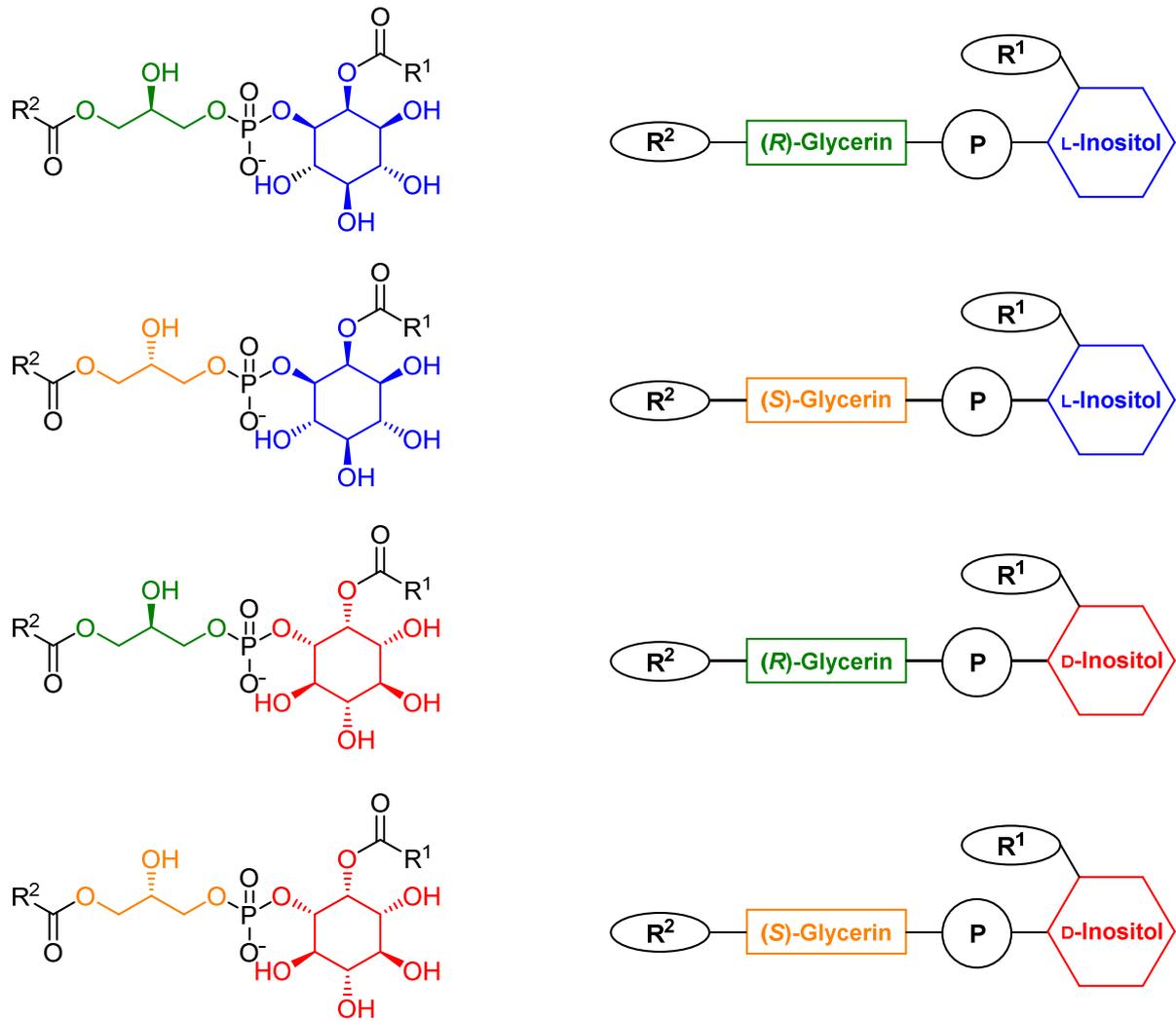
Auch Nkambule et al. verwendeten 2011 zur 2-*O*-Acylierung von 3,4,5,6-*O*-geschütztem Inositol einen Orthoester, welcher regioselektiv geöffnet werden konnte (**Schema 7**).<sup>[67]</sup> Auch verwendeten Nkambule et al. die von Ward und Young genutzte Camphanoylgruppe zur Enantiomerentrennung. Dabei setzten sie das Diol *(rac)*-14 mit Camphansäurechlorid um, wodurch sie den 1-*O*-substituierten Ester *(mix)*-15 als Diastereomeregemisch erhielten. Da eine chromatographische Trennung auf dieser Stufe nicht möglich war, führten sie eine basenkatalysierte Acylgruppenwanderung durch. Das daraufhin erhaltene Gemisch aus den 2-*O*-camphanoylierten *myo*-Inositolderivaten *D*-16 und *L*-16 eigneten sich hingegen recht gut zu einer Trennung auf Kieselgel. 2016 stellten Aiba et al. eine Syntheseroute zur Synthese der enantiomerenreinen EhPIa-Isomere **17a** und **17b** vor (**Schema 8**). Hier wird in einem stereoselektiven Phosphorylierungsschritt mithilfe eines Binaphthyl-Liganden nur das *D*-*myo*-Inositolphosphat gebildet. Das *L*-Enantiomer wird dabei nicht erhalten. In einer aufwendigen Synthesemethode gelang es ihnen, EhPIa, EhPIb sowie zwei Derivate mit verschiedenen Acylketten herzustellen.



**Schema 8:** Synthese eines EhPIa-Derivats nach Aiba et al.<sup>[68]</sup>

## 5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Weg zur Synthese 2-*O*-acylierter Phosphatidylinositole mit T-Zell-immunstimulierenden Eigenschaften zu erarbeiten. Als Vorbild diente dafür das Oberflächenfragmentmolekül EhPIb **18** des Erregers *E. histolytica*, welches sich in der Vergangenheit als Stimulans für *i*NKT-Zellen herausgestellt hat. Mit Hilfe einer vorteilhaften Schutzgruppenchemie sowie einer effizienten Kupplungsmethode sollte es gelingen, verschiedene Derivate von EhPIb in ausreichender Menge zu produzieren, um immunbiologische *in-vitro*-Tests durchführen zu können. Dazu sollten zunächst vier Stereoisomere **19a-d** synthetisiert werden. Diese ergeben sich aus der Kombination zweier möglicher Relativkonfiguration chiraler *myo*-Inositol-Derivate und den zwei möglichen Konfigurationen der *sn*-2-Position von chiralen Glycerin-Derivaten (**Abb. 15**). Dabei sollte sich auf ein bereits in der Masterarbeit entwickeltes Trennverfahren gestützt werden, welches das Racemat in diastereomere Camphanate überführt, welche dann per *flash*-Säulenchromatographie voneinander getrennt werden können. Ein weiterer Kernpunkt der Syntheseroute sollte die Kupplung von Inositol und Glycerin über ein Phosphatdiester darstellen. Dabei sollte erprobt werden, ob eine Kupplung mittels *H*-Phosphonat-Methode, Amidit-Methode oder einer anderen Methode bewerkstelligt werden sollte. Im Anschluss sollten daraufhin verschiedene Derivate synthetisiert werden, um die Leistung der bereits hergestellten Verbindungen zu erhöhen oder hinsichtlich anderer Parameter zu verbessern. Im Hinblick auf die Bindungsaffinität zu CD1d sollten dafür Derivate verschiedener Kettenlängen an den Positionen C-2 des Inositolteils und an der terminalen Hydroxyfunktion des Glycerinteils synthetisiert werden. Weiterhin sollte versucht werden, die metabolische Stabilität zu erhöhen, indem die im Molekül enthaltenen und metabolisch labilen Esterfunktionen durch andere, stabilere ersetzt werden sollten. Zusätzlich sollte die Syntheseroute auch auf ihre Ausbeute hin optimiert werden, was Vorteile hinsichtlich des Syntheseaufwands und der Wirtschaftlichkeit mit sich bringt. Schließlich sollten alle synthetisierten Derivate auf ihre Fähigkeit *i*NKT-Zellen zu aktivieren bzw. die Pathogenlast in Zellen zu vermindern erprobt werden.



**Abb. 15:** Schematische Darstellung (**links**) und Strukturformeln (**rechts**) der vier zu synthetisierenden Verbindungen mit variablen Resten  $R^1$  und  $R^2$ .

## 6 Resultate und Diskussion

Phosphatidylinositole sind Naturstoffe, die auf viele unterschiedlichen Weisen synthetisiert werden können (Kap. 4.7). Ihnen allen gemein ist der Phosphatdiester, welcher den Glycerin-Teil mit dem *myo*-Inositol-Teil verbindet. Retrosynthetisch ergab es daher Sinn, eine konvergente Syntheseroute zu wählen, bei der zunächst der Inositol- und der Glycerin-Teil optisch rein hergestellt werden, um diese dann in einem Kopplungsschritt zum Phosphatdiester zu verknüpfen. Weiterhin sollten die Fettsäureester auf einer Stufe ins Molekül eingebracht werden, die es erlaubt, auch Fettsäuren anderer Kettenlängen einführen zu können.

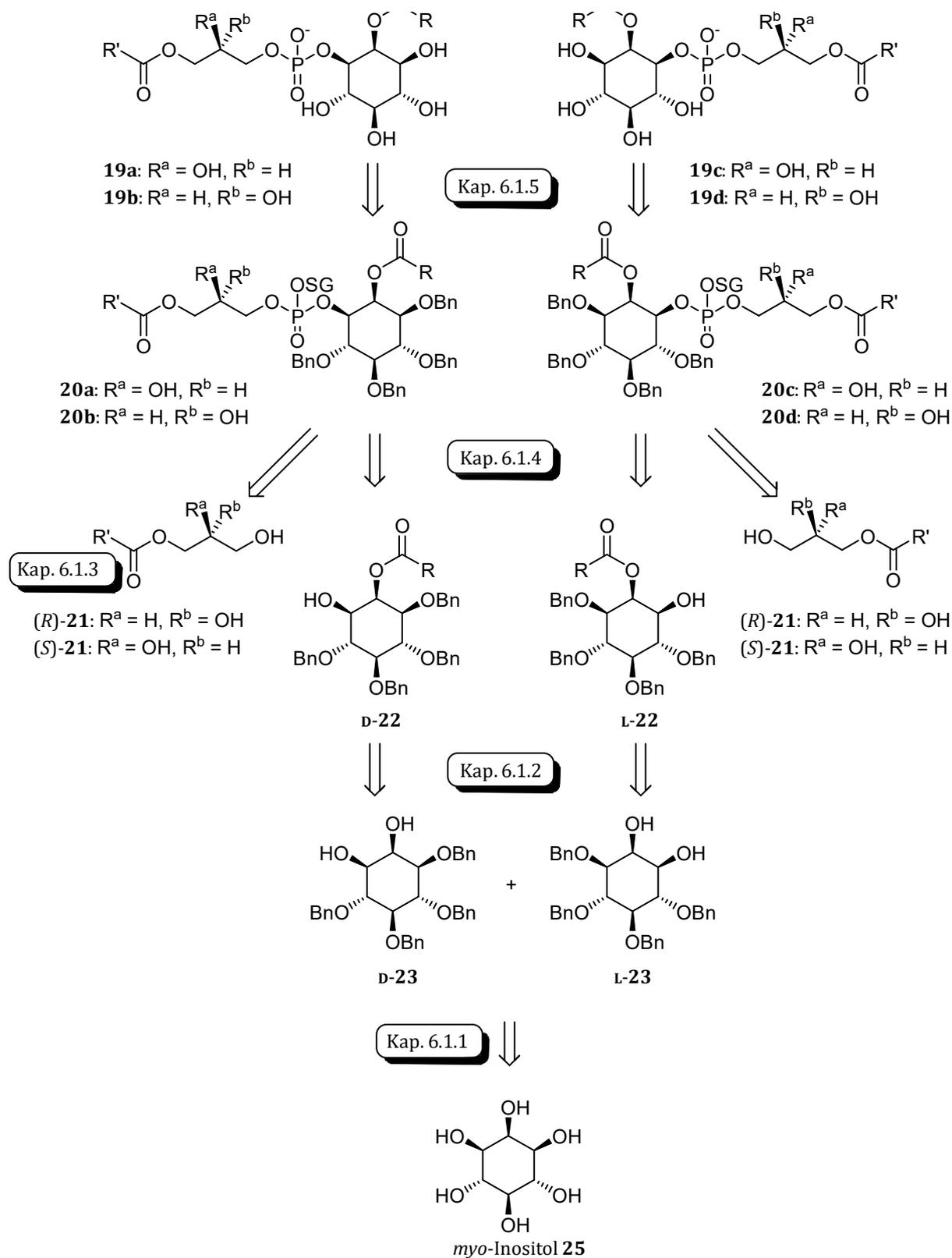
Wie bereits erwähnt, gelang Aiba et al. 2016 die Synthese des EhPIa-Derivats **17**.<sup>[68, 69]</sup> Dieser beinhaltet lediglich einen D-*myo*-Inositol-Baustein und keine 2-*O*-Acyl-Funktion. Die zweistufige Kupplung als Teil einer zehnstufigen, konvergenten Synthese erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode und unter Mitsunobu-Bedingungen. <sup>[68, 69]</sup>

Für die Synthese von entsprechenden EhPIb-Derivaten wurden mehrere denkbare Ausführungen angestrebt. In der ersten Phase der Arbeit wurde versucht, eine Syntheseroute zu finden, um dem EhPIb strukturell ähnliche Verbindungen herzustellen. Diese sollten sich hinsichtlich der Konfigurationen des *myo*-Inositol-Teils und der *sn*-2-OH-Gruppe des Glycerin-Teils voneinander unterscheiden und unter dem Begriff „Generation-I-EhPI-Analoga“ zusammengefasst werden. Darauf aufbauend sollten in einem zweiten Ansatz stereochemisch vereinfachte Phosphatidylinositole dargestellt werden. Bei diesen „Generation-II-EhPI-Analoga“ ist die *sn*-2-OH-Gruppe des Glycerin-Bausteins durch ein einfaches H-Atom ersetzt, wodurch sich nach Entfernung des Stereozentrums eine Vereinfachung der Synthese ergibt. Die Veränderung der immunstimulatorischen Aktivität sollte daraufhin in immunbiologischen Assays getestet werden.

In einer dritten Phase sollten hydrolysestabile Derivate hergestellt werden. Das sollte durch den Austausch der Esterfunktionen durch Etherfunktionen erreicht werden. Diese Verbindungen sollten als „Generation-III-EhPI-Analoga“ bezeichnet werden.

In einer vierten Phase sollte die Wasserlöslichkeit der Generation-III-EhPI-Analoga erhöht werden. Dies sollte durch die Einbringung hydrophiler Gruppen erreicht werden.

## 6.1 Synthese der Generation I-EhPI-Analoga



**Abb. 16:** Retrosyntheseschema zur Synthese von EhPIb-Derivaten mit variablen Acylresten R und R', einer variablen Schutzgruppe SG sowie  $R^a$  und  $R^b$  als Reste am *sn*-2-Kohlenstoffatoms des Glycerin-Bausteins.

Zur Absolutkonfiguration des immunbiologisch aktiven Naturstoffs EhPIb konnten bisher keine Aussagen gemacht werden (Kap. 4.4). Aus diesem Grund sollten zunächst die *myo*-Inositol-EhPIb-Derivate **19a-d** mit allen vier möglichen Konfigurationskombinationen aus *myo*-Inositol- und Glycerin-Bausteinen hergestellt werden. Dazu bedurfte es einer vorteilhaften Schutzgruppenstrategie. In der Diplomarbeit von Dirk Landschulze wurden bereits erste Ergebnisse bei der Synthese von EhPIb-Derivaten erarbeitet und während meiner Masterarbeit vertieft.<sup>[64, 70]</sup> In **Abb. 16** ist die Syntheseroute retrosynthetisch bis hin zum Ausgangsstoff *myo*-Inositol dargestellt.

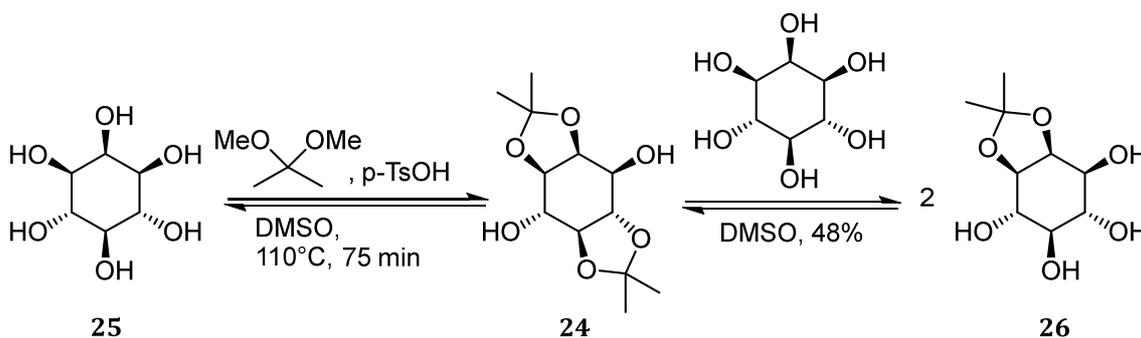
Die Phosphatdiester **19a-d**, welche über eine möglichst effiziente Entschützung (Kap. 6.1.5) aus den Verbindungen **20a-d** erhalten werden sollten, wurden über Kupplungsreaktionen (Kap. 6.1.4) aus den Vorläufern (*R*)-**21** und (*S*)-**21** sowie **D-22** und **L-22** generiert. Hier bot sich eine Phosphor-III-basierte Chemie an, da Phosphor in dieser Oxidationsstufe im Gegensatz zur Oxidationsstufe V eine höhere Reaktivität besitzt. Die Herstellung der Glycerinbausteine (*R*)-**21** und (*S*)-**21** wird in dieser Arbeit nicht im Detail dargestellt (Kap. 6.1.3), da diese Synthesen von Dirk Landschulze durchgeführt wurden und anderweitig veröffentlicht werden. Die Synthese der Bausteine **D-22** und **L-22** (Kap. 6.1.2) sollte durch selektive Acylierung der axialen O-2-Position erfolgen, welche auf dem Wege einer vollständigen Blockierung der anderen Hydroxyfunktionen erreicht werden sollte. Aufbauend auf den Ergebnissen meiner Masterarbeit sollte eine Enantiomerentrennung des racemischen Diols (*rac*)-**23** mit Hilfe der (1*S*)-(-)-Camphanoyl-Gruppe etabliert werden. Die Synthesen zur Darstellung des Diols (*rac*)-**23** sind bereits in meiner Masterarbeit beschrieben worden und wurden im Zuge dieser Arbeit weiterentwickelt (Kap. 6.1.1).

### 6.1.1 Synthese des racemischen Diols (*rac*)-**23**

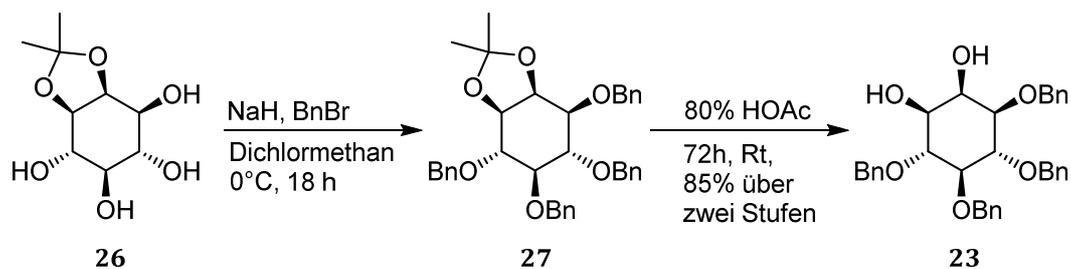
Die Synthese des selektiv 2,3-*O*-freien Diols **23** ist aufgrund der Tatsache anspruchsvoll, dass *myo*-Inositole 1,2,3,4,5,6-Cyclohexanhexole sind und durch ihre hohe Symmetrie sechs chemisch sehr ähnliche Hydroxyfunktionen besitzen. Daher ist es nötig, durch vorteilhafte Schutzgruppenchemie zuvor bestimmte Hydroxyfunktionen zu blockieren, um die anderen selektiv zugänglich zu machen. In seiner energieärmsten Konformation besitzt *myo*-Inositol fünf äquatoriale und eine axiale OH-Funktion. Aufgrund ihrer Orientierung im Raum kommen sich die äquatorialen Hydroxyfunktionen nicht sehr nahe. Durch die axiale Orientierung der 2-OH-Gruppe besteht zwischen den OH-Funktionen der Positionen C-1, C-2 und C-3 eine gewisse räumliche Nähe. Daher ist es möglich, mit Hilfe einer kleinen bidentaten Schutzgruppe zwei dieser drei Positionen selektiv zu blockieren, um die anderen vier Hydroxyfunktionen zugänglich zu machen. Dieser Umstand sollte genutzt werden, um die anderen vier Positionen O-3 bis O-6 zu benzylieren und somit die Positionen O-1 und O-2 des *myo*-Inositols nach der Entschützung der Klammer

zugänglich zu machen, da sie im späteren Verlauf im Fall von O-1 zum Phosphat- und im Fall von O-2 zum Carbonsäureester umgesetzt werden sollten.

*myo*-Inositol ist eine Mesoverbindung, da eine Spiegelebene durch die Kohlenstoffatome C-2 und C-5 verläuft. Jede asymmetrische Substitution an den Positionen C-1, C-3, C-4 und C-6 führt zu einer Desymmetrisierung und damit zur Bildung von Enantiomeren. Ausgehend von *myo*-Inositol, welches in großen Mengen verfügbar war, wurde zunächst an den Positionen 1 und 2 mit Hilfe von 1,2-Dimethoxypropan nach Gigg et al. isopropylideniert.<sup>[71]</sup> Dabei entsteht zunächst das 1,2:4,5-disubstituierte Diol **24**, welches sich bei Zugabe weiteren *myo*-Inositols **25** zum 1,2-monosubstituierten Tetrol **26** umsetzt (**Schema 9**). Da sich *myo*-Inositol zwar hervorragend in sehr polaren Lösungsmitteln wie Wasser, jedoch nur schwerlich in organischen Lösungsmitteln löst, wurde für diese Reaktion heißes DMSO verwendet. Ab einer Temperatur von über 100°C geht Inositol schließlich in Lösung. Nach 75-minütiger Reaktionszeit mit stetiger destillativer Entfernung des entstandenen Methanols, wurde das racemische Tetrol **26** in mäßiger Ausbeute von 48% erhalten. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert, wobei große Mengen unverbrauchten *myo*-Inositols zurückgewonnen werden konnten (31%). Die geringe Ausbeute ist durch die Gleichgewichtseinstellung sowie durch die geringe Löslichkeit zu erklären. Da jedoch große Mengen an *myo*-Inositol verfügbar waren und *myo*-Inositol im Allgemeinen ein kommerziell günstiger Grundbaustein ist, wurde auf weitere Reaktionsoptimierungen verzichtet. Auf diese Weise waren nun die Positionen OH-3 bis OH-6 zugänglich und konnten mit der zur Acetonid-Schutzgruppe orthogonalen Benzylgruppe geschützt werden.<sup>[72]</sup> Da sich Benzylether nur unter speziellen Bedingungen abspalten lassen und strukturell eine hohe Stabilität aufweisen, eigneten sie sich sehr gut zur frühen Schützung der Hydroxy-Funktionen.



**Schema 9:** Synthese des racemischen Tetrols **26**.



**Schema 10:** Synthese von Diol **23**.

Da die Acetonid-Schutzgruppe zwar säure- aber nicht basenlabil ist, konnte die Benzilylierung unter basischen Bedingungen durchgeführt werden. Dazu wurde die Nucleophilie der freien OH-Gruppen durch Deprotonierung mit Hilfe von Natriumhydrid erhöht. Unter Bildung von Natriumbromid wurde daraufhin die Substitution zum Benzylether **27** realisiert (**Schema 10**). Die Reaktion war stark exotherm und wurde daher unter Kühlung bei 0°C durchgeführt.

Das Rohprodukt dieser Reaktion, welches als gelbes Öl vorlag und noch einen relativ hohen Anteil an Verunreinigungen durch Benzylbromid und Benzylalkohol aufwies, war chromatographisch schwer zu reinigen. Daher waren mehrere Chromatographiedurchgänge nötig, um eine hohe Reinheit des Produkts zu gewährleisten. Es hat sich jedoch in Folgeversuchen herausgestellt, dass es sich lohnt, das verunreinigte Produkt weiter zu verwenden, da sich die genannten Verunreinigungen während der Reinigung der nächsten Stufe leicht entfernen lassen und dabei dennoch eine hohe Ausbeute über zwei Stufen erreicht wird.

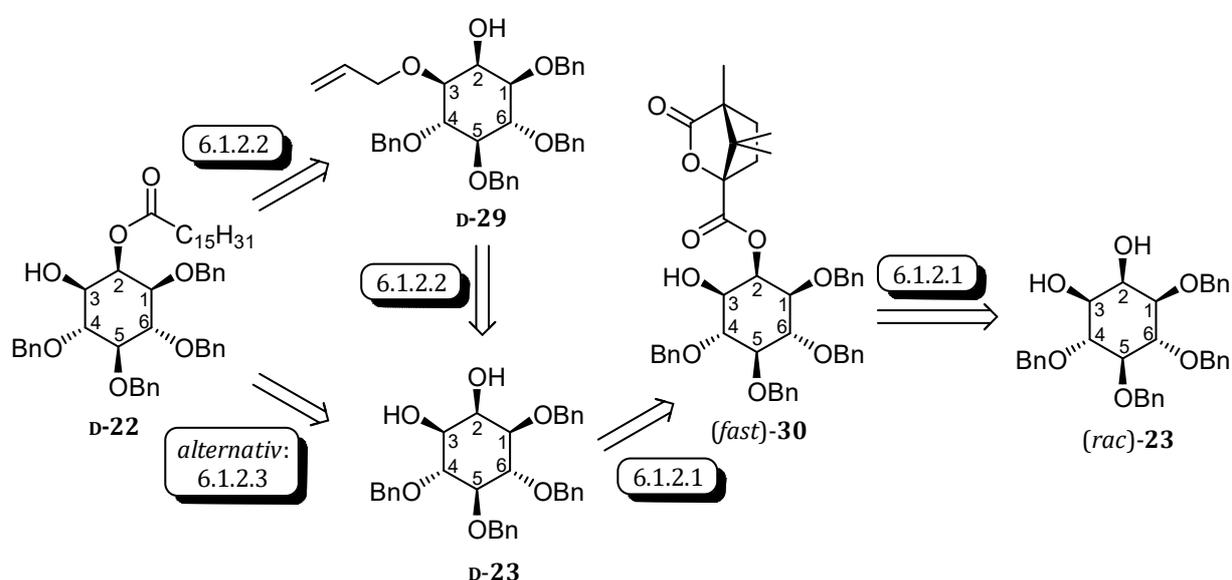
Eine alternative Schutzgruppe ist die *para*-Methoxybenzyl-Gruppe (PMB), welche aufgrund des +M-Effekts der Methoxygruppe nicht nur reaktiv, sondern im Gegensatz zu unsubstituierten Benzylethern auch unter sauren Bedingungen oder oxidativ abspaltbar ist.<sup>[73]</sup> Allerdings ist *para*-Methoxybenzylchlorid, das zur Einbringung der PMB-Gruppe verwendet wird, wesentlich teurer als Benzylbromid, welches zur Bildung von Benzylethern benötigt wird. Das 2-*O*-acylierte tetra-*O*-*para*-Methoxybenzyl-*myo*-inositol **28** (**Schema 24**, Kap. 6.1.4) wurde im Zuge einer Abschlussarbeit von Nils Jeschik<sup>[74]</sup> hergestellt und wird in dieser Arbeit bei Kupplungsreaktionen erprobt und mit der Benzyl-Schutzgruppe verglichen (Kap. 6.1.4).

Vollacetale können unter sauren Bedingungen hydrolysiert und so abgespalten werden. Das Acetonid **27** wurde daher 72 h bei Raumtemperatur mit Essigsäure (80%) umgesetzt.<sup>[75]</sup> Durch Neutralisation der Lösung wurde das Diol **23** ausgefällt und filtriert. Nach Entfernung zurückgebliebener Säure durch Extraktion und Säulenchromatographie konnte das Diol **23** in einer hohen Reinheit mit einer Ausbeute von 85% über zwei Stufen erhalten werden (**Schema 10**).

Neben der säulenchromatographischen Reinigung konnte das Produkt auch aus einem Gemisch von Petrolether/Ethylacetat 2:1 umkristallisiert werden. Auch auf diese Weise konnte das Produkt in hoher Reinheit gewonnen werden.

Durch die Optimierung der Reinigungsschritte war es möglich, die Ausbeute über zwei Stufen im Vergleich zu den Ergebnissen der Masterarbeit von 65% auf 85% zu erhöhen. Zusammengenommen ergibt sich für die Synthese von Diol (*rac*)-**23** eine Gesamtausbeute von 37% über drei Stufen.

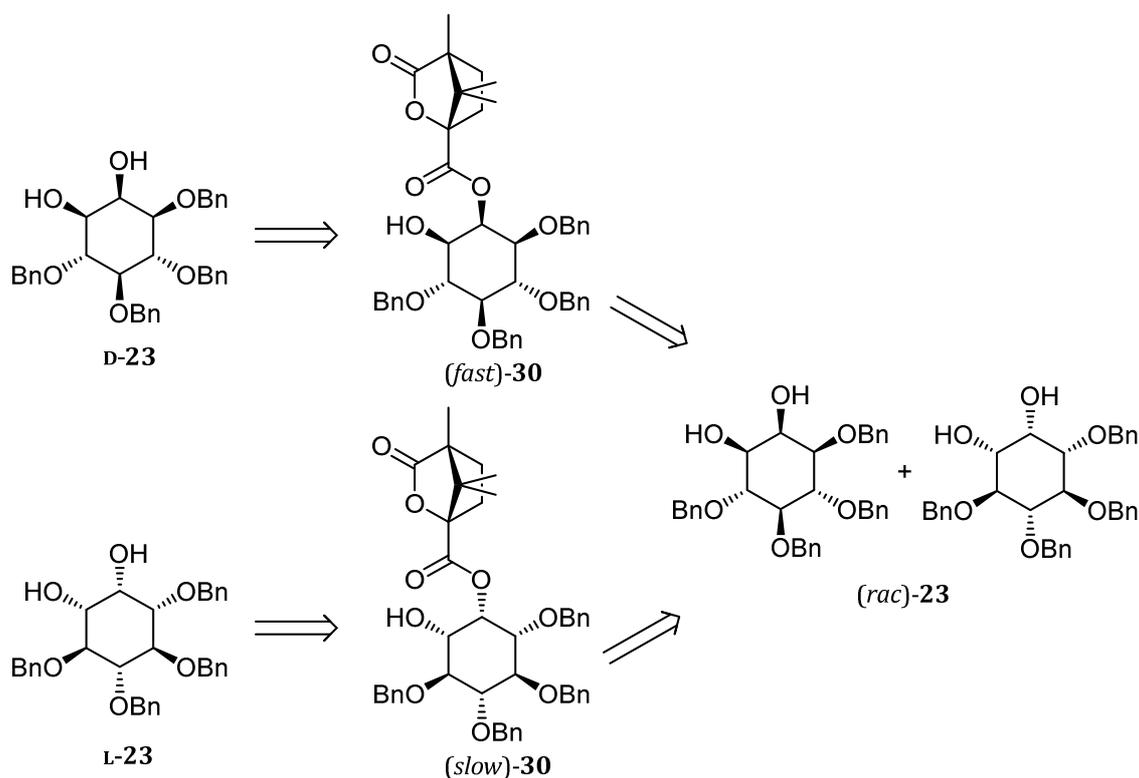
### 6.1.2 Synthese der Bausteine D-22 und L-22



**Schema 11:** Retrosyntheschema für die Verbindungen **D-22** und **L-22** (Kap. 6.1.2). Die in Kap. 6.1.2.3 beschriebene Route ist optional. Dargestellt sind nur die entsprechenden D-Derivate.

Ausgehend vom racemischen Diol (*rac*)-**23** sollte eine Syntheseroute zur Darstellung der Vorläufer **D-22** und **L-22** erprobt werden (**Schema 11**). Diese sollten dabei über die Diole **D-23** und **L-23** dargestellt werden, was über zwei Wege erreicht werden konnte. Einerseits konnten zunächst die 1-*O*-Allylether **D-29** und **L-29** hergestellt werden, welche eine Einbringung verschiedener Acylgruppen an der 2-Hydroxyfunktion ermöglichen sollten (Kap. 6.1.2.2). Alternativ dazu sollte eine direkte 2-*O*-Palmitoylierung durch Addition an das Racemat (*rac*)-**23** erprobt werden (Kap. 6.1.2.3). Die Darstellung der enantiomerenreinen Diole **D-23** und **L-23** durch Überführung des Racemats (*rac*)-**23** in die Diastereomere (*fast*)-**30** und (*slow*)-**30** sowie deren chromatographische Trennung wurde bereits in Teilen in Vorarbeiten<sup>[64]</sup> beschrieben und wird in Kap. 6.1.2.1 näher behandelt.

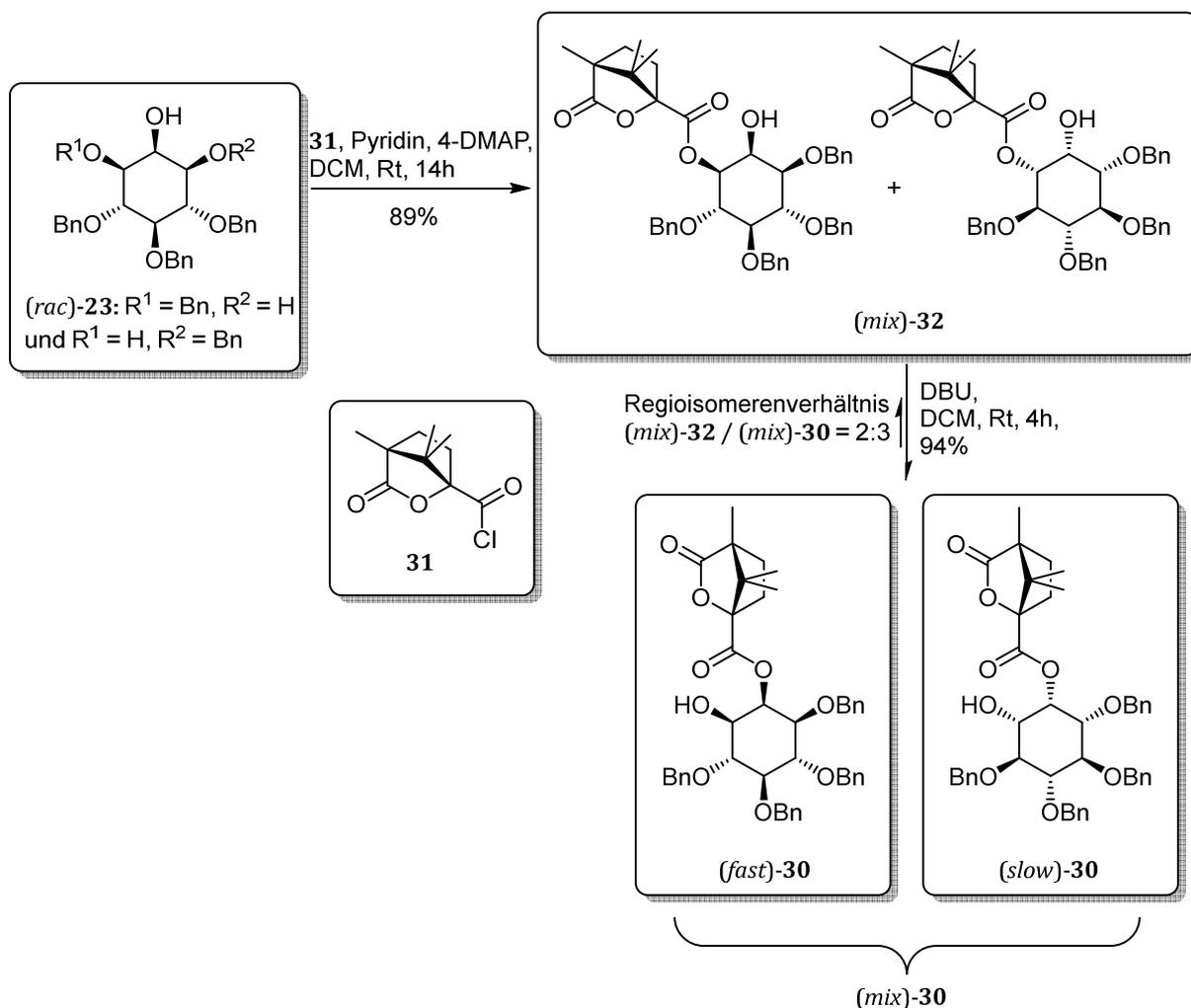
### 6.1.2.1 Enantiomerentrennung von Diol (*rac*)-23



**Schema 12:** Retrosyntheseschema für die Enantiomerentrennung von D-23 und L-23.

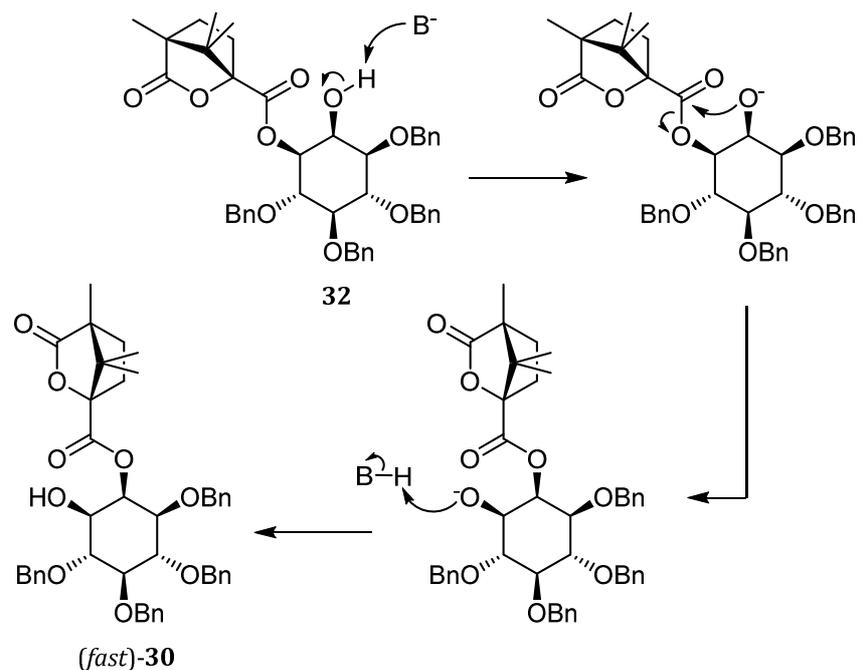
In meiner Masterarbeit beschäftigte ich mich unter anderem mit der Enantiomerentrennung des Racemats (*rac*)-23. Dabei verwendete ich drei verschiedene chirale Campherderivate, welche kovalent an 23 gebunden wurden. Der auf diese Weise erreichten Überführung in Diastereomere (**Schema 12**) sollte daraufhin ein präparativer Chromatographieschritt folgen, infolgedessen die nun chemisch unterschiedlichen Verbindungen getrennt werden sollten, was mit zwei der drei getesteten Campherderivate gelang.<sup>[64]</sup> Dabei hat sich die Verwendung der Camphanoylgruppe als die vorteilhafteste Methode herausgestellt.

Das Diol 23 wurde nach einer Vorschrift von Nkambule et al.<sup>[67]</sup> mittels 1*S*-(-)-Camphanoylchlorid 31 in Dichlormethan unter Zusatz von Pyridin acyliert, wobei der 1-*O*-acylierte Alkohol (*mix*)-32 in einer Ausbeute von 89% erhalten wurde (**Schema 13**). Nach der chromatographischen Reinigung konnte anschließend eine basenkatalysierte Acylgruppenwanderung des 1-*O*-acylierten Regioisomers durchgeführt werden, um 2-*O*-camphanoylierten Alkohol (*mix*)-30 zu erhalten.<sup>[67]</sup>



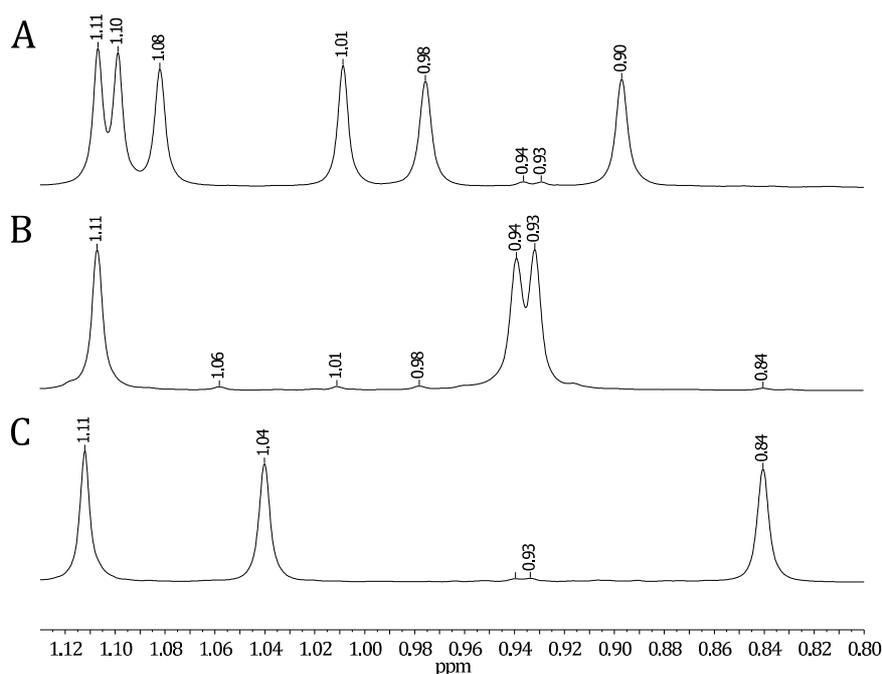
**Schema 13:** Einbringung der Camphanoylgruppe und baseninduzierte Acylgruppenwanderung im *large-scale*-Fall.

Bei der baseninduzierten Acylgruppenwanderung handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, bei der eine intramolekulare Umesterung zweier vicinaler Hydrofunktionen stattfindet (**Abb. 17**). Dabei wurden zum Teil sehr unterschiedliche Beobachtungen im Fall von *low scale* und *large scale*-Reaktionen gemacht. Während der Versuche der Masterarbeit konnten im *low-scale*-Fall nur Ausbeuten von 55% erreicht werden. Bei der *large scale*-Reaktion konnte die Ausbeute auf 94% erhöht werden, allerdings ergab sich dabei auch bloß ein Regioisomeren-Verhältnis  $(mix)\text{-}32 / (mix)\text{-}30$  von ca. 2:3 (**Schema 13**) im Gegensatz zu 1:4 im *low-scale*-Fall. Es wird daher angenommen, dass die Ansatzgröße einen Einfluss auf die Gleichgewichtseinstellung bei der Acylgruppenmigration ausübte.



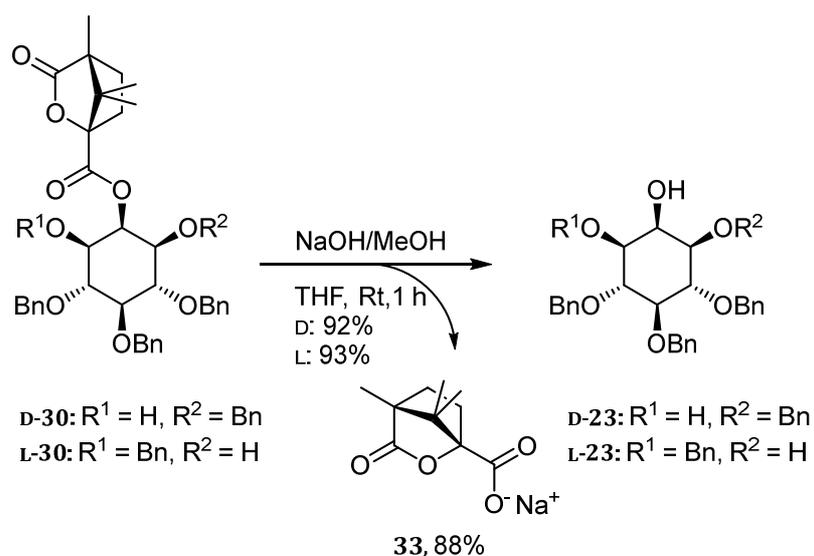
**Abb. 17:** Mechanismus der baseninduzierten Acylgruppenwanderung, beispielhaft für die Bildung von (*fast*)-30 dargestellt (B: Base).

Die Trennung der Diastereomere erfolgte auf die gleiche Weise wie in meiner Masterarbeit durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit einem Eluentengemisch von Dichlormethan und Diethylether (13:1, v/v). Alle anderen getesteten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische (u.a. Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol, Petrolether) hatten keine erkennbare Trennung der Diastereomere zur Folge gehabt.<sup>[64]</sup> **Abb. 18** zeigt die unterschiedlichen Isomere in ihrer Reinheit nach der chromatographischen Trennung.



**Abb. 18:** Markante Methylgruppen-Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zur Unterscheidung der Diastereomere nach der chromatographischen Reinigung: **A:** Diastereomeregemisch (*mix*)-**32**. **B:** Diastereomer (*fast*)-**30**. **C:** Diastereomer (*slow*)-**30**.

Zur Herstellung der Diole **D-23** und **L-23** musste als nächstes die Camphanoylgruppe abgespalten werden. Dazu wurden die Alkohole **D-30** und **L-30** in methanolischer Natriumhydroxidlösung (2 M) und Tetrahydrofuran basisch verseift.<sup>[76]</sup> Nach Neutralisation mit Salzsäure und wässriger Aufarbeitung konnten die Diole **D-23** und **L-23** in guten Ausbeuten von 92% und 93% erhalten werden (**Schema 14**).



**Schema 14:** Abspaltung der Camphanoylgruppe unter Generierung der Diole **D-23** und **L-23** sowie Reisolierung des Natriumsalzes der (1*S*)-(-)-Camphansäure **33**.

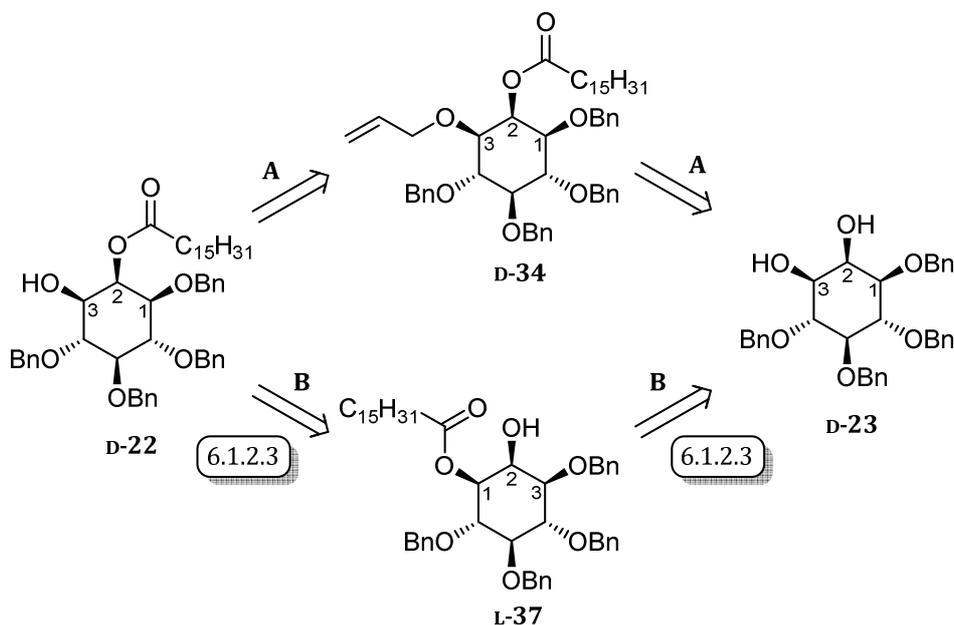
Da es sich beim abgehenden (1*S*)-(-)-Camphanat um einen chiralen und damit wertvollen Baustein handelte, wurde versucht, diesen rückzugewinnen. Dazu wurde das entstandene Anion **33** während der Aufarbeitung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung aus der organischen Phase extrahiert. Auf diesem Wege konnten 88% der eingesetzten (1*S*)-(-)-Camphansäure zurückgewonnen werden. Diese kann dann durch Chlorierung zum entsprechenden Säurechlorid **31** umgesetzt und zur Enantiomerentrennung von racemischen Diol (*rac*)-**23** eingesetzt werden.

Die Zuordnung der erhaltenen Enantiomere **D-23** und **L-23** wurde über Vergleich ihrer Drehwerte mit Literaturwerten (**D-23**: 21.2°, Literatur: 24°<sup>[62]</sup>, **L-23**: -24.1°, Literatur: -23.6°<sup>[77]</sup>) und der unterschiedlichen <sup>1</sup>H-NMR-Methyl-Signale<sup>[67]</sup> ihrer Vorstufen (*fast*)-**30** und (*slow*)-**30** (**Abb. 18**) durchgeführt.

Diese vorgestellte Art der Enantiomerentrennung von Diol **23** ist durchaus kritisch zu sehen, da hierfür drei Syntheseschritte benötigt werden. Die Ausbeuten über drei Stufen von 77% und einem Regioisomerenverhältnis von ca. 3:2 im *large-scale*-Fall bzw. 38% Ausbeute und einem Regioisomerenverhältnis von ca. 4:1 im *small-scale*-Fall befinden sich dennoch in einem zufriedenstellenden Bereich. Weiterhin ist zwar der Aufwand zur chromatographischen Trennung der Diastereomere (*fast*)-**30** und (*slow*)-**30** groß, jedoch ist es auf diese Weise möglich gewesen, große Mengen voneinander zu trennen. Eine chromatographische Trennung der Diole (*rac*)-**23** mit Hilfe von chiralen HPLC-Säulen ist zwar erwiesenermaßen möglich<sup>[65]</sup>, aber für multi-Gramm-Synthesen teuer und sehr aufwendig.

Die Diole **D-23** und **L-23** lagen also nahezu enantiomerenrein vor. Die Verunreinigung durch das jeweils andere Enantiomer lag bei unter 4%, weshalb keine weitere Reinigung durchgeführt und die Syntheseroute fortgeführt wurde.

### 6.1.2.2 Synthese über eine dreistufige Synthesesequenz: Schützungs-Acylierung-Entschützung

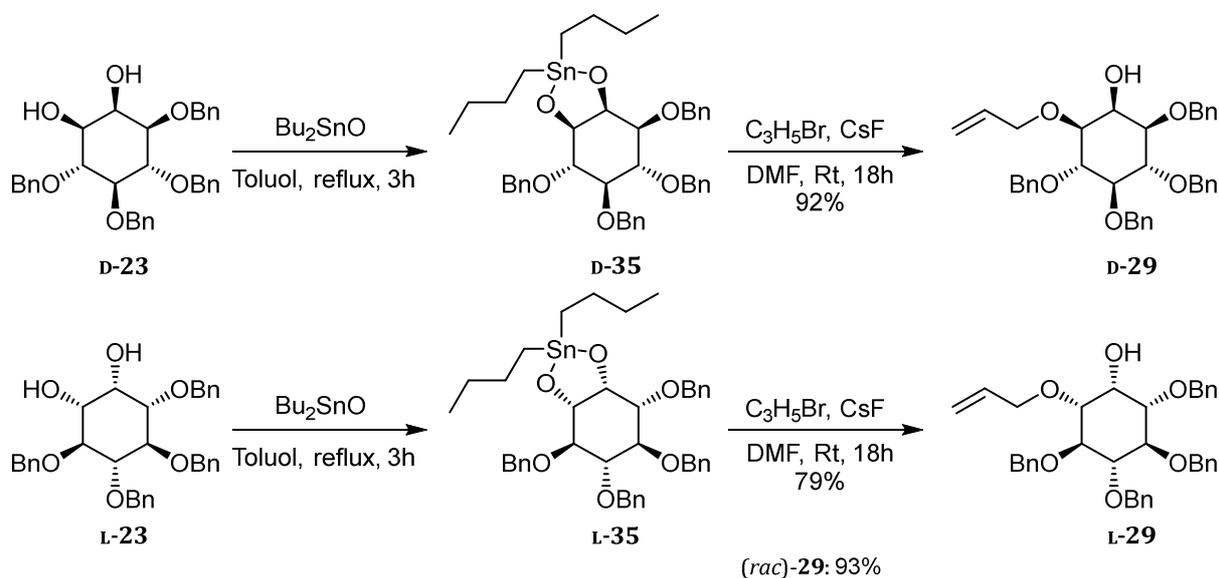


**Schema 15:** Retrosyntheseschema zur Synthese der Alkohole **D-22** und **L-22** (hier dargestellt als entsprechende D-Enantiomere).

Die Synthese der Alkohole **D-22** und **L-22** konnte über zwei Syntheserouten realisiert werden. Einerseits konnte eine dreistufige Synthesesequenz *Schützungs-Acylierung-Entschützung* nach Schlüter et al.<sup>[50]</sup> durch regioselektive 1-O-Allylierung der Diole **D-23** und **L-23** zu den entsprechenden Allylethern **D-34** und **L-34** durchgeführt werden (**Schema 15, A**) oder über eine zweistufige Synthesesequenz durch 1-O-Acylierung mit anschließender baseninduzierter Acylgruppenwandlung nach Nkambule et al.<sup>[67]</sup>, welche bereits in einem anderen Kontext (Kap. 6.1.2.1) angewendet wurde (**Schema 15, B**, Kap. 6.1.2.3).

Es soll an dieser Stelle auf die Synthese der 2-O-acylierten Allylether **D-34** und **L-34** eingegangen werden. Eine Anforderung an die gesamte Syntheseroute war, dass auf einer Stufe eine Einführung verschiedener Acylgruppen an die 2-O-Position möglich sein sollte. Dafür geeignet war der Allylether **29** aufgrund der 1-O-Allylgruppe, die eine Orthogonalität zu den vier Benzylgruppen aufwies, sowie der freien 2-Hydroxyfunktion. Diol **23** musste also regioselektiv an der 1-O-Position allyliert werden. Alais et al. realisierten 1983 einige regioselektive Allylierungen und Benzylierungen von Disacchariden unter Zuhilfenahme von Dibutylzinnoxid.<sup>[78]</sup> Diese Methode wurde daraufhin häufig bei Polyhydroxiden wie Sacchariden<sup>[79]</sup> und Inositolen<sup>[50]</sup> angewendet. Bei dieser Reaktion bildet sich ein Organylstannan, welches aufgrund der räumlichen Anordnung der Butylreste die Nucleophilie von einer einzigen Hydroxyfunktion erhöht, bzw. die der benachbarten abschwächt. Infolgedessen kommt es in der Reaktion mit Allyl-

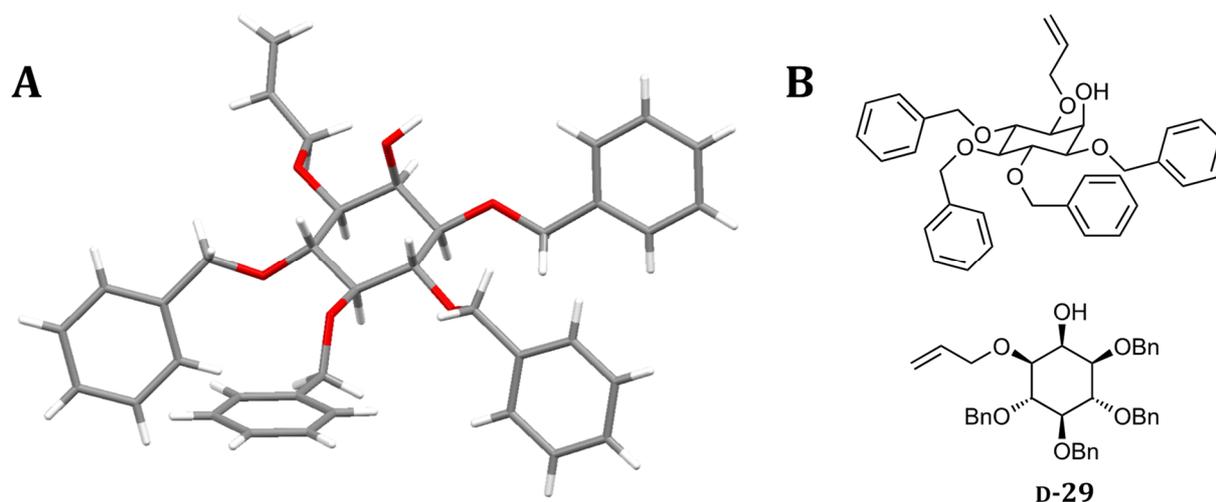
oder Benzylbromid zu einer regioselektiven Schützung. Ausgehend von den Diolen **D-23** und **L-23** wurde daher zunächst mit Dibutylzinnoxid das entsprechende Stannan **D-35** bzw. **L-35** gebildet. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Kondensation, weshalb die Reaktion unter Abscheidung von Wasser in siedendem Toluol in einer Dean-Stark-Apparatur durchgeführt wurde. Die entstehende Menge an Wasser ist hierbei so gering, dass sie mit bloßem Auge nur bei Multi-Gramm-Reaktionen sichtbar ist. Nach ca. drei Stunden war die Kondensation abgeschlossen. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde das Zinnorganyl **35** in *N,N*-Dimethylformamid mit einem leichten Überschuss an Allylbromid umgesetzt. Zum Fällen des Bromids wurde zusätzlich Caesiumfluorid hinzugegeben. Nach 18 h Reaktionszeit wurden schließlich die 1-*O*-Allylether **D-29**, **L-29** und (*rac*)-**29** in guten Ausbeuten von 79% - 93% erhalten (**Schema 16**). Die Bildung des unerwünschten 2-*O*-Allylethers konnte nicht festgestellt werden.



**Schema 16:** Regioselektive Allylierung von **D-29**, **L-29** und (*rac*)-**29**.

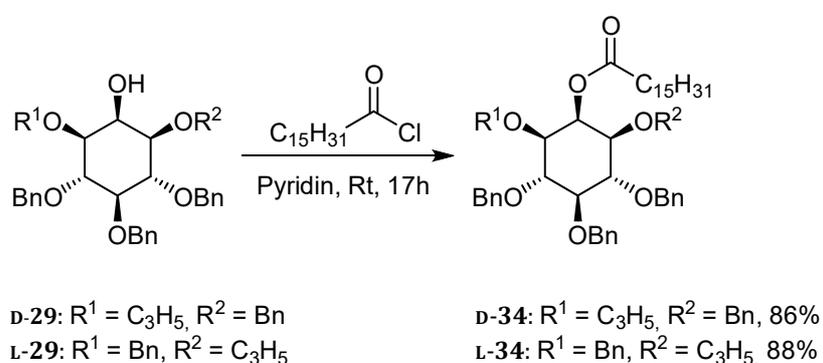
Testweise wurde auch im kleinen Maßstab versucht, das entstehende Wasser mit Hilfe von Molekularsieb aus dem Reaktionssystem zu entfernen. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Molekularsieb eine zu geringe Wasserspeicherkapazität besaß, um die entstehenden Mengen aufzunehmen. Infolgedessen sank die Ausbeute der gesamten Reaktion auf 29%.

Das gereinigte, kristalline Produkt wurde daraufhin röntgenkristallographisch untersucht. Mit dieser Aufnahme konnte jedoch keine Bestimmung der Absolutkonfiguration durchgeführt werden, da sich im Molekül kein Schweratom befindet und somit der Flack-Parameter bei der Messung weder 0 noch 1 war. Die Absolutkonfiguration konnte allerdings bereits an anderer Stelle durch den Vergleich mit der Literatur bestätigt werden (Kap. 6.1.2.1). Die Kristallstruktur ist in **Abb. 19** abgebildet.



**Abb. 19:** Verschiedene Darstellungen der Verbindung **D-29**: **A:** Kristallstruktur, **B:** Keil-Strich-Darstellungen.

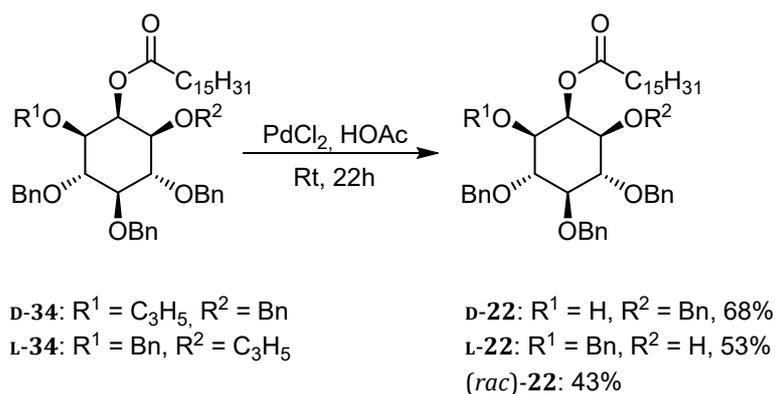
Als nächster Schritt konnte die freie 2-Hydroxyfunktion des *myo*-Inositolderivates acyliert werden. Beim Acylrest sollte es sich wie im Naturstoff EhPIb **18** (Kap. 4.4) um einen Palmitoylrest handeln. In einer Vorarbeit war von Landschulze bereits die Acylierung unter Steglich-Bedingungen erprobt worden, wobei nach zwei Tagen eine Ausbeute von 83% erhalten werden konnte.<sup>[70]</sup> Aufgrund der niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit und der daraus resultierenden langen Reaktionszeit sollte nun eine Optimierung vorgenommen werden. Dazu wurde der Alkohol **29** im Sinne der Einhorn-Variante der Schotten-Baumann-Reaktion mit Palmitoylchlorid in trockenem Pyridin umgesetzt (**Schema 17**). Pyridin ist in zweierlei Hinsicht ein geeignetes Lösungsmittel. Einerseits sind die Löslichkeitseigenschaften gut, andererseits dient die nicht nukleophile Base zum Abfangen freiwerdenden Chlorwasserstoffs, wobei sich Pyridiniumchlorid bildet. Natürlich ist eine trockene Reaktionsführung Voraussetzung, da andernfalls das Hydroxid anion als starkes Konkurrenz nukleophil gebildet werden kann, was eine Verseifung, also die Rückreaktion zur Folge hätte.



**Schema 17:** Acylierung der Alkohole **D-29** und **L-29** zu den Estern **D-34** und **L-34**.

Durch Veränderung der Reaktionsbedingungen konnte nun im Vergleich zu der in der Masterarbeit bereits vorgestellten Reaktion eine Verkürzung der Reaktionsdauer von zwei Tagen auf 17 h und ein leicht verbesserter Umsatz festgestellt werden. Da das Säurechlorid **36** in dreifachem Überschuss zugegeben wurde und bei der basisch-wässrigen Aufarbeitung die freie Palmitinsäure entstand, welche aufgrund ihrer Lipophilie ähnliche chromatographische Eigenschaften wie Ester **34** besaß, gestaltete sich die Reinigung als problematisch. Es ergab sich, dass eine vollständige Reinigung des Rohproduktes durch mehrmaliges Wiederholen des Reinigungsschrittes zwar potentiell möglich war, dies ging jedoch mit leichten Ausbeuteverlusten einher. **D-34** und **L-34** konnten so mit einer Ausbeute von 86% und 88% erhalten werden (**Schema 17**). Es stellte sich aber als vorteilhaft heraus, die vollständige Reinigung auf der Stufe des Alkohols **L-22** durchzuführen, da verbliebene Mengen an Palmitinsäure keinen negativen Einfluss auf die Folgereaktion ausübten und sich das erhaltene Produkt aufgrund unterschiedlicher Retentionseigenschaften leicht von der Palmitinsäure abtrennen ließ.

Im nächsten Schritt wurde die Entfernung der Allyl-Schutzgruppe bei bereits bekannten Reaktionsbedingungen nach Landschulze<sup>[70]</sup>, Mereyala et al.<sup>[80]</sup> bzw. Smith et al.<sup>[81]</sup> unter Palladium(II)-Katalyse durchgeführt. Dazu wurde der Allylether **34** mit Palladium(II)-chlorid in Essigsäure (80%) zum Alkohol **22** umgesetzt. Die von Landschulze<sup>[70]</sup> angegebene Ausbeute von 75% konnte jedoch auch nach mehrmaliger Durchführung und dem Versuch der Reaktionsoptimierung nicht erhalten werden. Die erreichten Ausbeuten lagen stets im Bereich zwischen 43% und 68% (**Schema 18**).



**Schema 18:** Deallylierung der vollständig geschützten *myo*-Inositole **D-34** und **L-34** zu den Alkoholen **D-22** und **L-22**.

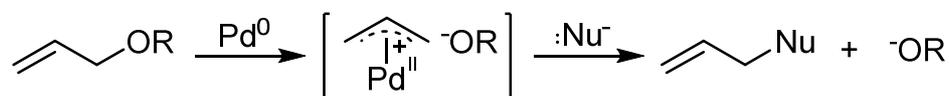
Es sollte daher eine Alternativreaktion gefunden werden. Konda et al. entwickelten 2011 eine schonende Methode zur Abspaltung von Allylethern mit Hilfe von elementarem Iod in Polyethylenglykol nach den Prinzipien der grünen Chemie.<sup>[82]</sup> Sie postulierten einen

Mechanismus, der eine heterolytische Spaltung des elementaren Iods und eine Mehrfachkoordinierung des I<sup>+</sup>-Ions durch Polyethylenglykol (PEG), ähnlich einem Kronenether, vorsieht. Nach diesem Vorbild wurde **D-34** mit 10 mol-% Iod in PEG-400 umgesetzt, doch konnte auch nach mehreren Tagen kein Umsatz festgestellt werden.

Mart und Shashidar veröffentlichten Reaktionsbedingungen, die eine Deallylierung mit Hilfe von Palladiumhydroxid auf Aktivkohle (Pearlman's Katalysator) vorsahen.<sup>[83]</sup> Nach dieser Vorschrift wurde **D-34** mit Pearlman's Katalysator versetzt und 1.5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte jedoch lediglich das Edukt reisoliert werden.

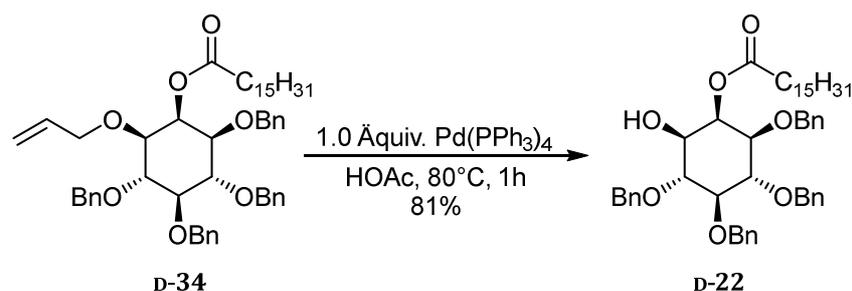
Nakayama et al.<sup>[84]</sup> verwendeten Palladium(0) zur Deallylierung. Dazu verwendeten sie Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) und erzielten Ausbeuten von bis zu 88% bei der Deallylierung von Glucosaminderivaten (*E. coli* Lipid-A, Kap. 3, **Abb. 1**) in Essigsäure bei 80°C. Auffällig war dabei, dass sie beim Einsatz von katalytischen Mengen Palladium(0)-Spezies signifikant weniger Ausbeute erhielten als mit äquimolarem Stoffverhältnis. Dennoch gingen sie weiterhin davon aus, dass es sich tatsächlich um einen Katalysator handelte, da diese These einerseits durch den vermuteten Mechanismus (**Abb. 20**) und andererseits durch eine Nichtlinearität von eingesetztem Katalysator und Ausbeute bestätigt wurde. Die Halbierung des Katalysators hatte lediglich eine Ausbeuteverringerung von 88% auf 86% zur Folge, der Einsatz des Katalysators auf 0.3 Äquivalente führte zu einer Ausbeute von 79%.<sup>[84]</sup>

Mechanistisch gesehen wird der Allylether in einem ersten Schritt oxidativ an das Palladiumatom addiert. Durch Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen bildet sich ein  $\eta^3$ - $\pi$ -Komplex. In einem zweiten Schritt wird das aktivierte Alken von einem Nukleophil angegriffen und verlässt schließlich im Zuge einer reduktiven Eliminierung den Komplex.



**Abb. 20:** Postulierter Mechanismus der Deallylierung mit Palladium(0)-Katalysator über einen  $\pi$ -Allyl-Komplex nach Nakayama et al.<sup>[84]</sup>

Unter den von Nakayama et al. veröffentlichten Bedingungen wurde der Allylether **D-34** umgesetzt. Dieser wurde 1 h bei 80°C in Eisessig mit Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) umgesetzt, wonach der Alkohol **D-22** mit einer Ausbeute von 81% erhalten werden konnte (**Schema 19**). Dabei konnte eine Acylabspaltung festgestellt werden. Wie weiter unten beschrieben, lag die Ausbeute des entsprechenden Ether-Derivats (Kap. 6.3.1) bei 98%.



**Schema 19:** Deallylierung von **D-34** mit Hilfe von Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0).

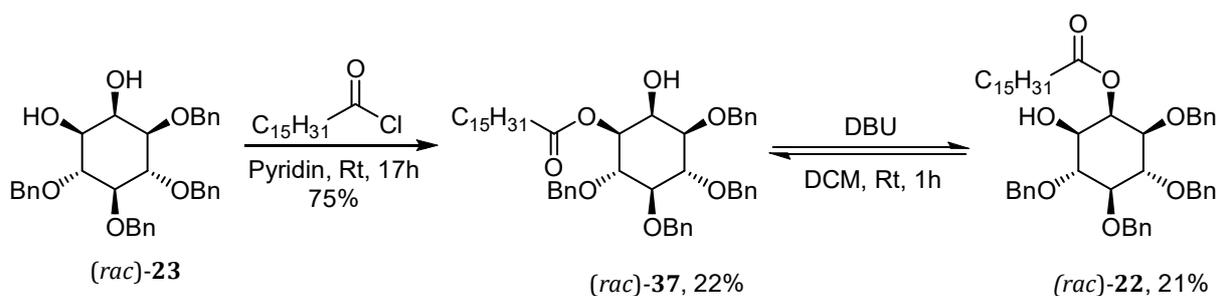
Daher wird davon ausgegangen, dass zwar ein nahezu vollständiger Umsatz stattgefunden hat, aber die Differenz der Ausbeuten auf eine Abspaltung der Estergruppe aufgrund der relativ harschen Reaktionsbedingungen (80°C, Eisessig) zurückzuführen ist. Dennoch brachte die Umstellung von Pd(II) auf Pd(0) eine deutliche Verbesserung der Ausbeute und der gesamten Syntheseroute mit sich. Alle Syntheseschritte ausgehend vom Tetrol **26** wiesen nun Ausbeuten von 79% und höher auf.

Zusammengefasst wurden die Alkohole **D-22** und **L-22** ausgehend von den Diolen **D-23** und **L-23** mit einer Gesamtausbeute von 64% und 37% über drei Stufen hergestellt. Der Unterschied der Ausbeuten lässt sich hauptsächlich durch den Umstand erklären, dass **D-34** Pd(0)-katalysiert deallyliert wurde, während bei **L-34** eine Pd(II)-Katalyse durchgeführt wurde.

### 6.1.2.3 Synthese über eine Acylgruppenwanderung

Optional zu der dreistufigen Synthesesequenz *Schützung-Acylierung-Entschützung* ausgehend vom Diol **23** (Kap. 6.1.2.2) konnte der Alkohol **22** auch durch direkte 2-*O*-Acylierung synthetisiert werden. Da sich jedoch die 1-Hydroxyfunktion in vorangegangenen Reaktionen als tendenziell reaktiver als die 2-Hydroxyfunktion herausgestellt hatte, war bevorzugt eine 1-*O*-Acylierung des Diols zum Ester **37** zu erwarten.

Das racemische Diol **23** wurde daher in einer Testreaktion bei ähnlichen Bedingungen wie in Kap. 6.1.2.1 beschrieben mit Palmitoylchlorid in Pyridin umgesetzt. Wie bereits erwartet, wurde nach der vollständigen Reaktion der 1-*O*-acylierte Ester (*rac*)-**37** in einer Ausbeute von 75% erhalten. Das 2-*O*-Regioisomer konnte nicht nachgewiesen werden. In Kap. 6.1.2.1 wird eine baseninduzierte 1-*O*-2-*O*-Acylgruppenwanderung beschrieben. In gleicher Weise wurde (*rac*)-**37** unter ähnlichen Reaktionsbedingungen mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) umgesetzt (**Schema 20**).



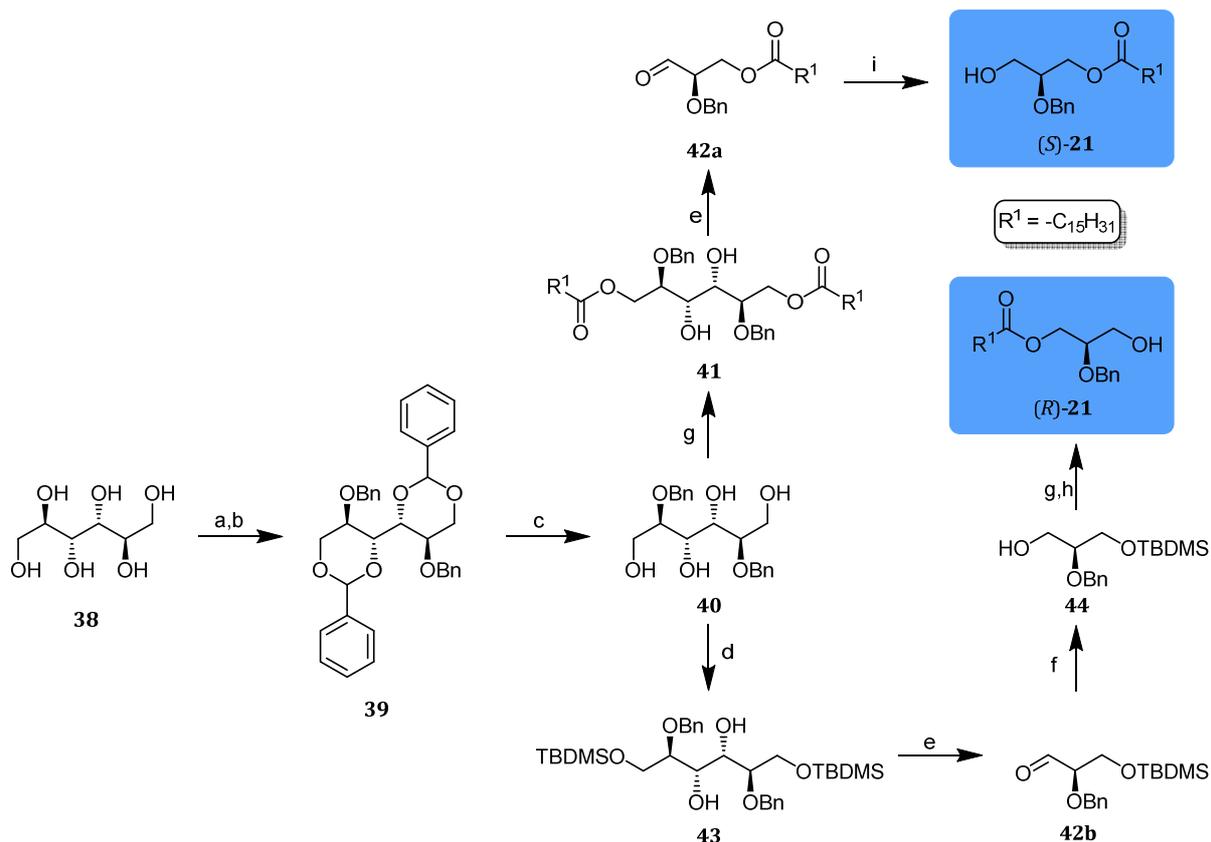
**Schema 20:** Synthese von 2-*O*-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**22** durch Acylierung und baseninduzierte Acylgruppenwanderung.

Im Gegensatz zu den in Kap. 6.1.2.1 beschriebenen Reaktionsbedingungen wurde die Reaktionslösung nur eine Stunde lang gerührt, da nach dieser Zeit dünnschichtchromatographisch eine Einstellung des Reaktionsgleichgewichts festgestellt werden konnte. Nach Beendigung der Reaktion, Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnten die beiden Regioisomere (*rac*)-**22** und (*rac*)-**37** mit einem Verhältnis von 1:1 in einer Ausbeute von 43% erhalten und erfolgreich chromatographisch voneinander getrennt werden. Im Vergleich zur dreistufigen Synthese über den Allylether **29** (Kap. 6.1.2.2) ist dieser Reaktionsweg jedoch wegen einer deutlich geringeren Ausbeute unterlegen.

### 6.1.3 Synthese der Glycerinderivate (*R*)-**21** und (*S*)-**21**

Die Synthese der Glycerinderivate (*R*)-**21** und (*S*)-**21** (**Abb. 21**) wurde in unserem Arbeitskreis von Dirk Landschulze durchgeführt und wird daher an dieser Stelle nur skizziert. Die Synthese beider Vorläufer verlief ausgehend vom *D*-Mannitol **38** *ex-chiral-pool*. Dabei wurden die Hydroxyfunktionen an den Positionen C-1 und C-3 sowie C-4 und C-6 zunächst selektiv mit jeweils einer Benzyliden-Klammer blockiert. Durch die Blockierung der daraufhin freiliegenden Positionen C-2 und C-5 mit jeweils einer Benzylschutzgruppe wurde das vollständig geschützte Mannitolderivat **39** dargestellt. In einem dritten Schritt wurden dann die Benzyliden-Schutzgruppen säurekatalysiert entfernt. Das erhaltene Tetrol **40** stellte einen Gabelpunkt in der Syntheseroute dar, da von dort aus auf zwei verschiedenen Routen die Alkohole (*R*)-**21** und (*S*)-**21** synthetisiert werden konnten. Zunächst soll die Route zum (*S*)-Derivat beschrieben werden. Durch selektive Acylierung der Positionen C-1 und C-6 wurde das *syn*-Diol **41** erhalten.

Auf dieser Stufe ist es möglich, durch die Wahl des Säurechlorides die Kettenlänge der späteren Glycerin-Fettsäurekette des Phosphatidylinositols zu bestimmen. Wie bereits dargestellt, hatten massenspektrometrische Analysen vom amöbialen EhPIb **18** ergeben, dass es sich bei dem Naturstoff um eine aliphatische C<sub>28</sub>-Kette handelt (Kap. 4.4).<sup>[1]</sup> Versuche, eine Octacosanoylgruppe wie bei den Naturstoffen EhPIb anzubringen, schlugen zunächst an dieser Stelle fehl.



**Abb. 21:** Reaktionsschema zur Synthese von (*S*)-**21** und (*R*)-**21**. Die Synthese wird in der Dissertationsschrift von Dirk Landschulze (unveröffentlicht) ausführlich beschrieben. Reaktionsbedingungen: **a)** Benzaldehyd,  $H^+$ , **b)**  $BnBr$ ,  $NaH$ , TBAL, **c)**  $H^+$ , **d)**  $TBDMSCl$ , Imidazol, **e)**  $NaIO_4$ , **f)**  $NaBH_4$ , **g)** Palmitoylchlorid, Pyridin, **h)**  $Et_3N \cdot 3 HF$ , **i)**  $NaBH_3CN$ , pH 5.

Da weder eine Acylierung unter Steglich-Bedingungen aufgrund der Unlöslichkeit der Octacosansäure noch die Synthese des entsprechenden  $C_{28}$ -Säurechlorids mit Hilfe von Thionylchlorid gelang, wurde aus diesem Grund hier zunächst als Acylierungsreagenz das kürzere und damit lösliche Palmitinsäurechlorid gewählt, das auch für die Acylierung der 2-Position des Inositolteils verwendet wurde.<sup>[70]</sup> Eine Möglichkeit dennoch eine  $C_{28}$ -Kette an das dem Glycerin ähnlichen 1,3-Propandiol anzubringen wird im Kap. 6.2.2.1 näher erläutert.

Das *syn*-Diol **41** wurde dann mit Hilfe von Natriumperodat oxidativ zum Aldehyd **42a** gespalten und daran anschließend mit Natriumborhydrid zum Alkohol (*S*)-**21** reduziert. Zur Synthese des entsprechenden (*R*)-Alkohols (*R*)-**21** wurde das Tetrol **40** mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zum entsprechenden *syn*-Diol **43** silyliert. Äquivalent zur zuvor beschriebenen Route wurde die Verbindung **43** oxidativ zum Aldehyd **42b** gespalten und direkt zum Alkohol **44** reduziert. Die nun freie *sn*-1-Hydroxyfunktion wurde daraufhin mit Palmitoylchlorid acyliert. Nach anschließender Desilylierung mit Triethylamin-Trihydrofluorid konnte somit (*R*)-**21** als Enantiomer von Verbindung (*S*)-**21** erhalten werden. Auf diese gezeigte Weise war es möglich, aus einem einzelnen optisch reinen Naturstoff **38** und seinem optisch reinen Spaltprodukt **40**

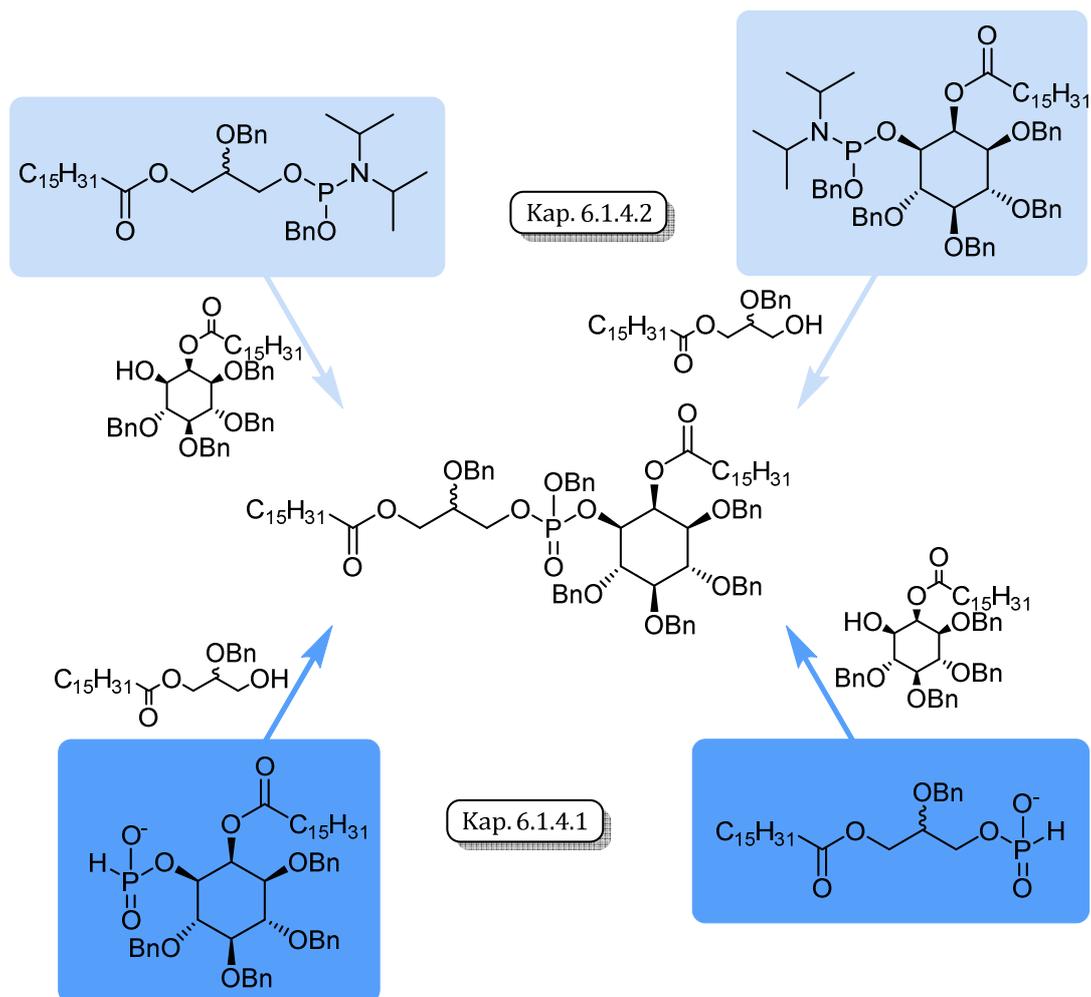
*ex-chiral-pool*-synthetisch die beiden Enantiomere (*R*)-**21** und (*S*)-**21** als Ausgangsverbindungen zur Kupplung zum Phosphatidylinositol in guten Ausbeuten darzustellen.

#### 6.1.4 Kupplung zum Phosphatidylinositol

Phosphatidylinositole sind Phosphatdiester. Ähnlich wie bei DNA und RNA stellt die Phosphatgruppe eine Brücke zwischen zwei Molekülteilen dar. Eine derartige Phosphatbrücke kann über zwei Alkohol-Vorläufer hergestellt werden, indem einer erst an einen aktivierten Phosphor(III)-Baustein und dieser schließlich an den zweiten Vorläufer gekuppelt wird. Im Fall von Phosphatidylinositolen kann also die Synthese auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden. Einerseits kann zuerst der *myo*-Inositol-Teil mit einem reaktiven Phosphat- oder Phosphatvorläufer-Baustein versehen werden, welcher dann in einer zweiten Kupplungsreaktion an den Glycerin-Teil gekuppelt wird. Der zweite Weg wäre die Synthese in umgekehrter Reihenfolge (**Abb. 22**).

Da die Synthesen der enantiomerenreinen Alkohole **D-22** und **L-22** sowie (*R*)-**21** und (*S*)-**21** sehr zeit- und materialaufwendig sind, werden unten in einigen vorgestellten Reaktionen zu Testzwecken Modellverbindungen verwendet, deren Synthesen erheblich einfacher und kürzer sind und die strukturelle Ähnlichkeiten mit den o.g. Verbindungen besitzen. So wurde statt der Glycerine (*R*)-**21** und (*S*)-**21** in einigen Reaktionen 3-Hydroxypropylpalmitat **46** verwendet, welches keine 2-Hydroxyfunktion besitzt und daher achiral ist. Die Herstellung dieses Bausteins ist eine einfache Ein-Stufen-Synthese und wird in Kap. 6.2 dargestellt. Inwiefern diese *pseudo*-Glycerin-Verbindungen immunbiologisch aktiv sind und welchen Einfluss die 2-Hydroxyfunktion am Glycerin-Teil auf die Erkennung durch den TCR hat, wird im Kap. 6.4 näher erläutert. Als weitere Vereinfachung wurde in einigen Testreaktionen statt der enantiomerenreinen *myo*-Inositole **D-22** und **L-22** das entsprechende Racemat (*rac*)-**22** verwendet, welches eine drei Stufen kürzere Syntheseroute besitzt und keine aufwendige chromatographische Trennung der Diastereomere benötigt.

In der Literatur sind eine Reihe von Kupplungsreaktionen bekannt. Neben der *cycloSal*-Methode<sup>[85]</sup>, welche im Arbeitskreis Meier entwickelt wurde und dort sehr etabliert ist (nicht gezeigt), können Kupplungen auch über Amidite<sup>[86]</sup> (**Abb. 22**, hellblau) oder *H*-Phosphonate (**Abb. 22**, dunkelblau)<sup>[87]</sup> durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde sowohl die *H*-Phosphonat-Methode (Kap. 6.1.4.1), als auch die Phosphoramidit-Methode (Kap. 6.1.4.2) erprobt, wobei sich letztere gegenüber den anderen als überlegen erwies (Kap. 6.1.4.3).

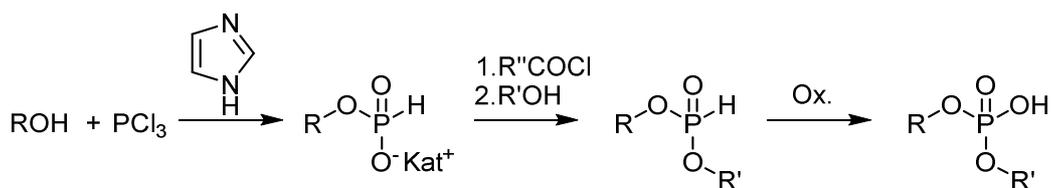


**Abb. 22:** Zwei Methoden zur Synthese von Phosphattriestern durch Kupplung von Glycerin- und Inositolvorläufern. **Hellblau:** Phosphoramidit-Methode. **Dunkelblau:** *H*-Phosphonat-Methode.

Weiterhin als wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Synthese hat sich die Wahl der Schutzgruppe des entstehenden Phosphats herausgestellt. Hier wurden zwei Schutzgruppen getestet. Zunächst wurde für das phosphorhaltige Kupplungsreagenz die geläufige Cyanoethyl-Gruppe erprobt. Diese wird im Rahmen der chemischen DNA-Synthese verwendet, da sie dort hohe Ausbeuten und eine gute Abspaltbarkeit zeigt. In Kap. 6.1.4.2.3 wird allerdings dargestellt, dass große Probleme bei der Abspaltung der Cyanoethylgruppe auftraten. Als zweites wurde die Benzylgruppe getestet. Dies ermöglichte schließlich die erfolgreiche Synthese der Zielverbindungen.

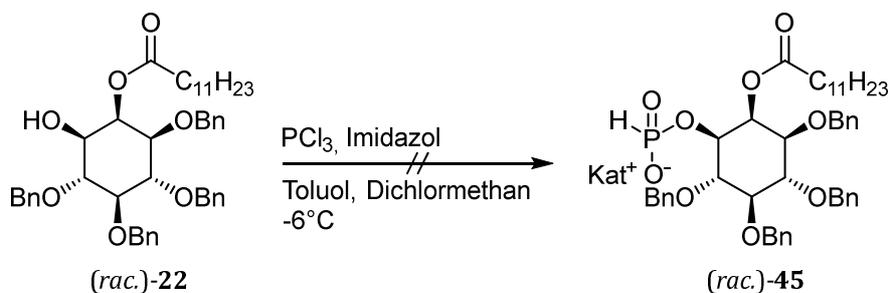
### 6.1.4.1 Kupplung über *H*-Phosphonate

Die *H*-Phosphonat-Methode ist eine seit langem etablierte Methode zur Synthese von Nucleotiden oder anderen phosphorhaltigen Verbindungen wie GPI-Strukturen. *H*-Phosphonate besitzen aufgrund ihrer Mesomerieeigenschaften eine vergleichsweise hohe Stabilität, weswegen sie häufig bei der Synthese von Phosphatdi- oder triestern Verwendung finden.<sup>[14, 20, 55, 88-90]</sup>



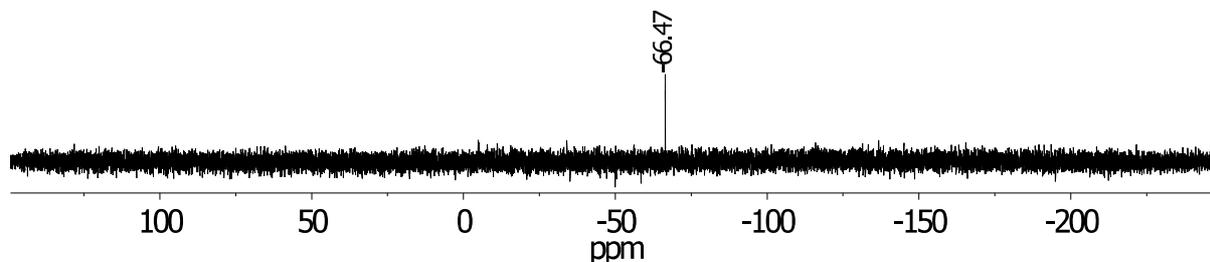
**Schema 21:** Generelles Reaktionsschema zur Säurechlorid-aktivierten Kupplung über *H*-Phosphonate.

Im klassischen Sinne stellt man bei der *H*-Phosphonat-Methode zunächst einen *H*-Phosphonsäuremonoester aus einem Alkohol, Phosphor(III)-chlorid und Imidazol her, welcher dann mit Hilfe eines Säurechlorids wie Pivaloylchlorid aktiviert und mit dem gewünschten Alkohol zu einem *H*-Phosphonsäurediester umgesetzt wird. Nach der Oxidation mit einem oxidativen Reagenz wie elementarem Iod oder *meta*-Chlorperbenzoesäure wird dann der Phosphatdiester erhalten (**Schema 21**).



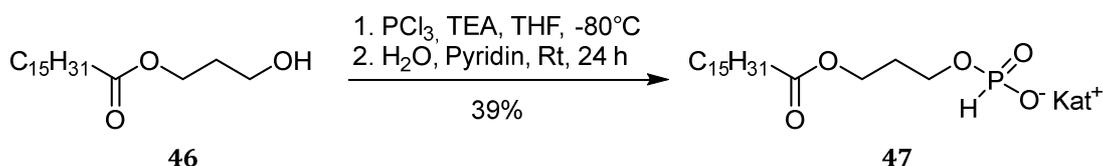
**Schema 22:** Versuch der Synthese von *H*-Phosphonat (*rac*)-45.

Als erstes wurde versucht, auf diese Weise einen *H*-Phosphonsäuremonoester eines *myo*-Inositols herzustellen. Dazu wurde der Alkohol (*rac*)-22 bei  $-6^{\circ}\text{C}$  mit Phosphor(III)-chlorid umgesetzt. Es konnte jedoch statt des Produkts (*rac*)-45 lediglich eine unidentifizierte Phosphorspezies erhalten werden (**Schema 22**, **Abb. 23**).



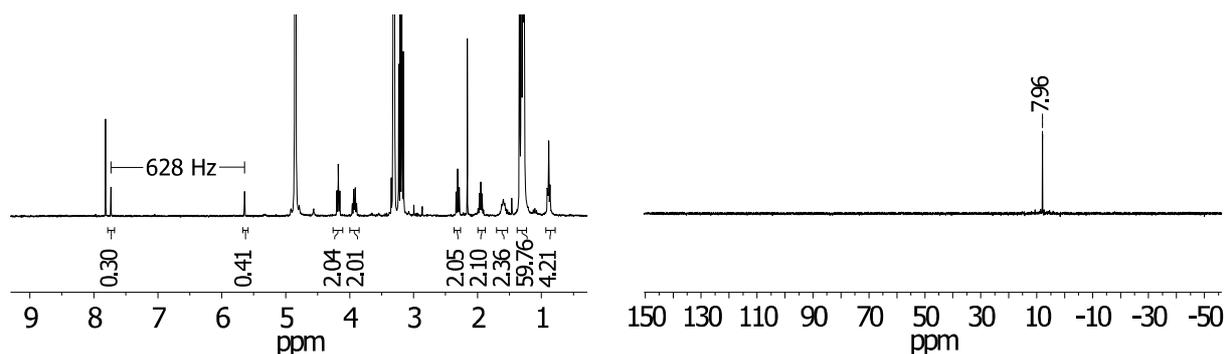
**Abb. 23:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Rohprodukts mit unbekannter Phosphorspezies.

Anschließend wurde versucht, das entsprechende *H*-Phosphonat von 3-Hydroxypropylpalmitat **46** zu synthetisieren. Dazu wurde ein zweifacher Überschuss an Phosphor(III)-chlorid mit 3-Hydroxypropylpalmitat bei -80°C versetzt. Nach Hydrolyse und einer Aufarbeitung mit mehreren Extraktionsschritten wurde das Rohprodukt aus eiskaltem Methanol umkristallisiert und chromatographisch gereinigt. Schließlich konnte der *H*-Phosphonatmonoester **47** in einer mäßigen Ausbeute von 39% erhalten werden (**Schema 23**). Als Nebenreaktion entstand bei der Reaktion auch der entsprechende *H*-Phosphonsäurediester, welcher bei der chromatographischen Reinigung abgetrennt werden konnte.



**Schema 23:** Synthese des *H*-Phosphonatmonoesters **47**.

Die Charakterisierung des erhaltenen Produkts erfolgte über <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie. Anhand der für *H*-Phosphonsäuremonoester typischen <sup>1</sup>J<sub>H,P</sub>-Kopplungskonstante von 628 Hz konnte das Produkt vom *H*-Phosphonsäurediester mit einer typischen Kopplungskonstante von ca. 700 Hz unterschieden werden (**Abb. 24**).

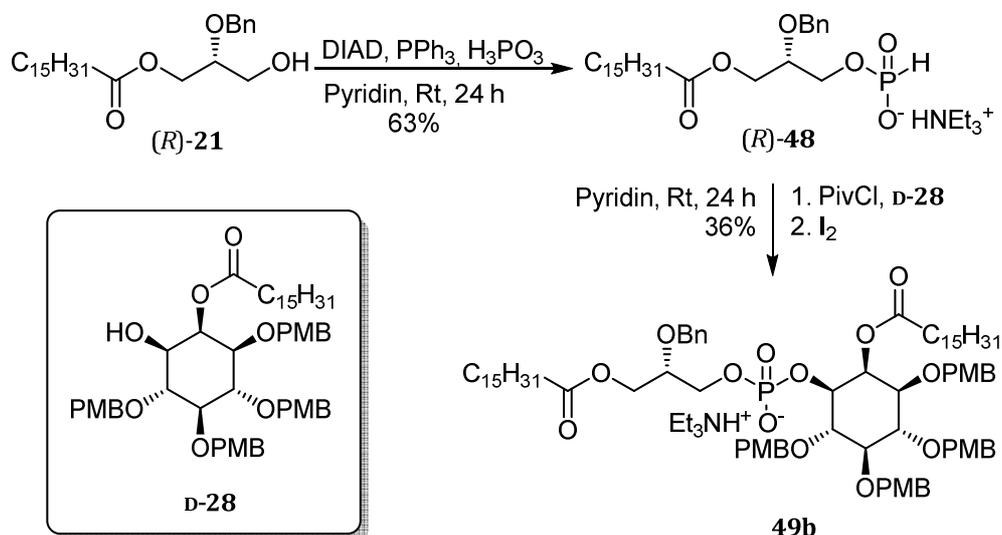


**Abb. 24:** Links: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **47** in Methanol-d<sub>4</sub>. Hervorgehoben ist die <sup>1</sup>J<sub>H,P</sub>-Kopplungskonstante von 628 Hz. Rechts: <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum des *H*-Phosphonsäure-Monoesters **47**.

In einer weiteren Reaktion wurde eine *H*-Phosphonat-Kupplung unter Mitsunobu-Bedingungen erprobt. Dies hat den Vorteil, dass die Bildung eines *H*-Phosphonat-Diesters auf diesem Wege nicht zu erwarten ist. Stawinski und Lavén veröffentlichten diesbezüglich 2009 eine Methode zur

Phosphorylierung von Nucleosiden mittels Phosphonsäure, Diethylazodicarbonsäure (DEAD) und Triphenylphosphin in Pyridin.<sup>[89]</sup>

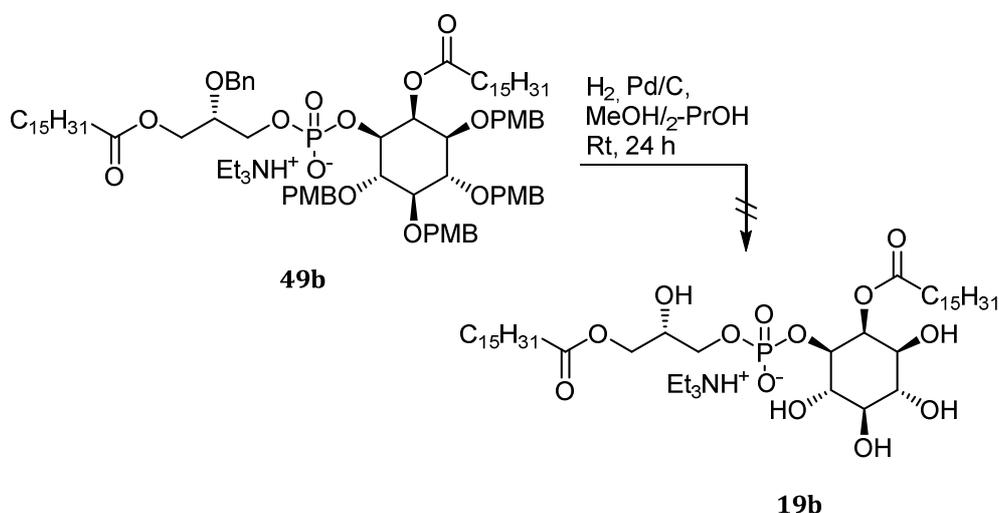
Daran angelehnt wurde Glycerin (*R*)-**21** mit Phosphonsäure, Triphenylphosphin und Diisopropylazodicarbonsäure (DIAD) versetzt und für 19 h bei Rt in Pyridin umgesetzt. Aufgrund ihrer hohen Polarität gestaltete sich das Chromatographieren von *H*-Phosphonaten bei einer Normalphasen-Chromatographie ohne Zusätze als schwierig. Durch Zugabe von Triethylamin (1%) zum Lösungsmittel wurde das Triethylammonium-Gegenion erhalten, wodurch der  $R_f$ -Wert von 0 auf 0.5 stieg, somit eine Normal-Phasen-Chromatographie möglich war und das gewünschte Produkt (*R*)-**48** in einer guten Ausbeute von 63% erhalten werden konnte (**Schema 24**). Das *H*-Phosphonat (*R*)-**48** wurde daraufhin nach Aktivierung mit Pivaloylchlorid in Pyridin mit Alkohol **D-28** versetzt, für 24 h bei Rt gerührt und das entstandene Phosphit schließlich mit elementarem Iod oxidiert. Eine vollständige Reinigung gelang zunächst nicht, da alle chromatographierten Fraktionen Iod enthielten. Nach mehrmaliger Wiederholung des Reinigungsschrittes konnte der Phosphatdiester **49b** schließlich in einer moderaten Ausbeute von 36% dargestellt werden (**Schema 24**). Die niedrige Ausbeute ist auf die aufwendige chromatographische Reinigung zurückzuführen.



**Schema 24:** Synthese von (*R*)-**48** unter Mitsunobu-Bedingungen und Kupplung zum Phosphatdiester **49b**.

In einem abschließenden Schritt sollten nun die PMB-Gruppen abgespalten und so der Phosphatdiester **19b** generiert werden (**Schema 25**). Dies kann wie oben erwähnt (6.1.1) unter sauren Bedingungen und hoher Temperatur, oxidativ oder reduktiv unter Hydrogenolyse erfolgen. Da neben den *para*-Methoxybenzylethern auch ein Benzylether abgespalten werden sollte, sollten die Ether unter Palladiumkatalyse hydrogenolytisch gespalten werden. Dazu wurde

der Phosphatdiester **49b** in einer Wasserstoffatmosphäre mit Palladium auf Aktivkohle in einem Methanol/2-Propanol-Gemisch umgesetzt. Nach einem Tag war nach dem Entfernen von Toluol im Vakuum bereits keine UV-Aktivität per DC erkennbar. Daher wurde der Reaktionsansatz durch Celite® filtriert und mit viel Lösungsmittel (Methanol/2-Propanol-Gemisch) nachgespült. Das Filtrat wurde nach dem Entfernen des Lösungsmittels NMR-spektroskopisch untersucht. Es konnten jedoch keinerlei Produktsignale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum erkannt werden. Daher wurde davon ausgegangen, dass das gesuchte Produkt auf der Celite®-Oberfläche adsorbiert und immobilisiert wurde. In Kap. 6.1.5 wird auf diesen Umstand näher eingegangen.



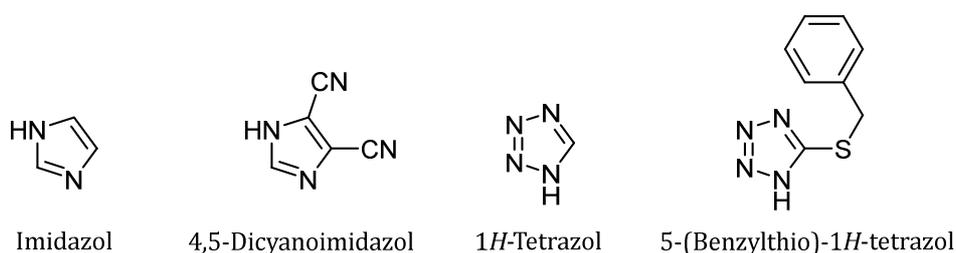
**Schema 25:** Versuch der Abspaltung von PMB- und Benzyl-Schutzgruppen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Synthese der zu kuppelnden *H*-Phosphonat-Monoester in zwei Fällen gelang. Im ersten Fall lag die Ausbeute lediglich bei 39%, da neben der Bildung des erwünschten *H*-Phosphonat-Monoesters auch die Bildung des entsprechenden *H*-Phosphonat-Diesters stattfand. Im zweiten Fall wurde dieses Problem umgangen, da hier eine direkte Kupplung des Alkohols mit Phosphonsäure durchgeführt wurde. Auf diese Weise konnte eine Ausbeute von 63% erzielt werden. Eine anschließende Kupplung mit dem *myo*-Inositol-Baustein **D-28** verlief erfolgreich mit einer moderaten Ausbeute von 36%, was auf die säulenchromatographische Reinigung zurückzuführen ist. Dabei übte die Ladung der *H*-Phosphonate am Phosphoratom einen negativen Einfluss auf die Aufarbeitung und das Retentionsverhalten während der chromatographischen Reinigung aus. Die Isolierung des Phosphatdiesters **49b** konnte nicht realisiert werden, da das Produkt während der Aufarbeitung auf der Celite®-Oberfläche adsorbiert wurde.

## 6.1.4.2 Iterative Kupplung unter Verwendung von Phosphoramiditen und Wahl der Schutzgruppe am Phosphor

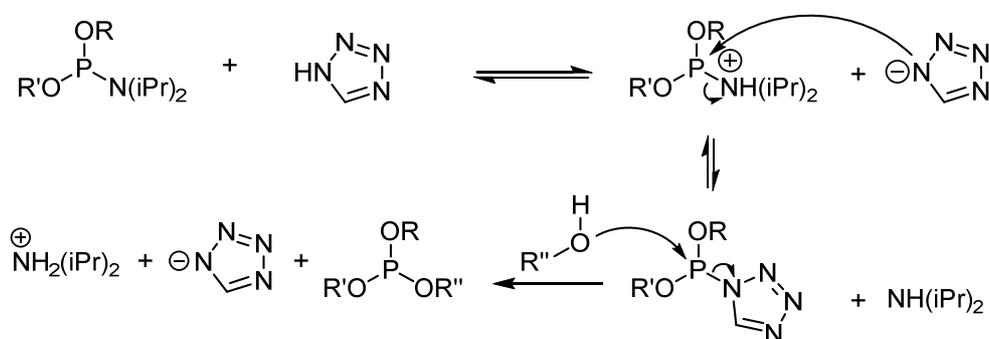
### 6.1.4.2.1 Kupplung über Bis(diisopropylamino)-phosphoramidite

Wie in **Abb. 22** gezeigt gibt es noch die Phosphoramidit-Methode, mit welcher Phosphatdiester dargestellt werden können. Neben der *H*-Phosphonatmethode ist diese bei der Synthese von Phosphatidylinositolen eine weitere beliebte und häufig eingesetzte Methode.<sup>[18, 21, 91]</sup> Das liegt an der einerseits guten Handhabbarkeit und Stabilität von Phosphoramiditen und andererseits an deren dennoch guten Reaktivitäten unter leichter Säurekatalyse. Typische Katalysatoren sind in der Regel *N*-Heterozyklen wie Imidazole oder Tetrazole (sog. *Aktivatoren*, **Abb. 25**).



**Abb. 25:** Verwendete Imidazol- und Tetrazolaktivatoren für Phosphoramidite (von links nach rechts): Imidazol, 4,5-Dicyanoimidazol (DCI), 1*H*-Tetrazol, 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT).

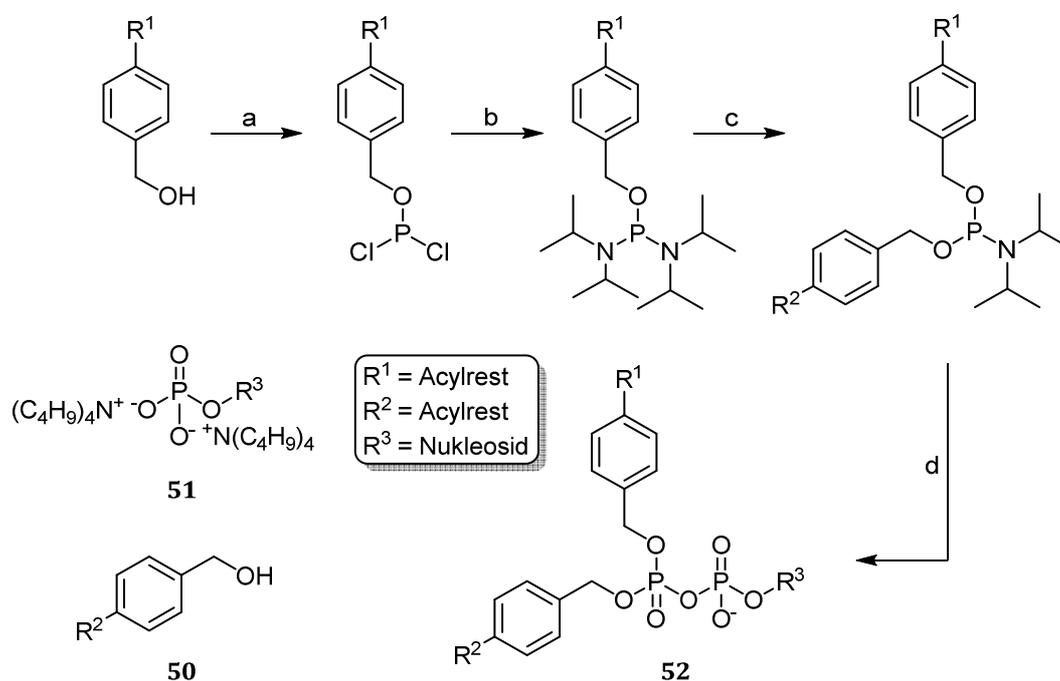
Nach dem Start der Reaktion wird zunächst das Amiditstickstoffatom durch den Aktivator protoniert. Das nun negativ geladene Aktivatormolekül substituiert daraufhin das Ammonium, welches das Molekül als Amin (im Fall dieser Arbeit ist dies stets *N,N*-Diisopropylamin) verlässt. Nach erfolgreicher Phosphitylierung durch den Angriff des nukleophilen Sauerstoffatoms wird das entstandene Tetrazolid bzw. Imidazolid abgespalten und so formell der Säurekatalysator regeneriert.



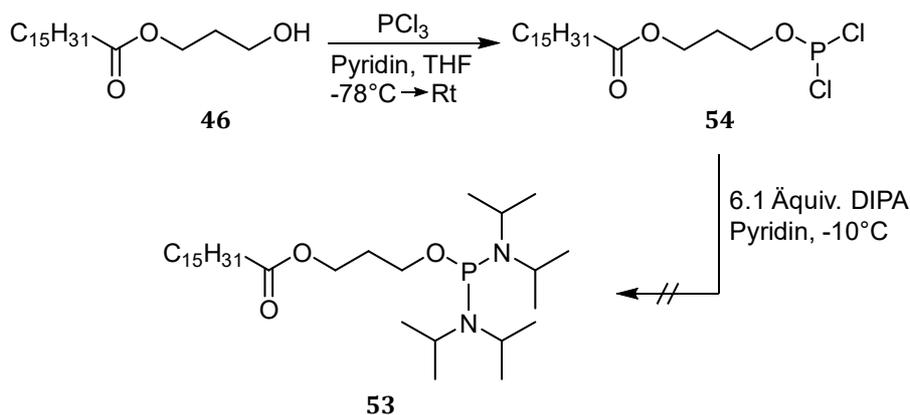
**Abb. 26:** Postulierter Mechanismus der Phosphoramiditkupplung. Beispielhaft dargestellt mit 1*H*-Tetrazol-Aktivator. Verändert nach Russel et al.<sup>[92]</sup>

Am Ende bildet sich jedoch ein Salz aus Austrittsgruppe und Aktivator (**Abb. 26**), weshalb es notwendig ist, äquimolare Mengen des Aktivators während der Reaktion zu verwenden. Vorteilhaft an diesem Umstand ist jedoch, dass sich das Salz nach der Reaktion leicht mit einer wässrigen Lösung extrahieren lässt, während das gewünschte Phosphit oder Phosphat in der Regel in der organischen Phase verbleibt.

Phosphoramidite sind also in besonderem Maße säurelabil, weshalb mit Ausnahme der Kupplungsreaktion unter streng säurefreien Bedingungen gearbeitet werden muss. Als besonders vorteilhafte Phosphoramidite haben sich in der Vergangenheit die *N,N*-Diisopropylaminophosphoramidite herausgestellt, welche auch zur Synthese von asymmetrischen Nucleosid-Diphosphaten eingesetzt werden.<sup>[86]</sup> Nach Weinschenk et al. wird einer der zwei zu kuppelnden Alkohole mit einem Überschuss Phosphor(III)-chlorid umgesetzt und das entstehende Phosphordichloridit mit einem sechsfachem Überschuss an *N,N*-Diisopropylamin (DIPA) versetzt (**Abb. 27**). Das entstandene Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit wird daraufhin iterativ unter Säurekatalyse mit dem zweiten Alkohol **50** und schließlich unter ähnlichen Bedingungen mit dem Nucleosidmonophosphat **51** zum gemischten P(III)-P(V)-Anhydrid gekuppelt. In einem letzten Schritt wird dann zum Diphosphat **52** oxidiert.

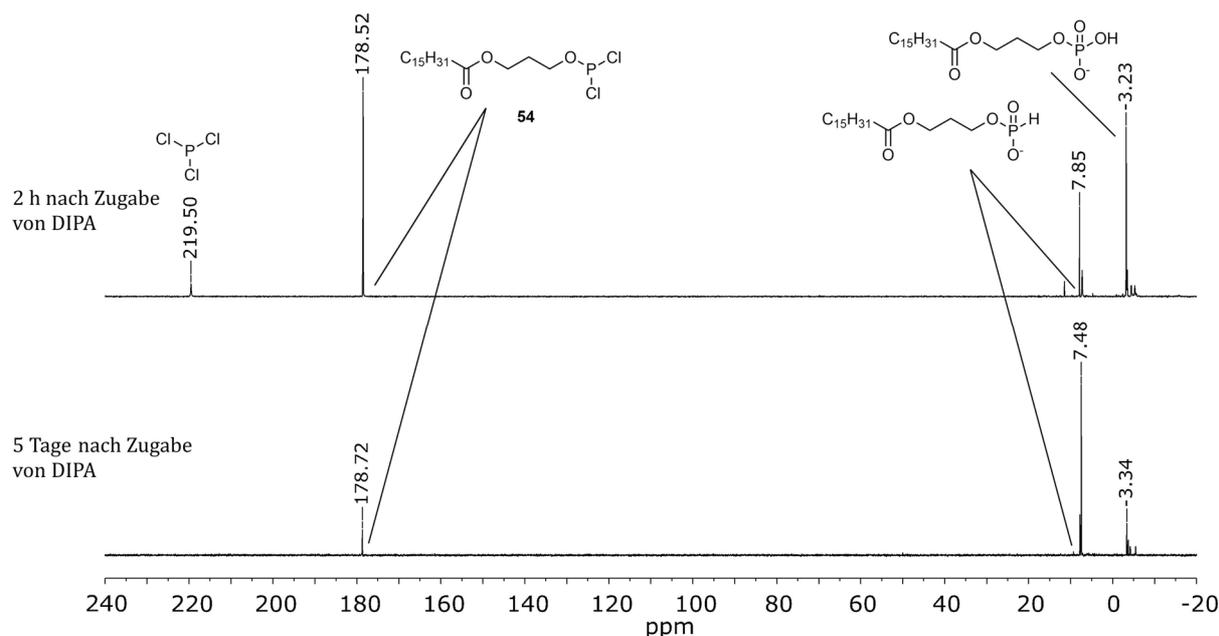


**Abb. 27:** Synthese von Nucleosiddiphosphaten **52** nach Weinschenk über Bis(diisopropylamino)-phosphoramidite.<sup>[93]</sup> **a:** PCl<sub>3</sub>, Pyridin, THF, -78°C, 16h, **b:** DIPA, THF, -10°C, 24-48h, **c:** 4-Acylbenzylalkohol **50**, DCI, MeCN, 0°C, 30-60 min, **d:** 1. **51**, DCI, MeCN, Rt, 30 min, 2. MeCN, *t*-BuOOH, Rt, 15 min.



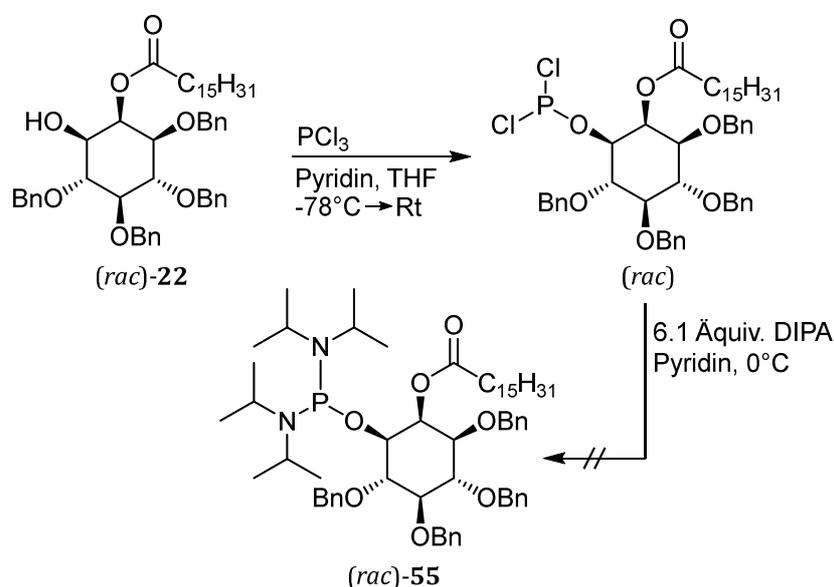
**Schema 26:** Versuch der Synthese von Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **53**.

Unter analogen Reaktionsbedingungen wurde versucht, das Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **53** zu synthetisieren (**Schema 26**). Dazu wurde zu einem leichten Überschuss Phosphor(III)-chlorid bei  $-78^\circ\text{C}$  der Alkohol **46** gegeben und auf Rt aufgewärmt, bis kein Alkohol **46** mehr per DC nachgewiesen werden konnte. Nach Zugabe von einem sechsfachen Überschuss an *N,N*-Diisopropylamin (DIPA) konnte jedoch kein Umsatz zu einem Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit beobachtet werden. Eine Abnahme der Phosphordichloridkonzentration konnte zwar festgestellt werden, doch anstelle des gewünschten Bis(diisopropylamino)-phosphoramidits **53** ( $^{31}\text{P}$ -NMR-Signal bei ca. 123 ppm) konnte nur eine Zunahme von *H*-Phosphonaten (ca. 7 ppm), Phosphaten (ca. -3 ppm) und anderen Nebenprodukten detektiert werden (**Abb. 28**).



**Abb. 28:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zur Reaktionsverfolgung bei der Synthese von Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **53**.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Reaktionsführung nicht trocken genug war. Allerdings spricht gegen diese These, dass das sehr reaktive und hydrolyseempfindliche Dichloridit **54** noch nach fünf Tagen Reaktionszeit detektierbar war (**Abb. 28**). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bildung eines Bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidits wegen der räumlichen Nähe der beiden *Diisopropylaminofunktionen* aus sterischen Gründen verhindert worden sein könnte. Allerdings spricht einerseits dagegen, dass Bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidite auch in der Vergangenheit bereits erfolgreich hergestellt werden konnten und dass andererseits auch nicht die Bildung eines sterisch weniger anspruchsvollen Monoamidits in den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (ca. 149 ppm) erkennbar war. Es konnte somit nicht abschließend geklärt werden, weshalb die Reaktion misslang.

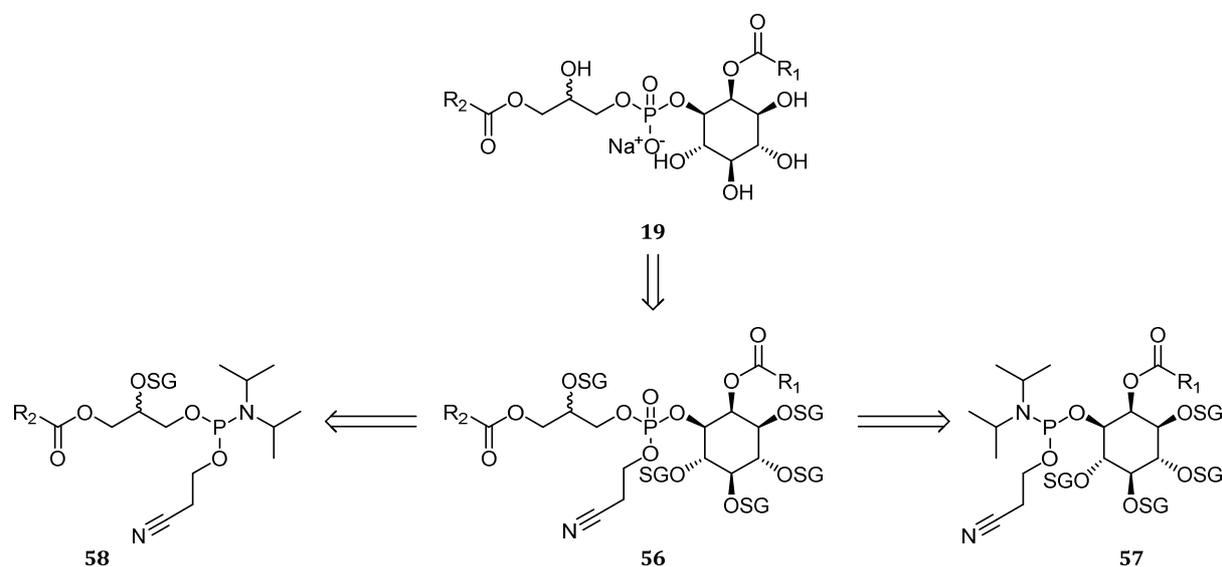


**Schema 27:** Versuch der Synthese von Bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidit (*rac*)-55.

Ein \u00e4hnliches Bild ergab sich auch bei der Darstellung des entsprechenden Inositol-bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidits (*rac*)-55 aus dem Alkohol (*rac*)-22. Zur Sicherstellung der Trockenheit w\u00e4hrend der Reaktion wurde aktiviertes Molsieb ins Reaktionsgef\u00e4\u00df gegeben und f\u00fcr die gesamte Reaktionsdauer verwendet. Da w\u00e4hrend der Reaktion des Bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidits **53** Phosphonat- und Phosphatdiester detektiert worden waren (**Abb. 28**), wurde der \u00dcberschuss von Phosphor(III)-chlorid von 1.1 \u00c5quiv. auf 1.5 \u00c5quiv. erh\u00f6ht, um die Gefahr einer Disubstitution zu verringern. Nach anschlie\u00dfendem Versetzen mit 6.1 \u00c5quiv. *N,N*-Diisopropylamin konnte dennoch auch bei dieser Reaktion (**Schema 27**) kein Umsatz zu einem Bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidit, sondern erneut lediglich die Bildung von *H*-Phosphonaten, Phosphormonoamiditen und Amidaten beobachtet werden. Hier k\u00f6nnte der

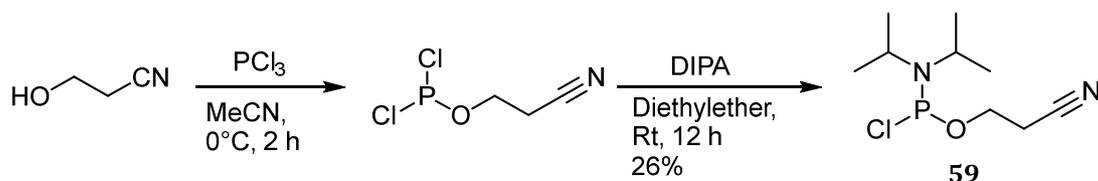
große sterische Anspruch der vier *Isopropyl*gruppen für den Misserfolg der Reaktion verantwortlich gewesen sein.

#### 6.1.4.2.2 Kupplung über 2-cyanoethyl-geschützte Phosphoramidite



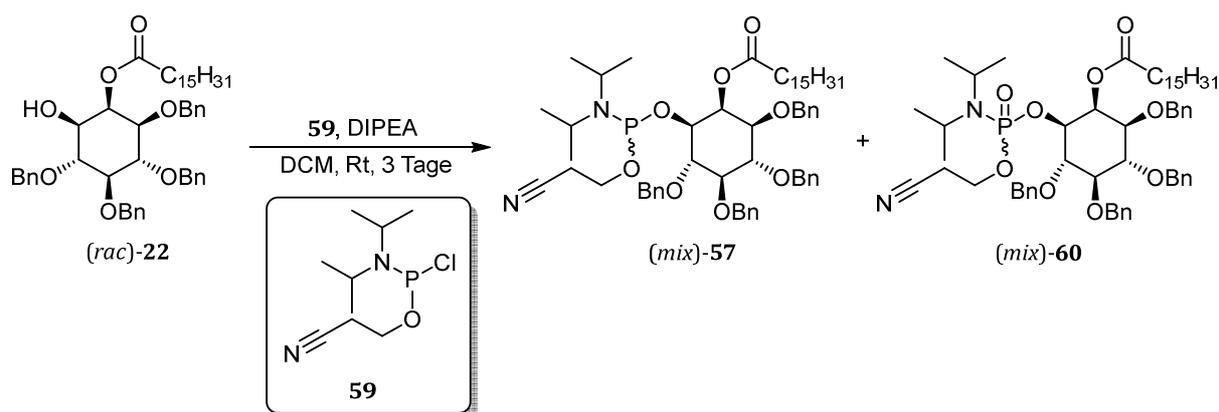
**Abb. 29:** Retrosyntheseschema zur Synthese von EhPIb-Analoga **19a-d** unter Verwendung der 2-Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphat bzw. Phosphoramidit am Beispiel L-konfigurierter *myo*-Inositol. SG: Bn oder PMB.

Die Bis(diisopropylamino)-phosphoramidite **55** und **53** besitzen durch die zwei Diisopropylamino-Funktionen auch zwei mögliche Kupplungsstellen für Alkohole. Da es sich bei den Zielmolekülen **19a-d** aber um Phosphatdiester handelte, musste die Kupplung von Inositol **22** und Glycerin **21** nicht zwangsläufig über ein solches Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit realisiert werden. Darüber hinaus kann es mit zwei identischen Gruppen in einem Molekül auch zu Disubstitutionen mit dem zu kuppelnden Alkohol kommen. Es war also möglich, dass eine der beiden Aminogruppe durch eine Schutzgruppe ersetzt werden könnte. Eine klassische Schutzgruppe für Phosphate stellt die 2-Cyanoethyl-Gruppe dar, da sie unter anderem in der automatisierten DNA-Synthese neben einer guten Stabilität eine leichte Abspaltbarkeit unter basischen Bedingungen in hohen Ausbeuten zeigt.<sup>[55, 94]</sup> Darauf aufbauend wurde versucht, die Phosphatidylinosole **19a-d** über 2-cyanoethyl-geschützte Phosphatriester **D-56** und **L-56** aufzubauen. Diese wiederum sollten entweder aus den Phosphormonoamiditen **57** oder **58** generiert werden (**Abb. 29**).



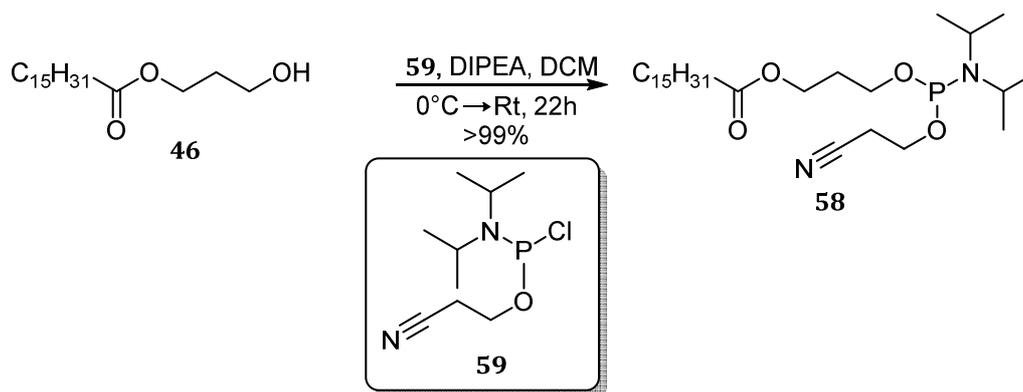
**Schema 28:** Synthese von Phosphoramidit **59**.

Qian et al. verwendeten 2006 zur Synthese von Phosphatidylinositolen die 2-Cyanoethyl-Gruppe, indem sie das Phosphoramidit **59** zur Herstellung von Glycerin-Phosphoramiditbausteinen verwendeten.<sup>[95]</sup> Dieses wurde also nach Vorschrift von Parang et al.<sup>[96]</sup> hergestellt. Dazu wurde Phosphor(III)-chlorid mit 2-Cyanoethanol bei 0°C umgesetzt. Nach Filtration unter Inertgasbedingungen und anschließender Destillation wurde das erhaltene Produkt schnell mit einem zweifachen Überschuss an Diisopropylamin versetzt. Das gewünschte Produkt **59** konnte dann destillativ in einer Ausbeute von 26% über zwei Stufen erhalten werden (**Schema 28**).



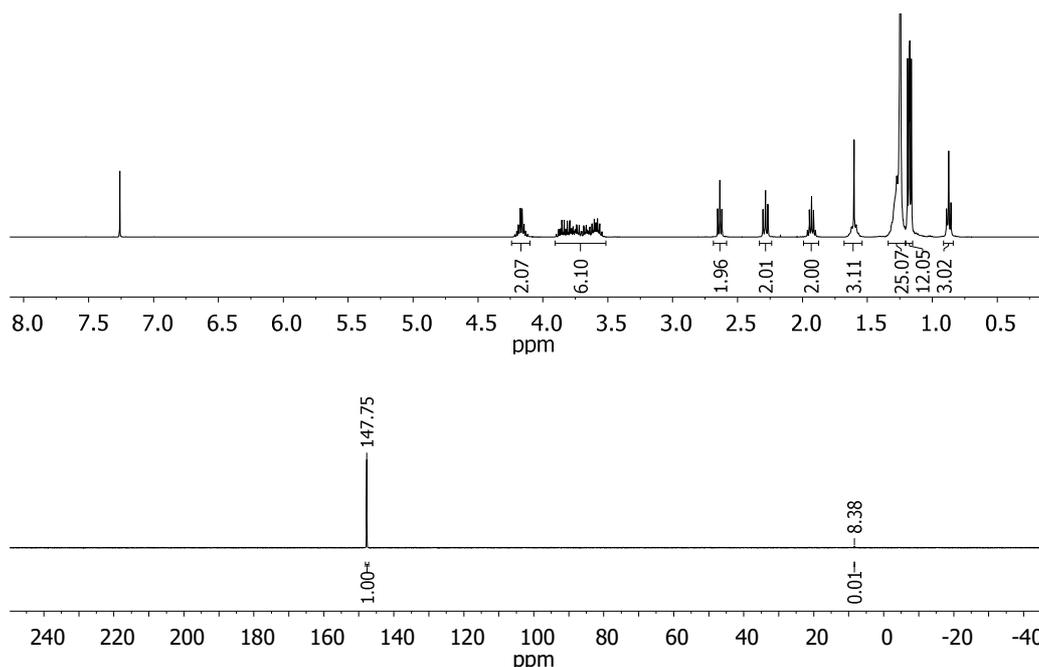
**Schema 29:** Versuch der Synthese von Phosphoramidit (*mix*)-**57**, dabei entsteht Phosphoramidat (*mix*)-**60**.

Zur Synthese des Phosphoramidits **57** wurde das Phosphorchloridit **59** mit einem anderthalbfachen Überschuss *myo*-Inositol (*rac*)-**22** in Dichlormethan bei Anwesenheit von Hünig-Base umgesetzt (**Schema 29**). Nach 20 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt unter Zusatz von 2% Triethylamin über Kieselgel chromatographiert. Es konnte jedoch lediglich eine geringe Menge des Produkts **57** erhalten werden, welches mit dem Phosphoramidat **60** verunreinigt war. Da diese Synthese erfolglos blieb, wurde versucht, das entsprechende Phosphoramidit **58** des Glycerin-Teils herzustellen.



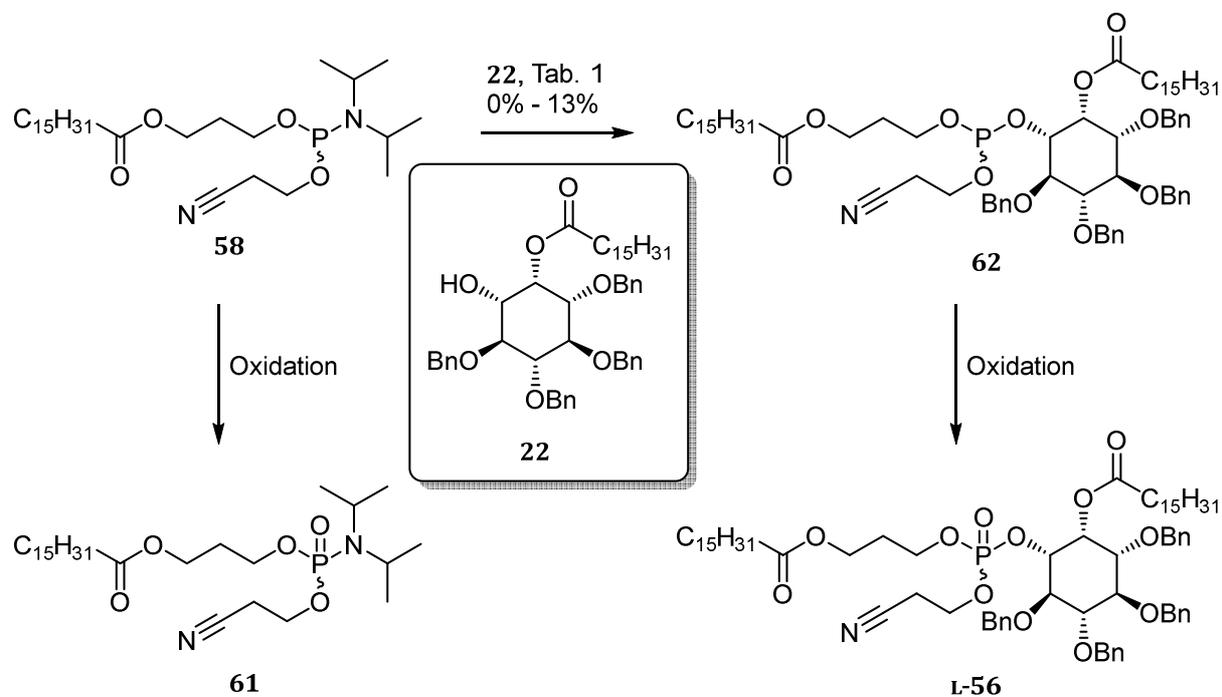
**Schema 30:** Reaktionsschema zur Synthese von Phosphoramidit **58**.

Dazu wurde Verbindung **59** bei 0°C in Gegenwart von einem zweifachen Überschuss an *N,N*-Diisopropylethylamin (Hünig-Base) mit 3-Hydroxypropylpalmitat **46** umgesetzt (**Schema 30**). Die Zugabe weiterer Reagenzien ist hierbei nicht vonnöten, da die Oxophilie des Phosphoratoms ausreicht, um die Phosphor-Chlor-Bindung bei 0°C zu lösen und eine Reaktion ermöglicht. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Dabei wurde das Lösungsmittelgemisch mit 5% Triethylamin versetzt, um eine Reaktion des Phosphoramidits mit Säurerückständen im Kieselgel zu verhindern. Die chromatographische Reinigung verlief reibungslos, da das Phosphoramidit **58** im Gegensatz zu allen entstandenen Nebenprodukten einen sehr hohen  $R_f$ -Wert aufwies, wodurch die Verbindung mit einer hohen Ausbeute von über 99% und in einer hohen Reinheit erhalten werden konnte (**Abb. 30**).



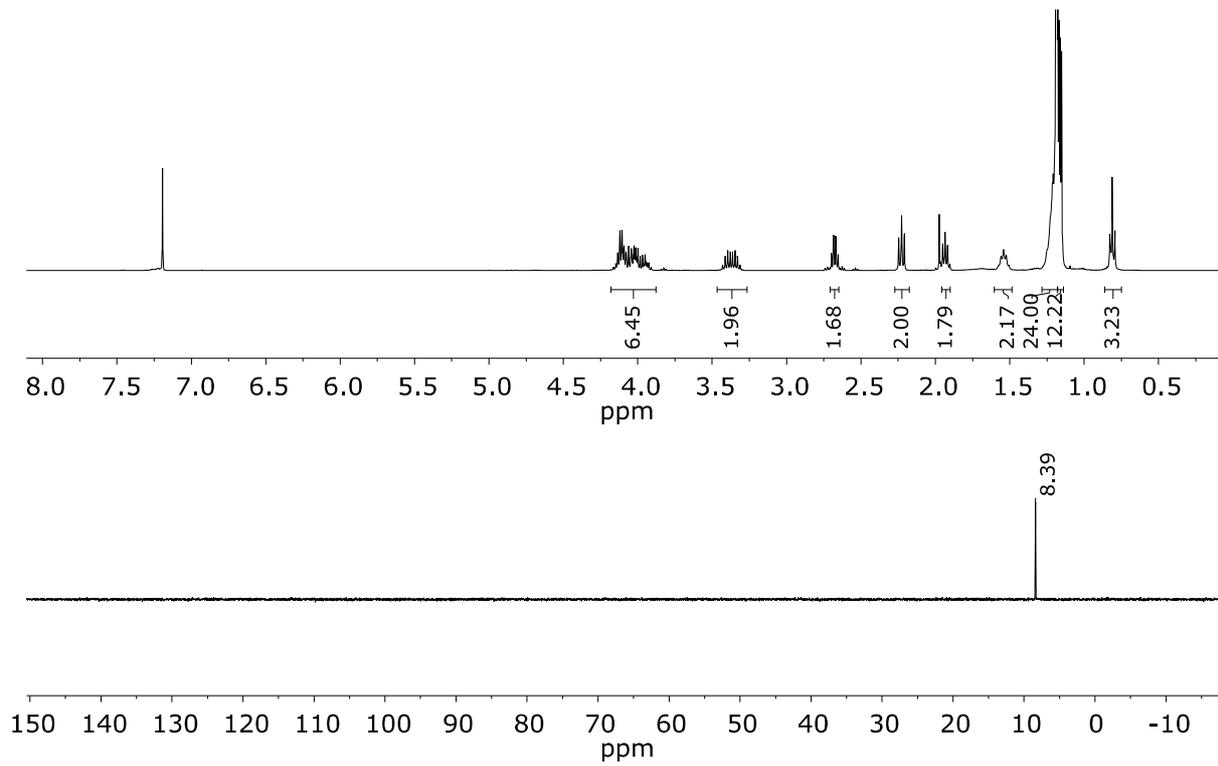
**Abb. 30:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (**oben**) und <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum (**unten**) des Phosphoramidits **58**.

Zur Kupplung mit dem entsprechenden *myo*-Inositol zum Phosphattriester **56** diente eine von Jessen et al. verfasste Vorschrift zur Synthese von Nukleosidphosphaten.<sup>[97]</sup> Dabei wurden das Phosphoramidit und der Alkohol in einer *one-pot*-Synthese in Acetonitril mit DCI gekuppelt und anschließend mit *meta*-Chlorperbenzoesäure oxidiert. Diese Bedingungen wurden für die folgende Reaktion übernommen.

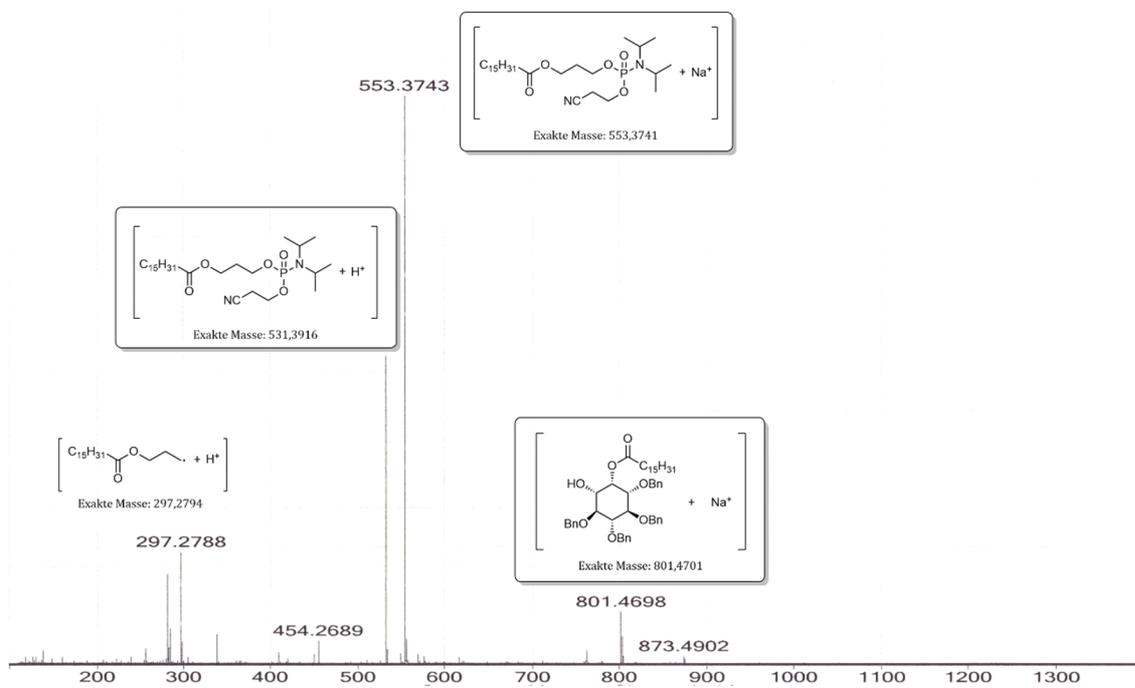


**Schema 31:** Versuch der Synthese des Phosphatidylinositols L-56. Dabei entsteht als Nebenprodukt das Phosphoramidat **61**.

Das Phosphoramidit **58** und der Alkohol L-**22** wurden im Verhältnis 2:3 bei 0°C mit einem leichten Überschuss DCI zur Reaktion gebracht (**Schema 31**). Durch NMR- und DC-Reaktionsverfolgung konnte beobachtet werden, dass die Reaktion nach Zugabe des Aktivators sofort startete und dann innerhalb weniger Minuten ablief (**Abb. 33**). Dennoch wurde die Reaktionslösung 1 h lang gerührt und anschließend die Oxidation des entstandenen Phosphits durch Zugabe von wässriger *meta*-Chlorperbenzoesäure-Lösung herbeigeführt (**Tab. 1**, #1). Nach der Aufarbeitung und der chromatographischen Reinigung konnte jedoch die überwiegende Bildung eines Nebenproduktes beobachtet werden. Mittels NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Methoden konnte dieses als Phosphoramidat **61** charakterisiert werden (**Abb. 31** und **Abb. 32**).



**Abb. 31:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (**oben**) und  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum (**unten**) von Phosphoramidat **61**.



**Abb. 32:** ESI (pos.)-Massenspektrum des Rohproduktes bei der Darstellung von **L-56**.

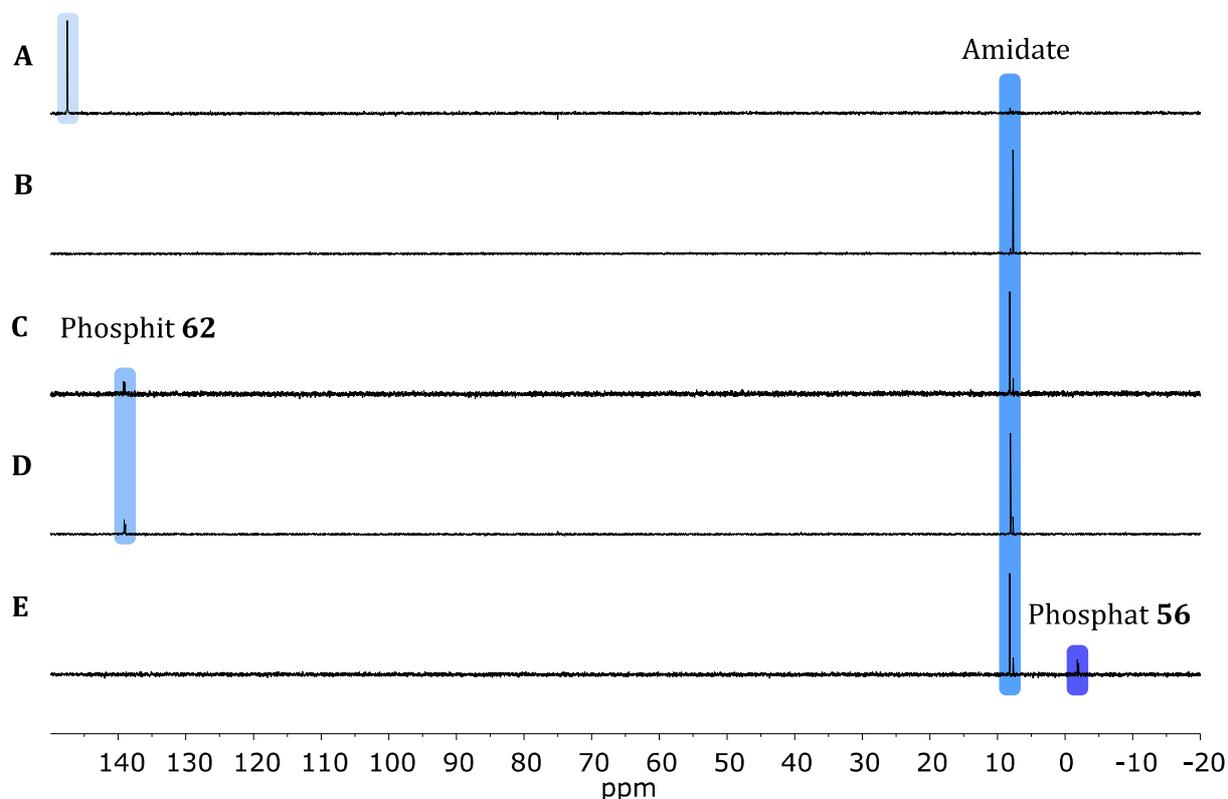
Anschließend wurde versucht, durch Veränderungen der Reaktionsbedingungen die Bildung des Phosphoramidats zu unterdrücken. Eine mögliche Erklärung für die Bildung des Phosphoramidats war, dass das protonierte Amidit während der Reaktion durch den Alkohol **L-22** oxidiert wurde. Daher wurde in einem weiteren Versuch der Anteil des Alkohols **L-22** verringert. Hier wurden Phosphoramidit **58** und Alkohol **L-22** in einem Verhältnis von 3:2 eingesetzt, was zwar in einer leichten Verbesserung der Ausbeute resultierte (**Tab. 1**, #2), aber immer noch ein ungenügendes Ergebnis erbrachte. Eine weitere Möglichkeit für die Bildung von **61** war, dass der eingesetzte Aktivator eine zu geringe Reaktivität besaß und so das aktivierte Phosphoramidit eher eine Oxidationsreaktion einging als eine Substitution durch den Alkohol **L-22**. Daher wurde ein Wechsel der Aktivator-Lösung vorgenommen. 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT, pK<sub>s</sub> 4.1) besitzt gegenüber 4,5-Dicyanoimidazol (DCI, pK<sub>s</sub> 5.2) eine höhere Säurestärke. Durch den Wechsel des Aktivators konnte allerdings keine weitere Verbesserung bei Ausbeute oder Bildung des Amidates beobachtet werden (**Tab. 1**, #3). Eine weitere Möglichkeit für die Bildung des Phosphoramidates wären Spuren von Wasser. Zwar wurden alle Reaktionen unter Ausschluss von Wasser und in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt, es wurde dennoch versucht, durch häufigeres Koevaprieren, zusätzliche mehrtägige Vortrocknung aller verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel und durch den verstärkten Einsatz von Molekularsieb eine möglichst trockene Reaktionsführung zu gewährleisten (**Tab. 1**, #4). Doch auch dabei konnte keine Verbesserung der Ergebnisse beobachtet werden. In einem weiteren Experiment wurde versucht, durch eine größere Menge an eingesetztem Phosphoramidit **58** den Verlust durch die Oxidation desselben zu kompensieren. Durch den Einsatz von einem dreifachen Überschuss Phosphoramidit **58** konnte die Ausbeute auf 13% gesteigert werden (**Tab. 1**, #5, **Abb. 34**). Allerdings ist diese Ausbeute weiterhin zu niedrig, um eine Weiterführung der Syntheseroute auf diesem Wege zu rechtfertigen.

**Tab. 1:** Reaktionsbedingungen zur Synthese von Phosphit **62**. \*: vorgetrocknet, \*\*Anteil Amidat **61** am Gesamtphosphor, ermittelt über <sup>31</sup>P-NMR.

#	Aktivator [Äquiv.]	Aktivator	Amidit 58 [Äquiv.]	Alkohol L-22 [Äquiv.]	Ausbeute	Amidat 61 **
1	1.2	DCI	1.0	1.5	0%	100%
2	1.0	DCI	1.5	1.0	8%	84%
3	1.5	BTT	1.5	1.0	2%	82%
4	1.5	BTT*	1.5	1.0	4%	75%
5	3.0	BTT*	3.0	1.0	13%	80%

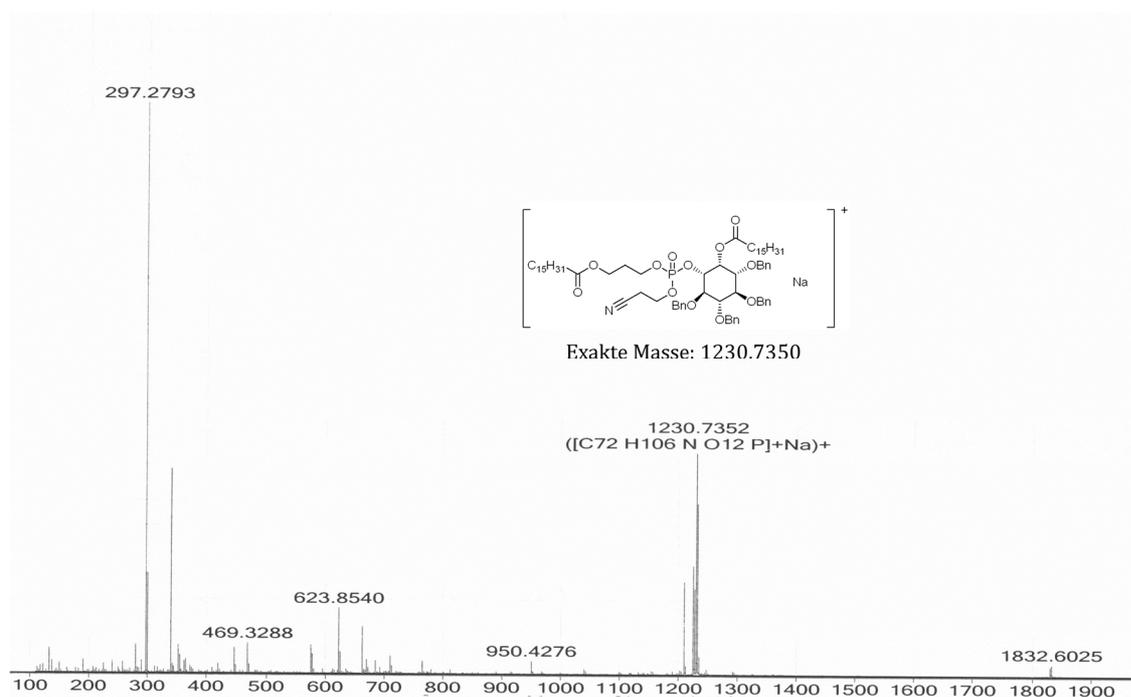
Um den Zeitpunkt für die Bildung des Amidats genauer bestimmen zu können, wurde daher versucht, den Ablauf der Reaktion  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopisch zu verfolgen. Die erste Messung zeigte das in Acetonitril gelöste Phosphoramidit **58** (**Abb. 33, A**). Bereits hier war ein sehr geringer Teil Amidat **61** bei einer chemischen Verschiebung von ca. 8 ppm zu erkennen. Nach Zugabe von BTT und somit nach Aktivierung des Phosphoramidits, jedoch in Abwesenheit eines Alkohols oder eines anderen Nucleophils, fand innerhalb weniger Minuten eine vollständige Oxidation zum Amidat **61** statt (**Abb. 33, B**). Dies zeigt, dass sich erstens die oxidative Spezies also schon in der Reaktionslösung befunden haben musste und zweitens die Reaktion sehr schnell verlief. Wurde BTT (1.5 Äquiv.) zu einem Gemisch aus dem Alkohol **22** (1.0 Äquiv.) und dem Amidit **58** (1.5 Äquiv.) gegeben, bildete sich nach 5 min (**Abb. 33, C**) und nach 20 min (**Abb. 33, D**) Reaktionszeit neben einer geringen Menge an Phosphit **62** eine große Menge Amidat **61** (Verhältnis ca. 1:4, durch Integration des  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums bestimmt). Wurden anschließend 1.5 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid hinzugegeben, fand erwartungsgemäß eine Oxidation des Phosphits **62** zum Phosphat **56** statt, während Phosphoramidat **61** unverändert vorlag (**Abb. 33, E**).

#### Phosphoramidit **58**



**Abb. 33:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren in unterschiedlichen Reaktionsphasen. **A:** Nur Amidit **58** in MeCN, **B:** Amidit **58** und BTT in MeCN, **C:** Amidit **58**, Alkohol **22** und BTT in MeCN - nach 5 min Reaktionszeit, **D:** Amidit **58**, Alkohol **22** und BTT in MeCN - nach 20 min Reaktionszeit, **E:** Amidit **58**, Alkohol **22** und BTT in MeCN - nach 60 min Reaktionszeit und Zugabe *t*-BuOOH.

Es stellte sich somit die Frage, auf welchem Wege das beobachtete Phosphoramidat **61** erzeugt wurde. Eine bereits verifizierte Eigenschaft der Phosphoramidite ist, dass sie, einmal durch eine Säure aktiviert, sehr schnell reagieren. Fragwürdig ist nur, woher der benötigte Sauerstoff kommt, der zur Oxidation maßgeblich benötigt wird. Möglichkeiten wären neben Spuren von Wasser und Luftsauerstoff im Reaktionsgemisch die Silikatoberfläche der Reaktionsgefäße. Eine intramolekulare Reaktion bzw. die Reaktion eines Phosphoramidits mit anderen Amiditmolekülen ist zwar denkbar, allerdings konnte erstens keine Veränderung des Moleküls mittels NMR-Spektroskopie festgestellt werden und zweitens hätten durch die Reaktion zweier Amiditmoleküle zwei verschiedene Phosphorspezies entstanden sein müssen, was nicht beobachtet wurde. Es konnte daher weder ein belastbarer Grund gefunden werden, welcher zur Bildung einer derartig großen Menge Phosphoramidats führen konnte, noch eine Methode, die die Bildung des Phosphoramidats bei der Synthese 2-cyanoethylgeschützter Phosphatidylinositol-Vorläufer vollständig unterdrücken konnte.



**Abb. 34:** ESI (pos.)-Massenspektrum des Rohproduktes der Synthese von **56**.

#### 6.1.4.2.3 *Abspaltungsversuche der 2-Cyanoethyl-Gruppe*

Da eine gewisse Menge an Phosphattriester **56** hergestellt und isoliert werden konnte, konnten Versuche zur Entschützung der 2-Cyanoethyl-Gruppe gemacht werden. Die 2-Cyanoethyl-Gruppe besitzt durch den starken Elektronenzug der Nitril-Funktionalität azide Protonen am  $\beta$ -C-Atom, die im Zuge einer  $\beta$ -Eliminierung basisch abgespalten werden können. Durch konzertierte

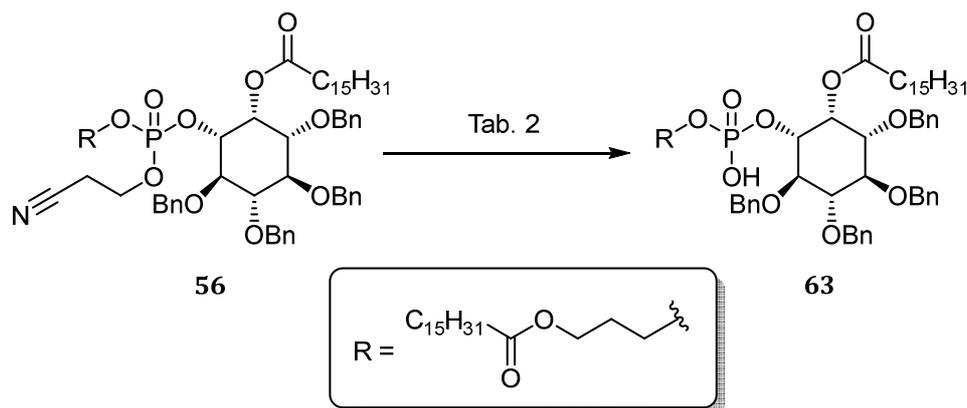
Bildung einer Doppelbindung und Lösung der O-C-Bindung wird das Phosphat und Acrylnitril freigesetzt. Die vorrangig in der automatisierten Nukleotidsynthese eingesetzte 2-Cyanoethyl-Gruppe wird dort durch Ammoniumhydroxid abgespalten.

Zur Abspaltung der 2-Cyanoethyl-Gruppe im vollständig geschützten Phosphatriester **56** wurden verschiedene Basen unter unterschiedlichen Bedingungen erprobt. Als erstes wurde das Phosphat **56** mit einer Mischung aus Methanol und wässriger Ammoniaklösung (25%) im Verhältnis von 95:5 (v/v) versetzt und für 1 h bei Rt gerührt (**Tab. 2**, #1). Eine ESI-massenspektroskopische Überprüfung des Rohgemisches ergab, dass neben dem gewünschten Produkt auch Abbauprodukte gebildet worden waren, die auf Esterspaltungen zurückzuführen waren. Nach chromatographischer Reinigung des Rohproduktes mittels präparativer DC und anschließender Extraktion bzw. Desorption von der Kieselgeloberfläche mit Dichlormethan konnte jedoch kein Produkt erhalten werden. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung ist, dass das Produkt, das wahrscheinlich als Ammoniumsalz vorlag, eine nicht ausreichend gute Löslichkeit in Dichlormethan und eine zusätzlich zu hohe Affinität zur polaren Oberfläche von Kieselgel besaß. Als nächstes wurde versucht, die 2-Cyanoethyl-Abspaltung wegen der zuvor aufgetretenen Esterhydrolysen wasserfrei durchzuführen. Dazu wurde das Phosphat **56** in Acetonitril unter trockenen Bedingungen mit Triethylamin versetzt (**Tab. 2**, #2). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Abspaltung mit Triethylamin mit langen Reaktionszeiten einhergeht.<sup>[73]</sup> Aus diesem Grund wurde das Reaktionsgemisch für 22 h bei Rt gerührt. Die Abtrennung von überschüssigem Triethylamin und Lösungsmittel erfolgte durch Evaporation im Vakuum. Auch hier wurde eine chromatographische Reinigung über präparative Dünnschichtchromatographie und eine Extraktion mit Hilfe eines Gemisches aus Dichlormethan und Methanol (13:1, v/v) durchgeführt. Es konnte zwar ein weißer Feststoff erhalten werden, jedoch wies dieser im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum keine Signale auf. Es wird angenommen, dass das Produkt bei der Extraktion nicht von der Kieselgeloberfläche desorbiert werden konnte.

**Tab. 2:** Reaktionsbedingungen zur Abspaltung der 2-Cyanoethylgruppe von **56**.

Reaktion	Base	Äquiv.	Dauer [h]	Temperatur	Ausbeute
#1	Methanol/Ammoniak	-	1	Rt	< 1%
#2	Triethylamin	1	24	Rt	0%
#3	DBU	10	1.5	Rt	< 1%

In einem weiteren Versuch wurde die wesentlich stärkere und nicht nukleophile Base DBU verwendet (**Tab. 2**, #3). Nach 1.5 h Reaktionszeit bei Rt konnte dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Der Phosphatdiester **63** konnte jedoch nur in Teilen massenspektrometrisch (ESI, pos. sowie neg.) aus dem Rohgemisch nachgewiesen werden. Eine Isolierung des Produkts gelang nicht. Dies wird auf die Bildung zahlreicher Neben- und Zerfallsprodukte zurückgeführt.



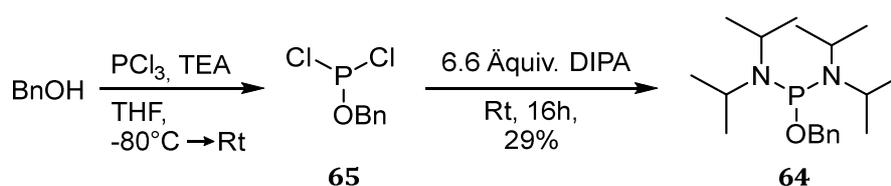
**Schema 32:** Synthese des Phosphatdiesters **63**.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Route mit 2-Cyanoethyl als Phosphat-Schutzgruppe in der Reaktionssequenz *Kupplung-Oxidation-Entschützung* keine ausreichend guten Ergebnisse lieferte. Die Kupplung wurde durch eine Konkurrenzreaktion gestört, in der das eingesetzte Phosphoramidit **58** nach Aktivierung zu einem großen Teil zum Amidat **61** oxidiert wurde und somit niedrige Ausbeuten generierte. Nur durch den Einsatz eines großen Überschusses an Phosphoramidit **58** ließ sich dieses Problem teilweise beheben, wodurch eine Ausbeute von bis zu 13% erzielt werden konnte. Da dabei jedoch überschüssiges Edukt nicht zurückgewonnen werden konnte, war dieser Reaktionsweg nicht vorteilhaft. Die Oxidation verlief problemlos, schnell und vollständig. Die Abspaltung der Schutzgruppe ging ebenfalls mit einer niedrigen Umsetzung oder einer Zersetzung des Moleküls einher. Zusätzlich gestaltete sich die chromatographische Reinigung als problematisch. Es gelang zwar, auf diesem Weg geringe Mengen des Phosphatdiesters herzustellen (**Abb. 34**), sodass lediglich eine Abspaltung der Benzylgruppen gefehlt hätte, um die Zielmoleküle **19c-d** herstellen zu können. Jedoch waren die Ausbeuten zu niedrig und die Reaktionsführung zu aufwendig, um diese Syntheseroute weiter zu verfolgen.

#### 6.1.4.2.4 Kupplung über benzyl-geschützte Phosphoramidite

Wie in Kap. 6.1.4.2.3 beschrieben, bedarf es im Fall des 2-cyanoethyl-geschützten Phosphats **56** zur Darstellung von **19a-d** zwei sich anschließende Entschützungsstufen, da 2-Cyanoethyl und die Benzylgruppen separat abgespalten werden müssen. Es sollte daher der Benzylester als Phosphat-Schutzgruppe erprobt werden. Zwar unterscheiden sich die Benzylether chemisch vom Benzylester am Phosphat, allerdings lassen sich beide Gruppen katalytisch mit Wasserstoff in einem Reaktionsschritt abspalten.

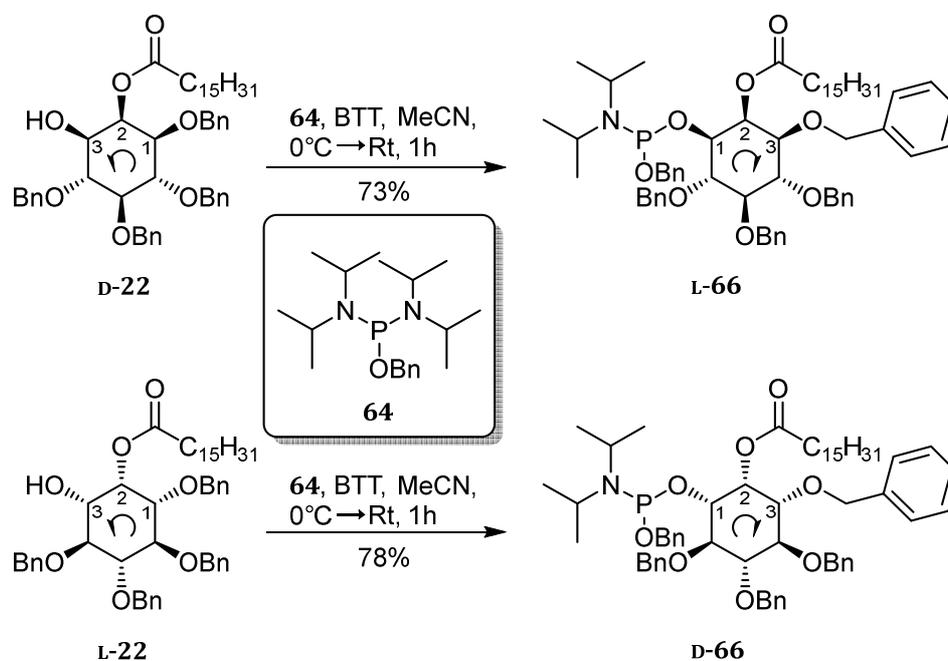
Ähnlich wie beim Amidit **59** wurde zunächst ein Kupplungsreagenz hergestellt, die eine iterative Kupplung ermöglichen sollte. Die Synthese von Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **64** wurde schon in vielen Publikationen beschrieben. Die in unserem Arbeitskreis etablierte *one-pot*-Synthese bildet als Zwischenstufe Phosphordichloridit **65** und wurde u.a. von Jacobsen beschrieben.<sup>[98]</sup> Benzylalkohol wurde zunächst mit einem anderthalbfachen Überschuss an Phosphor(III)-chlorid umgesetzt, um das Phosphordichloridit **65** herzustellen. Nach vollständigem Umsatz des Benzylalkohols wurden 6.6 Äquiv. Diisopropylamin hinzugegeben, um das Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **64** herzustellen (**Schema 33**). Durch Filtration unter Inertgasbedingungen wurde entstandenes Triethylammoniumchlorid entfernt. Das säurelabile Produkt wurde dann über Normalphasen-Kieselgel mit Zusatz von Triethylamin chromatographisch gereinigt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Anteil des Triethylamins im Lösungsmittel mindestens 3% betrug. Die erhaltene Ausbeute von 29% war zwar recht gering, doch konnten wegen der niedrigen Kosten der Edukte große Mengen erfolgreich hergestellt werden.



**Schema 33:** *One-pot*-Synthese von Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **64** als Kupplungsreagenz.

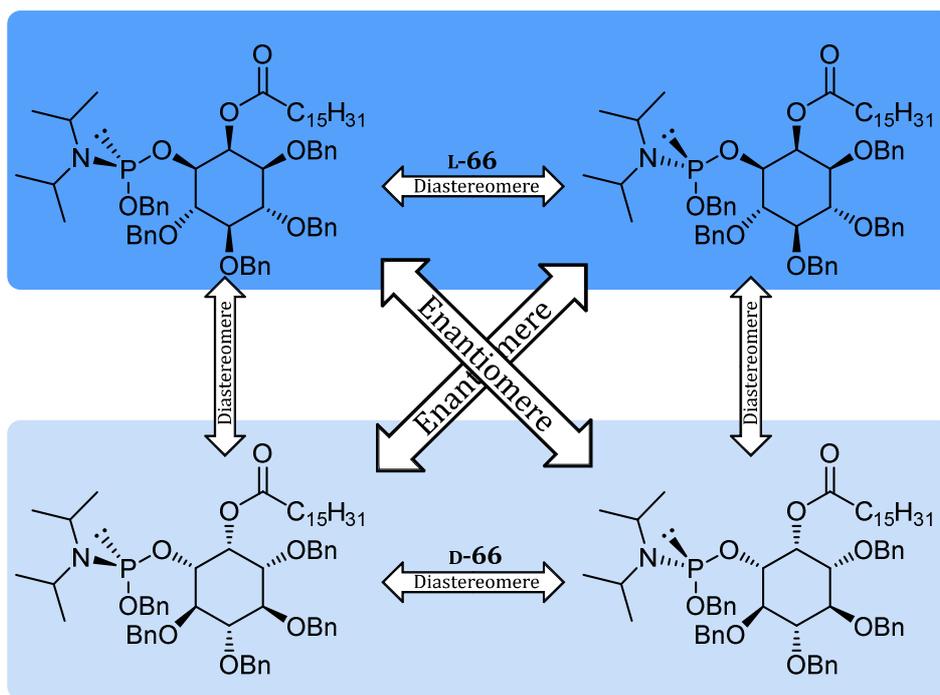
Zur iterativen Synthese von Phosphatidylinositolen mittels der Amidit-Methode existieren einige Veröffentlichungen.<sup>[50, 99-101]</sup> Die meisten dieser Synthesen werden über ein Phosphoramidit des Glycerins realisiert, welche dann mit einem *myo*-Inositol-Baustein gekuppelt werden. Ob nun diese Reaktionsabfolge oder die umgekehrte in einer besseren Art und Weise zum Zielmolekül führt, sollte im Folgenden geklärt werden. Weinschenk et al. zeigten bei der Synthese von Nukleosid-Diphosphaten, dass die Art der Zugabe des Aktivators bei Phosphoramidit-

Kupplungsreaktionen eine größere Rolle einzunehmen schienen, als bisher angenommen. Dabei wurde gezeigt, dass eine langsame, sukzessive Zugabe kleiner Mengen des Aktivators zu einer Erhöhung der Ausbeute geführt hat.<sup>[86]</sup> Auf diesen Erkenntnissen und Reaktionsbedingungen basierend wurden daraufhin die folgenden Kupplungsreaktionen durchgeführt.



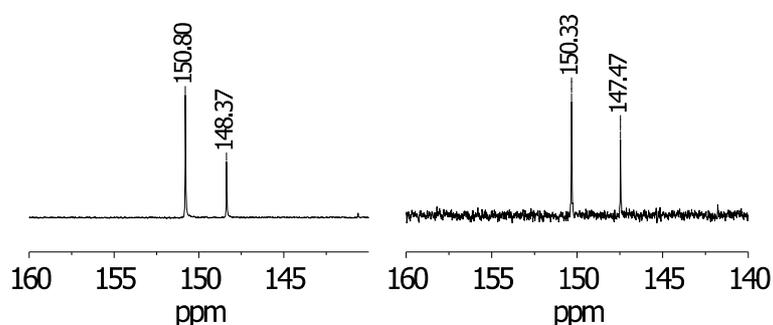
**Schema 34:** Synthese der Phosphoramidite **L-66** und **D-66**. Eine Stereochemische Besonderheit bei der Einführung phosphorhaltiger Gruppen in *myo*-Inositol: Nach der Einführung kehrt sich die Zählreihenfolge um, was eine formelle Namensänderung nach sich zieht.

Zur Bildung der Phosphoramidite **D-66** wurden 1.0 Äquiv. des jeweiligen Enantiomers des Alkohols **D-22** bzw. **L-22** und 1.5 Äquiv. des Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidits **64** zunächst zweimal mit Toluol koevaporiert. Eine trockene und saubere Reaktionsführung ist an dieser Stelle unentbehrlich, da aktivierte Phosphoramidite eine sehr reaktive Spezies sind und schnell mit O- oder N-Nukleophilen reagieren (Kap. 6.1.4.2.2). Die Zugabe des BTT-Aktivators geschah nach Weinschenk<sup>[93]</sup> in fünf sukzessiven Zugaben in einem jeweiligen zeitlichen Abstand von jeweils 5 min. Dazu wurden zunächst 0.5 Äquiv. hinzugegeben und daraufhin viermal weitere 0.25 Äquiv. bis 1.5 Äquiv. Aktivator hinzugegeben waren. Nach 1 h Reaktionszeit wurde schließlich die Reaktion beendet, unter basischen Bedingungen wässrig aufgearbeitet und chromatographisch gereinigt. Bei der chromatographischen Reinigung musste das Lösungsmittel stets etwa 3-5% Triethylamin enthalten. Da Triethylamin selbst eine dem Ethylacetat ähnliche Elutionskraft besitzt, wurde die chromatographische Reinigung in einem Gemisch aus Petrolether und Triethylamin (10:1) durchgeführt.



**Abb. 35:** Bei der Darstellung von L-66 und D-66 aus den Alkoholen D-22 und L-22 entstehen aufgrund des neu entstandenen Stereozentrums am Phosphoratom jeweils zwei Diastereomere. Zwei der vier Verbindungen bilden jeweils ein Enantiomerenpaar, während sich alle anderen Verbindung zueinander als Diastereomere verhalten.

Dabei konnte das Phosphoramidit D-66 mit einer Ausbeute von 78% und L-66 mit einer Ausbeute von 73% erhalten werden (**Schema 34**). Da eine der beiden Diisopropylamino-Gruppen im Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **64** während der Reaktion substituiert wird und somit vier verschiedene Substituenten am Phosphoratom vorliegen, handelt es sich bei den Verbindungen D-66 und L-66 jeweils um ein Gemisch zweier Diastereomere (**Abb. 35**). Dies lässt sich durch zwei Signale in den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren bestätigen (**Abb. 36**).

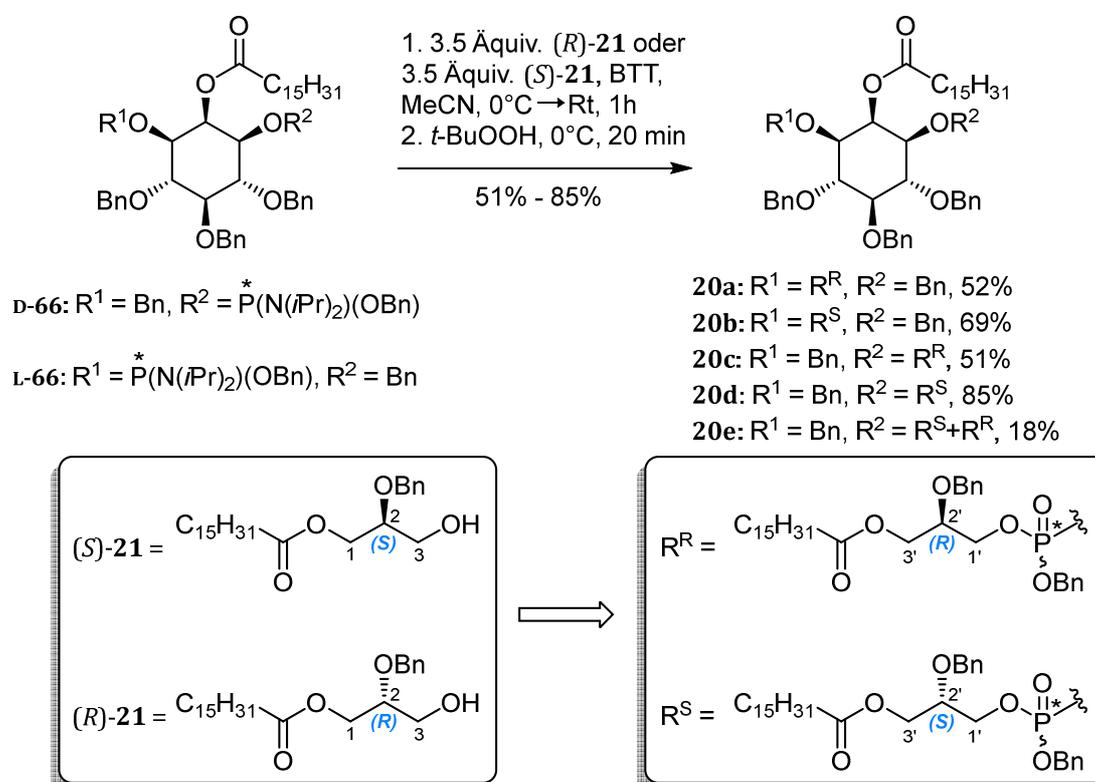


**Abb. 36:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der Verbindungen L-66 (links) und D-66 (rechts).

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Synthese war, dass sich durch das Einführen eines Phosphoratoms in das *myo*-Inositol nach IUPAC die Zählreihenfolge innerhalb des Moleküls ändert, da das Phosphoratom eine höhere Priorität besitzt als das Kohlenstoffatom der Methylengruppe in der Benzylgruppe. Daraus resultiert eine Umkehrung der formellen stereochemischen Bezeichnung (Kap. 4.6, **Schema 34**). Beispielsweise wird aus dem 1D-konfigurierten Alkohol **D-22** somit nach der Reaktion nach IUPAC<sup>[52]</sup> das 1L-konfigurierte Phosphoramidit **L-66**. Eine Bildung eines Phosphoramidats konnte auch bei dieser Reaktion festgestellt werden, doch geschah dies in einem geringeren Umfang, weshalb es chromatographisch abgetrennt werden konnte.

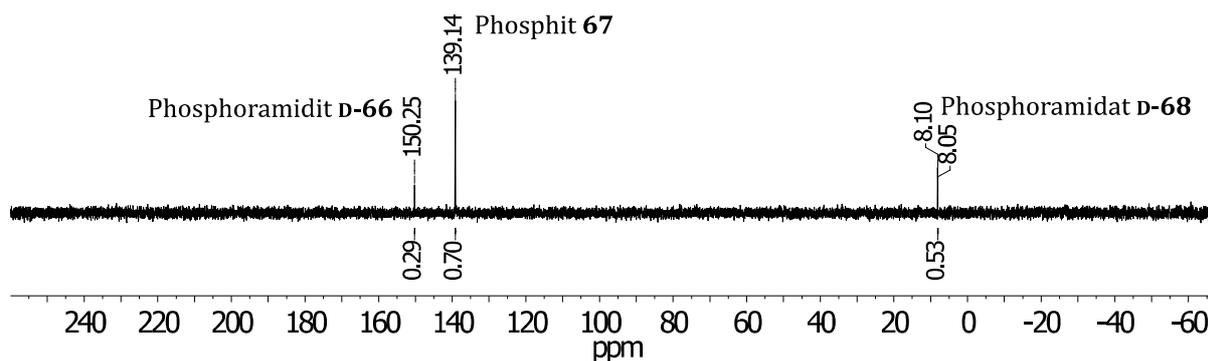
#### 6.1.4.2.5 Kupplung zum Phosphattriester

Aufbauend auf den Phosphoramiditen **D-66** und **L-66** sollten nun in einem weiteren Kupplungsschritt die entsprechenden Phosphate **20a-d** hergestellt werden. Da es sich bei den Phosphoramiditen **D-66** und **L-66** um jeweils zwei Diastereomere handelte (**Abb. 35**) und diese mit den zwei Enantiomeren des Glycerinalkohols (*R*)-**21** und (*S*)-**21** (Kap. 6.1.3) gekuppelt werden sollten, waren somit vier Kombinationen und damit vier Produkte möglich. Jedes der Produkte **20a-d** besteht wegen des Stereozentrums am Phosphoratom wiederum aus einem Gemisch zweier Diastereomere. Zusätzlich dazu wurde ein Derivat **20e** mit einem racemischen Glycerinbaustein synthetisiert (**Abb. 37**).



**Abb. 37:** Synthese der vier verschiedenen Diastereomerengemische **20a-d** sowie **20e**, \* signalisiert das Stereozentrum am Phosphoratom.

Zur Kupplung wurden 3.5 Äquiv. des (*R*)- oder (*S*)-konfigurierten Glycerins (*R*)-**21** bzw. (*S*)-**21** und 1.0 Äquiv. des Phosphoramidits **L-66** oder **D-66** mit Toluol koevaporiert, in Acetonitril gelöst und anschließend durch sukzessive Zugabe von insgesamt 1.0 Äquiv. BTT-Aktivators bei 0°C zur Reaktion gebracht. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 0°C und einer anschließenden Reaktionszeit von 1 h bei Rt wurde das entstandene Phosphit **67** durch Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid bei 0°C *in situ* oxidiert.

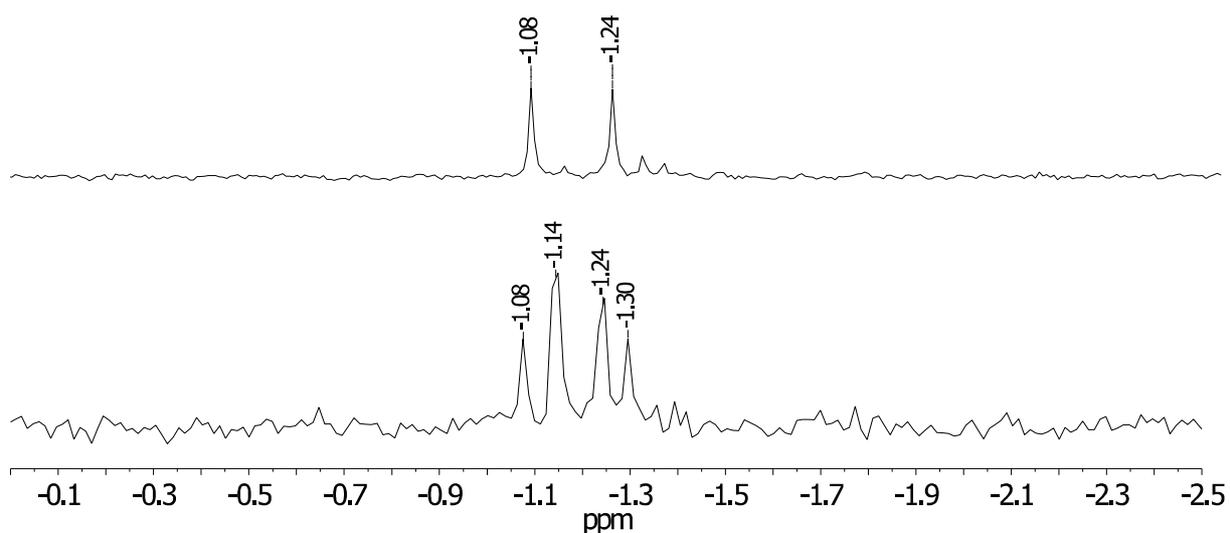


**Abb. 38:** <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum (200 MHz, CD<sub>3</sub>CN) vor der Oxidation von **20c** nach 80 min Reaktionszeit.

Ähnlich wie bei der Synthese von Phosphoramidit **D-66** konnte auch während der Reaktion zum Phosphatriester **20c** die Bildung des Phosphoramidats **D-68** beobachtet werden (**Abb. 38**). Die Oxidation des Phosphoramidits muss demnach vor der eigentlichen Kupplung stattgefunden haben. Ein Vergleich der Integrale im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum zeigt, dass das Phosphoramidat **68** etwa ein Drittel des Gesamtphosphoranteils ausmachte. Die chromatographische Reinigung nach der Aufarbeitung gestaltete sich problematisch. Die Unterschiede im Retentionsverhalten vom gewünschten Produkt **20**, Glycerin **21** und Phosphoramidat **68** in den verwendeten Eluenten (Petrolether/Ethylacetat bzw. Dichlormethan/Methanol) waren derart gering, dass in der Regel drei Wiederholungen der säulenchromatographischen Reinigung notwendig waren, um das Produkt in einer ausreichenden Reinheit zu erhalten. Hinzu kam, dass das synthetisierte Produkt **20** trotz seiner sechs Benzylgruppen eine schlechte Detektierbarkeit aufwies. Eine Extinktion von UV-Licht bei 254 nm und 310 nm war nur bei hohen Konzentrationen erkennbar. Eine Anfärbung mit Kaliumpermanganat, Hanessian-Stain oder Phosphat-Anfärbereagens (Kap. 7.1.5.2) gelang auch lediglich in hohen Produktkonzentrationen. Die Reaktion wurde dennoch mit allen vier Kombinationen durchgeführt und so konnten die Stereoisomere **20a-d** in Ausbeuten von 51% bis 85% erhalten werden (**Abb. 37**).

Auf eine ähnliche Art und Weise, wie schon bei der Bildung des Phosphoramidits **66** beschrieben, ändert sich auch infolge dieser Reaktion formal ein weiteres Stereozentrum. In beiden Fällen spielte dabei die hohe Symmetrie der jeweiligen Moleküle eine entscheidende Rolle. Durch die Kupplung der phosphorhaltigen Spezies erfolgt eine Umkehr der Zählreihenfolge, die dadurch eine Umkehr der Bezeichnung nach Cahn-Ingold und Prelog am *sn*-2-Kohlenstoff der Glycerinspezies hervorruft (**Abb. 37**).

Eine weitere wichtige Schlussfolgerung lässt sich aus dem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ziehen. Die erwarteten zwei Signale, die wie bereits geschildert anhand des Stereozentrums am Phosphoratom zustande kommen, deuten darauf hin, dass sowohl der Glycerin-, als auch der Inositolteil enantiomerenrein vorgelegen haben mussten (**Abb. 39**, oben). Im Fall des Diastereomerengemisches **20e** sind im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum vier Signale erkennbar (**Abb. 39**, unten). Dies ist auf den Umstand zurückzuführen, dass es sich bei **20e** um ein Gemisch von vier Diastereomeren handelte, welche durch einen racemischen Glycerinvorläufer (*rac*)-**21** generiert wurden.



**Abb. 39:** Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren. **Oben:** **20b** als Gemisch zweier Diastereomere. **Unten:** **20e**. Ein Gemisch von vier Diastereomeren.

### 6.1.4.3 Vergleich der verwendeten Kupplungsmethoden

Im Hinblick auf die Kupplungsmethoden lässt sich zusammenfassend sagen, dass sowohl die Kupplung über *H*-Phosphonate, als auch die Kupplung über Phosphoramidite erfolgreich verliefen. Dafür wurden einige Reaktionsbedingungen erprobt. Hierbei wurde jeweils versucht, den Aufbau des Phosphatdiesters sowohl über einen *myo*-Inositol-Baustein, als auch über einen Glycerin- bzw. Pseudoglycerin-Vorläufer zu realisieren.

Zuerst wurde versucht, *H*-Phosphonat **45** im klassischen Sinne durch Reaktion des Inositols **22** mit Phosphor(III)-chlorid und Imidazol zu synthetisieren, was wegen der Bildung eines unbekanntes Nebenprodukts nicht erfolgreich verlief. Im Fall des 3-Hydropropylpalmitat-*H*-phosphonats **47** verlief diese Reaktion zwar erfolgreich, jedoch in moderater Ausbeute von 39%. Die von Stawinsky et al. publizierte *H*-Phosphonat-Monoester-Synthese<sup>[89]</sup> unter Mitsunobu-Bedingungen stellt eine unkonventionelle und moderne Synthesemethode dar. Unter analogen Bedingungen konnte der Glycerin-*H*-phosphonat-Monoester **48** in einer Ausbeute von 63% hergestellt werden.

Zur Erprobung der Phosphoramiditsynthese wurde zunächst versucht, eine direkte Kupplung eines Alkohols an Phosphor(III)-chlorid mit anschließender Umsetzung zum Bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidit durchzuführen. Aufgrund einer ausgeprägten Bildung von Nebenprodukten wie unerwünschten *H*-Phosphonaten und Phosphoramidaten während der Reaktion wurde dieser Syntheseweg verworfen.

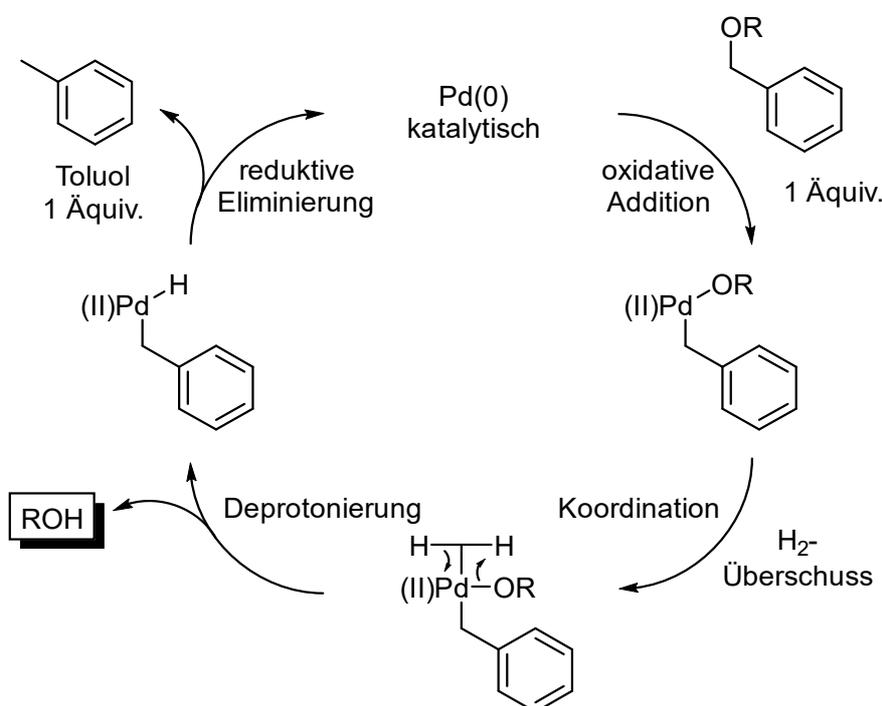
Durch die Synthese des 2-cyanoethyl-geschützten Phosphorchloridits **59**, welches als Kupplungsreagenz eingesetzt wurde, konnten erfolgreich die Phosphoramidite des *myo*-Inositols **57** und des 3-Hydroxypropylpalmitats **58** hergestellt werden. Eine Kupplung zum Phosphattriester **56** gelang zwar, allerdings wegen der Bildung des Phosphoramidats **61** in nur sehr geringen Ausbeuten.

Durch Synthese des Benzyloxy-bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidits **64** konnten sowohl die Inositol-Phosphoramidite **D-66** und **L-66**, als auch das entsprechende Phosphoramidit **69** (Kap. 6.1.6.1) des Glycerinbausteins (*S*)-**21** synthetisiert werden. Nach Phosphitylierung und Oxidation zum Benzyl-geschützten Phosphattriester **20** konnte zwar auch die Bildung des Phosphoramidats **68** beobachtet werden, was Ausbeuteeinbußen zur Folge hatte, jedoch konnten Ausbeuten von 50% und höher erzielt werden.

Werden die *H*-Phosphonat-Methode und die Phosphoramidit-Methode miteinander verglichen, lässt sich feststellen, dass sowohl die Synthese, als auch die Kupplung der Phosphoramidite einfacher und in besseren Ausbeuten gelang. Als passende Schutzgruppe für die Phosphat-Untereinheit wurde der Benzylester gefunden, wodurch mit Hilfe des Benzyloxy-bis(*diisopropylamino*)-phosphoramidits **64** eine Synthese der Phosphattriester **20a-d** erfolgreich durchgeführt werden konnte. Hinsichtlich der Entschützung der Phosphat-Schutzgruppe stellte sich die 2-Cyanoethylgruppe gegenüber der Benzylgruppe bei diesen Reaktionen als unterlegen heraus. Die Entschützung des Benzylesters und aller anderen Benzylgruppen im Molekül soll nun erläutert werden.

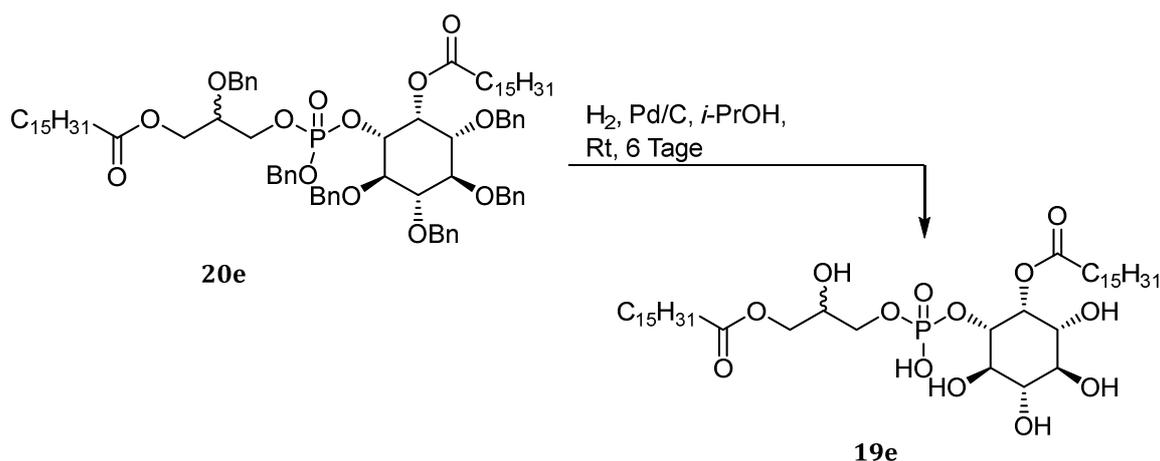
### 6.1.5 Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen

Nach der erfolgreichen Synthese der Phosphatriester **20a-d** sollten in einem letzten Schritt alle sechs im Molekül vorkommenden Benzyl-Gruppen abgespalten werden. Benzylether-Spaltungen werden in der Regel unter reduktiven Bedingungen hydrogenolytisch durchgeführt. Dazu wird in den meisten Fällen ein auf Aktivkohle adsorbierter Palladium(0)-Katalysator (Pd/C) und elementarer Wasserstoff verwendet. Durch die oxidative Addition des Benzylrestes an das Metallatom wird dieser zu Palladium(II) oxidiert. Nach einer Koordination von elementarem Wasserstoff aus der Gasphase, wird zunächst der zuvor geschützte Alkohol und in einem letzten Schritt Toluol reaktiv eliminiert (**Abb. 40**).



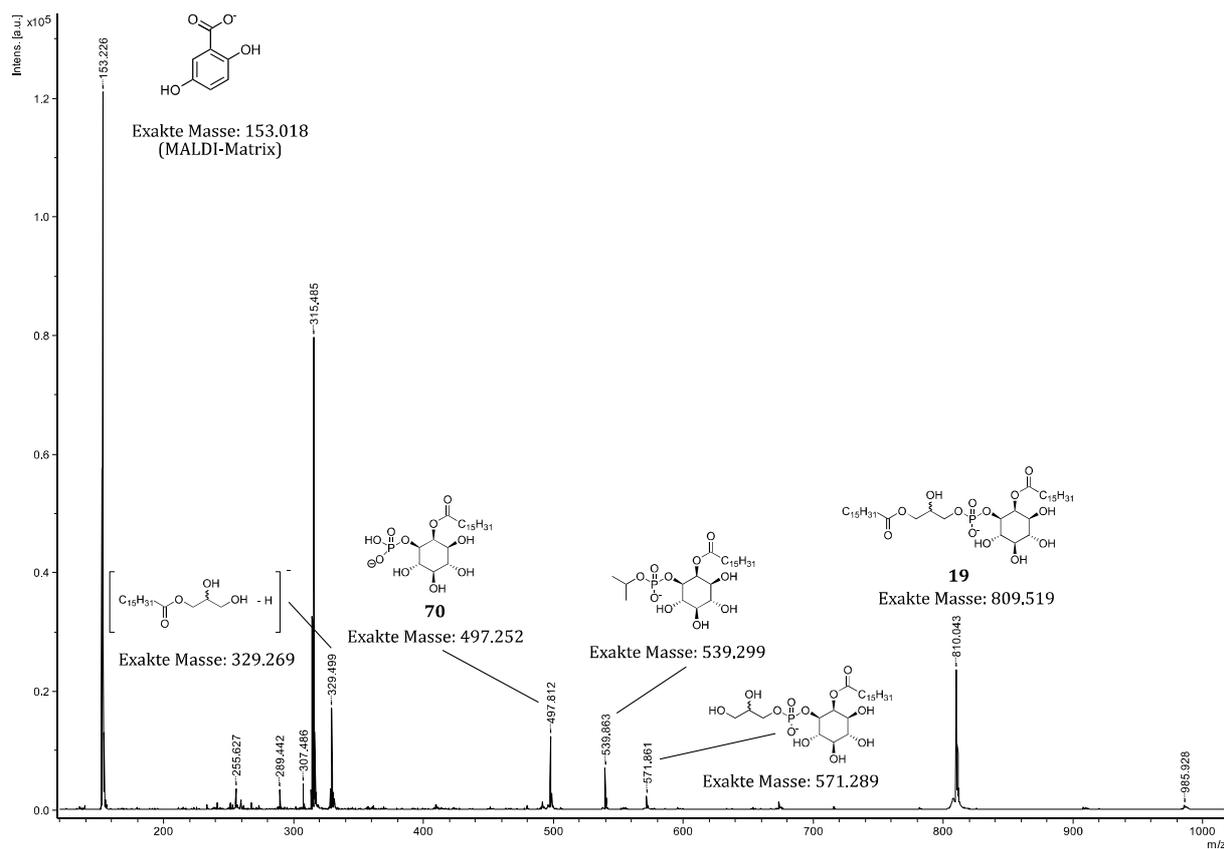
**Abb. 40:** Postulierter Mechanismus der Debenzylierung mit Pd(0)-Katalysator und elementarem Wasserstoff.<sup>[102]</sup>

Um die Bedingungen in einer Testreaktion zu erproben, wurde der Phosphatriester **20e** verwendet (**Schema 35**). Da sich durch die Abspaltung der unpolaren Benzylgruppen die Polarität des gesamten Moleküls ändert, sollte ein Lösungsmittel verwendet werden, welches sowohl das unpolare Edukt, als auch polare Zwischenprodukte möglichst gut lösen kann. Außerdem sollte es nicht reduzierbar sein. Aus diesem Grund wurde die Reaktion in *Isopropanol* in einer Wasserstoffatmosphäre (ca. 1 bar) für 6 Tage bei Rt durchgeführt.



**Schema 35:** Versuch der Synthese von **19e** aus Phosphattriester **20e**.

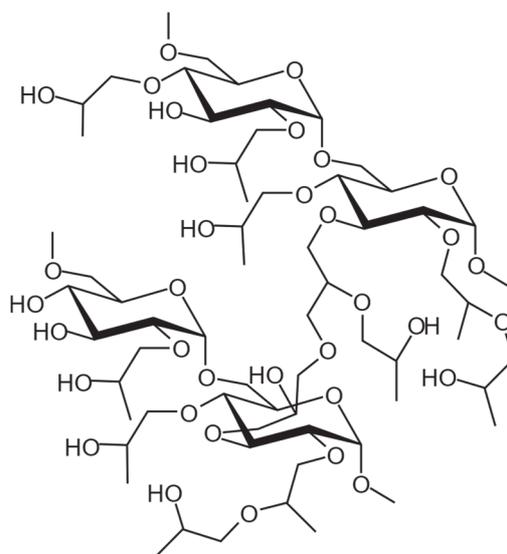
Während der Reaktionsdauer war ein weißer Feststoff ausgefallen, weshalb davon ausgegangen wurde, dass *Isopropanol* den voll- oder teilentschützten Phosphatdiester **19e** nicht vollständig lösen konnte. Daher wurde zunächst die flüssige Phase durch Zentrifugation von der festen Phase getrennt und anschließend die feste Phase, die zu einem großen Teil aus Trägermaterial und Katalysator bestand, zweimal mit 2-Propanol, einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (1:1) und schließlich mit Dichlormethan extrahiert. Das Rohprodukt, das auf diese Weise erhalten werden konnte, war ein weißer Feststoff, dessen Masse lediglich 19 gew-% der ursprünglich eingesetzten Masse an Edukt entsprach. Demnach musste ein Stoffmengenanteil von 69 mol-% des Phospholipids auf der großen Trägeroberfläche des Katalysators adsorbiert geblieben sein. Nach Entfernung des Lösungsmittels des Extrakts gelang es zunächst nicht, den erhaltenen weißen Feststoff für eine chemische Charakterisierung erneut in Lösung zu bringen. Dies wird durch den Umstand erklärt, dass das erhaltene Phospholipid sowie einige Nebenprodukte stark bipolare Stoffeigenschaften aufweisen. Die im Molekül enthaltenen langen Alkylketten stellen einen sehr unpolaren Teil dar, während das Phosphat und der *myo*-Inositol-Grundkörper polar sind. Aufgrund der schlechten Lösungseigenschaften wurde daher eine massenspektrometrische Analyse des Rohproduktes durchgeführt. MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) ist eine Ionisierungstechnik, bei der eine feste Probe direkt von einem Träger mit Hilfe eines Lasers ionisiert wird, ohne dass diese zuvor notwendigerweise komplett in Lösung gebracht werden musste. Die Signalintensität ist hierbei stark abhängig von der verwendeten Matrix. Im Fall von Phospholipiden werden in der Regel drei Matrices verwendet: 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 1,5-Diaminonaphthalen (DAN) und 9-Aminoacridin (9AA).<sup>[103]</sup> Da mit DHB bereits etablierte Messprotokolle existierten, wurde zunächst diese Matrix zur Messung verwendet. Im MALDI (neg.)-Spektrum waren jedoch neben dem zu erwartenden Molekülpeak des Produkts noch die Signale einiger Spaltprodukte erkennbar (**Abb. 41**).



**Abb. 41:** MALDI (neg.)-Spektrum des Rohproduktes bei der Synthese von **19e**.

So ist ein Signal eines Phosphatdiesters zu erkennen, dem ein Palmitoylrest fehlt ( $m/z$ : 571.861). Zwei weitere Signale deuten auf eine Spaltung des Produktes am Phosphatester hin. Es wurde sowohl ein passendes Signal zum Glycerinalkohol **21** ( $m/z$ : 329.499) als auch ein weiteres zum Inositolphosphat **70** ( $m/z$ : 497.812) gefunden. Ein weiteres deutet auf die Bildung eines Inositolphosphat-*isopropylesters* ( $m/z$ : 539.863) hin. Dies könnte durch die Reaktion des Lösungsmittels *Isopropanol* mit dem Inositolphosphat **70** entstanden sein.

Zur Reinigung des Rohprodukts wurde eine Gel-Permeations-Chromatographie mittels Sephadex LH-20® durchgeführt. Eine Chromatographie mit dem üblichen Normalphasen-Kieselgel war aufgrund der hohen Affinität und der daraus resultierenden hohen Retention des polaren Phosphat-Teils von **19** beinahe unmöglich. Hingegen war eine Chromatographie mit C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Kieselgel aufgrund der hohen Affinität der langen unpolaren Alkylketten nicht vorteilhaft. Eine Reinigung mittels einer stationären Sephadex®-Phase schien somit, besonders in Hinblick auf die großen Molekularmassenunterschiede, die im MALDI-Spektrum zu erkennen waren, vorteilhaft. Allerdings ist die Trennleistung einer solchen Sephadex®-Phase in der Regel schwächer als bei Normalphasen-Kieselgel.



**Abb. 42:** Struktur von Sephadex® LH-20.<sup>[104]</sup>

Zur Verbesserung von Ausbeute und Reinheit der Produkte wurden hauptsächlich drei Änderungen vorgenommen.

Ein Problem bestand in der Adsorption des Produktes an die Aktivkohle-Trägeroberfläche des Katalysators. Durch einen Wechsel auf Palladium-black® konnte dieser Umstand umgangen werden. Palladium-black ist ein ausschließlich aus Palladium(0) bestehender Feststoff mit einer relativ großen Oberfläche (40-60 m<sup>2</sup>/g).<sup>[105]</sup> Um dennoch adsorbiertes Produkt von der Oberfläche zu extrahieren, wurde der nach der Reaktion abgetrennte Katalysator für 6 h bei Rt in einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch (2:1) gerührt, was eine weitere Menge des Rohprodukts zugänglich machte. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der Hydrierung von „locked“ Nukleinsäuren (LNA) gemacht.<sup>[106]</sup> Hier wurde das Trägermaterial 1 h in *N,N*-Dimethylformamid refluxiert und heiß filtriert, um einen Großteil des gewünschten Produktes von der Oberfläche zu lösen. Diese Bedingungen hätten vermutlich jedoch zu einem Zerfall der Verbindung geführt.

Ein weiteres Problem bestand darin, dass eine Reaktion des *Isopropanols* mit einem Nebenprodukt beobachtet worden war. Durch einen Wechsel auf Tetrahydrofuran konnten keine derartigen Nebenreaktionen und dennoch gute Lösungseigenschaften beobachtet werden.

Ein weiteres Problem war die Reinigung des Rohprodukts. Hierbei sollte weiterhin eine Säulenchromatographie mit Sephadex Verwendung finden, da das Phospholipid eine zu hohe Affinität zu der Oberfläche von Kieselgelen zeigte. Es wurde daher ein Wechsel des Lösungsmittelgemisches vollzogen. Durch die Zugabe von Wasser konnte das Rohprodukt in einem Lösungsmittelgemisch (Dichlormethan/Methanol/Wasser, 10:5:1, v/v/v) erfolgreich gereinigt werden. Die Säulenchromatographie ist unter diesen Umständen nur kurze Zeit möglich,

da sich bei diesem hohen Wasseranteil ohne ausreichenden Fluss innerhalb von Minuten zwei Phasen ausbilden, die Risse im Säulenmaterial nach sich ziehen. Eine vollständige Reinigung des Zielmoleküls war anzustreben, da die erhaltenen Phosphatdiester wegen der daran anschließenden immunbiologischen Untersuchungen untoxisch gegenüber Zellen sein mussten und keine Verunreinigungen durch Schwermetalle oder organische Nebenprodukte enthalten sollten. Eine Reinigung über andere automatisierte chromatographische Verfahren wurde auch in Erwägung gezogen, allerdings basieren diese in der Regel auf der Verwendung von Kieselgel (s.o.) und auf einer UV-Detektion, was für schwach konzentrierte und wenig UV-aktive Phospholipide unvorteilhaft ist.

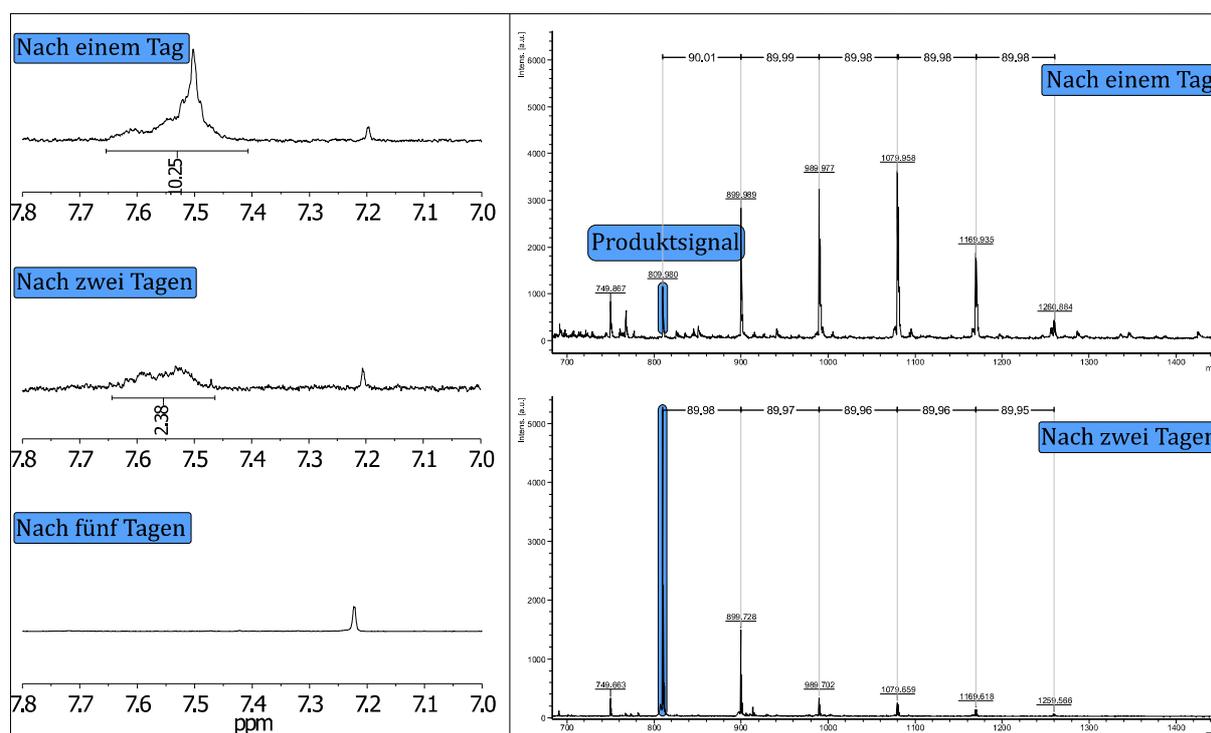
Eine Aufarbeitung durch Extraktion mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Dichlormethan schlug fehl. Nach der Abtrennung der wässrigen Phase und Entfernung des Lösungsmittels, was sich aufgrund einer starken Schaumbildung als schwierig erwies, konnte zwar ein weißer Feststoff erhalten werden, allerdings stellte sich dieser als ein Gemisch von Zerfallsprodukten heraus, die auf eine basische Verseifung der Esterfunktionen zurückzuführen waren. Eine Extraktion aus einem Gemisch aus Dichlormethan und Wasser schlug auch fehl, da sich das bipolare Produkt wahrscheinlich an der Phasengrenze anlagerte. Zwar konnte das gewünschte Produkt auch in der wässrigen Phase nachgewiesen werden, allerdings in einer verunreinigten und schwach konzentrierten Form, was wiederum auf die schlechte Löslichkeit des Phospholipids zurückzuführen war.

Die Synthese von **19b** in Tetrahydrofuran und mit Palladium-black (2.0 Äquiv.) als Katalysator wurde daher per NMR-Spektroskopie und MALDI-Massenspektrometrie verfolgt (**Abb. 43**). Nach 24 h war im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum das Integral der Signale für die aromatischen Protonen der Benzylgruppen (7.45 ppm bis 7.65 ppm) von 25 auf ca. 10, also auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Wertes geschrumpft (**Abb. 43**, links). Nach 48 h betrug es nur noch etwa 8% und nach fünf Tagen waren keine Signale mehr erkennbar. Auch die massenspektrometrische Überprüfung zeigte eine deutliche Abnahme von benzylierten Spezies nach zwei Tagen (**Abb. 43**, rechts).

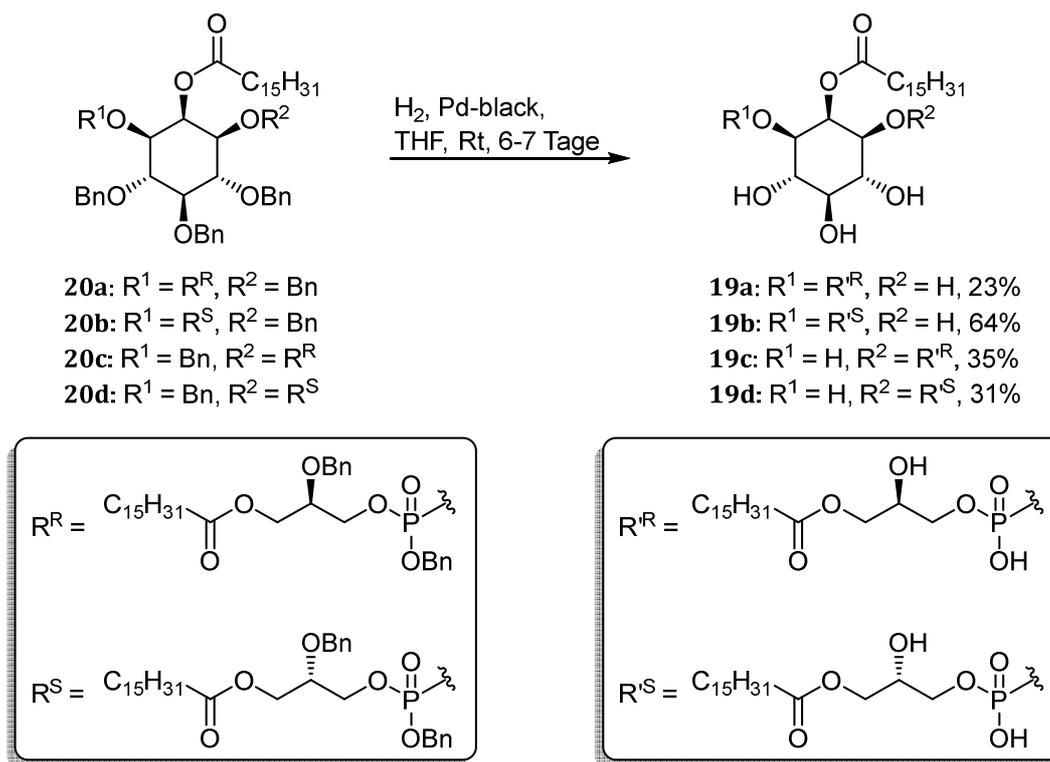
In dieser und in allen folgenden Reaktionsdurchführungen fiel auf, dass der eingesetzte Palladium-black-Katalysator zunächst pulverförmig war, aber nach einigen Stunden stark verklumpte und somit seine Oberfläche verringerte. Aus diesem Grund wurden jeweils nach 24 h weitere 2.0 Äquiv. Palladium-black hinzugegeben. Nach fünf Tagen Reaktionszeit wurde eine Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20® in einem Dichlormethan-Methanol-Wasser-Gemisch (10:5:1, v/v/v) durchgeführt. Der erwünschte Phosphatdiester **19b** war aufgrund seines Molekulargewichts wie zu erwarten die zuerst eluierte Verbindung und konnte so in einer niedrigen Ausbeute von 23% rein erhalten werden. Allerdings folgten überschneidend *myo*-

Inositolphosphat und andere Nebenprodukte, welche nicht vollständig von der Produktfraktion abgetrennt werden konnten. Dies liegt nicht zuletzt in der dennoch mäßigen Löslichkeit des Phospholipids im gewählten Gemisch aus Dichlormethan, Methanol und Wasser (10:5:1), da der Analyt so nur niedrig konzentriert aufgetragen werden konnte.

Nachdem neben den Reaktionsbedingungen auch Aufarbeitung und Reinigung optimiert wurden, konnten nun auch die drei übrigen Stereoisomere **19a** und **19c-d** hergestellt werden. Die Ausbeuten betragen dabei 31% - 64% (**Schema 36**).

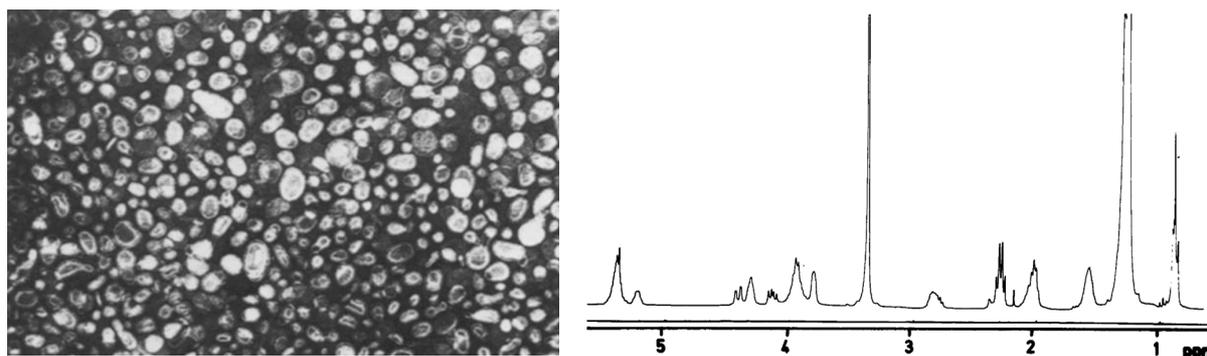


**Abb. 43: Links:** Abspaltung der Benzylgruppen: die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des Reaktionsgemisches zeigen den Rückgang der aromatischen Protonen nach einem bis fünf Tagen. Das Signal bei etwa 7.26 ppm entspricht Chloroform-d. Die Integrale sind normiert auf die CH<sub>3</sub>-Gruppen am Ende der Palmitoylgruppen, Kalibrierung der chemischen Verschiebung erfolgte über Methanol-d<sub>4</sub> (4.87 ppm). **Rechts:** die MALDI (neg.)-Spektren des Reaktionsgemisches zeigen den Rückgang der benzylierten Spezies nach ein bis zwei Tagen, die Abspaltung einer Benzylgruppe entspricht ca.  $\Delta m/z = 90$ . Der Molekülpeak des entschützten Produkts liegt bei  $m/z = 809.980$ .



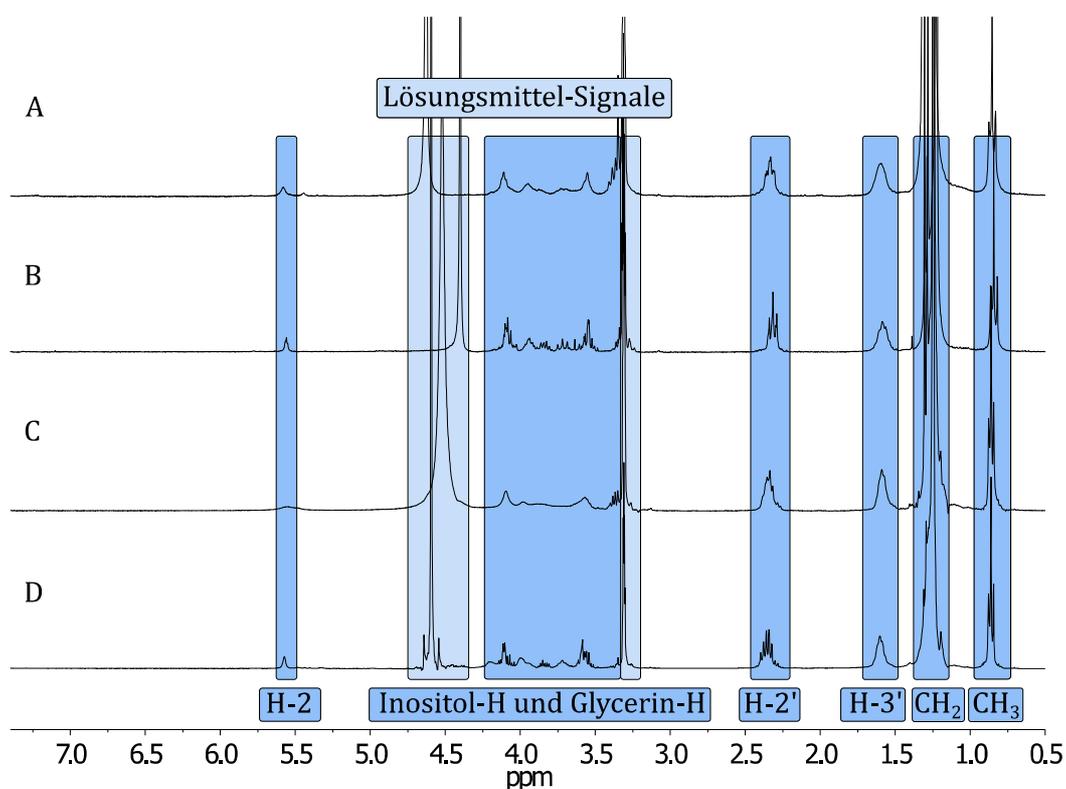
**Schema 36:** Synthese der Generation-I-EhPIs **19a-d**.

An dieser Stelle soll noch einmal auf die Problematik eingegangen werden, die sich aus der schlechten Löslichkeit und anderen synthetisch unvorteilhaften Eigenschaften der reinen Verbindungen **19a-d** ergaben. Es wurde versucht die Verbindungen in Methanol, Ethanol, 1-Butanol, Wasser, Dichlormethan, Chloroform, Toluol, Benzol, Ethylacetat, Essigsäure, Tetrahydrofuran, Aceton, Acetonitril, *N,N*-Dimethylformamid und 1,4-Dioxan zu lösen, wobei bei allen genannten Lösungsmitteln keine befriedigende Löslichkeit festgestellt werden konnte. Eine mäßige Löslichkeit besitzen die Verbindungen **19a-d** in Gemischen aus Dichlormethan und Methanol, bzw. Chloroform und Methanol. Eine gute Löslichkeit wurde zwar in Pyridin beobachtet, allerdings führte dies innerhalb weniger Tage zu einer Zersetzung des Moleküls. Wegen der mäßigen Löslichkeit konnten Messungen des spezifischen Drehwinkels nur in sehr niedrigen Konzentrationen durchgeführt werden, was zu hohen Schwankungen der ermittelten Messwerte führte. Im Fall der NMR-Spektroskopie konnten Messungen auch nur in niedrigen Konzentrationen in Gemischen aus Chloroform-*d* und Methanol-*d*<sub>4</sub> durchgeführt werden. Daraus resultierten sehr niedrige Signal/Rausch-Verhältnisse und eine schlechte Auflösung. Ein weiterer Aspekt war die Bildung von Agglomeraten wie Mizellen, inverse Mizellen oder Liposomen, die die Signalstärke einzelner Molekülteile oder des ganzen Moleküls verringerten, die Halbwertsbreite stark erhöhten und so die NMR-Analytik erschwerten (**Abb. 45**).<sup>[107, 108]</sup>



**Abb. 44:** Liposomenbildung von Phospholipiden am Beispiel Phosphatidylcholin. **Links:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (99000-fache Vergrößerung) einer sonifizierten Phosphatidylcholin-Lösung in Wasser (1 mM bei 25°C). **Rechts:** niedrige Auflösung bei einem 500 MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Phosphatidylcholin in D<sub>2</sub>O (20 mM, 27°C), Abbildungen entnommen von Michaelis et al. [108]

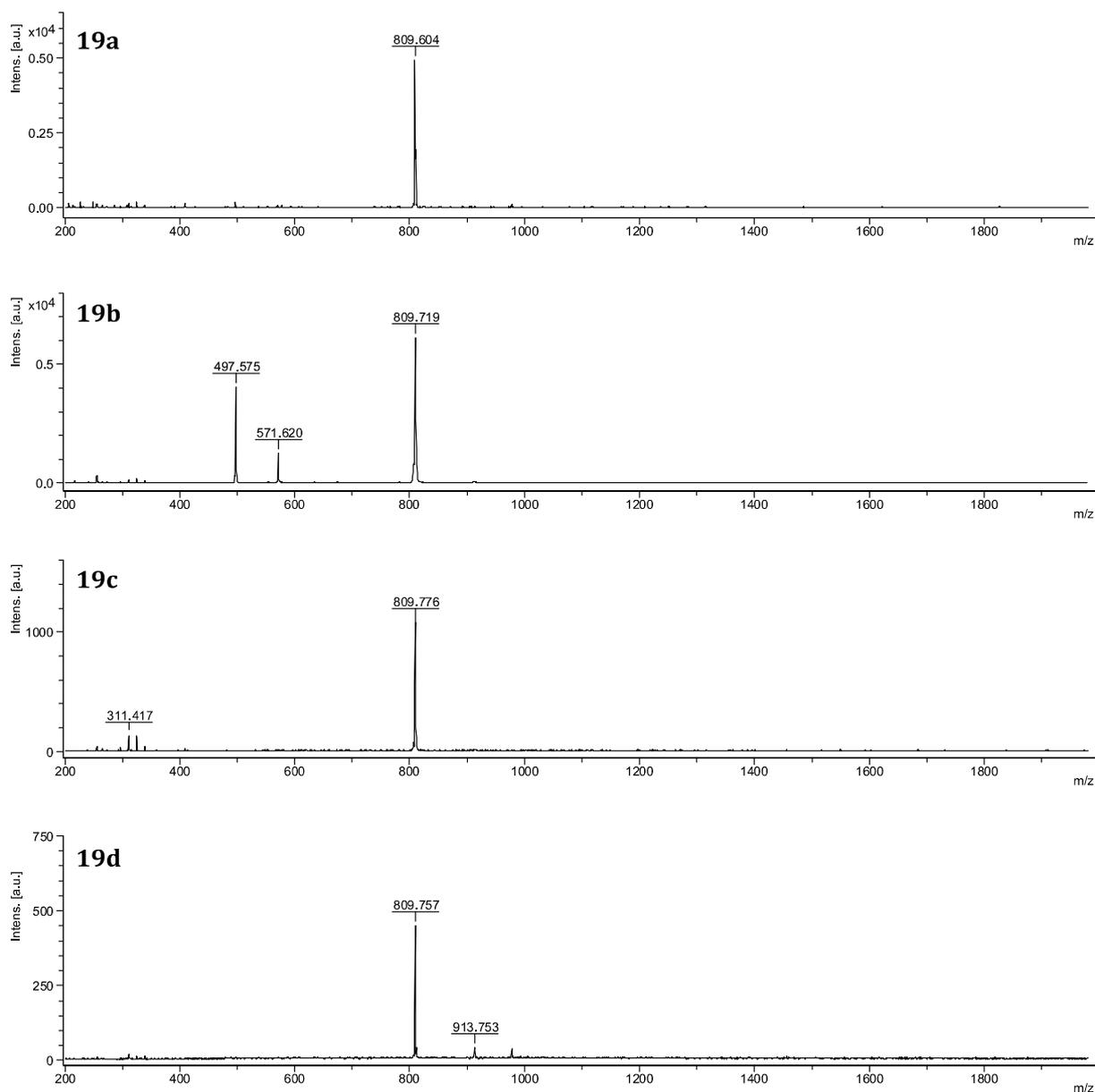
Diese Umstände sind in der Literatur bekannt und haben in der Vergangenheit zu einer Vielzahl von nicht ausreichend aufgelösten NMR-Spektren geführt (**Abb. 44**).<sup>[19, 68, 76]</sup> Durch die Entwicklung leistungsstärkerer NMR-Geräte und neuartiger Methoden wird die Analytik von Assoziationskolloiden z.B. bei Phospholipiden jedoch verbessert. Da diese Agglomerationen auch insbesondere in wässrigen Lösungen auftreten<sup>[108]</sup>, ist davon auszugehen, dass sie auch einen Einfluss auf immunbiologische Evaluierungen haben.



**Abb. 45:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Verbindungen **19a** und **19b** gemessen in CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O (10:5:1, v/v/v), kalibriert auf MeOD (3.31 ppm). **A:** 300 MHz-Spektrum der Verbindung **19a** mit niedriger Auflösung durch Mizellenbildung, **B:** 300 MHz-Spektrum der Verbindung **19a** mit höherer Auflösung, **C:** 400 Mhz-Spektrum der Verbindung **19b** mit niedriger Auflösung durch Mizellenbildung. **D:** 400 MHz-Spektrum der Verbindung **19b** mit höherer Auflösung.

Die NMR-Spektroskopie ließ sich jedoch in einem begrenzten Umfang optimieren. So ließen sich die in der Regel schlecht aufgelösten und breiten Signale (**Abb. 45, A, C**) durch eine hohe Magnetfeldstärke des NMR-Geräts, eine möglichst hohe Anzahl von Scans, eine hohe Probenkonzentration (allerdings werden nach Überschreiten der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) Aggregate gebildet, was wiederum in schlechten Spektren resultiert), eine hohe Reinheit der Probe und ein geeignetes Lösungsmittel (in der Regel ein Chloroform-d/Methanol-d<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O-Gemisch oder Pyridin-d<sub>5</sub>) verbessern (**Abb. 45, B, D**).

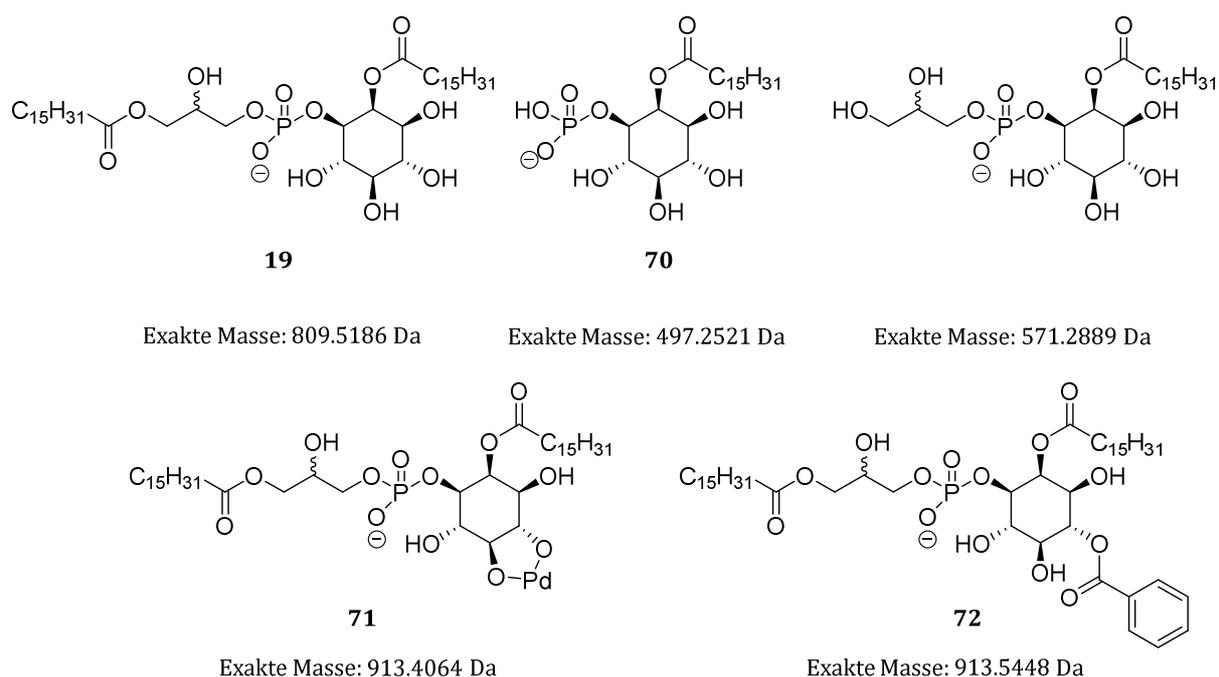
Einen weiteren negativen Einfluss übte die schlechte Löslichkeit auf die Chromatographie aus. Wie bereits oben erwähnt, wurde die Trennleistung der Sephadex-Säulenchromatographie herabgesetzt, da der Analyt entweder in niedriger Konzentration oder als Suspension auf die Säule aufgetragen werden musste. Ein weiteres Hindernis ergab sich aus der hohen Bipolarität im Molekül. Sowohl die C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Chromatographie, die wegen der langen Alkylketten auf der stationären Phase unvorteilhaft ist, als auch die Normalphasen-Chromatographie, die wegen der im Molekül befindlichen Ladung eine starke Retention des Analyten hervorruft, sind für die Moleküle **19a-d** in ihrer vorliegenden Form nicht durchführbar. Ein Weg, die vorliegenden Verbindungen **19a-d** dennoch auf Normalphasen-Kieselgel eluieren zu können, lag im Zusetzen von Essigsäure zum Eluenten. Auf diese Weise war es möglich den Retentionsfaktor (R<sub>f</sub>) bei einem Gemisch von Dichlormethan/Methanol/Essigsäure/Wasser (12.5:7.5:2:1, v/v/v/v) von 0.0 auf 0.9 zu steigern. Allerdings steigt durch den Zusatz von Säure die Wahrscheinlichkeit einer säurekatalysierten Esterseifung und damit die Zersetzung des Moleküls. Ein weiterer Punkt, der die Chromatographie der Verbindungen **19a-d** erschwerte, war die ausgesprochen schwache UV-Absorption, da viele automatisierte Chromatographieverfahren wie die HPLC darauf beruhen. Aus diesem Grund wurden für die Charakterisierung der Phospholipide insbesondere massenspektrometrische Verfahren verwendet. Insbesondere die MALDI-Ionisierungsmethode hatte den Vorteil, dass eine vollständige Lösung des Analyten nicht vorausgesetzt wird. Zudem hat die Massenspektrometrie gegenüber der NMR-Spektroskopie den Vorteil, dass sie sensitiver ist und wesentlich kleinere Analytkonzentrationen benötigt. So können auch schlecht lösliche Substanzen, wie die Phospholipide **19a-d**, charakterisiert werden (**Abb. 46**).



**Abb. 46:** MALDI (neg.)-Massenspektren der Verbindungen **19a-d**.

Um passende Messbedingungen für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie für die Verbindungen **19a-d** herzustellen, wurden einige Methoden erprobt. Als Matrix wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und 9-Aminoacridin (9AA) in unterschiedlichen Konzentrationen und Lösungsmitteln getestet. Als beste Bedingungen stellten sich eine 1:1-Mischung aus Analyt in Methanol (ca. 1 mg/mL) und einer 9AA-Lösung (10 mg/mL) in einem 2-Propanol/Acetonitril-Gemisch (3:2) heraus. Da es sich bei den Phosphatdiestern um leichte Säuren handelt, wurde der negative Modus gewählt. Um die Auflösung der Messung zu erhöhen, wurde mit einer Reflektor-*time-of-flight*-Detektion gearbeitet. So konnten die Massenspektren von allen vier Zielverbindungen aufgenommen werden (**Abb. 46**). Neben den Molekülsignalen bei

$m/z = 809.757$  ist im Spektrum der Verbindung **19d** noch ein Signal bei  $m/z = 913.753$  zu erkennen. Dieses könnte entweder auf ein Addukt mit Palladium **71** oder eine benzylierte Spezies **72** hinweisen (**Abb. 47**). Die Signale  $m/z = 571.620$  sowie  $m/z = 497.575$  lassen sich Molekülen nach einer Verseifung zuordnen (**Abb. 47**), welche entweder bei der Ionisation oder durch Lagerung aufgetreten sein könnten. Im Fall des Signals bei  $m/z = 571.620$  kann nicht abschließend gesagt werden, welcher der beiden Hexadecanoylreste abgespalten wurde, da beide resultierenden Ionen die gleiche Masse besitzen.



**Abb. 47:** Mögliche Strukturen für Signale in den Massenspektren in den **Abb. 46.** und **Abb. 48.**

Auch durch hochaufgelöste ESI-Massenspektrometrie konnten die Verbindungen analysiert werden (**Abb. 48**). Hier fielen die Signale um  $m/z = 913.538$  herum bei drei Verbindungen auf (**Abb. 47**). Bei der Verbindung **19a** war eine Verseifung zu erkennen. Das Signal  $m/z = 497.2447$  ist wie oben erwähnt dem *myo*-Inositolphosphat **70** zuzuordnen. Diese Verseifung kann allerdings auch während der Ionisation im Massenspektrometer aufgetreten sein.

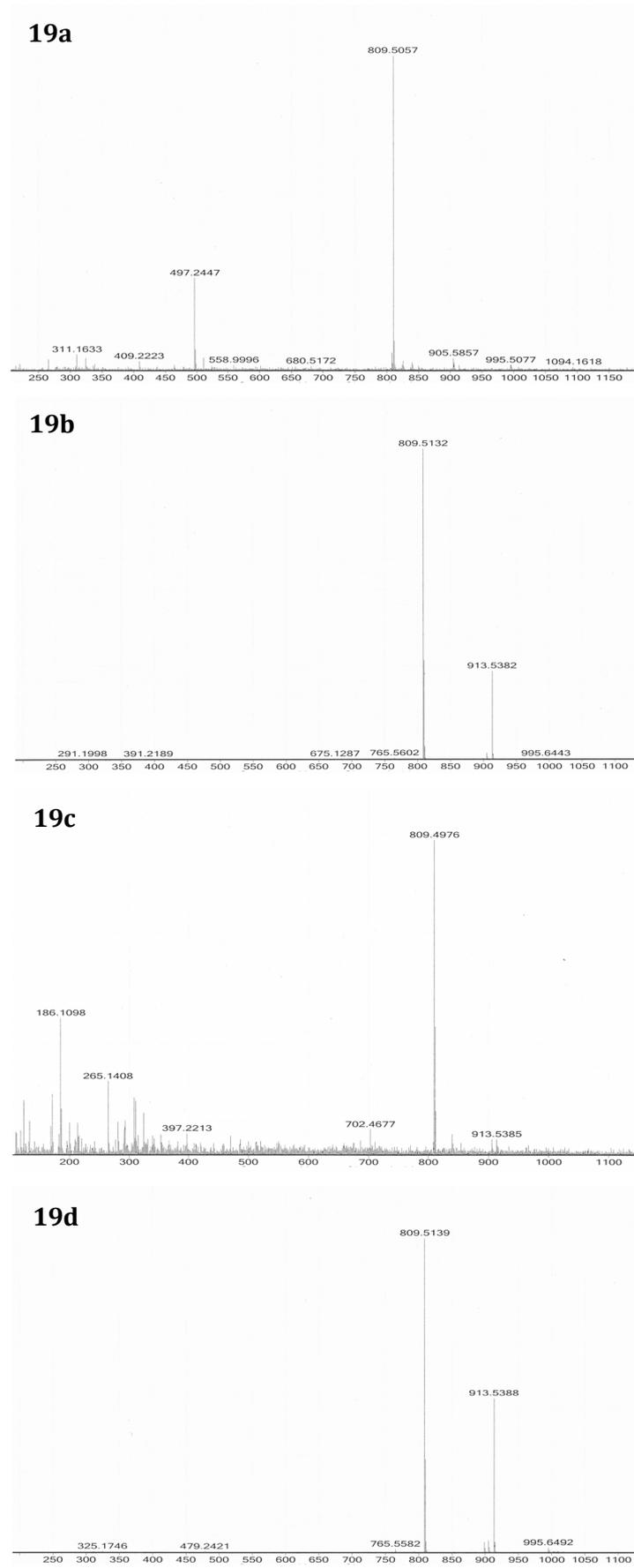


Abb. 48: ESI (neg.)-Massenspektren der Verbindungen 19a-d.

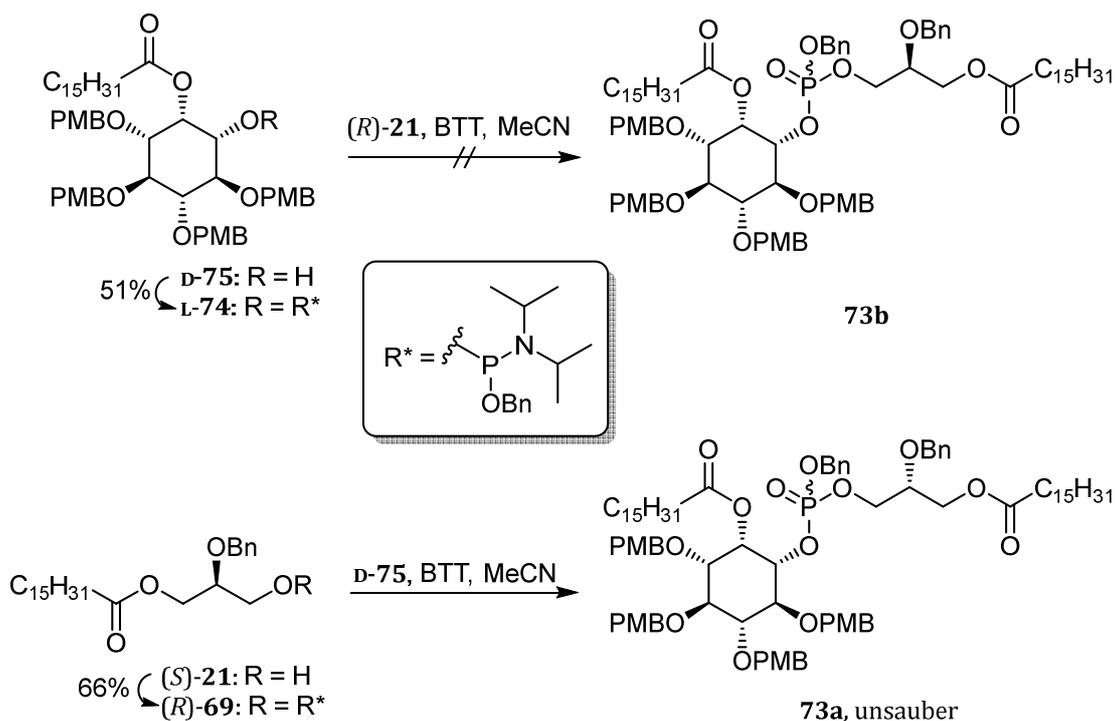
## 6.1.6 Synthese über PMB-geschützte *myo*-Inositole

### 6.1.6.1 PMB-geschützte *myo*-Inositole und benzylierter Glycerin

Wie bereits in Kap. 6.1.1 erläutert, wird die *para*-Methoxybenzyl-Gruppe hauptsächlich wegen ihrer leichten und vielseitigen Abspaltbarkeit verwendet. Um diesen Vorteil zu nutzen, wurden entsprechende Kupplungen PMB-geschützter *myo*-Inositole zur Synthese der Phosphatriester **73a** und **73b** über die Zwischenstufen der *para*-Methoxy-benzylierten Phosphoramidite **L-74** und (*R*)-**69** erprobt. Da es sich bei den Glycerin-Bausteinen um benzylierte Derivate handelte, entstanden zwar Mischspezies aus Benzyl- und *para*-Methoxybenzylethern, diese konnten jedoch beide in einer einzelnen Folgereaktion hydrogenolytisch unter Palladiumkatalyse gespalten werden.

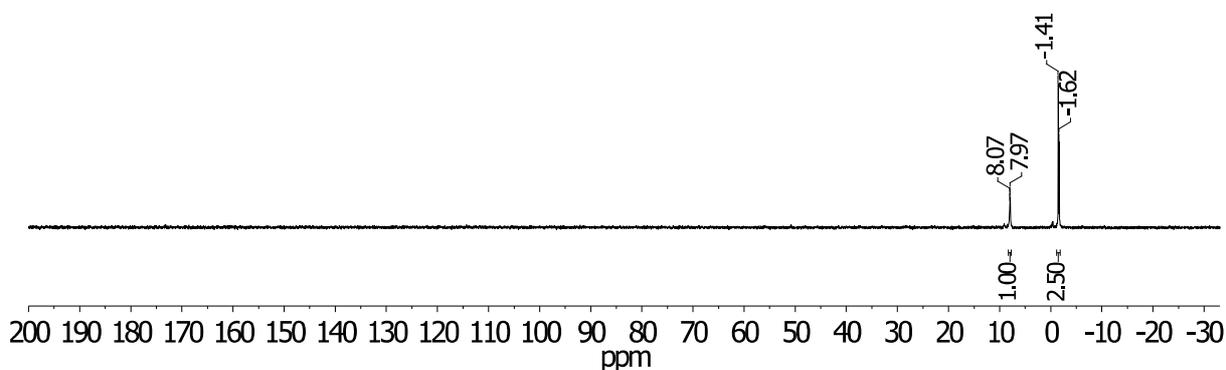
Zunächst wurden die entsprechenden Phosphoramidite **L-74** und (*R*)-**69** analog zu den Bedingungen in Kap. 6.1.4.2.4 ausgehend von den Alkoholen **D-75** und (*S*)-**21** hergestellt (**Schema 37**). **D-75** wurde von Nils Jeschik zur Verfügung gestellt, die Synthese der Alkohole (*R*)-**21** und (*S*)-**21** wird in Kap. 6.1.3 erläutert. Zur Synthese des jeweiligen Phosphoramidits wurden **D-75** und (*S*)-**21** vorgetrocknet und jeweils mit einem anderthalbfachen Überschuss an Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **64** in Acetonitril bei 0°C mit 1.5 Äquiv. BTT-Aktivator umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 45 min. bei 0°C wurden die beiden Ansätze den bereits bekannten Reaktionen entsprechend aufgearbeitet und chromatographisch gereinigt. Die Ausbeuten betragen 51% für das *myo*-Inositol-Phosphoramidit **L-74** und 66% für das Glycerin-Phosphoramidit (*R*)-**69** (**Schema 37**).

Für die Synthese des Phosphatriesters **73b** wurde anschließend das Phosphoramidit **L-74** mit dem Glycerin (*R*)-**21** analog zu den in Kap. 6.1.4.2.5 genannten Bedingungen unter BTT-Aktivierung umgesetzt, mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert und entsprechend der etablierten Methode aufgearbeitet. Das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum des Rohprodukts zeigte jedoch keine Signale, die für den Phosphatriester **73b** typisch gewesen wären, sondern nur ein Signal bei 8.3 ppm, was auf die Bildung eines *H*-Phosphonsäurediesters oder Phosphoramidats hindeutete. Somit wurde davon ausgegangen, dass keine Kupplung stattgefunden hatte. Stattdessen wurde vermutet, dass das Phosphoramidit **L-74** ähnlich wie bei bereits vorgestellten Phosphoramiditkupplungen vor der Reaktion bereits hydrolysiert oder oxidiert wurde.



**Schema 37:** Reaktionsschema zur Synthese der Phosphattriester **73a** und **73b** ausgehend von den Verbindungen  $(R)\text{-21}$ ,  $(S)\text{-21}$  und  $D\text{-75}$ .

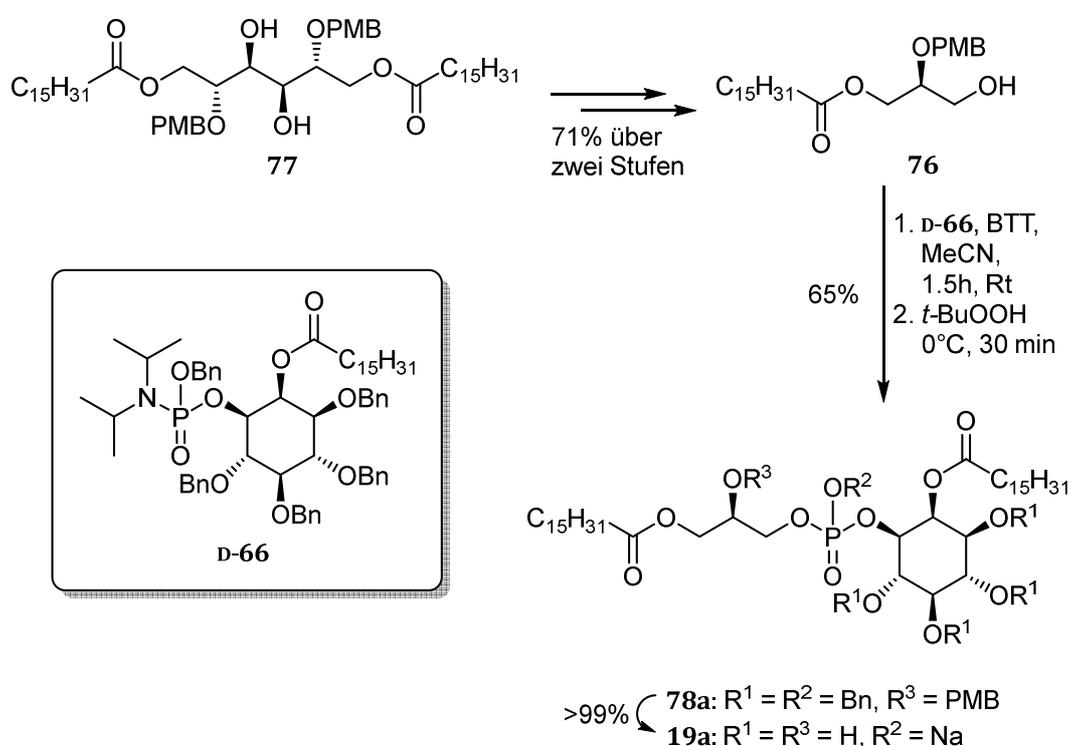
Im Fall des Phosphoramidits  $(R)\text{-69}$ , welches unter gleichen Bedingungen mit *myo*-Inositol  $D\text{-75}$  umgesetzt wurde, zeigte das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Rohprodukts auch die für *H*-Phosphonate oder Phosphoramidate typischen Signale bei ca. 8.0 ppm. Allerdings waren auch zwei weitere Signale um -1.5 ppm mit 2.5-facher Peakfläche zu erkennen, welche auf den Phosphattriester **73a** hindeuteten (**Abb. 49**). Dementsprechend wurde eine säulenchromatographische Reinigung mit einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch (200:1, v/v) durchgeführt, die allerdings keine ausreichende Trennung ermöglichte. Es wurden daraufhin noch zwei weitere Reinigungen (Dichlormethan/Diethylether, 20:1, und Petrolether/Ethylacetat, 2:1) durchgeführt, jedoch konnte Phosphattriester **73a** nur unsauber erhalten werden (**Schema 37**).



**Abb. 49:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **73a**.

### 6.1.6.2 PMB-geschützter Glycerinbaustein und benzylierter myo-Inositol-Baustein

In einem weiteren Versuch wurde die Kupplung über einen *para*-Methoxybenzyl-geschützten Glycerin-Baustein getestet. Der Alkohol (*S*)-**76** wurde dazu aus dem *cis*-Diol **77** im Zuge einer milden oxidativen Periodat-Spaltung generiert. Das *cis*-Diol **77** wurde dafür analog zu den in Kap. 6.1.3 geschilderten Bedingungen in Dichlormethan und Ethanol mit Natriumperodat unter leicht basischen Bedingungen umgesetzt. Nach Neutralisation wurde der entstandene Aldehyd direkt im Anschluss mit Natriumcyanoborhydrid zum Alkohol (*S*)-**76** reduziert, welcher nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung in einer guten Ausbeute von 71% über zwei Stufen erhalten werden konnte (**Schema 38**).



**Schema 38:** Synthese des Phosphatidylinositols **19a** über das vollständig geschützte Phosphatidylinositol **78a**.

Der erhaltene Alkohol (*S*)-**76** wurde daraufhin mit dem Phosphoramidit **D-66** zum Phosphattriester **78a** in bekannter Reaktionsdurchführung (Kap. 6.1.4.2.5) umgesetzt und aufgearbeitet. Die bereits genannten Probleme bei der chromatographischen Reinigung des Phosphattriesters traten auch hier auf. Durch einen Wechsel des Eluenten auf ein Lösungsmittelgemisch von Dichlormethan und Aceton (20:1) konnte das vollständig geschützte Phosphatidylinositol **78a** jedoch in einer guten Ausbeute von 65% erhalten werden (**Schema 38**).

Die erfolgreiche Reaktionsführung zur Abspaltung der Benzylether (Kap. 6.1.5) konnte auch auf die Abspaltung der Ether-Schutzgruppen von Verbindung **78a** übertragen werden. Dazu wurde diese unter einer Wasserstoffatmosphäre mit Palladium-black® in Tetrahydrofuran fünf Tage bei Rt gerührt. Nach Zentrifugation zur Abtrennung des Katalysators wurde das Rohprodukt chromatographisch mithilfe von Sephadex® LH-20 gereinigt und das Phosphatidylinositol **19a** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten (**Schema 38**).

Die Ausbeute bei der Synthese des Phosphatriesters **73** mit PMB-geschützten *myo*-Inositol-Hydroxyfunktionen lagen deutlich unter denen der entsprechenden benzylierten Derivate (Kap. 6.1.4.2.5). Dies lag hauptsächlich an der Bildung von Nebenprodukten wie *H*-Phosphonaten und Phosphoramidaten. Die Bildung von *H*-Phosphonaten kann im Allgemeinen auf Verunreinigungen durch Wasser zurückgeführt werden. Da jedoch generell unter möglichst wasserfreien Bedingungen gearbeitet wurde, könnten geringe Mengen an Wasser durch die PMB-geschützten Verbindungen in die Reaktion mitgeschleppt worden sein. Ob PMB-geschützte *myo*-Inositol-Derivate eine höhere Affinität zum Einschluss von Wasser aufweisen, ist bisher nicht untersucht worden. Auch die Bildung von Phosphoramidaten konnte bislang nicht erklärt werden, ist aber nicht auf eine Verunreinigung durch Wasser zurückzuführen (Kap. 6.1.4.2.1, **Abb. 28**).

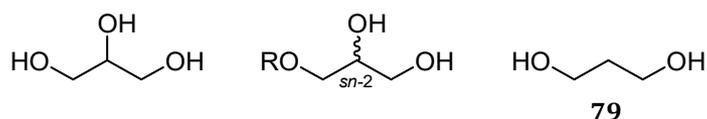
Sowohl bei der Kupplung des mono-*para*-Methoxybenzyl-geschützten Phosphatriesters **78a**, als auch bei der Entschützung der Bn- und PMB-Gruppen konnten gute Ausbeuten von über 65% erzielt werden. Diese im Vergleich zu den reinen benzyl-geschützten Verbindungen (Kap. 6.1.4.2.5) verhältnismäßig hohe Ausbeute könnte durch die bereits optimierten Reaktionsbedingungen und die geringe Anzahl an PMB-Gruppen zu erklären sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Schützung der *myo*-Inositol-Hydroxyfunktionen mit *para*-Methoxybenzyl-Gruppen zu keinem befriedigenden Ergebnis führte. Hier könnte ein Mitschleppen von kleinen Wassermengen die Reaktion gestört haben. Im Fall der Schützung der *sn*-2-Hydroxyfunktion des Glycerinbausteins mit der *para*-Methoxybenzyl-Gruppe konnte zwar eine gute Ausbeute erzielt werden, was möglicherweise auf die geringe Anzahl an PMB-Gruppen im Molekül zurückzuführen ist, dennoch wird die Benzylgruppe zur Schützung der Hydroxyfunktionen bevorzugt, da diese einerseits stabiler ist und Benzylbromid, welches zur Einbringung der Benzylgruppen benutzt wurde, günstiger ist als *para*-Methoxybenzylchlorid, welches zur Einbringung der PMB-Gruppe genutzt wird. Die Abspaltung der PMB-Gruppen verlief zwar schneller, aber in gleichem Maße vollständig wie die Abspaltung der Benzylgruppen (Kap. 6.1.5), weshalb die Verwendung der PMB-Gruppe nur einen geringen Vorteil bot.

## 6.2 Synthese von Generation-II-EhPIb-Analoga

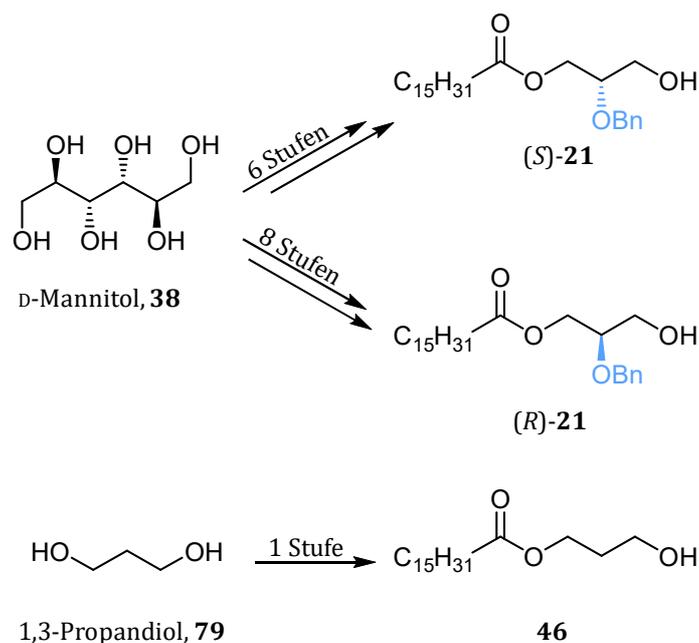
### 6.2.1 Synthese von Generation-II-EhPIb-Analoga mit zwei C<sub>16</sub>-Ketten

Glycerin ist aufgrund seiner Symmetrie achiral (**Abb. 50**). Unsymmetrisch substituierte Glycerinderivate hingegen sind chiral. Bei der Desymmetrisierung entsteht ein stereogenes Zentrum am *sn*-2-Kohlenstoff-Atom. Wenn dabei achirale Reagenzien Verwendung finden, entsteht in der Regel ein Racemat, das es zu trennen gilt, wenn optisch reine Produkte erhalten werden sollen. Möglichkeiten der Trennung sind z.B. die kinetische Racematspaltung oder eine Enantiomerentrennung durch chromatographische oder Kristallisationsmethoden. Außerdem gibt es noch die Möglichkeit einer *ex-chiral-pool*-Synthese, bei der bereits optisch reine Ausgangsstoffe verwendet werden, welche nach und nach zu den gewünschten Verbindungen umgesetzt werden. Eine solche Synthese wird in Kap. 6.1.3 beschrieben. Diese Methoden sind in der Regel sehr aufwendig und erfordern viel Synthese- und Entwicklungsarbeit.



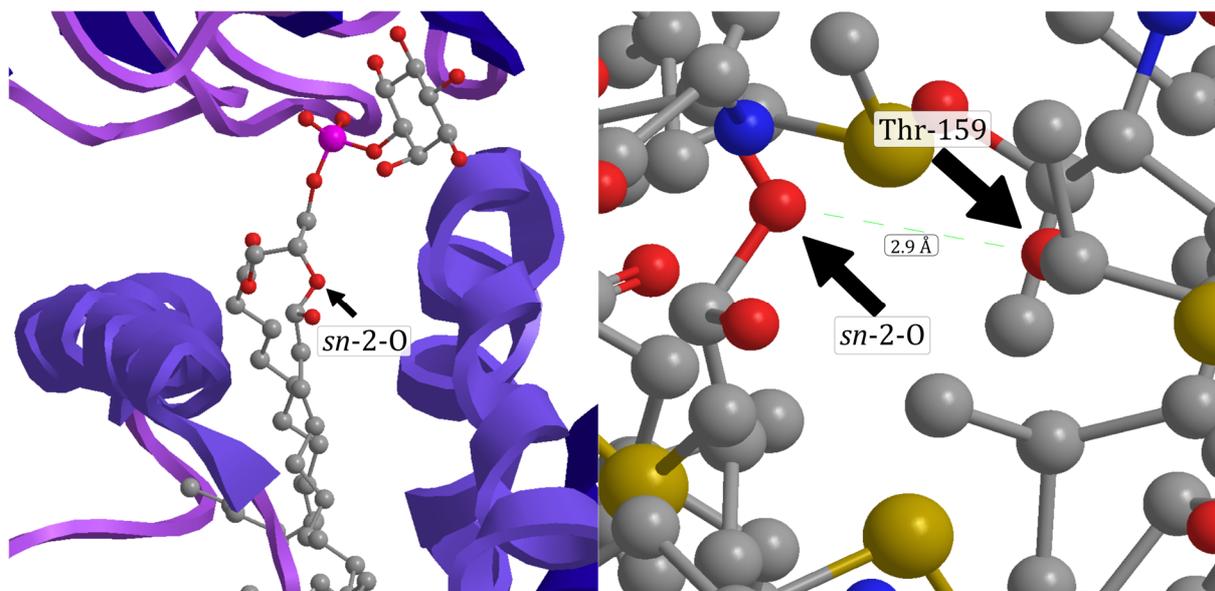
**Abb. 50: Links:** Glycerin, eine achirale Verbindung. **Mitte:** Durch unsymmetrische Substitution ( $R \neq H$ ) erhaltenes chirales Glycerinderivat als Racemat. **Rechts:** 1,3-Propandiol **79**, auch nach unsymmetrischer Substitution eine achirale Verbindung.

Eine Möglichkeit dieser Schwierigkeit zu begegnen ist die formelle Entfernung des *sn*-2-Sauerstoffatoms oder anders formuliert, die Substitution der Hydroxyfunktion durch ein Proton. Somit wird das stereogene Zentrum eines unsymmetrisch substituierten Glycerins entfernt. Dies hat eine weitreichende synthetische Vereinfachung zur Folge. Bezogen auf die Synthese von (*R*)-**21** und (*S*)-**21** wird zur Herstellung des zu kuppelnden Alkohols anstatt der sechs- bzw. achtstufigen Syntheseroute lediglich eine Stufe zur Synthese eines einzelnen achiralen Esters **46** aus 1,3-Propandiol **79** benötigt (**Abb. 51**).

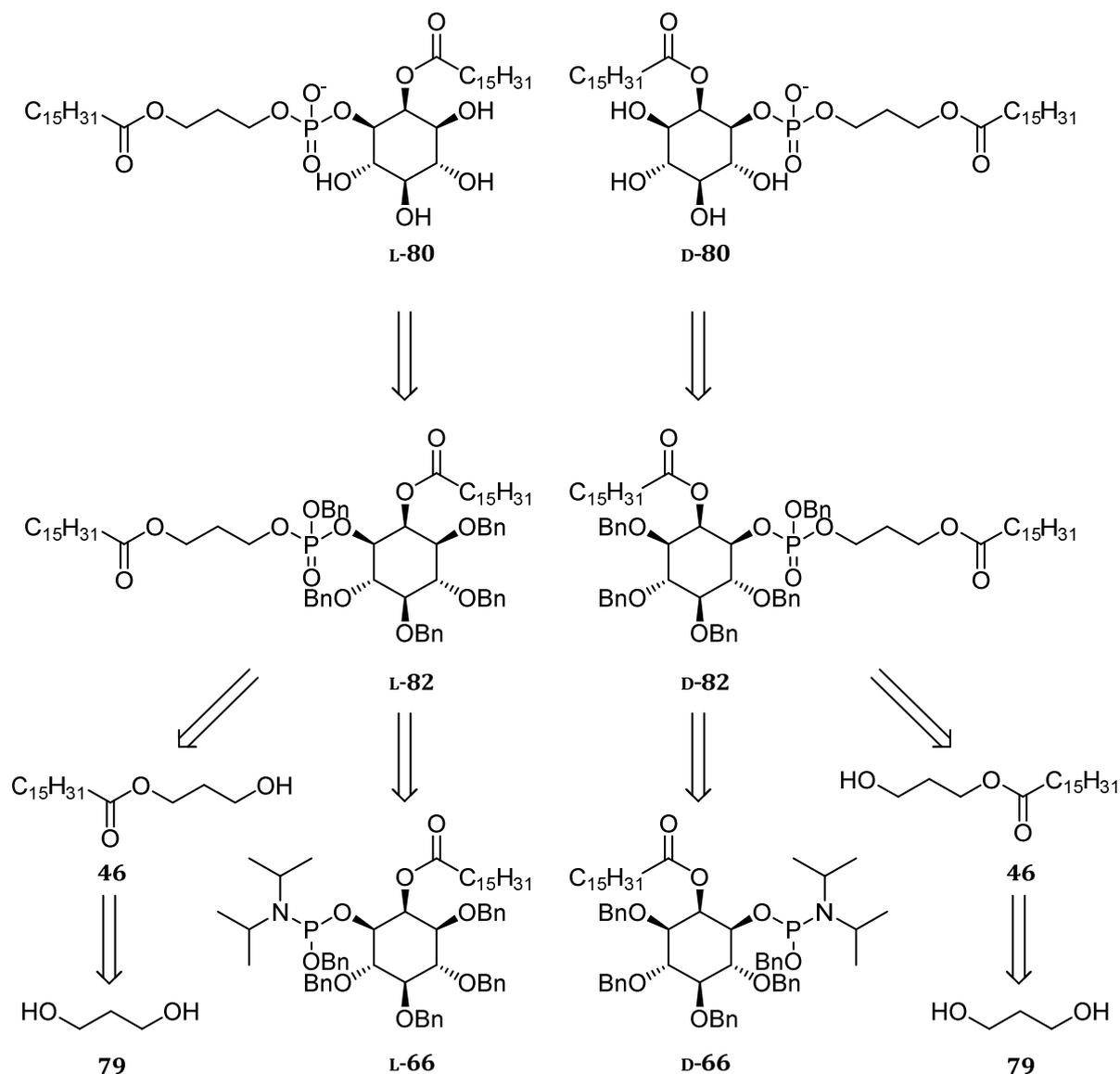


**Abb. 51:** Vergleich der Syntheserouten von (S)-21, (R)-21 und 46.

Der Einfluss der *sn*-2-OH-Gruppe auf den CD1d-Ligand-TCR-Komplex (Kap. 4.3) ist bislang nicht genau bekannt. Eine von Clarke und Rossjohn gemessene Kristallstruktur<sup>[2]</sup> eines CD1d-PI-TCR-Komplexes zeigt, dass sich im Umfeld der *sn*-2-OH-Gruppe des Glycerin-Teils die OH-Funktion des Threonin-159-Rests befindet (**Abb. 52**). Die betroffenen Sauerstoffatome haben hierbei einen Abstand von 2.9 Å. Dies könnte auf eine Interaktion der beiden Gruppen hindeuten.



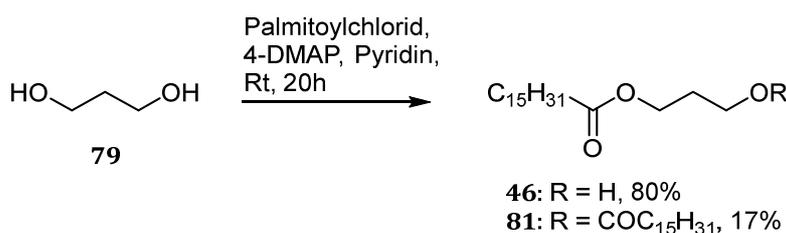
**Abb. 52:** Ausschnitt aus der Kristallstruktur von einem PI in einem CD1d-TCR-Komplex (PDB ID: 3QI9). **Links:** Darstellung der Bindungstasche von CD1d als Cartoon. **Rechts:** Kugel-Stab-Darstellung mit Abstand zwischen dem *sn*-2-Sauerstoffatom und dem Sauerstoffatom aus der Seitenkette von Threonin-159.<sup>[2]</sup>



**Schema 39:** Retrosyntheseschema von **D-80** und **L-80**.

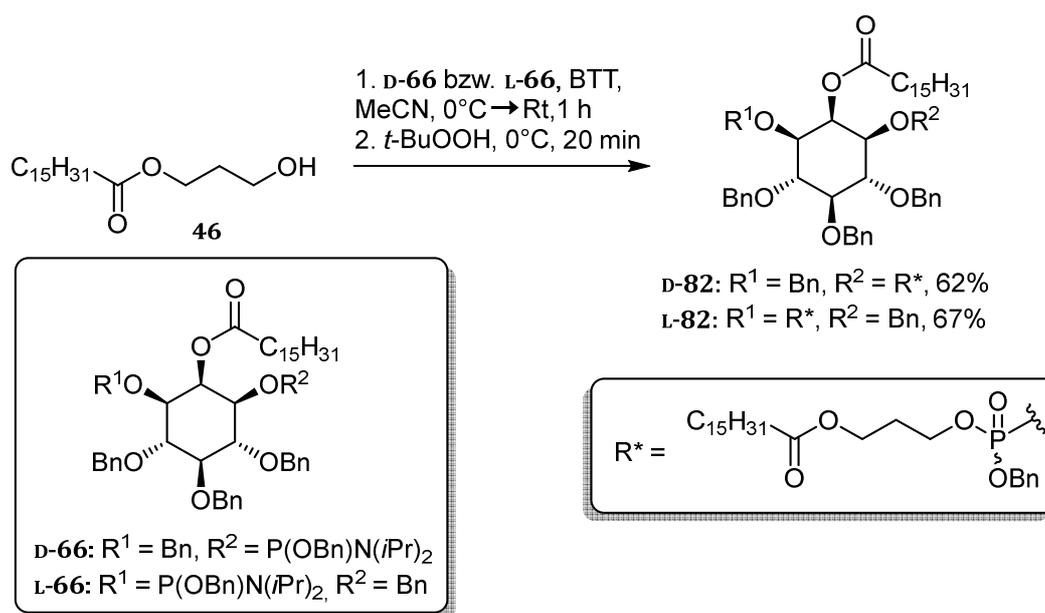
Da, wie in Kap. 6.4 gezeigt, die *sn*-2-OH-Gruppe in der Tat keinen nennenswerten negativen Einfluss auf die Stabilität des CD1d-Ligand-TCR-Komplexes ausübte und sich die immunregulatorischen Aktivitäten der Verbindungen **19a-d** sowie **D-80** und **L-80** nicht gravierend unterschieden, sind die „Generation-II-EhPI-Analoga“ eine lohnenswerte Alternative zu den Generation-I-EhPIs, da sie synthetisch wesentlich einfacher zugänglich sind. Um diesen Einfluss zu überprüfen, sollten somit die beiden Enantiomere **D-80** und **L-80** (**Schema 39**, **Schema 41**) synthetisiert werden. Um die Vergleichbarkeit zu den bereits hergestellten Generation-I-Derivaten zu gewährleisten, wurden die Generation-II-Derivate auch mit einer C<sub>16</sub>-Kette acyliert.

Ausgehend vom 1,3-Propandiol wurde der Ester **46** in Pyridin dargestellt (**Schema 40**). Pyridin fungiert hierbei als Lösungsmittel und Base. Um die Bildung des zweifach substituierten Diesters **81** zu unterdrücken, wurde 1,3-Propandiol in einem dreifachen Überschuss hinzugegeben. Der Diester **81** entstand daher nur in untergeordneter Menge (17%) und konnte durch eine anschließende chromatographische Reinigung leicht abgetrennt werden. Dies ist nicht zuletzt damit zu begründen, dass sich die Retentionszeit des polareren Esters **46** von der des Diesters **81** in einer ausreichenden Form unterschied. Somit konnte das gewünschte Produkt **46** in einer Ausbeute von 80% erhalten werden.

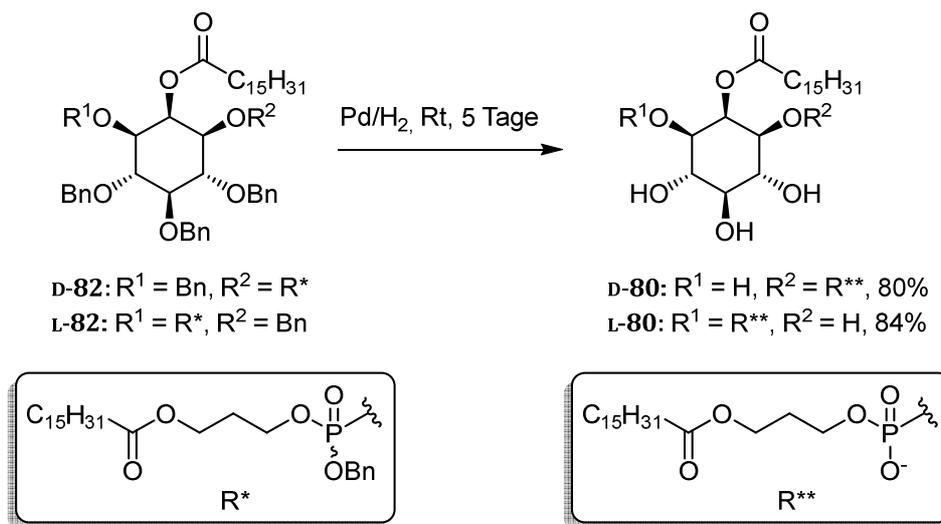


**Schema 40:** Synthese von 3-Hydroxypropylpalmitat **46**.

Die weitere Synthese wurde daraufhin analog zur etablierten Route für die Generation-I-Analoga durchgeführt. Dazu wurden die vollständig geschützten Phosphatriester **D-82** und **L-82** über die etablierte BTT-vermittelte Amidit-Kupplung in Ausbeuten von 67% und 62% hergestellt (**Schema 41**). Parallel hierzu wurde auch die Kupplung mithilfe der *H*-Phosphonatmethode erprobt. Die Ergebnisse hierzu sind in Kap. 6.1.4.1 dargestellt.

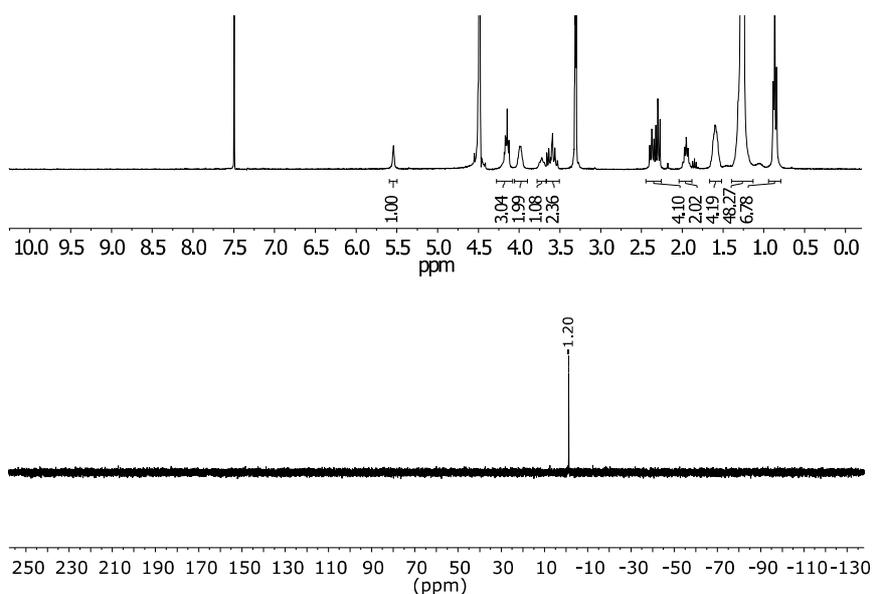


**Schema 41:** Synthese der Phosphatriester **L-82** und **D-82**.



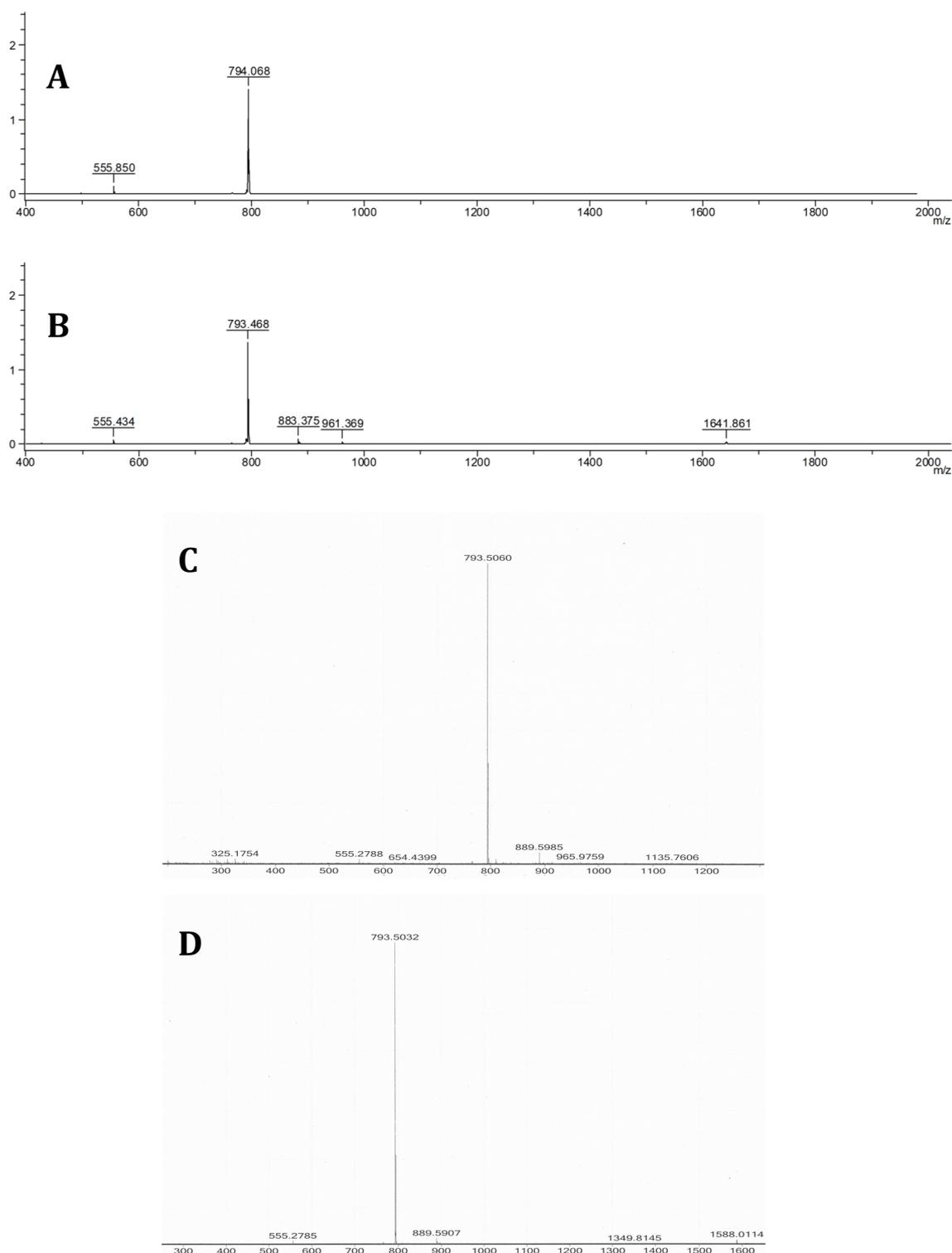
**Schema 42:** Synthese von **D-80** und **L-80**.

Zur Abspaltung der Benzylgruppen wurde auch hier Palladium-black® als Katalysator gewählt und das Reaktionsgemisch unter den bereits aus Kap. 6.1.5 bekannten Bedingungen umgesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Rohgemisch in Dichlormethan/Methanol (2:1, v/v) gelöst und 6 h bei Rt gerührt, um auf der Katalysatoroberfläche zurückgebliebenes Produkt zu extrahieren. Anschließend wurde der Katalysator per Zentrifugation abgetrennt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung über Sephadex® LH-20 in einem Gemisch von Dichlormethan, Methanol und Wasser (2:1:0.2) konnten die Enantiomere **L-80** und **D-80** in Ausbeuten von 84% und 80% synthetisiert werden (**Schema 42**).



**Abb. 53:** NMR-Spektren der Verbindungen **D-80** und **L-80**. **Oben:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **D-80** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}/\text{D}_2\text{O}$ , 10:6:1). **Unten:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von **L-80** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ , 3:1, 512 Scans).

NMR-Spektroskopie konnte nur in sehr geringen Konzentrationen und einem damit einhergehenden niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis (**Abb. 53, oben**) oder mit einer hohen Anzahl an Scans durchgeführt werden (**Abb. 53, unten**). Die Charakterisierung erfolgte daher auch hier bevorzugt über Massenspektrometrie (**Abb. 54**), da auch diese Verbindungen geringe Löslichkeiten in organischen Lösungsmitteln aufwiesen.



**Abb. 54: Oben:** MALDI (neg.)-Massenspektren von **A: L-80**, **B: D-80**. **Unten:** ESI (neg.)-Massenspektren von **C: L-80** und **D: D-80**.

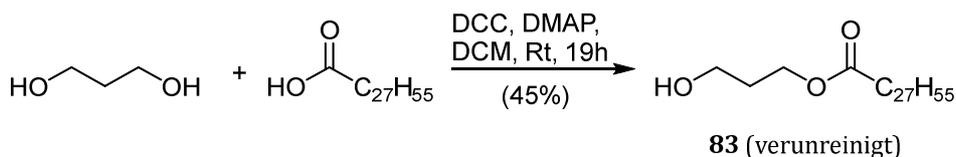
## 6.2.2 Synthese von Generation-II-EhPIb-Derivaten mit anderen Kettenlängen

### 6.2.2.1 Derivate mit einem C<sub>28</sub>-Acylrest

Neben der Synthese von C<sub>16</sub>-Derivaten wurden auch Derivate mit kürzeren und längeren Alkylketten hergestellt. Dies diente unter anderem zur Überprüfung der Variabilität der Syntheseroute. Wie schon in Kap. 4.3 beschrieben, hat die Länge der Alkyl- bzw. Alkenylketten einen Einfluss auf die Bindeaffinität des Liganden zu CD1d und damit auf die Stabilität des gesamten CD1d-Ligand-TCR-Komplexes. Wie Cerundolo et al. *in silico* gezeigt haben, passen Lipide mit der Kombination aus einer C<sub>18</sub>- und einer C<sub>26</sub>-Kette, wie sie im  $\alpha$ -GalCer **1** vorliegt, ideal in die Bindungstaschen A' und F'.<sup>[12]</sup> Aus diesem Grund wurde in Anlehnung an den Naturstoff EhPIb ein Derivat mit einer C<sub>28</sub>-Kette am *pseudo*-Glycerin-Teil sowie einer C<sub>16</sub>-Kette am Inositolbaustein synthetisiert.

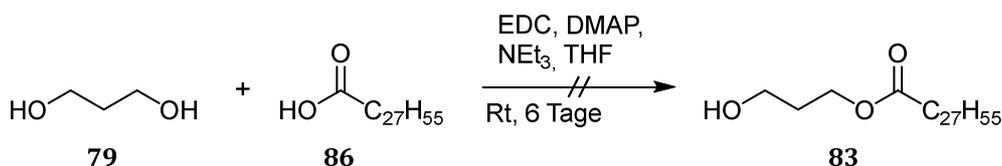
Die Synthese solch langkettiger Verbindungen ist häufig mit einigen Schwierigkeiten verbunden, da deren Vorläufer aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität und ihrer geringen natürlichen Häufigkeit anspruchsvoll in Handhabung und Anschaffung sind. Aiba et al. verwendeten zur Synthese ihres ungesättigten C<sub>30</sub>-Restes im EhPI-Analogen **17** eine Synthesestrategie, die auf einer Grignard-Kupplung eines C<sub>12</sub>- und eines C<sub>18</sub>-Körpers beruht.<sup>[68, 109]</sup> Da in dieser Arbeit jedoch ausschließlich gesättigte Acylreste getestet wurden, wurde Montansäure, welche in kleinen Mengen kommerziell erhältlich war, verwendet. Dazu wurde versucht, diese sowohl mittels einer Steglich-Veresterung an den entsprechenden Glycerinvorläufer anzubringen, als auch über die Einhorn-Variante einer Schotten-Baumann-vermittelten Acylierung unter vorheriger Synthese des entsprechenden Säurechlorids. Zuerst soll jedoch die Steglich-Veresterung beschrieben werden, da das Montansäurechlorid nicht kommerziell erhältlich war und es in Vorstudien zuerst nicht gelungen war, das Säurechlorid der Octacosansäure herzustellen (Kap. 6.1.3).

Octacosansäure wurde dafür in Dichlormethan suspendiert und mit 1,3-Propanediol, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und katalytischen Mengen 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) 18 h lang umgesetzt (**Schema 43**). Dabei fiel ein weißer Feststoff aus, welcher mithilfe von <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie als eine Mischung von **83** und Dicyclohexylharnstoff (DCU) identifiziert werden konnte. Dieser wurde abfiltriert und chromatographisch gereinigt. Es gelang jedoch nicht, das DCU vollständig abzutrennen, weshalb **83** lediglich leicht verunreinigt erhalten werden konnte.

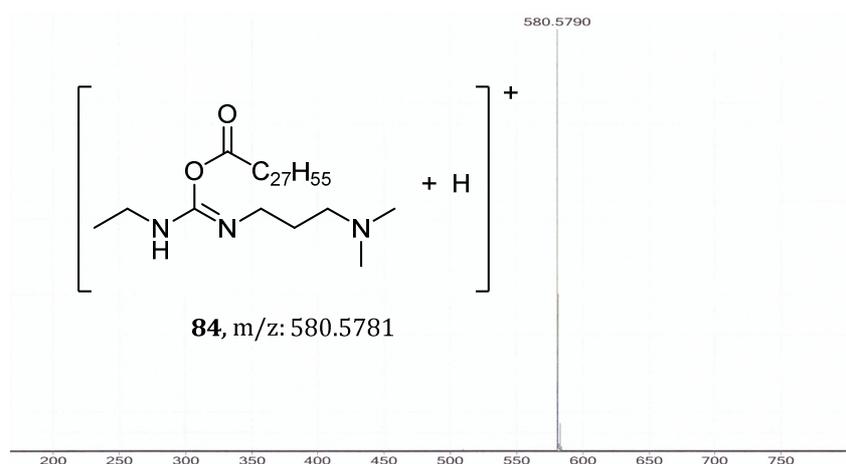


**Schema 43:** Synthese von **83**. Die Ausbeute in Klammern bezieht sich auf das verunreinigte Produkt.

Daher wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) anstelle von DCC für die Acylierung verwendet (**Schema 44**). Als jedoch auch nach sechs Tagen keine Verminderung der 1,3-Propanediol-Konzentration verzeichnet werden konnte, wurde die Reaktion aufgearbeitet und chromatographisch gereinigt. Es konnte jedoch lediglich das EDC-Addukt **84** (**Abb. 55**) in größeren Mengen isoliert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass entweder kein nukleophiler Angriff des 1,3-Propandiols **79** oder eine Eliminierung dessen nach erfolgreicher Addition an das Carbonyl-Kohlenstoffatom stattfand.



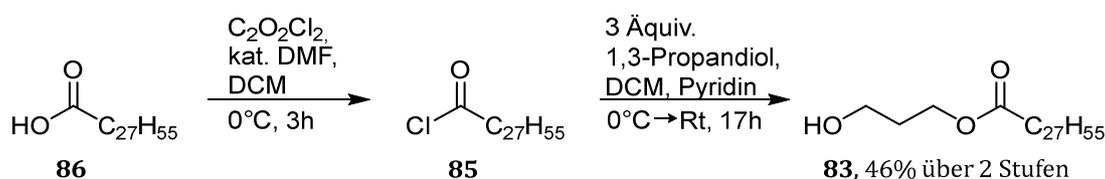
**Schema 44:** Versuch der Synthese von 3-Hydroxypropyloctacosanat **83**.



**Abb. 55:** ESI (pos.)-Massenspektrum, Strukturformel und exakte Masse des EDC-Addukts **84**.

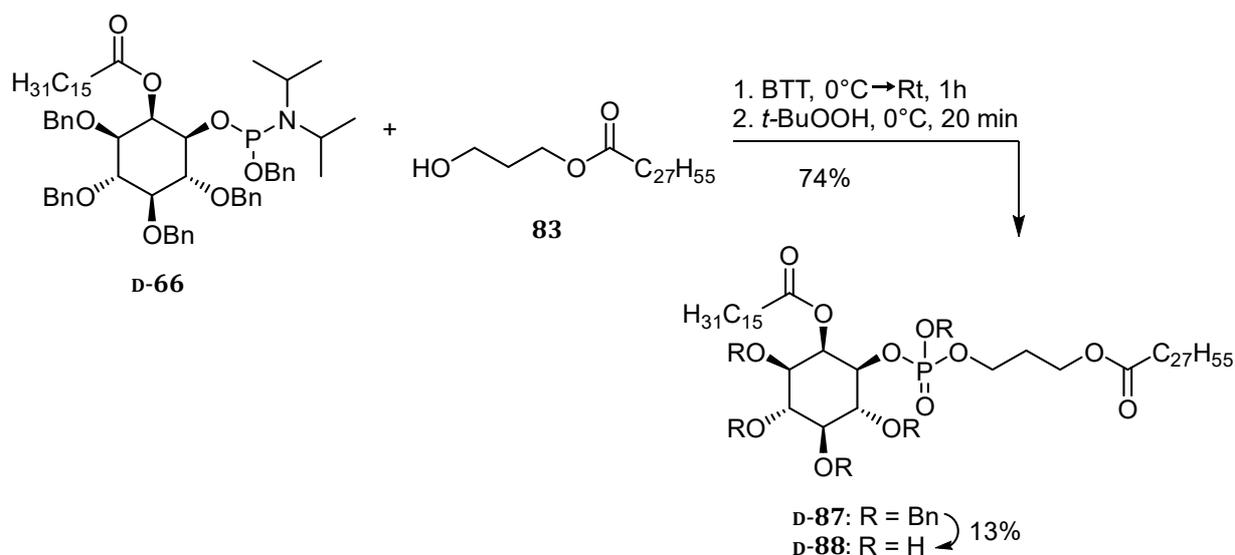
In einem weiteren Durchgang wurde versucht, das Säurechlorid **85** der Octacosansäure **86** herzustellen. Nach einer Vorschrift von Demchenko<sup>[110]</sup> et al. wurde Octacosansäure in Pyridin unter Rückfluss mit Thionylchlorid und einer katalytischen Menge 4-Dimethylaminopyridin

umgesetzt. Allerdings konnte erneut kein Produkt erhalten werden (vgl. Kap. 6.1.3). Aus diesem Grund wurde Octacosansäure mit Oxalylchlorid und einer katalytischen Menge Dimethylformamid in Dichlormethan bei 0°C umgesetzt (**Schema 45**). Nach erfolgreicher Reaktion wurde das erhaltene Säurechlorid **85** wegen seiner Hydrolyseempfindlichkeit direkt im Anschluss mit einem Überschuss von drei Äquivalenten 1,3-Propandiol **79** in Pyridin bei 0°C umgesetzt. Durch den Einsatz des Überschusses konnte bereits eine Disubstitution des äquivalenten C<sub>16</sub>-Derivats vermindert werden (Kap. 6.2.1). Nach erfolgreicher Reaktion konnte 3-Hydroxypropylmontanat **83** schließlich in einer Ausbeute von 46% über zwei Stufen rein erhalten werden (**Schema 45**). Ausbeuteverluste sind durch die Bildung des entsprechenden Diesters sowie durch Verluste während der chromatographischen Reinigung zu erklären, da der Ester **83** eine ähnlich schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aufwies, wie die freie Octacosansäure **86**.



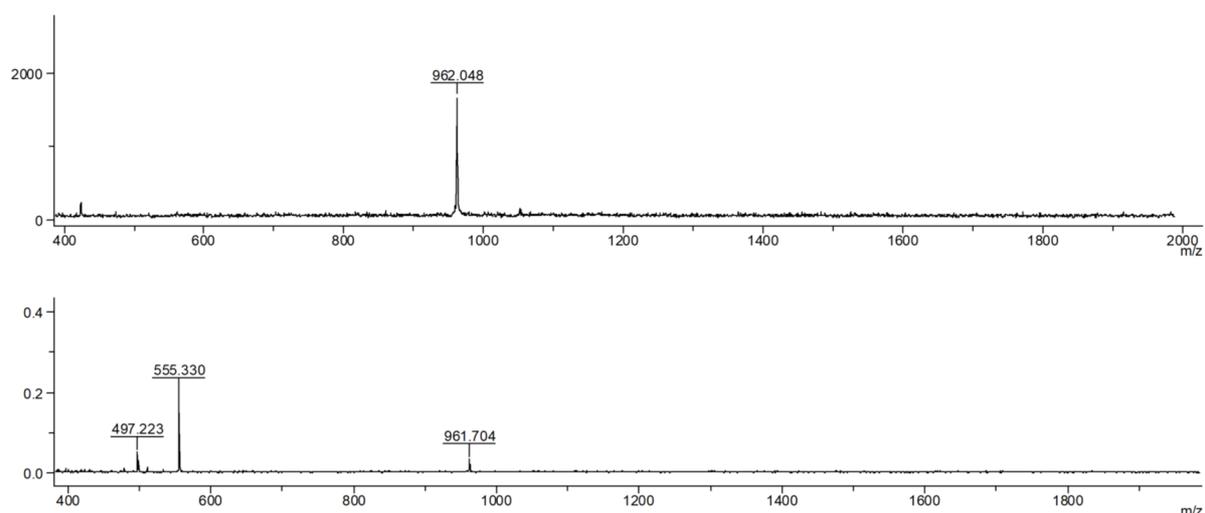
**Schema 45:** Synthese von 3-Hydroxypropylmontanat **83**.

Die folgenden Stufen wurden daraufhin analog zu denen der Generation-I-PIs durchgeführt (Kap. 6.1.4). Da im Zuge der IFN- $\gamma$ -Expressionsassays (Kap. 6.4.3) insbesondere die D-konfigurierten Derivate eine erhöhte Aktivität zeigten, wurde bei der Synthese des C<sub>28</sub>-Derivats diese Konfiguration gewählt. Der Alkohol **83** wurde dazu mit dem Phosphoramidit **D-66** zum vollständig geschützten Phosphatidylinositol **D-87** umgesetzt. Wegen der geringen Löslichkeit des Reaktanden **83** musste jedoch für diese Reaktion anstelle von Acetonitril Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet werden. Dennoch konnte eine gute Ausbeute von 74% erreicht werden (**Schema 46**).



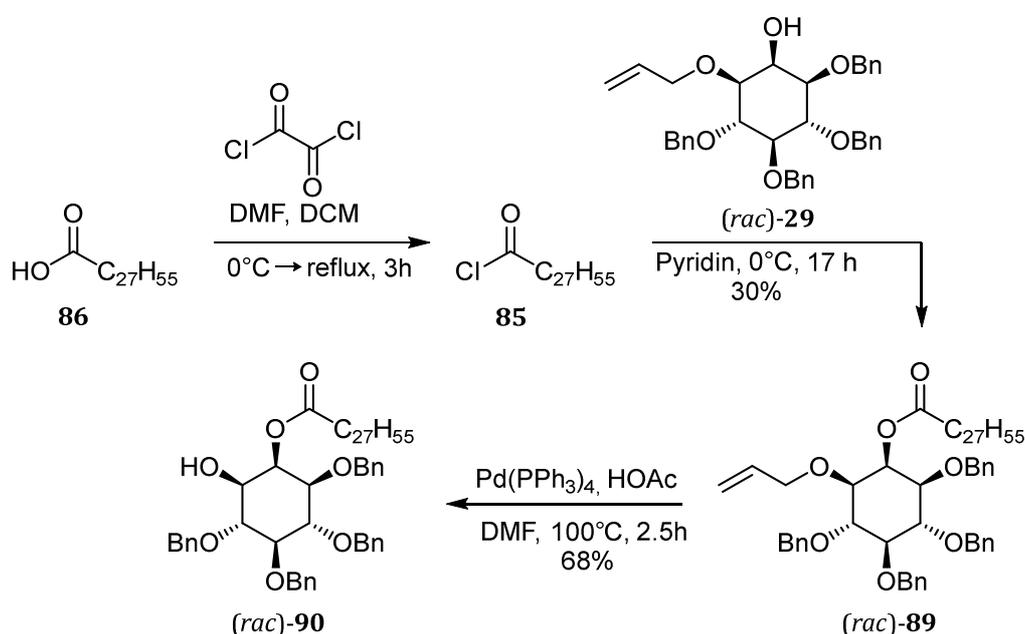
**Schema 46:** Kupplung und Debenzylierung zur Synthese der Verbindungen **D-87** und **D-88**.

Nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzylgruppen unter Verwendung von Palladium-black® (Kap. 6.1.5) konnte das D-konfigurierte Phosphatidylinositol **D-88** in einer Ausbeute von 13% erhalten werden. Die niedrige Ausbeute wird zum einen durch Verluste während der chromatographischen Reinigung aufgrund der schlechten Löslichkeit und zum anderen wegen der Adsorption des Produktes an die Katalysatoroberfläche erklärt. Ein weiterer Grund könnte eine Abspaltung von Octacosanoyl- oder Propylmontanat-Fragmenten gewesen sein. Im Laufe der säulenchromatographischen Reinigung konnten Fraktionen erhalten werden, die auf eine solche Abspaltung schließen ließen (**Abb. 56**).



**Abb. 56:** **Oben:** MALDI (neg.)-Spektrum des D-konfigurierten Phosphatidylinositols **D-88** (Exakte Masse:  $[M-H]^- = 961.711$ ). **Unten:** MALDI (neg.)-Spektrum einer Nebenfraktion bei der Synthese von Phosphatdiester **D-88**, Exakte Massen:  $[M-H]^- = 961.711$ ,  $[M-COC_{27}H_{54}-H]^- = 555.294$ ,  $[M-COC_{27}H_{55}-C_3H_5O-H]^- = 497.252$ .

Durch den Zugang zu Montansäurechlorid **85** wurden somit auch entsprechende C<sub>28</sub>-acylierte *myo*-Inositolen zugänglich. In diesem Zusammenhang wurde der Alkohol (*rac*)-**29** in einer Testreaktion mit dem Säurechlorid **74** umgesetzt, wodurch das C<sub>28</sub>-acylierte *myo*-Inositol (*rac*)-**89** ausgehend von Montansäure **86** in einer Ausbeute von 30% über zwei Stufen synthetisiert werden konnte. In einer weiteren, etablierten Deallylierungsreaktion (Kap. 6.1.2.2) konnte dann der Alkohol (*rac*)-**90** in einer Ausbeute von 68% erhalten werden (**Schema 47**). Ein entsprechendes Phosphatidylinositol wurde jedoch nicht hergestellt.



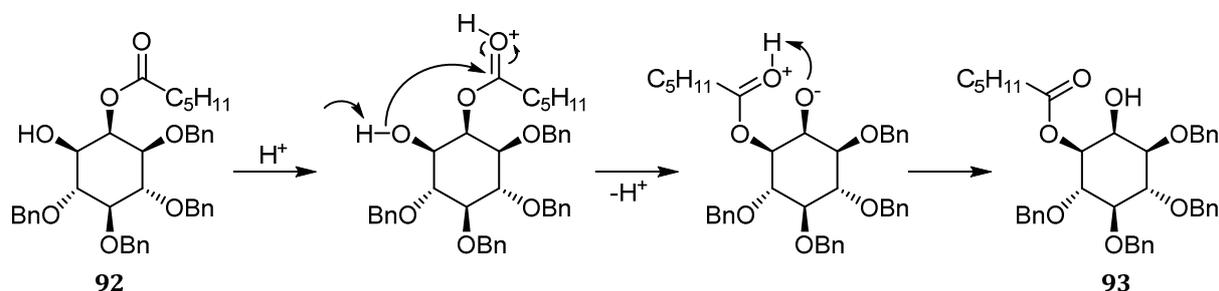
**Schema 47:** Synthese von (*rac*)-**90** ausgehend von Montansäure **86**.

### 6.2.2.2 Derivate mit C<sub>5</sub>- und C<sub>6</sub>-Acylresten

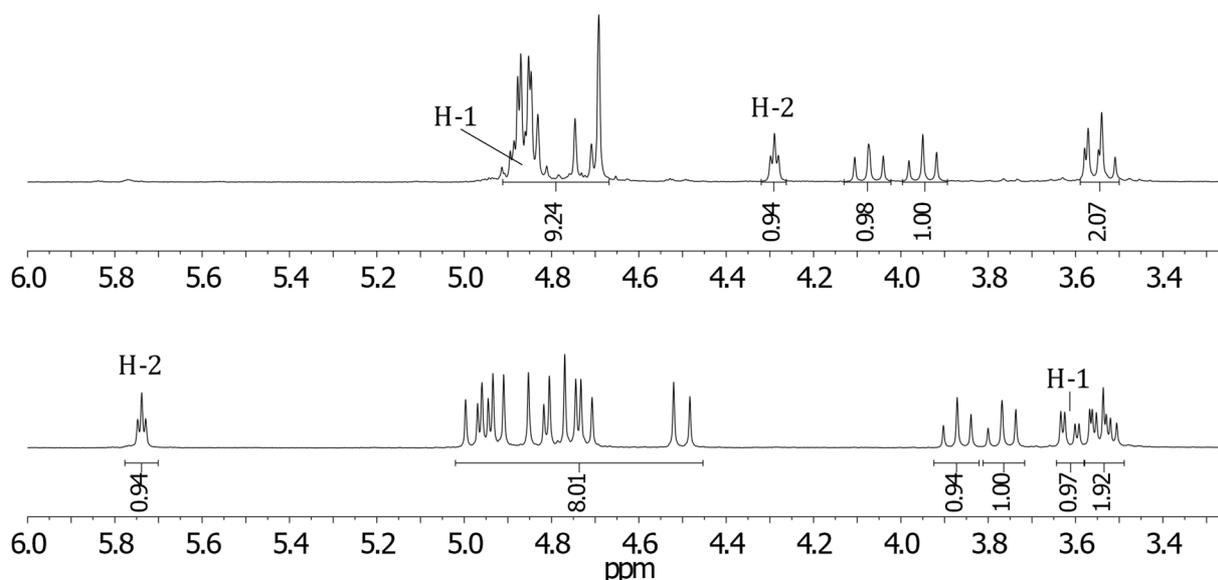
McCarthy et al. untersuchten 2007 den Einfluss der Kettenlänge von Lipidantigenen auf die Bindeaffinität zu CD1d und damit die Stabilität des CD1d-Ligand-Komplexes.<sup>[13]</sup> Sie fanden heraus, dass kürzere Ketten eine niedrigere Bindungsaffinität aufweisen, was eine Verminderung der Zytokinproduktion zur Folge hatte.<sup>[13]</sup> Die auf dem hydrophoben Effekt basierenden Wechselwirkungen zwischen Ligand und CD1d in den Bindungstaschen A' und F' sind hingegen laut McCarthy<sup>[13]</sup> und Cerundolo<sup>[12]</sup> maximal, wenn diese möglichst vollständig ausgefüllt sind, was bei Liganden mit C<sub>26</sub>- und C<sub>18</sub>-Kette der Fall ist. Um den Zusammenhang von kürzeren Alkylketten und einer verringerten Zytokinproduktion von iNKT-Zellen prüfen zu können, sollten daraufhin auch Derivate mit kürzeren Kettenlängen hergestellt werden.

Wie in Kap. 6.1.5 und 6.2.2.1 zu sehen ist, konnten mithilfe massenspektrometrischer Methoden Abspaltungen von Acylresten beobachtet werden. Im Fall des Phosphatidylinositols **80** (Kap. 6.2.2.1) konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem abgespaltenen Rest um den C<sub>28</sub>-Acylrest handelte. Bei den C<sub>16</sub>/C<sub>16</sub>-Derivaten konnte dies nicht mit Gewissheit nachempfunden werden. Aus diesem Grund wurden für die kurzkettigen Analoga verschieden lange Ketten für beide Bausteine gewählt. Am *myo*-Inositol-Teil wurde daher eine C<sub>6</sub>-Kette und am *pseudo*-Glycerin-Teil eine C<sub>5</sub>-Kette eingeführt. So konnte im Fall einer Acylabspaltung massenspektrometrisch ermittelt werden, um welche der beiden Acylgruppen es sich dabei handelt.

Die gewählten Reaktionsbedingungen wurden den bereits etablierten Bedingungen zur Synthese der Generation-I-EhPIs (Kap. 6.1.2.2, 6.1.4 und 6.1.5) und Generation-II-EhPIs (Kap. 6.2.1 und 6.2.2.1) nachempfunden. Dazu wurde der racemische Alkohol (*rac*)-**29** mit Capronsäurechlorid über Nacht in Pyridin umgesetzt, was das hexanoylierte *myo*-Inositol (*rac*)-**91** in einer Ausbeute von 52% ergab (**Schema 48**). Zur Deallylierung wurden die optimierten Reaktionsbedingungen mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in Essigsäure verwendet. Nach chromatographischer Reinigung konnte der gewünschte Alkohol (*rac*)-**92** in einer Ausbeute von 74% erhalten werden. Auffällig war hierbei, dass eine Acylgruppenwanderung der 2-*O*-Hexanoylgruppe zur 1-*O*-Position beobachtet wurde (**Abb. 57**, **Abb. 58**), welche bei den Derivaten mit längeren Kettenlängen nicht beobachtet werden konnte. Diese musste säurekatalysiert abgelaufen sein, da das Rohgemisch zu keiner Zeit einem basischen Milieu ausgesetzt war. Das zu 16% entstandene unerwünschte 1-*O*-Regioisomer **93** konnte aber leicht chromatographisch abgespalten werden. Ein Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der beiden Verbindungen ist in **Abb. 58** dargestellt.

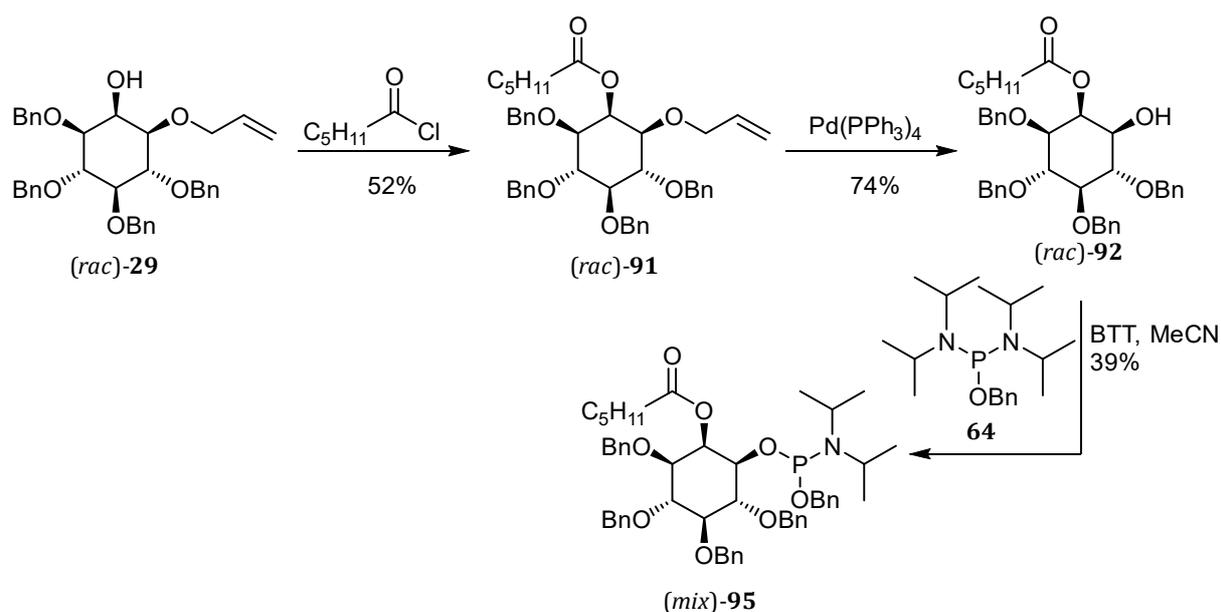


**Abb. 57:** Mechanismus im Fall einer säurekatalysierten Acylgruppenwanderung. Dargestellt als D-Enantiomer.



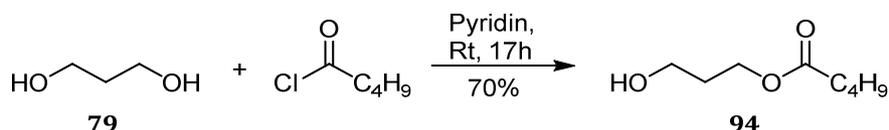
**Abb. 58:**  $^1\text{H-NMR}$ -Vergleich der beiden erhaltenen Verbindungen nach der Deallylierung von **91**. **Oben:** 1-*O*-acyliertes *myo*-Inositol **93**, erhalten durch unerwünschte Acyl-Migration. **Unten:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 2-*O*-acylierten *myo*-Inositols **92**.

Analog zu den Bedingungen, die bei vorherigen Kupplungsstudien erprobt worden sind, wurde die Kupplung über das Phosphoramidit des *myo*-Inositol-Bausteins **95** realisiert. Dazu wurde der zuvor erhaltene Alkohol **92** mit dem Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **64** in Acetonitril unter Säurekatalyse umgesetzt, wobei das Phosphoramidit (*mix*)-**95** mit einer Ausbeute von 39% erhalten werden konnte (**Schema 48**).



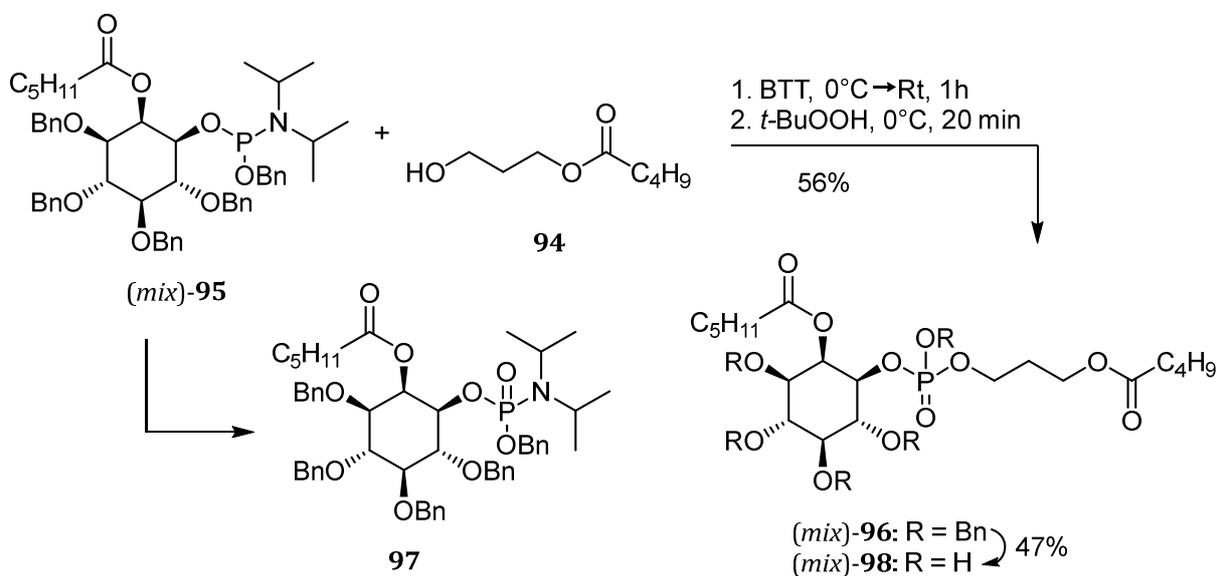
**Schema 48:** Synthese von Phosphoramidit **95**.

Zur Darstellung von 3-Hydroxypropylvaleriat **94** wurde Valerylchlorid mit einem dreifachen Überschuss an 1,3-Propanediol **79** bei Rt über Nacht in Pyridin umgesetzt (**Schema 49**). Der erwünschte Ester konnte mittels Säulenchromatographie über Kieselgel vom doppelt substituierten Nebenprodukt abgetrennt und mit einer Ausbeute von 70% erhalten werden.



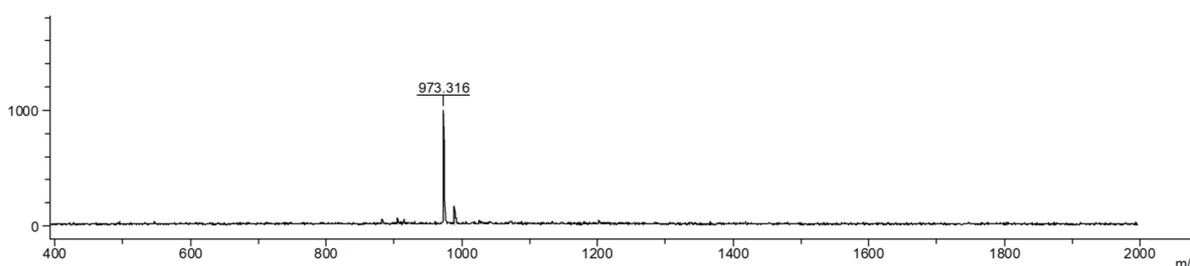
**Schema 49:** Synthese von 3-Hydroxypropylvaleriat **94**.

Die Kupplung zum Phosphatriester **96** wurde auch unter bekannten Reaktionsbedingungen (Kap. 6.1.4.2.5) durchgeführt. Das Phosphoramidit **95** und das 3-Hydroxypropylvaleriat **94** wurden zunächst in Acetonitril gelöst und anschließend bei 0°C mit dem BTT-Aktivator versetzt. Nach sukzessiver Zugabe von insgesamt 1.1 Äquivalenten bei 0°C wurde die Reaktionslösung für 1.5 h gerührt und schließlich die Oxidation des entstandenen Phosphits zum Phosphat durch Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid herbeigeführt.



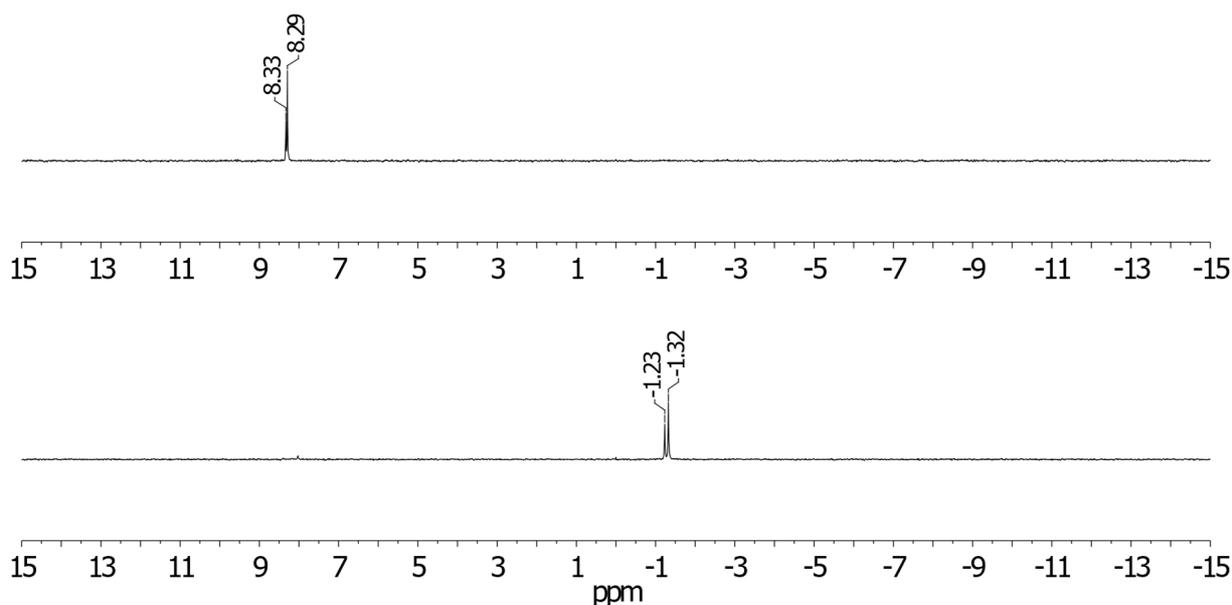
**Schema 50:** Synthese des Phosphatdiesters **98** über den Phosphatriester **96**. Als Nebenprodukt entstand dabei Phosphoramidat **97**.

Nach weiteren 20 min. Reaktionszeit wurde die Reaktion beendet und aufgearbeitet. Wie auch bei den analogen Reaktionen mit längeren Acylketten, war eine Detektion des Produktsignals auf der DC per UV-Detektion und Anfärbung mit Hanessian's Stain kaum möglich, was eine chromatographische Reinigung erschwerte. Eine erfolgreiche Detektion erfolgte daher größtenteils per MALDI-Massenspektrometrie (**Abb. 59**). Auf diese Weise konnte der gewünschte Phosphattriester mit einer Ausbeute von 56% erhalten werden (**Schema 50**). Die Ausbeuteverluste sind hauptsächlich auf die Bildung von Phosphoramidat **97** zurückzuführen, welches während der Reaktion entstand und mit Hilfe säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel abgetrennt werden konnte (**Abb. 60**).



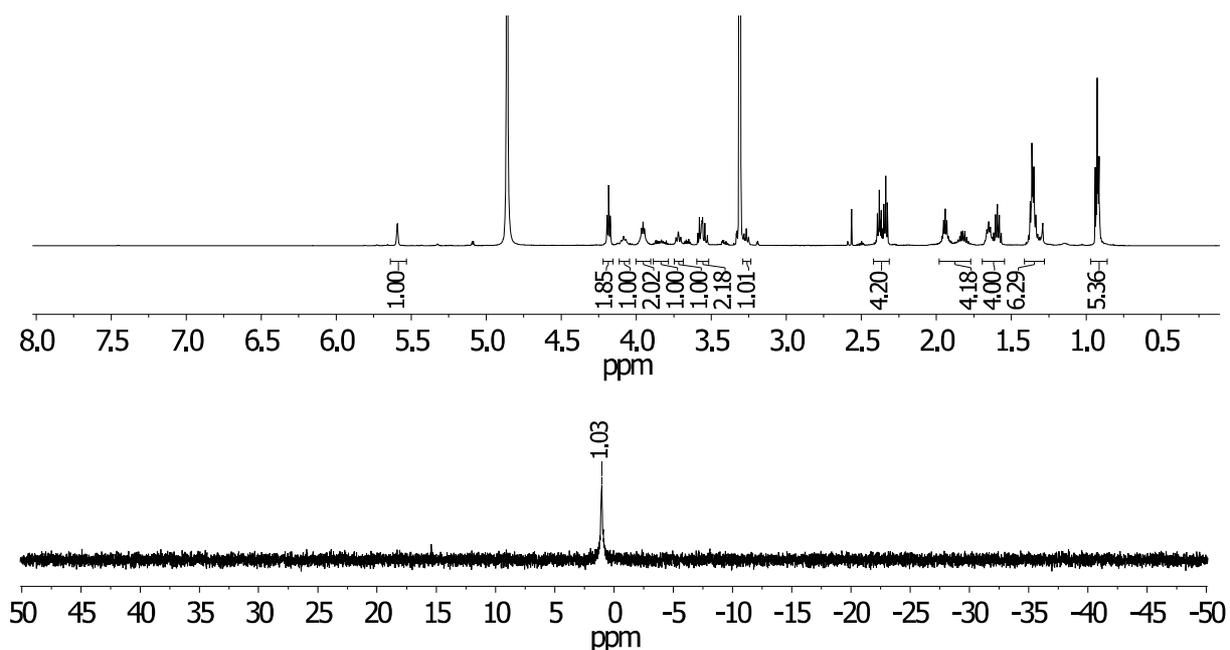
**Abb. 59:** MALDI (pos.)-Spektrum von Phosphattriester **96** (Exakte Masse: 973.426 [M+Na]<sup>+</sup>).

Zur vollständigen Abspaltung aller im Molekül befindlichen Benzylgruppen wurde der vollständig geschützte Phosphattriester in Tetrahydrofuran unter einer Stickstoffatmosphäre und Palladium-Katalyse umgesetzt (**Schema 50**). Durch eine Reaktionskontrolle mittels MALDI-Massenspektrometrie konnte festgestellt werden, dass die hydrogenolytische Spaltung der kurzkettigen Derivate im Vergleich zu den längerkettigen Derivaten deutlich langsamer verlief. Anstatt einer Reaktionszeit von drei bis sechs Tagen, dauerte es bis zur vollständigen Debenzylierung von **96** zehn Tage.



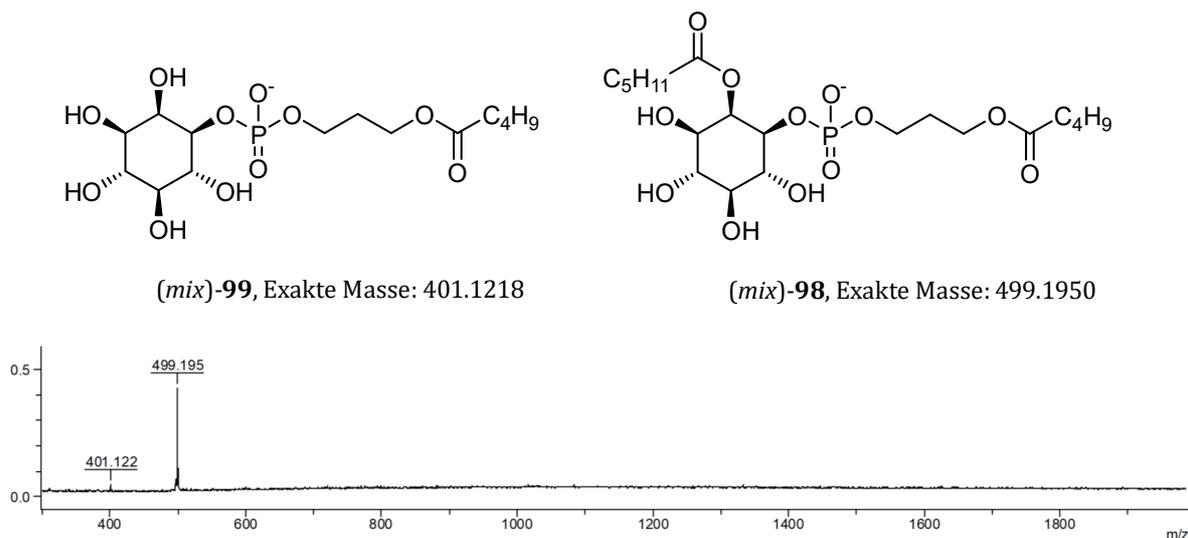
**Abb. 60:** Oben:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Phosphoramidats **97**. Unten:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Produkts (*mix*)-**96**.

Aufgrund der kürzeren Alkylketten und der damit einhergehenden niedrigeren Lipophilie konnte der Katalysator durch Filtration über RP-18-Kieselgel entfernt werden. Aus demselben Grund war auch eine Lösung des Rohprodukts in Tetrahydrofuran und Methanol möglich. Mithilfe von Sephadex-Säulenchromatographie konnte das erwünschte Phosphatidylinositol **98** mit einer Ausbeute von 47% erhalten werden (**Schema 50**).



**Abb. 61:** NMR-Spektren von (*mix*)-**98**. Oben:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (600 MHz). Unten:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum (254 MHz).

Bei der Analyse des Zielmoleküls fiel auf, dass das Signal im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum trotz einer relativ hohen Messfrequenz von 254 MHz sehr breit war (**Abb. 61**). Es ist daher davon auszugehen, dass die kurzkettigen Derivate eine größere Tendenz zur Aggregation haben. Dies ist verwunderlich, da eigentlich eine Abnahme des Mizellencharakters zu erwarten gewesen wäre. Weiterhin konnte per MALDI-Massenspektrometrie ein Fragment nachgewiesen werden, welches dem deacylierten Pentol **99** (**Abb. 62**) zugeordnet werden konnte. Es hat somit eine Deacylierung des inositolgebundenen Acylrests stattgefunden.



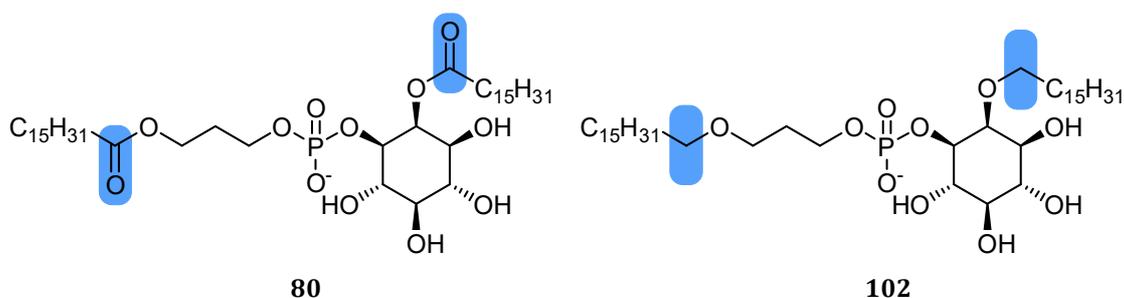
**Abb. 62:** MALDI (neg.)-Spektrum von (mix)-98 mit deacyliertem Pentol 99.

### 6.3 Synthese von Generation-III-EhPIb-Analoga

Ester-Verbindungen sind unter basischen oder sauren Bedingungen hydrolyselabil. So kann eine Acylgruppen-Migration auftreten (Kap. 6.1.2.3, 6.2.2.2) oder eine Abspaltung (Kap. 6.1.5, 6.2.2.2). Auch Esterasen, die in Organismen beinahe allgegenwärtig sind, katalysieren die Verseifung und führen somit in Organismen zu einem schnellen Abbau von beispielsweise Carbon- und Phosphorsäureestern.

Ether-Verbindungen sind sowohl in chemischen als auch in natürlichen Systemen wesentlich stabiler.<sup>[111]</sup> Eine Etherspaltung gelingt einzelfallabhängig nur unter relativ harschen, enzym- oder katalysatorgestützten Reaktionsbedingungen. In **Abb. 63** sind die strukturellen Unterschiede zwischen dem Ester **80** und dem Ether **102** dargestellt.

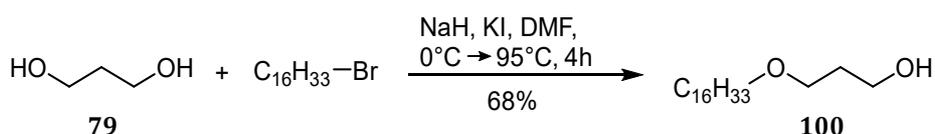
Die Ester **19a-d**, **D-80**, **L-80**, **D-88** und (*mix*)-**98** zeigten nach ihrer Synthese eine gewisse Hydrolyseempfindlichkeit. Aus diesem Grund sollte eine weitere Generation von EhPIs synthetisiert werden, die anstatt der beiden langkettigen Acylfunktionen Alkyletherfunktionen tragen sollten. Diese als Generation-III-PIs bezeichneten EhPI-Analoga wurden daraufhin auf ihre Aktivität und ihre Stabilität hin untersucht. Die Ergebnisse des folgenden Kapitels sind in Zusammenarbeit mit Julian Witt im Zuge seiner Bachelorarbeit erarbeitet worden.



**Abb. 63:** Vergleich des Generation-II-EhPIs **80** mit dem Generation-III-EhPI **102** mit L-konfiguriertem *myo*-Inositol dargestellt.

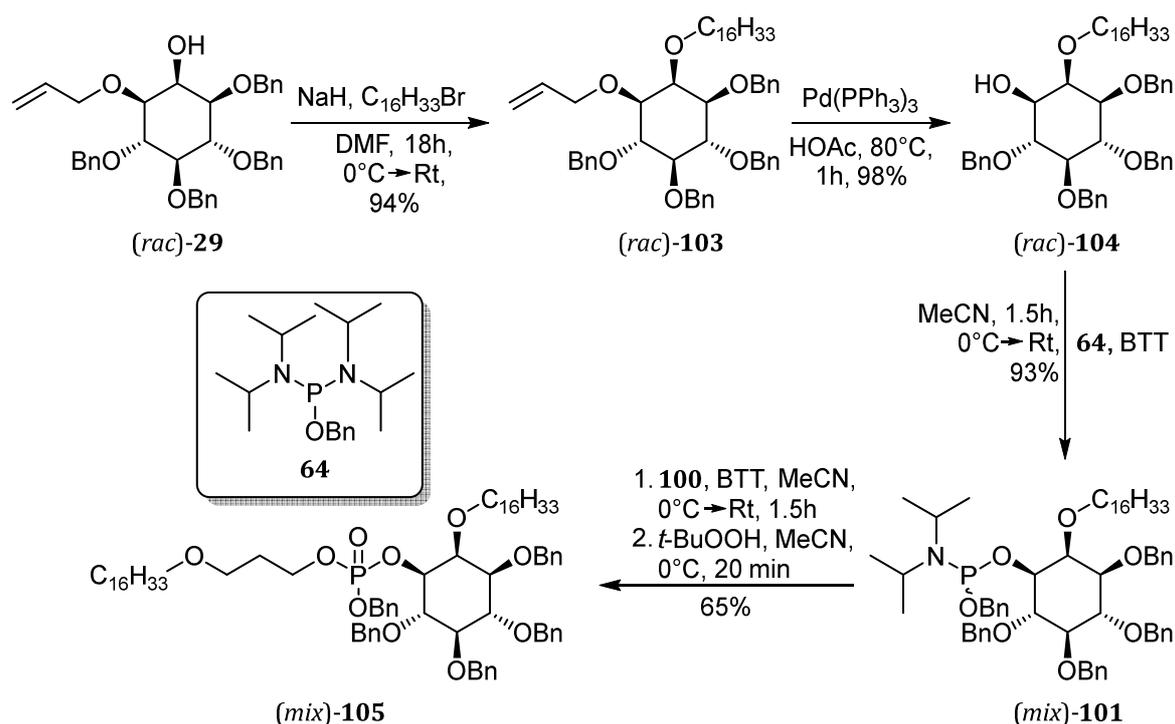
### 6.3.1 Synthese der Vorläufer **100** und **101** und Kupplung zum Dialkyl-EhPI **102**

Zunächst sollte der 3-Hydroxypropylhexadecylether **100** hergestellt werden. Dies wurde nach einer veränderten Vorschrift von Yamano et al. durchgeführt.<sup>[112]</sup> Dazu wurde ein Überschuss von 4.5 Äquivalenten 1,3-Propandiol **79** mit einem Äquivalent Hexadecylbromid im Sinne einer Williamson'schen Ethersynthese in Dimethylformamid umgesetzt. Vor der Zugabe des Alkylbromids wurde zur Erhöhung der Nukleophilie des Sauerstoffatoms die Hydroxyfunktion zuerst mit Natriumhydrid deprotoniert. Nach der Zugabe von Hexadecylbromid und eines Äquivalents Kaliumiodid fand zudem eine Halogenaustauschreaktion statt, welche *in-situ* ein entsprechendes Alkylidiodid aus dem Bromid generierte. Die dadurch verbesserte Abgangsgruppeneigenschaft des Halogenids ermöglichte eine schnellere Substitution. Nach einer Reaktionszeit von vier Stunden bei 95°C und einer wässrigen Aufarbeitung zur Entfernung des entstandenen Bromidsalzes konnte der monosubstituierte Hexadecylether **100** schließlich in einer Ausbeute von 68% erhalten werden (**Schema 51**).



**Schema 51:** Synthese von 3-Hydroxypropyl-hexadecylether **100**.

Zur Herstellung des *myo*-Inositol-Vorläufers wurde nach einer veränderten Vorschrift von Crossman et al. ausgehend vom racemischen Allylether (*rac*)-**29** zunächst ähnlich wie bei der vorangegangenen Reaktion die freie Hydroxyfunktion mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend die 2-*O*-Position des *myo*-Inositols alkyliert.<sup>[113]</sup> Dazu wurde das *myo*-Inositol (*rac*)-**29** mit einem zweifachen Überschuss Hexadecylbromid umgesetzt. Nach der Aufarbeitung und Reinigung wurde das 2-*O*-alkylierte Inositol (*rac*)-**103** erhalten. Die Ausbeute lag mit 94% etwas über der Literatursausbeute von 88% (**Schema 52**).



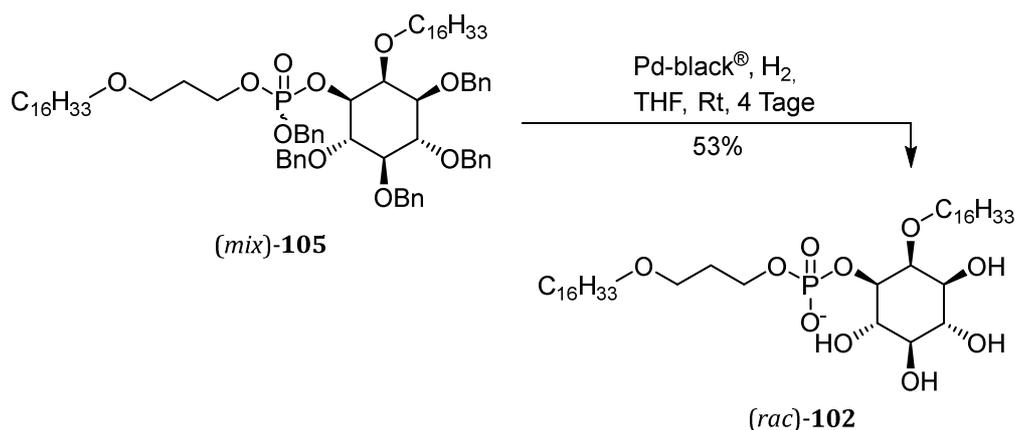
**Schema 52:** Synthese des vollständig geschützten Generation-III-EhPI-Analogons (*mix*)-**105** mit vorheriger Synthese der Verbindungen (*rac*)-**103**, (*rac*)-**104** und (*mix*)-**101**.

Als nächster Schritt wurde die Allyl-Schutzgruppe mit Hilfe von Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) abgespalten. In Kap. 6.1.2.2 ist beschrieben, dass ein Teil des 2-*O*-acylierten *myo*-Inositols unter den relativ harschen Bedingungen verseift wurde, was einen negativen Einfluss auf die Ausbeute hatte. Im Fall des 2-*O*-alkylierten Ether-Analogons war dies nicht der Fall. Aus diesem Grund konnte bei gleicher Reaktionsführung der Alkohol (*rac*)-**104** mit einer Ausbeute von 98% erhalten werden, was einen ersten Hinweis darauf gab, dass die Etherfunktionalisierten Analoga eine wesentlich höhere Hydrolysestabilität besitzen.

Ausgehend vom Alkohol (*rac*)-**104** wurde daraufhin gemäß der etablierten Methode zur säurekatalysierten Synthese von *myo*-Inositol-Phosphoramiditen (Kap. 6.1.4.2.4) der Vorläufer (*mix*)-**101** synthetisiert. Dabei wurde das Benzyloxy-bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **64** verwendet, dessen Synthese bereits dargestellt wurde. So konnte das

Phosphoramidit **101** in einer guten Ausbeute von 93% erhalten werden, was eine Ausbeutensteigerung von 15-20% gegenüber den 2-*O*-acylierten *myo*-Inositol-Bausteinen darstellt. Es wird davon ausgegangen, dass die Stabilität der Etherverbindung den positiven Einfluss auf die Ausbeute ausübte.

Nach der Synthese der Bausteine **100** und **101** konnte die Kupplung und Oxidation zum Phosphatriester (*mix*)-**105** durchgeführt werden. Dazu wurden die Reaktanden in Acetonitril gelöst, unter sukzessiver BTT-Zugabe gekuppelt und anschließend mit *tert*-Butylhydroperoxid bei 0°C oxidiert (**Schema 52**). Die Ausbeute von 65% ist verglichen mit den erreichten Ausbeuten der acylierten Derivate als überdurchschnittlich gute Ausbeute zu werten. Der Einfluss der Etherfunktionen auf die Ausbeute war bei dieser Reaktion jedoch nicht ausschlaggebend, da die Reaktionsbedingungen ohnehin milde waren und Ausbeuteeinbußen lediglich durch die Oxidation des Phosphoramidits und die damit einhergehende Bildung eines Phosphoramidats hervorgerufen wurden.

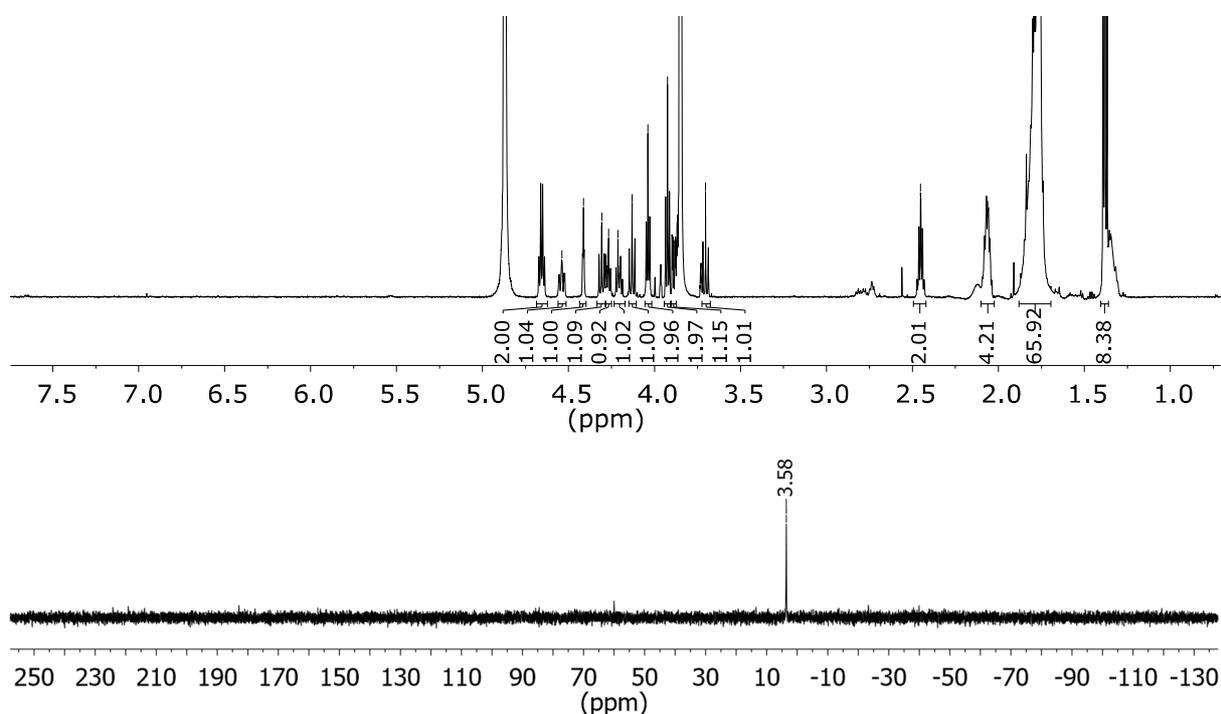


**Schema 53:** Synthese des Generation-III-EhPI-Analogs (*rac*)-**102**.

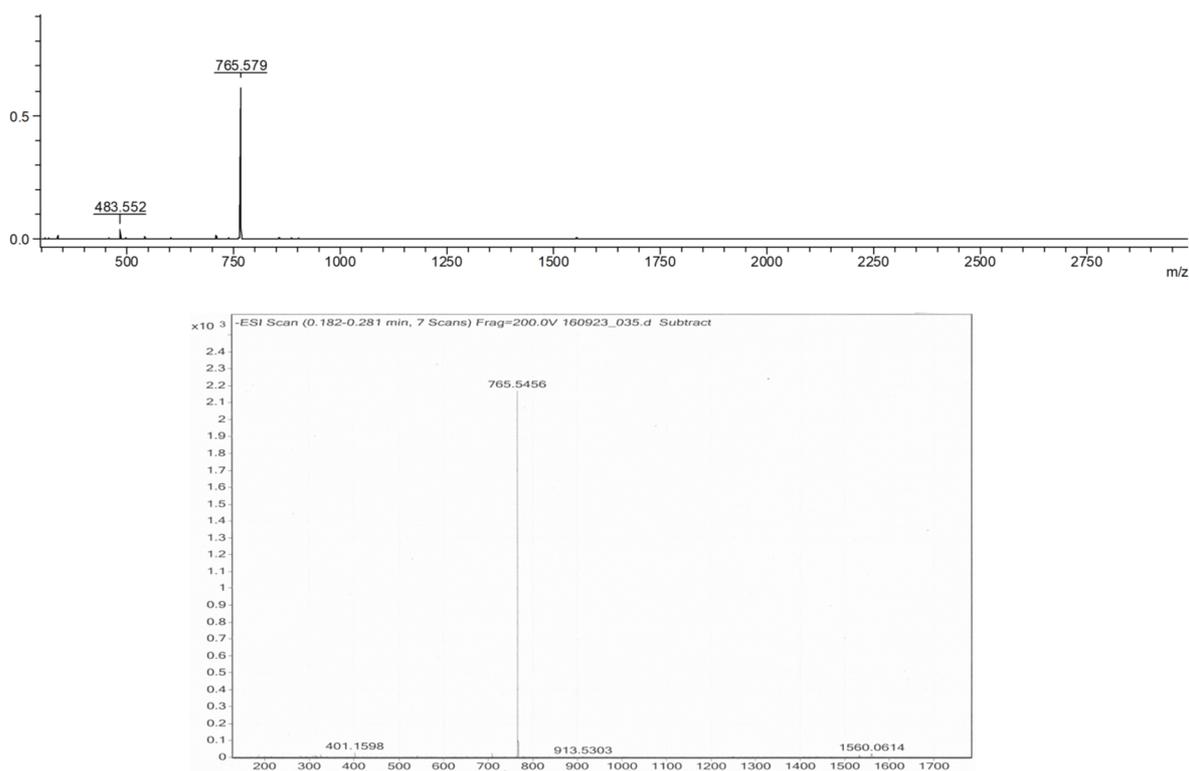
Der vollständig geschützte Phosphatriester (*mix*)-**105** wurde daraufhin zur Entfernung sämtlicher Benzylgruppen unter den bereits etablierten Reaktionsbedingungen umgesetzt und mit den Aufarbeitungsschritten der bereits bekannten Generation-I-EhPI-Syntheseroute aufgearbeitet und gereinigt. So wurde der vollständig geschützte Phosphatriester **105** mit Palladium-black® vier Tage in Tetrahydrofuran unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Palladium-Katalysator wurde durch Filtration entfernt und der Rückstand für 17 h mit einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch (2:1) extrahiert, um auf der Oberfläche adsorbierte Produktmoleküle in Lösung zu bekommen. Das erhaltene Rohprodukt wurde nach bekannten Bedingungen über Sephadex® säulenchromatographisch gereinigt. Hiernach konnte das gewünschte Produkt (*rac*)-**102** in einer Ausbeute von 53% als weißer Feststoff erhalten

werden (**Schema 53**). Diese etwa 10% unter der vergleichbaren Synthese des Esterderivats **19b** liegende Ausbeute kann auf die Adsorptionsproblematik des Palladiums zurückgeführt werden, welche in Kapitel 6.1.5 näher beschrieben ist. Ein weiterer Aspekt ist, dass der Phosphattriester **105** verglichen mit den acylierten Verbindungen **20a-d** sowie **L-82** und **D-82** eine noch geringere Löslichkeit in allen getesteten organischen Lösungsmitteln und Gemischen aufwies. Bei der Extraktion des Rohproduktes von der Katalysatoroberfläche könnte dies einen Unterschied gemacht haben.

Trotz der schlechten Löslichkeit der Verbindung konnten ein aufgelöstes  $^1\text{H}$ -NMR- und ein  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum aufgenommen werden (**Abb. 64**). Trotz eines racemischen *myo*-Inositol-Grundkörpers kann im Spektrum lediglich ein Signal beobachtet werden, da es sich bei den Verbindungen nicht um Diastereomere wie bei den Generation-I-Analoga, sondern um Enantiomere handelt. Im MALDI (neg.)-Spektrum konnte ein Zerfallsprodukt des Zielmoleküls ( $m/z = 483.552$ ) identifiziert werden, welches auf eine Spaltung des Phosphatesters zurückzuführen ist. Im ESI (neg.)-Spektrum konnte dieses Fragment nicht beobachtet werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Fragmentierung während der Aufnahme des MALDI-Massenspektrums erfolgte (**Abb. 65**).



**Abb. 64:** NMR-Spektren der Zielverbindung (*rac*)-**102** in  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}/\text{D}_2\text{O}$ . **Oben:**  $^1\text{H}$ -600 MHz-NMR-Spektrum. **Unten:**  $^{31}\text{P}$ -243 MHz-NMR-Spektrum.



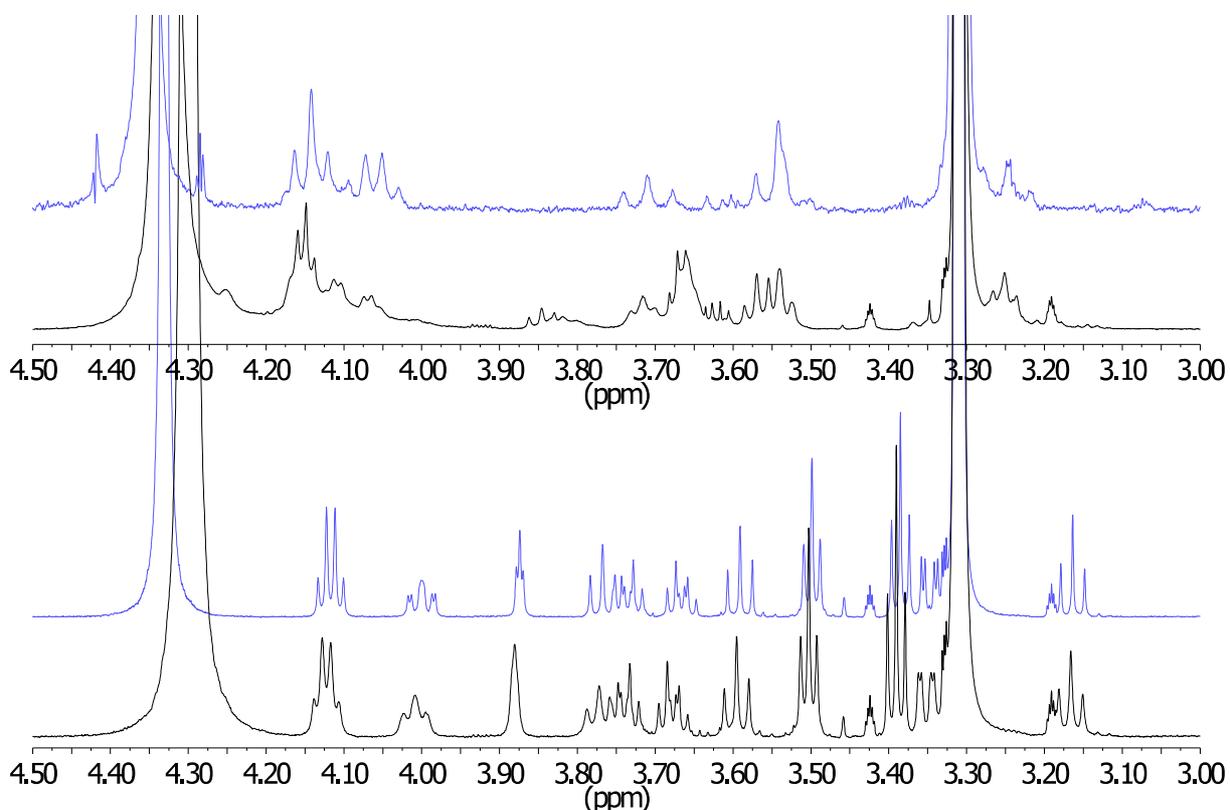
**Abb. 65:** Massenspektren von Verbindung **102** ( $m/z = 765.5651$ ). **Oben:** MALDI (neg.)-Spektrum, Fragmentsignal bei  $m/z = 483.552$  vermutlich *myo*-Inositol-Phosphat ( $m/z = 483.2728$ ), **Unten:** ESI (neg.)-Spektrum.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die dialkylierte Zielverbindung **102** erfolgreich mit einer Ausbeute von 30% ausgehend von Allylether **29** über fünf Stufen, bzw. mit 11% ausgehend von *myo*-Inositol über neun Stufen (längste Route) synthetisiert werden konnte, wobei nur drei der neun Stufen Ausbeuten von unter 85% aufwiesen. Lediglich die bekanntlich schlechte Isopropylidenierung sowie die Debenzylierung lagen bei 48% bzw. 53%. Die mäßigen 65% Ausbeute bei der Kupplung über das Amidit **101** mit anschließender Oxidation sind durch die bereits beschriebene Bildung des Amidats zu erklären, die auch bei den Diacyl-Derivaten auftrat. Zwar wies die Verbindung **102** eine noch schlechtere Löslichkeit auf, als die synthetisierten Diacylderivate **21a** und **21b**, dennoch konnten nach Einführung der Ethergruppen höhere oder gleichhohe Ausbeuten bei den Folgestufen beobachtet werden, die wahrscheinlich auf eine höhere Stabilität der Dialkylverbindungen zurückzuführen sind. Weiterhin sollte die synthetisierte Verbindung **102** Derivate auch eine höhere Haltbarkeit und Hydrolysestabilität aufweisen.

### 6.3.2 Evaluierung der Hydrolysestabilität von Generation-III-EhPIb-Analoga

Im Gegensatz zu Estern zeigen Ether eine geringere Anfälligkeit gegenüber Hydrolyse, chemischer oder enzymatischer Abbaureaktionen und Metabolisierung. Daher wurden die Generation-III-EhPIs synthetisiert, die statt Acylgruppen Alkylgruppen an der 2-Position des *myo*-Inositols und an der terminalen OH-Gruppe des *pseudo*-Glycerins tragen. Um die Stabilitäten der Verbindungen direkt vergleichen zu können, wurden das Dialkyl-PI **102** und das Diacyl-PI **D-80** zehn Tage in einem Chloroform-Methanol-Gemisch bei 37°C an der Luft gelagert. Anschließend wurden die Proben NMR-spektroskopisch mit dem Ursprungszustand verglichen. Der Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren ist in **Abb. 66** dargestellt. Der wichtigste Bereich im NMR-Spektrum der PIs ist der Bereich von 3.0 ppm bis 4.5 ppm, da sich hier die relevanten Signale von *myo*-Inositol und *pseudo*-Glycerin befinden. Bei den Diacyl-Derivaten befindet sich oberhalb von 4.5 ppm noch das H-2-Signal, das bei den Dialkyl-Derivaten bei ca. 3.9 ppm zu finden ist.

**Abb. 66** kann entnommen werden, dass im Fall der Dialkylverbindung **102** nach zehn Tagen kaum Unterschiede erkennbar waren, während bei den Diacylverbindungen nach zehn Tagen eine Veränderung im Bereich von 3.4 ppm bis 4.2 ppm beobachtet werden konnte. Bei ca. 3.55 ppm, um 3.65 ppm und bei ca. 3.85 ppm sind neue Signale unbekannter Spaltprodukte erkennbar.



**Abb. 66:** <sup>1</sup>H-NMR-Vergleich zur Hydrolysestabilität der Dialkyl-EhPIs bei 37°C in Chloroform/Methanol/Wasser (2:1:0.2) im Bereich von 3.0 ppm bis 4.5 ppm. **Oben:** Ester **D-80** frisch (blau) und nach 10 Tagen (schwarz). **Unten:** Zielmolekül **102** frisch (blau) und nach 10 Tagen (schwarz).

### 6.3.3 Versuch der Synthese wasserlöslicher EhPIb-Analoga

Wie in den Kapiteln 6.1.5, 6.2.2 und 6.3.1 beschrieben, wiesen sämtliche synthetisierten PIs niedrige Löslichkeiten in beinahe allen organischen und anorganischen Lösungsmitteln auf. Getestet wurden Chloroform, Dichlormethan, Methanol, Ethanol, Acetonitril, *N,N*-Dimethylformamid, Benzol, Toluol, 1,4-Dioxan, Ethylacetat und Tetrahydrofuran. Lediglich in einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (2:1) waren die Substanzen schwach löslich, in Pyridin sogar recht gut. In Wasser und Dimethylsulfoxid konnte auch eine sehr geringe Löslichkeit festgestellt werden. Wegen seiner Basizität war Pyridin jedoch auch ein ungeeignetes Lösungsmittel. Die schlechten Löslichkeiten in polaren sowie unpolaren Lösungsmitteln sind vermutlich durch die Amphiphilie der Verbindungen zu erklären. Die negative Ladung am Phosphatsauerstoff bildet mit den freien Hydroxygruppen am Inositol- und Glycerin-Baustein eine Art polaren Kopf, während die Alkylketten (zwischen 5 und 28 Kohlenstoffatomen Länge) an der 2-*O*-Position des Inositols und am Glycerin ein apolares Ende des Moleküls darstellen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Polaritäten bilden sich Agglomerate, welche vielerlei ungünstige Eigenschaften hervorrufen. Da jedoch keine tiefergehenden Studien durchgeführt wurden, kann nicht abschließend geklärt werden, um welche Art Agglomerate es sich hierbei handelt. Die Auswirkungen dieser Bipolarität äußern sich in schlechter Löslichkeit, daraus folgender niedriger Signalstärke in spektroskopischen Analysen wie NMR, IR und Polarimetrie, mangelhafter Chromatographie- und Detektierbarkeit und komplizierter immunbiologischer Analytik. Letztgenannte wird in der Regel in wässrigen Medien durchgeführt, in welchen die synthetisierten EhPI-Analoga nur eine geringe Löslichkeit aufweisen. Eine Abschwächung des bipolaren Charakters durch Maskierung der negativen Ladung am Phosphatsauerstoff oder die Herabsetzung der Hydrophilie der OH-Gruppen am Inositol würde lediglich eine Verbesserung der Löslichkeit in unpolaren organischen Lösungsmitteln nach sich ziehen. Eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit kann durch das Hinzufügen polarer Gruppen erreicht werden. Dies kann an der Kopfgruppe geschehen, da diese leichter zu funktionalisieren ist. Hierzu eignen sich nach dem Vorbild der Natur unter anderem Sulfat- und Sulfonat- sowie Phosphatgruppen. Da phosphorylierte *myo*-Inositole aufgrund ihrer natürlichen Häufigkeit häufig vorkommen, die wissenschaftliche Erfahrung entsprechend hoch und die Literatur in diesem Bereich vielfältig ist, wurde entschieden, die Hydrophilie durch Einführung polarer Phosphatgruppen zu erhöhen.

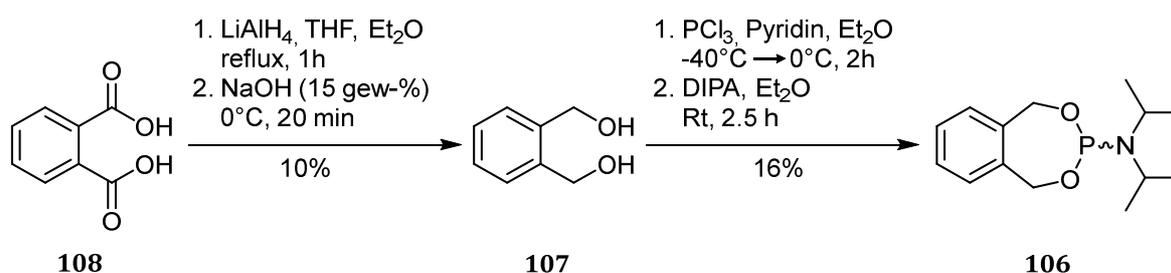
Zur Funktionalisierung des *myo*-Inositols eignen sich vor allem die vier freien Hydroxyfunktionen an den Positionen 3,4,5 und 6. Da sich die chemischen Reaktivitäten dieser vier OH-Gruppen bei vorangegangenen Synthesen als sehr ähnlich herausgestellt hatten, wäre eine gezielte Substitution einer, zweier oder dreier Hydroxyfunktionen sehr schwierig. Aus diesem Grund wurde versucht, alle vier Hydroxyfunktionen zu substituieren, um somit ein Pentakisphosphat herzustellen. Zur Schützung der Phosphatgruppen während der Einführung wurden drei

verschiedene Gruppen getestet, die *ortho*-Phenylbismethylen-Schutzgruppe (XEP), die Benzyl- und 2-Cyanoethylgruppe.

Der Einfluss der angebrachten Gruppen auf den CD1d-Ligand-TCR-Komplex konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschätzt werden. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass bereits Derivate mit mehreren Modifikationen an den Positionen 2,3,4 und 6 synthetisiert und erfolgreich auf ihre Erkennung durch CD1d und den TCR getestet wurden.<sup>[6, 15]</sup>

### 6.3.3.1 Phenylbismethylen-Derivate

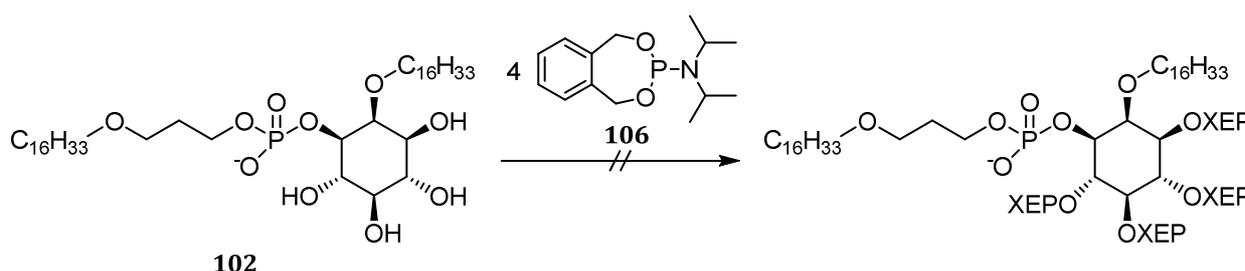
Jessen et al. verwendeten 2013 zur Synthese von polyphosphorylierten *myo*-Inositolen die *ortho*-Phenylbismethylen-Schutzgruppe (XEP), welche sie über das Phosphoramidit **106** ins Molekül einbrachten (**Schema 54**)<sup>[66]</sup>. Eine Abspaltung der Phenylbismethylen-Klammer wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre und Palladiumkatalyse hydrogenolytisch durchgeführt.



**Schema 54:** Retrosynthese des Phosphoramidits **106** aus Phthalsäure **108**.

Das Phosphoramidit **106** lässt sich über 1,2-Benzoldimethanol **107** herstellen, welches durch Reduktion aus Phthalsäure **108** generiert werden kann. Zunächst wurde diese in Diethylether und Tetrahydrofuran (2.5:1, v/v) mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert und schließlich mit verdünnter Natronlauge umgesetzt. Nach der Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte das Diol **107** in einer niedrigen Ausbeute von 10% erhalten werden. Die niedrige Ausbeute ist auf fehlenden Umsatz durch die geringe Löslichkeit der Phthalsäure in Tetrahydrofuran zurückzuführen. Zur weiteren Synthese des Phosphoramidits **106** wurde das Diol **107** mit Phosphor(III)-chlorid und Pyridin bei  $-40^\circ\text{C}$  in Diethylether umgesetzt. Nach Filtration und Destillation unter Luftausschluss wurde das erhaltene Chlorphosphit **109** mit einem Äquivalent Diisopropylamin versetzt. Nach erneuter Filtration unter Luftausschluss und Umkristallisation aus Hexan wurde das Phosphoramidit **106** in einer Ausbeute von 16% über zwei Stufen erhalten. Ein großer Teil der fehlenden Ausbeute lässt sich auf eine Polymerisation während der Destillation zurückführen. Diese konnte nur bei einer Temperatur von ca.  $150^\circ\text{C}$  durchgeführt werden, wobei sich orangefarbene, nicht-volatile Polymere bildeten.

In einer Testreaktion wurde versucht, das Tetrol **102** direkt unter Säureaktivierung mit einem vierfachen Überschuss an Phosphoramidit **106** in Acetonitril umzusetzen (**Schema 55**). Aufgrund der geringen Löslichkeit von Tetrol **102** in Acetonitril konnte dieses jedoch nicht in Lösung gebracht werden und so konnte auch nach vier Tagen Reaktionszeit kein Umsatz festgestellt werden. Eine Verbesserung der Löslichkeit durch Wechsel des Lösungsmittels auf ein Dichlormethan-Methanol-Gemisch kam wegen der Nukleophilie des Methanol-Sauerstoffatoms nicht in Frage.

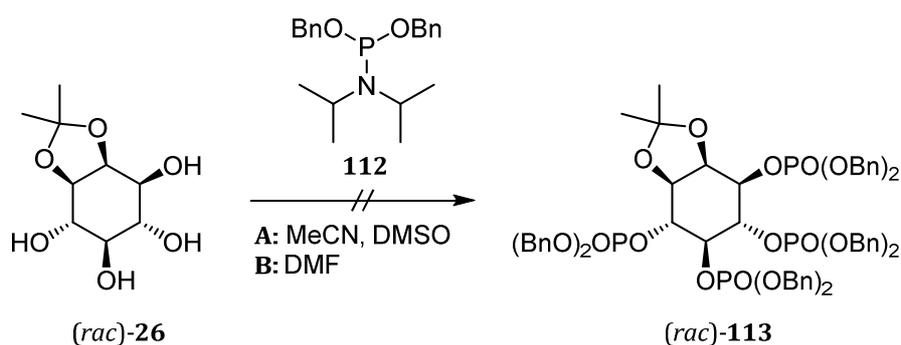


**Schema 55:** Versuch der Schützung von Generation-III-EhPI **102**.

Aus diesem Grund wurde versucht, die XEP-Gruppen an einem früheren Punkt der Syntheseroute von **102** einzuführen und so die vorher verwendeten Benzylether zu ersetzen. Dazu sollte das Tetrol **26** mit vier XEP-maskierten Phosphatgruppen versehen werden. Um eine hohe Reaktivität eines Reaktanden zu gewährleisten, wurde versucht, die Einführung der XEP-Schutzgruppe über ein Phosphorchloridit zu realisieren, da dieses ein stärkeres Elektrophil ist. Dazu wurde zunächst 1,2-Benzoldimethanol **107** bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Phosphor(III)-chlorid umgesetzt. Nach Filtration unter Inertgasbedingungen und Destillation wurde ein vierfacher Überschuss des erhaltenen Phosphorchloridits mit dem Tetrol (*rac*)-**26** in *N,N*-Dimethylformamid und Pyridin umgesetzt. Nach 18 h Reaktionszeit bei  $\text{Rt}$  wurde das entstandene Phosphit bei  $0^{\circ}\text{C}$  mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert. Nach Aufarbeitung und zweifacher chromatographischer Reinigung wurde das vollständig geschützte *myo*-Inositol **110** in einer Ausbeute von 19% über zwei Stufen erhalten (**Schema 56**). Auch bei dieser Reaktionsdurchführung kam es während der Destillation zu einer Bildung von Polymeren, was die Ausbeute negativ beeinflusste.



durchgeführt, allerdings konnte das eingesetzte Tetrol nicht vollständig in Lösung gebracht werden. Eine Kupplung fand dabei nicht statt. In einem weiteren Versuch wurde die Reaktion in *N,N*-Dimethylformamid durchgeführt, was eine vollständige Lösung des Startmaterials ermöglichte. Dennoch konnte nach 24 h Reaktionszeit kein Umsatz des Tetrols festgestellt werden. Das in der Reaktion befindliche Phosphoramidit **112** reagierte hingegen zu *H*-Phosphonaten, Amidaten und Phosphaten, was durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte.

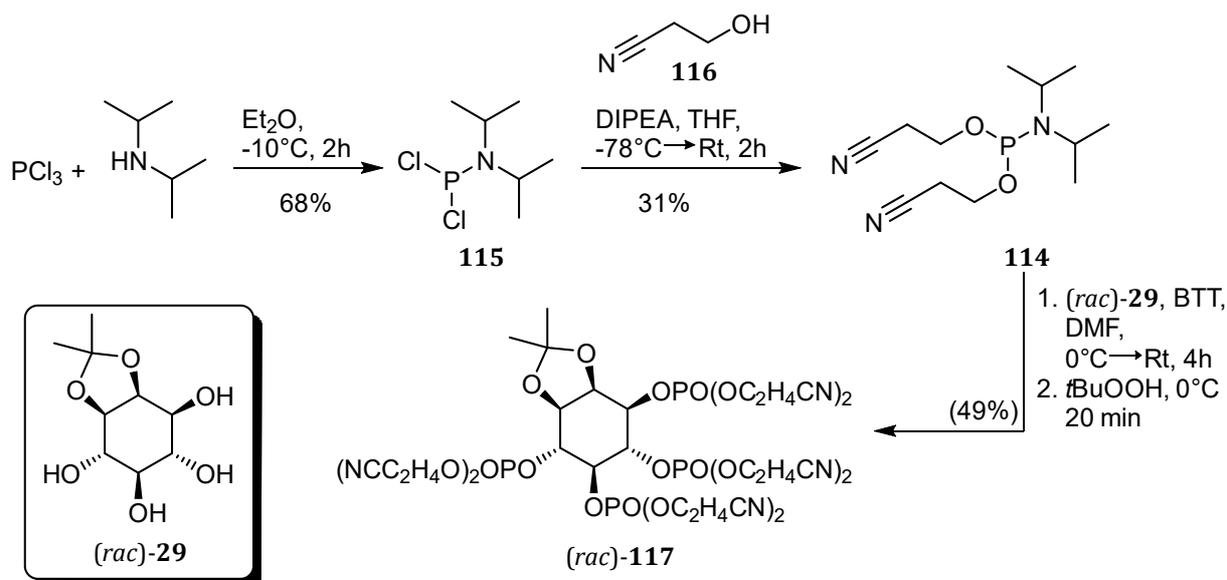


**Schema 58:** Zwei Versuche der Synthese von vollständig geschütztem *myo*-Inositol (*rac*)-**113**. **A:** In einem Gemisch aus Acetonitril. **B:** in *N,N*-Dimethylformamid.

### 6.3.3.3 2-Cyanoethyl-Derivate

Eine weitere in der Phosphatchemie häufig eingesetzte Schutzgruppe (Kap. 6.1.4.2.2) ist die 2-Cyanoethylgruppe. In einem weiteren Versuch sollte die Einbringung von vier bis-2-cyanoethylgeschützten Phosphatgruppen in das Tetrol (*rac*)-**26** getestet werden.

Dazu sollte zunächst das Phosphoramidit **114** hergestellt werden. In einem ersten Schritt wurde dafür Phosphor(III)-chlorid mit einem zweifachen Überschuss an *N,N*-Diisopropylamin in Diethylether umgesetzt, um das reaktive Phosphordichloridit **115** zu generieren, welches nach einer Filtration unter Inertgasbedingungen mit einer Ausbeute von 68% erhalten werden konnte (**Schema 59**). Auf eine Destillation des Rohprodukts wurde an dieser Stelle wegen der Labilität der Verbindung verzichtet, da zudem nur geringe Verunreinigungen festgestellt werden konnten. Das Dichloridit **115** wurde daraufhin zügig mit einem zweifachen Überschuss 3-Hydroxypropionitril **116** in Tetrahydrofuran umgesetzt und über Nacht bei Rt gerührt. Nach Filtration unter Inertgasbedingungen und einer säulenchromatographischen Reinigung unter Zugabe von Triethylamin konnte das gewünschte Phosphoramidit **114** mit einer Ausbeute von 31% erhalten werden.

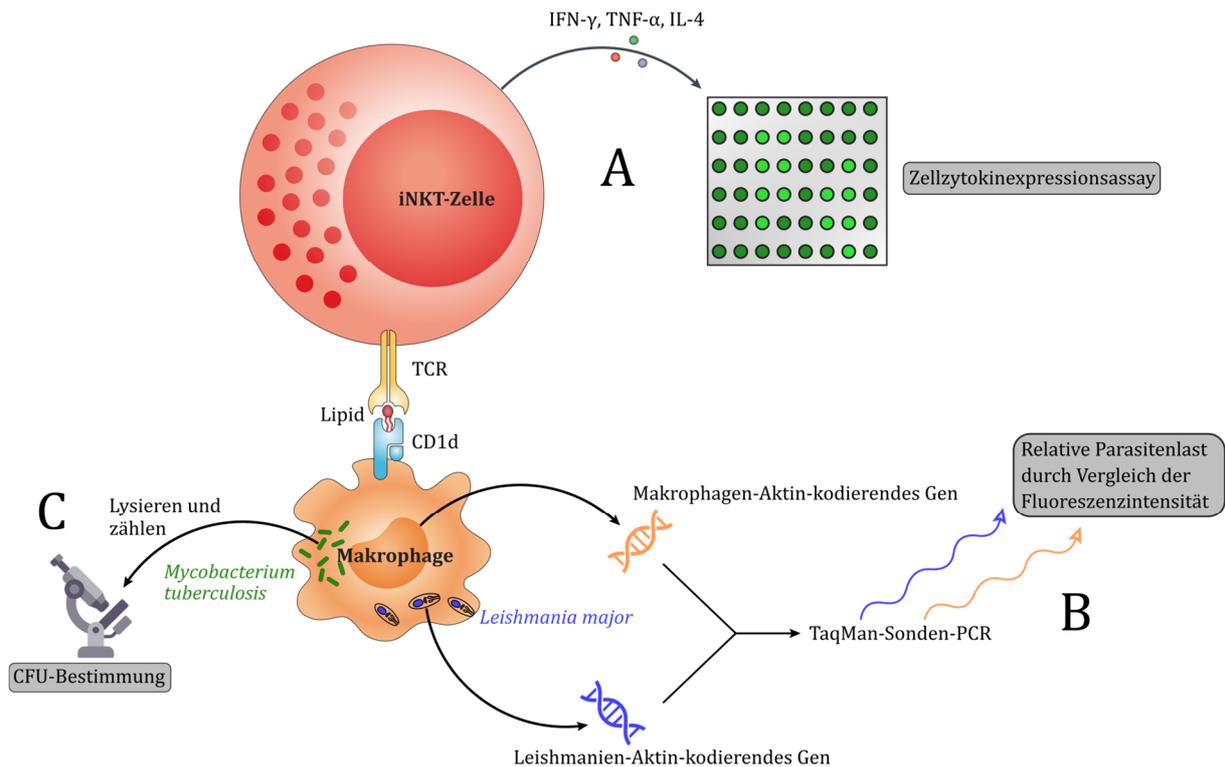


**Schema 59:** Synthese des vollständig geschützten *myo*-Inositol-tetrakisphosphats (*rac*)-**117**, verunreinigt mit einem dreifach substituierten Tris-(di-(2'-cyanoethyl))-phosphat.

In einer Kupplungsreaktion wurde dann das Tetrol **26** mit 4.4 Äquivalenten des Phosphoramidits **114** in *N,N*-Dimethylformamid bei 0°C mit sukzessiver Zugabe von BTT-Aktivator umgesetzt (**Schema 59**). Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde zur Oxidation des Tetrakisphosphits *tert*-Butylhydroperoxid bei 0°C hinzugegeben. Nach einer weiteren Reaktionszeit von 20 min. und basisch-wässriger Aufarbeitung wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Trotz einer vollständigen Schützung aller im Molekül vorhandener funktioneller Gruppen war das erhaltene *myo*-Inositol-tetrakisphosphat **117** nur im sehr polaren Lösungsmittel Methanol löslich. Durch eine Abspaltung der *Isopropyliden*-Klammer würde eine weitere Erhöhung der Hydrophilie eintreten, was wiederum polarere Lösungsmittel erfordert hätte. Im Hinblick auf weitere Reaktionen, die nicht in Methanol oder Wasser durchgeführt werden konnten, wurde eine weitere Entwicklung dieser polaren PIs zunächst eingestellt.

## 6.4 Biologische Evaluierung

Wie bereits in Kap. 4.3 und 4.4 beschrieben, sind  $\alpha$ -GalCer **1** und EhLPPG **2** Antigene für CD1d und werden vom T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt.<sup>[1]</sup> Die Zelle beginnt nach der Erkennung mit der Produktion von Zytokinen. Dies sind unter anderem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Interleukine wie IL-4 oder IL-10. In diesem Zusammenhang haben  $\alpha$ -GalCer und EhLPPG gezeigt, dass sie die Parasitenlast von *Leishmania major*-infizierten Knochenmarksmakrophagen (BMM) *in vitro* senken können.<sup>[114]</sup> Die hergestellten Verbindungen **19a-d** sind Analoga von EhPIb, welches der immunbiologisch aktive Teil von EhLPPG ist (Kap. 4.4).



**Abb. 67:** Im Zuge dieser Arbeit durchgeführte *in vitro*-Assays und Tests, Grafik teilweise übernommen von Brennan et al.<sup>[7]</sup> **A:** Zytokinexpressionsassays zur Quantifizierung der Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4 nach Inkubation von Milz- und Leberlymphozyten mit den synthetisierten EhPI-Analoga. **B:** Bestimmung der relativen Parasitenlast von murinen BMMs und humanen THP1-Zellen nach Infektion mit *L. Major* und Behandlung durch die synthetisierten EhPI-Analoga. **C:** Bestimmung des Einflusses der synthetisierten Analoga auf die koloniebildende Einheit von mit *M. tuberculosis* infizierten murinen BMMs.

Um eine immunbiologische Aktivität der synthetisierten Analoga **19a-d** sowie **D-80** und **L-80** qualitativ und quantitativ bewerten zu können, wurden diese im Zuge dieser Arbeit in *in vitro*-Zytokinexpressionsassays, einem *anti*-Leishmanien-Assay und einem *anti*-Tuberkulose-Test auf ihre biologische Aktivität hin überprüft (**Abb. 67**). Hierzu wurden für die Zytokinexpressionsassays murine Leber- und Milzzellen, für die *anti*-Leishmania-Tests murine BMMs und humane THP1-Zellen und für den *anti*-Tuberkulose-Test murine BMMs verwendet. Ein Protokoll zur *in vitro*-Vermessung von humanen mit Tuberkulose infizierten Zellen konnte bislang noch nicht etabliert werden. Dieses befindet sich derzeit in Entwicklung. Um schädliche Effekte auf gesunde Zellen zu überprüfen, wurden außerdem ein Hämolyse-Assay an humanem Blut und Zytotoxizitätsassays an humanen und murinen Zellen durchgeführt.

Die Durchführung der zellbiologischen Tests und Assays wurden insbesondere durch die Mitarbeiter des BNI Hamburg M.Sc. Siew Ling Choy und Dr. Hannah Bernin in der Arbeitsgruppe Molekulare Parasitologie unter der Leitung von Dr. Hannelore Lotter und Prof. Dr. Egbert Tannich durchgeführt. Einige der hier beschriebenen Experimente wurden von Dirk Landschulze und mir unter Anleitung der o.g. Mitarbeiter angefertigt. Die hier präsentierten Ergebnisse sind nur ein

Teil der gesamten Untersuchung, welche im Detail in der Dissertation<sup>[115]</sup> von Siew Ling Choy publiziert wird.

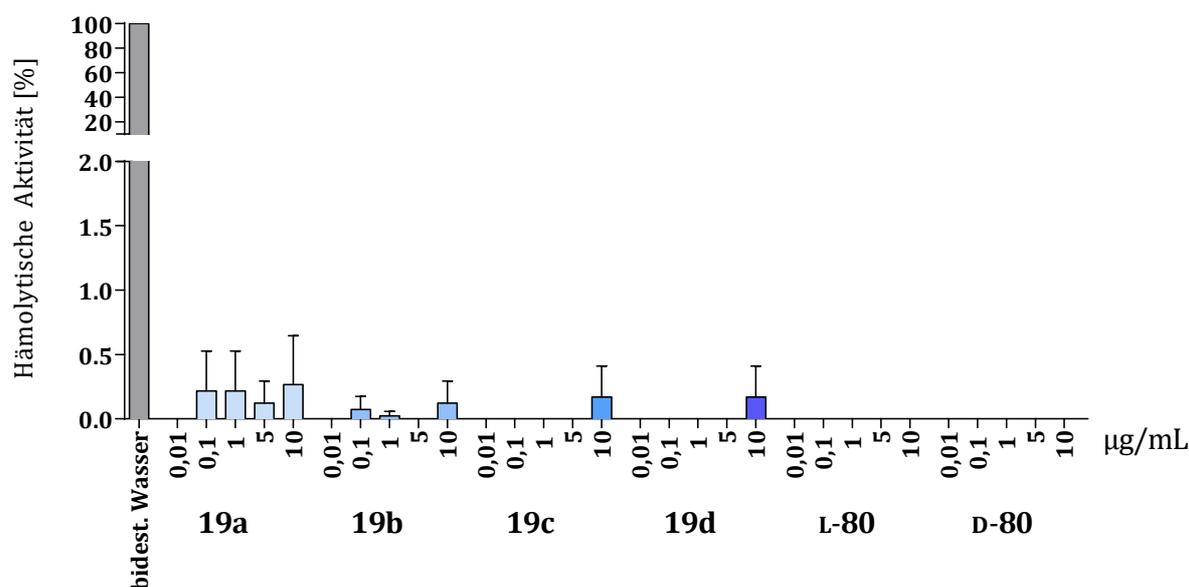
Die Messungen waren durch die Verwendung lebender Zellen stärkeren Schwankungen ausgesetzt und müssen daher stets im Vergleich zur Kontrollprobe betrachtet werden. Die statistische Signifikanz des Messwertes, welche sich aus den Mehrfachmessungen ergibt, ist daher von besonderer Aussagekraft. Als Referenz diente jeweils das verwendete Zellmedium mit einem Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO), da die synthetisierten PIs vor ihrer Verdünnung in DMSO gelöst waren. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde die Methode des *unpaired Student's t-test* verwendet.

Zum weiteren Vergleich der Aktivitäten wurde stets eine Vergleichsprobe mit  $\alpha$ -GalCer **1**, dem stärksten bekannten CD1d-Liganden, in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gemessen. In Kap. 4.3 wird näher auf diesen Naturstoff und die Bindung im CD1d-Ligand-TCR-Komplex eingegangen. Zum weiteren Vergleich der synthetisierten EhPI-Analoga wurde in jeder Durchführung auch der extrahierte Naturstoff EhLPPG **2** in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gemessen. Auf diese Weise kann ein Vergleich zur Aktivität des kompletten Naturstoffs hergestellt werden.

#### 6.4.1 Hämolyse-Assay

Zunächst wurde jedoch überprüft, ob die synthetisierten Verbindungen geeignet waren, um in zellbasierten Assays analysiert zu werden. Im Fall einer zu hohen hämolytischen Aktivität wäre dies aufgrund der toxischen Wirkung auf Zellen nicht möglich. In diesem Zusammenhang wurden verdünnte Erythrozyten in PBS-Puffer mit den synthetisierten Verbindungen **19a-d**, **D-80** und **L-80** in Konzentrationen von 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bis 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei 37°C für 1 h inkubiert und der Überstand anschließend photometrisch ausgewertet. Im Vergleich mit bidestilliertem Wasser hatten alle sechs getesteten Verbindungen in allen Konzentrationen eine hämolytische Aktivität von unter 0.3% (**Abb. 68**). Bei den Verbindungen **D-80** und **L-80** konnte auch nach zweifacher Messung in keiner Konzentration eine hämolytische Wirkung festgestellt werden (**Abb. 68**). Auch im Fall von **19c** und **19d** konnte bei Konzentrationen unterhalb von 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  keine hämolytische Aktivität beobachtet werden. Dies deutet auf sehr untoxische Verbindungen hin. Die in Kap 6.4.2 beschriebenen zytotoxischen Ergebnisse bestätigen dies.

Aufgrund dieser Tatsache konnten die synthetisierten Verbindungen für zellbasierte Assays verwendet werden.

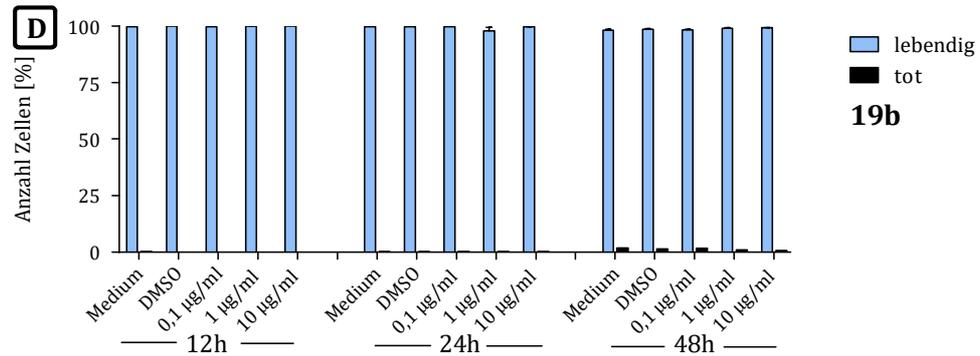
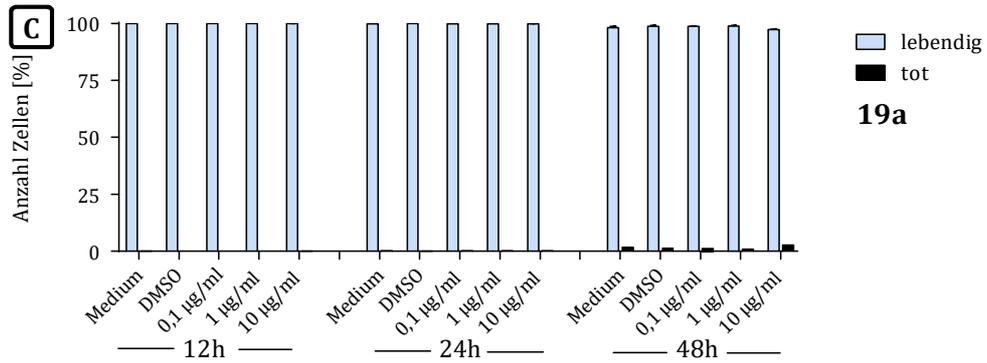
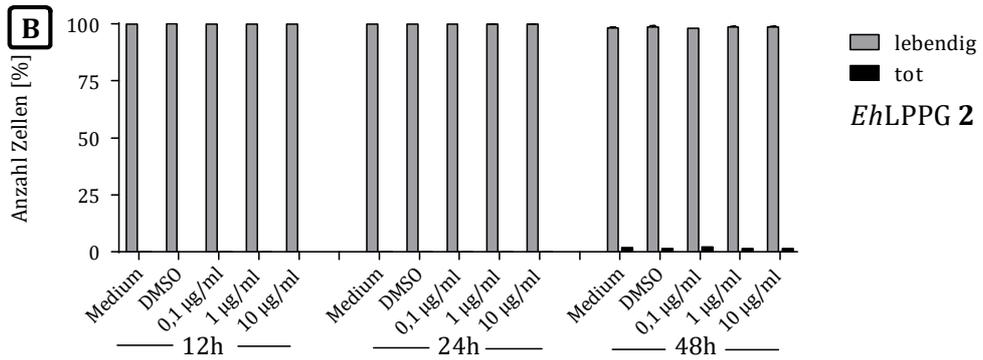
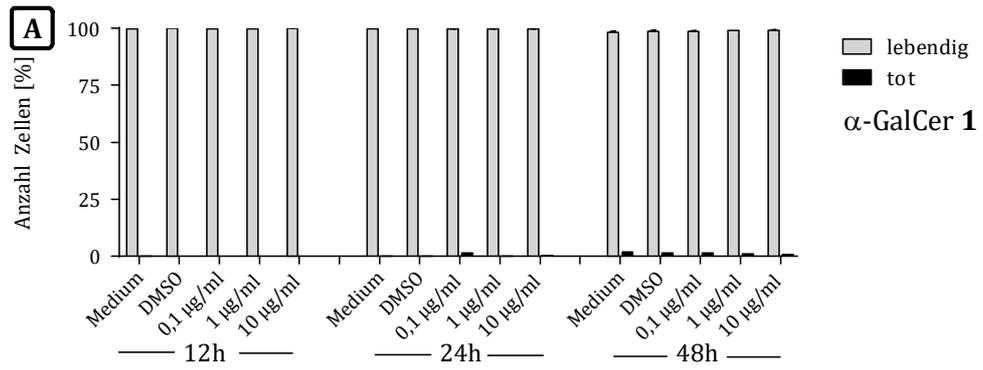


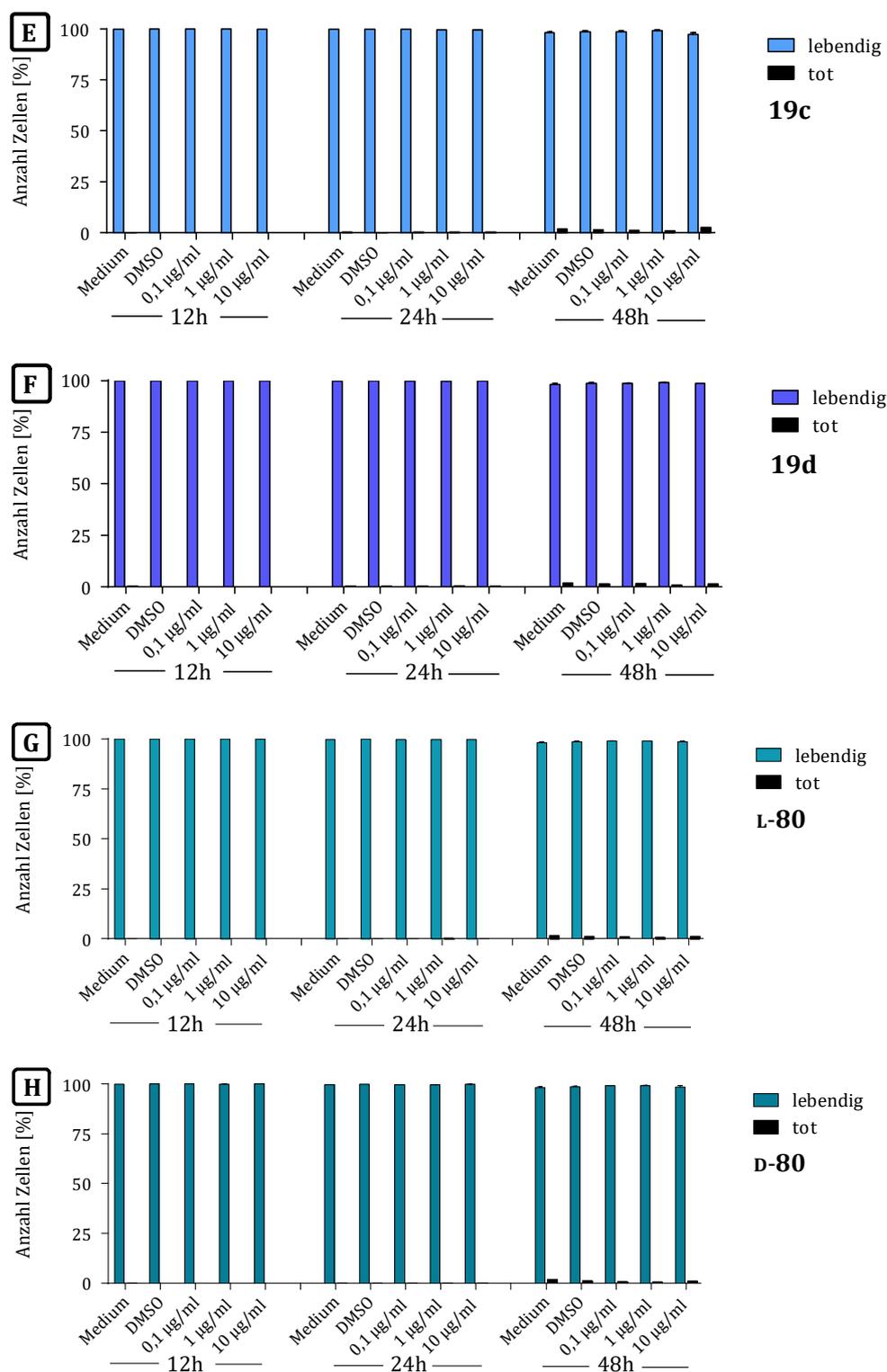
**Abb. 68:** Hämolytische Aktivität der synthetisierten Verbindungen **19a-d**, **L-80** und **D-80**.

## 6.4.2 Zytotoxizität

Um den Einfluss der synthetisierten Verbindungen auf lebende Zellen zu überprüfen, wurden Zytotoxizitätstests mit murinen Milzzellen und humanen PBMCs durchgeführt. Dies ist nötig, um die therapeutische Breite für ein mögliches Therapeutikum ermitteln zu können. Bei diesem Assay wurden die jeweiligen Zellen mit den Verbindungen **19a-d**, **D-80** und **L-80** in den Konzentrationen von 0.1 µg/mL bis 10 µg/mL inkubiert und daraufhin nach 12 h, 24 h und 48 h die noch lebenden Zellen ausgezählt.

Bei den humanen Zellen (**Abb. 69**) ist nach 12 h bei keiner der getesteten Verbindungen eine nennenswerte Toxizität erkennbar. Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich auch nach 24 h. Hier ist bei allen Verbindungen eine Lebensrate von über 99.6% zu messen. Nach einer Dauer von 48 h ergaben sich etwas niedrigere Lebensraten, die jedoch alle oberhalb von 97.5% lagen und höhere Lebensraten aufwiesen, als die Referenzproben, die nur Medium oder ein Gemisch aus Medium und DMSO enthielten. Nur in einem Fall lag ein Wert einer Verbindung unter dem der Referenzproben. Im Fall der Verbindung **19a** ergab sich bei einer Konzentration von 10 µg/mL eine Lebensrate von 97.2%. Diese Konzentration liegt aber weit oberhalb der effektivsten anzustrebenden Konzentration, die bei einer Therapie angelegt werden würde.



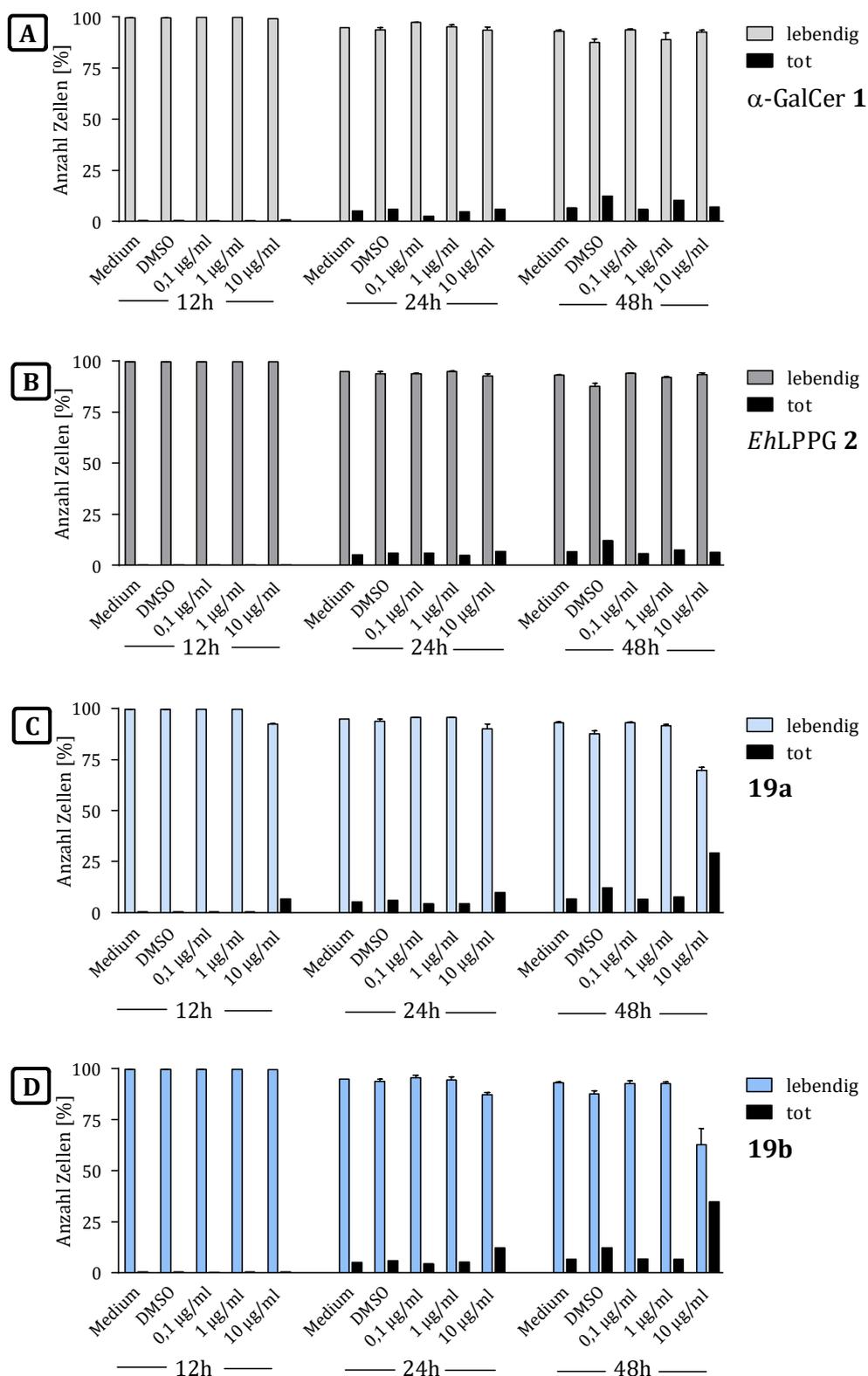


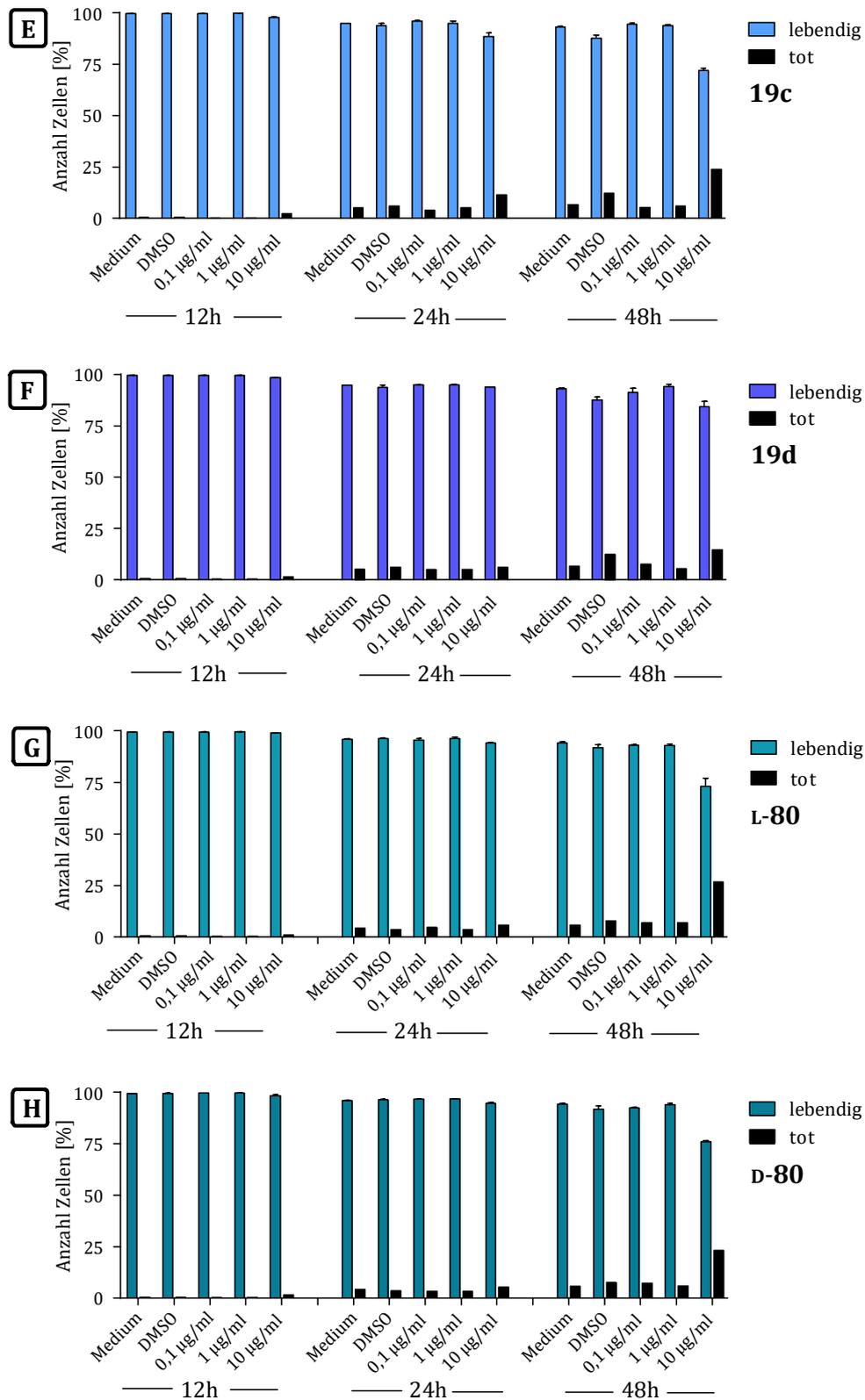
**Abb. 69:** Zytotoxizitätstest mit humanen PBMC nach 12h, 24h und 48h bei Konzentrationen von 0.1 µg/mL bis 10 µg/mL. **A:** α-GalCer **1**, **B:** EhLPPG **2**, **C:** **19a**, **D:** **19b**, **E:** **19c**, **F:** **19d**, **G:** **L-80**, **H:** **D-80**.

Murine Zellen unterscheiden sich in immunologischen Aspekten signifikant von humanen.<sup>[116]</sup> Dieser Umstand wird auch bei dem hier durchgeführten Zytotoxizitätsassay mit murinen Zellen deutlich (**Abb. 70**), denn hier konnten nach über 24 h deutlich niedrigere Lebensraten beobachtet werden. Nach einer Expositionszeit von 12 h fiel dieser Unterschied jedoch noch wesentlich geringer aus. Alle Verbindungen wiesen hohe Lebensraten auf, außer der Verbindung **19a**, bei der bei der höchsten Konzentration (10 µg/mL) eine Lebensrate von lediglich 92.6% erkennbar war.

Nach 24 h sank die Lebensrate bei den Konzentrationen 0.1 µg/mL und 1 µg/mL auf 93% - 97%. Erst bei den höher konzentrierten Proben mit 10 µg/mL lagen die Werte zwischen 87% und 96%. Nach 48 h überlebten bei den Konzentrationen 0.1 µg/mL und 1 µg/mL etwa 86% bis 94% der Zellen. Auch hier lagen die Werte etwa auf gleicher Höhe oder sogar niedriger als die Referenzproben, welche nur Medium und DMSO beinhalten. Bei der höchsten Konzentration von 10 µg/mL waren deutliche Toxizitäten nach 48 h erkennbar, die höher als die Referenzproben lagen. Hier ergaben sich Überlebensraten von lediglich 55% bis 87%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die getesteten Verbindungen allesamt sehr geringe Toxizitäten aufwiesen. Lediglich bei einer hohen Konzentration von 10 µg/mL waren überhaupt Zellsterblichkeiten erkennbar, die höher oder auf dem Level der Referenzproben waren. Weiterhin ist zu sagen, dass die effektivste Wirkkonzentration bei den Aktivitätsassays (Kap. 6.4.3, Kap. 6.4.4, Kap. 6.4.5) in den meisten Fällen bei 0.1 µg/mL lag, welche in allen getesteten Fällen eine niedrigere Toxizität als die Referenzproben aufwies. Auffällig war, dass sich ein deutlicher Unterschied zwischen den murinen und den humanen Zellen ergab. Während die humanen PBMC in allen Toxizitätstests Lebensraten von über 97.5% aufwiesen, konnten im Fall der murinen Milzzellen Lebensraten von lediglich 55% und höher festgestellt werden. Außerdem kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Toxizität unterhalb von 10 µg/mL stärker zeit- als dosisabhängig proportional anstieg. Im Fall der murinen Milzzellen konnte nur nach 48 h eine Konzentrationsabhängigkeit bei 10 µg/mL festgestellt werden.

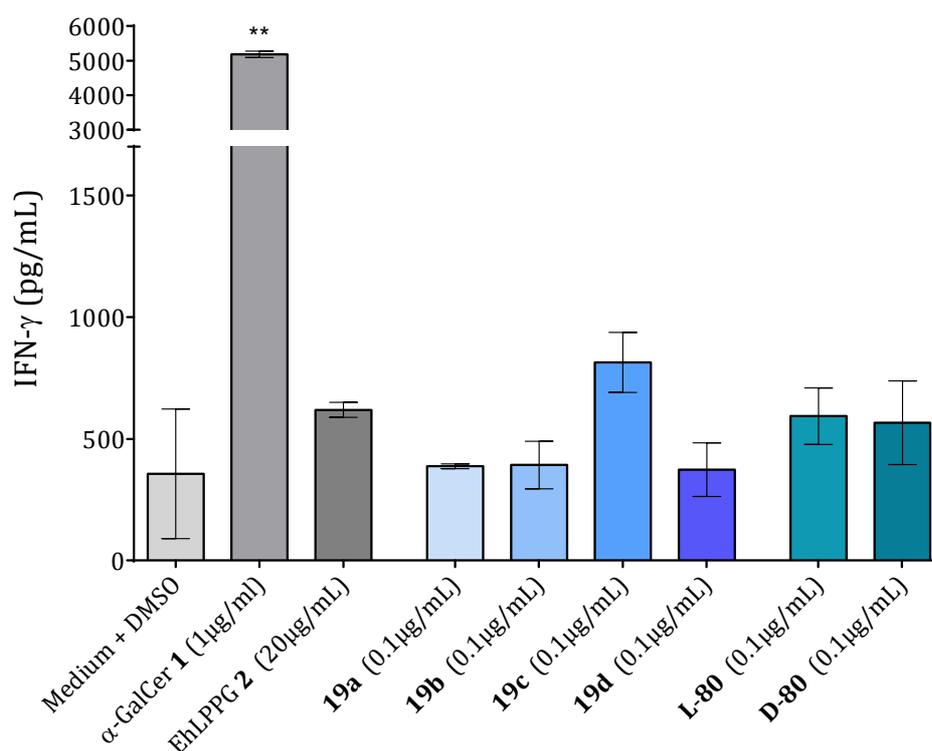




**Abb. 70:** Zelltoxizitätstest mit murinen Milzzellen nach 12h, 24h und 48h bei Konzentrationen von 0.1 µg/mL bis 10 µg/mL. **A:** α GalCer **1**, **B:** EhLPPG **2**, **C:** **19a**, **D:** **19b**, **E:** **19c**, **F:** **19d**, **G:** L-80, **H:** D-80.

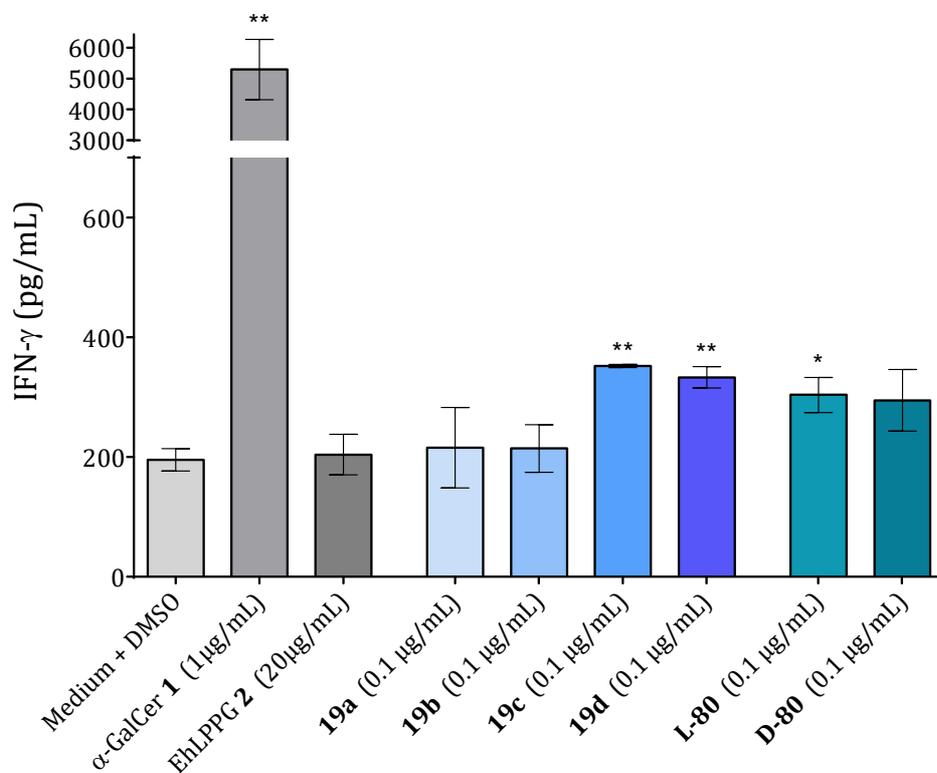
### 6.4.3 Zytokinexpressionsassays

Um eine grobe Einschätzung über die immunbiologische Wirkung bei der Aktivierung von T-Zellen zu bekommen, wurde der Einfluss der synthetisierten Verbindungen auf die Zytokinexpression von iNKT-Zellen getestet. Dazu wurden murine DCs zunächst mit den Probesubstanzen und dann mit Leberlymphozyten inkubiert und die Zellüberstände nach unterschiedlichen Zeitpunkten auf die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (**Abb. 71**, **Abb. 72**) und TNF- $\alpha$  (**Abb. 73**) als typische Th1-Zytokine sowie IL-4 (**Abb. 74**) als Th2-Zytokin mithilfe eines ELISA-Assays untersucht. T-Zell-Stimulanzien werden häufig anhand ihrer Eigenschaft die Produktion von IFN- $\gamma$  stimulieren zu können bewertet, da es sich hierbei um ein pro-inflammatorisches Th1-Zytokin handelt, das schnell und in großer Menge produziert wird und einfach detektiert werden kann.<sup>[38]</sup> Nach mehrmaliger Durchführung der Assays hat sich eine Inkubationsdauer von 48 h und eine Wirkstoffkonzentration von 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bis 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  für besonders aussagekräftig herausgestellt, da bei diesen Bedingungen signifikante Messwerte erhalten werden konnten.



**Abb. 71:** IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand von Leber-Lymphozyten nach Zugabe von **1**, **2**, **19a-d**, **L-80** und **D-80** nach 48 h, \*\*:p-Wert >99%.

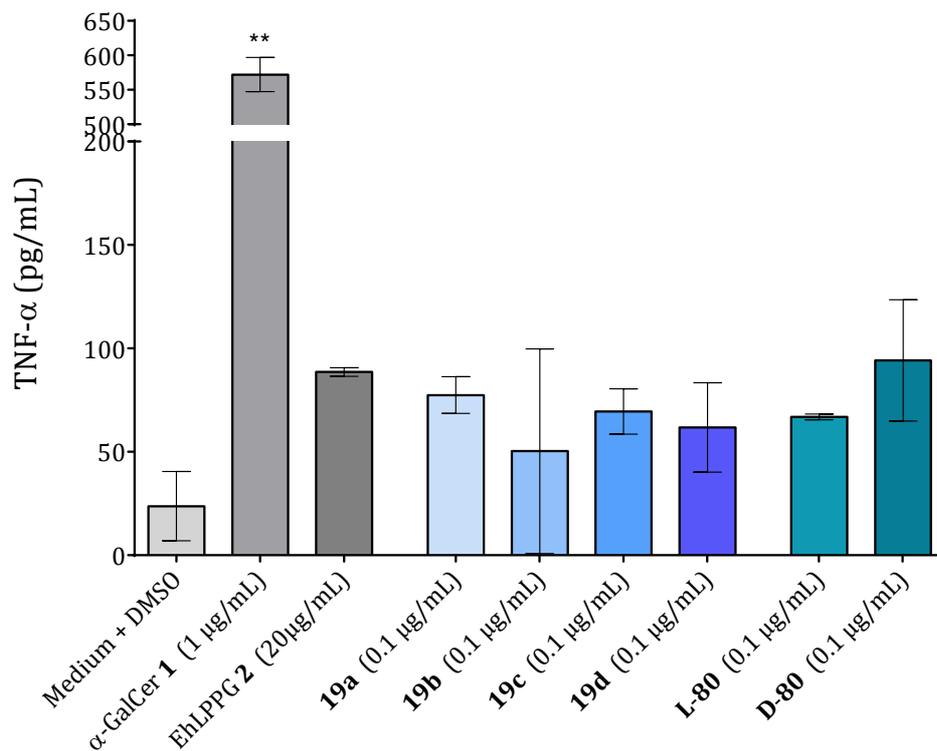
In der Natur vorkommende Phosphatidylinositol besitzen in der Regel einen D-konfigurierten *myo*-Inositol- sowie einen (2*R*)-konfigurierten Glycerin-Baustein. Daher sollte das EhPI-Analogon **19c** mit eben dieser Konfiguration die beste Erkennung durch den TCR erfahren. Dieser Umstand lässt sich tatsächlich in **Abb. 71** erkennen. Der Messwert besitzt trotz eines recht großen Fehlers den höchsten Wert unter den synthetisierten Analoga und sogar einen höheren Wert als EhLPPG **2**.  $\alpha$ -GalCer **1** stimulierte die iNKT-Zellen am stärksten. Letztere Verbindung erreicht einen etwa um den Faktor sechs höheren Wert als die Verbindung **19c**. Die Generation-II-EhPI-Analoga **D-80** und **L-80** zeigten auch Aktivität. Bei den Derivaten **19a**, **19b** und **19d** ist lediglich eine etwas höhere Aktivität im Vergleich zur Kontrolle erkennbar (**Abb. 71**).



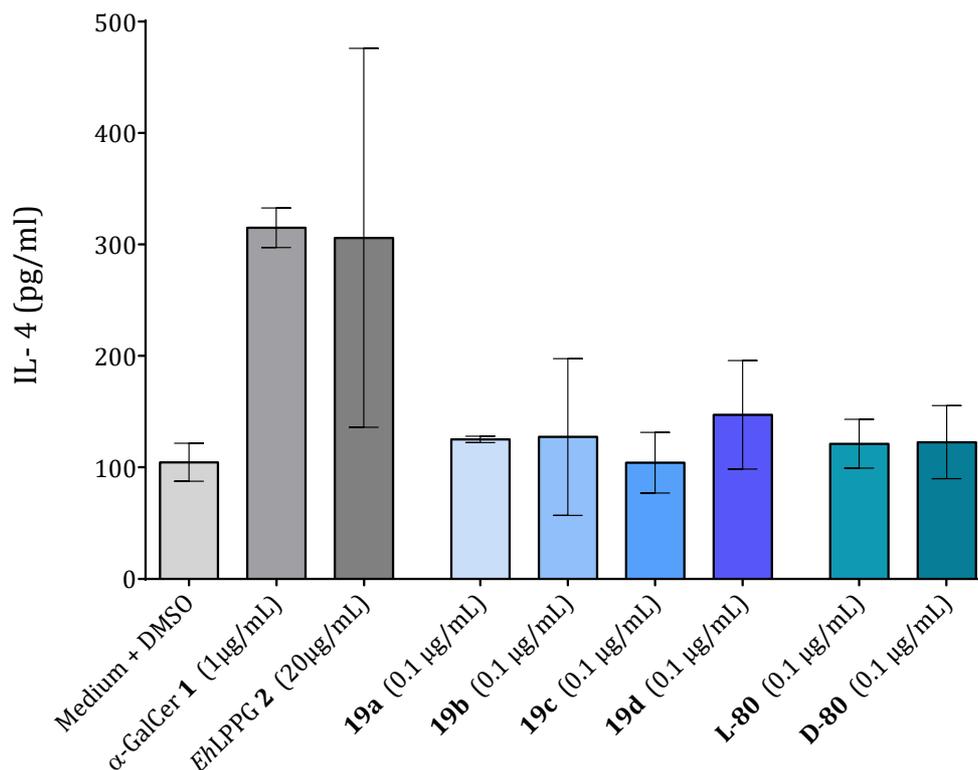
**Abb. 72:** IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand von Milz-Lymphozyten nach Zugabe von **1**, **2**, **19a-d**, **L-80** und **D-80** nach 48 h, \*:p-Wert >95%, \*\*:p-Wert >99%.

Bei der Messung der Milz-Lymphozyten konnten aufgrund geringerer Schwankungen des Kontrollwertes hingegen signifikante Werte für die Verbindungen **19c**, **19d** und **L-80** erhalten werden. Auch hier erreichte **19c** den höchsten Wert nach  $\alpha$ -GalCer mit einer Signifikanz (p-Wert) von über 99% (**Abb. 72**). Auch bei dieser Messung zeigte eine Inkubation mit EhLPPG **2** keine signifikante Zytokinexpression.

Neben IFN- $\gamma$  wurde auch die Konzentration von TNF- $\alpha$  im Überstand untersucht (**Abb. 73**). TNF- $\alpha$  ist wie IFN- $\gamma$  ein pro-inflammatorisches Th1-Zytokin, welches aufgrund seiner tumorbekämpfenden Eigenschaften entdeckt und charakterisiert wurde. Es aktiviert Makrophagen und hat somit einen immunstimulierenden Effekt. Dies kann zur Therapie von Infektionskrankheiten wie der Amöbiasis (Kap. 4.1.1) genutzt werden.<sup>[117]</sup> Wie in **Abb. 73** zu erkennen ist, konnten nach iNKT-Stimulation durch alle getesteten Verbindungen erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen gemessen werden. Im Fall von **19b** konnte allerdings kein aussagekräftiger Wert aufgrund von zu hohen Schwankungen erhalten werden.



**Abb. 73:** TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand von Leberlymphozyten nach Zugabe von **1**, **2**, **19a-d**, **L-80** und **D-80** nach 48 h. \*\*:p-Wert >99%.



**Abb. 74:** IL-4-Konzentration im Überstand von Leberlymphozyten nach Zugabe von **1**, **2**, **19a-d**, **L-80** und **D-80** nach 48 h.

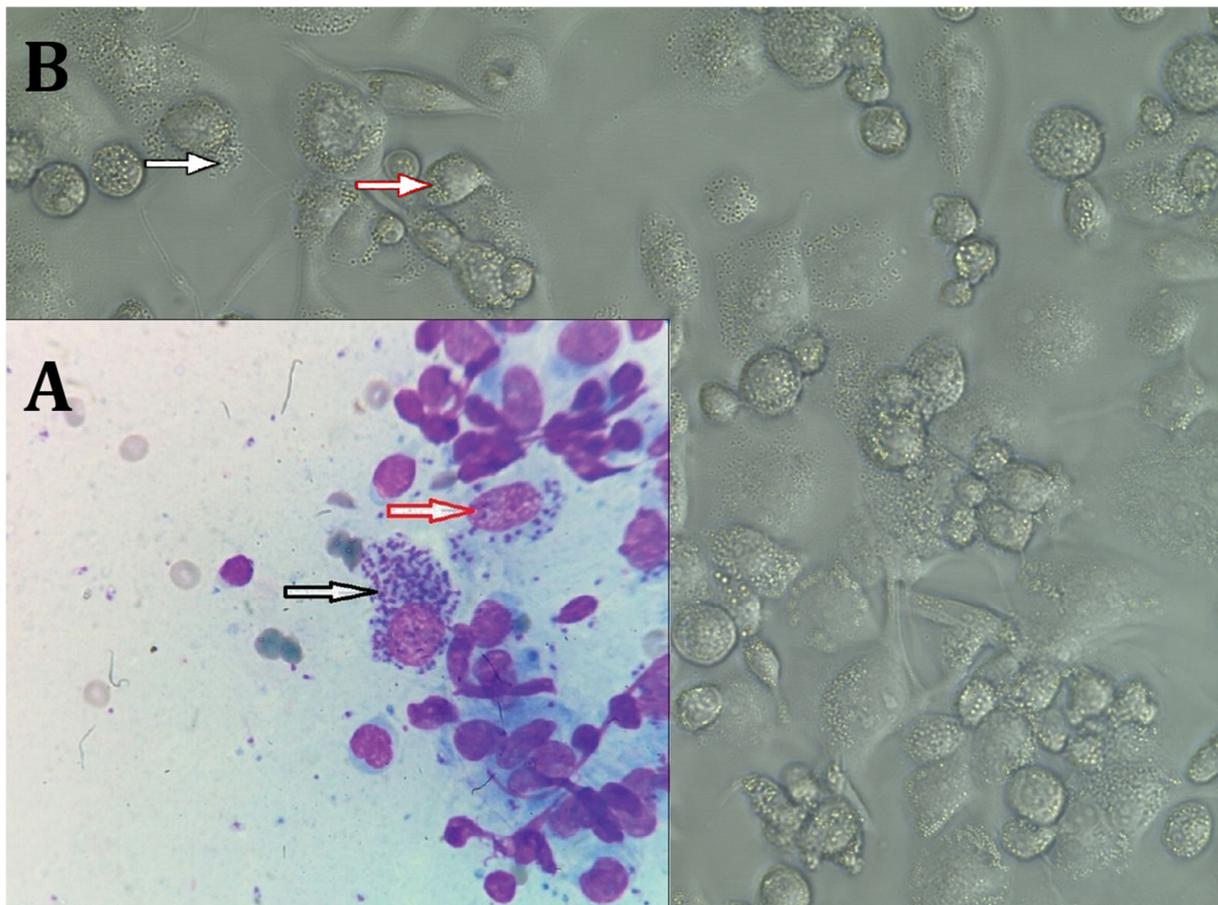
Das *anti*-inflammatorische Th2-Zytokin IL-4 wirkt hemmend auf die Bildung von weiteren Zytokinen in iNKT-Zellen. Die Produktion dieses Zytokins sollte bei einem Immunstimulans dementsprechend niedrig sein. Während α-GalCer **1** die IL4-Produktion stimuliert, ist bei den EhPI-Analoga nur eine geringe Aktivität erkennbar (**Abb. 74**). Im Fall von EhLPPG konnte kein aussagekräftiger Wert erhalten werden, da während der Messung Schwankungen auftraten. Allerdings konnte bereits von Wong-Baeza et al. festgestellt werden, dass sich EhLPPG gegenüber iNKT-Zellen hinsichtlich einer IL-4-Produktion nicht stimulierend verhält.<sup>[45]</sup>

Wie in Kap. 4.4 beschrieben, konnte vor der Synthese einiger EhPI-Stereoisomere wegen der massenspektrometrischen Analytik bei den Verbindungen EhLPPG **2** und EhPIb **18** keine Aussage über deren Absolutkonfiguration gemacht werden. Die Zuordnung der aktivsten Konfiguration war somit ein Ziel dieser Arbeit. Anzunehmen war, dass die in der Natur am häufigsten vorkommende Konfiguration, ein D-konfigurierter *myo*-Inositol-Baustein in Kombination mit einem (*R*)-konfigurierter Glycerin-Baustein, möglicherweise zu einer guten Erkennung und damit starken Bindung des TCRs und so zu einem stabilen CD1d-Ligand-TCR-Komplex führen könnte. Dies würde sich dann unter anderem in einer vergleichsweise höheren Produktion von Zytokinen

äußern. In der Tat konnte bei den in diesem Kapitel vorgestellten immunbiologischen Testungen beobachtet werden, dass vor allem die Verbindung **19c**, welche die o.g. Konfiguration besitzt, die höchste IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Zytokinexpression nach  $\alpha$ -GalCer **1** induzieren konnte. Auch für die anders konfigurierten Phosphatidylinositole **19a-d**, **D-80** und **L-80** konnte eine immunstimulierende Fähigkeit nachgewiesen werden. Lediglich beim *anti*-inflammatorischen Zytokin IL-4 konnten nur sehr geringe Aktivitäten festgestellt werden, welches jedoch positiv zu werten ist, da ein Immunstimulans nur die Produktion von *pro*-inflammatorischen Zytokinen induzieren sollte. Es sollte hier dennoch nicht außer Acht gelassen werden, dass neben der Konfiguration des *myo*-Inositol-Teils auch die Länge der im Molekül vorhandenen Acyl- bzw. Alkylketten eine entscheidende Rolle einnimmt. Die durch den hydrophoben Effekt hervorgerufene Bindung des Liganden an CD1d trägt maßgeblich zur Stabilität des CD1d-Ligand-TCR-Komplexes bei.<sup>[12]</sup>

#### 6.4.4 Anti-*Leishmania-major*-Aktivitätsassays

Nachdem die synthetisierten Verbindungen **19a-d**, **D-80** und **L-80** bereits teilweise signifikante Zytokinexpression bei verschiedenen Immunzellen hervorrufen konnten, sollte nun direkt der Effekt auf mit *L. major* infizierte murine und humane Makrophagen getestet werden. Ist ein Organismus mit *L. major* infiziert, so infiltrieren die Promastigoten das Wirtsgewebe. Nach der Ausschüttung der wesentlich kleineren Amastigoten können diese durch die Zellwand von Makrophagen (und anderen Zellen) des Wirtes penetrieren und dort den Zelltod hervorrufen (Kap. 4.1.2, **Abb. 3**). In **Abb. 75** sind sowohl extrazelluläre (schwarzer Pfeil), als auch intrazelluläre (roter Pfeil) Parasitenzellen nach der Infiltration erkennbar.

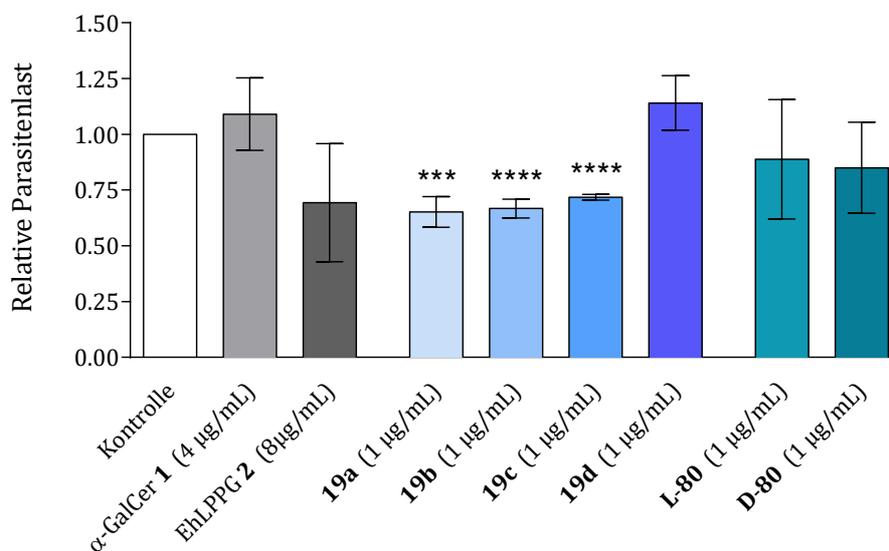


**Abb. 75:** Leishmanien-Amastigoten unter dem Mikroskop außerhalb (schwarzer Pfeil) und innerhalb (roter Pfeil) von Makrophagen. **A:** Histologisch angefärbte Zellen nach Infektion mit *L. donovani*.<sup>[118]</sup> **B:** Lichtmikroskopische Aufnahme der in dieser Arbeit untersuchten THP-1-Zellkultur nach Infektion mit *L. major*.

In beiden *in-vitro*-Experimenten wurden Makrophagen mit Leishmanien bei einer *Multiplizität der Infektion* (MOI) von 8 infiziert und nach 4 h mit den verschiedenen Phosphatidylinositolen in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Im Fall der murinen Knochenmarksmakrophagen

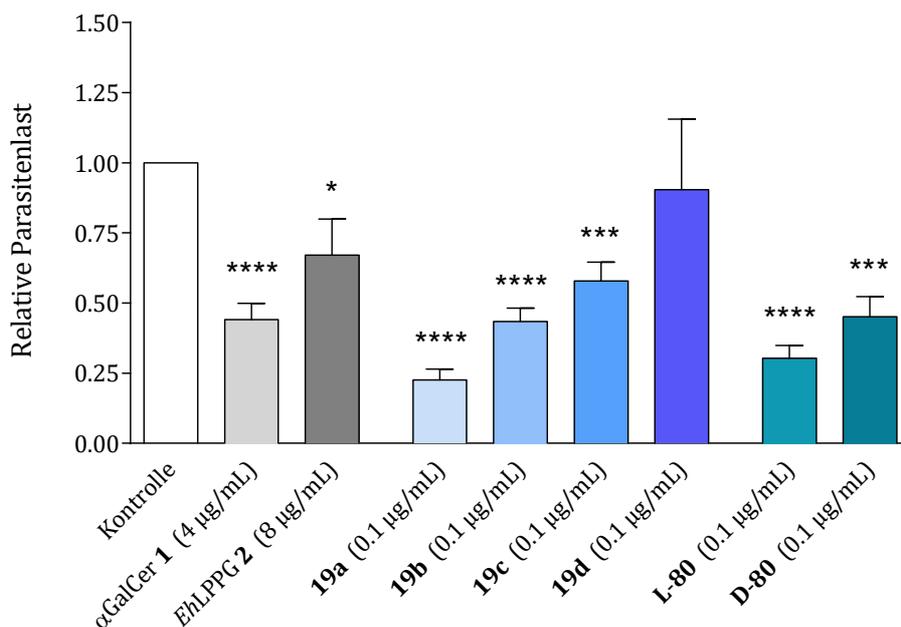
wurden bei einer Konzentration von 1 µg/mL für die Probesubstanzen signifikante Werte erhalten. Bei den humanen THP1-Zellen wurde dies bei einer Probenkonzentration von 0.1 µg/mL erreicht. Die in **Abb. 76** und **Abb. 77** abzulesenden Werte für die getesteten Probesubstanzen beziehen sich jeweils auf eine auf 1 normierte Kontrolle. Ein Wert kleiner als 1 entspricht somit einer Abnahme der Parasitenlast nach Behandlung, ein Wert größer als 1 entspräche einer Zunahme der Parasitenlast.

Die Verbindungen **19a-c** konnten in murinen BMM mit hoher Signifikanz (p-Wert < 0.001) eine Reduktion der Parasitenlast um 28% - 35% bewirken (**Abb. 76**). Bei den Verbindungen  $\alpha$ -GalCer **1**, EhLPPG **2**, **19d**, **D-80** und **L-80** konnten keine signifikanten Werte gemessen werden. Während bei den Verbindungen **D-80** und **L-80** nur eine sehr geringe Aktivität festgestellt werden konnte, erfolgte nach Zugabe von Verbindung **19d** und  $\alpha$ -GalCer **1** keine Reduktion der Parasitenlast bei den verwendeten BMM.



**Abb. 76:** Die relative Parasitenlast in murinen Knochenmarksmakrophagen (BMM) nach Behandlung mit den Verbindungen **1**, **2**, **19a-d**, **D-80** und **L-80**. MOI: 8, 4h nach Infektion. \*\*\*: p-Wert < 0.001, \*\*\*\*: p-Wert < 0.0001.

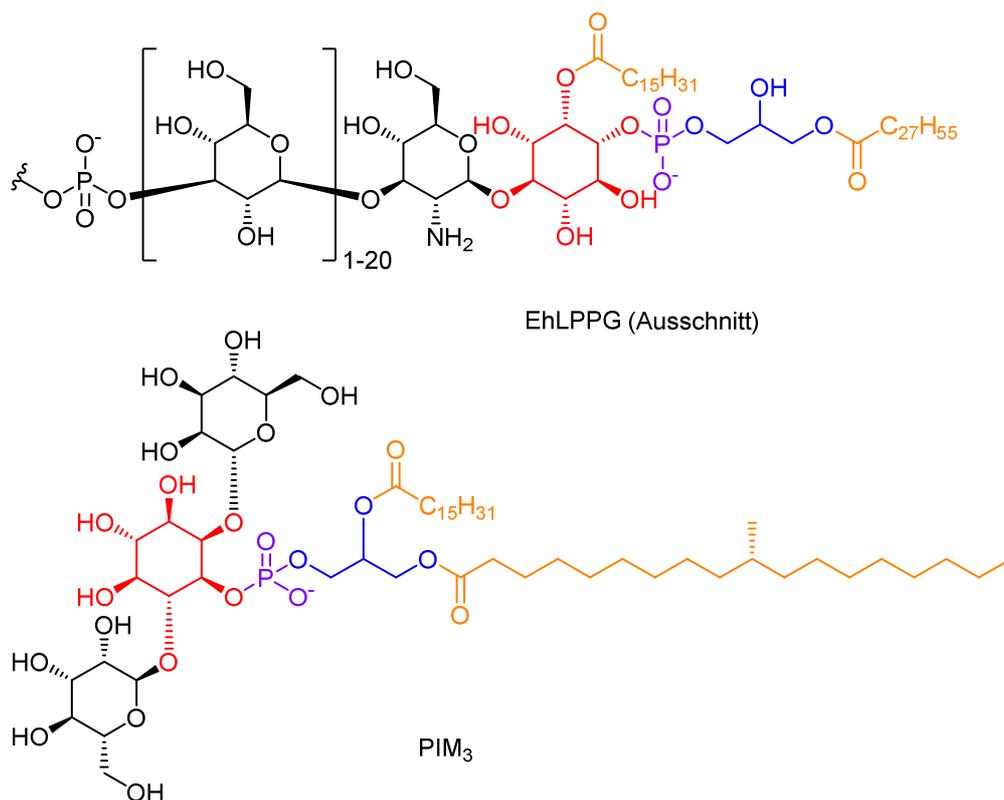
Im Fall der humanen Monozytenzelllinie THP1 zeigte sich ein ähnliches Bild (**Abb. 77**). Signifikante Werte konnten hierbei bei allen Proben außer Verbindung **19d** gemessen werden. Hier zeigte sich erneut die geringste Reduktion. Mit der Verbindung **19a** konnte auch hier die signifikant stärkste Aktivität mit einer Reduktion der Parasitenlast um 77% erreicht werden. Bei den Probesubstanzen **19b**, **19c**, **D-80** und **L-80** sowie bei  $\alpha$ -GalCer **1** konnten Reduktionen von 42% - 70% festgestellt werden.



**Abb. 77:** Die relative Parasitenlast in humanen Makrophagen (THP1-Zelllinie) nach Behandlung mit den Verbindungen **1**, **2**, **19a-d**, **D-80** und **L-80**. MOI: 8, Behandlung nach 4 h. \*: p-Wert <0.1, \*\*: p-Wert <0.01, \*\*\*: p-Wert < 0.001, \*\*\*\*: p-Wert < 0.0001.

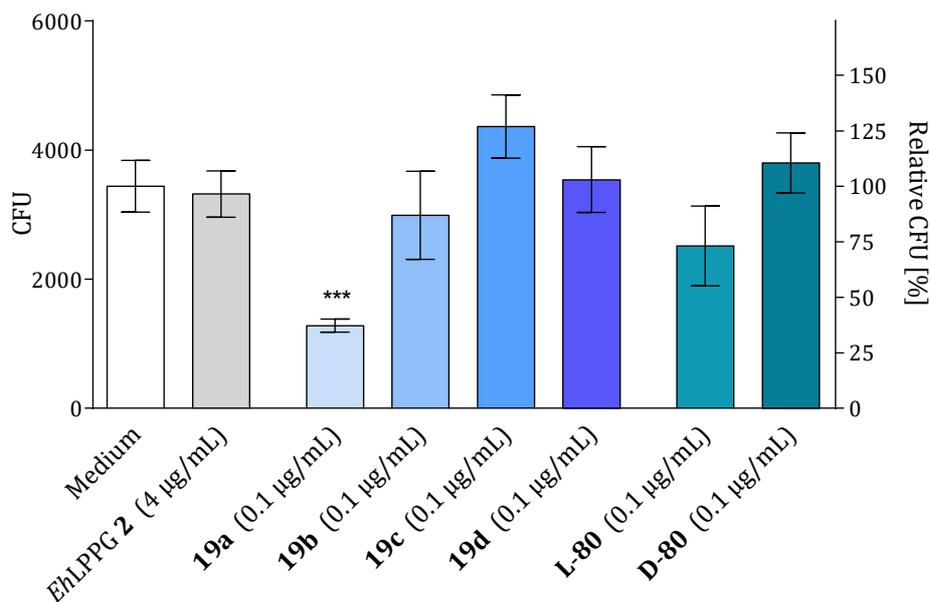
#### 6.4.5 Anti-*Mycobacterium-tuberculosis*-Aktivitätsassay

Tuberkulose gilt als eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten der Welt. Wegen der rasanten Resistenzbildung müssen ständig neue Therapien entwickelt werden. Wie schon in **Abb. 1** und **Abb. 78** gezeigt, gibt es strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Oberflächenmolekülen von *E. histolytica* und anderen Protozoen wie Leishmanien, Trypanosomen oder Plasmodien. Aber auch zu Oberflächenmolekülen des Mykobakteriums *M. tuberculosis* besteht strukturelle Ähnlichkeit. So sind Phosphatidylinositolmannoside (PIMs) ein Bestandteil von deren Hülle und können nach Präsentation durch CD1d die Sekretion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und IL-4 bei iNKT-Zellen stimulieren.<sup>[19]</sup> Wie EhLPPG durchlaufen auch sie zuvor die Endozytose, die Präsentation durch CD1d und die Erkennung durch den TCR. Vergleicht man beispielsweise deren strukturellen Aufbau (**Abb. 78**), lässt sich erkennen, dass beide eine GPI-Anker-Struktur aufweisen. An das zweifach acylierte Phosphatidylinositol schließen sich Mannose-, Glucose- bzw. Glucosamin-Bausteine an.



**Abb. 78:** Vergleich von Oberflächenmolekülen: EhLPPG (Ausschnitt)<sup>[45]</sup> und das in Mykobakterien vorkommende PIM<sub>3</sub><sup>[39]</sup>. Farbliche Codierung der Teilabschnitte: **rot:** Inositolteil, **lila:** Phosphatdiester, **blau:** Glycerinteil, **orange:** Fettsäureester.

Aus diesem Grund wurden auch die Verbindungen **2**, **19a-d**, **D-80** und **L-80** auf eine mögliche Aktivität bezüglich einer Infektion mit *M. tuberculosis* untersucht (**Abb. 79**). Dazu wurden murine BMMs mit Mtb infiziert und nach 4 h mit den jeweiligen Verbindungen **19a-d**, **D-80** und **L-80** behandelt. Die Multiplizität der Infektion betrug 0.5. Nach einer Dauer von 48 h wurden daraufhin Verdünnungsreihen der Zelllysate erstellt und die koloniebildende Einheit (CFU) nach vier Wochen berechnet. Eine Testung von humanen Zellen konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden.



**Abb. 79:** *anti*-Tuberkulose-Test mit murinen BMM. Bestimmung der CFU nach 48 h nach Zugabe der Verbindungen **2**, **19a-d**, **D-80** und **L-80**. MOI: 0.5. \*\*\*: p-Wert < 0.001.

Ähnlich wie beim *anti*-Leishmanien-Assay (Kap. 6.4.4, **Abb. 76**, **Abb. 77**) sind auch die Werte des Diagramms in **Abb. 79** relativ zur Referenz abzulesen, was auch in diesem Fall das Medium ist. Dies zeigt die Fähigkeit der gemessenen Probe an, die Ausbreitung der Mykobakterien zu unterdrücken. Die Verbindung **19a** zeigte hier eine signifikante Unterdrückung der Ausbreitung von *M. tuberculosis*. Dabei ergab sich eine Reduktion um 63%. Dies macht die Verbindung **19a** zu einem möglichen Therapeutikum für die Behandlung von Tuberkulose-Patienten.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeines

#### 7.1.1 Edukte und Reagenzien

Alle Edukte und Reagenzien wurden von den Firmen abcr, Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Grüssing GmbH, Janssen Chimica, Link Technologies, Merck, Sigma-Aldrich, TCI und VWR in Synthesequalität bezogen und, abgesehen von den nachstehenden Verbindungen, ohne weitere Reinigung für die Synthesen verwendet.

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU): Unter Inertgas destilliert und unter Licht- und Luftausschluss gelagert.

Diisopropylamin (DIPA)/*N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA)/Triethylamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ): Drei Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und unter Licht- und Luftausschluss gelagert.

Phosphor(III)-chlorid ( $\text{PCl}_3$ ): Unter Inertgas destilliert und gelagert.

#### 7.1.2 Lösungsmittel

##### 7.1.2.1 Lösungsmittel für die Aufarbeitung und Chromatographie

Die für die Chromatographie eingesetzten Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und gegebenenfalls vor ihrer Verwendung wie angegeben behandelt.

Acetonitril (MeCN, HPLC grade): Ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dichlormethan (DCM): Unter Normaldruck destilliert.

Ethylacetat (EE): Unter Normaldruck destilliert.

Methanol (MeOH): Unter Normaldruck destilliert.

Petrolether 50-70 (Petrolether): Unter Normaldruck destilliert.

Triethylamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ , HPLC grade): Ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ): Als Reinstwasser (Milli-Q) eingesetzt.

#### 7.1.3 Deuterierte Lösungsmittel

Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie, zu denen Chloroform- $\text{d}_1$  ( $\text{CDCl}_3$ ), Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ ), Dimethylsulfoxid- $\text{d}_6$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ) und Methanol- $\text{d}_4$  ( $\text{MeOD-d}_4$ ) zählten, wurden von Euriso-Top erworben.  $\text{DMSO-d}_6$  wurde für das Vermessen hydrolyselabiler

Verbindungen absolutiert. Dafür wurde das Lösungsmittel einen Tag über Phosphorpentoxid zum Sieden erhitzt und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas über Molsieb (4Å).  $\text{CDCl}_3$  wurde für das Vermessen säurelabiler Verbindungen durch basisches Aluminiumoxid neutralisiert.

#### 7.1.4 Absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen unter Feuchtigkeits- und/oder Sauerstoffausschluss wurden die nachstehenden Lösungsmittel wie angegeben erworben oder getrocknet. Zur Trocknung von Acetonitril, Dichlormethan, Diethylether, Pyridin, Tetrahydrofuran wurde auch eine MB-SPS 800-Lösungsmitteltrocknungsanlage der Firma MBraun verwendet.

Acetonitril (MeCN): a) Von Sigma-Aldrich ( $\leq 0.01\%$  Wasser, über Molsieb) erworben.

b) Mehrere Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (3Å) gelagert.

c) Trocknung durch MB-SPS 800, über Molekularsieb (3Å) gelagert.

Dichlormethan (DCM): a) Von Sigma-Aldrich ( $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molsieb) erworben.

b) Trocknung durch MB-SPS 800, über Molekularsieb (4Å) gelagert.

Diethylether ( $\text{Et}_2\text{O}$ ): a) Von Sigma-Aldrich ( $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molsieb) erworben.

b) Mehrere Tage über Natrium/Benzophenon zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und über Molsieb (4Å) gelagert.

c) Trocknung durch MB-SPS 800, über Molekularsieb (4Å) gelagert.

*N,N*-Dimethylformamid (DMF): Von Acros Organics (Extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molsieb) erworben.

Methanol (MeOH): Von Acros Organics (Extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molsieb) erworben.

Pyridin: a) Von Sigma-Aldrich ( $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molsieb) erworben.

b) Trocknung durch MB-SPS 800, über Molekularsieb (4Å) gelagert.

Tetrahydrofuran (THF): a) Mehrere Tage über Kaliumhydroxid vorgetrocknet, drei Tage über Kalium/Benzophenon zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und über Molsieb (4Å) gelagert.

b) Trocknung durch MB-SPS 800, über Molekularsieb (4Å) gelagert.

Toluol: Von Acros Organics (Extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molsieb) erworben.

## 7.1.5 Chromatographie

### 7.1.5.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionsverfolgung und Kontrolle der Säulenchromatographien wurden mit Kieselgel (Fluoreszenzindikator, 254 nm) beschichtete Aluminiumfolien (Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>, 0.2 mm Schichtdicke) verwendet. Die Laufstrecke betrug 4.1 cm. Alle R<sub>f</sub>-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion aller UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei Wellenlängen von 254 und 366 nm.

### 7.1.5.2 Anfärbereagenzien

Kaliumpermanganat-Lösung: Verbindungen mit Doppelbindung sowie ohne oder mit schwachem Chromophor wurden zusätzlich mit einem Gemisch aus Kaliumpermanganat, Kaliumbicarbonat, Natriumhydroxid und Wasser angefärbt.

Hanessian's-Stain: Einige Verbindungen wurden mit einer schwefelsauren Mischung aus Ammoniummolybdat und Cer(IV)-sulfat angefärbt.

Phosphathaltige Verbindungen: Phosphat- und phosphonathaltige Verbindungen wurden mit einer Mischung aus Hanessian's stain (s.o.) und salzsaurer Zinn(II)-chlorid-Lösung angefärbt.

Vanillin-Schwefelsäure: Verbindungen mit mehreren Hydroxidfunktionen wurden mit Hilfe einer schwefelsauren Vanillinlösung angefärbt.

Iod: Verbindungen, bei denen die o.g. Anfärbereagenzien keine Reaktion hervorriefen, wurden in einer mit Iodgas gesättigten Kammer entwickelt.

### 7.1.5.3 Säulenchromatographie

Affinitätschromatographie: Für säulenchromatographische Trennungen wurde Kieselgel der Firma Macherey-Nagel (Kieselgel 60 M, 0.04-0.063 mm, 230-400 mesh) verwendet.

Größenausschluss-Chromatographie: Für säulenchromatographische Trennungen wurde Sephadex® LH-20 der Firma Sigma oder GE Healthcare verwendet.

Umkehrphasenchromatographie (RP18-Chromatographie): Für die Reversed-Phase-Chromatography wurde Polygoprep® 100-50C<sub>18</sub> der Firma Macherey-Nagel als stationäre Phase verwendet.

### 7.1.5.4 Zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron®):

Unter Verwendung eines Chromatotrons® der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von bis zu 4 g chromatographiert. Als Trennmittel diente

gipshaltiges Kieselgel 60 PF254 (Merck Nr. 7749) in Schichtdicken von 1, 2 oder 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

## **7.1.6 Spektroskopie und Massenspektrometrie**

### **7.1.6.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR):**

Die bei Raumtemperatur erstellten NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie sowie des Instituts der Anorganischen Chemie des Departments Chemie an der Universität Hamburg aufgenommen. Hierfür wurden die folgenden Geräte genutzt: Varian Gemini 2000BB, Bruker Fourier 300, Bruker AMX 400, Bruker DRX 500 und Bruker AVIII 600. Die chemische Verschiebung  $\delta$  [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale bezogen, wobei  $\text{CDCl}_3$  auf 7.26 ppm ( $^1\text{H}$ ) bzw. 77.16 ppm ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{D}_2\text{O}$  auf 4.79 ppm ( $^1\text{H}$ ),  $\text{DMSO-d}_6$  auf 2.50 ppm ( $^1\text{H}$ ) bzw. 39.52 ppm ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{MeOD-d}_4$  auf 3.31 ppm ( $^1\text{H}$ ),  $\text{CD}_3\text{CN}$  auf 1.94 ppm ( $^1\text{H}$ ) bzw. 49.00 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) kalibriert wurden. Messungen in Gemischen aus  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}/\text{D}_2\text{O}$  wurden auf Methanol gelockt und wie diese o.g. kalibriert. Bei allen  $^{31}\text{P}$ -Spektren wurden die Signale zur Kalibrierung gegen einen externen 85%igen Phosphorsäurestandard angegeben.

### **7.1.6.2 Infrarotspektroskopie (IR):**

Die Messungen der IR-Spektren wurden an einem Alpha-P FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Verbindungen wurden als Reinsubstanzen durch abgeschwächte Totalreflexion (ATR) vermessen.

### **7.1.6.3 Massenspektrometrie (MS):**

Die Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Hamburg aufgenommen. Die EI-Massenspektren wurden an einem VG 70S EI doppelt fokussierenden Sektorfeldmassenspektrometer der Firma VG Analytical gemessen. Die hochaufgelösten (HR: high resolution) ESI-Messungen im negativen wie auch positiven Modus wurden an einem Agilent 6224 ESI-TOF-Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Die MALDI-Messungen erfolgten an einem Bruker UltrafleXtreme™ MALDI-TOF-TOF-Spektrometer, wobei 9-Aminoacridin (9AA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix dienten.

## **7.1.7 Weitere Geräte**

### **7.1.7.1 Gefriertrocknung**

Wässrige Lösungen wurden an einer Christ Alpha 2-4 LDPlus Gefriertrocknungsanlage in Kombination mit einer Drehschieberpumpe der Firma Vacuubrand lyophilisiert.

Zur Gefriertrocknung der immunbiologischen Proben wurde eine Lyovac GT2 der Firma Leybold-Heraeus verwendet.

### **7.1.7.2 Reinstwasseranlage**

Reinstwasser (Milli-Q) wurde durch ein arium® pro UV-Reinstwassersystem der Firma Sartorius bzw. bei den immunbiologischen Tests durch eine Water Distillation Unit 2004 der Firma GFL gewonnen.

### **7.1.7.3 Ultraschallbad**

Das Entgasen und Durchmischen von HPLC-Lösungsmitteln sowie das spezielle Behandeln von Hydrolyselösungen und Suspensionen erfolgte mit dem Ultraschallbad Sonorex RK512H der Firma Bandelin.

Bei den immunbiologischen Arbeiten wurde Sonorex Super der Firma Bandelin verwendet.

### **7.1.7.4 Zentrifugation**

Bei den Synthesen wurde zum Zentrifugieren eine eppendorf Centrifuge® 5418 R bei 14000 Umdrehungen/min bzw. eine IKA mini G eingesetzt.

Bei den immunbiologischen Arbeiten wurde zum Zentrifugieren eine eppendorf Centrifuge® 5810 R verwendet.

## **7.1.8 Immunbiologische Arbeiten**

### **7.1.8.1 Geräte**

Fluoreszenzmikroskopie	Evos FL Auto der Firma Life Technologies
IFN- $\gamma$ -ELISA-Reader	ELISA-Reader MRXII der Firma Dynex Technologies
FACS	LSR II der Firma BD Bioscience
Real-time PCR	Rotor-Gene RG-3000 der Firma Corbett Research

### 7.1.8.2 Kits und Reagenzien

Humaner IFN- $\gamma$ -ELISA	ELISA MAX <sup>®</sup> Standard SET Human IFN $\gamma$ der Firma Biolegend
Muriner IFN- $\gamma$ -ELISA	ELISA IFN- $\gamma$ murin der Firma R&D
qPCR-Kit	Systems KAPA PROBE FAST Universal der Firma peqlab
Zombie UV <sup>®</sup> Fixable Viability Kit	BioLegend
Accutase	PAN Biotech
Bicoll	Biochrom AG
Bovines Serum Albumin	Serva Electrophoresis GmbH
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH
IMDM	Sigma-Aldrich
PMA	Sigma Aldrich
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN
RPMI 1640	Gibco Life Technologies
Waschpuffer	Perm/Wash-Buffer der Firma BioLegend
X-VIVO <sup>®</sup> 15 (Mit Gentamycin)	Lonza Group Ltd.

### 7.1.8.3 Verbrauchsmaterial

Platte für Anti-Leishman.-Assay	8-well Nunc <sup>®</sup> Lab-Tek chamber slide
ELISA-Mikrotiterplatte	High-Binding 96-Well ELISA Mikrotiterplatte der Firma Greiner bio-one
Kultivierungsplatten	TPP <sup>®</sup> tissue culture plates 6-well flat bottom (6 Wells) bzw. Greiner bio-one (96 Wells)
Kulturflaschen	Produkte der Firmen Becton Dickenson oder Sarstedt
Neubauer-Zählkammer	Tiefe 0.1 mm, Fläche 2.5 $\mu\text{m}^2$ , der Firma Marienfeld-Superior
ZellScraper	Sarstedt

### 7.1.8.4 Puffer und Lösungen

ELISA-Substratpuffer	0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 5.5
----------------------	---

ELISA-TMB-Stammlösung	DMSO, 25 mM TMB
ELISA-Substratlösung	98.35% ELISA-Substratpuffer, 1.64% ELISA-TMB-Stammlösung, 0.01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)
NaPBS	6.7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3.3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 140 mM NaCl, pH 7.2
PBS	2.7 mM KCl, 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl
PBS/1% BSA	1% BSA in PBS, steril filtriert, Lagerung bei -20°C
ELISA-Blockpuffer	NaPBS, 2% FCS

### 7.1.8.5 Medien

<b>RPMI-Medium:</b>	500 mL RPMI 1640, 50 ml FCS, 5 mL L-Glutamin, 5 ml Natriumpyruvat, 500 µL β-Mercaptoethanol (Stock: 100 ml 0.9% NaCl+70 µl β-Mercaptoethanol), 2.5 ml Gentamycin (50 µg/mL)
<b>IMDM:</b>	55% IMDM (ohne Glutamin), 10% inaktiviertes FCS (30 min, 56°C), 5% Pferdeserum, 30% Überstand von L929 Zellen, 20 µg/mL Gentamycin
<b>RPMI+ (für THP1)</b>	88% RPMI-1640 mit 25 mM HEPES, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
<b>IMDM+</b>	87,5% RPMI 1640, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat, 0,5% β-Mercaptoethanol (Stock: 100 ml 0,9% NaCl + 70 µl β-Mercaptoethanol), 50 µg/mL Gentamycin
<b>X-VIVO® 15-Medium</b>	X-VIVO® 15 Medium, 1% Penicillin/Streptomycin

### 7.1.8.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer, Tiefe 0.1 mm, 2.5 µm<sup>2</sup>, Marienfeld, Deutschland) durchgeführt. Je 10 µL einer Zellsuspension von geeigneter Verdünnung (1:10 bis 1:100, v/v) in Trypanblau (Trypanblau 0.4%, Gibco, 1:10, v/v, verdünnt in PBS) wurden verwendet, vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Die Zellen wurden im Vornherein mit Trypanblau gefärbt, um die Unterscheidung lebender und toter Zellen zu ermöglichen. Zur Zellzahlbestimmung wurden jeweils nur lebendige Zellen gezählt.

### **7.1.8.7 Statistische Analysen**

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software PRISM® 6 der Firma Graphpad durchgeführt. Für die Bestimmung der Signifikanz wurde der *unpaired Student's t-test* verwendet.

### **7.1.8.8 Erreger**

*Leishmania major*: Die in dieser Arbeit verwendeten Leishmanien wurden von der Arbeitsgruppe Clos, BNITM, zur Verfügung gestellt. Infektion von murinen oder humanen Makrophagen wurden mit dem Isolat *Leishmania major*, 5ASKH (MHOM/TM/1973/5ASKH) durchgeführt.

*Mycobacterium tuberculosis*: Es wurden *Mykobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) des Typs H37Rv (ATCC 27294) verwendet, die vom Forschungszentrum Borstel (Arbeitsgruppe von Dr. Christoph Hölscher) zur Verfügung gestellt wurden.

### **7.1.8.9 Mäuse**

In dieser Arbeit wurden die Zellen von Hausmäusen der Art *Mus musculus* (Linneaus, 1958) verwendet. Alle murinen Zellen stammen von Mäusen aus Hauszucht des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg. Es handelt sich bei allen Mäusen um 8-14 Wochen alte Weibchen des Wildtyp-Mausstammes C57BL/6J. Die Tierversuche wurden unter den Voraussetzungen nach §8 des Tierschutzgesetzes Deutschland durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg genehmigt (46/13; 133/13)

## **7.2 Immunbiologische Assays**

Die folgenden immunbiologischen Tests wurden insbesondere durch Siew Ling Choy<sup>[115]</sup> und andere Mitarbeiter des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin Hamburg in der Arbeitsgruppe von Hanna Lotter durchgeführt. Einzelne Experimente wurden von mir unter der Anleitung der Mitarbeiter ausgeführt. Die Generierung, Bereitstellung und Präparation der Zellen und Erreger erfolgte durch die Mitarbeitern des BNITM.<sup>[46]</sup> Aus diesem Grund werden die Experimente und Tests im Folgenden nur kurz zusammengefasst.

### **7.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **7.2.1.1 Isolierung von Leukozyten aus humanem Spenderblut**

Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer genehmigt (PV3551). Frisches Spenderblut (15 mL) wurde zunächst bei Rt mit PBS (15 mL) vermischt und mit dem Gemisch Bicol (15 mL) überschichtet. Das heterogene Gemisch wurde daraufhin bei Rt 30 min zentrifugiert (1800 rpm) und die trübe von oben zweite Phase abgenommen. Nach Zugabe von PBS (add. 50 mL) wurde bei 4°C 20 min erneut zentrifugiert (1200 rpm) und der Überstand verworfen. Die Leukozyten-Pellets wurden in PBS (add. 20 mL) suspendiert und bei 4°C 12 min

zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abdekantiert und verworfen und die zurückgebliebenen Zellen in X-VIVO-15-Medium (1 mL) resuspendiert.

### **7.2.1.2 Isolierung von Leukozyten, Dendritischen Zellen und Knochenmarksmakrophagen aus murinem Knochenmarksgewebe**

Um Dendritische Zellen erhalten zu können, wurden zunächst Leukozyten aus dem Knochenmark von Tieren des Mäusestammes C57BL/6J entnommen. Dazu wurden Femur und Tibia der Hinterbeine entnommen und diese für 2 min in 2-Propanol (70%) sterilisiert. Nach der Epiphysenentfernung mit Abtrennung der knorpeligen Gelenkflächen wurden die Markräume mit RPMI-Medium gespült, um die Zellen herauszulösen. Die aufgefangene Suspension wurde 5-10 min auf Eis gelagert und der Überstand bei 4°C 8 min lang bei 1200 rpm sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in Medium (1 mL) resuspendiert und die Suspension filtriert. Der Rückstand wurde erneut in Medium (5 mL) suspendiert und die frischen Leukozyten zur weiteren Generierung von Dendritischen Zellen bzw. Knochenmarksmakrophagen verwendet.

Zur Herstellung von Dendritischen Zellen wurden  $4 \cdot 10^6$  der so erhaltenen Leukozyten entsprechend dem Protokoll von Lutz et al.<sup>[119]</sup> für sieben Tage in RPMI-Medium kultiviert und die so generierten Dendritischen Zellen entweder frisch verwendet oder steril in flüssigem Stickstoff gelagert. Im Fall der Verwendung von kryokonserviertem Zellmaterial wurden die Zellen nach dem Auftauen für eine Nacht in RPMI-Medium mit GM-CSF bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Verifizierung der Dendritischen Zellen wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie vorgenommen.

Zur Generierung von Knochenmarksmakrophagen (BMM) wurden die Leukozyten in IMDM<sup>+</sup> suspendiert und in einer Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 10 Tage inkubiert. Die ausdifferenzierten BMMs wurden anschließend mit warmem PBS gewaschen, mit Accutase abgelöst, in IMDM<sup>+</sup> aufgenommen, sedimentiert (1200 rpm, 4°C, 10 min) und erneut mit PBS gewaschen.

### **7.2.1.3 Isolierung von murinen Leukozyten aus Milz und Leber**

Zur Isolierung der murinen Leukozyten aus der Milz wurde diese zunächst der Maus entnommen und mit kaltem RPMI-Medium gewaschen. Anschließend wurde die Milz so lange mit RPMI-Medium gespült, bis sich eine helle Färbung des Organs ergab. Die erhaltene Suspension wurde anschließend bei 4°C und 1200 rpm 8 min lang pelletiert.

Zur Isolierung der murinen Leukozyten aus der Leber wurde diese zunächst der Maus entnommen, mit kaltem PBS gewaschen und mithilfe eines Falcon-Siebs zerrieben. Anschließend wurde mit kaltem PBS nachgespült und die erhaltene Suspension bei 4°C 8 min bei 1200 rpm

pelletiert. Das Pellet wurde in Pecoll® (80%) resuspendiert und mit Pecoll® (40%) überschichtet. Das Gemisch wurde bei 21°C 25 min bei 2000 rpm zentrifugiert und anschließend die obere gelbbraune Schicht zügig entfernt und verworfen. Der Lymphozytenring wurde abgetrennt, mit kaltem PBS suspendiert und bei 4°C 8 min bei 1200 rpm sedimentiert.

#### **7.2.1.4 Kultivierung von THP1-Zellen (hum.)**

Die humanen monozytischen THP1-Zellen (ATCC Katalognummer TIB-202) wurden aus dem Blut eines an der akuten monozytischen Leukämie erkrankten Patienten gewonnen.

Die erhaltenen THP1-Zellen wurden in der Zellkulturflasche in RPMI<sup>+</sup>-Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, alle fünf bis acht Tage sedimentiert (1200 rpm, 4°C, 8 min) und in RPMI<sup>+</sup>-Medium (1-5 mL) resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und erneut in eine Zellkulturflasche in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:4 ausgesät.

#### **7.2.1.5 Isolierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes, welche zur Bestimmung der Zelltoxizität verwendet wurden, wurden aus frischen menschlichen Blutproben gewonnen. Dazu wurde Biocoll (15 mL) mit einer Suspension aus menschlichem Blut in PBS (15 mL, 1:2, v/v) überschichtet und anschließend zentrifugiert (1800 rpm, Rt, 30 min). Die trübe von oben zweite Phase wurde entnommen und zweimal gewaschen. Dazu wurden die Zellen in kaltem PBS (add. 50 mL) suspendiert, zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 20 min), der Überstand verworfen und der Rückstand erneut suspendiert und zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 20 min). Schließlich wurde das entstandene Pellet in RPMI<sup>+</sup>-Medium (1 mL) gelöst und für den Zelltoxizitäts-Assay verwendet.

### **7.2.2 Zellbiologische Assays und Pathogen-Testssysteme**

#### **7.2.2.1 Zytokinexpressionsassay**

Für den Zytokinstimulationsassay wurden Dendritische Zellen ( $5 \cdot 10^4$ ) in RPMI<sup>+</sup>-Medium (50 µL pro Well) in Dublikaten oder Triplikaten in eine Mikrotiterplatte ausgesät und mit verschiedenen Probesubstanzen in verschiedenen Konzentrationen (0.01 µg/mL bis 20 µg/mL in DMSO) in RPMI<sup>+</sup>-Medium (50 µL) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 3 h inkubiert. Danach wurden die Lymphozyten ( $5 \cdot 10^5$ ) in RPMI<sup>+</sup>-Medium (100 µL pro Well) hinzugegeben und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 48 h bis 72 h inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (24 h - 48 h) wurde jeweils ein Überstand (60 µL - 140 µL pro Well) abgenommen und mithilfe eines IFN-γ-ELISA ausgewertet.

### 7.2.2.2 IFN- $\gamma$ -ELISA

Für den IFN- $\gamma$ -ELISA wurde zunächst die Polystyrol-Mikrotiterplatte (96 Well) mit dem *Capture*-Antikörper beschichtet. Dafür wurde dieser in PBS (1:180, v/v) gelöst, in die Wells (50  $\mu$ L pro Well) gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit Tween (0.05% in PBS) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit BSA (1% in PBS) bei Rt für 2 h blockiert und nach dem Entfernen des Blockpuffers wurde der Überstand (60  $\mu$ L - 140  $\mu$ L) aus den vorangegangenen Experimenten (Kap. 7.2.2.1) entweder verdünnt (in 0.1%-BSA/PBS) oder unverdünnt (50  $\mu$ L pro Well) hinzugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 0.05%-Tween/PBS wurde der IFN- $\gamma$ -Detektionsantikörper in 0.1%-BSA/PBS (1:180, v/v) hinzugegeben und bei Rt für 2 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 0.05%-Tween/PBS wurde Streptavidin-HRP in 0.1%-BSA/PBS (1:200, v/v, 50  $\mu$ L pro Well) hinzugegeben und bei Rt für 20 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 0.05%-Tween/PBS wurde eine Mischung aus Wasserstoffperoxid (30% in Wasser), TMB-Stammlösung und frischem Substratpuffer (100  $\mu$ L, Wasserstoffperoxid/TMB-Stammlösung/Substratpuffer, 0.6:100:6, v/v/v) und nach vollständiger Blaufärbung der Probenansätze zur Beendigung der Reaktion verdünnte Schwefelsäure (2M, 25  $\mu$ L pro Well) hinzugegeben. Die nun gelbgefärbten Proben wurden daraufhin mit dem ELISA-Plattenleser bei 450 nm spektrometrisch vermessen.

### 7.2.2.3 Anti-Leishmanien-Assays

#### 7.2.2.3.1 *Anti-Leishmanien-Assays mit murinen Makrophagen*

Murine Knochenmarksmakrophagen ( $1.5 \cdot 10^6$  BMMs) wurden in IMDM<sup>+</sup> (200  $\mu$ L) in eine Mikrotiterplatte ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 72 h inkubiert. Anschließend wurden drei Waschschriffe mit warmem PBS durchgeführt. Die Zellen wurden mit  $7.5 \cdot 10^6$  metazyklische Promastigoten von *Leishmania major* infiziert (Infektionsverhältnis 1:5) und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 4 h inkubiert. Daraufhin wurden drei Waschschriffe mit warmem PBS durchgeführt, verschiedene Probesubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen in IMDM<sup>+</sup> (1 mL, ohne M-CSF) hinzugegeben und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 48 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit warmem PBS wurden die Zellen mit Accutase (150  $\mu$ L) bei Rt für 10 min inkubiert, anschließend Medium (1 mL) hinzugegeben und die Zellen mit einem Zell-Scraper herausgelöst. Die gDNA der infizierten BMMs wurde anschließend mithilfe eines QIAamp DNA Mini Kits extrahiert und die Leishmanienlast in den Proben mittels einer qPCR mit TaqMan-Sonden quantitativ bestimmt.

#### 7.2.2.3.2 *Anti-Leishmanien-Assays mit humanen Makrophagen der THP1-Zelllinie*

Zunächst wurden die Monozyten ( $6 \cdot 10^5$  Zellen) in RPMI<sup>+</sup>-Medium (500  $\mu$ L) auf einer Titerplatte ausgesät, mit PMA (50 ng/mL) versetzt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 72 h inkubiert. Die nun differenzierten Makrophagen wurden daraufhin dreimal mit PBS gewaschen, anschließend mit

metazyklischen Promastigoten von *Leishmania major* in IMDM (300 µL) versetzt (Multiplizität der Infektion: 8) und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 4 h inkubiert. Dann wurden erneut drei Waschschrte mit PBS durchgeführt und anschließend die Probesubstanzen in verschiedenen Konzentrationen in RPMI<sup>+</sup>-Medium (1 mL) hinzugegeben und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 48 h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Zellrasen erneut mit warmem PBS gewaschen, mit Accutase (150 µL) für 10 min bei Rt inkubiert und schließlich RPMI<sup>+</sup>-Medium (1 mL) hinzugegeben. Der Zellrasen wurde mithilfe eines Zellscrapers abgelöst und die Parasitenlast mittels isolierter gDNA über qPCR mit TaqMan-Sonden bestimmt.

#### **7.2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus *L. major*-infizierten Makrophagen sowie deren quantitativen Bestimmung mittels PCR**

Die gDNA aus den durch *L. major* infizierten humanen THP1-Makrophagen wurde mithilfe eines QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben isoliert. Die gDNA wurde in 30 µL - 60 µL Elutionspuffer eluiert und die gewonnene gDNA in der quantitativen *real-time* (q)PCR mit TaqMan Sonden quantitativ analysiert. Dafür wurde das Kit KAPA PROBE FAST Universal von pqlab verwendet.

#### **7.2.2.5 Anti-Mykobakterien-Assays**

Für die Mtb-Infektionsassays wurden  $8 \cdot 10^4$  Zellen murine BMM pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DMDM<sup>+</sup>-Medium (200 µL) gewaschen und mit Mtb ( $4 \cdot 10^4$ , DMDM<sup>+</sup>-Medium) infiziert (Multiplizität der Infektion (MOI): 0.5). Nach 4 h bei Rt wurde die Zellen erneut gewaschen und die Verbindungen **2**, **19a-d**, **D-80** und **L-80** in Konzentrationen von 0.1 µg/mL bis 10 µg/mL hinzugegeben. Nach einer Dauer von 48 h wurden daraufhin die Zellen lysiert und eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000, v/v) erstellt, die auf Rinderserum-Agarplatten ausplattiert wurden. Die Platten wurden bei 37°C für vier Wochen bebrütet. Nach dieser Zeit wurden die entstandenen Kolonien gezählt und daraus die Koloniebildende Einheit (CFU) berechnet.

#### **7.2.2.6 Hämolyse-Assay**

Zur Überprüfung der hämolytischen Aktivität der synthetisierten Probesubstanzen wurden diese mit humanem Blut in PBS (1:10, v/v) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Probesubstanzen in verschiedenen Konzentrationen (0.1 µg - 20 µg/mL) zugegeben. Nach Zentrifugation (3200 rpm, 10 min) wurde ein Überstand (50 µL) entnommen und photometrisch (530 nm, Referenzfilter 630 nm) vermessen.

### **7.2.2.7 Zytotoxizitäts-Assay mit murinen Milz-Leukozyten**

Zur Bestimmung der Zelltoxizität wurden die wie in Kapitel 7.2.1.2 beschriebenen isolierten Milz-Leukozyten ( $10^6$  Zellen) in RPMI<sup>+</sup>-Medium (50  $\mu$ L) auf einer Mikrotiterplatte ausgesät und die Probesubstanzen **1**, **2**, **19a-d**, **D-80** und **L-80** (0.1  $\mu$ g/mL - 10  $\mu$ g/mL) hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 12 h, 24 h oder 48 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS (1 mL) gewaschen, zentrifugiert (1600 rpm, 4°C, 4 min) und mit PBS (100  $\mu$ L) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben erneut mit PBS (1 mL) gewaschen und zentrifugiert (1600 rpm, 4°C, 4 min). Der Rückstand wurde erneut mit PBS (150  $\mu$ L) resuspendiert und mithilfe von FACS analysiert.

### **7.2.2.8 Zytotoxizitäts-Assay mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)**

Zur Bestimmung der Zelltoxizität wurden die wie in Kapitel 7.2.1.5 beschrieben isolierten PBMCs ( $10^6$  Zellen) in RPMI<sup>+</sup>-Medium (50  $\mu$ L) auf einer Mikrotiterplatte ausgesät und verschiedene Probesubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen (0.1  $\mu$ g/mL - 10  $\mu$ g/mL) hinzugegeben und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 12 h, 24 h oder 48 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS (1 mL) gewaschen, zentrifugiert (1600 rpm, 4°C, 4 min) und der Rückstand in PBS (100  $\mu$ L) resuspendiert. Es folgte eine Färbung mit ZombieUV<sup>®</sup> (0.3  $\mu$ L) in der Dunkelheit bei Rt für 15 min. Schließlich wurde der Zellrasen mit PBS (1 mL) gewaschen, zentrifugiert (1600 rpm, 4°C, 4 min), das Pellet mit PBS (150  $\mu$ L) resuspendiert und mithilfe von FACS analysiert.

## 7.3 Synthesen

### 7.3.1 Allgemeine Versuchsvorschriften

#### 7.3.1.1 AAV 1: Kupplung von *myo*-Inositol-Phosphoramiditen und Glycerinbausteinen zu vollständig geschützten Phosphattriestern

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einem zuvor mit Toluol (3x 1.0 mL) koevaporierten Gemisch des jeweiligen Phosphoramidits (1.0 Äquiv.) und der jeweiligen Glycerinverbindung oder einem entsprechenden Derivat (3.5 Äquiv.) in abs. Acetonitril wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei 0°C und dann 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 20 min bei 0°C gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient) gereinigt.

#### 7.3.1.2 AAV 2: Debenzylierungen

Zur Entfernung gelösten Restsauerstoffs im Lösungsmittel wurde Stickstoff für 20 min durch das zu verwendende abs. Tetrahydrofuran geleitet. Darin wurde der jeweilige Phosphattriester (1.00 Äquiv.) und Palladium-black® suspendiert und für 3-7 Tage bei Rt in einer Wasserstoffatmosphäre (ca. 1 bar) gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch (2:1, v/v) aufgenommen. Die Lösung wurde zentrifugiert und das Lösungsmittel des Zentrifugats unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Sephadex® LH-20, Dichlormethan/Methanol/Wasser, 10:5:1, v/v/v) gereinigt.

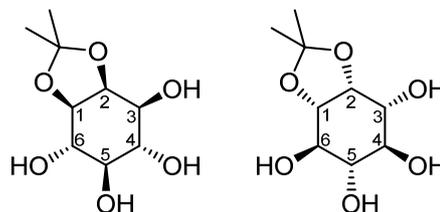
## 7.3.2 Synthese der Generation-I-PIs

### 7.3.2.1 Benzyl: Synthese der Generation-I-Vorläufer

#### 7.3.2.1.1 Synthese des Diols (*rac*)-23

##### 7.3.2.1.1.1 Synthese von *D,L*-1,2-Isopropyliden-*myo*-inositol (*rac*)-26

*myo*-Inositol **25** (10 g, 56 mmol, 0.50 Äquiv.), *para*-Toluolsulfonsäure (38 mg, 0.22 mmol, 0.0020 Äquiv.) und 2,2-Dimethoxypropan (38 mL, 32 g, 0.31 mol, 2.8 Äquiv.) in DMSO (41 mL) wurden 75 min bei 110°C gerührt. Während



(*rac*)-23

der Reaktion wurden Methanol und Wasser destillativ entfernt. Anschließend wurde erneut *myo*-Inositol (10 g, 56 mmol, 0.50 Äquiv.) zur Reaktionslösung gegeben. Nachdem für 90 min bei 120°C gerührt wurde, wurde CaCO<sub>3</sub> (81 mg) hinzugegeben und auf Rt abgekühlt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand aus Ethanol (0.6 L) umkristallisiert. Die Suspension wurde heiß filtriert und das Filtrat eingengt. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde filtriert und mit Ethanol gewaschen.

**Ausbeute:** Es konnten 11.7 g (53 mmol, 48%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse:** 220.22 g/mol, **Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>.

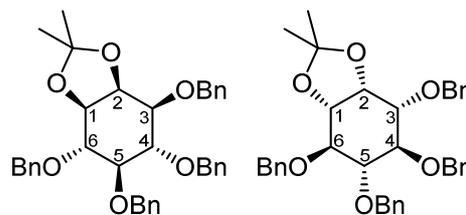
**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 4.51 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.6 Hz, 1H, H-2), 4.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, 1H, H-1), 3.88 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.2 Hz, 1H, H-3), 3.70 - 3.57 (m, 2H, H-4, H-6), 3.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, 1H, H-5), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(101 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 25.1 (CH<sub>3</sub>), 27.3 (CH<sub>3</sub>), 69.4 (C-3), 72.2 (C-4), 72.5 (C-5), 74.6 (C-6), 76.0 (C-2), 78.5 (C-1), 110.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3468, 3416, 3334, 3231, 2881, 1375, 1347, 1094, 1060, 1013, 870, 611, 446, 416.

**MS** (EI, pos.) *m/z*: 169.08 [M-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>, 147.08 [M-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>.

##### 7.3.2.1.1.2 Synthese von *D,L*-1,2-Isopropyliden-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-27

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu Natriumhydrid (5.03 g, 210 mmol, 9.25 Äquiv.) und abs. DMF (75 mL) wurde bei 0°C *D,L*-1,2-Isopropyliden-*myo*-inositol (*rac*)-**26** (5.00 g, 22.7 mmol, 1.00 Äquiv.) gegeben



(*rac*)-27

und 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde tropfenweise Benzylbromid (16.3 mL, 23.5 g, 137 mmol, 6.04 Äquiv.) hinzugegeben. Nachdem die Reaktionslösung 18 h bei Rt gerührt wurde,

wurde Methanol (10 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan (10 mL) aufgenommen, der ausgefallene Feststoff wurde filtriert und das Filtrat mit Wasser (2x 85 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol, 19:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 19.5 g eines verunreinigten gelben Öls erhalten werden, welches ohne weitere Reinigung weiterverwendet wurde. **Molmasse:** 580.72 g/mol, **Summenformel:** C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.44 - 7.25 (m, 20H, Bn-H), 5.00 - 4.72 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.5 Hz, 3.9 Hz, 1H, H-2), 4.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 1H, H-3), 3.97 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, 1H, H-6), 3.81 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 6.9 Hz, 1H, H-4), 3.73 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, 3.8 Hz, 1H, H-1), 3.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, 1H, H-5), 1.54 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 138.6 (Bn-C), 138.5 (Bn-C), 138.5 (Bn-C), 138.2 (Bn-C), 128.6 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.4 (4x Bn-C), 128.3 (2x Bn-C), 128.3 (2x Bn-C), 128.1 (2x Bn-C), 128.0 (4x Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.6 (Bn-C), 127.5 (Bn-C), 109.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 82.6 (C-4), 82.1 (C-5), 80.9 (C-6), 79.1 (C-3), 77.2 (C-1), 75.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 74.5 (C-2), 73.9 (Bn-CH<sub>2</sub>), 73.4 (Bn-CH<sub>2</sub>), 27.8 (CH<sub>3</sub>), 25.8 (CH<sub>3</sub>).

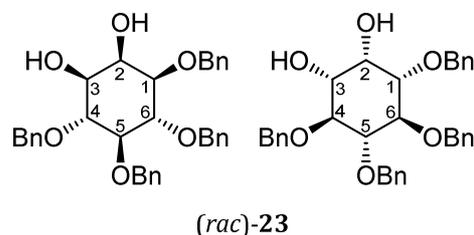
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3063, 3029, 2984, 2925, 1779, 1741, 1496, 1453, 1379, 1084, 1066, 1042, 907, 866, 731, 694, 604.

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 581.2898 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 581.2893 [M+H]<sup>+</sup>.

**DC:** R<sub>F</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 4:1, v/v) = 0.5, R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan/Methanol, 19:1, v/v) = 0.3.

#### 7.3.2.1.1.3 Synthese von *D,L*-1,4,5,6-tetra-*O*-Benzyl-myoinositol (*rac*)-**23**

Zu *D,L*-1,2-Isopropyliden-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myoinositol (*rac*)-**27** (19.5 g, 22.0 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde Essigsäure (80%, 475 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 72 h bei Rt gerührt und anschließend mit Natronlauge (2 mol/mL, 350 mL) versetzt. Der



ausgefallene weiße Feststoff wurde filtriert und der Rückstand in Dichlormethan (100 mL) gelöst und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 2:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** 10.3 g (19.1 mmol, 85% über zwei Stufen) eines weißen Feststoffs. **Molmasse:** 540.66 g/mol, **Summenformel:** C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.39 - 7.27 (m, 20H, Bn-H), 5.00 - 4.71 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.21 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, H-2), 3.97 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 3.54 - 3.46 (m, 3H, H-1, H-3, H-5); <sup>13</sup>C-NMR:(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 138.6 (Bn-C), 138.5 (Bn-C), 138.4 (Bn-C), 138.4 (Bn-C), 137.7 (Bn-C), 128.6 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 83.3 (C-5), 81.6 (C-6), 81.3 (C-4), 80.0 (C-3), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 71.7 (C-1), 69.1 (C-2).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3386, 3309, 3063, 2851, 1604, 1408, 1360, 1215, 1151, 1091, 1054, 1008, 940, 906, 753, 726, 708, 694, 636, 569.

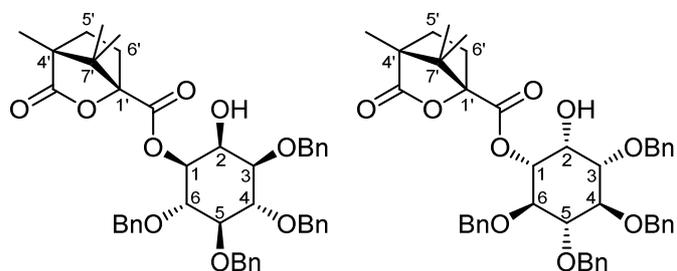
**HMS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 541.2585, gef.: 541.2582 (M+H<sup>+</sup>).

**DC:** R<sub>F</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 2:1, v/v): 0.3.

### 7.3.2.1.2 Trennung der Enantiomere mittels Camphanoylgruppe

#### 7.3.2.1.2.1 Synthese von D,L-1-((1'S)-(-)-Camphanoyl)-3,4,5,6-tetra-O-benzylmyo-Inositol (mix)-32

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von D,L-1,4,5,6-tetra-O-benzylmyo-Inositol (*rac*)-**23** (40.6 g, 75.1 mmol, 1.00 Äquiv.), abs. Pyridin (12.1 mL, 162 mmol, 2.16 Äquiv.) und einer



(*mix*)-**32**

katalytischen Menge 4-DMAP in abs. Dichlormethan (85 mL) wurde bei 0°C (1*S*)-(-)-Camphansäurechlorid (16.3 g, 75.1 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Rt erwärmt und für 14 h bei Rt gerührt. Als DC kein verbliebenes Edukt mehr anzeigte, wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan (1 L) verdünnt und mit ges. wässr. Ammoniumchloridlösung (350 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether-Ethylacetat-Gradient 20% - 33% sowie Dichlormethan/Diethylether 13:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** 48 g (66 mmol, 89%) eines weißen Feststoffes als Mischung zweier Diastereomere (*mix*)-**32**. **Molmasse:** 720.86 g/mol, **Summenformel:** C<sub>44</sub>H<sub>48</sub>O<sub>9</sub>.

**Analytische Daten zum Diastereomergemisch (mix)-32:**  $^1\text{H-NMR}$ :(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.35 - 7.22 (m, 20 H, Bn-H), 4.95 - 4.71 (m, 8 H, Bn- $\text{CH}_2$ ), 4.68 (dd, 1H,  $^3J_{\text{H,H}} = 11.4$  Hz, 3.6 Hz, H-1), 4.32 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz, 0.5H, H-2), 4.28 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz, 0.5H, H-2), 4.15 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.4$  Hz, 0.5H, H-6), 4.13 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.4$  Hz, 0.5H, H-6), 3.97 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.4$  Hz, 0.5H, H-4), 3.95 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.4$  Hz, 0.5H, H-4), 3.60 - 3.52 (m, 2H, H-3, H-5), 2.42 - 2.26 (m, 1H, H-6'), 2.02 - 1.84 (m, 2H, H-5', H-6'), 1.71 - 1.62 (m, 1H, H-5'), 1.11 (s, 1.5H, C-1'- $\text{CH}_3$ ), 1.10 (s, 1.5H,  $\underline{\text{C}}_{\text{quart}}\text{CH}_3$ ), 1.08 (s, 1.5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.01 (s, 1.5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.98 (s, 1.5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.90 (s, 1.5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$ :(126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 138.5 (Bn-C), 138.4 (Bn-C), 138.3 (Bn-C), 138.2 (Bn-C), 128.6 (Bn-C), 128.6 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.6 (Bn-C), 127.5 (Bn-C), 127.3 (Bn-C), 91.0 (2x C-4'), 83.0 (2x C-5), 81.1 (C-4), 81.1 (C-4), 79.9 (C-6), 79.9 (C-6), 78.4 (C-3), 78.4 (C-3), 75.5 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 75.5 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 74.8 (C-1), 74.7 (C-1), 73.1 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 73.1 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 67.7 (C-2), 67.4 (C-2), 54.8 (C-7'b), 54.4 (C-7'a), 30.7 (C-6'b), 30.6 (C-6'a), 29.1 (C-5'b), 28.8 (C-5'a), 16.7 ( $\text{CH}_3$ ), 16.7 ( $\text{CH}_3$ ), 16.6 ( $\text{CH}_3$ ), 16.5 ( $\text{CH}_3$ ), 9.8 (C-4'- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 9.7 (C-4'- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

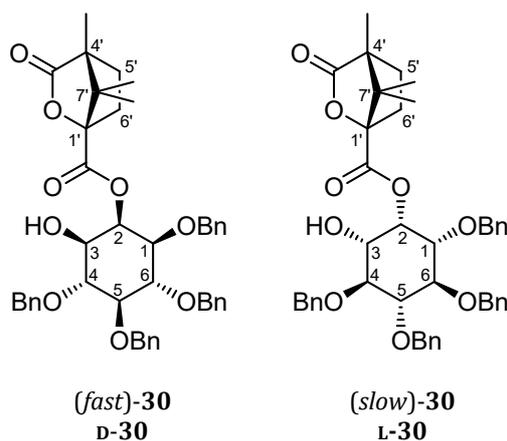
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3639, 2878, 1780, 1742, 1604, 1496, 1452, 1398, 1362, 1308, 1263, 1221, 1166, 1129, 1062, 730, 693, 454, 413.

**HR-MS:** (ESI, pos.)  $m/z$ : ber.: 743.3191, gef.: 743.3190 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ).

**DC:**  $R_f$ -Wert (Petrolether/Ethylacetat 2:1): 0.5.

### 7.3.2.1.2.2 Synthese von *D*-2-(1'S)-(-)-Camphanoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myo-Inositol **D-30** und *L*-2-(1'S)-(-)-Camphanoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myo-Inositol **L-30**

**Variante 1:** Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung aus Diastereomergemisch *D,L*-1-*O*-((1*S*)-(-)-Camphanoyl)-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myo-Inositol (**mix**)-32 (264 mg, 0.366 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (2 mL) wurde abs. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (0.109 mL, 111 mg, 1.34 mmol, 3.66 Äquiv.) getropft und die



Reaktionslösung für 4h bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. wässr. Ammoniumchloridlösung (3 mL) beendet und die Reaktionslösung mit Dichlormethan (3 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Ethylacetat-Gradient-25% - 50%; Dichlormethan/Diethylether, 13:1, v/v) gereinigt.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung aus Diastereomergemisch *D,L*-1-*O*-((1*S*)-(-)-Camphanoyl)-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-Inositol (*mix*)-**32** (35.6 g, 49.4 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (270 mL) wurde abs. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (14.7 mL, 15.0 g, 181 mmol, 3.66 Äquiv.) getropft und die Reaktionslösung für 4h bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. wässr. Ammoniumchloridlösung (270 mL) beendet und die Reaktionslösung mit Dichlormethan (270 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient-25% - 50%; Dichlormethan/Diethylether, 13:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** *Variante 1:* 30 mg (41.6 μmol, 11%) **D-30** als farbloses Öl, 65 mg (90.2 μmol, 25%) **L-30** als farblosen Schaum, sowie 50 mg (69.4 μmol, 19.0%) eines Diastereomergemisches aus **32** als farbloses Öl. *Variante 2:* 12.6 g (17.5 mmol, 35%) eines Diastereomergemisches aus **32** als farbloses Öl, 10.5 g (14.6 mmol, 30%) **D-30** als farbloser Schaum sowie 9.7 g (13.5 mmol, 27%) **L-30** als farbloser Schaum. **Molmasse:** 720.86 g/mol, **Summenformel:** C<sub>44</sub>H<sub>48</sub>O<sub>9</sub>.

**Analytische Daten** zu Diastereomer **D-30:** **<sup>1</sup>H-NMR:**(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.36 - 7.23 (m, 20H, Bn-H), 5.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-2), 5.01 - 4.52 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, 1H, H-4), 3.76 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, 1H, H-6), 3.63 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, 2.7 Hz, 1H, H-1), 3.57 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, 2.7 Hz, 1H, H-3), 3.52 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.4 Hz, 1H, H-5), 2.46 - 2.37 (m, 1H, H-6'), 1.95 - 1.85 (m, 1H, H-6'), 1.72-1.63 (m, 1H, H-5'), 1.11 (s, 3H, C<sub>quart</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.93 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR:**(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 178.4 (C=O), 166.8 (C=O), 138.4 (Bn-C), 138.3 (Bn-C), 138.2 (Bn-C), 137.4 (Bn-C), 128.7 (2x Bn-C), 128.4 (2x Bn-C), 128.4 (2x Bn-C), 128.3 (3x Bn-C), 128.2 (2x Bn-C), 128.1 (2x Bn-C), 128.0 (2x Bn-C), 128.0 (2x Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 91.3 (C-4'), 83.1 (C-5), 81.6 (C-4), 81.0 (C-6), 78.3 (C-3), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.9 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.6 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.5 (Bn-CH<sub>2</sub>), 70.3 (C-2), 69.7 (C-1), 55.0 (C-7'), 54.5 (C-1'), 30.8 (C-6'), 29.0 (C-5'), 16.6 (CH<sub>3</sub>), 16.6 (CH<sub>3</sub>), 9.8 (CH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3437, 3030, 2877, 1787, 1756, 1603, 1585, 1496, 1453, 1397, 1359, 1333, 1308, 1263, 1058, 1017, 932, 736, 696.

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 743.3191 [M+Na<sup>+</sup>], gef.: 743.3190 [M+Na<sup>+</sup>].

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{24} = 1.76^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.25).

**DC:** R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan/Diethylether 10:1): 0.3.

**Analytische Daten** zu Diastereomer **L-30:** **<sup>1</sup>H-NMR:**(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.39 - 7.25 (m, 20H, Bn-H), 5.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-2), 4.98 - 4.51 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.66 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 3.61 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 2.6 Hz, H-1), 3.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz,

2.6 Hz, 1H, H-3), 3.53 (t,  $^3J_{H,H} = 9.5$  Hz, 1H, H-5), 2.36 - 2.26 (m, 1H, H-6'), 2.04 - 1.94 (m, 1H, H-5'), 1.95-1.85 (m, 1H, H-6'), 1.73 - 1.64 (m, 1H, H-5'), 1.11 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 1.04 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 0.84 (s, 1H, CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 178.2 (C=O), 166.7 (C=O), 138.4 (Bn-C), 138.3 (Bn-C), 138.1 (Bn-C), 138.1 (Bn-C), 137.4 (Bn-C), 128.7 (2x Bn-C), 128.5 (2x Bn-C), 128.4 (2x Bn-C), 128.3 (2x Bn-C), 128.3 (2x Bn-C), 128.1 (2x Bn-C), 128.0 (2x Bn-C), 128.0 (2x Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 91.3 (C-4'), 83.2 (C-5), 81.9 (C-4), 80.3 (C-6), 78.1 (C-3), 76.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 70.2 (C-2), 69.6 (C-1), 54.9 (C-7'), 54.3 (C-1'), 30.7 (C-6'), 29.0 (C-5'), 16.8 (CH<sub>3</sub>), 16.5 (CH<sub>3</sub>), 9.8 (CH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3540, 3029, 2878, 1780, 1742, 1604, 1497, 1452, 1399, 1361, 1221, 1166, 1128, 1106, 1087, 1061, 1026, 1017, 995, 730, 693, 454.

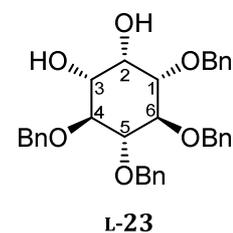
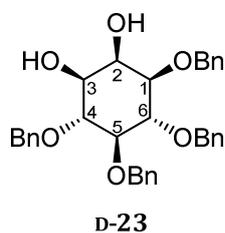
**HR-MS** (ESI, pos.)  $m/z$ : ber.: 743.3191 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 743.3190 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -16.72^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c$  1.25).

**DC:** R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan/Diethylether 10:1): 0.3.

### 7.3.2.1.2.3 Synthese von D-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inositol **D-23** und L-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inositol **L-23**

*Variante 1:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von D-2-O-((1'S)-(-)-Camphanoyl)-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inositol **D-30** (9.5 g, 13 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs.



THF (0.12 L) wurde bei Rt methanolische Natriumhydroxidlösung (0.12 L, 2.0 mol/L) getropft. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei Rt gerührt und anschließend mit konz. Salzsäure (20 mL) auf einen pH-Wert von ca. 8 gebracht. Ethylacetat (0.21 L) wurde hinzugegeben und die Lösung mit ges. Natriumchloridlösung (3x 0.21 L) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde langsam aus einer Mischung von Petrolether und Ethylacetat (0.21 L, 1:1, v/v) umkristallisiert.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von L-2-O-((1'S)-(-)-Camphanoyl)-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inositol **L-30** (2.1 g, 3.0 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. THF (30 mL) wurde bei Rt methanolische Natriumhydroxidlösung (15 mL, 2.0 mol/L) getropft. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei Rt gerührt und anschließend mit konz. Salzsäure (4 mL) auf einen pH-Wert von ca. 8 gebracht. Ethylacetat (40 mL) wurde hinzugegeben und die Lösung mit ges. Natriumchloridlösung (3x 40 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das

Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde langsam aus einer Mischung von Petrolether und Ethylacetat (46 mL, 1:1, v/v) umkristallisiert.

**Ausbeute:** *Variante 1:* Es konnten 6.5 g (12 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden. *Variante 2:* Es konnten 1.5 g (2.8 mmol, 93%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse:** 540.66 g/mol, **Summenformel:** C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>.

**Analytische Daten zu D-23:** **<sup>1</sup>H-NMR:**(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.38 - 7.28 (m, 20H, Bn-H), 4.92 - 4.74 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.21 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, H-2), 3.97 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 3.51 - 3.46 (m, 3H, H-1, H-3, H-5); **<sup>13</sup>C-NMR:**(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 138.6 (Bn-C), 138.5 (Bn-C), 138.4 (Bn-C), 138.4 (Bn-C), 137.8 (Bn-C), 128.6 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.6 (Bn-C), 83.2 (C-5), 81.7 (C-6), 81.3 (C-4), 80.0 (C-3), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.6 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 71.8 (C-1), 69.2 (C-2).

**HMS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 541.2585, gef.: 541.2582 (M+H<sup>+</sup>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3386, 3309, 3063, 2851, 1604, 1408, 1360, 1215, 1151, 1091, 1054, 1008, 940, 906, 753, 726, 708, 694, 636, 569.

**DC:** R<sub>F</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 2:1, v/v): 0.3.

**Drehwert D-23:**  $[\alpha]_D^{23} = 21.2^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.5);

**Drehwert L-23:**  $[\alpha]_D^{23} = -24.1^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.5).

### 7.3.2.1.3 2-O-Acylierung

#### 7.3.2.1.3.1 Synthese von D,L-1-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol (*rac*)-37

Die Reaktion wurde unter Stickstoff

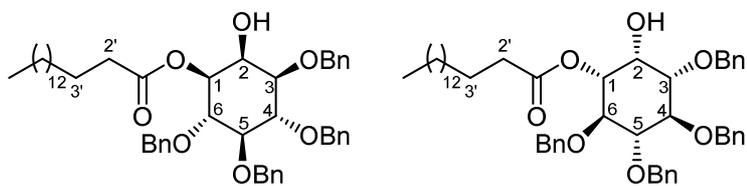
als Inertgas durchgeführt, um

Feuchtigkeit auszuschließen. Zu

D,L-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol (*rac*)-23

(500 mg,

0.925 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs.



(*rac*)-37

Pyridin (4.5 mL) wurde bei 0°C Palmitinsäurechlorid **36** (0.309 mL, 280 mg, 1.02 mmol, 1.10 Äquiv.) getropft und 17 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol (3x1.5 mL) und Dichlormethan (1.5 mL) koevaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (4 mL) gelöst und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (4 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das

Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat-Petrolether-Gradient 20% - 33%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 544 mg (0.698 mmol, 75%) eines weißen Feststoffs erhalten werden. 779.07 g/mol, **Summenformel:** C<sub>50</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.40 - 7.21 (m, 20H, Bn-H), 4.94 - 4.67 (m, 9H, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1), 4.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7Hz, 1H, H-2), 4.08 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, 1H, H-6), 3.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.60 - 3.50 (m, 2H, H-3, H-5), 2.42 - 2.19 (m, 2H, H-2'), 1.66 - 1.50 (m, 2H, H-3'), 1.33 - 1.19 (m, 24H, -CH<sub>2</sub>), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 173.4 (C=O), 138.7 (Bn-C), 138.7 (Bn-C), 138.6 (Bn-C), 137.7 (Bn-C), 128.7 (2x Bn-C), 128.5 (3x Bn-C), 128.5 (2x Bn-C), 128.2 (2x Bn-C), 128.1 (4x Bn-C), 127.8 (3x Bn-C), 127.7 (2x Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 83.3 (C-6), 81.3 (C-4), 80.1 (C-5), 79.3 (C-3), 76.11 (2x Bn-CH<sub>2</sub>), 75.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 73.2 (C-1), 73.1 (Bn-CH<sub>2</sub>), 68.1 (C-2), 34.5 (C-2'), 32.1 (C-3'), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 4:1, v/v): 0.4.

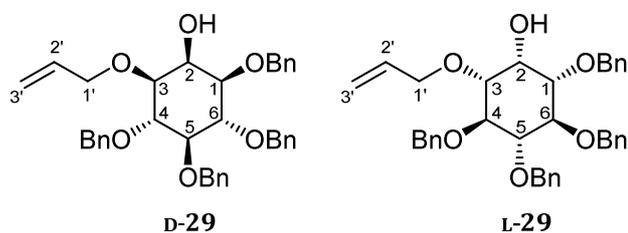
### 7.3.2.1.3.2 Synthese von *D,L*-3-*O*-Allyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**29**, *L*-3-*O*-Allyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **L-29** und *D*-3-*O*-Allyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-29**

*Variante 1:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. *D,L*-1,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**23**

(10.3 g, 19.1 mmol, 1.00 Äquiv.) und

Dibutylzinnoxid (5.22 g, 21.0 mmol, 1.10 Äquiv.) wurden in abs. Toluol (375 mL) gelöst und für 3h zum Rückfluss erhitzt. Das bei der Reaktion entstehende Wasser wurde während der Reaktion mit Hilfe eines Wasserabscheiders entfernt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in abs. DMF (180 mL) gelöst und Caesiumfluorid (8.70 g, 57.3 mmol, 3.00 Äquiv.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 5°C gekühlt und Allylbromid (3.00 g, 2.14 mL, 24.8 mmol, 1.29 Äquiv.) zugetropft. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Ethylacetat (360 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde wiederum mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2x40 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat 4:1, v/v) gereinigt.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde entsprechend der *Variante 1* durchgeführt. Es wurden 903 mg *L*-1,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **L-23** (1.67 mmol), 456 mg Dibutylzinnoxid (1.83 mmol),



0.19 mL Allylbromid (266 mg, 2.20 mmol), 768 mg Caesiumfluorid (5.05 mmol), 34 mL abs. Toluol und 16 mL abs. Dimethylformamid verwendet. Für die Aufarbeitung wurde mit 30 mL Ethylacetat extrahiert, mit 12 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 25-50%) gereinigt.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde entsprechend der *Variante 1* durchgeführt. Es wurden 1.19 g D-1,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-23** (2.20 mmol), 635 mg Dibutylzinnoxid (2.55 mmol), 0.25 mL Allylbromid (350 mg, 2.89 mmol), 1.01 g Caesiumfluorid (6.64 mmol), 47 mL abs. Toluol und 21 mL abs. Dimethylformamid verwendet. Für die Aufarbeitung wurde mit 40 mL Ethylacetat extrahiert, mit 60 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 4:1, v/v) gereinigt.

*Variante 4:* Die Reaktion wurde entsprechend der *Variante 1* durchgeführt. Allerdings wurde statt eines Wasserabscheiders Molsieb (4Å) verwendet. Es wurden 100 mg D-1,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-23** (185 µmol), 50.6 mg Dibutylzinnoxid (203 µmol), 20 µL Allylbromid (28 mg, 231 µmol), 84.4 mg Caesiumfluorid (555 µmol), 4.4 mL abs. Toluol und 2.0 mL abs. Dimethylformamid verwendet. Für die Aufarbeitung wurde mit 3.5 mL Ethylacetat extrahiert, mit 2x 3.5 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 4:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** *Variante 1:* 10.3 g (17.7 mmol, 93%) eines gelblichen Öls, *Variante 2:* 765 mg (1.32 mmol, 79%) eines farblosen Öls, *Variante 3:* 1.17 g (2.02 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffs, *Variante 4:* 31 mg (53.4 µmol, 29%) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 580.72 g/mol, **Summenformel:** C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 7.42 - 7.26 (m, 20H, Bn-H), 6.02 - 5.88 (m, 1H, H-2'), 5.30 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 17.3, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1H, H-3'), 5.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.4, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1H, H-3'), 4.95 - 4.73 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-2), 4.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 2H, H-1'), 4.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-6), 3.97 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-4), 3.46 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 3.43 (dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-3), 3.31 (dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-1), 2.49 (s, 1H, -OH); <sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 138.7 (2x Bn-C), 138.0 (2x Bn-C), 134.7 (C-2'), 128.5 (2x Bn-C), 128.4 (4x Bn-C), 128.1 (2x Bn-C), 128.1 (2x Bn-C), 127.9 (2x Bn-C), 127.9 (2x Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 117.5 (C-3'), 83.1 (C-5), 81.3 (C-6), 81.1 (C-4), 79.9 (C-3), 79.6 (C-1), 77.5 (Bn-CH<sub>2</sub>), 77.1 (Bn-CH<sub>2</sub>), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 71.8 (C-1'), 67.8 (C-2).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3404, 3028, 2918, 1605, 1496, 1453, 1397, 1356, 1091, 1055, 1027, 1008, 925, 693, 617, 518, 461.

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 603.2717, gef.: 603.2725 [M + Na<sup>+</sup>].

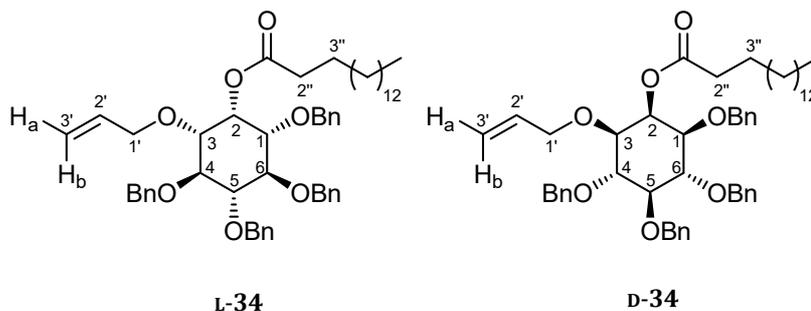
**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 3:1 v/v): 0.3.

**Drehwert L-29:**  $[\alpha]_D^{20} = -2.7^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.0);

**Drehwert D-29:**  $[\alpha]_D^{20} = 3.4^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.0).

7.3.2.1.3.3 *Synthese von D,L-3-O-Allyl-2-O-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol (rac)-34, D-3-O-Allyl-2-O-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol D-34 und L-3-O-Allyl-2-O-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol L-34*

*Variante 1:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu *D,L-3-O-Allyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol* (1.50 g, 2.58 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs.



Pyridin (30 mL) wurde bei 0°C Palmitoylchlorid (2.36 mL, 1.42 g, 5.16 mmol, 3.00 Äquiv.) zuge tropft und die Reaktionslösung langsam auf Rt aufgewärmt. Anschließend wurde die Reaktionslösung 17 h bei Rt gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde mit Toluol (2x15ml) und Dichlormethan (15 mL) koe vaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (30 mL) gelöst, mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (30 mL) gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulen chromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 10%-20%, v/v) gereinigt.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu *L-3-O-Allyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol L-29* (656 mg, 1.13 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. Pyridin (13 mL) wurde bei 0°C Palmitoylchlorid (1.03 mL, 933 mg, 3.41 mmol, 3.02 Äquiv.) zuge tropft und die Reaktionslösung erst 30 min bei 0°C und anschließend 17 h bei Rt gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol (2x 5 mL) und Dichlormethan (5 mL) koe vaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (13 mL) gelöst und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (13 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (2x 13 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulen chromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 5:1, v/v) gereinigt.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde entsprechend der *Variante 2* durchgeführt. Es wurden 284 mg (489 µmol) *D-3-O-Allyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol D-29*, 0.44 mL (399 mg, 1.46 mmol) Palmitoylchlorid und 5.5 mL abs. Pyridin verwendet. Es wurde mit 2x 2 mL Toluol und 2 mL Dichlormethan koe vaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (6 mL) gelöst und mit ges.

Natriumhydrogencarbonatlösung (6 mL) gewaschen. Es wurde mit 2x 6 mL Dichlormethan extrahiert.

**Ausbeuten:** *Variante 1:* Es konnten 2.27 g eines verunreinigten gelben Öls erhalten werden, welches ohne weitere Reinigung weiterverwendet wurde; *Variante 2:* Es konnten 818 mg (1.00 mmol, 88%) eines gelben Öls erhalten werden; *Variante 3:* Es konnten 344 mg (0.420 mmol, 86%) eines gelblichen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 819.14 g/mol, **Summenformel:** C<sub>53</sub>H<sub>70</sub>O<sub>7</sub>.

**Analytische Daten:** **<sup>1</sup>H-NMR:**(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.39 - 7.25 (m, 20H, Bn-H), 5.96 - 5.84 (m, 1H, H-2'), 5.80 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-2), 5.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 17.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-3'b), 5.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-3'a), 4.95 - 4.50 (m, 8 H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.20 (ddt, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.5 Hz, 1H, H-1'), 4.05 (ddt, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1H, H-1'), 3.91 - 3.75 (m, 2H, H-5, H-6), 3.54 - 3.46 (m, 2H, H-1, H-3), 3.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-4), 2.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-2''), 1.71 - 1.60 (m, 2H, H-3''), 1.41 - 1.10 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR:**(125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 173.3 (C=O), 138.8 (3x Bn-C), 138.7 (Bn-C), 137.9 (Bn-C), 134.7 (C-2'), 128.6 (Bn-C), 128.5 (3x Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.2 (3x Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.8 (2x Bn-C), 127.7 (Bn-C), 117.4 (C-3'), 83.0 (C-3), 81.6 (C-6), 81.6 (C-4), 78.6 (C-5), 78.3 (C-1), 76.4 (Bn-CH<sub>2</sub>), 76.1 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.3 (C-1'), 71.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 66.6 (C-2), 34.7 (C-2''), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (4x CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (C-3'), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 2922, 2852, 1739, 1454, 1358, 1087, 1069, 1028, 732, 696.

**HR-MS** (ESI, pos.): *m/z*: ber.: 841.5019 [M+Na<sup>+</sup>], gef.: 841.5018 [M+Na<sup>+</sup>].

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 3:1, v/v): 0.7.

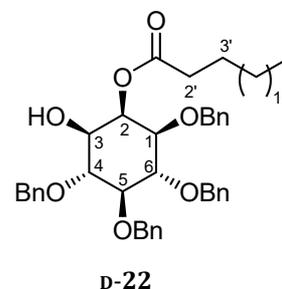
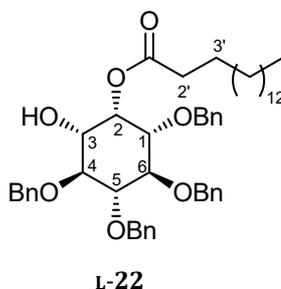
**Drehwert L-34:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -1.8^{\circ}$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.5),

**Drehwert D-34:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -8.2^{\circ}$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.5).

### 7.3.2.1.4 Deallylierungen

#### 7.3.2.1.4.1 Synthese von *D,L*-2-*O*-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**22**, *L*-2-*O*-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **L-22** und *D*-2-*O*-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-22**

*Variante 1:* Zu einer Lösung von *D,L*-3-*O*-Allyl-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**34** (2.11 g, 2.58 mmol, 1.00 Äquiv.) in konz. Essigsäure (11.3 mL) wurde Wasser (drei Tropfen), Palladium(II)-chlorid (744 mg, 4.20 mmol, 1.63 Äquiv.)



sowie Natriumacetat (744 mg, 9.06 mmol, 3.51 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 Tage bei Rt gerührt und weiteres Wasser (fünf Tropfen) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde weitere 2 h bei Rt gerührt, anschließend mit Ethylacetat (50 mL) verdünnt und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3x 50 mL), ges. Natriumchloridlösung (50 mL) und Wasser (50 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether-Ethylacetat-Gradient, 20% - 25%) gereinigt.

*Variante 2:* Zu einer Lösung von *L*-3-*O*-Allyl-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **L-34** (0.82 g, 1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) in konz. Essigsäure (4.4 mL) und Wasser (1 Tropfen) wurden Palladium(II)-chlorid (0.29 g, 1.7 mmol, 1.7 Äquiv.) sowie Natriumacetat trihydrat (0.48 g, 3.5 mmol, 3.5 Äquiv.) gegeben und die Reaktionslösung wurde für 22 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat (20 mL) verdünnt und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3x 20 mL), ges. Natriumchloridlösung (20 mL) und Wasser (20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) gereinigt.

*Variante 3:* Zu einer Lösung von *D*-3-*O*-Allyl-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-34** (0.87 g, 1.1 mmol, 1.0 Äquiv.) in konz. Essigsäure (4.5 mL) und Wasser (1 Tropfen) wurden Palladium(II)-chlorid (0.30 mg, 1.7 mmol, 1.6 Äquiv.) sowie Natriumacetat (0.30 mg, 3.7 mmol, 3.4 Äquiv.) gegeben und die Reaktionslösung wurde für 22 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat (21 mL) verdünnt und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3x 21 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether-Ethylacetat-Gradient, 20% - 25%) gereinigt.

*Variante 4:* Zu einer Lösung von D-3-*O*-Allyl-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-34** (105 mg, 0.128 mmol, 1.00 Äquiv.) in Essigsäure (2.4 mL) wurde Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (148 mg, 0.128 mmol, 1.00 Äquiv.) gegeben und 1 h bei 80°C gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol (0.8 mL) koevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat, 5:1, v/v) gereinigt.

*Variante 5:* Zu einer Lösung von D-3-*O*-Allyl-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-34** (50 mg, 61 µmol, 1.0 Äquiv.) in Isopropanol (1 mL) wurde Palladium(II)-hydroxid auf Aktivkohle (20 Ma-%, 19 mg, 31 µmol, 0.5 Äquiv.) gegeben und für 1.5 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde durch Celite® 545 filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) gereinigt.

*Variante 6:* Zu einer Lösung D-3-*O*-Allyl-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **D-34** (31 mg, 38 µmol, 1.0 Äquiv.) in Polyethylenglykol-400 (0.4 mL) wurde Iod (1.0 mg, 3.8 µmol, 0.10 Äquiv.) gegeben und die Reaktionslösung für drei Tage bei Rt gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 6:1) gereinigt.

*Variante 7:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von D,L-1-*O*-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **37** (78 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (0.1 mL) wurde 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (30 µL, 30 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) gegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. wässr. Ammoniumchloridlösung (0.5 mL) beendet und die Reaktionslösung mit Dichlormethan (0.5 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Aceton, 8:1) gereinigt.

**Ausbeuten:** *Variante 1:* Es konnten 860 mg (1.10 mmol, 43%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 2:* Es konnten 414 mg (0.53 mmol, 53%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 3:* Es konnten 510 mg (0.70 mmol, 68%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 4:* Es konnten 81.0 mg (10.4 mmol, 81%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 5:* Es konnten lediglich 35 mg Edukt reisoliert werden. *Variante 6:* Es konnten lediglich 15 mg Edukt reisoliert werden. *Variante 7:* Es konnten 16 mg (21 µmol, 21%) von D,L-2-*O*-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol als farbloses Öl und 17 mg (22 µmol, 22%) von D,L-1-*O*-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol als farblosen Feststoff erhalten werden.

**Molmasse:** 779.07 g/mol, **Summenformel:** C<sub>50</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.40 - 7.27 (m, 20H, Bn-H), 5.74 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-2), 5.02 - 4.48 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.78 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 3.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-3), 3.55 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-1), 3.57 - 3.51 (m, 2H, H-3, H-5), 2.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.65 (quint. <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-3'), 1.38 - 1.20 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 173.4 (C=O), 138.6 (Bn-C), 138.3 (Bn-C), 138.3 (Bn-C), 137.6 (Bn-C), 128.6 (2x Bn-C), 128.5 (2x Bn-C), 128.3 (3x Bn-C), 128.2 (3x Bn-C), 128.0 (2x Bn-C), 128.0 (2x Bn-C), 128.0 (3x Bn-C), 127.8 (2x Bn-C), 127.6 (Bn-C), 83.2 (C-3), 82.0 (C-4), 81.5 (C-6), 78.6 (C-5), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.9 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.6 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.1 (Bn-CH<sub>2</sub>), 70.3 (C-1), 68.9 (C-2), 34.5 (C-2'), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 25.2 (C-3'), 22.7 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

IR  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3435, 3030, 2922, 2852, 1739, 1604, 1496, 1454, 1359, 1069, 1027, 728, 694.

HR-MS (ESI, pos.): *m/z*: ber.: 801.4706 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 801.4703 [M+Na]<sup>+</sup>.

DC: R<sub>f</sub>(Petrolether/Ethylacetat, 1:1) = 0.64, R<sub>f</sub>(Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) = 0.2.

Drehwert L-22:  $[\alpha]_D^{22} = -2.4^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.5).

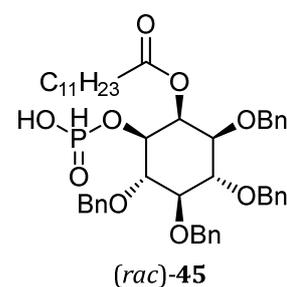
Drehwert D-22:  $[\alpha]_D^{22} = 3.2^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.5).

### 7.3.2.2 Kupplungen

#### 7.3.2.2.1 Kupplung unter Verwendung der H-Phosphonatmethode

##### 7.3.2.2.1.1 Versuch der Synthese *D,L*-2-dodecanoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myoinosit-1-yl-H-phosphonat (*rac*)-45

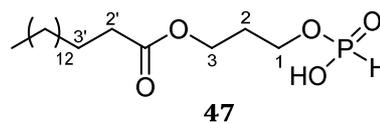
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu Phosphor(III)-chlorid (46  $\mu$ L, 0.53 mmol, 5.3 Äquiv.) in abs. Toluol (0.5 mL) wurde getrocknetes Imidazol (0.16 g, 2.4 mmol, 23 Äquiv.) und abs. Triethylamin (0.21 mL, 1.5 mmol, 15 Äquiv.) bei 0°C gegeben. Anschließend wurde *D,L*-2-dodecanoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myoinositol (74 mg,



0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. Toluol (1 mL) bei -6°C dazugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei -6°C gerührt. Daraufhin wurde ein Gemisch aus Pyridin und Wasser (4:1, v/v) hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (1 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde wiederum mit Dichlormethan (2x 10 mL) extrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Gemisch wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol, 20:1, v/v) gereinigt. Es konnte jedoch kein Produkt erhalten werden.

### 7.3.2.2.1.2 Synthese von 3-Oxo-palmitoyl-prop-1-yl- H-phosphonat **47**

*Variante 1:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.



3-Hydroxypropylpalmitat **46** (0.10 g, 0.32 mmol, 1.0 Äquiv.)

wurde 1 h im Vakuum getrocknet und anschließend in abs. Tetrahydrofuran (1 mL) gelöst. Daraufhin wurden bei 0°C Phosphor(III)-chlorid (0.14 mL, 0.22 g, 1.6 mmol, 5.0 Äquiv.) in abs. Tetrahydrofuran (0.5 mL) und schließlich abs. Triethylamin (0.66 mL, 0.48 g, 4.8 mmol, 15 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 min bei 0°C und dann 17 h bei Rt gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einer Lösung von Pyridin und Wasser (10mL, 4:1, v/v) beendet. Anschließend wurden Dichlormethan (20 mL) und Wasser (10 mL) hinzugegeben. Dann wurde bis zur Sättigung der wässr. Phase Natriumchlorid hinzugegeben, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu Phosphor(III)-chlorid (0.210 mL, 1.52 mmol, 2.00 Äquiv.) in Tetrahydrofuran (1.0 mL) wurde langsam bei 0°C Triethylamin (0.221 mL, 1.60 mmol, 2.10 Äquiv.) getropft und die Lösung 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus trockenem 3-Hydroxypropylpalmitat **46** (240 mg, 0.761 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. Tetrahydrofuran (3.0 mL) bei -5°C hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Rt aufgewärmt und dann 18 h bei Rt gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde zunächst eine Lösung aus Pyridin und Wasser (20 mL, 4:1, v/v), dann Dichlormethan (20 mL) und dest. Wasser (20 mL) hinzugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässr. Phase mit Natriumchlorid gesättigt und erneut mit Dichlormethan (20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert.

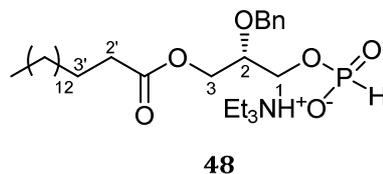
**Ausbeute:** *Variante 1:* Es konnten 13 mg (34 µmol, 11%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden. *Variante 2:* Es konnten 112 mg (0.296 mmol, 39%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden. **Molmasse:** 378.49 g/mol, **Summenformel:** C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub>P.

**Analytische Daten:** **<sup>1</sup>H-NMR:**(400 MHz, MeOD): δ (ppm) = 6.71 (d, <sup>1</sup>J<sub>HP</sub> = 628 Hz, 1H, P-H), 4.20 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.4 Hz, 2H, H-3), 3.94 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 2H, H-1), 2.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.97 (pent., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3, 1H, H-2), 1.68 - 1.56 (m, 2 H, H-3'), 1.42 - 1.20 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.91 (t, 3 H, CH<sub>3</sub>); **<sup>31</sup>P-NMR:**(162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.96.

**DC:** R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Methanol, 5:1, v/v) = 0.1.

### 7.3.2.2.1.3 Synthese von Triethylammonium-(2*S*)-2-*O*-benzyl-3-*O*-palmitoyl-glycer-1-yl)-*H*-Phosphonat **48**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. (2*R*)-2-*O*-Benzyl-1-*O*-palmitoyl-glycerin (*R*)-**21** (50.0 mg, 0.119 mmol, 1.0 Äquiv.) und Phosphonsäure (19.5 mg, 238  $\mu$ mol, 2.00 Äquiv.) wurden mit



abs. Pyridin (3x 0.4 mL) koevaporiert und anschließend in abs. Pyridin (2 mL) gelöst. Zu der Lösung wurde zunächst Triphenylphosphin (62.4 mg, 238  $\mu$ mol, 2.00 Äquiv.), dann Diisopropylazodicarboxylat (46.7  $\mu$ L, 48.1 mg, 238  $\mu$ mol, 2.00 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 19 h bei Rt gerührt, dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Dichlormethan (2x2 mL) koevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 5%-10%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 44.1 mg (75.1  $\mu$ mol, 63%) eines weißen Feststoffs erhalten werden.

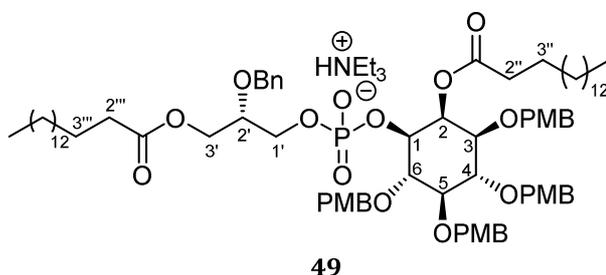
**Molmasse:** 484.61 g/mol, **Summenformel:** C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>O<sub>6</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 11.60 (s, 1H, NH), 7.36 - 7.20 (m, 5H, Bn-H), 6.83 (d, <sup>1</sup>J<sub>HP</sub> = 671.0 Hz, 1H, P-H), 4.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.8 Hz, 1H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.61 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.8 Hz, 1H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.30 - 3.97 (m, 4H, H-1, H-3), 3.85 - 3.75 (m, 1H, H-2), 3.08 (dq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 4.8 Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.65 - 1.50 (m, 2H, H-3'), 1.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 9H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.31 - 1.18 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 2:1, v/v) = 0.0.

### 7.3.2.2.1.4 Synthese von Triethylammonium-(2'*S*)-2'-*O*-benzyl-3'-*O*-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-*O*-palmitoyl-3,4,5,6-tetrakis-*O*-para-methoxybenzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **49**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von Triethylammonium-(2*S*)-2-*O*-benzyl-3-*O*-palmitoyl-glycer-1-yl)-*H*-Phosphonat (*S*)-**69** (44 mg, 75  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und D-2-*O*-



palmitoyl-3,4,5,6-tetrakis-*O*-paramethoxybenzyl-myo-inositol **D-28** (67 mg, 75  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) in abs. Pyridin (2.7 mL) wurde Pivalinsäurechlorid (37  $\mu$ L, 26 mg, 0.30 mmol, 4.0 Äquiv.) bei Rt gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Rt gerührt und anschließend bei Rt Iod (19 mg, 0.15 mmol, 2.0 Äquiv.) in einem Pyridin-Wasser-Gemisch (98:2, v/v, 2 mL) hinzugefügt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol und Dichlormethan

koevaporiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan-Methanol-Gradient, 2.5% - 20%, 1% Triethylamin) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 39 mg (27 μmol, 36%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 1482.97 g/mol, **Summenformel:** C<sub>86</sub>H<sub>132</sub>NO<sub>17</sub>P.

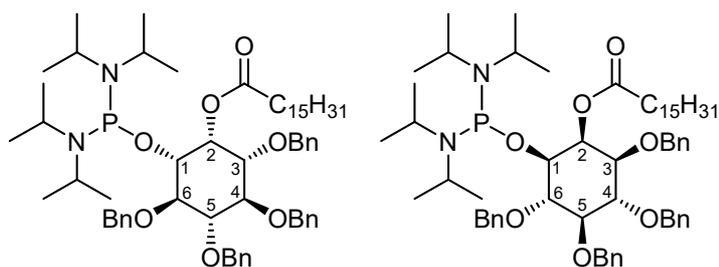
**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 11.9 (s, 1 H, HNEt<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.35 - 7.10 (m, 13H, 5x Bn-H, 8x PMB-H), 6.90 - 6.70 (m, 8H, PMB-H), 6.01 - 5.81 (m, 1H, H-2), 4.85 - 3.85 (m, 15H, PMB-CH<sub>2</sub>, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1, H-4, H-6, H-3'), 3.82 - 3.66 (m, 12H, -OCH<sub>3</sub>), 3.52 - 3.29 (m, 4H, H-3, H-5, H-1'), 3.10 (dq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 4.8 Hz, 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-2''), 2.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-2'''), 1.69 - 1.47 (m, 4H, H-3'', H-3'''), 1.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 9H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35 - 1.10 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>).

**DC:** R<sub>f</sub>(Dichlormethan/Methanol, 19:1, v/v, 1% Triethylamin) = 0.3.

### 7.3.2.2.2 Kupplung unter Verwendung der Amidit-Methode

#### 7.3.2.2.2.1 Versuch der Synthese von (*D,L*-2-*O*-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit-1-yl)-bis-(*N,N*-diisopropylamino)-phosphoramidit (*rac*)-55

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von *D,L*-2-*O*-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-22 (45 mg, 58 μmol, 1.0 Äquiv.) und abs. Pyridin (7.0 μL, 87 μmol, 1.5 Äquiv.)



(*rac*)-55

in abs. Tetrahydrofuran (1 mL) wurde bei -78°C Phosphor(III)-chlorid (5.1 μL, 7.9 mg, 87 μmol, 1.5 Äquiv.) gegeben und für 1 h bei -78°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Rt aufgewärmt und weitere 20 min bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel sowie Eduktüberschüsse wurden unter vermindertem Druck entfernt und anschließend abs. Tetrahydrofuran sowie *N,N*-Diisopropylamin (50 μL, 352 μmol, 6.1 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 19 h bei Rt gerührt und anschließend eine Filtration unter Intertgasbedingungen durchgeführt. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt. Im Rohprodukt konnte jedoch kein Produkt nachgewiesen werden.

7.3.2.2.2 Synthese von  $\pm$ -(2'-cyanoethyl-1'-yl)-(3-oxo-palmitoyl-prop-1-yl)-diisopropylphosphoramidit **58**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu Chlor-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **59**

(56  $\mu$ L, 75 mg, 0.32 mmol, 1.0 Äquiv.) und Diisopropylethylamin (0.11 mL, 84 mg, 0.65 mmol,

2.0 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (1.5 mL) wurde bei 0°C langsam eine Lösung von 3-Hydroxypropylpalmitat **46** (0.15 g, 0.48 mmol, 1.5 Äquiv.) in Dichlormethan (0.5 mL) getropft. Die Lösung wurde 2 h bei 0°C und dann 24 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 5% Triethylamin) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 169 mg (0.32 mol, 100%) eines farblosen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 514.73 g/mol, **Summenformel:** C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 4.22 - 4.11 (m, 2H, H-3), 3.90 - 3.52 (m, 6H, H-1', H-1, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.64 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, 2H, H-2'), 2.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 2H, H-2''), 1.93 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1H, H-2), 1.66 - 1.55 (m, 2H, H-3''), 1.33 - 1.22 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 1.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, 12H, CHCH<sub>3</sub>), 0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 174.7 (C=O), 100.1 (C-2'), 73.8 (C-3), 61.2 (C-3), 60.3 (C-1), 60.1 (C-1'), 43.2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34.5 (C-2''), 32.1 (C-2), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.83 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 25.1 (C-3''), 24.8 (CH<sub>3</sub>), 24.8 (CH<sub>3</sub>), 24.7 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (C-2'); <sup>31</sup>P-NMR:(162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 147.84.

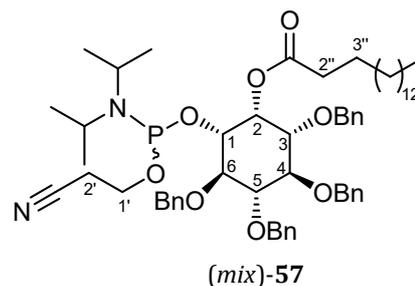
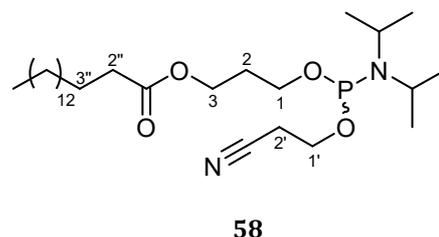
**HR-MS** (ESI, pos.): *m/z*: ber.: 553.3735 [M+O+Na]<sup>+</sup> (Phosphoramidat **61**), gef.: 553.3741 [M+O+Na]<sup>+</sup> (Phosphoramidat **61**).

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 1% Triethylamin) = 0.8.

7.3.2.2.3 Versuch der Synthese von  $\pm$ -(2'-Cyanoethyl-1'-yl)-(D,L-2''-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminylphosphoramidit (mix)-**57**

**Variante 1:** Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von Chlor-(2'-Cyanoethyl-1'-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **59** (4.5  $\mu$ L, 6.1 mg, 26  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und *N,N*-Diisopropylethylamin (8.9  $\mu$ L,

51  $\mu$ mol, 2.0 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (0.5 mL) wurde bei 0°C *D,L*-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**22** (30 mg, 39  $\mu$ mol, 1.5 Äquiv.)



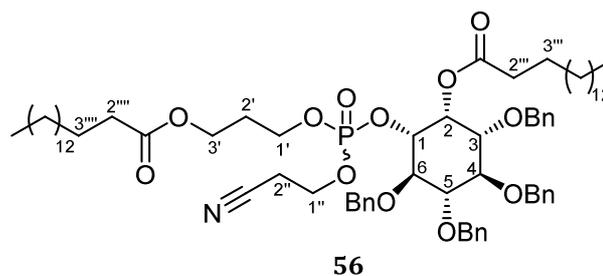
gegeben. Die Reaktionslösung wurde 3 Tage bei Rt gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat-Petrolether-Gradient 10% - 50%, 2% Triethylamin) gereinigt. Es konnte jedoch kein Produkt erhalten werden.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde entsprechend *Variante 1* durchgeführt. Es wurden 2.6 µL Chlor-(2'-Cyanoeth-1'-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **59** (15 µmol, 1.0 Äquiv.), 5.0 µL Diisopropylethylamin (29 µmol, 2.0 Äquiv.), 17 mg *D,L*-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**22** (22 µmol, 1.5 Äquiv.) und 0.3 mL Dichlormethan verwendet. Die Reaktion wurde 24 h bei Rt gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat-Petrolether-Gradient 10% - 20%, 4% Triethylamin). Es konnte jedoch kein Produkt erhalten werden.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde entsprechend *Variante 2* durchgeführt. Es wurden 7.53 µL Chlor-(2'-Cyanoeth-1'-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **59** (42.8 µmol, 1.00 Äquiv.), 14.8 µL Diisopropylethylamin (85.5 µmol, 2.00 Äquiv.), 50 mg *D,L*-2-*O*-palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**22** (64.2 µmol, 1.50 Äquiv.) und 0.5 mL Dichlormethan verwendet. Die Reaktion wurde 24 h bei Rt gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat-Petrolether-Gradient 10% - 100%, 4% Triethylamin). Es konnte kein Produkt erhalten werden.

#### 7.3.2.2.4 Synthese von (3'-Oxo-palmitoylprop-1'-yl)-(2''-cyanoeth-1''-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-inosit-1-yl)-phosphat **56**

*Variante 1:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. (2'-Cyanoeth-1'-yl)-(3-oxo-palmitoyl-prop-1-yl)-diisopropylaminophosphoramidit **58** (22 mg, 43 µmol, 1.0 Äquiv.) und *L*-2-*O*-Palmitoyl-



1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-Inositol **L-22** (50 mg, 64 µmol, 1.5 Äquiv.) wurden mit Acetonitril (3x 1 mL) koevaporiert. Anschließend wurde abs. Acetonitril (0.5 mL) hinzugegeben und bei 0°C und unter starkem Rühren 4,5-Dicyanoimidazol in abs. Acetonitril (0.25 mol/L, 0.21 mL, 51 µmol, 1.2 Äquiv.) hinzuge tropft und anschließend 1 h bei Rt gerührt. Dann wurde bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 7.8 µL, 43 µmol, 1.0 Äquiv.) hinzuge tropft und die Reaktionslösung weitere 30 min bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat (3 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 3 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron® (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) gereinigt.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde entsprechend *Variante 1* durchgeführt. Es wurden 38 mg (2'-Cyanoeth-1'-yl)-(3-oxo-palmitoyl-prop-1-yl)-diisopropylaminophosphoramidit **58** (74 µmol, 1.5 Äquiv.), 38 mg L-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-Inositol **L-22** (49 µmol, 1.0 Äquiv.), 0.5 mL abs. Acetonitril, 0.20 mL 4,5-Dicyanoimidazol in abs. Acetonitril (0.25 mol/L, 49 µmol, 1.0 Äquiv.), 10 mg *m*-Chlorperbenzoesäure (70% in Wasser, 59 µmol, 1.2 Äquiv.), 3 mL Ethylacetat und 2x 5 mL Natriumchloridlösung verwendet.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde entsprechend *Variante 1* durchgeführt. Es wurden 30 mg (2'-Cyanoeth-1'-yl)-(3-oxo-palmitoyl-prop-1-yl)-diisopropylaminophosphoramidit **58** (58 µmol, 1.5 Äquiv.), 30 mg L-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-Inositol **L-22** (39 µmol, 1.0 Äquiv.), 0.5 mL abs. Acetonitril, 0.19 mL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol in abs. Acetonitril (0.3 mol/L, 58 µmol, 1.5 Äquiv.), 11 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 58 µmol, 1.5 Äquiv.), 2 mL Ethylacetat und 2x 2 mL Natriumchloridlösung verwendet.

*Variante 4:* Die Reaktion wurde entsprechend *Variante 1* durchgeführt. Es wurden 15 mg (2'-Cyanoeth-1'-yl)-(3-oxo-palmitoyl-prop-1-yl)-diisopropylaminophosphoramidit **58** (29 µmol, 1.5 Äquiv.), 15 mg L-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-Inositol **L-22** (19 µmol, 1.0 Äquiv.), 0.5 mL abs. Acetonitril, 97 µL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol in abs. Acetonitril (0.3 mol/L, 29 µmol, 1.5 Äquiv.), 11 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 58 µmol, 3.0 Äquiv.), 1 mL Ethylacetat und 2x 1 mL Natriumchloridlösung verwendet.

*Variante 5:* Die Reaktion wurde entsprechend *Variante 1* durchgeführt. Es wurden 23 mg (2'-Cyanoeth-1'-yl)-(3-oxo-palmitoyl-prop-1-yl)-diisopropylaminophosphoramidit **58** (45 µmol, 1.5 Äquiv.), 23 mg L-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-Inositol **L-22** (30 µmol, 1.0 Äquiv.), 0.5 mL abs. Acetonitril, 0.15 mL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol in abs. Acetonitril (0.3 mol/L, 45 µmol, 1.5 Äquiv.), 16 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 88 µmol, 2.7 Äquiv.), 1.5 mL Ethylacetat und 2x 1.5 mL Natriumchloridlösung verwendet.

**Ausbeute:** *Variante 1:* Es konnte kein Produkt erhalten werden. *Variante 2:* Es konnten 5.0 mg eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 3:* Es konnte 1 mg (0.8 µmol, 2%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 4:* Es konnte 1 mg (0.8 µmol, 4%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 5:* Es konnte 4.5 mg (3.7 µmol, 13%) eines farblosen Öls erhalten werden.

**Molmasse:** 1207.75 g/mol, **Summenformel:** C<sub>72</sub>H<sub>106</sub>NO<sub>12</sub>P.

#### **Analytische Daten des Diastereomergemisches:**

**<sup>1</sup>H-NMR:**(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.39 - 7.20 (m, 20H, Bn-H), 5.89 - 5.85 (m, 1H, H-2), 5.02 - 4.46 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 0.5H, H-1), 4.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 0.5H, H-1), 170

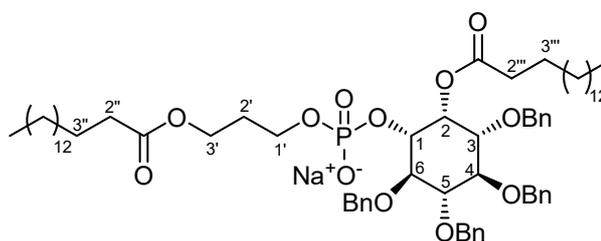
4.19 - 3.80 (m, 8H, H-4, H-6, H-1', H-2', H-3', H-1''), 3.59 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$  Hz, 1H, H-3), 3.56 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$  Hz, 1 H, H-5), 2.63 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$  Hz, 1H, H-2''), 2.45 - 2.19 (m, 5H, H-2'', H-2''', H-2'''), 1.94 (quint.,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, 1H, H-3'''), 1.79 (quint.,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, 1 H, H-3'''), 1.74 - 1.50 (m, 4H, H-3''', H-3''', CH<sub>2</sub>), 1.37 - 1.19 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$  Hz, 6H, CH<sub>3</sub>);  $^{31}\text{P-NMR}$ : (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -1.71, -1.91.

**HR-MS** (ESI, pos.)  $m/z$ : ber.: 1230.7350 [Ma+Na]<sup>+</sup>, gef.: 1230.7352 [Ma+Na]<sup>+</sup>.

**DC**: R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 1:1, v/v, 10% Essigsäure) = 0.6.

#### 7.3.2.2.5 Versuch der Synthese von (3'-Oxo-palmitoylprop-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat **D-63**

*Variante 1*: Eine Lösung von (3'-O-Palmitoyl-1',3'-propandiol-1'-yl)-(2''-cyanoethyl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat **56** (1 mg, 0.8  $\mu\text{mol}$ , 1 Äquiv.) in einem Methanol-Ammoniak-Wasser-Gemisch (95:4:1) wurde 1 h bei Rt



**D-63**

gerührt, anschließend mit Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Hilfe präparativer DC (Dichlormethan/Methanol, 13:1, v/v) gereinigt. Es konnte jedoch kein reines Produkt in ausreichender Menge erhalten werden.

**Analytische Daten: HR-MS** (ESI, pos.)  $m/z$ : ber.: 1155.7265 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 1155.7246 [M+H]<sup>+</sup>.

*Variante 2*: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Eine Lösung von zuvor mit abs. Acetonitril koevaporiertem (3'-O-Palmitoyl-1',3'-propandiol-1'-yl)-(2''-cyanoethyl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat (1 mg, 0.8  $\mu\text{mol}$ , 1 Äquiv.) und abs. Triethylamin (0.1 mL, 0.8  $\mu\text{mol}$ , 1 Äquiv.) in abs. Acetonitril (0.2 mL) wurde 24 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohgemisch mit Hilfe von präparativer DC (Dichlormethan/Methanol, 13:1, v/v) gereinigt. Es konnte jedoch kein Produkt erhalten werden.

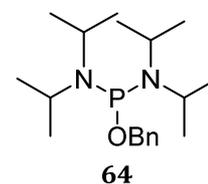
*Variante 3*: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu (2''-cyanoethyl)-(3'-Hydroxypropylpalmit-3'-yl)-(D-(2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat (5.0 mg, 4.1  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (1.8 mL) wurde 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (6.3  $\mu\text{L}$ , 42  $\mu\text{mol}$ , 10 Äquiv.) gegeben und die Reaktionslösung 1.5 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4 eingestellt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde versucht säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol, 10:1,

v/v) zu reinigen. Allerdings konnte kein reines Produkt in einer ausreichenden Menge erhalten werden.

**Analytische Daten: HR-MS** (ESI, pos.)  $m/z$ : ber.: 1155.7265[M+H]<sup>+</sup>, gef.: 1155.7243[M+H]<sup>+</sup>.

#### 7.3.2.2.6 Synthese von Benzyl-bis-(*N,N*-diisopropylamino)-phosphoramidit **64**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von Phosphor(III)-chlorid (0.63 mL, 0.99 g, 7.2 mmol, 1.5 Äquiv.) und Triethylamin (1.0 mL, 0.73 g, 7.2 mmol, 1.5 Äquiv.) in abs. THF (10 mL) wird bei -80°C Benzylalkohol (0.50 mL, 0.52 g, 4.8 mmol, 1.0 Äquiv.) getropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Gemisch auf Rt erwärmt. Als DC (Petrolether, Ethylacetat, 10:1, 2% Triethylamin) kein Edukt mehr anzeigte, wurde abs. *N,N*-Diisopropylamin (4.5 mL, 3.2 g, 32 mmol, 6.6 Äquiv.) hinzu getropft und die Reaktionslösung für 16 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde der ausgefallene weiße Feststoff unter Schlenkbedingungen abfiltriert, mit abs. THF nachgespült und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 10:1, 5% Triethylamin).



**Ausbeute:** Es konnten 0.48 g (1.4 mmol, 29%) eines farblosen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 338.48 g/mol, **Summenformel:** C<sub>19</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>OP.

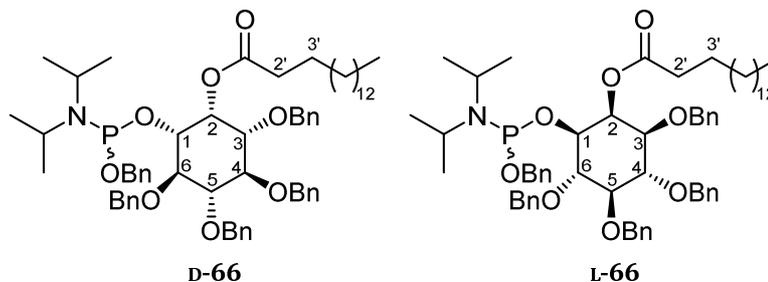
**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.39 - 7.34 (m, 2H, Bn-H), 7.32 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, Bn-H), 7.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 1H, Bn-H), 4.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.58 (dhept, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 4H, CH), 1.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 24H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 128.4 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.2 (Bn-C), 126.8 (Bn-C), 66.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 65.5 (Bn-CH<sub>2</sub>), 44.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>3</sub>), 23.9 (CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(243 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 123.69.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 2964, 2928, 2868, 1454, 1390, 1361, 1183, 1156, 1116, 1078, 1041, 1021, 950, 763, 727, 693, 523.

**DC:** R<sub>f</sub>(Petrolether/Ethylacetat, 10:1, 5% Triethylamin) = 0.7.

7.3.2.2.7 Synthese von  $\pm$ -Benzyl-(D,L-2-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-(N,N-diisopropylaminophosphoramidit **DL-66**,  $\pm$ -Benzyl-(D-2-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-(N,N-diisopropylaminophosphoramidit **D-66** sowie  $\pm$ -Benzyl-(L-2-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-(N,N-diisopropylaminophosphoramidit **L-66**

Variante 1: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu zuvor mit Toluol (2x 0.5 mL) koevaporiertem D,L-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-



benzyl-myo-inositol (*rac*)-**22** (50 mg, 64  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und Benzyl-bis-(N,N-diisopropylamino)-phosphoramidit (33 mg, 96  $\mu$ mol, 1.5 Äquiv.) in abs. Acetonitril (5 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 0.11 mL, 32  $\mu$ mol, 0.50 Äquiv.) getropft. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol Acetonitril (0.3 M, 55  $\mu$ L, 16  $\mu$ mol, 0.25 Äquiv.) hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan (10 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2x 10 mL) sowie Wasser (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 5% Triethylamin) gereinigt.

Variante 2: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu zuvor mit Toluol (2x 2 mL) koevaporiertem D-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inositol **D-22** (999 mg, 1.28 mmol, 1.00 Äquiv.) und Benzyl-bis-(N,N-diisopropylamino)-phosphoramidit **64** (652 mg, 1.93 mmol, 1.50 Äquiv.) in abs. Acetonitril (90 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 2.14 mL, 642  $\mu$ mol, 0.501 Äquiv.) getropft. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol Acetonitril (0.3 M, 1.07 mL, 321  $\mu$ mol, 0.250 Äquiv.) hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan (500 mL) verdünnt und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2x 500 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 12:1, v/v, 10% Triethylamin) gereinigt.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu zuvor mit Toluol (2x 1 mL) koevaporiertem L-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-inositol L-22 (130 mg, 0.167 mmol, 1.00 Äquiv.) und Benzyl-bis-(*N,N*-diisopropylamino)-phosphoramidit **64** (84.7 mg, 0.250 mmol, 1.50 Äquiv.) in abs. Acetonitril (12 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 0.280 mL, 840 µmol, 0.502 Äquiv.) getropft. Folgend wurde viermal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol Acetonitril (0.3 M in Acetonitril, 0.140 mL, 42.0 µmol, 0.250 Äquiv.) hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan (63 mL) verdünnt und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2x 63 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Triethylamin, 10:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** *Variante 1:* Es konnten 17 mg (17 µmol, 26%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 2:* Es konnten 945 mg (930 µmol, 73%) eines farblosen Öls erhalten werden. *Variante 3:* Es konnten 133 mg (0.131 mmol, 78%) eines farblosen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 1016.35 g/mol, **Summenformel:** C<sub>63</sub>H<sub>86</sub>NO<sub>8</sub>P.

**Analytische Daten des Isomerengemisches DL-66:** <sup>1</sup>H-NMR:(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.49 - 7.14 (m, 25H, Bn-H), 5.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5Hz, 0.5H, H-2), 5.79 - 5.76 (m, 0.5H, H-2), 5.02 - 4.07 (m, 10H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, 1H, H-6), 3.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.70 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 0.5H, H-1), 3.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 0.5H, H-1), 3.66 - 3.57 (m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 3.33 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-3), 2.40 - 2.30 (m, 2H, H-2'), 1.65 - 1.56 (m, 2H, H-3'), 1.26 - 1.18 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 1.18 - 1.11 (m, 12H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 172.8 (C=O), 139.0 (Bn-C), 138.9 (2x Bn-C), 138.8 (Bn-C), 138. (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.2 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.5 (Bn-C), 127.2 (Bn-C), 83.1 (C-5), 81.6 (C-6), 81.5 (C-4), 78.9 (C-3), 76.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.5 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.8 (C-1), 72.2 (Bn-CH<sub>2</sub>), 71.9 (Bn-CH<sub>2</sub>), 70.2 (C-2), 69.6 (C-2), 65.4 (Bn-CH<sub>2</sub>), 64.9 (Bn-CH<sub>2</sub>), 43.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34.6 (C-2'), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (C-3'), 24.9 (CH<sub>2</sub>), 24.8 (CH<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(243 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 150.90, 148.47.

**Analytische Daten des Diastereomerengemisches L-66:** <sup>1</sup>H-NMR:(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.44 - 7.19 (m, 25H, Bn-H), 5.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 0.5H, H-2), 5.79 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 0.5H, H-2), 4.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 14.8 Hz, 0.5H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 14.6 Hz, 0.5H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.88 - 4.59 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.9 Hz, 0.5H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.9 Hz, 0.5H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.91 (t,

$^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, 0.5H, H-6), 3.89 - 3.85 (m, 1H, H-1, H-6), 3.81 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, 0.5H, H-4), 3.79 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, 0.5H, H-4), 3.71 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, 2.6 Hz, 0.5H, H-1), 3.68 - 3.60 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.51 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.3$  Hz, 0.5H, H-5), 3.48 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.7$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$  Hz, 0.5H, H-3), 3.45 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$  Hz, 0.5H, H-5), 3.34 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, 2.7 Hz, 0.5H, H-3), 2.38 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$  Hz, 1H, H-2'), 2.37 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 1H, H-2'), 1.70 - 1.59 (m, 2H, H-3'), 1.39 - 1.11 (m, 36H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.89 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$ :(151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 172.8 (C=O), 172.8 (C=O), 139.0 (Bn-C), 138.9 (Bn-C), 138.9 (Bn-C), 138.7 (Bn-C), 138.7 (Bn-C), 138.6 (Bn-C), 138.0 (Bn-C), 137.9 (Bn-C), 137.7 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.2 (Bn-C), 128.2 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.5 (Bn-C), 127.5 (Bn-C), 127.3 (Bn-C), 127.3 (Bn-C), 127.2 (Bn-C), 127.1 (Bn-C), 83.2 (C-5), 83.1 (C-5), 81.6 (C-6), 81.6 (C-6), 79.3 (C-3), 79.3 (C-3), 76.3 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 76.3 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 76.0 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 76.0 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 72.8 (C-1), 72.2 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 71.9 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 70.2 (C-2), 65.3 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 65.2 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 65.0 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 64.8 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 43.5 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 43.3 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 43.3 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 43.2 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 34.7 (C-2'), 34.6 (C-2'), 32.1 ( $\text{CH}_2$ ), 29.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.2 ( $\text{CH}_2$ ), 25.4 (C-3'), 25.4 (C-3'), 25.0 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.9 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.6 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.8 ( $\text{CH}_2$ ), 14.3 ( $\text{CH}_3$ );  $^{31}\text{P-NMR}$ :(243 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 150.90, 148.47.

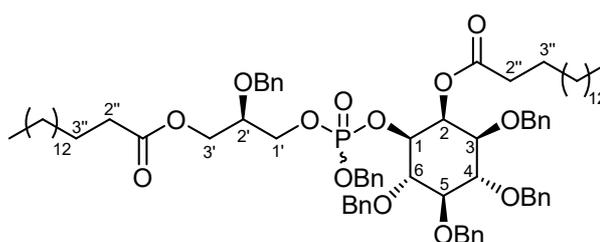
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3064, 3031, 2964, 2853, 1742, 1497, 1362, 1126, 1088, 1026, 974, 731, 694.

**Analytische Daten des Diastereomeregemisches D-66:**  $^1\text{H-NMR}$ :(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.45 - 7.17 (m, 25H, Bn-H), 5.84 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.4$  Hz, 0.5H, H-2), 5.82 - 5.77 (m, 0.5H, H-2), 5.06 - 4.21 (m, 10H, Bn- $\text{CH}_2$ ), 3.97 - 3.29 (m, 7H, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.38 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz, 1H, H-2'), 2.37 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz, 1H, H-2'), 1.74 - 1.58 (m, 2H, H-3'), 1.40 - 1.09 (m, 36H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.88 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{31}\text{P-NMR}$ :(81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 150.33, 147.47.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 2293, 2853, 1743, 1454, 1365, 1089, 1070, 1003, 732, 695.**DC:**  $R_f$ (Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 5% Triethylamin) = 0.6.

#### 7.3.2.2.2.8 Synthese von $\pm$ -Benzyl-(2'R)-2'-O-Benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **20a**

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 0.12 g  $\pm$ -Benzyl-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-



diisopropylaminophosphoramidit **L-66**

(0.12 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.17 g (2S)-2-O-

Benzyl-glycerylpalmitat (S)-**21** (0.40 mmol, 3.4 Äquiv.) in abs. Acetonitril (6.4 mL) verwendet.

Zur Aktivierung wurden 0.15 mL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 45 µmol, 0.30 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal 80 µL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 24 µmol, 0.20 Äquiv.) hinzugetropft. Für die Oxidation wurden 21 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 0.12 mmol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (23 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 13 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 20% - 100%) gereinigt.

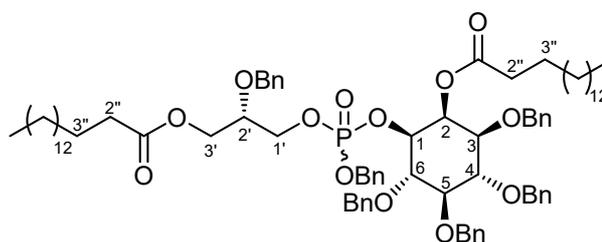
**Ausbeute:** Es konnten 83 mg (61 µmol, 52%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 1351.79, **Summenformel:** C<sub>83</sub>H<sub>115</sub>O<sub>13</sub>P.

**Analytische Daten des Diastereomergemisches:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.56 - 7.18 (m, 30H, Bn-H), 6.10 - 5.89 (m, 1H, H-2), 5.19 - 3.31 (m, 22H, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-1', H-2', H-3'), 2.43 - 2.20 (m, 4H, H-2''), 1.71 - 1.51 (m, 4H, H-3''), 1.39 - 1.11 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 174.0 (C=O), 173.0 (C=O), 138.8 (Bn-C), 138.5 (Bn-C), 138.4 (Bn-C), 137.9 (Bn-C), 129.9 (Bn-C), 129.9 (Bn-C), 128.7 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.2 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.6 (Bn-C), 82.5 (C-5), 81.5 (C-6), 80.2 (C-4), 78.4 (C-1), 77.3 (C-2'), 76.2 (C-3), 75.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.6 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.5 (Bn-CH<sub>2</sub>), 68.8 (C-2), 62.8 (C-1'), 62.2 (C-3'), 34.7 (C-2''), 34.3 (C-2''), 32.1 (-CH<sub>2</sub>), 29.8 (-CH<sub>2</sub>), 29.7 (-CH<sub>2</sub>), 29.7 (-CH<sub>2</sub>), 29.6 (-CH<sub>2</sub>), 29.5 (-CH<sub>2</sub>), 29.4 (-CH<sub>2</sub>), 29.3 (-CH<sub>2</sub>), 29.2 (-CH<sub>2</sub>), 25.5 (C-3''), 25.1 (C-3''), 22.8 (-CH<sub>2</sub>), 14.3 (-CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(81 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = -1.03, -1.20.

**DC:** R<sub>f</sub>(Dichlormethan/Methanol, 20:1) = 0.84.

#### 7.3.2.2.9 Synthese von *±*-Benzyl-(2'*S*)-2'-*O*-Benzyl-3'-*O*-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-*O*-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **20b**

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 99 mg *±*-Benzyl-(L-2-*O*-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-myo-inosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **L-66**



**20b**

(97 µmol, 1.0 Äquiv.) und 0.14 g (2*R*)-2-*O*-

Benzyl-glycerilpalmitat (*R*)-**21** (0.34 mmol, 3.5 Äquiv.) in abs. Acetonitril (5.0 mL) verwendet. Zur Aktivierung wurden 0.12 mL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 36 µmol, 0.37 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurden vier Mal 60 µL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 18 µmol, 0.19 Äquiv.) hinzugetropft. Zur Oxidation wurden 18 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 99 µmol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (19 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 11 mL)

gewaschen. Das Rohprodukt wurde dreimal säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 20% - 50%; SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v; SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 2:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 90 mg (67 µmol, 69%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 1351.79, **Summenformel:** C<sub>83</sub>H<sub>115</sub>O<sub>13</sub>P.

**Analytische Daten des Diastereomergemisches:** <sup>1</sup>H-NMR:(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.41 - 7.16 (m, 30H, Bn-H), 5.93 - 5.87 (m, 1H, H-2), 5.13 - 3.45 (m, 22H, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-1', H-2', H-3'), 2.44 - 2.16 (m, 4H, H-2''), 1.67 - 1.50 (m, 4H, H-3''), 1.41 - 1.06 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 173.3 (C=O), 172.7 (C=O), 138.7 (Bn-C), 138.6 (Bn-C), 137.7 (Bn-C), 136.1 (Bn-C), 128.7 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 127.3 (Bn-C), 82.2 (C-5), 80.7 (C-6), 78.8 (C-4), 78.5 (C-1), 78.1 (C-2'), 75.9 (C-3), 77.2 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.6 (2x Bn-CH<sub>2</sub>), 75.3 (C-2), 72.2 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 67.4 (Bn-CH<sub>2</sub>), 62.3 (C-1'), 61.8 (C-3'), 34.4 (C-2''), 32.0 (C-2''), 31.8 (-CH<sub>2</sub>), 29.8 (-CH<sub>2</sub>), 29.4 (-CH<sub>2</sub>), 28.8 (-CH<sub>2</sub>), 25.9 (-CH<sub>2</sub>), 25.4 (-CH<sub>2</sub>), 22.9 (-CH<sub>2</sub>), 22.8 (-CH<sub>2</sub>), 22.7 (-CH<sub>2</sub>), 22.2 (-CH<sub>2</sub>), 22.0 (-CH<sub>2</sub>), 14.3 (-CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(243 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = -1.11, -1.27.

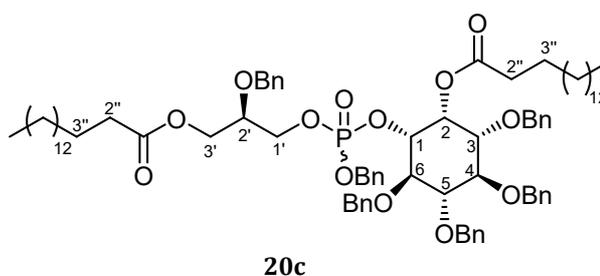
**MS** (MALDI, pos.) *m/z*: ber.: 1373.797 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 1373.384 [M+Na]<sup>+</sup>.

#### 7.3.2.2.10 Synthese von *±*-Benzyl-(2'R)-2'-O-Benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat **20c**

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 65 mg *±*-Benzyl-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **D-66**

(64 µmol, 1.0 Äquiv.) und 81 mg (2*S*)-2-O-

Benzyl-glycerylpalmitat (*S*)-**21** (0.19 mmol, 3.0 Äquiv.) in abs. Acetonitril (3.5 mL) verwendet. Zur Aktivierung wurden 0.14 mL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 42 µmol, 0.66 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal 70 µL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 21 µmol, 0.33 Äquiv.) hinzugegeben. Zur Oxidation wurden 12 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 66 µmol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (13 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 7 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 16% - 25%) gereinigt.



**Ausbeute:** Es konnten 44 mg (33  $\mu$ mol, 51%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 1351.79, **Summenformel:** C<sub>83</sub>H<sub>115</sub>O<sub>13</sub>P.

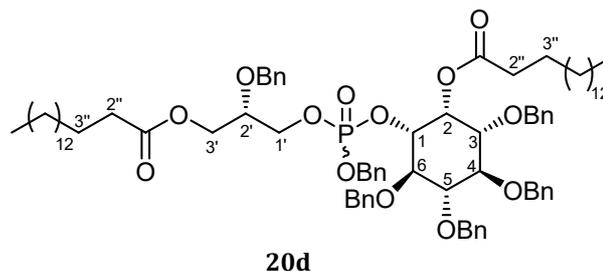
**Analytische Daten des Diastereomerengemisches:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.38 - 7.18 (m, 30H, Bn-H), 5.95 - 5.87 (m, 1H, H-2), 5.20 - 3.29 (m, 22H, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-1', H-2', H-3'), 2.47 - 2.18 (m, 4H, H-2''), 1.75 - 1.50 (m, 4H, H-3''), 1.42 - 1.09 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 173.3 (C=O), 172.7 (C=O), 138.7 (Bn-C), 138.6 (Bn-C), 137.7 (Bn-C), 136.1 (Bn-C), 128.7 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 127.3 (Bn-C), 82.2 (C-5), 80.7 (C-6), 78.8 (C-4), 78.5 (C-1), 78.1 (C-2'), 75.9 (C-3), 77.2 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.6 (2x Bn-CH<sub>2</sub>), 75.3 (C-2), 72.2 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 67.4 (Bn-CH<sub>2</sub>), 62.3 (C-1'), 61.8 (C-3'), 34.4 (C-2''), 32.0 (C-2''), 31.8 (-CH<sub>2</sub>), 29.8 (-CH<sub>2</sub>), 29.4 (-CH<sub>2</sub>), 28.8 (-CH<sub>2</sub>), 25.9 (-CH<sub>2</sub>), 25.4 (-CH<sub>2</sub>), 22.9 (-CH<sub>2</sub>), 22.8 (-CH<sub>2</sub>), 22.7 (-CH<sub>2</sub>), 22.2 (-CH<sub>2</sub>), 22.0 (-CH<sub>2</sub>), 14.3 (-CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(81 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -1.08, -1.24.

#### 7.3.2.2.11 Synthese von $\pm$ -Benzyl-(2'S)-2'-O-Benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat **20d**

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 70 mg  $\pm$ -Benzyl-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit **D-66**

(69  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und 95 mg (2R)-2-O-

Benzyl-glycerilpalmitat (R)-**21** (0.23 mmol, 3.3 Äquiv.) in abs. Acetonitril (3.8 mL) verwendet. Für die Aktivierung wurden 84  $\mu$ L 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 25  $\mu$ mol, 0.37 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal 42  $\mu$ L 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 13  $\mu$ mol, 0.19 Äquiv.) hinzugegeben. Zur Oxidation wurden 14  $\mu$ L tert-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 77  $\mu$ mol, 1.1 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (16 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 16 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 20% - 25%) gereinigt.



**Ausbeute:** Es konnten 79 mg (58  $\mu$ mol, 85%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 1351.79, **Summenformel:** C<sub>83</sub>H<sub>115</sub>O<sub>13</sub>P.

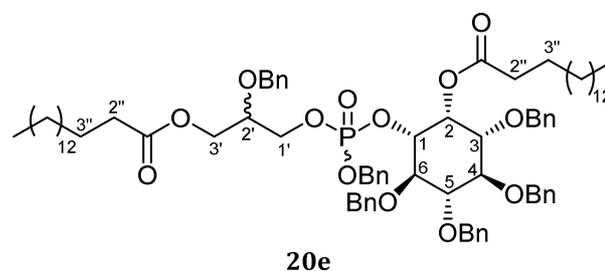
**Analytische Daten des Diastereomerengemisches:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.39 - 7.17 (m, 30H, Bn-H), 5.96 - 5.87 (m, 1H, H-2), 5.19 - 3.30 (m, 22H, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-1', H-2', H-3'), 2.40 - 2.13 (m, 4H, H-2''), 1.70 - 1.50 (m, 4H, H-3''), 1.45 - 1.02 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.94 - 0.86 (m, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 174.0 (C=O), 173.0 (C=O), 138.8 (Bn-C), 138.5 (Bn-C), 138.4 (Bn-C), 137.9 (Bn-C), 129.9 (Bn-C), 129.9 (Bn-C), 128.7 (Bn-C), 128.5

(Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.2 (Bn-C), 128.1 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.8 (Bn-C), 127.6 (Bn-C), 82.5 (C-5), 81.5 (C-6), 80.2 (C-4), 78.4 (C-1), 77.3 (C-2'), 76.2 (C-3), 75.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.6 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.5 (Bn-CH<sub>2</sub>), 68.8 (C-2), 62.8 (C-1'), 62.2 (C-3'), 34.7 (C-2''), 34.3 (C-2''), 32.1 (-CH<sub>2</sub>), 29.8 (-CH<sub>2</sub>), 29.7 (-CH<sub>2</sub>), 29.7 (-CH<sub>2</sub>), 29.6 (-CH<sub>2</sub>), 29.5 (-CH<sub>2</sub>), 29.4 (-CH<sub>2</sub>), 29.3 (-CH<sub>2</sub>), 29.2 (-CH<sub>2</sub>), 25.5 (C-3''), 25.1 (C-3''), 22.8 (-CH<sub>2</sub>), 14.3 (-CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = -1.13, -1.31.

DC: R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) = 0.5.

7.3.2.2.12 Synthese von  $\pm$ -Benzyl-((2R)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat und  $\pm$ -Benzyl-((2S)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **20e**

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 89 mg  $\pm$ -Benzyl-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-N,N-diisopropylamino-phosphoramidit **D-66** (88  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.), 0.13 g  $\pm$ -2-O-Benzyl-glycerylpalmitat (*rac*)-**21**



(0.31 mmol, 3.5 Äquiv.) in abs. Acetonitril (4.5 mL) verwendet. Zur Aktivierung wurden 106  $\mu$ L 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 32  $\mu$ mol, 0.36 Äquiv.) und folgend vier Mal 53  $\mu$ L Rt 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 16  $\mu$ mol, 0.18 Äquiv.) hinzuge tropft. Für die Oxidation wurden 16  $\mu$ L *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 88  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit 19 mL Ethylacetat verdünnt und mit 2x 11 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat, 5:1) gereinigt.

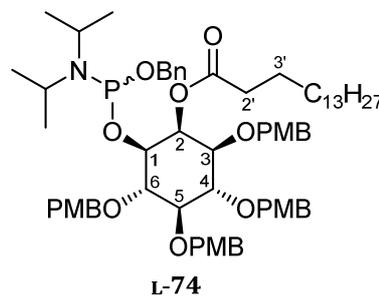
**Ausbeute:** Es konnten 21 mg (16  $\mu$ mol, 18%) eines farblosen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 1351.79, **Summenformel:** C<sub>83</sub>H<sub>115</sub>O<sub>13</sub>P.

**Analytische Daten des Diastereomere ngemisches von vier Diastereomeren:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.41 - 7.14 (m, 30H, Bn-H), 6.05 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 0.2H, H-2), 6.00 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 0.1H, H-2), 5.94 - 5.88 (m, 0.7H, H-2), 5.17 - 3.26 (m, 23H, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1, H-3, ), 2.36 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 2 H, H-2''), 2.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, 1H, H-2''), 2.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, 1H, H-2''), 1.70 - 1.50 (4H, H-3''), 1.36 - 1.16 (m, 24H, -CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 6H, -CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = -1.08, -1.14, -1.24, -1.30.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) = 0.4.

7.3.2.2.13 Synthese von  $\pm$ -(benzyl)-(L-2-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-para-methoxybenzyl-myoinosit-1-yl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit L-74

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. D-2-O-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-O-para-methoxybenzyl-myoinositol **D-75** (35 mg, 39  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und  $\pm$ -Benzyl-bis-(N,N-diisopropylamino)-Phosphoramidit **64** (20 mg, 60  $\mu$ mol, 1.5 Äquiv.) wurden in abs. Acetonitril (3 mL) und aktiviertem Molsieb (3 Å) 3 h bei Rt gerührt.



Dann wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 65  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol, 0.33 Äquiv.) hinzuge tropft. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol in Acetonitril (0.3 M, 32  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol, 0.16 Äquiv.) hinzuge tropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan (15 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2x15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 5% Triethylamin) gereinigt.

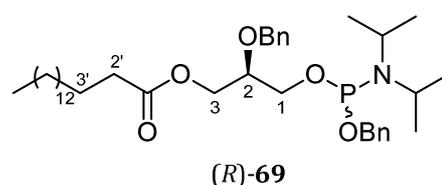
**Ausbeute:** Es konnten 23 mg (20  $\mu$ mol, 51%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 1136.46, **Summenformel:** C<sub>67</sub>H<sub>94</sub>NO<sub>12</sub>P.

**Analytische Daten des Diastereomere ngemisches:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.51 - 7.11 (m, 13H, Ar-H), 6.88 - 6.70 (m, 8H, Ar-H), 6.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 0.5H, H-2), 5.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 0.5H, H-2), 5.16 - 4.10 (m, 10H, Bn-CH<sub>2</sub>, PMB-CH<sub>2</sub>), 3.92 - 3.82 (m, 1H, H-4), 3.81 - 3.75 (m, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.75 - 3.67 (m, 1H, H-1, H-6), 3.60 - 3.33 (m, H-1, H-3, H-5, H-6), 3.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, H-3), 2.39 - 2.30 (m, 2H, H-2'), 1.64 - 1.56 (m, 2H, H-3'), 1.37 - 1.10 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(122 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 150.75, 150.67.

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 5% Triethylamin) = 0.3.

7.3.2.2.14 Synthese von  $\pm$ -Benzyl-((2R)-2-O-benzyl-3-O-palmitoyl-glycer-1-yl)-diisopropylaminophosphoramidit (R)-69

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einem zuvor mit Toluol (2x 1 mL) ko evaporiertem Gemisch aus (2S)-2-O-Benzyl-glyceripalmitat (S)-**21** (20 mg, 48  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und Benzyl-bis-(N,N-diisopropylamino)-phosphoramidit **64** (24 mg, 71  $\mu$ mol,



1.5 Äquiv.) in abs. Acetonitril (3.3 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.30 mol/L in Acetonitril, 80 µL, 24 µmol, 0.50 Äquiv.). Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei Rt 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 40 µL, 12 µmol, 0.25 Äquiv.) hinzugegeben und 1 h bei 0°C und 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan (8.5 mL) gelöst und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2x 8.5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 5% Triethylamin) gereinigt.

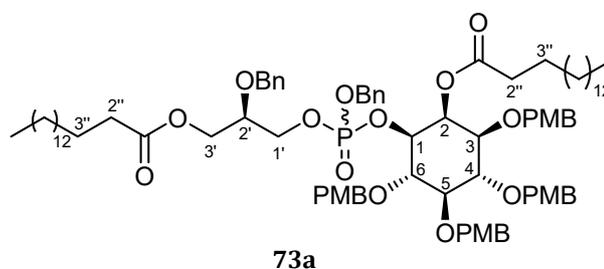
**Ausbeute:** Es konnten 21 mg (32 µmol, 66%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 657.92 g/mol, **Summenformel:** C<sub>39</sub>H<sub>64</sub>NO<sub>5</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.40 - 7.24 (m, 10H, Bn-H), 4.80 - 4.60 (m, 4H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.38 - 4.27 (m, 1H, H-3), 4.19 - 4.10 (m, 1H, H-3), 3.85 - 3.57 (m, 5H, H-1, H-2, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.30 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 2H, H-2'), 1.68 - 1.53 (m, 2H, H-3'), 1.36 - 1.21 (m, 24H, -CH<sub>2</sub>), 1.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 12H, -CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>).

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 10:1, v/v, 5% Triethylamin) = 0.7.

#### 7.3.2.2.15 Versuch der Synthese von *±*-Benzyl-((2'*R*)-2'-*O*-benzyl-3'-*O*-palmitoyl-glycer-1-yl)-(L-2-*O*-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-para-methoxybenzyl-myoinositol-1-yl)-phosphat **73a**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einem zuvor mit Toluol (2x 1 mL) koevaporiertem Gemisch aus *±*-Benzyl-((2*R*)-2-*O*-benzyl-3-*O*-palmitoyl-glycer-1-yl)-



diisopropylaminophosphoramidit (*R*)-**69** (20 mg, 30 µmol, 1.0 Äquiv.) und D-2-*O*-Palmitoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-para-methoxy-benzyl-myoinositol **D-75** (41 mg, 45 µmol, 1.5 Äquiv.) in abs. Acetonitril (1.5 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.30 mol/L in Acetonitril, 33 µL, 9.9 µmol, 0.33 Äquiv.). Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei Rt 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 17 µL, 5.0 µmol, 0.17 Äquiv.) hinzugegeben und 1 h bei 0°C und 20 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxid (5.4 µL, 5.5 mol/L in Decan, 30 µmol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde 20 min bei Rt gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat (6 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 3.5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde dreimal

säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 200:1, v/v, Dichlormethan/Diethylether, 20:1, v/v, Petrolether/Ethylacetat, 2:1, v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es konnten 12 mg (8.2  $\mu\text{mol}$ , 27%, verunreinigt) eines farblosen Öls erhalten werden.

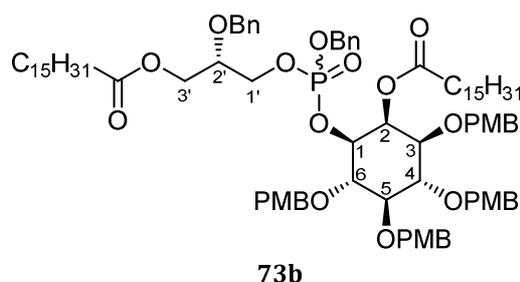
**Molmasse:** 1471.87 g/mol, **Summenformel:**  $\text{C}_{87}\text{H}_{123}\text{O}_{17}\text{P}$ .

**Analytische Daten:**  $^1\text{H-NMR}$ :(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.47 - 7.13 (m, 18H, Bn-H, PMB-H), 6.94 - 6.74 (m, 8H, PMB-H), 5.91 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.6$  Hz, 0.2H, H-2), 5.73 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.6$  Hz, 0.8 Hz, 1H, H-2), 5.15 - 3.96 (m, 12H, Bn- $\text{CH}_2$ , PMB- $\text{CH}_2$ ), 3.85 - 3.80 (m, 12H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.76 - 3.31 (m, 5H, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6), 2.50 - 1.96 (m, 4H, H-2''), 1.76 - 1.49 (m, 4H, H-3''), 1.45 - 1.07 (m, 48 H,  $\text{CH}_2$ ), 0.91 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz, 6 H,  $\text{CH}_3$ );  $^{31}\text{P-NMR}$ :(81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = -1.41, -1.62.

**HR-MS** (ESI, pos.)  $m/z$ : ber.: 1493.8390  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , gef.: 1493.8624  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### 7.3.2.2.16 Versuch der Synthese von $\pm$ -Benzyl-((2'S)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-para-methoxybenzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **73b**

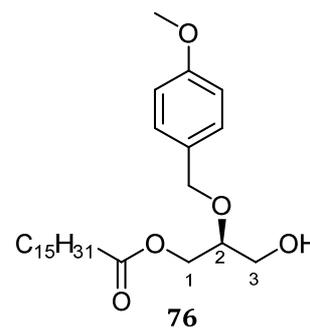
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von  $\pm$ -Benzyl-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-para-methoxybenzyl-myo-inosit-1-yl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit **L-74** (23 mg, 20  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) und (2R)-2-O-Benzyl-1-O-



palmitoylglycerin (17 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) in abs. Acetonitril (2 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 24  $\mu\text{L}$ , 7.2  $\mu\text{mol}$ , 0.36 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei Rt 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 12  $\mu\text{L}$ , 3.6  $\mu\text{mol}$ , 0.18 Äquiv.) hinzugegeben und 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan, 4.0  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben und die Reaktionslösung für 20 min bei 0°C gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (5 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 3 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es konnte jedoch kein Produkt erhalten werden.

### 7.3.2.2.3 Synthese von (S)-Palmitoyl-2-O-para-methoxybenzylglycerin **76**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Eine Lösung von (2R,3S,4S,5R)-2,5-Di-O-para-methoxybenzyl-1,6-di-O-palmitoylmannitol **77** (1.00 g, 1.11 mmol, 1.00 Äquiv.) und Natriumperodat (840 mg, 3.93 mmol, 3.54 Äquiv.) und ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (1 mL) in einer Mischung aus abs. Ethanol (40 mL) und abs. Dichlormethan (25 mL) wurde 18 h bei Rt gerührt. Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch



filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck eingengt. Hierzu wurde eine Lösung von Natriumcyanoborhydrid (375 mg, 5.97 mmol, 5.38 Äquiv.) in Wasser (1 mL) zugegeben und durch Zugabe von Essigsäure ein pH-Wert ca. 5 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2.5 h bei Rt gerührt, dann mit Ethylacetat (75 mL) verdünnt und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (25 mL) und ges. Natriumchloridlösung (2x 25 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether-Ethylacetat-Gradient 17%-20%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 712 mg (1.58 mmol, 74%) eines farblosen Öls erhalten werden.

**Molmasse:** 450.66 g/mol, **Summenformel:** C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.30 - 7.24 (m, 2H, Ar-H), 6.91 - 6.85 (m, 2H, Ar-H), 4.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.3 Hz, 1H, PMB-CH<sub>2</sub>), 4.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.3 Hz, 1H, PMB-CH<sub>2</sub>), 4.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, 2H, H-1), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.73 - 3.55 (m, 3H, H-2, H-3), 2.32 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.93 (s, 1H, OH), 1.62 (quint., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-3'), 1.36 - 1.18 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

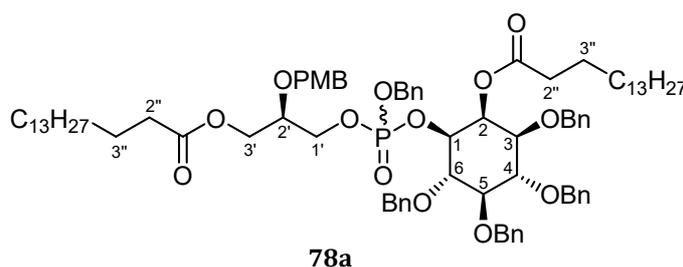
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 2922, 2852, 1737, 1613, 1464, 1246, 1173, 1110, 1036, 821, 515.

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 473.3243 [M+Na]<sup>+</sup>, 473.2892 [M+Na]<sup>+</sup>.

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat) = 0.3.

### 7.3.2.2.3.1 Synthese von Benzyl-((2'R)-2'-O-para-methoxybenzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **78a**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von (2'S)-2'-O-para-methoxybenzylglycerylpalmitat **76**



(0.31 g, 0.70 mmol, 3.5 Äquiv.) und  $\pm$ -Benzyl-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-inositol-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **L-66** (0.20 g, 0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. Acetonitril (12 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 0.23 mL, 69  $\mu$ mol, 0.35 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol Acetonitril (0.3 M, 0.12 mL, 35  $\mu$ mol, 0.18 Äquiv.) hinzugegeben, das Reaktionsgemisch wurde langsam aufgewärmt und schließlich 2 h bei Rt gerührt. Daraufhin wurde bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan, 37  $\mu$ L, 0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat (40 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 21 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Aceton, 20:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 177 mg (0.128 mmol, 65%) eines farblosen Sirups als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis von 4:1 erhalten werden. **Molmasse:** 1381.82 g/mol, **Summenformel:** C<sub>84</sub>H<sub>117</sub>O<sub>14</sub>P.

**Analytische Daten des Diastereomerengemisches:** <sup>1</sup>H-NMR:(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.40 – 7.23 (m, 27H, Bn-H, PMB-H), 6.86 – 6.81 (m, 2H, PMB-H), 5.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 0.2H, H-2), 5.91 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 0.8H, H-2), 5.10 – 4.37 (m, 13H, Bn-CH<sub>2</sub>, PMB-CH<sub>2</sub>, H-1), 4.27 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, 0.8H, H-3'), 4.25 – 4.21 (m, 0.8H, H-2'), 4.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, 0.8H, H-3'), 4.13 – 3.99 (m, 1.8H, H-1'), 3.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 0.2H, H-6), 3.92 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 0.8H, H-6), 3.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 0.2H, H-4), 3.80 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 0.8H, H-4), 3.76 (s, 0.6H, -OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 2.4H, -OCH<sub>3</sub>), 3.50 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 0.2H, H-5), 3.48 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 2.7 Hz, 0.2H, H-3), 3.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 0.8H, H-5), 3.33 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 0.8H, H-3), 2.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-2''), 2.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 1.6H, H-2''), 2.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 0.4H, H-2''), 1.69 - 1.54 (m, 4H, H-3'', H-3'''), 1.37 – 1.18 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.91 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 173.6 (C=O), 173.5 (C=O), 172.8 (C=O), 159.5 (Ar-C), 159.4 (Ar-C), 138.8 (Ar-C), 138.7 (Ar-C), 138.5 (Ar-C, Ar-C), 138.4 (Ar-C), 138.3 (Ar-C), 137.8 (Ar-C), 137.7 (Xb-Ar-C), 135.9 (Ar-C), 135.8 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 129.9 (Ar-C), 129.8 (2x Ar-C), 129.5 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (3xAr-C), 128.3 (Ar-C), 128.2 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.8 (2xAr-C), 127.7 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 114.0 (Ar-C), 113.9 (Ar-C), 82.7 (C-5), 81.3 (C-4), 80.2 (C-6), 80.1 (C-6), 78.4 (C-3), 78.3 (C-3), 76.4 (C-1), 76.3 (C-1), 76.0 (Ar-CH<sub>2</sub>), 75.9 (Ar-CH<sub>2</sub>), 75.7 (Ar-CH<sub>2</sub>), 75.6 (Ar-CH<sub>2</sub>), 75.2 (Ar-CH<sub>2</sub>), 75.1 (Ar-CH<sub>2</sub>), 72.4 (Ar-CH<sub>2</sub>), 72.2 (Ar-CH<sub>2</sub>), 72.0 (Ar-CH<sub>2</sub>), 71.9 (Ar-CH<sub>2</sub>), 69.6 (C-1'), 69.5 (C-1'), 68.5 (C-2), 68.4 (C-2), 66.1 (C-2'), 62.8 (C-3'), 62.5 (C-3'), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 36.6 (C-2''), 36.5 (C-2''), 34.3 (C-2'''), 34.2 (C-2'''), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (C-3''), 25.3 (C-3''), 25.0 (C-3'''), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(243 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -1.02, -1.37.

**HR-MS** (ESI, pos.)  $m/z$ : ber.: 1403.8079  $[M+Na]^+$ , gef.: 1403.8088  $[M+Na]^+$ .

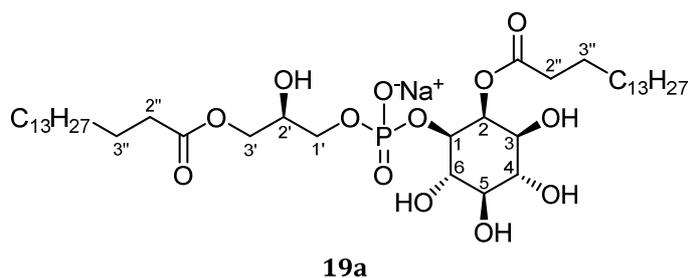
**IR**:  $\tilde{\nu}$   $[cm^{-1}]$ : 2923, 2852, 1740, 1612, 1514, 1497, 1455, 1359, 1249, 1213, 1156, 1090, 1071, 1019, 908, 824, 731, 696, 647, 596, 501.

**Drehwert**:  $[\alpha]_D^{22} = 4.5^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $c$  1.0).

### 7.3.2.3 Entschützungen der aromatischen Schutzgruppen

#### 7.3.2.3.1 Synthese von ((2'R)-3'-O-Palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **19a**

*Variante 1*: Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 75.0 mg (55.5  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.)  $\pm$ -Benzyl-((2'R)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-



inosit-1-yl)-phosphat **20a** in 11.7 mL Tetrahydrofuran sowie 11.7 mg Palladium (110  $\mu$ mol, 2.00 Äquiv.) verwendet. Die Reaktionszeit betrug sieben Tage.

*Variante 2*: Eine Lösung von  $\pm$ -Benzyl-(2'R)-2'-O-*para*-methoxybenzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **78** (177 mg, 128  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.) und Palladium-black® (29 mg) wurde in zuvor mit Stickstoff gesättigtem abs. Tetrahydrofuran (2.9 mL) für 4 Tage bei Rt in einer Wasserstoffatmosphäre (ca. 1 bar) gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch (15 mL, 2:1, v/v) aufgenommen. Die Lösung wurde zentrifugiert und das Lösungsmittel des Zentrifugats unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Sephadex® LH-20, Dichlormethan/Methanol/Wasser, 10:5:1, v/v/v) gereinigt.

*Variante 3*: Zu Triethylammonium-(2'S)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetrakis-O-*para*-methoxybenzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **49** (38.0 mg, 25.6  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.) in einem zuvor mit Stickstoff gesättigten Methanol/2-Propanol-Gemisch (6 mL, 1:1, v/v) wurde Palladium (134 mg, 10% auf Kohle) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 17 h in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend durch Celite® 545 filtriert und mit einem 2-Propanol/Wasser-Gemisch (40 mL, 1:1, v/v) gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute**: *Variante 1*: Es konnten 11 mg (13  $\mu$ mol, 23%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden. *Variante 2*: Es konnten 107 mg (128  $\mu$ mol, >99%) eines farblosen Feststoffs erhalten

werden. *Variante 3*: Es konnte kein sauberes Produkt in ausreichender Menge erhalten werden.

**Molmasse**: 811.04 g/mol (H<sup>+</sup> als Gegenion), 833.03 g/mol (Na<sup>+</sup> als Gegenion); **Summenformel**: C<sub>41</sub>H<sub>79</sub>O<sub>13</sub>P (H<sup>+</sup> als Gegenion).

**Analytische Daten**: **<sup>1</sup>H-NMR**:(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:5:1, v/v/v): δ (ppm) = 6.04 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-2), 4.65 - 4.60 (m, 1H, H-1), 4.57 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 2H, H-3'), 4.54 - 4.50 (m, 1H, H-2'), 4.47 - 4.41 (m, 2H, H-1'), 4.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 4.04 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5, 1H, H-4), 4.01 - 3.96 (m, 1H, H-3), 3.72 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 2.83 - 2.76 (m, 4H, H-2''), 2.10 - 2.02 (m, 4H, H-3''), 1.82 - 1.63 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 1.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); **<sup>31</sup>P-NMR**:(243 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = -1.07.

**HR-MS** (ESI, neg.) *m/z*: ber.: 809.5186 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 809.5057 [M-H]<sup>-</sup>.

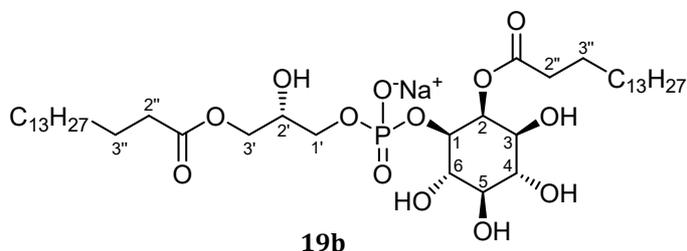
**MS** (MALDI, neg.) *m/z*: ber.: 809.519 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 809.524 [M-H]<sup>-</sup>.

**IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3370, 2956, 2917, 2850, 1742, 1467, 1382, 1163, 1098, 1040, 1010, 942, 865, 721, 520.

**Drehwert 19a**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = 2^{\circ}$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.05).

### 7.3.2.3.2 Synthese von ((2'S)-3'-O-Palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **19b**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 66 mg (49 μmol, 1.0 Äquiv.)  $\pm$ -Benzyl-((2'S)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **20b**



in 10 mL Tetrahydrofuran sowie 10 mg Palladium (97 μmol, 2.0 Äquiv.) verwendet. Die Reaktionszeit betrug sieben Tage. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt.

**Ausbeute**: Es konnten 26 mg (31 μmol, 64%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse**: 811.04 g/mol (H<sup>+</sup> als Gegenion), 833.03 g/mol (Na<sup>+</sup> als Gegenion); **Summenformel**: C<sub>41</sub>H<sub>79</sub>O<sub>13</sub>P (H<sup>+</sup> als Gegenion).

**Analytische Daten**: **<sup>1</sup>H-NMR**:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1): δ (ppm) = 5.85 (s, 1H, H-2), 4.59 - 4.16 (m, 4H, H-1', H-3'), 4.16 - 4.07 (m, 1H, H-1), 4.05 - 3.94 (m, 1H, H-2'), 3.92 - 3.77 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.65 - 3.59 (m, 1H, H-3), 2.71 - 2.52 (m, 4H, H-2''), 1.98 - 1.76 (m, 4H, H-3''), 1.65 - 1.42 (m, 48 H, CH<sub>2</sub>), 1.4 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>); **<sup>31</sup>P-NMR**:(162 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1): δ (ppm) = 0.85.

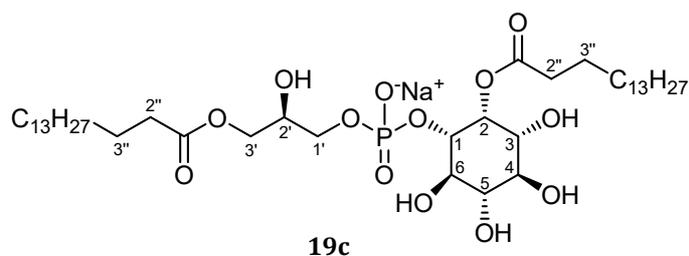
**HR-MS** (ESI, neg.)  $m/z$ : ber.: 809.5186 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 809.5132 [M-H]<sup>-</sup>.

**MS** (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 809.519 [M-H]<sup>-</sup>, gef.:  $m/z$  = 809.608 [M-H]<sup>-</sup>.

**Drehwert 19b**:  $[\alpha]_D^{23} = 15^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c$  0.05).

### 7.3.2.3.3 Synthese von ((2'R)-3'-O-Palmitoyl-glycer-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **19c**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 44 mg (33  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.)  $\pm$ -Benzyl-((2'R)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **20c**



in 7.0 mL Tetrahydrofuran sowie 7.0 mg Palladium (66  $\mu$ mol, 2.00 Äquiv.) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 6 Tage.

**Ausbeute**: Es konnten 9.3 mg (11  $\mu$ mol, 35%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse**: 811.04 g/mol (H<sup>+</sup> als Gegenion), 833.03 g/mol (Na<sup>+</sup> als Gegenion), **Summenformel**: C<sub>41</sub>H<sub>79</sub>O<sub>13</sub>P (H<sup>+</sup> als Gegenion).

**Analytische Daten**: <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1):  $\delta$  (ppm) = 5.85 (s, 1H, H-2), 4.59 - 4.16 (m, 4H, H-1', H-3'), 4.16 - 4.07 (m, 1H, H-1), 4.05 - 3.94 (m, 1H, H-2'), 3.92 - 3.77 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.65 - 3.59 (m, 1H, H-3), 2.71 - 2.52 (m, 4H, H-2''), 1.98 - 1.76 (m, 4H, H-3''), 1.65 - 1.42 (m, 48 H, CH<sub>2</sub>), 1.4 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(162 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1):  $\delta$  (ppm) = 0.85.

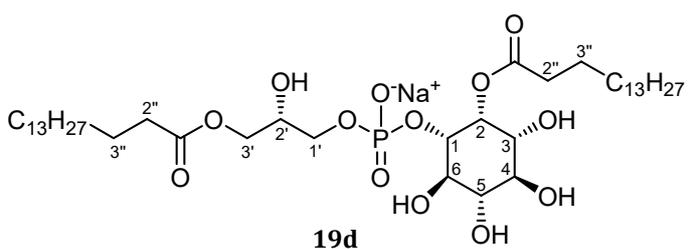
**HR-MS** (ESI, neg.)  $m/z$ : ber.: 809.5186 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 809.4976 [M-H]<sup>-</sup>.

**MS**: (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 809.519 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 809.699[M-H]<sup>-</sup>.

**Drehwert 19c**:  $[\alpha]_D^{23} = -13^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c$  0.05).

### 7.3.2.3.4 Synthese von ((2'S)-3'-O-Palmitoyl-glycer-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **19d**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 73 mg (54  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.)  $\pm$ -Benzyl-((2'S)-2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-



benzyl-*myo*-inosit-1-yl)-phosphat **20d** in 13 mL Tetrahydrofuran sowie 13 mg Palladium (0.12 mmol, 2.3 Äquiv.) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 3 Tage.

**Ausbeute:** Es konnten 15 mg (18  $\mu$ mol, 31%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse:** 811.04 g/mol ( $H^+$  als Gegenion), 833.03 g/mol ( $Na^+$  als Gegenion), **Summenformel:**  $C_{41}H_{79}O_{13}P$  ( $H^+$  als Gegenion).

**Analytische Daten:**  **$^1H$ -NMR:**(600 MHz,  $CDCl_3/MeOD/D_2O$ , 10:5:1, v/v/v):  $\delta$  (ppm) = 6.04 (t,  $^3J_{H,H} = 2.5$  Hz, 1H, H-2), 4.65 - 4.60 (m, 1H, H-1), 4.57 (t,  $^3J_{H,H} = 5.2$  Hz, 2H, H-3'), 4.54 - 4.50 (m, 1H, H-2'), 4.47 - 4.41 (m, 2H, H-1'), 4.18 (t,  $^3J_{H,H} = 9.5$  Hz, 1H, H-6), 4.04 (t,  $^3J_{H,H} = 9.5$ , 1H, H-4), 4.01 - 3.96 (m, 1H, H-3), 3.72 (t,  $^3J_{H,H} = 9.5$  Hz, 1H, H-5), 2.83 - 2.76 (m, 4H, H-2''), 2.10 - 2.02 (m, 4H, H-3''), 1.82 - 1.63 (m, 48H,  $CH_2$ ), 1.31 (t,  $^3J_{H,H} = 7.0$  Hz, 6H,  $CH_3$ );  **$^{31}P$ -NMR:**(243 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = -1.07.

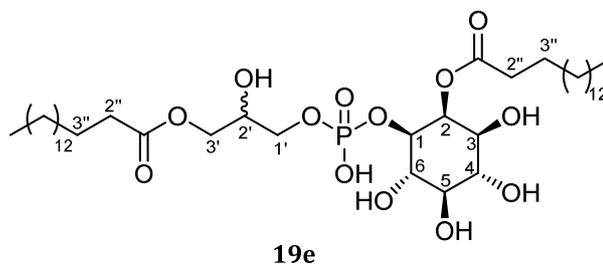
**HR-MS** (ESI, neg.)  $m/z$ : ber.: 809.5186 [M-H] $^-$ , gef.: 809.5139 [M-H] $^-$ .

**MS** (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 809.519 [M-H] $^-$ , gef.: 809.703 [M-H] $^-$ .

**Drehwert 19d:**  $[\alpha]_D^{23} = -8^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $c$  0.05).

### 7.3.2.3.5 Versuch der Synthese von ((2'R)-3'-O-Palmitoyl-glycer-1-yl)-(L-2-O-palmitoyl-*myo*-inosit-1-yl)-phosphat und ((2'S)-3'-O-Palmitoyl-glycer-1-yl)-(L-2-O-palmitoyl-*myo*-inosit-1-yl)-phosphat **19e**

Zu  $\pm$ -Benzyl-( $\pm$ -2'-O-benzyl-3'-O-palmitoyl-glycer-1'-yl)-(L-2-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-inosit-1-yl)-phosphat **20e** (21 mg, 16  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) in zuvor mit Stickstoff gesättigtem 2-Propanol (3.3 mL) wurde Palladium (74 mg, 10% auf Kohle)



gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 6 Tage in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit 2-Propanol (2x 1 mL), einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (1 mL, 1:1, v/v) und Dichlormethan (1 mL) extrahiert und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck entfernt. Der zurückgebliebene Katalysator wurde 6 h bei Rt in Dichlormethan gerührt, filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Daraufhin wurde ein Teil des Rohprodukts säulenchromatographisch (Sephadex® LH-20, Dichlormethan/Methanol, 1:1, v/v) gereinigt. Ein Teil des erhaltenen Feststoffs wurde in einem Gemisch aus ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Dichlormethan (1:1, v/v) suspendiert und das Lösungsmittel der wässrigen Phase unter vermindertem Druck entfernt. Ein zweiter Teil des nach der Säulenchromatographie erhaltenen Feststoffs wurde in einem Gemisch aus Wasser und

Dichlormethan (1:1, v/v) suspendiert und das Lösungsmittel der wässrigen Phase unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** Es konnten 12 mg eines stark verunreinigten grauen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse:** 811.04 g/mol (H<sup>+</sup> als Gegenion), 833.03 g/mol (Na<sup>+</sup> als Gegenion); **Summenformel:** C<sub>41</sub>H<sub>79</sub>O<sub>13</sub>P (H<sup>+</sup> als Gegenion).

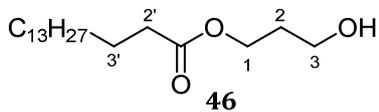
**MS** (MALDI, neg.) *m/z*: ber.: 809.519 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 810.043 [M-H]<sup>-</sup>.

### 7.3.3 Synthese der Generation-II-PIs

#### 7.3.3.1 Synthese des C16-Derivates

##### 7.3.3.1.1 Synthese von 3-Hydroxypropylpalmitat und 1,3-Dipalmitoxypropan **46**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von 1,3-Propandiol **79** (0.20 mL, 0.21 mg, 2.8 mmol, 3.0 Äquiv.) und 4-Dimethylaminopyridin (1 Kristall) in abs. Pyridin (5 mL) wurde bei 0°C Palmitinsäurechlorid **36** (0.28 mL, 0.25 g, 0.92 mmol, 1.0 Äquiv.) getropft. Die Reaktionslösung wurde 20 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt sowie mit Toluol (3 mL) und Dichlormethan (3 mL) koevaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (50 mL) gelöst und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 2:1, v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** Es konnten 231 mg (0.73 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffs von Palmitoyl-1,3-propandiol und 88 mg (0.16 mmol, 17%) eines farblosen Feststoffs von Dipalmitoyl-1,3-propandiol erhalten werden. **Molmasse:** 314.51 g/mol, **Summenformel:** C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>.

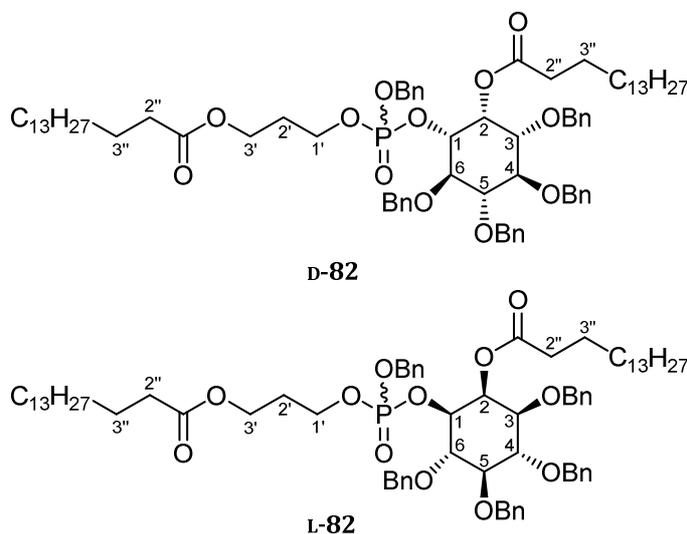
**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 4.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 2H, H-1), 3.69 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, 2H, H-3), 2.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 2H, H-2'), 1.87 (quint., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 2H, H-2), 1.62 (quint., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 2H, H-3'), 1.35 - 1.20 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 174.48 (C=O), 61.3 (C-1), 59.3 (C-3), 34.5 (C-2'), 32.0 (C-2), 31.2 (C-3'), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 25.1 (CH<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3323, 2955, 2915, 2847, 1731, 1472, 1462, 1194, 1095, 1081, 934, 851, 728, 720.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan/Methanol, 5:1, v/v) = 0.1.

7.3.3.1.2 Synthese von  $\pm$ -Benzyl-(3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(D,L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat (mix)-**82**,  $\pm$ -Benzyl-(3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **L-82** und  $\pm$ -Benzyl-(3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-phosphat **D-82**

*Variante 1:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von  $\pm$ -Benzyl-(D,L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit (mix)-**66** (10 mg, 9.8  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und 3-Hydroxypropylpalmitat (11 mg, 34  $\mu$ mol, 3.5 Äquiv.), welches zuvor mit abs. Toluol (2x0.5 mL) koevaporiert



worden war, in abs. Acetonitril (0.5 mL) wurde bei Rt 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 17  $\mu$ L, 5.0  $\mu$ mol, 0.5 Äquiv.) hinzuge tropft und 5 min bei Rt gerührt. Folgend wurde zwei Mal nach jeweils 5 min bei Rt 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 8.0  $\mu$ L, 2.4  $\mu$ mol, 0.5 Äquiv.) hinzuge tropft und 1 h bei Rt gerührt. Dann wurde bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxidlösung in Decan (1.8  $\mu$ L, 5.5 mol/L, 9.8  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) hinzuge tropft und 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat (2 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x1 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 4:1) gereinigt.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 157 mg  $\pm$ -Benzyl-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **D-66** (154  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.) und 169 mg 3-Hydroxypropylpalmitat **46** (0.537 mmol, 3.50 Äquiv.) in abs. Acetonitril (9.9 mL) verwendet. Zur Aktivierung wurden 200  $\mu$ L 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 60  $\mu$ mol, 0.39 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal 100  $\mu$ L 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 30  $\mu$ mol, 0.19 Äquiv.) hinzuge tropft. Für die Oxidation wurden 31.0  $\mu$ L *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 0.171 mmol, 1.11 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (28 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 16 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 17% - 25%) gereinigt.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 140 mg  $\pm$ -Benzyl-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-*myo*-inosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **L-66** (138  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.) und 152 mg 3-Hydroxypropylpalmitat **46** (0.483 mmol, 3.50 Äquiv.) in abs. Acetonitril (7.5 mL) verwendet. Zur Aktivierung wurden 170  $\mu$ L 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 51  $\mu$ mol, 0.37 Äquiv.) hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal 85  $\mu$ L 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 26  $\mu$ mol, 0.18 Äquiv.) hinzugetropft. Für die Oxidation wurden 26.0  $\mu$ L *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in Decan, 0.143 mmol, 1.04 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (28 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 15 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat-Gradient, 17% - 25%) gereinigt.

**Ausbeute:** *Variante 1:* Es konnten 5.5 mg (4.4  $\mu$ mol, 45%) eines farblosen Öls erhalten werden, *Variante 2:* Es konnten 119 mg (95.5  $\mu$ mol, 62%) eines farblosen Sirups erhalten werden, *Variante 3:* Es konnten 116 mg (93.1  $\mu$ mol, 67%) eines farblosen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 1245.67 g/mol, **Summenformel:** C<sub>76</sub>H<sub>109</sub>O<sub>12</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.38 - 7.19 (m, 25H, Bn-H), 5.94 - 5.89 (m, 1H, H-2), 5.12 - 4.68 (m, 9H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.48 - 4.36 (m, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>, H-1), 4.12 - 3.88 (m, 5H, H-1', H-3', H-4), 3.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-6), 3.58 - 3.48 (m, 2H, H-3, H-5), 2.45 - 2.15 (m, 4H, H-2''), 1.95 - 1.83 (m, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:(162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -1.03, -1.13.

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 1245.7735 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 1245.7733 [M+Na]<sup>+</sup>.

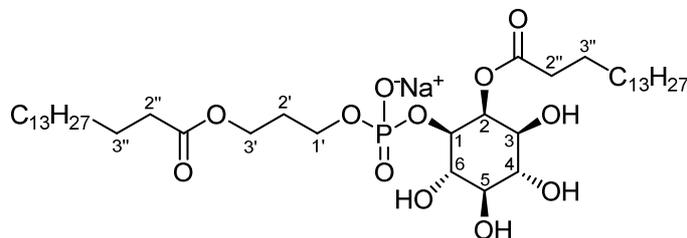
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 2923, 2852, 1740, 1612, 1514, 1497, 1455, 1359, 1249, 1213, 1156, 1090, 1071, 1018, 908, 824, 731, 696, 501.

**DC:** R<sub>f</sub>(Dichlormethan/Methanol, 20:1, v/v) = 0.84.

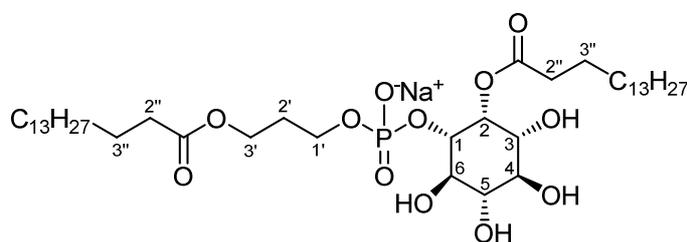
**Drehwert: L-82:**  $[\alpha]_D^{22} = 2.4^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.0).

7.3.3.1.3 Synthese von (3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(D,L-2-O-palmitoyl -myo-inosit-1-yl)-phosphat (mix)-**80**, (3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl -myo-inosit-1-yl)-phosphat **D-80** und Synthese von (3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl -myo-inosit-1-yl)-phosphat **L-80**

*Variante 1:* Zunächst wurde eine Lösung aus Ethylacetat, Tetrahydrofuran, 2-Propanol und Wasser (1.5 mL, 2:1:1:1, v/v/v/v) 20 min bei Rt mit Stickstoff gesättigt, dann wurden  $\pm$ -Benzyl-(3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(D,L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat (mix)-**82** (6.0 mg, 4.8  $\mu$ mol 1.0 Äquiv.) und Palladium(0)/Aktivkohle (10 Ma-%, 25 mg,) hinzugegeben und die Suspension in einer



**L-80**



**D-80**

Wasserstoffatmosphäre für zwei Tage bei Rt gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert und mit einer Lösung aus *iso*-Propanol und Wasser (40 mL, 1:1, v/v) gespült.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 0.12 g  $\pm$ -Benzyl-(3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat **D-82** (96  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) in 21 mL Tetrahydrofuran sowie 21 mg Palladium black® verwendet. Die Reaktionszeit betrug vier Tage. Der Rückstand wurde in 20 mL eines Gemisches aus Dichlormethan/Methanol/Wasser (20:10:1, v/v/v) aufgenommen.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 84 mg  $\pm$ -Benzyl-(3'-palmitoxy-prop-1'-yl)-(L-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat **L-82** (67  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) in 15 mL Tetrahydrofuran sowie 15 mg Palladium black® verwendet. Die Reaktionszeit betrug drei Tage. Der Rückstand wurde in 8 mL eines Gemisches aus Dichlormethan/Methanol/Wasser (20:10:1, v/v/v) aufgenommen.

**Ausbeute:** *Variante 1:* Es konnte keine ausreichende Menge des Produkts erhalten werden. *Variante 2:* Es konnten 61 mg (77  $\mu$ mol, 80%) eines weißen Feststoffs erhalten werden. *Variante 3:* Es konnten 45 mg (55  $\mu$ mol, 82%) eines weißen Feststoffs erhalten werden. **Molmasse:** 817.03 g/mol (Gegenion Na<sup>+</sup>), **Summenformel:** C<sub>41</sub>H<sub>78</sub>NaO<sub>12</sub>P.

**Analytische Daten zu D-80:** <sup>1</sup>H-NMR:(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1, v/v/v):  $\delta$  (ppm) = 5.54 (s, 1H, H-2), 4.24 - 4.10 (m, 3H, H-1, H-1'), 4.05 - 3.92 (m, 2H, H-3'), 3.72 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 3.67 - 3.52 (m, 2H, H-3, H-4), 3.35 - 3.28 (m, 1H, H-5), 2.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 2H, H-2''), 2.30 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> =

7.6 Hz, 2H, H-2''), 1.95 (dt,  $^3J_{H,H} = 6.3$  Hz,  $^3J_{H,H} = 6.2$  Hz, 2H, H-2'), 1.66 - 1.51 (m, 4H, H-3''), 1.39 - 1.15 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.87 (t,  $^3J_{H,H} = 6.7$  Hz, 6H, CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1, v/v/v):  $\delta$  (ppm) = 171.5 (C=O), 74.6 (C-5), 73.1 (C-4), 73.0 (C-2), 69.8 (C-1), 69.6 (C-6), 64.3 (C-1'), 61.6 (C-3), 61.5 (C-3') 34.8 (C-2''), 34.7 (C-2''), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (C-2'), 25.5 (C-3''), 14.3 (CH<sub>3</sub>).  $^{31}\text{P-NMR}$ : (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -1.04.

**MS** (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 793.523 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 793.519 [M-H]<sup>-</sup>.

**Analytische Daten** zu **L-80**:  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1, v/v/v):  $\delta$  (ppm) = 5.56 (t,  $^3J_{H,H} = 2.2$  Hz, 1H, H-2), 4.15 (t,  $^3J_{H,H} = 6.5$  Hz, 3H, H-1, H-1'), 3.71 (t,  $^3J_{H,H} = 9.5$  Hz, 1H, H-6), 3.62 (t,  $^3J_{H,H} = 6.5$  Hz, 2H, H-3'), 3.59 - 3.49 (m, 2H, H-3, H-4), 3.25 (t,  $^3J_{H,H} = 9.5$  Hz, 1H, H-5), 2.35 (t,  $^3J_{H,H} = 7.5$  Hz, H-2''), 2.28 (t,  $^3J_{H,H} = 7.5$  Hz, H-2''), 1.84 (quint.,  $^3J_{H,H} = 6.4$  Hz, 2H, H-2'), 1.63 - 1.55 (m, 4H, H-3''), 1.35 - 1.17 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.85 (t,  $^3J_{H,H} = 6.6$  Hz, 6H, CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 10:6:1, v/v/v):  $\delta$  (ppm) = 174.3 (C=O), 173.2 (C=O), 76.1 (C-1), 74.1 (C-5), 72.5 (C-4), 72.0 (C-2), 71.7 (C-6), 69.7 (C-3), 61.1 (C-1'), 58.2 (C-3'), 34.0 (C-2''), 33.9 (C-2''), 31.6 (C-2'), 29.4 (-CH<sub>2</sub>), 29.3 (-CH<sub>2</sub>), 29.2 (-CH<sub>2</sub>), 29.1 (-CH<sub>2</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>), 28.9 (-CH<sub>2</sub>), 28.8 (-CH<sub>2</sub>), 24.7 (C-3''), 24.6 (C-3''), 22.3 (-CH<sub>2</sub>), 13.5 (-CH<sub>3</sub>);  $^{31}\text{P-NMR}$ : (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = -1.20.

**MS** (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 793.523 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 793.514 [M-H]<sup>-</sup>.

**IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3366, 2956, 2917, 2850, 1737, 1467, 1380, 1165, 1098, 1018, 721, 509.

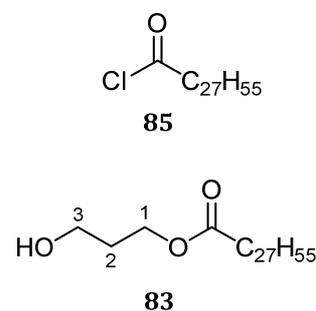
**Drehwert: D-80**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -12^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c$  0.05);

**Drehwert: L-80**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 18^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c$  0.05).

### 7.3.3.2 Synthese des C28:C16-Derivates

#### 7.3.3.2.1 Synthese von Octacosanoylchlorid **85** und 3-Hydroxypropylmontanat **83**

*Variante 1*: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Eine Lösung von 1,3-Propanediol **79** (50  $\mu\text{L}$ , 55 mg, 0.69 mmol, 1.0 Äquiv.), Octacosansäure **86** (0.32 mg, 0.76 mmol, 1.1 Äquiv.), Dicyclohexylcarbodiimid (0.17 g, 0.83 mmol, 1.2 Äquiv.), 4-Dimethylaminopyridin (8.6 mg, 0.070 mmol, 0.10 Äquiv.) in Dichlormethan (2 mL) wurde 18 h bei Rt gerührt. Der ausgefallene



Feststoff wurde filtriert, das Filtrat mit Dichlormethan verdünnt und mit Ammoniumchlorid gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde erst aus Ethylacetat, dann bei -18°C aus Dichlormethan umkristallisiert und anschließend säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Dichlormethan, 1:1, v/v) gereinigt.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Eine Lösung von 1,3-Propandiol **79** (8.0  $\mu\text{L}$ , 9.0 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äquiv.), Octacosansäure **86** (50 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äquiv.), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (25 mg, 0.13 mmol, 1.1 Äquiv.), 4-Dimethylaminopyridin (1 Kristall) und Triethylamin (50  $\mu\text{L}$ , 0.39 mmol, 3.3 Äquiv.) in Tetrahydrofuran (1 mL) wurde sechs Tage bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Wasser (8 mL) versetzt und filtriert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Dichlormethan/Methanol, 10:1, v/v) gereinigt.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Eine Suspension aus Octacosansäure **86** (0.10 g, 0.24 mmol, 1.0 Äquiv.) und Thionylchlorid (0.50 mL, 0.82 g, 14 mmol, 29 Äquiv.) wurde 2 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde zu einer Lösung von 1,3-Propandiol (38  $\mu\text{L}$ , 39 mg, 0.58 mmol, 1.1 Äquiv.) und 4-Dimethylaminopyridin (1 Kristall) in abs. Pyridin (6.0 mL) gegeben und 2 Tage bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit Methanol (3 mL) beendet. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Toluol (3 mL) koevaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in Dichlormethan (7 mL) gelöst und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde versucht säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Dichlormethan, 1:1, v/v) zu reinigen, allerdings konnte kein Produkt erhalten werden.

*Variante 4:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Octacosansäure **86** (0.30 mg, 0.68 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde bei 0°C in abs. Dichlormethan (6 mL) suspendiert und Oxalylchlorid (70  $\mu\text{L}$ , 0.10 g, 0.82 mmol, 1.2 Äquiv.) hinzuge tropft. Anschließend wurden bei 0°C zwei Tropfen abs. Dimethylformamid hinzugegeben und nach Abschluss der Gasentwicklung 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden das Lösungsmittel sowie andere flüchtige Verbindungen unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Gemisch wurde daraufhin in abs. Dichlormethan (5 mL) und abs. Pyridin (4 mL) gelöst und tropfenweise 1,3-Propandiol **79** (147  $\mu\text{L}$ , 154 mg, 2.03 mmol, 3.0 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben und die Reaktionslösung für 17 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und mit Toluol und Dichlormethan koevaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (15 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (15 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (15 mL) extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Ethylacetat, 1:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** *Variante 1:* Es konnten 0.15 g (0,31 mmol, 45%) eines durch DCU verunreinigten weißen Feststoffs erhalten werden. *Variante 2:* Es konnte lediglich das EDC-Addukt **84** erhalten werden. *Variante 3:* Es konnte kein Produkt erhalten werden. *Variante 4:* Es konnten 147 mg (0.304 mmol, 46% über zwei Stufen) eines farblosen Feststoffs erhalten werden. **Molmasse:** 482.83 g/mol, **Summenformel:** C<sub>31</sub>H<sub>62</sub>O<sub>3</sub>.

**Analytische Daten:** **<sup>1</sup>H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 2H, H-1), 3.69 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 2H, H-3), 2.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.87 (pent, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, 2H, H-2), 1.70 (s, 1H, -OH), 1.62 (pent, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-3'), 1.37 – 1.22 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 174.5 (C=O), 61.3 (C-1), 59.4 (C-3), 34.5 (C-2'), 32.1 (C-2), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (-CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 25.2 (C-3'), 22.9 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3324, 2955, 2915, 2847, 1732, 1472, 1462, 1172, 1057, 730, 719.

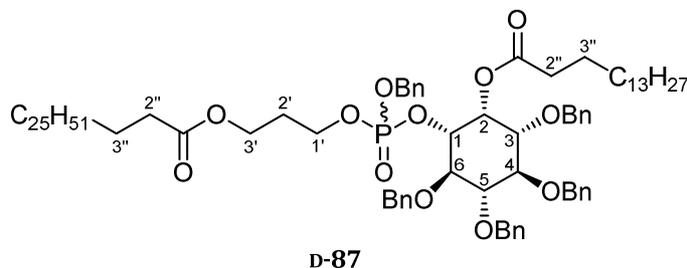
**MS** (MALDI, neg.) *m/z*: ber.: 481.462 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 480.666 [M-H]<sup>-</sup>.

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 505.4597 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 506.5233 [M+Na]<sup>+</sup>.

**DC:** R<sub>f</sub>(Petrolether/Ethylacetat, 1:1, v/v): 0.3.

### 7.3.3.2 Synthese von $\pm$ -Benzyl-(D-2-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-(3'-montanoxy-prop-1'-yl)-phosphat **D-87**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von  $\pm$ -Benzyl-(D-2-O-Palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **D-66**



(50 mg, 49  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und 3-Hydroxypropylmontanat **83** (81 mg, 0.17 mmol, 3.5 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (6 mL) wurde bei Rt 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 60  $\mu$ L, 18  $\mu$ mol, 0.37 Äquiv.) gegeben. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei Rt 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 30  $\mu$ L, 9.0  $\mu$ mol, 0.19 Äquiv.) hinzuge tropft und 1 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxid (11  $\mu$ L, 54  $\mu$ mol, 1.1 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 20 min bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (9 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumchloridlösung (2 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether-Ethylacetat-Gradient, 20-33%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 51 mg (36  $\mu\text{mol}$ , 74%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse:** 1413.99 g/mol, **Summenformel:**  $\text{C}_{88}\text{H}_{133}\text{O}_{12}\text{P}$ .

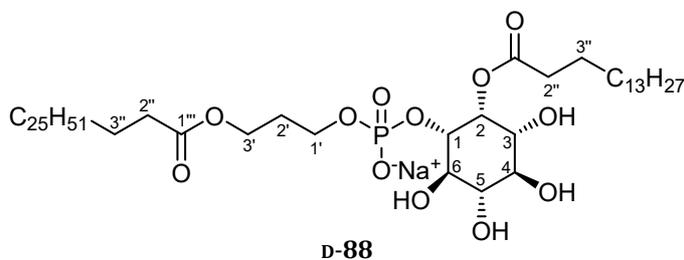
**Analytische Daten:**  **$^1\text{H-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.38 - 7.19 (m, 25H, Bn-H), 5.93 - 5.88 (m, 1H, H-2), 5.10 - 4.68 (m, 9H, Bn- $\text{CH}_2$ ), 4.47 - 4.36 (m, 2H, Bn- $\text{CH}_2$ , H-1), 4.15 - 3.88 (m, 5H, H-1', H-3', H-4), 3.83 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, 1H, H-6), 3.57 - 3.49 (m, 2H, H-3, H-5), 2.43 - 2.16 (m, 4H, H-2''), 1.89 (pent.,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$  Hz, 1H, H-2'), 1.66 - 1.55 (m, 4H, H-3''), 1.37 - 1.18 (m, 72H,  $\text{CH}_2$ ), 0.96 - 0.84 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ );  **$^{31}\text{P-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): -1.06, -1.16.

**MS** (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 1435.943  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , gef.: 1436.210  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**DC:**  $R_f$  (Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) = 0.2.

### 7.3.3.2.3 Synthese von (D-2-O-Palmitoyl-myo-inosit-1-yl)-(3'-montanoxy-prop-1'-yl)-phosphat **D-88**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV2 durchgeführt. Es wurden 9 mg  $\pm$ -Benzyl-(D-2-O-palmitoyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-Inosit-1-yl)-(3'-montanoxyprop-1'-yl)-phosphat **D-87** (6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.), 2 mL Tetrahydrofuran und 4 mg



Palladium-black® verwendet. Die Reaktionszeit betrug 3 Tage.

**Ausbeute:** Es konnten 0.8 mg (0.8  $\mu\text{mol}$ , 13%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse:** 985.35 g/mol (Natriumsalz), **Summenformel:**  $\text{C}_{53}\text{H}_{103}\text{O}_{12}\text{P}$ .

**Analytische Daten:**  **$^1\text{H-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (600 MHz,  $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ , 2:1, v/v): 5.99 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 1H, H-2), 4.62 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, H-1), 4.58 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$  Hz, 2H, H-3'), 4.15 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$  Hz, 1H, H-6), 4.05 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$  Hz, 2H, H-1'), 4.00 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$  Hz, 1H, H-4), 3.96 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 1H, H-3), 3.61 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.1$  Hz, 1H, H-5), 2.79 - 2.66 (m, 3H, H-2'', H-2''), 2.43 - 2.37 (m, 1H, H-2''), 2.26 (quint.,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$  Hz, 1H, H-2'), 2.05 - 1.97 (m, 4H, H-3''), 1.79 - 1.61 (m, 72H,  $\text{CH}_2$ ), 1.28 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ );  **$^{13}\text{C-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (151 MHz,  $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ , 2:1, v/v): 174.6 (C=O), 174.5 (C=O), 77.6 (C-2), 72.3 (C-1), 64.0 (C-4), 60.8 (C-3'), 58.3 (C-6), 57.6 (C-1'), 48.5 (C-3), 45.3 (C-5), 34.3 (C-2'), 31.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 29.0 ( $\text{CH}_2$ ), 28.9 ( $\text{CH}_2$ ), 24.9 ( $\text{CH}_2$ ), 22.5 ( $\text{CH}_2$ ), 20.2 ( $\text{CH}_3$ ), 14.7 ( $\text{CH}_3$ );  **$^{31}\text{P-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (243 MHz,  $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ , 2:1, v/v): -1.00.

**MS** (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 961.711  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , gef.: 961.966  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -18^\circ$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 2:1,  $c$  0.05).

7.3.3.2.4 *Synthese von D,L-3-O-Allyl-2-O-Octacosanoyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol (rac)-89*

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Intertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Suspension von Octacosansäure **86** (0.10 g, 0.23 mmol, 1.0 Äquiv.) und Oxalylchlorid (24  $\mu$ L, 34 mg, 0.27 mmol, 1.2 Äquiv.) in abs. Dichlormethan (2 mL) wurde bei 0°C ein Tropfen abs. Dimethylformamid gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Rohgemisch bei 0°C zu einer Lösung von *D,L*-3-Allyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**29**

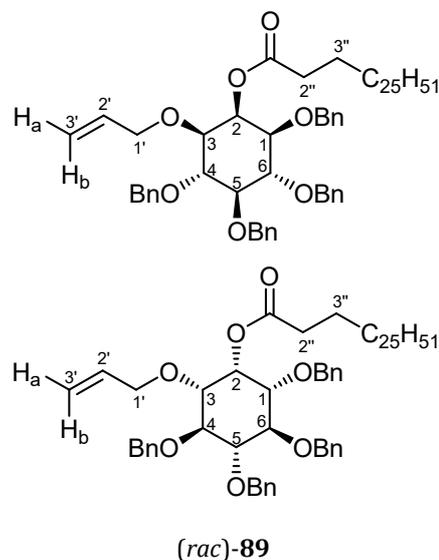
(131 mg, 226  $\mu$ mol, 1.00 Äquiv.) in abs. Pyridin (2.5 mL) gegeben und für 20 h bei Rt gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol (1 mL) und Dichlormethan

(1 mL) koevaporiert. Das Rohgemisch wurde in Dichlormethan (3 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 66 mg (67  $\mu$ mol, 30%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 987.46 g/mol, **Summenformel:** C<sub>65</sub>H<sub>94</sub>O<sub>7</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.38 – 7.27 (m, 20H, Bn-H), 5.95 – 5.88 (m, 1H, H-2'), 5.81 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-2), 5.31 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 17.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, 1H, H-3'b), 5.19 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, 1H, H-3'a), 4.93 – 4.53 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.21 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1H, H-1'), 4.06 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1H, H-1'), 3.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-6), 3.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-4), 3.50 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-5), 3.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-3), 3.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-1), 2.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-2''), 1.67 (quint., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-3''), 1.40 – 1.20 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173.3 (C=O), 138.8 (2x Bn-C), 138.7 (Bn-C), 137.9 (Bn-C), 134.7 (C-2'), 128.5 (8x Bn-C), 128.3 (2x Bn-C), 128.2 (6x Bn-C), 127.9 (Bn-C), 127.8 (2x Bn-C), 127.7 (Bn-C), 117.4 (C-3'), 83.0 (C-5), 81.6 (C-6, C-4), 78.6 (C-3), 78.3 (C-1), 76.4 (Bn-CH<sub>2</sub>), 76.1 (2x Bn-CH<sub>2</sub>), 72.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 71.3 (C-1'), 66.6 (C-2), 34.7 (C-2''), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (19x CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (C-3'), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

**MS** (MALDI, pos.) m/z: ber.: 1009.690 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 1009.620 [M+Na]<sup>+</sup>.

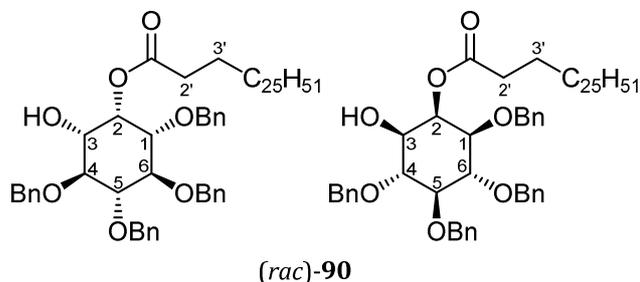


**HR-MS** (ESI, pos.) m/z: ber.: 1009.6897 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 1009.6801 [M+Na]<sup>+</sup>.

**DC:** R<sub>f</sub> (Dichlormethan) = 0.7.

### 7.3.3.2.5 Synthese von *D,L*-2-*O*-Octacosanoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**90**

Eine Lösung von *D,L*-3-*O*-Allyl-2-*O*-Octacosanoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**89** (41 mg, 42 μmol, 1.0 Äquiv.), Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (49 mg, 42 μmol, 1.0 Äquiv.) in Essigsäure (1 mL) und abs.



Dimethylformamid (2 mL) wurde 2.5 h bei 100°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohgemisch säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether-Aceton-Gradient 5%-10%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 27 mg (28 μmol, 68%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 947.40 g/mol, **Summenformel:** C<sub>62</sub>H<sub>90</sub>O<sub>7</sub>.

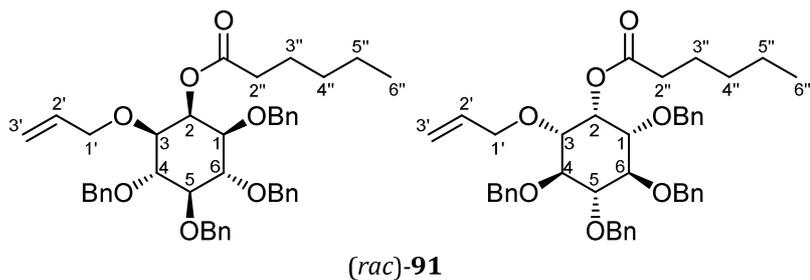
**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.38 - 7.24 (m, 20H, Bn-H), 5.74 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-2), 5.01 - 4.47 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 3.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-3), 3.57 - 3.51 (m, 2H, H-1, H-5), 2.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 2H, H-2'), 1.64 (quint., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-3'), 1.39 - 1.71 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173.5 (C=O), 138.8 (Bn-C), 138.4 (2x Bn-C), 137.8 (Bn-C), 128.8 (2x Bn-C), 128.6 (2x Bn-C), 128.5 (4x Bn-C), 128.4 (2x Bn-C), 128.2 (2x Bn-C), 128.1 (5x Bn-C), 127.9 (2x Bn-C), 127.8 (Bn-C), 83.3 (C-5), 82.1 (C-6), 81.6 (C-4), 78.7 (C-3), 76.1 (2x Bn-CH<sub>2</sub>), 75.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.2 (Bn-CH<sub>2</sub>), 70.3 (C-1), 69.0 (C-2), 34.6 (C-2'), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (19x CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (2x CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (C-3'), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Aceton, 10:1, v/v) = 0.2.

### 7.3.3.3 Synthese des C6:C5-Derivates

#### 7.3.3.3.1 Synthese von *D,L*-3-*O*-Allyl-2-*O*-hexanoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-Inositol (*rac*)-**91**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von *D,L*-3-*O*-Allyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-



inositol (*rac*)-**29** (0.50 g, 0.86 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. Pyridin (10 mL) wurde bei 0°C

Hexanoylchlorid (0.36 mL, 1.3 mmol, 3.0 Äquiv.) hinzugetropft und die Reaktionslösung für 20 h bei Rt gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (12 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (12 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das sirupöse, braune Rohprodukt wurde schließlich chromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 6:1) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 305 mg (0.45 mmol, 52%) eines farblosen Sirups erhalten werden.

**Molmasse:** 678.87 g/mol, **Summenformel:** C<sub>43</sub>H<sub>50</sub>O<sub>7</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.39 - 7.25 (m, 20H, Bn-H), 5.98 - 5.83 (m, 1H, H-2'), 5.80 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-2), 5.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 17.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.4 Hz, 1H, H-3'), 5.17 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 17.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.4 Hz, 1H, H-3'), 4.94 - 4.49 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.24 - 4.15 (m, 1H, H-1'), 4.09 - 4.00 (m, 1H, H-1'), 3.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 3.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 3.48 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 1H, H-3), 3.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 1H, H-1), 2.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-2''), 1.66 (quint, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-3''), 1.40 - 1.23 (m, 4H, H-4'', H-5''), 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 3H, H-6'').

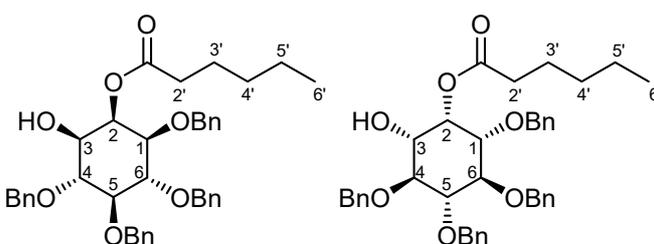
**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 701.3454 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 701.4595 [M+Na]<sup>+</sup>.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat, 6:1): 0.3.

### 7.3.3.2 Synthese von *D,L*-2-Hexanoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**92**

Eine Lösung von *D,L*-3-Allyl-2-Hexanoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-Inositol (*rac*)-**91** (302 mg, 445 μmol, 1.00 Äquiv.)

Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (514 mg, 445 μmol, 1.00 Äquiv.)



(*rac*)-**92**

in Essigsäure (8.3 mL) wurde für 1h bei 80°C gerührt. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Petrolether/Aceton-Gradient 10% - 14%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 211 mg (127 μmol, 74%) eines gelblichen Sirups erhalten werden.

**Molmasse:** 638.80 g/mol, **Summenformel:** C<sub>40</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>.

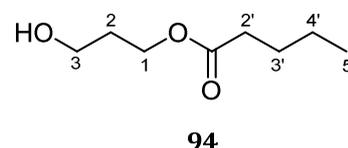
**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.38 - 7.28 (m, 20H, Bn-H), 5.75 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-2), 5.03 - 4.49 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 3.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-6), 3.79 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-4), 3.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-3), 3.59 - 3.52 (m, 2H, H-1, H-5),

2.42 (t,  $^3J_{H,H} = 7.4$  Hz, 2H, H-2'), 1.73 – 1.61 (m, 2H, H-3'), 1.40 – 1.30 (m, 4H, H-4', H-5'), 0.89 (t,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz, 3H, H-6').

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Aceton, 9:1): 0.2.

#### 7.3.3.3.3 Synthese von 3-Hydroxypropylvaleriat **94**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu 1,3-Propandiol **79** (1.0 mL, 1.1 g, 14 mmol, 3.0 Äquiv.) in abs. Pyridin (25 mL) wurde Valerylchlorid (0.55 mL, 0.56 g, 4.7 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und für 17 h bei Rt gerührt.



Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol und Dichlormethan koevaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (100 mL) aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das farblose Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether-Ethylacetat-Gradient, 33% - 50%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 527 mg (3.3 mmol, 70%) eines farblosen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 160.21 g/mol, **Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>.

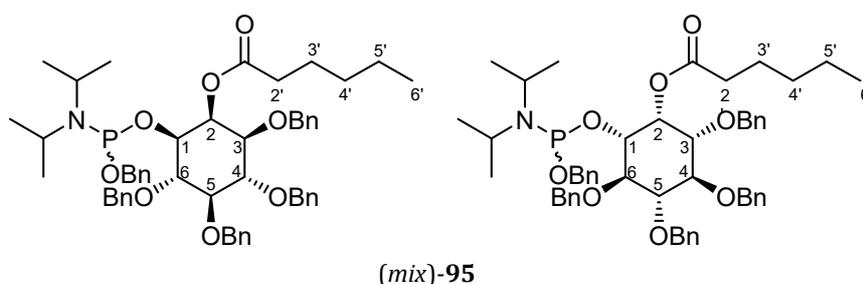
**Analytische Daten:** **<sup>1</sup>H-NMR:** δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.21 (t,  $^3J_{H,H} = 6.2$  Hz, 2H, H-1), 3.67 (t,  $^3J_{H,H} = 6.1$  Hz, 2H, H-3), 2.30 (t,  $^3J_{H,H} = 7.7$  Hz, 2H, H-2'), 2.21 (s, 1H, OH), 1.85 (pent.,  $^3J_{H,H} = 6.2$  Hz, 2H, H-2), 1.59 (pent.,  $^3J_{H,H} = 7.7$  Hz, 2H, H-3'), 1.33 (sext.,  $^3J_{H,H} = 7.7$  Hz, 2H, H-4'), 0.89 (t,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 3H, H-5'); **<sup>13</sup>C-NMR:** δ [ppm] (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 174.5 (C=O), 61.3 (C-1), 59.3 (C-3), 34.1 (C-2'), 31.9 (C-2), 27.2 (C-3'), 22.4 (C-4'), 13.8 (C-5').

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 161.1172 [M+H<sup>+</sup>], gef.: 161.0971[M+Na<sup>+</sup>].

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 1:1, v/v) = 0.2

#### 7.3.3.3.4 Synthese von $\pm$ -Benzyl-(2-hexanoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit-1-yl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (mix)-**95**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von D,L-2-



Hexanoyl-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**92** (0.21 g, 0.33 mmol, 1.0 Äquiv.) und Benzyl-bis-(*N,N*-diisopropylamino)-phosphoramidit **64** (0.17 g, 0.50 mmol, 1.5 Äquiv.) in abs.

Acetonitril (24 mL) wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 0.56 mL, 0.17 mmol, 0.5 Äquiv.) gegeben. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 0.28 mL, 84 µmol, 0.25 Äquiv.) hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung für 30 min bei 0°C und anschließend 1h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 130 mL Dichlormethan aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x 130 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Triethylamin 10:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 0.11 g (0.13 mmol, 39%) eines farblosen Sirups erhalten werden.

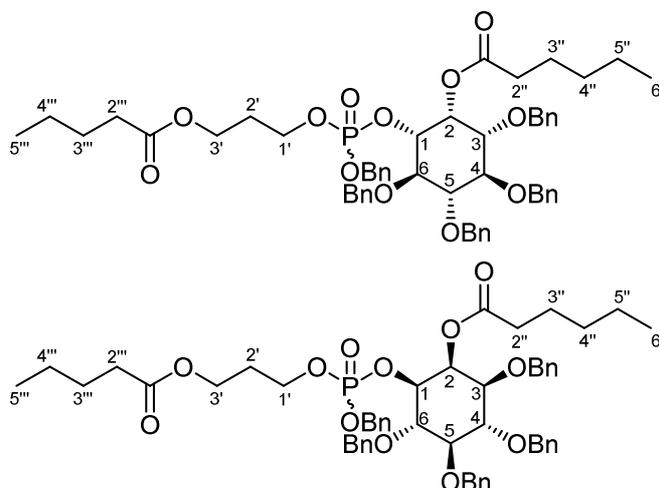
**Molmasse:** 876.08 g/mol, **Summenformel:** C<sub>53</sub>H<sub>66</sub>NO<sub>8</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>31</sup>P-NMR:δ [ppm] (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 150.86, 148.43.

7.3.3.3.5 *Synthese von  $\pm$ -Benzyl-(3'-valeroxyprop-1'-yl)-(D,L-2-O-caproyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-phosphat (mix)-96*

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.  $\pm$ -Benzyl-(2-O-caproyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinosit-1-yl)-bis-(*N,N*-diisopropylamino)-

phosphoramidit (*mix*)-95 (57 mg, 66  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und 3-Hydroxypropylvaleriat 46 (37 mg, 0.23 mmol, 3.5 Äquiv.) wurden mit Toluol (1.5 mL) koevaporiert und anschließend in abs. Acetonitril (3.7 mL) gelöst und



(*mix*)-96

anschließend bei 0°C mit 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 0.08 mL, 24  $\mu$ mol, 0.37 Äquiv.) versetzt. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 0.04 mL, 12  $\mu$ mol, 0.19 Äquiv.) hinzuge tropft und die Reaktionslösung nacheinander 30 min bei 0°C und 1h bei Rt gerührt. Daraufhin wurde *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (5.5 M in Decan, 12  $\mu$ L, 66  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) bei 0°C hinzuge tropft und die Reaktionslösung weitere 20 min bei 0°C gerührt. Dann wurde die Lösung mit Ethylacetat (13 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 7 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 35 mg (37  $\mu$ mol, 56%) eines farblosen Sirups erhalten werden. **Molmasse:** 951.10 g/mol, **Summenformel:** C<sub>55</sub>H<sub>67</sub>O<sub>12</sub>P.

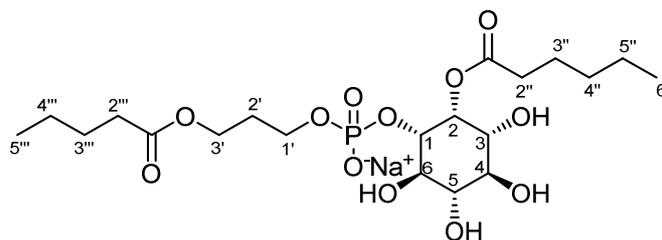
**Analytische Daten des Diastereomere ngemisches:** <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.39 - 7.18 (m, 25H, Bn-H), 5.94 - 5.88 (m, 1H, H-2), 5.10 - 4.66 (m, 10H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.47 - 4.38 (m, 2H, H-3'), 4.08 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 4.04 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 3.96 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-1), 3.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.7 Hz, 1H, H-6), 3.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.59 - 3.49 (m, 2H, H-3, H-5), 2.43 - 2.18 (m, 6H, H-2', H-2'', H-2'''), 1.91 - 1.83 (m, 2H, H-3'''), 1.68 - 1.50 (m, 4H, H-3'''), 1.33 - 1.24 (m, 6H, H-4''', H-4'', H-5''), 0.90 - 0.80 (m, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:  $\delta$  [ppm] (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): -1.23, -1.32.

**MS** (MALDI, pos.) *m/z*: ber.: 973.427 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 973.316 [M+Na]<sup>+</sup>.

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v) = 0.3.

7.3.3.3.6 Synthese von (D,L-2-O-Caproyl-myo-inosit-1-yl)-(3'-valeroxyprop-1'-yl)phosphat (mix)-98

In Tetrahydrofuran (3.6 mL), welches unter einer Stickstoffatmosphäre durch Hindurchleiten von Stickstoff 20 min lang entgast wurde, um eventuelle Anteile an gelöstem Sauerstoff zu verdrängen wurde D,L-Benzyl-(2-O-caproyl-3,4,5,6-tetra-O-



(mix)-98

benzyl-myo-Inosit-1-yl)-(valeroxyprop-1'-yl)-phosphat (mix)-96 (15 mg, 16  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) gelöst und Palladium-black® (3.6 mg) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 14 Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre (ca. 1 bar) gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Methanol aufgenommen und zentrifugiert. Das Lösungsmittel des Zentrifugats wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Sephadex® LH-20, Dichlormethan/Methanol, 2:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 3.9 mg (7.5  $\mu\text{mol}$ , 47%, bezogen auf  $\text{Na}^+$  als Gegenion) eines farblosen Feststoffs erhalten werden. **Molmasse:** 500.4778 g/mol (Gegenion:  $\text{H}^+$ ), **Summenformel:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}_{12}\text{P}$ .

**Analytische Daten:**  **$^1\text{H-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (600 MHz, MeOD): 5.59 (s, 1H, H-2), 4.18 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz, 2H, H-3'), 4.08 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$  Hz, 1H, H-1), 3.95 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$  Hz, 2H, H-1'), 3.72 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$  Hz, 1H, H-6), 3.59 - 3.52 (m, 2H, H-3, H-4), 3.27 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$  Hz, 1H, H-5), 2.43 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz, 2H, H-2'''), 2.38 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz, 2H, H-2''), 2.34 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz, 2H, H-2'''), 1.94 (pent.,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz, 2H, H-2'), 1.82 (pent.,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz, H-3''), 1.68 - 1.56 (m, 4H, H-3''', H-4''), 1.41 - 1.32 (m, 4H, H-4''', H-5''), 0.95 - 0.90 (m, 6H, H-6'', H-5''');  **$^{13}\text{C-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (151 MHz, MeOD): 175.6 (C=O), 175.4 (C=O), 101.39 (C-2), 76.3 (C-1), 74.5 (C-4), 74.3 (C-6), 74.1 (C-3), 71.6 (C-5), 62.5 (C-3'), 49.6 (C-1'), 36.4 (C-2'''), 35.3 (C-2''), 34.8 (C-2'), 32.4 (C-3'''), 28.2 (C-3'''), 25.8 (C-4''), 23.5 (C-4'''), 23.3 (C-5''), 14.3 (C-5'''), 14.1 (C-6'');  **$^{31}\text{P-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm] (243 MHz, MeOD): 1.04.

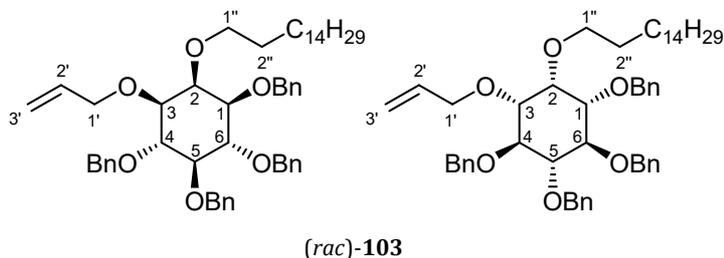
**MS** (MALDI, neg.)  $m/z$ : ber.: 499.194  $[\text{M-H}]^-$ , gef.: 499.169  $[\text{M-H}]^-$ .

### 7.3.4 Synthese der Generation-III-PIs

#### 7.3.4.1 Synthese des Ether-Derivates

##### 7.3.4.1.1 Synthese von *D,L*-3-*O*-Allyl-2-*O*-hexadecyl-1,4,5,6-*O*-tetra-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**103**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu Natriumhydrid (330 mg, 13.8 mmol, 4.00 Äquiv.) wurde eine Lösung von



*D,L*-1-*O*-Allyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol (*rac*)-**29** (2.00 g, 3.44 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. Dimethylformamid (56 mL) getropft. Die Suspension wurde 30 min bei Rt gerührt, daraufhin 1-Bromhexadecan (2.10 mL, 6.88 mmol, 2.00 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben und anschließend 18 h bei Rt gerührt. Dann wurde die Reaktion durch tropfenweise Zugabe von Methanol (10 mL) beendet, Diethylether (100 mL) hinzugegeben und mit ges. wässr. Natriumchloridlösung (3x 300 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat, 20:1 v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 2.60 g (3.23 mmol, 94%) eines farblosen Sirups erhalten werden.

**Molmasse:** 805.15 g/mol, **Summenformel:** C<sub>53</sub>H<sub>72</sub>O<sub>6</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.41 - 7.27 (m, 20H, Bn-H), 6.01 - 5.86 (m, 1H, H-2'), 5.35 - 5.14 (m, 2H, H-3'), 4.95 - 4.66 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.14 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.34 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.52 Hz, 2H, H-1'), 4.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.55 Hz, 1H, H-6), 3.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.55 Hz, 1H, H-4), 3.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.42 Hz, 1H, H-2), 3.75 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.79 Hz, 2H, H-1''), 3.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.24 Hz, 1H, H-5), 3.35 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.79 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.33 Hz, 1H, H-3), 3.23 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.79 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.32 Hz, 1H, H-1), 1.71 - 1.54 (m, 2H, H-2''), 1.17 - 1.48 (m, 26H, CH<sub>2</sub>), 0.91 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.16 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 139.0 (2x Bn-C), 138.91 (2x Bn-C), 138.85 (2x Bn-C), 138.5 (2x Bn-C), 134.6 (C-2'), 128.34 (2x Bn-C), 128.30 (2x Bn-C), 128.11 (2x Bn-C), 128.08 (2x Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 127.5 (2x Bn-C), 116.6 (C-3'), 83.6 (C-5), 81.6 (C-4), 81.5 (C-6), 80.8 (C-1), 80.6 (C-3), 77.6 (Bn-CH<sub>2</sub>), 77.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 76.6 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.4 (C-2), 73.4 (C-1''), 72.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 71.6 (C-1'), 29.7 (14x CH<sub>2</sub>), 14.3 (Alkyl-CH<sub>3</sub>).

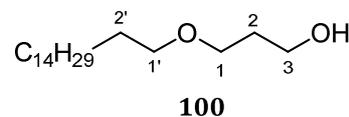
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3063, 3030, 2921, 2851, 1605, 1496, 1454, 1209, 1129, 1067, 1027, 921, 730, 694, 596, 462.

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 827.5221 [M+Na<sup>+</sup>], gef.: 827.5228 [M+Na<sup>+</sup>].

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 20:1 v/v): 0.2.

#### 7.3.4.1.2 Synthese von Hexadecyl-3-hydroxypropylether **100**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu Natriumhydrid (719 mg, 30.0 mmol, 1.50 Äquiv.) wurde 1,3-Propandiol **79** (6.51 mL, 6.90 g,



90.7 mmol, 4.54 Äquiv.) in abs. DMF (40 mL) gegeben und die Suspension für 20 min bei Rt gerührt. Anschließend wurde bei 0°C Kaliumiodid (3.32 g, 20 mmol, 1.00 Äquiv.) und tropfenweise 1-Bromhexadecan (6.11 mL, 6.11 g, 20.0 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 4 h bei 95°C gerührt. Dann wurde Eis hinzugegeben und mit Ethylacetat (100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde daraufhin mit ges. wässr. Natriumchloridlösung (2x 140 mL) gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat, 4:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** 4.06 g (13.5 mmol, 68%) eines farblosen Feststoffs, **Molmasse:** 300.53 g/mol, **Summenformel:** C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.82 - 3.27 (m, 2H, H-1), 3.61 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.69 Hz, 2H, H-3), 3.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.83 Hz, 2H, H-1'), 2.53 (s, 1H, OH), 1.83 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.63 Hz, 2H, H-2), 1.62 - 1.48 (m, 2H, H-2'), 1.39 - 1.15 (m, 26H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.49 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 71.5 (C-1'), 70.5 (C-3), 62.5 (C-1), 31.9 (C-2), 29.7 (13x CH<sub>2</sub>), 26.1 (CH<sub>2</sub>), 22.7 (C-2'), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

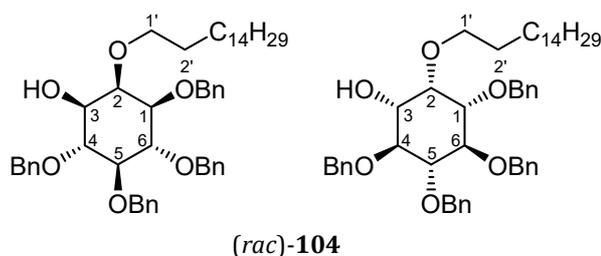
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3318, 2954, 2915, 2847, 1471, 1463, 1363, 1120, 1091, 1056, 1028, 980, 752, 728, 720, 570.

**MS** (EI, pos.) *m/z*: ber.: 301.31 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 301.37 [M+H]<sup>+</sup>.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 4:1 v/v): 0.3.

#### 7.3.4.1.3 Synthese von D,L-2-O-Hexadecyl-1,4,5,6-Tetra-O-benzyl-myoinositol (*rac*)-**104**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu D,L-3-O-Allyl-1,4,5,6-tetra-O-benzyl-2-O-hexadecyl-myoinositol (*rac*)-**103** (0.20 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) in Essigsäure (4.6 mL,



4.8 g, 81 mmol, 327 Äquiv.) wurde Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (0.28 g, 0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei 80°C gerührt und das Lösungsmittel

unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/Aceton 9:1 v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 0.19 g (0.24 mmol, 98%) eines farblosen Öls erhalten werden. **Molmasse:** 765.09 g/mol, **Summenformel:** C<sub>50</sub>H<sub>68</sub>O<sub>6</sub>.

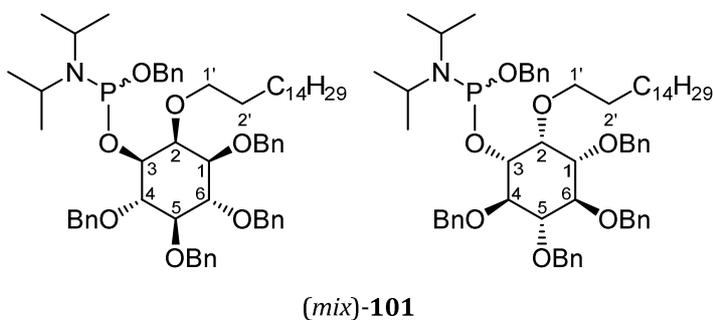
**Analytische Daten:** **<sup>1</sup>H-NMR:** δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.38 - 7.27 (m, 26H, Bn-H), 5.68 - 4.97 (m, 8H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.03 - 3.89 (m, 2H, H-1', H-4), 3.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.59 Hz, 1H, H-2), 3.75 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.58 Hz, 1H, H-6), 3.67 - 3.56 (m, 1H, H-1'), 3.51 - 3.37 (m, 3H, H-1, H-3, H-5), 2.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.30 Hz, 1H, -OH), 1.65 - 1.52 (m, 2H, H-2'), 1.41 - 1.19 (m, 26H, CH<sub>2</sub>), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.38 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR:** δ [ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 138.7 (2x Bn-C), 138.6 (2x Bn-C), 138.6 (2x Bn-C), 138.3 (2x Bn-C), 128.5 (2x Bn-C), 128.4 (2x Bn-C), 128.3 (2x Bn-C), 128.0 (2x Bn-C), 127.9 (2x Bn-C), 127.7 (2x Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 127.6 (2x Bn-C), 83.6 (C-5), 82.6 (C-6), 82.0 (C-4), 81.4 (C-3), 77.7 (C-2), 76.01 (Bn-CH<sub>2</sub>), 76.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 75.7 (Bn-CH<sub>2</sub>), 73.7 (C-1'), 73.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 72.5 (C-1), 29.7 (14x CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**HR-MS** (ESI, pos.) *m/z*: ber.: 787.4908, gef.: 787.4908 [M+Na<sup>+</sup>].

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat, 3:1, v/v): 0.6.

#### 7.3.4.1.4 Synthese von *±*-Benzyl-(*D,L*-2-*O*-hexadecyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit-1-yl)- *N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (*mix*)-**101**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu *D,L*-1,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-2-*O*-hexadecyl-*myo*-inositol (*rac*)-**104** (1.0 g, 1.3 mmol, 1.0 Äquiv.) und Benzyl-bis-(diisopropylamino)-



phosphoramidit **64** (0.88 g, 2.6 mmol, 1.5 Äquiv.) in Toluol wurde tropfenweise 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 2.9 mL, 0.87 mmol, 0.66 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben. Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 1.45 mL, 0.44 mmol, 0.33 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung nacheinander 30 min bei 0°C und 1h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der farblose, feste Rückstand in Dichlormethan (0.48 L) gelöst und zweimal mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0.96 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelblich, viskose Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/Triethylamin, 9:1 v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 1.16 g (2.75 mmol, 93%) eines farblosen Sirups erhalten werden.

**Molmasse:** 1002.37 g/mol, **Summenformel:** C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>NO<sub>7</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.42 - 7.18 (m, 25H, Bn-H), 5.01 - 4.37 (m, 10H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.07 - 3.20 (m, 10H, H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-1', -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.67 - 1.47 (m, 2H, H-2'), 1.39 - 0.98 (m, 38H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>), 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.63 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR: δ [ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 149.07, 145.71.

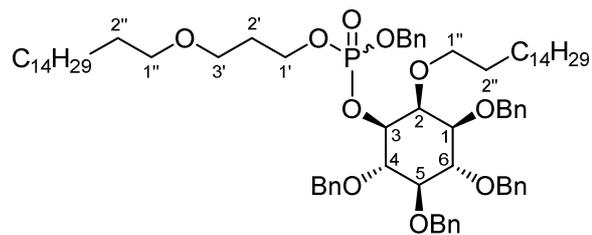
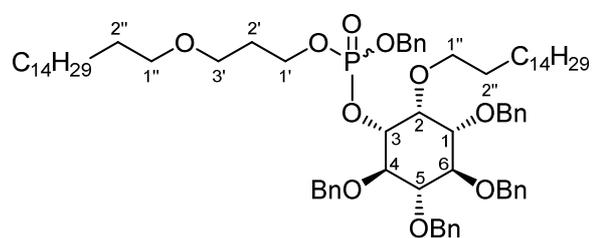
**DC:** R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Et<sub>3</sub>N 9:1 v/v): 0.6.

#### 7.3.4.1.5 Synthese von *±*-Benzyl-(D,L-2-O-hexadecyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-1-yl)-(3'-hexadecyloxyprop-1'-yl)-phosphat (*mix*)-**105**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

*±*-Benzyl-(D,L-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-2-O-hexadecyl-myo-inosit-1-yl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit (*mix*)-**101**

(1.15 g, 1.15 mmol, 1.00 Äquiv.) und Hexadecyl-3-hydroxypropylether **100** (1.21 g, 4.04 mmol, 3.51 Äquiv.) wurden in abs. Acetonitril (64 mL) gelöst. Anschließend wurde bei 0°C 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 1.41 mL, 423 μmol, 0.37 Äquiv.) hinzuge tropft.



(*mix*)-**105**

Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol Acetonitril (0.3 M, 705 μL, 212 μmol, 0.18 Äquiv.) hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan, 252 mg, 280 μL, 1.15 mmol, 1.00 Äquiv.) zugetropft. Es wurde für 20 min gerührt, Ethylacetat (218 mL) zugefügt und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2x 256 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das farblose Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether-Ethylacetat-Gradient, 14% - 20%) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 903 mg (742 μmol, 65%) eines farblosen, viskosen Öls erhalten werden.

**Molmasse:** 1323.83, **Summenformel:** C<sub>83</sub>H<sub>119</sub>O<sub>11</sub>P.

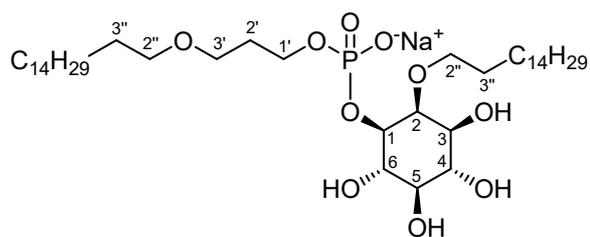
**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.40 - 7.16 (m, 25H, Bn-H), 5.09 - 4.57 (10H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.25 - 3.93 (m, 6H, H-1, H-2, H-4, H-6, H-1'), 3.87 - 3.58 (m, 2H, H-1''), 3.49 - 3.23 (m, 6H, H-3, H-5, H-3', H-1''), 1.86 (quint., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 1.74 (quint., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.4 Hz, 1H, H-2'), 1.67 - 1.42 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.41 - 1.13 (m, 50H, CH<sub>2</sub>), 0.92 - 0.81 (m, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR: δ

[ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 128.5 (Bn-C), 128.5 (Bn-C), 128.4 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.3 (Bn-C), 128.2 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 128.0 (Bn-C), 127.7 (Bn-C), 127.6 (Bn-C), 127.5 (Bn-C), 127.5 (Bn-C), 80.5 (Ino-C), 29.7 (-CH<sub>2</sub>), 29.6 (-CH<sub>2</sub>), 29.3 (-CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:δ [ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.54, 1.46.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether/Ethylacetat 5:1 v/v): 0.2.

#### 7.3.4.1.6 Synthese von (D,L-2-O-Hexadecyl-myo-inosit-1-yl)-(3'-hexadecyloxyprop-1'-yl)-phosphat (rac)-102

Die Reaktion wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Durch abs. Tetrahydrofuran wurde 20 min unter Rühren Stickstoff geleitet. Dazu wurden ±-Benzyl-(D,L-2-O-hexadecyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo-inosit-



(rac)-102

1-yl)-(3'-O-hexadecyloxyprop-1'-yl)-phosphat (mix)-105 (903 mg, 0.742 mmol, 1.00 Äquiv.) und Palladium-black® (166 mg) gegeben und bei Rt vier Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (2:1, v/v) extrahiert und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel der vereinigten flüssigen Phasen wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Sephadex® LH-20, Dichlormethan/Methanol/Wasser, 10:5:1, v/v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 298 mg (388 μmol, 52%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**Molmasse:** 767.08 g/mol, **Summenformel:** C<sub>41</sub>H<sub>83</sub>O<sub>10</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 2:1:0.2, v/v/v): 4.66 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, 2H, H-3'), 4.54 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-1), 4.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-2), 4.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 4.27 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 4.21 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 4.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-6), 4.04 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 2H, H-2''), 3.92 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 2H, H-2''), 3.89 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7, 1H, H-3), 3.70 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 2.45 (pent., <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 2H, H-2'), 2.10 - 2.02 (m, 4H, H-3''), 1.88 - 1.71 (m, 52H, CH<sub>2</sub>), 1.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.14 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR:δ [ppm] (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 2:1:0.2, v/v/v): 83.7 (C-2), 82.2 (C-1), 78.4 (C-5), 78.1 (C-1'), 78.1 (C-2''), 76.8 (C-6), 75.8 (C-4), 75.5 (C-3), 70.8 (C-2'), 68.4 (C-3'), 35.7 (CH<sub>2</sub>), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 34.1 (C-2'), 33.7 (CH<sub>2</sub>), 33.6 (CH<sub>2</sub>), 33.5 (C-3'', C-3'', CH<sub>2</sub>), 33.4 (2x CH<sub>2</sub>), 33.3 (CH<sub>2</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 17.7 (2x CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR:δ [ppm] (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/D<sub>2</sub>O, 2:1:0.2, v/v/v): 3.58.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 3335, 2955, 2484, 1467, 1366, 1217, 1163, 1084, 1035, 977, 942, 878, 753, 720, 707, 597, 540, 504, 472, 416.

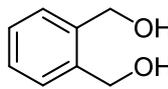
**HR-MS** (ESI, neg.)  $m/z$ : ber.: 765.5646 [M-H]<sup>-</sup>; gef.: 765.5456 [M-H]<sup>-</sup>.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -1.3^{\circ}$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c$  0.05).

### 7.3.4.2 Synthese wasserlöslicher EhPIs

#### 7.3.4.2.1 XEP-Ansatz

##### 7.3.4.2.1.1 Synthese von 1,2-Benzoldimethanol **107**

Die Reaktion wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Suspension von Lithiumaluminiumhydrid (0.934 g, 24.6 mmol, 1.25 Äquiv.) in abs. Diethylether (40 mL) wurde bei 0°C  **107** tropfenweise und unter starkem Rühren über 10 min Phtalsäure **108** (3.27 g, 19.7 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. THF (16 mL) gegeben. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 1.5 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde zunächst Wasser (1 mL), dann Natronlauge (15%, 1 mL) und schließlich erneut Wasser (3 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt, dann filtriert und mit Ether (50 mL) gespült. Das Filtrat wurde mit Wasser (30 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat 1:1, v/v) gereinigt.

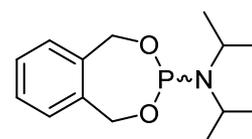
**Ausbeute:** Es konnten 271 mg (1.96 mmol, 10%) eines farblosen kristallinen Festoffs erhalten werden. **Molmasse:** 138.17 g/mol, **Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.13 (s, 2H, -OH), 4.57 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 7.28 (4H, Ar-H); <sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 63.67 (CH<sub>2</sub>), 128.40 (Ar-C), 129.53 (Ar-C), 139.29 (Ar-C).

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 1:1, v/v) = 0.2.

##### 7.3.4.2.1.2 Synthese von 1,2-Benzoldimethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit **106**

Die Reaktion wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu Phosphor(III)-chlorid (1.53 mL, 2.38 g, 17.4 mmol, 1.20 Äquiv.) in Diethylether (140 mL) wurde bei -40°C ein Gemisch aus 1,2-Benzoldimethanol **107** (2.00 g, 14.5 mmol, 1.00 Äquiv.), abs. Pyridin (2.10 mL, 2.06 g, 26.0 mmol, 1.80 Äquiv.) und abs.



**106**

Diethylether (20 mL) getropft. Die Suspension wurde 2 h bei 0°C gerührt und anschließend unter Intertgasbedingungen filtriert. Das Filtrat wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt im Hochvakuum bei ca. 150°C destilliert. Das Destillat wurde bei Rt mit einer Lösung aus *N,N*-Diisopropylamin (2.04 mL, 1.46 g, 14.5 mmol, 1.00 Äquiv.) und abs. Diethylether (40 mL) versetzt und für 2 h bei Rt gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde unter Inertgasbedingungen filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in abs. Hexan suspendiert, um eine vollständige Ausfällung des entstandenen Salzes zu gewährleisten. Dieses wurde unter Inertgasbedingungen filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Triethylamin, 9:1, v/v).

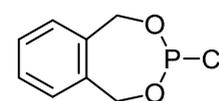
**Ausbeute:** Es konnten 632 mg (2.36 mmol, 16%) farblose Nadeln erhalten werden. **Molmasse:** 267.31 g/mol, **Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>P.

**Analytische Daten:** **<sup>1</sup>H-NMR:** δ [ppm] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.35 – 7.10 (m, 4H, Ar-H), 5.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 13.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 5.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 13.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 13.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 13.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.63 – 3.50 (m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.13 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.11 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR:** δ [ppm] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 138.8 (Ar-C), 136.4 (Ar-C), 130.9 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 66.4 (CH<sub>2</sub>), 66.3 (CH<sub>2</sub>), 44.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 44.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.8 (CH<sub>3</sub>), 24.7 (CH<sub>3</sub>); **<sup>31</sup>P-NMR:** δ [ppm] (122 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 150.45.

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Triethylamin, 9:1, v/v) = 0.7.

#### 7.3.4.2.1.3 Synthese von 1,2-Benzoldimethyl-chlorphosphit **109**

Die Reaktion wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. 1,2-Benzoldimethanol **107** (1.0 g, 7.2 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde zunächst mit Toluol coevaporiert (2x 1 mL) und anschließend in abs. Diethylether (70 mL) gelöst und schließlich wurde

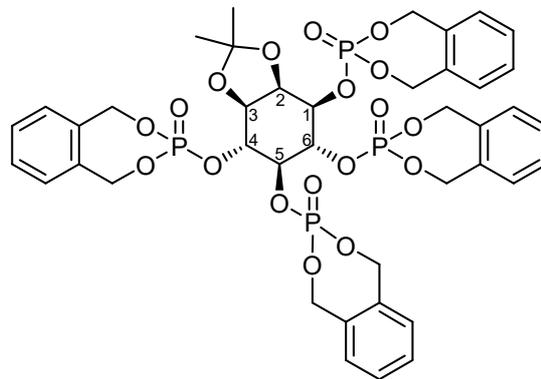


**109**

bei -20°C tropfenweise Phosphor(III)-chlorid (0.76 mL, 8.7 mmol, 1.2 Äquiv.) hinzugegeben und anschließend 10 min gerührt. Nun wurde über 20 min bei -20°C eine Lösung aus abs. Pyridin (1.1 mL) und abs. Diethylether (10 mL) tropfenweise hinzugegeben und für 1 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Inertgasbedingungen filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt am Hochvakuum bei ca. 150°C destilliert und sofort ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

7.3.4.2.1.4 Synthese von *D,L*-2,3-Isopropyliden-1,4,5,6-tetrakis(3-oxido-1,5-dihydrobenzo[*e*][1.3.2]dioxaphosphepin-3-yl)-*myo*-inositol **110**

Die Reaktion wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu *D,L*-2,3-Isopropyliden-*myo*-inositol (*rac*)-**26** (0.1 g, 0.44 mmol, 1.0 mmol) in abs. *N,N*-Dimethylformamid (5.8 mL) und abs. Pyridin (0.15 mL) wurde bei 0°C *O,O*-Benzoldimethylchlorphosphit **109** (0.40 g, 1.9 mmol, 4.4 Äquiv.) getropft und die Reaktionslösung für 1 h bei 0°C



**110**

gerührt. Dann wurde auf Rt erwärmt und die Reaktionslösung für 18 h bei Rt gerührt und schließlich *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan, 0.35 mL, 1.9 mmol, 4.4 Äquiv.) bei 0°C hinzuge tropft und 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand zweimal säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan-Methanol-Gradient, 1-3%; SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Ethylacetat, 3:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 79 mg eines farblosen Feststoffs erhalten werden (83 µmol, 19%).

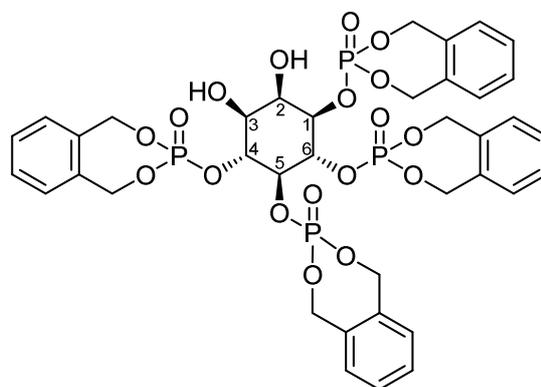
**Molmasse:** 948.68 g/mol, **Summenformel:** C<sub>41</sub>H<sub>44</sub>O<sub>18</sub>P<sub>4</sub>.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.43 – 7.26 (m, 16H, Ar-H), 5.73 – 4.76 (m, 21H, CH<sub>2</sub>, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 1H, H-2), 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>): -4.76, -6.98, -7.06, -8.04.

**DC:** R<sub>f</sub>(Dichlormethan/Methanol, 20:1, v/v) = 0.5.

7.3.4.2.1.5 Versuche der Synthese von *D,L*-1,4,5,6-tetrakis-(3-oxido-1,5-dihydrobenzo[*e*][1.3.2]dioxaphosphepin-3-yl)-*myo*-inositol **111**

**Variante 1:** Eine Lösung von *D,L*-2,3-Isopropyliden-1,4,5,6-tetrakis-(3-oxido-1,5-dihydrobenzo[*e*][1.3.2]dioxaphosphepin-3-yl)-*myo*-inositol **110** (79 mg, 83 µmol, 1.0 Äquiv.) in Essigsäure (66% in Wasser, 2 mL) wurde 3 Tage bei Rt gerührt. Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.



**111**

**Variante 2:** Eine Lösung von *D,L*-2,3-Isopropyliden-1,4,5,6-tetrakis-(3-oxido-1,5-

dihydrobenzo[e][1.3.2]dioxaphosphopin-3-yl)-*myo*-inositol **110** (14 mg, 15  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) in Essigsäure (80% in Wasser, 1.2 mL) wurde 1 d bei Rt gerührt. Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.

*Variante 3:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Eine Lösung von *D,L*-2,3-Isopropyliden-1,4,5,6-tetrakis-(3-oxido-1,5-dihydrobenzo[e][1.3.2]dioxaphosphopin-3-yl)-*myo*-inositol **110** (14 mg, 15  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) und *para*-Toluolsulfonsäure (1.0 mg, 6.0  $\mu$ mol, 0.40 Äquiv.) in abs. Methanol (1.2 mL) wurde 1 d bei Rt gerührt. Es konnte kein Umsatz festgestellt werden. Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch für 3 h bei 60°C gerührt, wobei erneut kein Umsatz festgestellt werden konnte. Daraufhin wurde *para*-Toluolsulfonsäure (1.5 mg, 9.0  $\mu$ mol, 0.60 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 16 h bei Rt gerührt woraufhin auch kein Umsatz festgestellt werden konnte. Schließlich wurde *para*-Toluolsulfonsäure (2.5 mg, 15  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 4 h bei Rt gerührt. Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.

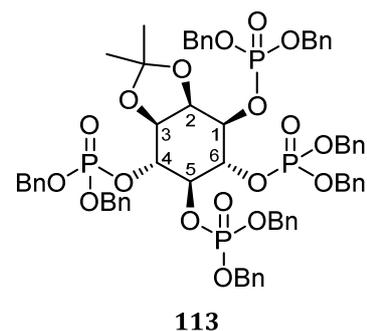
*Variante 4:* Eine Lösung von *D,L*-2,3-Isopropyliden-1,4,5,6-tetrakis-(3-oxido-1,5-dihydrobenzo[e][1.3.2]dioxaphosphopin-3-yl)-*myo*-inositol **110** (28 mg, 30  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) in Trifluoressigsäure (80% in Wasser, 1.25 mL) wurde 30 min bei Rt gerührt. Es konnte nach chromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan-Methanol-Gradient 5%-20%) kein Produkt erhalten werden.

*Variante 5:* Eine Lösung von *D,L*-2,3-Isopropyliden-1,4,5,6-tetrakis-(3-oxido-1,5-dihydrobenzo[e][1.3.2]dioxaphosphopin-3-yl)-*myo*-inositol **110** (28 mg, 30  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) in Trifluoressigsäure (80% in Wasser, 1.25 mL) wurde 30 min bei Rt gerührt und anschließend mit Natronlauge (2 M) neutralisiert. Der ausgefallene Feststoff wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat/Methanol, 9:1, v/v) gereinigt, jedoch konnte kein reines Produkt erhalten werden.

#### 7.3.4.2.2 *Bis-Benzyl-Derivate*

##### 7.3.4.2.2.1 *Versuch der Synthese von D,L-1,4,5,6-O-Tetrakis-(dibenzylphosphat)-2,3-isopropyliden-myoinositol (rac)-113*

*Variante 1:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Suspension von *D,L*-1,2-Isopropyliden-*myo*-inositol (*rac*)-**26** (200 mg, 0.908 mmol, 1.00 Äquiv.) und Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **112** (1.83 mL, 1.88 g, 5.45 mmol, 6.00 Äquiv.) in abs. Acetonitril (50 mL) und abs. Dimethylsulfoxid (5 mL) wurde bei 0°C langsam 5-(Benzylthio)-



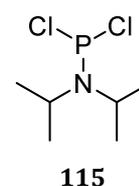
1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 18.2 mL, 5.45 mmol, 6.00 Äquiv.) getropft. Das Gemisch wurde 1 h bei 0°C und anschließend 19 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde *tert*-Butylhydroperoxid (0.99 mL, 5.5 M in Hexan, 5.45 mmol, 6.00 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben und für 20 min bei 0°C gerührt. Es konnte jedoch kein Umsatz des 1,2-Isopropyliden-*myo*-inositols festgestellt werden.

*Variante 2:* Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Suspension von D,L-1,2-Isopropyliden-*myo*-inositol (*rac*)-**26** (100 mg, 0.454 mmol, 1.00 Äquiv.) und Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **112** (0.913 mL, 941 mg, 2.72 mmol, 6.00 Äquiv.) in abs. Dimethylformamid (2.5 mL) wurde bei 0°C langsam 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 9.07 mL, 2.72 mmol, 6.00 Äquiv.) getropft. Das Gemisch wurde 1 h bei 0°C und anschließend 18 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde *tert*-Butylhydroperoxid (544 µL, 5.5 M in Hexan, 2.72 mmol, 6.00 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben und für 20 min bei 0°C gerührt. Es konnte jedoch kein Umsatz des 1,2-Isopropyliden-*myo*-inositols festgestellt werden.

### 7.3.4.2.3 Cyanoethyl-Ansatz

#### 7.3.4.2.3.1 Synthese von Dichlor-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **115**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von Phosphor(III)-chlorid (0.87 mL, 1.4 g, 10 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. Diethylether (6 mL) wurde tropfenweise bei -25°C *N,N*-Diisopropylamin (3.0 mL, 2.1 g, 21 mmol, 2.1 Äquiv.) gegeben. Anschließend wurde weiterer abs. Diethylether (7 mL) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 2 h bei -10°C gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung unter inertgasbedingungen filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

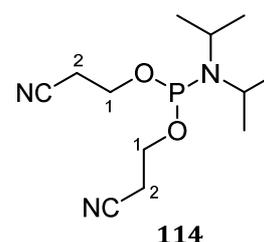


**Ausbeute:** Es konnten 1.4 g (6.8 mmol, 68%) einer farblosen Flüssigkeit erhalten werden.  
**Molmasse:** 202.06, **Summenformel:** C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>NP.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN): 4.05 – 3.88 (m, 2H, CH), 1.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz); <sup>31</sup>P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CD<sub>3</sub>CN): 169.9.

#### 7.3.4.2.3.2 Synthese von Di-(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **114**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen. Zu einer Lösung von Dichlor-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **115** (1.37 g, 6.76 mmol, 1.00 Äquiv.) und abs. Diisopropylethylamin (2.40 mL, 1.82 g, 14.1 mmol, 2.10 Äquiv.) in abs. Tetrahydrofuran (60 mL) wurde bei -78°C tropfenweise 2-Cyanoethanol (940 µL, 1.00 g, 14.1 mmol, 2.10 Äquiv.) gegeben. Nach der Zugabe wurde die



Reaktionslösung auf Rt erwärmt und 19 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter Inertgasbedingungen filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Ethylacetat, 4:1, v/v, 5% Triethylamin) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 562 mg (2.07 mmol, 31%) eines farblosen Öls erhalten werden.

**Molmasse:** 271.30, **Summenformel:** C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>P.

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.94 – 3.77 (m, 4H, H-1), 3.69 - 3.56 (m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.65 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 4H, H-2), 1.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 149.1.

**DC:** R<sub>f</sub> (Petrolether/Ethylacetat, 4:1, v/v, mit Zusatz von 5% Triethylamin) = 0.4.

#### 7.3.4.2.3.3 Synthese von *D,L*-2,3-*O*-Isopropyliden-1,4,5,6-*O*-Tetrakis-(bis-(2'-cyanoethyl)-phosphat)-*myo*-inositol **117**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

*D,L*-1,2-*O*-Isopropyliden-*myo*-inositol (*rac*)-**26**

(88 mg, 0.40 mmol, 1.0 Äquiv.) und Di-(2-cyanoethyl)-*N,N*-

diisopropylaminophosphoramidit **114** (0.50 g,

1.8 mmol, 4.4 Äquiv.) wurden zunächst mit Toluol

(2x 2 mL) koevaporiert. Dann wurde das Gemisch

in abs. Dimethylformamid (5 mL) gelöst und bei

0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0.3 M in Acetonitril, 2.0 mL, 0.59 mmol, 1.5 Äquiv.) hinzugegeben.

Folgend wurde vier Mal nach jeweils 5 min bei 0°C 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol Acetonitril (0.3 M,

0.98 mL, 0.30 mmol, 0.75 Äquiv.) hinzugetropft und anschließend 4 h bei Rt gerührt. Daraufhin

wurde *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan, 0.35 mL, 1.8 mmol, 4.4 Äquiv.) bei 0°C

hinzugegeben und die Reaktionslösung für 20 min bei 0°C gerührt. Schließlich wurde die

Reaktionslösung mit Ethylacetat (60 mL) verdünnt und mit ges. Natriumchloridlösung (2x 30 mL)

gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel

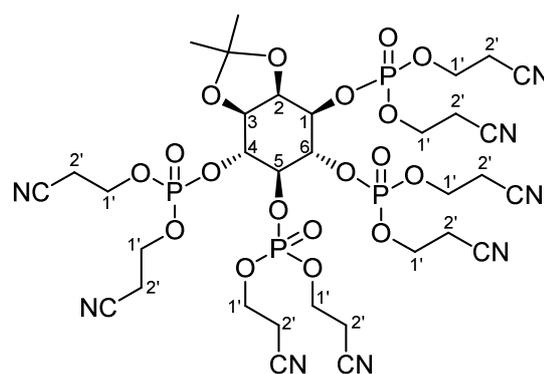
unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>,

Dichlormethan/Methanol, 10:1, v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnten 0.19 g (0.20 mmol, 49%) eines farblosen Schaums erhalten werden als

Gemisch aus *D,L*-2,3-*O*-Isopropyliden-1,4,5,6-*O*-Tetrakis-(di-(2'-cyanoethyl))-phosphat-*myo*-inositol und *D,L*-2,3-*O*-Isopropyliden-1,4,5,6-*O*-Tris-(di-(2'-cyanoethyl))-phosphat-*myo*-inositol.

**Molmasse:** 964.65 g/mol, **Summenformel:** C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>18</sub>P<sub>4</sub>.



**117**

**Analytische Daten:** <sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, MeOD): 4.82 – 4.39 (m, 3H, H-1, H-2, H-4), 4.37 - 4.16 (m, 16 H, -O-CH<sub>2</sub>-), 4.11 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.5 Hz, 1H, H-3), 3.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-6), 3.51 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 2.81 – 2.67 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>CN), 1.48 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>, MeOD): 0.84, 0.61, 0.37, 0.05, 0.01, -0.03, -0.38, -0.49.

**MS** (MALDI, pos.) *m/z*: ber.: 987.162 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 987.028.

**DC:** R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Methanol, 10:1, v/v) = 0.4.

## 8 Literatur

1. H. Lotter, N. Gonzalez-Roldan, B. Lindner, F. Winau, A. Isibasi, M. Moreno-Lafont, A. J. Ulmer, O. Holst, E. Tannich, T. Jacobs, Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess, *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000434.
2. T. Mallevaey, A. J. Clarke, J. P. Scott-Browne, M. H. Young, L. C. Roisman, D. G. Pellicci, O. Patel, J. P. Vivian, J. L. Matsuda, J. McCluskey, D. I. Godfrey, P. Marrack, J. Rossjohn, L. Gapin, A molecular basis for NKT cell recognition of CD1d-self-antigen, *Immunity* **2011**, *34*, 315-326.
3. E. Tupin, Y. Kinjo, M. Kronenberg, The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 405-417.
4. D. I. Godfrey, H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, L. Van Kaer, NKT cells: what's in a name?, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 231-237.
5. K. S. Wun, G. Cameron, O. Patel, S. S. Pang, D. G. Pellicci, L. C. Sullivan, S. Keshipeddy, M. H. Young, A. P. Uldrich, M. S. Thakur, S. K. Richardson, A. R. Howell, P. A. Illarionov, A. G. Brooks, G. S. Besra, J. McCluskey, L. Gapin, S. A. Porcelli, D. I. Godfrey, J. Rossjohn, A molecular basis for the exquisite CD1d-restricted antigen specificity and functional responses of natural killer T cells, *Immunity* **2011**, *34*, 327-339.
6. J. Rossjohn, D. G. Pellicci, O. Patel, L. Gapin, D. I. Godfrey, Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells, *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 845-857.
7. P. J. Brennan, M. Brigl, M. B. Brenner, Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions, *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 101-117.
8. S. Vasan, M. Tsuji, A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity, *Semin. Immunol.* **2010**, *22*, 87-96.
9. C. Paget, T. Mallevaey, A. O. Speak, D. Torres, J. Fontaine, K. C. Sheehan, M. Capron, B. Ryffel, C. Faveeuw, M. Leite de Moraes, F. Platt, F. Trottein, Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids, *Immunity* **2007**, *27*, 597-609.
10. D. Wu, G. W. Xing, M. A. Poles, A. Horowitz, Y. Kinjo, B. Sullivan, V. Bodmer-Narkevitch, O. Plettenburg, M. Kronenberg, M. Tsuji, D. D. Ho, C. H. Wong, Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 1351-1356.
11. Z. Zeng, Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove, *Science* **1997**, *277*, 339-345.

12. V. Cerundolo, J. D. Silk, S. H. Masri, M. Salio, Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies, *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 28-38.
13. C. McCarthy, D. Shepherd, S. Fleire, V. S. Stronge, M. Koch, P. A. Illarionov, G. Bossi, M. Salio, G. Denkberg, F. Reddington, A. Tarlton, B. G. Reddy, R. R. Schmidt, Y. Reiter, G. M. Griffiths, P. A. van der Merwe, G. S. Besra, E. Y. Jones, F. D. Batista, V. Cerundolo, The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation, *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1131-1144.
14. C. Murakata, T. Ogawa, Synthetic studies on glycoposphatidylinositol anchor: a highly efficient synthesis of glycobiosyl phosphatidylinositol through *H*-phosphonate approach, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 101-104.
15. M. Denis, G. D. Ainge, D. S. Larsen, W. B. Severn, G. F. Painter, A synthetic analogue of phosphatidylinositol mannoside is an efficient adjuvant, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2009**, *31*, 577-582.
16. G. D. Ainge, N. A. Parlane, M. Denis, B. S. Dyer, A. Harer, C. M. Hayman, D. S. Larsen, G. F. Painter, Phosphatidylinositol mannoside ether analogues: syntheses and interleukin-12-inducing properties, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5291-5296.
17. G. D. Ainge, N. A. Parlane, M. Denis, C. M. Hayman, D. S. Larsen, G. F. Painter, Phosphatidylinositol mannosides: synthesis and adjuvant properties of phosphatidylinositol *di*- and *tetramannosides*, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7615-7624.
18. J. Lu, K. N. Jayaprakash, U. Schlueter, B. Fraser-Reid, Synthesis of a malaria candidate glycosylphosphatidylinositol (GPI) structure: a strategy for fully inositol acylated and phosphorylated GPIs, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7540-7547.
19. P. S. Patil, T. J. Cheng, M. M. Zulueta, S. T. Yang, L. S. Lico, S. C. Hung, Total synthesis of tetraacylated phosphatidylinositol hexamannoside and evaluation of its immunomodulatory activity, *Nat Commun* **2015**, *6*, 7239.
20. P. S. Patil, S. C. Hung, Synthesis of mycobacterial triacylated phosphatidylinositol dimannoside containing an acyl lipid chain at 3-*O* of inositol, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2618-2621.
21. G. M. Rankin, B. J. Compton, K. A. Johnston, C. M. Hayman, G. F. Painter, D. S. Larsen, Synthesis and mass spectral characterization of mycobacterial phosphatidylinositol and its dimannosides, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6743-6759.
22. Y. Xu, B. R. Sculimbrene, S. J. Miller, Streamlined synthesis of phosphatidylinositol (PI), PI3P, PI3,5P2, and deoxygenated analogues as potential biological probes, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4919-4928.
23. X. Liu, S. Siegrist, M. Amacker, R. Zurbriggen, G. Pluschke, P. H. Seeberger, Enhancement of the immunogenicity of synthetic carbohydrates by conjugation to virosomes: a leishmaniasis vaccine candidate, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 161-164.

24. C. H. Marzabadi, R. W. Franck, Small-Molecule Carbohydrate-Based Immunostimulants, *Chemistry (Easton)* **2017**, *23*, 1728-1742.
25. T. E. M. Agency, *Guideline on Adjuvants in vaccines for human use*, **2005**, London.
26. A. B. Tomoyoshi Nozaki, *Amebiasis*, **2015**, Tokio.
27. C. Brachthäuser, *Verhalten der Entzündungsparameter bei der Behandlung der invasiven Amöbiasis*, **2001**, Hamburg.
28. E. T. G. Burchard, Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der Amöbiasis, *Deutsches Ärzteblatt* **2004**, *101*.
29. L. Mortimer, K. Chadee, The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*, *Exp. Parasitol.* **2010**, *126*, 366-380.
30. WHO, *World : Endemicity of cutaneous leishmaniasis, 2015*, **2017** abgerufen: 2017; Link: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish\\_CL\\_2015.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2015.png).
31. WHO, **2017**, *World : Endemicity of visceral leishmaniasis, 2015*.
32. WHO, *Leishmaniasis*, **2017** abgerufen: 07.09.2017; Link: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
33. F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, M. Boelaert, Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?, *Nature Reviews Microbiology* **2007**, *5*, S7-S16.
34. WHO, *Tuberculosis*, **2017** abgerufen: 2017; Link: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
35. Ä. o. Grenzen, *Tuberkulose in ärmeren Ländern*, **2017** abgerufen: 2017; Link: <https://www.aerzte-ohne-grenzen.de/medikamentenkampagne/tuberkulose>.
36. WHO, **2016**, *World : Estimated TB incidence rates, 2015*.
37. WHO, **2016**, *World : Estimated TB mortality rates in HIV-negative people, 2015*.
38. S. Middendorp, E. E. Nieuwenhuis, NKT cells in mucosal immunity, *Mucosal Immunol.* **2009**, *2*, 393-402.
39. D. B. Moody, TLR gateways to CD1 function, *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 811-817.
40. J. L. Matsuda, L. Gapin, N. Fazilleau, K. Warren, O. V. Naidenko, M. Kronenberg, Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 12636-12641.
41. J. Wojno, J. P. Jukes, H. Ghadbane, D. Shepherd, G. S. Besra, V. Cerundolo, L. R. Cox, Amide analogues of CD1d agonists modulate iNKT-cell-mediated cytokine production, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 847-855.
42. J. L. Ferrara, S. Abhyankar, D. G. Gilliland, Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1, *Transplant. Proc.* **1993**, *25*, 1216-1217.

43. S. Moody-Haupt, J. H. Patterson, D. Mirelman, M. J. McConville, The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans, *J. Mol. Biol.* **2000**, 297, 409-420.
44. S. Moody, S. Becker, Y. Nuchamowitz, D. Mirelman, Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids, *Parasitology* **1997**, 114, 95-104.
45. I. Wong-Baeza, M. Alcantara-Hernandez, I. Mancilla-Herrera, I. Ramirez-Saldivar, L. Arriaga-Pizano, E. Ferat-Osorio, C. Lopez-Macias, A. Isibasi, The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*, *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 2010, ID: 254521.
46. H. Bernin, *Evaluierung des immuntherapeutischen Potentials eines Lipopeptidphosphoglykans aus Entamoeba histolytica*, **2014**, Hamburg.
47. P. E. Murthy, *Structure and Nomenclature of Inositol Phosphates, Phosphoinositides, and Glycosylphosphatidylinositols* in *Biology of Inositols and Phosphoinositides*, B.B.B. A. Lahiri Majumder, Editor. **2006**, Springer: Niederlande.
48. J. M. Berg, Stryer, Lubert, Tymoczko, John L., *Stryer Biochemie*, Vol. 6. **2007**, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
49. F. Loewus, *Inositol and Plant Cell Wall Polysaccharide Biogenesis*, in *Biology of Inositols and Phosphoinositides*, B.B.B. A. Lahiri Majumder, Editor. **2006**, Springer: Niederlande. S. 21-46.
50. U. Schlueter, J. Lu, B. Fraser-Reid, Synthetic approaches to heavily lipidated phosphoglyceroinositides, *Org. Lett.* **2003**, 5, 255-257.
51. K. S. Bruzik, A. A. Hakeem, M. D. Tsai, Are D- and L-chiro-phosphoinositides substrates of phosphatidylinositol-specific phospholipase C?, *Biochemistry* **1994**, 33, 8367-8374.
52. I.U.P.A.C., *Nomenclature of cyclitols*, **1973**, London.
53. Y.-H. Tsai, S. Götze, N. Azzouz, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, D. Varon Silva, Eine allgemeine Methode zur Herstellung von GPI-Membranankern am Beispiel der Totalsynthese des "Low-molecular-weight-Antigens" von *Toxoplasma gondii*, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10136-10139.
54. C. Stefaniu, I. Vilotijevic, G. Brezesinski, P. H. Seeberger, D. Varon Silva, A comparative structural study in monolayers of GPI fragments and their binary mixtures, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 9259-9265.
55. A. V. Nikolaev, N. Al-Maharik, Synthetic glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors: how these complex molecules have been made, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 970-1020.
56. P. A. Gent, R. Gigg, C. D. Warren, Studies towards a synthesis of phosphatidylinositol, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11, 2575-2578.
57. J.Davies, T. Malkin, *Chem. Ind.* **1959**1155-1156.

58. R. Gigg, Synthesis of glycolipids, *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *26*, 287-404.
59. R. Gigg, C. D. Warren, Derivatives of 2,3,4,5,6-penta-*O*-benzyl-*myo*-inositol, *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1969**2367.
60. B. A. Klyashchitskii, E. G. Zhelvakova, V. I. Shvets, R. P. Evstigneeva, N. A. Preobrazhenskii, Synthesis of optically active pentabenzyl ethers of *myo*inositol. Total synthesis of phosphatidylinositol with natural structure, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 587-590.
61. J. G. Ward, R. C. Young, Synthesis of 1,2-dipalmitoyl-glycer-3-yl-inositol-1-phosphate, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6013-6015.
62. K. S. Bruzik, G. M. Salamończyk, Synthesis of the enantiomeric 1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo* inositols, *Carbohydr. Res.* **1989**, *195*, 67-73.
63. Kana M. Sureshan, T. Das, Mysore S. Shashidhar, Rajesh G. Gonnade, Mohan M. Bhadbhade, Sulfonate Protecting Groups: Synthesis of *D*- and *L*-*myo*-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate Precursors by a Novel Silver(I) Oxide-Mediated *O*-Alkylation of 2,4(6)-Di-*O*-acyl-6(4)-*O*-sulfonyl-*myo*-Inositol 1,3,5-Orthoformate Derivatives Through Intramolecular Assistance of the Sulfonyl Group, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 1035-1041.
64. F. Ting, *Stereoselektive Synthese eines Bausteins des Phosphatidylinositols b von E. histolytica*, **2013**, Hamburg.
65. H. Gillandt, *Innovationen auf dem Gebiet der Synthese enantiomerenreiner myo-Inositphosphate für die zellbiologische Anwendung*, **2005**,
66. S. Capolicchio, D. T. Thakor, A. Linden, H. J. Jessen, Synthesis of unsymmetric diphospho-inositol polyphosphates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 6912-6916.
67. C. M. Nkambule, N. W. Kwezi, H. H. Kinfe, M. G. Nokwequ, D. W. Gammon, S. Oscarson, E. Karlsson, Efficient regioselective protection of *myo*-inositol via facile protecting group migration, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 618-623.
68. T. Aiba, M. Sato, D. Umegaki, T. Iwasaki, N. Kambe, K. Fukase, Y. Fujimoto, Regioselective phosphorylation of *myo*-inositol with BINOL-derived phosphoramidites and its application for protozoan lysophosphatidylinositol, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6672-6675.
69. H. Bernin, Lotter, H., Gonzalez-Rodan, N., Tannich, E., Fujimoto, Y., Fukase K., *Novel immunostimulatory molecules*, F.B. BNITM, Editor. **2016**.
70. D. Landschulze, *Synthese von Schlüsselintermediaten des Phosphatidylinositols a von E. histolytica*, **2012**, Hamburg.
71. J. Gigg, R. Gigg, S. Payne, R. Conant, (±)-1,2:4,5-Di-*O*-isopropylidene-*myo*-inositol, *Carbohydr. Res.* **1985**, *142*, 132-134.
72. B. S. a. G. S. Phillippe Guédât, Synthesis of (±) 1,2-Dideoxy-1,2-Diamino-*myo*-Inositol, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7375-7378.

73. P. G. M. W. Theodora W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. ed, **2002**, New York: John Wiley & Sons, Inc.
74. N. Jeschik, *Synthese eines enantiomerenreinen 2-Acyl-myo-inositols*, **2014**, Hamburg.
75. M. B. Cid, Julia B. Bonilla, F. Alfonso, M. Martín-Lomas, Synthesis of New Hexosaminy D- and L-*chiro*-Inositols Related to Putative Insulin Mediators, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003, 3505-3514.
76. B. M. Swarts, Z. Guo, Chemical synthesis and functionalization of clickable glycosylphosphatidylinositol anchors, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 2342-2352.
77. R. Verduyn, C. J. J. Elie, C. E. Dreef, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, Stereospecific synthesis of partially protected 2-azido-2-deoxy-D-glucosyl D-*myo*-inositol: Precursor of a potential insulin mimetic and membrane protein anchoring site, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1990**, 109, 591-593.
78. J. Alais, A. Maranduba, A. Veyrieres, Regioselective mono-*O*-alkylation of disaccharide glycosides through their dibutylstannylene complexes, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 2383-2386.
79. S. Sato, S. Nunomura, T. Nakano, Y. Ito, T. Ogawa, An efficient approach to stereoselective glycosylation of ceramide derivatives: Use of pivaloyl group as a stereocontrolling auxiliary, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4097-4100.
80. H. B. Mereyala, S. Guntha, A novel, mild palladium mediated deprotection of *O*-allyl and prop-1-enyl ethers, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6929-6930.
81. A. B. Smith, R. A. Rivero, K. J. Hale, H. A. Vaccaro, Phyllanthoside-phyllanthostatin synthetic studies. 8. Total synthesis of (+)-phyllanthoside. Development of the Mitsunobu glycosyl ester protocol, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2092-2112.
82. S. G. Konda, V. T. Humne, P. D. Lokhande, Rapid and selective deallylation of allyl ethers and esters using iodine in polyethylene glycol-400, *Green Chem.* **2011**, 13, 2354.
83. A. Mart, M. S. Shashidhar, Elaboration of the ether cleaving ability and selectivity of the classical Pearlman's catalyst [Pd(OH)<sub>2</sub>/C]: concise synthesis of a precursor for a *myo*-inositol pyrophosphate, *Tetrahedron* **2012**, 68, 9769-9776.
84. K. Nakayama, K. Uoto, K. Higashi, T. Soga, T. Kusama, A Useful Method for Deprotection of the Protective Allyl Group at the Anomeric Oxygen of Carbohydrate Moieties Using Tetrakis(triphenylphosphine)palladium, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1992**, 40, 1718-1720.
85. C. Meier, cycloSal Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery — Chemistry Meets Biology, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.
86. L. Weinschenk, T. Gollnest, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro nucleoside diphosphates of anti-HIV active nucleoside analogues, *ChemMedChem* **2015**, 10, 891-900.

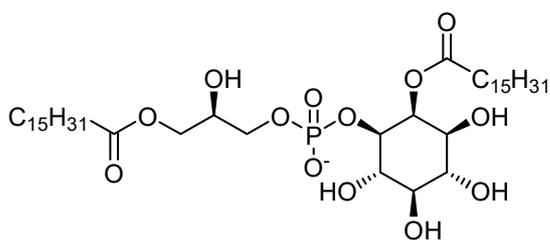
87. C. Meier, 5',5'-O-Dinucleosid- $\alpha$ -hydroxybenzylphosphonsäureester als lipophile, potentielle Prodrugs von 2',3'-Didesoxythymidin (ddT), *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1854-1856.
88. X. Liu, Y. U. Kwon, P. H. Seeberger, Convergent synthesis of a fully lipidated glycosylphosphatidylinositol anchor of *Plasmodium falciparum*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5004-5005.
89. J. S. Gaston Lavéna, Synthetic studies on nucleoside 5'-H-phosphonate monoesters under Mitsunobu reaction conditions, *ARKIVOC* **2008**, *2009*, 20.
90. M. R. V. Garigapati, Synthesis of Short Chain Phosphatidylinositols, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 769-772.
91. B. D. Chandler, A. L. Burkhardt, K. Foley, C. Cullis, D. Driscoll, N. Roy D'Amore, S. J. Miller, A fully synthetic and biochemically validated phosphatidyl inositol-3-phosphate hapten via asymmetric synthesis and native chemical ligation, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 412-418.
92. M. A. Russell, A. P. Laws, J. H. Atherton, M. I. Page, The mechanism of the phosphoramidite synthesis of polynucleotides, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3270-3275.
93. L. Weinschenk, *DiPPro-Nucleotide mit asymmetrischer Maskierung der Pyrophosphateinheit*, **2015**, Hamburg.
94. I. Sarac, C. Meier, Efficient Automated Solid-Phase Synthesis of DNA and RNA 5'-Triphosphates, *Chemistry (Easton)* **2015**, *21*, 16421-16426.
95. L. Qian, Y. Xu, T. Simper, G. Jiang, J. Aoki, M. Umezū-Goto, H. Arai, S. Yu, G. B. Mills, R. Tsukahara, N. Makarova, Y. Fujiwara, G. Tigyi, G. D. Prestwich, Phosphorothioate analogues of alkyl lysophosphatidic acid as LPA3 receptor-selective agonists, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 376-383.
96. Y. Ahmadibeni, K. Parang, Selective diphosphorylation, dithiodiphosphorylation, triphosphorylation, and trithiotriphosphorylation of unprotected carbohydrates and nucleosides, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5589-5592.
97. G. S. Cremosnik, A. Hofer, H. J. Jessen, Iterative Synthese von Nukleosidoligophosphaten mit Phosphoramiditen, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 290-294.
98. M. Jacobsen, *Synthesis of Oligonucleotides Damaged with Carcinogenic Aromatic Amines at the C8- and N6-Position of 2'-Deoxyadenosin*, **2010**, Hamburg.
99. X. Wu, Z. Guo, Convergent synthesis of a fully phosphorylated GPI anchor of the CD52 antigen, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4311-4313.
100. H. Zhang, J. He, T. G. Kutateladze, T. Sakai, T. Sasaki, N. Markadieu, C. Erneux, G. D. Prestwich, 5-Stabilized phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate analogues bind Grp1 PH, inhibit phosphoinositide phosphatases, and block neutrophil migration, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 388-395.

101. M. V. de Almeida, J. Cleophax, G.-O. A., G. Prestat, D. Dubreuil, S. D. Gero, Synthesis of Deoxy Phosphatidylinositol Analogues and Phosphonate Isosters of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, *Tetrahedron* **1999**, *55*.
102. CommonOrganicChemistry.com, **2018**, *Benzyl Deprotection (H<sub>2</sub> + Pd/C)*.
103. V. Chagovets, M. Lisa, M. Holcapek, Effects of fatty acyl chain length, double-bond number and matrix on phosphatidylcholine responses in matrix-assisted laser desorption/ionization on an Orbitrap mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 2374-2384.
104. A. Biosciences, *Gel Filtration - Principles and Methods*. **2002**.
105. Sigma-Aldrich, *Palladium black surface area 40-60 m<sup>2</sup>/g, 99.95% trace metals basis | Sigma-Aldrich*, Link: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/520810>.
106. T. Koch, D. S. Pedersen, Analogues of LNA (Locked Nucleic Acid): Synthesis of the 2'-Thio-LNA Ribothymidine and 5-Methylcytidine Phosphoramidites, *Synthesis* **2004**, 578-582.
107. P. Meneses, T. Glonek, High resolution <sup>31</sup>P NMR of extracted phospholipids, *J. Lipid Res.* **1988**, *29*, 679-689.
108. L. Michaelis, P. Schlieper, 500 MHz<sup>1</sup>H NMR of phospholipid liposomes, *FEBS Lett.* **1982**, *147*, 40-44.
109. T. Aiba, S. Suehara, S. L. Choy, Y. Maekawa, H. Lotter, T. Murai, S. Inuki, K. Fukase, Y. Fujimoto, Employing BINOL-Phosphoroselenoyl Chloride for Selective Inositol Phosphorylation and Synthesis of Glycosyl Inositol Phospholipid from *Entamoeba histolytica*, *Chemistry (Easton)* **2017**, *23*, 8304-8308.
110. A. V. Demchenko, M. A. Wolfert, B. Santhanam, J. N. Moore, G. J. Boons, Synthesis and biological evaluation of Rhizobium sin-1 lipid A derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6103-6112.
111. G. F. White, N. J. Russell, E. C. Tidswell, Bacterial scission of ether bonds, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 216-232.
112. Y. Yamano, K. Tsuboi, Y. Hozaki, K. Takahashi, X. H. Jin, N. Ueda, A. Wada, Lipophilic amines as potent inhibitors of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3658-3665.
113. A. Crossman, M. J. Paterson, M. A. J. Ferguson, T. K. Smith, J. S. Brimacombe, Further probing of the substrate specificities and inhibition of enzymes involved at an early stage of glycosylphosphatidylinositol (GPI) biosynthesis, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2049-2059.
114. S. L. Choy, H. Bernin, T. Aiba, E. Bifeld, S. C. Lender, M. Muhlenpfordt, J. Noll, J. Eick, C. Marggraff, H. Niss, N. G. Roldan, S. Tanaka, M. Kitamura, K. Fukase, J. Clos, E. Tannich, Y. Fujimoto, H. Lotter, Synthetic analogs of an *Entamoeba histolytica* glycolipid designed to combat intracellular Leishmania infection, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9472.
115. S. L. Choy, *Dissertation*, **2018**, Hamburg.

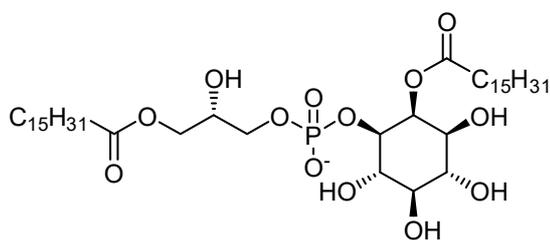
116. J. Mestas, C. C. W. Hughes, Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology, *The Journal of Immunology* **2004**, *172*, 2731-2738.
117. H. Lotter, E. Tannich, The current status of an amebiasis vaccine, *Arch. Med. Res.* **2006**, *37*, 292-296.
118. M. Balai, L. K. Gupta, A. K. Khare, A. Srivastava, A. Mittal, A. Singh, Cutaneous Leishmaniasis in a Nonendemic Area of South Rajasthan: A Prospective Study, *Indian J. Dermatol.* **2016**, *61*, 521-524.
119. M. B. Lutz, N. Kukutsch, A. L. J. Ogilvie, S. Rößner, F. Koch, N. Romani, G. Schuler, An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow, *J. Immunol. Methods* **1999**, *223*, 77-92.

## 9 Anhang

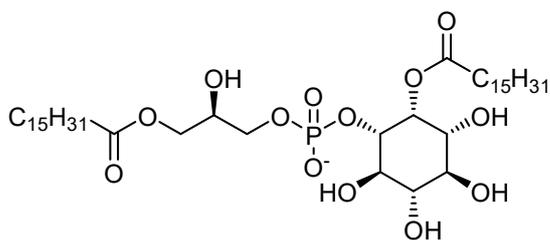
### 9.1 Verbindungsübersicht



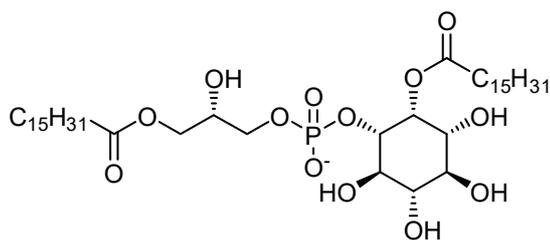
19a



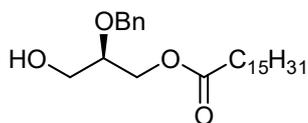
19b



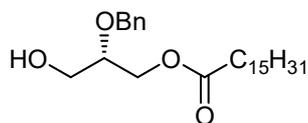
19c



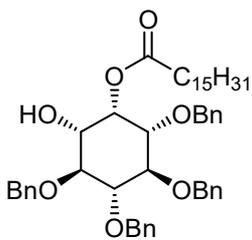
19d



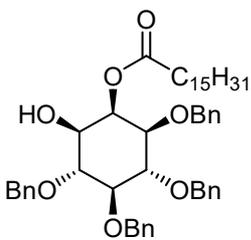
(R)-21



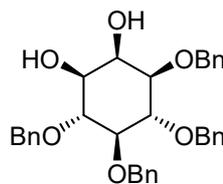
(S)-21



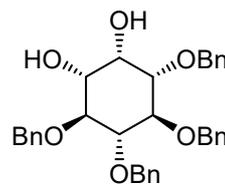
L-22



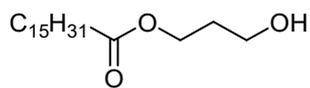
D-22



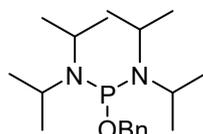
D-23



L-23



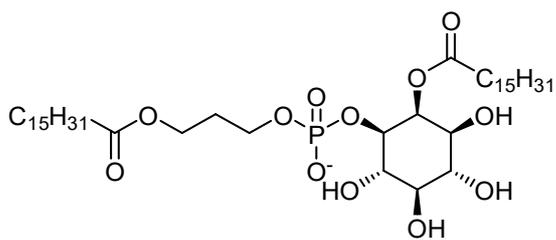
46



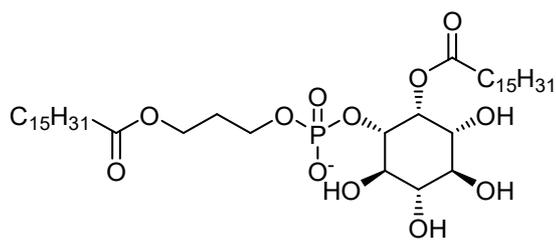
64



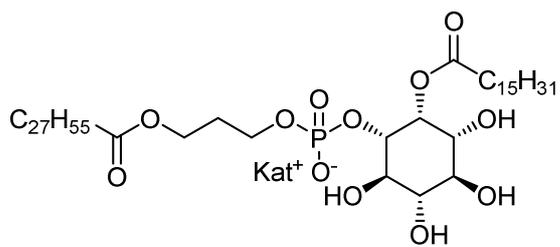
79



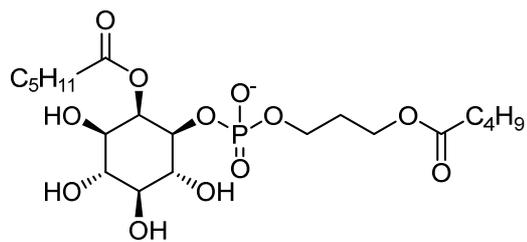
D-80



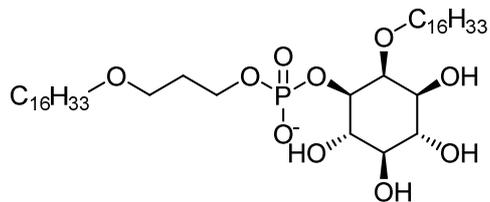
L-80



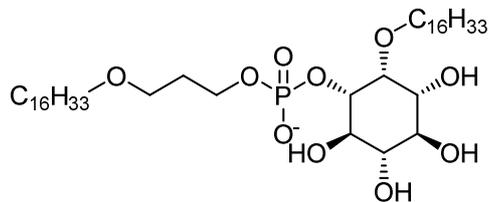
D-88



98



(rac)-102



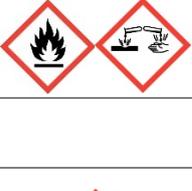
## 9.2 Gefahrstoffverzeichnis

Die folgende Liste umfasst die Reagenzien und Lösungsmittel, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden. Für die Gefahrstoffe sind die gültigen Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, sich oder andere Personen mit diesen Verbindungen zu kontaminieren und sie in die Umwelt einzubringen.

Substanz	Piktogramm	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
<i>(1S)-(-)-Camphansäurechlorid</i>		Gefahr	314	280-305+351+338-310
<i>1,2-Benzoldimethanol</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>1,3-Propandiol</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>1-Bromhexadecan</i>		Achtung	315	
<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid</i>		Gefahr	314	280-305+351+338-310
<i>2,2-Dimethoxypropan</i>	 	Gefahr	225-319-EUH066	210-305+351+338
<i>2-Cyanoethanol</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>2-Propanol</i>	 	Gefahr	225-319-336	210-233-240-305+351+338-403+235
<i>4,5-Dicyanoimidazol</i>	 	Gefahr	315-318-335	261-280-305+351+338
<i>4-DMAP</i>		Gefahr	301-310-315-319-335	280-301+310+330-302+352+310-304+340+312-305+351+338-337+313
<i>5-(Benzylthio)-1H-tetrazol</i>	 	Gefahr	315-318-335	261-280-305+351+338
<i>Aceton</i>	 	Gefahr	225-319-336-EUH066	210-240-305+351+338-403+233
<i>Acetonitril</i>	 	Gefahr	225-332-302-312-319	210-240-302+351+338-403+233

<i>Allylbromid</i>		Gefahr	225-301-331- 314-340-350- 400	210-280- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338- 310
<i>Ammoniak 25%</i>		Gefahr	290-314-335- 400	260-273-280- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338
<i>Ammoniumchlorid</i>		Achtung	302-319	305+351+338
<i>Benzylalkohol</i>		Achtung	332-302-319	261- 301+312+330- 305+351+338
<i>Benzylbromid</i>		Achtung	315-319-335	261- 305+351+338
<i>Caesiumfluorid</i>		Gefahr	301+311+331- 315-318-361f- EUH032	261-280- 301+330+331+ 310- 302+352+312- 304+340+311- 305+351+338+ 310
<i>Calciumcarbonat</i> <i>Celite® 545</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>Cer(IV)-sulfat</i>		Achtung	315-319-335	305+351+338
<i>Chloroform</i>		Gefahr	302-331-315- 319-351-361d- 336-372	261-281- 305+351+338- 311
<i>DBU</i>		Gefahr	301-314-412- 290	273-280- 301+310- 305+351+338- 310
<i>Dibutylzinnoxid</i>		Gefahr	301-315-317- 318-341-360- 370-372-411	201-260-273- 280-301+310- 305+351+338
<i>Dichlormethan</i>		Achtung	315-319-335- 336-351-373	261-281- 304+351+338
<i>Dicyclohexylcarbodiimid</i>		Gefahr	302-311-317- 318	280- 301+312+330- 302+352+312- 305+351+338

<i>Diethylether</i>	 	Gefahr	224-302-336- EUH019- EUH066	210-240- 403+235
<i>Diisopropylazodi- carboxylat</i>	 	Achtung	315-319-335- 351-373-411	261-273-281- 305+351+338
<i>Dimethylsulfoxid</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>Essigsäure</i>	 	Gefahr	226-290-314	210-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
<i>Ethanol</i>	 	Gefahr	225-319	210-240- 305+351+338- 403+233
<i>Ethylacetat</i>	 	Gefahr	225-319-336- EUH066	210-233-240- 305+351+338- 403+235
<i>Hexansäurechlorid</i>	 	Gefahr	226-314	280- 305+351+338- 310
<i>Imidazol</i>	  	Gefahr	360D-302-314	201-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
<i>Iod</i>	  	Achtung	312+332-315- 319-335-372- 400	273-302+352- 305+351+338- 314
<i>Kieselgel</i>	-	-	-	260
<i>Lithiumaluminium- hydrid</i>	 	Gefahr	260-314- EUH014	280- 301+330+331- 305+351+338- 370+378- 308+310- 402+404
<i>Magnesiumsulfat</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>meta-Chlorper- benzoesäure</i>	 	Gefahr	242-315-317- 319-335	220-261-280- 305+351+338- 410-411+235
<i>Methanol</i>	  	Gefahr	225-331-311- 301-370	210-233-280- 302+352- 304+340- 308+310- 403+235
<i>N,N-Diisopropylamin</i>	  	Gefahr	225302-331- 314-335	210-260-280- 310- 303+361+353- 305+351+338- 403+235

<i>N,N-Diisopropyletylamin</i>		Gefahr	225-302-331-318-335	210-261-280-305+351+338-311
<i>N,N-Dimethylformamid</i>		Gefahr	226-312-332-319-360D	201-210-302+352-304+340-305+351+338-308+313
<i>Natriumacetat</i>	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.			
<i>Natriumchlorid</i>	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.			
<i>Natriumhydrid</i>		Gefahr	228-260-314	210-223-231+232-280-370+278-422
<i>Natriumhydrogen-carbonat</i>	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.			
<i>Natriumhydroxid</i>		Gefahr	290-314	280-301+330+331-305+351+338-308+310
<i>Natriumperiodat</i>		Gefahr	271-314-372-400	210-221-273-280-301+330+331-305+351+338-308+310
<i>Natriumsulfat</i>	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.			
<i>Octacosansäure</i>	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.			
<i>Palladium(II)-chlorid</i>		Gefahr	290-302-317-318-410	280-301+310+330-333+313
<i>Palladium/Kohle</i>		Achtung	315-319	305+351+338
<i>Palladium-black©</i>		Gefahr	228-315-319-335	210-261-305+351+338
<i>Palmitinsäurechlorid</i>		Gefahr	314-335-EUH014	280-301+330+331-304+340-305+351+338-309+310
<i>para-Toluolsulfonsäure</i>		Achtung	315-319-335	302+352-304+340-305+351+338

<i>Petrolether</i>		Gefahr	225-304-315- 336-361f-373- 411	201-210- 301+310-331- 370+378-501
<i>Phosphor(III)-chlorid</i>		Gefahr	300+330-373- 314-EUH014- EUH029	260-280- 301+310-330- 303+361+353- 304+340-310- 305+351+338- 403+233
<i>Phtalsäure</i>		Achtung	335-315-319	261-280- 305+351+338- 304+340-405- 501
<i>Pivalinsäurechlorid</i>		Gefahr	225-290-302- 330-314	210-280- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338- 310
<i>Polyethylenglykol-400</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>Pyridin</i>		Gefahr	225-332-302- 312-319-315	210-280- 305+351+338
<i>Salzsäure</i>		Gefahr	290-314-335	260-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
<i>Schwefelsäure</i>		Gefahr	290-314	280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
<i>tert-Butylhydroperoxid in n-Decan</i>		Gefahr	226-242-302- 311-330-314- 317-341-411	210-220-280- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338- 310
<i>Tetrahydrofuran</i>		Gefahr	225-302-319- 335-351- EUH019	210-280- 301+312+330- 305+351+338- 370+378- 403+235
<i>Tetrakis(triphenyl- phosphin)-palladium(0)</i>		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
<i>Thionylchlorid</i>		Gefahr	302-331-314- 335-EUH014- EUH029	280- 301+330+331- 304+340-

				305+351+338-309+310
<i>Toluol</i>		Gefahr	225-304-315-336-361d-373	210-240-301+310+330-302+352-314-403+233
<i>Triethylamin</i>		Gefahr	225-302-311+331-314-335	210-280-303+361+353-304+340-310-305+351+338-403+233
<i>Trifluoressigsäure</i>		Gefahr	290-331-314-412-EUH071	260-273-280-303+361+353-305+351+338-312
<i>Triphenylphosphin</i>		Achtung	302-317-373	280-301+312+330-333+313
<i>Valeriansäurechlorid</i>		Gefahr	226-290-331-314-412	261-280-305+351+338-310
<i>Wasserstoff</i>		Gefahr	220-280	210-377-381-403

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden experimentellen Bedingungen sowie für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem technischen Personal des NMR-Teams um Herrn Dr. Thomas Hackl und Herrn Dr. Erhard T. K. Haupt danke ich für das Vermessen vieler NMR-Proben und für die Hilfestellungen bei analytischen Problemen. Gleichermaßen danke ich der gesamten MS-Abteilung von Frau Dr. Maria Riedner für die massenspektrometrischen Messungen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. F. Hoffmann und Isabelle Nevoigt von der Röntgenstrukturanalyse-Abteilung für die Vermessung der Kristallstrukturen.

Für die Messung zahlreicher Immunoassays, den guten wissenschaftlichen Austausch und die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Dr. Hanna Lotter, Siew Ling Choy, Dr. Hannah Bernin und Corinna Lender vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Der Universität Hamburg danke ich für die Finanzierung meines Promotionsstipendiums.

Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft bei Fragestellungen jeglicher Art. Hervorzuheben sind hier vor allem Dirk Landschulze, Rosmirt Sielaff, Katharina Höfler, Ivo Sarac, Tristan Gollnest, Nils Jeschik, Conny Fohrmann, Alexander Laubach und Patrick Dekiert.

Für die tatkräftige Unterstützung bei experimentellen Arbeiten möchte ich mich bei allen Studenten und Wissenschaftlern bedanken, die in den letzten Jahren Experimente mit mir zusammen durchgeführt haben, das sind insbesondere Prof. Dr. Peter Prehm, Julian Witt, Andrey Krutilin und Francesca Palumbo.

Für die fachspezifische und kritische Durchsicht dieser Arbeit geht mein herzlicher Dank an Alexander Laubach.

Insbesondere meiner Frau Jana danke ich für die Unterstützung und dass sie mir den Rücken während der ganzen Zeit freigehalten hat. Ich danke auch meinen Eltern, meinen Geschwistern und der Familie meiner Frau für ihre Unterstützung und die gemeinsame Zeit.

Meinen Kindern danke ich einfach dafür, dass sie da sind.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation „Synthese amöbischer Lipidantigene zur T-Zell-Immunistimulation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Frederic Ting