

**Synthese von Naturstoffen auf
Inositolbasis ausgehend von
para-Benzochinon**

Vom Fachbereich 9 - Chemie -
der Bergischen Universität Wuppertal
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
- Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) -
genehmigte Dissertation

von

Michael Alois Linus Podeschwa

aus Wuppertal

2003

„Man muß ins Gelingen verliebt sein, nicht ins Scheitern“

Ernst Bloch

für Evelyn

meinen Eltern,
welche diesen Augenblick leider
nicht miterleben können

Eingereicht am:

15.07.2003

Tag der mündlichen Prüfung

26.09.2003

Referent:

Prof. Dr. H.-J. Altenbach

Korreferent:

Prof. Dr. G. Vogel

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1999 bis Mai 2003 im Fach Organische Chemie des Fachbereichs 9 – Chemie - der Bergischen Universität Wuppertal angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Altenbach gilt mein Dank für die interessante und interdisziplinär orientierte Themenstellung, die Gewährung wissenschaftlicher Freiheit sowie seine Bereitschaft, mir jederzeit mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite zu stehen. Die freundliche Betreuung und die zahlreichen anregenden Diskussionen habe ich in dieser Zeit zu schätzen gelernt.

Grundsätzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Organische Chemie, dabei insbesondere Frank Meier und Jens Ostrowski, bedanken. Dabei gilt mein Dank vor allem meinen Laborkollegen Herrn Frank Schieweck, der mir die Grundlagen der Laborarbeit beibrachte. An dieser Stelle danke ich allen, die durch die Aufnahme von Spektren sowie die Durchführung von Analysen zu dieser Arbeit beigetragen haben. Für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren danke ich Frau Ilka Polanz, Herrn Prof. Dr. R. Eujen und Herrn Dr. C. M. Weisshuhn. Frau Eva Smets danke ich für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn R. Radon für die Anfertigung von Elementaranalysen. Besonders danke ich meinem Forschungspraktikanten Herrn Jochen vom Brocke für seine aufopfernde Leistung bei der *neo*-Inositol synthese. Meiner studentischen Hilfskraft Herrn Markus Volk möchte ich hiermit für die Durchführung der *scyllo*-Inositol- sowie für die *myo*-Inositolpentakisphosphat synthese danken. Meiner studentischen Hilfskraft Herrn Pierre Lebus möchte ich für seine „kochende“ Tätigkeit, welche selbst freitagnachts oft noch vonstatten ging, danken.

Den Kooperationspartnern gilt mein besonderer Dank: Dabei möchte ich insbesondere dem Arbeitskreis Biochemie der Universität Wuppertal danken. Dabei Hervorzuheben ist vor allem Herr Guido Dallmann und Herr Stephan Adelt für HPLC-Messungen und – Aufreinigungen sowie enzymatischer Umsetzungen von Inositolphosphaten. Herrn Chang-Sheng Zhang (Arbeitskreis Piepersberg, Mikrobiologie der Universität Wuppertal) danke ich für die sehr fruchtbare Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Acarbosebiosynthese. Für weitere anregende interdisziplinäre Zusammenarbeit danke ich dem Arbeitskreis Pfüller (Institut für Phytochemie der Universität Witten-Herdecke, Lectininhibitoren) und Herrn Ulf Eidhoff (Forschungszentrum Jülich, β -Arrestin). Besonders danken möchte ich ebenfalls Herrn Oliver Plettenburg, mit dessen Kooperation auf dem *myo*-Inositolsektor das Fundament für diese Arbeit aufgebaut wurde. Für das Korrekturlesen möchte ich mich bei meiner Ehefrau Evelyn Frint, bei Herrn Dr. Markus Roggel und Herrn Dr. Stephan Adelt herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Vogel gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferats.

Summary

Cyclitols, polyhydroxylated five- and six-membered carbocycles, are isolated from natural sources as single compounds or as part of more complex structures and play key functions in biological systems. Especially during the last two decades, a new level of attention was focused on inositol phosphates after the discovery, in 1983, that *myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) is a Ca²⁺-mobilizing second messenger.

In this work a *de novo* strategy for the preparation of inositol derivatives is presented. Starting from *p*-benzoquinone, optically pure compounds in both forms can be prepared easily via enzymatic resolution of derived diacetoxy conduritol B yielding the building blocks of this concept.

In the first part, several *myo*-inositol phosphates were synthesized by use of either a C₂-symmetrical or a non-symmetrical approach. Among others, a new, very short and effective route to *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄, *myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅, *myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅, *myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ and *myo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ is presented.

The second part further emphasizes the potential of this *de novo* approach in the construction of non-racemic inositol phosphate derivatives. The obtained azido-conduritol B were transformed into several azido-*myo*-inositols on a multigram scale without the need for chromatographic separation. The described efficient, high-yielding routes allowed the introduction of nitrogen-containing functional groups in 1-, 3-, 4- and 6-position of the cyclitol ring system to give several pure azido- and amino-*myo*-inositols in both enantiomeric forms.

In the third chapter a practical route is described for the preparation of a wide variety of enantiomerically pure inositol isomers. The potential of this concept is demonstrated by easy synthesis of *myo*-, *L-chiro*-, *D-chiro*-, *scyllo*-, *epi*-, *allo*- and *neo*-inositol derivatives.

In the fourth chapter a new synthetic approach is described for the preparation of branched cyclitols from conduritol B by stereoselective hydroformylation, thereby extending the synthetic potential of the versatile building blocks by transforming them in two steps into carbasugar systems.

To demonstrate the potential of this versatile approach Mycothiol, a GSH-similarity on inositolbasis, is synthesized by a new and diastereoselective access in the last chapter.

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung dieser Arbeit	16
2	Durchführung	19
2.1	Einführung	19
2.1.1	Darstellung der enantiomerenreinen Bausteine („building blocks“).....	21
2.1.2	Konzept der Differenzierung einzelner funktioneller Gruppen.....	23
2.1.2.1	C_2 -symmetrischer Ansatz zur Darstellung der <i>myo</i> -Inositole	23
2.1.2.2	Desymmetrisierender Weg zur Darstellung der <i>myo</i> -Inositole	25
2.1.3	Nomenklatur der Inositole und NMR-spektroskopische Untersuchung.....	26
2.1.4	Darstellung des Phosphorylierungsreagenzes und Grundlagen der Phosphorylierung	28
2.2	Darstellung der Amino- und Azido- <i>myo</i> -inositole und der Amino- <i>myo</i> -inositolpolyphosphate.....	30
2.2.1	Darstellung der Diazido- bzw. Diamino- <i>myo</i> -inositole mittels symmetrischen Konzept	30
2.2.1.1	Synthese von 3,6-Diazido- <i>myo</i> -Ins(1,2,4,5)P ₄ (-)- 73 als Substrat für die Co-Kristallisation von β -Arrestin	32
2.2.2	Darstellung der Azido- bzw. Amino- <i>myo</i> -inositole mittels desymmetrisierenden Konzept	35
2.2.2.1	Ausführliche NMR-spektroskopische Erläuterung von Inositolphosphaten am Beispiel von 6-Amino- <i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)- 81	42
2.2.2.2	Synthese von Affinitätsmaterial:.....	48
2.2.2.3	Enzymatische Umsetzungen der Amino- <i>myo</i> -inositolpentakisphosphate mit der InsP ₅ /InsP ₄ Phosphohydrolase und Phytase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	50
2.3	Darstellung der <i>myo</i> -Inositolphosphate.....	55
2.3.1	Darstellung der <i>myo</i> -Inositolphosphate mittels symmetrischem Konzept	55
2.3.1.1	Darstellung der zentralen Zwischenstufe 2,3-Di- <i>O</i> -acetyl-1,4-di- <i>O</i> -benzylkonduritol B (+)- 51	56
2.3.1.2	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(1)P bzw. <i>myo</i> -Ins(3)P (-)- und (+)- 11	58
2.3.1.3	Konzept der gezielten Schutzgruppenmigration: Darstellung von <i>myo</i> -Ins(2)P 96 und <i>myo</i> -Ins(2,3,6)P ₃ (+)- 105 bzw. <i>myo</i> -Ins(1,2,4)P ₃ (-)- 105	61
2.3.1.4	Synthese von InsP ₂ -Isomeren über den symmetrischen Weg	67
2.3.2	Darstellung der <i>myo</i> -Inositolphosphate mittels desymmetrisierenden Konzept.....	72
2.3.2.1	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(1,2,4,5,6)P ₅ (-)- 29 bzw. <i>myo</i> -Ins(1,2,3,4,5)P ₅ (-)- 31	79
2.3.2.2	Verwendung der <i>myo</i> -Inositolpentakisphosphat-Standards zur Untersuchung der Stereo- und Regiospezifität von <i>myo</i> -InsP ₆ Dephosphorylierungen durch Phytasen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Pichia rhodanensis</i>	84
2.3.2.3	Synthese von weiteren <i>myo</i> -Inositolpolyphosphaten mittels Bausteinen aus der desymmetrisierenden Route: Darstellung von <i>myo</i> -Ins(6)P und <i>myo</i> -Ins(4)P (-)- bzw. (+)- 15 sowie <i>myo</i> -Ins(1,3,4,5)P ₄ (-)- 24	90
2.3.3	Verwendung der <i>myo</i> -InsP ₁ und <i>myo</i> -InsP ₂ Isomere.....	94
2.4	Darstellung der Inositolstereoisomeren.....	97
2.4.1	Symmetrischer Weg: Darstellung von <i>chiro</i> -, <i>scyllo</i> -, <i>neo</i> -, <i>myo</i> - und <i>allo</i> -Inositol.....	97
2.4.2	Desymmetrisierender Weg: Darstellung von <i>epi</i> -Inositol über Konduritol C Derivate	114
2.4.3	Stereo- und Regiospezifität der Dephosphorylierung von <i>myo</i> -InsP ₆ Stereoisomeren durch Phytasen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Pichia rhodanensis</i>	117
2.4.4	Analytische Trennung der Inositol-Stereoisomere und Wachstumskurven.....	127
2.5	Synthese von Konduritol F-Derivaten als potentielle Galactoseanaloga.....	132
2.6	Darstellung von Mycothiol als Disulfid 38a und Analoga.....	138
2.6.1	Synthese der Disaccharid-Komponenten	142
2.6.1.1	Synthese des Glycosyl-Akzeptors.....	142
2.6.1.2	Synthese der aktivierten Glycosyl-Donoren	143
2.6.2	Glycosidische und anschließende peptidische Verknüpfung der Bausteine.....	148
2.6.3	Peptidische Verknüpfung und Fertigstellung der Totalsynthese	152
2.7	Synthese von Carbazuckern	158
2.7.1	Darstellung von Standards zur Aufklärung der Acarbose-Biosynthese	159
2.7.2	Erarbeitung eines neuen Darstellungsweges zu enantiomerenreinen Carbazucker	164
3	Zusammenfassung	168

4	Experimenteller Teil	181
4.1	Allgemeine Arbeitstechniken, Meßmethoden und verwendete Geräte	181
4.1.1	Darstellung der enantiomerenreinen Bausteine („building-blocks“)	186
4.1.1.1	Synthese von 5r,6t-Dibrom-2-cyclohexen-1,4-dion 41a	186
4.1.1.2	Synthese von 2,3-Dibromcyclohex-5-en-1,4-diol 42	186
4.1.1.3	Synthese von (±)-1,4-Diacetoxy-2,3-dibromcyclohex-5-en 43	187
4.1.1.4	Enzymatische Racematspaltung:	189
4.1.2	Darstellungen von Phosphorylierungsreagenzien und anderer Reagenzien	192
4.1.2.1	Darstellung von Tris(diethylamino)phosphit 65	192
4.1.2.2	Darstellung von Benzol-1,2-dimethanol 66	193
4.1.2.3	Darstellung von o-Xyliden- <i>N,N</i> -diethylamino-phosphit 62 (3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan)	193
4.1.2.4	Darstellung von Benzyl <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl)carbamate 251	194
4.1.2.5	Darstellung von Tribenzylphosphit 252	195
4.2	Darstellung der Amino- und Azido- <i>myo</i> -inositole und der Amino- <i>myo</i> -inositolphosphate	196
4.2.1	Darstellung der Diazido- bzw. Diamino- <i>myo</i> -inositole mittels symmetrischen Konzeptes	196
4.2.1.1	Darstellung von (<i>1S,2R,3R,4S</i>)-1,4-Di-azido-konduritol B (+)- 69	196
4.2.1.2	Darstellung von (<i>1S,2R,3R,4S</i>)-2,3-Di- <i>O</i> -acetyl-1,4-di-azido-konduritol-B (+)- 52	198
4.2.1.3	Darstellung von 4,5-Di- <i>O</i> -acetyl-3,6-didesoxy-3,6-di-azido- <i>myo</i> -inositol (-)- 54	200
4.2.1.4	Darstellung von 3,6-Didesoxy-3,6-di-azido- <i>myo</i> -inositol (-)- 71	202
4.2.1.5	Darstellung von 3,6-Didesoxy-3,6-di-amino- <i>myo</i> -inositol (+)- 253	204
4.2.1.6	Darstellung von 3,6-Didesoxy-3,6-di-azido-1,2,4,5-tetrakis(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphhep-2-yl)- <i>myo</i> -inositol (-)- 72	206
4.2.1.7	Darstellung von 3,6-Didesoxy-3,6-di-azido-1,2,4,5- <i>myo</i> -inositol-tetrakisphosphat (-)- 73	207
4.2.2	Darstellung der Azido- bzw. Amino- <i>myo</i> -inositole mittels desymmetrisierenden Konzeptes	209
4.2.2.1	Synthese von (<i>1R,2S,3R,6R</i>)-2-Bromo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-4-en-3-ol, (-)- 67	209
4.2.2.2	Synthese von (<i>1R,2S,3R,6S</i>)-6-Azido-2-brom-cyclohex-4-en-1,3-diol (+)- 68	210
4.2.2.3	Darstellung von (<i>1S,2R,3R,4S</i>)-1-Azido-konduritol B (+)- 74	212
4.2.2.4	Darstellung von (<i>1S,2R,3R,4S</i>)-2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-1-azido-konduritol-B (+)- 55	214
4.2.2.5	Darstellung von 3,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy-6-azido- <i>myo</i> -inositol (-)- 57 bzw. 4,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-3-desoxy-3-azido- <i>myo</i> -inositol (+)- 58	216
4.2.2.6	Darstellung von 1,2,3,4,5-Penta- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy-6-azido- <i>myo</i> -inositol (+)- 75	220
4.2.2.7	Darstellung von 1,2,4,5,6-Penta- <i>O</i> -acetyl-3-desoxy-3-azido- <i>myo</i> -inositol (-)- 76	222
4.2.2.8	Darstellung von 6-Desoxy-6-azido- <i>myo</i> -inositol (-)- 77	224
4.2.2.9	Darstellung von 3-Desoxy-3-azido- <i>myo</i> -inositol (+)- 78	226
4.2.2.10	Darstellung von 6-Desoxy-6-amino- <i>myo</i> -inositol (+)- 79	228
4.2.2.11	Darstellung von 3-Desoxy-3-amino- <i>myo</i> -inositol (+)- 80	229
4.2.2.12	Darstellung von 3-Desoxy-3-amino- <i>myo</i> -inositol-1,2,4,5,6-pentakisphosphat (-)- 82	231
4.2.2.13	Darstellung von 6-Desoxy-6-amino- <i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)- 81	234
4.2.2.14	Darstellung von 6-Desoxy-6-acetamido- <i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)- 83	235
4.2.2.15	Darstellung von 3-Desoxy-3-acetamido- <i>myo</i> -inositol-1,2,4,5,6-pentakisphosphat (+)- 84	238
4.2.2.16	Darstellung von 6-Desoxy-6-hexansäure(6'-amino)-amido- <i>myo</i> -inositol- 1,2,3,4,5,-pentakisphosphat (-)- 88	240
4.2.2.17	Darstellung von 3-Amino- <i>myo</i> -Ins(1,2,6)P ₃ (-)- 90	242
4.2.2.18	Darstellung von (<i>1R,2S,3S,4R</i>)-1-Azido-2,3- <i>O</i> -isopropyl-konduritol B (-)- 254	243
4.2.2.19	Darstellung von (<i>1R,2S,3S,4R</i>)-1-Azido-2,3- <i>O</i> -isopropyl-4- <i>O</i> -(<i>p</i> -Methoxyphenyl)- carbamyl-konduritol-B - 255	245
4.3	Synthese der <i>myo</i> -Inositolphosphate	247
4.3.1	Synthese der <i>myo</i> -Inositolphosphate mittels symmetrischen Konzeptes	247
4.3.1.1	Darstellung der Zentralen Zwischenstufe 61	247
4.3.1.1.1	Synthese von (+)-1,4-Di- <i>O</i> -benzylkonduritol B 50	247
4.3.1.1.2	Synthese von (+)-2,3-Di- <i>O</i> -acetyl-1,4-di- <i>O</i> -benzylkonduritol B 51	249
4.3.1.1.3	Synthese von 4,5-Di- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol (+)- 53	251
4.3.1.1.4	Synthese von 2,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol (+)- 61	253
4.3.1.2	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(1)P und <i>myo</i> -Ins(3)P 11	255
4.3.1.2.1	Darstellung von 2,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-1- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo- 1,3,2-dioxaphosphhep-2-yl)- <i>myo</i> -inositol (+)- 93	255
4.3.1.2.2	Darstellung von <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat (-)- 11	257
4.3.1.3	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(2)P 96	260
4.3.1.3.1	Darstellung von 1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol (+)- 101	260

4.3.1.3.2	Darstellung von 1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-2- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol (+)- 102	261
4.3.1.3.3	Darstellung von <i>myo</i> -Inositol-2-phosphat 96	264
4.3.1.4	Darstellung der Trisphosphate <i>myo</i> -Ins(2,3,6)P ₃ 105	265
4.3.1.4.1	Darstellung von 1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol (+)- 103	265
4.3.1.4.2	Darstellung von 1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tris- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol (+)- 104	266
4.3.1.4.3	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(2,3,6)P ₃ (+)- 105	268
4.3.1.5	Darstellung der <i>myo</i> -Inositolbisphosphate.....	270
4.3.1.5.1	Darstellung von 4,5-Di- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-1,2-bis- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol (+)- 110	270
4.3.1.5.2	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(1,2)P ₂ (-)- 111	272
4.3.1.5.3	Darstellung von 1,2,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol (+)- 106	274
4.3.1.5.4	Darstellung von 1,2,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-3,6-bis- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol (+)- 107	276
4.3.1.5.5	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(3,6)P ₂ (+)- 17	278
4.3.1.5.6	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1,4-Di- <i>O</i> -benzyl-2,3-bis- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)-konduritol B (+)- 108	281
4.3.1.5.7	Darstellung von 3,6-Di- <i>O</i> -benzyl-4,5-bis- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol (+)- 109	283
4.3.1.5.8	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(4,5)P ₂ (+)- 16	285
4.3.2	Desymmetrisierender Weg zur Darstellung von <i>myo</i> -Inositolphosphaten	287
4.3.2.1	Darstellung von (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-Benzyloxy-2-brom-cyclohex-4-en-1,3-diol, (+)- 91	287
4.3.2.2	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -Benzyl-konduritol F (-)- 117	289
4.3.2.3	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1- <i>O</i> -Benzyl-konduritol B (+)- 112	291
4.3.2.4	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -benzyl-konduritol B (+)- 56	294
4.3.2.5	Darstellung von 1,2,3,4,5-Penta- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -benzyl- <i>myo</i> -inositol (+)- 59 und 1,2,4,5,6-Penta- <i>O</i> -acetyl-3- <i>O</i> -benzyl- <i>myo</i> -inositol (+)- 60	296
4.3.2.6	Darstellung von 3- <i>O</i> -Benzyl- <i>myo</i> -Inositol (+)- 119	300
4.3.2.7	Darstellung von 6- <i>O</i> -Benzyl- <i>myo</i> -Inositol (-)- 118	302
4.3.2.8	Darstellung von <i>myo</i> -Inositol-1,2,4,5,6-pentakisphosphat (-)- 29 und <i>myo</i> -Inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)- 31	304
4.3.2.9	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1- <i>O</i> -Benzyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)-konduritol B (+)- 256	309
4.3.2.10	Darstellung von 1,2,3,4,5-Penta- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)- <i>myo</i> -inositol (+)- 123	311
4.3.2.11	Darstellung von <i>myo</i> -Inositol-6-phosphat (-)- 15	313
4.3.2.12	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(1,3,4,5)P ₄ (-)- 24	315
4.4	Darstellung von Inositolisomeren	318
4.4.1	Darstellung von <i>neo</i> -, <i>D</i> - <i>chiro</i> -, <i>L</i> - <i>chiro</i> -, <i>scyllo</i> - und <i>allo</i> -Inositol	318
4.4.1.1	Darstellung von 1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -acetyl-konduritol-E (+)- 153	318
4.4.1.2	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1,2,4-Triacetoxy-3-bromcyclohex-5-en (+)- 157	320
4.4.1.3	Darstellung von (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-1,6-Epoxy-2,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan (+)- 158	322
4.4.1.4	Darstellung von 2,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl- <i>neo</i> -Inositol (+)- 159	324
4.4.1.5	Darstellung von Hexa- <i>O</i> -acetyl- <i>neo</i> -inositol 160	326
4.4.1.6	Darstellung von <i>neo</i> -Inositol 3	327
4.4.1.7	Darstellung von Hexa- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)- <i>neo</i> -inositol 161a	329
4.4.1.8	Darstellung von <i>neo</i> -Inositolhexakisphosphat 161	329
4.4.1.9	Darstellung von <i>D</i> - <i>neo</i> -Ins(1,2,5,6)P ₄ (-)- 173	331
4.4.1.10	Darstellung von 2,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -benzyl- <i>D</i> - <i>neo</i> -inositol (-)- 174	332
4.4.1.11	Darstellung von 1- <i>O</i> -Benzyl- <i>D</i> - <i>neo</i> -inositol (-)- 176	333
4.4.1.12	Darstellung von <i>D</i> - <i>neo</i> -Ins(2,3,4,5,6)P ₅ (+)- 172	334
4.4.1.13	Darstellung von 3,4,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- <i>allo</i> -inositol (+)- 162	336
4.4.1.14	Darstellung von <i>allo</i> -Inositol 9	338
4.4.1.15	Darstellung von <i>allo</i> -Inositolhexakisphosphat 163	339
4.4.1.16	Synthese von (3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-4-Brom-5-hydroxy-3 <i>a</i> ,4,5,7 <i>a</i> -tetrahydro-benzo[1,3]dioxol-2-on [(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-Brom-1,2-carbonat-konduritol C] (-)- 141	341
4.4.1.17	Synthese von (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-Brom-konduritol C (-)- 142	343
4.4.1.18	Synthese von (3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-4-Brom-2,2-dimethyl-5-hydroxy-3 <i>a</i> ,4,5,7 <i>a</i> -tetrahydro-benzo[1,3] dioxol [(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-Brom-1,2-isopropylidyl-konduritol C] (-)- 143	344

4.4.1.19	Synthese von (3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-Essigsäure-4-brom-2,2-dimethyl-3 <i>a</i> ,4,5,7 <i>a</i> -tetrahydro-benzo[1,3] dioxol-5-yl ester [(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4- <i>O</i> -Acetyl-3-brom-1,2-isopropylidyl-konduritol C] (-)- 144	346
4.4.1.20	Synthese von 1-Brom-2,3- <i>O</i> -isopropyl-4,5,6-tri- <i>O</i> -acetyl-D- <i>neo</i> -inositol 145	347
4.4.1.21	Darstellung von 2,3-Anhydro-1,4-di- <i>O</i> -benzyl- <i>myo</i> -inositol (-)- 133	349
4.4.1.22	Darstellung von 2,5-Di- <i>O</i> -benzyl-L- <i>chiro</i> -inositol (-)- 134	351
4.4.1.23	Darstellung von L- <i>chiro</i> -Inositol (-)- 4	353
4.4.1.24	Darstellung von L- <i>chiro</i> -Inositolhexakisphosphat (-)- 135	354
4.4.1.25	Darstellung von L- <i>chiro</i> -Ins(1,2,3,5,6)P ₅ (-)- 177 und L- <i>chiro</i> -Ins(1,2,3,6)P ₄ (-)- 178	357
4.4.1.26	Darstellung von (+)-2,5-Di- <i>O</i> -benzyl-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)-D- <i>chiro</i> -inositol 136	360
4.4.1.27	Darstellung von D- <i>chiro</i> -Ins(1,3,4,6)P ₄ (+)- 137	361
4.4.1.28	Darstellung von 1,2-Anhydro-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-4,5-di- <i>O</i> -isopropyl- <i>myo</i> -inositol 138	363
4.4.1.29	1- <i>O</i> -Allyl-2,5-di- <i>O</i> -benzyl- <i>scyllo</i> -inositol 139	364
4.4.1.30	<i>scyllo</i> -Inositol 5	365
4.4.1.31	<i>scyllo</i> -Inositolhexakisphosphat 140	366
4.4.2	Synthese von <i>epi</i> -Ins Derivate ausgehend von (+)- 43	368
4.4.2.1	Synthese von 4,5-Didesoxy-4,5-dibrom-3,6-di- <i>O</i> -acetyl-D- <i>myo</i> -inositol (-)- 164	368
4.4.2.2	Synthese von 4,5-Didesoxy-4,5-dibrom-2,3,6-tri- <i>O</i> -acetyl-D- <i>myo</i> -inositol (-)- 168	370
4.4.2.3	Darstellung von (-)-(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1,2,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-konduritol C 169	372
4.4.2.4	Darstellung von (-)-(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1,2,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)-konduritol C 170	374
4.4.2.5	Darstellung von (+)-2,3,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-1,4,5-tris- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)-D- <i>epi</i> -inositol 171	376
4.4.2.6	Darstellung von D- <i>epi</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat (+)- 12	379
4.4.2.7	Synthese von 4,5-Didesoxy-4,5-dibrom-1,2,3,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-D- <i>myo</i> -inositol (-)- 165	380
4.4.2.8	Synthese von (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -acetyl-konduritol C (-)- 166	382
4.4.2.9	Darstellung von Hexa- <i>O</i> -acetyl- <i>epi</i> -inositol 167	384
4.4.2.10	Darstellung von <i>epi</i> -Inositol 8	386
4.5	Darstellung der Konduritol F Analoga	389
4.5.1	Darstellung von (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-1- <i>O</i> -Benzyl-konduritol F (+)- 179	389
4.5.2	Darstellung von (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-Cyclohexan-1,2,3,4-tetraol (+)- 180	391
4.6	Synthese von Mycothiol (+)- 38a	393
4.6.1	Synthese der Glycosyl-Donoren mittels Azidonitratisierung und anschließende Aktivierung ...	393
4.6.1.1	Synthese von 3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-gluco(manno)pyranosylnitrat 207	393
4.6.1.2	Synthese von 3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-gluco(manno)pyranose 208	394
4.6.1.3	Synthese von <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-gluco(manno)pyranosyl)-trichloracetimidat 211 , 212 und <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat 213	396
4.6.2	Glycosilierungen und anschließende peptidische Verknüpfungen:	399
4.6.2.1	Synthese von (+)- <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-gluco(manno)pyranosyl)-(1 \rightarrow 1)-(2,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol) 214	399
4.6.2.2	Synthese von (+)- <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-amino-2-desoxy- α -D-gluco(manno)pyranosyl)-(1 \rightarrow 1)-(2,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-D- <i>myo</i> -inositol); Hydrochlorid 224	401
4.6.2.3	Synthese von <i>O</i> -(2-Amino-2-desoxy- α -D-gluco(manno)pyranosyl)-(1 \rightarrow 1)-(D- <i>myo</i> -inositol); Hydrochlorid (+)- 199	402
4.6.2.4	Synthese von <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 1)-(2,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol) 217	404
4.6.2.5	Synthese von <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-gluco(manno)pyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-(2,5,6-tri- <i>O</i> -acetyl-1,4-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol) (+)- 215	405
4.6.2.6	Synthese von <i>O</i> -(2-Amino-2-desoxy- α -D-gluco(manno)pyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-(D- <i>myo</i> -inositol); Hydrochlorid (+)- 216	406
4.6.2.7	<i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-(<i>N</i> -Acetyl-S-Benzyl-L/D-cysteinyl)amido-2-desoxy- α -D-gluco(manno)pyranosyl)-(1 \rightarrow 1)-(2,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol) 219 und 220	408
4.6.2.8	Synthese <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-(<i>N</i> -Z-S-Benzyl-L-cysteinyl)amido-2-desoxy- α -D-gluco(manno)pyranosyl)-(1 \rightarrow 1)-(2,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl-D- <i>myo</i> -inositol) (-)- 223	411
4.6.2.9	Darstellung von Mycothiol als Disulfid 38a	413

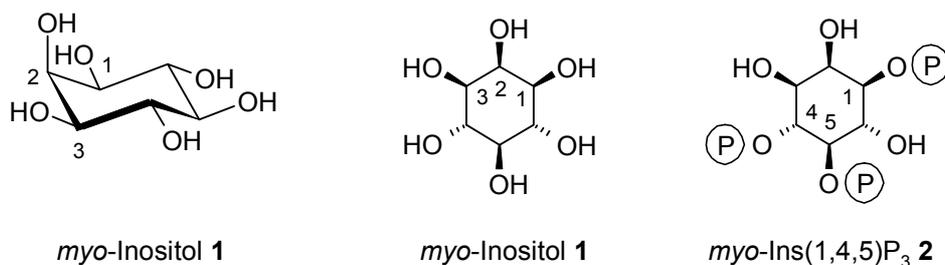
4.7	Darstellungen von Carbazuckern	416
4.7.1	Darstellung von geschützten 1- <i>epi</i> -Valienol-1-phosphat 242	416
4.7.1.1	Darstellung von 2,3-4,7-Di- <i>O</i> -Isopropyl-1- <i>epi</i> -Valienol 238	416
4.7.1.2	Darstellung von 2,3-4,7-Di- <i>O</i> -Isopropyl-1- <i>O</i> -(2-oxo-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphep-2-yl)-1- <i>epi</i> -Valienol 242	417
4.7.2	Synthese von Carbazuckern mittels Hydroformylierung	419
4.7.2.1	Darstellung von 1,4-Di- <i>O</i> -benzyl- β -D-carbaglucose-7-aldehyd (+)- 246	419
4.7.2.2	Darstellung von 1,4-Di- <i>O</i> -benzyl- β -D-carbaglucose (+)- 248	421
4.7.2.3	Darstellung von 1,4-Di- <i>O</i> -benzyl-2,3,7-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-carbaglucose 257	422
4.7.2.4	Darstellung von β -D-Carbaglucose (+)- 249	423
4.7.2.5	Darstellung von 1,4-Di- <i>O</i> -benzyl-2,3-di- <i>O</i> -acetyl- β -L-Carbaglucose-7-aldehyd (+)- 250	424
4.8	Abkürzungsverzeichnis	426
5	Verbindungsverzeichnis	429
6	Literaturverzeichnis	443

1 Einleitung

Inositole [griech. Inos: *Muskel*, daraus isoliert] und ihre Derivate sind Hexahydroxycyclohexane, welche eine wichtige Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse spielen.^{1,2,3} Diese sind, in ihrer freien und in ihrer polyphosphorylierten Form, in nahezu jedem Organismus zu finden und nehmen vielfältige Aufgaben wahr. Inositolphosphate sind in der Humuserde die dominierende Klasse an organischem Phosphat, mit einer Konzentration von bis zu 0.5 mg pro Gramm Bodenprobe.⁴ Inositolphosphate können ebenfalls im Wasser in großer Menge nachgewiesen werden, wo sie z. B. das Wachstum von toxinproduzierenden Cyanobakterien steuern.⁵ Sie lassen sich in nahezu allen Lebensformen, in Konzentrationen von einigen Milligramm je Kilogramm Lebendgewicht, nachweisen.

Insbesondere die Phosphate des ubiquitären *myo*-Inositol **1** (Abk.: *myo*-InsP_x) stehen für eine große Familie an natürlich vorkommenden Verbindungen, welche in den letzten zwei Dekaden intensiv untersucht wurden.

Abbildung 1: Sesselschreibweise und planare Darstellung von *myo*-Inositol (*myo*-Ins) **1** sowie *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2**

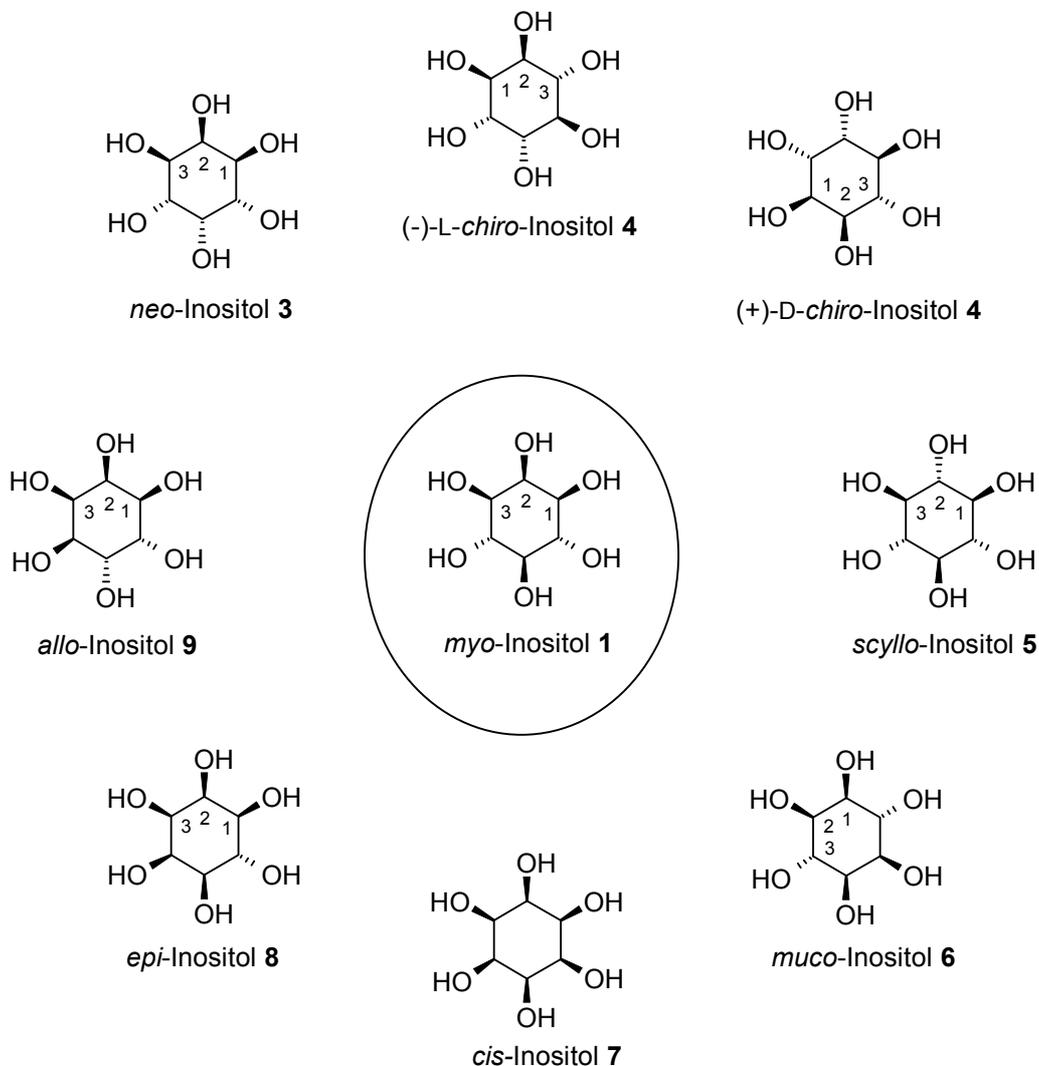


In ihrer Entdeckungsgeschichte ist das Jahr 1983 von besonderer Bedeutung. Schulz und Berridge gelang damals der Nachweis, daß *myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat (Abkürzung: *myo*-Ins(1,4,5)P₃) **2** wesentlich an der Regulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration beteiligt ist.⁶ *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** ist ein calciummobilisierender intrazellulärer Botenstoff (engl.: second messenger), der eine bedeutende Rolle in der Signaltransduktion und der Homeostase spielt.^{7,8,9}

Der Grundkörper der Inositele basiert auf der allgemeinen Summenformel $C_6H_6(OH)_6$. Je nach Stereoisomerie der Hydroxygruppen unterscheidet man neun Isomere, von denen fünf (*myo*-, *scyllo*-, *neo*-, *D-chiro*-, *L-chiro*-) in Organismen nachgewiesen werden konnten. Die restlichen vier Stereoisomere (*epi*-, *allo*-, *cis*-, *muco*-) sind unnatürliche, synthetische Produkte.

Sieben dieser Isomere besitzen eine Spiegelebene und sind somit optisch inaktive *meso*-Verbindungen. Lediglich das *chiro*-Inositol **4** kommt in zwei enantiomerenreinen Formen vor (Vorsilbe analog der Kohlenhydrate: D- und L-).

Abbildung 2: Stereoisomere Inositele



Zahlen geben die Nummerierung der einzelnen Positionen an (nach IUPAC)^{10,11}

Zur Vertiefung soll im folgenden Abschnitt auf die einzelnen Stereoisomere näher eingegangen werden.

Nahezu alle dieser Isomere treten in freier oder in derivatisierter Form in der Natur auf. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist *myo*-Inositol **1** die zentrale Vorstufe aller anderen Isomere. Es geht biosynthetisch aus der Umwandlung von D-Glucose-6-phosphat **10** in D-*myo*-Inositol-3-phosphat (+)-**11** (D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase, siehe auch Abbildung 3) und anschließender Dephosphorylierung hervor. Das gebildete *myo*-Inositol **1** kann durch Epimerisierungs-Reaktionen in andere, natürlich auftretende Isomere überführt werden.¹² Die vom ubiquitären *myo*-Inositol abgeleiteten *myo*-Inositolphosphate und Phosphoinositide besitzen herausragende biologische Bedeutung, aber es liegen nur wenige Informationen über die Relevanz von anderen Inositol-Stereoisomeren und ihren Derivaten vor. Nachgewiesen wurden geringe Konzentrationen von *scyllo*- **5**, *chiro*- **4** und *neo*-Inositol **3** in Gewebeproben von Säugetieren. Untersuchungen von Bodenproben belegen, daß die darin enthaltenen Hexakis- und Pentakisphosphate weit größere Mengen an Inositolisomeren aufweisen als lange Zeit angenommen. So kommt das *myo*-Isomer lediglich zu 65% vor, während das *scyllo*-Isomer mit bis zu 25%, das *neo*-Isomer mit ca. 7% sowie das *chiro*-Isomer mit bis zu 10% vorliegt.¹³

Im Gegensatz zu den Inositolphosphaten können die ungeladenen Inositol-Stereoisomere aktiv (z.B. über Transporter) oder passiv von Zellen aufgenommen werden und stellen daher einen attraktiven Ansatzpunkt für die Entwicklung potentieller Wirkstoffe und neuer therapeutischer Ansätze dar. Inositol-Isomere können die Blut-Hirn-Schranke passieren. Über die Möglichkeit der Verwendung von *epi*-Inositol **8** und *scyllo*-Inositol **5** zur Abschwächung neurotoxischer Effekte bei Alzheimer wurde bereits berichtet.¹⁴

neo-Inositol **3**: Dieses Stereoisomer wurde zuerst im Jahre 1955 von Angyal und Matheson erwähnt und beschrieben und war als Nebenprodukt bei der Synthese von L-*chiro*-Inositol aus 1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden-L-*chiro*-inositol isoliert worden.¹⁵ Zudem konnte es aus Humus als das Hexakisphosphat isoliert werden,¹⁶ wo es vergesellschaftet mit *myo*- und *scyllo*-Inositolhexakisphosphate vorliegt. Außerdem wurde *neo*-Inositol in reiner Form in *Croton celtidifolius*,¹⁷ einer Pflanze, die in der traditionellen brasilianischen Medizin verwendet wird, gefunden.¹⁸ Es konnte gezeigt werden, daß *Entamoeba histolytica*, ein Darmparasit, hohe Konzentrationen an verschiedenen *neo*-Inositolpolyphosphaten aufweist.¹⁹ L-*neo*-Inositol-1-phosphat wurde in mikromolarer Konzentration im Hirn, Herz, Hoden und Milz von Ratten nachgewiesen.¹⁸ Untersuchungen zur Strukturaufklärung, insbesondere im

Hinblick auf das gute Kristallisationsverhalten,²⁰ folgten. Eine der wenigen Darstellungsmethoden in der Literatur wird von Hudlicky et al. berichtet.³⁴ Dabei wird von Brombenzol ausgegangen und über enzymatische Hydroxylierung in sieben Schritten *neo*-Inositol erhalten.

D-chiro- and *L-chiro*-Inositol **4**: Kürzlich konnte aufgezeigt werden, daß Derivate von *chiro*-Inositol viele interessante biologische Prozesse vermitteln. Beispielsweise übt D-Pinitol (3-*O*-Methyl-*D-chiro*-inositol), eine aktive Komponente der traditionellen antidiabetischen Pflanze *Bougainvillea spectabilis*, insulinähnliche Effekte aus.²¹ Die Phosphoinositolglykane (IPGs) in Rattenleber, welche als Antwort auf Insulinstimulation gebildet werden, enthalten ausschließlich oder überwiegend *chiro*-Inositol.^{22,23} Ebenfalls konnte *D-chiro*-Inositol im Urinsekret von Rhesusaffen und Menschen, die eine beeinträchtigte Glucosetoleranz, eine Insulin Resistenz oder Typ 2 Diabetis mellitus aufweisen, beobachtet werden.²⁴

allo-Inositol **9**: Erstmals konnte dieses nicht-natürliche Cyclitol 1939 von Dangschat and Fischer synthetisiert werden.²⁵ Es folgten vor allem in den letzten Jahren weitere Synthesen.²⁶

epi-Inositol **8**: Shaldubina und Mitarbeiter konnten aufzeigen, daß *epi*-Inositol, ebenfalls ein nicht-natürliches Epimer, das Potential besitzt, die Expression des Hefegens *INO1*, welches die Inositol-3-P Synthase kodiert, zu regulieren.²⁷ Infolgedessen ist *epi*-Inositol biologisch aktiv und besitzt die Fähigkeit, die Regulation des *myo*-Inositol Biosyntheseweges zu beeinflussen. Wie bereits oben erwähnt, ist *myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat [*myo*-Ins(1,4,5)P₃] **2** ein intrazellulärer „second messenger“.²⁸ Die Bindung von *myo*-Ins(1,4,5)P₃ an seinen Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor im Endoplasmatischen Retikulum [Endoplasmatischen Retikulumrezeptor (ERR)] induziert die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Basierend auf der verwandten Struktur von *epi*-Ins(1,4,5)P₃ **12** könnte das eine ebenfalls hohe Affinität zu genanntem Rezeptor besitzen. Belmaker et al. konnte zudem aufzeigen, daß freies *epi*-Inositol ein potentiell Antidepressivum ist, eine Beobachtung die zur Zeit in einer präklinischen Studie weiter untersucht wird.²⁹

scyllo-Inositol **5**: Dieses Stereoisomer kann in Tieren und Pflanzen nachgewiesen werden.³⁰ Es wird diskutiert, daß eine Verbindung zwischen bestimmten Krankheiten des Menschen und der Verringerung der *scyllo*-Inositol Konzentration besteht.³¹

cis-Inositol **7**: Besitzt in beiden Sesselkonformationen drei *syn*-axiale Hydroxygruppen und bildet deshalb mit Metallkationen äußerst starke Komplexe.^{32,33}

Aufgrund der Tatsache, daß die Konzentration von *myo*-Inositolphosphaten in den Zellen gering ist und ein schneller Stoffwechsel erfolgt, ist die Entwicklung praktischer Synthesen der Inositolphosphate eine Grundvoraussetzung für weitere biologische Untersuchungen. Ein wichtiger Ansatz um ein besseres Verständnis über die enzymatischen Mechanismen und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erhalten, ist die Untersuchung von ausgewählten Stereoisomeren, an denen gezielte Stereozentren invertiert sind. Die Entwicklung von synthetischen Routen der Isomere dürfte somit die Forschung vereinfachen.³⁴ Aus diesem Grunde existiert seit einigen Jahren ein wachsender Bedarf an praktischen und effektiven Synthesen zur Darstellung von *myo*-Inositolen sowie deren Stereoisomeren und Analoga. Überdies hinaus konnten in den letzten Jahren einige Inositolisomere in der Natur nachgewiesen werden, deren biologische Funktionen aber bisher größtenteils unbekannt sind. Daher bietet die organische Synthese der neun Inositol-Isomere und ihrer Derivate einen sinnvollen Zugang, die das gesamte Potential dieser Verbindungen im Hinblick auf deren biologischer Wirksamkeit erforschen läßt. Eine gezielte Synthese ist bei enantiomerenreinen Polyolen, wie den stereoisomeren Inositolphosphaten, häufig sehr problematisch. Hierbei bedarf es zunächst einer praktikablen Schützung der einzelnen Hydroxygruppen, welche die Synthesesequenz stark verlängert. Außerdem liefert die Synthese von Inositolphosphaten ausgehend von achiralen Inositolen nur Racemate, die wiederum getrennt werden müssen. Viele Synthesen der Inositolisomere und ihrer Derivate starten entweder von enantiomerenreinen Naturprodukten, besonders Kohlenhydraten,³⁵ oder von günstigem *myo*-Inositol.^{36, 37, 38} Diese werden dann über stereospezifische Prozesse in die gewünschten Inositolisomere umgewandelt. Der Nachteil bei der Verwendung von *myo*-Inositol (*meso*-Verbindung) als Synthesebaustein liegt vor allem darin, daß auf einer späteren Stufe eine Racematspaltung erfolgen muß. *de novo* Konzepte basieren häufig auf mikrobieller Oxidation von Brombenzol³⁴ oder auf Generierung des Cyclohexenringes durch „Ring-Closing“ Olefin-Metathese^{39,40} und darauffolgende Funktionalisierung des erhaltenen Konduritols (5-Cyclohexen-1,2,3,4-tetrole).⁴¹ Solche Strategien bringen normalerweise aufgrund der schrittweisen Manipulation der Funktionalitäten lange Syntheserouten mit sich und führen generell nur zu einem Enantiomer. Eine asymmetrische *de novo* Synthese sollte die Flexibilität der Synthese beider Enantiomere bringen.

Die Phosphate des ubiquitären *myo*-Inositol (Abk.: *myo*-InsP_x)

Da *myo*-Inositol ein Cyclohexangerüst mit sechs Hydroxygruppen ist, können 63 verschieden stark phosphorylierte Inositolphosphate auftreten, vom *myo*-Inositol-1-phosphat bis hin zum sechsfach phosphoryliertem *myo*-InsP₆ (Phytinsäure) **13**. Untersuchungen zur biologischen Funktion ergaben, daß diese neben den Aufgaben zur Signalvermittlung auch gerade in ihrer Hexakisphosphat-Form einen effektiven Phosphatspeicher darstellen, welcher in der Keimungsphase von Pflanzen eine tragende Rolle spielt.⁴²

Niederphosphorylierte *myo*-Inositole sind bisher nur unzureichend erforscht, und ihre physiologische Rolle ist nur zum Teil aufgeklärt. *myo*-InsP₆ **13**, sowie das *myo*-Ins(1,3,4,5,6)P₅, beide Bestandteile aus Erythrocyten von Vögeln, sind potentielle allosterische Effektoren von Hämoglobin. Durch die bis zu 60-mal höhere Konzentration von *myo*-Ins(1,3,4,5,6)P₅ (3.2 µmol/ml Erythrocyt) gegenüber *myo*-InsP₆ **13** kann jedoch nur *myo*-Ins(1,3,4,5,6)P₅ die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins maßgeblich vermindern. Damit hat *myo*-Ins(1,3,4,5,6)P₅ eine ähnliche Bedeutung in der Atmungskette bei Vögeln, wie 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) für Säuger.⁴³

Das *myo*-Ins(1,2,6)P₃ ist ein Trisphosphat-Isomer mit breitem Wirkungsspektrum und fand Anwendung in dem Schmerz- und Entzündungshemmer „ α -TrinositolTM“ der Firma Perstorp Pharma.⁴⁴ *myo*-Ins(1,2,6)P₃ wirkt, wie auch die metabolische Vorstufe *myo*-InsP₆ **13**, als Antioxidans. Durch die Besetzung aller Koordinationsstellen am Fe³⁺-Ion besitzen die Verbindungen die Eigenschaft, die durch freies Fe³⁺ katalysierte Bildung von OH-Radikalen im Haber-Weiss-Zyklus effektiv zu unterdrücken.⁴⁵

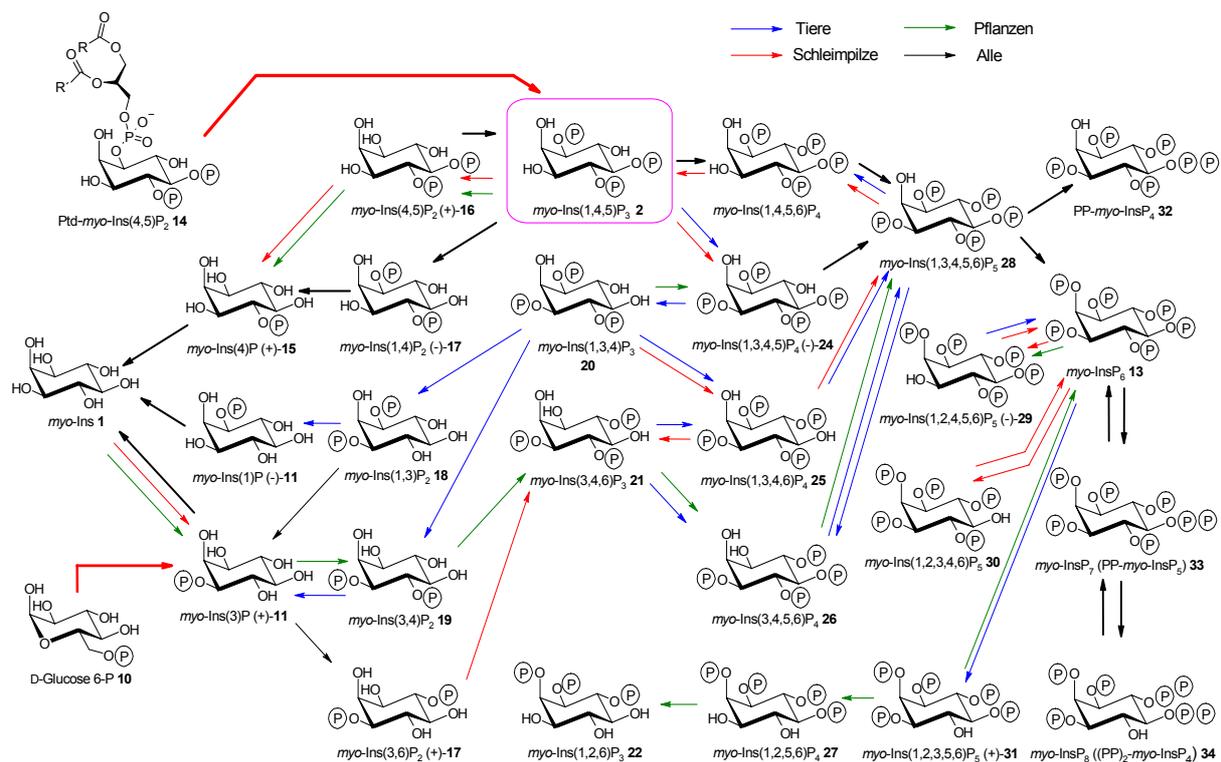
myo-Inositolphosphatstoffwechsel

Perzeption äußerer Reize und die Reaktion hierauf ist eine der grundlegenden Eigenschaften lebender Organismen. Ein Prinzip ist die Aufnahme von Signalen durch membranständige Rezeptorproteine, die chemische oder physikalische Reize auf der extrazellulären Seite der Membran spezifisch registrieren und in das Cytoplasma der Zelle weiterleiten. Zu diesen Transmembransensoren zählt neben Ionenkanal-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptoren mit eigener katalytischer Aktivität auch die große Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), welche die Plasmamembran mit sieben α -Helices durchspannen. Von den über 1000 bekannten GPCRs zählen Rhodopsin (Opsin) und der β_2 -adrenerge Rezeptor, der als

erster GPCRs isoliert wurden, zu den am besten charakterisierten⁴⁶ (weiterführende Informationen siehe Lit. 71).

Die primäre Antwort nach Agonistenstimulation ist in der Regel, die durch ein heterotrimeres G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (β -Form). Diese spaltet das in der Plasmamembran lokalisierte Phospholipid PtdIns(4,5)P₂ **14** in die „second-messenger“ Diacylglycerol (Abk.: DAG) und *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** (siehe links oben in Abbildung 3, roter Pfeil). DAG verbleibt als lipophiler Botenstoff in der Membran und aktiviert die Proteinkinase C, die in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen die Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threoninreste an Proteinen bewirkt. Die Rezeptorstimulation resultiert in vielen Fällen in einem transienten, etwa 10 bis 30 Sekunden dauernden Anstieg der *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** Konzentration.

Abbildung 3: Überblick über die Metabolismuswege der *myo*-Inositolphosphate



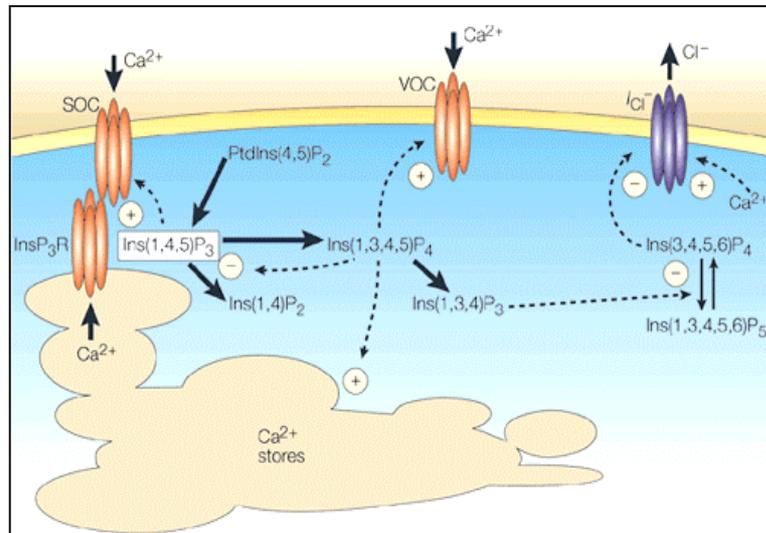
Quelle: Irvine und Schell (Nature Reviews 2001).⁹

Der hydrophile „second-messenger“ *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** diffundiert ins Cytosol und bindet spezifisch an einen Ca²⁺-Ionenkanal des endoplasmatischen Reticulums (*myo*-Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor) und bewirkt ebenfalls einen transienten Calciumausstoß aus diesen internen Calciumspeichern. Der Anstieg der Calciumionen-Konzentration reguliert unter Einbeziehung von Calmodulin eine Vielzahl grundlegender Zellfunktionen wie Sekretion und Kontraktion.⁴⁷ Die Wirkung des kurzlebigen „second-messengers“ *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** wird durch einen komplexen Metabolismus moduliert. Es konnte gezeigt werden, daß die Oszillation der Calciumionenkonzentration eher durch die Oszillation der *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** Konzentration als durch rein calciumbasierte Rückkopplungsmechanismen abläuft.⁴⁸

Der Hauptabbauweg von *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** bei tierischen Zellen ist die Dephosphorylierung durch die Inositolpolyphosphat 5-Phosphatase und es kommt zur Bildung von *myo*-Ins(1,4)P₂ (-)-**17**. Diese Reaktionen beendet die Ca²⁺-freisetzende Wirkung und es kommt zu einer Signaltermination. Die weitere Abspaltung einer Phosphatgruppe führt zum *myo*-Ins(4)P (+)-**15**. Letztlich wird das verbleibende Monophosphat über eine unspezifische Monophosphatase zu freiem *myo*-Inositol umgesetzt, welches dann zum Aufbau von PtdIns(4,5)P₂ **14** wieder zur Verfügung steht.

Alternativ kann es aber auch zu einer ATP-abhängigen Phosphorylierung von *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** durch die *myo*-Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase kommen. Das Produkt *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24** hat selber eine Vielzahl an biologischen Aufgaben und ist neben **2** das einzige Isomer, dessen Funktion bewiesen ist.

Vier Konsequenzen aus der Entstehung von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24** sind in Abbildung 4 dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung 4 ist ersichtlich wie *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24** die 5-Dephosphorylierung von *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** inhibiert. Dieses verstärkt die Freisetzung von Ca²⁺ durch *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2**.⁴⁹ In der Mitte der Abbildung ist sichtbar, daß *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24** einen direkten Einfluß auf die Ca²⁺-Kanäle in der Plasmamembran hat. Außerdem scheint es auch eine komplexe Rolle bei der durch *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** induzierten Ca²⁺-Freisetzung aus Ca²⁺-Speichern zu haben.^{50,51,52} Das rechts abgebildete *myo*-Ins(1,3,4)P₃, welches aus *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24** entsteht, inhibiert die 1-Kinase mit dem Ergebnis der Erhöhung der *myo*-Ins(3,4,5,6)P₄ Konzentration.^{53,54} Dies führt zu einer Abnahme des Chlorid-Stromes aus der Zelle.⁵⁵

Abbildung 4: Die Rolle von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24**

Quelle: Irvine und Schell (Nature Reviews 2001).⁹

Übersicht über die Auswirkung der *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24** Bildung. Wechselwirkungen (Aktivierung und Inhibierung) sind mit gestrichelten Linien und chemische Umsetzungen sind mit Pfeilen dargestellt. SOC: Lagerabhängiger Ca²⁺ Kanal (store-operated Ca²⁺ channel); VOC: Spannungsabhängiger Ca²⁺ Kanal (voltage-operated Ca²⁺ channel); InsP₃R: *myo*-Ins(1,4,5)P₄ **2** Rezeptor; I_{Cl}: Chloridkanal.

Eine ausführlichere Diskussion des weitverzweigten Metabolismus von *myo*-Inositolphosphaten erfolgt in den einzelnen Kapiteln der Durchführung bei den entsprechenden Synthesen. Dort wird explizit auf die jeweiligen Inositolphosphate eingegangen.

Zusammenfassend sind *myo*-Inositolphosphate an intrazellulären Signalübertragungen (*myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** als „second messenger“), wie der Regulation des Calciumgehaltes in der Zelle, beteiligt. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß das Vorkommen von Inositolen in fetalem Gewebe besonders hoch ist.⁵⁶ Diese Tatsache gibt einen ersten Hinweis auf den Einfluß von Inositolen beim Zellwachstum. Studien an Inositolen und Inositolsystemen und deren Beteiligung an biologischen Vorgängen gehören mit zu den Schwerpunkten der heutigen Forschung im Grenzgebiet der organischen Synthese, der Biochemie und der Medizin.

Azido-/Amino-Analoga von *myo*-Inositol und *myo*-Inositolpolyphosphat

Die *myo*-Inositolstoffwechselwege sind ein attraktives Ziel für das Eingreifen in die Kontrolle von Zellwachstum und Proliferation.^{8,9} Seit der Entdeckung im Jahre 1983,^{6,28} daß D-*myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat **2** beteiligt ist an der Signaltransduktion als Ca²⁺-mobilisierender „second messenger“, existiert ein wachsendes Interesse an der Synthese von Analoga.

Legler konnte erstmals belegen, daß freie und konjugierte Amino-Derivate von *myo*-Inositol Glycosidaseinhibitoren sind und eine antibiotische Wirkung besitzen.⁵⁷ Lehman und Mitarbeiter konnten zudem aufzeigen, daß racemisches Diamino-konduritol B (Zwischenstufe bei unserem *de novo* Konzept zur Synthese der Azido-/Amino-*myo*-inositolphosphate) nach β -D-Galactosylierung zu Pseudodisacchariden ein kompetitiver Inhibitor der β -D-Galactosidase aus *Escherichia coli*, mit einem K_i Wert von 5.5 mM, ist. Der Grund für die Enzymresistenz gegenüber der β -D-Galactosidase liegt vor allem in der Konkurrenz der NH₂ Gruppe um das für die Hydrolyse erforderliche aktivierende Proton.⁵⁸ Die Wirkung von freien und konjugierten Aminoinositolen in antibiotischen Prozessen kann somit vermutlich über deren effektive enzyminhibierende Aktivität auf Glykosidasen erklärt werden.

Wesentlich interessanter jedoch sind die Azido-*myo*-inositole aufgrund ihres großen Potentials als bioaktive Substanz durch antiproliferative Aktivität bei Tumorzellen (Fibroblasten).⁵⁹ Es gilt als sicher, daß Azido- und Amino-Derivate, die an der 3-Position substituiert sind, durch Zellen aufgenommen werden und in Abwesenheit von physiologischen *myo*-Inositol selektiv das Zellwachstum inhibieren.⁶⁰

Diese Effekte können dadurch erklärt werden, daß Azido- und Amino-*myo*-inositole als Substrate der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase dienen und somit mit der Signalkaskade interagieren. Kozikowski konnte zusätzlich aufzeigen, daß tritiiertes 3-Azido-*myo*-inositol in zelluläre Phosphatidylinositole von v-sis NIH 3T3 Zellen eingebaut wird.^{59a} Diese Verbindungen haben Einfluß auf physiologische Prozesse in der Zelle indem sie mit den spezifischen Wegen interagieren. Dies läßt den Schluß zu, daß einige Azido- und Amino-*myo*-inositolderivate zur Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe gegen Krebs und anderen Krankheiten, in denen die zelluläre Wachstumsregulation gestört ist, führen können.⁶⁰

Darüber hinaus dürften Amino- und Azido-*myo*-inositolphosphate bei unserer fortgeführten Untersuchungen der Regiospezifität von Phosphohydrolasen behilflich sein.⁶¹ Solche Verbindungen sind wertvolle Werkzeuge, um die Substrat-Aktivitäts-Beziehung der Dephosphorylierung bei Phytasen und anderen Phosphohydrolasen aufzuklären.

Amino-*myo*-inositolphosphate dürften auch gute Liganden für die Affinitätschromatographie sein. Dies könnte bei der Isolierung von *myo*-Inositolpentakisphosphat bindenden Enzymen von großer Bedeutung sein.

Bisher sind nur wenige Synthesen von Amino- oder Azido-*myo*-inositolen publiziert worden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß ausgehend von chiralen Ausgangsmaterialien aus dem *chiral pool* wie D-Quebrachitol⁶² nur eine sehr limitierte Anzahl an Stereoisomeren zugänglich ist. Die Verwendung von *myo*-Inositol als sehr günstiges Ausgangsmaterial benötigt die Einführung der Stickstoff enthaltenen Gruppe entweder unter Retention oder über doppelte Inversion des spezifischen Stereozentrums.⁶³ Alternativ wurde aufgezeigt, daß zwei separate Inversionen einer *cis*-Dioleinheit zum Wiedererhalt der *myo*-Konformation genutzt werden konnte.⁶⁴ Überdies muß nicht chirales Ausgangsmaterial zuerst in die enantiomerenreine Form überführt werden. Diese Probleme, die synthetisch schwierig sind, können durch einen *de novo* Zugang umgangen werden. Ausgehend von *p*-Benzochinon erhält man zuerst Azido-Konduritolderivate. Diese Synthesestufen können nicht nur zur Synthese von *myo*-Inositolanaloga genutzt werden, sondern sind potentielle Vorstufen für die Synthese von Verbindungen, die bei der Aufklärung der Biosynthese von Aminoglycosiden, wie Butirosin,^{65,66} Minosaminomycin⁶⁷ und Streptomycin⁶⁸ hilfreich sein können.

Weitere natürlich vorkommende komplexere Inositolverbindungen:

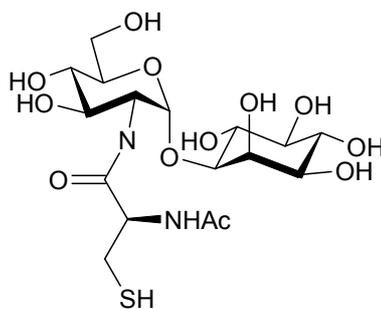
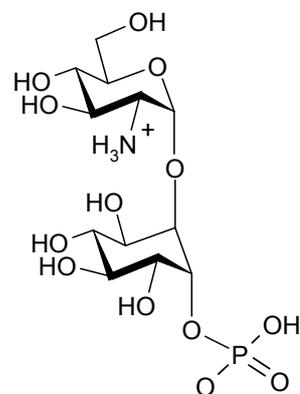
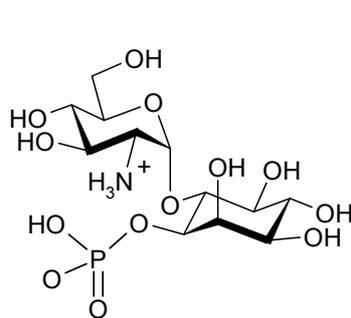
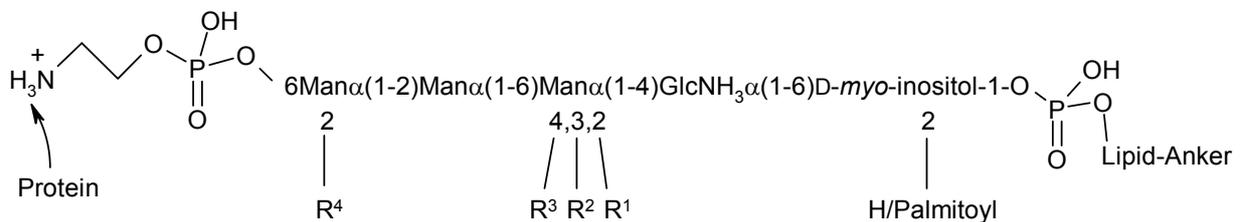
Vorkommen und Potential von Mycothiol (38) - ein GSH-Analogon auf Inositolbasis

Inositole sind Bestandteile einer großen Anzahl an biologisch aktiven Verbindungen. Neben den oben erwähnten Phosphatidylinositolphosphaten konnten in den letzten Jahren viele weitere Verbindungen auf Inositolbasis isoliert werden. Vor allem wurden Verbindungen isoliert, bei denen Inositole glycosidisch mit Kohlenhydraten verknüpft sind. Darunter fallen die Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker **35**, die zu einer Klasse an natürlich vorkommenden Glycolipiden gehören, welche Proteine über den C-Terminus an die Membran binden. Vermutlich führt die enzymatische Spaltung der Glycosylphosphatidylinositole **35** zur Bildung der Inositolphosphoglycan (IPGs) Mediatoren. Es wird postuliert, daß dies eine neue intrazelluläre Signaltransduktion einleitet. Man unterteilt die IPGs in die Familie der *myo*-Inositol enthaltenden IPGs (Typ-A IPGs) **36** und die Familie der *chiro*-Inositol enthaltenden IPGs (Typ-P IPGs) **37**. So werden die Inositolphosphoglycane (IPGs) mit

chiro-Inositol als Komponente **37** als Mediatoren der Insulin-Wirkung diskutiert.²³ Die Rolle der IPGs als Insulin-second messenger beruht auf der Tatsache, daß die IPGs die Fähigkeit besitzen, die Aktivität einer Vielzahl an Enzymen zu modulieren, wie der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Zell-Proteinen, der Protein-Synthese und Gen-Expression, dem Lipidmetabolismus und der Stimulation des Zellwachstums.^{23,69,70}

Die auf *myo*-Inositol basierende Verbindung **38** mit dem Trivialnamen Mycothiol (Mycothiol als Disulfid dimer **38a** nicht abgebildet) wird in zahlreichen Actinomyceten gefunden und hat eine dem Glutathion analoge Funktion. Die Synthese von Mycothiol und Mimetika eröffnet die Möglichkeit, neue, hochspezifische Antibiotika zu finden.

Abbildung 5: Inositol enthaltende Biomoleküle

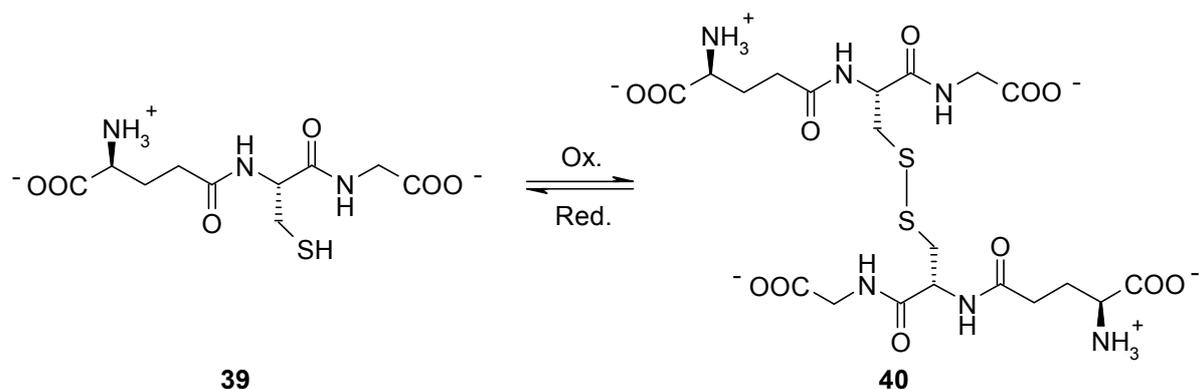


Im Folgenden soll auf die Grundlagen zur Erforschung von Mycothiol (+)-**38** näher eingegangen werden.

Zum Schutz gegen „reactive oxygen species“ (engl.: ROS) und andere Radikale enthalten alle Zellen Antioxidantien. Diese sind Reduktionsmittel, die leicht mit oxidierenden Substanzen reagieren und dadurch wichtige Moleküle vor Oxidation schützen. Zu den biologischen Antioxidantien gehören die Vitamine C und E, Coenzym Q und einige Carotinoide. Besonders niedermolekulare Thiole dienen als Träger von Reduktionsäquivalenten zum Erhalt einer stabilen intrazellulären Redoxumgebung. Eukaryotische und prokaryotische Zellen sind permanent einem oxidativen Streß durch atmosphärischen Sauerstoff und metabolischen Nebenprodukten unterworfen. Dabei sorgen Thiole dafür, daß diese Nebenprodukte abgebaut werden und damit die Zelle vor dem sicheren Zelltod bewahrt wird. Zusätzlich zu diesen Aufgaben sind niedermolekulare Thiole in zellulären Prozessen, wie etwa der DNA-Synthese und der Formaldehyd-Reduktion, beteiligt.⁷¹

Von besonderer Bedeutung ist das Glutathion, ein Tripeptid mit freier SH-Gruppe (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH, **39**). Die reduzierte Form des Glutathions dient als Sulfhydrylpuffer, der die Cysteinreste im Hämoglobin und anderen Erythrocytenproteinen in reduziertem Zustand hält und darüber hinaus auch am Transport der Aminosäuren beteiligt ist. Das Glutathion kommt in tierischen Zellen in hohen Konzentrationen bis zu 5 mM vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung, indem es mit Wasserstoffperoxyd und organischen Peroxyden, den schädlichen Nebenprodukten der aeroben Lebensweise, reagiert. Katalysiert wird diese Redoxreaktion von der Glutathion-Peroxidase. Darüber hinaus ist das reduzierte Glutathion notwendig, um den zweiwertigen Zustand des Eisens im Hämoglobin aufrechtzuerhalten.

Abbildung 6: Oxidation von Glutathion zu Glutathiondisulfid



Die Regeneration des Glutathions wird durch die Glutathion-Reduktase katalysiert, wobei Elektronen mittels FAD von NADPH auf die oxidierte Form des Glutathion (GSSG), das Glutathiondisulfid **40**, übertragen werden. Das Verhältnis zwischen Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSH) beträgt normalerweise 500:1.

Die ubiquitäre Funktion des Glutathions als Antioxidans unter lebenden Organismen war lange Zeit unumstritten. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, daß bei den Prokaryoten lediglich Cyanobakterien und Purpurbakterien Glutathion besitzen.^{72, 73, 74} Die meisten Bakterien, inklusive vieler strikt aerob lebender Spezies, die kein Glutathion aufweisen, synthetisieren andere niedermolekulare Thiole. Eine aerobe Untergruppe der Halobakterien, die Archaeobakterien, besitzen anstelle GSH γ -Glutamylcystein.⁷⁵ Dazu finden sich in einigen Bakterienspezies teilweise neben den obig erwähnten Verbindungen L-Cystein, Schwefelwasserstoff und Thiosulfat.

Bei Untersuchungen von Gram-positiven Bakterien, insbesondere bei einigen Streptomyceten-Arten, wurde δ -(L- α -Aminoacidipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV), ein Tripeptid analog dem GSH **39**, entdeckt. Da ACV aber nur bei Streptomyceten auftrat, die Penicillin und Cephalosporin herstellen und zudem die Zellkonzentration an ACV zu niedrig war, folgerte Newton et al., daß ACV nur als Intermediat in der Biosynthese dient und nicht als GSH Analogon fungiert.⁷⁴ Newton et al. fand schließlich ein Thiol, welches in größeren Zellkonzentrationen als ACV vorlag, wobei die Struktur dieser Verbindung zunächst nicht aufgeklärt werden konnte. Diese zunächst unbekannt Verbindung wurde U17 genannt.⁷⁴

Sakuda et al. konnten 1994 aus Streptomyceten Arten erstmals U17 als Disulfid isolieren und gaben die Struktur mit 2-(N-Acetyl-L-cysteinyl)amido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-D-*myo*-inositol) an.⁷⁶ Fast zeitgleich isolierten und identifizierten Spies und Steenkamp U17 aus *Mycobacterium bovis*,⁷⁷ wobei sie die Ergebnisse von Sakuda und Mitarbeiter bestätigten. Letztere gaben schließlich diesem GSH-Analogon den Trivialnamen Mycothiol (MSH) (+)-**38**. Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, ist das Zuckergerüst auf der linken Seite zu erkennen, an dessen Aminofunktion auf der 2-Position eine acylgeschützte α -Amino- γ -mercapto-propansäure (N-Acyl-L-cystein) über eine Peptidbindung gekuppelt ist. Das Inositol ist glycosidisch mit Glucosamin verknüpft (siehe Abbildung 5, S. 12, rechter Teil der Struktur).

Mycothiol wurde in der Ordnung der Actinomyceten in hohen Konzentrationen gefunden. Hierunter befinden sich unter anderen die Actinobakterien wie *Micrococcus* Spezies, wobei MSH bei *Arthrobacter*, *Agromyceten* oder *Actinomyceten genera* nicht vorkommt. Bei den

Nocardio-Formen synthetisieren Nocardia, Rhodococcus und Mycobakterien MSH. Streptomyceten, Micromonospora, Actinomadura und Nocardiosis sind ebenfalls MSH-Produzenten. Eine MSH-Synthese konnte bei Bacillus, Streptococcus, Staphylococcus und Listeria nicht nachgewiesen werden.⁷⁸

Eine besondere Eigenschaft des Mycothiols **38** ist, daß es sich weitaus langsamer einer kupferkatalysierten Autooxidation unterzieht als Glutathion, welches selbst wiederum viel langsamer autooxidiert als Cystein.⁷⁹ Diese Eigenschaft und die Tatsache daß Mycothiol in Mycobakterien in großen Konzentrationen vorliegt legen den Schluß nahe, daß Mycothiol analog dem Glutathion das Puffersystem für den Redox-Zustand der Zelle darstellt.⁷⁸

Zusätzlich zum oxidativen Streßmanagement ist Mycothiol bei Gram-positiven Bakterien an der Entgiftung der Zelle beteiligt. Formaldehyd, ein sehr starkes Zellgift, wird in Zellen, die Glutathion enthalten, mittels der NAD- und GSH-abhängigen Formaldehyd-Dehydrogenase oxidiert. J. A. Duine konnte 1997 bei Gram-positiven Bakterien ein analoges System, nämlich eine NAD- und MSH-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase nachweisen.⁸⁰ Er zeigte auch, daß der Co-Faktor, das MSH, nicht durch L-Cystein, N-Acetyl-L-cystein oder N-Acetyl-cysteamin substituiert werden konnte.

Zusätzlich konnte im Jahre 1998 S. Blanchard et al. erstmals nachweisen, daß auch das Fragment des Mycothiols, die 2-(N-Acetyl-L-cysteinyl)amido-2-deoxy- α -D-glucopyranose, ein Substrat der *Mycobacterium tuberculosis* Mycothiol-Reduktase (siehe auch Glutathion-Reduktase) ist, wobei die Anwesenheit von α und β Diastereomeren keinen Einfluß auf die Aktivität der Reduktase hat.⁸¹ Damit scheint der Inositol-Teil keinen allzu großen Einfluß auf die Aktivität des Substrates zu haben.

Die neu auftkommenden multiresistenten pathogenen Bakterien, insbesondere das *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkuloserreger), sind dabei von besonderem Interesse zahlreicher Forschungsarbeiten. Im Vergleich zu den weit verbreiteten Tripeptid-Thiolen, wie Glutathion, Trypanothion und Coenzym A ist das Mycothiol strukturell einzigartig. Die besondere Struktur des Mycothiols **38** eröffnet daher die Möglichkeit, hochspezifische Inhibitoren gegen die Enzyme, die an dem Mycothiol Metabolismus beteiligt sind, zu entwickeln. Diese inhibitorischen Antibiotika hätten weniger Nebenwirkungen bei infizierten Vertebraten, da diese nur Glutathion und kein Mycothiol besitzen. Ferner könnte ein empfindlicher Nachweis von Mycothiol die Diagnose von Tuberkulose und anderer durch Mycobakterien verursachten Krankheiten erheblich erleichtern.

Wie dringlich diese Suche nach neuen Antibiotika ist, zeigt die Schätzung der WHO (World Health Organisation), wonach jährlich acht Millionen Neuinfektionen und drei Millionen Todesfälle direkt der Tuberkulose zuzuschreiben sind.⁸² Im Ergebnis ist die Tuberkulose weltweit führend bei den tödlichen Infektionskrankheiten.

Die extrem geringe Verfügbarkeit von Mycothiol **38** aus natürlichen Quellen wirkt sich stark limitierend auf die biochemische Forschung aus, die ohne Substrat keine kinetischen Untersuchungen an Enzymen durchführen kann. Außerdem liefern natürliche Quellen nur Mycothiol und keine Derivate, aber gerade die Derivate sind bei der Suche nach geeigneten Inhibitoren unabdingbar. Es ist daher eine Herausforderung, nicht nur Mycothiol zu synthetisieren, sondern bei dessen Synthese universelle Grundkörper so zu wählen, daß später leicht Mycothiol-Mimetika dargestellt werden können.

1.1 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Grenzgebiet der organischen Synthese, der Biochemie und der Medizin ist die Forschung an Inositolen, Inositol-Systemen und deren Wirkung auf biologische Systeme von hohem Interesse. Da selbst die in der Natur am meisten vorkommenden *myo*-Inositolphosphate nicht in größeren Mengen isoliert werden können, liefert die organische Synthese der neun Isomere des Inositols den einzig sinnvollen Zugang zu dieser Verbindungsklasse. Damit ist es möglich, Studien an Wirkmechanismen seiner Derivate zu unternehmen und das ganze Potential dieser Verbindungen an biologischen Systemen zu erforschen. Obwohl schon ein breites Spektrum an Methoden zur Gewinnung von *myo*-Inositolphosphaten und gezielt differenzierter Inositol-Derivate ausgehend von preiswertem *myo*-Inositol existiert, wird weiter nach guten und einfachen Darstellungswegen gesucht. Dies liegt vor allem daran, daß die Differenzierung der OH-Gruppen problematisch ist und auf einer Stufe eine Racematspaltung erfolgen muß. Aus diesem Grund sind die bisher publizierten Synthesen über derartige Routen meist langwierig und bedürfen einer aufwendigen Abtrennung der Nebenprodukte, weshalb sie meist nur wenig effizient sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzte *de novo* Synthese bietet dabei eine konkurrenzfähige Alternative, da diese eine sehr große Flexibilität bezüglich der darstellbaren Produkte erlaubt. Durch eine *de novo* Synthese lassen sich gezielt nacheinanderfolgend geschützte Hydroxygruppen einführen, die sich auf diese Weise selektiv schützen lassen. Damit können gezielt

z.B. Inositolphosphate dargestellt werden, die über andere Darstellungswege schwierig oder zum Teil überhaupt nicht synthetisierbar sind.

Im Arbeitskreis Altenbach existieren bereits einige Arbeiten zu Cyclitolen. Ausgehend von *p*-Benzochinon **41** werden über den bewährten Zugang zu den enantiomerenreinen Bausteinen (+)-**42** und (+)-**43** die Synthesewege entwickelt. Die gute Verfügbarkeit der enantiomerenreinen Bausteine im über 100 g Maßstab macht diese als Ausgangsverbindung für die Naturstoffsynthese interessant. Das Hauptaugenmerk liegt im Folgenden auf der Darstellung enantiomerenreiner Substanzen. Die hochfunktionalisierten enantiomerenreinen Bausteine konnten bereits in der Synthese von Konduritolen, Inositolen (Klein,⁸³ Bien⁸⁴), Manumycin-Typ-Verbindungen sowie verzweigte Cyclitole (Block⁸⁵) und vor allem *myo*-Inositolphosphate (Ritter,⁸⁶ Plettenburg⁸⁷) ihre Flexibilität unter Beweis stellen. Insbesondere zu *myo*-Inositolphosphaten existieren bereits interessante Konzepte.^{86,87}

Im ersten Teil der eigenen Arbeit galt es insbesondere die Konzepte der Synthese der *myo*-InsP₄⁸⁷ zur Synthese weiterer enantiomerenreiner *myo*-Inositolphosphate zu nutzen und gleichzeitig einen Weg zu den biologisch sehr interessanten enantiomerenreinen *myo*-Inositolpentakisphosphaten zu entwickeln.

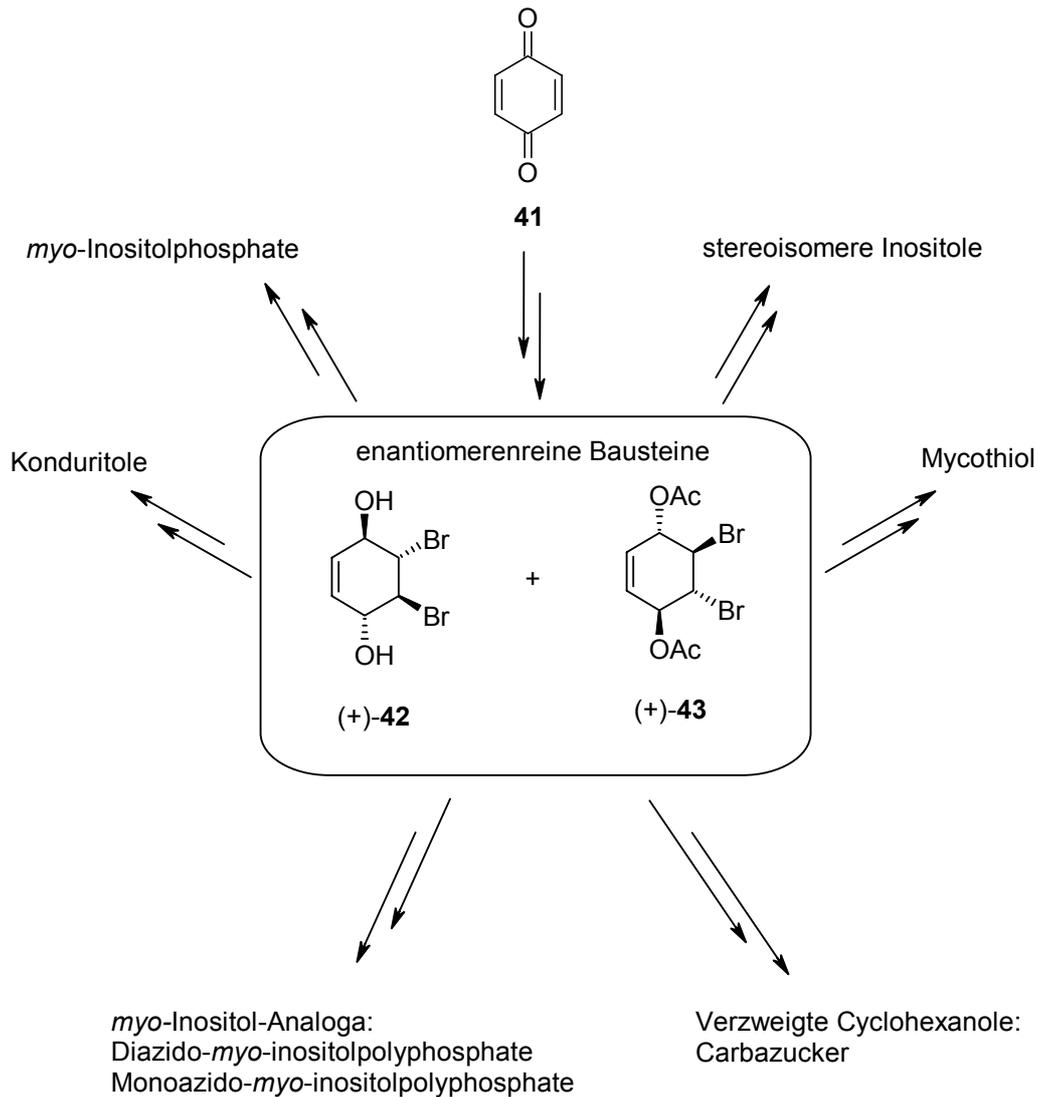
Im zweiten Teil sollte das Potential der enantiomerenreinen Bausteine für die Synthese von *myo*-Inositolphosphat-Derivaten, den Azido-/Amino-*myo*-inositolphosphaten, verwendet werden.

Will man andererseits das Potential der aus der Racematspaltung erhaltenen Bausteine für die Darstellung von Inositolstereoisomeren nutzen, so müssen gezielt Stereozentren invertiert werden. Inositolstereoisomere sind aufgrund ihrer sechs Stereozentren anspruchsvoll in der Synthese und somit finden sich bisher in der Literatur bei vielen Stereoisomeren der Inositole nur wenige Beispiele ihrer Darstellung. Aufbauend auf den Ergebnissen aus dem ersten und zweiten Teil sollte im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges Synthesekonzept zur Darstellung von Inositolstereoisomeren und ihrer Phosphate entwickelt werden.

Die große Flexibilität bei der Darstellung der *myo*-Inositolphosphate und die gute Verfügbarkeit im Multigrammmaßstab erlaubten auch weitaus komplexere Naturstoffe auf Inositolbasis zu synthetisieren. Ein solcher Naturstoff auf Inositolbasis ist Mycothiol, eine biologisch hochinteressante Verbindung, bei der bis zu diesem Zeitpunkt kein vollsynthetischer Darstellungsweg existierte.

Im letzten Teil sollte ein neuer, allgemeiner Darstellungsweg entwickelt werden, der im Gegensatz zu bisher im Arbeitskreis bekannten Synthesewegen, enantiomerenreine verzweigte Cyclitole liefert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Theorie hierzu nicht in der Einleitung, sondern im Absatz 2.7 ausführlich erörtert.

Abbildung 7: Zielmoleküle dieser Arbeit



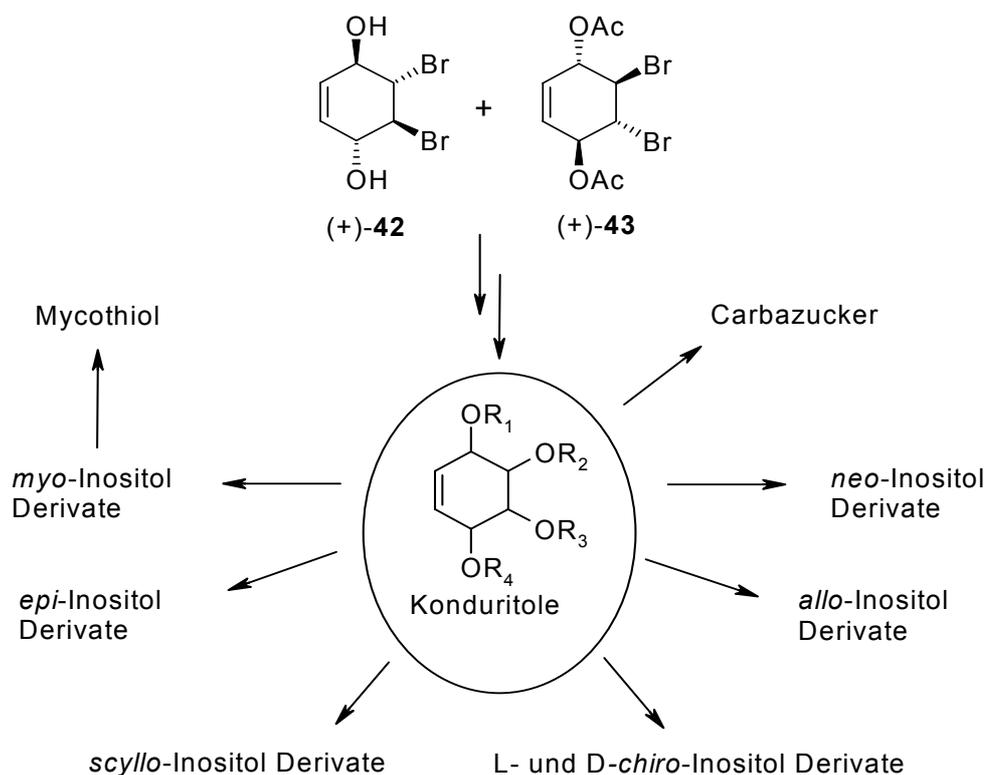
2 Durchführung

In den folgenden Kapiteln werden die *de novo* Strategien zur Darstellung von verschieden substituierten *myo*-Inositolen (Abschnitt 2.2 und 2.3), stereoisomeren Inositolen (Abschnitt 2.4), Galactose-Analoga (Abschnitt 2.5), Mycothiol (Abschnitt 2.6) und Carbazucker (Abschnitt 2.7) eingehend erläutert. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der selektiven Synthese von flexiblen, enantiomerenreinen Zwischenstufen, die dann wiederum hochselektiv funktionalisiert werden.

2.1 Einführung

Von zentraler Bedeutung für die in dieser Arbeit vorgestellten Synthesen ist die Umwandlung der enantiomerenreinen Bausteine (+)-**42** und (+)-**43** (Synthese siehe Abschnitt 2.1.1, S. 21) in geeignet geschützte Zwischenstufen.

Abbildung 8: Konduritole, die zentralen Zwischenstufen bei der Synthese der stereoisomeren Inositole

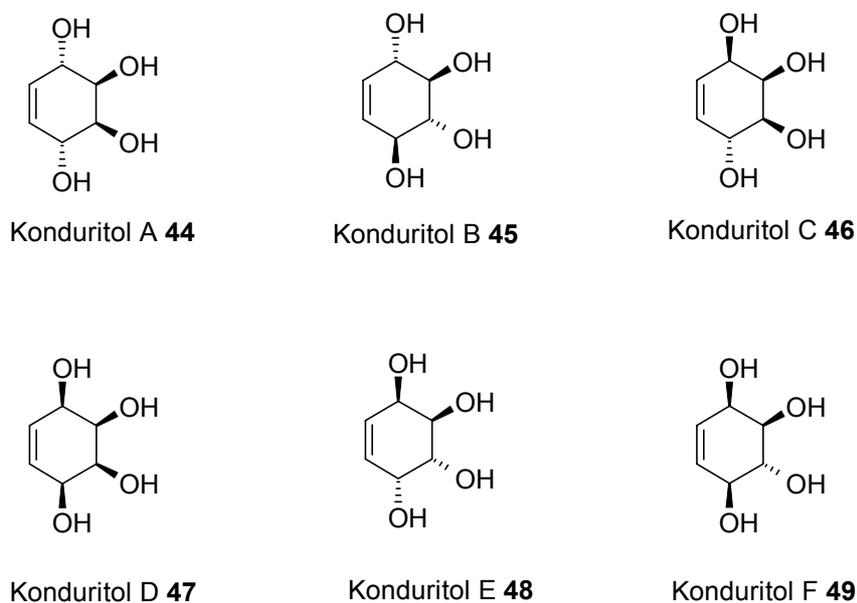


Diese Zwischenstufen sind häufig Konduritol-Derivate (5-Cyclohexen-1,2,3,4-tetrol-Derivate), welche dann weiter zu den gewünschten Zielverbindungen umgesetzt werden.

Konduritole und ihre Derivate haben selber interessante biologische Eigenschaften, so sind sie zum Beispiel als Epoxy- und Amino-Derivate (potentielle Übergangszustand-Mimetika) gute Glycosidase-Inhibitoren.⁵⁷ Neben ihrem pharmakologischen Potential sind diese Verbindungen sehr nützliche Vorstufen bei der Synthese der Inositolstereoisomeren. Die zentralen Zwischenstufen in diesem Konzept sind vor allem Konduritol B, C, E und F Derivate.

Zum Verständnis der Nomenklatur dieser Zwischenstufen sind diese in Abbildung 9 aufgelistet.

Abbildung 9: Nomenklatur der Konduritole



Von besonderer Relevanz bei der Darstellung der Inositole ist die praktische Durchführbarkeit der Synthese der zentralen Zwischenstufen. Bis auf den Zugang zum Konduritol B, welches in diesem Arbeitskreis durch Ritter⁸⁶ und Plettenburg^{87,88} ausführlich beschrieben wurde, existieren nur wenige effiziente Synthesen der anderen Konduritole. Häufig sind die anderen Konduritole nur in wenigen Milligramm über lange Synthesesequenzen darstellbar (Aus diesem Grund eignet sich ein solcher Zugriff nicht für die Synthese der stereoisomeren Inositole). Eine Grundvoraussetzung für die Synthese der einzelnen Inositole ist ein effektiver und kurzer Darstellungsweg der wichtigen Konduritol-Zwischenstufen, da diese Konduritole nämlich nachträglich noch über eine weitere Synthesesequenz funktionalisiert und geschützt

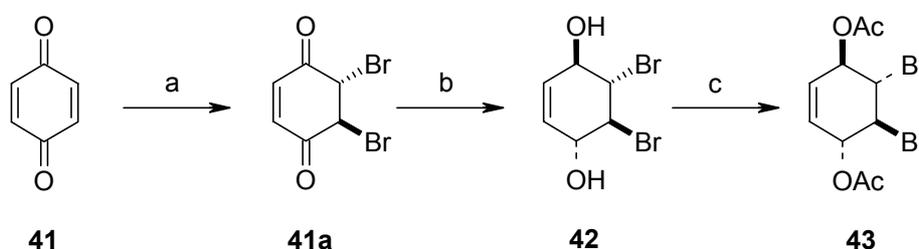
werden müssen. Ein Zugang zu den Konduritolen in einer Stufe ausgehend von (+)-**42** und (+)-**43** wäre dabei besonders wünschenswert.

Die Doppelbindung dieser Konduritole läßt sich auf verschiedene Weise funktionalisieren. Durch ihre C_2 -Symmetrie sind vor allem Konduritol B oder E besonders wertvolle Vorstufen, da, wie noch in späteren Abschnitten näher erläutert wird, eine *cis*-Dihydroxylierung oder Epoxidierung der Doppelbindung nur zu einem einzigen Diastereomer führt. Die Konduritole A und D sind C_s -symmetrisch (bei Gleichheit aller Schutzgruppen an den Hydroxygruppen) und daher achiral.

2.1.1 Darstellung der enantiomerenreinen Bausteine („building blocks“)

Als geeignetes Startmaterial zur Darstellung von Konduritol-Derivaten ist das Dibromdiacetat **43**. Dies wird nach einem von Altenbach⁸⁹ und Stegelmeier⁹⁰ in den 70er Jahren entwickelten, und durch Klein,⁸³ Ritter⁸⁶ und Block⁹¹ optimierten Verfahren dargestellt. Die Bromierungs-Reduktionssequenz liefert ausgehend von *p*-Benzochinon **41** hauptsächlich das all-*trans* Diol **42**. Die anschließende Acetylierung von **42** in Pyridin und Essigsäureanhydrid liefert das Diacetat **43**, welches zur Entfernung sämtlicher Nebenprodukte (Isomere) auf dieser Stufe durch Umkristallisation aus Ethanol aufgereinigt wird. Die einfache Durchführbarkeit dieser Synthesesequenz erlaubt Ansatzgrößen von bis zu einem Kilogramm. Damit kann der Grundkörper **43** in ausreichender Menge für die nachfolgende enzymatische Racematspaltung bereitgestellt werden.

Schema 1: Synthese von (±)-3,6-Diacetoxy-4,5-dibrom-1-cyclohexen **43**

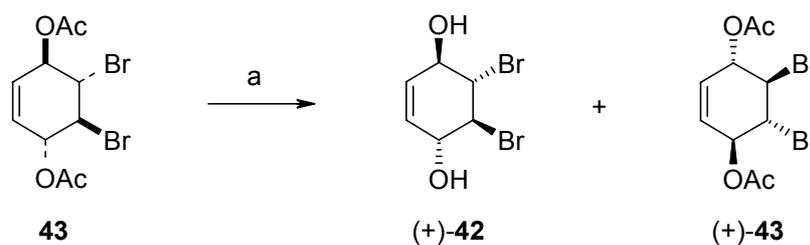


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) CH_2Cl_2 , Br_2 . – (b) NaBH_4 , Et_2O . – (c) Ac_2O , Pyridin.

Enzymatische Racematspaltung

Zur enzymatischen Differenzierung wurde das (\pm)-Diacetat **43** nach einer Vorschrift von Klein⁸³ in einem Zweiphasengemisch aus Phosphat-Puffer (pH = 7) und Diethylether suspendiert und anschließend mit pig pancreas lipase II (PPL) versetzt.

Schema 2: Enzymatische Racematspaltung



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Pig Pancreas Lipase II, Et₂O, H₂O.

Das Enzym ist hochselektiv und setzt ausschließlich nur ein Enantiomer um. Somit konnte man den Reaktionsansatz ohne weitere Kontrolle rühren lassen. Eine GC-Analyse nach zehn Tagen ergab einen 50%igen Umsatz und damit konnte die Reaktion abgebrochen werden.

Nach Aufarbeitung erhält man einen Feststoff, der beide Produkte, nämlich das (+)-Diol **42** und (+)-Diacetat **43**, beinhaltet. Die Trennung der beiden Produkte ist aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften leicht möglich. Durch einfaches Digerieren in Dichlormethan lassen sich beide Produkte voneinander trennen. Das (+)-5,6-Dibrom-2-cyclohexen-1,4-diol **42** bleibt als farbloser Feststoff zurück, während das (+)-3,6-Diacetoxy-4,5-dibrom-1-cyclohexen **43** in Lösung geht (jeweils >99% *ee*).

Die leichte Handhabbarkeit dieser enzymatischen Reaktion läßt Ansatzmengen von 100 g Edukt problemlos zu. Die nach der Racematspaltung erhaltenen enantiomerenreinen Produkte sind hochflexible Bausteine, deren Potential noch lange nicht ausgereizt ist.

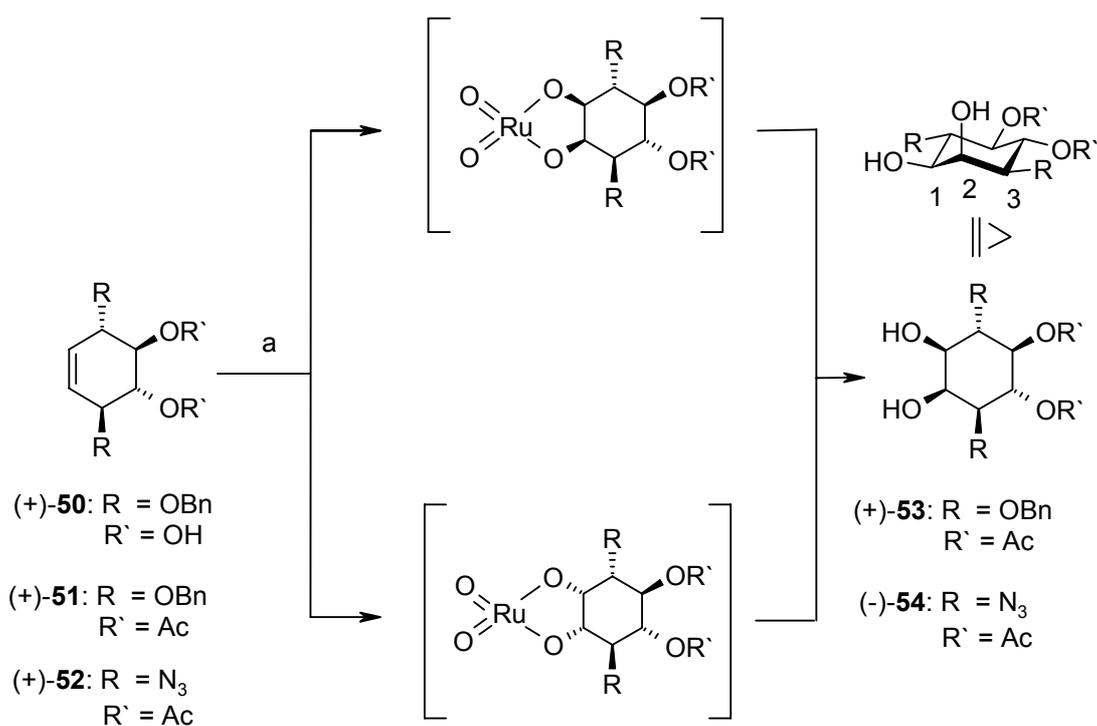
2.1.2 Konzept der Differenzierung einzelner funktioneller Gruppen

Grundlegend wurden bei der Synthese von *myo*-Inositol und seiner Derivate zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen erfolgte die Synthese der *myo*-Inositole über den klassischen C_2 -symmetrischen Ansatz und zum anderen über einen neu entwickelten desymmetrisierenden Weg.

2.1.2.1 C_2 -symmetrischer Ansatz zur Darstellung der *myo*-Inositole

Eine ideale Voraussetzung bei der Synthese von *myo*-Inositolbausteinen bieten C_2 -symmetrische Vorstufen, wie all-*trans* konfigurierte Konduritit B Derivate **42**, **43** (siehe Abschnitt 2.4.2, S. 114ff), **50**, **51** bzw. **52**. Durch die all-*trans* Konfiguration der Substituenten führt eine *cis*-Dihydroxylierung zu einem einzigen Stereoisomer, das in *myo*-Konfiguration vorliegt.

Abbildung 10: Symmetrischer Weg zur Darstellung von *myo*-Inositolen und ihrer Derivate



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril.

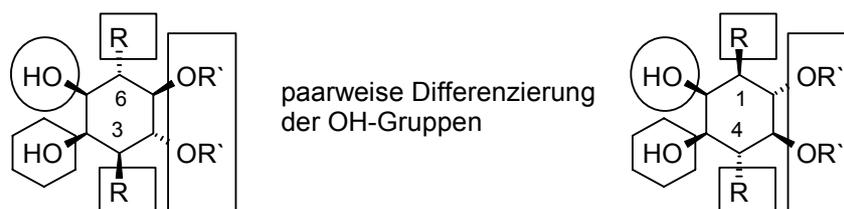
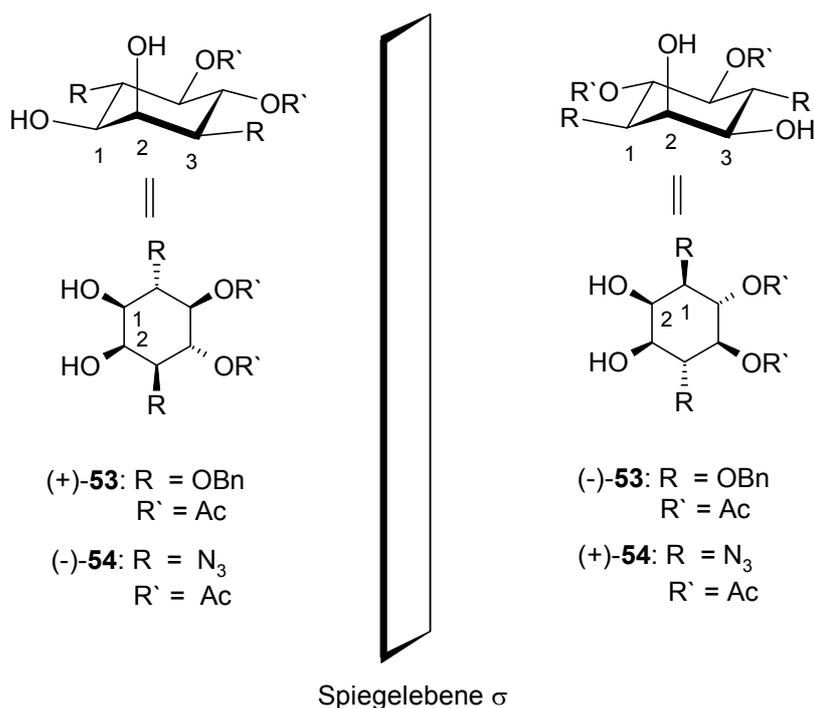
Der Angriff des Oxidationsmittels auf die Doppelbindung des Edukts kann grundsätzlich von der Ober- oder der Unterseite erfolgen. Aufgrund der C_2 -Symmetrie des Edukts ergibt der Angriff von der Oberseite dasselbe Produkt wie der von der Unterseite.

Im Gegensatz zu den restlichen Gruppen und wie in obiger Abbildung ersichtlich ist, steht die Hydroxylgruppe in der 2-Position axial. Die durch die *cis*-Dihydroxylierung eingeführten OH-Gruppen sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Orientierung im Ring differenzierbar.

Da *myo*-Inositol eine *meso*-Verbindung ist, liefert der Zugang, ausgehend von beiden Enantiomeren, letztendlich unterschiedlich substituierte Inositole. Diese sind nicht nur Spiegelbilder (Enantiomere), sondern können auch als unterschiedliche Serie an D-Inositolen aufgefaßt werden (siehe Abschnitt 2.1.3).

Der C_2 -symmetrische Ansatz liefert paarweise differenzierte Gruppen, mit denen viele Inositole und Inositol-Phosphate dargestellt werden können.

Abbildung 11: Konzept der paarweisen Differenzierung



Der Vorteil der paarweisen Differenzierung birgt aber auch eine gewisse Limitierung in sich. Diese scheinbare Einschränkung wird aber zum Teil durch den Zugriff auf beide Enantiomere überkompensiert.

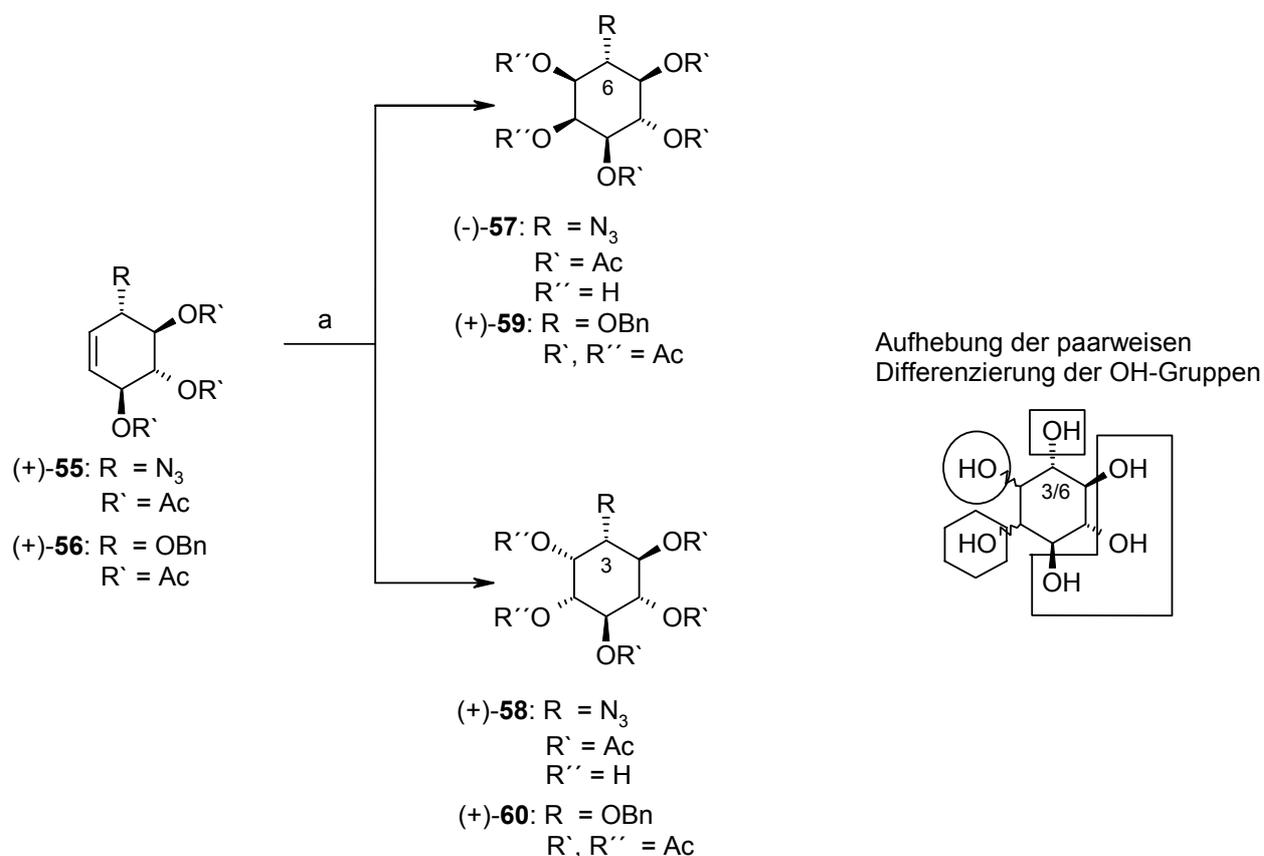
Die Symbole R und R' (Abbildung 11) sind dabei verschiedene Substituenten der Hydroxylgruppen. Hydroxylgruppen, die die gleichen Symbole tragen, sind gleich substituiert. Mit der Wahl der entsprechend vorfunktionalisierten Ausgangsmoleküle ist eine effiziente und direkte Synthese von vielen Inositol-Derivaten möglich.

2.1.2.2 Desymmetrisierender Weg zur Darstellung der *myo*-Inositole

Das Konzept des C_2 -symmetrischen Weges liefert aufgrund der meist nur paarweisen Differenzierungsmöglichkeiten nur eine begrenzte Anzahl an Inositol-Derivaten. Die Modifikation einzelner Hydroxygruppen ist lediglich bei denen durch die *cis*-Dihydroxylierung eingeführten OH-Gruppen möglich (axiale 2- bzw. äquatoriale 1-Position). Bei Aufgabe der C_2 -symmetrischen Zwischenstufe könnte bei Verwendung von unsymmetrischen Konduritol B-Derivaten die Anzahl der daraus darstellbaren Inositol-Derivate deutlich gesteigert werden. Da beide Konzepte grundsätzlich andere Substitutionsmuster zulassen, ergänzen sich beide Wege hervorragend.

Da keine C_2 -symmetrischen Edukte bei der *cis*-Dihydroxylierung eingesetzt werden, ist eine Trennung der entstehenden Diastereomere erforderlich (hier oder auf einer späteren Stufe). Der Erfolg der Synthese hängt maßgeblich von der Praktikabilität der Trennung beider Diastereomere ab. Das Entstehen von Diastereomeren liefert aber auch den Vorteil, daß man „zwei Serien“ an Inositolderivaten erhält. Damit erhält man eine große Anzahl an Inositolderivaten, die bisher über andere Synthesewege nur schwer oder zum Teil nicht darstellbar sind. Ausgehend von beiden Enantiomeren **43** bzw. **42** lassen sich z. B. bei der Azido-Route mittels unsymmetrischen Konzeptes vier der sechs möglichen Positionen des Inositolringes substituieren.

Abbildung 12: Konzept der Desymmetrisierung: Darstellung von 3- bzw. 6-substituierten *myo*-Inositolen am Beispiel eines Enantiomers.



Reagenzien: (a) 1. RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril. Nur bei **59** und **60**: 2. Pyridin, Ac₂O

2.1.3 Nomenklatur der Inositolen und NMR-spektroskopische Untersuchung

Inositolen sind Cyclohexanhexole oder Cyclitole,⁸ wobei die Konfiguration mit einer axialen und fünf äquatorialen Hydroxylgruppen nach der IUPAC-Kommission als *myo*-Inositol **1** bezeichnet wird.¹⁰ Unsubstituiertes *myo*-Inositol **1** weist eine Symmetrieebene auf, die durch C-2 und C-5 läuft und ist dementsprechend achiral.

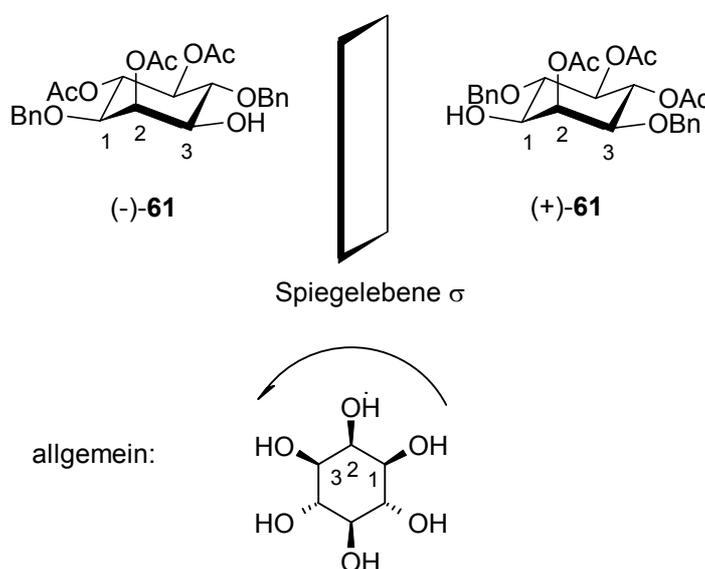
Erklärung der Nomenklatur am Beispiel von *myo*-Inositol **1**:

Das Kohlenstoffatom, das die axiale Hydroxylgruppe trägt, wird als C-2 bezeichnet. Die anderen Ringkohlenstoffatome werden von C-1 bis C-6 im oder gegen den Uhrzeigersinn durchnummeriert, wobei sich C-1 auf einer der beiden Seiten von C-2 befindet.

Vereinbarungsgemäß führt die Nummerierung gegen den Uhrzeigersinn bei einem asymmetrisch substituierten Inositol zur D- und eine Nummerierung im Uhrzeigersinn zur L-Konfiguration. Das strikte Einhalten dieser IUPAC-Regeln war jedoch problematisch und es kam häufig zu Verwechslungen. Deshalb wurde in einer IUPAC-Empfehlung vorgeschlagen, alle biologisch relevanten Verbindungen als D-Derivate zu kennzeichnen.¹¹ Aus diesem Grunde werden auch alle restlichen Inositolstereoisomere mit der D-Nomenklatur bezeichnet. Hierbei erfolgt die Nummerierung ausnahmslos gegen den Uhrzeigersinn. Die L-Nomenklatur findet sich aber noch in älteren Publikationen.

Die Bezeichnung wurde so gewählt, daß beim (+)-**61** das Kohlenstoffatom mit der freien äquatorialen Hydroxylgruppe mit „eins“ bezeichnet wurde. Bei dem entgegengesetzten Enantiomer wird hingegen das Kohlenstoffatom mit der freien äquatorialen Hydroxylgruppe mit „drei“ benannt.

Abbildung 13: Sesselschreibweise von (+)-2,4,5-Tri-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-D-*myo*-inositol und (-)-2,5,6-Tri-*O*-acetyl-1,4-di-*O*-benzyl-D-*myo*-inositol **61**



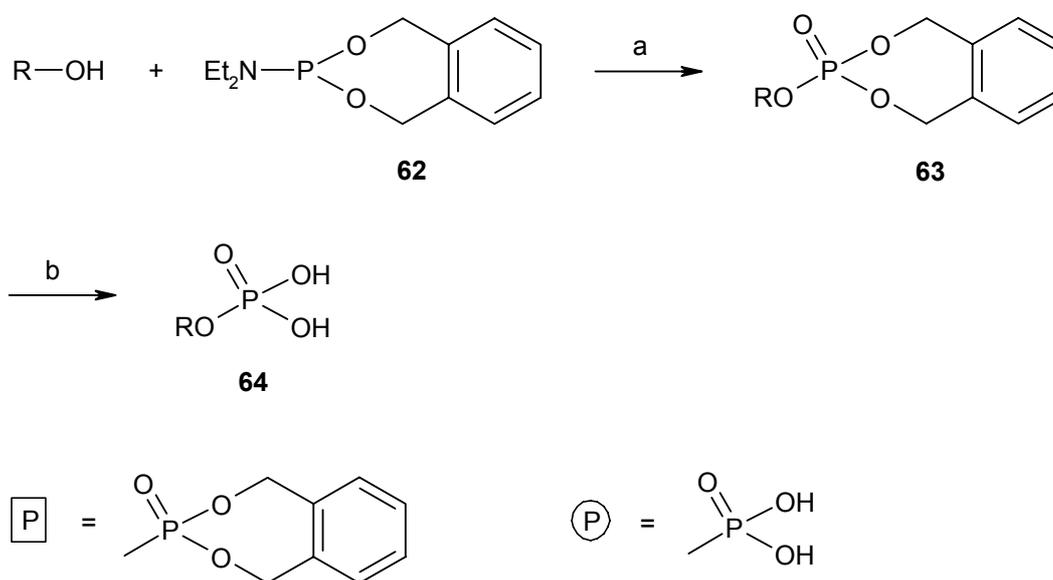
Die Nummerierung der stereoisomeren Inositole erfolgt, mit Ausnahme von *chiro*-Inositol **4**, ebenfalls ausschließlich nach der D-Nomenklatur (siehe die Nummerierung in Abbildung 2).

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung wird am Beispiel von 6-Amino-*myo*-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)-**81** ausführlich erläutert (siehe ab S. 42, Abbildung 16 bis Abbildung 20).

2.1.4 Darstellung des Phosphorylierungsreagenzes und Grundlagen der Phosphorylierung

Die Phosphorylierung der freien Hydroxylgruppen wurde überwiegend nach einer Methode von Ozaki durchgeführt.⁹² Bei dieser Methode erfolgt die Phosphorylierung mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** in Anwesenheit von 1*H*-Tetrazol. [Das Phosphorylierungsreagenz **62** wurde dabei aus Tris(diethylamino)phosphit **65** und Phthalylalkohol **66** in einem Einstufenverfahren synthetisiert.] Durch das als Hilfssäure zugesetzte 1*H*-Tetrazol wird die P-N-Bindung des Phosphorylierungsreagenz zunächst geschwächt. Dadurch kann die Hydroxylgruppe des zu phosphorylierenden Alkohols leichter am Phosphor nucleophil angreifen. Zum Schluß muß noch das intermediär entstandene Phosphit mit *m*-CPBA hochoxydiert werden.

Schema 3: Phosphorylierungsreaktion



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA. – (b) Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser.

Durch den Überschuß an Phosphorylierungsreagenz **62** muß das Rohprodukt, das aus 3-Diethylamino-3-oxo-3λ⁵-2,4,3-benzodioxaphosphapan und dem gewünschten phosphorylierten (geschützten) Alkohol besteht, immer flash-säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Die Wahl des richtigen Elutionsmittels ist dabei von großer Bedeutung. Bei Verwendung von Ethylacetat/Cyclohexangemischen erhält man Wiederfindungsraten am dargestellten geschützten Inositolphosphat **63** von über 90%. Die Aufreinigung von geschützten Inositoltetra-, -penta- und -hexakisphosphate bedarf aber der Verwendung von polareren Lösungsmittelgemischen (z. B. Dichlormethan/Methanolgemische). Unter diesen Bedingungen kommt es wahrscheinlich zu Dephosphorylierung an Silicagel und deshalb sind die Wiedergewinnungsraten dabei meist nur bei 50-60%. Um diesem zu umgehen, wurde häufig das Rohprodukt nicht auf dieser Stufe aufgereinigt, sondern gleich freigesetzt. Das freie Inositolphosphat **64** muß dann mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden (siehe dazu Abschnitt 4.1).

2.2 Darstellung der Amino- und Azido-*myo*-inositole und der Amino-*myo*-inositolpolyphosphate

Die Darstellung von Amino- bzw. Azido-*myo*-inositolen und der Amino-*myo*-inositolphosphate erfolgt über das symmetrische sowie das desymmetrisierende Konzept.

Die Totalsynthese von enantiomerenreinen Azido-/Amino-*myo*-inositolen ist aufgrund der sechs stereogenen Zentren sehr anspruchsvoll und aus diesem Grunde sind bisher nur wenige Darstellungsversuche veröffentlicht worden. Die Synthese von 5-Azido und 6-Azido-Derivate wurde durch Sanfilippo et al. im Jahre 1998 publiziert.⁹³ Bei dieser Route startet Sanfilippo von einem racemischen Konduritol E Derivat, das er mittels enzymatischer Acetylierung differenziert. Die Azido-Gruppe führt er später über eine selektive Epoxidöffnung mit Natriumazid ein. Ein synthetischer Ansatz, der eine größere Flexibilität in Bezug auf die Stelle der Substitution erlaubt, ist bisher noch nicht publiziert worden. Aus diesem Grunde wurde ein umfassendes Konzept entwickelt, das eine maximale Flexibilität bezüglich der Position der Amin-/Azido-Gruppe ermöglicht und den Kooperationspartnern (U. Eifdhoff, Forschungszentrum Jülich und S. Adelt, Biochemie der Universität Wuppertal) interessante Inositol-Derivate bereitstellt.

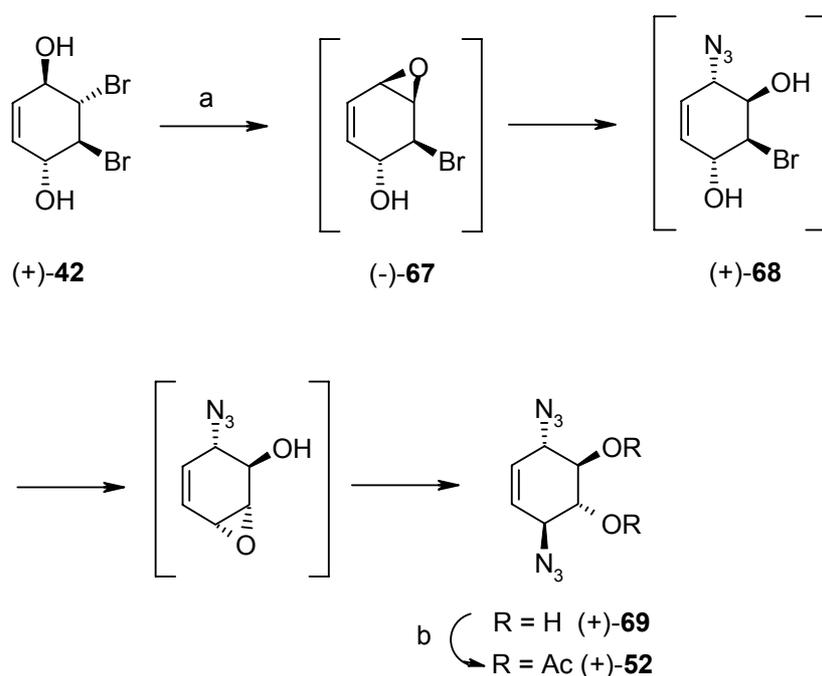
2.2.1 Darstellung der Diazido- bzw. Diamino-*myo*-inositole mittels symmetrischen Konzept

Substituiertes 3,6-Diazido-*myo*-inositol wurde ausgehend von den enantiomerenreinen Ausgangsverbindungen (+)-Diol **42** bzw. (+)-Diacetat **43** dargestellt. Die zentrale Zwischenstufe bei der Synthese der Diazido-*myo*-inositole ist das 1,4-Diazido-konduritol B **69**. Die doppelte Einführung der Azido-Funktion wurde bereits durch Lehmann et al.⁵⁸ in einer Zweistufensynthese publiziert. Dabei wird racemisches Diol **42** zuerst in das C_2 -symmetrische *anti*-Benzoldioxid **70** (Verbindung nicht abgebildet) überführt, gefolgt von einer doppelten Allylöffnung durch Natriumazid unter Zinksulfat-Katalyse. Das erhaltene racemische Diazido-konduritol B **69** wird dabei in einer Gesamtausbeute von 26% erhalten.

Die geringe Ausbeute führte dazu, einen optimierteren Syntheseweg zu entwickeln. Dabei halfen Syntheseüberlegungen aus der desymmetrisierten Route (siehe Absatz 2.2.2). Im Arbeitskreis Altenbach wurde bereits durch Kaffee⁹⁴ ein Mehrstufenprozeß entwickelt, der

über die desymmetrisierende Route das gewünschte 1,4-Diazido-konduritit B **69** lieferte. Dabei verwendete Kaffee eine nacheinanderfolgende doppelte Epoxidgenerierungs-Epoxidöffnungs (mit NaN_3)-Sequenz ausgehend von Diol **42**. Diese Synthese liefert gute Ausbeuten, aber die Reaktionssequenz ist verhältnismäßig aufwendig. Daher wurde versucht, eine effiziente und kurze Syntheseroute zu entwickeln. Dabei half die bekannte Tatsache, daß sich das Monoepoxid **67** leicht mit dem guten Nucleophil Azid öffnen läßt. Durch Optimierungsversuche konnte ein Einstufenprozeß aus (+)-Diol **42** zum Diazido-konduritit B (+)-**69** etabliert werden. Diese Einstufensynthese kombiniert die Reaktionsbedingungen der Epoxidgenerierungs-Epoxidöffnungs-Sequenz miteinander. Hier wählt man die gleichen Bedingungen, die zur Synthese des Monoepoxides **67** benötigt werden. Anstelle der Aufarbeitung erfolgt hier die Zugabe des Nucleophils (durch Natriumazid) zum Reaktionskolben. Die *in situ* Generierung der Epoxide führt unter einem stereokontrollierten allylischen, nucleophilen Angriff der Azido-Anionen zum gewünschten Produkt in über 50%iger Ausbeute.

Schema 4: Darstellung von 1,4-Diazido-konduritit B



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) LiOH , $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$. Nach 2 h NaN_3 , H_2O . [51%].
– (b) Ac_2O , Pyridin [99%].

Mit diesem neuen Konzept konnte die Route entscheidend verkürzt werden. Durch diesen Weg konnte erstmals ein einfacher, sehr kurzer und effizienter Weg zum enantiomerenreinem

1,4-Diazido-konduritol B **52** aufgezeigt werden. Dieser Baustein steht nun für weitere Funktionalisierungen im Multigrammmaßstab zur Verfügung.

2.2.1.1 Synthese von 3,6-Diazido-*myo*-Ins(1,2,4,5)P₄ ((-)-73) als Substrat für die Co-Kristallisation von β -Arrestin

Grundlagen:

Die Desensibilisierung der β_2 -adrenergen Rezeptoren erfolgt u. a. durch Phosphorylierung der Serin- und Threonin-Seitengruppen im C-Terminus des Rezeptors.⁹⁵ Dieser Mechanismus der Phosphorylierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zur Regulation ist weit verbreitet. Die Phosphorylierung des aktiven Rezeptors alleine inhibiert die Bindung und Aktivierung des G-Proteins noch nicht. Die Affinität des G-Proteins zum Rezeptor wird bei gleichzeitiger Erhöhung der Affinität eines anderen regulatorischen Proteins, des β -Arrestins, verringert. β -Arrestin konkurriert mit dem trimeren G-Protein G_s um die Bindungsstellen an den ligandaktivierten β -adrenergen Rezeptoren. Durch die Phosphorylierung wird die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor favorisiert und damit die Signalweiterleitung über G_s blockiert.⁹⁶

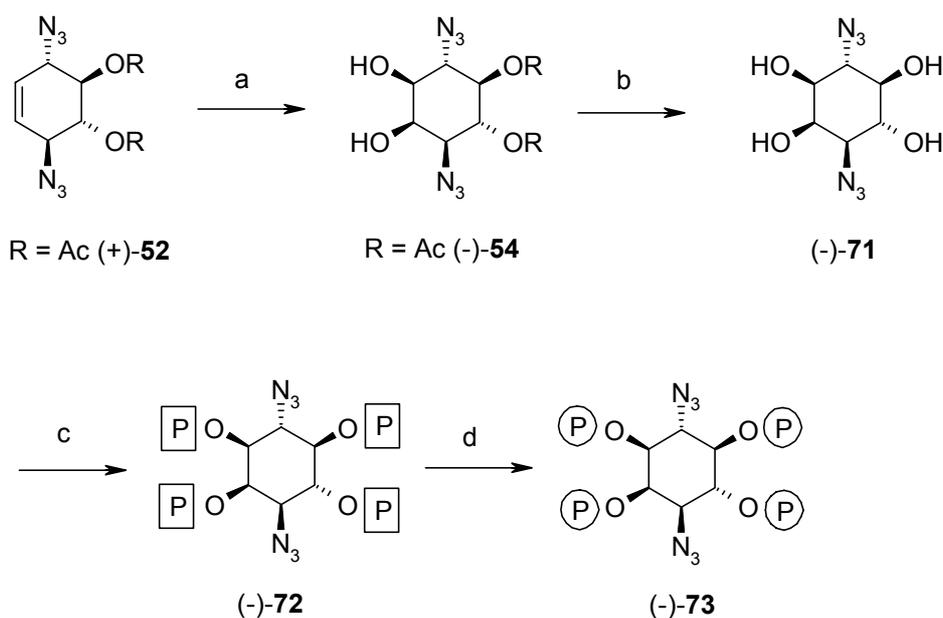
β -Arrestin 1 (418 AS: 47.1 kDa) aus *Bos taurus* wurde bereits 1990 kloniert und als Faktor, der die Signalweiterleitung von β ARK-phosphorylierten β -adrenergen Rezeptor um mehr als 75% vermindert beschrieben (Abk.: β ARK: β -adrenerge Rezeptorkinase).⁹⁷ Alle Arrestine sind äußerst konservativ und haben eine hohe Homologie (weiterführende Literatur siehe auch Lit.: 98, 99, 100).

Um die Struktur des Peptids genau zu bestimmen versuchte Eidhoff β -Arrestin 1 (aus *S. cerevisiae*) zu kristallisieren.¹⁰¹ Unter Verwendung von K₂Na-Tartrat als Fällungsmittel konnte β -Arrestin kristallisiert werden, wobei die geringe Stabilität und die geringe Diffraktionseigenschaft der bis zu 800 μ m großen Kristalle zunächst die röntgenkristallographische Analyse behinderte. Durch die Co-Kristallisation mit *myo*-InsP₆ **13** als Ligand konnte Eidhoff die Diffraktionsqualität deutlich steigern. *myo*-InsP₆ **13** ist dabei ein Substitut für den natürlichen Liganden, dem membrangebundenen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Immerhin konnte die Phosphoinositid-Bindestelle (PI-BS) durch Co-Kristallisation des β -Arrestins lokalisiert werden. Er konnte dabei aufzeigen, daß das Protein-*myo*-InsP₆ **13** Verhältnis im Kristall bei 1:1 liegt. *myo*-InsP₆ **13** verbrückt zwei β -Arrestin 1 Moleküle über eine Koordinationsstelle in einer N-terminalen Domäne und einer

C-terminalen Domäne. Somit liegen zwei *myo*-InsP₆ **13** Moleküle mit einem Arrestin assoziiert vor. Folglich sind alle Arrestine, wie einzelne Kettenglieder in einer Art Kette, über dazwischenliegendes *myo*-InsP₆ **13** miteinander verknüpft.

Ziel der Kooperation mit Eidhoff war die Ermittlung der Proteinstruktur von β -Arrestin bei hoher Auflösung (mind. 3.5 Å). Es wurde zuerst ein Ligand synthetisiert, welches ein besseres Analoga zum natürlichen Ligand sein sollte. Außerdem sollte es in Mengen über 40 mg dargestellt werden können, da für Kristallisationsversuche größere Mengen an Substrat benötigt werden. Weil das natürliche Ligand membrangebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) ist, sollte ein *myo*-Ins(1,4,5)P₃ Derivat Ziel synthetischer Überlegungen sein. Da die 2-Position häufig keinen Einfluß bei der Substraterkennung besitzt, dürfte auch ein *myo*-Ins(1,2,4,5)P₄ Derivat ein guter Ligand sein. Ebenso sollte das Molekül zwei Azido-Gruppen aufweisen, die alternativ während der Kristallisation mit UV-Licht photolysiert werden sollten. Die Photolyse mit UV-Licht könnte zur Erhöhung der Diffraktionsqualität durch das Eingehen von kovalenten Bindungen mit dem Arrestin führen und dadurch zu einer höheren kristallographischer Auflösung beitragen.

Retrosynthetische Betrachtungen zur Synthese eines 3,6-Diazido-*myo*-Ins(1,2,4,5)P₄ Derivates ließen den Schluß zu, daß 1,4-Diazido-konduritol B (+)-**69** eine ideale Vorstufe ist. Nach Acetylierung und anschließender *cis*-Dihydroxylierung mit RuCl₃/NaIO₄ an (+)-**69** erhielt man das geschützte Diazido-*myo*-inositol (-)-**54**. Bei der gewählten Methode wird das Rutheniumtetroxid *in situ* durch Oxidation des Ruthenium(III)chlorid mit Natrium(meta)-periodat erzeugt.¹⁰² Bereits nach wenigen Minuten war das Edukt komplett umgesetzt. Ein Überschreiten dieser Reaktionszeit soll nach Shing et al. zur Weiteroxidation, d. h. zur Diolsplaltung des *myo*-Inositols (-)-**54** und so zur Synthese des Dialdehyds führen.^{103, 104} Diese oxidative Spaltung konnte nicht beobachtet werden und so ist diese Stufe leicht durchführbar. Entschützung unter basischen Bedingungen und direkte Phosphorylierung mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** in Anwesenheit von 1*H*-Tetrazol und nachfolgende Oxidation mit *m*-CPBA ergab das geschützte Diazido-tetrakisphosphat (-)-**72**. Zum Erhalt der Azido-Funktion des gewünschten Produktes ist eine hydrogenolytische Entschützung mit Palladium auf Kohle als Katalysator nicht möglich. Man erhält sonst nur das Diamino-Produkt. Zum Erhalt der Azidofunktionalität erfolgte die Entschützung in einer Stufe mit Trimethylsilylbromid^{105,106} und man erhielt 3,6-Diazido-*myo*-inositol-tetrakisphosphat (-)-**73** in quantitativer Ausbeute.

Schema 5: Darstellung von Diazido-*myo*-inositol tetrakisphosphat

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl_3 , NaIO_4 , Acetonitril [99%]. - (b) NaOMe , MeOH [99%]. - (c) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphoshepan, 1*H*-Tetrazol, Acetonitril dann *m*-CPBA [45%]. - (d) TMSBr , CH_2Cl_2 [99%].

Die kristallographischen Untersuchungen mit dem 3,6-Diazido-Derivat (-)-73 laufen zur Zeit im Institut für biologische Informationen, Jülich. Erste Untersuchungen zeigen, daß beim Bestrahlen des Gemisches aus β -Arrestin und (-)-73 mit UV-Licht nach 20 min kein Diazido- InsP_4 (-)-73 mehr HPLC-spektroskopisch nachzuweisen ist. Die Photolyse scheint somit quantitativ zu erfolgen. Auch konnten mittels Gelelektrophorese β -Arrestin-Dimere eindeutig nachgewiesen werden. Die Dimere lagen aber bisher nur in einer Menge von 10% im Vergleich zum β -Arrestin Monomer vor.

Weitere biologische Bedeutung des *myo*- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ Analogons (-)-73:

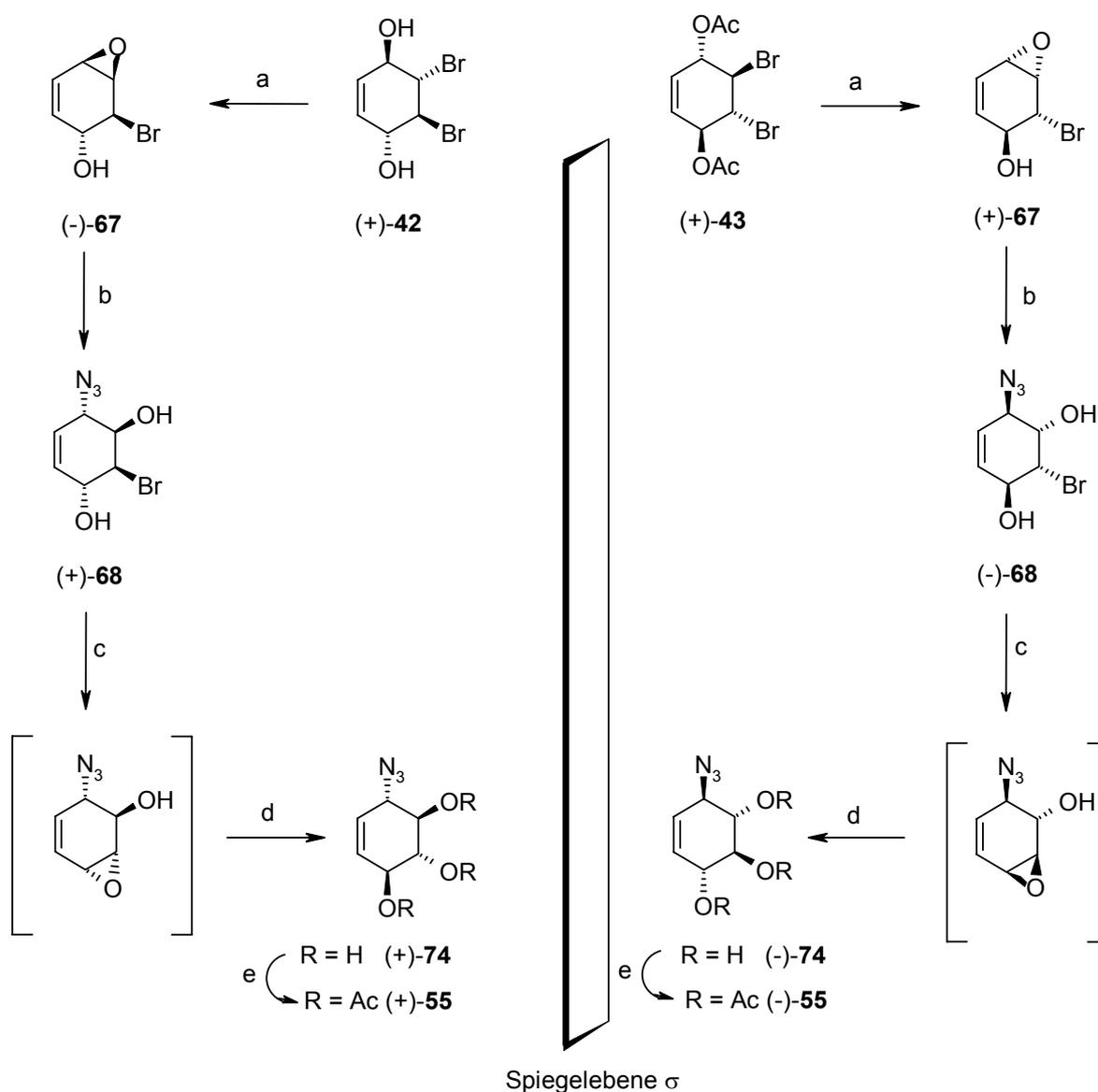
Es konnte gezeigt werden, daß *myo*- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$, ein nicht-physiologisches Inositolphosphat, eine vergleichbare Bindungsaffinität zu *myo*- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Bindeproteinen aufweist. Ebenfalls ist racemisches *myo*- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ ein kompetitiver Inhibitor der 5-Phosphatase aus menschlichen Erythrocyten.^{107,108} Das Diazidoanalog (-)-73 könnte somit ähnliche biologische Aktivitäten aufweisen.

2.2.2 Darstellung der Azido- bzw. Amino-*myo*-inositole mittels desymmetrisierenden Konzept

Der für racemische Verbindungen von Plettenburg⁸⁷ aufgezeigte Zugang zu Azido- und Amino-*myo*-inositolen sollte auch für die weitaus interessanteren enantiomerenreinen Verbindungen etabliert und zur Darstellung von Inositolphosphat-Analoga ausgenutzt werden. Die Probleme des enantiomerenreinen Zugangs liegen vor allem in der zur racemischen Route viel geringeren Kristallisationstendenz der einzelnen Produkte. Aus diesem Grunde müssen veränderte Trennmethode etc. entwickelt werden, um beide Diastereomere einfach und effizient voneinander zu trennen.

Das (+)-Diol **42** bzw. (+)-Diacetat **43** kann nach einer Vorschrift von Bien⁸⁴ und Block⁹¹ durch Behandeln mit Lithiumhydroxyd als schwache Base in einem Gemisch aus Diethylether und Methanol in quantitativer Ausbeute in das Epoxid (-)-**67** bzw. Epoxid (+)-**67** überführt werden. Die Azido-Gruppe wird anschließend durch nucleophilen Angriff von Azid eingeführt. Die Reaktion erfolgt durch Ammoniumchlorid-Katalyse aus einem Gemisch von Dimethoxymethan, Ethanol, Wasser und Natriumazid. Die Reaktion führt zu einer selektiven Öffnung in der Allyl-Position und ergibt ausschließlich das geöffnete Produkt (+)-**68**.

Das Azid (+)-**68** kann unter den obig beschriebenen Bedingungen wiederum leicht in das zweite Epoxid überführt werden. Da das Intermediat leicht eine Ringöffnung eingeht, war eine Aufreinigung auf dieser Stufe unbefriedigend. Es blieb viel Öffnungsprodukt bei Flash-Chromatographie auf der Säule hängen. Aus diesem Grund wurde das Rohprodukt ohne jegliche Aufreinigung gleich weiter umgesetzt. Die direkte Ringöffnung mit Wasser unter saurer *p*-Toluolsulfonsäure-Katalyse ergab das Azido-konduritol B (+)-**74**, welches zur Entfernung der Nebenprodukte (Edukten und S_N' Produkte) aus Essigsäureethylester umkristallisiert wird. Mittels einfacher Aufreinigung auf dieser Stufe erhält man ausgehend von (+)-Diol **42** über vier Stufen analysenreines Azido-konduritol B (+)-**74** in einer Ausbeute von ca. 50%. Die Effizienz dieser Route liegt vor allem in der einfachen Aufreinigungsmöglichkeit. Eine Aufreinigung der Zwischenstufen ist nicht erforderlich und eine Umkristallisation ist auch im großen Maßstab leicht durchführbar.

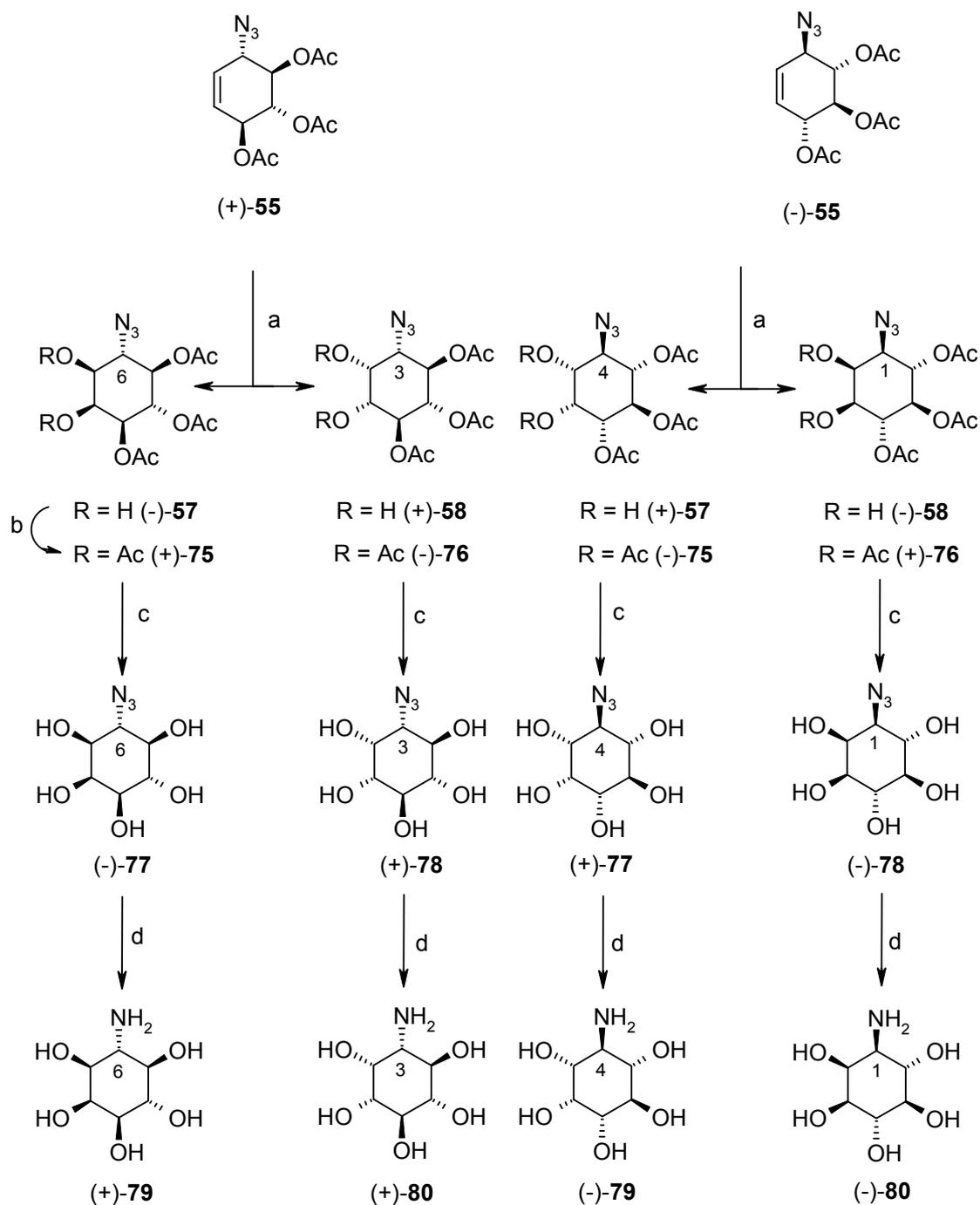
Schema 6: Darstellung des Azidotriols **55**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) LiOH, Et₂O/MeOH [99%]. – (b) NaN₃, DME/H₂O/EtOH, NH₄Cl. [99%]. - (c) LiOH, Et₂O/MeOH [99%]. – (d) *p*-TsOH, H₂O [45%]. – (e) Ac₂O, Pyridin [99%].

Nach Acetylierung und *cis*-Dihydroxylierung mit 1.5 Äquivalenten Natriummetaperiodat und katalytischer Menge an Rutheniumtrichlorid (10 mol%) in Acetonitril erhält man ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (Verhältnis 3-Azido zu 6-Azido-Produkt: 3:2). Erste Versuche bei der *cis*-Dihydroxylierung in Essigsäureethylester waren zwar erfolgreich, aber man erhielt durch starke Schutzgruppenwanderung ein Gemisch aus vielen Produkten. Erst durch Verwendung von Acetonitril (HPLC-Grade) konnte die Schutzgruppenwanderung unterdrückt werden. Erwähnenswert ist, daß diese Reaktion sehr sensitiv auf Säurespuren reagiert. Folglich werden zur Unterdrückung der Schutzgruppenwanderung nur frisch destillierte

Lösungsmittel verwendet. Die Probleme der Acetatgruppenwanderung an Polyolen werden häufig beobachtet und stellen ein maßgebliches Problem bei der Praktikabilität der einzelnen Syntheserouten dar.^{109,110} Die *cis*-Dihydroxylierung führt zu zwei Produkten mit *myo*-Konfiguration (siehe Abschnitt 2.1.2.2).

Schema 7: Synthese der Azido- bzw. Amino-*myo*-inositole



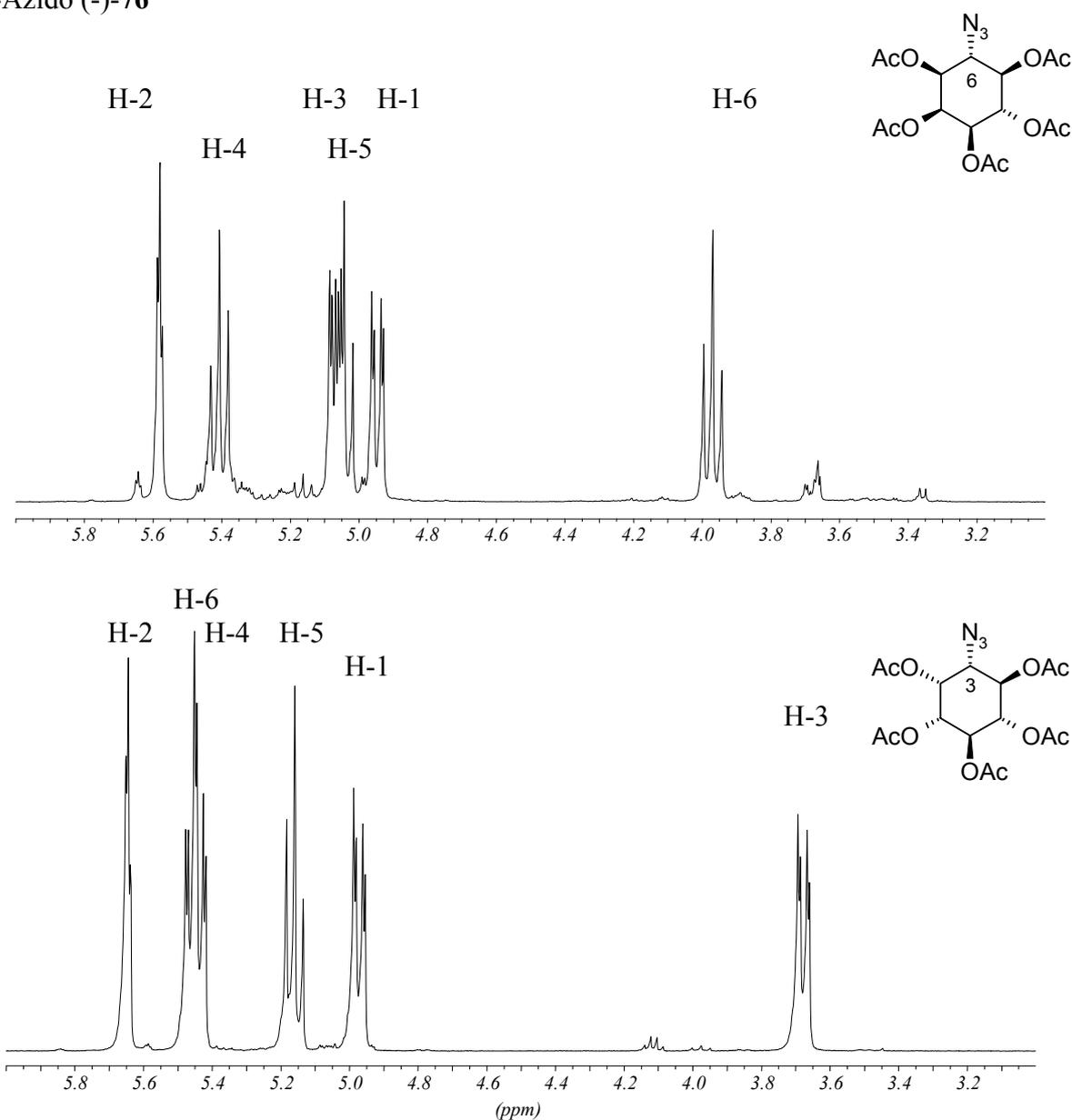
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril [90%]. – (b) Ac₂O, Pyridin [99%]. – (c) NaOMe, MeOH [99%]. – (d) Pd/C, H₂, Wasser [99%].

Eine Trennung der Diastereomere ist aber auf dieser Stufe weder säulenchromatographisch, noch über HPLC (Normalphasen- und reversed-phase-) möglich. Eine fraktionierte Kristallisation scheidet von vorneherein durch die leicht eintretende Schutzgruppenwanderung aus. Beide Produkte zeigen aber ein extrem unterschiedliches Lösungsverhalten. Es konnte, basierend auf dieser physikalischen Eigenschaft, ein Verfahren etabliert werden, mit der beide Produkte äußerst einfach und effizient voneinander getrennt werden können. Beide Produkte wurden dazu in Chloroform digeriert. Dabei verbleibt 4,5,6-Tri-*O*-acetyl-3-azido-*myo*-inositol (+)-**58** als weißer, unlöslicher Feststoff (Reinheit >99%), während 3,4,5-Tri-*O*-acetyl-6-azido-*myo*-inositol (-)-**57** (Reinheit > 90 - 95%) sich in CHCl₃ löst. Wenn höhere Reinheiten der 6-Azido/6-Amino-*myo*-inositol Derivate benötigt werden, kann eine weitere Aufreinigung nur auf der Stufe des Pentaacetats (+)-**75** durch Umkristallisation aus Ethanol erfolgen. Eine Trennung der Diastereomeren auf der Stufe der Pentaacetate (**75** bzw. **76**), wie sie Plettenburg⁸⁷ aufzeigte, erwies sich bei der enantiomerenreinen Verbindung als nicht effizient. Mit dieser Methode erhält man nur geringe Mengen an reinen Verbindungen.

Die Abspaltung der Acetatgruppen kann auf vielfältige Weisen erfolgen. Aus Praktikabilitätsgründen ist eine katalytische Entschützung zu bevorzugen. Die Freisetzung von (+)-**58** bzw. (-)-**57** oder ihrer Pentaacetate **76** bzw. **75** konnte mit Umsetzung von katalytischer Menge an Natriummethanolat in absolutem Methanol erfolgreich durchgeführt werden. Pd/C-katalysierte hydrogenolytische Reduktion des Azids in Wasser führte in quantitativer Ausbeute zu dem 6-Amino-*myo*-inositol (+)-**79** bzw. 3-Amino-*myo*-inositol (+)-**80**.

Die Zuordnung der beiden Diastereomeren war anhand von ¹H-NMR-Experimenten leicht an den pentaacetylierten Verbindungen möglich. Diese sind mittels Standardacetylierung in Pyridin/Essigsäureanhydrid erhältlich. Die einzigen im Hochfeld verbleibenden Signale sind die der Azido-Gruppe benachbarten CH-Gruppen. Alle Ringprotonen an acetylierten Hydroxygruppen erfahren eine Tieffeldverschiebung von zwei ppm und liegen damit bei fünf bis sechs ppm. Das zur Azido-Gruppe benachbarte Proton beim 3-Azido-inositol (-)-**76** weist zu einem Proton eine *cis*- und zum anderen Proton eine *trans*-Kopplung auf. Es erscheint als Dublett vom Dublett mit einer Kopplungskonstanten mit $J = 10.7$ bzw. 2.5 Hz bei 3.68 ppm. Das H-6-Signal beim 6-Azido-inositol (+)-**75** weist zu beiden benachbarten Protonen zwei *trans*-Kopplungen von $J = 10.7$ Hz auf und liegt als ein Pseudotriplett bei 3.97 ppm vor.

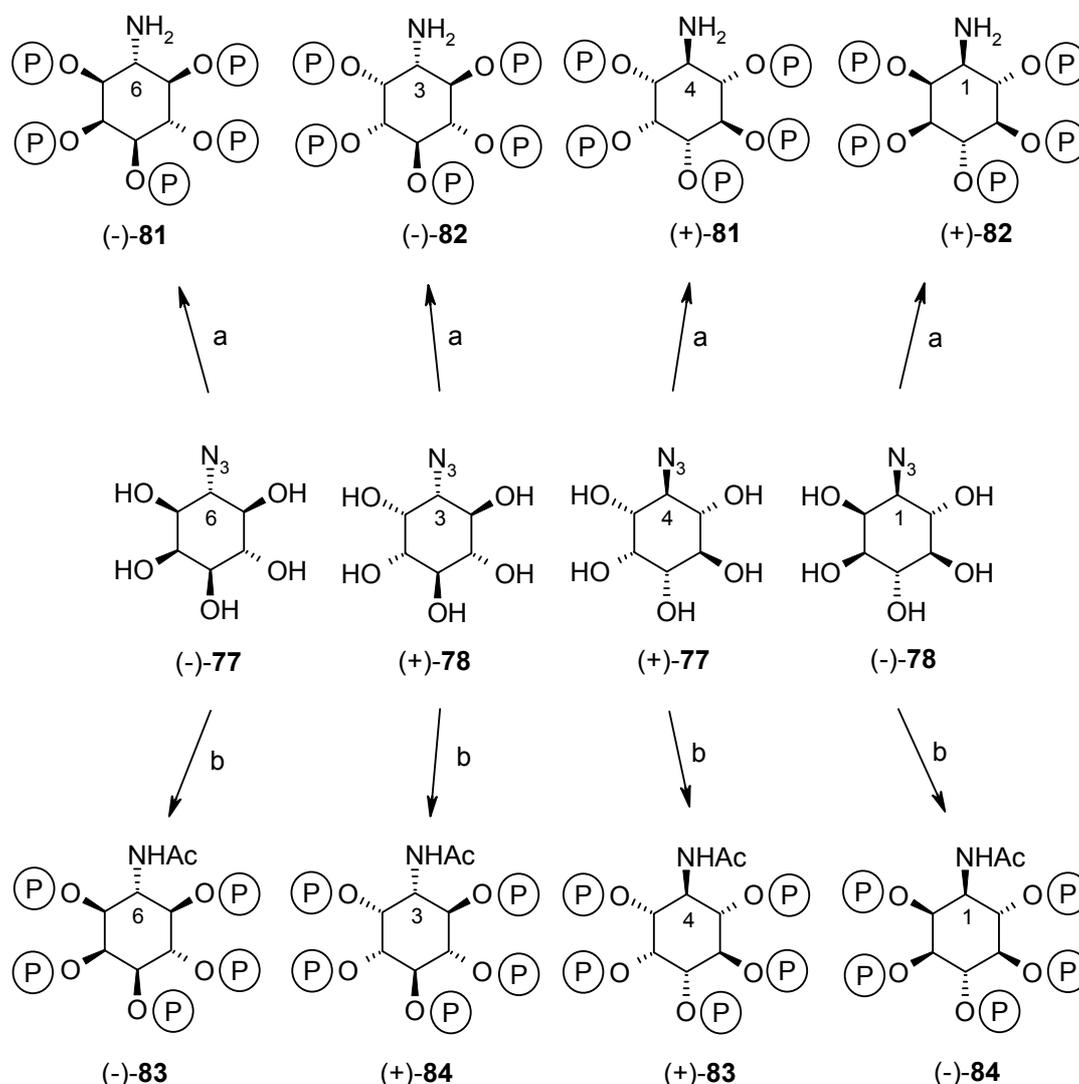
Abbildung 14: $^1\text{H-NMR}$ Spektren von geschützten 6-Azido-*myo*-inositol (+)-**75** und 3-Azido (-)-**76**



Für die Darstellung der *N*-Acetyl-amino-*myo*-inositolpentakisphosphate mußte zuerst die Azidofunktionalität in eine *N*-Acetyl-amino-Funktionalität überführt werden. Dabei wurde zunächst die Azido-Gruppe hydrogenolytisch reduziert und die Verbindung später mit Pyridin/ Essigsäureanhydrid peracetyliert. Die basische Entschützung lieferte problemlos das *N*-Acetyl-amino-*myo*-inositol. Unter Standardbedingungen wurde es phosphoryliert und anschließend ohne jegliche Aufreinigung hydrogenolytisch entschützt. Die Aufreinigung mittels HPLC lieferte reines 3-Desoxy-3-acetamido-*myo*-inositol-pentakisphosphat (+)-**84** bzw. 6-Desoxy-6-acetamido-*myo*-inositol-pentakisphosphat (-)-**83**. Die optischen Antipoden (-)-**84** und (+)-**83** konnten analog dargestellt werden.

Die Synthese der Amino-*myo*-inositol-pentakisphosphate (-)-**82** und (-)-**81** und ihrer Enantiomeren erwies sich hingegen als äußerst problematisch.

Schema 8: Darstellung der Amino- bzw. *N*-Acetyl-amino-*myo*-inositolpentakisphosphate



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, Acetonitril dann *m*-CPBA [50%]. 2. Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser [80%]. - (b) 1. Pd/C, H₂ Methanol. 2. Ac₂O, Pyridin [80% über beide Stufen]. 3. NaOMe, MeOH [80%]. 4. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, Acetonitril dann *m*-CPBA [43%]. 5. Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser [nach HPLC 80%].

Die Einführung der fünf Phosphatgruppen durch Phosphorylierung von 6-Azido-*myo*-inositol (-)-**77** oder 3-Azido-*myo*-inositol (+)-**78** führte unter Standardbedingungen mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol in Dichlormethan (12 Stunden Rührzeit), gefolgt von anschließender Oxidation des resultierenden Phosphits mit *m*-Chlorperbenzoesäure, nicht zum gewünschten Produkt.

Bei der Phosphorylierung unter den üblichen Standardbedingungen gingen die schwer löslichen Edukte fast gar nicht in Lösung und so mußten längere Reaktionszeiten in Kauf genommen werden. Durch die langen Reaktionszeiten erfolgte bemerkenswerterweise auch eine quantitative Reduktion der Azido-Funktionalität (analog der Staudinger Reduktion). Dies war im IR gut zu beobachten. Diese Reaktion verlief im Verhältnis zur Phosphorylierung sehr langsam. Mit kürzeren Rührzeiten und der Verringerung der üblichen Menge an Phosphorylierungsreagenzes von 2.0 auf unter 1.2 Äquivalente pro OH-Gruppe konnten diese Nebenreaktionen weitgehend unterdrückt werden. Um auch vernünftige Phosphorylierungsraten zu erhalten, wurde von Dichlormethan auf das stärker polare Lösungsmittel Acetonitril umgestellt. Infolge dieser Optimierungen erreicht man nach chromatographischer Aufreinigungen übliche Umsatzraten von über 50%. Zur Verbesserung der Ausbeute wurden ebenfalls zahlreiche Phosphorylierungen in polarerer Lösungsmitteln wie DMF und DMSO durchgeführt. Reaktionen in diesen Lösungsmitteln führten aber zu keiner Produktbildung.

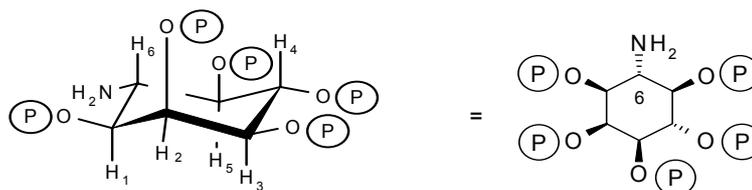
Die Überlegenheit gegenüber bisherig publizierten Routen zeigt sich auch an dieser Stelle. Interessanterweise lassen sich bei Phosphorylierungen von Diastereomergemischen aus 6-Azido-*myo*-inositol (-)-**77** und 3-Azido-*myo*-inositol (+)-**78** beide Produkte leicht durch Flash-Chromatographie trennen (R_f -Wert: 0.12 und R_f -Wert: 0.25). Das macht diese Route sehr leicht durchführbar, denn eine vorherige Diastereomerentrennung ist nicht unbedingt nötig. Die folgende Pd/C-katalysierte Entschützung/Hydrogenolyse ergibt NMR-sauberes 3-Amino-*myo*-inositol-1,2,4,5,6-pentakisphosphat (-)-**82** oder 6-Amino-*myo*-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)-**81**. Um eine für biologische Untersuchung ausreichende Reinheit zu gewährleisten, wurden die Produkte mittels HPLC weiter aufgereinigt.

Beide Produkte lassen sich eindeutig NMR-spektroskopisch charakterisieren. Man erkennt analog zu den ^1H -NMR Spektren der geschützten 6-Azido- (+)-**75** und 3-Azido (-)-**76** *myo*-Inositole ein ähnliches Spektrum. Aufgrund der Aminofunktionalität ist das dem Amin benachbarte Ringprotonen, also H-6 bei 6-Amino-*myo*-inositol-pentakisphosphat (-)-**81**, gegenüber den anderen Ringprotonen deutlich hochfeldverschoben. Analoges gilt für das 3-Amino-*myo*-inositol-1,2,4,5,6-pentakisphosphat (-)-**82**.

2.2.2.1 Ausführliche NMR-spektroskopische Erläuterung von Inositolphosphaten am Beispiel von 6-Amino-*myo*-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)-**81**

myo-Inositol-Derivate zeigen charakteristische Signale der Ringprotonen im NMR. Diese sind durch ihre jeweilige Lage zu ihren Nachbarprotonen bedingt.

Abbildung 15: Sessel-Konformation von (-)-**81**



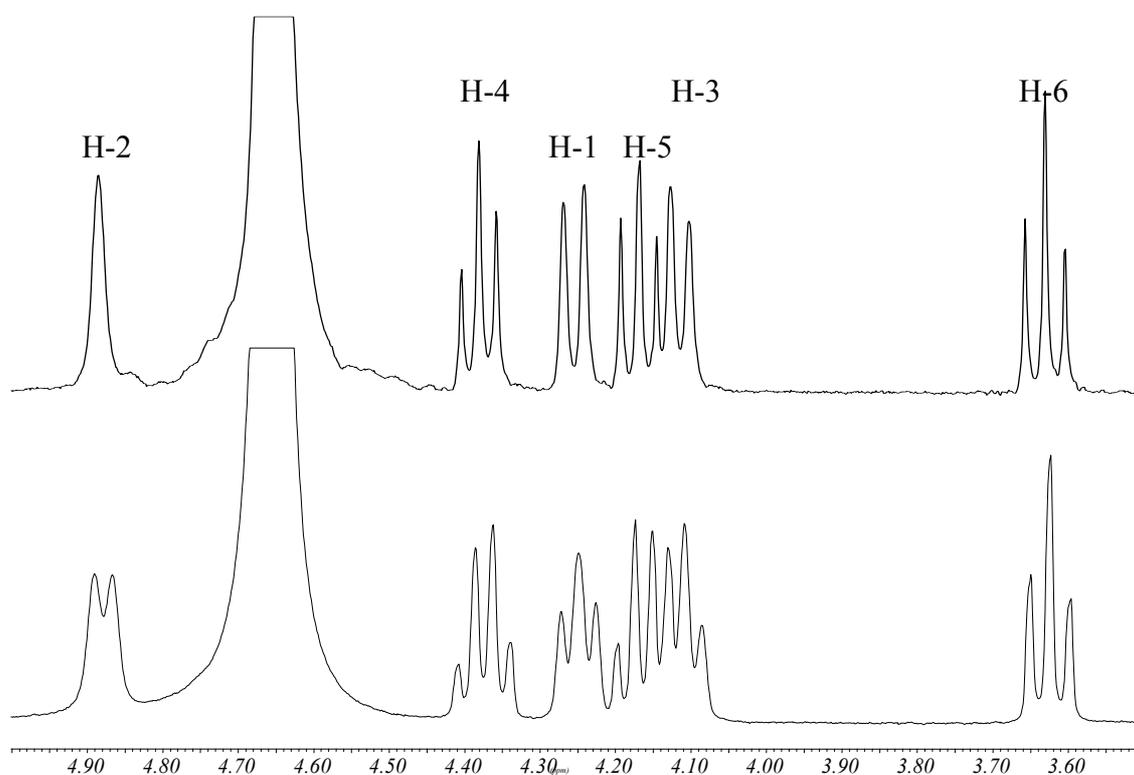
Die grundsätzliche Überlegung soll zuerst am ^{31}P entkoppelten ^1H -NMR veranschaulicht werden (siehe Abbildung 16, S. 43). In der Sesselkonformation des Cyclohexanrings unterscheidet man drei vicinale Kopplungen.¹¹¹ Die $^3J_{\text{axial-axial}}$ (*trans*)-Kopplung (üblicherweise zwischen 7 bis 10 Hz), die $^3J_{\text{axial-äquatorial}}$ (*cis*)-Kopplung (zwischen 1 bis 3 Hz) und die $^3J_{\text{äquatoriale-äquatoriale}}$ (*trans*)-Kopplung (ebenfalls zwischen 1 bis 3 Hz). Der letztere Kopplungsfall ist üblicherweise bei *myo*-Inositol nicht zu beobachten, da normalerweise die Konformation auftritt, die zur maximalen äquatorialen Ausrichtung der Substituenten führt (somit stehen H-1, H-3, H-4, H-5 und H-6 axial). Im *chiro*-Inositol (siehe 2.4.1) ist dies aber durch die andere Anordnung der Substituenten zu berücksichtigen.

Da bei *myo*-Inositol jedes Proton mit zwei benachbarten, nicht äquivalenten Protonen koppelt, ist jeweils ein Dublett vom Dublett zu erwarten. Liegen zwei *cis* oder *trans* Kopplungen vor, ergibt sich daraus häufig ein Pseudotriplett. Bei schlechter Auflösung kann es durch den geringen Beitrag der *cis*-Kopplungen zu einer weiteren Vereinfachung kommen, indem diese Kopplungen häufig nicht zu sehen sind. Daraus ergibt sich für das H-1 bzw. H-3 Signal ein Dublett vom Dublett mit einer Kopplungskonstante $^3J_{\text{ax-eq}} \approx 2.5$ und $^3J_{\text{ax-ax}} \approx 10$ Hz. Durch die schlechte Auflösung ist beim 6-Amino-pentakisphosphat (-)-**81** nur ein Dublett mit $^3J_{\text{ax-ax}} \approx 9$ Hz zu erkennen (siehe Abbildung 16). Die Signale von H-4, H-5 und H-6 erscheinen jeweils als Pseudotriplett mit einer Kopplungskonstanten von $^3J_{\text{ax-ax}} \approx 10$ Hz. Das H-2 Signal erscheint im Spektrum als Pseudosingulett, obwohl es eine Kopplungskonstante zu seinem *cis*-ständigen vicinalen Protonen von $^3J_{\text{ax-eq}} \approx 2.5$ haben dürfte. Bemerkenswert ist, neben der

signifikanten Signalform, die starke Tieffeldverschiebung des äquatorialen Protons H-2 (bis 0.6 ppm), die eine leichte Identifizierung dieser Position ermöglicht.

Die Phosphorylierung einer Hydroxy-Gruppe bewirkt neben einer Tieffeldverschiebung von bis zu 0.5 ppm eine weitere $^3J(\text{P},\text{H})$ -Kopplung von 7 bis 10 Hz. Durch diese zusätzliche große Kopplung erfolgt eine Signalveränderung. So erscheint im ^1H -NMR nun das H-2 Signal als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $^3J = 9.7$ Hz und das H-4 Signal beispielsweise als Pseudoquartett mit $^3J = 9.3$ Hz.

Abbildung 16: Vergleich von $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ - und ^1H -NMR-Spektren von 6-Amino-*myo*-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)-**81**



Wichtige Strukturparameter kann man aus den phosphor-entkoppelten ^1H -NMR-Spektren entnehmen. Durch Vereinfachung des betreffenden Signals, im Vergleich zum nicht-entkoppelten ^1H -NMR-Spektrum, kann man die Positionen des Phosphates identifizieren. Deshalb ist die Aufnahme eines ^1H - ^{31}P -Cosy-Spektrums häufig nicht nötig. An der Verbindung (-)-**81** sind demzufolge die Position H-1 bis H-5 phosphoryliert.

Sehr charakteristisch ist die Lage des C-6 im ^{13}C -Spektrums, welches durch den benachbarten Aminosubstituent stark hochfeldverschoben ist und bei 56 ppm liegt. Mittels ^{13}C - ^1H -Cosy-

Spektrums läßt sich das H-6 Signal im ^1H -NMR somit leicht zuordnen (das Signal ist schwach unter der HDO-Spiegelung zu erkennen). Das H-6 Signals ist als Pseudotriplett bei 3.62 ppm zu erkennen (siehe Abbildung 18).

Mittels eines ^1H - ^1H -Cosy Spektrums lassen sich nun die beiden benachbarten Protonen H-1 und H-5 leicht zuordnen. Diese beiden Protonen koppeln jeweils mit dem äquatorialen Proton (H-2) und einem weiteren axialständigen Proton (H-4). Folglich lassen sich alle Protonen eindeutig zuordnen.

Abbildung 17: ^1H - ^1H - NMR Spektrum von 6-Amino-*myo*-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)-**81**

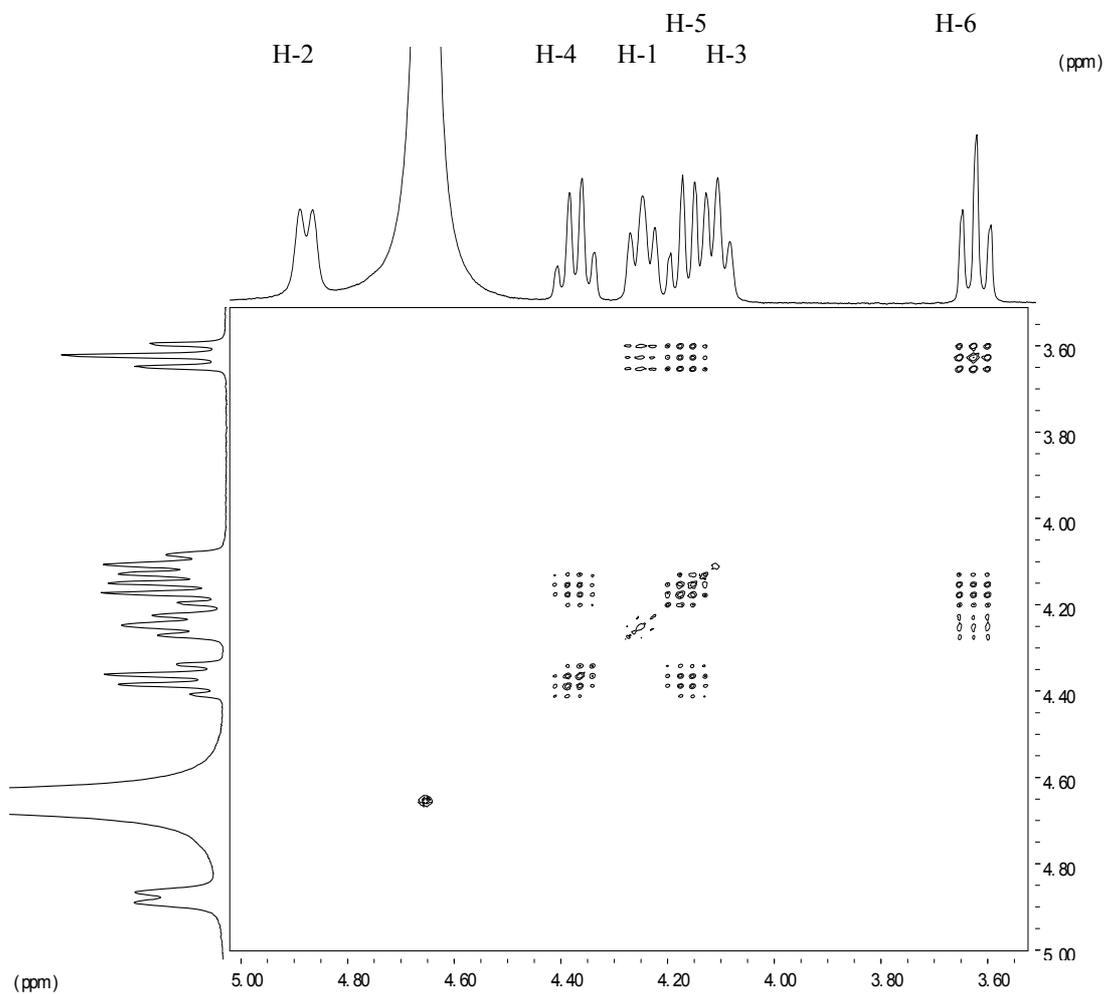
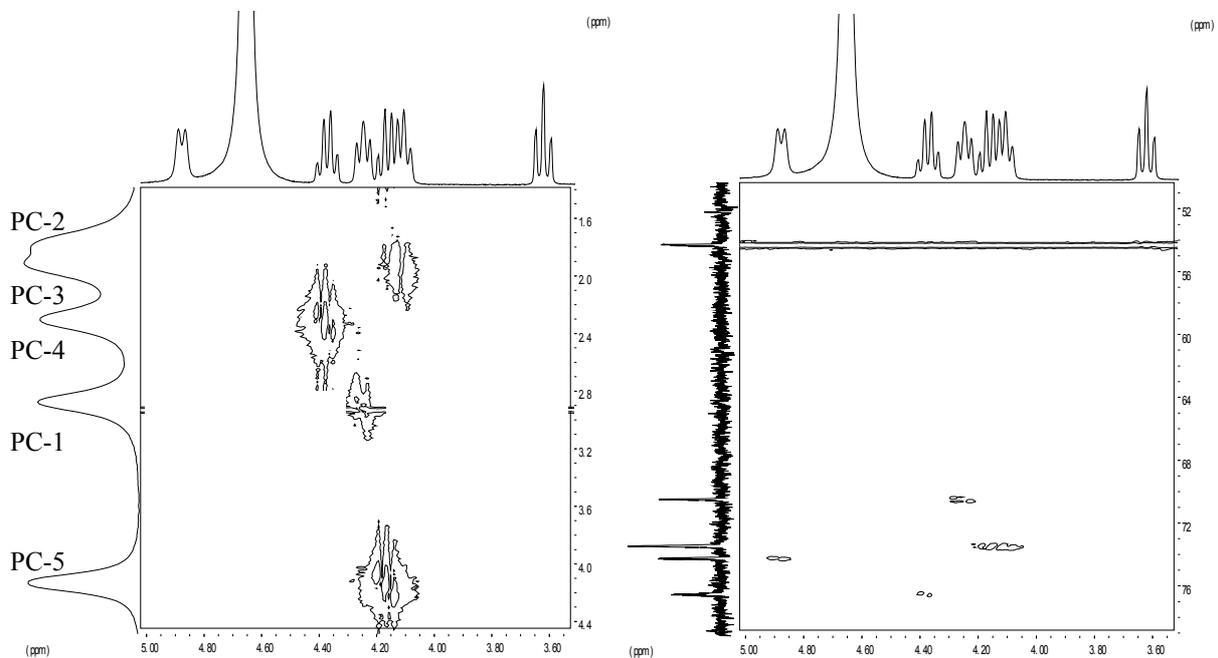
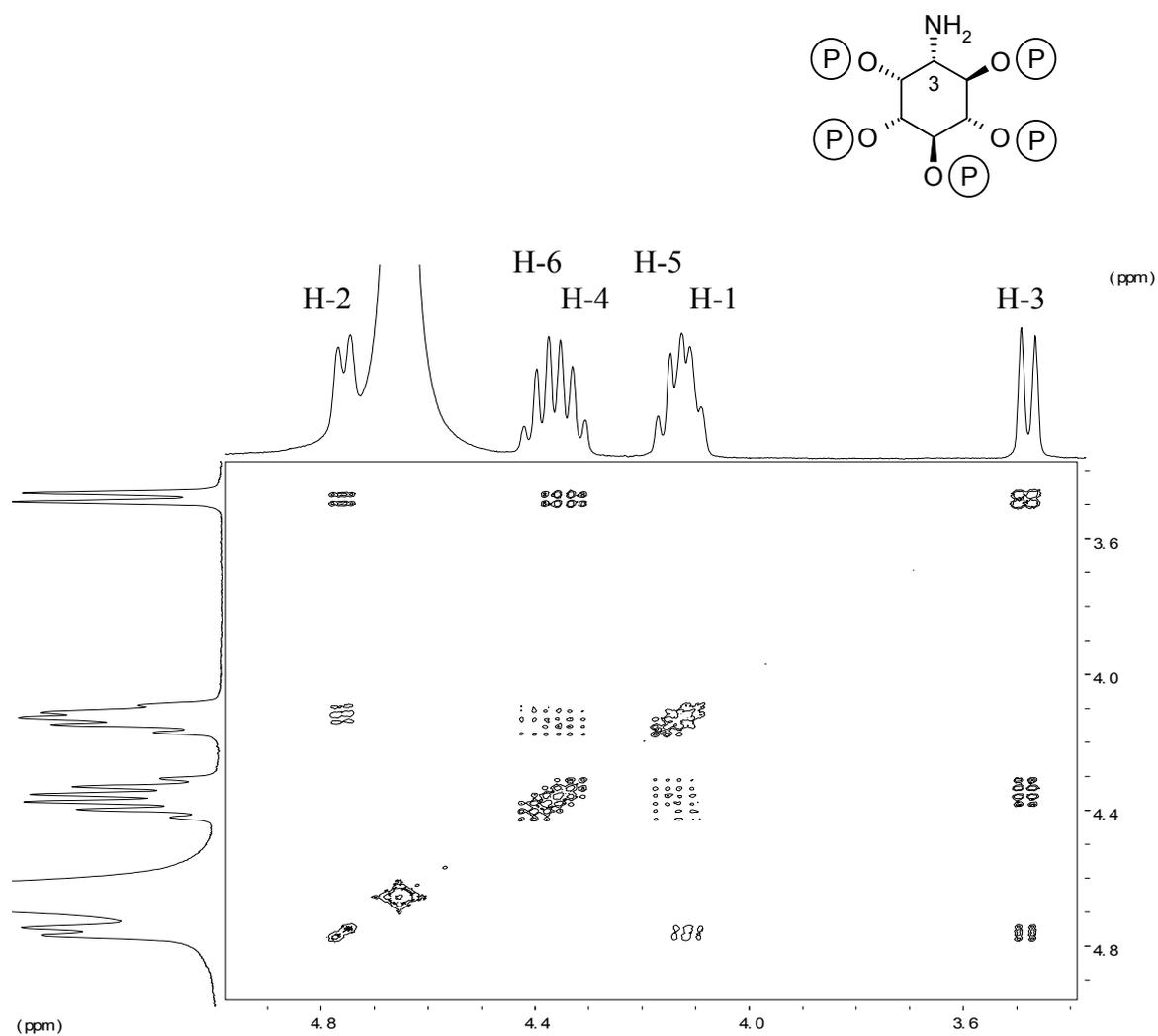


Abbildung 18: $^1\text{H}-^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Cosy-Spektrum bzw. $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ -Cosy-Spektrum von 6-Amino-*myo*-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat (-)-**81**



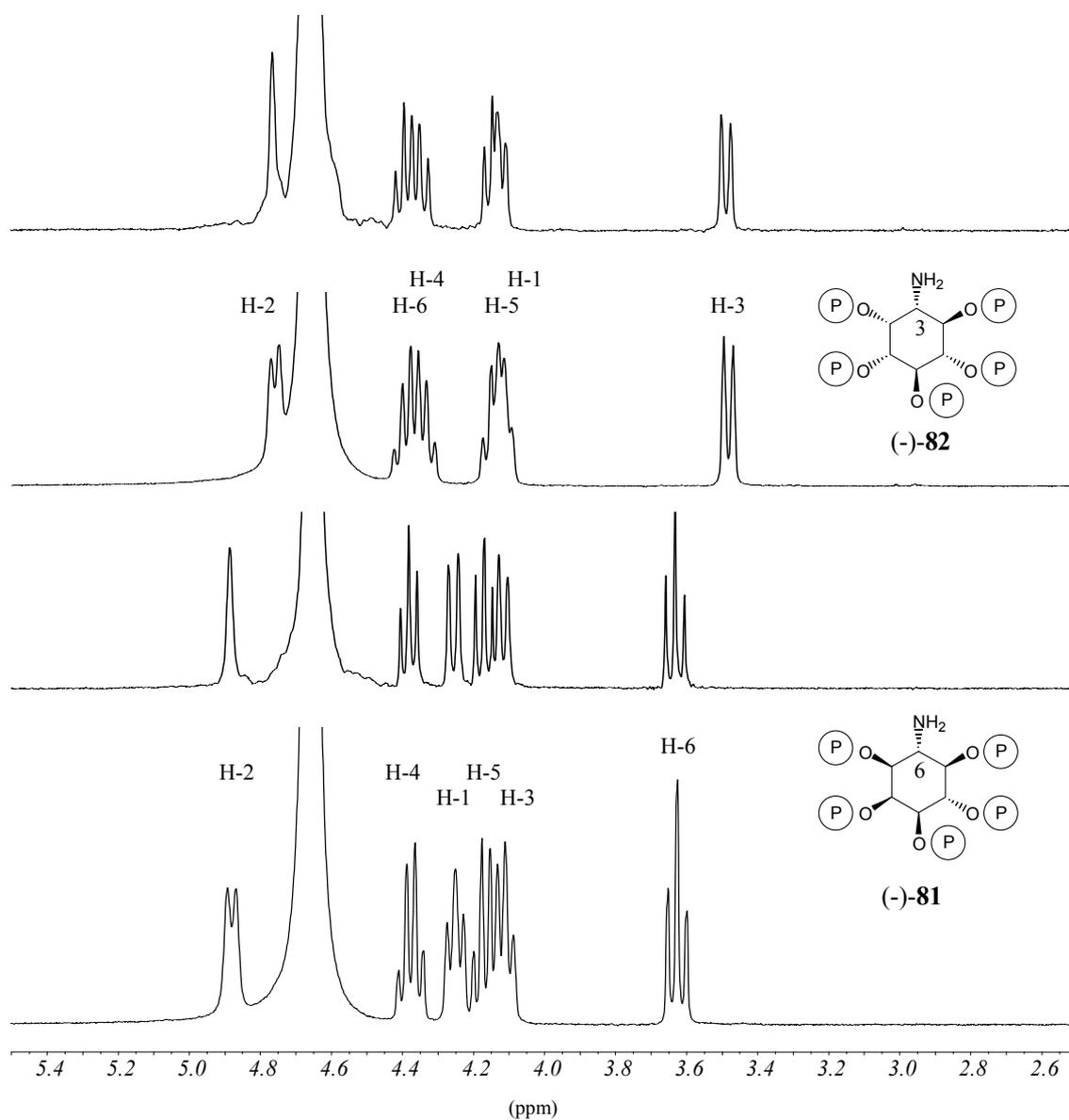
Aufgrund von langen Relaxationszeiten sind im Spektrum nicht immer alle Kopplungen zu sehen. Hier ist deutlich sichtbar, daß im $^1\text{H}-^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Cosy-Spektrum für das H-2 keine Kopplung zum Phosphor zu erkennen ist, obwohl der obig gezeigte Vergleich von $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -mit dem ^1H -NMR-Spektrum eindeutig eine starke Phosphorkopplung zum H-2 aufweist. Mittels $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ -Cosy-Spektrum lassen sich alle ^{13}C -Signale eindeutig zuordnen. Sehr charakteristisch ist die Lage des C-6 mit 56 ppm. Leider liegt in diesem Fall das Signal genau unter einer HDO-Spiegelung. Diese ist als Horizontale im Spektrum zu erkennen. Alle übrigen Ringprotonen sind üblicherweise zwischen 68 und 79 ppm aufzufinden.

Analoges gilt bei der NMR-spektroskopischen Betrachtung des 3-Amino-*myo*-inositol-pentakisphosphat **82**.

Abbildung 19: ^1H - ^1H -NMR Spektrum (-)-82

Durch die Aufnahme von ^1H - ^1H -Cosy-NMR-Spektren konnten die Signale aller Ringprotonen eindeutig zugeordnet werden. Ausgehend vom charakteristischen Signal des H-3 bei 3.48 ppm und unter dem obig beschriebenen Aufspaltungsmuster ergibt sich die getroffene Zuordnung.

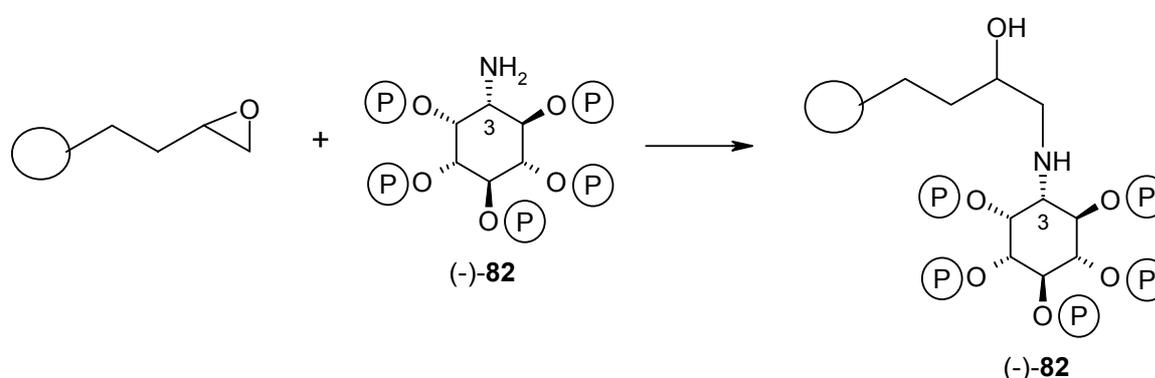
Abbildung 20: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von 3-Amino-*myo*-Ins(1,2,4,5,6) P_5 **82** und 6-Amino-*myo*-Ins(1,2,3,4,5) P_5 **81**



2.2.2.2 Synthese von Affinitätsmaterial mit Hilfe der Aminoinsitolpentakisphosphate

Neben der Synthese zahlreicher Diazido-, Amino- und Acetamido-*myo*-inositolpolyphosphate und ihrer biologischen Anwendung besitzt diese Verbindungsklasse ein weit höheres Potential. So lassen sich **82** und **81** über die Aminogruppe an ein Trägermaterial kovalent anbinden.

Schema 9: Anbindung an Trägermaterialien mit epoxy-aktivierten Gruppen



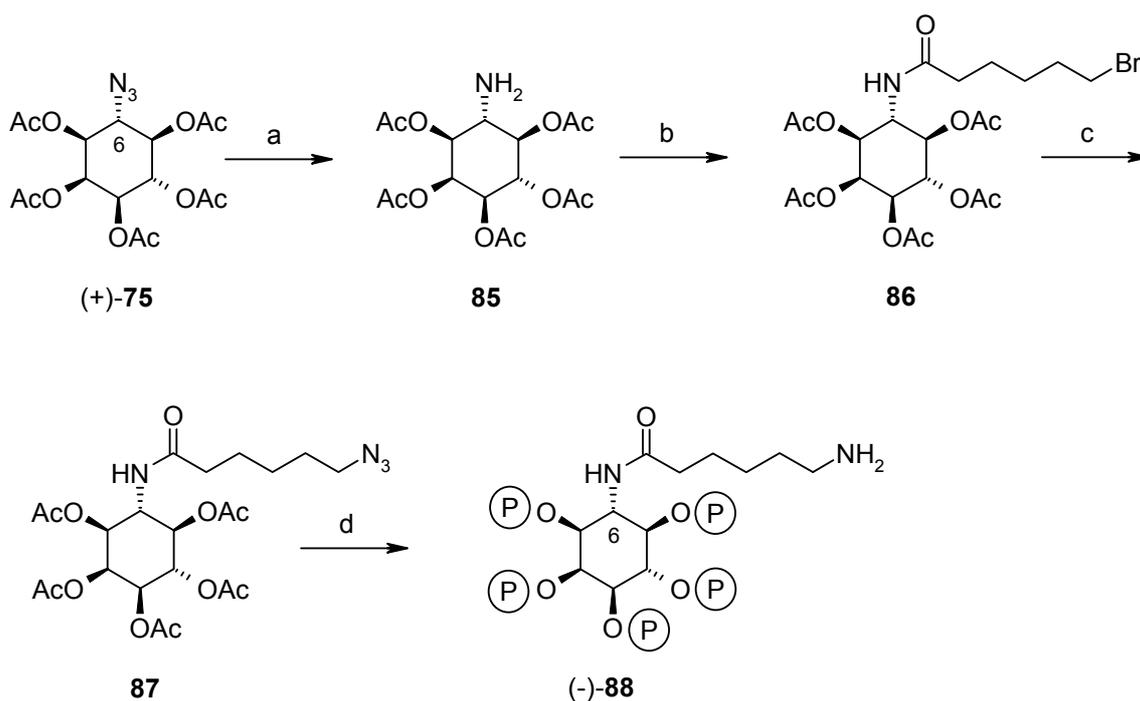
Als Trägermaterial wurde epoxy-aktivierte Sepharose (Ligand: 1,4-Bis(2:3-epoxypropyl)-butan; Spacer 12 Atome; 19-40 μmol pro ml) verwendet. Zuerst wurde 3-Amino-*myo*-Ins(1,2,4,5,6) P_5 (**-82**) in einem Puffer (pH = 11) gelöst und das Trägermaterial zur Reaktionslösung gegeben. Zur Quantifizierung der gebundenen Verbindung wurde das zuvor gründlich mit Wasser gewaschene Trägermaterial in 10 M H_2SO_4 im Borsilikat-Glas verkocht und das freigesetzte Phosphat bestimmt. Dabei konnte in keinem Versuch eine Anbindung nachgewiesen werden. Die Probleme bei der Anbindung der Amino-*myo*-inositolpentakisphosphate an die epoxy-aktivierte Matrix beruhten vermutlich in der Protonierung der Aminogruppe durch nachbarständige Phosphatgruppen. Durch die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung ist eine Deprotonierung erst bei einem pH-Wert von über 10 zu beobachten, so daß die Epoxidöffnungsreaktion im stark alkalischen erfolgen mußte. Die vorliegenden Hydroxid-Ionen öffnen dabei ebenfalls das Epoxid in einer Konkurrenzreaktion.¹¹² Dies führt nach 12 h Reaktionszeit zu einer vollständigen Hydrolyse der Epoxidgruppen, weshalb die Ausbeute stark vermindert (unter 3 Prozent bezogen auf eingesetztes Amino-*myo*-inositolpentakisphosphat) wurde.

Optimierungsversuche, wie die Variation des pH-Wertes, waren alle nicht erfolgreich. Deshalb wurde das Konzept stark überarbeitet und es wurde vor allem nach einem anderen,

nichtwässrigen Lösungsmittel gesucht. Als ideal erwies sich dabei Pyridin als Lösungsmittel, da es basisch ist und somit es zur Deprotonierung der Phosphat- bzw. Aminogruppe kommt, und zum anderem die Epoxidöffnung aktiviert. Durch Verwendung von Pyridin anstelle wässriger NaOH-Lösung konnten schließlich Anbindungsraten von 10% erreicht werden.

Um die Darstellung von Affinitätsmaterialien zu vereinfachen, konnte zusätzlich eine Synthesesequenz entwickelt werden, die eine Spacergruppe am Amin einführt. Das sekundäre Amin bei **82** ist, wie bereits oben beschrieben wurde, aufgrund der Protonierung durch die benachbarten Phosphatgruppen äußerst unreaktiv. Durch die Einführung eines Spacers am Amin, der zusätzlich eine endständige Amino-Funktionalität trägt, sollte diese Verbindung leichter an das Affinitätsmaterial anbindbar sein.

Schema 10: Darstellung von 6-Desoxy-6-Hexansäure(6'-amino)-amido-*myo*-inositol-1,2,3,4,5,-pentakisphosphat (-)-**88**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Pd/C, H₂, EtOAc. – (b) 6-Bromhexansäurechlorid, abs. CHCl₃, NEt₃. – (c) NaN₃, 18-Krone-6, DMF. (d) 1. NaOMe, MeOH. 2. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, abs. CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA. 2. Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser (10% über alle Stufen).

Dazu wurde zuerst das Azid **75** unter Pd/C-Katalyse hydriert. Da die Schutzgruppenwanderung auf dieser Stufe eine Aufreinigung nicht zweckmäßig erscheinen läßt, wurde das erhaltene Amin **85** ohne jegliche Aufreinigung gleich weiter umgesetzt. Anschließend wurde das leicht erhältliche 6-Bromhexansäurechlorid unter basischen Bedingungen mit dem Amin **85** umgesetzt. Das Bromid bei **86** wurde unter äußerst milden Bedingungen unter 18-Krone-6 Katalyse in DMF durch Azid substituiert.

Nach basischer Entschützung folgte die Phosphorylierung unter den bereits zuvor genannten Bedingungen. Erst auf dieser Stufe erfolgte die grobe Aufreinigung mit Flash-Säulenchromatographie auf Kieselgel. Das Produkt ist aber immer noch nicht ausreichend rein, sodaß das Produkt noch einmal nach Pd/C-katalysierter, hydrogenolytischen Entschützung mittels HPLC aufgereinigt werden mußte. Die Aufreinigung liefert letztendlich in 10%iger Ausbeute über alle Stufen das Amino-pentakisphosphat (-)-**88** (¹H-NMR siehe Abbildung 74, S. 241).

Damit konnte erstmalig 6-Desoxy-6-Hexansäure(6'-amino)-amido-*myo*-inositol-1,2,3,4,5,-pentakisphosphat (-)-**88** synthetisiert werden, welches sich wohlmöglich weitaus besser als Affinitätsmaterial eignen dürfte, da eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung vermindert sein dürfte. Ein solches Affinitätsmaterial dürfte bei der Aufreinigung von *myo*-Inositolpolyphosphat-erkennenden Enzymen (z. B. Kinasen) behilflich sein, eine Idee, die zur Zeit im Arbeitskreis Vogel (Biochemie) in Wuppertal weiterverfolgt wird.

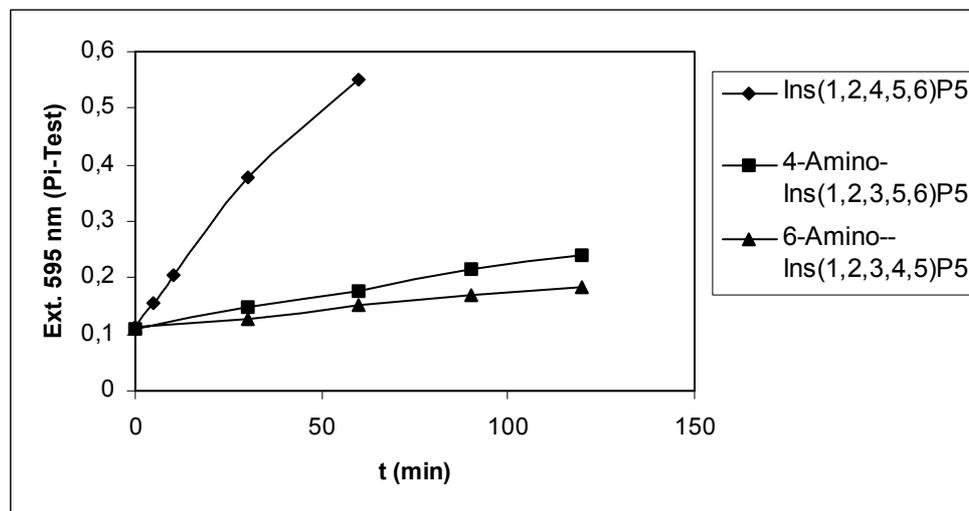
2.2.2.3 Enzymatische Umsetzungen der Amino-*myo*-inositolpentakisphosphate mit der InsP₅/InsP₄-Phosphohydrolase und Phytase aus *Dictyostelium discoideum*

Die zuvor im Abschnitt 2.2.2 synthetisierten Amino-*myo*-inositolpentakisphosphate **81** und **82** sind aufgrund ihrer Substitutionsmuster ideale Substrate für den Einsatz in einer gezielten Dephosphorylierung mit der InsP₅/InsP₄-Phosphohydrolase aus *Dictyostelium discoideum*. Wie Adelt und Plettenburg bereits aufzeigen konnten, erfolgt bei diesem Enzym die Dephosphorylierung von *myo*-Inositolpolyphosphaten ausschließlich in Nachbarschaft zu *trans*-ständigen OH-Gruppen. Die Aminogruppe bei den Amino-*myo*-inositolpentakisphosphaten ist dabei elektronisch, aufgrund Van der Waals Radien, fast wie eine freie OH-Gruppe zu betrachten und daher kann man bereits aufbauend auf diesem Modell der Positionsspezifität die möglichen Abbauege vorhersagen.

Um zu klären, ob diese Amino-inositole überhaupt Substrate für die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphohydrolase bzw. Phytase sind, wurden zuerst Kinetiken der enzymatischen Umsetzungen aufgenommen. Bei den kinetischen Umsetzungen zeigte sich, daß alle Amino-inositol-pentakisphosphate als Substrate erkannt werden.

Die kinetischen Messungen mit der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphohydrolase zeigten, daß beide Verbindungen mit vergleichbaren Geschwindigkeiten umgesetzt werden (siehe Abbildung 21). Ebenfalls wurde *myo*- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ (-)-**29** (Synthese siehe Abschnitt 2.3.2.1) als relativer Standard enzymatisch umgesetzt.

Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Dephosphorylierung von (+)- und (-)-**81** gemessen über eine Phosphatbestimmung ($\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphohydrolase aus *Dictyostelium discoideum*)



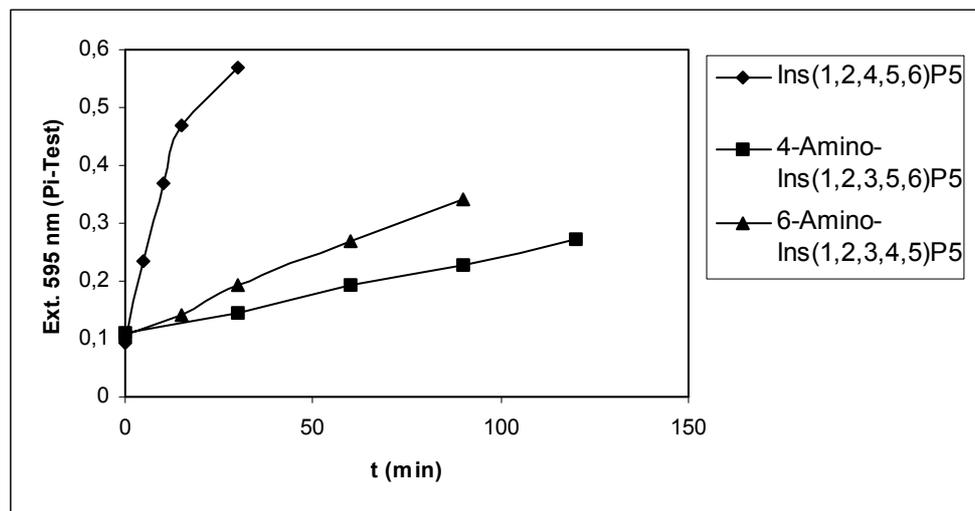
Bedingungen für die HPLC-Messungen: 0.22 Extinktionseinheiten entsprechen 2 nmol Phosphat; Ausgangskonzentration $c = 200 \mu\text{M}$ (120 μl Probenvolumen, entspricht 24 nmol) an entsprechender Verbindung.

Im Vergleich zu *myo*- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ (-)-**29** wird 4- NH_2 -*myo*- $\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$ (+)-**81** bzw. 6- NH_2 -*myo*- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ (-)-**81** mit einer relativen Aktivität von 16% bzw. 7% dephosphoryliert.

In einem analogen Experiment wurde 4- NH_2 -*myo*- $\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$ (+)-**81** bzw. 6- NH_2 -*myo*- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ (-)-**81** enzymatisch mit der Phytase aus *Dictyostelium discoideum* dephosphoryliert (siehe Abbildung 22). Hier zeigte sich das gleiche Bild wie bei der Umsetzung mit der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphohydrolase. 4- NH_2 -*myo*- $\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$ (+)-**81** bzw.

6-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅ (-)-**81** wird mit einer relativen Aktivität von 18% bzw. 6% (im Vergleich zu *myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-**29**) dephosphoryliert.

Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Dephosphorylierung von **81** gemessen über eine Phosphatbestimmung (Phytase aus *Dictyostelium discoideum*)



Bei beiden Enzymen wurde der enzymatische Abbau der Amino-*myo*-inositolpentakisphosphate parallel mit der HPLC-MDD kontrolliert. Dabei zeigte sich, daß der enzymatische Abbau analog den *myo*-InsP_x-Verbindungen über definierte Zwischenstufen erfolgt. Somit werden alle Amino-*myo*-inositolpentakisphosphate als Substratanaloga erkannt und über einen selektiven Abbauweg dephosphoryliert.

Abbauwege bei Umsetzungen mit der InsP₅/InsP₄-Phosphohydrolase:

Es zeigt sich, daß 3-Amino-*myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-**82** und 4-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ (+)-**81** sehr selektiv dephosphoryliert wird. Es entsteht bei beiden Verbindungen jeweils nur ein einziges IP₄, welches gleich weiter abgebaut wird. Dabei reichert sich letztendlich die jeweilige IP₃-Verbindung an, eine Tatsache, die sehr hilfreich bei der präparativen Aufreinigung ist. Vorausgesetzt das Modell der *trans*-ständigen OH-Gruppen ist hierauf übertragbar, dürfte der erste Dephosphorylierungsschritt an der zum Amin benachbarten *trans*-ständigen Phosphatgruppe erfolgen. Somit dürfte 4-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ (+)-**81** über das 4-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,6)P₄ zum 4-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3)P₃ abgebaut werden. Das 3-Amino-*myo*-inositolpentakisphosphat (-)-**82** dürfte zum 3-Amino-*myo*-Ins(1,2,6)P₃ umgesetzt werden.

Abbauwege bei Umsetzungen mit der Phytase:

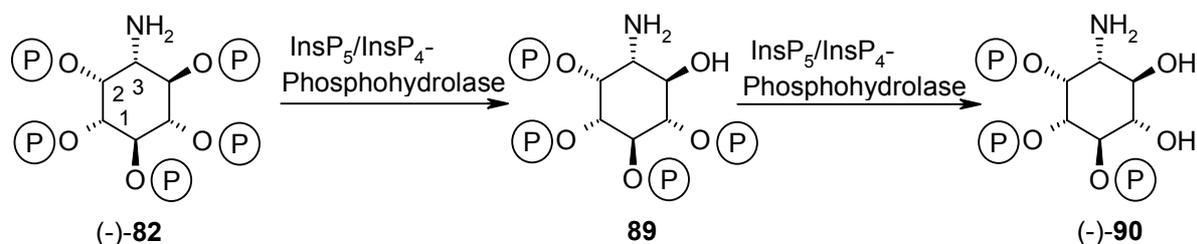
4-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ (+)-**81** wird über zwei Reaktionskanäle im Verhältnis 95:5 umgesetzt. Vermutlich entsteht als Hauptprodukt 4-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,6)P₄ und in geringem Maße 4-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,5)P₄.

Das 6-NH₂-*myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅ (-)-**81** wird ebenfalls selektiv dephosphoryliert und dies wohl hauptsächlich in der 3-Position (90%) und in geringerem Maße in der 5-Position. Die Zuordnung erfolgte in Analogie zu den Erkenntnissen aus der Umsetzung der *myo*-Inositolpentakisphosphate mit Phytasen aus *Dictyostelium discoideum* (Absatz 2.3.2.2, S. 84). Ein letztendlichen Beweis, welche Zwischenprodukte gebildet werden, würde aber nur eine Isolation dieser Abbauprodukte mit anschließender NMR-spektroskopischer Untersuchung liefern. Im Falle des 3-Amino-*myo*-inositolpentakisphosphats (-)-**82** konnte das Abbauprodukt isoliert und charakterisiert werden.

Präparative enzymatische Umsetzung:

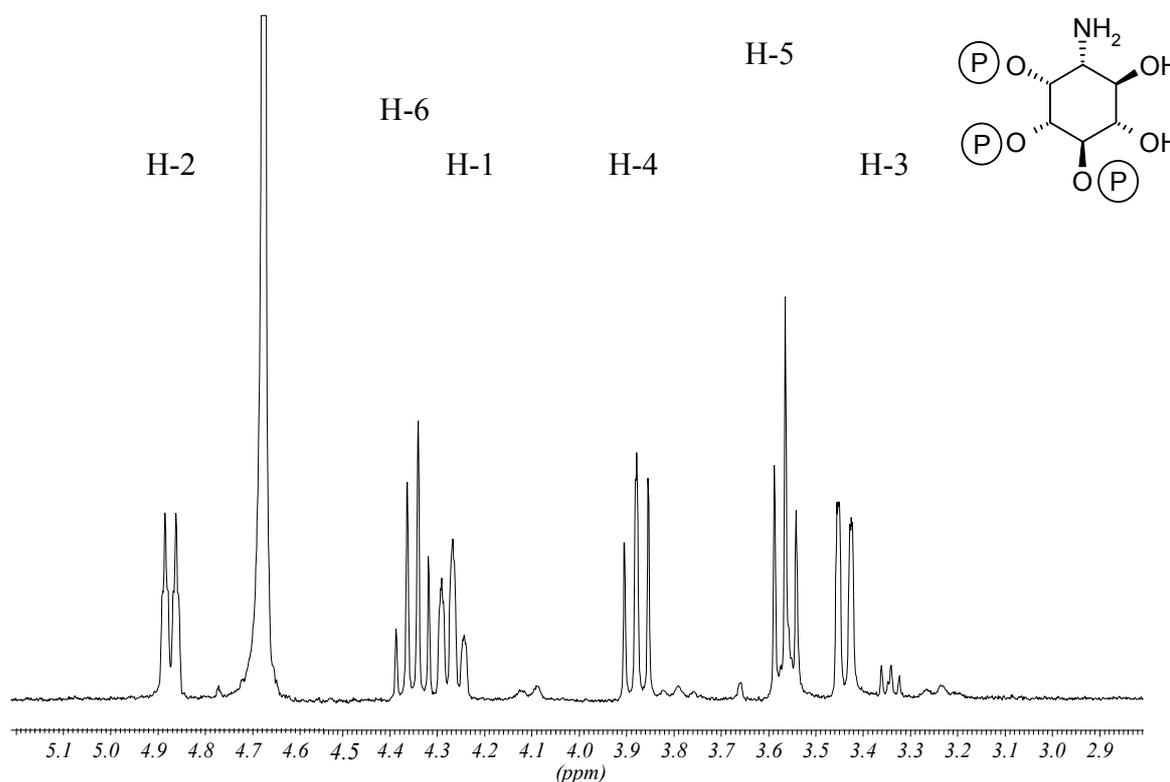
Bei der enzymatischen Umsetzung, die in Zusammenarbeit mit Adelt durchgeführt wurden, wurde ca. 15 μmol 3-Amino-*myo*-inositolpentakisphosphat (-)-**82** mit der InsP₅/InsP₄-Phosphohydrolase umgesetzt. Die Abreaktion wurde mit einem Phosphat-Assay verfolgt und mit HPLC-MDD kontrolliert. Die Reaktionslösung wurde anschließend ionenchromatographisch aufgereinigt, um das Hauptprodukt, das 3-Amino-InsP₃ (-)-**90** zu isolieren.

Schema 11: Umsetzung von Amino-*myo*-inositolpentakisphosphat (-)-**82** mit der InsP₅/InsP₄-Phosphohydrolase aus *Dictyostelium discoideum*



Die erwartete Regioselektivität der enzymatischen Reaktion konnte durch NMR-spektroskopische Methoden bestätigt werden. Das Produkt kann eindeutig als das 3-Amino-*myo*-Ins(1,2,6)P₃ (-)-**90** identifiziert werden. Das Resultat zeigt, daß die Aminogruppe eine ähnliche Rolle wie die Hydroxygruppe bei der enzymatischen Dephosphorylierung spielen kann.

Abbildung 23: ¹H-¹H-NMR Spektrum von 3-Amino-*myo*-inositol-1,2,6-trisphosphat (-)-**90**



Zusammenfassung:

Wie bereits oben erwähnt wurde sind enantiomerenreine Azido-*myo*-inositole sowie Amino-*myo*-inositole wirksame Inhibitoren des Zellwachstums und somit potentielle Antitumor-Therapeutika.^{60,59} Die gezeigte Synthese führt effizient und hochselektiv zu Vertretern dieser Verbindungsklasse. Darüber hinaus konnten weitere interessante Anwendungen mit diesen Verbindungen etabliert werden, welche das große Potential dieser Azido-/Amino-*myo*-inositole aufzeigen.

2.3 Darstellung der *myo*-Inositolphosphate

Analog der Synthese der Azido- bzw. Amino-*myo*-inositole (Kapitel 2.2) kann man bei der Synthese der *myo*-Inositolphosphate ebenfalls grundsätzlich alle retrosynthetischen Betrachtungen auf das symmetrische (Kapitel 2.1.2.1) sowie desymmetrisierende Konzept (Kapitel 2.1.2.2) zurückführen. Das symmetrische Konzept liefert über einen hochspezifischen Weg zahlreiche *myo*-Inositolphosphate. Durch dieses Konzept kommt es aber zu einer paarweisen Differenzierung der einzelnen Hydroxy-Gruppen. Dadurch ist die Anzahl, der über diesen Weg darstellbaren Produkte von vorneherein limitiert. Auf nahezu ideale Weise ergänzt sich bei der Darstellung der *myo*-Inositolphosphate das desymmetrisierende Konzept mit dem symmetrischen Konzept. Durch eine Monofunktionalisierung des Konduritol-Bausteins lassen sich *myo*-Inositolpentakisphosphate sowie *myo*-Inositolmonophosphate darstellen.

Das Hauptaugenmerk bei der Synthese von *myo*-Inositolphosphaten lag in der Erweiterung des durch Ritter⁸⁶ und Plettenburg⁸⁷ entwickelten symmetrischen Konzeptes. In Ergänzung zu diesem Weg sollte eine neue Syntheseroute über unsymmetrische Zwischenstufen in enantiomerenreiner Form etabliert werden.

2.3.1 Darstellung der *myo*-Inositolphosphate mittels symmetrischem Konzept

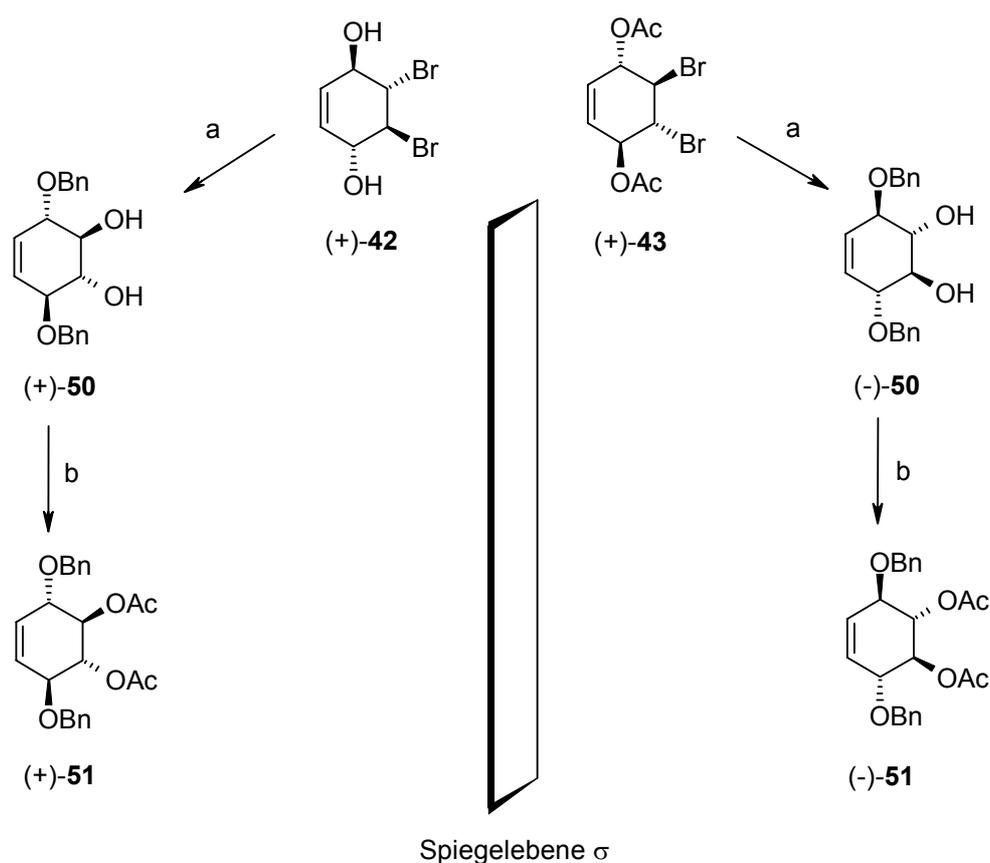
myo-Inositolmono-, *myo*-Inositolbis- und *myo*-Inositoltrisphosphate wurden durch Variation des bei der Darstellung des Monophosphates *myo*-Ins(1)P (-)-**11** aufgezeigten Synthesewegs dargestellt. Dieser Syntheseweg wird zunächst ausführlich beschrieben.

Erste zentrale Zwischenstufen bei der Synthese von *myo*-Ins(1)P bzw. seines optischen Antipoden *myo*-Ins(3)P sind die Konduritol B Derivate **50** und **51**, welche nachfolgend weiter funktionalisiert werden. Dieser Baustein wurde bereits durch Ritter⁸⁶ und Plettenburg⁸⁷ als Grundkörper für die Synthese der *myo*-Inositolphosphate verwendet. Aufbauend auf diesen Arbeiten sollten weitere Inositolphosphate dargestellt werden.

2.3.1.1 Darstellung der zentralen Zwischenstufe 2,3-Di-*O*-acetyl-1,4-di-*O*-benzylkonduritol B (+)-51

Die Benzylieerung des aus der Racematspaltung erhaltenen (+)-5,6-Dibrom-2-cyclohexen-1,4-diol **42** wurde mit Natriumbenzylat in Benzylalkohol/THF in einen Einstufenprozeß durchgeführt. Das (+)-Diacetat **43** konnte bei diesen Reaktionsbedingungen analog umgesetzt werden. Das Rohprodukt enthält S_N'-Nebenprodukte, die unbedingt abgetrennt werden müssen. Die Ansatzgrößen von über 100 g ließen aber eine säulenchromatographische Aufreinigung, wie sie Ritter und Plettenburg im enantiomerenreinen Fall beschrieben, nicht praktikabel erscheinen. Im Gegensatz zum racemischen Rohprodukt erwies sich die Umkristallisation des enantiomerenreinen Rohprodukts als problematisch.

Schema 12: Synthese von (+)-2,3-Di-*O*-acetyl-1,4-di-*O*-benzylkonduritol B **51**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) BnOH, THF, NaOBn [99%]. – (b) Ac₂O, Pyridin [76%].

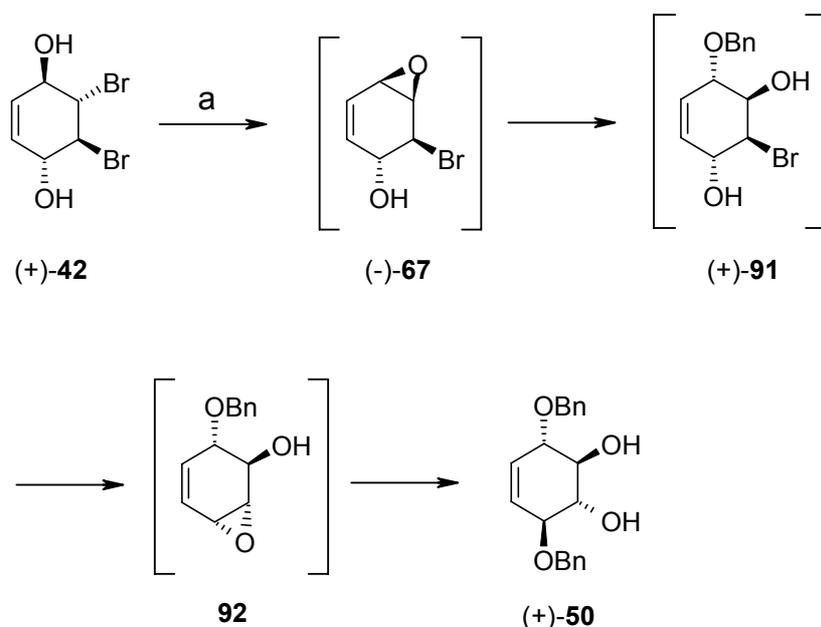
Umkristallisationsversuche aus Essigsäureethylester-Cyclohexan-Gemischen blieben erfolglos. Durch Wechsel des Lösungsmittels zu reinem Essigsäureethylester konnte schließlich

eine akzeptable Aufreinigung des Rohprodukts erreicht werden. Diese Methode lieferte einen rötlich-braunen öligen Feststoff (+)-**50**. Die Ausbeute betrug 99% mit einer Reinheit von über 80%. Das Erreichen eines höheren Reinheitsgrades war nicht erforderlich, da die Verunreinigungen bei der nächsten Stufe nicht störten und das dort erhaltene Produkt kristallisierbar war.

Der Drehwert konnte von (+)-**50** mit $[\alpha]_D^{20} = +134.2$ ermittelt werden und entsprach ca. dem von Klein ($[\alpha]_D^{20} = +132.4$).⁸³ Es sei darauf hingewiesen, daß in der Literatur starke Diskrepanzen zwischen den einzelnen Werten zu beobachten sind. Ritter⁸⁶ erhielt den entgegengesetzten Drehwert mit $[\alpha]_D^{20} = -138.8$, den Zimmermann¹¹³ bestätigte ($[\alpha]_D^{20} = -130.3$).

Bei mechanistischer Betrachtung zeigt sich die Inversion sämtlicher Stereozentren des Eduktes im Vergleich zum Produkt. Dabei wird im Fall des Diacetats **43** zunächst die Acetat-Gruppen durch Benzylat abgespalten. Das durch die starke Base erzeugte Alkoholat bildet durch intramolekulare Substitution des α -Bromatoms als Zwischenstufen *in situ* Allyl-Monoepoxide **67**, **91** bzw. *anti*-Benzoldioxid **70** (Verbindung nicht abgebildet). Diese werden dann nucleophil über einen Rückseitenangriff an der aktivierten allylischen Position durch Benzylat geöffnet.

Schema 13: Vorgeschlagener Mechanismus der Bildung von (+)-1,4-Di-*O*-benzylkonduritol B **50**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) BnOH, THF, NaOBn.

Die Acetylierung des (+)-1,4-Di-*O*-Benzylkonduritols **50** wurde nach einer Standardvorschrift mit Acetanhydrid in Pyridin durchgeführt.¹¹⁴ Die Ausbeute nach Umkristallisation an farblosen Feststoff lag bei 76%. Die erfolgreiche Schützung der freien OH-Gruppen konnte im NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Diese Umkristallisation ist entscheidend für den Erfolg dieser Route, da nur so alle S_N'-Nebenprodukte aus der vorigen Synthese restlos entfernt werden können.

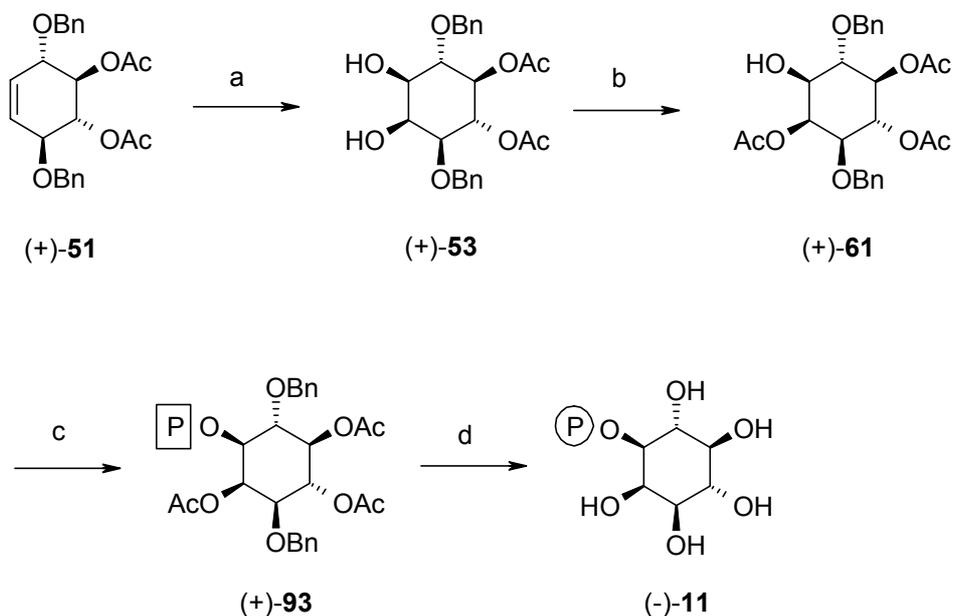
Die Drehwerte weisen wiederum starke Diskrepanzen auf. So konnte der Drehwert von (+)-**51** mit $[\alpha]_D^{20} = +192.2$ ermittelt werden und es zeigte sich erneut, daß sich in vorangegangene Arbeiten ein Fehler eingeschlichen hatte. So setzte Ritter als Edukt (-)-**50** ein, welches wie obig erwähnt das (+)-**50** war, und erhielt (+)-**51**.⁸⁶ Diese Verwirrungen konnten somit endgültig ausgeräumt werden.

2.3.1.2 Darstellung von *myo*-Ins(1)P bzw. *myo*-Ins(3)P (-)- und (+)-11

Funktionalisierung der Doppelbindung mit anschließender Monofunktionalisierung und Phosphorylierung

Die *cis*-Dihydroxylierung an Di-*O*-acetyl-1,4-di-*O*-benzylkonduritols B (+)-**51** erfolgte nach Shing et al.^{102, 103, 104} mit Rutheniumtetroxid in einem Zweiphasensystem aus Essigsäureethylester, Acetonitril und Wasser. Bei strikter Einhaltung aller Reaktionsparameter kann nach Aufarbeitung ein Rohprodukt mit einer Ausbeute von 86% und einer Reinheit von mehr als 97% erhalten werden. Wie in Abschnitt 2.1.2.1 auf Seite 23 bereits grundlegend erwähnt wurde, lieferte diese Reaktion nur ein einziges Produkt, welches in *myo*-Konfiguration vorliegt.

Die anschließende Monofunktionalisierung des 4,5-Di-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-D-*myo*-inositol (+)-**53** erfolgt mit Hilfe von Orthoessigsäuretriethylester und *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator, wobei der Grundkörper mit der freien OH-Gruppe in der 1-Position erhalten wird.^{86,115,116,117} Die Differenzierung der zwei freien OH-Gruppen kann durch deren unterschiedliche Reaktivität erfolgen. Wie gezeigt wurde, steht die Hydroxylgruppe in der 2-Position im Gegensatz zu den restlichen Gruppen axial.

Schema 14: Darstellung von *myo*-Ins(1)P (-)-**11**

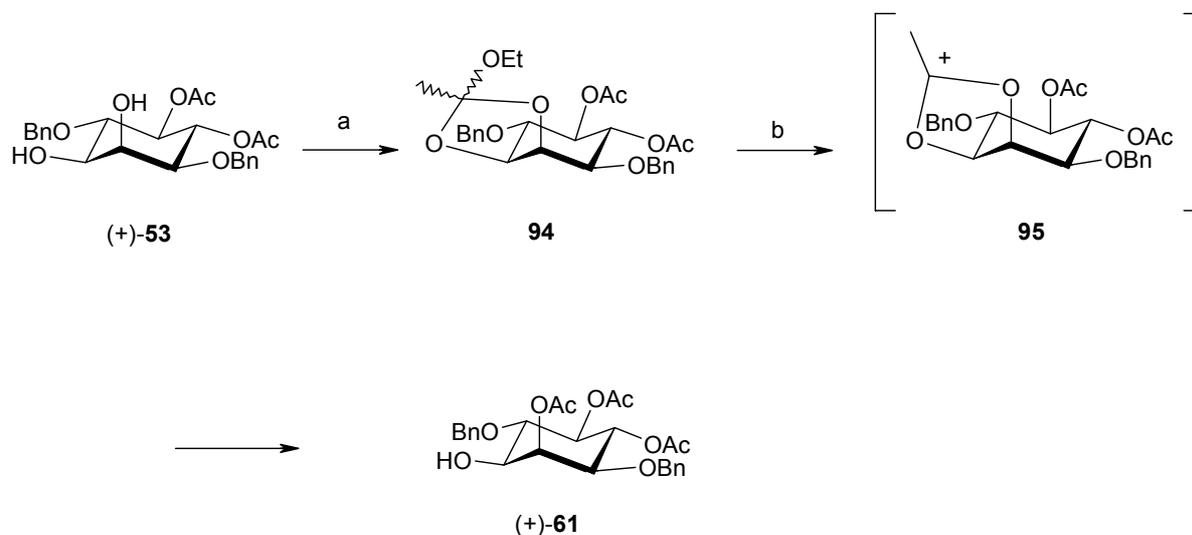
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl_3 , NaIO_4 , Acetonitril/EtOAc [86%]. - (b) 1. $\text{MeC}(\text{OEt})_3$, *p*-TSA. 2. HOAc (80%) [Ausbeute über beide Stufen: 82%]. - (c) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphapan, 1*H*-Tetrazol, CH_2Cl_2 dann *m*-CPBA [60%]. - (d) 1. Pd/C, H_2 , Ethanol/Wasser. 2. 0.25 N NaOH [99%].

Bei der säurekatalysierten Umsetzung von (+)-**53** mit Orthoessigsäuretriethylester wird zunächst der Orthoester **94** als Diastereomergemisch erhalten. Dieser wird anschließend mit wäßriger Essigsäure gespalten. Da die protonenkatalysierte Ringöffnung eine ionische Zwischenstufe, bei der das Kohlenstoffatom, welches die positive Ladung trägt als sp^2 -Hybrid vorliegt, durchläuft, und damit planar ist, geht die Stereoinformation an diesem Kohlenstoffatom verloren.

Das Dioxolium-Ion **95** wird nun über einen Vorderseitenangriff nucleophil durch Wasser angegriffen. Orbitalelektronische Gründe führen letztendlich dazu, daß der Hemi-Orthoester nur zum axialen Ester (+)-**61** umlagern kann.¹¹⁸

Das Produkt wurde Flash-säulenchromatographisch aufgereinigt. Da das Rohprodukt nur geringe Mengen an Edukt und weiteren Verunreinigungen (ca. 5-10%) enthielt, konnte alternativ auch eine Kieselgelfiltration durchgeführt werden.

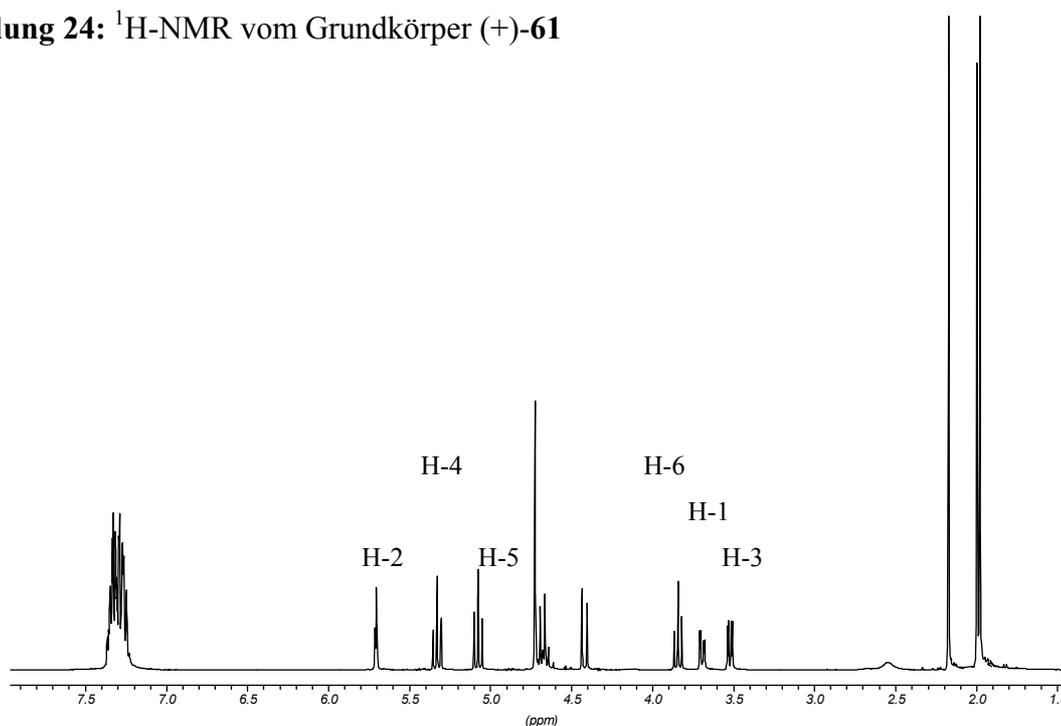
Das Produkt wurde in 82%-iger Ausbeute im Fünfgrammaßstab als farblose Kristalle isoliert.

Schema 15: Zwischenstufen bei der Monofunktionalisierung

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 1. $\text{MeC}(\text{OEt})_3$, $p\text{-TSA}$. 2. HOAc (80%).

Die Monofunktionalisierung kann im $^1\text{H-NMR}$ (siehe Abbildung 24) leicht überprüft werden. So liegt das Pseudotriplett des Protons an der 2-Position nun stark tiefeldverschoben bei 5.70 ppm (vgl. Edukt: 4.21 ppm) vor. Die Lage des H-1 Protons bleibt hingegen, im Vergleich zum Edukt, nahezu unverändert (Verschiebung von 3.58 nach 3.68 ppm).

Abbildung 24: $^1\text{H-NMR}$ vom Grundkörper (+)-61



Die Phosphorylierung der freien Hydroxylgruppe, unter Standardbedingungen mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol in Dichlormethan und anschließender Oxidation des resultierenden Phosphits mit *m*-Chlorperbenzoesäure, lieferte (+)-**93**. Zur Abtrennung des Phosphorylierungsmittels ist eine flash-säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) nötig. Die Abspaltung der Schutzgruppen durch Hydrogenolyse, gefolgt von basischer Verseifung der Acetatgruppen, liefert analysenreines *myo*-Ins(1)P (-)-**11**. Das Enantiomer *myo*-Ins(3)P (+)-**11** wurde ebenfalls auf analogem Wege, ausgehend von (-)-**51**, dargestellt.

Biologische Bedeutung: *myo*-Ins(3)P (+)-**11** kommt natürlich als Produkt der Inositol-Synthase vor, welche die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat **10** zu Inositol-3-Phosphat **11** katalysiert. Das nach enzymatischer Dephosphorylierung des Inositolmonophosphats gebildete *myo*-Inositol kann durch Epimerisierungsreaktionen in die anderen natürlich auftretenden Isomere überführt werden (siehe auch Abschnitt 2.4: Darstellung der Inositolstereoisomeren).¹¹⁹

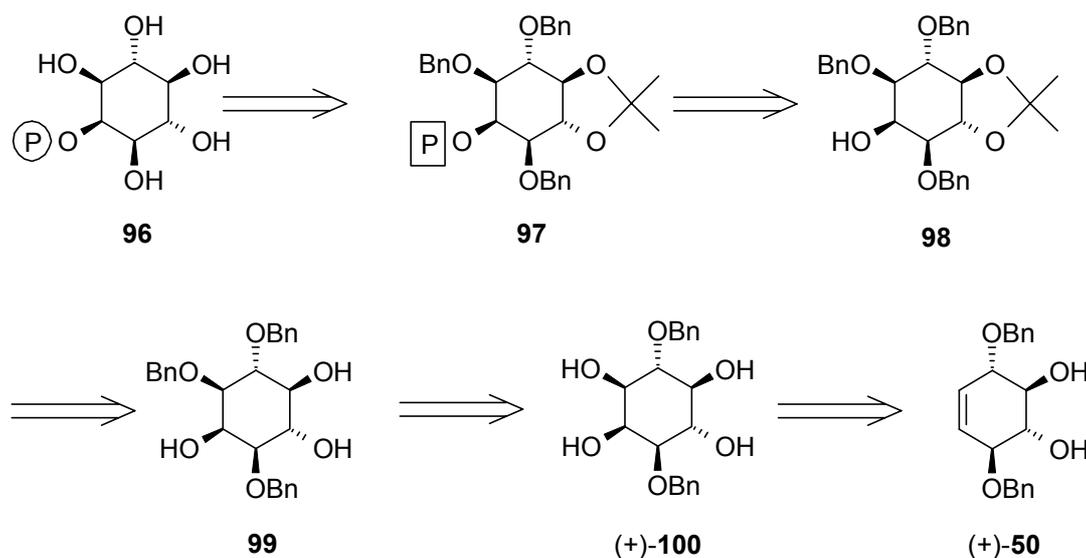
2.3.1.3 Konzept der gezielten Schutzgruppenmigration: Darstellung von *myo*-Ins(2)P **96** und *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (+)-**105** bzw. *myo*-Ins(1,2,4)P₃ (-)-**105**

Die gezielte orthogonale Schützung von Hydroxylgruppen an Inositolen ist eine Grundvoraussetzung zur Synthese zahlreicher Inositolphosphate. Häufig beobachtet man aber Schutzgruppenmigrationen, die meist zu Nebenprodukten führen, die nur schwer abgetrennt werden können. Mit einer neuen Konzeption, nämlich die Migration von Schutzgruppen gezielt auszunutzen und in die Syntheseplanung mit einzubeziehen, sollte das symmetrische Konzept gezielt erweitert werden. Damit wäre erstmals die Totalsynthese von *myo*-Ins(2)P **96** sowie von *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (+)-**105** möglich.

Darstellung von *myo*-Ins(2)P **96**

Versuch der Synthese von *myo*-Ins(2)P **96 über eine gezielte Schützung der 1-OH-Gruppe:** Nach der obig beschriebenen hochselektiven Schützung der 2-Position sollte für die Synthese von *myo*-Ins(2)P **96** zuerst die äquatoriale OH-Gruppe (1-Position) regioselektiv geschützt werden.

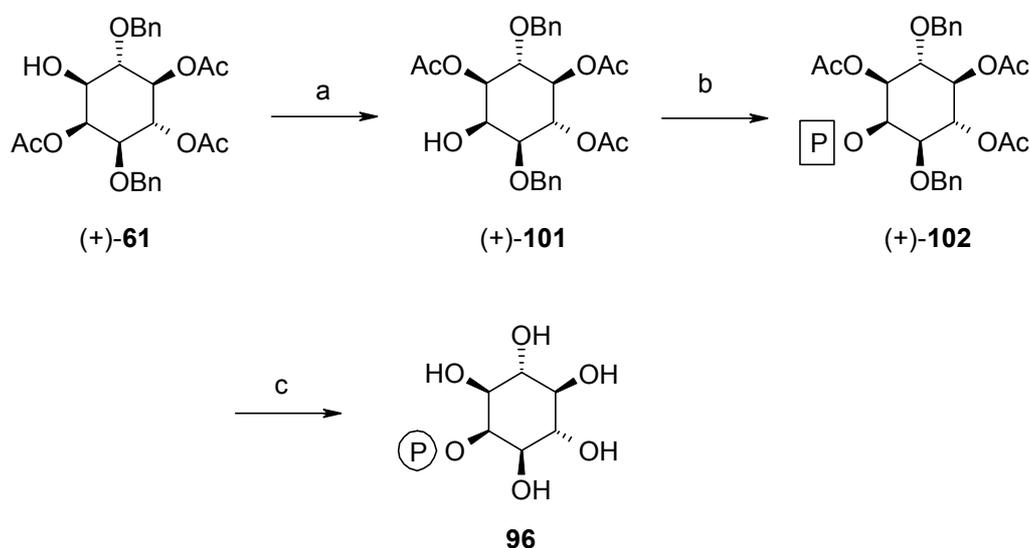
Schema 16: Retrosynthetische Betrachtung zur Darstellung von *myo*-Ins(2)P **96**



Wie bereits durch Plettenburg⁸⁷ an racemischen **100** aufgezeigt wurde, sollte es möglich sein, in einer Zweistufensynthese selektiv die äquatoriale 1-OH-Gruppe zu benzylieren. Dazu wurde das Tetrol **(+)-100**, welches durch *cis*-Dihydroxylierung aus **(+)-50** leicht zugänglich ist, mit Benzaldehyd unter Zinkchloridkatalyse acetalysiert. Das Rohprodukt, das aus dem *endo*- und dem *exo*-Produkt bestand, wurde ohne weitere Aufreinigung gleich weiter umgesetzt. Das so erhaltene Acetal wurde nach einer von Chan¹²⁰ entwickelten Methode mit Boran-Tetrahydrofuran-Komplex und Dibutylboryltrifloursulfonat reduziert. Dabei sollte nach Plettenburg das Produkt mit der äquatorialen Benzylgruppe **99** entstehen. Eine nachfolgende Schützung der Dioleinheit als Isopropylidenketal ist mit 2,2-Dimethoxypropan problemlos durchführbar. So sollte es möglich sein, in zwei Stufen zu einer Vorstufe zu gelangen, die fast direkt in das geschützte Monophosphat überführbar wäre. Leider führten mehrere Reduktionsversuche des Acetals zu keinem oder nur geringem Umsatz und es zeigte sich zudem, daß die Reaktion unselektiv abläuft. Da die Abtrennung des Boran-Reagenzes sich zusätzlich als außerordentlich schwierig erwies, wurde dieser Syntheseansatz nicht weiter verfolgt.

Synthese von *myo*-Ins(2)P (96) über gezielte Schutzgruppenwanderung: Parallel dazu wurde nach einer Alternative zur Synthese von *myo*-Ins(2)P **96** gesucht. Kozinski¹²¹ berichtete von gezielter basenkatalysierter Schutzgruppenwanderung. Dabei wurde eine axiale Benzoat-Gruppe unter Kaliumcarbonat-Katalyse gezielt auf die benachbarte äquatoriale OH-Gruppe verschoben. In diesem Fall ist die thermodynamisch treibende Kraft der Schutzgruppenwanderung die größere Stabilität der äquatorialen Benzoat-Gruppe im Produkt. Dieser Ansatz müßte auf unser System übertragbar sein, zumal die äquatoriale Acetat-Gruppe beim Produkt ebenfalls thermodynamisch stabiler ist und damit eine Rückreaktion nur bedingt zu erwarten sein dürfte.

Schema 17: Darstellung von *myo*-Ins(2)P **96**



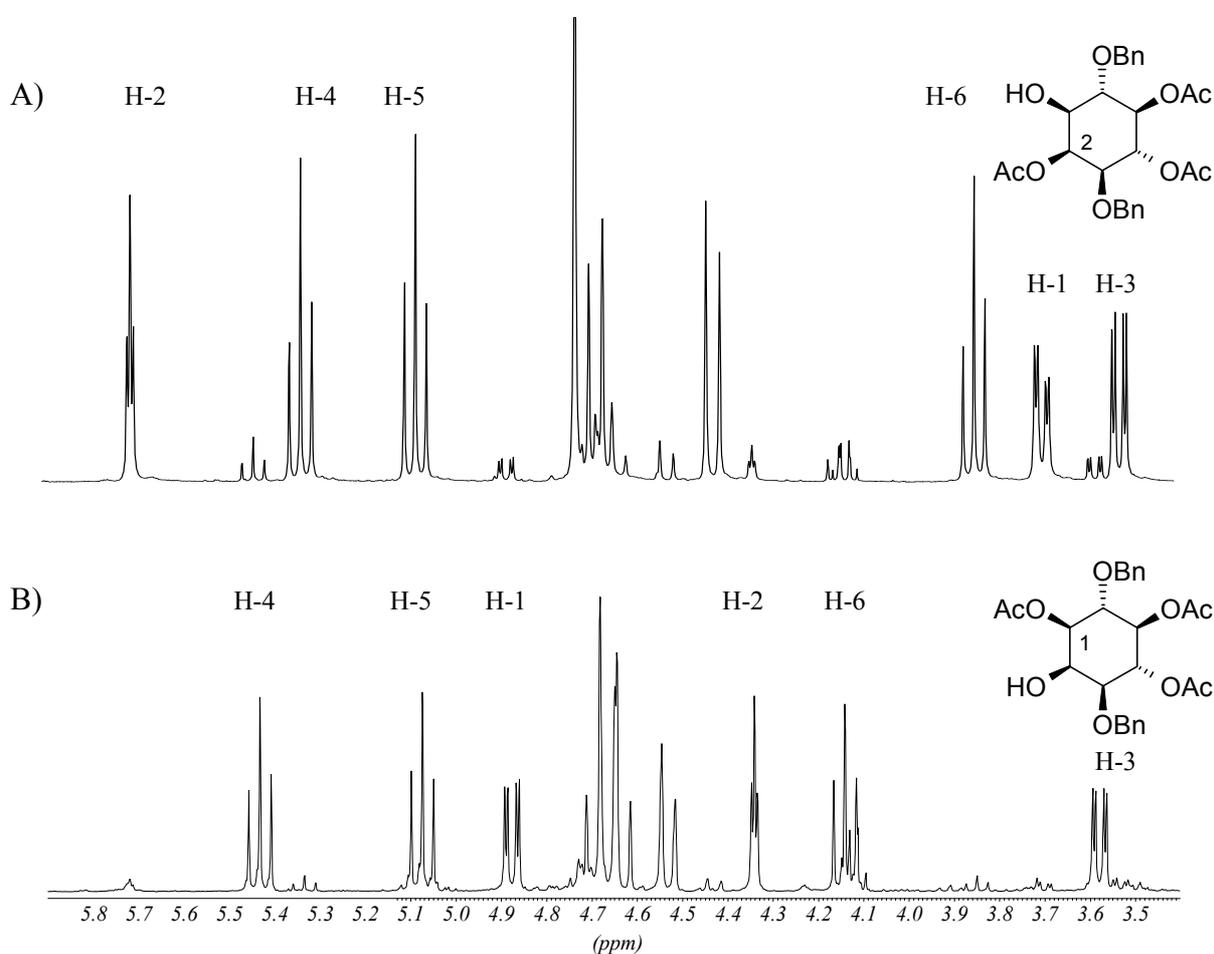
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) TMS-TfI, CH₂Cl₂ [100%]. - (b) 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphospehan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA [60%]. - (c) 1. Pd/C, H₂, Ethanol/Wasser. 2. 0.25 N NaOH [98%].

Eine ideale Vorstufe für einen solchen Ansatz ist das bereits bei der Synthese von *myo*-Ins(1)P in Multigrammmengen dargestellte 2,4,5-Tri-*O*-acetyl-*D*-*myo*-inositol (+)-**61** sein. Die von De Ninno et al.^{122, 123} an einem Zuckersystem angewendeten Reaktionsbedingungen, nämlich in absolutem Dichlormethan unter Zusatz von gepulvertem K₂CO₃, wurden auf (+)-**61** angewendet. Nach der Aufarbeitung war dabei lediglich Edukt im NMR-Spektrum zu erkennen. Ebenfalls problematisch bei dieser Reaktion ist, wie zu erwarten war, daß es unter diesen basischen Bedingungen leicht zur Abspaltung der Acetate kommen kann. Bei Überlegungen zum Mechanismus der Acetatwanderung und inspiriert durch die bereits

gemachten Erfahrungen sollten saure Bedingungen geeigneter sein. Dazu wurde (+)-**61** in 80%iger Essigsäure mehrere Tage gerührt. Dabei konnten neben dem Edukt geringe Mengen am Migrationsprodukt **101** detektiert werden. Unter drastischeren Bedingungen ist eventuell eine stärkere Produktbildung zu beobachten. Deshalb wurde (+)-**61** unter Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat-Katalyse (TMS-Tf) in absolutem Dichlormethan umgesetzt. Nach 48-stündiger Rührzeit war das Edukt vollständig umgesetzt und es kam zur quantitativen Bildung des gewünschten 1,4,5-Tri-*O*-acetyl-D-*myo*-inositol (+)-**101**.

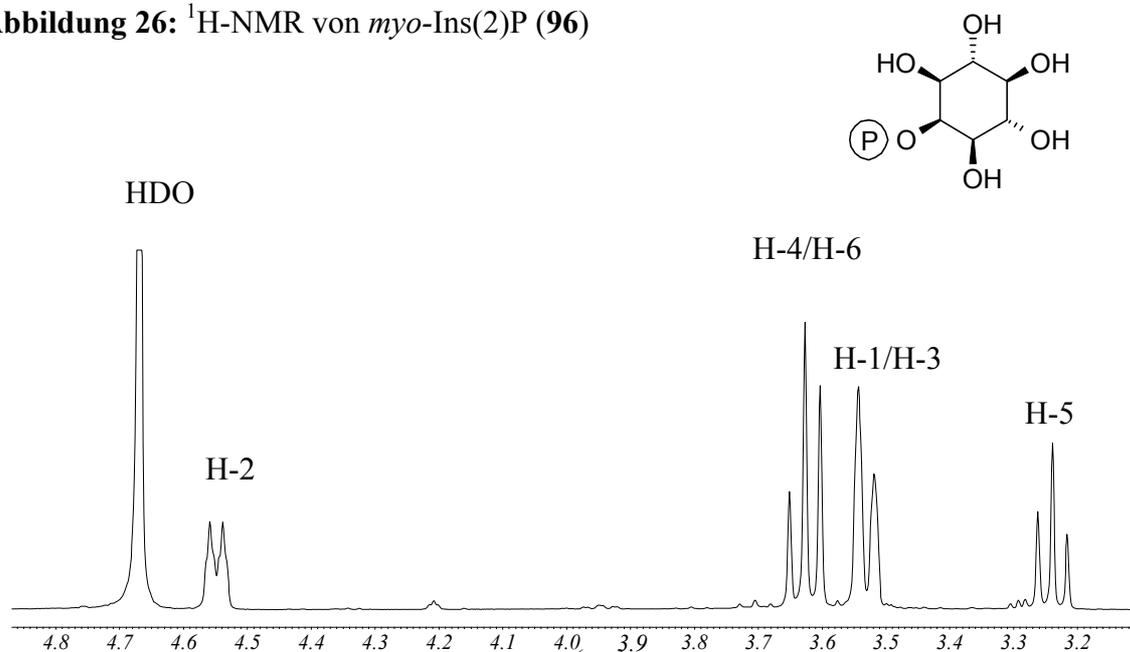
Das $^1\text{H-NMR}$ zeigt eine deutliche Veränderung zum $^1\text{H-NMR}$ des Eduktes. Auffällig ist dabei die starke Hochfeldverschiebung des Protons in 2-Position um 1.3 ppm im Vergleich zum Edukt **61**, die durch die Deacetylierung bewirkt wird. Gleichzeitig erfolgt bei der 1-Position durch die Acetylierung eine Tieffeldverschiebung von 3.68 ppm auf 4.88 ppm. Ebenfalls zeigt sich, daß in Folge der Schutzgruppenwanderung immer die eine Verbindung in geringem Maße mit dem Regioisomer verunreinigt ist.

Abbildung 25: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (Ausschnitt zwischen 3.4 und 5.8 ppm) von **61** (A) und **101** (B).



Die anschließende Phosphorylierung und sukzessive Freisetzung lieferte **96** in sehr guter Ausbeute. Die Phosphorylierung der 2-Position kann mit Hilfe des ^1H - ^{31}P -Cosy sowie aus dem ^1H -NMR eindeutig bestimmt werden. Hierbei zeigt sich eine typische Kopplungskonstante $^3J(\text{P},\text{H}) = 8.1 \text{ Hz}$ des H-2 Protons.

Abbildung 26: ^1H -NMR von *myo*-Ins(2)P (**96**)



Da aufgrund der C_s -Symmetrie das Produkt **96** achiral ist, kann die Synthese von *myo*-Ins(2)P **96** grundsätzlich auch mit racemischen Edukten durchgeführt werden. Es wurde aber die enantiomerenreine Route gewählt, um weitere enantiomerenreine Inositolphosphate auf diesem Wege darzustellen (s. folgenden Abschnitt).

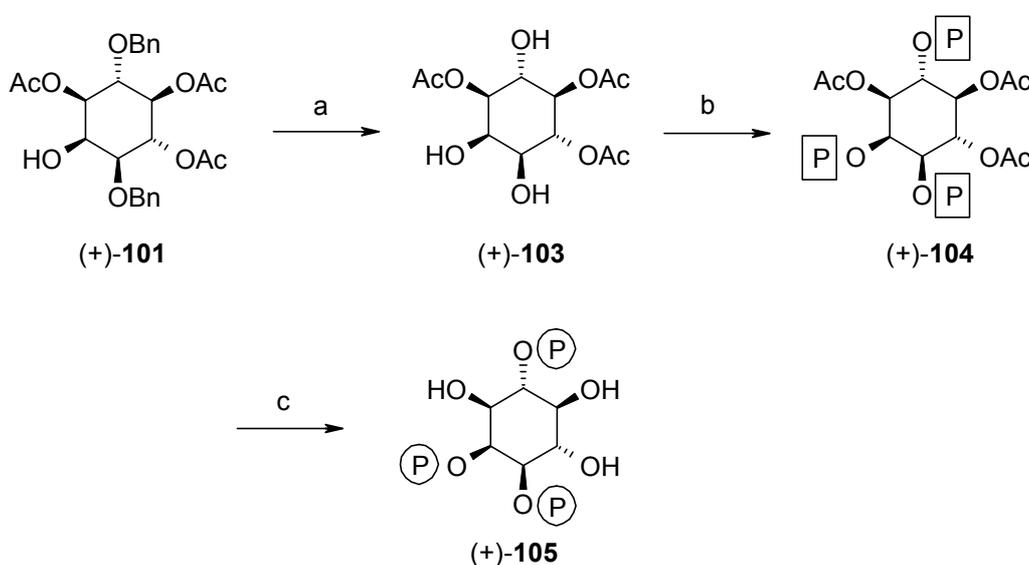
Darstellung von *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (+)-105 bzw. *myo*-Ins(1,2,4)P₃ (-)-105

Die erste *de novo* Synthese von *myo*-Ins(2,3,6)P₃ bzw. des Enantiomers *myo*-Ins(1,2,4)P₃ wurde durch Adelt und Plettenburg beschrieben.¹²⁴ Diese Totalsynthese kombiniert einen totalsynthetischen Ansatz mit einer darauffolgenden regiospezifischen enzymatischen Dephosphorylierung. Dieser Ansatz erlaubt aber nur die Darstellung kleiner Mengen, da eine doppelte Aufreinigung der freien Inositolphosphate auf der Stufe der InsP₄er und auf der Stufe der InsP₃er mittels HPLC erfolgen muß. Damit sind Ansatzgrößen von über 10 mg an

freien InsP_3 er nur schwer zu realisieren. Die gute Verfügbarkeit von **101** ließ erstmals eine reine *de novo* Synthese von beiden Enantiomeren zu.

Bei Gebrauch des Grundkörpers (+)-**101**, welcher auch auf dem Syntheseweg von *myo*- $\text{Ins}(2)\text{P}$ **96** (siehe Kapitel 2.3.1.3) Anwendung fand, sollte es möglich sein, eine geeignete Zwischenverbindung zu synthetisieren, die die Phosphorylierung an den Positionen 2,3 und 6 erlaubt. Dabei werden zuerst die beiden zu Acetat-Gruppen orthogonalen Schutzgruppen, die Benzylgruppen, in Ethanol mit Pd/C hydrogenolytisch abgespalten. Aufgrund der langen Reaktionszeiten (12 h) traten zunächst in großem Maße Schutzgruppenwanderungen auf. Durch Zugabe von Ethylacetat zum Reaktionsgemisch ist das Edukt komplett gelöst und es kommt zu einer schnelleren Hydrogenolyse. Mit Verkürzung der Reaktionszeit auf ein Minimum konnte die Schutzgruppenwanderung weitestgehend unterdrückt werden. Man erhält nach 4 Stunden ein nahezu reines Triol (+)-**103**.

Schema 18: Darstellung von *myo*- $\text{Ins}(2,3,6)\text{P}_3$ (+)-**105**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Pd/C, H_2 , Ethylacetat/Ethanol [99%]. - (b) 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH_2Cl_2 dann *m*-CPBA [53%]. - (c) 1. Pd/C, H_2 , Ethanol/Wasser. 2. 0.25 N NaOH [99%].

Nach Phosphorylierung mit anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung erhält man das Produkt (+)-**104**, welches nach hydrogenolytischer Freisetzung das gewünschte *myo*- $\text{Ins}(2,3,6)\text{P}_3$ (+)-**105** mit ausreichender Reinheit und Menge liefert. Die Ausbeute über alle Stufen lag bei über 50%. Das entspricht einer Durchschnittsausbeute von über 80%. Diese rein chemische Darstellung vermeidet die Kultivierung von Zellen und die Isolierung

eines Enzyms und ist somit deutlich praktikabler. Die Synthese des optischen Antipoden erfolgte analog. Ausgehend von (-)-**101** erhält man (-)-**105**.

Biologische Bedeutung: *myo*-Ins(3,4,5,6)P₄ ist ein Inhibitor des kalziumaktivierten Chloridkanals in der Plasmamembran.¹²⁵ Dies hat Auswirkungen auf pH-Gleichgewicht und Osmoregulation. *myo*-Ins(1,3,4)P₃, ein Abbauprodukt der Phosphoinositid-Signalkaskade, reguliert die *myo*-Ins(3,4,5,6)P₄ Konzentration in der Zelle. *myo*-Ins(1,3,4)P₃ ist dabei ein kompetitives Substrat für die *myo*-Ins(3,4,5,6)P₄ 1-Kinase und wird von diesem an der 5- bzw. 6-Position phosphoryliert.¹²⁶ Also sind nicht physiologische Analoga/Isomere von *myo*-Ins(1,3,4)P₃ von hohem pharmakologischem Interesse. Adelt und Plettenburg konnten aufzeigen, daß *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (+)-**105** kein Inhibitor für die 1-Kinase und *myo*-Ins(1,2,4)P₃ (-)-**105** ein Substrat und nicht ein Inhibitor des Enzyms ist.¹²⁴

2.3.1.4 Synthese von InsP₂-Isomeren über den symmetrischen Weg

Der problemlose Zugang zu den Edukten aus vorigem Kapitel (2.3.1.1 und 2.3.1.2) und die bekannten Einflüsse auf biologische Systeme lassen diese Syntheseziele ebenfalls attraktiv erscheinen.

Synthese von *myo*-Ins(1,4)P₂ (-)-**17** bzw. *myo*-Ins(3,6)P₂ (+)-**17**:

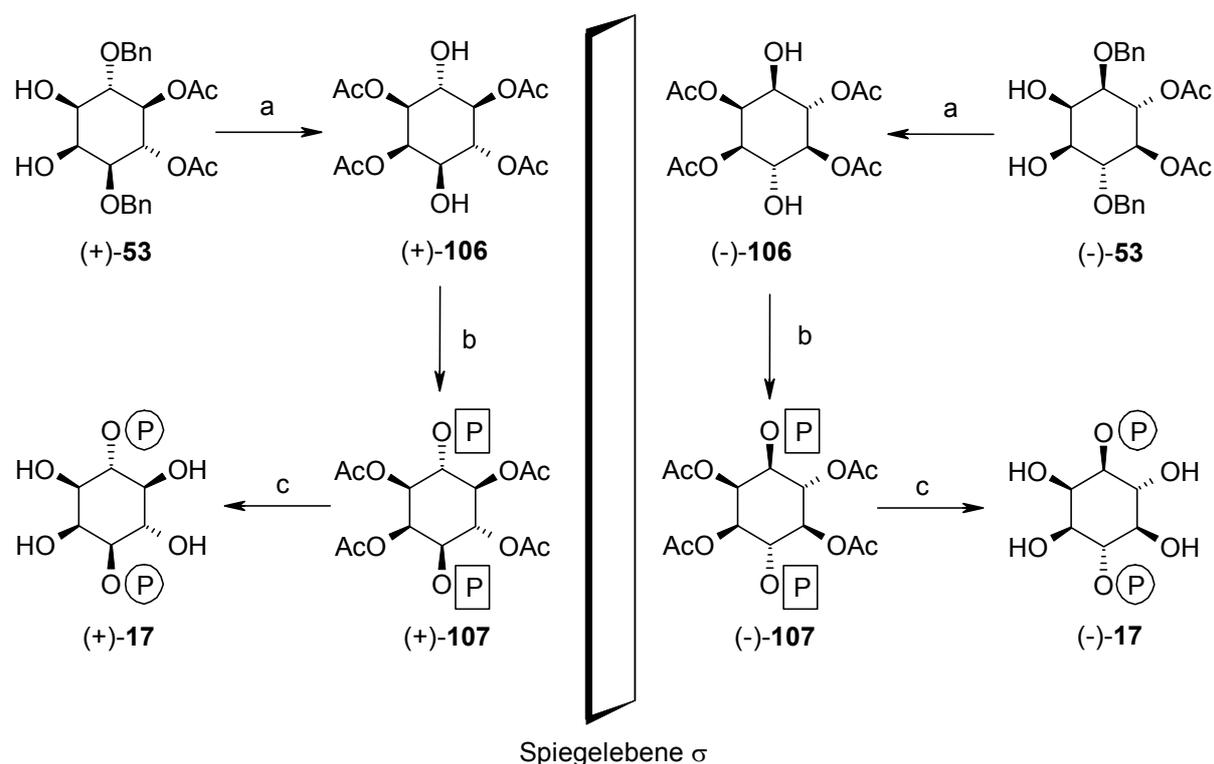
myo-Ins(1,4)P₂ (-)-**17** ist ein häufig auftretendes Isomer und entsteht durch Dephosphorylierung von *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2** durch eine *5-Phosphatase*. *myo*-Ins(1,4)P₂ aktiviert eine DNA-Polymerase in menschlichen Fibroblasten und in Ochsennerenzellen.^{127,128} *myo*-Ins(3,6)P₂ (+)-**17** hingegen ist ein nicht natürlich vorkommendes Isomer.

Die von Plettenburg⁸⁷ durchgeführte Synthese von enantiomerenreinen **17** bediente sich der nucleophilen Öffnung von *anti*-Benzoldioxid mit Dibenzylphosphat. Dieses Konzept führt gleich zu Beginn der Synthesesequenz die Phosphatgruppen ein. Das in dieser Arbeit vorgelegte Konzept ergänzt sich mit dem Konzept von Plettenburg, da man über zwei unterschiedliche Wege zu **17** gelangt.

Das durch Acetylierung von (+)-**53** leicht zugängliche Tetraacetat (+)-**106** wurde ohne weitere Aufreinigung zur Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen gleich weiter einer Hydrogenolyse unterzogen. Damit erhält man die beiden Hydroxygruppen an der gewünschten 3- und 6-Position in quantitativer Ausbeute über zwei Stufen.

Die Phosphorylierung der freien Hydroxygruppen unter Standardbedingungen, mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol in Dichlormethan und anschließender Oxidation des resultierenden Phosphits mit *m*-Chlorperbenzoesäure, lieferte (+)-**107**. Zur Abtrennung des Phosphorylierungsmittels ist eine flash-säulenchromatographische Aufreinigung (Ethylacetat 1:1) unbedingt nötig. Die Abspaltung der Schutzgruppen durch Hydrogenolyse gefolgt von basischer Verseifung der Acetatgruppen liefert analysenreines *myo*-Ins(3,6)P₂ (+)-**17**. Das optische Antipode *myo*-Ins(1,4)P₂ (-)-**17** wurde ebenfalls auf analogen Wege dargestellt.

Schema 19: Darstellung von *myo*-Ins(3,6)P₂ (+)-**17** und *myo*-Ins(1,4)P₂ (-)-**17**



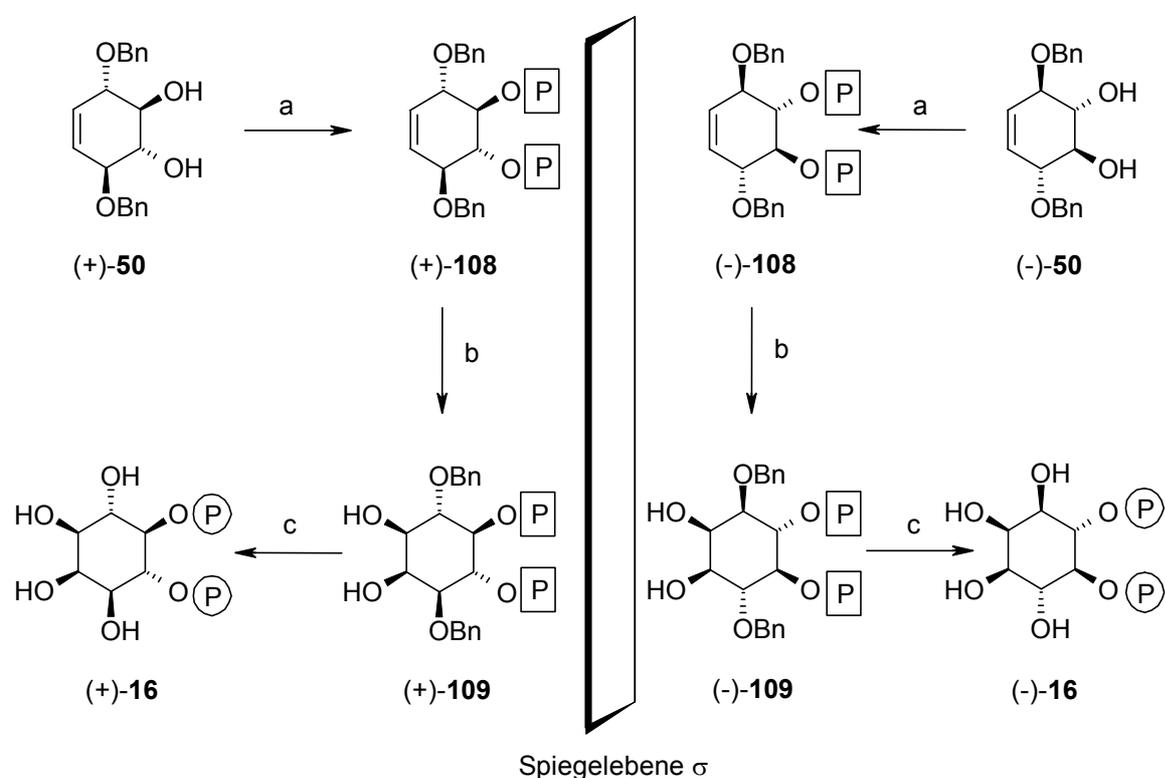
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. Ac₂O, Pyridin. 2. Pd/C, H₂, Ethylacetat/Ethanol [99%].
 - (b) 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA [50%].
 - (c) 1. Pd/C, H₂, Ethanol/Wasser. 2. 0.25 N NaOH [99%].

Die Ausbeute über vier Stufen liegt bei über 50%. *myo*-Ins(3,6)P₂ (+)-**17** konnte über diese effiziente Route alternativ dargestellt werden.

Synthese von *myo*-Ins(4,5)P₂ (-)-**16** bzw. *myo*-Ins(5,6)P₂ (-)-**16**:

Die bereits von Ritter⁸⁶ durchgeführte Synthese von racemischen Inositol-4,5-bisphosphat (+)-**16** konnte im Rahmen dieser Arbeit enantiomerenrein durchgeführt werden. Dabei wurde lediglich ein anders geschütztes Phosphorylierungsmittel verwendet.

Schema 20: Darstellung von *myo*-Ins(4,5)P₂ (+)-**16** bzw. *myo*-Ins(5,6)P₂ (-)-**16**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphoshepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA [65%]. - (b) NaIO₄, RuCl₃, Acetonitril [99%].- (c) 1. Pd/C, H₂, Ethanol/Wasser [99].

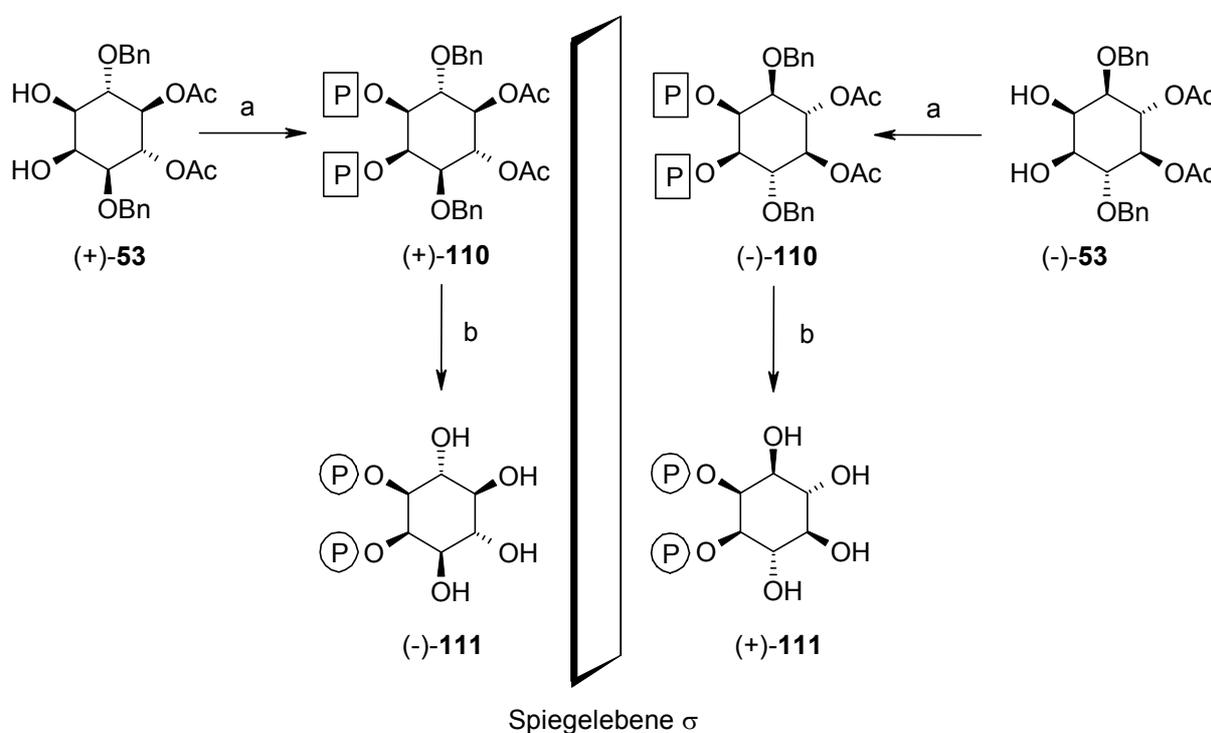
Der problemlose Zugang zu (+)-**50** bzw. (-)-**50** in 100 g-Maßstab (siehe Kapitel 2.3.1.1) macht dieses Diol zu einer idealen Ausgangsverbindung für die Synthese von *myo*-Ins(4,5)P₂ (+)-**16** bzw. *myo*-Ins(5,6)P₂ (-)-**16**.

Die Phosphorylierung der freien Hydroxygruppen unter Standardbedingungen mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** liefert (+)-**108** in sehr guter Ausbeute. Das Produkt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Ethylacetat/Cyclohexan 3:1) aufgereinigt. Anschließende *cis*-Dihydroxylierung unter Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel liefert das geschützte *myo*-Inositol-4,5-bisphosphat (+)-**109**. Pd/C-katalysierte Hydrogenolyse ergibt analysenreines *myo*-Ins(4,5)P₂ (-)-**16** in quantitativer Ausbeute. Das andere Enantiomer *myo*-Ins(5,6)P₂ (-)-**16** kann ebenfalls auf entsprechendem Wege dargestellt werden.

Synthese von *myo*-Ins(1,2)P₂ (-)-**111** bzw. *myo*-Ins(2,3)P₂ (+)-**111**:

Zur Synthese von *myo*-Ins(1,2)P₂ (-)-**111** bzw. *myo*-Ins(2,3)P₂ (+)-**111** wird das aus Kapitel 2.3.1.2 bekannte Diol **53** herangezogen.

Schema 21: Darstellung von *myo*-Ins(1,2)P₂ (-)-**111** bzw. *myo*-Ins(2,3)P₂ (+)-**111**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA [58%]. – (b) 1. Pd/C, H₂, Ethanol/Wasser. 2. 0.25 N NaOH [99%].

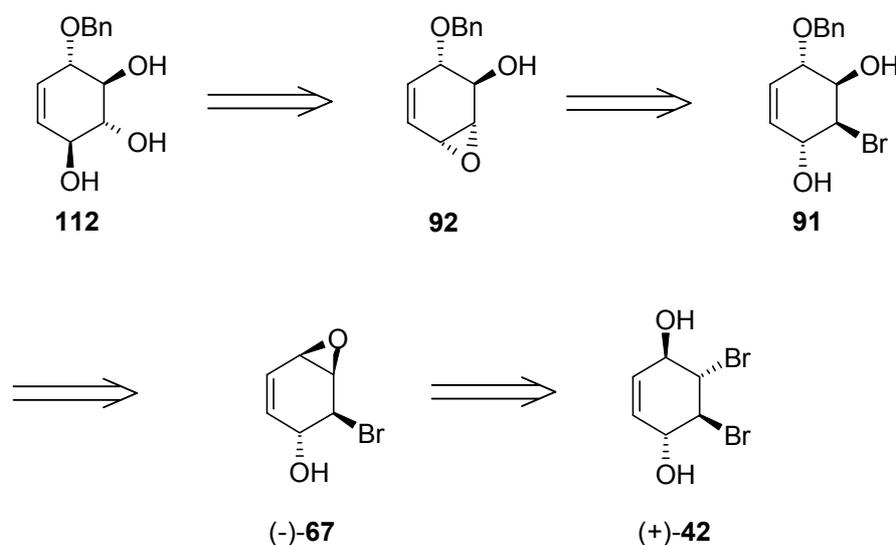
Die Phosphorylierung zum geschützten Bisphosphat wurde mit 1.8 Äquivalenten Phosphorylierungsmittel **62** und 2 Äquivalenten *IH*-Tetrazol pro OH-Gruppe durchgeführt und das Rohprodukt durch anschließende Flash-Chromatographie aufgereinigt. Die folgende hydrogenolytische Entfernung der Benzyl- und Xylyl-Schutzgruppen und basische Verseifung der Acetat-Gruppen führt zu reinem *myo*-Ins(1,2)P₂ (-)-**111** bei einer Ausbeute von fast 70% über alle Stufen.

HPLC-Messungen ergaben eine Isomerenreinheit von >99%. Dieses Ergebnis ermöglicht den Einsatz als Standard für die HPLC-Analytik.

2.3.2 Darstellung der *myo*-Inositolphosphate mittels desymmetrisierenden Konzept

Es wurde bereits im Arbeitskreis gezeigt,^{87,129} daß eine zur Monoazido-Route (Kapitel 2.2.2) analoge Reaktionssequenz einen Monobenzyl-Konduritol-Baustein **112** liefert. Statt die Azido-Funktionalität einzuführen, ist es möglich, das Epoxid (-)-**67** mit anderen Nucleophilen, in diesem Fall Benzylalkohol, zu öffnen (siehe dazu auch Schema 22). Die Übertragung des für racemische Verbindungen durch Braun¹²⁹ und Plettenburg⁸⁷ skizzierten Konzepts in eine auch für enantiomerenreine Verbindungen praktikable Syntheseroute stand dabei im Vordergrund. Letztendlich hängt der Erfolg maßgeblich von einer einfachen und effektiven Synthese des Monobenzylkonduritol **112** ab. Dieses Monobenzylkonduritol **112** läßt sich nachfolgend leicht in *myo*-Inositol-Derivate umsetzen.

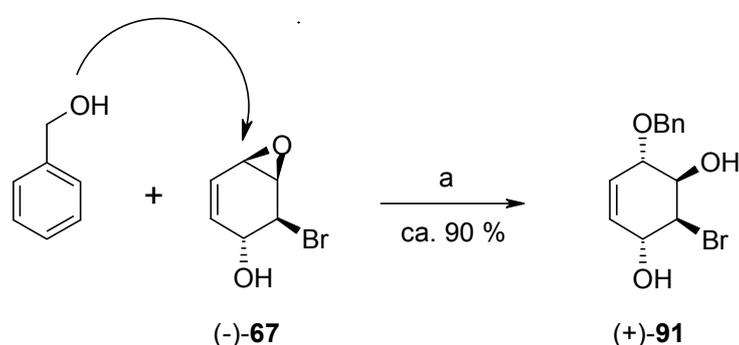
Schema 22: Retrosynthetische Betrachtung des monofunktionalisierten Konduritol-Bausteins **112**



Das (+)-Diol **42** bzw. (+)-Diacetat **43** kann nach der obig beschriebenen Vorschrift (Kapitel 2.2.2) in das Epoxid (-)-**67** bzw. Epoxid (+)-**67** überführt werden. Ausgehend vom Epoxid (-)-**67** wird nun das Allyl-Epoxid nach einer Vorschrift von Braun¹²⁹ und Plettenburg⁸⁷ geöffnet. Durch Zugabe geringer Mengen Schwefelsäure erfolgt die sauer katalysierte Öffnung mit Benzylalkohol. Das Verfahren lieferte aber oft zum Teil nicht reproduzierbare schwankende Ausbeuten von manchmal nur 30%. Der Grund dafür lag in den noch in Spuren vorhandenen Lithiumhydroxyd-Resten, welche den nur in geringen Mengen vorhandenen Katalysator neutralisierten. Eine weitere Zugabe des Katalysators ist aber sehr schwer zu

dosieren, da ein größerer Überschuß an Schwefelsäure zur Produktzersetzung in Form von Dehydratisierung führt. Das Rohprodukt an (-)-**67** wurde, zur Entfernung jeglicher Lithiumhydroxid-Reste, in Dichlormethan aufgenommen und noch einmal mit gesättigter Kochsalzlösung gegengeschüttelt. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man salzfreies Monoepoxid. Diese scheinbare kleine Änderung der Reaktionsvorschrift hatte enorme Ausbeuteerhöhung zur Folge. Damit konnte eine nahezu quantitative Umsetzung zum **91** erzielt werden.

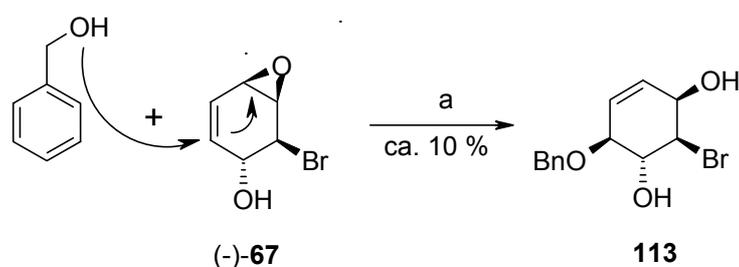
Schema 23: Öffnung des Epoxids (-)-**67** mit Benzylalkohol (S_N -Produkt)



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) BnOH, H₂SO₄ (Kat.).

NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten aber, daß neben dem zu erwartenden Hauptprodukt, welches durch den Allyl-Angriff entsteht, noch ein weiteres Produkt zu etwa 10% auftaucht. Es handelt sich hierbei um das C-3 Epimere zu **91**. Dieses sogenannte S_N' -Produkt **113** entsteht durch den S_N' -Angriff durch Benzylalkohol.

Schema 24: Öffnung des Epoxids (-)-**67** mit Benzylalkohol (S_N' -Produkt)



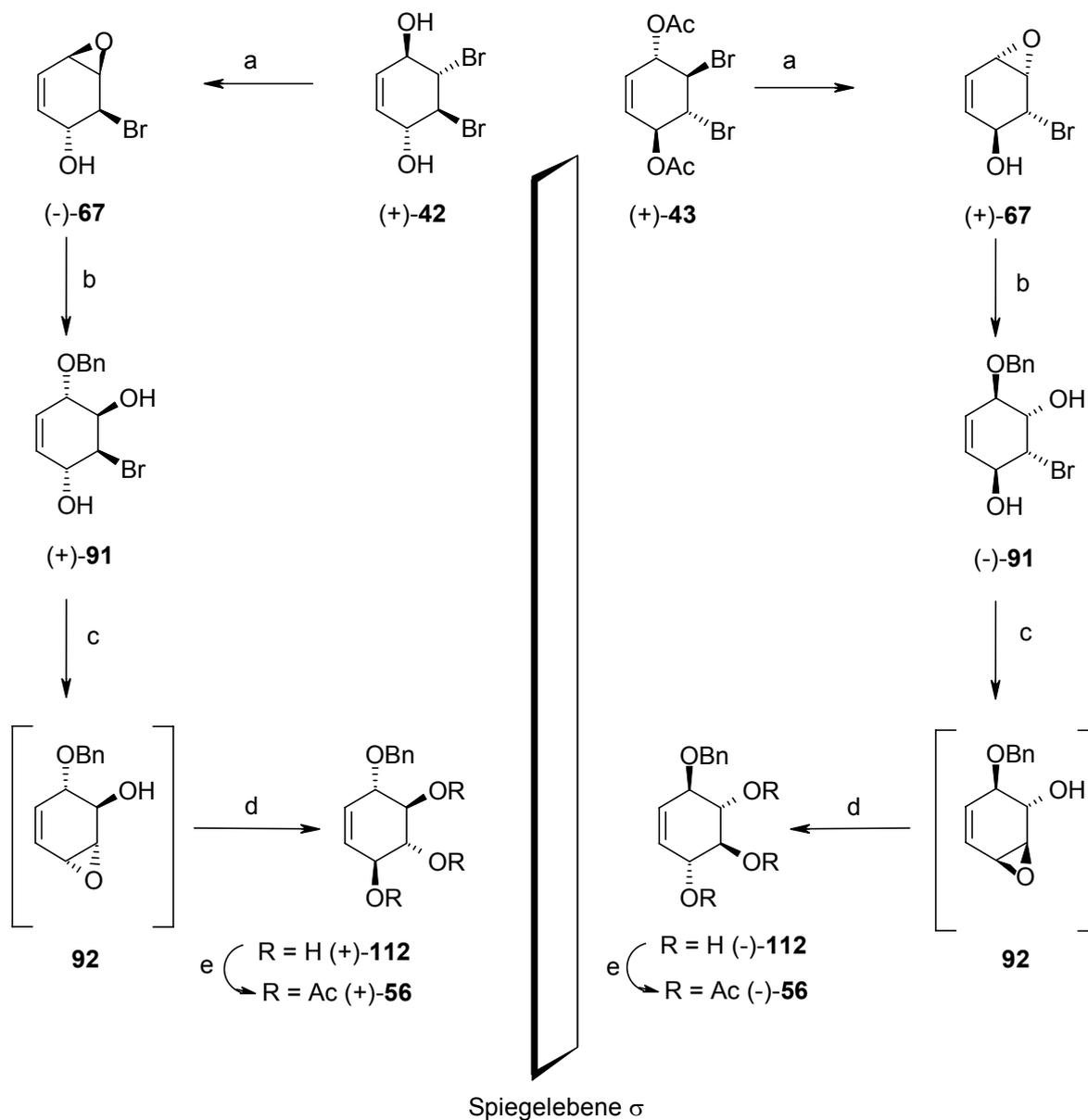
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) BnOH, H₂SO₄ (Kat.).

Da es sich hierbei um einen stereokontrollierten Angriff handelt, kommt es hier ausschließlich zum Angriff von der Oberseite (d. h. von der gleichen Seite im Vergleich zum Epoxid). Dieses Nebenprodukt läßt sich nur schwer mittels Flash-Säulenchromatographie abtrennen. Deshalb muß die Synthesesequenz auf einer der nächsten Stufen eine Kristallisation zur Aufreinigung beinhalten, da sonst das gewünschte Benzyl-konduritol B **112** nur in kleinem Maßstab darstellbar wäre. Für analytische Zwecke konnte das Hauptprodukt mittels säulenchromatographischer Aufreinigung analysenrein erhalten werden.

Klassische Route zur Synthese des Benzyl-konduritol B Bausteins (+)-56:

Das Monobenzyl-konduritol (+)-**91** (Rohprodukt) kann unter den obig beschriebenen Bedingungen wiederum leicht in das zweite Epoxid überführt werden. Da das zweite Epoxid ebenfalls nicht sehr stabil ist (siehe Kapitel 2.2.2), wurde das erhaltene Intermediat (nach entfernen der Lithiumhydroxid-Salze) gleich weiter umgesetzt. Die direkte Ringöffnung mit Wasser in THF unter *p*-Toluolsulfonsäure Katalyse ergibt das Benzyl-konduritol B (+)-**112**.

In dieser Reaktionssequenz kommt es bei der Epoxid-Generierungs-Öffnungssequenz im Vergleich zur unsymmetrischen Azido-Route verstärkt zu Nebenreaktionskanälen. Das Rohprodukt enthält immerhin Benzyl-konduritol B (+)-**112** als Hauptprodukt, aber dieses ist mit einer großen Anzahl an Nebenprodukten verunreinigt. Eine Aufreinigung auf dieser Stufe ist durch die große Anzahl sehr ähnlicher Nebenprodukte (Edukten und S_N'-Produkte) unabdingbar und somit hängt der Erfolg der Route maßgeblich von der Möglichkeit ab, dieses Produkt einfach und effizient aufzureinigen. Die Umkristallisation mit racemischen Benzyl-konduritol B **112** erweist sich hierbei durch die geringe Kristallisationstendenz des Produktes als sehr problematisch. Nach mehreren Wochen kristallisiert nur wenig Produkt aus. Eine Aufreinigung mittels Flash-Säulenchromatographie ist aufgrund der vielen ähnlichen Nebenprodukte sehr unbefriedigend und liefert äußerst unreine Produkte. Enantiomerenreines (+)-**112** kristallisiert fast gar nicht mehr aus Essigsäureethylester oder auch Lösungsmittelgemischen. Erst nach drei Wochen im Kühlschrank erhielt man wenig sauberes Produkt (ca. 20%).

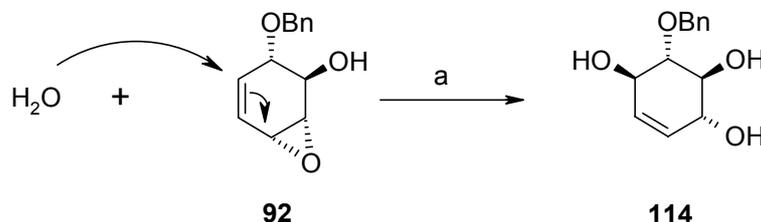
Schema 25: Darstellung von Benzyl-konduritol B **112**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) LiOH, Et₂O/MeOH [92%]. – (b) BnOH, H₂SO₄ (Kat.) [99%]. – (c) LiOH, Et₂O/MeOH [99%]. – (d) *p*-TsOH, H₂O [nach Umkristallisation 30%]. – (e) Ac₂O, Pyridin [99%].

Eine durch Dr. Roggel durchgeführte Epoxidöffnung an reinem Epoxid **92** lieferte ein überraschendes Ergebnis. Im Gegensatz zu dem stereokontrolliertem S_N'-Angriff aus der Öffnung des ersten Epoxides ist die Öffnung des zweiten Epoxides weit unselektiver. So konnten mittels analytischer Flash-Säulenchromatographie nicht nur 1-Benzyl-konduritol B (+)-**112**, sondern neben anderen Produkten noch 2-Benzyl-konduritol B **114** isoliert werden.

Daß es sich um ein Konduritol B Derivat handelt, kann im $^1\text{H-NMR}$ leicht im Hochfeld an zwei Pseudotriplets mit einer Kopplungskonstante von ca. 10 Hz erkannt werden.

Schema 26: Nebenreaktionskanal bei der Öffnung des Epoxids **92** mit Wasser ($\text{S}_{\text{N}}' \text{-Produkt}$)



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) *p*-TsOH, Wasser.

Mittels Umkristallisieren auf dieser Stufe erhält man zwar analysenreines Benzyl-konduritol B (+)-**112** in geringer Ausbeute (20%), aber die vielen Nebenprodukte machen diese Route sehr uneffizient.

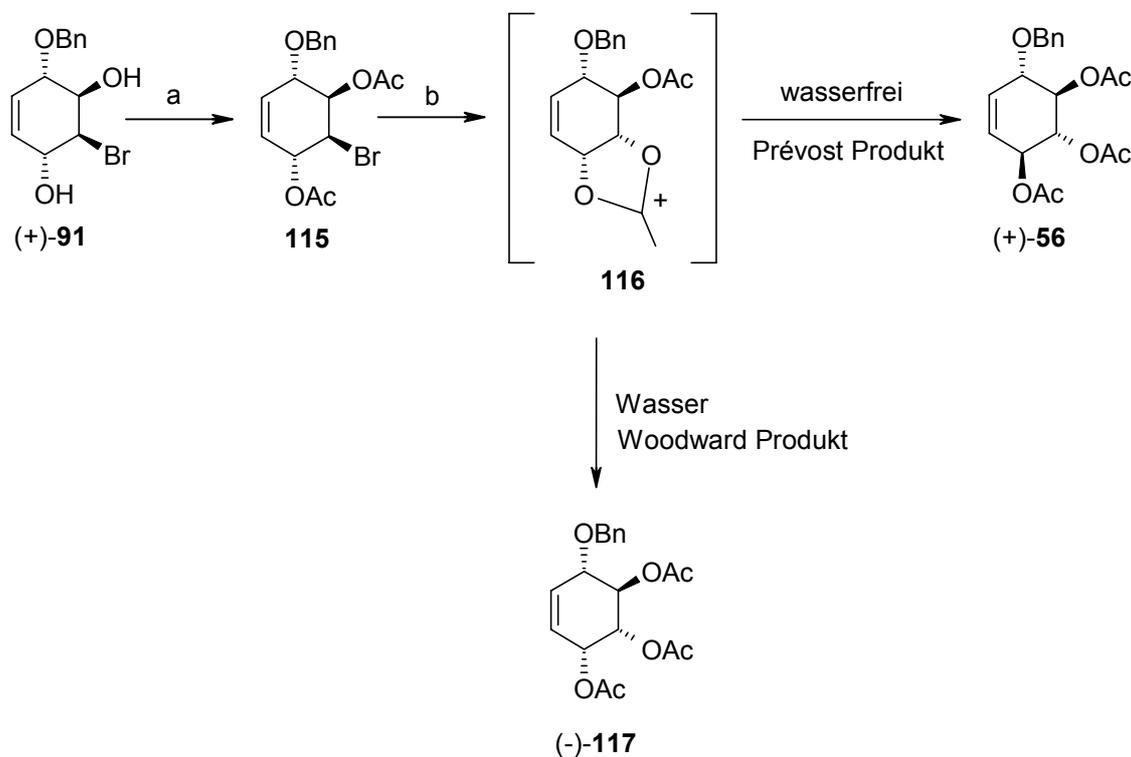
Reines Benzyl-konduritol B (+)-**112** konnte anschließend mit Pyridin und Essigsäureanhydrid problemlos in das Triacetat (+)-**56** umgesetzt werden.

Dieses Produkt hat ebenfalls nur eine geringe Kristallisationstendenz, so daß sich diese Stufe auch nicht zur Aufreinigung eines Rohproduktes eignet. Auf dieser Stufe ergaben sich die gleichen Probleme bei der Aufreinigung eines Rohproduktes wie auf voriger Stufe.

Neues Konzept zur Synthese des Benzyl-konduritol B Bausteins (+)-**56**:

Damit schien die obige Route, trotz zahlreicher Optimierungsversuche, prinzipiell nicht durchführbar. Dies machte einen grundlegenden Strategiewechsel erforderlich, um das enorme Potential der desymmetrisierenden Route für die Synthese enantiomerenreiner *myo*-Inositolphosphate nutzbar zu machen. Da die ersten beiden Stufen fast quantitativ verliefen, mußte folglich die zweite Epoxid-Generierung und -Öffnung umgangen werden.

Hier zeigte sich, daß das Know-how aus den anderen Routen, in diesem Fall der Konduritol E Synthese (siehe Stereoisomere Inositole, Abschnitt 2.4, ab S. 97) sich auf andere Syntheserouten übertragen ließ. Aus Arbeiten von Stegelmeier⁹⁰ war bekannt, daß sich das Diacetat **43** mit Silberacetat nahezu quantitativ in Konduritol B Tetraacetat **132** überführen läßt (siehe Schema 34: Bildung des Prévost¹³⁰-Produktes aus Diacetat (+)-**43**).

Schema 27: Dirigierung der Reaktion mit und ohne Wasserzusatz

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Ac_2O , Pyridin. - (b) wasserfrei: NaOAc oder KOAc , $\text{AcOH}/\text{Ac}_2\text{O}$, 5 Tage, $130\text{ }^\circ\text{C}$ [55%]. wasserhaltig: NaOAc oder KOAc , AcOH (95%), 3 Tage, $130\text{ }^\circ\text{C}$. DMAP, Ac_2O , CH_2Cl_2 [90%].

Durch Anwendung der bei Stegelmeier beschriebenen Reaktionsbedingungen auf acetyliertes $(+)\text{-91}$ sollte man $(+)\text{-56}$ isolieren. Da aber auch hier die Reaktionsbedingungen zu einer geringen Ausbeute führten und zudem zu kostenintensiv sind, wurde das bei *neo*-Inositol angewendete Verfahren auf dieses Molekül übertragen. Wie aus Arbeiten der Inositolstereoisomeren (siehe Kapitel 2.4.1) bereits bekannt war, läßt sich Silberacetat durch Kalium- oder Natriumacetat ersetzen. Hier kann zwar ebenfalls ein S_{N}' -Angriff, analog der Öffnung der Acetoxoniumion-Zwischenstufe mit Wasser bei Schema 34, erfolgen, dieser führt aber durch den desymmetrischen Baustein nicht zur Racemisierung des Produktes (siehe analog Schema 34, Seite 99). Man erhält hier lediglich Regioisomere oder Epimere von Konduritol B, welche sich mittels Umkristallisation entfernen lassen sollten. Da schon bekannt war, daß die Reaktionen mit Kalium- oder Natriumacetat deutlich länger dauern würden, müßten lediglich die Reaktionsbedingungen geändert werden.

Dabei wurde zuerst das Brom-Diol **91** in Pyridin und Essigsäureanhydrid acetyliert. Der praktische Aufwand der Acetylierung ist äußerst gering, denn dieses Produkt wurde einfach durch Einengen im Hochvakuum isoliert und mußte nicht weiter aufgereinigt werden. Die Synthese des unsymmetrischen Konduritol B-Bausteins (+)-**56** erfolgte anschließend durch Umsetzung des Brom-Diacetats **115** mit Kaliumacetat in absoluter Essigsäure. Erwähnenswert ist dabei, daß wasserfrei gearbeitet werden muß, da man sonst das Woodward-Produkt erhält. Praktisch läßt sich das sehr einfach durch Zugabe von bis zu 10% an Essigsäureanhydrid zum Reaktionsgemisch realisieren. Mechanistisch betrachtet substituiert die *trans*-ständige Acetatgruppe unter Ausbildung eines Acetoxonium-Ions (durch den aktivierenden Effekt des Kaliums) das Bromid. Dieses Acetoxonium-Ion **116** wird anschließend unter Inversion am allylischen Zentrum von Essigsäure substituiert. Das Triacetat **56** konnte durch fünftägiges Rückflußkochen als bräunliches Öl erhalten werden. Das Rohprodukt wurde zur Abtrennung der bromierten Nebenprodukte mittels Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt. Das erhaltene Produkt hat nun ausreichende Reinheit und kann jetzt leicht zur Abtrennung des S_N'-Produktes aus Diethylether/Cyclohexan umkristallisiert werden. Man erhält reines Triacetat (+)-**56** als farblosen Feststoff in 60%iger Ausbeute. Damit konnte ein neuartiger, sehr effizienter Weg zur Darstellung des desymmetrisierten Konduritol B-Bausteins entwickelt werden.

Führt man hingegen die Reaktion mit Kalium- oder Natriumacetat unter Zusatz von Wasser durch, so wird durch Hydrolyse des intermediär gebildeten Acetoxonium-Ions **116** das Molekül mit der *cis*-Stereochemie gebildet. Nach Aufarbeitung, Acetylierung und Umkristallisation aus EtOH erhält man das Triacetat **117** in sehr guter Ausbeute. Die Synthese des Benzyl-konduritol F Triacetats (-)-**117** mittels dieser Route stellt eine Alternative zu der Synthese über die *neo*-Inositol-Route dar.

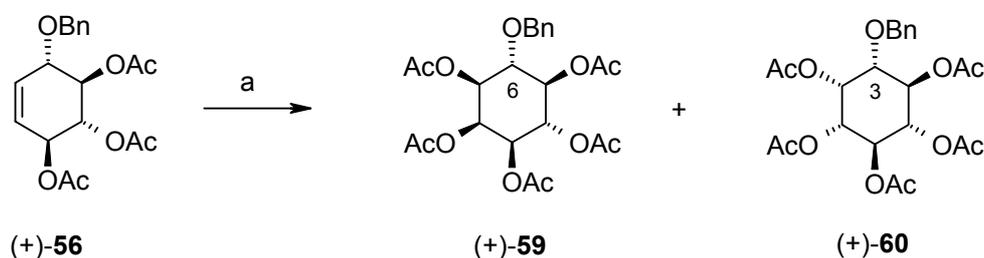
Anhand dieses neuen Verfahrens konnte das desymmetrisierende Konzept weiter verfolgt werden und somit steht genügend Monobenzyl-Konduritol B **56** für die weitere Funktionalisierung zur Verfügung.

2.3.2.1 Darstellung von *myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-29 bzw. *myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅ (-)-31

Eins der interessantesten Ziele, die über den desymmetrisierten Weg erhalten werden können, ist die Synthese der *myo*-Inositolpentakisphosphate. Durch Verwendung von beiden enantiomeren Konduritit B-Bausteinen **56** dürften fast alle *myo*-Inositolpentakisphosphate darstellbar sein.

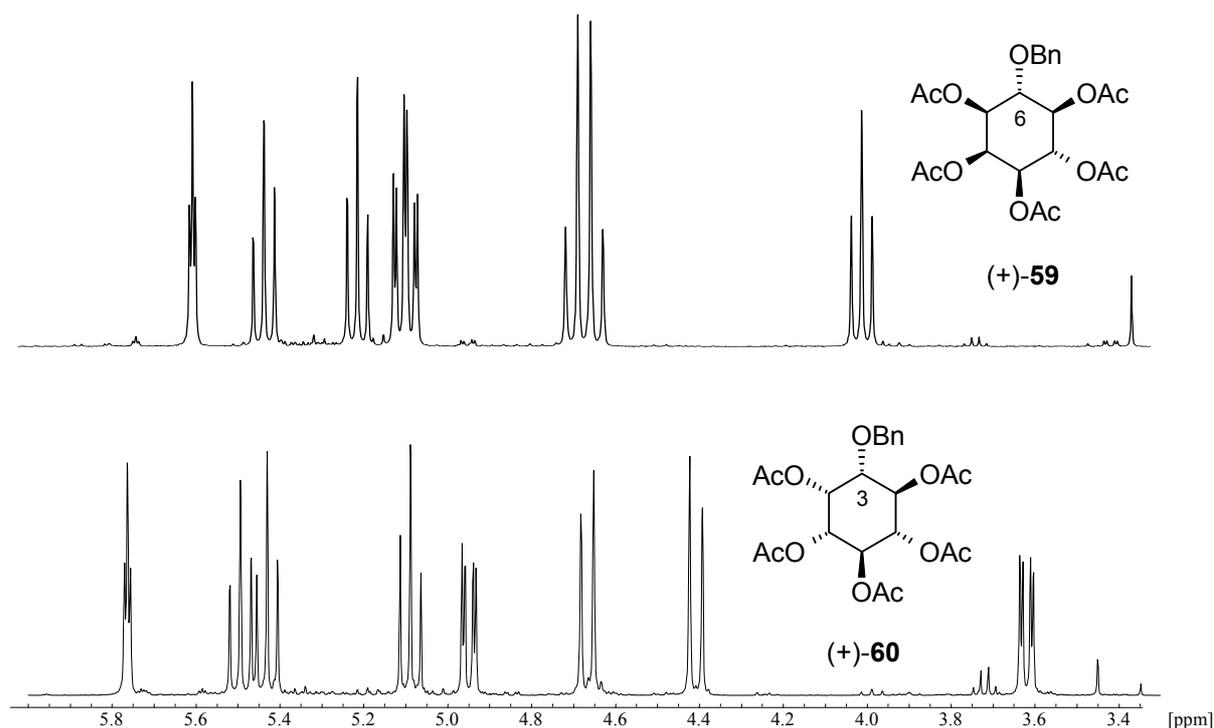
Die *cis*-Dihydroxylierung mit Rutheniumtrichlorid und Natriumperiodat unter Standardbedingungen, wie sie unter Kapitel 2.2.2 (S. 35) beschrieben sind, liefert zwei Diastereomere. Diese können durch Kristallisation nur angereichert werden. Zudem erschwert die Schutzgruppenwanderungen die Aufreinigung. Deshalb wurde das Rohprodukt gleich in Pyridin und Essigsäureanhydrid acetyliert. Durch den größeren sterischen Anspruch der Benzylgruppe ist das Diastereomerenverhältnis leicht zur Seite des 6-Benzyl-inositols **59** verschoben.

Schema 28: *cis*-Dihydroxylierung an (+)-**56**



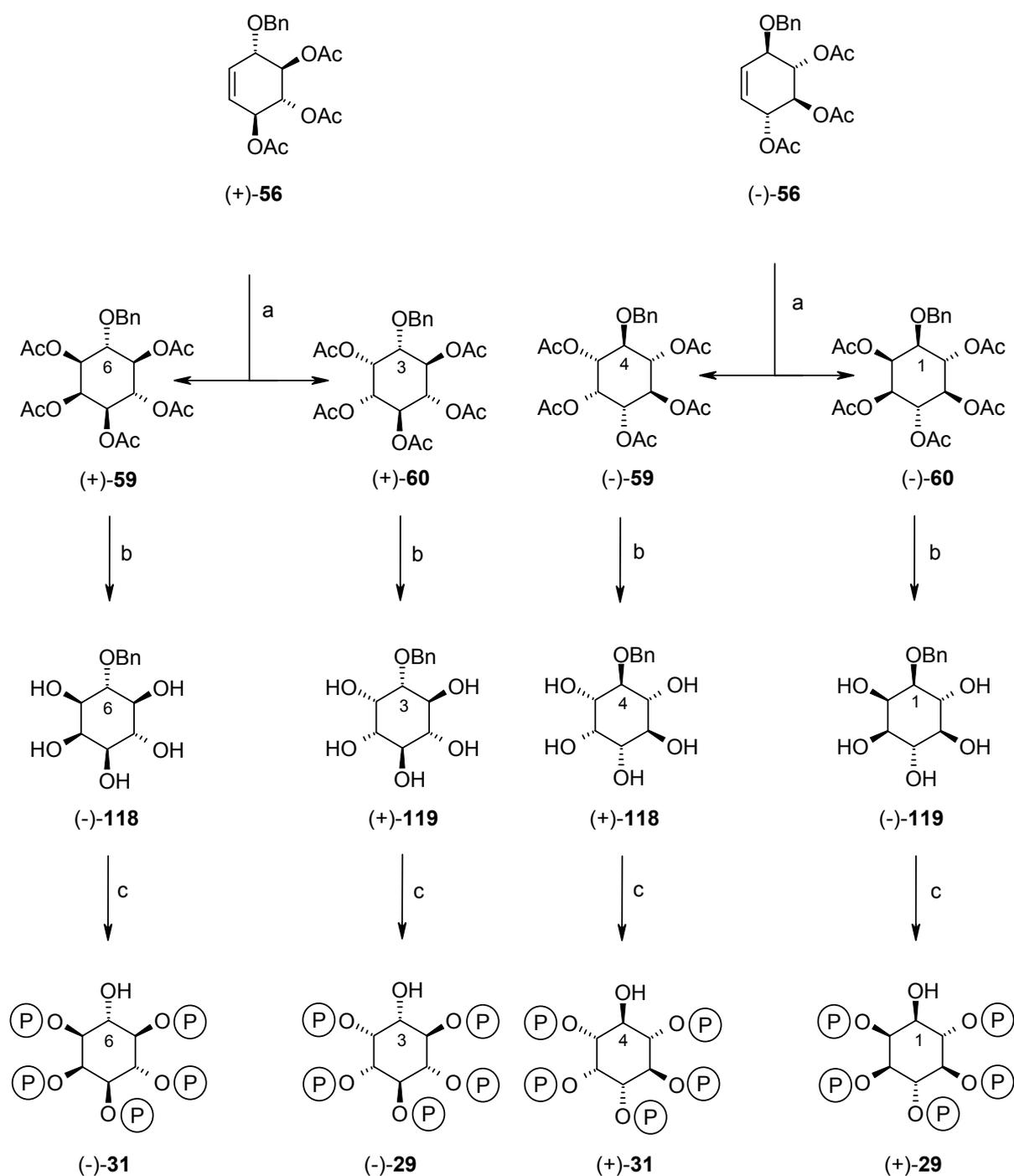
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril 2. Ac₂O, Pyridin [99%].

Die Diastereomere konnten mittels einer HPLC nicht voneinander getrennt werden. Aus diesem Grund ist die zuvor angeregte Trennung durch Flash-Säulenchromatographie unmöglich.⁸⁷ Die Trennung der pentaacetylierten Diastereomere ist mit fraktionierter Kristallisation möglich, aber wie sich noch später zeigt, lassen sich die geschützten Pentakisphosphate nachher noch leichter durch Flash-Säulenchromatographie trennen. Für analytische Zwecke wurde eine fraktionierte Kristallisation durchgeführt. Beide Produkte lassen sich leicht im ¹H-NMR mit der im Hochfeld verbliebenen Signalgruppe zuordnen.

Abbildung 27: $^1\text{H-NMR}$ -Vergleich der beiden diastereomeren Inositole (+)-**60** und (+)-**59**

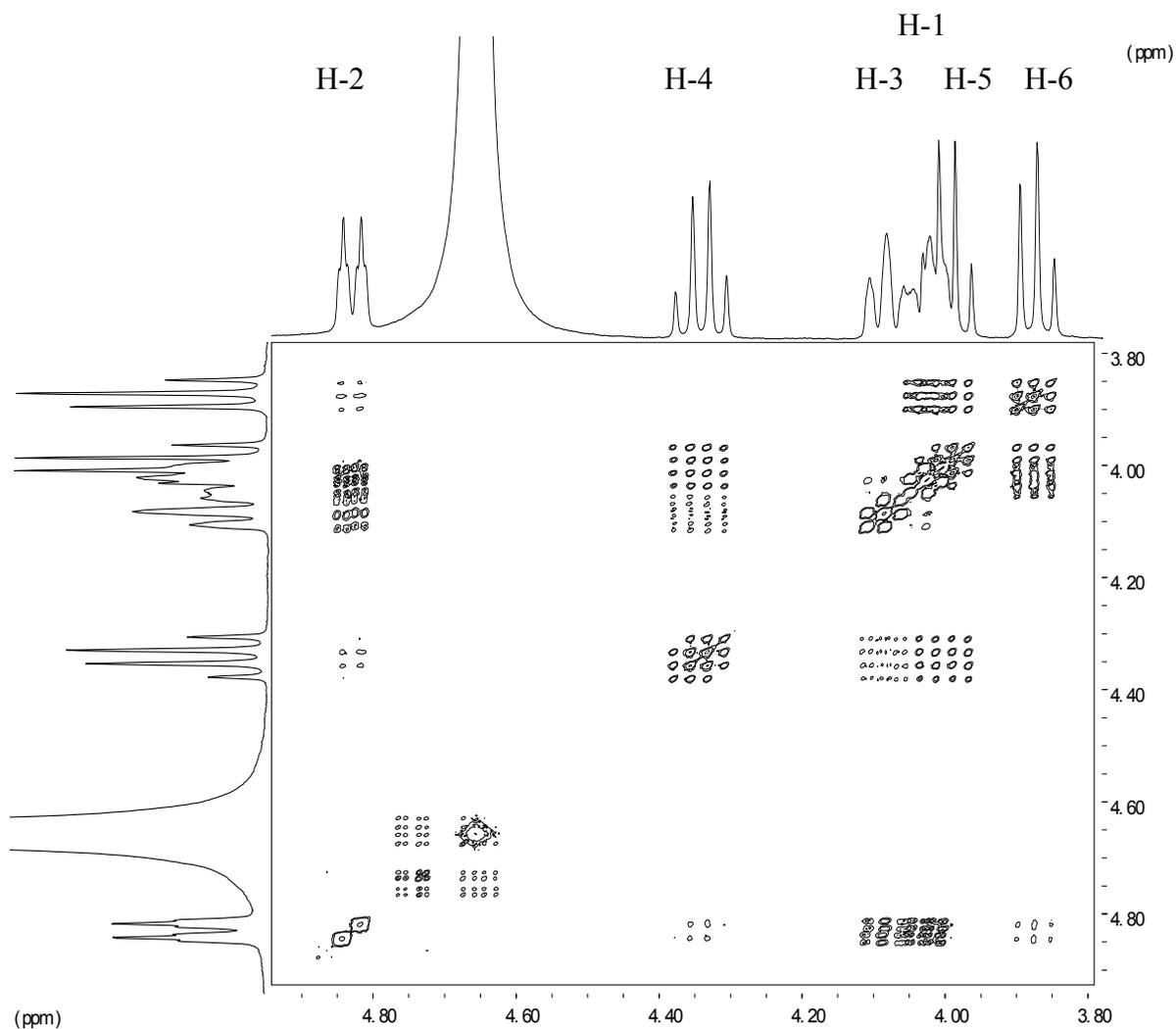
Beide diastereomere Inositole (+)-**59** und (+)-**60** ließen sich problemlos verseifen und lieferten das 6-*O*-Benzyl-*myo*-inositol (-)-**118** und 3-*O*-Benzyl-*myo*-inositol (+)-**119**.

Die Probleme, wie sie bei der Phosphorylierung der Azido-Pentole **77** bzw. **78** auftraten, waren hier nicht zu beobachten. Die Benzyl-Pentole (-)-**118** und (+)-**119** sind zum Teil löslich in Dichlormethan. Die Löslichkeit ist ausreichend für die Umsetzung. Außerdem können keine Reduktionen, wie sie bei der Synthese der Azido-pentakisphosphate vorkamen, auftreten (vergl. Kapitel 2.2.2). Die Phosphorylierung der freien Hydroxygruppen des Diastereomerengemisches aus 3-*O*-Benzyl-*myo*-inositol (+)-**119** und 6-*O*-Benzyl-*myo*-inositol (-)-**118** unter Standardbedingungen mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphospehan **62** in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol in Dichlormethan und anschließender Oxidation des resultierenden Phosphits mit *m*-Chlorperbenzoesäure liefert die geschützten Pentakisphosphate. Zur Abtrennung des Phosphorylierungsmittels war eine flash-säulenchromatographische Aufreinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) unbedingt nötig. Interessanterweise ließen sich die Diastereomere dabei separieren, so daß eine Diastereomerentrennung auf einer früheren Stufe hinfällig wird.

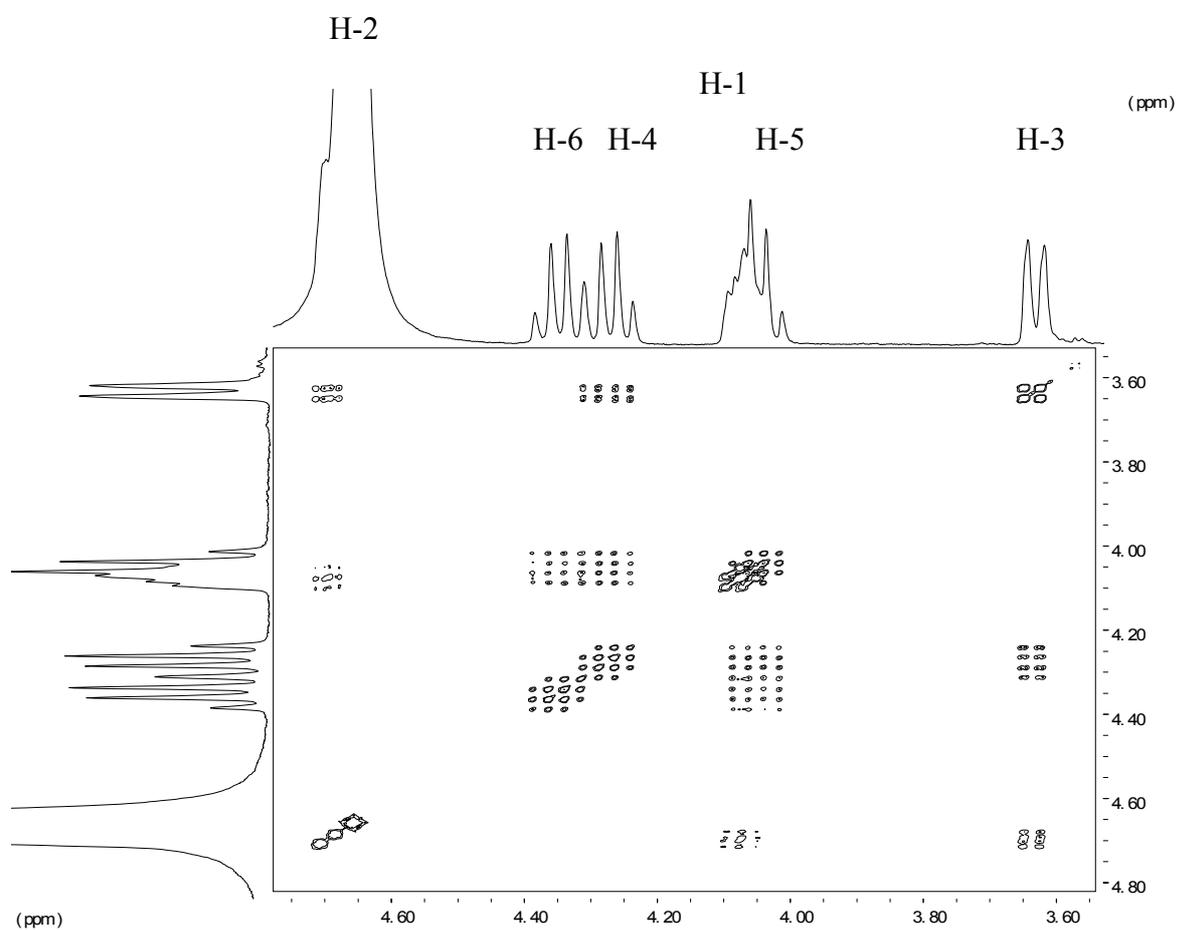
Schema 29: Übersicht zur Darstellung der *myo*-Inositol-pentakisphosphate

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. RuCl_3 , NaIO_4 , Acetonitril 2. Ac_2O , Pyridin [99%]. – (b) NaOMe , MeOH [99%]. – (c) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH_2Cl_2 dann *m*-CPBA [50%]. 2. Pd/C , H_2 , Ethanol/Wasser [83%].

Die folgende Pd/C -katalysierte Entschützung/Hydrogenolyse ergab NMR-sauberes *myo*-Ins(1,2,4,5,6) P_5 (-)-29 bzw. *myo*-Ins(1,2,3,4,5) P_5 (-)-31. Um eine für biologische Untersuchung ausreichende Reinheit zu gewährleisten, wurden die Produkte mittels HPLC weiter aufgereinigt.

Abbildung 28: ^1H - ^1H -Cosy Spektrum von *myo*-Ins(1,2,3,4,5) P_5 (-)-**31**

Beide Produkte lassen sich eindeutig NMR-spektroskopisch charakterisieren. So findet sich ein ähnliches Spektrum wie das der acetatgeschützten 6-Benzyl- (+)-**59** und 3-Benzyl (+)-**60** *myo*-Inositole. Auch hier sind die der Hydroxylgruppe benachbarten Ringprotonen, also H-6 bei *myo*-Ins(1,2,3,4,5) P_5 (-)-**31**, aufgrund der „Nichtphosphorylierung“ deutlich gegenüber den anderen Ringprotonen hochfeldverschoben. Analoges gilt für H-3 bei *myo*-Ins(1,2,4,5,6) P_5 (-)-**29**.

Abbildung 29: ^1H - ^1H -Cosy Spektrum von *myo*-Ins(1,2,4,5,6) P_5 (-)-**29****Resümee:**

Mit Optimierung der Synthesen und durch das Umsetzen des neuen „Acetoxoniumionenkonzepts“ konnte die desymmetrisierende Route etabliert werden. Neben dem durch Plettenburg bereits über die symmetrischen Route dargestellten *myo*-Ins(1,3,4,5,6) P_5 **28** konnten alle enantiomeren Pentakisphosphate erhalten werden. Diese Pentakisphosphate sind nicht käuflich erhältlich und somit wichtige Referenzsubstanzen zur Aufklärung des *myo*-Inositolphosphat-Stoffwechsels.

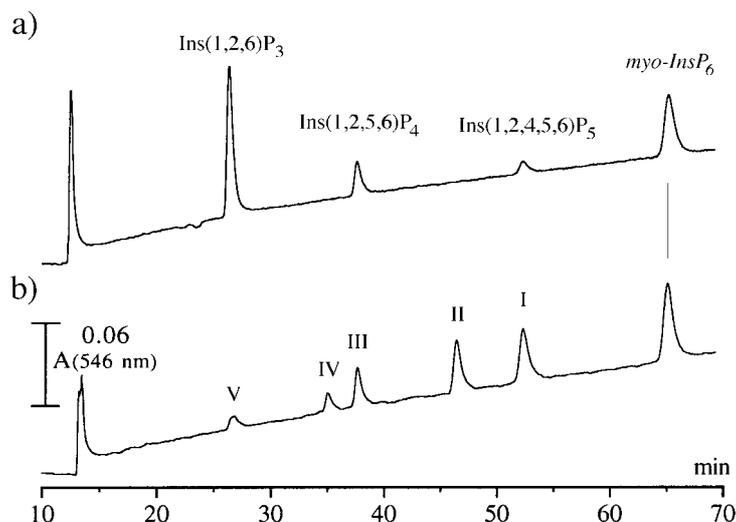
2.3.2.2 Verwendung der *myo*-Inositolpentakisphosphat-Standards zur Untersuchung der Stereo- und Regiospezifität von *myo*-InsP₆ Dephosphorylierungen durch Phytasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia rhodanensis*

Viele Hefestämme sekretieren Phytasen und erlauben daher eine einfache Isolation dieser Enzyme. Die Zellen sind zudem leicht zu kultivieren, mit kurzer Generationszeit, und so ist frisches Zellmaterial leicht in großer Menge zugänglich.

Die Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ **13** mit Bäcker Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) führt über eine streng stereo- und regiospezifische Route.^{131,132} Vorausgehende Experimente mit *Pichia rhodanensis* sprachen für eine Phytase-Aktivität mit einem komplexen Dephosphorylierungsmuster. Da diese Spezies große Mengen der Phytase ins Kulturmedium sekretiert, konnte Dallmann eine schnelle Methode zur Isolation dieses Enzyms etablieren, die auf Präzipitation aus dem Medium durch Zugabe von Ethanol beruht.¹³³ Die Umsetzungen mit angereicherten Enzympräparationen anstelle von ganzen Zellen hatten dabei den Vorteil, daß unter anderem keine Kontamination aufgrund von Zelllyse stattfand und außerdem eine Umsetzung mit lebenden Zellen nur einen limitierten Temperatur- und pH-Bereich zuließ.

In einer umfassenden Untersuchung von Hefephytasen wurde aufgezeigt, daß fast alle Enzyme eine optimale Aktivität in einem pH-Bereich zwischen 4-5 haben.¹³⁴ Beide Phytasen wurden deshalb unter identischen Bedingungen, nämlich bei einer Temperatur von 45°C, einem pH von 4.6 (Acetatpuffer) und einer anfänglichen Substratkonzentration von 1 mM *myo*-InsP₆ **13** eingesetzt.¹³² Im Experiment blieb *Saccharomyces cerevisiae* lebensfähig über mehrere Stunden, so daß ein problemloser Einsatz über Stunden möglich war. Der literaturbekannte K_M-Wert für die teilaufgereinigte Phytase von *Pichia rhodanensis* ist 0.25 mM¹³⁴ bzw. 0.21 mM für die Phytase aus *Saccharomyces cerevisiae*.¹³⁵ Diese Werte lassen darauf schließen, daß eine Konzentration von 1 mM Inositolhexakisphosphat zu einer Substratsättigung des Enzyms führt. Die von Adelt et al. beschriebene Bestimmung des durch Hydrolyse freigesetzten Phosphats bietet eine zuverlässige Möglichkeit zur Quantifizierung der phosphorylierten Substanzen.⁸⁸ Das Chromatogramm in Abbildung 30 demonstriert wie die Phytase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Spur 1a) und *Pichia rhodanensis* (Spur 1b) die schrittweise Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ **13** katalysiert.

Abbildung 30: HPLC-MDD Analyse der enzymatischen Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ **13**



(a) *myo*-InsP₆ **13** Dephosphorylierung durch die Phytase aus *S. cerevisiae* und (b) die korrespondierende Reaktion katalysiert durch die Phytase aus *P. rhodanensis* (I: Ins(1,2,4,5,6)P₅/Ins(2,3,4,5,6)P₅ **29**; II: Ins(1,2,3,4,5)P₅/Ins(1,2,3,5,6)P₅ **31**; III: Ins(1,2,5,6)P₄/Ins(2,3,4,5)P₄; IV: Ins(1,2,4,5)P₄/Ins(2,3,5,6)P₄; V: InsP₃ Isomere).

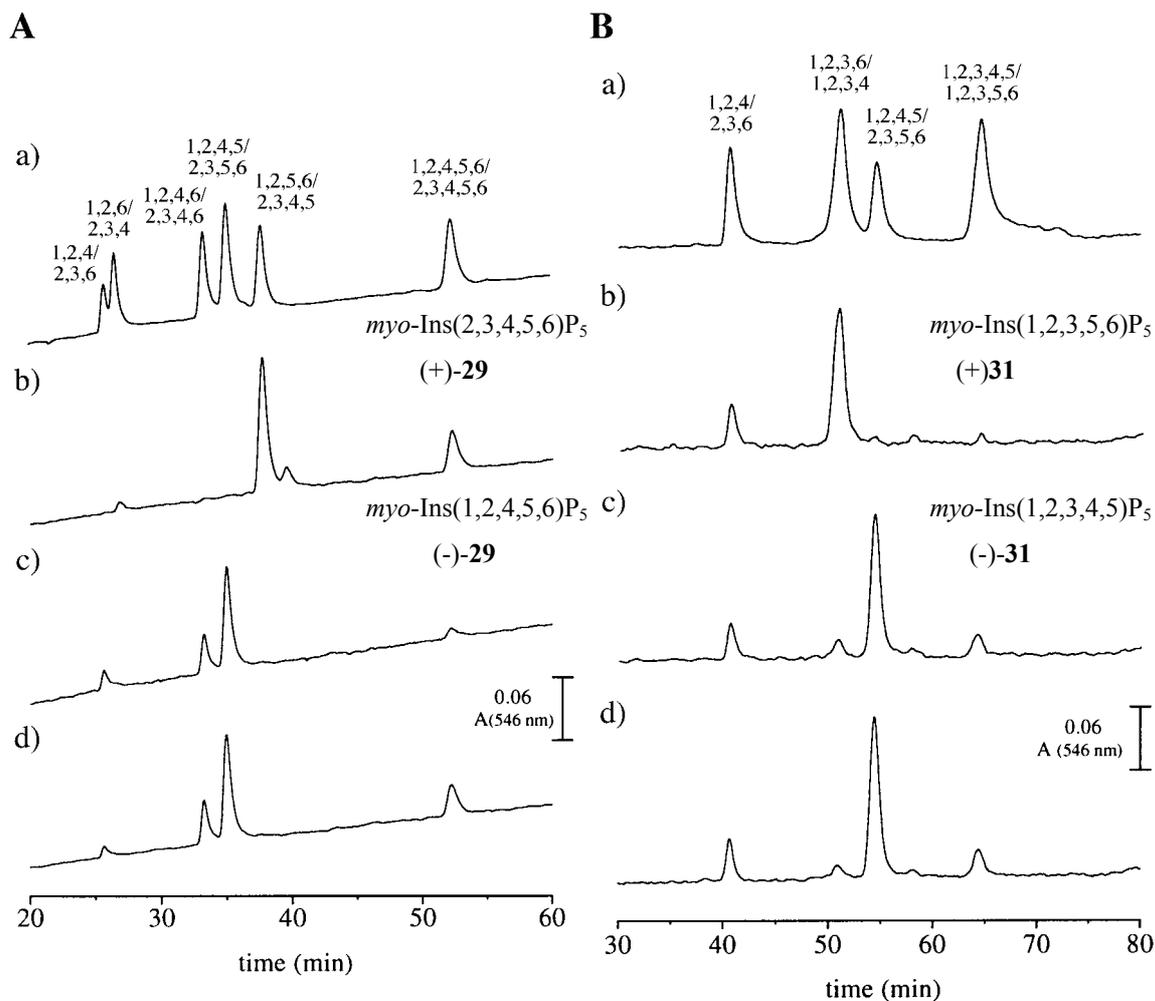
Die analytische Methode erlaubt aber keine Zuordnung der absoluten Konfiguration. Jedoch ist für die Phytase aus *Saccharomyces cerevisiae* die absolute Konfiguration des sich anhäufenden *myo*-InsP₃-Isomers eindeutig bestimmt worden. Es ist ausschließlich D-*myo*-Ins(1,2,6)P₃ (alpha-trinositol, PP56), eine Verbindung mit einem interessanten pharmakologischen Profil.¹³⁶ Cochromatographien mit Standards belegen, daß die Vorstufen D-*myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-**29** und D-*myo*-Ins(1,2,5,6)P₄ sind. Für die Phytase aus *Pichia rhodanensis* zeigen sich folgende *myo*-InsP₆ **13** Abbauprodukte: Ins(1,2,4,5,6)P₅/Ins(2,3,4,5,6)P₅ **29**, Ins(1,2,3,4,5)P₅/Ins(1,2,3,5,6)P₅ **31**, Ins(1,2,5,6)P₄/Ins(2,3,4,5)P₄, Ins(1,2,4,5)P₄/Ins(2,3,5,6)P₄ und InsP₃ Isomere.

Das Wissen über die exakte enzymatische *myo*-InsP₆ **13** Dephosphorylierung, einschließlich der absoluten Konfiguration der Zwischenstufen, ist eine Voraussetzung für die Erforschung der Substratspezifität mit den Stereoisomeren *neo*-InsP₆ (**161**) und L-*chiro*-InsP₆ ((-)-**135**) (siehe Kapitel 2.4.1).

In Kooperation mit der hiesigen biochemischen Arbeitsgruppe (Prof. Vogel, Dr. Adelt und Dipl.-Chem. Dallmann) konnte zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von *myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅/*myo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ **29** und *myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅/*myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ **31** aus der *Pichia rhodanensis*-Phytase-Umsetzung ein neuartiges Verfahren entwickelt werden. Dabei dient eine teilweise aufgereinigte Phytase aus *Dictyostelium discoideum* als ein

enzymatisches Hilfsmittel.¹²⁴ Nur 20 nmol des *myo*-Inositolpentakisphosphatisomers wird für die enzymatische Umsetzung benötigt.

Abbildung 31: HPLC-MDD Analyse zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der *myo*-Inositolpentakisphosphate **29** bzw. **31** mittels enzymatischer Dephosphorylierung



Stereoselektive Zuordnung von *myo*-Inositolpentakisphosphaten nach Umsetzung mit einer Phytase aus *D. discoideum*. HPLC-MDD Chromatogramme für die Enantiomerenpaare *Ins*(1,2,4,5,6) P_5 /*Ins*(2,3,4,5,6) P_5 (A; saures Elutionssystem) und *Ins*(1,2,3,4,5) P_5 /*Ins*(1,2,3,5,6) P_5 (B; basisches Elutionssystem).

A: Standardlösung aufgetrennter Isomere (a). Enzymatisch umgesetztes enantiomerenreines *Ins*(2,3,4,5,6) P_5 (+)-**29** (b), *Ins*(1,2,4,5,6) P_5 (-)-**29** (c) und isolierte korrespondierende Isomere aus dem *myo*-*InsP*₆ **13** / *Pichia*-Phytase Abbau (d).

B: Standardlösung aufgetrennter Isomere (a). Enzymatisch umgesetztes enantiomerenreines *Ins*(1,2,3,5,6) P_5 (+)-**31** (b), *Ins*(1,2,3,4,5) P_5 (-)-**31** (c) und das isolierte korrespondierende Isomere aus dem *myo*-*InsP*₆ **13** / *Pichia*-Phytase Abbau (d).

Die obig synthetisierten enantiomerenreinen Standards spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Abbildung 31 faßt die dabei erhaltenen Ergebnisse, die mittels HPLC-MDD (**metal dye detection**) aufgenommen wurden, für die Enantiomerenpaare *myo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅/Ins(1,2,4,5,6)P₅ **29** und *myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅/Ins(1,2,3,4,5)P₅ **31** zusammen.

Wie das Chromatogramm in Abbildung 31Ab zeigt, findet die erste Dephosphorylierung von *myo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ (+)-**29** hauptsächlich in der Position 6 statt und führt zu *myo*-Ins(2,3,4,5)P₄ **27**. Das Enantiomer *myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-**29** wird ebenfalls hauptsächlich an der Position 6 dephosphoryliert und es entsteht *myo*-Ins(1,2,4,5)P₄ **120** als Hauptprodukt (Chromatogram Ac). Dadurch entstehen klar unterscheidbare Dephosphorylierungsprodukte. Es ist besonders bedeutsam, daß sich die Signale der enzymatischen Abbauprodukte von *myo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ (+)-**29** und *myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-**29** nicht überlagern. Experimente mit künstlichen Gemischen der optischen Antipoden liefern eine Nachweisgrenze von unter 2% für das weniger konzentrierte Enantiomer. (Chromatogramm nicht abgebildet). Aufgereinigtes *myo*-Inositolpentakisphosphat mit der Retentionszeit von Ins(1,2,4,5,6)P₅/Ins(2,3,4,5,6)P₅ **29** aus der Umsetzung von *myo*-InsP₆ **13** mit *Pichia* Phytase konnte mit Hilfe dieses Verfahrens eindeutig als D-*myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ identifiziert werden ($\geq 98\%$ *ee*, Chromatogram Ad).

Schema 30: Bestimmung der Enantiomerenreinheit der *myo*-Inositolpentakisphosphate **29** bzw. **29** mittels enzymatischer Dephosphorylierung

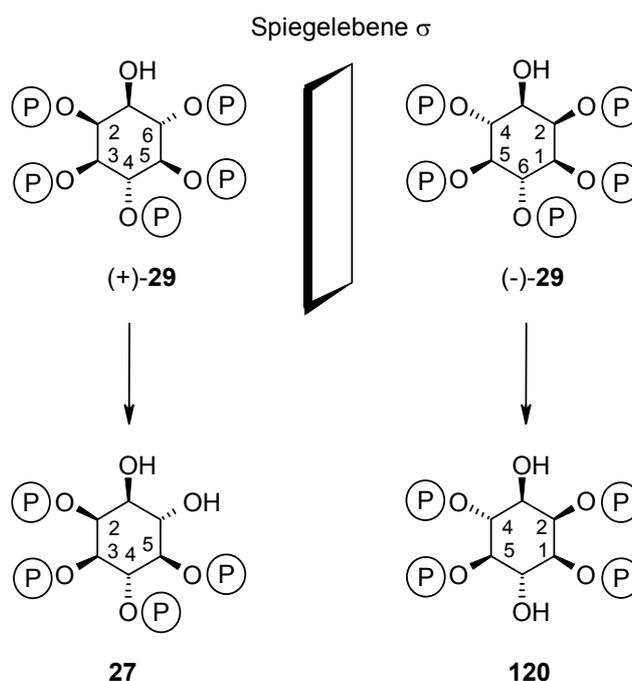
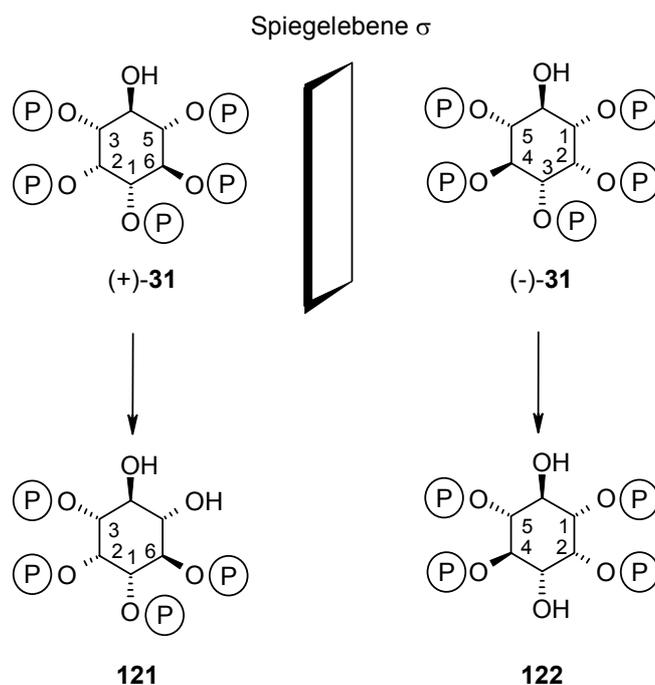


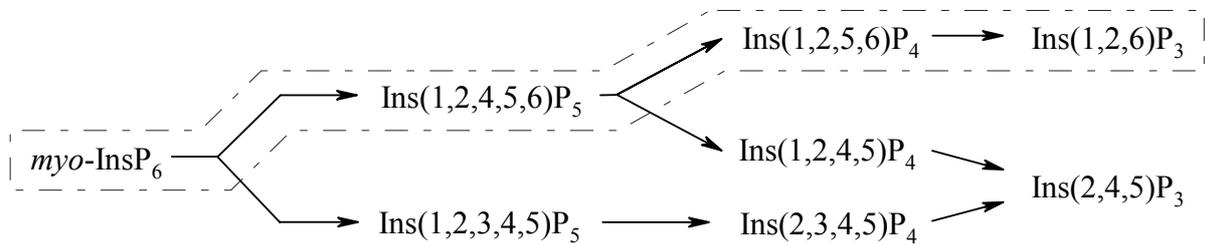
Abbildung 31B zeigt den analytischen Vergleich (analog dem obig beschriebenen Laufes) der enzymatischen Umsetzung der synthetisch dargestellten Referenzverbindungen *myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ (+)-**31** (Chromatogramm **Bb**) und *myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅ (-)-**31** (Chromatogramm **Bc**). In diesem Fall wurden für eine bessere Separation der Abbauprodukte die Proben mit dem basischen Elutionssystem chromatographiert. Die Hauptprodukte sind Ins(1,2,3,6)P₄ **121** aus Ins(1,2,3,5,6)P₅ (+)-**31** und Ins(1,2,4,5)P₄ **122** aus Ins(1,2,3,4,5)P₅ (-)-**31**. Analoge Experimente mit dem zweiten isolierten Inositolpentakisphosphat, das aus der Umsetzung von *myo*-InsP₆ **13** mit *Pichia* Phytase erhalten wurde, zeigt, daß es sich bei dieser Verbindung um *D*-*myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅ ($\geq 98\%$ *ee*, Chromatogramm **Bd**) handelt.

Schema 31: Bestimmung der Enantiomerenreinheit der *myo*-Inositolpentakisphosphate **31** bzw. **31** mittels enzymatischer Dephosphorylierung



Auf Basis der absoluten Konfiguration der isolierten Inositolpentakisphosphate, konnte mittels HPLC-MDD der Abbauweg bis zum Inositoltrisphosphat eindeutig bestimmt werden (siehe Abbildung 32).

Abbildung 32: Hauptabbauwege von *myo*-InsP₆ **13** katalysiert durch Phytase aus *P. rhodanensis* (umrandete Reaktionssequenz charakteristisch für *S. cerevisiae*).



Zusammenfassung:

In Zusammenarbeit mit Adelt und Dallmann konnte eine neue Strategie zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit von *myo*-Inositolpentakisphosphaten etabliert werden. Mit Hilfe der enantiomerenreinen Standards konnten die Hauptabbauwege von *myo*-InsP₆ **13** durch Phytase aus *P. rhodanensis* aufgeklärt werden. Das Wissen über die Abbauwege von *myo*-InsP₆ **13** durch Phytasen aus *P. rhodanensis* und *S. cerevisiae* ließ die Synthese der Epimeren von *myo*-InsP₆ **13** als interessantes Ziel erscheinen (siehe Absatz 2.4).

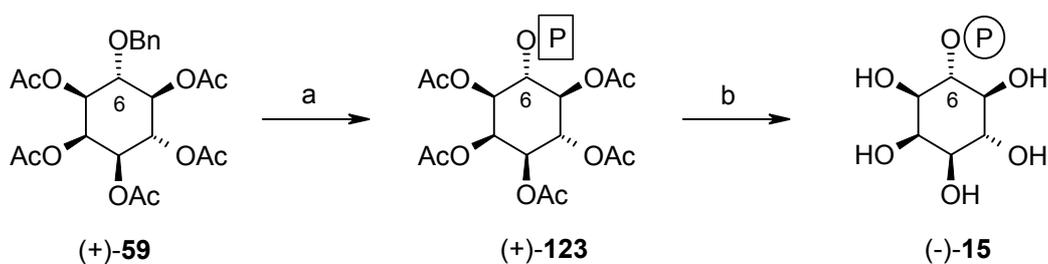
2.3.2.3 Synthese von weiteren *myo*-Inositolpolyphosphaten mittels Bausteinen aus der desymmetrisierenden Route: Darstellung von *myo*-Ins(6)P und *myo*-Ins(4)P (-)- bzw. (+)-15 sowie *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-24

Die desymmetrisierende Route liefert ergänzend neben den *myo*-Inositolpentakisphosphaten weitere Regioisomere, die nur über diesen Weg darstellbar sind.

Darstellung von *myo*-Inositol-6-phosphat (-)-15

Aufgrund der Orthogonalität der Schutzgruppen des asymmetrischen Konzepts können alle *myo*-InsP₅ Vorstufen grundsätzlich auch für die Synthese der *myo*-Inositolmonophosphate genutzt werden. Penta-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-*D*-*myo*-inositol (+)-59 ist dabei die ideale Vorstufe zur Synthese von *myo*-Ins(6)P (-)-15. Die Synthesesequenz startet dabei mit der Palladium-katalysierten hydrogenolytischen Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe an der 6-Position.

Schema 32: Darstellung von *myo*-Inositol-6-phosphat (-)-15



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. Pd/C, H₂, EtOAc [99%]. 2. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphapan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA [51%]. - (d) 1. Pd/C, H₂, Ethanol/Wasser. 2. 0.25 N NaOH [99%].

Das erhaltene Produkt wurde dabei nicht weiter aufgearbeitet, da die Schutzgruppenwanderungstendenz womöglich alle Aufreinigungsversuche zunichte machen dürfte. Deshalb wurde das Rohprodukt gleich weiter mit dem Phosphorylierungsmittel **62** umgesetzt und man erhielt das geschützte (+)-123 in über 50%iger Ausbeute. Die Freisetzung der Verbindung zum *myo*-Ins(6)P (-)-15 erfolgte dagegen unter Standardbedingungen quantitativ. Das

optische Antipod *myo*-Ins(4)P (+)-**15** wurde dabei über analogem Weg ausgehend von (-)-**59** synthetisiert.

Weitere Synthesen der *myo*-Inositolphosphate über diesen Weg sind dagegen nicht sinnvoll, da *myo*-Ins(3)P (+)-**11** und sein optischer Antipode *myo*-Ins(1)P (-)-**11** bereits über den symmetrischen Weg dargestellt werden konnte.

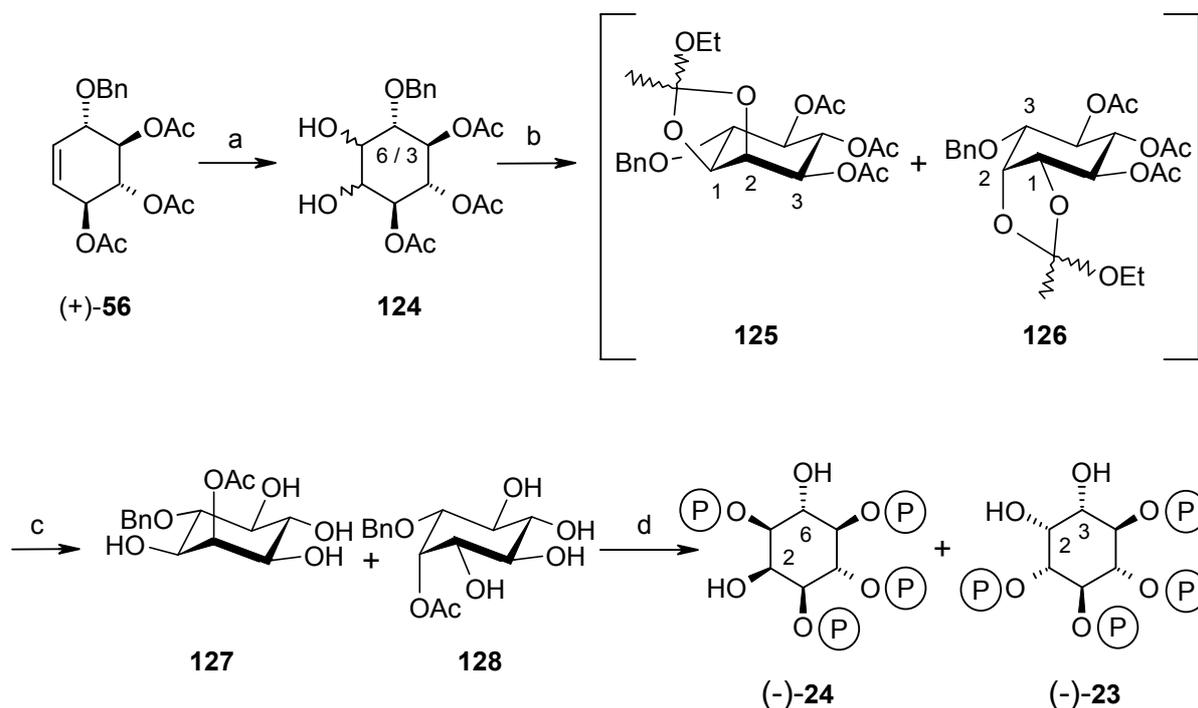
Darstellung von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, ist *myo*-Ins(1,4,5)P₃ durch die Rolle als „second-messenger“ wohl das biologisch wichtigste *myo*-Inositolphosphat. Daneben hat das *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ **24** ebenfalls eine Funktion bei der Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (siehe Einleitung). Dieses Inositolphosphat ist durch einen *de novo* Ansatz bisher nur in einer umständlichen Synthese racemisch dargestellt worden.⁸⁷ Schwachstelle in dieser Synthese ist ebenfalls die bei enantiomerenreiner Umsetzung schlechte Kristallisationstendenz der Intermediate, und somit lieferte der enantiomerenreine Syntheseversuch kein Produkt.

Der hier verfolgte neue Ansatz sollte äußerst schnell und einfach auch enantiomerenrein durchführbar sein. Bei der Konzeption dieser Route ist von maßgeblicher Bedeutung, daß die axiale Hydroxygruppe leicht als Acetat geschützt werden kann (siehe auch Synthese von *myo*-Ins(1)P **11**).

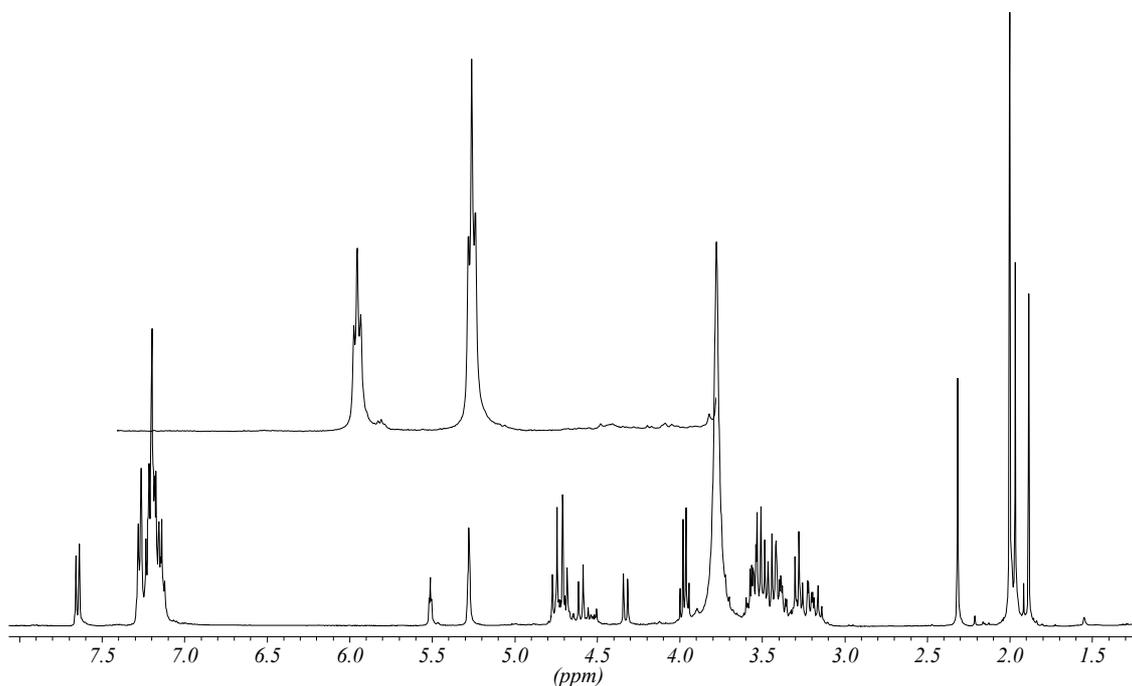
Der erste Schritt in dieser Synthese ist bereits im vorigen Abschnitt an **56** durchgeführt worden. Diese beinhaltet die *cis*-Dihydroxylierung mit Rutheniumtrichlorid und Natriumperiodat unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 2.3.2.1, S. 79). Diese führt im desymmetrisierenden Konzept zu zwei Diastereomeren. Die zwei Diastereomere wurden nicht getrennt, sondern gleich ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Eine anschließende Monofunktionalisierung (siehe auch Schema 15, S. 60) mittels Orthoessigsäuretriethylester und saurer Aufarbeitung würde zwar zu dem gewünschten Produkt mit dem an der 2-Position geschützten Acetat führen, aber eine selektive Abspaltung der Acetatschutzgruppen an der 3-, 4- und 5-Position ist dann aufgrund der Gleichheit der Schutzgruppe nicht mehr möglich.

Schema 33: Darstellung von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24**

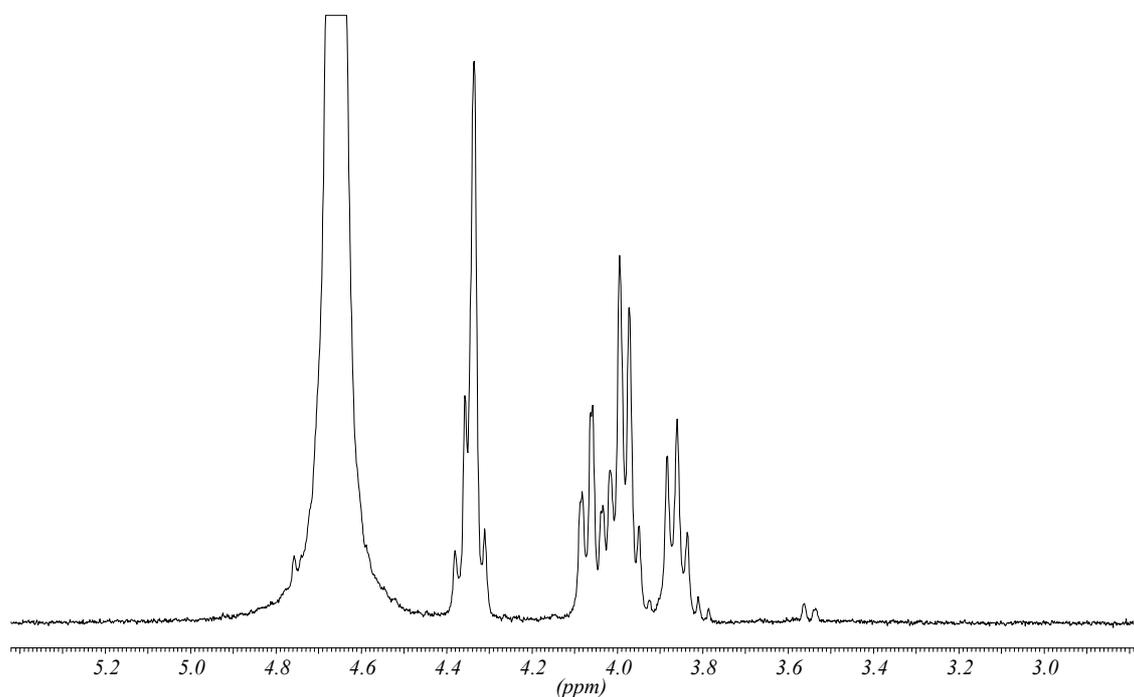
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril. – (b) MeC(OEt)₃, *p*-TSA. - (c) 1. NaOMe, MeOH. 2. 80%ige AcOH. - (d) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphoshepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA 2. Pd/C, H₂, Ethanol/Wasser dann 0.25 M NaOH [Ausbeute über alle Stufen: 20%].

Dies läßt den Schluß zu, daß dieser eingeschlagene Weg scheinbar nicht sinnvoll ist. Eigentlich müßte man zuerst das Triacetat **56** umschützen. Da die Acetatgruppe später an der 2-Position eingeführt wird, muß man eine orthogonale Schutzgruppe zur Acetatgruppe verwenden (z. B. sauer labile, wie MEM oder MOM-Schutzgruppe). Dieses Konzept würde aber die Synthese deutlich verlängern und deshalb wurde an diesem System erstmals das *in situ* gebildete Intermediat in die Überlegung mit einbezogen. Wenn man den Orthoester **125** und **126** nicht sauer aufarbeitet, sondern diesen als Schutzgruppe für die neue Diolereinheit sieht, löst sich das Problem. Da die Orthoester **125** und **126** basenstabil sind, wird einfach zuerst mit katalytischer Menge an Natriummethanolat in Methanol basisch de-*O*-acetyliert. Man erhält *in situ* den Triolorthoester (Struktur nicht abgebildet), welcher in einem folgendem sauren Aufarbeitungsschritt zum axialen Acetat (**127** und **128**) umlagert.

Abbildung 33: ^1H -NMR des Diastereomerengemisches **127** und **128**

Die erfolgreiche Umsetzung dieses Plans kann NMR-spektroskopisch verfolgt werden. Das Proton an der 2-Position ist dabei leicht zu erkennen, da es als Pseudotriplett nun stark tiefeldverschoben bei über 5.27 bzw. 5.51 ppm liegt. Die restlichen Ringprotonen sind hingegen hochfeldverschoben und liegen zwischen 3 bis 4 ppm.

Nach Phosphorylierung, Hydrogenolyse und basischer Verseifung der Acetatgruppen erhält man ein Gemisch aus *myo*-Ins(1,3,4,5) P_4 **24** und *myo*-Ins(1,4,5,6) P_4 **23**. Diese konnten leicht mit ionenchromatographischer HPLC voneinander getrennt und aufgereinigt werden. Das *myo*-Ins(1,4,5,6) P_4 **23** fällt zwar bei dieser Synthesesequenz auch an, dieses konnte aber Plettenburg sehr viel einfacher auf dem symmetrischem Wege darstellen.⁸⁸

Abbildung 34: $^1\text{H-NMR}$ von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-24

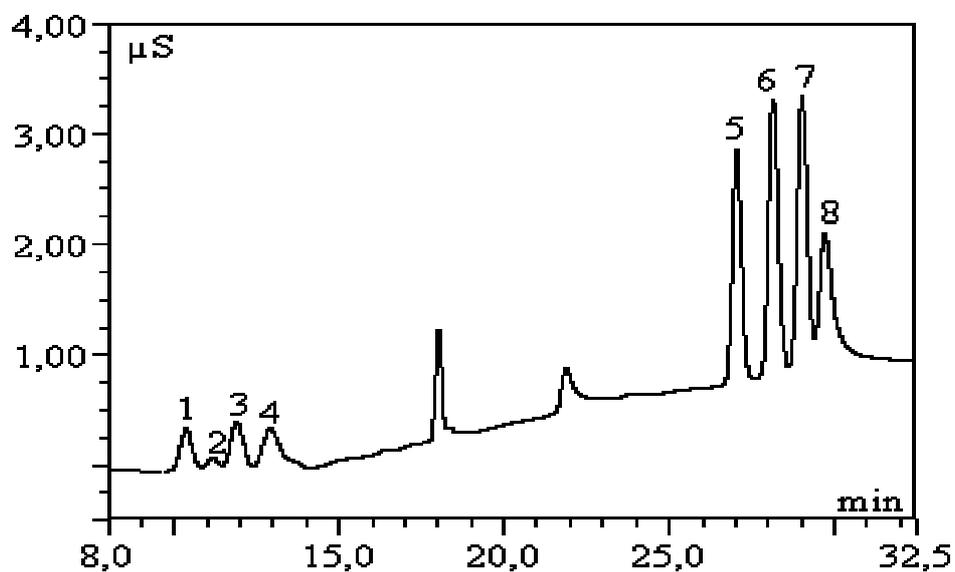
Mit einer eleganten Reaktionsführung ließ sich das gewünschte Produkt äußerst schnell generieren und steht somit für Untersuchungen an *Dictyostelium discoideum* zur Verfügung. Der Trick in diesem Konzept ist die Schützung der 2-Acetat-Position als Orthoester während die anderen Acetate abgespalten werden.

2.3.3 Verwendung der *myo*-InsP₁ und *myo*-InsP₂ Isomere

Der Stoffwechsel der höher phosphorylierten *myo*-Inositolpolyphosphate ist bereits eingehend erforscht worden. Demgegenüber ist die biologische Bedeutung der niederphosphorylierten *myo*-InsP_x Isomere bisher weitgehend unbekannt. Die dargestellten *myo*-InsP₁ und *myo*-InsP₂ Isomere könnten daher zahlreiche bisher unbekannte biologische Aufgaben besitzen. Der Grund an dem geringen Wissen ist die Schwierigkeit beim Nachweis. Bisher werden diese Isomere häufig nur mittels Gaschromatographie als ihre silylierten Derivate nachgewiesen. Die Nachweisgrenze ist dabei bei weitem nicht so niedrig wie oftmals erwünscht. Außerdem

lassen sich die Isomere dabei oft nicht voneinander getrennt nachweisen. Daher wurde in Kooperation mit der Biochemie der Universität Wuppertal, im Rahmen eines DFG-Projektes (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant VO 348/3-1), an einer verbesserten Nachweismethode gearbeitet. Die bisherige MDD-Methode beruht auf Komplexbildung von Metallionen, daher ist die Nachweisgrenze von niederphosphorylierten Inositolen sehr gering. Zur Etablierung eines neuen Verfahrens wurde eine Vielzahl an Referenzverbindungen benötigt, die größtenteils über den symmetrischen sowie den unsymmetrischen Weg synthetisiert wurden.

Abbildung 35: Standardlauf der *myo*-InsP₁ und *myo*-InsP₂ Isomere



Erläuterung: *myo*-InsP₁- und *myo*-InsP₂-Isomere:

Ins(2)P **96** [10.4 min (1)]; Ins(4)P (+)-**15** [11.2 min (2)]; Ins(3)P (+)-**11** [11.9 min (3)]; Ins(5)P [12.9 min (4)]

Ins(1,6)P₂ [27.1 min (5)]; Ins(4,5)P₂ (+)-**16** [28.2 min (6)]; Ins(2,4)P₂ [29.0 min (7)]; Ins(1,4)P₂ (-)-**17** [29.7 min (8)]

Im Rahmen der Kooperation (biochemische Arbeitsgruppe Prof. Vogel, Dr. Adelt und Dipl.-Chem. Dallmann) konnte ein auf anionenaustausch-basierendes HPLC-Verfahren entwickelt werden, bei dem die Detektion über eine Leitfähigkeitsbestimmung nach Suppression (HPIC-CD) erfolgt. Nach Methodenoptimierung konnte das Zeitfenster zur Elution der *myo*-Inositolbisphosphate von weniger als 0.5 min. auf mehr als 3.5 min gespreizt werden. Wie dem Chromatogramm zu entnehmen ist, erlaubt der entwickelte Gradient auch

die Trennung aller möglichen *myo*-Inositolmonophosphate (*myo*-Ins(2)P, *myo*-Ins(3)P, *myo*-Ins(4)P, *myo*-Ins(5)P). Die Nachweisgrenzen liegen dabei im unteren μM -Bereich (≈ 50 pmol total).

Zusammenfassung:

Zusammenfassend stellt der in dieser Arbeit weiterentwickelte *de novo* Zugang zu den enantiomerenreinen *myo*-Inositolphosphaten eine interessante Alternative zu den bereits bekannten Synthesen dar. Die große Flexibilität sowohl des desymmetrisierenden als auch des symmetrischen Konzepts und das Ineinandergreifen beider Routen konnte in dieser Arbeit zur Synthese von zahlreichen *myo*-Inositolphosphaten genutzt werden.

In Kooperation mit der biochemischen Arbeitsgruppe (Prof. Vogel, Dr. Adelt und Dipl.-Chem. Dallmann) konnte zudem eine neue Strategie zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit von *myo*-Inositolpentakisphosphaten sowie ein analytisches Verfahren zum Nachweis von *myo*-Inositolbis- und -monophosphaten etabliert werden. Damit ist es möglich den Stoffwechsel der niederphosphorylierten *myo*-Inositole bei *Dictostelium discoideum* aufzuklären.

2.4 Darstellung der Inositolstereoisomeren

Die Synthese von Stereoisomeren von *myo*-Inositol **1** wurde durch unsere fortgeführte Untersuchung der Regiospezifität von Phosphohydrolasen notwendig.⁶¹ Hexaphosphorylierte Inositolregioisomere können als Werkzeuge für die Erforschung der strukturellen Anforderungen der Dephosphorylierung von Phytasen und anderen Phosphohydrolasen dienen.

Inositolisomere waren in den letzten Jahren häufig Ziel synthetischer Ansätze. Jedoch gab es zu Beginn der Arbeit in der Literatur noch kein umfassendes Konzept zur selektiven Synthese der Stereoisomere.

Wie schon in den vorigen Abschnitten ausgenutzt wurde, sollte enantiomerenreines Diacetoxy-dibromcyclohex-5-en (+)-**43** und (-)-**43** ebenfalls ein hervorragender Baustein für die Synthese der Inositol-Isomere sein. Dieses synthetische Konzept basiert auf der stereospezifischen Umwandlung dieses „building blocks“ in geeignete geschützte enantiomerenreine Konduritolderivate. Diese werden später durch Umwandlung der Doppelbindung in Inositol-Isomere überführt. Somit verwendet man wiederum den gut etablierten enzymatischen Schritt für die Darstellung einer Vielzahl verschiedener Inositol-Isomere.

Ansätze dazu wurden bereits durch Block¹³⁷ und Plettenburg⁸⁷ demonstriert. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde ein umfassendes Synthesekonzept erarbeitet und zur Darstellung von InsP₆-Isomeren herangezogen. Die Syntheserouten, die über symmetrische Konduritoll-Zwischenstufen durchlaufen, sind unter dem symmetrischen Weg zusammengefaßt. Syntheserouten, die unsymmetrische Konduritoll-Zwischenstufen durchlaufen, sind unter dem desymmetrisierenden Weg zusammengefaßt.

2.4.1 Symmetrischer Weg: Darstellung von *chiro*-, *scyllo*-, *neo*-, *myo*- und *allo*-Inositol

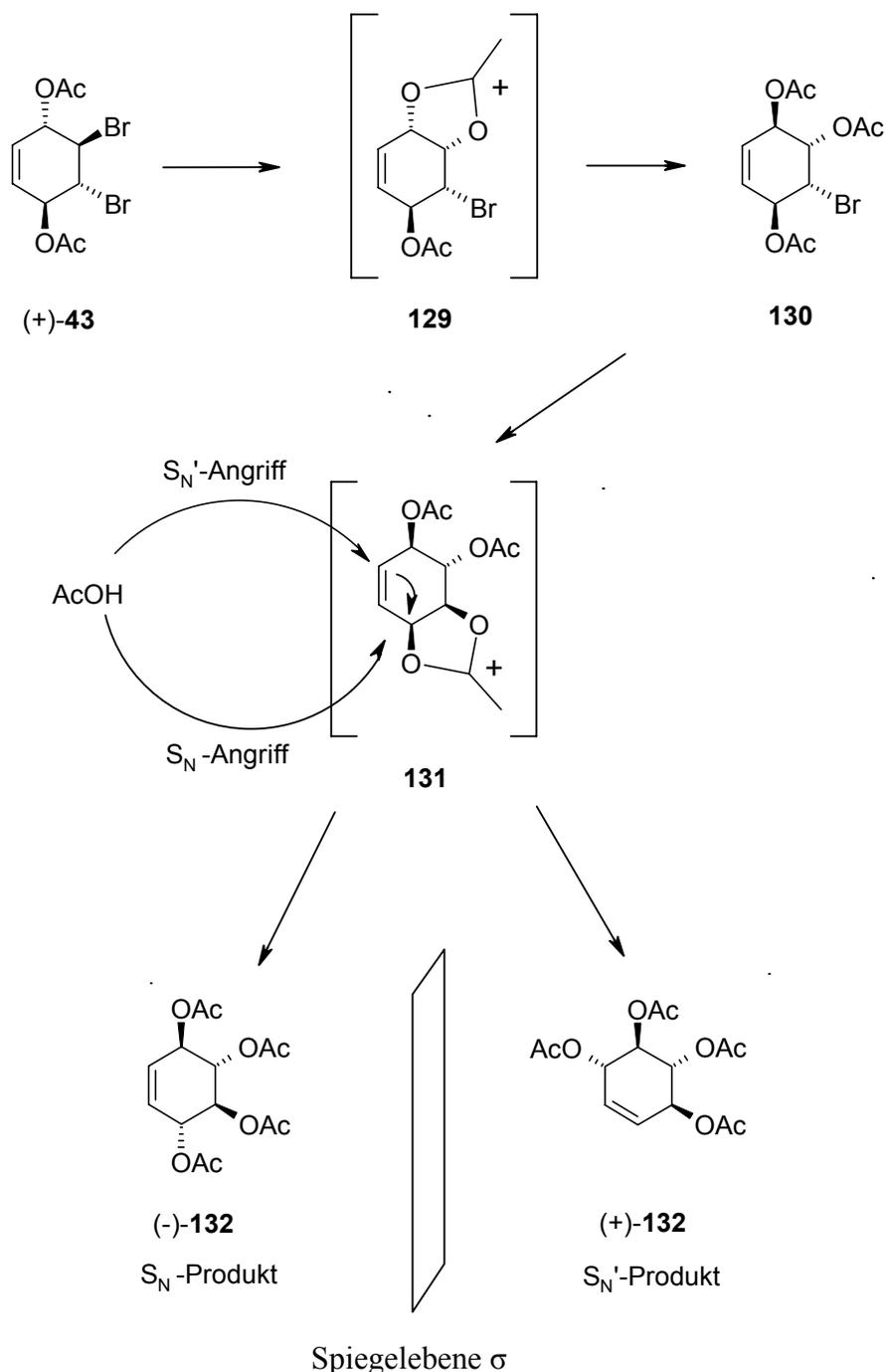
Der hier beschriebene neue Syntheseweg soll zu Konduritoll E und Konduritoll B in einer Stufe von enantiomerenreinen Diacetat **43** führen. Es wurde versucht, einen enantiomerenreinen Weg zu etablieren, weil die biologische Aktivität dieser Verbindungen und ihrer Phosphate, besonders ihre Rolle in der intrazellulären Kommunikation, nur an enantiomerenreinen Phosphat-Derivaten untersucht werden kann.

Für die Synthese von *meso*-Verbindungen, wie sie die freien Inositate (außer *chiro*-Inositol) sind, ist es natürlich nicht notwendig, enantiomerenreines Edukt zu verwenden. Alle Syntheserouten können wahlweise ausgehend von racemischen **43** durchgeführt werden. Neben der kürzeren Route vereinfacht sich oftmals die Synthese, da racemische Intermediate eine viel größere Kristallisationsdendenz aufweisen und sich somit häufig nur durch einfache Umkristallisation aufreinigen lassen.

Trotzdem wurde auch in diesen Fällen ein enantiomerenreiner Weg etabliert, da die Hydroxygruppen der enantiomerenreinen Intermediate orthogonal geschützt sind. Damit kann man enantiomerenreine Inositol-Derivate synthetisieren, die zur Aufklärung von Abbauwegen von InsP_6 -Isomeren beitragen können.

Synthese von enantiomerenreinem L- und D- *chiro*-Inositol sowie von *scyllo*-Inositol:

Retrosynthetische Betrachtungen lassen Konduritol B Derivate als geeignete Ausgangsverbindungen erscheinen. Aus Arbeiten von Stegelmeier war bekannt, daß sich das Diacetaat **43** mit Silberacetat im siedenden Eisessig (wasserfreie Bedingungen) nahezu quantitativ in Konduritol B **132** umsetzen läßt.⁹⁰ Durch den aktivierenden Effekt des Silbers substituiert die *trans*-ständige Acetatgruppe unter Ausbildung eines Acetoxonium-Ions das Bromid. Danach erfolgt nach der Ausbildung der Acetoxoniumionen-Zwischenstufen (**129** und **131**) jeweils der Angriff der Acetylal-Anionen ausschließlich an den Allylpositionen. Das bei der Verwendung von enantiomerenreinem (+)-**43** erhaltene Konduritol B (-)-**132** war NMR-analytisch ein hochreines Produkt, welches einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = -54.1^\circ$ ($c = 1.2$, CHCl_3) aufwies. Vergleiche mit Arbeiten von Trost¹³⁸ und Ley¹³⁹ zeigten jedoch zum Teil erheblich höhere Drehwerte. So gibt ihn Trost mit $[\alpha]_D^{20} = -172.8^\circ$ ($c = 1.28$, CHCl_3) und Ley mit $[\alpha]_D^{20} = -70^\circ$ ($c = 0.85$, CHCl_3) an. Das Produkt konnte an chiraler HPLC-Phase basisliniengetrennt (Chiracell ODH, Heptan/IPA 95:5) werden. In Übereinstimmung mit dem geringen Drehwert kann man hier eindeutig belegen, daß das Produkt nur einen Enantiomerenüberschuß von 24% *ee* aufweist. Da enantiomerenreines Edukt eingesetzt wurde muß der Grund dafür im Mechanismus der Reaktion liegen. Da gleich vier Stereozentren invertiert werden müßten, scheint es aber zunächst äußerst unwahrscheinlich, daß bei dieser Reaktion eine Racemisierung stattfindet.

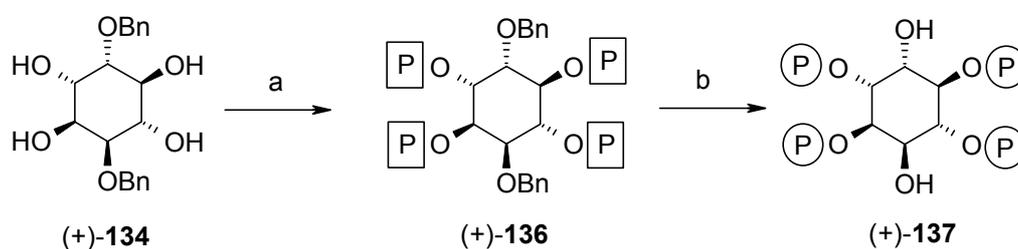
Schema 34: Bildung des Prévost-Produktes aus Diacetat (+)-**43**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. AgOAc, absolute AcOH/Ac₂O, 1 Tag, 125 °C.

Während man in der Regel einen Angriff in der nicht-allylischen Position durch ein Nucleophil an **131** und **131** ausschließen kann, so ergibt sich neben der Öffnung in der Allylposition (S_N2 -Angriff) ein zweiter Reaktionskanal durch einen S_N' -Angriff (1,4-Angriff). Dieser erfolgt meist stereoselektiv (d.h. *syn* zum Acetoxonium-Ion) an der dem Acetoxoniumion benachbarten Doppelbindung. Ein stereoselektiver Angriff würde damit zu einem Konduritol F Derivat führen, welches man als Nebenprodukt vermutlich leicht

Aufgrund der C_2 -Symmetry des Konduritol B Derivat (-)-**50** führt die Epoxidation nur zu einem Produkt, dem (-)-**133**. In Übereinstimmung mit der "Fuerst-Plattner-Regel"¹⁴⁰ öffnet der Oxiranring selektiv und bildet nur das *trans*-diaxiale Produkt, das *L-chiro*-Isomer (-)-**134**. Hydrierung des Dibenzyl *chiro*-inositol (-)-**134** führt zum freien *L-chiro* Inositol (-)-**4** als farblosen Feststoff. *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** kann durch Phosphorylierung und anschließende hydrogenolytische Freisetzung aus *L-chiro* Inositol (-)-**4** problemlos dargestellt werden. Außerdem wurde das optische Antipod *D-chiro*-Inositol (+)-**4** ausgehend von (+)-Diol **42** erhalten.

Schema 36: Darstellung von *D-chiro*-Ins(1,3,4,6)P₄ **137**



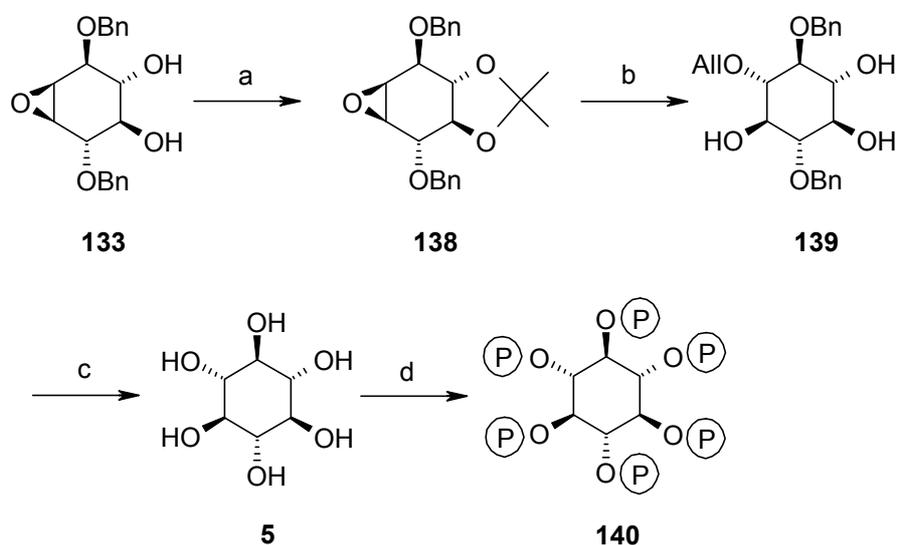
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, Acetonitril dann *m*-CPBA [30%]. –(b) Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser [99%].

Analog der Synthese von (-)-**135** wurde das *D-chiro* Derivat (+)-**134** unter Standardbedingungen phosphoryliert. Das geschützte Tetrakisphosphat (+)-**136** konnte analysenrein durch säulenchromatographische Aufreinigung isoliert werden. Hydrogenolytische Entschützung mit Pd/C liefert reines *D-chiro*-Ins(1,3,4,6)P₄ (+)-**137**, eine Standardverbindung, die zur Aufklärung der Abbauege von *D-chiro*-InsP₆ mit behilflich sein konnte.

Synthese von *scyllo*-inositol 5:

Block¹³⁷ konnte beobachten, daß sich die Regioselektivität der Epoxidöffnung bei **133** durch vorsichtige Wahl der Reaktionsbedingungen und der Schutzgruppen beeinflussen läßt. Es konnte beobachtet werden, daß das Derivat **138**, welches eine cyclische Isopropylidengruppe in 5 und 6 Position besitzt, eine invertierte Regioselektivität bei der Epoxidöffnung zeigt. Die basische Öffnung mit Allylalkohol gefolgt von saurer Entschützung führt nach Umkristallisation ausschließlich zum *scyllo* Isomer **139**.

Schema 37: Synthese von *scyllo*-Inositolhexakisphosphat **140**

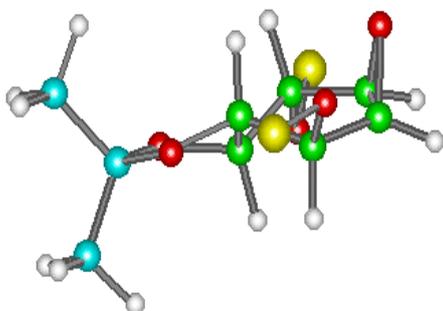


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 2,2-Dimethoxypropane, Aceton, PPTS [96%]. – (b) 1. NaOAll, AlIOH, 90 °C. 2. HCl [60%]. – (c) 1. Pd/C, MeOH. 2. HCl. 3. Pd/C, H₂ [85]. – (d) 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphapan, 1*H*-Tetrazol, Dichlormethan dann *m*-CPBA [40%]. 2. Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser [99%].

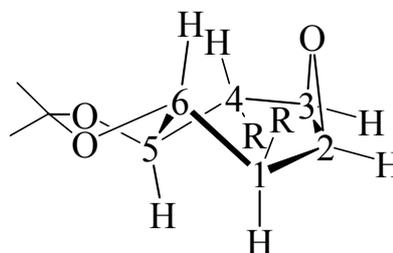
Die Regioselektivität der Epoxidöffnung an **138** scheint zunächst im Gegensatz zur “Fuerst-Plattner-Regel” (Regioselektivität der unflexiblen Steroidepoxide) zu stehen.¹⁴⁰ Das Ergebnis konnte mittels Molekularmodelling mit HyperChem 5.01 (TM von Hypercube Inc) rationalisiert werden. Die Spannung, die aufgrund des zyklischen Isopropylidenringes entsteht, scheint eine Reaktion über den twist-Übergangszustand zu favorisieren. Zusätzlich ist der Abstand zwischen dem Sauerstoff des Oxiranringes und dem Wasserstoff an C-5 äußerst gering (berechneter Wert liegt bei 2.63 Å). Eine Oxiranöffnung, die ausschließlich an der C-2-Position erfolgt, führt zur Auflösung dieser sterischen Spannung.

Abbildung 36: Modell des isopropylidengeschützten Epoxids **138**

a)



b)



Für eine bessere Übersicht wurden die Benzylgruppen durch gelbe Bälle (Abb. a) bzw. bei Abbildung b) ist OBn durch R ersetzt. Die Kalkulation wurde mit semiempirischer AM1 Methode (als Algorithmus) durchgeführt.

Die saure Aufarbeitung läßt die allylische Gruppe unangetastet. Zur Entschützung wird die Doppelbindung zuerst mit Hilfe von Pd/C isomerisiert und der erhaltene Enolether sauer gespalten. Die Hydrogenolyse führt letztlich zum gewünschtem *scyllo*-Inositol **5** in 85%iger Ausbeute ausgehend von **139**.

Die Phosphorylierung wurde mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** unter Zusatz von 1*H*-Tetrazol in Dichlormethan und anschließender Oxidation des Phosphits mit *m*-CPBA durchgeführt. Die anschließende Pd/C-katalysierte hydrogenolytische Entfernung der Xylyl-Gruppen ergibt zu *scyllo*-Inositol-hexakisphosphat **140**.

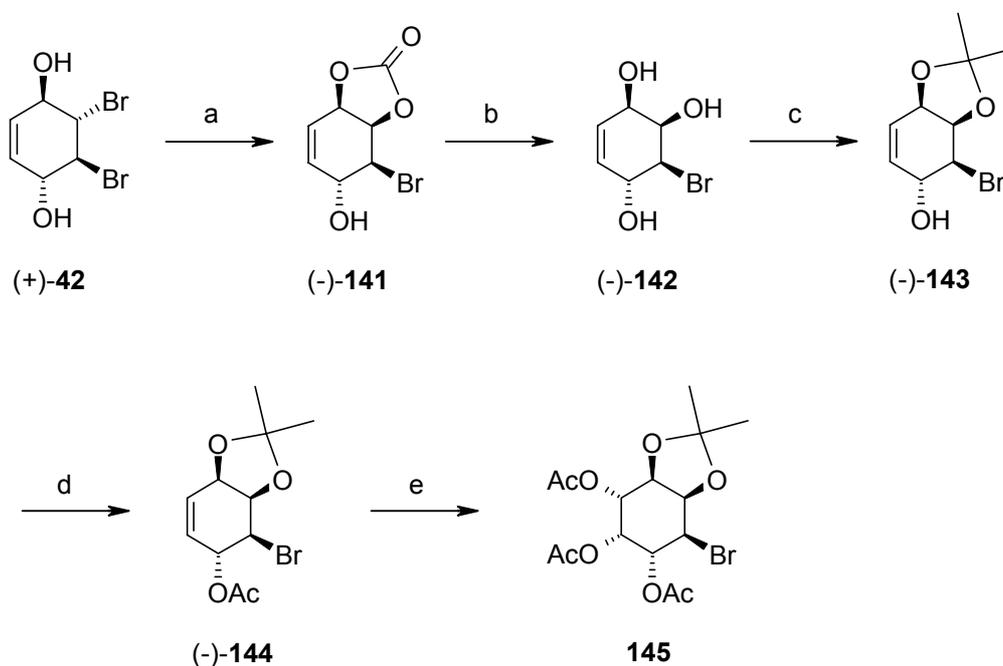
Synthese of *neo*-inositol 3:

Es wurden parallel zwei grundsätzlich unterschiedliche Konzepte verfolgt. Zum einen wurde ein unsymmetrischer Ansatz über Konduritol C Derivate und zum anderen ein symmetrisches Konzept über Konduritol E Zwischenstufen verfolgt.

Syntheseversuch von *neo*-Inositol ausgehend von Konduritol C Vorstufen

Retrosynthetische Betrachtungen lassen den Monocarbonat-Baustein **141** (Synthese siehe auch Schema 40, S. 106) als aussichtsreiches Startmolekül erscheinen. Gleichzeitig wäre eine Synthesesequenz wünschenswert, die neben dem freien *neo*-Inositol **3** auch eine geeignete differenziert geschützte Vorstufe liefert. Diese könnte die Möglichkeit eröffnen *neo*-Ins(1,4,5)P₃ darzustellen.

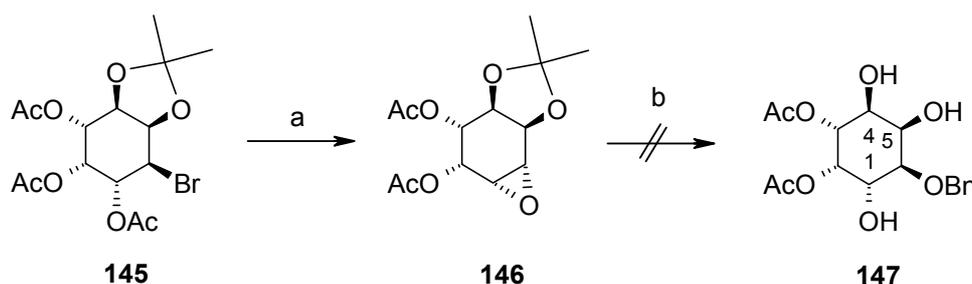
Schema 38: Versuch der Darstellung von *neo*-Inositol und *neo*-Ins(1,4,5)P₃



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) DBU, THF, CO₂, - 50 °C, 2 h [92%]. – (b) Pyridin, H₂O, 50 °C 12 h [99%]. – (c) 2,2-Dimethoxypropan, absolutem Aceton, PTSA [76%]. – (d) Ac₂O, Pyridin [99%]. – (e) (a) 1. RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril. 2. Ac₂O, Pyridin [99%].

Um dafür orthogonale Schutzgruppen zu generieren, mußte das freie Monocarbonat (-)-**141** zuerst mild unter basischen Bedingungen entschützt werden. Während der Entschützung verfärbte sich der Ansatz stark, so daß als Rohprodukt nur eine ölig, braune Masse isoliert werden konnte. Hauptproblem bei dieser Entschützung eines Monocarbonates ist vermutlich die Aromatisierung des Systems unter basischen Bedingungen. Diese Tatsache konnte auch bei der Entschützung des Biscarbonates **148** beobachten werden. Aus diesem Grunde lieferte auch die anschließende Isopropylidenschützung des Rohproduktes keine vollständige Umsetzung, und man erhielt den Monoalkohol (-)-**143** in 50%iger Ausbeute über beide Stufen. Da man diese Synthese aber leicht in Multigrammmaßstab durchführen kann, ist die geringe Ausbeute bei der Umschützung durchaus akzeptabel. Die nach Acetylierung durchgeführte *cis*-Dihydroxylierung lieferte wie gewünscht, aufgrund der großen sterischen Hinderung der Isopropylidenschützung, ausschließlich das *neo*-Isomer. Interessanterweise ist die Schutzgruppenwanderung sehr dominierend. Man erhält drei Produkte in fast gleichen Mengenverhältnis. Das ist der Beweis dafür, daß die Acetatgruppe zwischen allen drei Hydroxygruppen wandert. Da aber zur einfacheren Aufreinigung peracetyliert wird, erhält man das Triacetat **145** in fast quantitativer Ausbeute. Bis zu diesem Zeitpunkt verläuft die Synthese sehr erfolgreich und es kann die gewünschte Vorstufe **145** in einer sehr guten durchschnittlichen Ausbeute von 84% erhalten werden.

Schema 39: Darstellungsversuch von *neo*-Ins(1,4,5)₃ Vorstufe



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. KOH, THF, MeOH. 2. Ac₂O, Pyridin. – (b) BnOH, H₂SO₄ (Kat.).

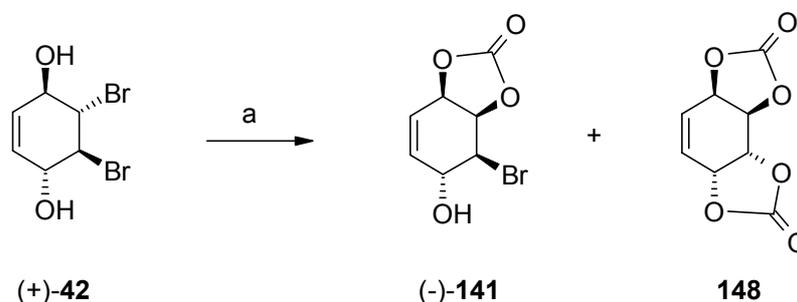
Die anschließende Epoxidgenerierung verlief hingegen äußerst unzureichend. Zwar konnte das Epoxid im NMR eindeutig nachgewiesen werden, aber dies nur in einer sehr geringen Ausbeute (unter 20%). Optimierungsversuche dieser Epoxidgenerierung führten nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Ausbeute. Vermutlich ist die Ringspannung durch den

ankondensierten Isopropylidenring zu hoch, als das es zur leichten Ausbildung eines weiteren Ringes, dem Epoxid, kommt. Mit dem Rohprodukt der Epoxidierung, welches aus einem Gemisch aus **145** und **146** bestand, wurden weiterführende Versuche unternommen. So wurde unter lewissauren Bedingungen in Benzylalkohol das Epoxid geöffnet und das Produkt, zwecks besserer Untersuchungsmöglichkeit im $^1\text{H-NMR}$, peracetyliert. Mittels Flash-Säulenchromatographie konnte neben Edukt **146** und **145** ein Produkt isoliert werden, das als einziges Ringproton-Signal im $^1\text{H-NMR}$ im Hochfeld (unter 4 ppm) ein Pseudotriplet mit einer Kopplungskonstanten von $J \approx 9\text{-}10\text{ Hz}$ aufweist. Daraus läßt sich schließen, das zumindest zu einem Teil ein Angriff auf die andere Epoxid-Position erfolgt sein muß und ein *chiro*-Isomer (Struktur nicht abgebildet) gebildet wurde. Da größere Mengen an *neo*-inositol **3** benötigt werden und diese Route zum Schluß unbefriedigend bezüglich Ausbeute und Selektivität ist, wurde diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt.

Synthese von *neo*- und *allo*-Inositol ausgehend von Konduritol E Vorstufen.

Von Anfang an wurde parallel das durch Plettenburg⁸⁷ angerissene Konzept zur Darstellung von *neo*-Inositol weiterverfolgt. Dieses Konzept beruht auf der retrosynthetischen Überlegung, daß Konduritol E Derivate geeignete Vorstufen zur Synthese von *neo*-Inositol sein dürften. Behandeln des Diols (+)-**42** mit DBU und wasserfreiem CO_2 führte zwar zur Bildung des Konduritol E biscarbonat **148**, aber leider lag es nur als Beiprodukt des Monocarbonats in 30%iger Ausbeute vor.

Schema 40: Darstellung von Monocarbonat (-)-**141**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen:

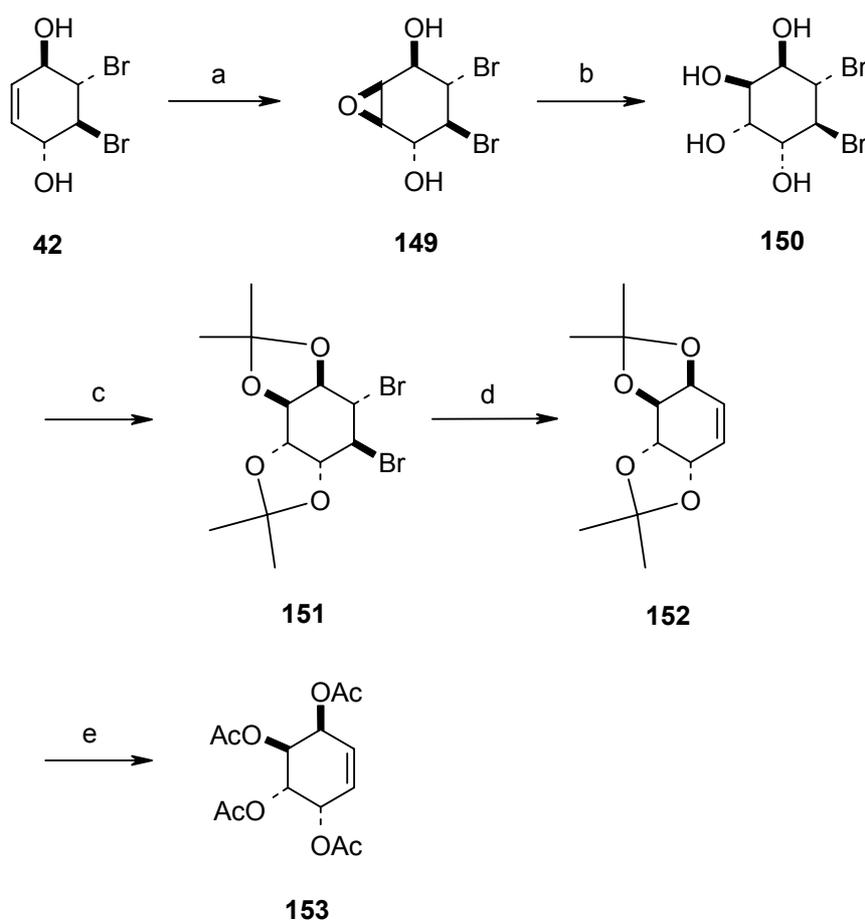
DBU, THF, CO_2 , - 50 °C	Rühren für 2 h	92%	0%
	Rühren für 12 h	60%	30%

Mechanistisch greift die durch die Base (DBU) deprotonierte OH-Gruppe zunächst die Carbonyl-Gruppe des Kohlendioxids an. Anschließend erfolgt eine intramolekulare nucleophile Substitution des Bromids. Im Gegensatz zu Plettenburg, der racemisches Biscarbonat **148** vom Monocarbonat **141** durch Umkristallisation voneinander trennte, war bei enantiomerenreiner Umsetzung die Isolierung der Produkte nicht möglich.

Aufgrund der geringen Ausbeute, Aufreinigungsproblemen und der Schwierigkeit, die Ansatzgröße zu erhöhen, wurde diese Konduritol E-Synthese nicht weiter verfolgt.

Deshalb mußte ein neuer Darstellungsweg zu Konduritol E Derivaten gefunden werden. Die erste Synthese von Konduritol E ausgehend von *p*-Benzochinon wurde durch Balci et al.¹⁴¹ im Jahre 1992 beschrieben. In fünf Stufen konnte Konduritol E ausgehend von **42** dargestellt werden.

Schema 41: Darstellung von Konduritol E nach nach Balci

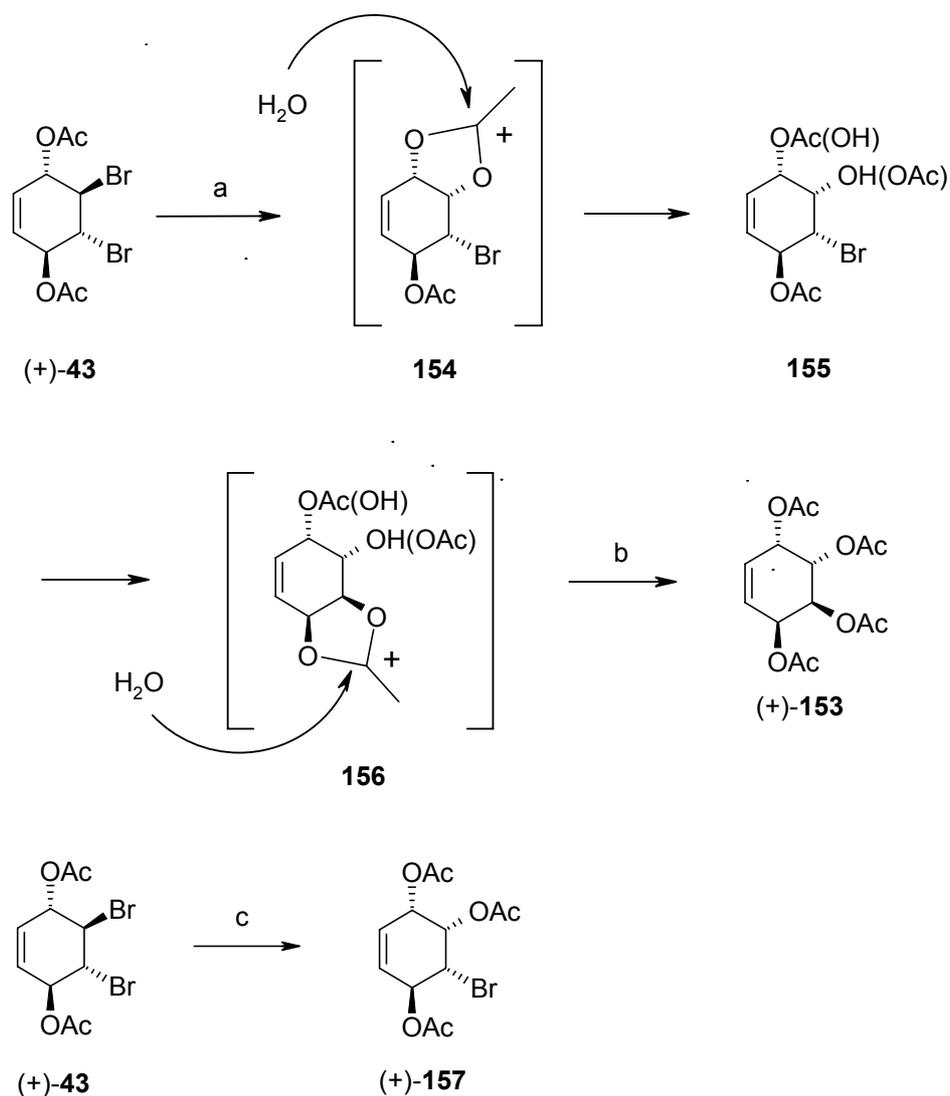


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 3-Chlor-perbenzoesäure (*m*-CPBA), Et₂O, Rückfluß 12 h. – (b) 0.5 N H₂SO₄, Rückfluß 4 h. – (c) 2,2-Dimethoxypropan, *p*-Toluolsulfonsäure, Benzol, 3 h. – (d) Zn, DMSO, 95 °C. – (e) 1. 0.5 N H₂SO₄, Rückfluß 5 h. 2. Ac₂O, Pyridin.

Balci bedient sich beim zentralen Schritt der Epoxidöffnung mittels Wasser, welche zum Konduritol E Vorläufer **150** führt (*trans*-diaxiale Produkt nach der „Fuerst-Plattner-Regel“).¹⁴⁰

Eine direkte, kostengünstige und einfache Umwandlung von Diol (+)-**42** bzw. Diacetat (+)-**43** in (+)-**153** ist bisher nicht bekannt geworden. Da es sich um die erste Stufe einer Totalsynthese handelt, sollte auch die Praktikabilität dieser Stufe im Vordergrund stehen. So sollte die Reaktion leicht im Multigramm-Maßstab durchführbar sein.

Führt man die Reaktion mit Diacetat (+)-**43** und Silbersalz in Essigsäure (siehe dazu auch Schema 34, Seite 99) unter Zusatz von Wasser durch, so sollte ebenfalls durch den aktivierenden Effekts des Silbers, die Acetat-Gruppe unter Ausbildung des Acetoxonium-Ions das Bromid substituieren. Nach Ausbildung der Acetoxonium-Ionen-Zwischenstufen (**154** und **156**) erfolgt unter diesen Bedingungen nicht der Angriff der Acetyl-Anionen an den Allylpositionen, sondern deren Hydrolyse. Damit kann man die Reaktion leicht zum Woodward Produkt,^{142,143} der *cis*-Regiochemie, dirigieren. Die Reaktion mit Silbersalz und Wasser ergibt zunächst einmal ein Gemisch aus drei Diolen, dessen Behandlung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin ein braunes Öl liefert. Nach Flash-Säulenchromatographie erhält man das Tetraacetat (+)-**153** als farbloses Öl, das nach Tagen kristallisiert. Neben der Reaktionszeit (72 Stunden) sind auch die Ausbeuten für die Reaktion unter Wassereinfluß deutlich niedriger als bei der Reaktion in trockener Essigsäure. Die geringe Ausbeute dieser Reaktion (unter 30%, aufgrund von Oxidation des Allylalkohols durch Silber(I)-Ionen) und der hohe Preis für Silberacetat machen diese Reaktion ebenfalls für einen Multigramm-Maßstab uninteressant. Eine Verbesserung der Ausbeute ergibt sich somit durch einen Ersatz von Silberacetat, wenngleich dies eine längere Reaktionsdauer erfordert. Haines und Mitarbeiter¹⁴⁴ versuchten durch Erhitzen von **43** in wäßriger Essigsäure und Kaliumacetat für 24 Stunden Konduritol E **153** in einer Stufe aus **153** darzustellen. Anstelle des gewünschten Produkts konnten sie aber nur 1,2,4-Triacetoxo-3-bromcyclohex-5-en **157** isolieren. Dabei erkannten sie aber nicht, daß sie lediglich das Intermediat dieser Reaktion isoliert hatten. Aufbauend auf diesen Arbeiten sollte es somit grundsätzlich möglich sein, das gewünschte Produkt **153** darzustellen. Lediglich die Reaktionsbedingungen müßten drastisch verändert werden.

Schema 42: Bildung des Woodward-Produktes aus Diacetat (+)-**43**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. NaOAc oder KOAc, AcOH (95%), 10 Tage, 130 °C. Alternativ im Mikrowellenreaktor: 190 °C, 15 bar, 10 min. 2. Ac_2O , CH_2Cl_2 , DMAP (Kat.) [Ausbeute über beide Schritte 70%]. - (c) 1. NaOAc oder KOAc, AcOH (95%), 3 Tage, 130 °C. 2. Ac_2O , CH_2Cl_2 , DMAP (Kat.) [85%].

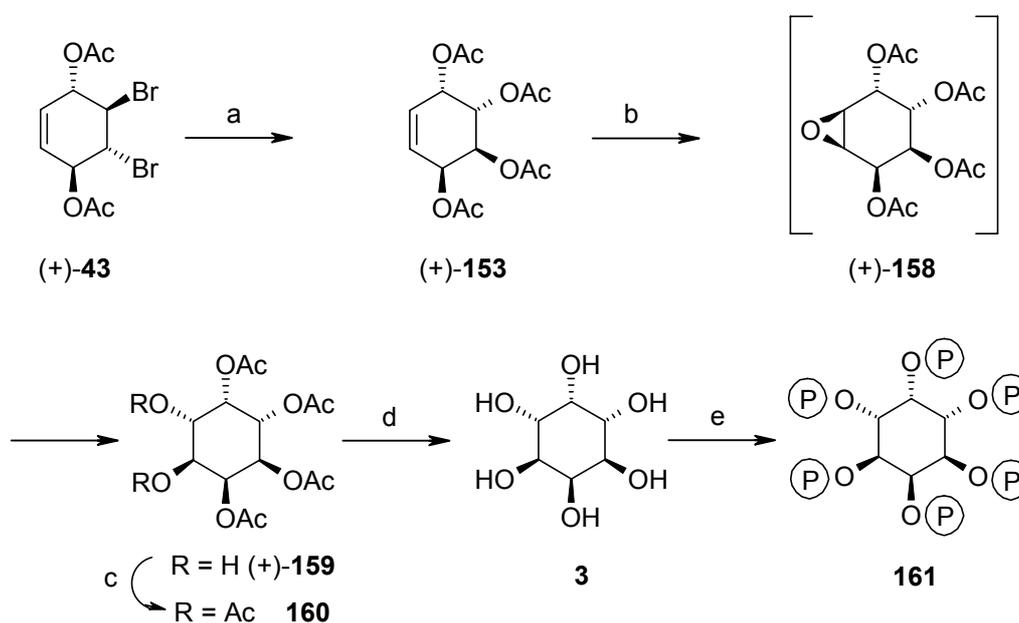
Durch zahlreiche Optimierungsversuche konnte letztlich Konduritol E **153** durch Erhitzen in wäßriger Essigsäure mit Kaliumacetat oder Natriumacetat (über 10 Tage) erhalten werden. Nach Acetylierung und Aufreinigung konnte (+)-**153** in 70%iger Ausbeute als einziges Isomer (NMR spektroskopisch) isoliert werden. Die Enantiomerenreinheit konnte mit chiraler HPLC (chiracell ODH, heptane/isopropanol 95:5) überprüft werden und lag bei >99%. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß enantiomerenreines (+)-1,2,4-Triacetoxy-3-bromcyclohex-5-en **157** (das Intermediat in dieser Reaktion) leicht durch Abbrechen dieser

Reaktion nach drei Tagen in 85%iger Ausbeute isoliert werden kann. Dieses Produkt konnte weiter zu Galactose-Analoga umgesetzt werden (siehe Abschnitt 2.5, ab Seite 132).

Die lange Reaktionszeit verlangte nach modifizierten Bedingungen. Im Mikrowellenreaktor konnte die Reaktionszeit drastisch verkürzt werden. Unter Mikrowellenbestrahlung wurde in einem Druckreaktor bei 190 °C zehn Minuten stark gerührt, wobei der Druck bei ca. 15 bar lag. Standardaufarbeitung (siehe oben) lieferte ein Rohprodukt, welches im NMR hauptsächlich das gewünschte Produkt zeigte. Im NMR konnte weder das Edukt **43** noch das Intermediat **157** nachgewiesen werden, so daß die Reaktion schon nach dieser extrem kurzen Reaktionszeit komplett abgelaufen war.

Die Oxidation von (+)-**153** mit Trifluorperessigsäure ergibt Konduritol E Epoxid (+)-**158**, welches problemlos, aber in geringer Ausbeute, isoliert werden kann. Drastischere Reaktionsbedingungen bewirken *in situ* Hydrolyse.

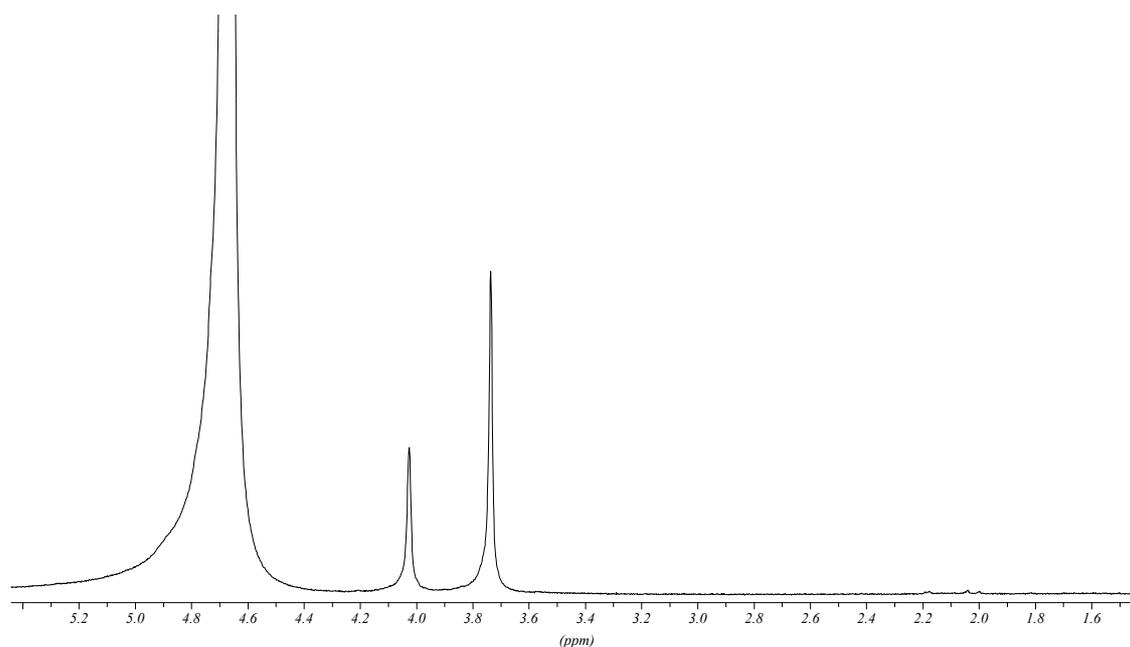
Schema 43: Synthese von *neo*-Inositolhexakisphosphat **161**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. NaOAc oder KOAc, AcOH (95%), 10 Tage, 130 °C. 2. Ac₂O, CH₂Cl₂, DMAP (Kat.) [70%]. - (b) (CF₃CO)₂O, H₂O₂, CH₂Cl₂, NaHCO₃ [71]. - (c) Ac₂O, Pyridin [83%]. - (d) NaOMe, MeOH dann Wasser/NaOH [99%]. - (e) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphoshepan, 1*H*-Tetrazol, Acetonitril dann *m*-CPBA 2. Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser [20%].

Die Regioselektivität dieser Ringöffnung ergibt ausschließlich das *neo*-Isomer. De-*O*-Acetylierung von (+)-**159** durch Behandeln mit katalytischer Menge an Natriummethanolat in Methanol ist aufgrund von der starken Präzipitation von teilentschützten *neo*-Inositols in Methanol sehr unbefriedigend. So erfolgt die Entschützung nur zum Teil. Eine vollständige Verseifung konnte nur durch Rühren des erhaltenen teilentschützten Rohproduktes in kochender NaOH-Lösung erfolgen. Bemerkenswerterweise ist das *neo*-Inositol im Gegensatz zu allen anderen Pseudozuckern und Inositolen selbst in kochendem Wasser nahezu unlöslich.¹⁴⁵ So kann man *neo*-Inositol **3** leicht durch Umkristallisation aus Wasser aufreinigen. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit in nahezu allen Lösungsmitteln ist eine NMR-Analytik äußerst schwer. So löst sich für eine NMR-Probe weniger als 1 mg in 1 ml D₂O.

Abbildung 37: ¹H-NMR von *neo*-Inositol **3**



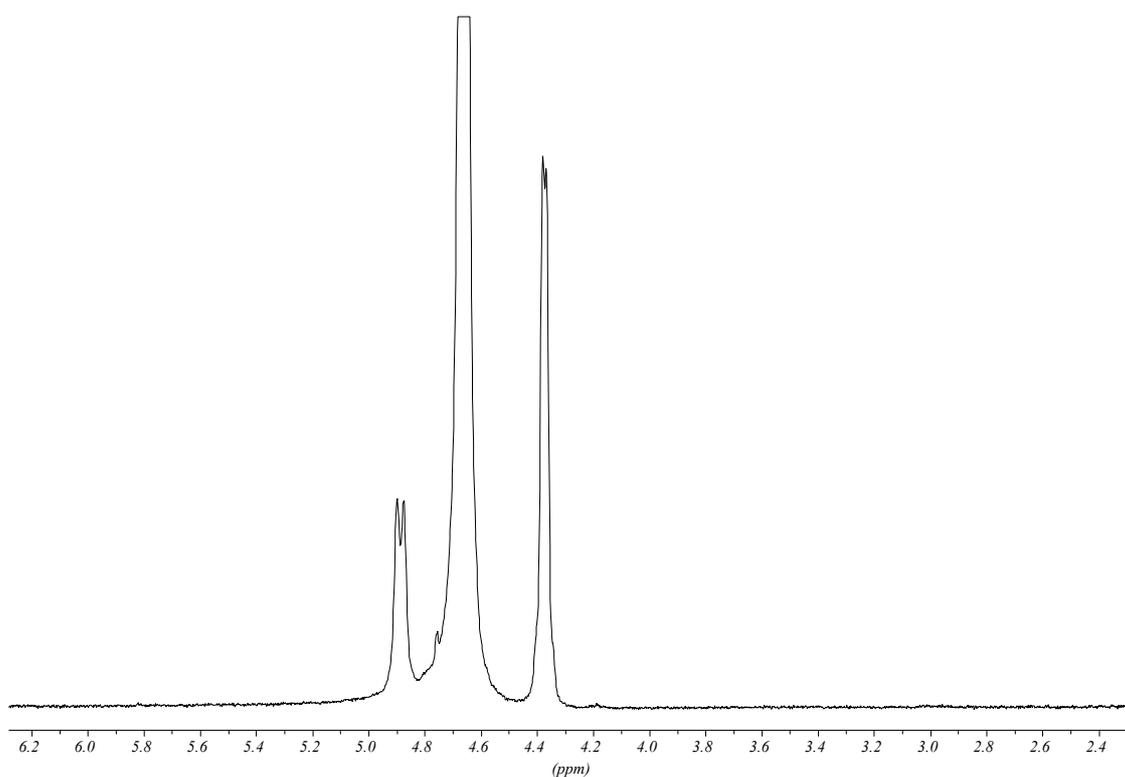
Eine noch elegantere und effektivere Methode zum Erhalt von reinem *neo*-Inositol **3** ist durch Digerieren von Hexa-*O*-acetyl-*neo*-inositol **160** in wenig Ethylacetat möglich, welches durch Acetylierung von Tetra-*O*-acetyl-*neo*-Inositol (+)-**159** unter Standardbedingungen zugänglich ist. Die Entschützung unter den obig beschriebenen Bedingungen liefert hochreines **3** als Rohprodukt. Eine Umkristallisation ist dann auf dieser Stufe überflüssig.

Aufgrund der bereits erwähnten Unlöslichkeit von freiem *neo*-Inositol **3** in nahezu allen Lösungsmitteln erweist sich eine weiterführende Funktionalisierung der freien Hydroxygruppen als äußerst schwierig.

Die Einführung der sechs Phosphatfunktionalitäten wurde mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphan **62** unter Zusatz von 1*H*-Tetrazol in Dichlormethan durchgeführt. Dabei zeigte sich zunächst kein Umsatz, so daß die Reaktionszeit auf 36 Stunden erhöht wurde. Um die Löslichkeit des Eduktes im organischen Lösungsmittel zu erhöhen, wurde Acetonitril zugegeben und leicht erwärmt (40 °C). Dabei muß sehr behutsam vorgegangen werden, da sonst sehr viele Reaktionsnebenprodukte wie z.B. Arbuzov-Produkte entstehen. Die anschließende Oxidation des Phosphits mit *m*-CPBA und Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie liefert das geschützte Hexakisphosphat **161a** in 21% Ausbeute. Die anschließende Pd/C-katalysierte hydrogenolytische Entfernung der Xylyl-Gruppen führt zu *neo*-Inositolhexakisphosphat **161**.

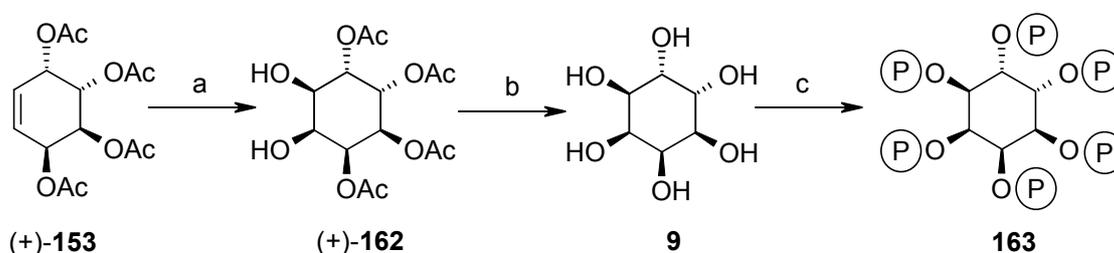
Alternativ wurde *neo*-Inositol **3** in Polyphosphorsäure phosphoryliert. Dadurch erhält man in einer Stufe direkt *neo*-Inositolhexakisphosphat **161**. Diese Methode liefert **161** in etwas höherer Ausbeute. Die Entfernung des Phosphats mit Hilfe eines Ionentauschers ist sehr aufwendig und liefert immer noch kein reines Produkt, so daß es noch einmal mittels HPLC aufgereinigt werden muß.

Abbildung 38: ^1H -NMR von *neo*-Inositolhexakisphosphat **161**



Synthese von *allo*-Inositol:

Aufgrund der C_2 -Symmetrie des Eduktes ist Konduritol E (+)-**153** ein idealer Vorläufer für die *allo*-Inositol Synthese. *cis*-Dihydroxylierung führt nur zur *allo*-Konfiguration, unabhängig von der Seite des Angriffs durch das hydroxylierende Agens. Durch *cis*-Dihydroxylierung an Konduritol E (+)-**153** mit Rutheniumtrichlorid und Natriummetaperiodat erhält man somit in einem Schritt *allo*-Inositol (+)-**162**. Anschließende Abspaltung der Acetat-Gruppen durch Behandeln mit katalytischen Mengen an Natriummethanolat in Methanol führt zu reinem *allo*-Inositol **9** in 83% Ausbeute in Multigrammmaßstab.

Schema 44: Darstellung von *allo*-InsP₆ **163**

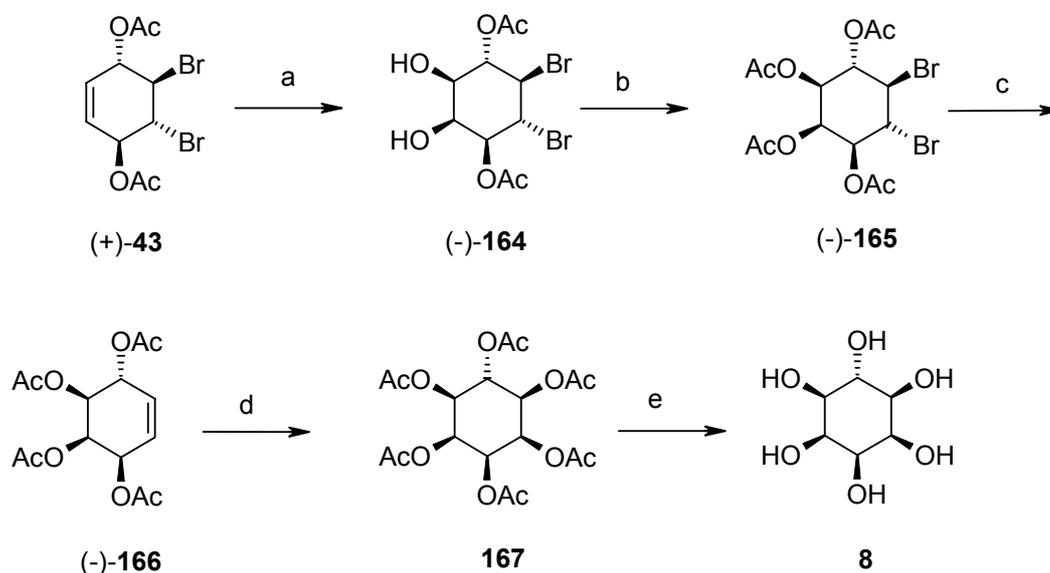
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril.– (b) NaOMe, MeOH. – (c) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, Acetonitril dann *m*-CPBA 2. Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser.

Die Einführung der sechs Phosphatfunktionalitäten mit 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan **62** unter Zusatz von 1*H*-Tetrazol in Dichlormethan war im Gegensatz zur *neo*-Inositolhexakisphosphatsynthese **161** aufgrund der sehr viel besseren Löslichkeit in Dichlormethan unproblematisch und lieferte nach Hydrogenolyse das *allo*-InsP₆ **163**.

2.4.2 Desymmetrisierender Weg: Darstellung von *epi*-Inositol über Konduritol C Derivate

Die Schlüsselverbindung bei der retrosynthetischen Syntheseplanung von *epi*-Inositol dürfte ein Konduritol C Derivat sein. Ein Zugang zu Konduritol C liefert der bereits durch Klein und Balci aufgezeigte Syntheseweg.^{83,141} Interessanterweise führt die *cis*-Dihydroxylierung an (-)-**166** mit RuCl₃/NaIO₄ überwiegend zum Diol mit *epi*-Inositol Stereochemie. Die hohe Diastereoselektivität (>80% *de*) scheint durch den dirigierenden Effekt der axialen Acetatgruppe bedingt zu sein, welche als Lewisdonor für den Ruthenium Komplex dient. Aufgrund der Schutzgruppenwanderungsproblematik des Produktes war eine Isolierung des Diols nicht sinnvoll und deshalb wurde das Rohprodukt sofort ohne weitere Aufreinigung ins Hexaacetat **167** überführt. An dieser Stelle wurde auch das Diastereomerenverhältnis anhand NMR-spektroskopischer Methoden bestimmt. Umkristallisation aus EtOH führte zu reinem **167**, welches unter Standardbedingungen entschützt wurde und freies *epi*-Inositol **8** lieferte.

Schema 45: Darstellung von *epi*-Inositol **8**



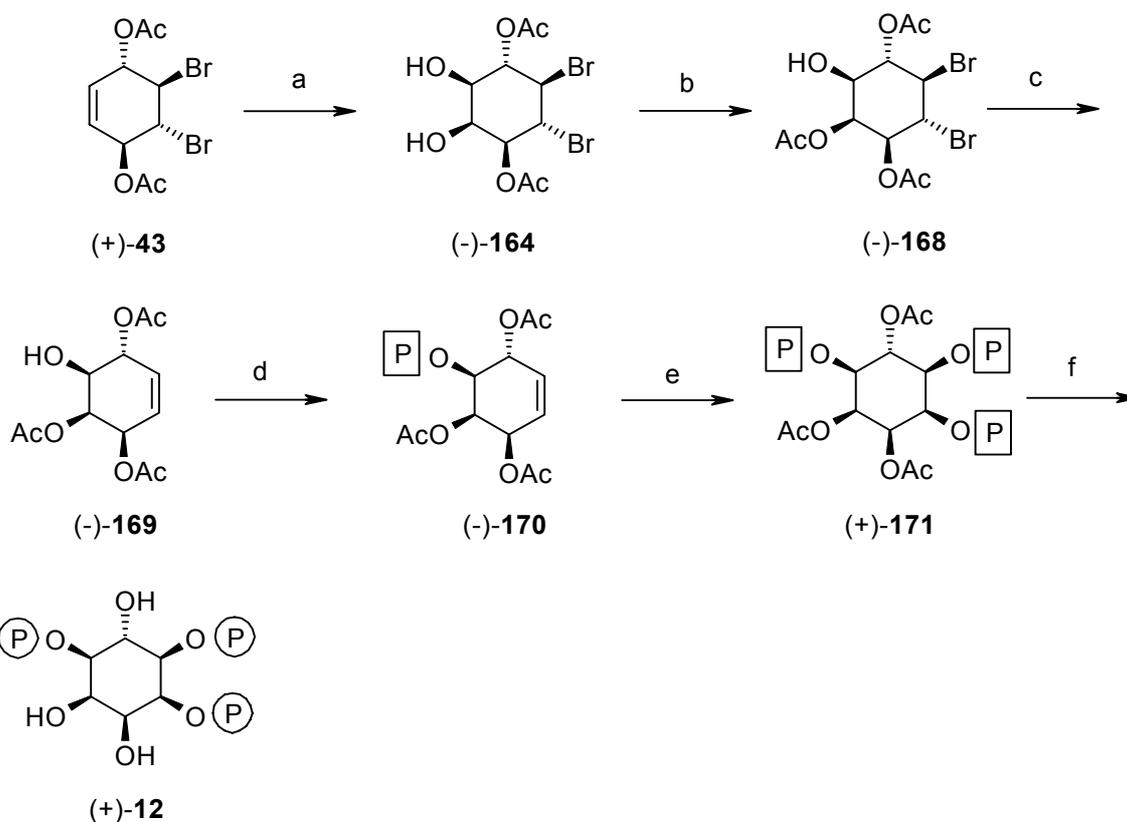
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril [81%]. – (b) Ac₂O, Pyridin [99%]. – (c) Zn, Et₂O, AcOH [68%]. – (d) 1. RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril, 2. Ac₂O, Pyridin [50%]. – (e) NaOMe, MeOH [99%].

Synthese von *epi*-Ins(1,4,5)P₃ (+)-12:

Um das Potential, welches in diesem Zugang zu den Stereoisomeren steckt, aufzuzeigen, wurde erstmals versucht, das interessante Epimer des *myo*-Ins(1,4,5)P₃ **2**, das *epi*-Ins(1,4,5)P₃ (+)-**12**, zu synthetisieren.

Die erste Stufe bei der Synthese von *epi*-Ins(1,4,5)P₃ **12** war die bereits aus der Synthese von (+)-2,4,5-Tri-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-*D*-*myo*-inositol **61** bekannte Monofunktionalisierung der axialen Hydroxygruppe von (-)-**164**. Dabei wurde das Diol (-)-**164** unter lewis-sauren Bedingungen (*p*-Toluolsulfonsäure) mit Triethylorthoacetat in wasserfreiem THF umgesetzt. Der intermediär gebildete Orthoester wurde dann anschließend mittels Essigsäure direkt in das gewünschte Produkt mit dem axialen Acetat (-)-**168** umgewandelt. Die Regioselektivität dieser Reaktion ist, bedingt durch stereoelektronische Effekte, beachtenswert hoch und liefert fast ausschließlich das gewünschte Regioisomer.^{146,147}

Schema 46: Darstellung von *epi*-Inositol (1,4,5)-trisphosphat (+)-12



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril. - (b) 1. CH₃C(OEt)₃, THF, *p*-TsOH. 2. AcOH (80%) [Ausbeute: 81%]. - (c) Zn, Et₂O, AcOH, I₂ [82%]. (d) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA [70%]. - (e) 1. RuCl₃, NaIO₄, Acetonitril. 2. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA [50%]. - (f) 1. Pd/C, H₂ Ethanol/Wasser. 2. 0.25 M NaOH [99%].

Nach diesem Schritt folgte die Debromierung unter milden Bedingungen. Das Triacetat (-)-**169** wurde nur für analytische Zwecke aufgereinigt. Ohne weitere Aufreinigung wurde das Produkt sofort unter Standardbedingungen phosphoryliert. Man erhält das Monophosphat (+)-**170** in fast 60% Ausbeute über drei Stufen.

cis-Dihydroxylierung mit $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$ gab ein Diol, welches hauptsächlich durch den dirigierenden Effekt durch die axiale Acetat-Gruppe *epi*-Inositol Stereochemie (> 70% Ausbeute) aufweist (in Analogie zur Synthese von *epi*-Inositol **167**). Es wurde auf eine Aufreinigung auf dieser Stufe verzichtet, da nach der nächsten Stufe ohnehin mittels säulenchromatographischer Methode aufgereinigt werden muß. Das Diol wurde direkt unter Standardbedingungen phosphoryliert und ergab das geschützte Trisphosphat (+)-**171** in über 50% Ausbeute. Beachtenswert ist bei dieser Synthese, daß man fast ohne Aufreinigungsschritte bei den Zwischenstufen auskommt. Bedingt durch auftretende Schutzgruppenwanderungen ist eine Aufreinigung des Diols nur unter großem Verlust möglich. Durch Pd/C-katalysierte Hydrogenolyse und alkalischer Verseifung der Acetatgruppen erhält man die freie Zielverbindung *epi*-Ins(1,4,5) P_3 (+)-**12**. Damit konnte erstmals *epi*-Ins(1,4,5) P_3 (+)-**12** synthetisiert werden.

Biologische Bedeutung:

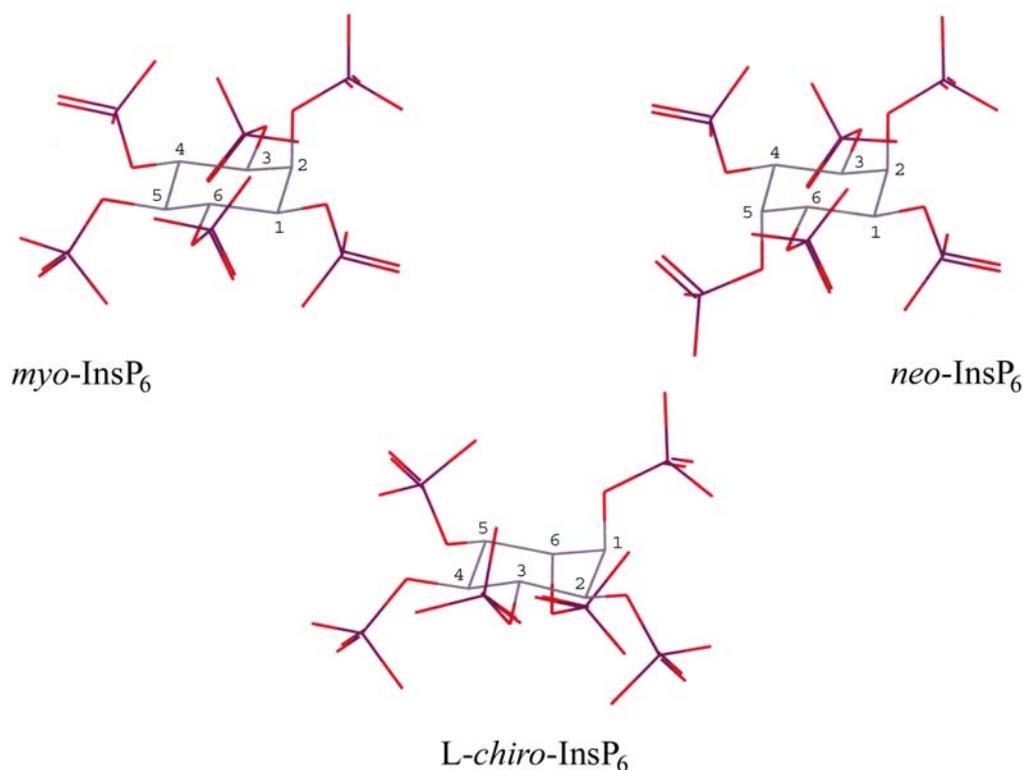
Wie bereits erwähnt wurde, ist *myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat [Ins(1,4,5) P_3] ein intrazellulärer „second messenger“.²⁸ Die Bindung von *myo*-Ins(1,4,5) P_3 an den IP_3 -Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum induziert die Ausschüttung von Kalzium in Cytosol. Es konnte gezeigt werden, daß *epi*-Ins(1,3,6) P_3 (wurde fälschlicherweise als *epi*-Ins(1,4,5) P_3 bezeichnet) eine geringere Affinität zum IP_3 -Rezeptor aufwies.¹⁴⁸ Die dramatisch geringere Affinität des *epi*-Ins(1,3,6) P_3 zum IP_3 -Rezeptor ist das Ergebnis der Modifikation der essentiellen 6-Hydroxygruppe. Basierend auf der angelehnten Struktur sollte *epi*-Ins(1,4,5) P_3 **12** eine höhere Affinität als andere Analoga zu diesem Rezeptor haben und könnte damit pharmakologisches Potential aufweisen.

2.4.3 Stereo- und Regiospezifität der Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ Stereoisomeren durch Phytasen aus *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia rhodanensis*

Enzymatische Umsetzung von *neo*-InsP₆ **161** und *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135**

Die Strukturunterschiede zwischen *myo*-InsP₆ **13**, *neo*-InsP₆ **161** und *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** liegen in der unterschiedlichen Orientierung eines einzelnen Substituenten (bestätigt durch NMR bei einem pH 5-7, siehe Abbildung 39). Im Gegensatz zu *myo*-InsP₆ **13** ist die Phosphatgruppe in der 5-Position des Epimers *neo*-InsP₆ **161** axial orientiert. Bei *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** befindet sich dagegen eine zusätzliche axiale Phosphatgruppe in der 3-Position (in Abbildung 39 entspricht dies der 6-Position von *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135**). Abbildung 39 entspricht dabei aber nur einer idealisierten Darstellung der Strukturen in einer wässrigen Lösung. Die räumliche Anordnung der Phosphatgruppen in diesen Molekülen hängt dabei unter anderem vom Protonierungsgrad, der Hydratation und der Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen ab.

Abbildung 39: Molekülstrukturen und Nummerierung der Kohlenstoffatome der Inositolhexakisphosphat Stereoisomere.



Für eine erste Abschätzung, inwieweit die Phytasen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia rhodanensis* Abweichungen von der *myo*-Konfiguration bei der katalytischen Dephosphorylierung tolerieren, wurden die Anfangsraten für den ersten Dephosphorylierungsschritt der Epimere *neo*-InsP₆ **161** und *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** miteinander verglichen. Dabei wurde erneut das HPLC-MDD System zur Quantifizierung der drei Stereoisomeren verwendet. Mit einer Startkonzentration von 1 mM wurden Kinetiken bis zu einem Verbrauch von maximal 30% Inositolhexakisphosphat gemessen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der Enzymaktivitäten bei Verwendung verschiedener Inositolhexakisphosphat Stereoisomere

InsP ₆ Stereoisomer	Phytaseaktivität	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mU/mg Feuchtgewicht)	<i>Pichia rhodanensis</i> (mU/mg Protein)
<i>myo</i> -InsP ₆ 13	0.13 ± 0.03	9.3 ± 1
<i>neo</i> -InsP ₆ 161	0.55 ± 0.03	9.7 ± 1.1
<i>L-chiro</i> -InsP ₆ (-)- 135	nicht nachweisbar	18.6 ± 0.5

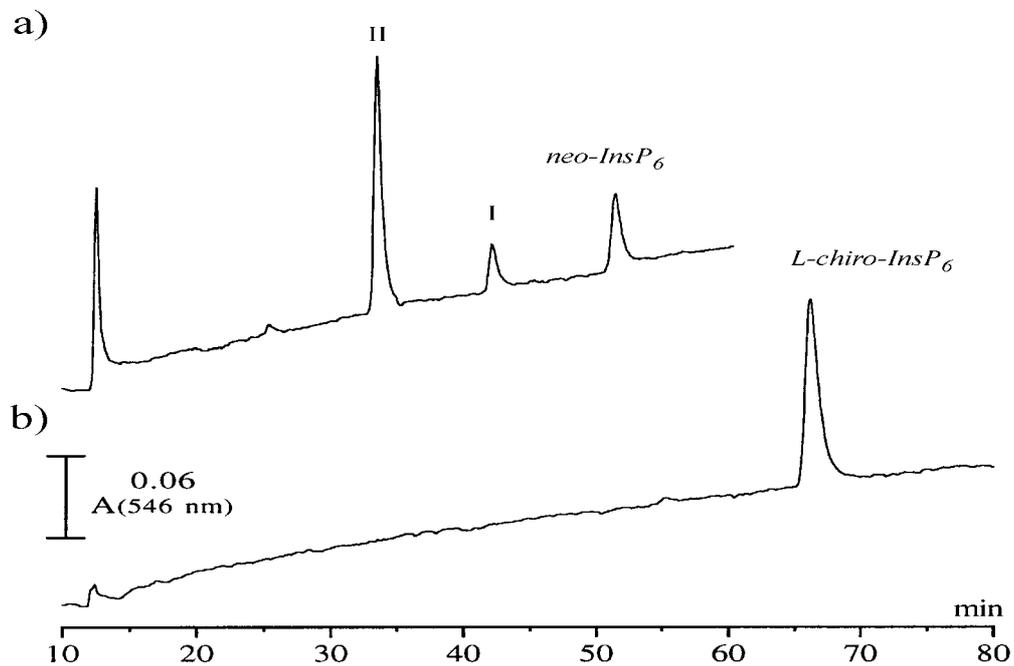
Für *S. cerevisiae* wurde die Phytaseaktivität in Relation zum Feuchtgewicht der Zellen angegeben, während für *P. rhodanensis* die angegebenen Werte die spezifische Aktivität des Rohenzym darstellen. Dabei fanden sich zum Teil unerwartete Ergebnisse bei *S. cerevisiae* (siehe Abbildung 40):

1. *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** wird nicht durch die Phytase von *S. cerevisiae* abgebaut
2. Das "natürliche" Substrat *myo*-InsP₆ **13** wird deutlich langsamer dephosphoryliert als *neo*-InsP₆ **161**.

Die Situation bei *P. rhodanensis* ist hingegen vollkommen anders. So sind die Abbauraten von *neo*-InsP₆ **161** und *myo*-InsP₆ **13** nahezu identisch, während die Umsetzung von *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** doppelt so schnell verläuft. Obwohl es nicht vorher für Phytasen eukaryotischen Ursprungs gezeigt wurde, überrascht es nicht, daß die Enzyme auch die Dephosphorylierung anderer Isomere als *myo*-InsP₆ **13** katalysieren. Dies liegt vor allem an dem natürlichen Vorkommen von Hefen und der Tatsache, daß viele Inositolhexakisphosphat-Isomere Bestandteile des Humus sind. Erwartet wurde aber, daß die katalytische Reaktion optimiert ist für die Verbindung, die als das "natürliche" Substrat angesehen wird.

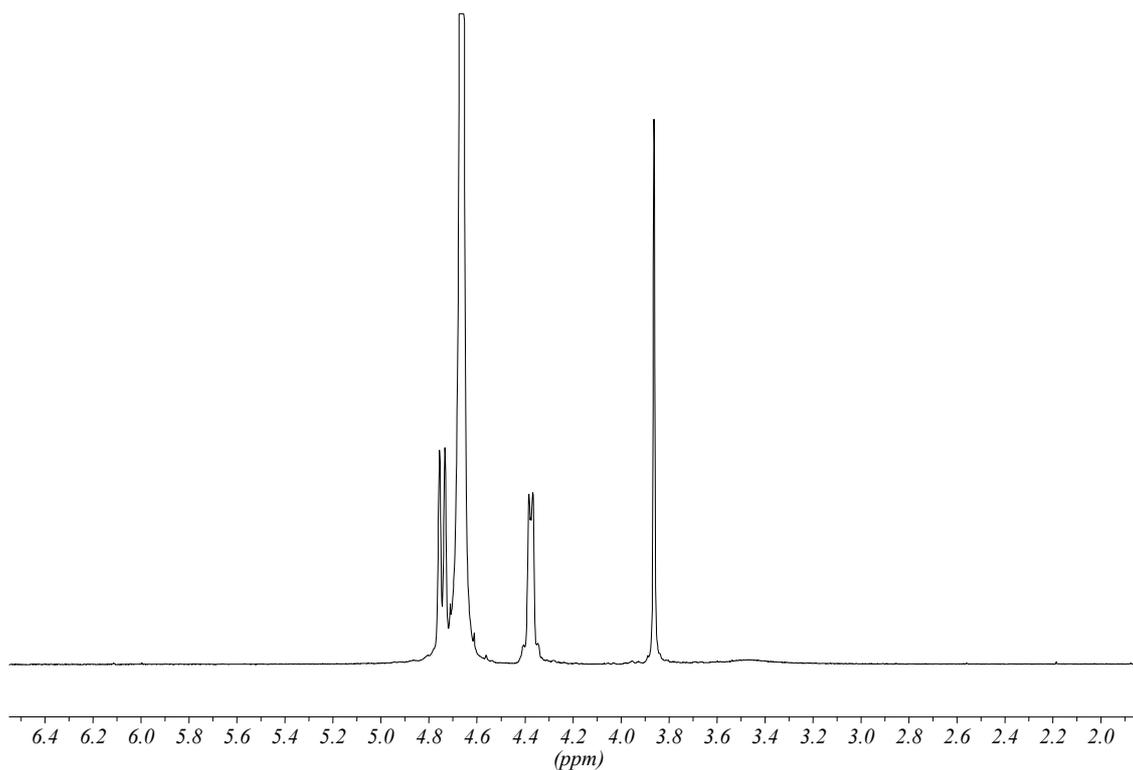
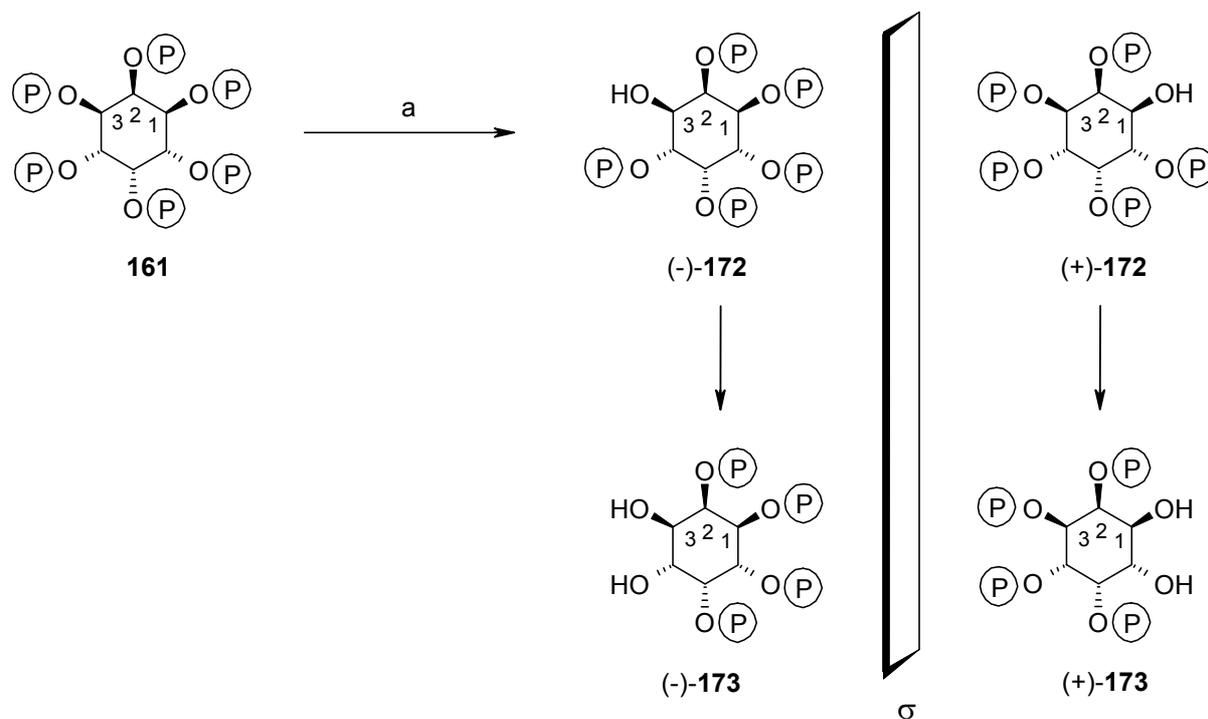
Um zu klären, ob die Dephosphorylierung der Substratanaloga spezifisch oder nur zufällig ist, wurden die Abbauprodukte mittels HPLC separiert und NMR-spektroskopisch charakterisiert.

Abbildung 40: Umsetzung von *neo*-InsP₆ **161** und *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** durch Phytase aus *S. cerevisiae*.



(a) *neo*-InsP₆ **161** (I: *neo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅/*neo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ **172**; II: *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄/*neo*-Ins(2,3,4,5)P₄ **173**)
 (b) *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135**)

Abbildung 40 zeigt die HPLC-MDD Analyse nach Umsetzung der zwei synthetischen Inositolhexakisphosphat Isomere mittels der Phytase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Während *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** nicht umgesetzt wird (Abbildung 40b), reichert sich ein *neo*-Inositoltetraakisphosphat in Folge der Umsetzung von *neo*-InsP₆ (**161**; Abbildung 40a) an. Als mögliche Vorstufe ist ein einziges *neo*-Inositolpentakisphosphat zu beobachten. Das läßt auf eine spezifische enzymatische Umsetzung schließen. Auch nach komplettem Abbau von *neo*-InsP₆ **161** zeigt die Verbindung mit der Retentionszeit eines *neo*-InsP₄ Isomeres nur eine äußerst geringe Tendenz, weiter dephosphoryliert zu werden. Ein präparativer Ansatz lieferte genügend *neo*-InsP₄ für eine NMR-spektroskopische Untersuchung.

Abbildung 41: $^1\text{H-NMR}$ von *neo*-Ins(1,2,5,6) P_4 /*neo*-Ins(2,3,4,5) P_4 (-)-**173****Schema 47:** Mögliche Abbauwege von *neo*-Ins P_6 **161** durch Phytase aus *Saccharomyces cerevisiae*

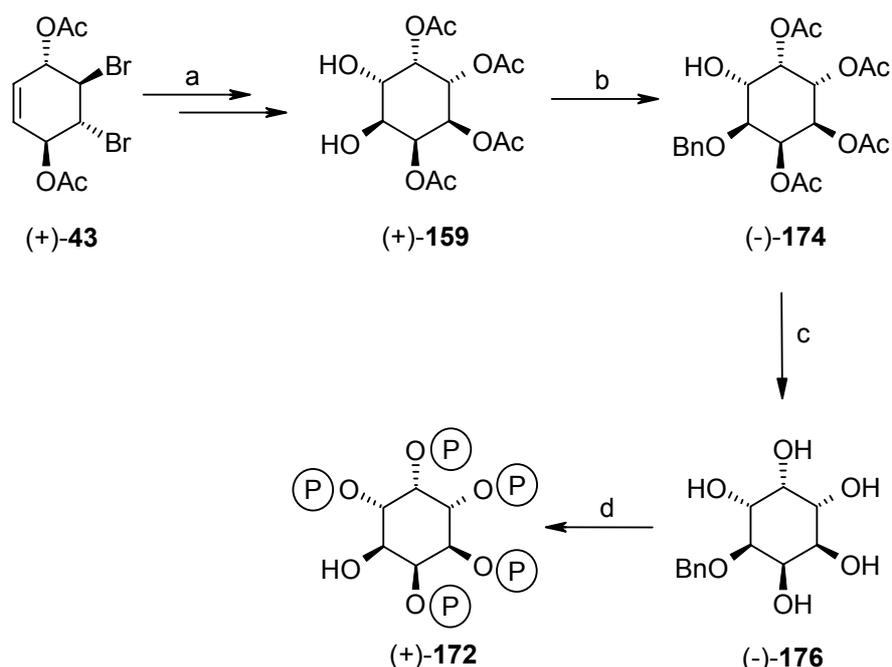
Reagenzien: (a) Phytase aus *S. cerevisiae*, 45°C, 75 mM Natriumacetat (pH 4.6), Startkonzentration: 1 mM **161**.

Das ^{13}C -NMR zeigt nur drei Signale, was auf eine Symmetrieachse hinweist. Damit ist die Verbindung C_S - oder C_2 -symmetrisch.. Das ^1H - ^1H -COSY Experiment macht deutlich, daß Phosphatgruppen auf beiden axialen Hydroxygruppen und an C-3 und C-4 beziehungsweise C-1 und C-6 sitzen. Das Produkt weist einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = -12.8^\circ$ ($c = 0.22$, H_2O) auf. Daraus kann man erkennen, daß es chiral und damit C_2 -symmetrisch ist, es sich also nicht um das C_S -symmetrische *neo*-Ins(2,4,5,6) P_4 [ist identisch mit *neo*-Ins(1,2,3,5) P_4] handeln kann. Aufgrund dieser spektroskopischen Daten kann es sich nur um eines der beiden Enantiomere *neo*-Ins(1,2,5,6) P_4 /*neo*-Ins(2,3,4,5) P_4 **173** handeln.

Synthese von Standards zur absoluten Bestimmung von *neo*-Ins(1,2,5,6) P_4 / *neo*-Ins(2,3,4,5) P_4 **173**

In Analogie zum *myo*-Ins P_6 **13** Abbau mit *Saccharomyces cerevisiae* sollte die Dephosphorylierung selektiv an der C-3 bzw. der analogen Position C-4 stattfinden. Um einen tieferen Einblick in die enzymatische Dephosphorylierung zu bekommen, ist es nötig, enantiomerenreines Referenzmaterial zu synthetisieren. Zuerst wurde versucht *neo*-Ins(2,3,4,5) P_4 **173** darzustellen. Enantiomerenreines Tetra-*O*-acetyl-*neo*-inositol (-)-**159** stellt ein ideales Startmaterial dar. Dabei sollte versucht werden, die beiden freien Hydroxygruppen mit einer orthogonalen Schutzgruppe selektiv zu schützen. Eine ideale Schutzgruppe ist Benzylether, da es möglich ist, diesen am Ende der Reaktionssequenz zusammen mit den Xylyl-Schutzgruppen in einer Stufe komplett zu entfernen.

Die milde Benzylieierung mit 2,2,2-Trichloracetimidbenzylester unter lewissauren Bedingungen lieferte aber nur reines monobenzyliertes *neo*-Inosiltetraacetat (+)-**174** in 20%iger Ausbeute. Das gewünschte Dibenzyl-*neo*-inosiltetraacetat **175** (Struktur nicht abgebildet) wurde lediglich in geringer Ausbeute und stark verunreinigt mit Trichloracetamid und anderen Nebenprodukten erhalten. Auch andere milde Benzylieierungsmethoden, wie die Benzylieierung mit Benzylbromid mit Triethylamin oder Benzylbromid mit Silber(I)oxid, führten zu keiner oder sehr geringen Produktbildung. Dieses Ergebnis erforderte es nach anderen Möglichkeiten zu suchen, um die absolute Konfiguration zu bestimmen. Aus diesem Grunde wurde das Intermediat der enzymatischen Dephosphorylierung von *neo*-Ins P_6 **161**, *neo*-Ins P_5 **172** als neues Zielmolekül einer Totalsynthese ausgewählt. Das Wissen über die absolute Konfiguration der *neo*-Ins P_5 **172** Zwischenstufe sollte ebenfalls die Zuordnung der absoluten Konfiguration von *neo*-Ins P_4 **173** ermöglichen.

Schema 48: Darstellung von *neo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ (+)-**172**

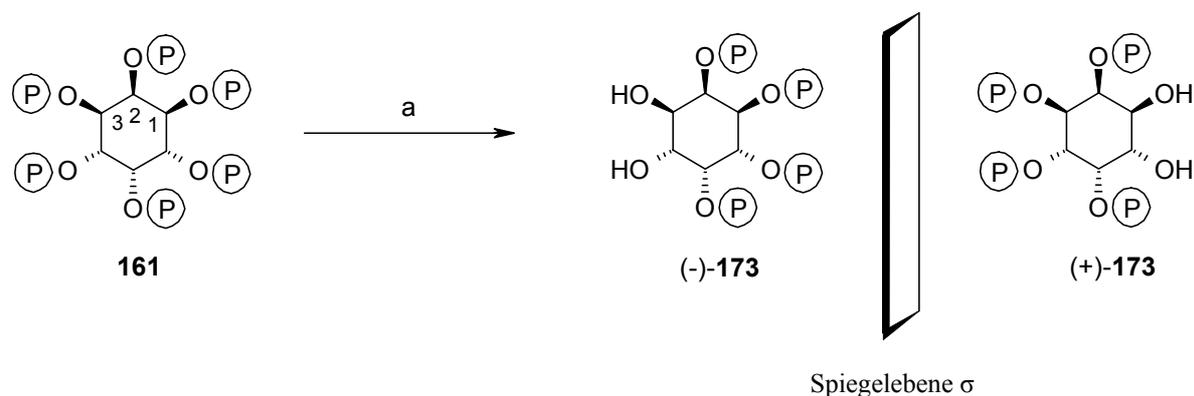
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 1. NaOAc, AcOH (95%), 10 Tage, 130 °C dann Ac₂O, CH₂Cl₂, DMAP (Kat.). 2. (CF₃CO)₂O, H₂O₂, CH₂Cl₂, NaHCO₃. – (b) 2,2,2-Trichloracetimidbenzylester, CF₃SO₃H [22%]. – (c) NaOMe, MeOH [99%]. – (d) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-Benzodioxaphosphhepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA. 2. Pd/C, H₂ EtOH/H₂O [50%].

Entsprechend wurde das andere Enantiomer (+)-**159** mittels 2,2,2-Trichloracetimidbenzylester in Dichlormethan/Hexan benzyliert und lieferte das monobenzylierte Produkt (-)-**174**. Alkalische Methanolyse gab freies 1-Benzyl-*neo*-inositol (-)-**176** in quantitativer Ausbeute. Phosphorylierung mit 3-Diethylamino-2,3,4-benzodioxaphosphhepan in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol und anschließende Oxidation mit *m*-CPBA und sukzessive Pd/C-katalysierte Hydrogenolyse von (-)-**176** lieferte *neo*-(2,3,4,5,6)InsP₅ (+)-**172**.

Bestimmung der absoluten Konfiguration mit Hilfe des Standards ((+)-172)

In Analogie zur *myo*-InsP₆ **13** Umsetzung mit der Phytase aus *S. cerevisiae* ist es sehr wahrscheinlich, daß **161** zuerst an der 3-Position hoch stereoselektiv dephosphoryliert wird. Nach zweiter Dephosphorylierung müßte das gebildete Produkt *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ (-)-**173** sein, aber eine eindeutige Zuordnung der absoluten Konfiguration kann nur mit Hilfe von enantiomerenreinem Referenzmaterial erfolgen.

Schema 49: Umsetzung von *neo*-InsP₆ **161** durch die Phytase aus *S. cerevisiae*.



Reagenzien: (a) Phytase aus *S. cerevisiae*, 45°C, 75 mM Natriumacetat (pH 4.6), Startkonzentration: 1 mM **161**.

Aus diesem Grunde wurde Ins(2,3,4,5,6)P₅ (+)-**172** (siehe Schema 48, Seite 122) mit der Phytase aus *S. cerevisiae* enzymatisch abgebaut. Der enzymatische Abbau von *neo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ (+)-**172** erfolgt dabei sehr viel unspezifischer, so daß drei HPLC-aufgelöste *neo*-Inositoltrakisphosphat Isomere nachgewiesen werden können (vermutlich handelt es sich dabei um *neo*-Ins(2,4,5,6)P₄, *neo*-Ins(2,3,5,6)P₄ und *neo*-Ins(2,3,4,5)P₄). Diese reichern sich aber nicht an, sondern werden gleich weiter dephosphoryliert.

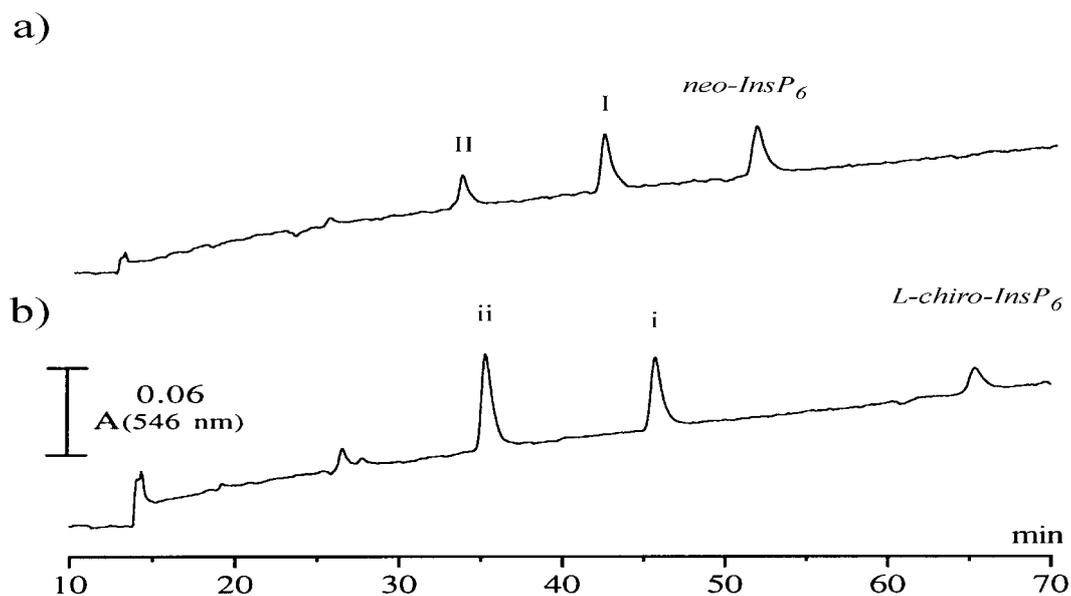
Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, daß *neo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (**-172**) das beobachtete Intermediat der *neo*-InsP₆ **161** Umsetzung ist. Damit kann das *neo*-InsP₄ (**-173**) eindeutig als das *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ identifiziert werden.

Die Akkumulation von *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ (**-173**) geht zurück auf eine Eigenschaft, die bei den meisten Phytasen beobachtet wird: die Abspaltung einer axialen Phosphatgruppe wird nur sehr schlecht katalysiert.^{149, 150} In Analogie zur Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ **13**, startet der *neo*-InsP₆ **161** Abbau an der Position 3, gefolgt von der Position 4; dann, im Gegensatz zu *myo*-InsP₆ **13**, stoppt die Reaktion nahezu, weil die Phosphatgruppe in Position 5 axial orientiert ist. Bei der Suche nach Strukturelementen, die beim Verständnis der Substraterkennung durch die Phytasen behilflich sein könnten, wurde *myo*-InsP₆ **13** in zwei charakteristische Hälften aufgeteilt. Erstens in ein all-*cis* 1,2,3-Motiv mit einer äquatorial-axial-äquatorial Anordnung der Phosphatgruppen und zweitens in ein all-*trans* 4,5,6-Motiv mit ausschließlich äquatorialen Phosphatgruppen. Das C₂-symmetrische *neo*-InsP₆ **161** besteht aus zwei äquivalenten Teilen (1,2,3 und 4,5,6), wobei jedes dem all-*cis* 1,2,3-Motiv von *myo*-InsP₆ **13** ähnelt. L-*chiro*-InsP₆ (**-135**) fehlt komplett diese Konstellation der Phosphatgruppen. Die Phytase aus *S. cerevisiae* greift zuerst die 3-Position in dem 1,2,3-

Motiv von *myo*-InsP₆ **13** an. Dies erklärt möglicherweise, warum *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** gegenüber dieser Phytase so resistent ist.

Desweiteren wurde die enzymatische Umsetzung von *neo*-InsP₆ **161** und *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** durch die Phytase aus *Pichia rhodanensis* untersucht (siehe Abbildung 42). Abbildung 42a zeigt dabei das Abbaumuster von *neo*-InsP₆ **161**.

Abbildung 42: Umsetzung von *neo*-InsP₆ **161** und *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** durch Phytase aus *P. rhodanensis*.

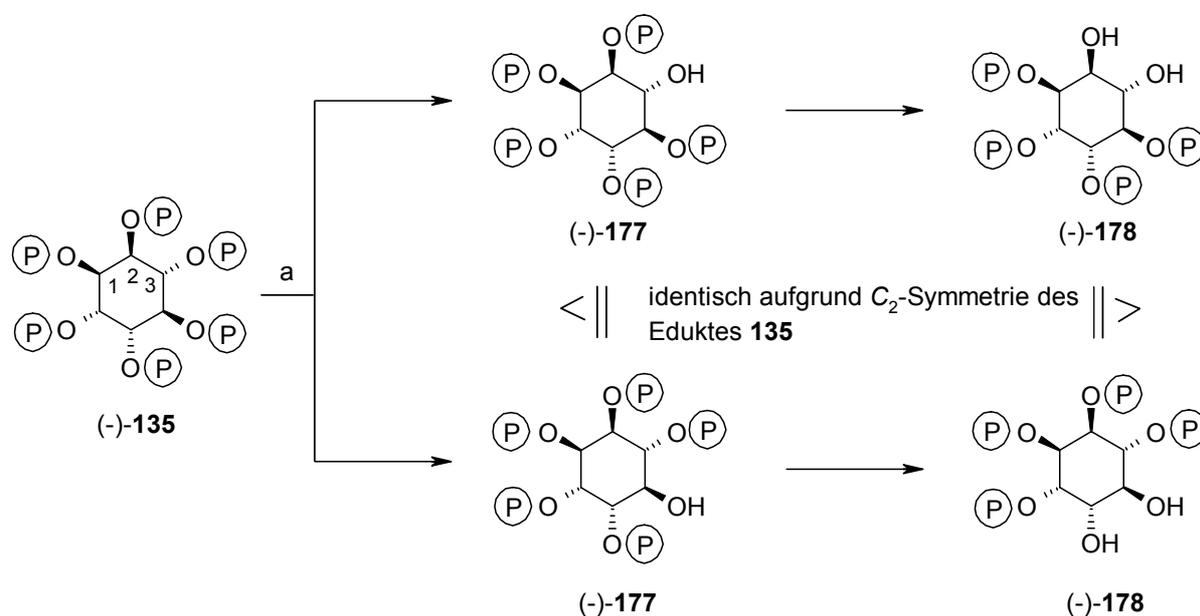


(a) *neo*-InsP₆ **161** Dephosphorylierung (I: *neo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-**172**; II: *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ (-)-**173**)
 (b) *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** Dephosphorylierung (i: *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ ((-)-**177**); ii: *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ (-)-**178**) durch die Phytase aus *P. rhodanensis*.

Hier treten wie bei der *Saccharomyces* Phytase die gleichen Intermediate auf. Dieses Ergebnis korreliert mit denen der Umsetzung von *myo*-InsP₆ **13** durch *Pichia* Phytase (Abbildung 32, S. 89). Ein wichtiger Zweig in diesem Reaktionsschema startet mit der Entfernung der Phosphatgruppe in der 3-Position und ist somit absolut identisch mit der spezifischen Dephosphorylierungssequenz wie sie durch das Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* katalysiert wird. Wie bereits obig beschrieben wurde, finden die ersten beiden Stufen der *neo*-InsP₆ **161** Dephosphorylierung in den korrespondierenden Positionen statt. Das Fehlen eines all-*trans* 4,5,6-Motivs in der Struktur von *neo*-InsP₆ **161** scheint dabei der Grund für das definierte Dephosphorylierungsmuster zu sein. Es kann kein weiterer Abbauweg durch Entfernen einer im all-*trans* Motiv vorliegenden Phosphatgruppe in der 6-Position (Abbildung 32, S. 89) vorkommen.

Für *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** ist die Situation hingegen vollkommen anders. Im Einklang mit IUPAC-IUB variiert die Nummerierung der Ringkohlenstoffe mit der für *neo*-InsP₆ **161** und *myo*-InsP₆ **13**.¹⁵¹ Um Verwechslungen zu vermeiden wird die IUPAC-konforme Nummerierung aus Schema 50 verwendet. Das all-*cis* 1,2,3-Motiv von *myo*-InsP₆ **13** ist in *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** gestört. Dieses Motiv entspricht der 2,1,6-Anordnung der Phosphatgruppen in *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** (siehe Schema 50). Ein erster Dephosphorylierungsschritt würde zur Entfernung eines Phosphates in der axial orientierten 6-Position von *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** führen und damit sehr unwahrscheinlich sein. Hingegen ähnelt die 5,4,3-Anordnung der Phosphate dem all-*trans* 4,5,6-Motiv in *myo*-InsP₆ **13**. Aus diesem Grunde ist ein Angriff in der 3-Position von *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** als erster dephosphorylierender Schritt wahrscheinlich. Eine HPLC-MDD Analyse der Umsetzung zeigt einen ebenfalls hochspezifischen Abbau (Abbildung 42b) an. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung des aufgereinigten *L-chiro*-Inositolpentakisphosphates bestätigt diese Voraussage, und somit ist das erste Produkt dieser enzymatische Umsetzung *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ (-)-**177**.

Schema 50: Umsetzung von *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** durch Phytase aus *P. rhodanensis*.



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Phytase aus *P. rhodanensis*, 45°C, 75 mM Natriumacetat (pH 4.6), Startkonzentration: 1 mM (-)-**135**, Enzymaktivität 8.5 mU/mL (bezogen auf *myo*-InsP₆ **13**).

Aufgrund der C_2 -Symmetrie des Eduktes *L-chiro*-InsP₆ (-)-**135** ist es unmöglich zwischen einer Dephosphorylierung in 3- oder 4-Position zu unterscheiden. Diese Positionen sind homotop und deshalb sind die erhaltenen Produkte *L-chiro*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (-)-**177** und *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ (-)-**177** identisch. Im Einklang mit den IUPAC-IUB Regeln,¹⁵¹ welche die geringere Numerierung der Substituenten vorsieht, ist die korrekte Abkürzung *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ (-)-**177**. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung des isolierten *L-chiro*-Inositoltrikisphosphats zeigt, daß die enzymatische Hydrolyse hauptsächlich, wie im Fall von *myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅ (-)-**31** (Abbildung 32), an der benachbarten transständigen Position zur freien Hydroxygruppe erfolgt. In Bezug auf die Nachweisgrenze der NMR Methode, ist die Verbindung zu über 95% isomerenreines, homogenes *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ (-)-**178**.

Biologische Bedeutung und mögliche Anwendungen:

In Kooperation mit Adelt und Dallmann konnte eine neue Strategie zur Synthese von Inositolphosphaten etabliert werden. Diese kombiniert die Vorzüge einer stereokontrollierten chemischen Transformation mit einem regio- und stereospezifischen enzymkatalysierten Schritt.¹³³ *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ (-)-**173**, welches als Analoga von *myo*-Ins(1,2,6)P₃ betrachtet werden kann, wurde dabei erstmalig dargestellt. Dies könnte entzündungs- und schmerzhemmende Effekte wie *myo*-Ins(1,2,6)P₃ aufweisen.^{44, 152} Das Potential von *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ (-)-**173** als Ersatzstoff von *myo*-Ins(1,2,6)P₃ wurde bisher noch nicht untersucht. *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ (-)-**178** ist strukturell mit *myo*-Ins(1,2,3,6)P₄, einer Verbindung mit möglicher physiologischer Funktion als Eisentransporter und Beschleuniger der Calciumaufnahme, verwandt.^{153, 154} Mittels dem *L-chiro* Isomer ließ sich das Verständnis der Struktur-Aktivität Beziehung weiter vertiefen.

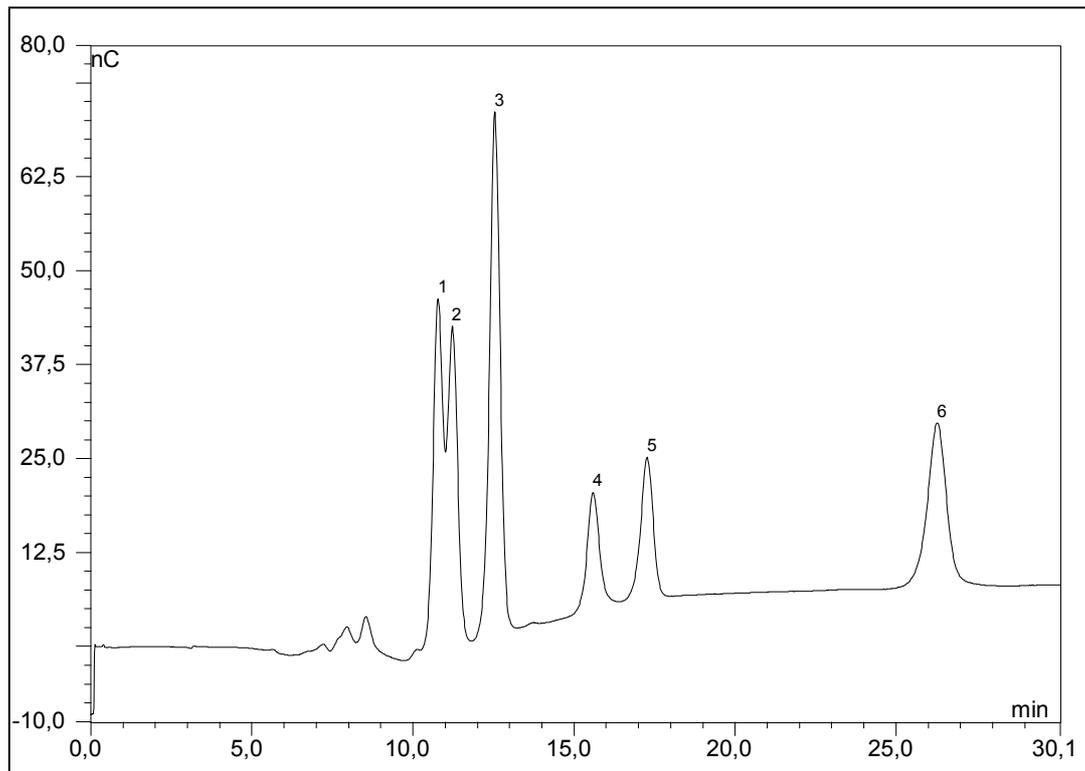
2.4.4 Analytische Trennung der Inositol-Stereoisomere und Wachstumskurven

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden bereits viele Stereoisomere in verschiedenen Organismen nachgewiesen. Ihre Rolle und Funktion in den unterschiedlichen Arten ist hingegen größtenteils unbekannt. Es sind bisher nur wenige Methoden beschrieben, die eine direkte Trennung von Inositolstereoisomeren und deren Quantifizierung erlauben.¹⁵⁵

Im Zusammenhang mit der Synthese der stereoisomeren Inositole wurde nach einer chromatographischen Methode gesucht, die eine leichte und schnelle Bestimmung dieser Isomere erlaubt. Inositole sind schwache Säuren, die bei einem pH von 13 bis 14 ionisieren. Bei diesen pH Werten, die nahe den pK_a Werten liegen, sollten die Inositolisomere mittels Anionenaustausch-Chromatographie voneinander getrennt werden können.

In Kooperation mit dem hiesigen biochemischen Arbeitskreis (Prof. Vogel, Dr. Adelt und Dipl.-Chem. Dallmann) konnte eine Methode zur Trennung und amperometrischen Detektion (IPAD) von Inositol-Stereoisomeren erarbeitet werden. Durch Verwendung eines linearen Gradienten bis 250 mM NaOH und einer Säule mit hoher Kapazität (CarboPac MA1) können Stereoisomerengemischen aus *neo*-, *myo*-, *scyllo*-, *epi*-, *chiro*- und *allo*-Inositol mit HPIC-IPAD (high performance ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection) analysiert werden. Die gepulste amperometrische Detektion (PAD) ist eine leistungsfähige Detektionsmethode, die hauptsächlich beim Nachweis von Kohlenhydraten Verwendung findet. Hier wird dieses Verfahren zum Nachweis der Inositolstereoisomere ausgenutzt. Über diese Methode, welche im Gegensatz zur Gaschromatographie keine Derivatisierung der Proben benötigt, lassen sich direkt die freien Inositole detektieren. Bei einem hohen pH-Wert werden die Inositole an einer Goldelektrode bei einem positiven Potential elektrochemisch oxidiert. Der gemessene Strom ist dabei proportional zu der Konzentration der Inositole.

Wie in Abbildung 43 erkennbar ist, können alle dargestellten Stereoisomere voneinander getrennt werden. Lediglich *myo*- und *neo*-Inositol sind nicht grundliniengetrennt. *neo*-Inositol ist damit bei einem hohen Überschuss an *myo*-Inositol nur schwer nachweisbar. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei nur 50 nM (entsprechend 5 pmol pro Substanz im analytischen Lauf).

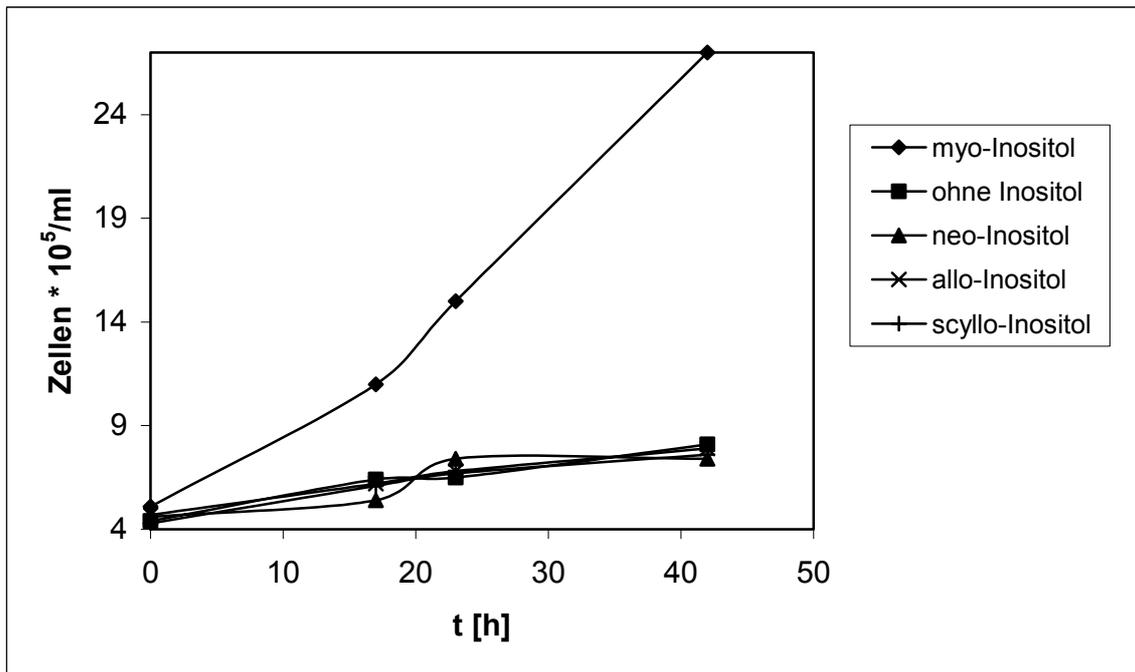
Abbildung 43: Trennung der Inositol-Isomere

Bedingungen/Erläuterungen: 1: *neo-3*, 2: *myo-1*, 3: *scyllo-5*, 4: *epi-8*, 5: *chiro-4*, 6: *allo-Inositol 9*.
 Programm: 0 bis 250 mM NaOH in 10min, anschließend 250 mM NaOH isokratisch

Wachstum von HR-2-Mutante in Gegenwart verschiedener Inositolisomere:

In Kooperation mit Andreas Fischbach (Biochemie, Universität Wuppertal) wurden Fütterungsversuche an *D. discoideum* durchgeführt. Dabei wurde eine HR-2 Mutante verwendet, die kein *D-myo*-Inositol-3-phosphat aus Glucose 6-phosphat synthetisieren kann (rekombinante Mutante mit einer vernachlässigbaren *myo*-Inositol 3-phosphat Synthaseaktivität). Diese sogenannte *myo*-Inositol auxotrophe Mutante kann ohne Zugabe von *myo*-Inositol zum Nährmedium nicht wachsen. Interessant schien nun, ob ein Inositolstereoisomer als Ersatz dienen kann.

Zuerst wurden, um sicher zu stellen das keines der Inositolstereoisomere toxisch ist, Fütterungsversuche am Wildtyp durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Inositolstereoisomere zum Nährmedium zugegeben. In allen Versuchen fand ein normales Wachstum statt, woraus geschlossen werden kann, daß kein Stereoisomer toxisch wirkt.

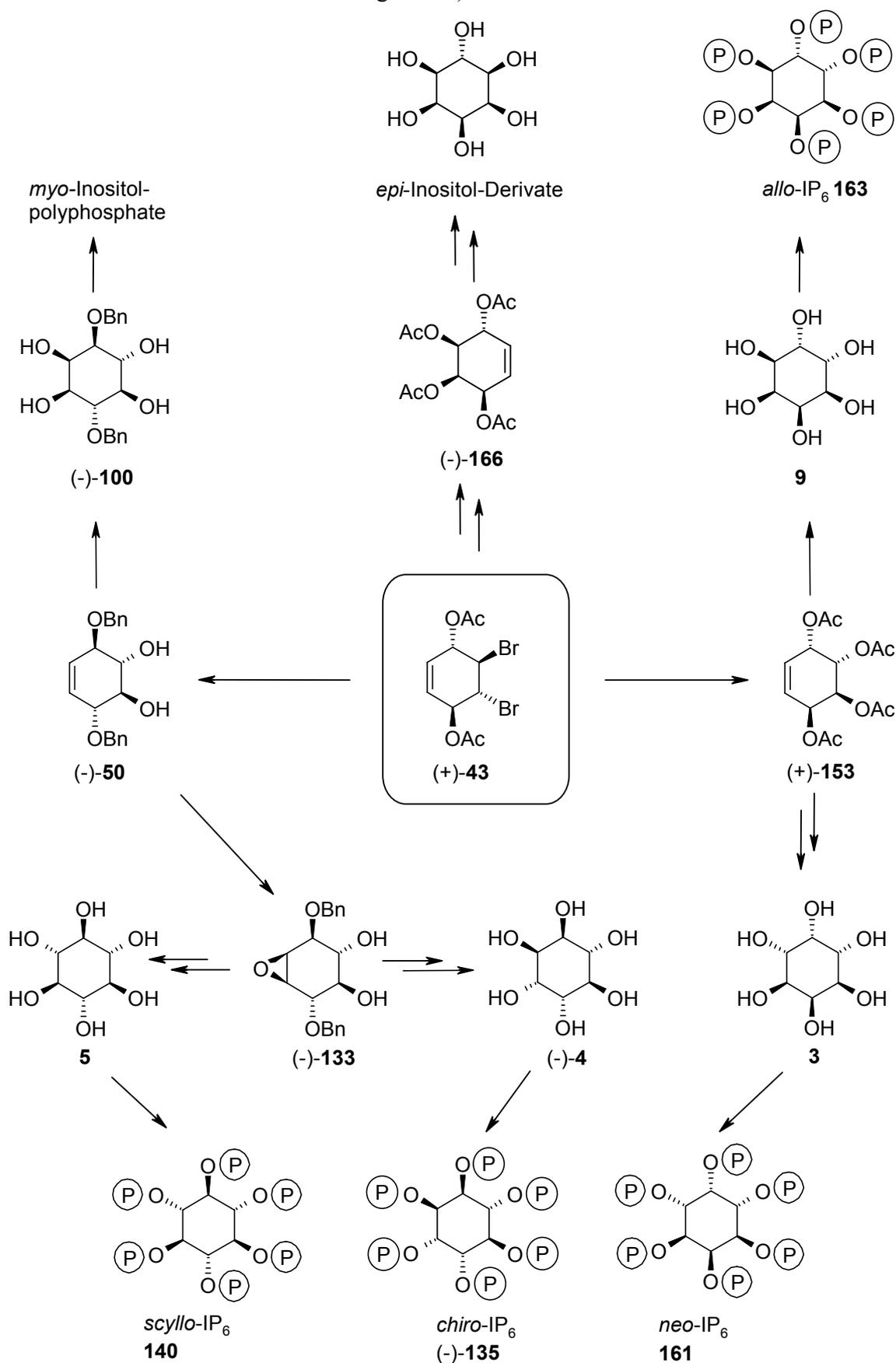
Abbildung 44: Wachstum der HR-2 Mutante in Gegenwart verschiedener Inositolisomere

Bedingungen: Ansatz von fünf 300 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml FM-Medium

(1) Waschen von HR-2 mit Sörensenpuffer (500 g, 4 °C, 5 min.). (2) Zusatz von Zellen auf eine Zelldichte von $5.0 \cdot 10^5$ Zellen/ml. (3) Zusatz von 500 μ M am entsprechendem Inositolstereoisomer (vorher Sterilfiltration der Inositole). (4) Abnahme einer 500 μ l Probe zur Zellzahlbestimmung zu verschiedenen Zeiten.

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich ist, kommt es bei Zugabe von keinem Stereoisomer zur *myo*-Inositol auxotrophen HR-2 Mutante zu einem signifikanten Wachstums der Kulturen im Vergleich zum inositolfreiem Medium (im inositolfreiem Medium stoppt das Wachstum nach etwa einer Verdoppelung). Damit kann kein getestetes Stereoisomer bei *D. discoideum* die Rolle von freiem *myo*-Inositol übernehmen.

Schema 51: Übersicht der Synthesewege der einzelnen Inositol Stereoisomere (zur besseren Übersicht wurde nur ein Enantiomer abgebildet).



Zusammenfassung und Ausblick:

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein umfassendes und praktikables Konzept zur Darstellung der stereoisomeren Inositole entwickelt werden. Dabei gelang es gleichzeitig zum Teil neue und effektive Konduritol-Synthesen zu etablieren. Diese Konduritole wurden anschließend in wenigen Stufen hochselektiv zu den gewünschten Inositolen umgesetzt. Zusätzlich zu den chemischen Synthesen erwiesen sich die Verbindungen als hilfreich bei der Entwicklung analytischer Trennmethode. Darüber hinaus konnten biochemische Abbauewege der InsP_6 -Isomere aufgeklärt werden.

Mit der etablierten, sensitiven Analytik lassen sich nun Störungen im Stoffwechsel mit Auswirkungen auf den Inositol-Pool der Zellen erfassen. In Planung sind Experimente zu den Auswirkungen von Diabetes auf den Stoffwechsel der Inositol-Epimere bei der Maus.

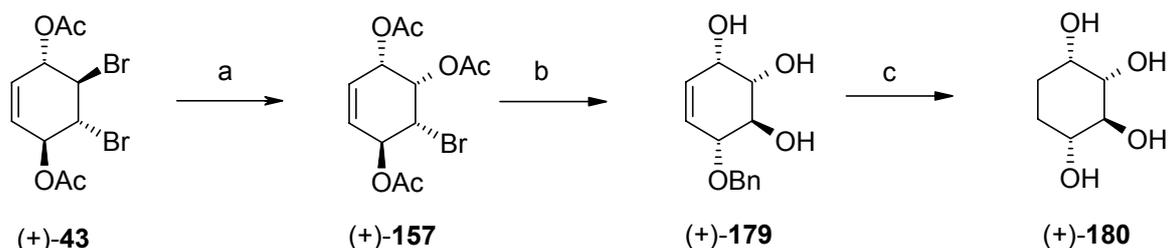
2.5 Synthese von Konduritol F-Derivaten als potentielle Galactoseanaloga

Biologische Grundlagen: Kohlenhydrate stehen im Zusammenhang mit der molekularen und der Zell-Zell-Erkennung. Der Asialoglykoproteinrezeptor der Leberzellen entfernt Glykoproteine aus dem Blutkreislauf, sobald sie ihre endständigen Sialinsäurereste verloren haben. Dabei erkennt der Asialoglykoproteinrezeptor die offenliegenden Galactosereste dieser Glykoproteine. Pflanzen enthalten viele lösliche kohlenhydratbindenden Proteine, die man als Lectine bezeichnet. Diese kohlenhydratbindende Proteine sind maßgeblich an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt, indem sie die Glycoproteine an der Zelloberfläche erkennen. In Säugetieren kommen kohlenhydratbindende Proteine u. a. in membrangebundener Form vor. Gegenwärtig sind von fast allen menschlichen Organen (Leber, Herz, Lunge etc.) kohlenhydratbindende Proteine bekannt, die vorrangig als Oberflächenrezeptoren dienen.^{71, 156}

Durch die Zugabe von D-Galactose **181** bzw. *N*-Acetyl-D-galactosamin lassen sich *in vitro* die „Combining Sites“ der Mistellectine kompetitiv hemmen, so daß eine Bindung an Zellrezeptoren nicht mehr möglich ist.¹⁵⁷ In Analogie zu den Glycosidase-Inhibitoren könnte man mit Hilfe von Lectin-Inhibitoren die Zell-Zell-Erkennung unterdrücken. Besonders aussichtsreich erscheinen dabei Galactoseanaloga, bei denen der Ringsauerstoff durch eine Methylengruppe oder Heteroatom ersetzt wird. In der Medizin wären solche Inhibitoren hilfreich um Abstoßungsreaktionen von transplantierten Organen zu unterbinden. Damit gebührt Molekülen die in die Zell-Zell-Erkennung eingreifen ein starkes Interesse.

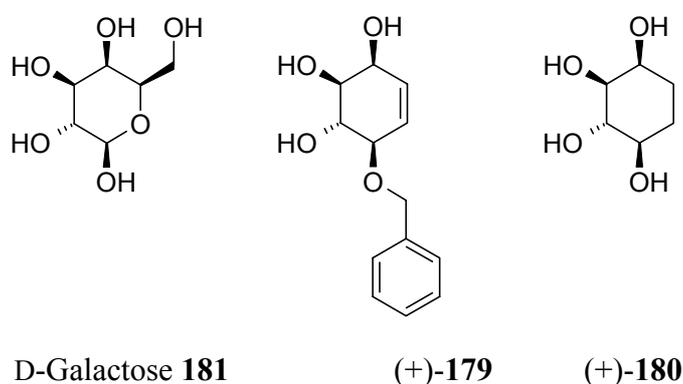
Syntheseweg:

Behandeln von 1,2,4-Triacetoxy-3-bromcyclohex-5-en (+)-**157**, welches bei der Synthese von Konduritol E (+)-**153** als Intermediat isoliert werden kann (siehe Kapitel 2.4.1, Schema 42, S. 109), mit einem Überschuß an Natriumbenzylat in absolutem Benzylalkohol bei Raumtemperatur generiert das Epoxid, welches nach 12 h Rühren fast vollständig hydrolysiert. Die Regioselektivität der Öffnung des Oxiranringes erfolgt dabei ausschließlich in Allylposition an C-1. Direkte chromatographische Aufreinigung des Rohproduktes liefert einen cremigen Feststoff in 66% Ausbeute. Die Pd/C-katalysierte Hydrogenolyse ist problemlos und liefert das Tetrol (+)-**180** in quantitativer Ausbeute.

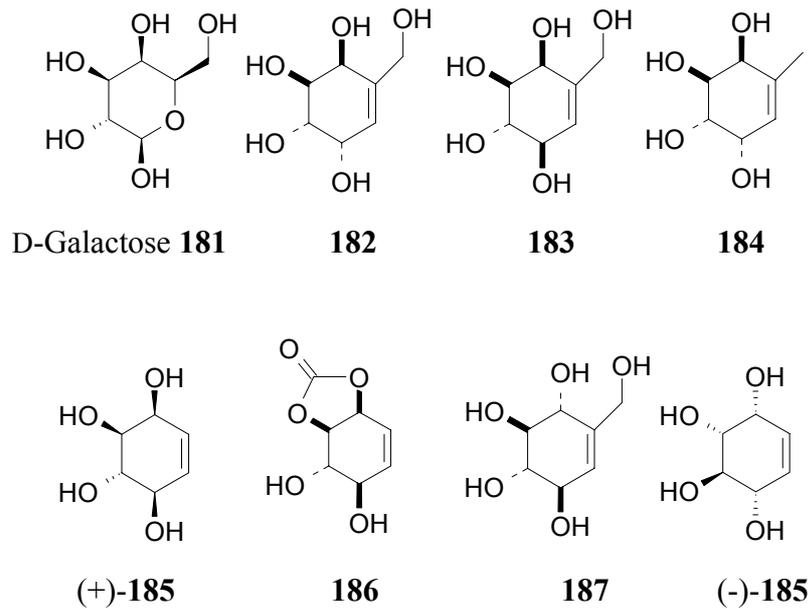
Schema 52: Darstellung von Konduritol F

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) NaOAc oder KOAc, AcOH (95%), 3 Tage, 110 °C. 2. Ac₂O, CH₂Cl₂, DMAP (Kat.) [85%]. –(b) NaOBn, BnOH/THF [66%]. – (c) Pd/C, H₂ Wasser [99%].

Wie aus unterer Abbildung hervorgeht sind die beiden Verbindungen (+)-179 und (+)-180 strukturell stark mit der β -D-Galactose **181** verwandt. Da das Monobenzylkonduritol (+)-179 lipidgängiger sein dürfte, könnte eine solche Verbindung durchaus pharmakologisches Potential aufweisen.

Abbildung 45: Strukturvergleich von potentiellen D-Galactose-Analoga

In Kooperation mit Block⁸⁵ wurden Galactose-Analoga zur Vermessung mit dem BIAcore System¹⁵⁸ vorbereitet. Die Vermessung von unterschiedlichen synthetischen Analoga sollte einen tieferen Einblick in die strukturellen Erfordernisse solcher Verbindungen ergeben. Dabei konzentrierte sich Block auf die Synthese von verzweigten Galactosidase-Analoga. Die durch obigen Syntheseweg dargestellten Verbindungen ((+)-179 und (+)-180) sollten Aussagen über die Substratspezifität liefern und insbesondere erkennen lassen, ob die gesättigten Verbindungen genauso aktiv sind wie die ungesättigten.

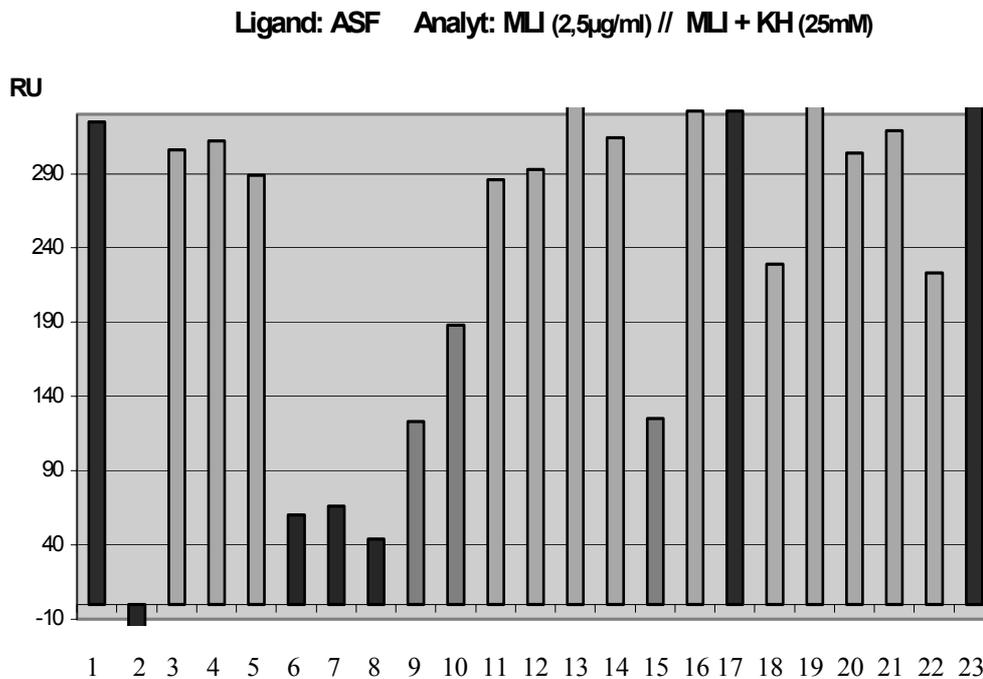
Abbildung 46: Weitere dargestellte Verbindungen

Die biomolekulare Interaktionsanalyse erlaubt die kontinuierliche Beobachtung der Wechselwirkung zwischen zwei oder mehreren Molekülen. Bei diesem speziellen Fall wurde die Wechselwirkung von Mistellectinen mit dem Pharmaka untersucht. Kernstück des BIAcore-Meßsystems ist der Sensor-Chip, der aus einem Glasträger besteht. Auf diesem ist ein dünner Goldfilm aufgedampft, dem eine carboxymethylierte Dextran-Schicht folgt. An dieser Dextranschicht ist kovalent der Ligand gebunden. Im Fall dieser Meßreihe diente Asialofetuin (ASF) als immobilisierter Ligand. Fetuin ist ein Glycoprotein tierischen Ursprungs (Rind), welches durch enzymatische Umsetzung mit Neuramidasen leicht modifiziert wurde. Wegen des großen Galactosegehalts an der Peripherie des Moleküls ist ASF ein exzellenter Ligand für die Untersuchung von Galactose-erkennenden Mistellectinen.

Die Carbazucker wurden durch Prof. Dr. U. Pfüller (Institut für Phytochemie, Universität Witten/Herdecke) für die Hemmwirkung auf ML I (Mistellectin I, gal), ML III (Mistellectin III, galNAc) mittels BIAcore vermessen. Die Messung erfolgte, indem eine Lösung an dem entsprechendem Lectin mit einer zu Hemmung ausreichenden Konzentration (25 mM) an ausgewählten Cyclitolen (Abk. KH, Kohlenhydrat) herstellt wurde. Mit Hilfe des BIAcore-Systems wurde die Wechselwirkung zwischen dem Mistellectin und dem ASF in Gegenwart des in der Probenlösung enthaltenen Saccharids gemessen. Das zu untersuchende Cyclitol konkurriert mit den Galactose-Resten des ASF um die Zuckerbindestellen des ML I. Die

kompetitive Hemmung der Bindung des Lectins an den immobilisierten Liganden wird mit Standards wie D-Galactose, *N*-Acetyl-D-galactosamin oder D-Fucose verglichen.

Abbildung 47: BIAcore Messung mit ML I



Balkennummern:

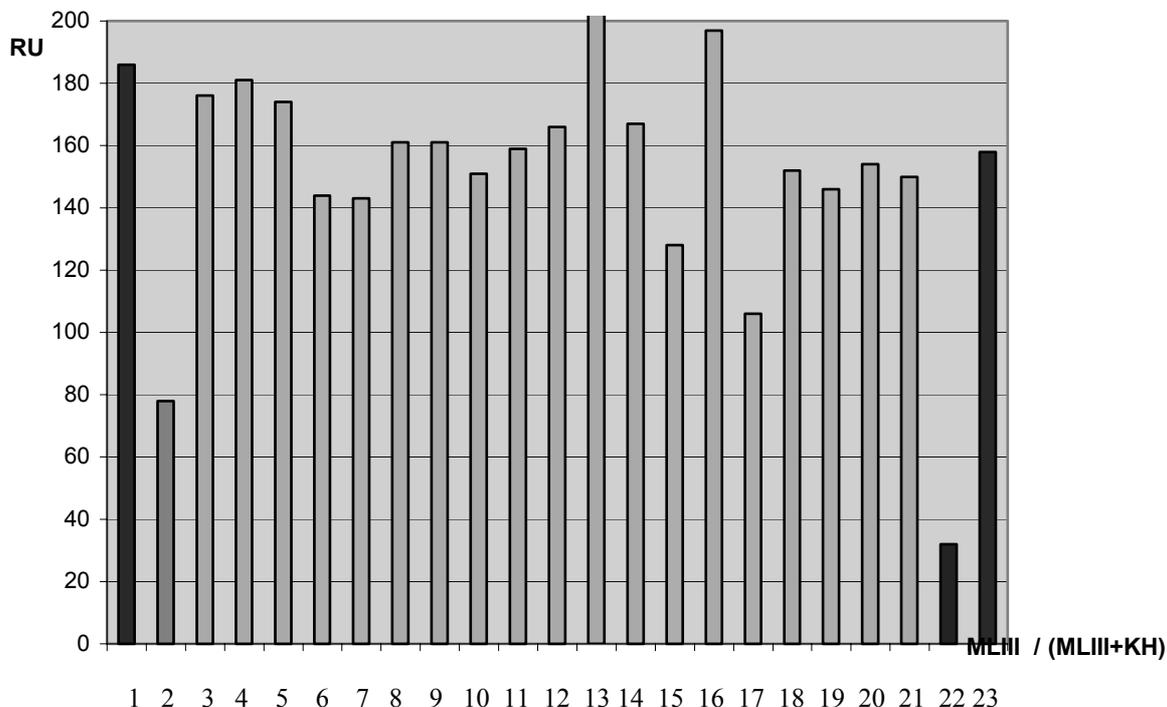
ML I / (ML I + KH)

1, 17, 19 und 23. ML I ohne Co-Verbindung. 2. D-Galactose **181**. 3. D-Fucose. 4. D-Glucose 5. **187**. 6. **183** 7. **183** 8. **182** 9. **184** 10. rac. **185** 11. rac. **180**. 12. (-)-**185**. 13. (-)-**180**. 14. Gemisch (-)-**180** und **182** 15. (+)-**185**. 16. (+)-**180**. 17. ML I ohne Co-Verbindung. 18. (+)-**179**. 20. **186**. 21. und 22. Standards.

KH: eingesetztes Cyclitol

Abbildung 48: BIAcore Messung Mit ML III

Ligand: ASF Analyt: MLIII (2,5µg/ml) // MLIII + KH(25mM)



Balkennummern:

1, und 23. ML ohne Co-Verbindung. 2. D-Galactose **181**. 3. D-Fucose. 4. D-Glucose 5. **187**. 6. **183**. 7. **183**. 8. **182**. 9. **184**. 10. rac. **185**. 11. rac. **180**. 12. (-)-**185**. 13. (-)-**180**. 14. Gemisch (-)-**180** und **182**. 15. (+)-**185**. 16. (+)-**180**. 17. (+)-**179**. 18. (-)-**179**. 19. **186**. 20. und 21. Standards. 22. *N*-Acetyl-D-galactose.

Beeindruckend sind die selektiven Hemmwirkungen von ML I durch Verbindung **182**, **183**, **184**, (+)-**185** sowie (+)-**179**. ML III wird dagegen nur durch (+)-**179**, (+)-**185**, **183** leicht gehemmt. Man erkennt, daß die stärkste Blockierung der Bindung des ML I an ASF auf der Chip-Oberfläche von der Galactose ausgeht (s. Balken 2). Aber auch die Cyclitole auf Konduritole-Basis zeigen eine diesbezügliche Tendenz, wenn auch zum Teil erheblich geringer. Bei allen Messungen ist besonders auffällig, daß fast alle Analoga mit deutlicher Affinität zum Lectin eine Doppelbindung im Ring besitzen. Offenbar sind die elektronischen Verhältnisse bei diesen Verbindungen ähnlich im Vergleich zum natürlichen Substrat (der D-Galactose). Das Tetrol (-)- und (+)-**180** zeigt so gut wie keine Inhibierung der Mistel-Lectine (siehe Abbildung 47 Balken 13 und 16 und Abbildung 48: Balken 13 und 16). Desweiteren scheint bei den enantiomerenreinen Verbindungen das Enantiomer, welches der D-Galactose **181** entspricht, bevorzugt zu werden [siehe Balken 12 und 15, (-)- und (+)-**185**,

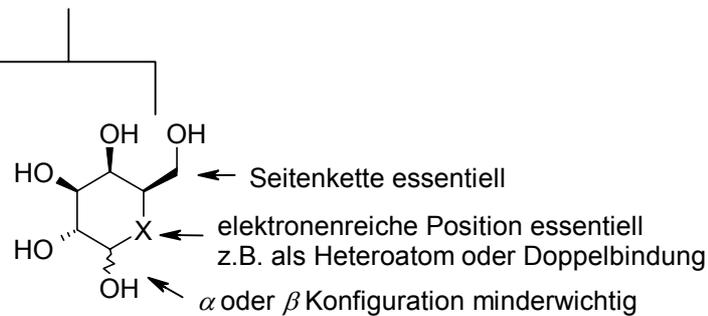
bei beiden Abbildungen]. Das optische Antipode wird hingegen nur schwer erkannt und es kommt nicht zu einer kompetitiven Hemmung.

Aus der angefertigten Studie geht folgende Substratspezifität hervor:

Die Seitenkette scheint einen maßgeblichen Einfluß zu besitzen. Fast alle Verbindungen mit α - oder β -Galactose-Konfiguration, die eine Doppelbindung aufweisen und zudem eine Seitenkette am C-5 besitzen, wie die Verbindungen **183** und **182** (Abbildung 47: Balken 7 und 8), zeigen eine kompetitive Hemmung im Bereich des natürlichen Liganden (D-Galactose).

Abbildung 49: Spezifität der Mistellectine ML I und ML II nach den bisherigen Ergebnissen

D-Galactose Konfiguration essentiell

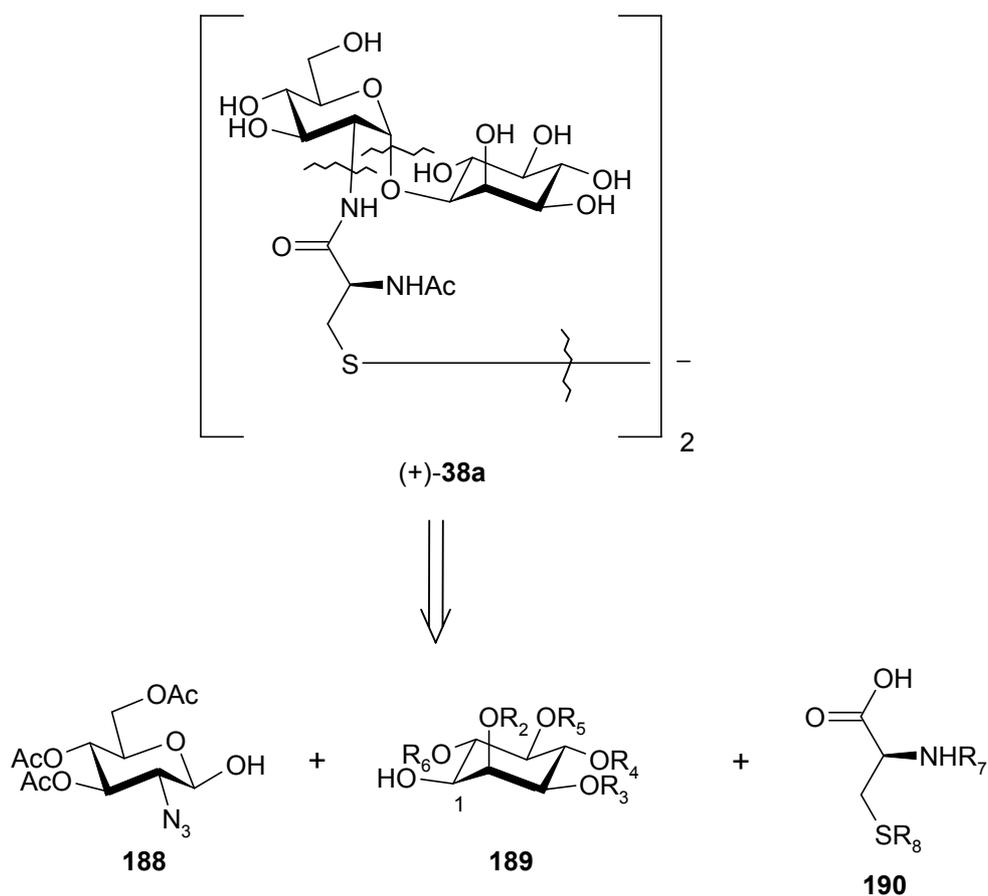


Die C-6 Position muß elektronenreich sein. Entweder durch ein Heteroatom, wie beim natürlichen Substrat, oder wie hier erstmals gezeigt werden konnte, durch eine Doppelbindung im Ring.

2.6 Darstellung von Mycothiol als Disulfid (38a) und Analoga

Die retrosynthetische Betrachtung zeigt, daß man das Molekül mittels natürlicher Bindungsbrüche in drei Grundkörper aufteilen kann. Dazu muß einmal die S-S-Brücke, die peptidische und die glycosidische Bindung gespalten werden. Durch diese Bindungsbrüche erkennt man die drei Grundbausteine, aus dem Mycothiol zusammengesetzt wird. Einmal aus dem entsprechend geschützten L-Cystein **190**, dem entsprechend geschützten Inositol **189** und dem entsprechend geschützten D-Glucosamin **188**. Das empfindliche, geschützte L-Cystein sollte dabei als letztes in der Synthese von Mycothiol **38a** eingeführt werden.

Abbildung 50: Retrosynthetische Betrachtung von Mycothiol **38a**

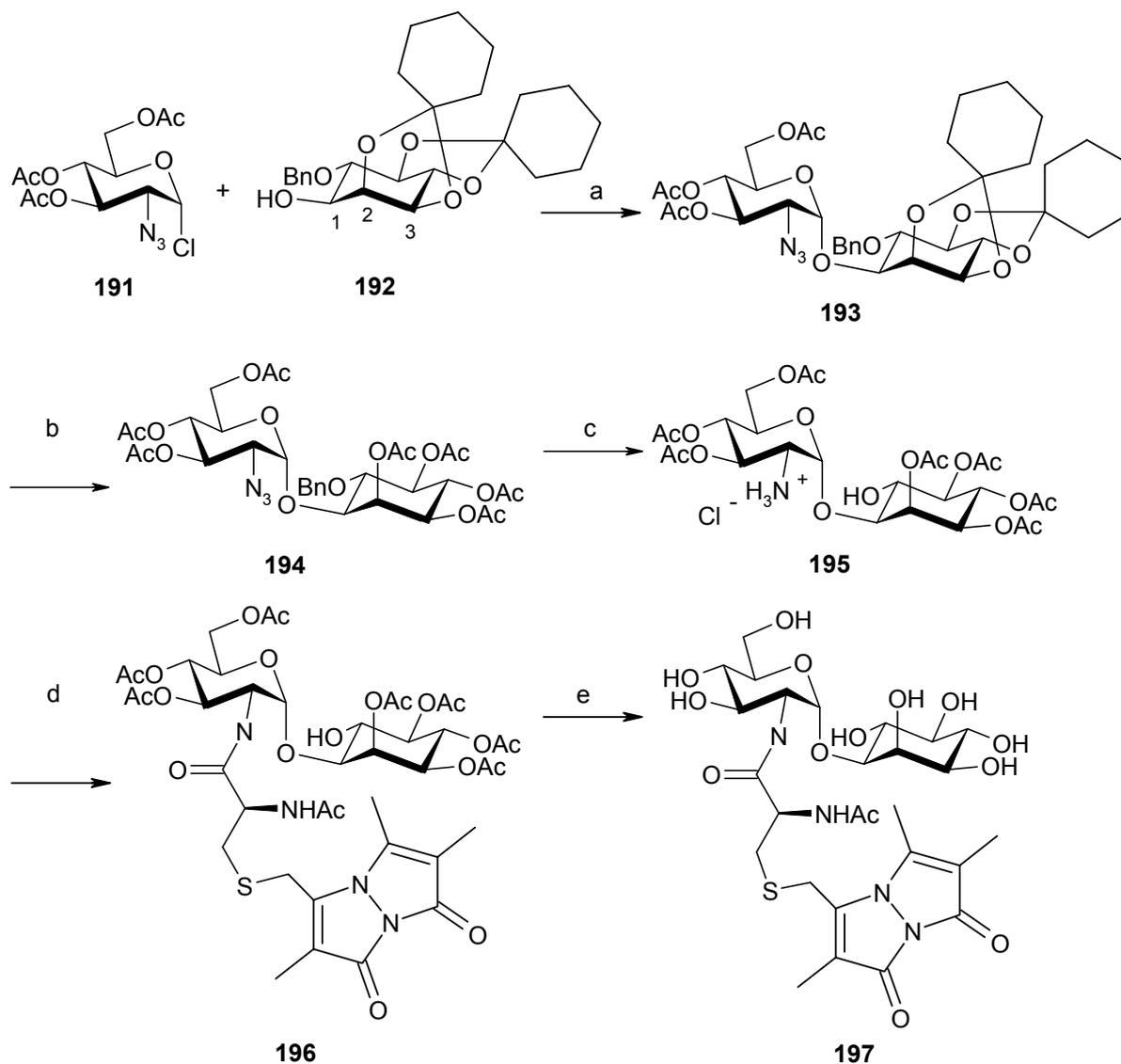


In der Literatur gab es bisher nur wenige Versuche zu Darstellung des Mycothiols bzw. ähnlicher Fragmente.

Die erste literaturbeschriebene Totalsynthese erfolgte durch Steenkamp et al. im Jahre 1997.¹⁵⁹ In dieser Arbeit wird die Synthese der Disaccharid-Komponente ausgehend von

myo-Inositol **1** und einem D-Glucosaminderivates beschrieben. Die Verwendung eines racemischen 1-ungeschützten *myo*-Inositolderivates als Glycosyl-Akzeptor und eines amingeschützten Glycosyl-Donors (2-(*N*-2,4-Dinitrophenyl)amino-glucopyranosylderivat) wurde glycosidisch unter Anwendung der Koenigs-Knorr-Kupplung miteinander verknüpft.¹⁶⁰ Dabei zeigte sich eine Schwachstelle dieser Syntheseroute. Durch den Nachbargruppen effekt der geschützten Amino-Gruppe bilden sich auch β -verknüpfte Disaccharide. Aufgrund der verwendeten racemischen Inositol-Komponente entstanden letztendlich vier Diastereomere, die α -konfigurierten D,D- und D,L-, sowie β -konfigurierten D,D-, D,L-Glycoside. Nur durch aufwendige Trennung, die nur in kleinem Maßstab durchführbar ist, konnte Steenkamp letztlich das gewünschte α -konfigurierte D,D-Glycosid erhalten. Die organisch synthetische Fertigstellung umging er, indem er die peptidische Verknüpfung (mit L-Cystein) mit Hilfe eines zellfreien Rohextraktes von *Mycobacterium smegmatis* durchführte und im letzten Schritt die Aminofunktion acetylierte. Diese Syntheseroute ist nur von bedingter Praktikabilität und aus diesem Grunde wurde nach alternativen Zugriffen gesucht.

Eine Verbesserung stellt eine im Jahre 2002 ebenfalls durch Steenkamp publizierte Totalsynthese von Mycothiol dar,¹⁶¹ bei der enantiomerenreine geschützte *myo*-Inositol-derivate eingesetzt wurden. Er verwendete wieder den ungeeigneten Glycosyl-Donor, das 2-(*N*-2,4-Dinitrophenyl)amino-glucopyranosylderivat. Dadurch erhielt er wiederum neben α - auch β -konfigurierte Glycoside, die er wiederum trennen mußte. Dabei unterlief ihm aber ein gravierender Fehler. So bezeichnete er den *myo*-Inositolbaustein als 1-D, zeichnete aber die Struktur als 1-L (entspricht der 3-D-Position). Allerdings findet sich seit 1997 in zahlreichen Publikationen von mehreren Arbeitskreisen das gleiche Problem. Damit war die absolute Konfiguration des Inositolbausteins im Mycothiol widersprüchlich zugeordnet. Von großer Bedeutung ist dabei, daß diese Diskrepanz auch in Publikationen auftaucht, die Teilsynthesen beinhalten und Enzym und Substratspezifitäten untersuchen. Aufgrund dieser widersprüchlichen Zuordnung der Verknüpfungsstelle erfolgte ebenfalls im Jahre 2002 die erste Totalsynthese von Mycothiol durch Brewley.¹⁶² Die durch Brewley beschriebene Synthese ist dabei von vorneherein für enantiomerenreine Inositolbausteine konzipiert und so bedarf es keiner Diastereomerentrennung der Pseudodisaccharide. Er erkannte die Problematik der Amino-Gruppe in der 2-Position eines Glycosyl-Donorderivates und verwendete ebenfalls, siehe später die eigene Synthese, die nicht nachbargruppenaktive 2-Azidofunktion als Synthone für die Amino-Gruppe.

Schema 53: Totalsynthese Mycothiol-Biman nach Brewley

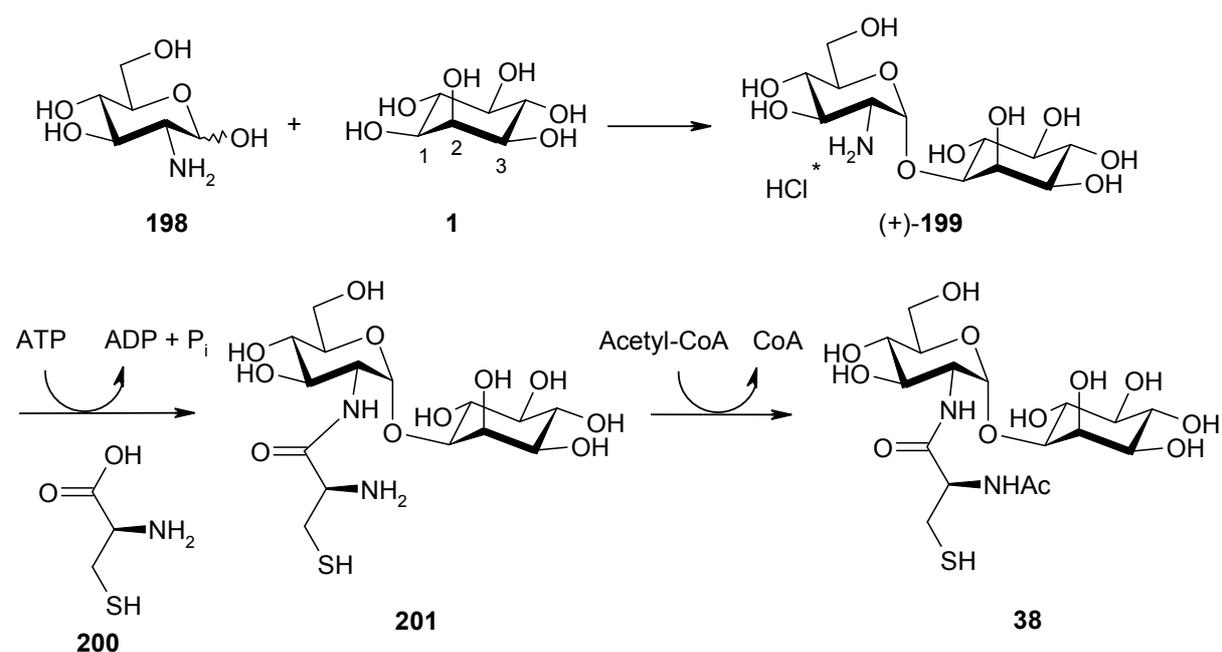
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) AgOTf, 2,6-Diisopropyl-4-methyl-pyridin, CH_2Cl_2 , 44% - (b) 1. Ethylenglycol, (+)-Camphersulfonsäure, MeCN. 2. Ac_2O , Pyridin 80%. - (c). Pd/C, H_2 , EtOAc, 86%. - (d) DEPC, $i\text{Pr}_2\text{EtN}$, DMF. *N*-Acetyl-L-(S)-cysteinylmonobiman, 31%. - (e) 1. $\text{Mg}(\text{OMe})_2$, MeOH (trocken), 75%.

Dabei wird fast ausschließlich das α -glycosidische Kupplungsprodukt erhalten. Anschließend wurde die Azid-Gruppe hydrogenolytisch reduziert, so daß die Route, wie in Schema 53 beschrieben, fortgesetzt wurde. Dabei verwendet er in der peptidischen Verknüpfung *N*-Acetyl-geschütztes L-Cystein, ein Baustein, der nur selten zur peptidischen Verknüpfung herangezogen wird. Der Grund dafür liegt in der starken Racemisierungstendenz während der Aktivierung der Aminosäure (siehe Schema 55: Nachbargruppeneffekt bei der glycosidischen Verknüpfung, Seite 144). Aus diesem Grunde verwendete er das Shioiri-Kupplungsreagenz (Diethylphosphorylcyanid, DEPC),¹⁶³ da hier bei der *N*-Acetyl-

Aminosäure nur wenig Racemisierung auftritt. Als Schwefelschutzgruppe verwendete Brewley das Biman (siehe Schema 53, S. 140), welches er auch am Ende der Reaktionssequenz nicht abspaltete. Ein aus Naturmaterial aus *M. smegmatis* durch Fahey et al. synthetisiertes Mycothiol-Biman **197** diente dabei als Vergleichssubstanz zur Klärung der absoluten Konfiguration des *myo*-Inositolbausteins.¹⁶⁴ ^1H -, ^{13}C und CD Spektren von beiden Verbindungen wurden miteinander verglichen, wobei sich eine vollkommene Übereinstimmung zeigte. Somit ist seit diesem Jahr die Struktur des Mycothiols eindeutig bestimmt.

Die Tatsache, daß der zellfreie Rohextrakt von *Mycobacterium smegmatis* das α -konfigurierte D,D-Glycosid mit L-Cystein peptidisch verknüpft, zeigt einen wahrscheinlichen Weg der Biosynthese des Mycothiols.¹⁵⁹ Demnach wird zuerst *myo*-Inositol **1** mit D-Glucosamin **198** glycosidisch unter Bildung des Disaccharid **199** verknüpft.

Schema 54: Postulierter Biosyntheseweg von Bornemann et al.



Das Disaccharid wird unter Verbrauch von einem Äquivalent ATP mit Cystein **200** gekuppelt. Anschließend wird das gebildete 2(L-Cysteinyl)amino-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-(D-*myo*-inositol) **201** mit Hilfe von Acetyl-CoA acetyliert. Grundlage der Annahme von Brewley war, daß ein Analogon des Disaccharids **199** der Glycosylphosphatidylinositol-Anker in Eukaryoten ist, von dem der Biosyntheseweg bereits bekannt ist.¹⁶⁵ Bei diesem Analogon erfolgt die Verknüpfung von D-Glucosamin mit Phosphatidylinositol mit Hilfe von UDP-N-Acetylglucosamin sowie einer Acetylase.

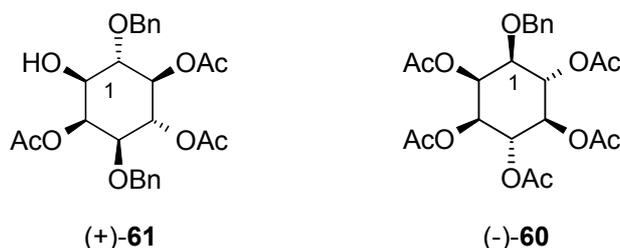
2.6.1 Synthese der Disaccharid-Komponenten

Bei der Disaccharid-Synthese müssen zwei polyfunktionelle Reaktionspartner miteinander verknüpft werden. Beide müssen sich selektiv blockieren und deblockieren lassen. Für eine glycosidische Verknüpfung muß das anomere Zentrum der Glycosylkomponente aktivierbar sein. Zusätzlich muß bedacht werden, daß die Reaktivitäten sehr stark von dem jeweiligen Blockierungsmuster der Komponenten abhängen. Die Schutzgruppen können den Verknüpfungsschritt also maßgeblich beeinflussen. Weiterhin sind konformative und sterische Einflüsse der beiden Partner von Bedeutung. Alle diese Abhängigkeiten zeigen, daß die Reaktionsbedingungen für den folgenden Verknüpfungsschritt sorgfältig erprobt werden müssen.

2.6.1.1 Synthese des Glycosyl-Akzeptors

Bei der Inositol-Komponente des Mycothiols wurde auf die bereits aus der Synthese von *myo*-Inositolphosphaten erhaltenen Zwischenstufen zurückgegriffen. Danach sollten geschützte Inositolbausteine Verwendung finden, die an der 1-Position freie Hydroxygruppen aufweisen und an denen alle restlichen Hydroxygruppen geschützt sind (siehe Synthese von *myo*-Inositolmonophosphaten, siehe Abschnitt 2.3, ab Seite 55). Inositolbausteine mit säurelabilen Schutzgruppen, wie etwa der Isopropyliden-Schutzgruppe, können durch die spätere glycosidische Kupplung, welche unter lewissauren Bedingungen erfolgt, nicht genommen werden.

Somit kommt nur der Dibenzyl-Baustein (+)-**61** (s. Absatz 2.3.1.2, Schema 14, S. 59) und der Monobenzyl-Baustein (-)-**60** (s. Schema 29, S. 81) zur Synthese von Mycothiol **38** in Frage.

Abbildung 51: Mögliche Bausteine für die Synthese von Mycothiol

Der Monobenzyl-Baustein (-)-**60** müßte zuvor hydrogenolytisch entschützt werden. Dies sollte problemlos möglich sein. Da der Dibenzyl-Baustein (+)-**61** über den symmetrischen Syntheseweg dargestellt wurde, ist dieser gegenüber (-)-**60** besser zugänglich und steht somit im Fünfgammaßstab für die Synthese des Disaccharids bereit. Hier zeigt sich wiederum die Flexibilität der Syntheserouten. Über den symmetrischen sowie den desymmetrisierenden Weg (siehe Absatz 2.3) lassen sich geeignet geschützte Grundkörper für die Mycothiol-synthese darstellen, die für weiteren Synthesen herangezogen werden können.

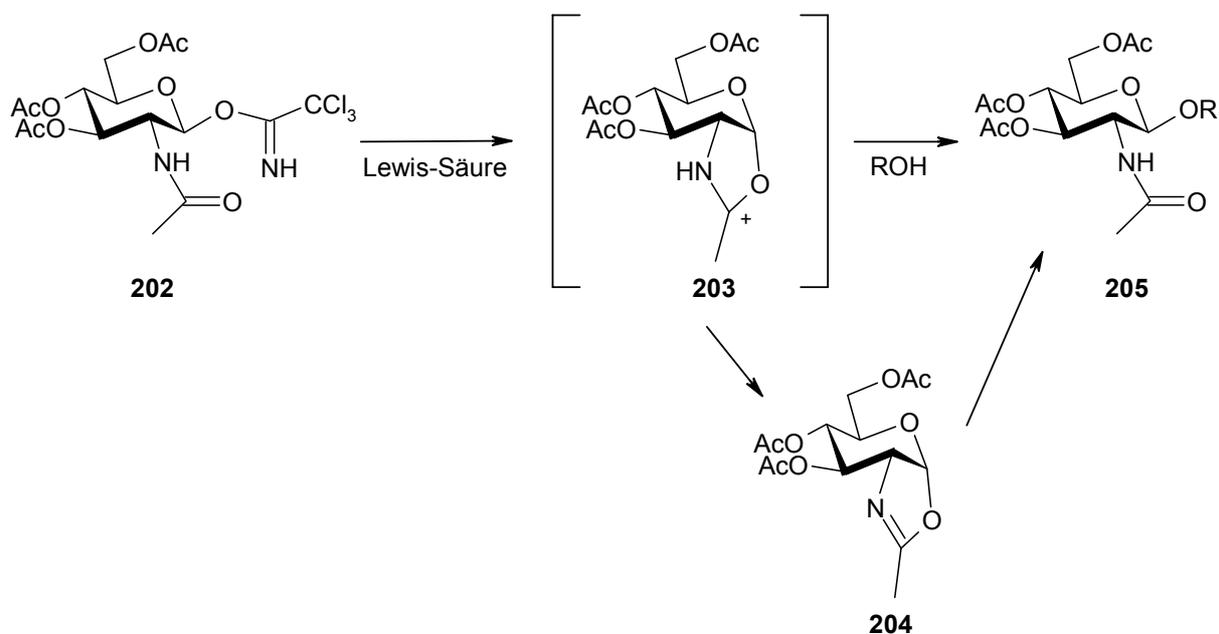
2.6.1.2 Synthese der aktivierten Glycosyl-Donoren

In der Literatur gibt es verschiedene Glycosylierungsverfahren, die aber zum Teil erhebliche Nachteile haben. So sind 1-*O*-acylierte Zucker¹⁶⁶ meist zu unreaktiv und Triarylacetimide¹⁸⁵ sterisch zu anspruchsvoll. Die Koenigs-Knorr-Methode zur Glycosylierung, die Bromogenosen als Glycosyldonoren verwendet, ist eine Schwermetallsalz-katalysierte Kupplungsreaktion.¹⁶⁷ Begrenzend wirkt sich auf diese Methode aus, daß die Halogenosen thermisch instabil sind und infolgedessen häufig nur *in situ* und bei tiefen Temperaturen erzeugt werden können. Zusätzlich werden als Schwermetallkatalysatoren entweder stark toxische Quecksilbersalze oder explosives Silberperchlorat eingesetzt.¹⁶⁸ Vielversprechend sind hingegen Arylthioglycoside,¹⁶⁹ SmI₂-katalysierte glycosidische Verknüpfungen¹⁷⁰ sowie die Trichloracetimidat-Methode. Letztere wurde angewendet, da sie keine der obigen Nachteile aufweist und zusätzlich hohe α -Selektivität besitzt.

Mycothiol weist einen Glucosamin-Baustein auf, der α -glycosidisch mit dem Inositol-Baustein verknüpft ist. Bei der Synthese von α -Glycosiden von 2-Aminozuckern ist es jedoch erforderlich, daß sich an C-2 ein nicht nachbargruppenaktiver Substituent befindet. Demnach ist 2-Acylaminoglucose **202** zur α -Glycosid-Synthese denkbar ungeeignet. So reagieren

2-Acetamido-D-glycosyltrichloracetimidate entweder unter Nachbargruppenbeteiligung zu Oxazolinen **204**^{171, 172, 173} oder, und das bevorzugt, zu β -Glycosiden **205**.¹⁷⁴

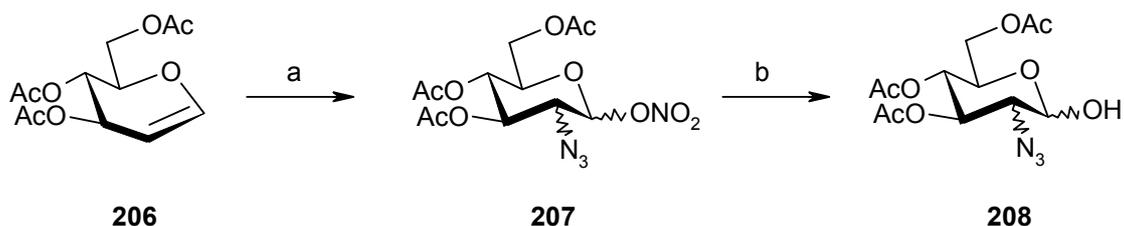
Schema 55: Nachbargruppenwirkung bei der glycosidischen Verknüpfung



Die β -Glycoside entstehen durch nucleophilen Angriff des Glycosyl-Akzeptors an der C-1 Position des Dioxocarbenium-Ion **203** (Acetoxonium-Ion). Dort kommt es zur Inversion des Stereozentrums. Die Oxazoline **204** reagieren ebenfalls zum β -Glycosid, weshalb sie häufig zur Synthese von β -1,2-*trans*-Glycosiden von 2-Aminozuckern eingesetzt wurden. Die Azide haben sich als nicht nachbargruppenaktive Substituenten in vielen Synthesen bewährt.^{175, 171} Vor allem ist die 2-Azidofunktion als Schutzgruppe, aufgrund des geringen sterischen Anspruchs, bei der späteren α -glycosidischen Kupplung gegenüber anderer Amino-Schutzgruppen im Vorteil.

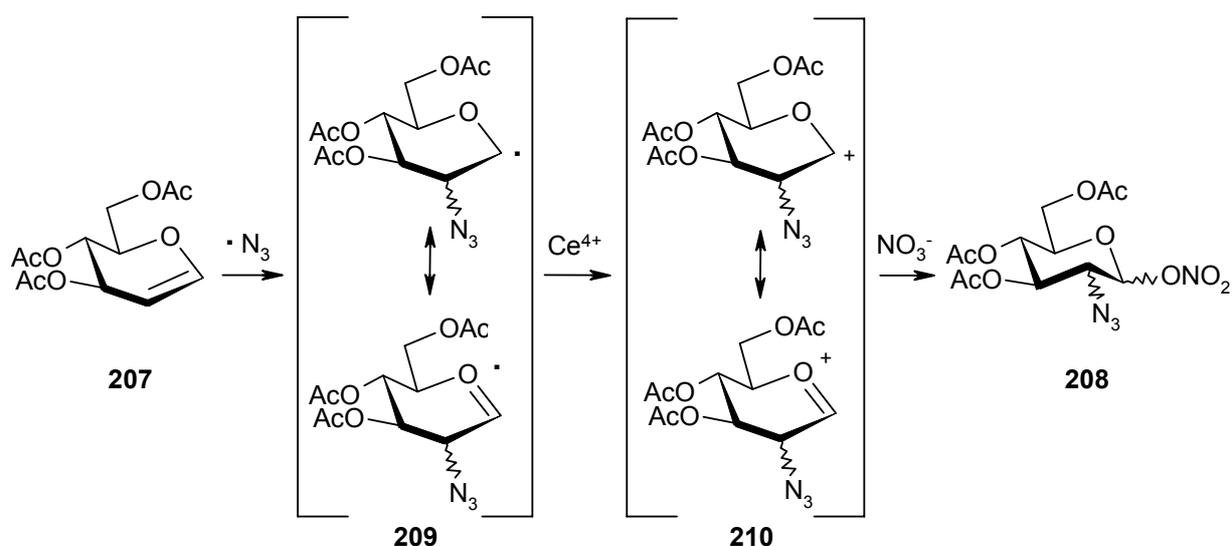
Synthese der Glycosyl-Donoren

Der 2-Azido-2-desoxy-D-Glucose-Baustein wurde in dieser Arbeit über den klassischen Weg der Azidonitratisierung nach Lemieux und Ratcliffe ausgehend von D-Glycal hergestellt.^{176,177} Diese Methode wurde erstmals an α -Azido- β -nitroalkanen aus Olefinen von Trahanovsky et al. im Jahre 1971 durchgeführt.¹⁷⁸

Schema 56: Synthese des Glycosyl-Donors

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) CAN, MeCN, NaN₃. – (b) Dioxan, NaNO₂. 80 °C

Dazu wurde zunächst käufliches, acetylgeschütztes D-Glucal **206** als Glucose-Baustein in Acetonitril mit einem Überschuß an Cer(IV)-ammoniumnitrat und Natriumazid umgesetzt. Bei dieser Reaktion handelt es sich vermutlich um einen Radikalmechanismus, bei der das Cer(IV)-Ion als starkes Oxidationsmittel zunächst das Azidoradikal generiert. Da der Angriff des Azido-Radikals an das Glucal **206** von der re- und si-Seite an der 2-Position erfolgen kann, entsteht bei axialem Angriff das Mannose-Isomer und bei äquatorialem Angriff das Glucose-Isomer. Damit erhält man ein Gemisch aus je drei Diastereomeren 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranosylnitrat und 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-mannopyranosylnitrat **207**. Aufgrund der sterischen Hinderung entsteht das β -manno-Derivat nicht.

Schema 57: Mechanismus der Azidonitratisierung

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) CAN, MeCN, NaN₃

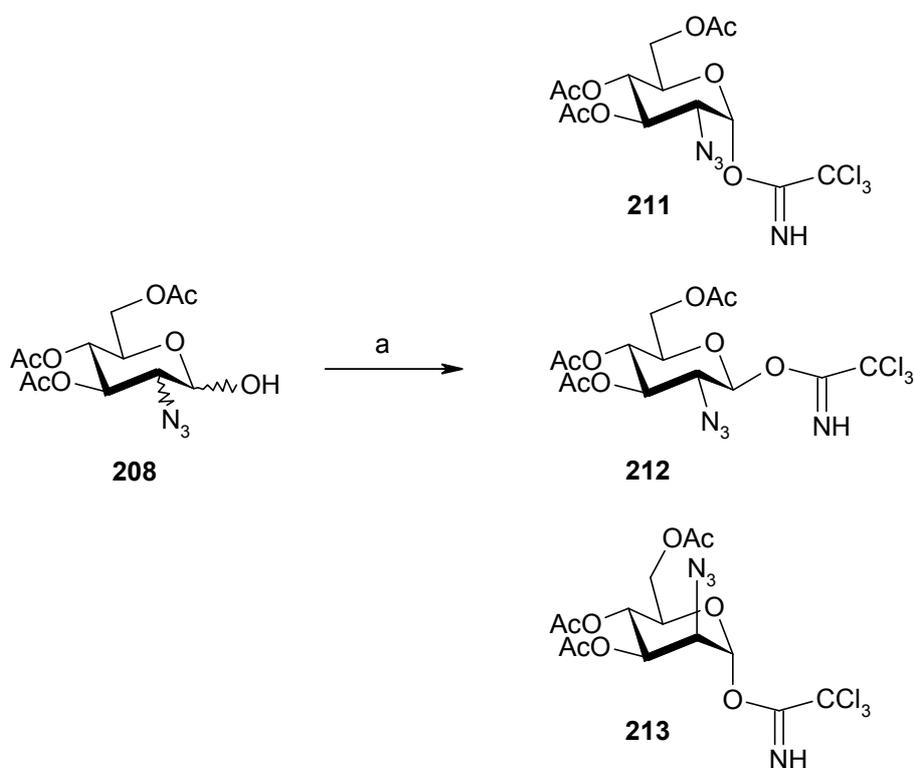
Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung nach einer Vorschrift von R. R. Schmidt entschützt.^{179,180,171, 181} Eine Trennung der Diastereomere ist mit Flash-Säulenchromatographie auf dieser Stufe weder möglich noch sinnvoll, da bei der Nitratabsplaltung wieder eine Epimerisierung erfolgt.

Als einziges Nebenprodukt zeigt das ¹H-NMR-Spektrum bei 8.10 ppm (d, ³J_{NH-H-1} = 10 Hz) eine leichte Verunreinigungen mit 1-Acetamido 3,4,6, tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-gluc(manno)pyranose, einem Produkt aus der Ritter-Amidierung.^{182, 183}

Aktivierung der Glycosyl-Donoren über die Trichloracetimidat-Methode

Für die glycosidische Kupplung nach der Trichloracetimidat-Methode werden zuvor die freien Hydroxygruppen (1-Position) der 2-Azidohexosen **208** in die entsprechenden Trichloracetimidate **211**, **212** und **213** überführt. Dabei wird ausgenutzt, daß sich Ketenimine und Nitrile, die elektronenziehende Substituenten enthalten, sehr leicht durch Alkohol in ihre Imidate überführen lassen.¹⁸⁴

Schema 58: Darstellung der Glycosyl-Trichloracetimidate



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Cl₃CCN, K₂CO₃, CH₂Cl₂.

Das obig erhaltene Alkoholgemisch **208** konnte nach einer von R. R. Schmidt entwickelten Methode durch eine Addition an Trichloracetonitril in die *O*-Glycosyltrichloracetimide überführt werden.^{185,181,179}

Die Reaktion wird mit Kaliumcarbonat als Base unter Feuchtigkeitsausschluß durchgeführt. Das erhaltene Gemisch besteht hauptsächlich aus den drei diastereomeren Trichloracetimidaten **211**, **212** und **213**, welche auf dieser Stufe leicht durch Flash-Säulenchromatographie auf Kieselgel voneinander getrennt werden können.

Die Trichloracetimide sind im Kühlschrank unter Argon-Atmosphäre mehrere Monate lagerstabil.

Tabelle 2: Charakteristische NMR-Daten und Produktverteilung

Verbindung	211	212	213
	<i>α</i> -gluco	<i>β</i> -gluco	<i>α</i> -manno
δ [ppm] NH	8.84	8.81	8.78
δ [ppm] H-1 (d)	6.49 (³ J = 3.6)	5.73 (³ J = 8.1)	6.29 (³ J = 1.0)
δ [ppm] H-2 (dd)	3.78 (³ J = 3.6; 10.2)	n. A.	n. A.
δ [ppm] C-1	94.0	96.4	95.3
δ [ppm] $\underline{\text{C}}\text{Cl}_3$	90.5	90.2	90.4

Die Wahl der Basen bei dieser Synthese hat Einfluß auf die Produktverteilung der Trichloracetimide. Mit Kaliumcarbonat entsteht das *β*-Imidat **212** in doppelter Menge im Verhältnis zum *α*-Imidat **211**. Mit Natriumhydrid wurde fast ausschließlich das *α*-Imidat **211** beobachtet.¹⁷⁹ Da voraussichtlich nur das *β*-Imidat **212** zum *α*-gekuppelten Disaccharid führt, wurde Kaliumcarbonat als Base gewählt. Vermutlich liegt der Grund dafür darin, daß mit der starken Base Natriumhydrid das kinetisch bevorzugte *β*-Imidat schnell (ca. in einer Stunde) zum thermodynamisch stabileren *α*-Imidat anomerisiert.¹⁸⁶ Diese basenkatalysierte Anomerisierung ist mit der schwächeren Base Kaliumcarbonat bedeutend langsamer, so daß das *β*-Imidat selbst nach mehr als sechs Stunden als Hauptprodukt isoliert werden kann.

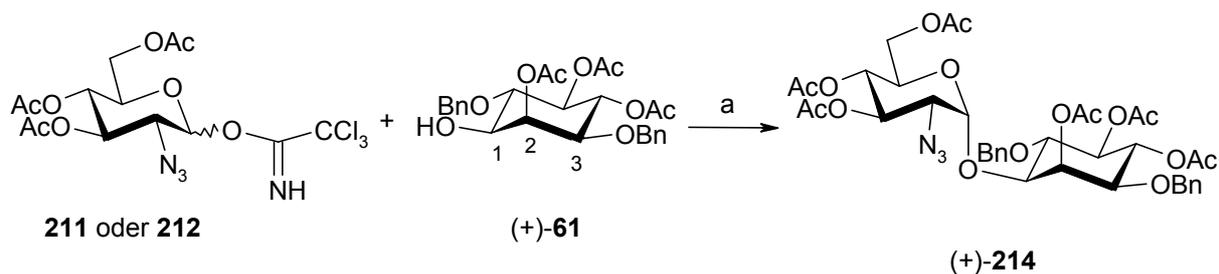
2.6.2 Glycosidische und anschließende peptidische Verknüpfung der Bausteine

Glycosidische Verknüpfung

Zur Glycosylierung nach der Trichloracetimidat-Methode wurden der Glycosyl-Donor **212** und Glycosyl-Akzeptor (+)-**61** in Diethylether unter streng wasserfreien Bedingungen und Zugabe von Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure als Katalysator bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis RT glycosidisch gekuppelt.

Bei der Glycosylierung der 2-Azidoglycosyl-trichloracetimide **211**, **212** und **213** kann die Stereoselektivität durch die Wahl des Lewisäure-Katalysators gesteuert werden. Infolgedessen wurde Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure als Katalysator verwendet. Es ist bekannt, daß dieser eine hohe α -Selektivität besitzt.¹⁷⁹

Die Glycosylierungen nach der Trichloracetimidat-Methode wurde unter absolutem Feuchtigkeitsausschluß durchgeführt, da der Katalysator äußerst empfindlich gegenüber Wasserspuren ist. Eine denkbare Alternative bei dieser Glycosylierungsmethode, nämlich geringfügige Wasserspuren mit einem Überschuß an Katalysator abzufangen, war nicht erfolgreich, da der sehr reaktive Katalysator eine starke Zersetzung des Eduktes bewirkte. Es war somit essentiell, absolut wasserfrei zu arbeiten. Reaktionstemperaturen von $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ lieferten ebenfalls nur eine geringe Ausbeute. Erst eine Temperaturerhöhung brachte letztlich den Durchbruch. So erwies sich eine Reaktionsführung als vorteilhaft, die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ anfängt und sich im Laufe von zwei Stunden auf RT erwärmt. Bei strikter Einhaltung aller Parameter konnte letztlich nach flash-säulenchromatographischer Aufreinigung eine Ausbeute an Disaccharid **214** von 50% erzielt werden. Es ist bekannt, daß acylierte 2-Azido-2-desoxy-D-glucopyranosyl-trichloracetimide selektiver aber gleichzeitig unreaktiver¹⁸⁷ sind als elektronenreiche 2-Azido-2-desoxy-D-glucopyranosyl-trichloracetimide,¹⁸⁸ und deshalb lassen sich größere Ausbeuten mit der Trichloracetimidat-Methode mit **211** bzw. **212** nur schwer erreichen.

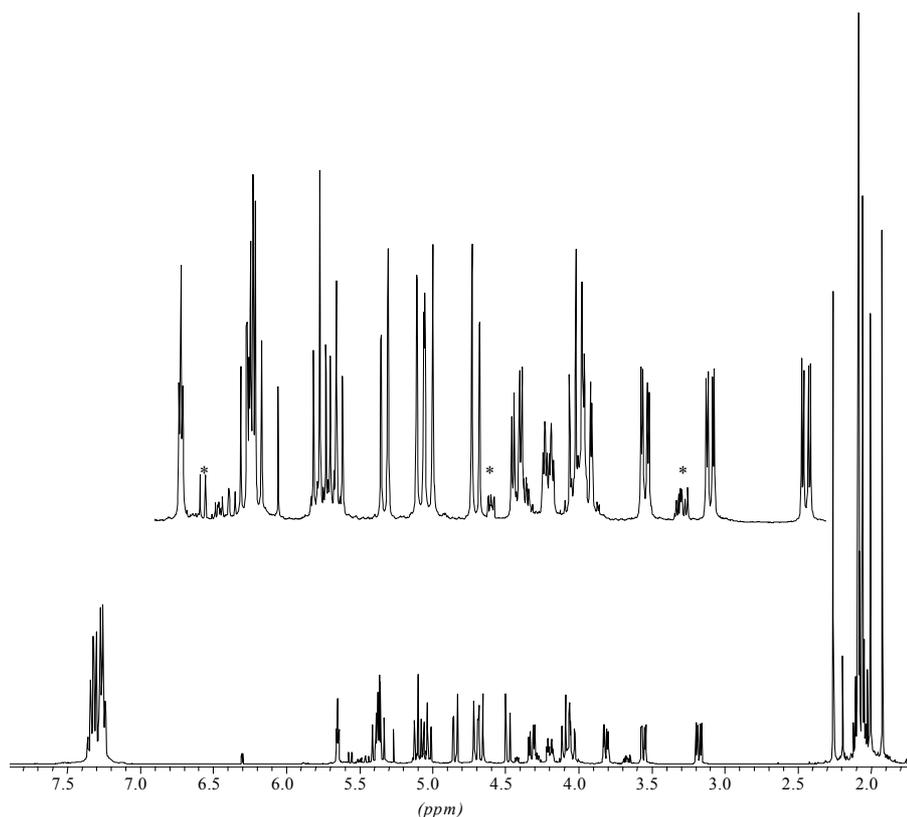
Schema 59: Glycosidische Kupplung des Inositol-Bausteins (+)-**61**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) TMS-TfI, Et₂O, 3 Å Molsiebpulver [50%]

Von mechanistischem Interesse war, daß auch aus dem α -Imidat **211** fast ausschließlich das α -Disaccharid **214** gebildet wurde.¹⁸⁹ Die starke Lewis-Säure führt offensichtlich zur Bildung eines ionischen Übergangszustands, wodurch es zur Bildung der thermodynamisch stabileren α -Glycoside kommt (keine Inversion).^{190, 191}

Die erfolgreiche Kupplung konnte mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren eindeutig belegt werden. Die Auswertung der Signale des Inositol-Ringes erwies sich als problemlos, da sich erwartungsgemäß die Lagen der einzelnen Protonen gegenüber dem Glycosyl-Akzeptor nur geringfügig verschieben.

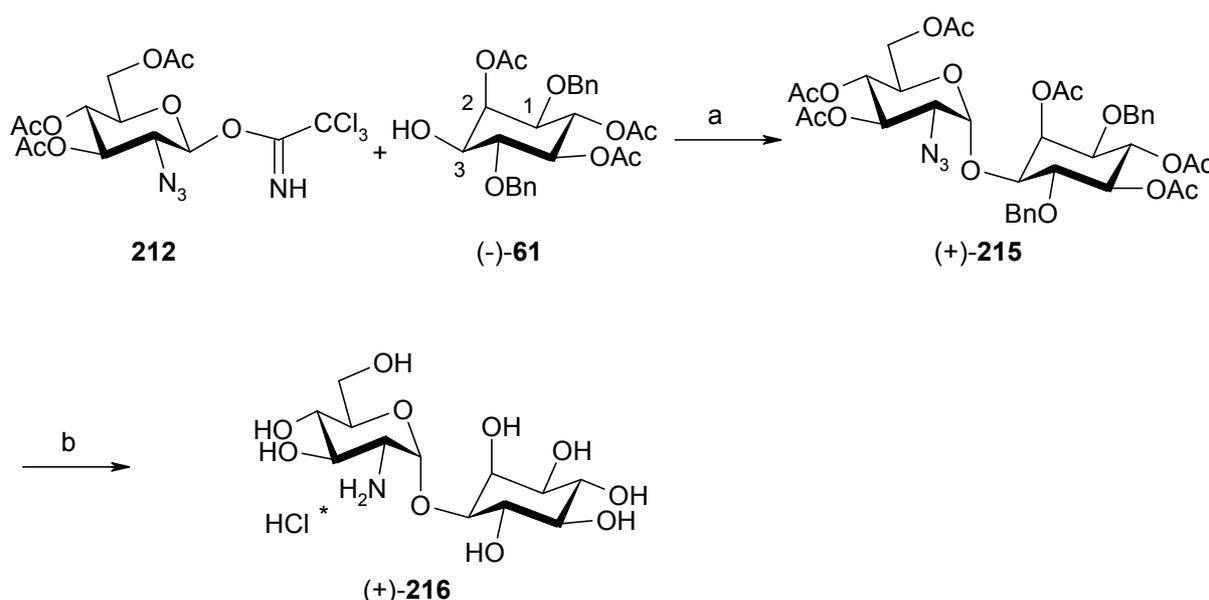
Abbildung 52: ¹H-NMR-Spektrum des α -gluco-konfigurierten Disaccharid **214**



Das Glucose-System ist hingegen sehr aussagekräftig. So lässt sich hier eine eindeutige Aussage darüber geben, um welches Isomer es sich hier handelt. Das Vorliegen des α -gluco-konfigurierten Produkt **214** kann mit Hilfe der Kopplungskonstanten am anomeren H-1 bzw. dem H-2 Proton belegt werden. Bei relativ hohem Feld von 3.18 ppm erscheint das Signal für das H-2-Proton als Dublett vom Dublett. Hier findet sich eine kleine Kopplungskonstante mit einem Wert von $^3J=3.6$ Hz, welche auf eine axial-äquatoriale Kopplung hindeutet.^{192,111} Diese Kopplungskonstante findet man auch beim Dublett des H-1 Signals wieder. Die große 3J -Kopplung von 10.7 Hz bezieht sich auf die diaxiale Kopplung zwischen H-2 und H-3.

Analog wurde das andere Enantiomer (-)-**61** ebenfalls erfolgreich glycosidisch gekuppelt. Das erhaltene Disaccharid (+)-**215** zeigt im Vergleich zu seinem Diastereomer (+)-**214** ein sehr ähnliches Spektrum.

Schema 60: Darstellung des Disaccharides (+)-**216**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) TMS-TfI, Et₂O, 3 Å Molsiebpulver [45%].
- (b) 1. NaOMe, MeOH. - (c) Pd/C, H₂, Wasser [80%].

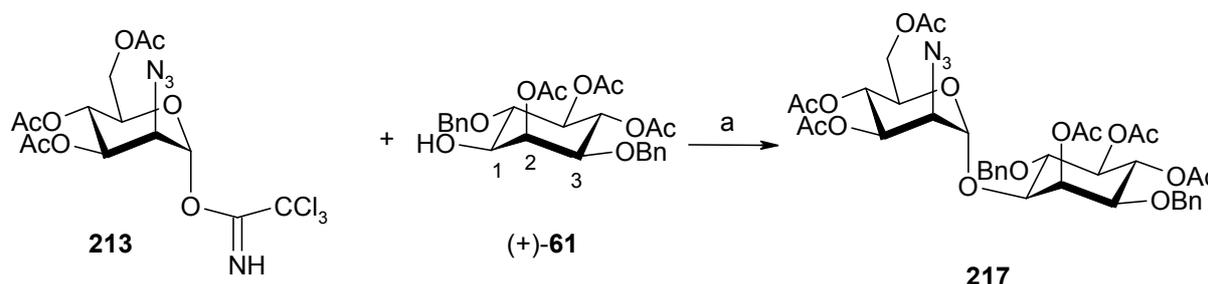
Die Entschützung dieses Bausteins lieferte das freie *O*-(2-Amino-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-(D-*myo*-inositol) Hydrochlorid (+)-**216**.

Da keine Kopplung zwischen den beiden Komponenten sichtbar ist, könnte man bei einer racemischen Umsetzung des Glycosyl-Akzeptors (\pm)-**61** und einer nachfolgenden chromatographischen Trennung beider Diastereomeren keine Zuordnung mit NMR-

Spektroskopie darüber machen, um welches Diastereomer es sich handelt. Nur die hier vollzogene enantiomerenreine Synthese erlaubt die sichere Zuordnung, da die Enantiomere zuvor eindeutig bestimmt waren.

Ebenfalls entsprechend der obigen Glycosylierung wurde das 2-Azido- α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat **213** mit dem Glycosyl-Akzeptor (+)-**61** umgesetzt. Damit konnten alle Isomeren aus der Azidonitratisierung umgesetzt werden. Auch hier konnte das Produkt in einer Ausbeute von 50% isoliert werden.

Schema 61: Darstellung des *manno*-konfigurierten Disaccharid **217**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) TMS-TfI, Et_2O , 3 Å Molsiebpulver [41%].

Am Zucker-System läßt sich wiederum die Struktur eindeutig belegen. Das Vorliegen des α -mannose-konfigurierten Produkt **217** kann an Hand von Kopplungskonstanten am anomeren Proton bzw. dem H-3 Proton belegt werden. Bei 5.15 ppm erscheint das Signal für das H-3-Proton als Dublett vom Dublett. Der Wert für die Kopplung zum H-2 liegt bei $^3J = 3.5$ Hz. Das deutet auf eine axial-äquatoriale Kopplung hin. Dies ist der Beleg dafür, daß es sich um das manno-konfigurierte Produkt handelt. Das Signal für das Proton am anomeren Zentrum liegt bei 4.95 ppm als Dublett mit $^3J \approx 1.0$ Hz. Für vicinale Protonen, die in einem Winkel von 60° zueinander stehen, sollte der Wert für die Kopplungskonstante zwischen 2-5 Hz liegen. Tatsächlich liegt der gefundene Wert unterhalb dieses Bereiches. Das ist allerdings typisch für eine diäquatoriale Anordnung.

Das Entstehen eines β -mannose-konfigurierten Produktes konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

2.6.3 Peptidische Verknüpfung und Fertigstellung der Totalsynthese

Erster Darstellungsversuch zur Synthese von Mycothiol als Dimer (38a)

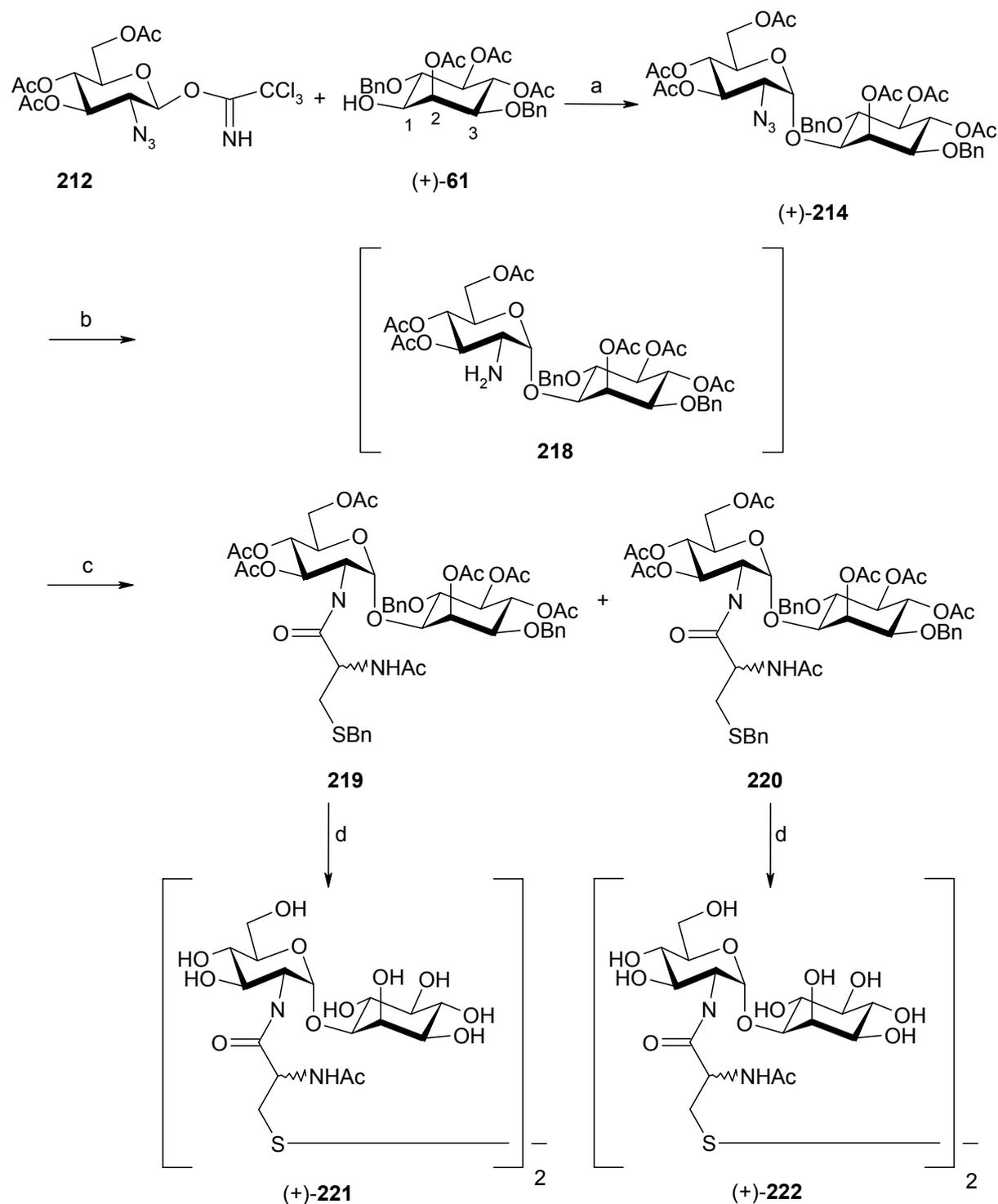
Für die peptidische Verknüpfung mußte zuerst die Azid-Funktion selektiv reduziert werden. Zur Reduktion einer Azido-Funktion in Gegenwart von Benzyl- und Acetyl-Schutzgruppen steht eine große Anzahl an Reagenzien zur Verfügung. Die Reduktion des Azids **215** und **214** zum Amin wurde mit einer ganzen Reihe an verschiedenen Reagenzien erprobt. Eine äußerst milde Reduktionsmethode ist die Reduktion mit Ethandithiol¹⁹³ oder Schwefelwasserstoff.¹⁹⁴ Die Reduktion des Azids **214** mit Ethan-1,2-dithiol in wäßrigen Pyridin/Triethylamin lieferte zwar das gewünschte Amin (DC-Kontrolle), jedoch konnte dies nicht von den gleichzeitig gebildeten Polysulfiden getrennt werden.

Aus diesem Grunde wurde Schwefelwasserstoff in wäßrigen Pyridin als Reduktionsmittel getestet.¹⁹⁵ Bei dieser Methode entsteht elementarer Schwefel, der aber spätestens ab den nächsten Stufen bei einer säulenchromatographischen Aufarbeitung auf Kieselgel abgetrennt werden kann. Bei der Synthese wurde Schwefelwasserstoff 1 Stunde bei 0°C und weitere 2 Stunden bei 50°C durch die Reaktionslösung geleitet. IR- sowie NMR-spektroskopische Untersuchungen belegt die erfolgreiche Reduktion. Auf diese Weise ist schließlich ein mögliches Verfahren zur Generierung der Amino-Gruppe am Disaccharid **214** gefunden. Da aber die Synthese äußerst unpraktikabel ist, wurde letztlich doch nach einer alternativen Reduktion gesucht. Versuche mit Natriumborhydrid (in Anwesenheit von Nickel(II)chlorid und Borsäure) in Ethanol zur Reduktion der Azido-Funktionalität wurden ebenfalls durchgeführt.¹⁹⁶ Diese Methode lieferte das Amin, aber es kam hierbei zu einer Teilentschützung der Acetat-Gruppen.

Eine alternative Reduktion durch Hydrierung erfolgt am einfachsten mit Hilfe von Palladium auf Aktivkohle als Katalysator. Die Benzylschutzgruppen im Molekül **214** schließen jedoch diese Methode aus, da sie dabei mit abgespalten werden. Deshalb wurde der Lindlar-Katalysator verwendet, dessen Selektivität durch die Vergiftung vergrößert wurde und mit dem die Benzyl-Schutzgruppen nicht angegriffen werden.¹⁹⁷ Diese Reduktionsmethode lieferte aber keinen Umsatz. Aus diesem Grunde wurde schließlich doch Palladium auf Aktivkohle als Katalysator verwendet. Um jedoch die Aktivität des Katalysators abzuschwächen, damit die Benzylgruppen unbeschadet die Reaktion überstehen, wurde der Katalysator *in situ* mit dem Puffer Ammoniumformiat desaktiviert. Die Reduktion erfolgte

dabei in wenigen Minuten quantitativ und die Benzylgruppen verblieben auf dem System. Die Reaktion mußte jedoch schnell abgebrochen werden, um eine Hydrogenolyse der Benzyl-Schutzgruppen zu vermeiden. Die setzt meistens nach der Azidreduktion ein.

Schema 62: Erster Darstellungsweg von Mycothiol



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) TMS-TfI, Et₂O, 3 Å Molsiebpulver [50%]. - (b) Pd/C, NH₄HCO₃, H₂, MeOH, EtOAc [99%]. - (c). THF, EDC, HOBT, *N*-Acetyl-*S*-benzyl-*L*-cystein[Ausbeute an beiden Produkten: 50%] - (d) 1. Na, NH₃, THF. 2. O₂, H₂O, H₂O₂ [80%].

Durch genaues „timing“ gelang es, das geschützte Amin **218** zu synthetisieren. Da eine Acetyl-Gruppenwanderung von der 3-Position des Glucosaminteils auf die 2-Position unter Bildung eines Amides zu erwarten war, wurde das Amin ohne weitere Aufreinigung gleich weiter umgesetzt. Das Amin **218** wurde peptidisch mit *N*-Acetyl-*S*-benzyl-*L*-cystein gekuppelt. Dabei wurde ein System aus *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) und Hydroxybenzotriazol (HOBT) zur Peptidverknüpfung verwendet.¹⁹⁸ EDC ist ein wasserlösliches Kupplungsreagenz, das anstelle von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) verwendet wird. Es ist, im Gegensatz zu DCC, leicht durch wäßriges Ausschütteln zu entfernen.¹⁹⁹

Das HOBT wurde verwendet, um eine Racemisierung der Aminosäure zu vermeiden. Die Reaktion führte aber neben freiem Amin zu einem Gemisch aus zwei Produkten, welche nur durch präparativer RP-HPLC (H₂O/MeOH 80:20) voneinander getrennt werden konnten. Beide Produkte wurden in einer Menge von knapp unter 25% Ausbeute ausgehend von **214** isoliert. Die Produkte konnten eindeutig als das gewünschte Kupplungsprodukt identifiziert werden. Hier scheint es sich offensichtlich um das geschützte Mycothiol sowie dem an der Aminosäure epimerisierten Produkt zu handeln (**219** bzw. **220**).

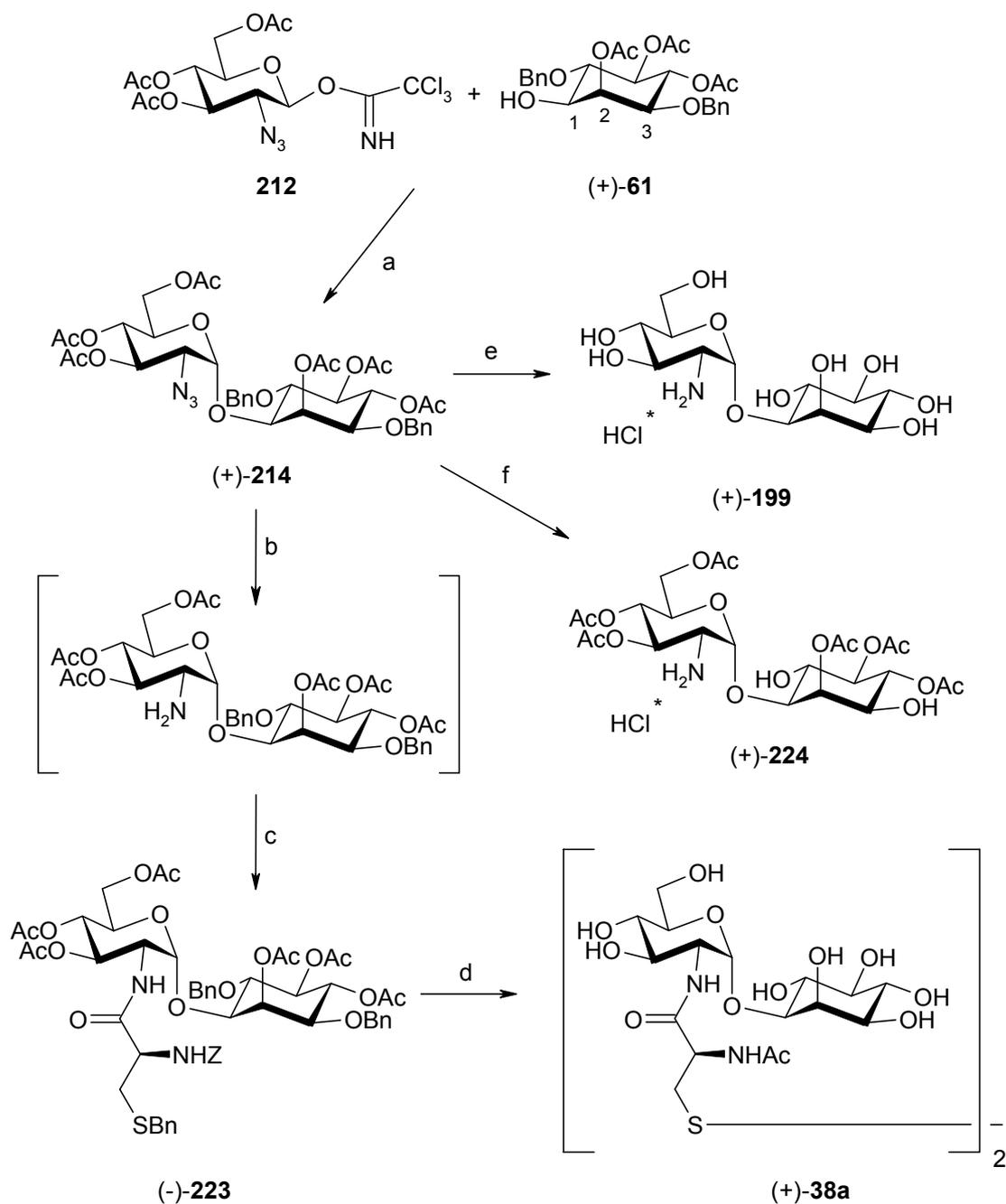
Da die NMR Experimente (COSY und NOESY) keine Zuordnung ermöglichten, und Kristallisationsversuche nur zur Zersetzung der äußerst empfindlichen Produkte führten, wurden beide Produkte mittels Birch-Reduktion freigesetzt. Die NMR-Spektren von beiden freigesetzten Verbindungen **221** und **222** waren sehr ähnlich, so daß wiederum keine Zuordnung der Produkte mittels NMR-Experimente möglich war. Lediglich der Drehwert beider Produkte zeigte eine gewisse Abweichung. Jedoch waren beide Werte innerhalb der Fehlergrenzen des Literaturwertes für Mycothiol. Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse bei der Zuordnung der Produkte und der Racemisierungsproblematik wurde die peptidische Kupplung komplett überarbeitet.

Zweite Syntheseroute: Synthese von Mycothiol als Dimer (38a)

Da die Azidreduktion mit Pd/C nur schwer steuerbar ist und es häufig zur Benzylabspaltung kommt, wurde die Azidreduktion überarbeitet. Eine der mildesten und selektivsten Methoden der Azidoreduktion stellt die Staudinger Reaktion dar. Bei dieser Methode werden die Azide mit Triphenylphosphin reduziert.^{200, 201, 202} Nach dieser klassischen Methode wurde das Azid **214** umgesetzt und anschließend gleich weiter peptidisch gekuppelt. Leider war die

Aufreinigung mit Hilfe von präparativer HPLC sehr unbefriedigend, da dieses Reagenz stark UV aktiv ist und jegliche Detektion des Produktes verhinderte. Das führte zu einer unzureichenden Aufreinigung des Produktes und deshalb wurde diese Methode ebenfalls verworfen.

Schema 63: Darstellung von Mycothiol als Dimer **38a**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) TMS-Tf, Et₂O, 3 Å Molsiebpulver [50%]. - (b) 1. THF, PMe₃, 2. THF, 2 M HCl. - (c) DMF, HATU, Z-N-S-benzyl-L-cystein, DIPA [40% über beide Stufen]. - (b) 1. Na, NH₃, THF. 2. O₂, H₂O, H₂O₂ später Ac₂O. 3. CH₂Cl₂, Ac₂O, DMAP. 4. H₂O, MeOH, NEt₃. - (e) 1. NaOMe, MeOH. 2. (c) Pd/C, H₂, Wasser, 1 N HCl [61%]. - (f) Pd/C, H₂, EtOAc, 1 N HCl [95%]

Eine Variante der Staudingerreduktion zeigt einen eleganten Ausweg aus dieser Problematik auf. Hier wird anstelle von Triphenylphosphin das Trimethylphosphin verwendet.^{203,204} Der Vorteil bei dieser Methode liegt vor allem darin, daß Trimethylphosphin und Trimethylphosphinoxid im Hochvakuum leicht zu entfernen sind. Somit entfällt die Kontamination mit dem Reduktionsmittel und eine weiterführende Aufreinigung ist nicht notwendig.

Ebenfalls wurde die peptidische Kupplung komplett überarbeitet. Um eine Racemisierung der Aminosäure größtenteils zu unterdrücken, wurde ein Aminosäurebaustein verwendet, der keine Acetylgruppe am Stickstoff trägt. Als Schutzgruppe wurde die Benzyl-Carbamat-Schutzgruppe zur Schützung des Cystein-Stickstoffs verwendet, da diese auch bei einer späteren Birch-Reduktion (Entschützung) entfernt werden kann.

Dementsprechend wurde das Rohprodukt aus der Reduktion mit dem Trimethylphosphin peptidisch mit *Z-N-S*-benzyl-L-Cystein gekuppelt. Als Kupplungsreagenz wurde *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat kurz HATU verwendet, da es noch effizienter und wesentlich racemisierungsfreier arbeitet.^{205, 206} Mittels dieser Reaktionsführung erhält man ein epimerisierungsfreies, geschütztes Mycothiol (-)-**223** in einer Ausbeute von 40% (nach präparativer RP-HPLC Aufreinigung (H₂O/Acetonitril 90:10)).

Da die Aminosäure anstelle der *N*-Acetylgruppe noch die *Z*-Schutzgruppe trägt, ist die Entschützung infolgedessen komplizierter. Die Birch-Reduktion bewirkt zunächst die komplette Entschützung von (-)-**223**, welches dann mittels Luftsauerstoff und Wasserstoffperoxid zum Disulfid oxidiert wird. Anschließend wird komplett acetyliert. Damit löst man gleich zwei Probleme auf einmal. Zum einen wird der Stickstoff acetyliert und zum anderen wird es durch die Peracetylierung möglich, sämtliche Salzfrachten aus der Birchreduktion durch einfaches Ausschütteln mit Wasser zu entfernen. Zur letztendlichen Entschützung wurde das peracetylierte Mycothiol mit Methanol und Triethylamin äußerst mild deacetyliert und lieferte das freie Mycothiol (+)-**38a** in einer Ausbeute von 61%.

Eine Alternative zur Darstellung von Mycothiol konnte ebenfalls entwickelt werden. Durch Pd/C-katalysierte Hydrierung von (+)-**214** in EtOAc ließ sich das Azid reduzieren und gleichzeitig die Benzylschutzgruppen abspalten. Leider war das Produkt (+)-**224** stark mit Schutzgruppenwanderungsprodukten, vor allem mit dem 2-Acetamid (Struktur nicht abgebildet), verunreinigt. Die Bildung der unerwünschten Nebenprodukte konnte aber durch

Zugabe von 1 N HCl zur Hydrierung verhindert werden, da dies sofort zur Protonierung des Amins führt, wodurch eine Schutzgruppenwanderung vollkommen unterbunden werden konnte. (+)-**224** ist dem Zwischenprodukt aus der Totalsynthese von Mycothiol-Biman nach Brewley¹⁶² (**195**) sehr ähnlich. Somit ist eine nach Brewley analoge Folgereaktionssequenz möglich und damit ist auch eine formale Totalsynthese gelungen.

Zusammenfassung:

Der hochflexible Zugang zu einer großen Anzahl an Grundkörpern auf Inositolbasis konnte erstmals dazu ausgenutzt werden, komplexere Inositolverbindungen zu synthetisieren. Dabei konnte zum ersten Mal der Naturstoff Mycothiol (+)-**38a** mit einer *de novo* Strategie totalsynthetisch hergestellt werden. Dabei erlaubte diese sehr flexible Route auch analoge Disaccharid-Verbindungen zu synthetisieren, die nun für weitere Umsetzungen bereit stehen.

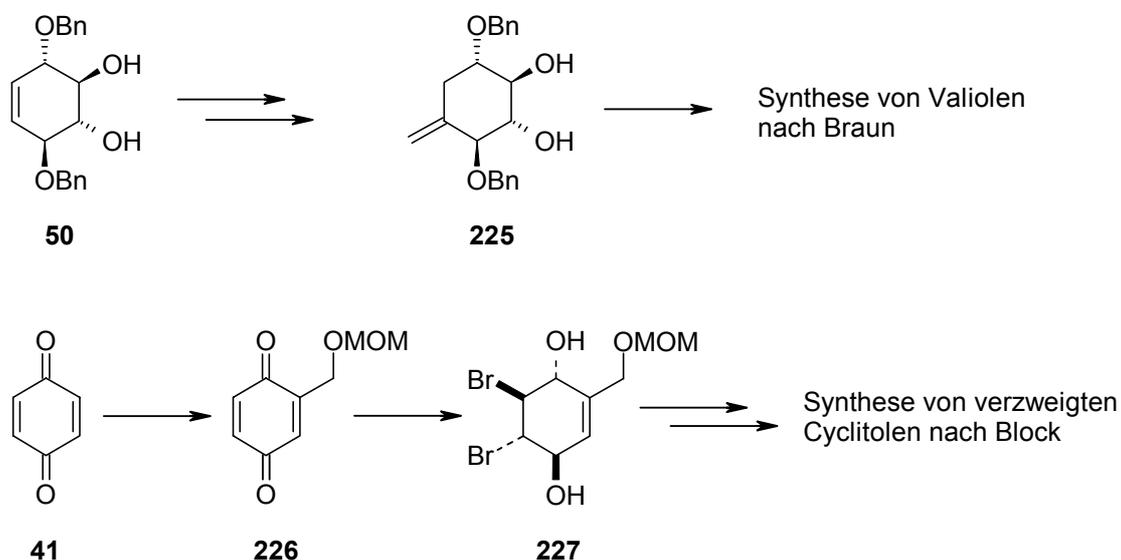
2.7 Synthese von Carbazuckern

Carbazucker sind eine Klasse von Verbindungen, bei denen der Ringsauerstoff im Vergleich zu den natürlichen Zuckern durch ein Kohlenstoffatom ersetzt ist.²⁰⁷ In dieser Arbeit wird der Begriff Carbazucker, wie häufig auch in der Literatur, etwas weiter gefasst und beinhaltet auch ungesättigte Verbindungen wie die *C*₇-Cyclitoleinheiten bei der Acarbose-Biosynthese. Polyhydroxylierte verzweigte und unverzweigte Cyclohexanoide, von denen Inositol,⁹ Konduritol (Strukturen siehe Abbildung 9, S. 20), Streptol,²⁰⁸ Cyclophellitol¹³⁸ und Valienamin²⁰⁹ die wohl wichtigsten Vertreter sind, haben durch ihre strukturellen Ähnlichkeiten zu den korrespondierenden Zuckern biologisch interessante Eigenschaften. Neben ihrer glucosidaseinhibierenden Eigenschaft^{57,210} zeigen diese Verbindungen biologische Wirkungen bei Diabetes^{21,22}, viralen Infektionen²¹¹ und HIV²¹².

Die Synthese von verzweigten Cyclitolen ist im Arbeitskreis von Prof. Altenbach schon auf mehreren Wegen aufgezeigt worden. Braun bediente sich dabei des enantiomerenreinen Bausteins aus der *myo*-Inositolsynthese, indem er den Dibenzylbaustein **50** (siehe Abschnitt 2.3.1.1, ab Seite 56) mittels Hydroborierung, Oxidation und Wittig-Reaktion weiter funktionalisierte.¹²⁹ Diese Route ist aber sehr langwierig und liefert nur unzureichende Ausbeuten.

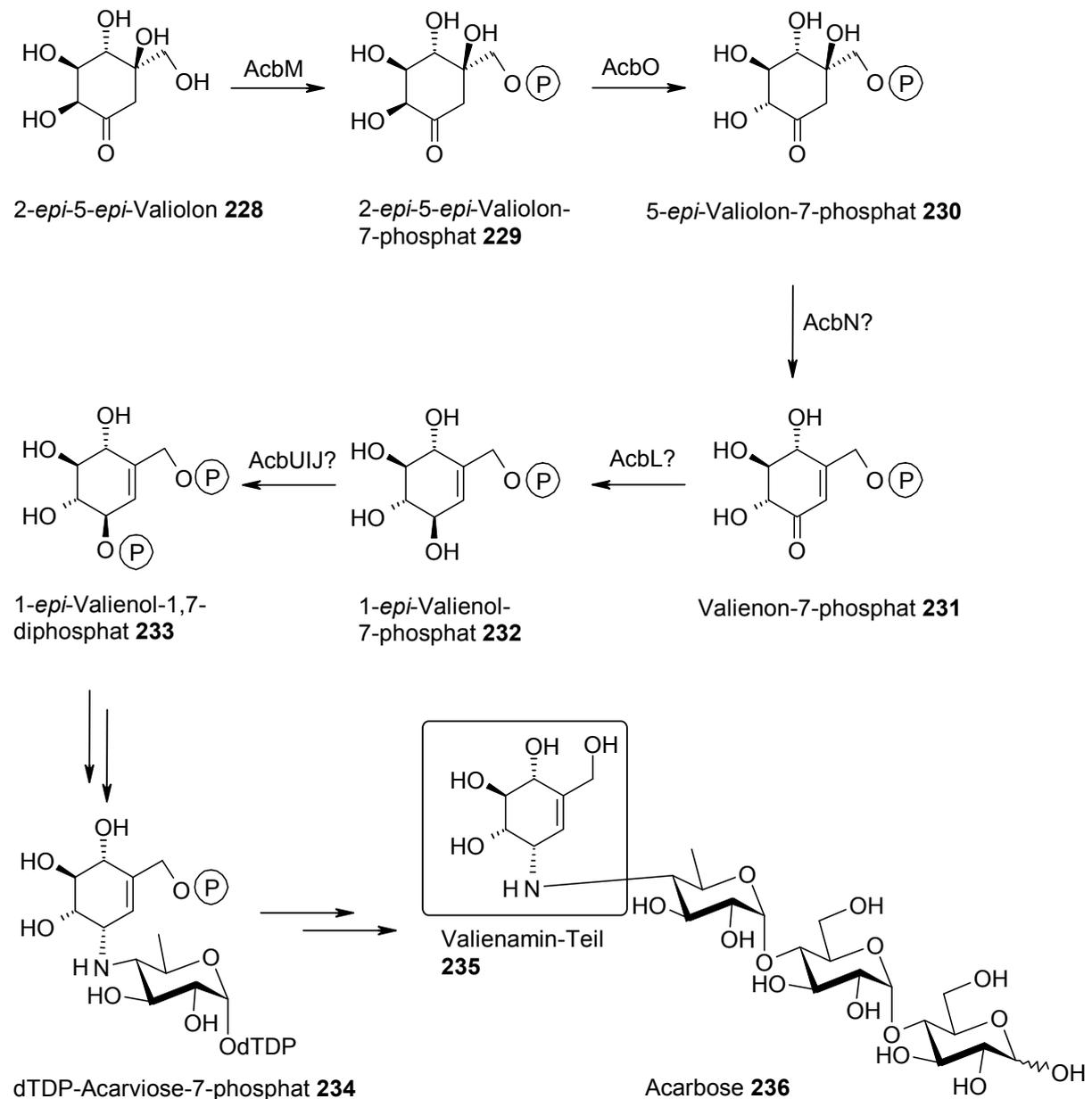
Block⁸⁵ bediente sich der radikalischen Addition von Dimethoxymethan an *p*-Benzochinon **41**. Dieser Weg hat gegenüber dem von Braun eingeschlagenen Weg einen entscheidenden Vorteil. Da er die Seitenkette frühzeitig einführt kann das Dibromid **227** analog der Synthese ausgehend von **42** und **43** weiter umgesetzt werden. Damit erhält er maximale Flexibilität für die Folgereaktionen und kann somit eine Vielzahl an Stereoisomeren synthetisieren. Als Nachteil erweist sich allerdings, daß man nur racemische Produkte erhält und für dieses System bisher noch keine effektive enzymatische Racematspaltung etabliert werden konnte. Zur Zeit wird eine Racematspaltung durch F. Meier im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelt.²¹³

Abbildung 53: Bekannte Synthesewege von verzweigten Cyclitolen des Arbeitskreises Altenbach



2.7.1 Darstellung von Standards zur Aufklärung der Acarbose-Biosynthese

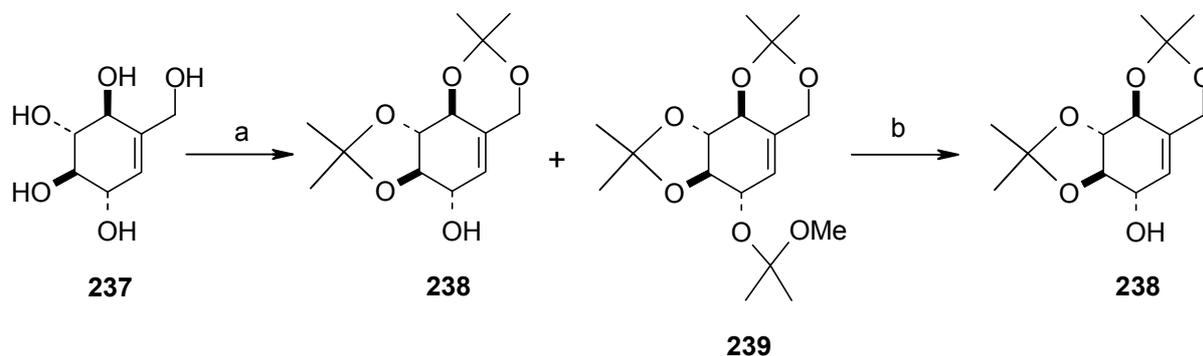
Acarbose **236** (Struktur siehe Schema 64) gehört zu einer ganzen Reihe von mikrobieller Sekundärmetaboliten und wird in einem biotechnologischen Prozess mit Stämmen der Gattung *Actinoplanes* sp SE50/110 gewonnen.²¹⁴ Acarbose wird als α -Glucosidase-Inhibitor (Glucobay[®]) in den meisten westlichen Ländern gegen Diabetes mellitus Typ II (insulinabhängige Form) eingesetzt. Die Struktur des Pseudotetrasaccharid Acarbose beinhaltet ein ungesättigtes Cyclitol, das als Valienamin **235** bezeichnet wird, und eine Trisaccharid-Einheit.

Schema 64: Von Zhang vorgeschlagener Biosyntheseweg der C₇-Einheit von Acarbose²¹⁵

Die Aufklärung der Acarbose-Biosynthese ist dadurch von hohem industriellem Interesse und wird u. a. durch die Chemische Mikrobiologie in Wuppertal betrieben. Die Biosynthese der Trisaccharid-Einheit ist weitestgehend bekannt, wobei hingegen der Aufbau der Valienamin-Einheit überwiegend unerforscht ist. Stratmann et al.²¹⁶ konnte dabei im Jahre 1999 aufzeigen, daß die Biosynthese des Valienamin-Teils (Struktur s. Schema 64) durch Zyklisierung von *sedo*-Heptulose-7-phosphat zum 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon **228**, katalysiert durch das AcbC-Protein, startet. Am Anfang der Kooperation war nur das erste Produkt **228** der Biosynthese bekannt und es waren viele Zwischenstufen denkbar.

Zur weiteren Aufklärung der Biosynthese wurden Standards benötigt, welches nur die organische Synthese liefern konnte. In Anlehnung zu den Arbeiten von Block sollte versucht werden, das zu diesem Zeitpunkt postulierte Biosynthesewenstprodukt, das 1-*epi*-Valienol-1-phosphat **243** als Standard zu synthetisieren. Dabei fand die durch Block⁸⁵ etablierte Route Verwendung. Er konnte 1-*epi*-Valienol **237** in einem Mehrstufenprozess von *p*-Benzochinon in guter Ausbeute darstellen. Da die 1-Position phosphoryliert werden muß, mußten zunächst die restlichen freien Hydroxygruppen geschützt werden. Der Umsatz des Pentols **237** mit Aceton/Dimethoxypropan unter Katalyse von PPTS sollte zuerst das energetisch günstigste 4,7-*O*-Isopropylidengeschützte Produkt liefern. Die Schützung der *trans*-ständigen Hydroxygruppen im Ring sollte unter diesen drastischen Reaktionsbedingungen ebenfalls erfolgen. Analog der Synthese des isopropylidengeschützten Azidotriols,⁸⁷ sollte es auch hier bevorzugt zur Schützung der OH-Gruppen in der 2- und 3-Position kommen.

Schema 65: Darstellung von *O*-2,3-4,7-Diisopropyliden-1-*epi*-valienol **238**

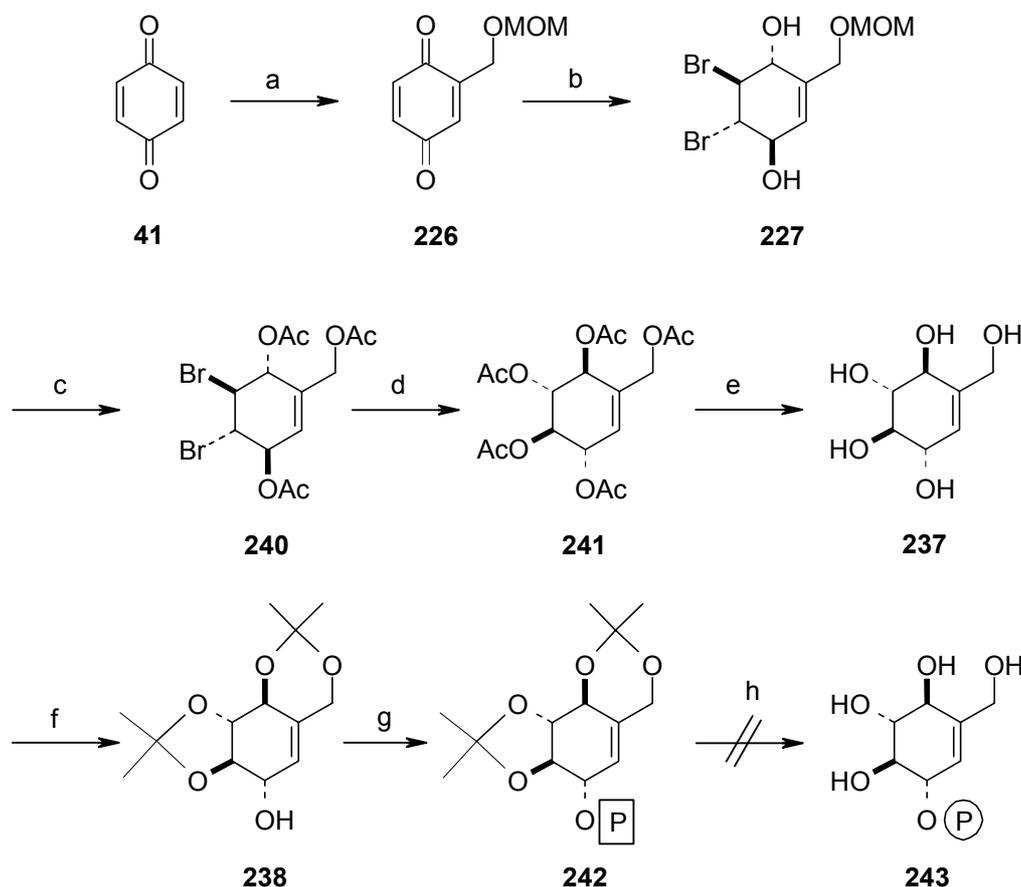


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 2,2-Dimethoxypropan, abs. Aceton, PPTS. – (b) abs. Aceton, PTSA.

NMR-spektroskopische Untersuchungen des Rohprodukts aus der Umsetzung belegten, daß das vorher postulierte diisopropylidengeschützte Produkt **238** tatsächlich die Hauptverbindung ist. Als Nebenprodukt konnte das *O*-2,3-4,7-Diisopropyliden-1-*O*-(2-Methoxy)-isopropyl-1-*epi*-valienol **239** identifiziert werden. Da die 1-*O*-(2-Methoxy)-isopropylgruppe im **239** aber viel instabiler ist als die restlichen Isopropylidenacetale, wurde das komplette Rohprodukt in Aceton gelöst und anschließend mit PTSA versetzt. Unter diesen milden Bedingungen kommt es zur Überführung von **239** in das **238** und man erhält das gewünschte Produkt in nahezu quantitativer Ausbeute.

Die Phosphorylierung erfolgte ebenfalls mit dem bereits bei der Synthese der Inositolphosphate verwendeten Phosphorylierungsmittel **62**.

Schema **66**: Versuch zur Darstellung von 1-*epi*-Valienol-1-Phosphat **243**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Dimethoxymethan, FeSO₄, H₂O₂. - (b) 1. CH₂Cl₂, Br₂. 2. NaBH₄, Et₂O, H₂O, Phosphatpuffer pH = 7, MTB-Ether. - (c) 1. MeOH, konz. HCl, 50 °C. 2. Ac₂O/Pyridin. - (d) AgOAc, AcOH abs., Ac₂O, 12 h 125 °C. - (e) NaOMe, MeOH. - (f) 1. 2,2-Dimethoxypropan, abs. Aceton, PPTS. 2. abs. Aceton, PTSA. - (g) 1. 3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphoshepan, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ dann *m*-CPBA. - (h) TMSBr, CH₂Cl₂ dann Dowex 50 (H⁺-Form).

Die Phosphorylierung war zunächst erfolglos, da es gleichzeitig unter diesen Bedingungen zu einer Teilentschützung kam. Durch sorgsame Wahl der Reaktionsbedingungen und sehr kurze Reaktionszeit (2 h) konnte letztlich das geschützte 1-Phosphat **242** in sehr guter Ausbeute isoliert werden. Die Versuche zur Entschützung von **242** verliefen hingegen äußerst negativ. Erste Entschützungsversuche mittels Birch-Reduktion (Na in flüssigem Ammoniak) führte nur zur Zersetzung. Dies scheint daran zu liegen, daß das geschützte Allylphosphat **242** sich während der Folgereaktion sehr schnell zersetzt. Auch mit Trimethylsilylbromid in Dichlormethan konnte in keinem Fall das entschützte Produkt **243** isoliert werden.

In Kooperation mit Zhang²¹⁵ konnte schließlich das AcbM-katalysierte *2-epi-5-epi*-Valiolon-7-phosphat **229** als Nachfolgeprodukt der Biosynthese isoliert und identifiziert werden. Da das erste Intermediat in der Synthese des Valienamin-Bausteins das an der 7-Position phosphorylierte *2-epi-5-epi*-Valiolon **229** ist, wurde die Synthese von Standardverbindungen, die keine Phosphatgruppe an der Hydroxymethylseitenkette (C-7) tragen, nicht weiter verfolgt. Da *1-epi*-Valienol-1-phosphat **243** wahrscheinlich nicht an der Acarbose-Biosynthese beteiligt ist, war die Synthese nun nicht mehr vom Interesse. Anknüpfend an dieses Ergebnis ist als Standard das *1-epi*-Valienol-1,7-diphosphat **233** ins Blickfeld gerückt, welches aber bisher noch nicht auf dem *de novo* Ansatz, ausgehend von **237**, dargestellt werden konnte.

Zhang konnte kürzlich das epimerisierte *5-epi*-Valiolon-7-phosphat **230** als Nachfolgeprodukt der AcbM Reaktion schließlich isolieren.

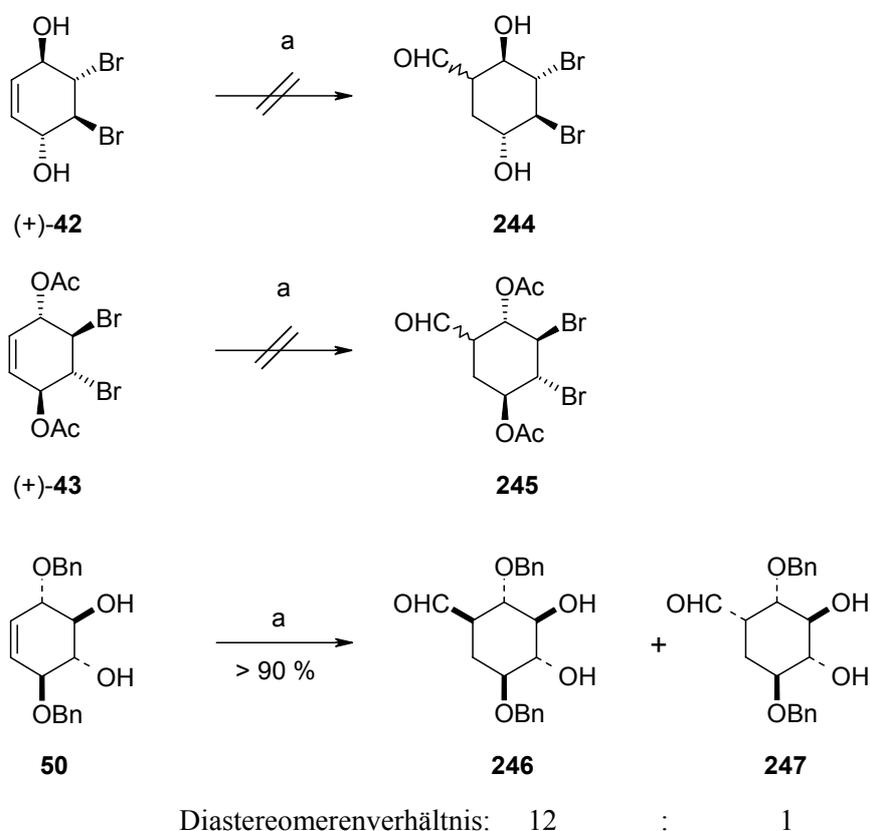
Obwohl das *1-epi*-Valienol **237** in der Biosynthese wahrscheinlich nicht auftritt, da schon frühzeitig eine Phosphorylierung an der 7-OH-Gruppe erfolgt, wurde **237** mit den kompletten Enzymen des Gen-Clusters der Acarbose-Biosynthese umgesetzt. Zusätzlich wurde ATP zum Reaktionsansatz zugegeben. Interessanterweise entstand dabei ebenfalls das an der 7-Position phosphorylierte Produkt, das *1-epi*-Valienol 7-phosphat **232**.

Infolge der Untersuchung an dem Biosyntheseweg konnten im Rahmen der Kooperation drei weitere Stufen isoliert und identifiziert werden.

2.7.2 Erarbeitung eines neuen Darstellungsweges zu enantiomerenreinen Carbazucker

Darstellung von Carbazuckern mittels Hydroformylierung: Die Hydroformylierung ist ein im technischen Maßstab durchgeführte Methode, um vor allem Doppelbindungen von Fettsäuren durch die Einführung einer Aldehydfunktion zu funktionalisieren.²¹⁷ Erst in den letzten Jahren wurden Arbeiten veröffentlicht, die als Substrat nicht nur natürliche Fette, sondern auch Cyclohexen verwendeten.^{218,219} Dabei wurden ebenfalls quantitative Umsetzungen beobachtet. Aufgrund dieser Tatsache stellte sich die Frage, ob man die Hydroformylierung auch erstmals zum Aufbau von Pseudozuckern (polyhydroxylierte Cyclohexenderivate) heranziehen kann. Ausgehend von geeignet geschützten polyhydroxylierten Cyclohexenderivaten, wie sie die Gruppe der Konduritole (Nomenklatur der Konduritole siehe Abbildung 9, S. 20) bieten, sollte so direkt verzweigte Systeme, die zu Carbazucker führen, zugänglich gemacht werden können.

Schema 67: Darstellung von Carbazuckern mittels Hydroformylierung



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) MTBE, Rh(acac)(CO)₂, Druckreaktor (20 bar Synthesegas), 95 °C, 16 h.

Das Potential der Hydroformylierung an Konduritolderivaten konnte in Kooperation mit D. Obst (Fachbereich Prof. Dr. A. Behr Chemietechnik der Universität Dortmund) erstmals untersucht werden. Dabei wurden verschiedene Konduritolderivate in MTB-Ether gelöst und im Druckreaktor bei 95 °C 16 Stunden umgesetzt. Als Katalysator wurde Rhodium-Acetylacetonato-Dicarbonyl [Rh(acac)(CO)₂] zugegeben.

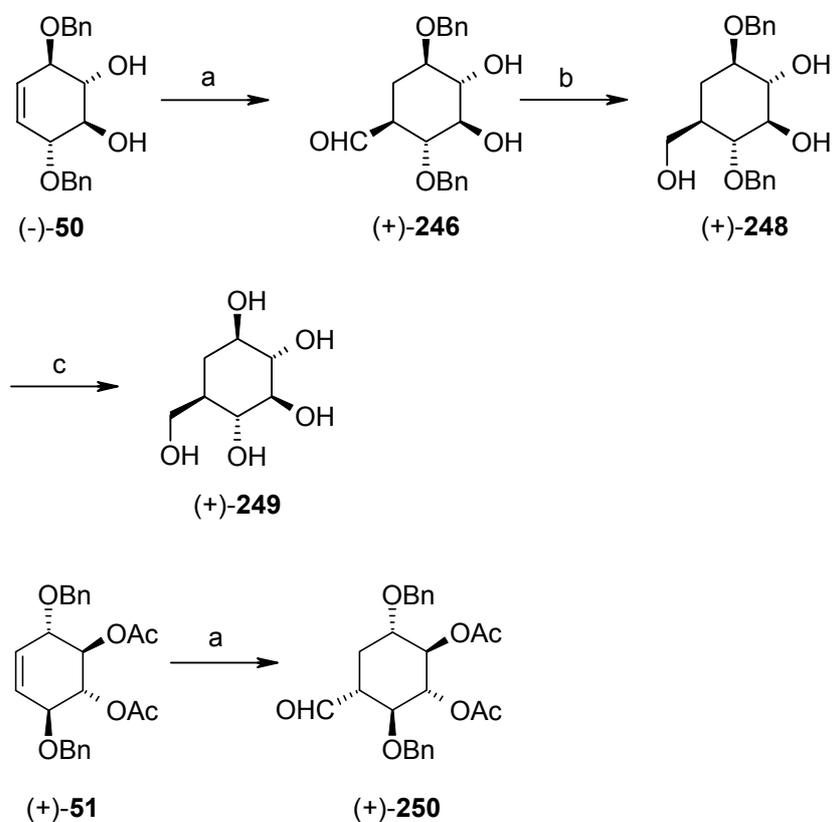
Leider war bei den bromierten Verbindungen kein Umsatz zu beobachten. Beim Dibenzylkonduritol B **50** kam es jedoch zu einer nahezu quantitativen Umsetzung und man erhielt zwei Produkte in einem Verhältnis von 12:1.

Das ¹³C-NMR der Umsetzung des **50** zeigt klar die quantitative Umsetzung des Eduktes. Neben der Desymmetrisierung im Vergleich zum Edukt läßt sich die erfolgreiche Generierung der Methylengruppe bei 26.13 bzw. 27.25 ppm, sowie der neuen CH-Gruppe im Ring bei 50.33 bzw. 44.64 ppm zeigen. Ebenso kann das Aldehydproton im ¹H-NMR-Spektrum sowie die C=O-Valenzschwingung im IR eindeutig nachgewiesen werden.

Da das Edukt problemlos im Multigrammmaßstab in enantiomerenreiner Form erhältlich ist, sollte diese Reaktion leicht auf enantiomerenreine Edukte übertragbar sein. Aus diesem Grunde wurde in Kooperation mit Frank Meier²¹³ die komplette Route in enantiomerenreiner Form weiterentwickelt. Bei Verwendung von umkristallisierten, enantiomerenreinem (-)-**50** traten zunächst unerwartet starke Probleme auf. Alle Hydroformylierungsversuche schlugen zunächst fehl und lieferten neben dem nicht umgesetzten Edukt stark zersetzte Produkte. Während racemisches **50** leicht aus Cyclohexan/Ethylacetat umkristallisierbar ist und in sehr hoher Reinheit vorliegt, kann wie bereits in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben ist, enantiomerenreines **50** nur unbefriedigend umkristallisiert werden und man erhält es lediglich in einer Reinheit von 80%. Durch Aufreinigung des Eduktes mittels Flash-Säulenchromatographie erhält man sauberes enantiomerenreines **50**, das problemlos hydroformyliert werden konnte. Damit scheinen hier, wie bereits die Vorversuche an **42** und **43** zeigten, die im Rohprodukt noch vorhandenen bromierten Neben- bzw. Zwischenprodukte den Katalysator zu vergiften. Das Rohprodukt der Hydroformylierung (+)-**246** wurde direkt weiter zum Trialkohol (+)-**248** reduziert. Auf dieser Stufe wurde das gewünschte Produkt mittels Flash-Säulenchromatographie von seinem Nebenprodukt, dem reduzierten **247**, abgetrennt. Das Nebenprodukt konnte aber dabei nicht rein isoliert werden.

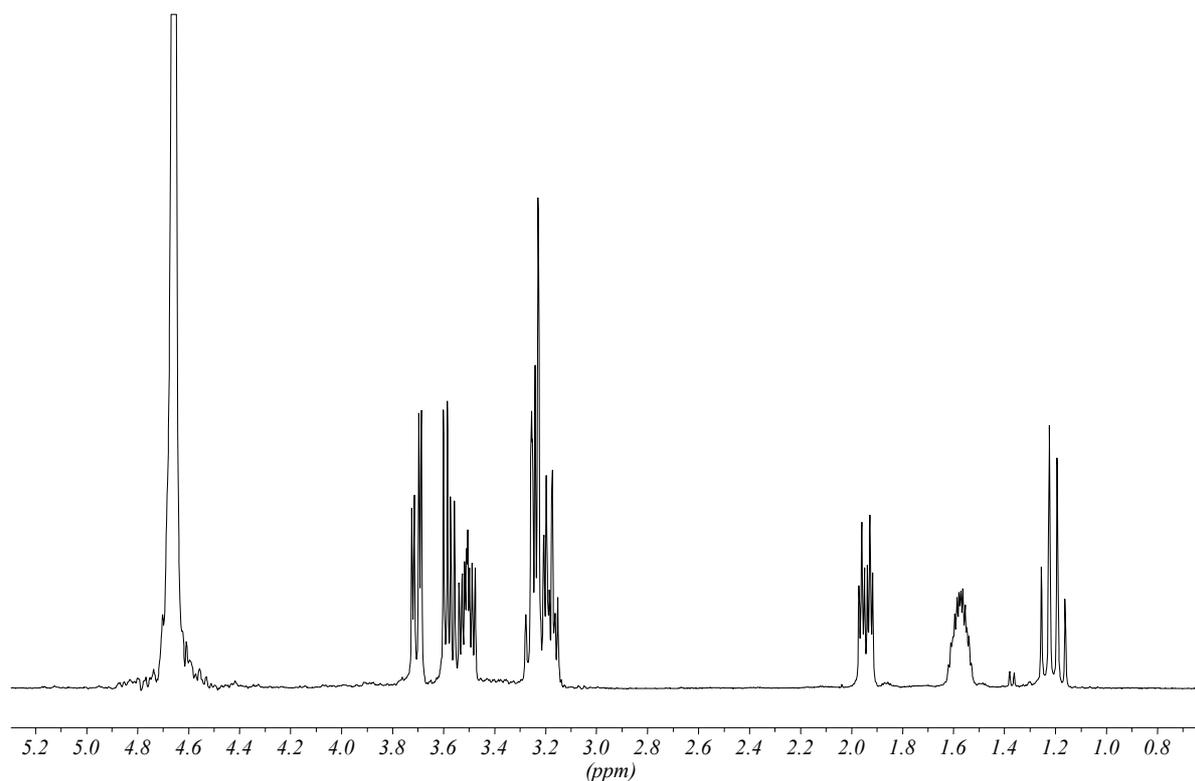
Das acetatgeschützte Dibenzylkonduritol B (+)-**51** ließ sich ebenfalls problemlos hydroformylieren und lieferte in über 50%iger Ausbeute das β -L-Carbaglucosederivat (+)-**250**.

Schema 68: Darstellung von β -D-carbaglucose (+)-**249** sowie von geschütztem β -L-carbaglucose-6-aldehyd (+)-**250**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) MTBE, Rh(acac)(CO)₂, Druckreaktor (20 bar Synthesegas), 95 °C, 16 h. - (b) NaBH₄, Et₂O, H₂O [insgesamt 50% über beide Stufen]. - (c) H₂, Pd/C, EtOH, H₂O [99%].

Letztlich wurde der Trialkohol (+)-**248** schließlich hydrogenolytisch entschützt und lieferte in sehr hoher Reinheit und ohne weitere Ausfreinigung die β -D-Carbaglucose (+)-**249** in quantitativer Ausbeute. Die Auswertung des NMR's und der Vergleich mit literaturbekannten Daten²²⁰ bestätigt die erfolgreiche Darstellung dieses Carbazuckers. Der Drehwert lag mit $[\alpha]_D^{20} = +13.9^\circ$ ($c = 1.3$, H₂O) im Bereich von dem durch Ogawa et al. angegebenen Wert ($[\alpha]_D^{20} = +13.0^\circ$ ($c = 2.1$, H₂O)).²²¹

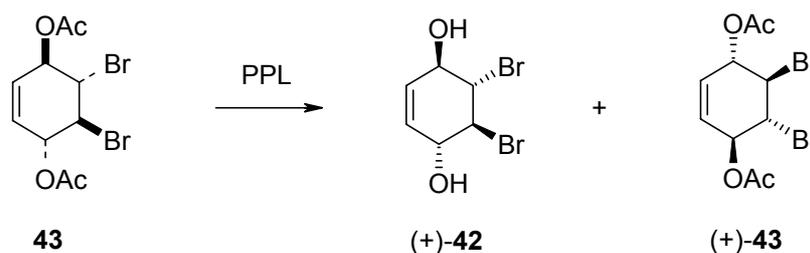
Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum von β -D-carbaglucose (+)-**249****Zusammenfassung und Ausblick:**

Damit ist erstmals eine hocheffiziente Synthese von enantiomerenreinen Carbazuckern, ausgehend von *p*-Benzochinon, möglich. Die Möglichkeit, derartige Substanzen z. B. zu Vergleichszwecken, darstellen zu können, ist ein lohnendes Ziel und wird durch Frank Meier in Kooperation mit dem Fachbereich Chemietechnik der Universität Dortmund weiterverfolgt.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten ausgehend von den zentralen enantiomerenreinen Schlüsselbausteinen (+)-**42** und (+)-**43**, welche leicht in wenigen Stufen aus *p*-Benzochinon darstellbar sind, zahlreiche polyhydroxylierte Sechsringverbindungen synthetisiert werden. Das Hauptaugenmerk galt zuerst der Synthese von *myo*-Inositolpolyphosphaten. Zudem konnten von diesen „building blocks“ ausgehend Syntheserouten etabliert werden, die komplexere *myo*-Inositolderivate wie z. B. Mycothiol und Amino-/Azido-*myo*-inositole lieferten. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde ein umfassendes Konzept zur Darstellung von Inositolstereoisomeren entwickelt. Bei allen Synthesen wurden die Routen soweit optimiert, daß sie hochpraktikabel und im großem Maßstab nachvollziehbar sind.

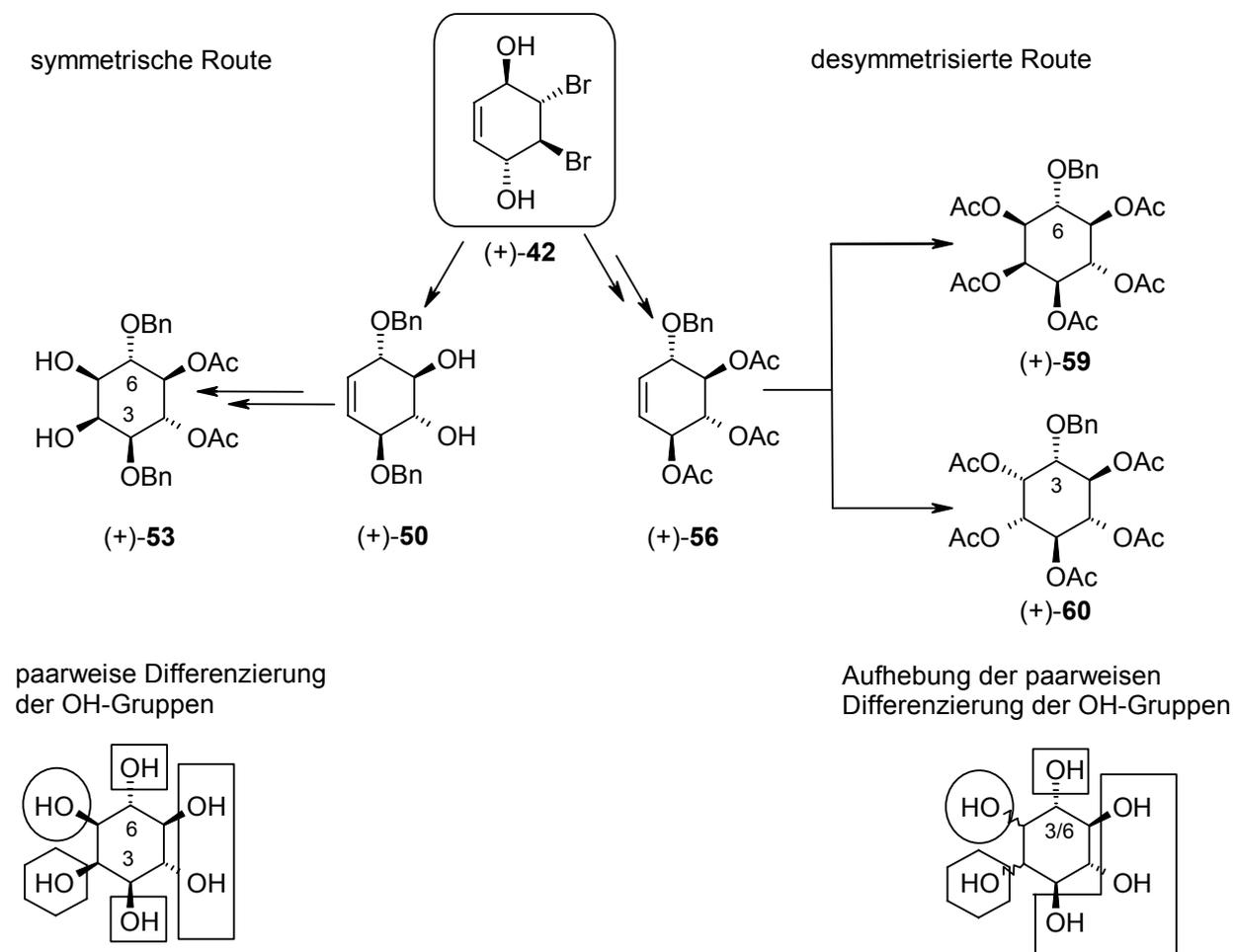
Schema 69: Darstellung der enantiomerenreinen Bausteine („building block“)



Synthese der *myo*-Inositole: Ausgehend von *p*-Benzochinon konnte das bereits im Arbeitskreis erarbeitete Konzept der Synthese der *myo*-Inositolpolyphosphate optimiert und weiter ausgebaut werden. Generell wurden alle Synthesen über zwei grundsätzlich verschiedenen Routen umgesetzt. Über den klassischen symmetrischen Weg, der über *anti*-Benzoldioxid und 1,4-Dibenzylkonduritol B verläuft,^{87,86} konnten zahlreiche weitere *myo*-Inositolpolyphosphate dargestellt werden. In Ergänzung zu diesem Weg wurde ein neues Synthesekonzept über unsymmetrische Zwischenstufen in enantiomerenreiner Form etabliert. Die konsequente Verwendung beider enantiomerer Bausteine und die Etablierung des unsymmetrischen neben dem symmetrischen Zugang lieferte eine große Anzahl an *myo*-Inositolvorstufen. Durch die Wahl der entsprechend vorfunktionalisierten Ausgangsmoleküle und gegebenenfalls durch Differenzierung von verbleibenden Hydroxylgruppen ist eine schnelle und gezielte Synthese von *myo*-Inositolphosphaten möglich.

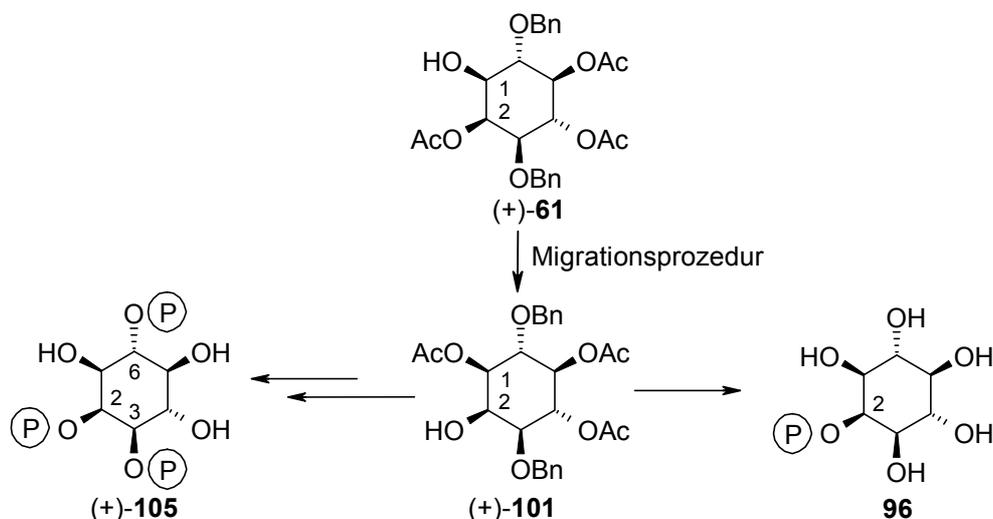
Schema 70: Konzepte zur Darstellung der *myo*-Inositolpolyphosphate

(nur ein Enantiomer abgebildet)



Exemplarisch für die Synthese der *myo*-Inositolphosphate wird hier kurz auf die Synthese von *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (+)-105 (symmetrische Route) und *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-24 (desymmetrisierte Route) eingegangen.

Symmetrische Route: Das Potential des Konzepts kann vor allem bei der Synthese von *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (+)-105 demonstriert werden. Neben den klassischen Funktionalisierungsmethoden konnten neue Methoden zur Darstellung verschiedener Schutzgruppenmuster umgesetzt werden. Bei der Synthese von *myo*-Ins(2,3,6)P₃ wurde erstmals eine gezielte Schutzgruppenwanderung forciert, wodurch *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (+)-105 in einer äußerst kurzen Syntheseroute erstmals vollsynthetisch erhalten werden konnte. Nebenbei konnte mit diesem diesen Konzeptes *myo*-Ins(2)P **96** synthetisiert werden.

Schema 71: Einbindung einer gezielten Schutzgruppenmigration in die Synthesesequenz

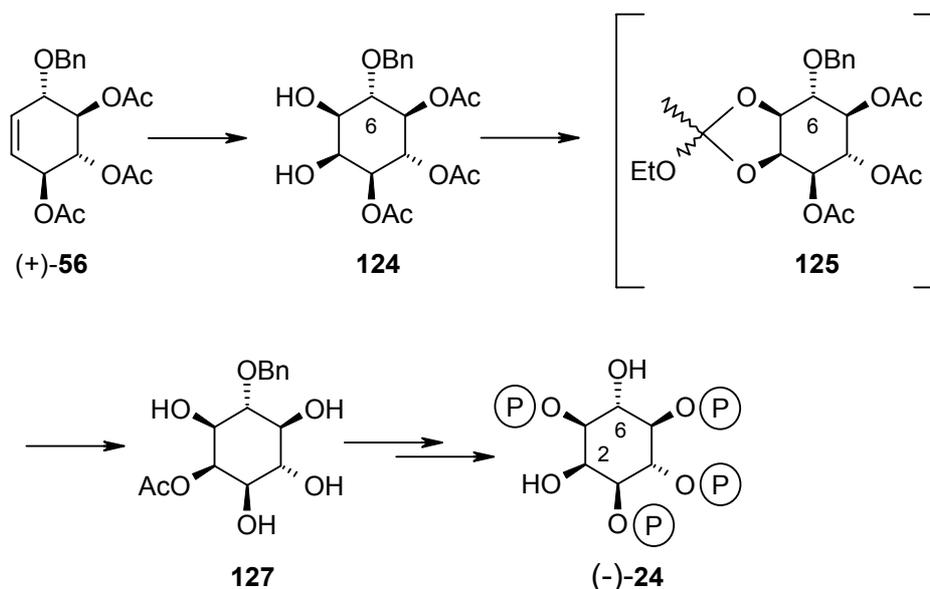
Das symmetrische Konzept konnte somit durch eine effektive Schutzgruppen-Migrationsprozedur erfolgreich erweitert werden.

Desymmetrisierte Route: Im Rahmen dieser Arbeit konnte die unsymmetrische Route zur synthetischen Reife, insbesondere auch für enantiomerenreine Verbindungen gebracht werden. Im Vergleich zur unsymmetrischen Azido-Route kam es bei der Epoxidöffnung verstärkt zu Nebenreaktionskanälen und die Produkte ließen sich durch das sehr schlechte Kristallisationsverhalten der Benzyl-Konduritol-Derivate nicht durch Umkristallisation aufreinigen. Trotz dieser anfänglichen Schwierigkeiten konnte diese Route, vor allem in enantiomerenreiner Form, erfolgreich umgesetzt werden. Hier zeigte sich, daß das know-how aus den anderen Synthesewegen, in diesem Fall der Konduritol E-Synthese (siehe stereoisomere Inositate) sich auf andere Syntheserouten übertragen läßt. Durch Umgehung der Epoxid-Generierung-Öffnungssequenz durch Anwendung der „Acetoxoniumionen-chemie“ konnte letztlich Konduritol B **56** in sehr guter Ausbeute und in großer Menge erhalten werden. Bei der anschließenden *cis*-Dihydroxylierung entstehen zwei Diastereomere, die im darauffolgenden Syntheseschritt voneinander getrennt wurden. Diese Route lieferte alle enantiomerenreine Pentakisphosphate **29** bzw. **31** in sehr guten Ausbeuten.

Besonders hervorzuheben ist dabei die Synthese von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24**. Die Verwendung des Benzyltriacetat **56** machte eine grundlegende Umstellung der Synthesestrategie erforderlich, da hier Acetate gleichzeitig abgespalten und angebracht werden mußten. Bei diesem Konzept wurde erstmals der *in situ* gebildete Orthoester der Monofunktionalisierung **125** mit in die Syntheseüberlegung einbezogen. Letztendlich konnte

in einer Stufe **127** aus **124** erhalten werden. Dies führte bei einer massiven Verkürzung der Syntheseroute zum *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24**, einem teuren (100 µg kosten 980,- EUR, Sigma-Aldrich) und biologisch hochaktiven *myo*-Inositolphosphat.

Schema 72: Synthese von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24**



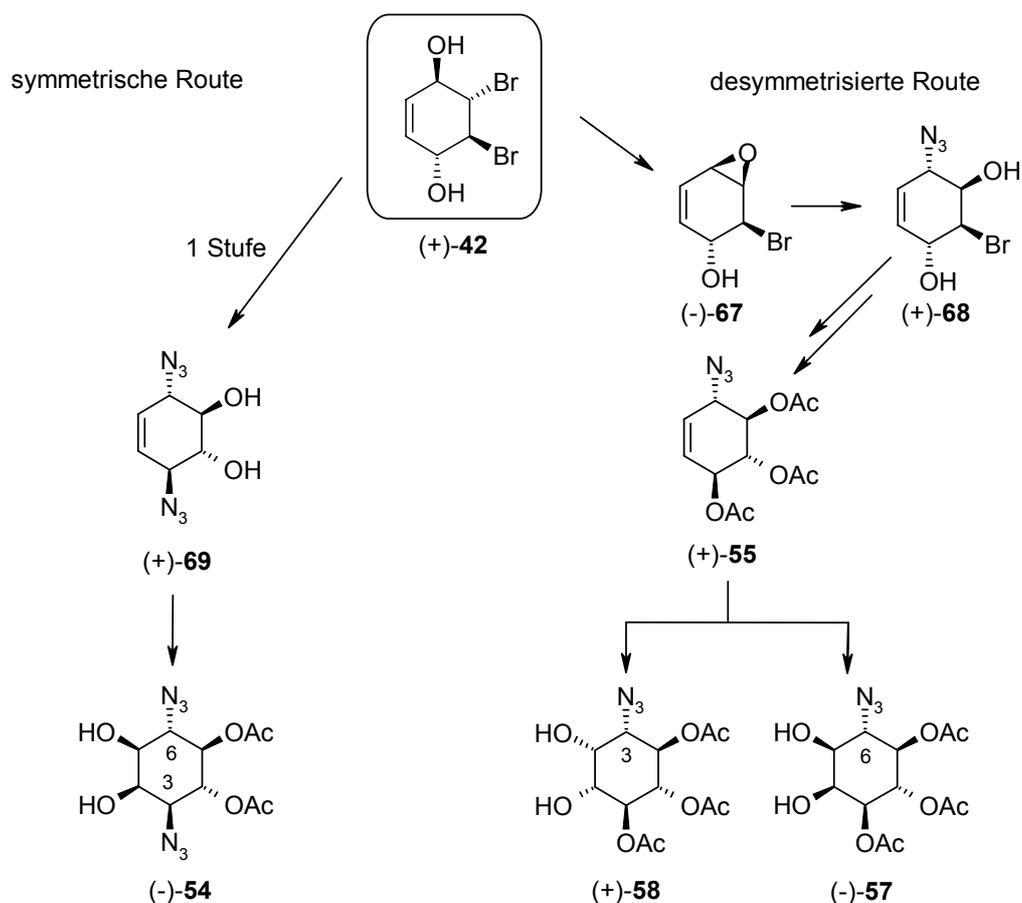
In Kooperation mit der hiesigen biochemischen Arbeitsgruppe von Prof. Vogel konnte außerdem eine neue Strategie zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit von *myo*-Inositolpentakisphosphaten etabliert werden. Dabei fand eine neue von Adelt et al. entwickelte Methode zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von *myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅/*myo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ **29** und *myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅/*myo*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ **31** Verwendung. Hierbei diente eine teilweise aufgereinigte Phytase aus *Dictyostelium discoideum* als ein enzymatisches Werkzeug (in 20 nmol Maßstab). Die auf obigen Weg synthetisierten enantiomerenreinen Standards, welche nicht käuflich erhältlich sind, spielten hierbei eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe der enantiomerenreinen Standards konnten schließlich die Hauptabbauwege von *myo*-InsP₆ **13** durch Phytase aus *P. rhodanensis* aufgeklärt werden. Diese Methode wurde im Rahmen einer gemeinsamen Publikation über die Inositolstereoisomere veröffentlicht.¹³³

Zusammenfassend stellt der in dieser Arbeit weiterentwickelte *de novo* Zugang zu den enantiomerenreinen *myo*-Inositolphosphaten eine interessante Alternative zu den bereits bekannten Synthesen dar.

möglichen *myo*-Inositolphosphaten genutzt werden. Dabei ist die Variabilität dieser Synthesestrategie ein entscheidender Vorteil gegenüber anderer Syntheserouten.³⁶

Azido-/Amino-substituierte *myo*-Inositolphosphate: Azido- und Amino-*myo*-inositol-derivate stellen eine pharmakologisch interessante Verbindungsklasse dar. Solche Verbindungen werden einfach zugänglich, wenn gleich zu Beginn der Reaktionssequenz anstelle von geschützten Sauerstoffresten Azid nucleophil eingeführt wird. Analog der Synthese der *myo*-Inositole kann die Synthese der Azido-/Amino-*myo*-inositole sowohl über einen symmetrischen, als auch einen unsymmetrischen Weg erfolgen. Dabei konnte das symmetrische Konzept grundlegend verkürzt werden, sodaß die Darstellung von Diazido-Konduritol B **69** erstmals in einer Eintopfsynthese gelang.

Schema 73: Synthesekonzepte zur Darstellung der Azido- und Diazido-*myo*-inositole und ihrer Phosphate (nur ein Enantiomer abgebildet)

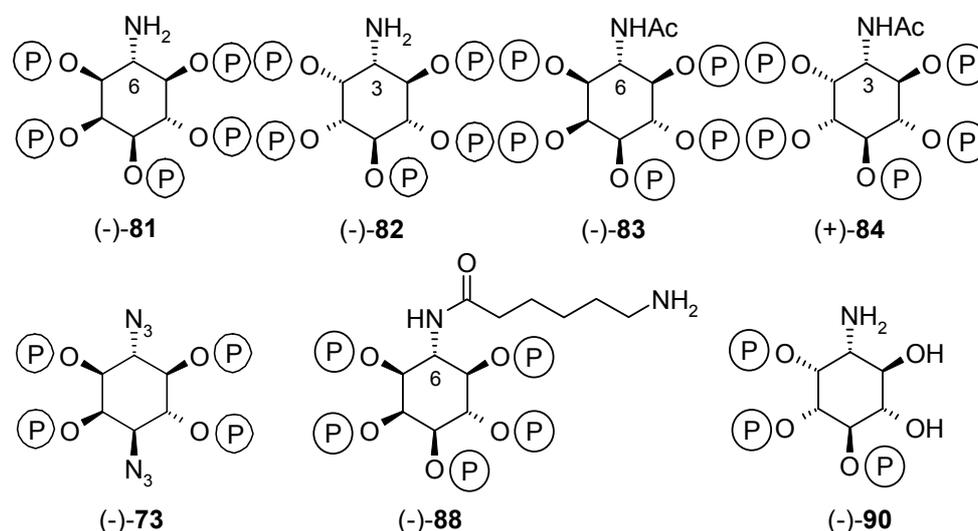


Die Trennung der Diastereomere bei der desymmetrisierten Route erfolgte dabei äußerst elegant durch einfaches Digerieren in Chloroform. Dabei geht das eine Diastereomer **57** in Lösung, während das andere Diastereomer **58** in Chloroform praktisch unlöslich ist. Das gelöste Diastereomer **57** muß lediglich noch auf der nächsten Stufe als Pentaacetat durch einfache Umkristallisation aufgereinigt werden. Die Route konnte in soweit optimiert werden, als daß sie ohne jegliche säulenchromatographische Aufreinigung durchführbar ist.

Diese Grundkörper konnten erfolgreich zur Darstellung von insgesamt 23 freigesetzten Diazido-, Diamino-, Azido-, Amino- und Acetamido-*myo*-inositolen und ihrer Polyphosphate herangezogen werden.

Abbildung 56: Dargestellte Amino-*myo*-inositolpolyphosphate

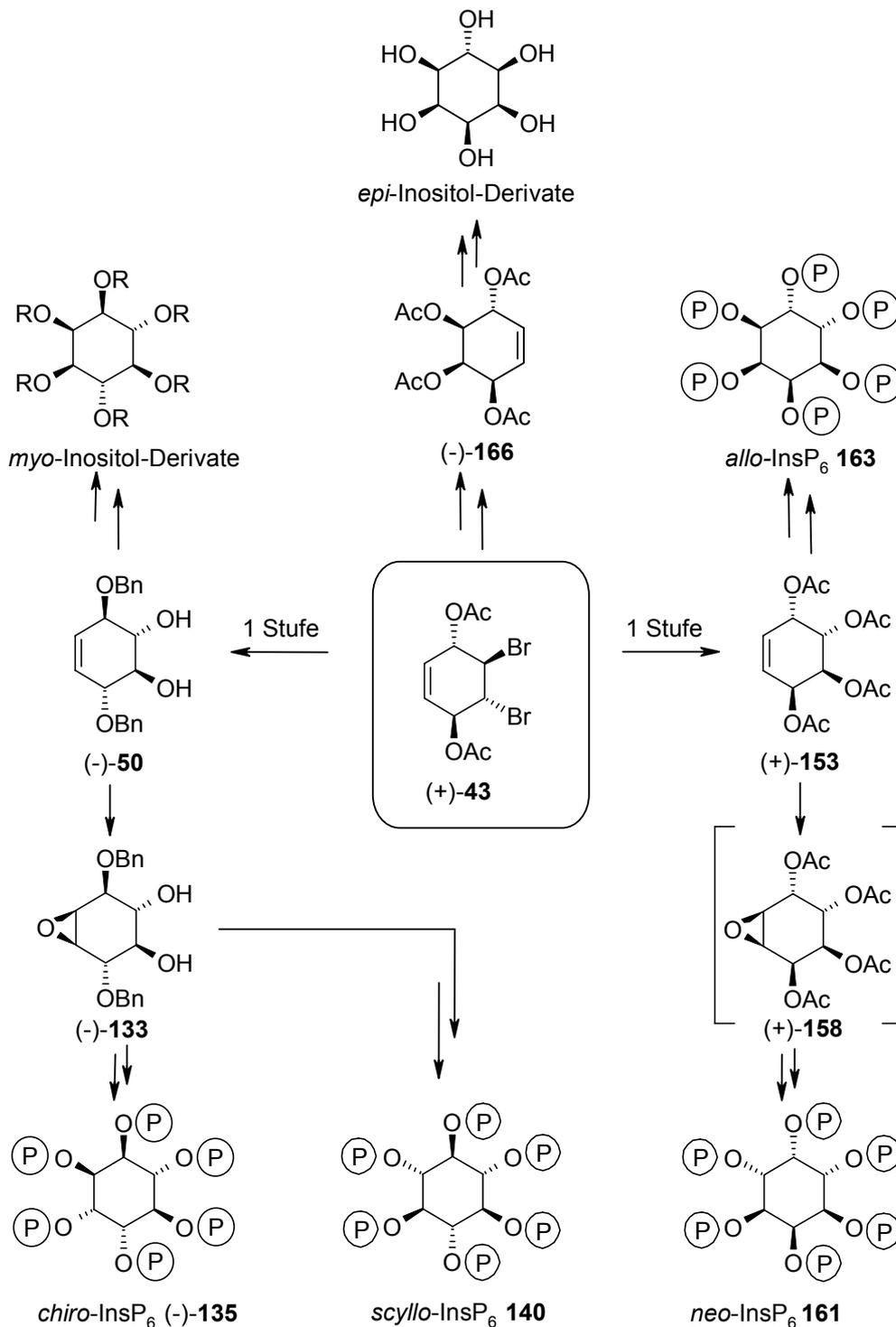
(nur ein Enantiomer abgebildet)



Für die Synthese von Affinitätsmaterialien konnte über die Aminofunktion das Pentakisphosphat **82** erfolgreich an ein Trägermaterial angebunden werden. Die anfänglichen Probleme bei der Anbindung der Amino-*myo*-inositolpentakisphosphate an die epoxidaktivierte Matrix, die offenbar vor allem in der Protonierung der Aminogruppe durch nachbarständige Phosphatgruppen begründet ist, konnte zum Teil durch Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel gelöst werden. Um die Synthese von Epoxidmaterialien zu vereinfachen, wurde ein Weg aufgezeigt, der eine Spacergruppe am Amin einführt. Es konnte erstmalig das Hexansäure(6'-amino)-Derivat **(-)-88** synthetisiert werden, welches sich weitaus besser als Affinitätsmaterial eignen dürfte. Ein solches Trägermaterial dürfte bei der Aufreinigung von *myo*-Inositolpolyphosphaten erkennenden Enzymen (z. B. Kinasen) behilflich sein und wird zur Zeit im Arbeitskreis von Prof. Vogel in Wuppertal weiterverfolgt.

Synthese der stereoisomeren Inositolpolyphosphate: Das Wissen über die Abbauege von *myo*-InsP₆ **13** durch Phytasen aus *P. rhodanensis* und *S. cerevisiae* ließ die Synthese von Epimeren von *myo*-InsP₆ **13** als interessantes Ziel erscheinen.

Schema 74: Überblick der Synthese von isomeren Inositolpolyphosphaten über symmetrische und unsymmetrische Konduritol-Bausteine (nur ein Enantiomer abgebildet)

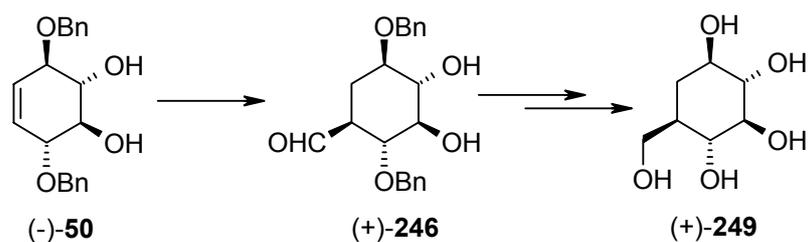


Bisher ist über die Stereoisomere von *myo*-Inositol und ihrer Polyphosphate wenig bekannt und daher kann die Bereitstellung dieser Verbindungen in präparativem Maßstab die Grundlagenforschung in diesem hochinteressanten Bereich stark vorantreiben. Da bislang nur wenige Synthesen zu den Inositolstereoisomeren existieren, wurden ausgehend von den Bausteinen **42** und **43** neue Synthesewege entwickelt. Bei der Synthese werden zunächst Konduritolzwischenstufen genutzt. Neben der bereits bekannten effektiven Synthese der Konduritol B-Bausteine (siehe Synthese von **50**) konnten kurze und praktikable Routen zu den Konduritol E, F und C-Systemen entwickelt werden. Dabei ist vor allem die Konduritol E **153** Synthese hervorzuheben. Bisher waren nur Synthesewege bekannt, die über vier bis fünf Stufen, ausgehend von **43** einen Konduritol E Baustein lieferten. Im Laufe der Arbeit konnte ein Eintopfverfahren entwickelt werden, das hocheffizient den gewünschten Baustein in Multigrammmengen liefert.

Die anschließende Funktionalisierung (*cis*- und *trans*-Dihydroxylierung) der Doppelbindung bis hin zur Synthese der Inositolstereoisomere konnte soweit optimiert werden, daß die Darstellung hoch diastereoselektiv erfolgt (siehe Schema 74).

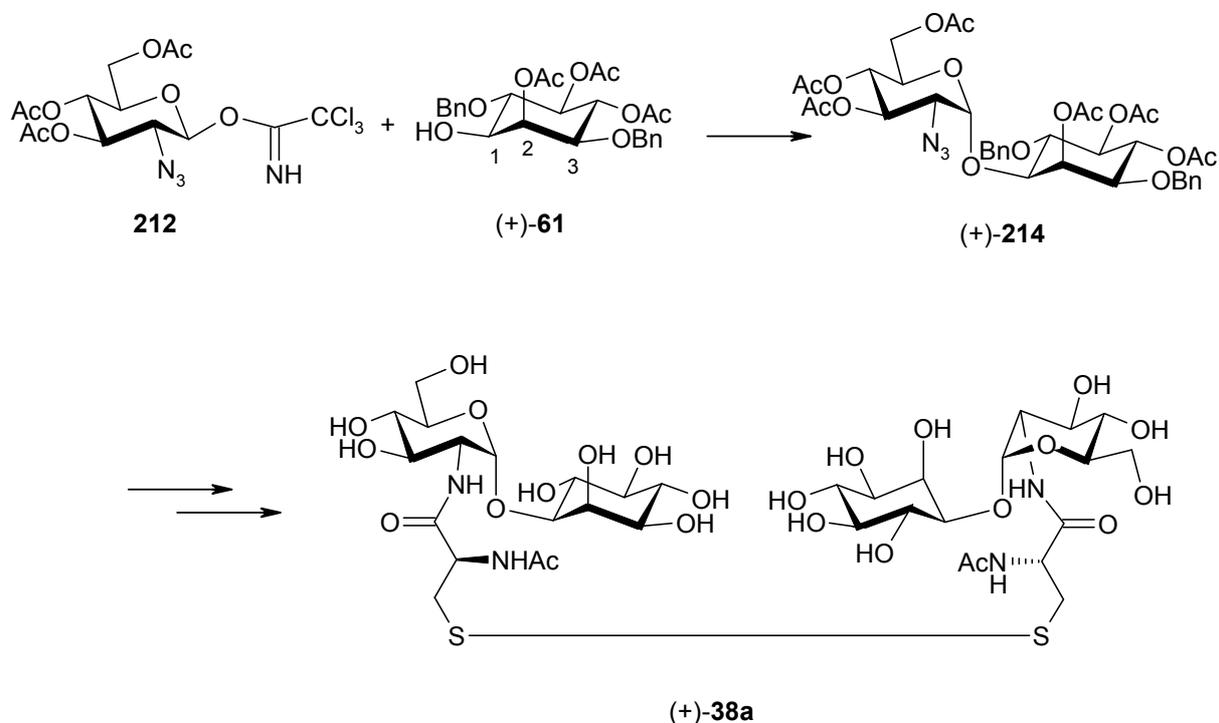
In wenigen Schritten gelang so die Darstellung von sieben der neun Inositolstereoisomere. Das Potential dieses Ansatzes konnte dazu genutzt werden, um *myo*-, *L-chiro*-, *D-chiro*-, *epi*-, *scyllo*-, *allo*- und *neo*-Inositolsysteme zu synthetisieren. Neben der Synthese von *meso*-Verbindungen konnten von enantiomerenreinen Edukten erfolgreich enantiomerenreine *chiro*- und *neo*-Inositolpolyphosphate dargestellt werden, die zur Aufklärung von enzymatischen Abbauwegen unabdingbar sind. Durch Verwendung beider enantiomerenreiner Bausteine konnten letztendlich beide Enantiomere aller Verbindungen synthetisiert werden. Obwohl sich die Phosphorylierung zum Teil als äußerst schwierig erwies, konnten schließlich fast alle Inositolhexakisphosphate (InsP₆) dargestellt werden.

Carbazucker: Mit der effektiven Darstellung von enantiomerenreinen Konduritolsystemen bot sich auch ein Weg zu verzweigten Cyclitolen, wie Carbazuckern an. Die Hydroformylierung der Doppelbindung der Konduritole schien dabei eine geeignete Methode zur Einführung einer CH₂OH-Gruppe zu sein.

Schema 75: Darstellung von Carbazucker über diastereoselektive Hydroformylierung

Es konnte erstmalig aufgezeigt werden, daß die Hydroformylierung nicht auf einfache Systeme limitiert ist, sondern auch das Potential besitzt, funktionalisierte Cyclohexenderivate (die Konduritole) umzusetzen. Die Hydroformylierung an Konduritol B Derivaten, wie z. B. **50** lieferte hoch diastereoselektiv reine Carbazucker-Derivate.

Mycothiolsynthese: Der hochflexible Zugang zu einer großen Anzahl an Grundkörpern auf Inositolbasis konnte durch die Synthese des Naturstoffes Mycothiol noch weiter unterstrichen werden.

Schema 76: Darstellung von Mycothiol **38a**

Die Synthese des Glycosyl-Akzeptors (+)-**61** wurde soweit optimiert, daß er in Multi-grammaßstab zur Glycosylierung zur Verfügung stand. Die Glycosylierung nach der Trichloracetimidat-Methode lieferte mit α -Selektivität das Disaccharid **214** in über 50%iger

Ausbeute. Dabei wurden auch diastereomere Disaccharide für die Synthese von Mycothiol-Mimetika dargestellt. Die Azidreduktion und die anschließende peptidische Verknüpfung mit einem Cystein-Derivat, war, wie auch in der Literatur beschrieben, das größte Problem in der Synthese. Neben den auftretenden Schutzgruppenwanderungen wurden anfänglich auch eine Eliminierung sowie eine Racemisierung der Aminosäure beobachtet. Diese Probleme konnten aber letztendlich durch Optimierung der Reaktionsbedingungen gelöst werden. Fast zeitgleich wurde eine weitere *de novo* Synthese durch Donohoe et al. publiziert.²²²

Resümee: Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß mit der in dieser Arbeit entwickelten *de novo* Strategie ein hochflexibler Zugang zu einer großen Bandbreite von selektiv funktionalisierten, enantiomerenreinen Inositolssystemen möglich ist. Die strukturell hohe Vielfalt an Regio-, Stereo- sowie auch Substitutionsisomeren von *myo*-Inositol konnte in einem umfassenden Synthesekonzept ausgearbeitet werden. Im Vordergrund stand häufig die Verkürzung der Synthesesequenz durch ungewöhnliche Reaktionsschritte (siehe z. B. Synthese von *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ (-)-**24** und Konduritol E **153**).

Ein neues, innovatives Konzept wurde in der Synthese der Carbazucker aufgezeigt. Durch die Einführung einer Seitenkette mittels diastereoselektiver Hydroformylierung wurden erstmals über eine kurze Synthesesequenz Carbazucker dargestellt, die dann über diese Route problemlos auch enantiomerenrein synthetisiert werden konnten.

Im letzten Teil der Arbeit gelang als weiterer „Highlight“ eine effektive Darstellung von Mycothiol **38a** (sowie Disaccharidanaloga), einer Verbindung von hohem biologischen Interesse.

Die große Flexibilität der Bausteine wird mit über 70 freigesetzten Verbindungen unterstrichen.

Ausblick: Die gezielte Migration von Funktionalitäten sollte auch auf andere Grundkörper übertragbar sein. So dürfte über eine gezielte Phosphatgruppenmigration weitere Inositolphosphate darstellbar sein (auch hier wurden bereits vielversprechende Vorversuche durchgeführt).

Aussichtsvoll ist die Übertragung der Hydroformylierung auf die bereits dargestellten stereoisomeren Konduritole. Damit wären weitere neue Carbazucker zugänglich. So könnte man z.B. ausgehend von Konduritol E und Konduritol C Derivaten β -D-Carbaaltrose- bzw.

β -D-Carbamannose-Derivate erhalten. Diese Möglichkeiten werden zur Zeit im Rahmen einer Diplomarbeit durch Frank Meier²¹³ weiter untersucht. Zusätzlich sollten chemoenzymatische Umsetzungen der Carbazucker und ihrer Phosphate bei der Untersuchung der Substratspezifität von Enzymen behilflich sein.

Aufgrund der sehr flexiblen Synthesestrategie können sehr viele weitere Inositolpolyphosphate dargestellt werden, die zur Aufklärung wichtiger Biosynthesewege beitragen können.

Eigene Publikationen: Ein Teil der Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden bereits publiziert

Michael A. L. Podeschwa, Frank G. Meier, Dietmar Obst, Arno Behr and Hans-Josef Altenbach, Synthesis of β -D- and L-Carbaglucopyranose by Stereoselective Hydroformylation of Conduritol B Systems, *Chem. Comm.* **2003**, submitted.

Michael Podeschwa, Oliver Plettenburg, Jochen vom Brocke, Oliver Block, Stephan Adelt, and Hans-Josef Altenbach, Stereoselective Synthesis of *myo*-, *neo*-, *L-chiro*, *D-chiro*, *allo*-, *scyllo*- and *epi*-Inositol Systems via Conduritols Prepared from *p*-Benzoquinone *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1958-1972.

Michael A. L. Podeschwa, Oliver Plettenburg, Hans-Josef Altenbach, Stereoselective Synthesis of Several Azido- and Diazido-/diamino-Inositols and their Phosphates from *p*-Benzoquinone, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1919-1929.

Zhang, C.-S., Stratmann, A., Block, O., Brückner, R., Podeschwa, M., Altenbach, H.-J., Wehmeier, U., Piepersberg, W., Biosynthesis of the C₇-cyclitol Moiety of Acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110: 7-*O*-Phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathway, *J. Biol. Chem.* **2002**, Vol. 277, 25, 22853-22862.

Oliver Plettenburg, Michael Podeschwa, Stereoselective Synthesis of *myo*-Inositolpolyphosphates from *p*-Benzoquinone *J. Org. Chem.* **2003**, in preparation.

S. Adelt, M. Podeschwa, G. Dallmann, H.-J. Altenbach, G. Vogel, Stereo- and Regiospecificity of Yeast Phytases-Chemical Synthesis and Enzymatic Conversion of the Substrate Analogues *neo*- and *L-chiro*-Inositol Hexakisphosphate, *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 1, 44-67.

Zhang, C.-S., Podeschwa, M., Altenbach, H.-J., Piepersberg, W., Wehmeier, U., The acarbose-biosynthetic enzyme AcbO from *Actinoplanes* sp. SE50/110 is a 2-*epi*-5-*epi*-valiolone-7-phosphate 2-epimerase, *FEBS Letters* **2003**, *540*, 47-52.

Zhang, C.-S., Podeschwa, M., Altenbach, H.-J., Piepersberg, W., Wehmeier, U., Identification of a 1-*epi*-valienol 7-kinase activity in the producer of acarbose, *Actinoplanes* sp. SE50/110, *FEBS Letters* **2003**, *540*, 53-57.

Adelt, S., Podeschwa, M., Dallmann, G., Plettenburg, O., Altenbach, H.-J., Vogel, G., Chemoenzymatic synthesis of biologically active inositolphosphate analogues, *Biological Chemistry* **2001**, Vol. 382, special supplement, 87.

Poster:

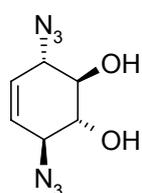
Biological Chemistry Tagung, Dortmund 2001, Chemoenzymatic synthesis of biologically active inositolphosphate analogues.

Die Seiten 181 bis 428 beinhalten den experimentellen Teil der Arbeit und werden auf Wunsch des Verfassers an dieser Stelle zunächst nicht veröffentlicht.

5 Verbindungsverzeichnis

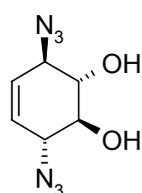
Die folgende Abbildung zeigt sämtliche Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert worden sind. Die Synthesevorschriften findet man unter den angegebenen Abschnitten und Seiten.

Amino-/Azido-*myo*-Inositol:

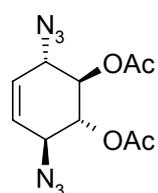


(+)-69

(Abschnitt 4.2.1.1, Seite 196)

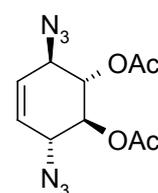


(-)-69

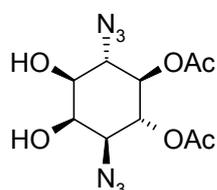


(+)-52

(Abschnitt 4.2.1.2, Seite 198)

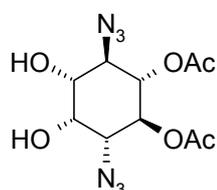


(-)-52

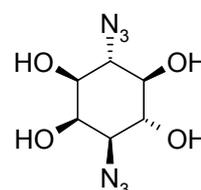


(+)-54

(Abschnitt 4.2.1.3, S. 200)

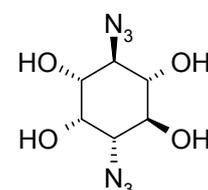


(-)-54

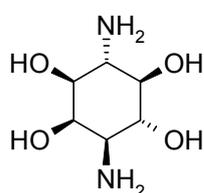


(-)-71

(Abschnitt 4.2.1.4, S. 202)

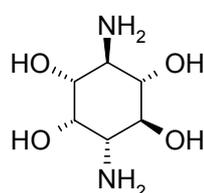


(+)-71

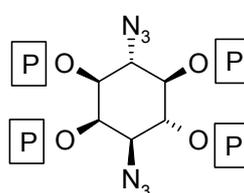


(+)-253

(Abschnitt 4.2.1.5, S. 204)

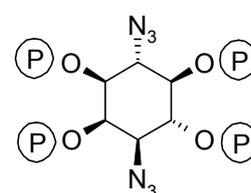


(-)-253



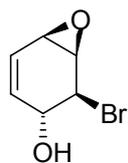
(-)-72

(Abs. 4.2.1.6, S. 206)



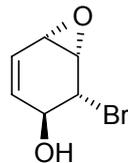
(-)-73A

(Abs. 4.2.1.7, S. 207)

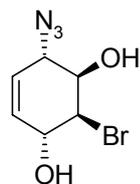


(-)-67

(Abschnitt 4.2.2.1, S. 209)

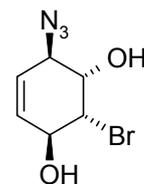


(+) -67

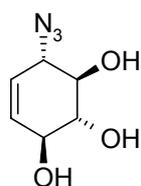


(+) -68

(Abschnitt 4.2.2.2, S.210)

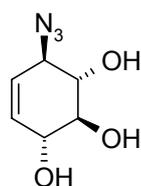


(-)-68

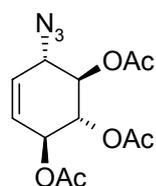


(+) -74

(Abschnitt 4.2.2.3, S. 212)

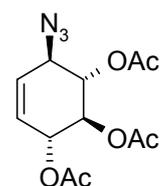


(-)-74

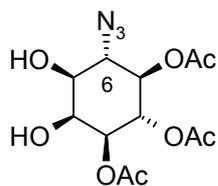


(+) -55

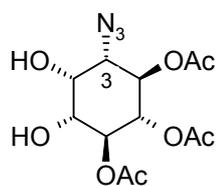
(Abschnitt 4.2.2.4, S. 214)



(-)-55

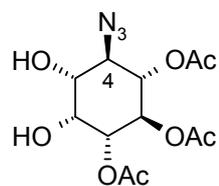


(-)-57

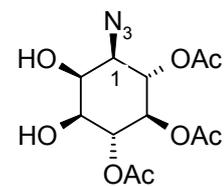


(+) -58

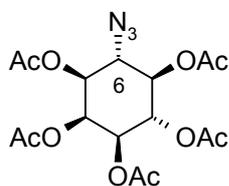
(Abschnitt 4.2.2.5, S. 216 ff)



(+) -57

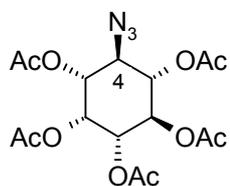


(-)-58

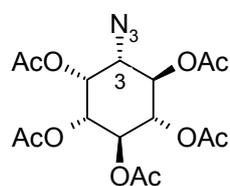


(+) -75

(Abschnitt 4.2.2.6, S. 220)

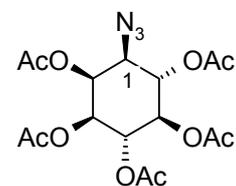


(-)-75

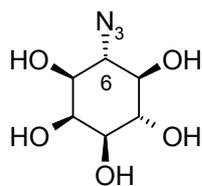


(-)-76

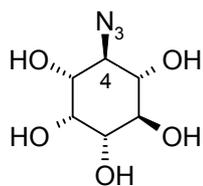
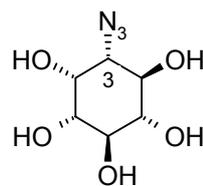
(Abschnitt 4.2.2.7, S. 222)



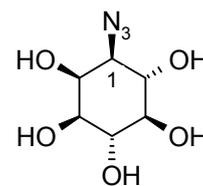
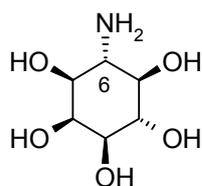
(+) -76

**(-)-77**

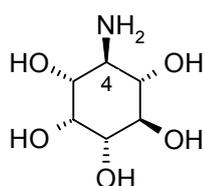
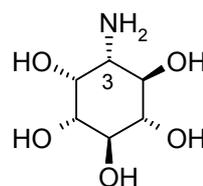
(Abschnitt 4.2.2.8, S. 224)

**(+)-77****(+)-78**

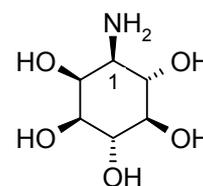
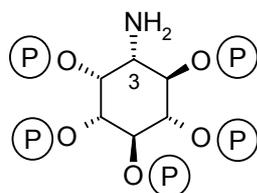
(Abschnitt 4.2.2.9, S. 226)

**(-)-78****(+)-79**

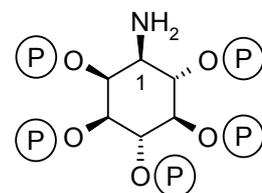
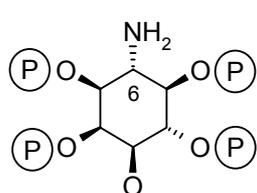
(Abschnitt 4.2.2.10, S. 228)

**(-)-79****(+)-80**

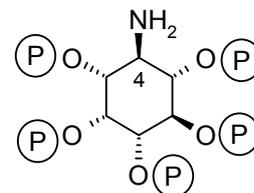
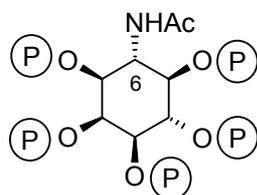
(Abschnitt 4.2.2.11, S. 229)

**(-)-80****(-)-82**

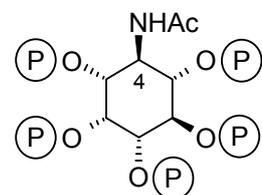
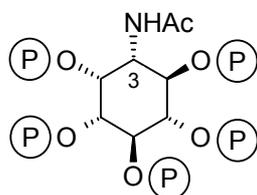
(Abschnitt 4.2.2.12, S. 231)

**(+)-82****(-)-81**

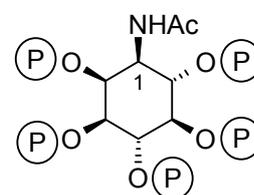
(Abschnitt 4.2.2.13, S. 234)

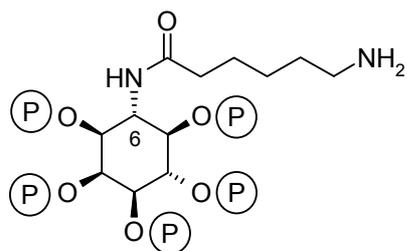
**(+)-81****(-)-83**

(Abschnitt 4.2.2.14, S. 235)

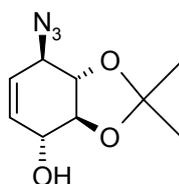
**(+)-83****(+)-84**

(Abschnitt 4.2.2.15, S. 238)

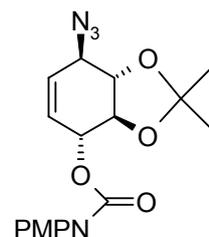
**(-)-84**

**(-)-88**

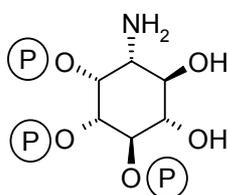
(Abschnitt 4.2.2.16, S. 240)

**(-)-254**

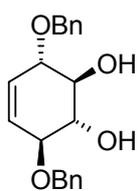
(Abschnitt 4.2.2.18, S. 243)

**255**

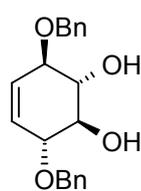
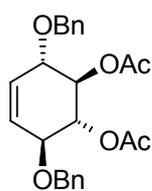
(Abschnitt 4.2.2.19, S. 245)

**(-)-90**

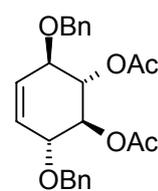
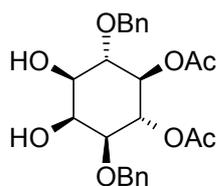
(Abschnitt 4.2.2.1.17, S. 242)

***myo*-Inositolpolyphosphate:****(+)-50**

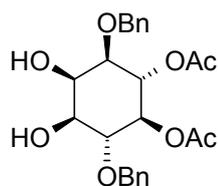
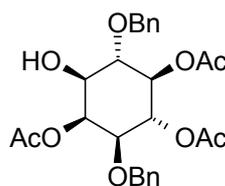
(Abschnitt 4.3.1.1.1, S. 247)

**(-)-50****(+)-51**

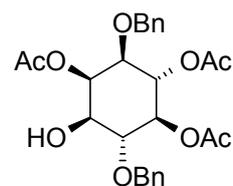
(Abschnitt 4.3.1.1.2, S. 249)

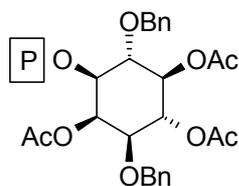
**(-)-51****(+)-53**

(Abschnitt 4.3.1.1.3, S. 251)

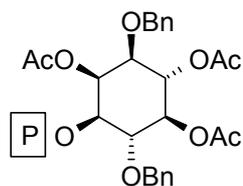
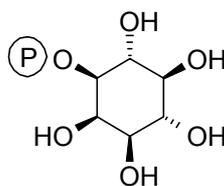
**(-)-53****(+)-61**

(Abschnitt 4.3.1.1.4, S. 253)

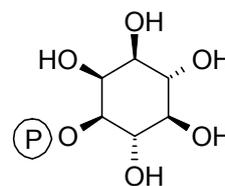
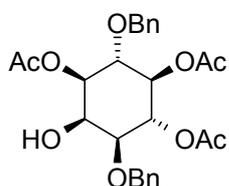
**(-)-61**

**(+)-93**

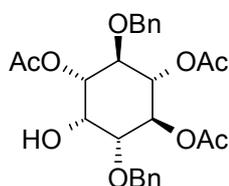
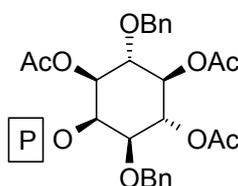
(Abschnitt 4.3.1.2.1, S. 255)

**(-)-93****(-)-11**

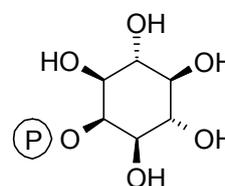
(Abschnitt 4.3.1.2.2, S. 257)

**(+)-11****(+)-101**

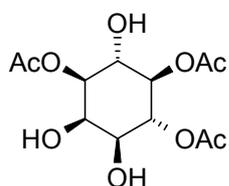
(Abschnitt 4.3.1.3.1, S. 260)

**(-)-101****(+)-102**

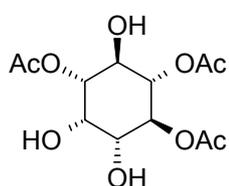
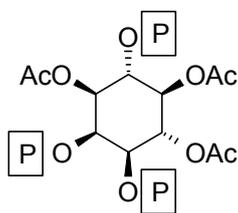
(Abs. 4.3.1.3.2, S. 261)

**96**

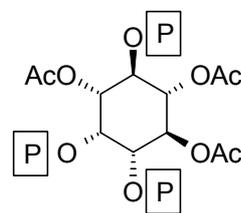
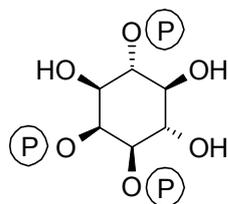
(Abs. 4.3.1.3.3, S. 264)

**(+)-103**

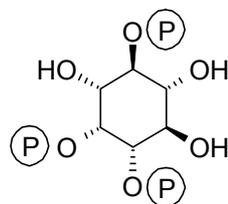
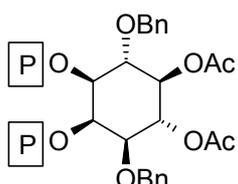
(Abschnitt 4.3.1.4.1, S. 265)

**(-)-103****(+)-104**

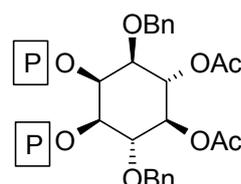
(Abs. 4.3.1.4.2, S. 266)

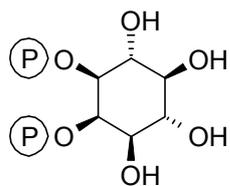
**(-)-104****(+)-105**

(Abschnitt 4.3.1.4.3, S.268)

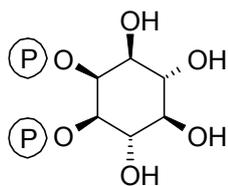
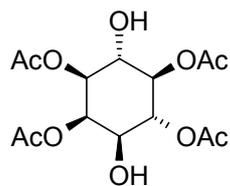
**(-)-105****(+)-110**

(Abschnitt 4.3.1.5.1, S. 270)

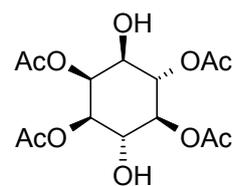
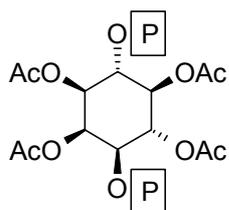
**(-)-110**

**(-)-111**

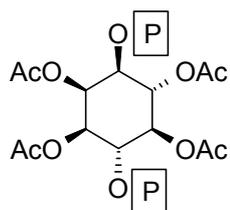
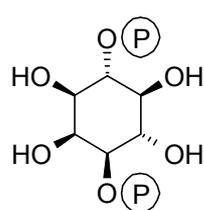
(Abschnitt 4.3.1.5.2, S. 272)

**(+)-111****(+)-106**

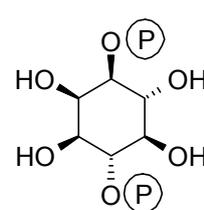
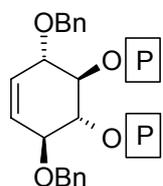
(Abschnitt 4.3.1.5.3, S. 274)

**(-)-106****(+)-107**

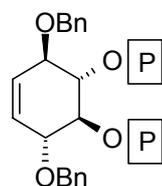
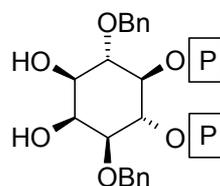
(Abschnitt 4.3.1.5.4, S. 276)

**(-)-107****(+)-17**

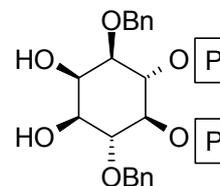
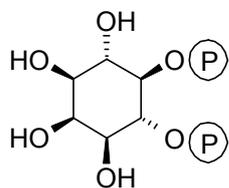
(Abschnitt 4.3.1.5.5, S. 278)

**(-)-17****(+)-108**

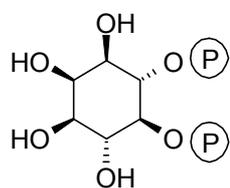
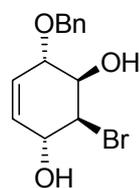
(Abschnitt 4.3.1.5.6, S.281)

**(-)-108****(+)-109**

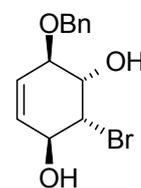
(Abschnitt 4.3.1.5.7, S. 283)

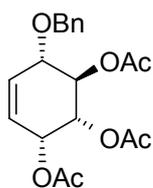
**(-)-109****(+)-16**

(Abschnitt 4.3.1.5.8, S. 285)

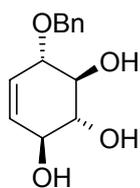
**(-)-16****(+)-91**

(Abschnitt 4.3.2.1, S. 287)

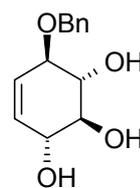
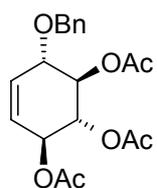
**(-)-91**

**(-)-117**

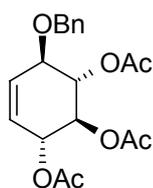
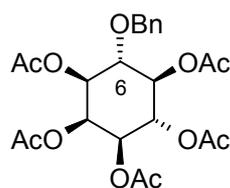
(Abschnitt 4.3.2.2, S. 289)

**(+)-112**

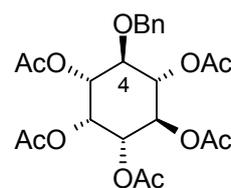
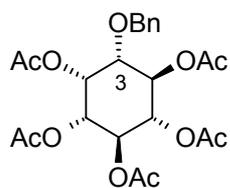
(Abschnitt 4.3.2.3, S. 291)

**(-)-112****(+)-56**

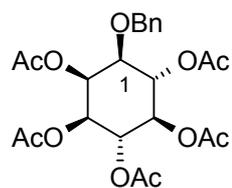
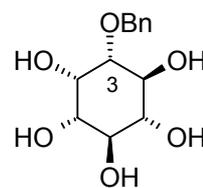
(Abschnitt 4.3.2.4, S. 294)

**(-)-56****(+)-59**

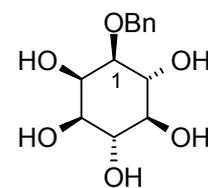
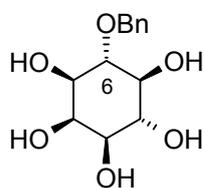
(Abschnitt 4.3.2.5, S. 296)

**(-)-59****(+)-60**

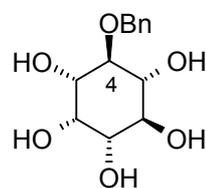
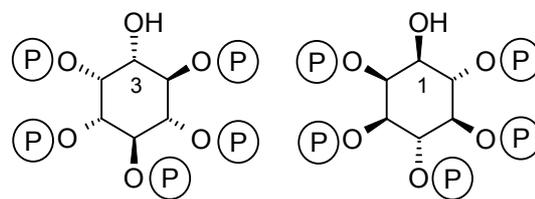
(Abschnitt 4.3.2.5, S. 296)

**(-)-60****(+)-119**

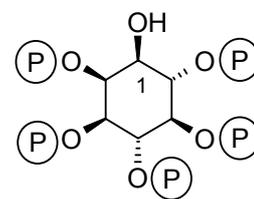
(Abschnitt 4.3.2.6, S. 300)

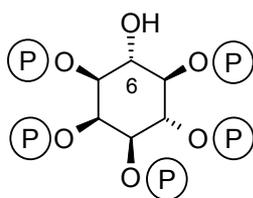
**(-)-119****(-)-118**

(Abschnitt 4.3.2.7, S. 302)

**(+)-118****(-)-29**

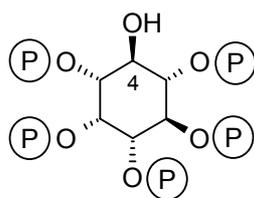
(Abschnitt 4.3.2.8, S. 304)

**(+)-29**



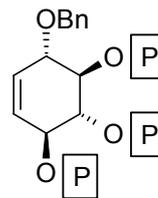
(-)-31

(Abschnitt 4.3.2.8, S. 304)

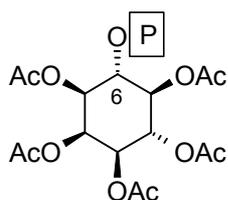


(+)31

(Abschnitt 4.3.2.9, S. 309)

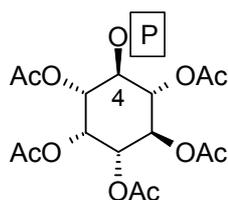


(+)256

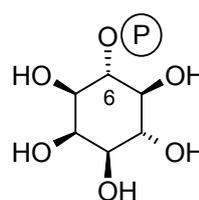


(+)123

(Abschnitt 4.3.2.10, S. 311)

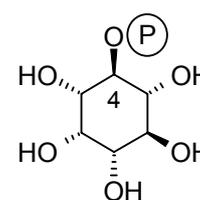


(-)123

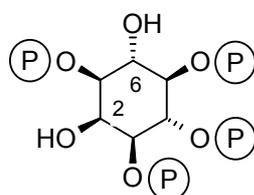


(-)15

(Abschnitt 4.3.1.11, S. 313)

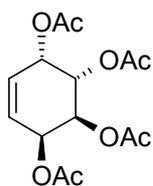


(+)15



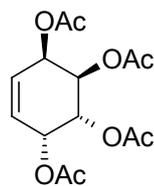
(-)24

(Abschnitt 4.3.2.12, S. 315)

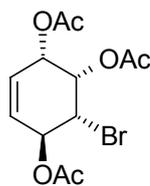
Stereoisomere Inositol:

(+)153

(Abschnitt 4.4.1.1, S. 318)

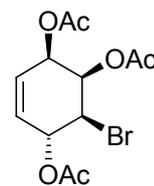


(-)153

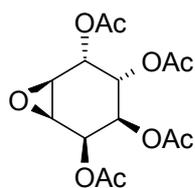


(+)157

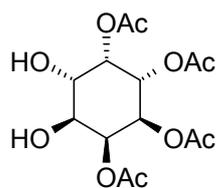
(Abschnitt 4.4.1.2, S. 320)



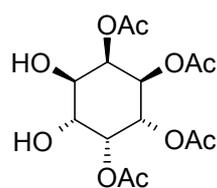
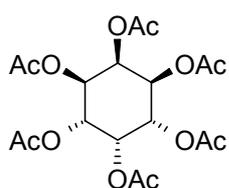
(-)157

**(+)-158**

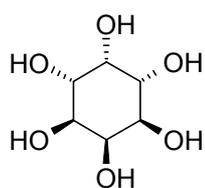
(Abschnitt 4.4.1.3, S. 322)

**(+)-159**

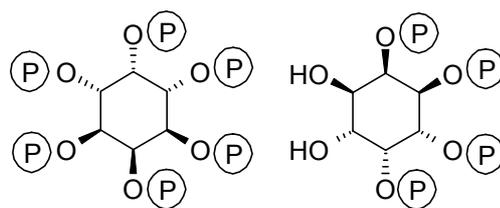
(Abschnitt 4.4.1.4, S. 324)

**(-)-159****160**

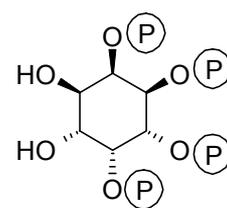
(Abs. 4.4.1.5, S. 326)

**3**

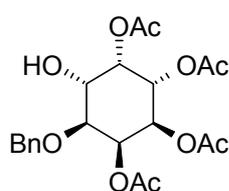
(Abs. 4.4.1.6, S. 327)

**161**

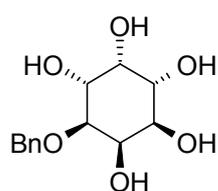
(Abs. 4.4.1.8, S. 329)

**(-)-173**

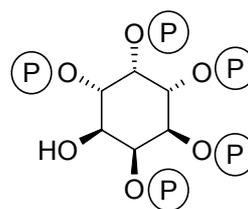
(Abs. 4.4.1.9, S. 331)

**(-)-174**

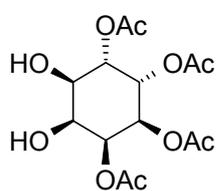
(Abschnitt 4.4.1.10, S. 332)

**(-)-176**

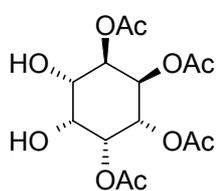
(Abschnitt 4.4.1.11, S. 333)

**(+)-172**

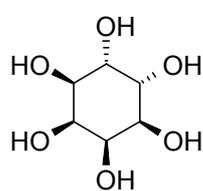
(Abschnitt 4.4.1.12, S. 334)

**(+)-162**

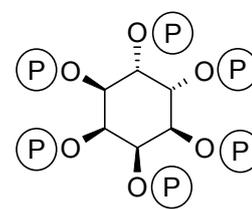
(Abschnitt 4.4.1.13, S. 336)

**(-)-162**

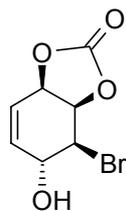
(Abschnitt 4.4.1.13, S. 336)

**9**

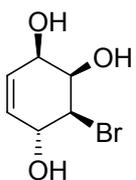
(Abs. 4.4.1.14, S. 338)

**163**

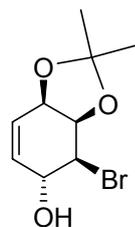
(Abs. 4.4.1.15, S. 339)

**(-)-141**

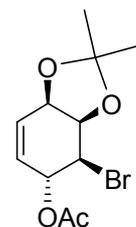
(Abs. 4.4.1.16, S. 341)

**(-)-142**

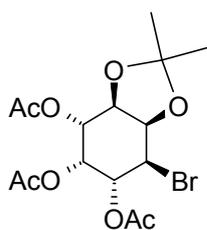
(Abs. 4.4.1.17, S. 343)

**(-)-143**

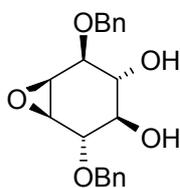
(Abs. 4.4.1.18, S. 344)

**(-)-144**

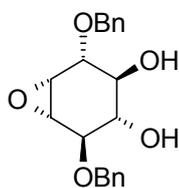
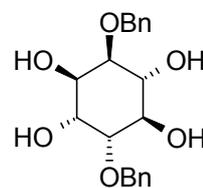
(Abs. 4.4.1.19, S. 346)

**145**

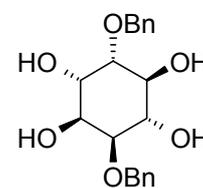
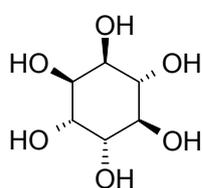
(Abs. 4.4.1.20, S. 347)

**(-)-133**

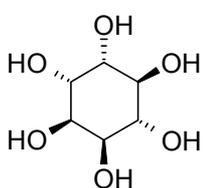
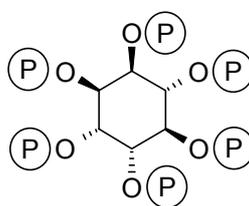
(Abschnitt 4.4.1.21, S. 349)

**(+)-133****(-)-134**

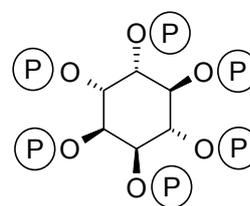
(Abschnitt 4.4.1.22, S. 351)

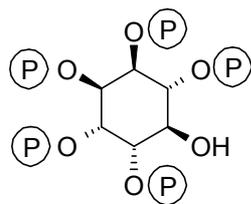
**(+)-134****(-)-4**

(Abschnitt 4.4.1.23, S. 353)

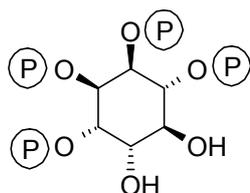
**(+)-4****(-)-135**

(Abschnitt 4.4.1.24, S. 354)

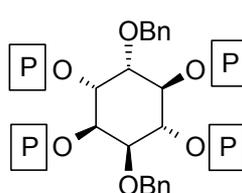
**(+)-135**

**(-)-177**

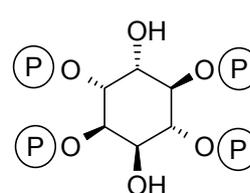
(Abs. 4.4.1.25, S. 357)

**(-)-178**

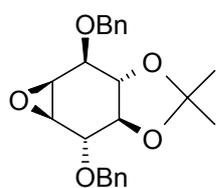
(Abs. 4.4.1.26, S. 360)

**(+)-136**

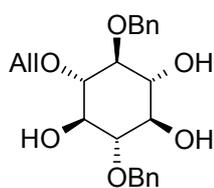
(Abs. 4.4.1.26, S. 360)

**(+)-137**

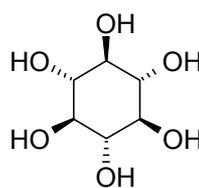
(Abs. 4.4.1.27, S. 361)

**138**

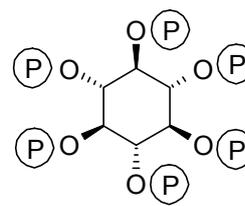
(Abs. 4.4.1.28, S. 363)

**139**

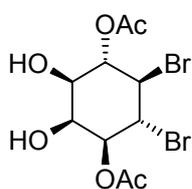
(Abs. 4.4.1.29, S. 364)

**5**

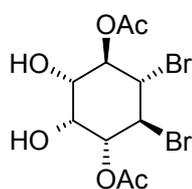
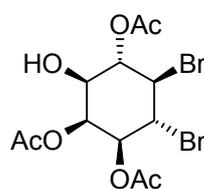
(Abs. 4.4.1.30, S. 365)

**140**

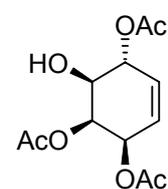
(Abs. 4.4.1.31, S. 366)

**(-)-164**

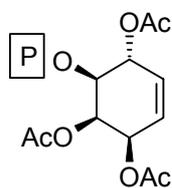
(Abschnitt 4.4.2.1, S. 368)

**(+)-164****(-)-168**

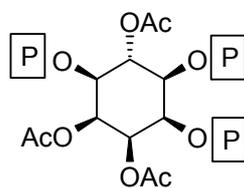
(Abs. 4.4.2.2, S. 370)

**(-)-169**

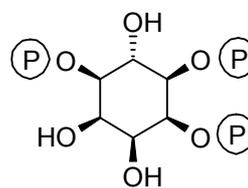
(Abs. 4.4.2.3, S. 372)

**(-)-170**

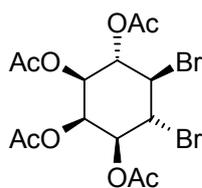
(Abs. 4.4.2.4, S. 374)

**(+)-171**

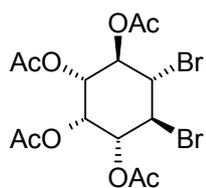
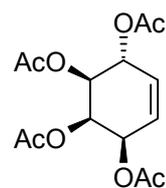
(Abs. 4.4.2.5, S. 376)

**(+)-12**

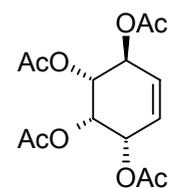
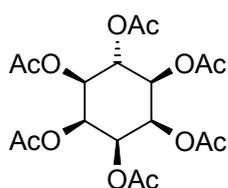
(Abs. 4.4.2.6, S. 379)

**(-)-165**

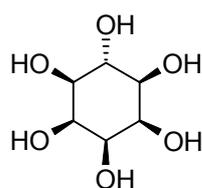
(Abschnitt 4.4.2.7, S. 380)

**(+)-165****(-)-166**

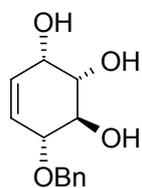
(Abschnitt 4.4.2.8, S. 382)

**(+)-166****167**

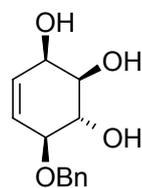
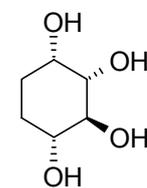
(Abs. 4.4.2.9, S. 384)

**8**

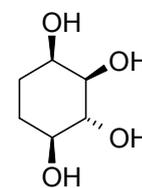
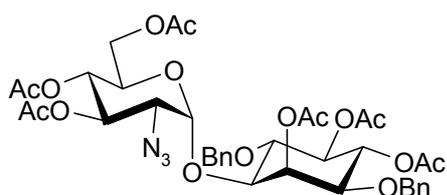
(Abs. 4.4.2.10, S. 386)

Knduritol F Derivate:**(+)-179**

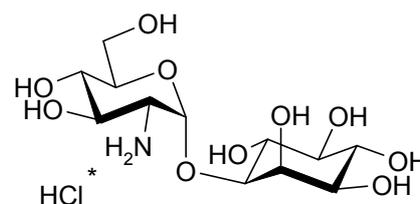
(Abschnitt 4.5.1, S. 389)

**(-)-179****(+)-180**

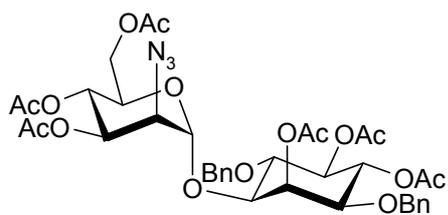
(Abschnitt 4.5.2, S. 391)

**(-)-180****Mycothiolsynthese:****(+)-214**

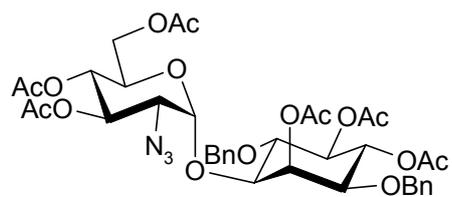
(Abschnitt 4.6.2.1, S. 399)

**(+)-199**

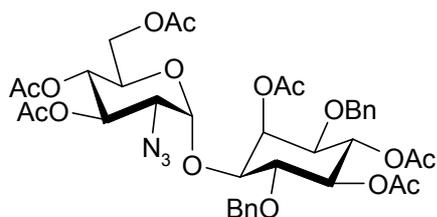
(Abschnitt 4.6.2.3, S. 402)

**217**

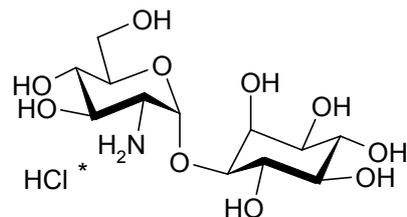
(Abschnitt 4.6.2.4, S. 404)

**(+)-224**

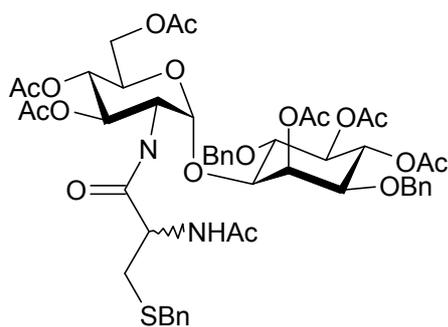
(Abschnitt 4.6.2.2, S. 401)

**(+)-215**

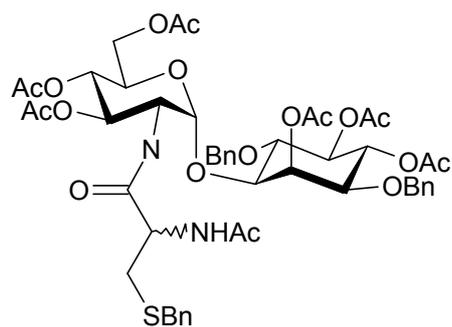
(Abschnitt 4.6.2.5, S. 405)

**(+)-216**

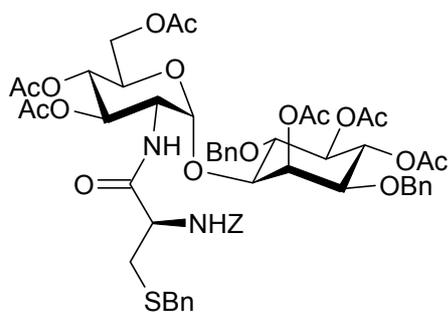
(Abschnitt 4.6.2.6, S. 406)

**219**

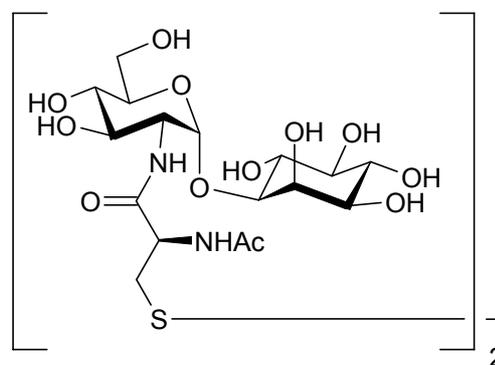
(Abschnitt 4.6.2.7, S. 408)

**220**

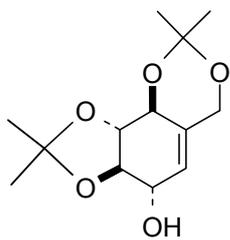
(Abschnitt 4.6.2.7, S. 408)

**(-)-223**

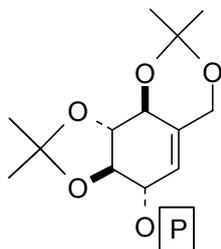
(Abschnitt 4.6.2.8, S. 411)

**(+)-38a**

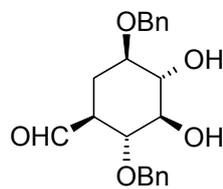
(Abschnitt 4.6.2.9, S. 413)

Carbazucker:**238**

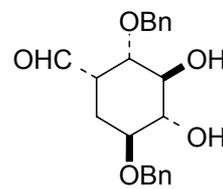
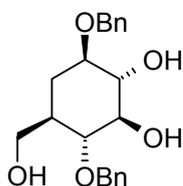
(Abs. 4.7.1.1, S. 416)

**242**

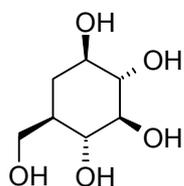
(Abs. 4.7.1.2, S. 417)

**(+)-246**

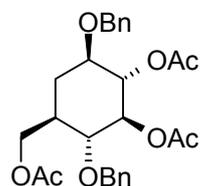
(Abschnitt 4.7.2, S. 419)

**247****(+)-248**

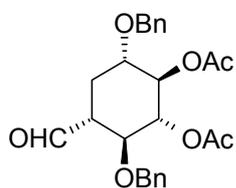
(Abs. 4.7.2.2, S. 421)

**(+)-249**

(Abs. 4.7.2.4, S. 423)

**257**

(Abs. 4.7.2.3, S. 422)

**(+)-250**

(Abs. 4.7.2.5, S. 424)

6 Literaturverzeichnis

-
- ¹ S. Posternak *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1919**, 169, 138-140.
- ² Th. Posternak *Chemistry of the cyclitols – The Cyclitols* **1965**, Hermann, Paris.
- ³ D. C. Billington *The Inositol Phosphates* **1993**, VCH Weinheim.
- ⁴ G. Anderson *Trans. Int. Congress Soil Sci.* **1964**, 4, 563-571.
- ⁵ B. A. Whitton, S. L. J. Grainger, G. R. W. Hawley, J. W. Simon *Microbiol. Ecol.* **1991**, 21, 85-98.
- ⁶ H. Streb, R. F. Irvine, M. J. Berridge, I. Schulz, Release of Ca²⁺ from nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **1983**, 306, 67-69.
- ⁷ Berridge, M. J. *Nature* **1993**, 361, 315-325 und Refs darin.
- ⁸ B. V. L. Potter, D. Lampe *Angew. Chemie* **1995**, 107, 2085–2125 (*Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1933–1972).
- ⁹ R. F. Irvine, M. J. Schell *Nature Reviews* **2001**, Vol. 2, 327–338.
- ¹⁰ I. U. P. A. Chem., **1973**, 285.
- ¹¹ Nomenclature Committee-IUB *Eur. J. Biochem.* **1989**, 180, 485.
- ¹² O. Hoffmann-Ostenhof, F. Pittner *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 1863-71
- ¹³ G. C. J. Irving, D. J. Cosgrove *Commun. in soil sci. plant anal.* **1982**, 13, 957-967.
- ¹⁴ J. McLaurin, R. Golomb, A. Jurewicz, J. P. Antel, P. E. Fraser *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18495-502.
- ¹⁵ S. J. Angyal, N. K. Matheson *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 4343-4346
- ¹⁶ D. J. Cosgrove, M. E. Tate, *Nature* **1963**, 200, 568-569
- ¹⁷ R. Mukherjee, E. M. Axt *Phytochemistry* **1984**, 23, 2682-2684
- ¹⁸ W. R. Sherman, S. L. Goodwin, K. D. Gunnell *Biochemistry* **1971**, 10, 3491-3499.
- ¹⁹ J.-B. Martin, T. Laussmann, G. Vogel, G. Klein, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 10134-10140.
- ²⁰ S. J. Angyal, D. C. Craig *Carbohydr. Res.* **1994**, 263, 149-154
- ²¹ S. Bates, R. Jones, C. Bailey *British Journal of Pharmacology* **2000**, 130, 1944-1948.
- ²² K. Bruzik, A. Hakeem, M.-D. Tsai *Biochemistry* **1994**, 33, 8367-8374.
- ²³ J. Larner *Int. J. Exp. Diabetes Res.* **2002**, 3, 47-60.
- ²⁴ H. K. Ortmeier, N. Bodkin, J. Larner, B. C. Hansen *Endocrinol.* **1993**, 132, 640-642.
- ²⁵ G. Dangschat, H. O. L. Fischer *Naturwissenschaften* **1939**, 27, 756-757.
- ²⁶ [a] M. Desjardins, L. E. Brammer Jr., T. Hudlicky *Carbohydr. Res.* **1997**, 304, 39-42. [b] G. Mehta, S. Lakshminath *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, 3509-3512. [c] M. Mandel, T. Hudlicky *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 741-743.
- ²⁷ A. Shaldubina, S. Ju, D. L. Vaden, D. Ding, Belmaker, M. L. Greenberg *Molecular Psychiatry* **2002**, 7, 174-180.
- ²⁸ H. Streb, R. F. Irvine, M., J. Berridge, I. Schulz *Nature* **1983**, 312, 375-76.
- ²⁹ H. Einat, A. Shaldubina, R. H. Belmaker *Drug Development Research* **2000**, 50, 309-315.
- ³⁰ [a] E. R. Seaquist, R. Grueter *Mag. Reson. Med.* **1998**, 39, 316–316. [b] B. Narasimham, G. Pliska Matyshalk, R. Kinnard, S. Carstensen; M. A. Ritter, L. Weymarn, P. P. N. Murthy *Plant Physiol.* **1997**, 113, 1385–1393.
- ³¹ Y. H. H. Lien, T. Michaelis, R. A. Moats, B. D. Ross *Life Sci.* **1994**, 54, 1507–1512.

- ³² R. D. Hancock, K. J. Hegetschweiler *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 2137-2140.
- ³³ S. J. Angyal *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1989**, *47*, 1-43.
- ³⁴ T. Hudlicky, N. Restrepo-Sanchez, P. D. Kary *Carbohydr. Res.*, **2000**, *324*, 200-203
- ³⁵ V. Pistarà, P. Barili, G. Catelani, A. Corsaro, F. D'Andrea, S. Fiscicella *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 3253-3256.
- ³⁶ S.-K. Chung, Y.-U. Kwon, J.-H. Shin, Y.-T. Chang, C. Lee, B.-G. Shin, K.-C. Kim, M.-J. Kim *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 5626-5637.
- ³⁷ C. Husson, L. Odier, Ph. J. A. Vottéro *Carbohydr. Res* **1998**, *307*, 163-165.
- ³⁸ A. M. Riley, D. J. Jenkins, B. V. L. Pottter *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 277-281.
- ³⁹ A. Kornienkoko, M. d'Alarcao *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 827.
- ⁴⁰ L. Ackermann, D. E. Tom, A. Fürsner *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2195-2202.
- ⁴¹ R. M. Conrad, M. J. Grogan, C. Bertozzi *Organic Letters* **2002**, Vol. 4, 8, 1359-1361.
- ⁴² D.J. Cosgrove *Rev. Pure. Appl. Chem.* **1966**, *16*, 209.
- ⁴³ I. Casals, J. L. Villar, M. Riera-Codina *Analytical Biochemistry* **2002**, *300*, 69-76.
- ⁴⁴ [a] M. Sirén U.S. Patent No. 4.851.560. [b] M. Sirén, L. Linne, L. Persson *ACS Symposium Series* **1991**, *463*, 103-110 ACS, Washington, DC.
- ⁴⁵ Ph. T. Hawkins, D. R. Poyner, T. R. Jackson, A. J. Letcher, D. A. Lander, R. F. Irvine *Biochem J.* **1993**, *294*, 929-934.
- ⁴⁶ J. Nathans, D. S. Hogness, Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* **1983**, *34*, 807 – 814.
- ⁴⁷ M. J. Berridge, P. Lipp M. D. Bootman *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 11.
- ⁴⁸ A. T. Harootunian, J. P. Kao, S. Paranjape, R. Y. Tsien *Science* **1991**, *251*, 75.
- ⁴⁹ M. C. Hermosura et al. *Nature* **2000**, *408*, 735-740.
- ⁵⁰ A. Luckhoff, D. E. Clapham *Nature* **1992**, *355*, 356-358.
- ⁵¹ H. Tsubokawa, K. Oguro, H. P. C. Robinson, T. Masuzawa, N. Kawai *J. Physiol.* **1996**, *497*, 67-78.
- ⁵² C. Szinyai, T. Behnisch, G. Reiser, K. G. Reymann *J. Physiol.(Lond.)* **1999**, *516*, 855-868.
- ⁵³ X. Yang et al. *J. Biol. Chem* **1999**, *274*, 18973-18980.
- ⁵⁴ X. Yang, S. B. Shears *Biochem J.* **2000**, *351*, 551-555.
- ⁵⁵ M. W. Y. Ho, M. A. Carew, X. Yang, S. B. Shears in *Biology of Phosphoinositides* (Ed. S. Cockcroft) **2000**, Oxford Univ. Press, Oxford, 298-319.
- ⁵⁶ M. Hallmann *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *795*, 67.
- ⁵⁷ G. Legler *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry NY* **1990**, *48*, 319-389.
- ⁵⁸ J. Lehmann, B. Rob *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, 199-208 und Ref. darin
- ⁵⁹ [a] G. Brunn, A. H. Fauq, S. Chow, A. P. Kozikowski, A. Gallegos, G. Powis *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *35*, 71. [b] G. Powis, I. A. Aksoy, C. D. Melder, S. Aksoy, H. Eichinger, A. H. Fauq, A. P. Kozikowski *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1991**, *29*, 95. [c] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, G. Powis, P. Kurian, F. T. Crews *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 362.
- ⁶⁰ A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, G. Powis *Curr. Med. Chem.* **1994**, *1*, 1-12
- ⁶¹ a) S. Adelt, O. Plettenburg, G. Dallmann, F. Ritter, S. Shears, H.-J. Altenbach, G. Vogel *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2705-2708. b) O. Plettenburg, S. Adelt, *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 1057-1061.

- ⁶² (a) H. Paulsen, W. Roeben *Liebigs Annalen* **1985**, 974-994; (b) H. Paulsen, F. R. Heiker *Liebigs Annalen* **1981**, 2180-2203; (c) S. C. Johnson, J. Dahl, T. L. Shih, D. J. A. Schedler *J. Med. Chem* **1993**, *36*, 3628-35.
- ⁶³ S. Ballereau; P. Guédat; S. N. Poirier, G. Guillemette, B. Spiess, G. Schlewer *J. Med. Chem* **1999**, *42*, 4824-4835.
- ⁶⁴ T. Suzuki, S. T. Suzuki, I. Yamada, Y. Koashi, K. Yamada, N. Chida *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2874-2880.
- ⁶⁵ T. Furumai, K. Takeda, A. Kinumaki, Y. Ito, T. Okuda *J. Antibiotics* **1979**, *32*, 891-899.
- ⁶⁶ H. Tamegai, E. Nango, M. Kuwahara, H. Yamamoto, Y. Ota, H. Kuriki, T. Eguchi, K. Kakinuma *J. Antibiotics* **2002**, *55*, 707-714.
- ⁶⁷ I. Katsuharu, K. Shinichi, M. Kenji, U. Hamao *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1850-1854.
- ⁶⁸ J. Ahlert, J. Distler, K. Mansouri, W. Piepersberg *Arch. Microbiol.* **1997**, *168*, 102-113.
- ⁶⁹ G. N. Gaulton, J. C. Pratt *Seminars in Immunology* **1994**, *6*, 97-104.
- ⁷⁰ A. R. Saltiel *FASEB J.* **1994**, *8*, 1034-1040.
- ⁷¹ L. Stryer *Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1991**.
- ⁷² R. C. Fahey, W. C. Brown, W. B. Adams, M. B. Worsham *J. Bacteriol.*, **1978**, *133*, 1126.
- ⁷³ R. C. Fahey, R. M. Buschbacher, G. L. Newton *J. Mol. Evol.* **1987**, *25*, 81-88.
- ⁷⁴ G. L. Newton, R. C. Fahey, G. Cohen, Y. Aharonowitz *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2734.
- ⁷⁵ G. L. Newton, B. Javor *J. Bacteriol.* **1985**, *161*, 438-441.
- ⁷⁶ S. Sakuda, Z. Y. Zhou, Y. Amada *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1347.
- ⁷⁷ H. S. C. Spies, D. J. Steenkamp *Eur. J. Biochem* **1994**, *224*, 203-213.
- ⁷⁸ G. L. Newton, K. Arnold, M. S. Price, C. Sherrill, S. B. Delcardyre, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, R. C. Fahey und C. Davies *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1990.
- ⁷⁹ G. L. Newton, C. A. Bewley, T. J. Dwyer, R. Horn, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, D. J. Faulkner, R. C. Fahey *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 821-825.
- ⁸⁰ M. Misset-Smits, P. W. van Ophem, S. Sakuda, J. A. Duine *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 221f.
- ⁸¹ M. P. P. Patel, J. S. Blanchard *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1138.
- ⁸² A. Kochi *Tubercle* **1991**, *72*, 1.
- ⁸³ G. Klein, *Dissertation*, Bergische Universität-Gesamthochschule Paderborn, **1992**.
- ⁸⁴ D. Bien, *Dissertation*, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal, **1995**.
- ⁸⁵ O. Block, *Dissertation*, Universität Wuppertal, **2000**.
- ⁸⁶ F., P. Ritter *Dissertation*, Bergische Universität-GH Wuppertal, **1997**.
- ⁸⁷ O. Plettenburg, *Dissertation*, BUGH Wuppertal **2000** und Ref. darin
- ⁸⁸ S. Adelt, O. Plettenburg, R. Stricker, G. Reiser, H.-J. Altenbach, G. Vogel *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1262-1273.
- ⁸⁹ H.-J. Altenbach, H. Stegelmeier, E. Vogel *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *36*, 3333.
- ⁹⁰ H. Stegelmeier, *Dissertation*, Universität Köln, **1979**.
- ⁹¹ O. Block, G. Klein, H.-J. Altenbach, D. J. Brauer *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 716-721.
- ⁹² Y. Watanabe, Y. Comoda, K. Ebisuya, S. Ozaki *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 255.
- ⁹³ C. Sanfilippo, A. Patti, G. Nicolosi *Tetrahedron Asymm.* **1998**, *9*, 2809-2817
- ⁹⁴ A. Kaffee, *angefangene Dissertation* (1995), Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal.
- ⁹⁵ Z. L. Fredericks, J. A. Pitcher, R. J. Lefkowitz, Identification of G-Proteins-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13795 – 13803.

- ⁹⁶ S. G. Ferguson, L. S. Barak, J. Zhang, M. G. Caron, G-Protein-Coupled Receptor Regulation: Role of G-Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1996**, *74*, 1095 – 1110.
- ⁹⁷ M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, β -Arrestin: A Protein that regulates β -Adrenergic Receptor Function *Science* **1990**, *248*, 1547 – 1550.
- ⁹⁸ I. Gaidarov, J. G. Krupnick, J. R. Falck, J. L. Benonvic, J. H. Keen Arrestin function in G-Protein-coupled Receptor Endocytosis Requires Phosphoinositide Binding *EMBO J.* **1999**, *18* (4), 871-881.
- ⁹⁹ R. A. Dixon, B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlman, T. Frielle, M. A. Bolanowski, C. D. Bennett, E. Rands, R. E. Diehl, Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin *Nature* **1986**, *321*, 75 – 79.
- ¹⁰⁰ H. Kurose, M. Isogaya, H. Kikkawa, T. Nagao, Domains of β_1 and β_2 Adrenergic Receptors to Bind Subtype selective Agonist *Life Sciences* **1998**, *62*, 1513 – 1517.
- ¹⁰¹ U. Eidhoff *Dissertation*, Institute for structural Biology, Research Center Jülich, **2001**.
- ¹⁰² T. K. M. Shing, V. W.-F. Tai, E. K. W. Tam *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2408.
- ¹⁰³ T. K. M. Shing, E. K. W. Tam, V. W.-F. Tai, I. H. F. Chung, Q. Jiang, *Chem. Eur. J.*, **1996**, *2*, 50.
- ¹⁰⁴ T. K. M. Shing *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol.7, Pergamon Press, Oxford, **1991**, 703.
- ¹⁰⁵ M. E. Jung *J. Org. Chem.* **1977**, *43*, 3741.
- ¹⁰⁶ M. E. Jung, M. A. Lyster *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3741
- ¹⁰⁷ S.-K. Chung, B.-G. Shin, Y.-T. Chang, B.-C. Suh, K.-T. Kim *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 659.
- ¹⁰⁸ S. J. Mills, B. V. L. Potter *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 1279.
- ¹⁰⁹ H. P. M. Fromageot, C. B. Reese, J. E. Sulston, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 3533.
- ¹¹⁰ A. H. Haines, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1976**, *33*, 11.
- ¹¹¹ M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* **1991**, Auflage 4, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- ¹¹² Pharmacia *Affinity Chromatography* **1991**.
- ¹¹³ P. Zimmermann *Diplomarbeit*, Bergische Universität-GH Wuppertal, **1998**.
- ¹¹⁴ T. W. Greene, P. G. M. Wuts *Protective groups in organic synthesis* Wiley & Sons, New York **1991**.
- ¹¹⁵ R. U. Lemieux, H. Driguez *J. Amer. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4069.
- ¹¹⁶ J. F. King, A. D. Allbutt *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 1754.
- ¹¹⁷ J. F. King, A. D. Allbutt *Tetrahedron Lett.* **1967**, 49.
- ¹¹⁸ P. Deslongchamps *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry* Pergamon Press, Oxford, **1983**.
- ¹¹⁹ O. Hoffmann-Ostenhof, F. Pittner The biosynthesis of *myo*-inositol and it's isomers *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1863 – 1871.
- ¹²⁰ T. H. Chan, L. Jiang *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 355.
- ¹²¹ P. Kocienski *Protecting groups* Thieme Stuttgart New York, **1994**, ISBN 3 13 135601 4.
- ¹²² M., P. De Ninno *Synthesis* **1991**, 583.
- ¹²³ S. J. Danishefsky, M. P. De Ninno, S.-H. Chen *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3929.
- ¹²⁴ S. Adelt, O. Plettenburg, G. Dallmann, F. P. Ritter, S. Shears, H.-J. Altenbach, G. Vogel *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2705-2708.
- ¹²⁵ W. Xie, M. A. Kaetzel, K. S. Bruzik, J. R. Dedman, S. B. Shears, D. J. Nelson *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14092.
- ¹²⁶ X. Yang, S. B. Shears *Biochem. J.* **2000**, *351*, 551.

- ¹²⁷ Sylvia, V., Curtin, G., Norman, J., Stec, J., Busbee, D. *Cell* **1988**, *54*, 651.
- ¹²⁸ J. D. York, J. E. Saffitz, P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.* **1995**, *269*, 19992.
- ¹²⁹ M. Braun *Dissertation*, Bergische Universität-GH Wuppertal **2000**.
- ¹³⁰ a) C., C., R. Prévost *Hebd. Seances Acad. Sci.* **1933**, *196*, 1129. b) C., C., R. Prévost *Hebd. Seances Acad. Sci.* **1933**, *197*, 1661.
- ¹³¹ M. Sirén, U.S. Patent No. 4,851,560.
- ¹³² C. Blum, S. Karlsson, G. Schlewer, B. Spiess, N. Rehnberg *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7239-7242.
- ¹³³ S. Adelt, M. Podeschwa, G. Dallmann, H.-J. Altenbach, G. Vogel, *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 1, 42-65.
- ¹³⁴ Y. Nakamura, H. Fukuhara, K. Sano *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 841-844.
- ¹³⁵ N. R. Nayini, P. Markakis *Lebensm. Wiss. und Technol.* **1984**, *17*, 24-26.
- ¹³⁶ H. Sirén *Inositolphosphates and Derivatives, Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential* (Reitz, A., Ed.) **1991**, ACS Symposium Series *463*, pp. 103-110 ACS, Washington, DC.
- ¹³⁷ O. Block, *Diplomarbeit*, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal, **1995**.
- ¹³⁸ B. M. Trost, E. J. Hembre *Tetrahedron Letters* **1999**, 219-222.
- ¹³⁹ J. E. Innes, P. Edwards, S. Ley *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, *6*, 795-796.
- ¹⁴⁰ A. Fuerst, A. Plattner *Abstracts of Papers, 12th International Congress of Pure and Applied Chemistry* **1951**, 409.
- ¹⁴¹ H. Seçen, A. Maraş, Y. Sütbeyaz, M. Balci *Synthetic Communications* **1992**, *22* (18), 2613-2619.
- ¹⁴² R. B. Woodward, F. B. Brutcher, Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 209.
- ¹⁴³ [a] S. Winstein, R. E. Buckles *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 2780. [b] S. Winstein, R. E. Buckles *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 2787. [c] S. Winstein, H. Hess, R. E. Buckles *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 2796.
- ¹⁴⁴ A. Haines, A. King, J. Knight, V.-A. Nguyen *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 4393.
- ¹⁴⁵ S. J. Angyal, D. C. Craig *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 149-154.
- ¹⁴⁶ R. U. Lemieux, H. Driguez *J. Amer. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 4069.
- ¹⁴⁷ Deslongchamps, P. *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, **1983**.
- ¹⁴⁸ S. Ballereau *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4824-4835.
- ¹⁴⁹ J. Dvořáková *Folia Microbiol.* **1998**, *43*, 323-338.
- ¹⁵⁰ J., Kerovuo, J., Rouvinen, F. Hatzack *Biochem. J.* **2000**, *352*, 623-628.
- ¹⁵¹ IUPAC and IUPAC-IUB Recommendations *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57*, 1-7.
- ¹⁵² A. B. Malmberg, B. Fallgren, T. Hedner *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *294*, 609-615.
- ¹⁵³ I. D. Spiers, C. J. Barker, S.-K. Chung, Y.-T. Chang, S. Freeman, J.-M. Gardiner, P. H. Hirst, P. A. Lambert, R. H. Michell, D. A. Poyner, C. H. Schwalbe, A. W. Smith, K. R. H. Solomons *Carbohydr. Res.* **1996**, *282*, 81-99.
- ¹⁵⁴ X. Shen, C. M. Weaver, A. Kempa-Steczko, B. R. Martin, B. Q. Phillippy, R. P. Heaney *J. Nutr. Biochem.* **1998**, *9*, 298-301.
- ¹⁵⁵ T. Masuda, K.-i. Kitahara, Y. Aikawa, S. Arai *Analytical Science*, **2001**, *Vol. 17* supplement, i895-i898.
- ¹⁵⁶ G., Ashwell, A., G. Marell, *Adv. Enzymol.* **1974**, *41*, 99.
- ¹⁵⁷ U. Pfüller, W. Göckeritz, K. Pfüller *EU Proceedings* **1997**, *5*.
- ¹⁵⁸ *Biotechnology Handbook*, Pharmacia Biosensor, Uppsala (Schweden).
- ¹⁵⁹ C. Bornemann, M. A. Jardine, H. S. C. Spies, D. J. Steenkamp *Biochem J.*, **1997**, *325*, 623.
- ¹⁶⁰ W. Koenigs, E. Knorr *Chem. Ber.*, **1901**, *34*, 957.

- ¹⁶¹ M. A. Jardine, H. S. C. Spiess, C. M. Nkambule, D. W. Gammon, D. J. Steenkamp *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 875-881.
- ¹⁶² G. M. Nicholas, P. Kováč, C. A. Brewley *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3492-3493.
- ¹⁶³ S. Takuma, Y. Hamada, T. Shioiri *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 3147-3153.
- ¹⁶⁴ G. L. Newton, Y. Av-Gay, R. C. Fahey *Biochemistry* **2000**, *39*, 10739-10746.
- ¹⁶⁵ T. Doering, W. J. Masterson, P. T. Englund, G. W. Hart *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11168.
- ¹⁶⁶ B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1933**, *66*, 378.
- ¹⁶⁷ W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.*, **1901**, *34*, 957.
- ¹⁶⁸ R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.*, **1980**, *92*, 763-764.
- ¹⁶⁹ T. Tsukida, M. Yoshida, K. Kurokawa, Y. Nakai, T. Achiha, T. Kiyoi, H. Kondo *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 6876.
- ¹⁷⁰ D. Urban, T. Skydstrup, J.-M. Beau *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2507.
- ¹⁷¹ R. R. Schmidt, G. Grundler *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826.
- ¹⁷² M. A. Nashed, C. W. Shife, M. Kiso, N. Anderson *Carbohydr. Res.* **1980**, *82*, 237.
- ¹⁷³ V. K. Shrivastava *Carbohydr. Res.* **1982**, *103*, 286.
- ¹⁷⁴ H. Paulsen *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184.
- ¹⁷⁵ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe *Ger. Off.* 2.816.340, (**19. Oct. 1978**).
- ¹⁷⁶ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe *Chem. Abstr.* **1979**, *90*, 87846k..
- ¹⁷⁷ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244.
- ¹⁷⁸ W. S. Trahanovsky, M. D. Robbins *J. Amer. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 5256.
- ¹⁷⁹ R. R. Schmidt, G. Grundler *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826.
- ¹⁸⁰ J. Honeyman, J. W. W. Morgan *J. Chem. Soc.* **1955**, 3660.
- ¹⁸¹ R. R. Schmidt, W. Kinzy *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1537.
- ¹⁸² J. J. Ritter *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 4045.
- ¹⁸³ J. J. Ritter *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 763.
- ¹⁸⁴ D. G. Nelson in S. Patai: *The Chemistry of Amides and Imidates*, Wiley, London, **1975**, 385.
- ¹⁸⁵ R. R. Schmidt, J. Michel *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763-764.
- ¹⁸⁶ R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1343.
- ¹⁸⁷ H. Dietrich, J. F. Espinosa, J. L. Chiara, J. Jimenez-Barbero, Y. Lein, I. Varela-Nieto, J.-M. Mato, F. H. Cano, C. Foces-Foces, M. Martin-Lomas *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 321-336.
- ¹⁸⁸ R. Wischnat, persönl. Mitteilung, **1998**
- ¹⁸⁹ G. Grundler, *Dissertation*, Universität Konstanz, **1983**.
- ¹⁹⁰ R. R. Schmidt in *Carbohydrates – Synthetic methods and application sin medical chemistry* (Hrsg.: H. Ogura, A. Hasegawa, T. Suami), Kodansha (Tokio) / VCH (Weinheim, New York, Cambridge, Basel), **1992**, 66.
- ¹⁹¹ D. M. Whitfield, S. P. Douglas, T.-H. Tang, I. G. Czismadia, H. Y. S. Pang, F. L. Moolten, J. J. Krepinsky *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 2225
- ¹⁹² M. Karplus *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11.
- ¹⁹³ U. Greilich, R. Brescello, K.-H. Jung, R. R. Schmidt *Liebigs Ann. Org. Bioorg. Chem.* **1996**, *5*, 663.
- ¹⁹⁴ H. Paulsen, M. Schueller *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 249.
- ¹⁹⁵ M. Wilstermann, G. Magnusson *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7961.
- ¹⁹⁶ H. Paulsen, D. Schnell *Chem. Ber.* **1981**, 333-345.

- ¹⁹⁷ H. Lindlar, R. Dobois *Org. Syn.* **1975**, *5*, 880.
- ¹⁹⁸ J. C. D. Müller, E. G. von Roedern, F. Grams, H. Nagase, L. Moroder *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1475
- ¹⁹⁹ J. C. Sheehan, S. L. Ledis *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 875.
- ²⁰⁰ H. Staudinger, E. Hauser *Helv. Chim. Acta* **1921**, 861.
- ²⁰¹ N. Knouzie, M. Vaultier, R. Carrie *Bull. Soc. Chim. D. France* **1985**, 815.
- ²⁰² Y. G. Gololobov, I. N. Zhmurova, L. F. Kasukin *Tetrahedron* **1981**, *37*, 437.
- ²⁰³ D. Xiao, M. D. Vera, B. Liang, M. M. Joullié *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2734-2742.
- ²⁰⁴ J. B. Hendrickson, M. L. Maddox, J. J. Sims, H. D. Kaesz *Tetrahedron* **1964**, *20*, 449-459
- ²⁰⁵ L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- ²⁰⁶ L. Carpino *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- ²⁰⁷ T. Suami, S. Ogawa *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 21.
- ²⁰⁸ [a] A. Isogai, S. Sakuda, J. Nakajama, S. Watanabe, A. Suzuki *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 2277. [b] T. Mahmud, I. Tornus, E. Egelkrout, E. Wolf, C. Uy, H. G. Floss, S. Lee *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6973.
- ²⁰⁹ P. Kapferer, F. Sarabia, A. Vasella *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 645 und Refs. darin.
- ²¹⁰ Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshikawa, K. Matsui *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1624.
- ²¹¹ [a] A. Bardsley-Elliot, S. M. Noble *Drugs* **2000**, *59*, 179. Für antibiotische Aktivität siehe: [b] Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshikawa, M. Takeuchi, T. Yamaguchi, K. Matsui *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1301. [c] Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshikawa, K. Matsui, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1575.
- ²¹² [a] Atsumi, S.; Iinuma, H.; Nosaka, C.; Umezawa, K. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1579. [b] Atsumi, S.; Umezawa, K.; Iinuma, H.; Naganawa, H.; Iitaka, Y.; Takeuchi T. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 49.
- ²¹³ F. Meier, Diplomarbeit, Universität Wuppertal, voraussichtlich **2003**.
- ²¹⁴ H. Bischoff, H. J. Ahr, D. Schmidt Stolefuß *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1994**, *42*, 1119.
- ²¹⁵ C.-S. Zhang, A. Stratmann, O. Block, R. Brückner, M. Podeschwa, H.-J. Altenbach, U. Wehmeier, W. Piepersberg, Biosynthesis of the C₇-cyclitol moiety of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110: 7-O-phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathway, *J. Biol. Chem.* **2002**, Vol. *277*, *25*, 22853-22862.
- ²¹⁶ A. Stratmann, T. Mahmud, S. Lee, J. Distler, H. G. Floss, W. Piepersberg *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10889-10896.
- ²¹⁷ B. Breit; W. Seiche *Synthesis* **2001**, *1*, 1-36.
- ²¹⁸ B. Breit, R. Winde, T. Mackewitz, R. Paciello, K. Harms *Chem. Europ. J.* **2001**, *14*, 3106-3121.
- ²¹⁹ H. Schumann, O. Stenzel, S. Dechert, F. Girgsdies, J. Blum, D. Gelman, R. Halterman *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, *1*, 211-220.
- ²²⁰ K. Block, J. F. B. Guzman *Carbohydr. Res.* **1988**, *174*, 354-359.
- ²²¹ S. Ogawa, Y. Iwasawa, T. Tetsuo *Chem. Lett.* **1984**, 355-356.
- ²²² G. M. Nocolas, P. Kováč, C. A. Bewley *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3492-3493.
- ²²³ G. M. Mayr in *Methods in Inositide Research* (R. F. Irvine, Ed.), **1990**, Raven Press, New York, 83-108.
- ²²⁴ A. Kaffee, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal, mündliche Mitteilung.
- ²²⁵ D. Müller, G. Vic, L. Roberts, J. M. Lord *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 2287
- ²²⁶ H. Paulsen, W. Roeben *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, *5*, 974-994.
- ²²⁷ Olesker et al. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 490.
- ²²⁸ K. Inuma et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1850-1854.

²²⁹ C. Sanfilippo, A. Patti, M. Piattelli, G. Nicolosi, *Tetrahedron Asymm.* **1997**, *10*, 1569-1573.

²³⁰ Liu, Ch., Davis, R., Nahorski, S., Ballereau, S., Spiess, B., Potter, B. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1991-1998.

²³¹ Hyldhoff, L., Madsen, R., *J. Amer. Chem. Soc.*, **2000**, *35*, 8444.

²³² Posternack, *Helv. Chim.* **1955**, 195