

**Chemo(und)informatik-getriebene  
Wirkstoffsynthese: neuartige Macrosphelid-Analoga  
als potente Mikrotubulistabilisatoren**

**Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung**

**Vorgelegt von  
Sebastian Schmidt  
aus Göppingen**

**Hauptberichter: Prof. Dr. Bernd Plietker**

**Mitberichterin: Prof. Dr. Sabine Laschat**

**Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 2013**

**Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart**

**2013**



Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd Plietker in der Zeit von Februar 2009 bis Februar 2013 an der Universität Stuttgart.

## **Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Chemo(und)informatik-getriebene Wirkstoffsynthese: neuartige Macrospinelid-Analoga als potente Mikrotubulistabilisatoren“

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

## **Declaration of Authorship**

I hereby certify that the dissertation entitled

“Chemo(and)informatics-driven drug synthesis: Novel Macrospinelide analogs as potent microtubule-stabilizing agents”

is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Name/Name: Sebastian Schmidt

Unterschrift/Signed: \_\_\_\_\_

Datum/Date: 27.02.2013 / 27 February 2013

*Für meine Familie*



*“As an adolescent I aspired to lasting fame, I craved factual certainty, and I thirsted for a meaningful vision of human life – so I became a scientist. This is like becoming an archbishop so you can meet girls.”*

*(Als Jugendlicher sehnte ich mich nach Ruhm und Anerkennung, ich suchte nach absoluten Gewissheiten und durstete nach einer sinnvollen Vision für mein weiteres Leben – also wurde ich Wissenschaftler. Das ist vergleichbar mit der Entscheidung, Erzbischof zu werden, um so an Frauen heranzukommen.)*

Dr. Matt Cartmill (Biologischer Anthropologe)





## Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	13
1. Einleitung.....	17
1. 1. Chemische Evolution.....	17
1. 2. Methoden der Wirkstoffentwicklung .....	19
1. 2. 1. Liganden-basiertes virtuelles Screening.....	20
1. 2. 2. Rezeptor-basiertes virtuelles Screening .....	21
1. 2. 3. Substanzbibliotheken .....	23
1. 3. Die Familie der Macrospheleide .....	24
1. 3. 1. Struktur und biologische Aktivität .....	24
1. 3. 2. Totalsynthesen der Macrospheleide.....	26
1. 4. Die Mikrotubuli.....	28
1. 4. 1. Struktur und Aufbau der Mikrotubuli .....	28
1. 4. 2. Die Funktionen der Mikrotubuli.....	30
2. Problemstellung .....	31
2. 1. Erweiterung einer Macrospheleide-Bibliothek.....	31
2. 2. Studien zur biologischen Aktivität .....	34
3. Aufbau der ( <i>R</i> )-Serie einer Bibliothek nicht-natürlicher Macrospheleide-Analoga.....	36
3. 1. Darstellung von ( <i>R</i> )-3-Hydroxybuttersäure- <i>tert</i> -butylester ( <i>R</i> )-41 .....	36
3. 2. Optimierungsversuche zur Ketohydroxylierung.....	39
3. 3. Aufbau der ( <i>R</i> )-Serie der Macrospheleide-Bibliothek.....	41
3. 3. 1. Darstellung der nicht natürlichen Macrospheleide mit <i>cis</i> -Konfiguration .....	41
3. 3. 2. Darstellung der Diketon-Macrospheleide .....	43
3. 3. 3. Zusammenfassung .....	43
4. Theoretische Studien zur biologischen Aktivität .....	44
4. 1. Die Target-Hypothese .....	45
4. 2. Identifizierung von flexiblen Aminosäureresten am Tubulin .....	45
4. 2. 1. Das Auswahlschema.....	46
4. 2. 2. Das Proteinalignment.....	46

4. 2. 3. Verbesserte Vorhersage der Struktur 1tvk .....	47
4. 3. Normalisierung der Affinitäten .....	48
4. 4. Auswertung der Docking-Strukturen .....	52
4. 5. Ergebnis des virtuellen Screenings.....	55
4. 6. Zusammenfassung .....	57
5. Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Aktivität .....	58
5. 1. Testen der gesamten Bibliothek .....	58
5. 2. Schlussfolgerungen und Diskussion .....	60
5. 3. Zusammenfassung .....	61
6. Virtuelle Generierung von zufälligen Molekülstrukturen.....	63
6. 1. Motivation .....	63
6. 2. Repräsentation von Molekülstrukturen .....	63
6. 3. Die SMILES-Notation .....	64
6. 4. Implementierung.....	65
6. 5. Evolution vorgegebener Strukturen .....	67
6. 6. Zusammenfassung .....	68
7. Zusammenfassung und Ausblick .....	70
8. Allgemeine Angaben.....	75
8. 1. Analytik.....	75
8. 2. Chromatographie.....	75
8. 3. Proteinassays.....	76
8. 4. Computersimulationen.....	76
9. Präparative Arbeiten .....	77
9. 1. Darstellung von <i>tert</i> -Butylsorbit 16.....	77
9. 2. Darstellung von ( <i>R</i> )- <i>tert</i> -Butyl-3-hydroxybutyrat ( <i>R</i> )-41 .....	78
9. 3. Darstellung von ( <i>rac</i> )- <i>tert</i> -Butyl-3-hydroxybutyrat ( <i>rac</i> )-41 .....	78
9. 4. Darstellung von <i>tert</i> -Butyl-3-oxo-pentanoat 46.....	79
9. 5. Darstellung von <i>tert</i> -Butyl-3-oxo-hexanoat 47.....	79
9. 6. Darstellung <i>tert</i> -Butyl-5-methyl-3-oxo-hexanoat 48.....	80

9. 7. Darstellung von ( <i>R</i> )- <i>tert</i> -Butyl-3-hydroxypentanoat 49 .....	81
9. 8. Darstellung von ( <i>rac</i> )- <i>tert</i> -Butyl-3-hydroxypentanoat ( <i>rac</i> )-49 .....	82
9. 9. Darstellung von ( <i>R</i> )- <i>O</i> -Acetylmandelsäure .....	82
9. 10. Darstellung von ( <i>R</i> )-3-(( <i>R</i> )-2-Acetoxy-2-phenylacetyl)- <i>tert</i> -butylpentanoat.....	83
9. 11. Darstellung von ( <i>rac</i> )-3-(( <i>R</i> )-2-Acetoxy-2-phenylacetyl)- <i>tert</i> -butylpentan-oat .....	84
9. 12. Darstellung von ( <i>rac</i> )-( <i>E</i> )- <i>tert</i> -Butyl-5-hydroxy-4-oxo-hex-2-enoat 39 .....	84
9. 13. Darstellung von ( <i>R</i> )-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-4-( <i>tert</i> -Butoxy)-4-oxobutan-2-yl-hex-2,4-dienoat ( <i>R</i> )-42 .....	85
9. 14. Darstellung von (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-( <i>R</i> )-4-((( <i>S</i> , <i>E</i> )-6-( <i>tert</i> -Butoxy)-3,6-dioxohex-4-en-2-yl)oxy)-4-oxobutan-2-yl-hexa-2,4-dienoat ( <i>R</i> )-43.....	86
9. 15. Darstellung von ( <i>E</i> )-(( <i>S</i> )-4-(( <i>E</i> )-6- <i>tert</i> -Butoxy-3,6-dioxo-hex-4-en-2-yloxy)-4-oxo-butan-2-yl)-4,5-dihydroxyhex-2-enoat ( <i>R</i> )-44 .....	87
9. 16. Darstellung von (4 <i>S</i> )-(7 <i>E</i> ,13 <i>E</i> )-9-Hydroxy-4,10,16-trimethyl-1,5,11-trioxacyclohexadeca-7,13-dien-2,6,12,15-tetraon ( <i>cis</i> ,9 <i>R</i> )-5 .....	88
9. 17. Darstellung von (4 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,13 <i>E</i> ,-)4,10,16-trimethyl-1,5,11-trioxacyclohexa-deca-7,13-diene-2,6,9,12,15-pentaon (9 <i>R</i> )-45 .....	91
9. 18. Asymmetrische Reduktion mit <i>L</i> -Weinsäure .....	94
10. Durchführung der Computersimulationen.....	95
10. 1. Erzeugen der Decoy-Bibliotheken und Vorbereiten der Dateien .....	95
10. 2. Vorbereitung der Koordinaten-Dateien der Kandidaten .....	104
10. 3. Durchführung der Dockings .....	105
10. 4. Automatische Auswertung der Dockings .....	106
10. 4. 1. Programm zur Berechnung der p-Werte.....	106
10. 4. 2. Programm zur Berechnung der Distanzen zum M-Loop.....	109
11. Durchführung der Proteinassays.....	114
11. 1. Vorbereitung der Proben .....	114
11. 2. Durchführung des Assays.....	114
11. 3. Messkurven der nicht aktiven Kandidaten .....	114
11. 4. Messkurven des aktiven Kandidaten .....	118
11. 5. Rohdaten der Polymerisationsassays.....	120

12. Literaturverzeichnis.....	128
13. Abstract .....	134
14. Lebenslauf .....	136
Danksagung .....	137

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
abs.	absolutiert
Abschn.	Abschnitt
Ac	Acetyl
ADH	Alkoholdehydrogenase
Äq.	Äquivalent(e)
Arg	Arginin
ASCII	American Standard Code for Information Interchange (Zeichencodierung)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BASIC	Beginner's All-Purpose Symbolic Instruction Code (Programmiersprache)
BINAP	(2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphtyl)
Bn	Benzyl
Bu	Butyl
bzw.	beziehungsweise
CASE	Computer-assisted structure elucidation
CHARMM	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics (Sammlung von Kraftfeldern für Moleküldynamik-Berechnungen)
CI	chemische Ionisierung
CSA	Camphersulfonsäure
d	days; Tage
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
d. h.	das heißt
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMP	DESS-MARTIN-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTS	diversitätsorientierte Totalsynthese
EbN1	Aromatoleum aromaticum
ee	enantiomeric excess; Enantiomerenüberschuss
eV	Elektronenvolt
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure

EI	Electron Impact (Elektronenstoß-Ionisierung)
ESI	Electrospray-Ionisierung
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und Andere
etc.	et cetera
GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
ges.	gesättigt
ggf.	gegebenenfalls
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks (anonymisiert: "Helen Lane")
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HTS	High Throughput Screening (Hochdurchsatzscreening)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell(s) (menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzelle(n))
Hz	Hertz
<i>i</i>	iso
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
InChI	International Chemical Identifier
IR	Infrarot(spektroskopie)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
konz.	konzentriert
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphatpuffer
L	Liter
LB	Lactobacillus
mL	Milliliter
mM	millimolar
M	molar (Konzentration)
Me	Methyl

MEM	(2-Methoxyethoxy)methyl
min.	Minuten
MM2	Molecular Mechanics 2 (Kraftfeld für Moleküldynamik-Berechnungen)
MNBA	6-Methyl-2-Nitrobenzoesäureanhydrid
MS	Massenspektrometrie
MT	Mikrotubuli
<i>n</i>	normal
N	normal (Äquivalentkonzentration)
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
o. a.	oben angeführt
OD	optische Dichte
PDB	Protein Database (Proteindatenbank und Dateiformat)
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
pM	picomolar
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
ppm	parts per million (Verhältnis, 10 <sup>-6</sup> )
Pr	Propyl
PSA	Polar Surface Area (polare Moleküloberfläche)
R	Rest
rac	racemisch
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RCM	Ringschlussmetathese
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Sdp.	Siedepunkt
SDF	Structure Data Format
SDS	sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
SLeX	Sialyl Lewis X
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Darstellung von Molekülstrukturen als Zeichenketten)
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
<i>tert/t</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure

THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
U	Units (Proteinaktivität)
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VIRGIM	Virtual generation of incidental molecules (virtuelle Erzeugung von Molekülstrukturen)
VS	virtuelles Screening
z. B.	zum Beispiel

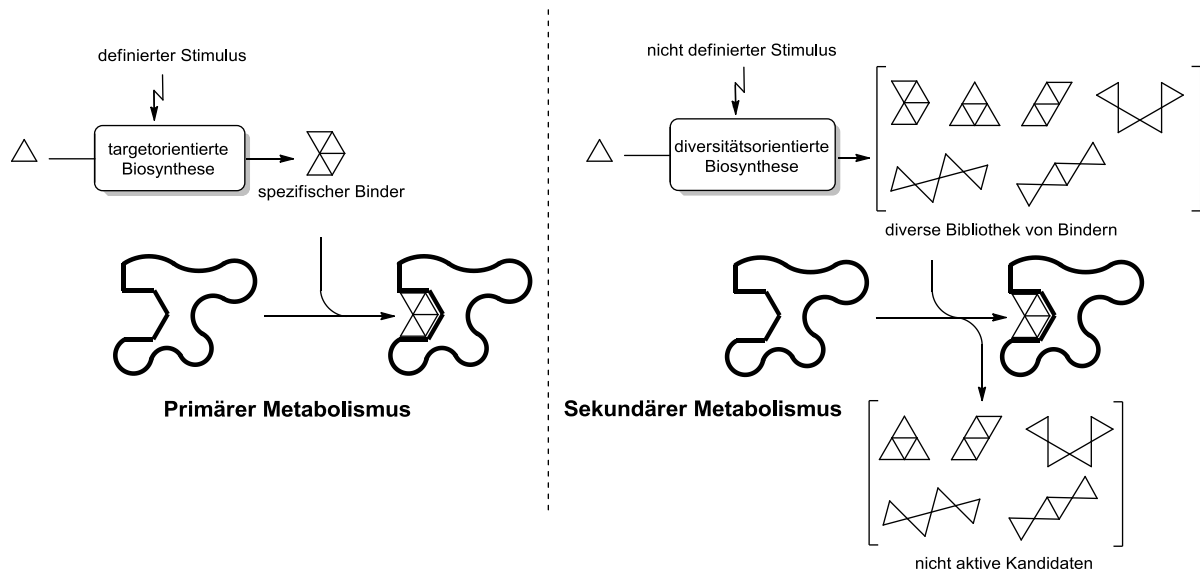


# 1. Einleitung

## 1. 1. Chemische Evolution

In der Natur finden sich häufig Naturstofffamilien, d. h. strukturell ähnliche Verbindungen, die alle aus demselben Organismus isoliert werden können. Beispiele hierfür sind etwa die Vinca-Alkaloide<sup>1</sup>, die Epothilone<sup>2</sup> oder die Taxane<sup>3</sup>, um nur wenige zu nennen. Es stellt sich nun die Frage, warum überhaupt ein Organismus nicht nur selektiv eine Verbindung, sondern eine Klasse von strukturell ähnlichen Verbindungen aufbaut. Eine Antwort auf diese Frage gibt die „Screening Hypothese“ von JONES und FIRN. Zentrale Überlegung dabei ist, wie ein Organismus eine Verbindung findet bzw. entwickelt, die eine ganz bestimmte Funktion für den Organismus erfüllt, also eine bestimmte biologische Aktivität besitzt. Der Screening Hypothese liegt die Annahme zugrunde, dass biologische Aktivität eine seltene Eigenschaft eines Moleküls ist. Demnach ist es wohl eher unwahrscheinlich, dass ein Organismus einen hochselektiven Syntheseweg entwickelt, der zu einer einzigen Zielverbindung führt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit keine für den Organismus nützliche Aktivität besitzt. Vielmehr begünstigt die Evolution Organismen, die „chemische Diversität“ günstig erzeugen und beibehalten können. Solche Organismen sind im Stande, große Substanzbibliotheken zu „screenen“, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine (sehr seltene) biologisch aktive Verbindung hervorzubringen.<sup>4</sup>

Dies erklärt allerdings nur das Vorkommen von Naturstoff*familien*, nicht jedoch das Vorkommen von anderen Naturstoffen, die Produkte von hochselektiven Biosynthesewegen sind und nicht zusammen mit strukturell ähnlichen Verbindungen vergesellschaftet vorkommen. Neben dem oben beschriebenen diversitätsorientierten Biosyntheseweg, dem sekundären Metabolismus, existiert ein weiterer sog. primärer Metabolismus, der eine Verbindung hochselektiv aufbaut (Schema 1.1). Der primäre Metabolismus ist ständig aktiv und ermöglicht den gezielten Aufbau der ständig benötigten Verbindungen, wie z. B. Tryptophan oder Cholesterol.<sup>5</sup>

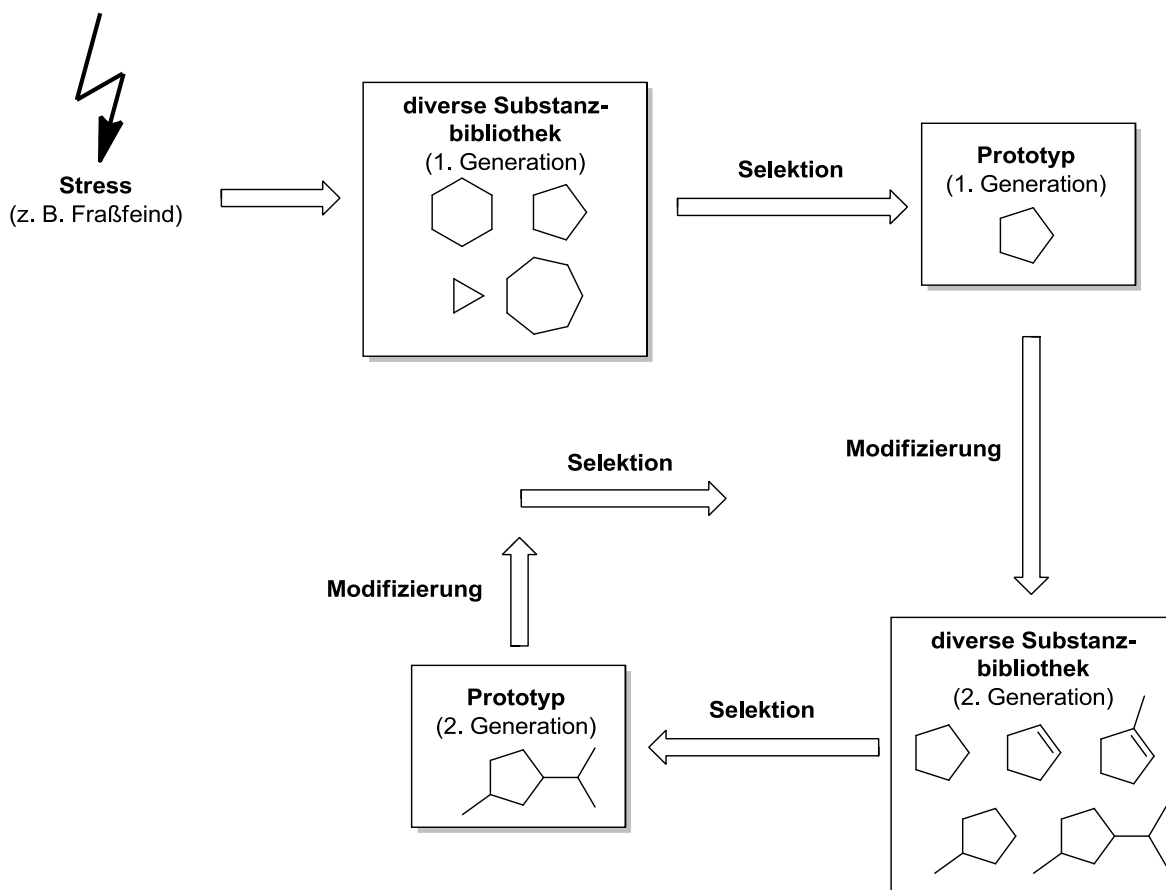


**Schema 1.1: Der primäre und sekundäre Metabolismus**

Der sekundäre Metabolismus dagegen wird aktiviert als Reaktion auf einen äußeren Umwelteinfluss bzw. Stress, z. B. einen Fraßfeind (Schema 1.2). Der Organismus baut eine diverse Bibliothek von Verbindungen auf, die nun der Selektion unterliegen. Im Laufe der Evolution überleben somit nur Phänotypen, die eine Verbindung hervorgebracht haben, die in angemessener Weise auf den Stress reagieren kann, also z. B. den Fraßfeind abzuwehren im Stande ist. Dieser Prototyp wird dann weiter modifiziert, indem erneut eine diverse Substanzbibliothek aufgebaut wird, deren Vertreter strukturell auf diesem ersten Prototypen basieren. Diese Bibliothek unterliegt wieder der Selektion, was einen Prototyp der zweiten Generation hervorbringt. Es werden schließlich mehrere Zyklen aus diversitätsorientierter Synthese und Selektion durchlaufen und es ist davon auszugehen, dass dieses System bei hinreichend großer Zeitkoordinate konvergiert und am Ende eine Verbindung resultiert, die optimal auf den Stress reagieren kann, also z. B. den Fraßfeind in optimaler Weise bekämpfen kann.

Wenn nun ein optimaler Naturstoff gefunden worden ist, wird die Information über seine Biosynthese Bestandteil des genetischen Codes und der primäre Metabolismus wird aktiviert. Der optimale Naturstoff wird dann also hochselektiv aufgebaut, was natürlich ökonomischer ist.

Dies kann in einem anschaulichen Vergleich zusammengefasst werden: Wenn man den Organismus mit einem Unternehmen vergleicht, dann ist der sekundäre Metabolismus die Entwicklungsabteilung und der primäre Metabolismus kann als die Produktionsabteilung angesehen werden.



**Schema 1.2: Die chemische Evolution**

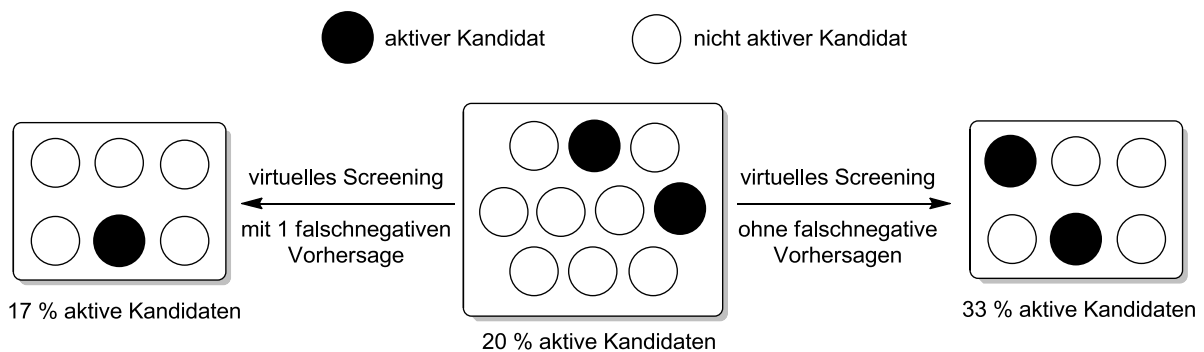
## 1. 2. Methoden der Wirkstoffentwicklung

Dass biologische Aktivität eine seltene Eigenschaft einer Verbindung ist, zeigt sich auch in der Wirkstoffentwicklung. In der Regel werden große Substanzbibliotheken gegen ein bestimmtes Target, z. B. ein Protein, gescreent, um einen potentiellen Wirkstoff zu identifizieren. Dieser Vorgang entspricht dem ersten Selektionsschritt der chemischen Evolution (Schema 1.2). Die Diversität solcher Bibliotheken ist hierbei ein entscheidender Faktor, denn je diverser eine Bibliothek ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, eine aktive Verbindung zu finden.

Die Substanzbibliotheken, die dabei zum Einsatz kommen, enthalten sowohl kommerziell erhältliche Verbindungen, als auch Verbindungen, die etwa durch kombinatorische Chemie oder Click-Chemie aufgebaut werden können. Die Screeningverfahren sind automatisierte Assays, in denen eine Vielzahl von Verbindungen innerhalb kurzer Zeit getestet werden kann (sog. Hochdurchsatzscreenings, HTS, „high throughput screening“).

Eine immer größer werdende Rolle spielen hierbei auch die Chemo- und Bioinformatik. Durch computergestützte Verfahren werden Substanzbibliotheken zunächst virtuell gescreent, um den Aufwand experimenteller Hochdurchsatzscreenings zu minimieren.

Ziel eines virtuellen Screenings ist es, eine Substanzbibliothek „anzureichern“, d. h. den Anteil an aktiven Kandidaten zu erhöhen (Schema 1.3). Voraussetzung hierfür ist, dass möglichst viele nicht aktive Kandidaten (sog. Negative) aus der Bibliothek entfernt werden und dass diese Vorhersagen korrekt sind; es sollten also möglichst wenige (im Idealfall keine) falschnegativen Vorhersagen getroffen werden. Im Gegensatz hierzu sind falschpositive Vorhersagen weniger problematisch, weil dabei keine aktiven Kandidaten aus der Bibliothek entfernt werden und sich der Anteil an aktiven Kandidaten trotzdem erhöhen kann.



**Schema 1.3: Virtuelles Screening**

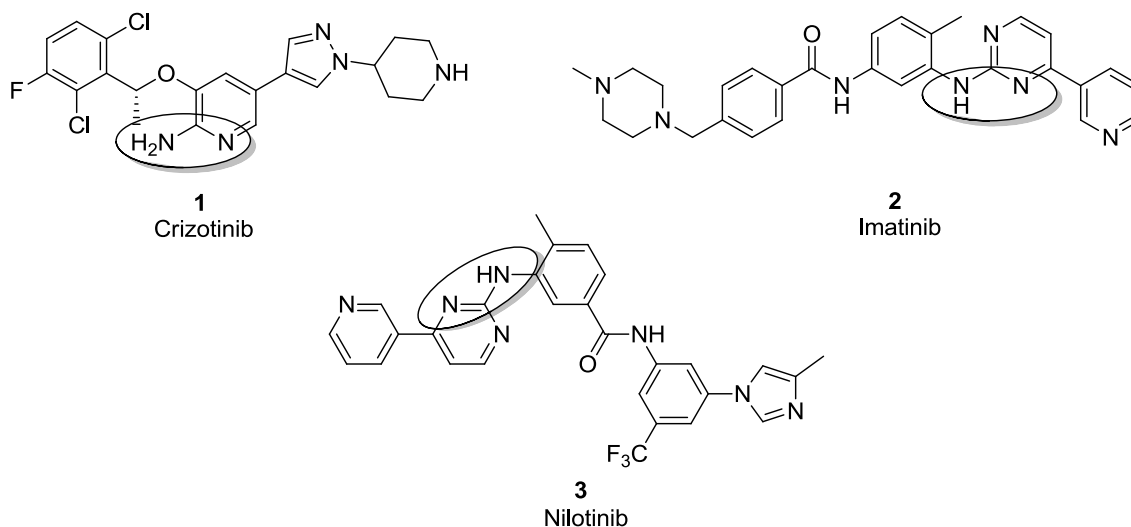
Grundlegend kann zwischen zwei Arten von virtuellem Screening unterschieden werden: dem Liganden-basierten („ligand-based“) und dem Target-basierten („receptor-based“ oder „target-based“) virtuellen Screening.<sup>6-8</sup>

### 1. 2. 1. Liganden-basiertes virtuelles Screening

Bei einem Liganden-basierten virtuellen Screening werden strukturelle Merkmale von Wirkstoffen mit bekannter Aktivität herangezogen.<sup>9</sup> Mit diesen Informationen kann ein Pharmakophor formuliert werden, d. h. eine Menge von strukturellen Eigenschaften, die für die biologische Aktivität essentiell sind. So weisen z. B. viele Kinaseinhibitoren ein bestimmtes Bindungsmotiv auf, das sog. „hinge binding“-Motiv, das von 2-Aminopyridin abgeleitet ist (Abb. 1.1).<sup>10</sup> Kinasen sind Enzyme, die einen Phosphatrest auf ein Protein übertragen; es werden meist Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen werden von der Natur oft genutzt, um die Funktion eines Proteins an- oder auszuschalten und spielen deshalb eine entscheidende Rolle bei der Regulation

zahlreicher Prozesse in der Zelle. Klinisch werden Kinaseinhibitoren in der Therapie von Tumorerkrankungen genutzt.<sup>11</sup>

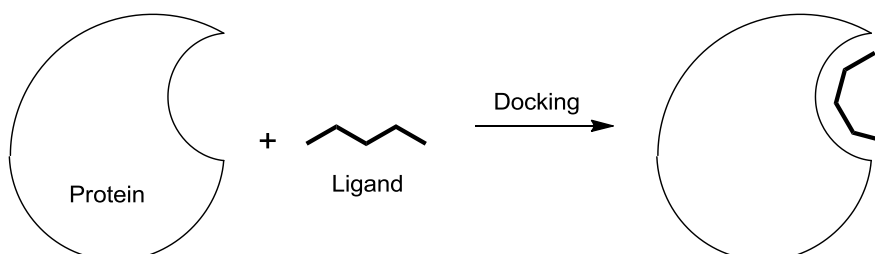
Die Aufgabe eines Liganden-basierten Screenings besteht nun darin, aus einer großen Fülle an zur Verfügung stehenden, kommerziell erhältlichen oder synthetisierbaren Verbindungen diejenigen zu finden, die das Pharmakophor enthalten. Ein Liganden-basiertes virtuelles Screening ermöglicht zwar nur eine grobe Abschätzung der Aktivität, bietet jedoch den Vorteil, dass kein Target bekannt sein muss.



**Abbildung 1.1: Beispiele für Kinaseinhibitoren**

### 1. 2. 2. Rezeptor-basiertes virtuelles Screening

Ein Rezeptor-basiertes virtuelles Screening erfordert ein bekanntes Target. Ein breit angewendetes Verfahren stellt hier das Docking dar. Beim Docking wird die energetisch günstigste Orientierung und Konformation eines Wirkstoffkandidaten, des Liganden, in der Bindungstasche des Targets berechnet (Schema 1.4).<sup>8</sup>



**Schema 1.4: Docking**

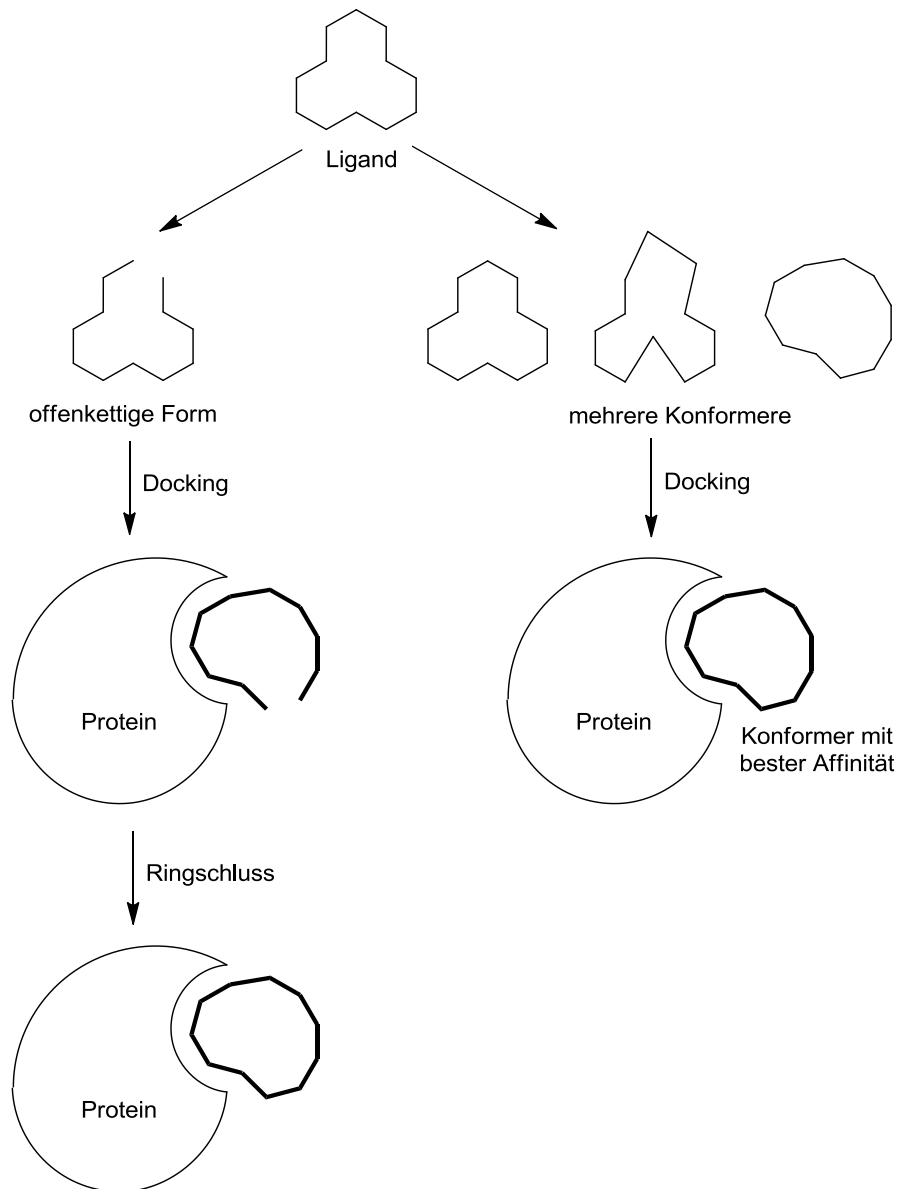
Dabei wird die Oberfläche des Proteins mit einer „grid map“ überzogen, d. h. einem Netz, dessen Punkte zusätzlich zu ihren räumlichen Koordinaten Partialladungen enthalten. Auch

die Atome des Liganden werden mit Partialladungen versehen. Es werden dann mithilfe einer „Scoring-Funktion“ die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein berechnet. Solche Wechselwirkungen sind im Wesentlichen (absteigend nach ihrer Stärke): Wasserstoffbrücken-bindungen, polare Wechselwirkungen und VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen. Dabei wird das Protein als vollständig rigide oder allenfalls teilweise flexibel behandelt, während der Ligand vollständig flexibel behandelt wird. Eine Ausnahme bilden zyklische Strukturen innerhalb des Liganden: Bindungen, die Teil von Ringen sind, werden generell als nicht rotierbar betrachtet. Dies bedeutet, dass die Ausgangskonformation eines zyklischen Liganden beim Docking erhalten bleibt. Diese Näherung mag bei kleinen Ringen (Fünf- oder Sechsringe) zu keiner großen Verfälschung des Ergebnisses führen, da solche Ringe selbst in Proteinen-Ligand-Komplexen erwartungsgemäß die energetisch günstigste Konformation einnehmen (d. h. die Sessel- oder Briefumschlagskonformation bei Sechs- bzw. Fünfringen). Bei größeren Ringsystemen ist dies jedoch nicht so trivial, sodass hier mehrere Konformere gedockt werden müssen; oder der Ring wird virtuell aufgebrochen, in der offenkettigen Form gedockt und anschließend wieder geschlossen (Schema 1.5).<sup>12</sup> In beiden Fällen ist dies mit einem erhöhten Rechenaufwand verbunden: Im Falle eines Multikonformer-Dockings müssen mehrere Dockings simuliert werden und im Falle des Dockings der offenkettigen Form steigt die Zahl der rotierbaren Bindungen, da ja ein Ringsystem aufgebrochen wurde.

Die Ergebnisse eines Dockings sind die räumliche Struktur des energetisch günstigsten Protein-Ligand-Komplexes und die dazugehörige Bindungsaffinität. Neben zahlreichen proprietären Docking-Anwendungen existieren mittlerweile auch gute Open-Source Alternativen, wie z. B. Autodock<sup>13</sup> oder Autodock Vina<sup>14</sup>.

Eine andere Rezeptor-basierte Methode ist das *de novo* Design von Pharmakophoren basierend auf einer bekannten Rezeptorstruktur. Als freie Anwendung ist hier „ZINC-Pharmer“ zu nennen.<sup>15</sup> Dieses Webtool ermöglicht das Laden von Proteinstrukturen aus der Proteindatenbank<sup>16</sup> und das Design eines Pharmakophors für die Bindungstasche eines Proteins. Dieses Pharmakophor wird dann an die ZINC-Datenbank<sup>17</sup> übermittelt und es wird nach Verbindungen gesucht, die dem Pharmakophor genügen.

Rezeptor-basierte Methoden liefern natürlich genauere Vorhersagen als Liganden-basierte Methoden. In der Praxis werden Liganden-basierte und Rezeptor-basierte Methoden kombiniert.



**Schema 1.5: Offenkettiges Docking und Multikonformer-Docking von zyklischen Liganden**

### 1. 2. 3. Substanzbibliotheken

Wie bereits erwähnt spielt die Diversität von Substanzbibliotheken eine entscheidende Rolle bei virtuellen und experimentellen Screenings. In den 1990er Jahren investierten viele große Pharmaunternehmen in kombinatorische Chemie; allerdings blieben die erhofften hohen Trefferraten in biologischen Assays aus.<sup>18</sup> Ein Grund hierfür war die Beschaffenheit von kombinatorischen Substanzbibliotheken, deren Verbindungen mehrheitlich Moleküle mit hoher Flexibilität waren. Bei der Bindung eines flexiblen Moleküls an ein Protein ist der Entropiebeitrag zur Bindungsaffinität höher als bei rigiden Molekülen, weil flexible Moleküle mehr Rotationsfreiheitsgrade aufweisen. Deshalb sind hochflexible Moleküle im Allgemeinen schlechtere Proteinbinder.<sup>19</sup> Naturstoffe dagegen weisen eine größere strukturelle

Komplexität auf als synthetische Wirkstoffe.<sup>20</sup> Dabei zeigen viele Naturstoffe auch eine geringere Flexibilität, was sie zu besserer Bindung an Proteine im weitesten Sinne befähigt. Dies erklärt die Tatsache, dass Naturstoffe eine höhere „drug-likeness“ besitzen als synthetische Verbindungen der kombinatorischen Chemie.

FEHER und SCHMIDT zeigten 2003, dass Naturstoffe auch mehr Diversität aufweisen und damit mehr „chemischen Raum“ erschließen als Verbindungen der kombinatorischen Chemie. Hierzu wurde eine Hauptkomponentenanalyse der Eigenschaften (darunter z. B. die Zahl der rotierbaren Bindungen, Zahl der H-Brückendonoren und -akzeptoren, Anzahl der Ringe und die Zahl Sauerstoff- und Stickstoffatome) von Naturstoffen, Wirkstoffen und kombinatorischen Verbindungen durchgeführt und die Plots der ersten beiden Hauptachsen verglichen. Die Datenpunkte der kombinatorischen Verbindungen liegen dabei räumlich sehr stark konzentriert, wohingegen die Datenpunkte der Naturstoffe deutlich diffuser im Raum verteilt sind.<sup>21</sup>

Es könnte sich deshalb für die Leitstruktursuche lohnen, auch Substanzbibliotheken zu untersuchen, die auf Naturstoffen basieren.<sup>22</sup> Dafür spricht z. B. die Tatsache, dass fast die Hälfte der seit 1994 zugelassenen Medikamente (Stand 2007) von Naturstoffen abgeleitet ist.<sup>23</sup> Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht hierbei die Naturstofffamilie der Macrosphelide, die im Folgenden vorgestellt werden.

### 1. 3. Die Familie der Macrosphelide

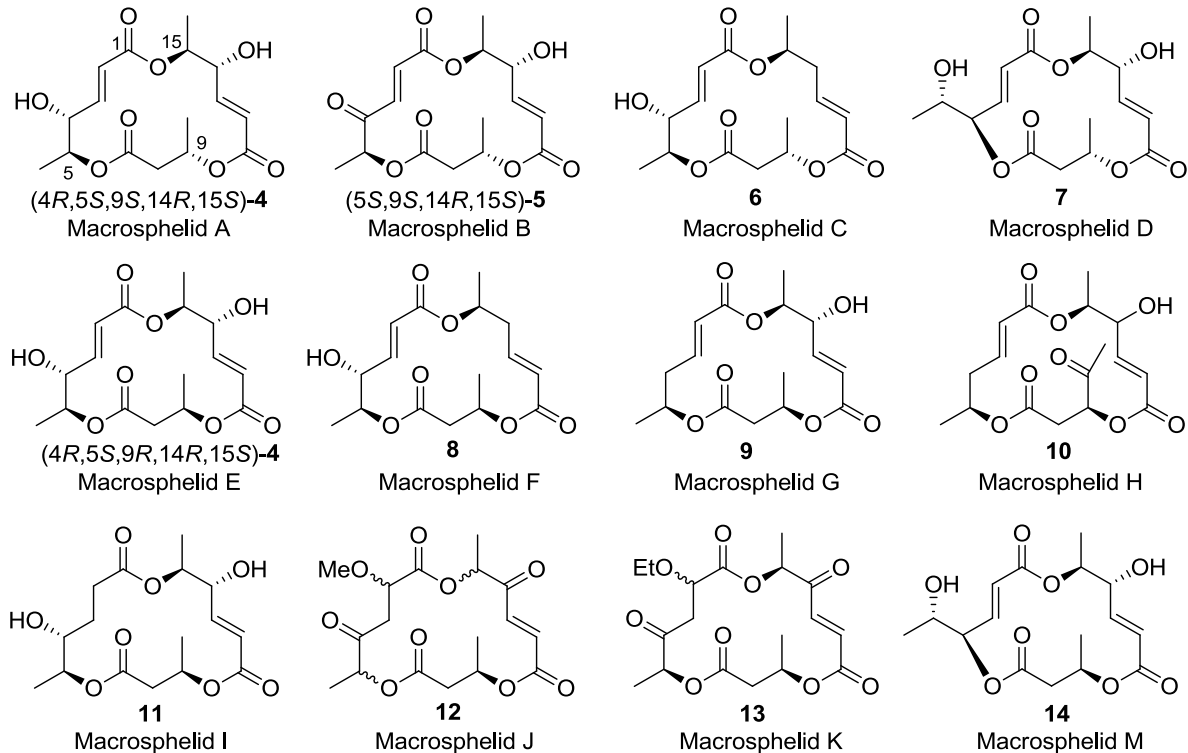
#### 1. 3. 1. Struktur und biologische Aktivität

Die Macrosphelide sind makrozyklische Trilactone, die erstmals 1995 von OMURA aus dem Pilzstamm *Macrospheeropsis* sp. FO-5050 isoliert wurden.<sup>24</sup> Die Vertreter unterscheiden sich in der Konfiguration der Stereozentren, in der Ringgröße (die meisten natürlichen Vertreter sind 16-gliedrig) sowie im Oxygenierungsgrad (Abb. 1.2).<sup>25</sup>

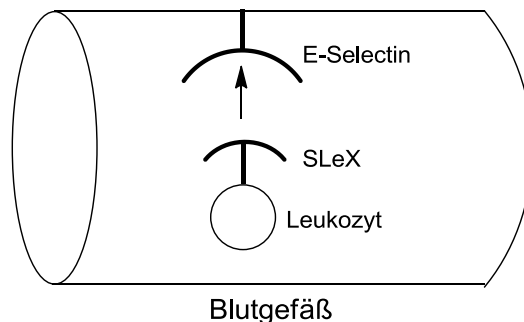
Die Macrosphelide weisen ein breites Spektrum an biologischer Aktivität auf. Die Macrosphelide A (4*R*,5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**4** und B (5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**5** inhibieren die von E-Selectin und Sialyl Lewis X vermittelte Zell-Zell-Adhäsion, wie 1995 von OMURA an HeLa60- und HUVEC-Zellen (menschliche Nabelschnurvenenzellen) gezeigt werden konnte.<sup>24</sup> Die IC<sub>50</sub>-Werte liegen bei 3.5 µM für Macrosphelid A (4*R*,5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**4** und 36 µM für Macrosphelid B (5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**5**. Diese Zell-Zell-Adhäsion spielt eine wichtige Rolle beim Leukozytenrollen und -anheftung, also bei der Bewegung von Immunzellen in Blutgefäßen.<sup>26</sup> E-Selectin ist ein Transmembranprotein, das auf der Oberfläche von Endothelzellen



repräsentiert wird. Es erkennt Sialyl Lewis X (SLeX), den Tetrasaccharidteil eines Transmembran-Glykoproteins, das auf der Oberfläche von Leukozyten repräsentiert wird. Aktivierte Leukozyten können so an die Innenwand von Blutgefäßen binden (Abb. 1.3) und wandern entlang eines Zytokingradienten an den Ort der Zytokinausschüttung (also zum Entzündungsherd). Dort können sie das Blutgefäß verlassen und ins umliegende entzündete Gewebe eintreten, um die Entzündung vor Ort zu bekämpfen.



**Abbildung 1.2: Die Familie der Macrophelide**



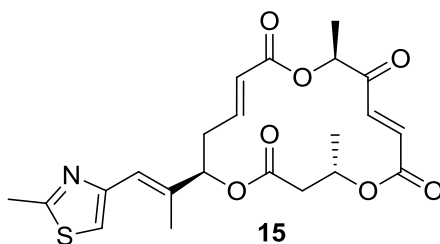
**Abbildung 1.3: Die Funktion von SLeX und E-Selectin**

Epithelzellen repräsentieren ebenfalls SLeX, allerdings als Dimer. Bei Tumorzellen, die letztendlich entartete Epithelzellen sind, kommt es aufgrund des Sauerstoffmangels in den peripheren Regionen von Tumoren zum sog. WARBURG-Effekt. Darunter versteht man eine Verschiebung des Kohlenhydratmetabolismus zu anaeroben Prozessen. Eine Folge hiervon

ist die „unvollständige Synthese“. Das bedeutet, dass die entarteten Epithelzellen veränderte Kohlenhydratmoleküle, darunter (mono-)SLeX, auf ihrer Zelloberfläche repräsentieren. Dies ermöglicht es den Tumorzellen, den Mechanismus des Leukozytenrolling und -tethering auszunutzen, dem sich auch die Immunzellen bedienen. Die Tumorzellen werden also von den Blutgefäßen fälschlicherweise als Immunzellen erkannt und können in entferntes Gewebe gelangen, um dort einen neuen Tumor anzusiedeln. Dieser Vorgang wird als Metastasenbildung bezeichnet.<sup>27,28</sup>

2002 konnten OMURA und HAYASHI tatsächlich die Unterdrückung der Metastasierung von B16/BL6-Zellen durch Macrosphehid B (5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**5** *in vivo* an Mäusen nachweisen.<sup>29</sup>

Macrosphehid B besitzt außerdem noch eine apoptoseinduzierende Wirkung, wie sich an HeLa-Zellen gezeigt hat, was die biologische Aktivität um eine zytostatische Wirkung erweitert.<sup>30</sup> Zu erwähnen ist an dieser Stelle auch das synthetische Hybrid **15** aus einem zyklischen Macrosphehidkern und einer von Epothilon abgeleiteten Thiazolseitenkette (Abb. 1.4), das eine gegenüber den natürlichen Macrosphehidien erhöhte apoptoseinduzierende Wirkung aufweist.<sup>31</sup>



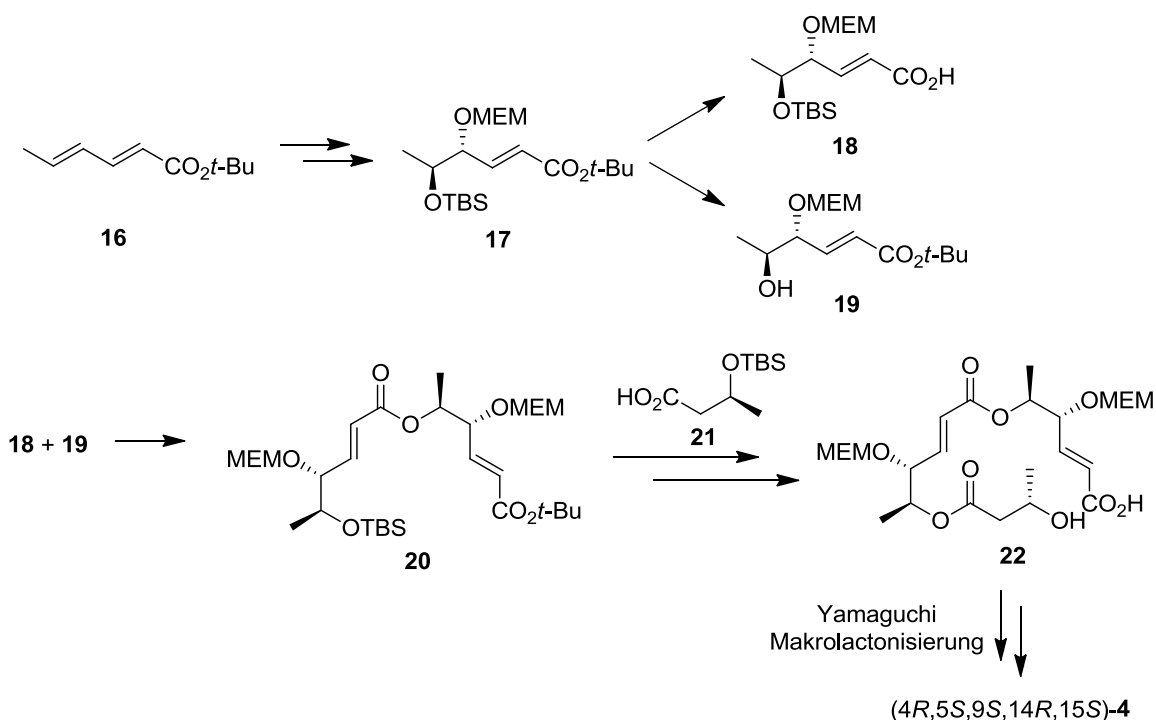
**Abbildung 1.4: Ein Macrosphehid-Epothilon-Hybrid**

### 1. 3. 2. Totalsynthesen der Macrosphehlide

In der Literatur sind bereits Totalsynthesen einiger Macrosphehlide beschrieben<sup>32-57</sup>, die sich im Wesentlichen in der finalen Ringschlussstrategie unterscheiden. Im Folgenden werden drei Totalsynthesen exemplarisch beschrieben.

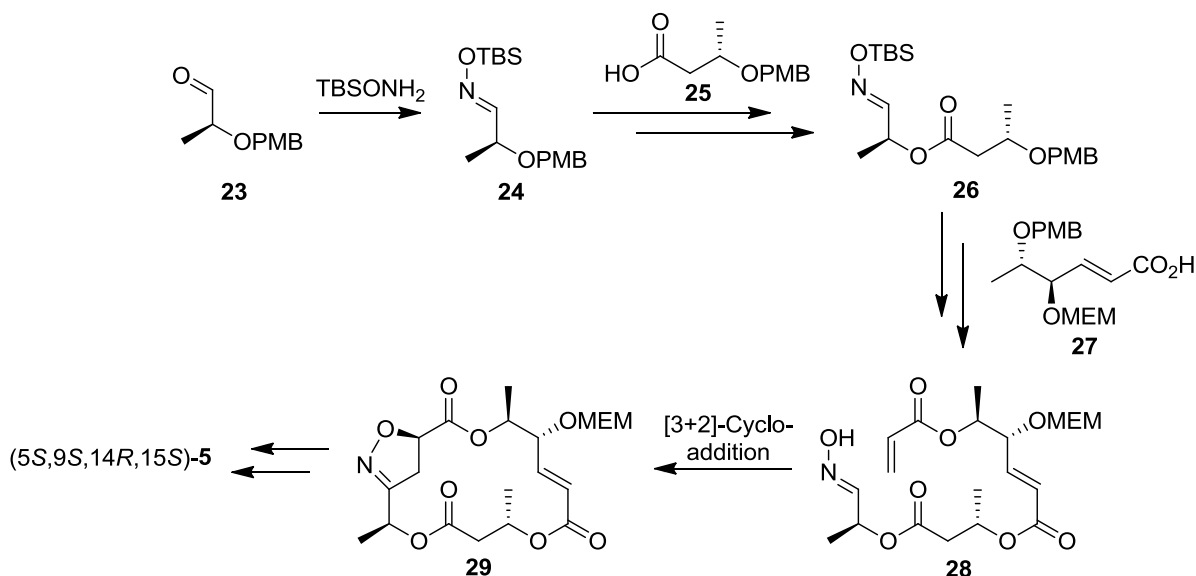
Die erste Totalsynthese eines Macrosphehids gelang 1997 OMURA mit Macrosphehid A (4*R*,5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**4** (Schema 1.6) in 11 Stufen. Dabei werden zuerst ausgehend von *tert*-Butylsorbat **16** zwei Bausteine **18** und **19** aufgebaut, die dann in einer STEGLICH-Veresterung miteinander verknüpft werden zu **20**.

In einer weiteren Veresterung wird das Fragment **21** eingeführt. Schließlich wird die *sec*-Säure **22** einer YAMAGUCHI-Makrolactonisierung unterzogen. Entschützung des Trilactons liefert schließlich Macrosphehid A (4*R*,5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**4**.<sup>36</sup>



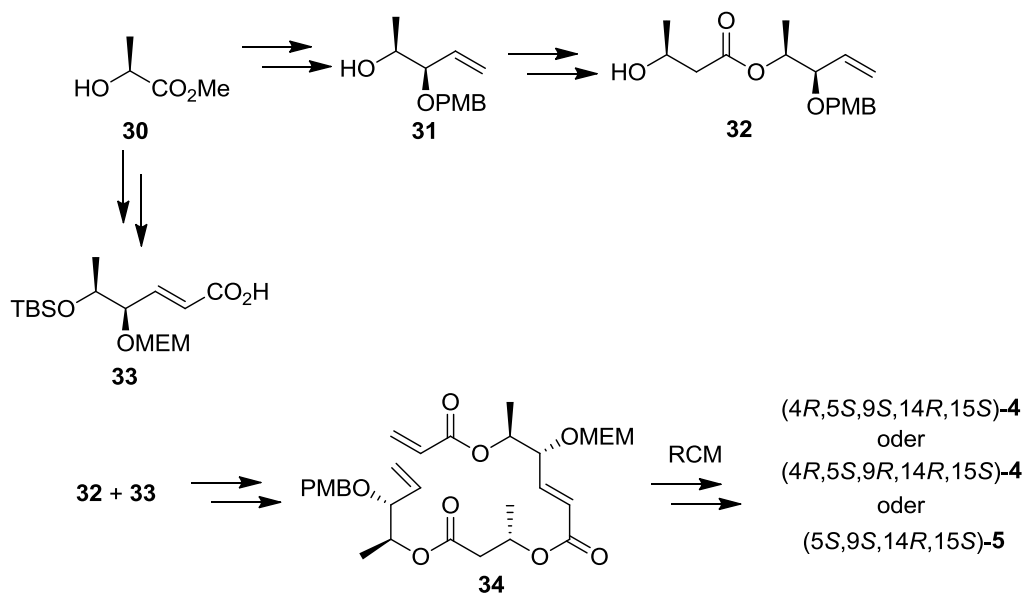
**Schema 1.6: Totalsynthese von Macrosphehid A nach OMURA et al.**

2009 berichtete SUH eine Totalsynthese von Macrosphehid B (5S,9S,14R,15S)-**5** in 13 Stufen, deren Schlüsselschritt eine intramolekulare [3+2]-Cycloaddition eines Nitriloxides an ein Olefin ist (Schema 1.7). Dabei wird das Nitriloxid *in situ* aus dem Oxim **28** gebildet.<sup>32,33</sup>



**Schema 1.7: Totalsynthese von Macrosphehid B nach SUH et al.**

Eine weitere Möglichkeit des finalen Ringschlusses, die Ringschlussmetathese, nutzt eine Totalsynthese, die 2004 von NEMOTO berichtet wurde (Schema 1.8). Diese Strategie ermöglicht den Zugang zu den Macrosphehid A (4R,5S,9S,14R,15S)-**4**, B (5S,9S,14R,15S)-**4** und E (4R,5S,9R,14R,15S)-**4** in 14 bis 15 Stufen.<sup>37,47</sup>



**Schema 1.8: Totalsynthese von Macrophelid A, B und E nach NEMOTO et al.**

Die beschriebenen Totalsynthesen ermöglichen jeweils einen selektiven Zugang zu Macropheliden. Dieser ist bzw. war sicherlich notwendig zur Strukturaufklärung, erlaubt jedoch nicht den Aufbau einer diversen Substanzbibliothek vor dem Hintergrund der Leitstruktursuche und -optimierung (s. Abschnitt 1. 2. 3.).

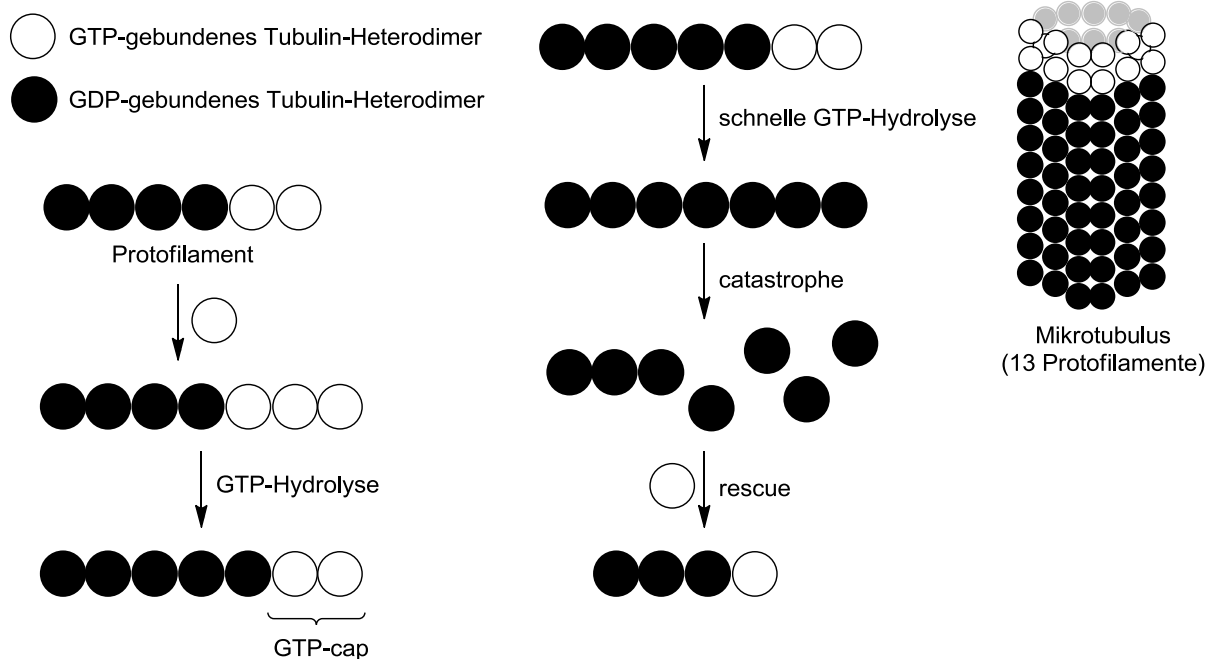
## 1. 4. Die Mikrotubuli

Der bioinformatische und der biochemische Teil dieser Dissertation befassen sich mit der biologischen Aktivität der Macrophelide, die auf einer Beeinflussung der Mikrotubuli beruht. Deshalb werden die Mikrotubuli im Folgenden näher beschrieben. Die Mikrotubuli (MT) sind etwa 25 nm große röhrenförmige Gebilde, die sich aus Tubulineinheiten zusammensetzen und in zahlreiche zelluläre Vorgänge involviert sind. In den letzten Jahrzehnten wurden die Mikrotubuli bzw. Tubulin zu beliebten und vielversprechenden Targets für die Therapie von Tumorerkrankungen.<sup>58</sup>

### 1. 4. 1. Struktur und Aufbau der Mikrotubuli

Die Mikrotubuli sind Röhren, die durch Zusammenlagerung von 13 Protofilamenten entstehen. Protofilamente sind Polymerketten aus Tubulin-Monomereinheiten. Tubulin wiederum ist ein Proteindimer (ein Heterodimer), das aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin besteht, die durch eine nicht-kovalente Wechselwirkung miteinander verbunden sind.<sup>59</sup>  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sind weitgehend konserviert und jeweils rund 450 Aminosäuren lang. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Tubulin besitzen jeweils eine Bindungsstelle für Guanosintriphosphat (GTP) bzw.

Guanosindiphosphat (GDP), wobei die GTP-Bindungsstelle von  $\beta$ -Tubulin eine Hydrolyseaktivität besitzt, nicht jedoch die GTP-Bindungsstelle von  $\alpha$ -Tubulin. Die Tubulin-Heterodimere fungieren ihrerseits als Monomere einer recht komplexen Polymerisation (Schema 1.9).



**Schema 1.9: Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli**

Hierbei wird zunächst ein Heterodimer durch Bindung eines GTP-Moleküls zur Polymerisation aktiviert. Dieses aktivierte Heterodimer kann nun an eine wachsende Kette angeknüpft werden. Tubulin, welches GDP bindet, ist nicht polymerisationsfähig. Nach einer gewissen Zeit wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert. Die Kette wird durch eine Kappe aus GTP-gebundenem Tubulin („GTP-cap“) vor dem Zerfall bewahrt. Das GTP-cap bleibt vorhanden, solange die Polymerisation schneller ist als die GTP-Hydrolyse.

Wird die GTP-Hydrolyse schneller als die Polymerisation, wird das schützende GTP-cap durch Hydrolyse von GTP zu GDP zerstört und das Protofilament zerfällt. Dieser Vorgang wird als „catastrophe“ bezeichnet. Der Zerfall des Protofilaments schreitet so lange fort, bis die Hydrolyse wieder langsamer als die Polymerisation wird. Dann kann wieder GTP-gebundenes Tubulin an die zerfallende Kette angeknüpft werden und das neue GTP-cap stabilisiert die Kette wieder. Der Abbruch des Zerfalls wird als „rescue“ bezeichnet.

Dieses Wechselspiel aus „catastrophe“ und „rescue“ wird „dynamische Instabilität“ genannt und ermöglicht die für die Funktionen der Mikrotubuli erforderliche schnelle Dynamik.<sup>60</sup>

### 1. 4. 2. Die Funktionen der Mikrotubuli

Die Mikrotubuli bilden das Zytoskelett, das für den intrazellulären Transport verantwortlich ist und sich in allen Zellen findet.<sup>61</sup> Eine weitere wichtige Funktion der Mikrotubuli ist der für die Zellteilung essentielle Spindelapparat, dessen Spindelfasern aus Mikrotubuli bestehen und der für die korrekte Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen sorgt.<sup>62</sup> Man kann sich leicht vorstellen, dass eine Störung der Polymerisations-/Depolymerisationsdynamik der Mikrotubuli auch in einer Beeinflussung der Funktionen der Mikrotubuli resultiert, insbesondere einer Störung der Mitose.

Wird die Polymerisation der Mikrotubuli inhibiert (die Mikrotubuli also destabilisiert), so kommt es zu einem Anhalten der Mitose („mitotic arrest“), weil der Spindelapparat sich nicht mehr ausbilden kann. Im Falle einer Stabilisierung der Mikrotubuli bleibt die Mitose stehen, weil der Spindelapparat sich zwar ausbilden kann, jedoch die Zugbewegung nicht mehr ausführen kann.

Ein verlängertes Anhalten der Mitose resultiert letztendlich im programmierten Zelltod, der Apoptose.<sup>63</sup> Genau diesen Mechanismus nutzen Wirkstoffe, deren Target die Mikrotubuli sind. Solche Mitosehemmer hemmen also das Wachstum aller Zellen, d. h. auch gesunder Zellen. Allerdings wirkt sich diese Wachstumshemmung bei Krebszellen, die sich sehr viel schneller als gesunde Zellen vermehren, stärker aus.

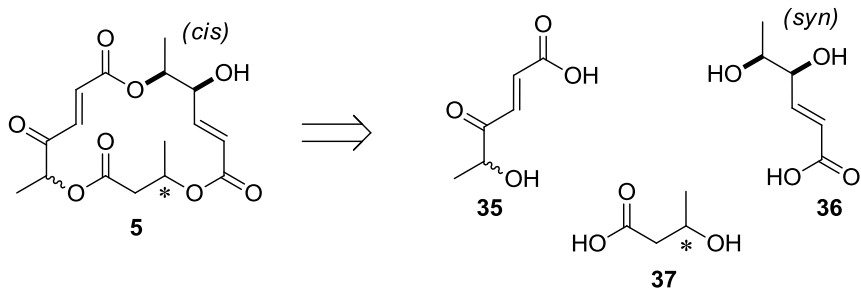
## 2. Problemstellung

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist die Nachahmung der in Abschnitt 1. 1. beschriebenen chemischen Evolution zum Zwecke der Leitstruktursuche bzw. -identifizierung am Beispiel der Macrosphelide. Die Macrosphelide, z. B. Macrosphelid B (5S,9S,14R,15S)-4, stellen dabei die ersten Prototypen dar. Im Gegensatz zur Vorgehensweise in der Pharmaforschung soll dabei also nicht der Weg der chemischen Evolution (Abb. 1.1) von Beginn an beschriftet werden, sondern der erste Selektionsschritt soll ausgelassen werden und ein Prototyp verwendet werden, der bereits von der Natur vorentwickelt wurde. Ein Naturstoff als Prototyp bietet gewisse Vorteile, denn Naturstoffe sind im Allgemeinen bessere Proteinbinder, wie bereits in Abschnitt 1. 2. 3. erwähnt wurde. Um den zweiten Evolutionszyklus zu imitieren, werden neben einem geeigneten Prototyp weiterhin benötigt:

- ein Zugang zu einer diversen Macrosphelid-Bibliothek, d. h. eine diversitätsorientierte Totalsynthese; diese sollte zudem kurz und modular sein (um möglichst viele Variationsmöglichkeiten nutzen zu können und so die Modifizierung von Substanzbibliotheken zu ermöglichen)
- Methoden, mit denen sich Rückschlüsse auf die biologische Aktivität ziehen lassen, um die Selektion zu imitieren.

### 2. 1. Erweiterung einer Macrosphelid-Bibliothek

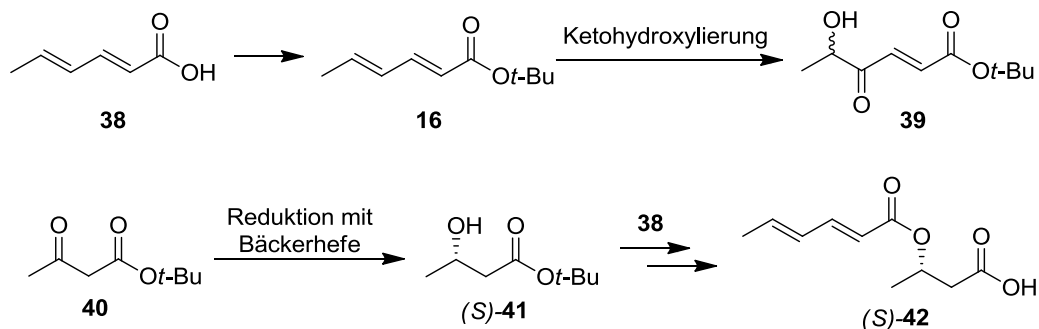
N. MATTHIAS NEISIUS konnte in seiner Dissertation bereits eine diverse Macrosphelid-Bibliothek aufbauen, die auch das natürliche Macrosphelid B (5S,9S,14R,15S)-4 enthält. Da sich die Macrosphelide, wie in Abschnitt 1. 3. erwähnt, u. a. maßgeblich in der Konfiguration der Stereozentren unterscheiden, bedeutet „Diversität“ in diesem Zusammenhang, dass möglichst alle Diastereomere zugänglich sind. Es wird also eine Synthesestrategie benötigt, die *nicht* diastereoselektiv ist. Um optisch aktive Diastereomere zu erhalten, wird dabei *ein* Stereozentrum definiert aufgebaut (in Schema 2.1 mit Stern markiert). Dabei reduziert sich auch die Zahl der Diastereomere, die natürlich als Gemisch anfallen, auf vier.



**Schema 2.1: Retrosynthetische Betrachtung**

NEISIUS konnte folgende Synthese ausarbeiten: Ausgehend von kommerziell erhältlichlicher Sorbinsäure **38**, die als *tert*-Butylester **16** geschützt wird, wird zunächst das (racemische)  $\alpha$ -Ketol **39** aufgebaut durch eine RuO<sub>4</sub>-katalysierte Ketohydroxylierung der  $\gamma,\delta$ -Doppelbindung von **16** (Schema 2.2). Die Reaktionsbedingungen der Ketohydroxylierung sind modifizierte Dihydroxylierungsbedingungen, allerdings wird durch die Verwendung von Oxone<sup>®</sup>, dessen reaktiver Bestandteil Kaliumperoxomonosulfat ist, nicht das Diol, sondern das Ketol gebildet. Grund hierfür ist der nukleophile Charakter von Peroxomonosulfat, das den intermediär gebildeten zyklischen Ruthenat(VI)-ester spaltet.<sup>64</sup>

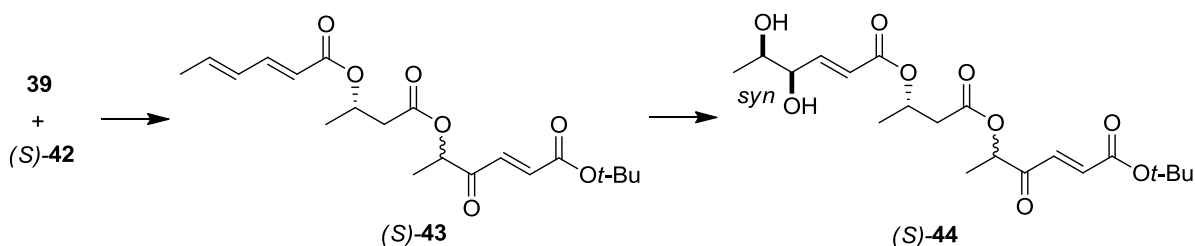
Der zweite Baustein (*S*)-**42**, der als einziger enantiomerenangereichert eingesetzt wird, wird durch asymmetrische (*S*)-selektive Reduktion des  $\beta$ -Ketoesters **40** mit Bäckerhefe und anschließender STEGLICH-Veresterung von (*S*)-**41** mit Sorbinsäure **38**, gefolgt von einem Entschützungsschritt, erhalten.



**Schema 2.2: Aufbau der Grundbausteine**

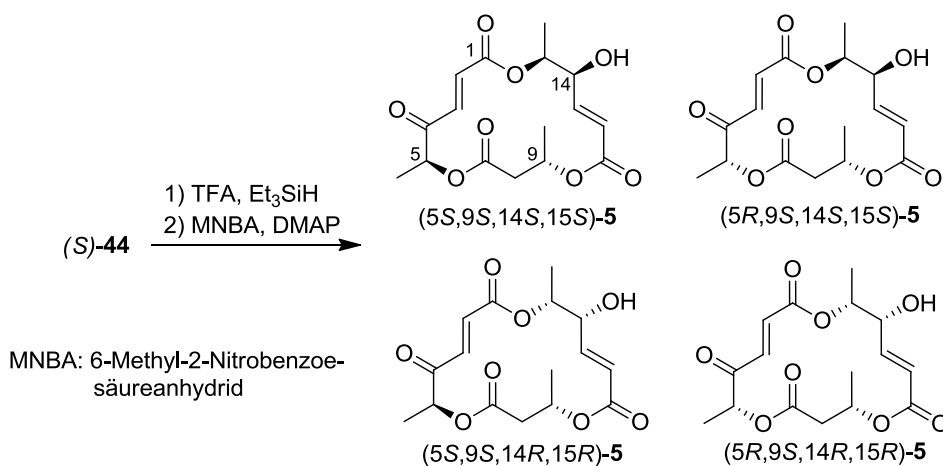
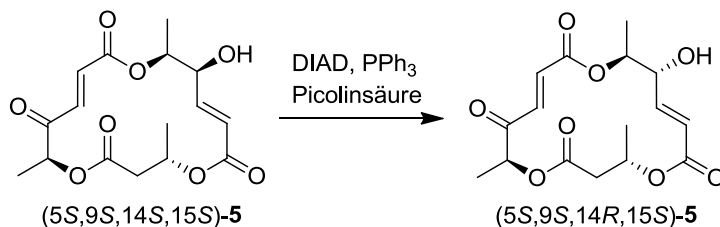
Das Ketol **39** und die Säure (*S*)-**42** werden nun in einem weiteren STEGLICH-Veresterungsschritt miteinander verknüpft (Schema 2.3). Der resultierende Triester (*S*)-**43** wird dann am Sorbinsäureteil dihydroxyliert. Hierbei wird auf die asymmetrische Dihydroxylierung verzichtet, um die Synthese möglichst unselektiv zu halten. Daher kommt hier eine RuO<sub>4</sub>-katalysierte Dihydroxylierung zum Einsatz. Die RuO<sub>4</sub>-vermittelte Dihydroxylierung ist zwar nicht asymmetrisch, aber dennoch diastereospezifisch, sodass aus dem *E*-Olefin das *syn*-Diol (*S*)-**44** entsteht.



**Schema 2.3: Dihydroxylierung des Triesters**

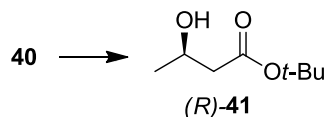
Nach Entschützung des Triesters (S)-44 wird die intermediär gebildete *seco*-Säure einer Makrolactonisierung nach YAMAGUCHI unterworfen (Schema 2.4). Dabei erhält man vier (enantiomerenreine) Diastereomere, die alle *cis*-konfiguriert sind (Relativkonfiguration an den Positionen 14 und 15) aufgrund der vorangegangenen *syn*-selektiven Dihydroxylierung. Dieses Diastereomergemisch wird im Folgenden „(S)-Serie“ (*cis*,9S)-5 genannt.

NEISIUS konnte schließlich nach Trennung der Diastereomere (5S,9S,14S,15S)-5 durch MITSUNOBU-Inversion in Macrosphehid B (5S,9S,14R,15S)-5 überführen, welches *trans*-konfiguriert ist (Schema 2.5).

**Schema 2.4: Finale Makrolactonisierung****Schema 2.5: MITSUNOBU-Inversion führt zu Macrosphehid B**

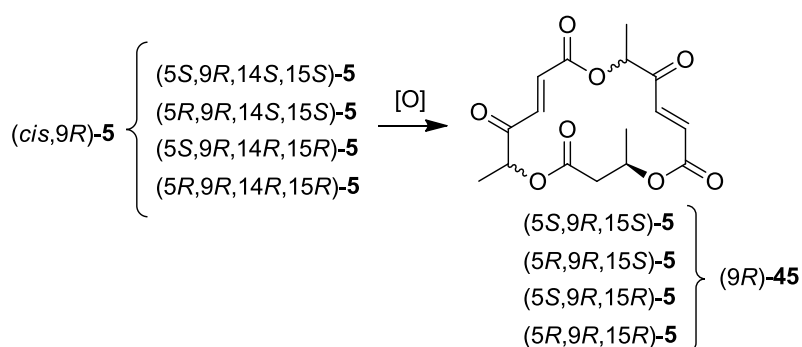
Gegenstand dieser Arbeit ist es nun, die von NEISIUS aufgebaute Macrosphehid-Bibliothek der (S)-Serie um eine enantiomere Serie, die (R)-Serie, zu erweitern. Das bedeutet, dass ein

einfacher Zugang zum enantiomerenreinen  $\beta$ -Hydroxybutyrat (*R*)-**41** benötigt wird (Schema 2.6).



**Schema 2.6: Für den Aufbau der (*R*)-Serie benötigter chiraler Bausteine**

Außerdem soll die Syntheseroute durch einen Modifizierungsschritt erweitert werden, der für die (*S*)-Serie bereits von NEISIUS und CHRISTINE HÄCKER ausgearbeitet wurde. Hierzu sollen die Macrosphehid-Analoga (*cis*,*9R*)-**5** zu den korrespondierenden Diketonen (*9R*)-**45** oxidiert werden (Schema 2.7).



**Schema 2.7: Darstellung der nicht natürlichen Diketone**

## 2. 2. Studien zur biologischen Aktivität

Die erweiterte Bibliothek von Macrosphehid-Analoga soll schließlich bezüglich biologischer Aktivität evaluiert werden. Dazu sollen theoretische und experimentelle Methoden kombiniert werden. Als theoretische Methode sollen Docking-Studien herangezogen werden, deren Grundlagen bereits in Abschnitt 1. 2. 2. erläutert wurden. Darauf basierend soll ein kleines virtuelles Screening entwickelt werden, das zumindest eine qualitative Abschätzung der biologischen Aktivität ermöglicht.

Da Docking eine Rezeptor-basierte Methode ist und für die Macrosphehlide kein Target beschrieben ist, muss zunächst - nach Literaturrecherche - zumindest eine Hypothese bezüglich eines möglichen Targets aufgestellt werden.

Weiterhin sollte ergründet werden, ob beim Docking dann Flexibilität berücksichtigt werden muss (vgl. Abschn. 1. 2. 2.) und zwar sowohl seitens der Liganden (die ja makrozyklisch sind) als auch seitens des Proteins (d. h. ob ggf. einzelne Aminosäurereste flexibel behandelt werden müssen und welche).

Anschließend sollen Kriterien gefunden bzw. formuliert werden, mit denen die Ergebnisse des Dockings schließlich ausgewertet werden können. Entscheidend ist hierbei die Fragestellung, ob die berechneten Bindungsaffinitäten zur Beurteilung der biologischen Aktivität ausreichen oder ob ggf. auch die Dockings (d. h. die berechneten 3D-Strukturen der Protein-Ligand-Komplexe) herangezogen werden müssen. In letzterem Fall muss natürlich geklärt werden, in welcher Orientierung (und ggf. Konformation) aktive Verbindungen an das Protein binden müssen.

Die Verlässlichkeit des virtuellen Screenings soll anschließend durch experimentelle Verfahren unter Beweis gestellt werden.

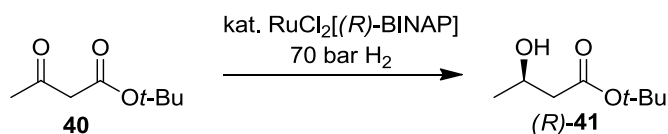
Die Studien zur biologischen Aktivität beschränken sich nicht nur auf die (*R*)-Serie, deren Aufbau Bestandteil der präparativen Aufgabenstellung dieser Arbeit ist, sondern beziehen auch Macrophelid-Analoga mit ein, die von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Plietker (Dr. N. MATTHIAS NEISIUS und Dipl.-Chem. CHRISTINE HÄCKER) dargestellt wurden.

### 3. Aufbau der (*R*)-Serie einer Bibliothek nicht-natürlicher Macrosphehid-Analoga

#### 3. 1. Darstellung von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-*tert*-butylester (*R*)-41

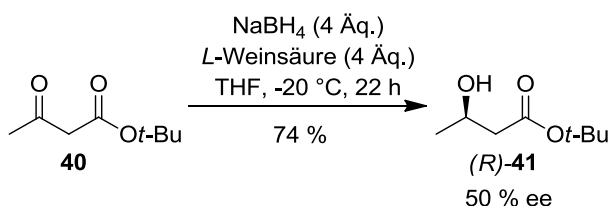
Wie bereits in Abschnitt 2. 2. erwähnt, wird für die (*R*)-Serie der chirale Baustein (*R*)-41 benötigt. Hierfür ist eine Methode zur asymmetrischen Reduktion des  $\beta$ -Ketoesters **40** erforderlich.

Eine der Standardmethoden für solche asymmetrischen Reduktionen stellt die NOYORI-Reduktion dar (Schema 3.1), die in den meisten Fällen quantitativ mit sehr guten Enantiomerenüberschüssen chirale sekundäre Alkohole liefert.<sup>65</sup> Allerdings muss hierfür der Katalysator, RuCl<sub>2</sub>[(*R*)-BINAP], hergestellt werden und die Methode ist mit einem größeren apparativen Aufwand verbunden, da ein Autoklav benötigt wird (70 bar). Daher wurde nach einer alternativen Methode zur asymmetrischen Reduktion gesucht.



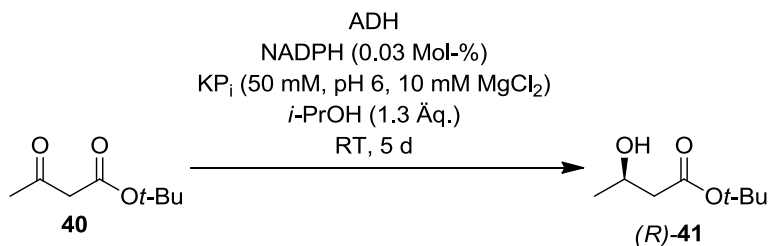
**Schema 3.1: Die NOYORI-Reduktion**

Eine Möglichkeit stellt die asymmetrische Reduktion mit Natriumborhydrid in Gegenwart von *L*-Weinsäure dar (Schema 3.2).<sup>66</sup> Allerdings konnten mit dieser Methode nur mäßige Enantiomerenüberschüsse von 50 % erreicht werden; in der Literatur ist der Enantiomerenüberschuss mit 84 %<sup>66</sup> beschrieben.



**Schema 3.2: Asymmetrische Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> und *L*-Weinsäure**

Daher wurde eine enzymatische Reduktion mit Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus* (LB-ADH) und *Azoarcus* sp. (EbN1-ADH) getestet. Dabei wurden keine aufgereinigten Proteine verwendet, sondern jeweils Rohextrakte (Schema 3.3).



**Schema 3.3: Enzymatische Reduktion mit Alkoholdehydrogenasen**

Zunächst wurden die Umsätze der Reduktionen mit beiden ADH unter kokatalytischer Wirkung von NADPH und Isopropanol als stöchiometrischem Reduktionsmittel verglichen. Wie Tabelle 3.1 zeigt, liefert die LB-ADH einen deutlich höheren Umsatz (63 %). Die isolierte Ausbeute ist mit 38 % (Tabelle 3.2) deutlich geringer, allerdings konnten im NMR-Spektrum des Rohprodukts keine weiteren Bestandteile neben Edukt und Produkt nachgewiesen werden. Die im Vergleich zum Umsatz geringere isolierte Ausbeute erklärt sich evtl. dadurch, dass es problematisch ist, das polare Produkt aus Wasser zu extrahieren.

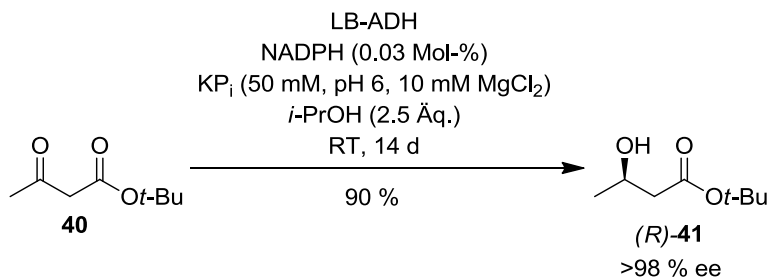
Als nächstes wurde die Menge an Isopropanol erhöht (Tabelle 3.2). Bei Verwendung von 2.5 Äquivalenten Isopropanol konnte die isolierte Ausbeute auf 71 % gesteigert werden; eine weitere Erhöhung auf 5 Äquivalente führt zu keiner Steigerung der Ausbeute mehr. Bei Verlängerung der Reaktionszeit auf 14 Tage konnten schließlich 90 % (*R*)-41 erhalten werden. Das Produkt enthält zwar noch Spuren von nicht umgesetzten Ketoester 40 (NMR), kann jedoch ohne chromatographische Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden (Schema 3.4).

Enzym	Umsatz* [%]
LB-ADH	63
EbN1-ADH	36

**Tabelle 3.1: Vergleich der beiden Alkoholdehydrogenasen (\*bestimmt durch NMR-Integration, Durchschnitt aus zwei Experimenten)**

Äquivalente <i>i</i> -PrOH	Ausbeute* [%]
1.3	38
2.5	71
5	67

**Tabelle 3.2: Variation der Menge an Isopropanol (\* isolierte Ausbeute)**

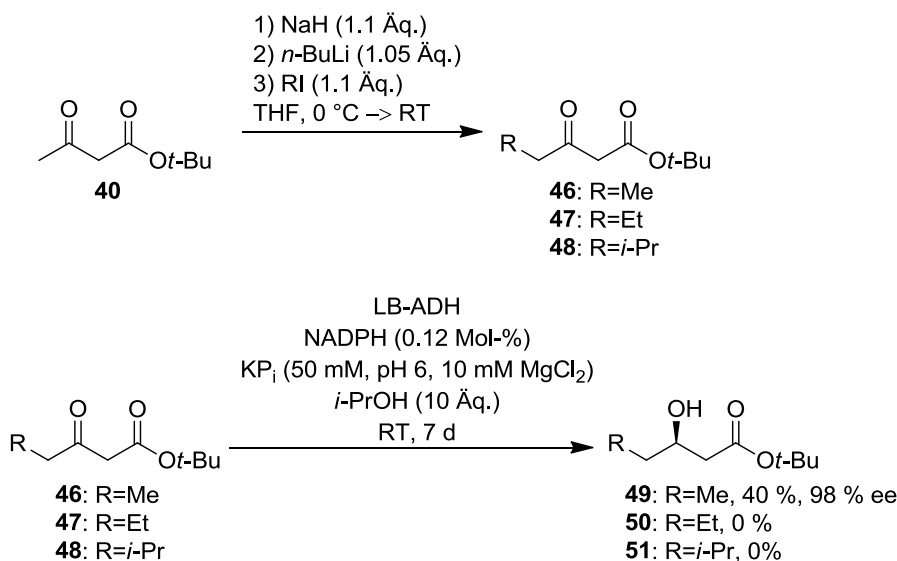


**Schema 3.4: Optimierte Reaktionsbedingungen der enzymatischen Reduktion**

Um Variationsmöglichkeiten an diesem Baustein zu untersuchen, wurden kettenverlängerte  $\beta$ -Hydroxyester dargestellt<sup>67</sup> und mit der LB-ADH umgesetzt (Schema 3.5). Hierbei zeigte sich, dass Substituenten in  $\gamma$ -Position vom Protein bis auf eine Methylgruppe nicht toleriert werden. So konnte bereits **47** nicht mehr umgesetzt werden, selbst bei Zusatz von 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat) konnte kein merklicher Umsatz beobachtet werden. Das Tensid SDS wird oft bei enzymatischen Reaktionen verwendet, um der Bindungstasche des Proteins mehr Flexibilität zu verleihen.<sup>68</sup> Auch bei Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37 °C konnte kein Umsatz beobachtet werden.

Dennoch kann immerhin **46** mit gutem Enantiomerenüberschuss und moderater Ausbeute noch ins optisch aktive **49** überführt werden, dessen absolute Konfiguration nach Überführung in den korrespondierenden (*O*)-Acetylmandelsäureester zugewiesen werden konnte.<sup>69, 70</sup>

Die Variationsmöglichkeiten am  $\beta$ -Ketoester sind also begrenzt unter der enzymatischen Reduktion.

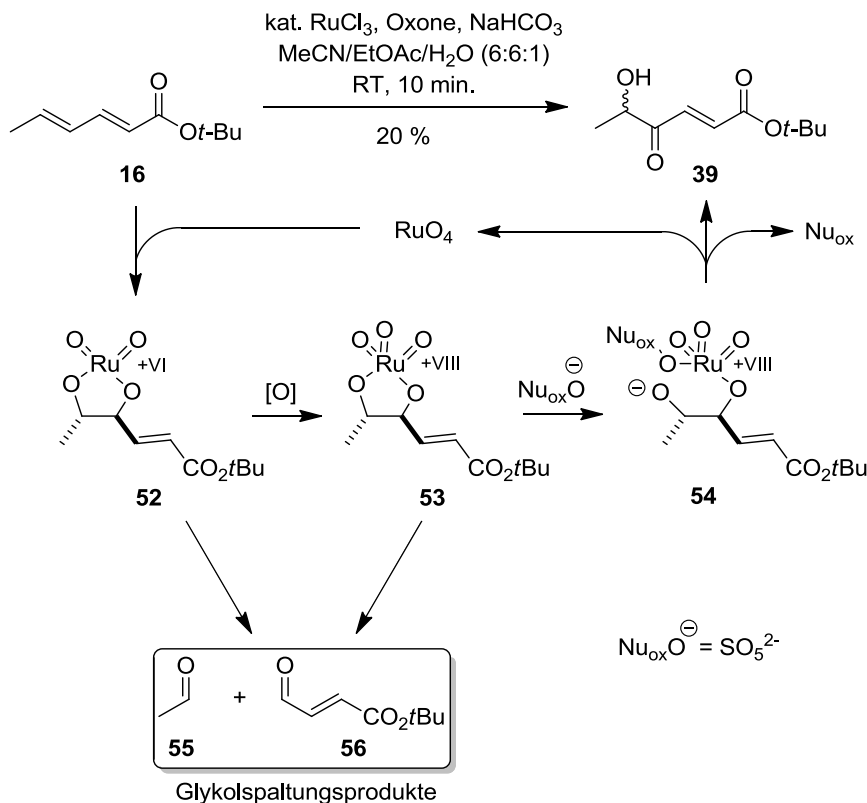


**Schema 3.5: Enzymatische Umsetzung von kettenverlängerten Ketoestern**

### 3. 2. Optimierungsversuche zur Ketohydroxylierung

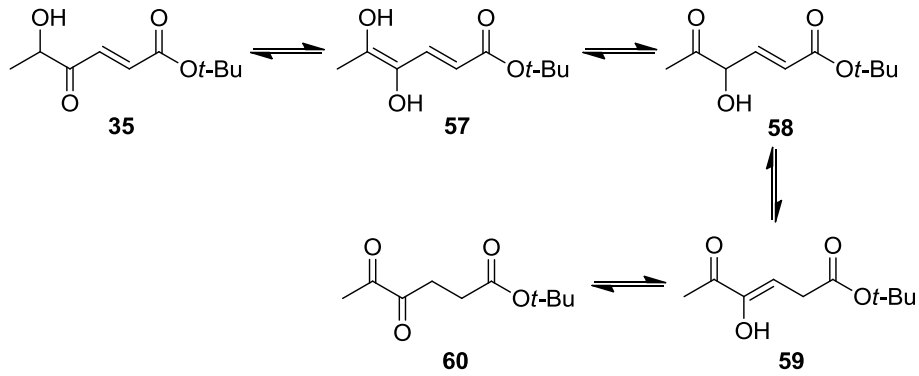
Die RuO<sub>4</sub>-katalysierte Ketohydroxylierung bietet einen einfachen und schnellen Zugang zum Ketol **39** (Schema 3.6).<sup>64</sup> Unglücklicherweise liefert sie mit Sorbaten als Substrate nur mäßige Ausbeuten.

Ein Grund für die schlechte Ausbeute ist die Überoxidation unter Spaltung der C-C-Bindung und Bildung von Aldehyden (Schema 3.6), was sich in den NMR-Spektren der Rohprodukte der Reaktion zeigt. Im Fall von Sorbaten bilden sich hier Acetaldehyd **55** und der mesomeriestabilisierte Aldehyd **56**.



**Schema 3.6: Die Ketohydroxylierung**

Ein Grund dafür, dass Sorbate keine guten Substrate für RuO<sub>4</sub>-vermittelte Oxidationen sind, sind Folgereaktionen, die speziell bei Dienen nach der Oxidation einer Doppelbindung auftreten (Schema 3.7). Dabei kommt es nach Tautomerisierung über das Endiol **57** zum regioisomeren Ketol **58** zu einer Isomerisierung der Doppelbindung. Anschließende Tautomerisierung liefert das gesättigte Diketon **60**, das eine thermodynamische Senke darstellt, wie sich an den berechneten Gibbs Energien zeigt (Abb. 3.1).



Schema 3.7: Folgereaktionen bei der Ketohydroxylierung

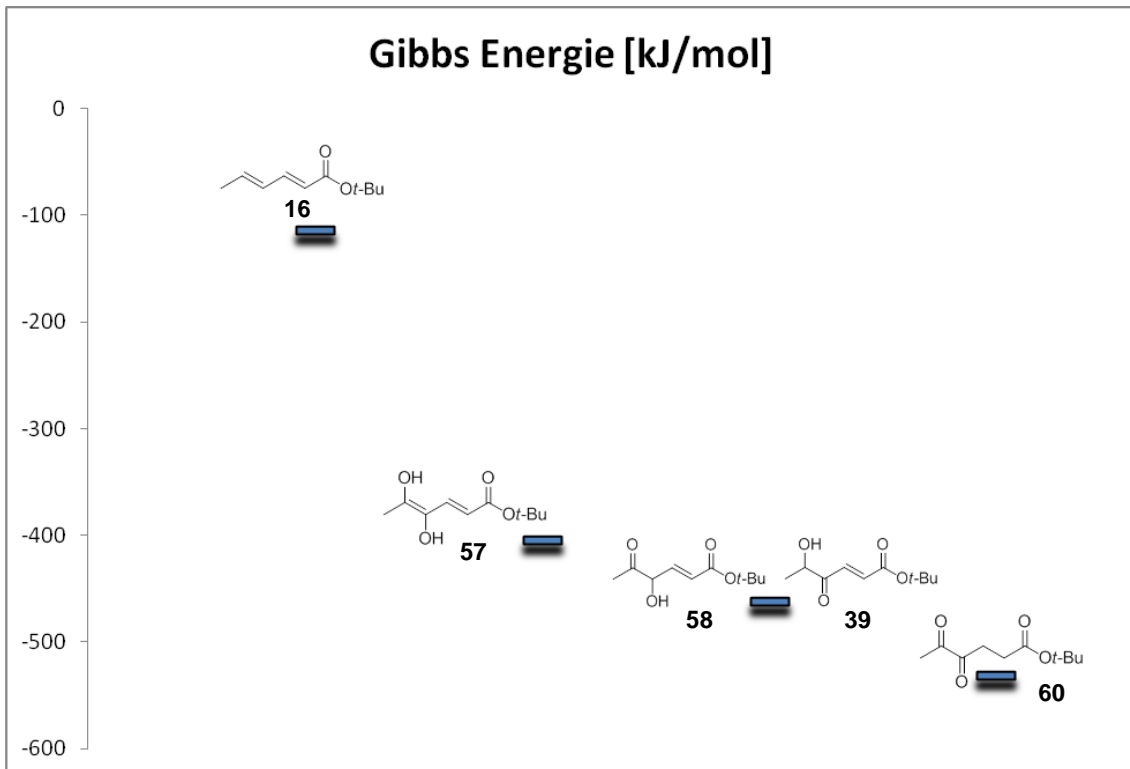


Abbildung 3.1: Vergleich der Energieniveaus der bei der Ketohydroxylierung auftretenden Intermediate

Schließlich ist der Umsatz der Ketohydroxylierung bei Verwendung von Dienen als Substrate bei weitem nicht vollständig. Dieser Befund zeigt sich auch bei der mechanistisch verwandten  $\text{RuO}_4$ -katalysierten Dihydroxylierung von Sorbaten wie **16**. Bei der Dihydroxylierung wird intermediär ebenfalls zyklischer Ruthenatester wie **52** und **53** gebildet.

Auch durch Variation der Reaktionsbedingungen konnte die Ausbeute leider nicht gesteigert werden. Bei geringeren Mengen an Oxone<sup>®</sup> oder niedrigeren Reaktionstemperaturen ist die Oxidation zu langsam und bei längeren Reaktionszeiten werden größere Mengen an Nebenprodukten (Diketon **60** und Glykolspaltungsprodukte **55** und **56**) gebildet.



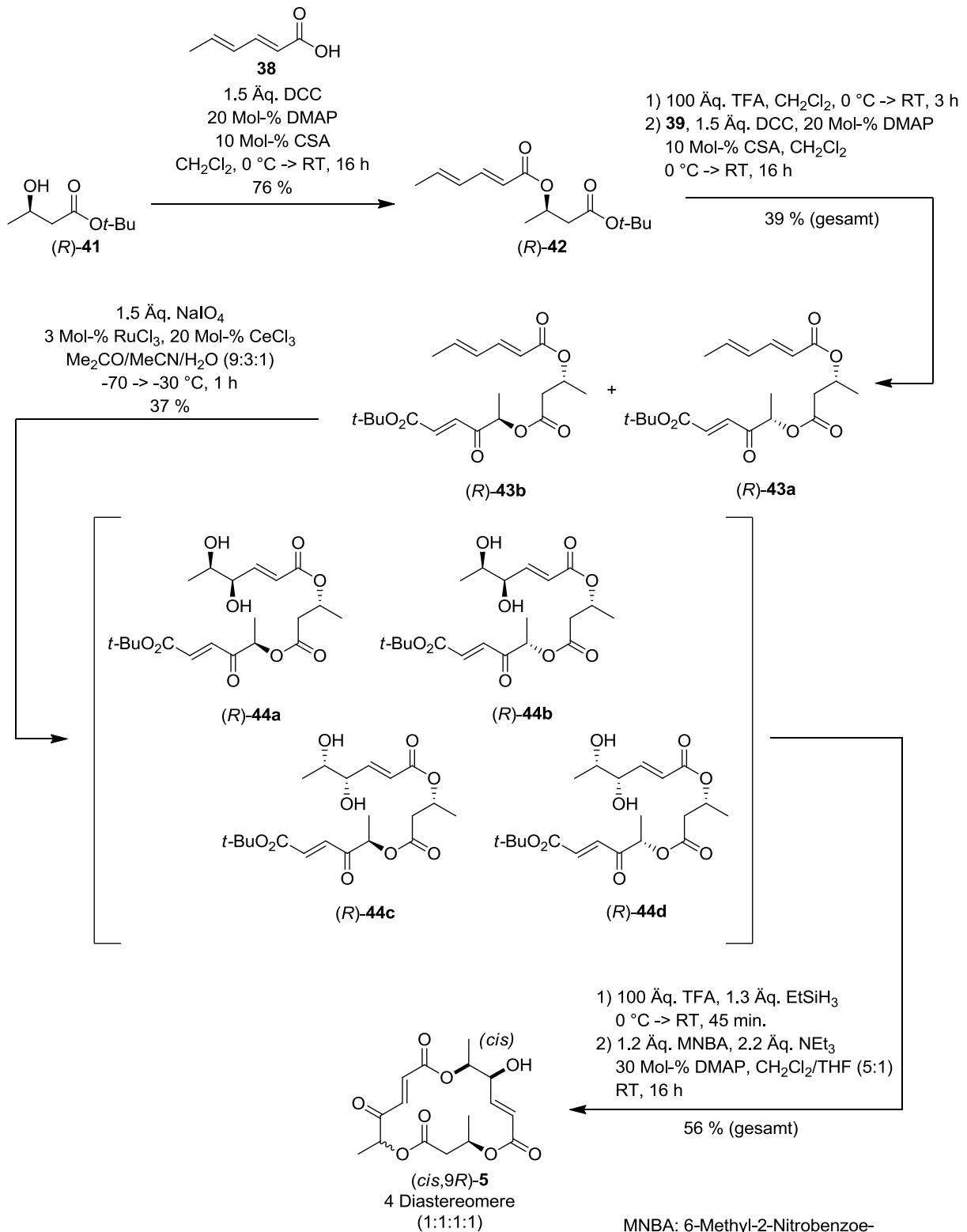
Allerdings ist es gelungen, die Ansatzgröße zu steigern. Dabei konnte die Menge an Lösungsmittel verringert werden, ohne Einbußen an Ausbeute in Kauf nehmen zu müssen, sodass 50 mmol Substrat problemlos in einem Ansatz mit 350 mL Reaktionsvolumen (statt 650 mL nach dem Standardprotokoll<sup>64</sup>) eingesetzt werden können.

### 3. 3. Aufbau der (*R*)-Serie der Macrophelid-Bibliothek

#### 3. 3. 1. Darstellung der nicht natürlichen Macrophelide mit *cis*-Konfiguration

Mit dem Ketol **39** und dem enantiomerenreinen Baustein (*R*)-**41** in Händen konnte schließlich die (*R*)-Serie aufgebaut werden (Schema 3.8). Veresterung von (*R*)-**41** mit Sorbinsäure **38** unter STEGLICH-Bedingungen und anschließende Entschützung des *tert*-Butylesters liefert die Säure (*R*)-**42**, die mit dem Ketol **39** in einer weiteren STEGLICH-Veresterung verknüpft wird. Der resultierende Triester (*R*)-**43** wird dihydroxyliert unter Bildung des *syn*-Diols (*R*)-**44**, das nach Entschützung schließlich der Makrolactonisierung unterzogen wird. Man erhält ein enantiomerenreines äquimolares Diastereomerengemisch aus vier *cis*-konfigurierten Macrophelid-Derivaten (*cis,9R*)-**5**, das mittels HPLC getrennt und NMR-spektroskopisch charakterisiert werden kann.

### 3. Aufbau der (R)-Serie einer Bibliothek nicht-natürlicher Macrophelid-Analoga

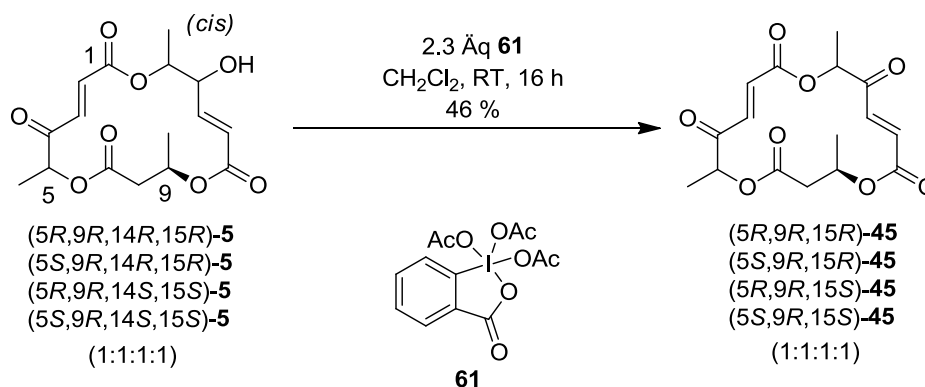


**Schema 3.8: Aufbau der (R)-Serie**

### 3. 3. 2. Darstellung der Diketon-Macrophelide

Die natürlichen Macrophelide unterscheiden sich nicht nur in der Konfiguration der Stereozentren, sondern auch maßgeblich im Oxygenierungsgrad, was sich beim Vergleich von Macrophelid A (4*R*,5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**4** und B (5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**5** zeigt. Um die Diversität der Macrophelid-Bibliothek weiter auszubauen, sollte auch der Oxygenierungsgrad variiert werden. Hierzu wurden die Produkte der in Abschnitt 3. 3. 1. beschriebenen (*R*)-Serie zu den korrespondierenden Diketonen (9*R*)-**45** oxidiert werden.

Dies gelang mit DESS-MARTIN-Periodinan **61** in moderaten Ausbeuten (Schema 3.9). So konnte das Diastereomergemisch der (*cis*,9*R*)-**5** in das Diastereomergemisch der Diketone (9*R*)-**45** überführt werden. Die diastereomeren Diketone konnten dann mittels HPLC getrennt werden.



**Schema 3.9: Oxidation zu den Diketonen**

### 3. 3. 3. Zusammenfassung

Die von NEISIUS aufgebaute (*S*)-Serie der Macrophelid-Bibliothek konnte erfolgreich um die (*R*)-Serie erweitert werden, wobei der enantiomerenangereicherte Baustein (*R*)-**41** durch eine enzymatische Reduktion des  $\beta$ -Ketoesters **40** mit der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus* dargestellt wurde. Außerdem konnte der Oxygenierungsgrad variiert werden, sodass auch die nicht-natürlichen Diketone (*cis*,9*R*)-**45** zugänglich sind.

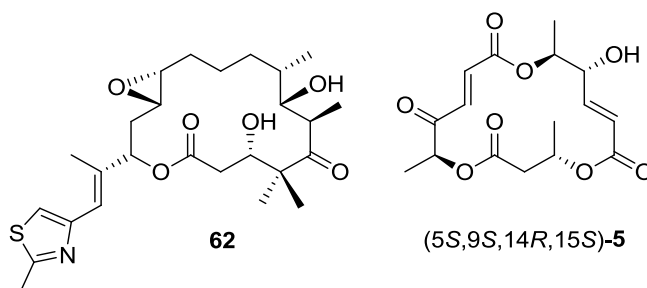
Die Ketohydroxylierung konnte nicht weiter optimiert werden; hier konnte lediglich der präparative Maßstab vergrößert werden. Breite Substratvariationen am  $\beta$ -Ketoester konnten nicht erzielt werden, da kettenverlängerte  $\beta$ -Ketoester von der ADH offenbar nicht toleriert werden.



Vermutung angestellt wurden, sind mit den in Abschnitt 1. 2. 1. beschriebenen Ligandenbasierten Methoden vergleichbar und werden im Folgenden ausgeführt.

#### 4. 1. Die Target-Hypothese

Vergleicht man die Macrospheleide mit den Epothilonen, einer Klasse von mikrotubulistabilisierenden Wirkstoffen, so fällt eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit auf (Abb. 4.2), die auch schon von NEMOTO festgestellt wurde.<sup>31</sup> Beide Substanzklassen enthalten 16-gliedrige Lactone. Auch die biologische Aktivität der Macrospheleide ist mit der der Epothilone vergleichbar; beide Substanzklassen wirken apoptoseinduzierend.<sup>2,30</sup> Für die Epothilone ist ein Target bekannt, nämlich Tubulin bzw. die Mikrotubuli.<sup>71</sup> Deshalb wurde Tubulin auch als Target der Macrospheleide vermutet.

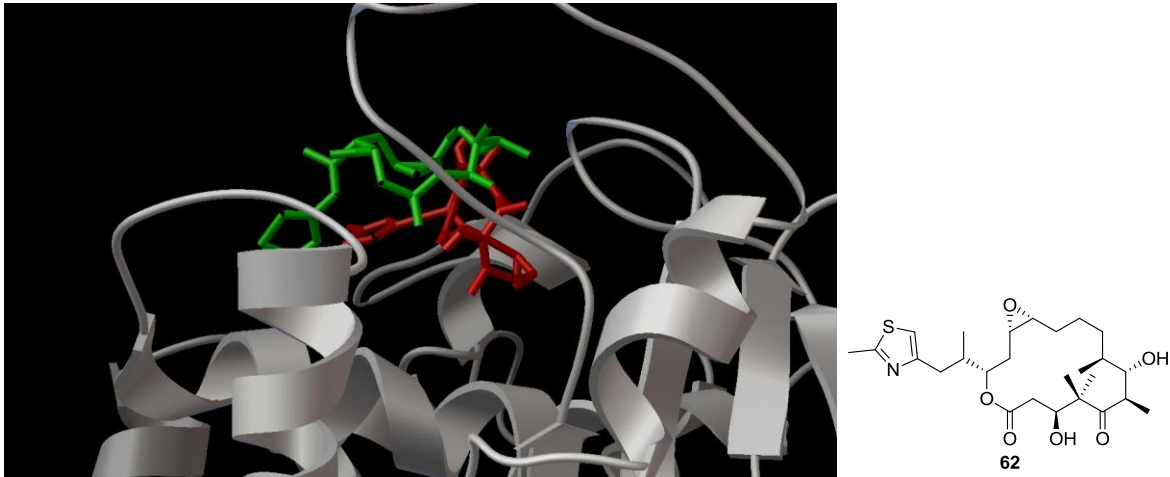


**Abbildung 4.2: Epothilon A und Macrospheleide B**

Als Rezeptor für das Docking wurde daher ( $\beta$ -)Tubulin zugrunde gelegt.

#### 4. 2. Identifizierung von flexiblen Aminosäureresten am Tubulin

In der Proteindatenbank findet sich eine Struktur eines Epothilon-Tubulin-Komplexes (1tvk'). Diese Struktur sollte zunächst durch ein Docking vorhergesagt werden, um die Verlässlichkeit von AutoDock Vina bei diesem Target zu verifizieren. Dabei wurde der Rezeptor (Tubulin) vollständig starr behandelt. Leider konnte die Struktur 1tvk nicht annähernd vorhergesagt werden (Abb. 4.3); es wird lediglich die korrekte Bindungsregion berechnet. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass Tubulin flexibel behandelt werden muss.



**Abbildung 4.3: Bestes Docking von Epothilon A 62 (rot) und korrekte Orientierung in der Proteinstruktur 1tvk (grün)**

Um flexible Aminosäurereste zu identifizieren, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: ein Auswahlschema mit bestimmten Kriterien für flexible Aminosäuren und ein Proteinalignment aller verfügbaren Tubulin-Strukturen.

#### 4. 2. 1. Das Auswahlschema

Flexible Aminosäurereste haben meist bestimmte Eigenschaften: So neigen lipophile Aminosäurereste eher zu Flexibilität als hydrophile, weil hydrophile Reste H-Brücken ausbilden können und so relativ stark intramolekular fixiert sind. Lipophile Reste können allenfalls (schwächere) VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen eingehen und sind daher weniger stark intramolekular fixiert.

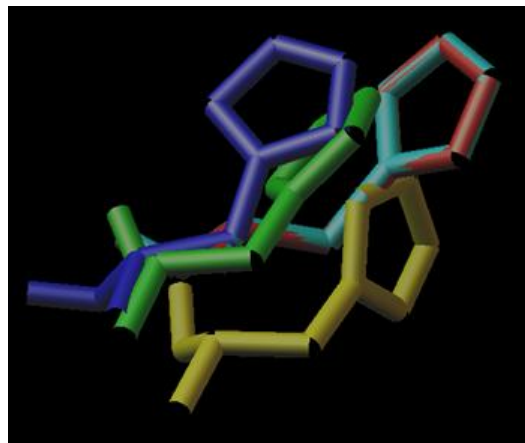
Außerdem sind Reste, die Teile von Loops sind, häufig flexibel. Der Grund hierfür liegt in der „Biegung“ des Peptidrückrats an Loops. Dadurch nehmen Aminosäurereste einen größeren Abstand zu benachbarten Resten ein und Torsionen sind weniger sterisch gehindert.<sup>72</sup>

Die Bindungstasche von Tubulin (Paclitaxel-Domäne) enthält hauptsächlich hydrophile Reste (wie Arg, Glu, Asp, Asn, Gln), die eher wenig flexibel sein sollten. His227 ( $\beta$ -Kette) allerdings erscheint verdächtig, zumal es sich hierbei um keinen hydrophilen Rest handelt und His227 Teil einer Helix ist. Auch bei Helices kommt es zu einer Biegung des Peptidrückrats, sodass dabei die Reste einen größeren Abstand zueinander einnehmen.

#### 4. 2. 2. Das Proteinalignment

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung flexibler Reste bietet ein Alignment aller verfügbaren Strukturen des Proteins. Bei einem Alignment werden Proteinstrukturen derart übereinandergelegt, dass der durchschnittliche Abstand (genauer die Wurzel der mittleren

quadratischen Abstände, „root-mean-square-deviation“, RMSD) korrespondierender Aminosäuren jeweils möglichst gering ist. Erwartungsgemäß sollten alle Atome exakt aufeinander liegen. Zeigen sich jedoch Unterschiede bei einem bestimmten Rest, so ist dies ein Hinweis darauf, dass der betreffende Rest eine gewisse Flexibilität besitzt. Andernfalls würde sich der Rest in verschiedenen Strukturen desselben Proteins immer in der gleichen Konformation zeigen. Abb. 4.4 zeigt ein Proteinalignment von fünf verschiedenen Tubulin-Strukturen, nämlich 1tvk<sup>73</sup>, 1jff<sup>74</sup>, 1tub<sup>59</sup>, 1ia0<sup>75</sup> und 1z2b<sup>76</sup>. Das Proteinalignment wurde mithilfe des Webtools „MultiProt“<sup>77</sup> durchgeführt und es wurde speziell die Bindungstasche (d. h. die Paclitaxeldomäne) betrachtet. His227 zeigt sich in diesen fünf Tubulin-Strukturen in vier verschiedenen Konformationen. Dies deutet auf eine vorhandene Flexibilität von His227 hin, was auch schon die Überlegungen im Rahmen des vorher besprochenen Auswahlschemas vermuten ließen.



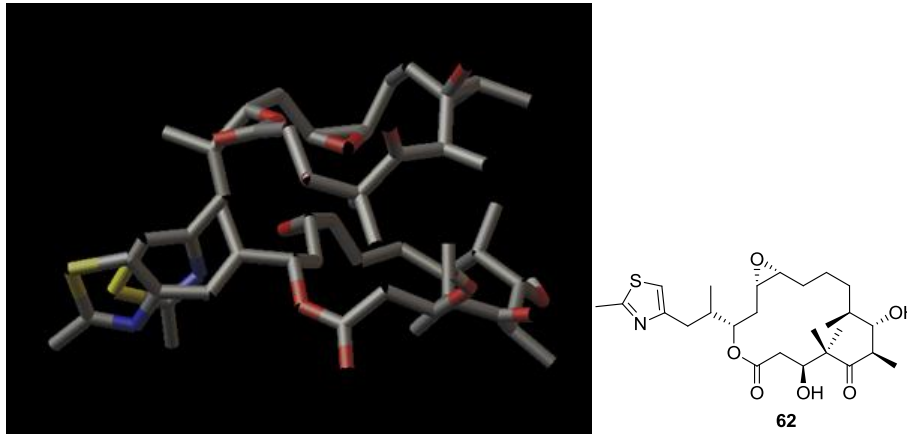
**Abbildung 4.4: Proteinalignment: Die verschiedenen Konformationen von His227 in den Strukturen 1tvk, 1tub, 1jff, 1ia0 und 1z2b; Protein ausgeblendet**

#### 4. 2. 3. Verbesserte Vorhersage der Struktur 1tvk

Aufgrund der Erkenntnisse der letzten beiden Abschnitte wurde nun His227 beim Docking flexibel behandelt. Dabei wurden beide Torsionen aktiviert, was der maximalen Flexibilität entspricht.

Epothilon A wurde mit dem CHARMM-Kraftfeld minimiert und an Tubulin gedockt. Abb. 4.5 zeigt das beste Docking, das nun besser mit der experimentellen Struktur 1tvk übereinstimmt: Zumindest die Orientierung des Epothilons konnte gut vorhergesagt werden. Die korrekte Konformation konnte erwartungsgemäß nicht vorhergesagt werden, weil Bindungen von Ringsystemen beim Docking generell als nicht rotierbar behandelt werden und ein energieminiertes Konformer von Epothilon als Input verwendet wurde (vgl. auch Abschnitt 1. 2. 2.). Auf ein Multikonformer-Docking wurde aufgrund des großen

Rechenaufwands verzichtet und proprietäre Software, die flexibles Docking von zyklischen Liganden erlaubt, stand nicht zur Verfügung.



**Abbildung 4.5: Bestes Docking von Epothilon A 62 (unten) und korrekte Orientierung in der Proteinstruktur 1tvk (oben); Protein ausgeblendet**

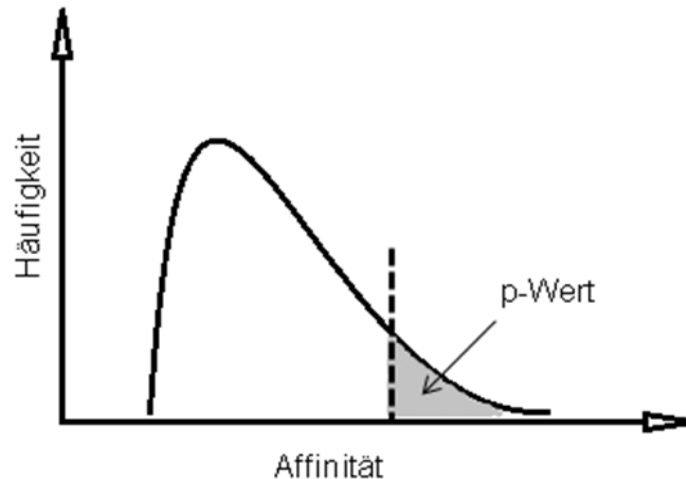
Somit konnte gezeigt werden, dass AutoDock Vina bei dem Rezeptor Tubulin mit flexiblem His227 annehmbare Vorhersagen liefert.

### 4. 3. Normalisierung der Affinitäten

Die Affinitäten, die von Docking-Anwendungen berechnet werden, besitzen in aller Regel nur beschränkte Aussagekraft. So können Affinitäten von Molekülen mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften nicht direkt verglichen werden. Z. B. zeigen große Liganden im Allgemeinen auch höhere Affinitäten, da größere Moleküle eine größere Moleküloberfläche besitzen, die mehr Kontaktfläche mit der Proteinoberfläche bilden kann.<sup>8</sup> Um Affinitäten von Liganden mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften vergleichen zu können, müssen diese Affinitäten normalisiert werden.

Eine Möglichkeit zur Normalisierung von Affinitäten bietet die Methode von WALLACH.<sup>78</sup> Dabei wird für jeden Kandidaten der virtuellen Bibliothek eine Bibliothek aus sog. Decoys erstellt. Decoys sind Liganden, die nachweislich keine Aktivität besitzen. Diese Decoys sollen außerdem dieselben physikalischen Eigenschaften besitzen wie der Ligand, zu dessen Normalisierung sie herangezogen werden. Die gesamte Decoy-Bibliothek wird gedockt und die Verteilung der Affinitäten betrachtet. Erwartungsgemäß sollte sich eine Normalverteilung zeigen, da die Decoys ja zufällig ausgewählt wurden (Abb. 4.6). Ein aktiver Ligand sollte überdurchschnittlich gut an das Protein binden und seine Affinität sollte demnach möglichst weit entfernt vom Maximum dieser Normalverteilung liegen, wie durch die gestrichelte Linie angedeutet ist.





**Abbildung 4.6: Verteilung der Decoy-Affinitäten und Affinität eines aktiven Liganden (gestrichelte Linie)**

Die Fläche unter der Kurve von dieser gestrichelten Linie bis nach rechts ins Unendliche hat aufgrund des asymptotischen Verhaltens der GAUSS-Funktion einen endlichen Wert, der für aktive Liganden minimal wird. Diese Fläche entspricht dem p-Wert, der anschaulich die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der der Ligand *nicht* aktiv ist bzw., genauer ausgedrückt, überdurchschnittlich *schlecht* bindet. Der p-Wert ist also die normalisierte Affinität und erlaubt den Vergleich von Liganden mit verschiedenen physikalischen Eigenschaften.

Eine Alternative zur analytischen Berechnung des p-Wertes (d. h. durch Integration) bietet eine Iterationsformel, die eine numerische Berechnung erlaubt (die einfacher implementiert werden kann):

$$p = 1 - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad x_i = \begin{cases} 1; & s_i \leq s_r \\ 0; & s_i > s_r \end{cases}$$

Darin sind  $s_i$  die Affinitäten der Decoys,  $s_r$  die Affinität des Kandidaten und  $n$  die Gesamtzahl der Decoys.

Um dieses Verfahren zur Normalisierung von Affinitäten anwenden zu können, werden also Decoy-Bibliotheken benötigt. Um eine repräsentative Normalverteilung zu erhalten, sollten die Decoy-Bibliotheken jeweils 80 bis 100 Decoys enthalten.

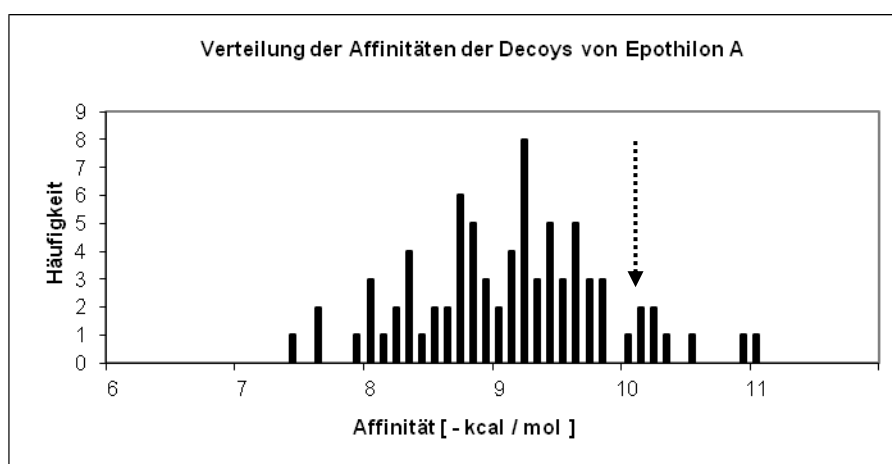
Da die Macrosphelide sich in ihren physikalischen Eigenschaften kaum unterscheiden, muss nicht für jeden Vertreter eine eigene Decoy-Bibliothek erstellt werden. So können alle Macrosphelide, die die gleiche Zahl von OH-Gruppen besitzen, gegen eine gemeinsame Decoy-Bibliothek normalisiert werden. Die Zahl der OH-Gruppen und damit die Zahl der H-Brückendonoren und rotierbaren Bindungen ist nämlich die einzige physikalische

Eigenschaft, in der sich die Macrophelide maßgeblich unterscheiden. Alle anderen physikalischen Eigenschaften, nämlich die Zahl der H-Brückenakzeptoren, die Molmasse, der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log P$ ) und die polare Moleküloberfläche (PSA), sind praktisch identisch. Die Decoy-Bibliotheken wurden erstellt, indem in der ZINC-Datenbank<sup>17</sup> nach Verbindungen mit den entsprechenden physikalischen Eigenschaften gesucht wurde (Tabelle 4.1). Im Fall der Diketone **45** konnten nicht genug Verbindungen gefunden werden, die diese Eigenschaften besitzen, daher wurden alle Diketone mit der Decoy-Bibliothek von Macrophelid B **5** normalisiert.

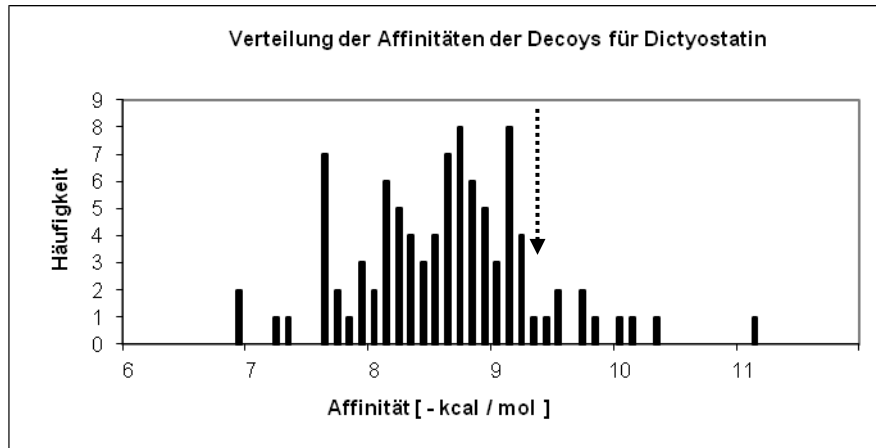
	<b>Dictyostatin 63</b>	<b>Epothilon A 62</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>45</b>
Molmasse	500 - 560	380 - 400	320 - 360	320 - 360	320 - 360
$\log P$	4.0 - 5.9	2.5 - 3.5	-0.2 - 1	0.2 - 1	0.2 - 1
rotierbare Bindungen	6 - 8	2	0 - 1	0 - 1	0 - 1
PSA	90 - 130	100 - 120	85 - 105	85 - 105	85 - 105
H-Donoren	4	2	2	1	0
H-Akzeptoren	6	7	8	8	8
gefunden	93	84	84	77	1

**Tabelle 4.1: Kriterien für die Suche von Decoys in der ZINC-Datenbank**

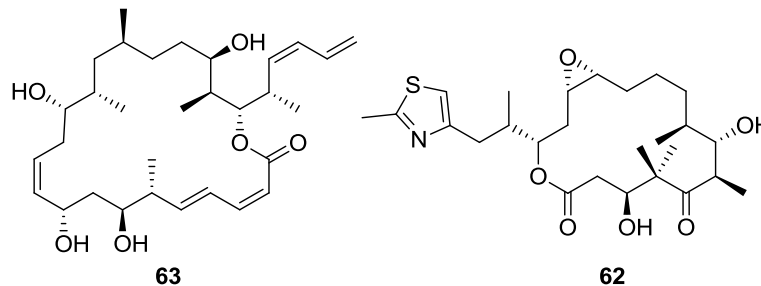
Die Decoy-Bibliotheken wurden nun mit Vina an Tubulin gedockt. Abb. 4.7 und Abb. 4.8 zeigen exemplarisch die Verteilungen der Affinitäten der Decoys für Epothilon A **62** und Dictyostatin **63** (Abb. 4.9). Epothilon A besitzt eine berechnete Affinität von -10.1 kcal/mol, Dictyostatin von -9.3 kcal/mol, wie durch die Pfeile angedeutet ist. Damit liegen die Affinitäten dieser bekanntermaßen aktiven Vertreter erwartungsgemäß in den äußeren Bereichen der Normalverteilungen.



**Abbildung 4.7: Verteilung der Affinitäten der Decoys für Epothilon A, dessen Affinität mit gestricheltem Pfeil gekennzeichnet ist**



**Abbildung 4.8:** Verteilung der Affinitäten der Decoys für Dictyostatin, dessen Affinität mit gestricheltem Pfeil gekennzeichnet ist



**Abbildung 4.9:** Bekannte MT-Stabilisatoren: Dictyostatin 63 und Epothilon A 62

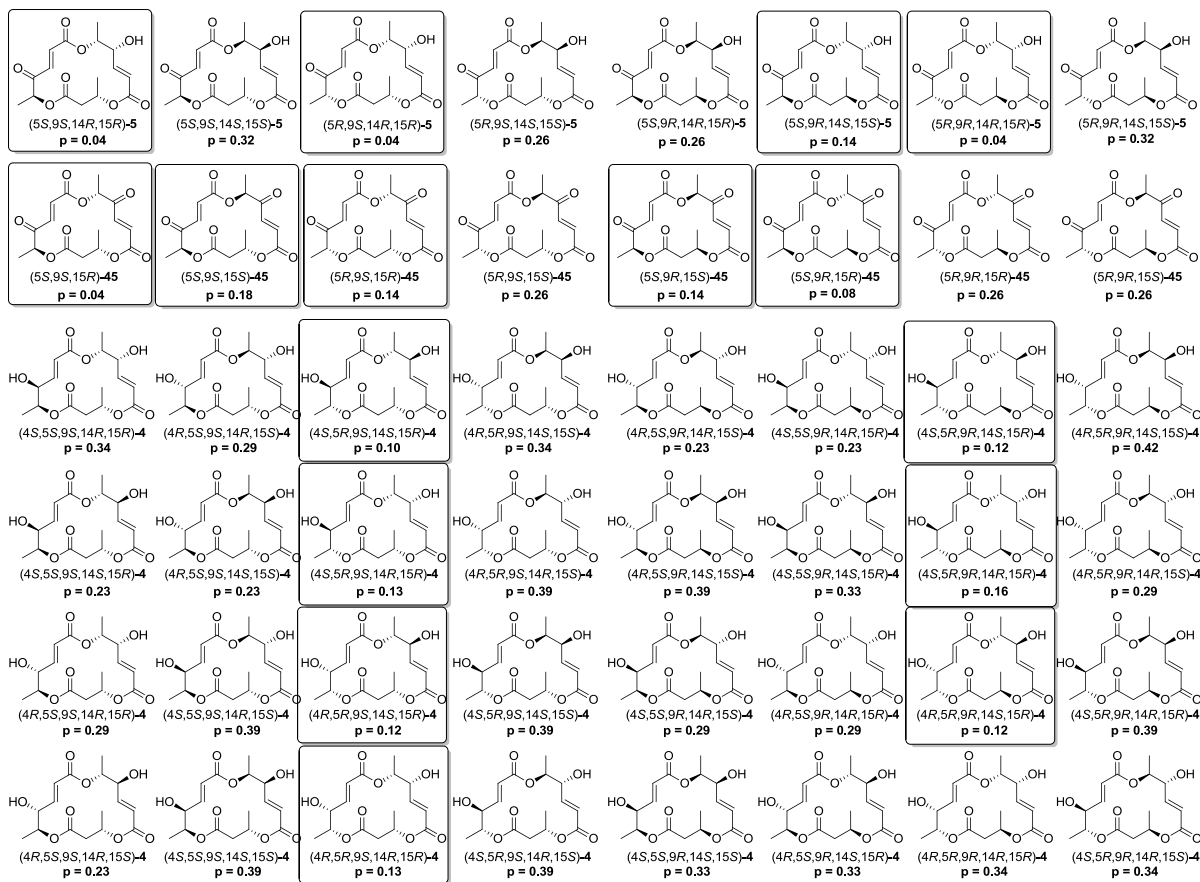
Nach der numerischen Iterationsformel berechnet sich der p-Wert für Epothilon A **62** zu  $p=0.08$ . Auch Dictyostatin **63** liegt mit  $p=0.11$  in diesem Bereich (leider konnten für Paclitaxel in der ZINC-Datenbank nicht genügend physikalisch vergleichbare Verbindungen gefunden werden, die als Decoys zur Normalisierung herangezogen werden können - ähnlich wie für die Diketone **45** -, sodass für Paclitaxel kein p-Wert angegeben werden kann).

Damit steht nun ein erstes Auswahlkriterium zur Verfügung, das die Beurteilung der beim Docking berechneten Bindungsaffinitäten erlaubt. Für ein virtuelles Screening muss nun noch ein Grenzwert festgelegt werden. Dieser Grenzwert wurde willkürlich auf  $p=0.2$  gesetzt, weil bekannte Wirkstoffe wie oben erwähnt um  $p=0.1$  liegen und noch kleine Abweichungen erlaubt werden. Wenn die Grenze zu scharf gezogen wird, können evtl. falsch-negative Vorhersagen getroffen werden. Deshalb sollte eher mehr Spielraum zugelassen und eventuelle falsch-positive Vorhersagen in Kauf genommen werden. Beim virtuellen Screening wird also nach Kandidaten gesucht, deren p-Werte kleiner als 0.2 sind.

Abb. 4.9 zeigt die p-Werte aller Vertreter der zugänglichen Macrophelid-Bibliothek. Nur die umrahmten Vertreter erfüllen das o. a. Auswahlkriterium ( $p < 0.2$ ). Das bedeutet, dass diese

Macrosphelid-Derivate überdurchschnittlich gut an Tubulin binden. Dies bekräftigt die Hypothese, dass Tubulin ein Target für die Macrosphelide sein könnte und erhärtet außerdem den Verdacht, dass die aufgebaute Macrosphelid-Bibliothek tatsächlich aktive Mikrotubulistabilisatoren enthält.

Allerdings ist gute Proteinbindung nur ein notwendiges Kriterium für die biologische Aktivität einer Verbindung. Natürlich binden aktive Wirkstoffe auch gut an das Target, doch die Umkehrung gilt nicht, denn gute Proteinbindung allein resultiert nicht unbedingt in einer biologischen Aktivität. Vielmehr ist für die Aktivität erforderlich, dass der Ligand in einer bestimmten Orientierung und Konformation an das Target bindet. Dieses hinreichende Kriterium wurde bisher nicht berücksichtigt.

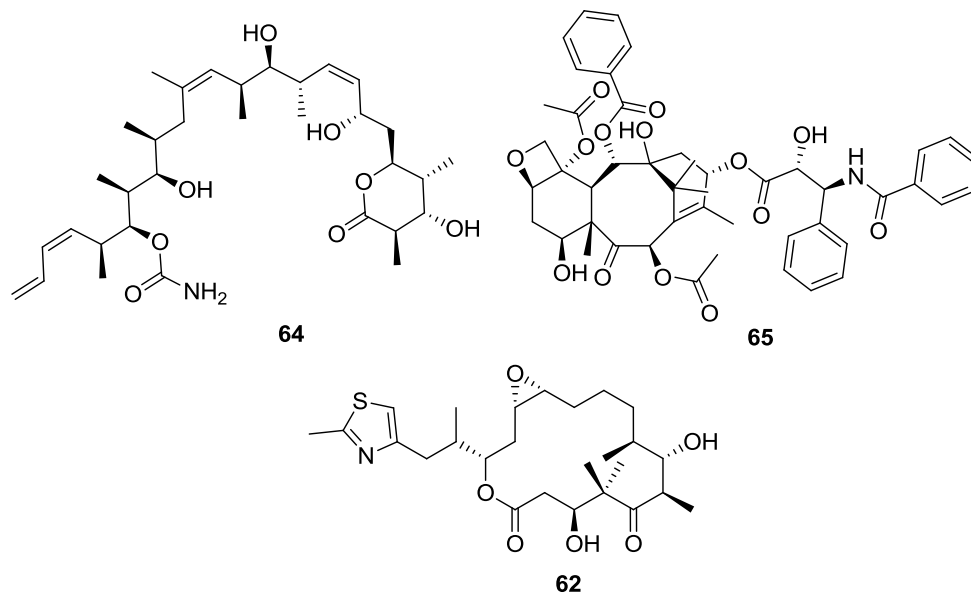


**Abbildung 4.9: p-Werte aller Derivate und überdurchschnittlich gut an Tubulin bindende Macrosphelide (umrahmt,  $p < 0.2$ )**

#### 4. 4. Auswertung der Docking-Strukturen

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie aktive Mikrotubulistabilisatoren an Tubulin binden, wurden die besten Dockings bekannter Wirkstoffe (Epothilon A **62**, Discodermolid **64** und Paclitaxel **65**, Abb. 4.10) betrachtet.

Es fällt auf, dass alle drei Wirkstoffe laut Docking an den M-Loop binden (Abb. 4.11). Der M-Loop ist eine 20 Aminosäuren lange Sequenz (Aminosäuren Nummer 270 bis 290) innerhalb der Bindungstasche von Tubulin. Dies steht auch im Einklang damit, dass der M-Loop essentiell für die lateralen Kontakte ist.<sup>71</sup> Die lateralen Kontakte sind die Wechselwirkungen zwischen den Protofilamenten innerhalb der Mikrotubuli. Eine Stabilisierung bzw. Destabilisierung des M-Loops könnte also auch in einer Beeinflussung der Stabilität der Mikrotubuli resultieren.



**Abbildung 4.10: Bekannte MT-Stabilisatoren: Discodermolid, Paclitaxel und Epothilon A**

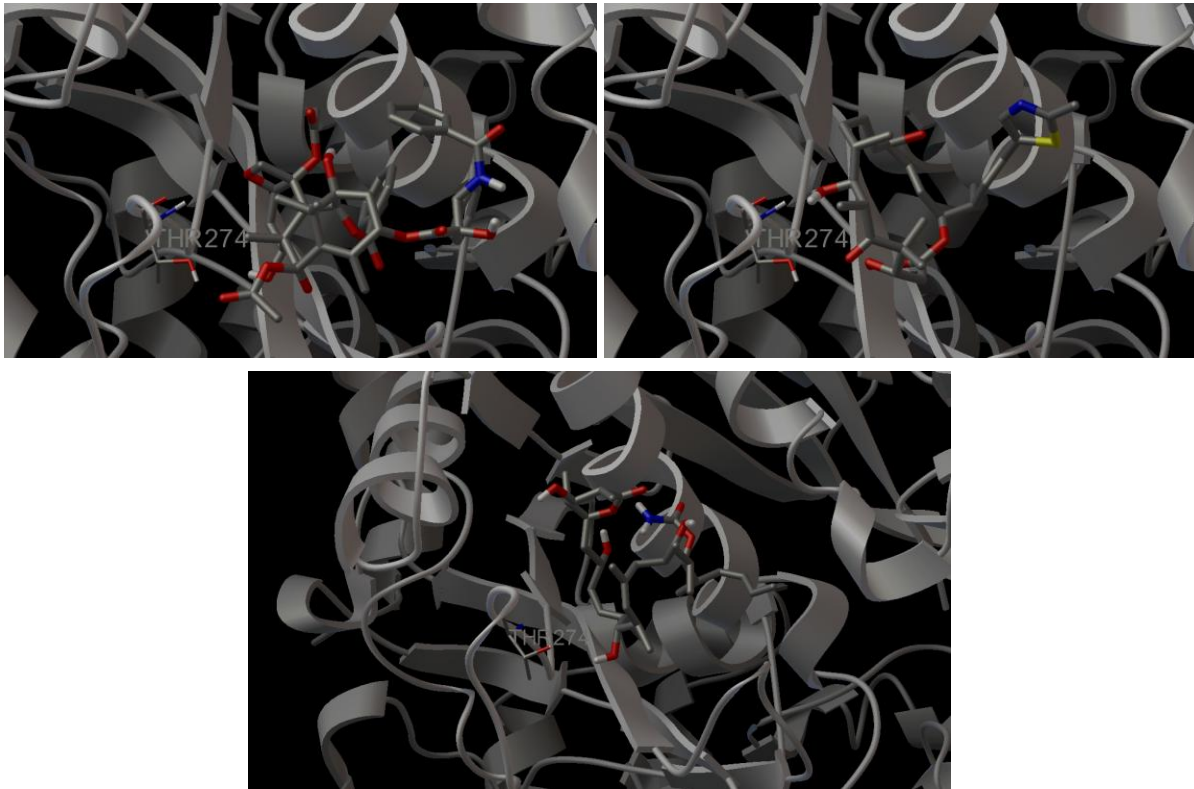
An dieser Stelle muss wieder ein Grenzwert für den maximalen Abstand eines Liganden zum M-Loop festgelegt werden. Dieser Grenzwert wurde auf 2.4 Å gesetzt, weil man für gute H-Brücken in Röntgenstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen Abstände um 2.2 Å findet.

Für das virtuelle Screening bedeutet dies, dass nach Liganden gesucht wird, die einen maximalen Abstand zum M-Loop von 2.4 Å nicht überschreiten. In Abb. 4.12 sind diejenigen Macrosphelid-Derivate umrahmt, die dieses Kriterium erfüllen. Auch Epothilon A **62**, Discodermolid **64** und Paclitaxel **65** erfüllen natürlich dieses Kriterium.

Die Anforderung, dass aktive Kandidaten an den M-Loop binden müssen, stellt nun eine hinreichende Bedingung für biologische Aktivität dar. Damit sind zwei Auswahlkriterien für das virtuelle Screening formuliert worden:

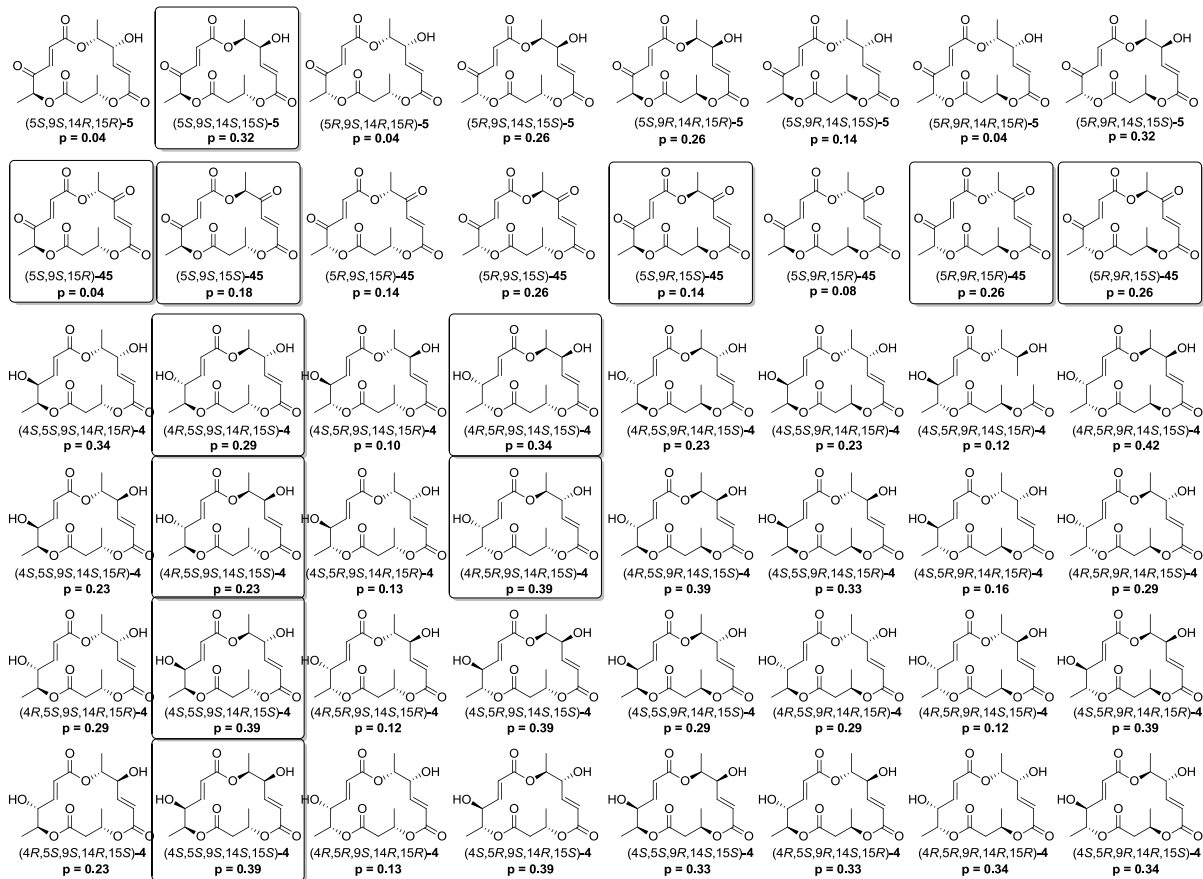
- $p < 0.2$
- Abstand zum M-Loop maximal 2.4 Å

Aktive Kandidaten sollten beiden Kriterien genügen.



**Abbildung 4.11: Bestes Docking von Paclitaxel 65 (oben links), Epothilon A 62 (oben rechts) und Discodermolid 64 (unten)**

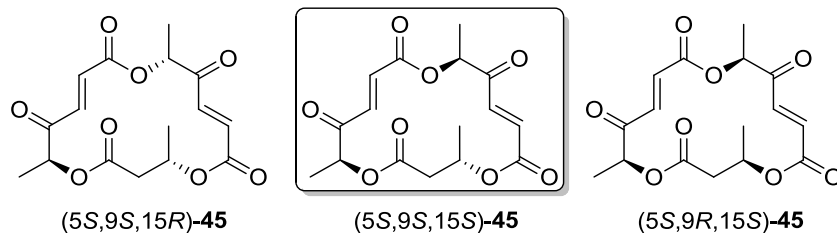
## 4. Theoretische Studien zur biologischen Aktivität



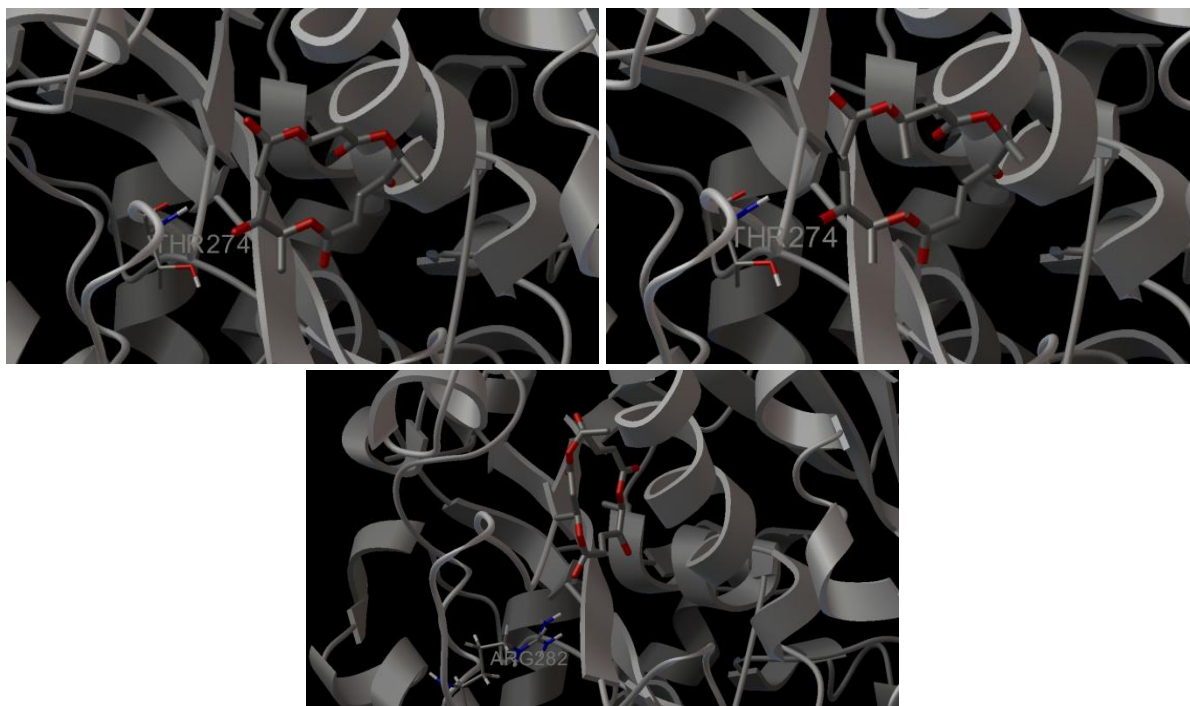
**Abbildung 4.12: Macrospheleid-Derivate, die an den M-Loop binden (maximaler Abstand 2.4 Å)**

### 4. 5. Ergebnis des virtuellen Screenings

Die in den letzten beiden Abschnitten beschriebenen Auswahlkriterien erlauben nun eine drastische Verkleinerung bzw. Anreicherung der Macrospheleid-Bibliothek: Von allen 48 präparativ zugänglichen Macrospheleid-Derivaten erfüllen nur drei Vertreter (Abb. 4.13) beide Auswahlkriterien, d. h.  $p < 0.2$  und Abstand zum M-Loop nicht größer als 2.4 Å (Abb. 4.14).



**Abbildung 4.13: Positive Vorhersagen des virtuellen Screenings (angereicherte Bibliothek); umrahmt: experimentell aktive Verbindung**



**Abbildung 4.14: Bestes Docking der positiven Vorhersagen (5S,9S,15S)-45, (5S,9R,15S)-45 und (5S,9S,15R)-45**

Wie im nächsten Kapitel beschrieben wird, zeigt nur ein einziger Vertreter tatsächlich eine mikrotubulistabilisierende Wirkung; hierbei handelt es sich um das Diketon (5S,9S,15S)-**45**. Dieses Diketon findet sich auch in der angereicherten Bibliothek nach dem virtuellen Screening. Die anderen beiden als aktiv vorhergesagten Diketone, (5S,9R,15S)-**45** und (5S,9S,15R)-**45**, zeigen keine Aktivität; hierbei handelt es sich also um falsch-positive Vorhersagen. Damit liegt die Falschpositivrate bei 67 % und es wurden keine falsch-negativen Vorhersagen getroffen.

Die hohe Falschpositivrate lässt sich evtl. durch die Näherungen erklären, die beim virtuellen Screening getroffen wurden. Zum Einen wurden hier Makrozyklen gedockt, die beim Docking generell keine Flexibilität besitzen (vgl. Abschn. 1. 2. 2.) und auf flexibles Docking bzw. Multikonformer-Docking wurde mangels Open-Source-Anwendungen bzw. wegen des höheren Rechenaufwands verzichtet. Zum Anderen handelt es sich bei den positiven Vorhersagen des virtuellen Screenings ausschließlich um Diketone, und zur Normalisierung der Affinitäten der Diketone wurde die Decoy-Bibliothek von Macrosphelid B (5S,9S,14R,15S)-**5** herangezogen (vgl. Abschn. 4. 3. 3.). Macrosphelid B besitzt eine OH-Gruppe (und damit einen H-Brückendonor), wohingegen die Diketone **45** keine OH-Gruppe besitzen.



#### **4. 6. Zusammenfassung**

Für das Rezeptor-basierte virtuelle Screening wurde zunächst eine Target-Hypothese aufgestellt, indem Tubulin als Target für die Macrosphelide vermutet wurde.

Die Verlässlichkeit des Dockings wurde durch Vorhersage der bekannten Struktur eines Tubulin-Epothilon-Komplexes unter Beweis gestellt, wobei sich zeigte, dass der Aminosäurerest von His227 beim Docking flexibel behandelt werden muss, um annehmbare Vorhersagen zu erhalten.

Die Affinitäten von Vina wurden nach der Methode von WALLACH gegen Decoys mit vergleichbaren physikalischen Eigenschaften normalisiert. Die normalisierten Affinitäten der Macrosphelid-Analoga wurden mit denen von bekannten MT-Stabilisatoren verglichen. Auch die Dockings der Macrosphelid-Analoga wurden mit denen von bekannten MT-Stabilisatoren, die an den M-Loop binden, verglichen.

Das virtuelle Screening konnte die Bibliothek aus 48 Macrosphelid-Analoga zu einer Bibliothek aus drei Kandidaten verkleinern. Einer dieser drei als aktiv vorhergesagten Liganden war tatsächlich aktiv und alle als nicht aktiv vorhergesagten Liganden waren tatsächlich auch experimentell nicht aktiv.

## 5. Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Aktivität

Der Einfluss potentieller Wirkstoffkandidaten auf die MT-Polymerisation kann in einem kommerziell erhältlichen Tubulin-Polymerisationsassay untersucht werden.<sup>79,80</sup> Dabei wird die Polymerisation von Tubulin, das zu Beginn vollständig monomer vorliegt, im zeitlichen Verlauf anhand der Absorption bei 340 nm bei 37 °C verfolgt. MT in Lösung zeigen nämlich eine Lichtstreuung, die proportional zur Konzentration ist. Zugesezte Wirkstoffkandidaten, die die MT-Stabilität beeinflussen, verändern auch die Geschwindigkeit der MT-Polymerisation: MT-stabilisierende Verbindungen beschleunigen die Polymerisation, MT-destabilisierende Verbindungen hingegen verlangsamen die Polymerisation. Dies zeigt sich an der erhöhten bzw. erniedrigten Maximalsteigung der Polymerisationskurve.

### 5. 1. Testen der gesamten Bibliothek

Zunächst wurden alle Kandidaten bei der Konzentration 20  $\mu\text{M}$  getestet. Dabei wurden teilweise Diastereomergemische verwendet, um nicht zu viel teures Protein zu verbrauchen, und die Konzentrationen wurden entsprechend angepasst: Bei Gemischen aus vier Diastereomeren wurde z. B. bei Konzentrationen von 80  $\mu\text{M}$  gearbeitet, was der gegenüber den diastereomerenreinen Proben 4-fach erhöhten Konzentration entspricht. Alle acht Diketone wurden jedoch diastereomerenrein getestet weil das virtuelle Screening nur Diketone als aktiv vorhergesagt hat (vgl. Abschn. 4. 5.).

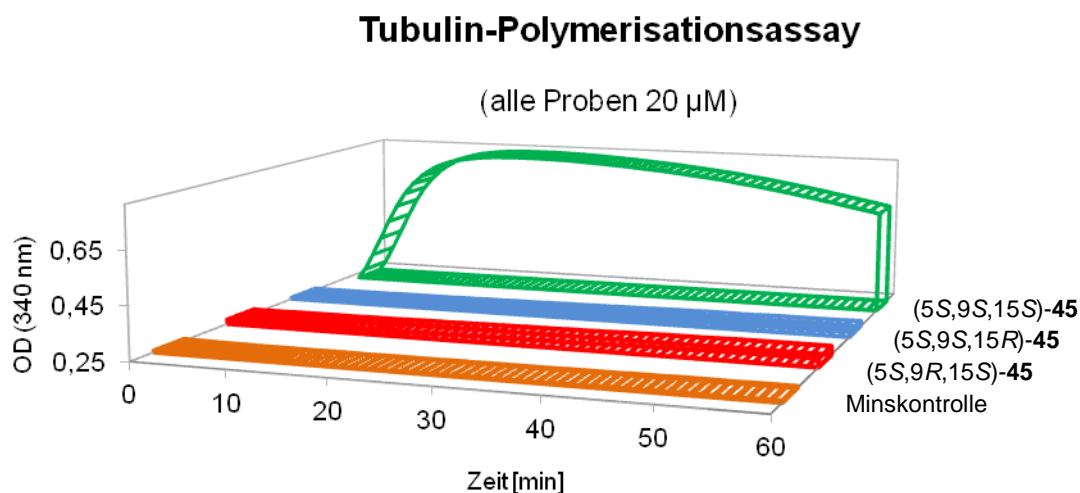
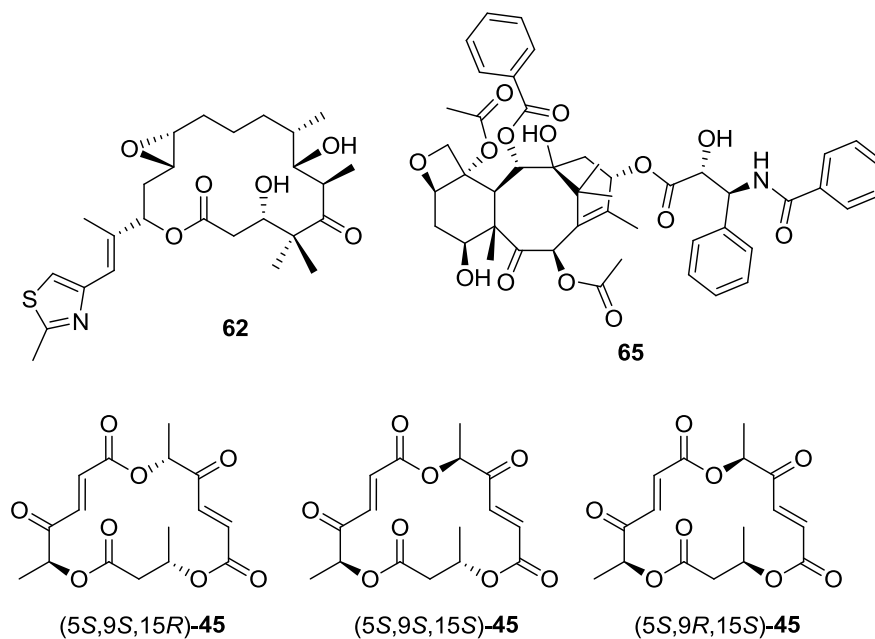


Abbildung 5.1: Tubulin-Polymerisation in Gegenwart der drei aktiv vorhergesagten Diketone

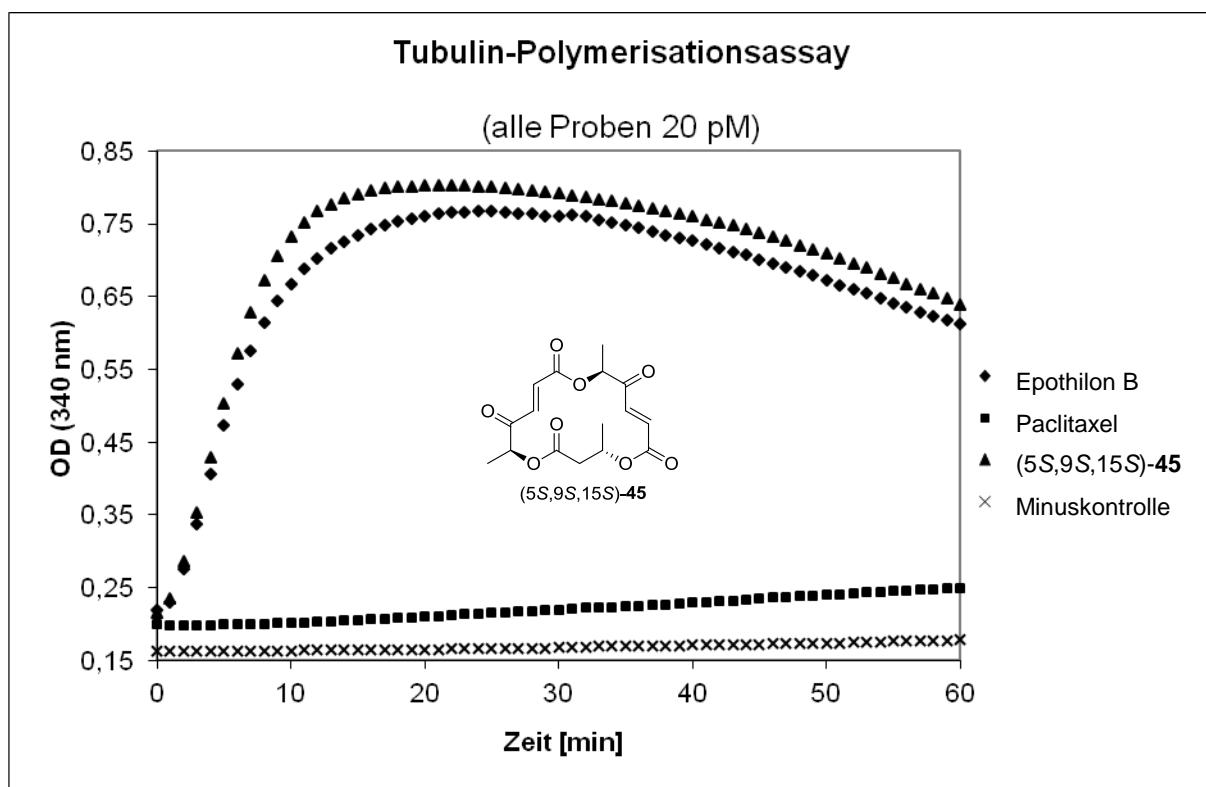
Unter allen 48 Kandidaten der Macrophelid-Bibliothek ist nur das Diketon (5S,9S,15S)-**45** aktiv im Sinne einer MT-stabilisierenden Wirkung (Abb. 5.1). Dies zeigt sich an der gegenüber der Minuskontrolle drastisch erhöhten Maximalsteigung der Polymerisationskurve, denn eine Stabilisierung der MT resultiert in einer schnelleren Polymerisation. Die Tubulinpolymerisation in Gegenwart der anderen 47 Kandidaten ist mit der Minuskontrolle identisch (deren Messkurven finden sich im experimentellen Teil, Abschn. 10. 3.).



**Abbildung 5.2: Positiv-Vorhersagen des virtuellen Screenings**

Quantitative Bestimmungen der Aktivität wurden aus Kostengründen nicht durchgeführt, weil hierfür Polymerisationskurven bei verschiedenen Probenkonzentrationen gemessen werden müssen. Um dennoch zumindest Anhaltspunkte über die Potenz zu erhalten, wurden die Probenkonzentrationen drastisch verringert auf 20 pM. In diesem Konzentrationsbereich weisen die beiden Positivkontrollen, Epothilon B und Paclitaxel **65**, deutlich unterschiedliche Potenzen auf (der MT-stabilisierende Effekt von Paclitaxel ist gerade noch erkennbar). Es zeigt sich, dass das Diketon (5S,9S,15S)-**45** eine Potenz aufweist, die mit der von Epothilon B vergleichbar ist (Abb. 5.3).

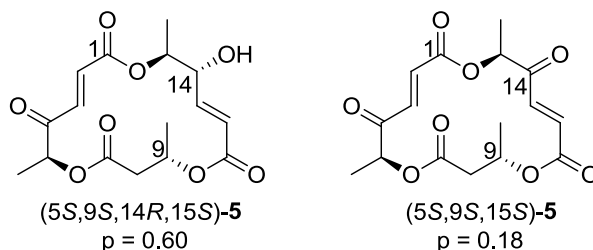
Zu erwähnen ist an dieser Stelle auch, dass (5S,9S,15S)-**45** auch schon von der Gruppe um NEMOTO berichtet wurde, die in einem zellulären Assay dessen antiproliferatorische Wirkung gezeigt haben.<sup>44</sup> Eine Hemmung des Zellwachstums ist vereinbar mit einer MT-stabilisierenden Wirkung, und damit steht das Ergebnis im Einklang mit der Literatur.



**Abbildung 5.3: Aktives Diketon (5S,9S,15S)-45 im Vergleich mit Epothilon B und Paclitaxel**

## 5. 2. Schlussfolgerungen und Diskussion

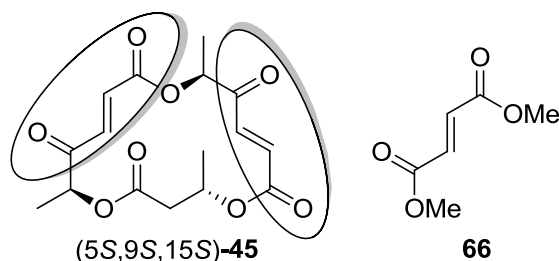
Da die [8x6]-Matrix von Macrospheid-Analoga nur die *cis*-konfigurierten Makrozyklen enthielt (vgl. Abschn. 2. 1.), wurde Macrospheid B (5S,9S,14R,15S)-5 nicht im Tubulin-Polymerisationsassay getestet. Den Ergebnissen des virtuellen Screenings zufolge dürfte (5S,9S,14R,15S)-5 nicht aktiv sein; zwar bindet (5S,9S,14R,15S)-5 innerhalb 2.4 Å an den M-Loop, doch der p-Wert liegt mit 0.60 deutlich zu hoch. Allerdings ist (5S,9S,14R,15S)-5 nachweislich aktiv, zumindest in zellulären Assays.



**Abbildung 5.4: Vergleich von Macrospheid B und dem aktiven Diketon**

Beim Vergleich von Macrospheid B (5S,9S,14R,15S)-5 mit dem MT-stabilisierenden Diketon (5S,9S,15S)-45 fällt jedoch auf, dass das Diketon (5S,9S,15S)-45 formal das Produkt der Oxidation der OH-Gruppe von (5S,9S,14R,15S)-5 an Position 14 unter Retention

aller übrigen Stereozentren ist (Abb. 5.4). Dies legt die Vermutung nahe, dass Macrosphelid B (5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**5** nur ein Prodrug ist, d. h. ein Wirkstoffvorläufer, der in der Zelle zum aktiven Diketon (5*S*,9*S*,15*S*)-**45** oxidiert wird, das wiederum die MT adressiert. Die Oxidation von allylischen sekundären OH-Gruppen innerhalb der Zelle erscheint keineswegs abwegig, zumal hierfür durchaus Stoffwechselwege in Frage kämen.



**Abbildung 5.5: Vergleich von Diketon (5*S*,9*S*,15*S*)-**45** mit Dimethylfumarat **66****

Interessant und auffällig ist auch die strukturelle Ähnlichkeit des Diketons (5*S*,9*S*,15*S*)-**45** mit Fumaraten (Abb. 5.5). Fumarate sind vielversprechend bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose und Schuppenflechte), wobei bereits der Wirkstoff Dimethylfumarat **66** zur Behandlung von Schuppenflechte zugelassen ist (Fumaderm<sup>®</sup>, Panaclar<sup>®</sup>). Auch dessen Wirksamkeit bei Multipler Sklerose konnte in ersten klinischen Untersuchungen gezeigt werden.<sup>81</sup> Die Wirkung von Dimethylfumarat besteht u. a. in der Verminderung der Expression von E-Selectin<sup>82-86</sup> und der Induktion der Apoptose<sup>87</sup>. Damit zeigt Dimethylfumarat ein ähnliches Wirkungsspektrum wie das strukturell verwandte Diketon (5*S*,9*S*,15*S*)-**45**.

### 5. 3. Zusammenfassung

In einem Tubulin-Polymerisationsassay wurden alle 48 Macrosphelid-Analoga bezüglich ihres Einflusses auf die MT-Polymerisation getestet. Nur ein Kandidat, das Diketon (5*S*,9*S*,15*S*)-**45**, zeigt eine MT-stabilisierende Wirkung, alle anderen 47 Kandidaten zeigen keinen Einfluss auf die MT-Polymerisation.

Im Großen und Ganzen bestätigen die experimentellen Ergebnisse damit die Ergebnisse des virtuellen Screenings bis auf die zwei falsch-positiven Vorhersagen (vgl. Abschn. 4. 5.).

Das (virtuell und experimentell) aktive Diketon (5*S*,9*S*,15*S*)-**45** ist formal das Oxidationsprodukt des virtuell nicht aktiven Macrosphelid B (5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**5**, was Vermutungen über Aspekte der Pharmakokinetik zulässt (Macrosphelid B als Prodrug?).

Schließlich konnte mit Tubulin erstmals ein Target für ein Macrosphelid-Derivat identifiziert werden, was die von anderen berichtete apoptoseinduzierende und antiproliferatorische

Wirkung von Macrophelid B (5*S*,9*S*,14*R*,15*S*)-**5**<sup>30</sup> und des Diketons (5*S*,9*S*,15*S*)-**45**<sup>44</sup> erklärt.

## 6. Virtuelle Generierung von zufälligen Molekülstrukturen

### 6. 1. Motivation

Bisher wurde beschrieben, wie durch die Kombination einer diversitätsorientierten Totalsynthese mit bioinformatischen Methoden die chemische Evolution der Natur nachgeahmt werden konnte. Das virtuelle Screening ermöglichte dabei die Imitation der Selektion. In diesem Kapitel wird ein Computerprogramm beschrieben, das einen anderen Aspekt der chemischen Evolution, den Aufbau einer diversen Substanzbibliothek, emuliert.

Um den zufälligen Aufbau einer diversen Substanzbibliothek zu imitieren, wird ein Programm benötigt, das Strukturen von organischen Verbindungen zufällig generieren kann. Solche Anwendungen werden bereits z. B. zur Strukturaufklärung (CASE, Computer-Assisted Structure Elucidation) verwendet, um beispielsweise zu einer experimentell (z. B. durch Massenspektrometrie oder Elementaranalyse) ermittelten Summenformel alle in Frage kommenden Strukturformeln zu generieren.<sup>88-98</sup> Mit Hilfe anderer Anwendungen können dann zu diesen Strukturen Erwartungsspektren simuliert werden, die schließlich mit den experimentellen Spektren verglichen werden können. Eine weitere Anwendung ist die automatische Generierung von kombinatorischen Substanzbibliotheken; dabei wird ein vorgegebenes Grundgerüst („scaffold“) an definierten Positionen mit vorgegebenen Substituenten („R-groups“) versehen und es werden alle möglichen Kombinationen (d. h. Strukturformeln) erzeugt.<sup>99</sup> Allerdings benötigen die beschriebenen Anwendungen einen Input, z. B. in Form einer Summenformel oder in Form von Fragmenten (die zum Aufbau einer kombinatorischen Substanzbibliothek verwendet werden).

Deshalb sollte an dieser Stelle ein Computerprogramm entwickelt werden, das Strukturen von organischen Verbindungen möglichst zufällig generieren kann. Zunächst sollte daher eine Möglichkeit gefunden werden, Strukturen EDV-technisch zu repräsentieren.

### 6. 2. Repräsentation von Molekülstrukturen

Zur Repräsentation von Strukturen stehen verschiedene Mittel zur Verfügung. Die 3D-Repräsentation, bei der alle Atome mit einem Atomtyp und räumlichen Koordinaten versehen werden, bietet wohl die realistischste Abbildung. Eine vereinfachte Alternative hierzu ist die 2D-Repräsentation, bei der alle Atome in einer Ebene liegen und durch ihre 2D-Koordinaten definiert werden (vergleichbar mit einer gezeichneten Strukturformel). Gebräuchliche

Dateiformate sind z. B. SDF oder MOLfile.<sup>100</sup> Schließlich existiert noch eine stark simplifizierte 1D-Darstellung, die lediglich die Konstitution der Moleküle in einer ASCII-Zeichenkette widerspiegelt. Hiervon stehen zwei Implementierungen zur Auswahl: die SMILES-Notation (Simplified Molecular Input Line Entry Specification, Daylight Chemical Information Systems Inc.) und die InChI-Notation<sup>101</sup> (International Chemical Identifier, IUPAC). Mit herkömmlichen Moleküleditoren können solche Zeichenketten dann in 2D-Strukturen umgewandelt werden, aus denen dann 3D-Koordinaten erzeugt werden können.

Die Implementierung der automatischen Erzeugung einer validen Strukturformel mit Hilfe einer 2D- oder 3D-Repräsentation erfordert zahlreiche linear-algebraische Berechnungen. Im Gegensatz dazu muss bei einer 1D-Repräsentation lediglich eine Zeichenkette erzeugt werden, was wesentlich einfacher zu implementieren ist. Daher wurde die SMILES-Notation zur Repräsentation der Strukturen verwendet, die im Folgenden kurz erklärt wird.

### 6. 3. Die SMILES-Notation

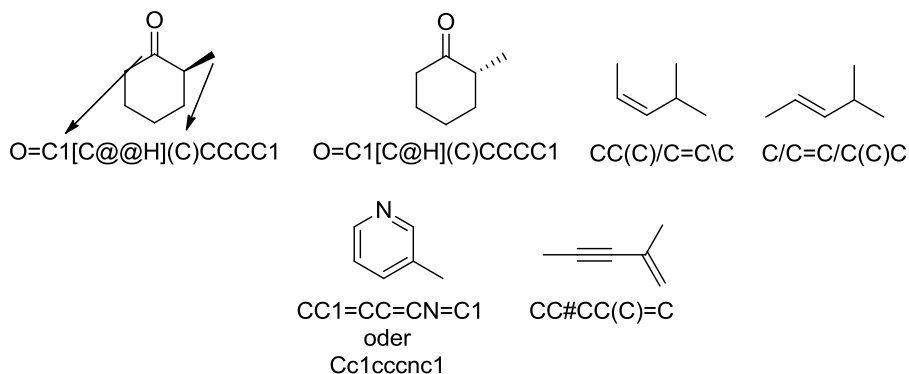
Die SMILES-Notation orientiert sich an der für organische Chemiker intuitiven Art, eine Strukturformel durch die Abfolge der Atome abzubilden: Atome werden durch ihre Elementsymbole dargestellt, wobei Wasserstoffatome weggelassen werden (mit Ausnahme von Stereozentren, bei denen immer alle vier Substituenten angegeben werden). Verzweigungen werden dargestellt, indem der Zweig in runde Klammern gesetzt wird. Doppelbindungen werden durch ein Gleichheitszeichen (=), Dreifachbindungen durch eine Raute (#) dargestellt. Für Ringschlüsse werden einstellige Zahlen verwendet, so lautet z. B. die SMILES-Notation von Cyclopentan C1CCCC1 und von Octahydropentalen C12CCCC1CCC2. Zur Darstellung aromatischer Systeme existieren zwei Möglichkeiten: entweder durch konjugierte Doppelbindungen wie C1=CC=CC=C1 für Benzol oder durch Kleinbuchstaben, die den mesomeren Charakter ausdrücken sollen: c1ccccc1.

Auch die Konfiguration von Stereozentren und die Geometrie von Doppelbindungen können definiert werden (durch die Zeichen @ bzw. @@ und / bzw. \). Abb. 6.1 zeigt einige Beispiele von SMILES.

Eine alternative SMILES-Darstellung bieten die „Disconnected SMILES“, bei denen Molekülfragmente angegeben werden, die dann mit Hilfe von Zahlen verknüpft werden. Die Zeichenkette unterscheidet sich dann von einem gewöhnlichen SMILES durch Punkte, die die einzelnen Fragmente trennen. So ist z. B. CCOCC (Diethylether) gleichbedeutend mit C1.C1OCC oder CCO1.CC1. Diese „Disconnected SMILES“ sind gebräuchlich in der



kombinatorischen Chemie, weil dadurch einzelne Fragmente sehr leicht auf verschiedene Arten miteinander verknüpft werden können.



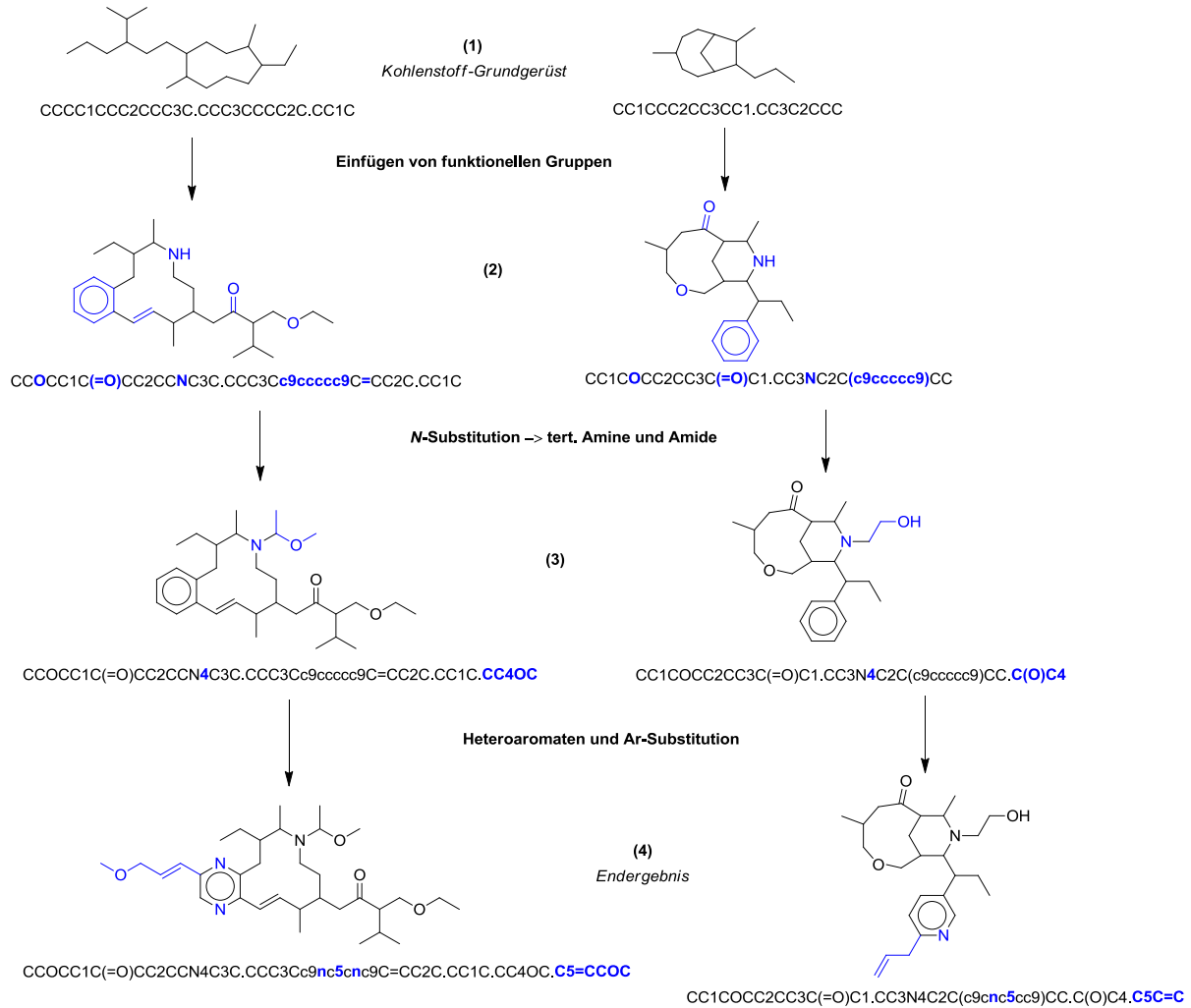
**Abbildung 6.1: Beispiele für SMILES-Repräsentationen einfacher Moleküle**

#### 6. 4. Implementierung

Im Folgenden wird der Algorithmus beschrieben, mit dem das Computerprogramm „VIRGIM“ (Virtual generation of incidental molecules) die SMILES erzeugt. Das Programm wurde in BASIC implementiert und ihm liegt ein Zufallsgenerator zugrunde, der auf dem MERSENNE-Twister-Algorithmus<sup>102</sup> basiert. Schema 6.1 zeigt zwei Beispiele für die Erzeugung von SMILES.

Im ersten Schritt (1) wird zunächst ein gesättigtes Kohlenstoffgrundgerüst aufgebaut. Die Zeichenkette besteht zu Beginn nur aus einem ‚C‘, dem nun schrittweise Zeichen angehängt werden. Ein angehängtes Zeichen kann entweder ein weiteres ‚C‘ sein, eine Nummer wie ‚1‘ (natürlich auch zwei Nummern wie ‚12‘) oder ein Punkt ‚.‘, der dann das Fragment abschließt. Bevor das erste Fragment abgeschlossen wird, zählen die Nummern, die vergeben werden, aufwärts. Dabei wird jede Nummer nur einmal vergeben mit Ausnahme der ersten Nummer (‚1‘), die – mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit – im ersten Fragment zweimal vergeben werden kann, wodurch ein Ringschluss zustande kommt, wie auf der rechten Seite von Schema 6.1 gezeigt. Ist das erste Fragment abgeschlossen (d. h. das erste Mal ein Punkt ‚.‘ gesetzt), so werden analog die folgenden Fragmente erzeugt, allerdings zählen nun die zu vergebenden Nummern abwärts, beginnend bei der größten Nummer, die im ersten Fragment vergeben wurde. Der Prozess endet, wenn jede Nummer exakt zweimal im gesamten SMILES auftritt und das letzte Fragment abgeschlossen wird. So sind alle Fragmente miteinander verknüpft und es resultiert ein einziges Molekül.

## 6. Virtuelle Generierung von zufälligen Molekülstrukturen



**Schema 6.1: Typische zufällige Erzeugung von Molekülstrukturen; bei jedem einzelnen Schritt eingeführte Elemente sind blau hervorgehoben.**

Im nächsten Schritt (2) werden funktionelle Gruppen eingeführt. Dazu wird an zufällig ausgewählten Positionen des SMILES eine zufällig ausgewählte Funktionalität eingefügt. Auch Mehrfachbindungen (also ‚=‘ und ‚#‘) und Benzolringe (entweder *ortho*-disubstituiert: ‚c1ccccc1‘ oder im Sinne einer Phenylgruppe: ‚(c1ccccc1)‘) werden als funktionelle Gruppen behandelt und an dieser Stelle zufällig eingebaut. So entstehen Ether, Alkohole, Olefine, Alkine, Ketone, Ester, Carbonsäuren, Aldehyde, Halogenide, etc. sowie primäre und sekundäre (jedoch nicht tertiäre) Amine und Amide.

Als nächstes wird die Unfähigkeit des Algorithmus, tertiäre Amine oder substituierte Aromaten zu generieren, korrigiert (3). Dazu werden zufällig ausgewählte Stickstoffatome ‚N‘ mit Nummern versehen (z. B. ‚N5‘) und weitere Fragmente angehängt, die diese Nummern enthalten, sodass diese neuen Fragmente an die entsprechenden Stickstoffatome geknüpft sind.

Im nächsten Schritt wird analog für aromatische Kohlenstoffatome ‚c‘ vorgegangen, um höher substituierte Aromaten zu erhalten. Schließlich werden zufällig ausgewählte ‚c‘ durch aromatische Stickstoffatome ‚n‘, Sauerstoffatome ‚o‘ oder Schwefelatome ‚s‘ ersetzt (4), sodass auch Heteroaromaten gebildet werden können. Die daraus resultierende SMILES-Zeichenkette ist dann das Endergebnis.

Die Wahrscheinlichkeit für die einzelnen Ereignisse der SMILES-Erzeugung können vom Benutzer in einer Konfigurationsdatei festgelegt werden. Dies beinhaltet die Wahrscheinlichkeit, mit der

- eine Nummer (d. h. Verzweigung) eingefügt wird,
- zwei Nummern eingefügt werden (was zu quartären C-Atomen führt),
- ein Fragment abgeschlossen wird (d. h. ein Punkt ‚.‘ eingefügt wird),
- das erste Fragment einen Ringschluss enthält (d. h. die Nummer ‚1‘ im ersten Fragment zweimal vorkommt),
- eine funktionelle Gruppe eingefügt wird,
- welche funktionelle Gruppe eingefügt wird,
- Stickstoffatome ‚N‘ substituiert werden,
- aromatische Kohlenstoffatome ‚c‘ substituiert werden, und
- Heteroaromaten gebildet werden (‚n‘, ‚s‘, ‚o‘).

Außerdem können die Gesamtgröße der gebildeten Moleküle sowie die Größe von Verzweigungen begrenzt werden.

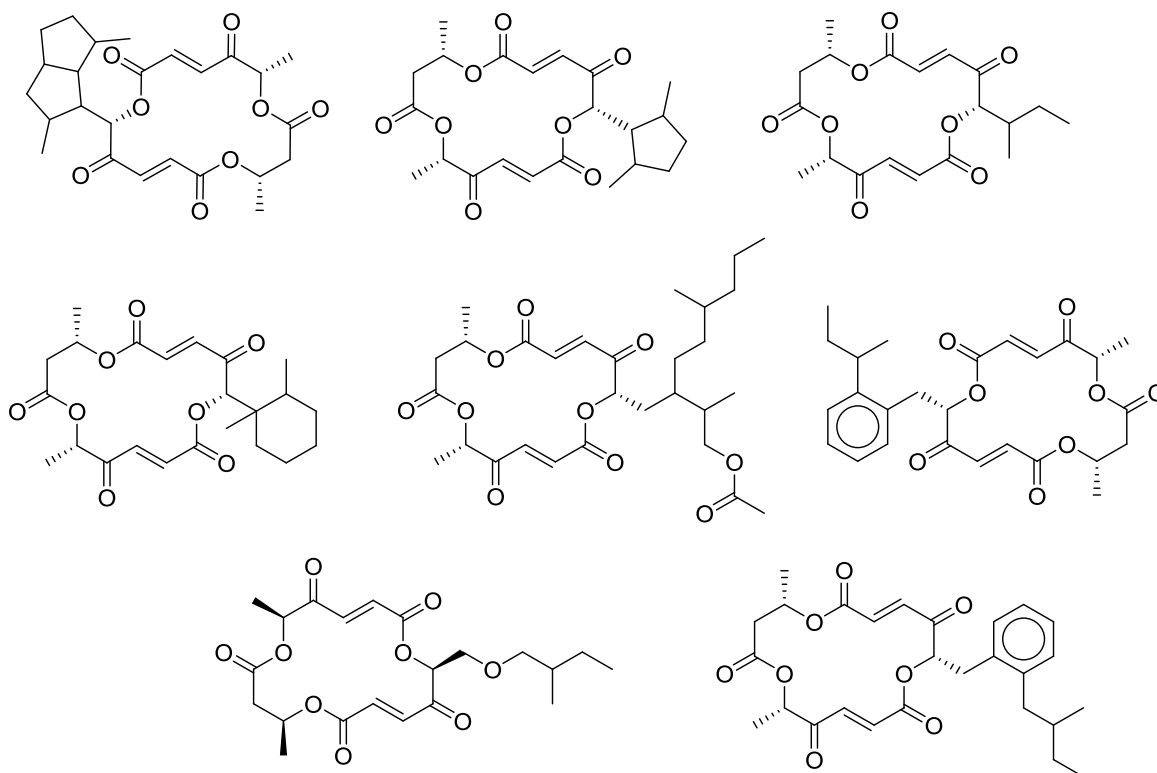
Der beschriebene Algorithmus bietet allerdings zwei wesentliche Einschränkungen: Die erste ist der Umstand, dass Aromaten ja als funktionelle Gruppen *eingefügt* werden und nicht sozusagen *de novo* erzeugt werden. Das bedeutet, dass komplexere aromatische Systeme d. h. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Naphtalin mit dem beschriebenen Algorithmus nicht generiert werden können. Die zweite Einschränkung besteht darin, dass der Algorithmus keine stereochemischen Deskriptoren berücksichtigt, d. h. die Konfigurationen aller Stereozentren und die Geometrien aller Doppelbindungen sind nicht definiert. Dies gilt jedoch nicht für die im folgenden Abschnitt beschriebenen Startfragmente, bei denen eine bestimmte Konfiguration vorgegeben werden kann. Diese Konfiguration bleibt erhalten.

### 6. 5. Evolution vorgegebener Strukturen

Die Erzeugung der SMILES-Zeichenkette startet wie oben beschrieben bei ‚C‘. Alternativ kann natürlich jede beliebige SMILES-Zeichenkette als Startpunkt gewählt werden. Dies

ermöglicht die Evolution einer gegebenen Teilstruktur. Im Falle der Macrospheptide bedeutet das, dass z. B. ein vorgegebenes Macrospheptidgerüst, wie etwa das aktive Diketon (5S,9S,15S)-**45**, virtuell modifiziert werden kann. Dazu müssen in der SMILES-Repräsentation von (5S,9S,15S)-**45** Zahlen eingefügt werden und zwar an den Positionen, an denen Substitutionsmöglichkeiten bestehen. Abb. 6.2 zeigt einige zufällig erzeugte Variationen des aktiven Diketons (5S,9S,15S)-**45**.

Teilstruktur: O1C(=O)/C=C/C(=O)[C@H](C)OC(=O)C[C@H](C)OC(=O)/C=C/C(=O)[C@@H]1



**Abb. 6.2: Virtuelle Modifizierung eines Prototypen: Zufällig erzeugte Variationen von des MT-stabilisierenden Diketons (5S,9S,15S)-**45**.**

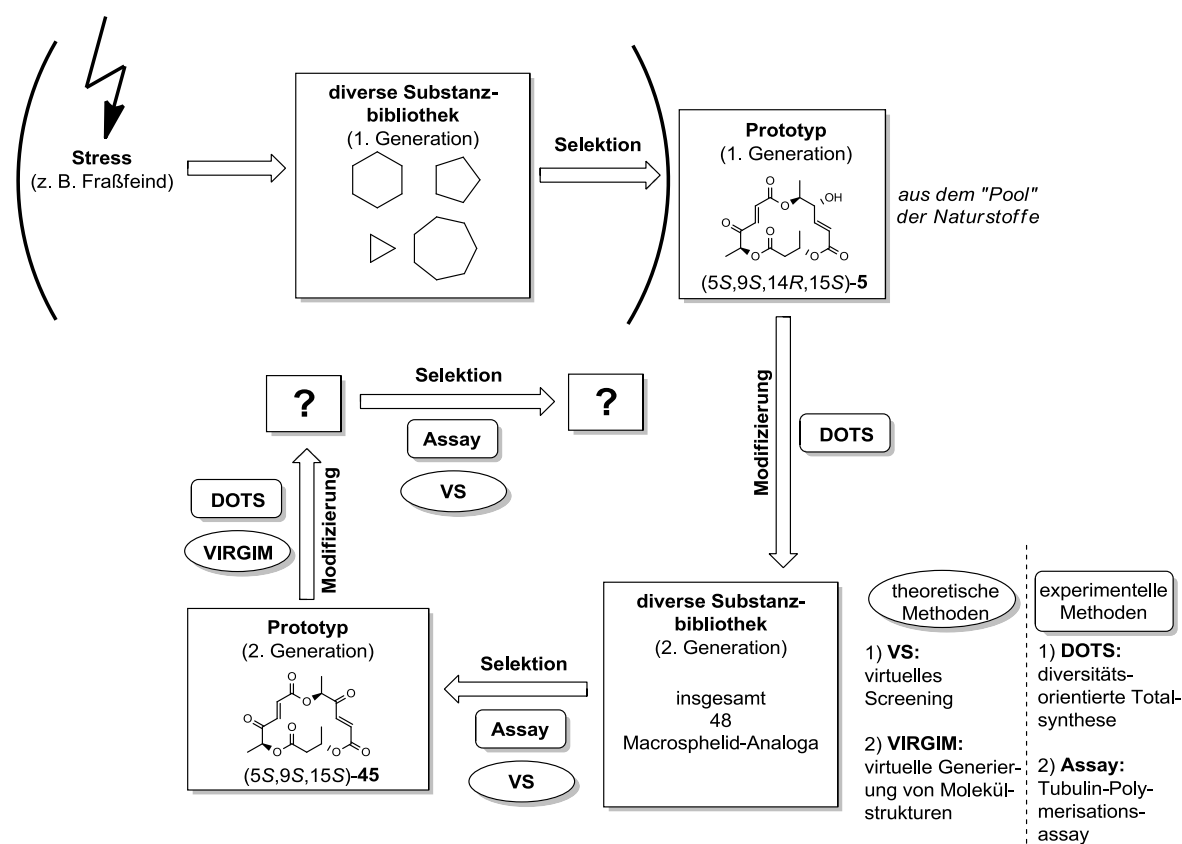
## 6. 6. Zusammenfassung

Das Programm VIRGIM ermöglicht die automatische Erzeugung von Zufallsmolekülen in (1D-)SMILES-Notation. Außerdem kann eine vorgegebene Teilstruktur zufällig variiert werden. Damit werden die bioinformatischen Methoden des virtuellen Screenings um ein chemoinformatisches Verfahren ergänzt, und alle Aspekte der chemischen Evolution können virtuell imitiert werden, d. h. die Selektionsschritte durch virtuelles Screening und die Modifizierungsschritte durch VIRGIM oder natürlich andere bereits zur Verfügung stehende

Anwendungen (z. B. SmiLib<sup>99</sup> zur Erzeugung von kombinatorischen Substanzbibliotheken basierend auf definierten Gerüsten und Substituenten).

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die in Abschn. 1. 1. beschriebene chemische Evolution nachgeahmt. Dabei wurde allerdings der erste Selektionsschritt ausgelassen; dieser Schritt entspricht der üblichen Vorgehensweise in der Pharmaforschung (Schema 7.1). Stattdessen wurde als erster Prototyp eine Verbindung aus der Natur verwendet. Es ist davon auszugehen, dass ein Naturstoff im Laufe der Evolution bereits zumindest ein Stück weit optimiert worden ist hinsichtlich der Bindung an Proteine im weitesten Sinne. Als strukturelles Vorbild für den ersten Prototyp diente die Familie der Macrospheleide, eine Klasse von makrozyklischen Trilactonen mit u. a. apoptoseinduzierender Wirkung.

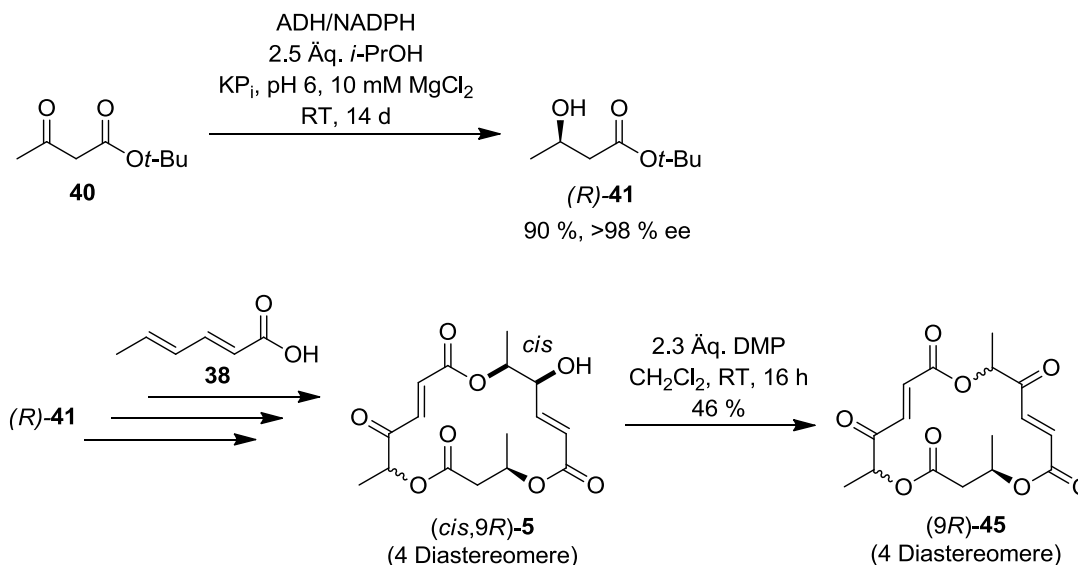


Sc

**hema 7.1: Nachahmung der chemischen Evolution**

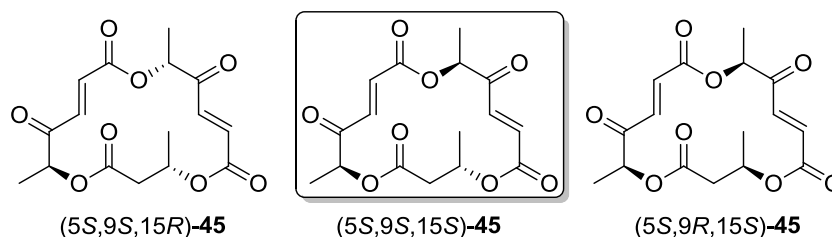
Im präparativen Teil der Arbeit wurde eine diversitätsorientierte Totalsynthese (DOTS) weiter ausgebaut, die den Zugang zu einer Macrospheleid-Bibliothek erlaubt. Produkt der nicht diastereoselektiven Syntheseroute ist ein enantiomerenreines Diastereomergemisch (Abb. 7.2). Dabei wurde die in Vorarbeiten von N. MATTHIAS NEISIUS aufgebaute (S)-Serie um die (R)-Serie erweitert. Der dafür benötigte enantiomerenreine  $\beta$ -Hydroxybuttersäureester (R)-41 konnte durch eine enzymatische Reduktion mit einer Alkoholdehydrogenase in guter Ausbeute und mit hohem Enantiomerenüberschuss erhalten

werden. Als weiterer Diversifizierungsschritt wurde eine nicht diastereospezifische Oxidation verwendet, die den Zugang zu weiteren nicht natürlichen Derivaten erlaubt.



**Schema 7.2: Aufbau der (R)-Serie**

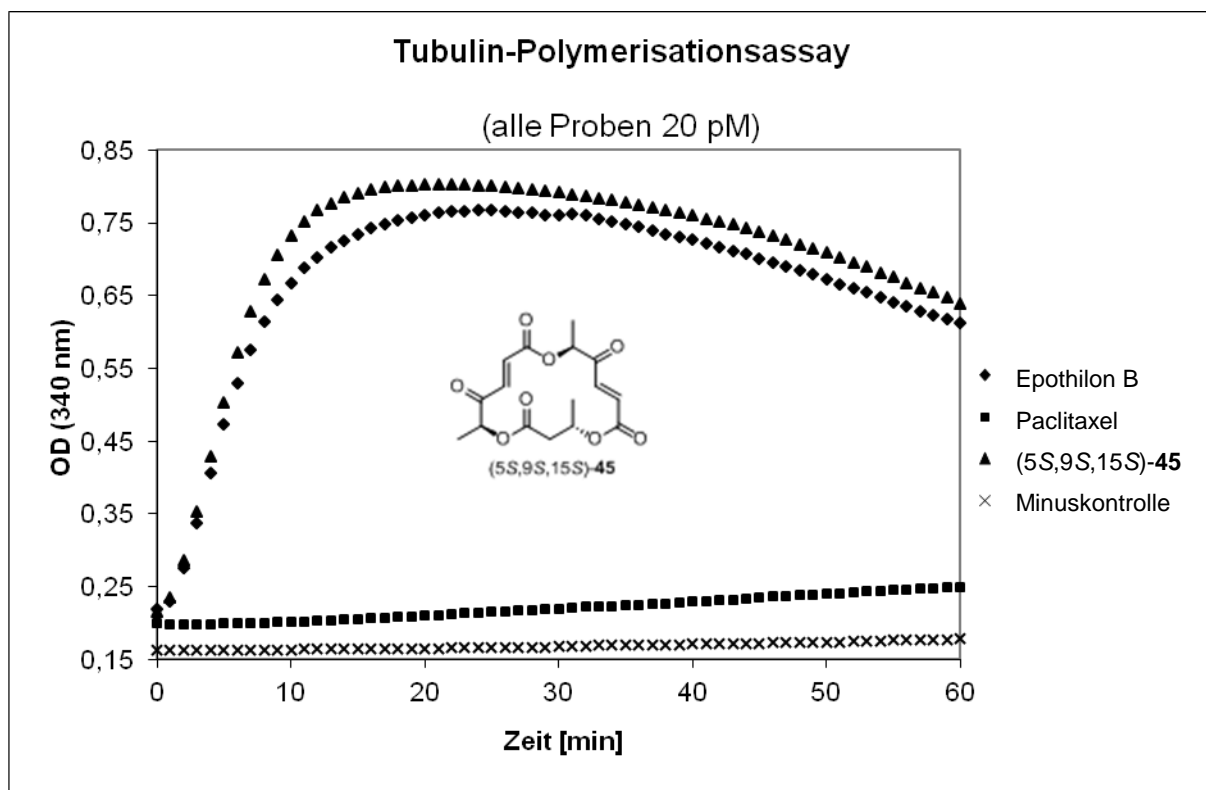
Der bioinformatische Teil der Arbeit befasste sich mit der Entwicklung eines Rezeptor-basierten virtuellen Screenings (VS) basierend auf Docking-Studien. Als Docking-Anwendung wurde hierbei das Open-Source-Programm AutoDock Vina verwendet. Dabei wurde Tubulin als Target für die Macrophelide virtuell identifiziert. Untersuchungen zur Flexibilität am Tubulin führten dazu, dass His227 ( $\beta$ -Kette) flexibel behandelt werden sollte, um annehmbare Vorhersagen mit Vina zu erhalten. Außerdem konnten aus einer Macrophelid-Bibliothek, die aus 48 Derivaten besteht (von denen viele von CHRISTINE HÄCKER dargestellt wurden), drei Kandidaten als mikrotubulistabilisierend vorhergesagt werden (Abb. 7.1).



**Abbildung 7.1: Positive Vorhersagen des virtuellen Screenings (angereicherte Bibliothek); umrahmt: experimentell aktive Verbindung**

Schließlich wurde im biochemisch-experimentellen Teil der Arbeit die gesamte Macrophelid-Bibliothek in einem Tubulin-Polymerisationsassay getestet. Dabei konnten die Ergebnisse des virtuellen Screenings bis auf zwei falsch-positive Vorhersagen (von insgesamt drei positiven Vorhersagen) bestätigt werden. Zudem wurde damit natürlich auch die Target-

Hypothese bestätigt. Außerdem konnte ein neuer Mikrotubulistabilisator (5S,9S,15S)-**45** identifiziert werden, dessen Potenz mit der von Epothilon B vergleichbar ist (Abb. 7.2). In der Literatur ist bereits die antiproliferatorische Wirkung von (5S,9S,15S)-**45** beschrieben, ohne dass jedoch ein Target identifiziert wurde.<sup>44</sup> Die antiproliferatorische Wirkung steht mit einer apoptoseinduzierenden Wirkung im Einklang.



**Abbildung 7.2: Einfluss von (5S,9S,15S)-**45** auf die Tubulin-Polymerisation**

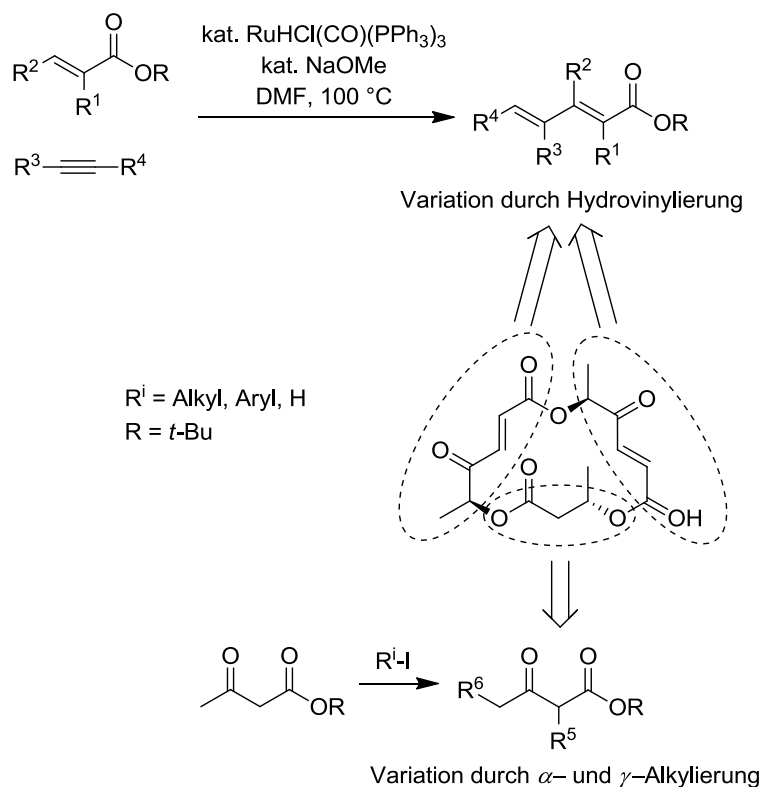
Zusammenfassend wurde also ein vollständiger Evolutionszyklus durchlaufen: Die Modifikation eines ersten Prototypen aus der Natur (d. h. die Macrosphelide) wurde durch eine diversitätsorientierte Totalsynthese initiiert und die Selektion wurde mit Hilfe eines virtuellen Screenings nachgeahmt, das experimentell größtenteils verifiziert werden konnte.

Gegenstand weiterführender Arbeiten ist konsequenterweise das Durchlaufen eines nächsten Evolutionsschritts. Dazu muss das Diketon (5S,9S,15S)-**45** weiter modifiziert werden, um so eine Substanzbibliothek der nächsten Generation, strukturell basierend auf (5S,9S,15S)-**45**, zu erhalten. Die diversifizierenden Elemente während des ersten Zyklus waren die Konfiguration der Stereozentren und der Oxygenierungsgrad. Diese strukturellen Eigenschaften sollten also beim Aufbau der nächsten Substanzbibliothek erhalten bleiben, denn es ist davon auszugehen, dass der Prototyp (5S,9S,15S)-**45** bereits die optimale Stereochemie und den optimalen Oxygenierungsgrad beinhaltet. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Rezeptor-basierten virtuellen Screenings, das die Identifizierung von MT-stabilisierenden Verbindungen erlaubt, kann die Substanzbibliothek der nächsten Generation



wieder bezüglich biologischer Aktivität evaluiert werden und so ein Prototyp der nächsten Generation gefunden werden.

Die Modifizierung des Prototyps erfordert Variationsmöglichkeiten bei der diversitätsorientierten Totalsynthese. Zwar sind die Variationsmöglichkeiten am  $\beta$ -Hydroxybuttersäure-Baustein unter den Bedingungen der enzymatischen Reduktion gering (vgl. Abschn. 3. 1.), doch die alternative NOYORI-Reduktion dürfte  $\alpha$ - und  $\gamma$ -substituierte  $\beta$ -Ketoester als Substrate zulassen. Auch seitens der beiden Sorbinsäure-Bausteine sind dank der im Arbeitskreis PLIETKER von N. M. NEISIUS und T. SCHABEL entwickelten Ruthenium-katalysierten Hydrovinylierung von Alkinen breite Variationen möglich.<sup>103</sup> Die Hydrovinylierung erlaubt einen einfachen Zugang zu hochsubstituierten Sorbinsäurederivaten ausgehend von kommerziell erhältlichen oder einfach zugänglichen Acrylaten und Alkinen (Schema 7.3).



**Schema 7.3: Variationsmöglichkeiten am Macrosphelid-Grundgerüst**

Mit Hilfe des virtuellen Screenings lassen sich dann Positionen am Macrosphelid-Gerüst sowie Substituenten vorhersagen, die die biologische Aktivität beibehalten oder auch erhöhen. Durch Einführung geeigneter Substituenten kann auch die „drug-likeness“ erhöht werden, insbesondere die Lipophilie gesteigert werden, denn hydrophile Verbindungen wie das Diketon (5S,9S,15S)-**45** sind z. B. im Allgemeinen schlecht oral verfügbar. Dies rührt daher, dass ein Wirkstoff die Zellmembran (d. h. die Lipid-Doppelschicht) der Epithelzellen

des Magens durchdringen und daher eine gewisse Lipophilie aufweisen muss (die natürlich nicht zu groß sein darf, damit der Wirkstoff nicht in der Membran verbleibt).<sup>104</sup>

Schließlich könnte mit dem in dieser Arbeit entwickelten Computerprogramm „VIRGIM“ auch der erste Schritt der chemischen Evolution, d. h. der Aufbau der allerersten diversen Substanzbibliothek imitiert werden. Außerdem könnte VIRGIM dazu verwendet werden, einen identifizierten Prototyp virtuell zu modifizieren. In Kombination mit anderen virtuellen Methoden (Docking, Liganden- und Rezeptor-basiertes virtuelles Screening, etc.) stehen damit chemo- bzw. bioinformatische Werkzeuge zur Verfügung, um alle Aspekte der chemischen Evolution zu imitieren. Ein weiterer wichtiger Aspekt bezüglich virtuell generierter Molekülstrukturen ist deren Synthetisierbarkeit, und auch vor diesem Hintergrund stellt die beschriebene diversitätsorientierte Totalsynthese einen leistungsstarken Zugang dar.

## 8. Allgemeine Angaben

### 8. 1. Analytik

Die NMR-Spektren wurden an den Geräten *Avance 300* (300 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ )) und *Avance 500* (500 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ )) der Firma BRUKER aufgenommen. Alle chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als internen Standard ( $\delta = 0$  ppm). Die Aufspaltung der Signale ist wie folgt angegeben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett), br (breit).

IR-Spektren wurden auf einem *Vector 22 FT-IR Spektrometer* der Firma BRUKER aufgenommen. Dabei wurden die Proben als Reinsubstanz in einer Golden-Gate Single Reflection ATR Messzelle vermessen. Die Messwerte sind in reziproken Wellenlängen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben und für die Bandenintensitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (stark), m (mittelstark), w (schwach), br (breit).

GC-MS Analysen wurden mit Hilfe eines Gaschromatographen der Firma HEWLETT-PACKARD, Typ *5890 SERIES II* (Trägergas: He, Säule: HP-5MS, 30 m x 0.25 mm ID, Phasendicke: 0.25  $\mu\text{m}$ ), der mit einem masseselektiven Detektor der Firma FINNIGAN MAT (Modell *MAT 95*) gekoppelt ist, oder mit einem GC-MS der Firma HP (Modell *HP6890*) aufgenommen.

Die Aufnahmen der Massenspektren erfolgten an einem Gerät der Firma FINNIGAN MAT des Typs *MAT 95* (EI und CI-Messungen) und an einem Spektrometer der Firma BRUKER des Typs *microTOF-Q* (ESI, APCI und hochauflösende Masse).

Die Drehwertbestimmungen erfolgten mit Hilfe eines PERKIN ELMER 341 Polarimeters bei der Wellenlänge  $\lambda = 589$  nm (Na-D-Linie).

Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktmessgerät *STUART SMP10* in offener Kapillare gemessen.

### 8. 2. Chromatographie

Für säulenchromatographische Trennungen wurde Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm) der Firma E. MERCK als stationäre Phase verwendet.

Für die analytische Dünnschichtchromatographie kamen DC-Platten (Kieselgel 60, F<sub>254</sub>) der Firma E. MERCK zum Einsatz. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe folgender Reagenzien:

a) Cer(IV)sulfat-Reagenz: 25 g Molybdänsäure  
10 g Cer(IV)-sulfat  
60 ml konz. Schwefelsäure  
940 ml demin. Wasser

b) KMnO<sub>4</sub>-Reagenz: 2 %-ige KMnO<sub>4</sub>-Lösung in 0.2 M Schwefelsäure

Für Trennungen mittels semipräparativer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) stand eine Pumpe *K-501* und ein *RI-Detektor K-2400* der Firma KNAUER zur Verfügung, die verwendeten Säulen waren vom Typ *Eurospher 100-5 Si* (250 mm x 20 mm).

Die Enantiomerentrennung wurde mit einer analytischen HPLC der Firma HEWLETT-PACKARD vom Typ *1050* (chirale Säule Chiralcel OD der Firma DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) durchgeführt.

### 8. 3. Proteinassays

Die Tubulin-Polymerisationsassays wurden mithilfe des absorptionsbasierten „Tubulin polymerization HTS assay“-Kit (Cat. # BK004P, >97 % Tubulin aus Schweinehirn) von CYTOSKELETON, INC. durchgeführt. Hierzu stand der Microtiterreader *Powerwave* von BIO-TEK, INC. zur Verfügung.

### 8. 4. Computersimulationen

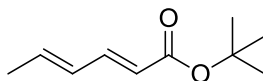
Die Dockings wurden mit AutoDock Vina<sup>14</sup> unter Linux durchgeführt (OpenSUSE 11.4). Zur Konvertierung der Dateiformate wurde OpenBabel<sup>105</sup> verwendet. Eigene Anwendungen wurden in BASIC (www.freebasic-portal.de) unter Linux (OpenSUSE 11.4 und Mint 13 „Maya“) implementiert.

## 9. Präparative Arbeiten

Alle Reaktionen (mit Ausnahme der enzymatischen Reduktion) wurden unter Stickstoffatmosphäre mit gängigen Schlenk-Techniken durchgeführt.

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ACROS ORGANICS, ALFA AESAR, E. MERCK, FLUKA, FLUOROCHEM, TCI und SIGMA ALDRICH bezogen. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung destilliert. Zur Trocknung von Dichlormethan, *n*-Hexan, Diethylether und Toluol wurde CaH<sub>2</sub> und für THF Natrium mit Benzophenon als Indikator verwendet. Alle Laufmittelzusammensetzungen sind als Volumenverhältnisse angegeben.

### 9. 1. Darstellung von *tert*-Butylsorbit 16



In einem Zweihalskolben mit Tropftrichter und Rückflusskühler wird zu 11.2 g (100 mmol) Sorbinsäure 15 mL (200 mmol) Thionylchlorid langsam zugegeben und das Gemisch für 2 Stunden auf Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt und das überschüssige Thionylchlorid im Wasserstrahlpumpen-Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 150 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, auf 0 °C gekühlt und 30 mL (315 mmol) *tert*-Butanol werden zugegeben. Es werden 16 mL (114 mmol) Triethylamin zugetropft und das Reaktionsgemisch unter Erwärmen auf Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Wasser wird die organische Phase abgetrennt und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Zu dieser getrockneten Lösung werden 7.61 g (50 mmol) DBU gegeben und es wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 100 mL 2N wässriger HCl gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird destilliert (Sdp.: 85-90 °C bei 11 mbar) und man erhält 12.9 g (77 mmol, 77 %) **16** als farblose Flüssigkeit.

$R_f = 0.95$  (Petrolether/Ethylacetat 3:1).

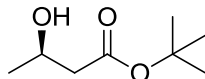
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.15 (dd,  $J = 15.4, 10.4$  Hz, 1H), 6.05-6.19 (m, 2H), 5.70 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H), 1.85 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 1.49 (s, 9H).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 166.8, 143.9, 138.5, 129.8, 120.9, 80.1, 28.2 (3C), 18.6.

IR (Film):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2979 (w), 1709 (s), 1633 (w), 1607 (w), 981 (w).

**MS** (CI):  $m/z$  (%) = 168 (25)  $[M+NH_4^+]$ , 169 (80)  $[M+H]$ , 130 (100), 113 (32)  $[C_6H_{11}O_2^+]$ .

### 9. 2. Darstellung von (*R*)-*tert*-Butyl-3-hydroxybutyrat (*R*)-41



Zu 100 mL Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6, 10 mM  $MgCl_2$ ) werden 12.64 g (80 mmol) *tert*-Butylacetoacetat **40**, 228  $\mu$ L (0.023 mmol) 100 mM NADPH, 1.6 mL LB-ADH-Rohextrakt und 31 mL (400 mmol) Isopropanol gegeben und die Reaktionsmischung 14 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wird mit NaCl gesättigt und 5mal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, getrocknet mit  $Na_2SO_4$  und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 12.4 g (77.5 mmol, 97 %) (*R*)-**41** als farblose Flüssigkeit. Dieses Rohprodukt muss nicht weiter gereinigt werden und kann direkt in der nächsten Stufe der Synthese eingesetzt werden. Der Enantiomerenüberschuss wurde bestimmt durch chirale HPLC (Chiracel-OD, *n*-Heptan/Isopropanol 98:2;  $t_R$  = 22.5 min.,  $t_S$  = 23.6 min.) zu >99 %.

$R_f$  = 0.36 (Petrolether/Ethylacetat 3:1).

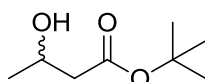
**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.08-4.20 (m, 1H), 3.23 (br s, 1H), 2.32-2.38 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.19 (d,  $J$  = 6.3, 3H).

**$^{13}C$ -NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 171.4, 81.2, 64.3, 43.7, 28.1 (3C), 22.2.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3650 (m), 2980 (s), 1725 (s), 1450 (w).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 145 (1)  $[C_7H_{13}O^+]$ , 105 (5)  $[C_4H_9O_3^+]$ , 103 (6), 87 (17)  $[C_4H_7O_2^+]$ , 59 (29), 57 (100)  $[C_4H_9^+]$ , 45 (13), 43 (21), 41 (18).

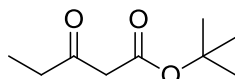
### 9. 3. Darstellung von (*rac*)-*tert*-Butyl-3-hydroxybutyrat (*rac*)-41



316 mg (2.0 mmol) des Ketoesters **40** werden in 7 mL abs.  $CH_2Cl_2$  gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Essigsäure (1.1 mL, 19 mmol) versetzt. Natriumborhydrid (160 mg, 4.2 mmol) wird portionsweise langsam zugegeben (Gasentwicklung!), das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h lang gerührt. Die Reaktionslösung wird 2mal mit je 6 mL ges.  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, die wässrige Phase 2mal mit je 6 mL Diethylether

extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 3:1) gereinigt. Man erhält 242 mg (*rac*)-**41** (1.5 mmol, 76 %) als farblose Flüssigkeit (analytische Daten s. Abschn. 8. 2.).

#### 9. 4. Darstellung von *tert*-Butyl-3-oxo-pentanoat **46**



Zu einer Suspension von Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 440 mg, 11.0 mmol) in abs. THF (25 mL) wird bei 0 °C *tert*-Butylacetoacetat **40** (1.58 g, 10.0 mmol) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung 10 min. lang gerührt. *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 6.6 mL, 10.5 mmol) wird langsam zugegeben und weitere 10 min. gerührt. Eine Lösung von Methyljodid (1.56 g, 11.0 mmol) in abs. THF (2 mL) wird langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 25 min. lang gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Eine Mischung aus 2 mL konz. HCl, 5 mL Wasser und 15 mL Diethylether wird zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 10 mL Ether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird im Vakuum destilliert (Sdp.: 88 °C bei 25 mbar). Man erhält 1.104 g (6.5 mmol, 65 %) **46** als leicht gelbliche Flüssigkeit.

$R_f = 0.52$  (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

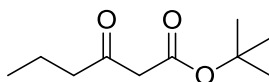
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.35 (s, 2H), 2.59 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.08 (q,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 203.9, 166.6, 81.9, 50.4, 36.2, 28.3 (3C), 7.6.

IR (Film):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 1713 (s), 1146 (s).

MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 116 (11) [M - <sup>t</sup>Bu], 99 (18), 69 (5), 57 (100).

#### 9. 5. Darstellung von *tert*-Butyl-3-oxo-hexanoat **47**



Zu einer Suspension von Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 440 mg, 11.0 mmol) in abs. THF (25 mL) wird bei 0 °C *tert*-Butylacetoacetat **40** (1.58 g, 10.0 mmol) tropfenweise zugegeben

und die Reaktionsmischung 10 min. lang gerührt. *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 6.6 mL, 10.5 mmol) wird langsam zugegeben und weitere 10 min. gerührt. Eine Lösung von Ethyliodid (1.72 g, 11.0 mmol) in abs. THF (2 mL) wird langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 25 min. lang gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Eine Mischung aus 2 mL konz. HCl, 5 mL Wasser und 15 mL Diethylether wird zugegeben und die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 10 mL Ether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird im Vakuum destilliert (Sdp.: 86 °C bei 20 mbar) und man erhält 1.00 g (5.4 mmol, 54 %) **47** als gelbliche Flüssigkeit.

$R_f = 0.60$  (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

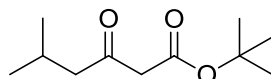
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.34 (s, 2H), 2.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.69-1.57 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 203.4, 166.6, 81.9, 50.7, 44.8, 28.0 (3C), 16.9, 13.6.

IR (Film): ν (cm<sup>-1</sup>) = 1734 (m), 1713 (s), 1145 (s).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 130 (13) [M - <sup>t</sup>Bu], 113 (16), 102 (3), 84 (3), 71 (41), 57 (100).

### 9. 6. Darstellung *tert*-Butyl-5-methyl-3-oxo-hexanoat **48**



Zu einer Suspension von Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 440 mg, 11.0 mmol) in abs. THF (25 mL) wird bei 0 °C *tert*-Butylacetoacetat **40** (1.58 g, 10.0 mmol) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung 10 min. lang gerührt. *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 6.6 mL, 10.5 mmol) wird langsam zugegeben und weitere 10 min. gerührt. Eine Lösung von Isopropyliodid (1.87 g, 11.0 mmol) in abs. THF (2 mL) wird langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 25 min. lang gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Eine Mischung aus 2 mL konz. HCl, 5 mL Wasser und 15 mL Diethylether wird zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 10 mL Ether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 10:1) und man erhält 894 mg (4.47 mmol, 45 %) **48** als orangefarbene Flüssigkeit.

$R_f = 0.49$  (Petrolether/Ethylacetat 10:1).



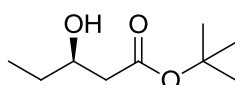
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.32 (s, 2H), 2.40 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.16 (7°, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 203.0, 166.8, 81.9, 51.8, 51.1, 28.0 (3C), 24.3, 22.5 (2C).

**IR** (Film): ν (cm<sup>-1</sup>) = 1735 (m), 1713 (s), 1140 (s).

**MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 144 (12) [M - <sup>t</sup>Bu], 127 (11), 102 (8), 85 (36), 69 (7), 57 (100).

### 9. 7. Darstellung von (*R*)-*tert*-Butyl-3-hydroxypentanoat **49**



2 mL Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) werden mit Isopropanol (600 mg) versetzt und nacheinander *tert*-Butyl-3-oxo-pentanoat (172 mg, 1 mmol) **46**, LB-Rohextrakt (40 μL) und NADPH (100 mM, 5.7 μL) gegeben. Die Mischung wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, danach nochmals die gleichen Mengen Enzymrohextrakt und NADPH zugegeben und die Mischung weitere 5 Tage gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit NaCl gesättigt und 5mal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, getrocknet mit NaSO<sub>4</sub> und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 5:1) und man erhält 62 mg (0.35 mmol, 35 %) **49** als gelbliche Flüssigkeit. Die Absolutkonfiguration wurde nach Überführung in den korrespondierenden (*O*)-Acetylmandelsäureester (vgl. Abschn. 9. 10.) bestätigt<sup>69,70</sup> und der Enantiomerenüberschuss wurde durch Integration der <sup>1</sup>H-NMR-Signale dessen Carbinolprotonen bestimmt zu 97 %.

*R*<sub>f</sub> = 0.43 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.93-3.85 (m, 1H), 2.44 (dd, *J* = 16.3 Hz, 3.1 Hz, 1H), 2.31 (dd, *J* = 16.3 Hz, 8.9 Hz, 1H), 1.59-1.40 (m, 2H), 1.47 (s, 9H).

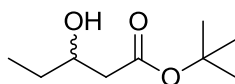
**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 172.7, 81.2, 69.5, 41.8, 29.3, 28.1 (3C), 9.8.

**IR** (Film): ν (cm<sup>-1</sup>) = 1713 (m), 1151 (s).

**MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 145 (4) [M - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>], 127 (8), 117 (5), 101 (13), 89 (6), 83 (10), 71 (4), 57 (100).

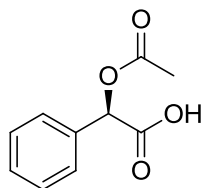
$\alpha_D^{20} = -10.9^\circ$  (c=4.6 g/L, MeOH).

### 9. 8. Darstellung von (*rac*)-*tert*-Butyl-3-hydroxypentanoat (*rac*)-49



172 mg (1.0 mmol) des Ketoesters **46** werden in 4 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Essigsäure (0.57 mL, 10 mmol) versetzt. Natriumborhydrid (80 mg, 2.1 mmol) wird portionsweise langsam zugegeben (Gasentwicklung!), das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h lang gerührt. Die Reaktionslösung wird 2mal mit je 6 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, die wässrige Phase 2mal mit je 6 mL Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 5:1) gereinigt. Man erhält 73 mg (*rac*)-**49** (0.42 mmol, 42 %) als farblose Flüssigkeit (analytische Daten s. Abschn. 8. 7.).

### 9. 9. Darstellung von (*R*)-*O*-Acetylmandelsäure



Zu einer Lösung von Acetanhydrid (1.3 mL, 14.3 mmol) in abs. Diethylether (20 mL) werden bei 0 °C Pyridin (5 mL, 62 mmol), DMAP (10 mg, 0.08 mmol, 0.6 mol-%) und (*R*)-Mandelsäure (2 g, 13.2 mmol) gegeben und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 2 N HCl angesäuert, 4mal mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, gewaschen mit Wasser und ges. NaCl-Lösung und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Wasser umkristallisiert. Man erhält 1.1 g (5.7 mmol, 73 %) (*R*)-*O*-Acetylmandelsäure als farblose nadelförmige Kristalle.

$R_f = 0.2$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.50-7.45 (m, 2H), 7.41-7.39 (m, 3H), 5.94 (s, 1H), 2.20 (s, 3H).

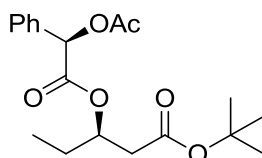
<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 173.9, 170.4, 133.1, 129.5, 128.9 (2C), 127.7 (2C), 74.0, 20.6.

IR (Film):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 1719 (s), 1220 (m).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 149 (21) [ $M^+ - CH_3-CO$ ], 134 (32), 107 (94), 91 (39), 77 (100), 60 (23), 51 (53).

$\alpha_D^{20} = -153^\circ$  ( $c = 1.0$  g/L,  $CHCl_3$ ).

### 9. 10. Darstellung von (*R*)-3-((*R*)-2-Acetoxy-2-phenylacetyl)-*tert*-butylpentanoat



Zu einer Lösung von (*R*)-*tert*-Butyl-3-hydroxypentanoat (87 mg, 0.5 mmol) **49** und (*R*)-*O*-Acetylmandelsäure (97 mg, 0.5 mmol) in abs. Dichlormethan (1.5 mL) werden bei 0 °C DMAP (12.2 mg, 0.1 mmol, 20 mol-%) und DCC (113.3 mg, 0.55 mmol) gegeben und die Mischung 3 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird verdünnt mit einer Mischung aus Petrolether und Ethylacetat (10:1), über eine Glasfritte filtriert und vom Filtrat das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 5:1) und man erhält 115 mg (0.33 mmol, 66 %) des Produkts als farbloses Öl.

$R_f = 0.46$  (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.49-7.45 (m, 2H), 7.41-7.35 (m, 3H), 5.86 (s, 1H), 5.26-5.17 (m, 1H), 2.42 (dd,  $J = 16.1$  Hz, 7.7 Hz, 1H), 2.34 (dd,  $J = 16.3$  Hz, 5.7 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.70-1.64 (m, 2H), 1.27 (s, 9H), 0.92 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H).

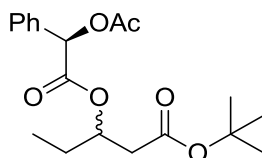
**$^{13}C$ -NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 170.4, 169.0, 168.2, 133.7, 129.1, 128.7 (2C), 127.6 (2C), 80.8, 74.2, 73.4, 39.6, 27.9 (3C), 26.9, 20.7, 9.2.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 1716 (s), 1727 (m).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 294 (4) [ $M - CH_3-CO$ ], 277 (6), 207 (5), 190 (2), 176 (14), 163 (2), 149 (44), 135 (6), 118 (8), 107 (100), 83 (29), 57 (72).

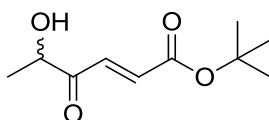
$\alpha_D^{20} = -57.2^\circ$  ( $c = 4.7$  g/L,  $CHCl_3$ ).

### 9. 11. Darstellung von (*rac*)-3-((*R*)-2-Acetoxy-2-phenylacetyl)-*tert*-butylpentanoat



Die Darstellung erfolgt analog wie in Abschn. 8. 9. beschrieben unter Verwendung des racemischen Alkohols (*rac*)-**49** (91.5 mg, 0.53 mmol), dessen Darstellung in Abschn. 8. 8. beschrieben ist. Man erhält 157 mg des Produkts (0.45 mmol, 84 %).

### 9. 12. Darstellung von (*rac*)-(*E*)-*tert*-Butyl-5-hydroxy-4-oxo-hex-2-enoat **39**



In einem 2L-Rundkolben wird  $\text{NaHCO}_3$  (7.35 g, 87.5 mmol) mit  $\text{RuCl}_3$ -Lösung (0.1 M, 5 mL, 1 mol-%) und Wasser (44 mL) versetzt. Acetonitril (150 mL) und Ethylacetat (150 mL) werden zugegeben, gefolgt von Oxone<sup>®</sup> (153 g, 0.5 mol). Die Reaktionsmischung wird kurz gerührt ( $\rightarrow$  Gelbfärbung) und danach *tert*-Butylsorbat **16** (8.4 g, 50 mmol) auf einmal zugegeben. Nach 7 min. wird nochmals  $\text{RuCl}_3$ -Lösung (0.1 M, 1 mL, 0.2 mol-%) zugegeben und weitere 5 min. gerührt. Es werden 60 mL Diethylether zugegeben, die Mischung filtriert (Glasfritte), wobei der Filterkuchen mehrmals mit Ethylacetat extrahiert wird. Das Filtrat wird mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen, die organischen Phasen vereinigt, getrocknet mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 5:1  $\rightarrow$  3:1) und man erhält 1.82 g (9.1 mmol, 18 %) **39** als gelbes Öl.

$R_f = 0.4$  (Petrolether/Ethylacetat 3:1).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.11 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.76 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 4.51 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.41 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

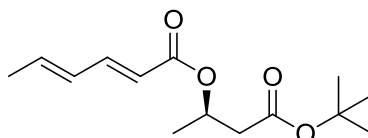
<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 201.1, 164.3, 135.0, 133.5, 82.4, 72.4, 27.9 (3C), 19.9.

IR (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3455 (w), 2891 (w), 1704 (s), 1695 (s), 1369 (m), 1303 (s), 1150 (s), 1061 (m), 976 (w).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 200 (1) [M], 156 (2), 127 (32), 100 (100), 99 (21), 82 (10), 72 (5), 57 (68), 55 (12), 45 (30), 41 (12), 29 (9).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $C_{10}H_{16}O_4$  199.0965, gefunden 199.0964.

### 9. 13. Darstellung von (*R*)-(2*E*,4*E*)-4-(*tert*-Butoxy)-4-oxobutan-2-yl-hex-2,4-dienoat (*R*)-42



(*R*)-3-Hydroxybuttersäure-*tert*-butylester (4.3 g, 26.9 mmol) und Sorbinsäure (4.92 g, 40.4 mmol) werden in 50 mL  $CH_2Cl_2$  gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Es werden nacheinander DMAP (656 mg, 5.4 mmol), CSA (624 mg, 2.7 mmol) und DCC (8.31 g, 40.4 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Es werden 25 mL einer Petrolether/Ethylacetat-Mischung (10:1) zugegeben und der ausgefallene *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff über eine 3 cm hohe Schicht aus Kieselgel abfiltriert (Glasfritte) und der Filterkuchen mit dem Lösungsmittelgemisch nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 5:1). Man erhält 5.94 g (*R*)-42 (23.4 mmol, 87 %) als gelbes Öl.

$R_f$  = 0.5 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.23 (dd,  $J$  = 15.5 Hz, 10.0 Hz, 1H), 6.02-6.22 (m, 2H), 5.73 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H), 5.25-5.37 (m, 1H), 2.57 (dd,  $J$  = 15.1 Hz, 7.6 Hz, 1H), 2.47 (dd,  $J$  = 15.1 Hz, 5.8 Hz, 1H), 1.85 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.31 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H).

**$^{13}C$ -NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 169.6, 166.4, 145.1, 139.3, 129.7, 119.0, 80.8, 67.4, 42.4, 28.0 (3C), 19.9, 18.6.

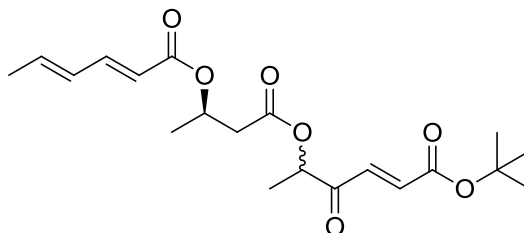
**IR** (Film):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 2979 (w), 1715 (s), 1710 (s), 1645 (m), 1325 (w), 1242 (s), 1129 (s), 998 (m).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 255 (44) [M+H], 199 (100) [ $C_{10}H_{15}O_4^+$ ], 187 (8), 181 (62), 169 (5), 141 (8), 112 (48), 97 (6), 95 (86), 57 (29).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $C_{14}H_{22}O_4Na$  277.1410, gefunden 277.1409.

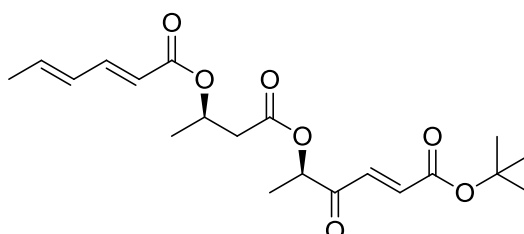
$\alpha_D^{20}$  = -16.9° (c = 2.4 g/L, MeOH).

**9. 14. Darstellung von (2E,4E)-(R)-4-(((S,E)-6-(tert-Butoxy)-3,6-dioxohex-4-en-2-yl)oxy)-4-oxobutan-2-yl-hexa-2,4-dienoat (R)-43**



Der *tert*-Butylester (*R*)-**42** (702 mg, 3 mmol) wird in 9 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, auf 0 °C gekühlt und TFA (9 mL, 117 mmol) langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wird 2 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die überschüssige TFA wird mehrmals azeotrop mit Toluol im Vakuum entfernt.

Die freie Carbonsäure wird mit dem Ketol **39** (400 mg, 2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es werden nacheinander DMAP (48 mg, 0.4 mmol), CSA (46 mg, 0.2 mmol) und DCC (618 mg, 3 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Man gibt 5 mL einer Petrolether/Ethylacetat-Mischung (10:1) zu, filtriert den ausgefallenen N,N'-Dicyclohexylharnstoff über 3 cm Kieselgel ab (Glasfritte) und wäscht den Filterkuchen mit dem Lösungsmittelgemisch nach. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 5:1). Man erhält 291 mg (*R*)-**43** (0.77 mmol, 38 %) als gelbes Öl und Diastereomergemisch (das nicht getrennt wurde).



$R_f = 0.47$  (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

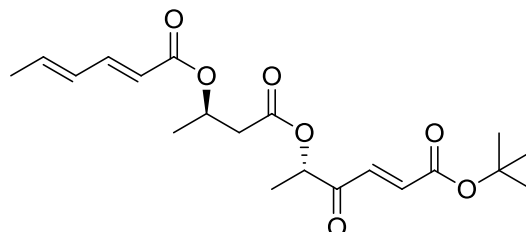
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.25 (dd,  $J = 15.5$  Hz, 10.1 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.73 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.08-6.24 (m, 2H), 5.75 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 5.24-5.42 (m, 2H), 2.78 (dd,  $J = 15.4$  Hz, 7.4 Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J = 15.5$  Hz, 5.7 Hz, 1H), 1.85 (d,  $J = 5.5$  Hz, 3H), 1.51 (s, 9H), 1.43 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.36 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 195.7, 169.4, 166.3, 164.1, 145.3, 139.4, 134.7, 133.8, 129.7, 118.8, 82.1, 74.0, 66.8, 40.6, 27.9 (3C), 19.8, 18.6, 15.9.

**IR** (Film):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2934 (w), 1715 (s), 1369 (m), 1250 (s), 1149 (s), 980 (w).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 322 (21) [ $C_{16}H_{18}O_7^+$ ], 293 (8), 243 (11), 226 (11), 149 (16), 57 (100) [ $C_4H_9^+$ ].

**HRMS** (ESI): berechnet für  $C_{20}H_{28}O_7$  380.1835, gefunden 380.1830.



$R_f$  = 0.47 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.24 (dd,  $J$  = 15.6 Hz, 10.0 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H), 6.73 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H), 6.05-6.25 (m, 2H), 5.75 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H), 5.24-5.42 (m, 2H), 2.78 (dd,  $J$  = 15.4 Hz, 7.2 Hz, 1H), 2.64 (dd,  $J$  = 15.4 Hz, 5.7 Hz, 1H), 1.85 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 3H), 1.51 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.43 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.35 (d,  $J$  = 6.3 Hz).

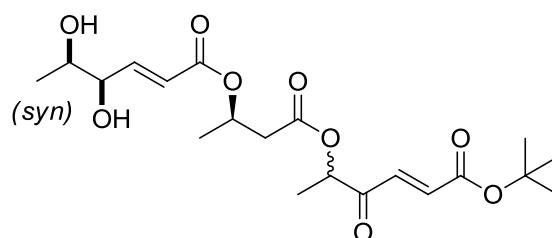
**$^{13}C$ -NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 195.7, 169.6, 166.3, 164.1, 145.2, 139.4, 134.7, 133.9, 129.7, 118.8, 82.1, 74.1, 66.9, 40.4, 27.9 (3C), 19.9, 18.6, 15.9.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 2934 (w), 1715 (s), 1369 (m), 1250 (s), 1149 (s), 980 (w).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 322 (20) [ $C_{16}H_{18}O_7^+$ ], 293 (8), 243 (10), 226 (12), 149 (18), 57 (100) [ $C_4H_9^+$ ].

**HRMS** (ESI): berechnet für  $C_{20}H_{28}O_7$  380.1835, gefunden 380.1830.

### 9. 15. Darstellung von (E)-((S)-4-((E)-6-tert-Butoxy-3,6-dioxo-hex-4-en-2-yloxy)-4-oxo-butan-2-yl)-4,5-dihydroxyhex-2-enoat (R)-44



In einem 50mL-Rundkolben wird Natrium-*meta*-periodat (385 mg, 1.8 mmol) in Wasser (0.48 mL) unter leichtem Erwärmen gelöst und mit Cer(III)-chloridheptahydrat (90 mg,

0.24 mmol) versetzt. Die Suspension wird kurz erhitzt ( $\rightarrow$  intensive Gelbfärbung), schnell auf 0 °C gekühlt und mit Acetonitril (1.8 mL), Aceton (5.4 mL) und wässriger Ruthenium(III)-chloridlösung (0.1 M, 360  $\mu$ L, 0.036 mmol, 3 Mol-%) versetzt. Die resultierende Suspension wird 3 min. lang gerührt und dann auf -78 °C gekühlt. Das Olefin (*R*)-**43** (456 mg, 1.2 mmol) wird in Aceton (0.6 mL) gelöst, auf -78 °C gekühlt und in einer Portion zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bis zum Auftreten von Glykospaltungsprodukt (DC-Kontrolle) gerührt und dabei auf etwa -30 °C erwärmen gelassen. Die Reaktion wird beendet durch Zugabe von 1-2 g festem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gefolgt von 10 mL Ethylacetat und die Reaktionsmischung wird über eine Glasfritte filtriert, wobei der Filterkuchen mehrmals mit Ethylacetat extrahiert wird. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit ges. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, die wässrige Phase 3mal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 1:1) und man erhält 153.2 mg (*R*)-**44** (0.37 mmol, 30 %) als gelbes Öl und Diastereomeregemisch (das nicht getrennt wurde).

$R_f$  = 0.21 (Petrolether/Ethylacetat 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.08 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H), 6.99-6.90 (m, 1H), 6.73 (dd,  $J$  = 15.8 Hz, 2.53 Hz, 1H), 6.18-6.10 (m, 1H), 5.44-5.33 (m, 1H), 5.32-5.23 (m, 1H), 4.11-4.05 (m, 1H), 3.81-3.71 (m, 1H), 2.82-2.60 (m, 2H), 1.51 (s, 9H), 1.46-1.42 (m, 3H), 1.38-1.35 (m, 3H), 1.28-1.24 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 195.8, 169.6, 165.3, 164.3, 147.0, 134.9, 133.8, 122.4, 82.4, 75.5, 74.2, 70.1, 67.3, 40.4, 27.9 (3C), 19.8, 19.0, 15.9.

**IR** (Film):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3478 (m), 2981 (w), 1712 (s), 1370 (w), 1256 (m), 1151 (s), 1057 (s), 983 (w).

**MS** (CI):  $m/z$  (%) = 415 (15) [M+H], 360 (16), 359 (100) [C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>], 341 (8), 265 (7), 231 (10), 215 (30) [C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>], 195 (36), 129 (13), 111 (11), 84 (15), 69 (21).

**HRMS** (CI): berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>O<sub>9</sub> 415.1968, gefunden 415.1951.

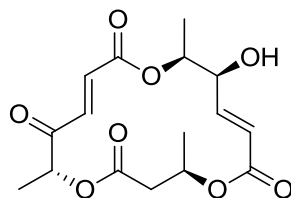
### 9. 16. Darstellung von (4*S*)-(7*E*,13*E*)-9-Hydroxy-4,10,16-trimethyl-1,5,11-trioxacyclohexadeca-7,13-dien-2,6,12,15-tetraon (*cis*,9*R*)-5

Das Diol (*R*)-**44** (207 mg, 0.5 mmol) wird in 4 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, auf 0 °C gekühlt und Triethylsilan (86  $\mu$ L, 0.54 mmol) wird zugegeben. TFA (3.85 mL, 50 mmol) wird langsam zugegeben und die Reaktionslösung 25 min. gerührt. Danach wird noch 20 min. bei



Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die überschüssige TFA mehrmals azeotrop mit Toluol im Vakuum entfernt. Der Rückstand, d. h. die *seco*-Säure, wird ohne Reinigung zügig weiter umgesetzt.

In einem 500mL-Kolben werden 5-Methyl-2-nitrobenzoesäureanhydrid (207 mg, 0.6 mmol), trockenes Triethylamin (153  $\mu$ L, 1.1 mmol) und DMAP (16 mg, 0.125 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL) gelöst. Innerhalb von 7 h wird eine Lösung der *seco*-Säure (s. o.) in 100 mL einer  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /THF-Mischung (1:1) langsam zugetropft und die Reaktionslösung nach beendeter Zugabe über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 1:1). Man erhält 70 mg (*cis,9R*)-**5** (0.21 mmol, 42 %) als farbloses, Öl im Diastereomerenmisch. Die vier Diastereomere werden anschließend per HPLC (Petrolether/Ethylacetat 1:1) getrennt.



$R_f = 0.28$  (Petrolether/Ethylacetat 2:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.14 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.75 (dd,  $J = 15.8$  Hz, 3.7 Hz, 1H), 6.69 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.03 (dd,  $J = 15.8$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.45 ( $m_c$ , 1H), 5.29 (dq,  $J = 7.0$  Hz, 3.5 Hz, 1H), 5.17 (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.44 ( $m_c$ , 1H), 2.77 (dd,  $J = 16.8$ , 10.8 Hz, 1H), 2.62 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 2.2 Hz, 1H), 1.44 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 1.42 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.33 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).

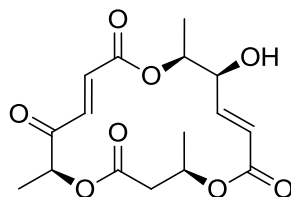
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 196.3, 169.9, 165.0, 164.4, 145.1, 134.5, 132.0, 122.9, 75.1, 73.1, 72.1, 67.2, 40.3, 19.7, 15.5, 14.9.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3463 (w), 2930 (w), 1712 (s), 1391 (w), 1250 (s), 1174 (m), 1055 (s), 730 (w).

**MS** (APCI):  $m/z$  (%) = 341 (3) [ $\text{M}+\text{H}$ ], 255 (3), 195 (11), 127 (20), 111 (100).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{Na}$ : 363.1050, gefunden 363.1043.

$\alpha_D^{20} = 16^\circ$  ( $c = 8$  g/L, MeOH).



$R_f = 0.28$  (Petrolether/Ethylacetat 2:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.05 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 6.89 (dd,  $J = 15.8$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 6.76 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H); 6.07 (dd,  $J = 15.8$  Hz, 1.7 Hz, 1H), 5.33-5.44 (m, 1H), 5.10-5.18 (m, 1H), 5.02 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.48-4.52 (m, 1H), 2.84 (dd,  $J = 16.3$  Hz, 3.5 Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J = 16.3$  Hz, 7.3 Hz, 1H), 1.43 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 1.42 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.41 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H).

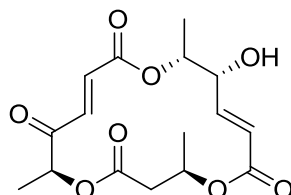
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 196.2, 169.3, 164.5, 145.8, 132.7, 132.6, 122.8, 73.1, 71.8, 67.0, 39.9, 19.2, 16.0, 14.4.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3461 (w), 2925 (w), 1715 (s), 1261 (s), 1054 (m).

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = 363 (100) [M+Na], 289 (2), 139 (5).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{Na}$ : 363.1050, gefunden: 363.1042.

$\alpha_D^{20} = -29^\circ$  ( $c = 0.4$  g/L,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).



$R_f = 0.28$  (Petrolether/Ethylacetat 2:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.99 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J = 15.7$  Hz, 3.4 Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H); 6.08 (dd,  $J = 15.7$  Hz, 1.8 Hz, 1H), 5.20-5.31 (m, 2H), 5.10 (q,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 4.41-4.48 (m, 1H), 2.87 (dd,  $J = 15.7$  Hz, 3.8 Hz, 1H), 2.60 (dd,  $J = 15.7$  Hz, 7.3 Hz, 1H), 1.48 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 1.46 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 1.42 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H).

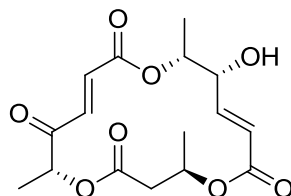
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 196.1, 169.1, 165.1, 148.0, 133.3, 132.8, 120.7, 75.7, 73.1, 72.4, 67.5, 39.9, 19.4, 15.8, 15.7.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2937 (w), 1714 (s), 1260 (s), 1188 (m), 1052 (s).

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = 363 (100) [M+Na], 227 (2), 139 (7).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $C_{16}H_{20}O_8Na$ : 363.1050; gefunden: 363.1041.

$\alpha_D^{20} = 18^\circ$  ( $c = 0.4$  g/L,  $CH_2Cl_2$ ).



$R_f = 0.28$  (Petrolether/Ethylacetat 2:1).

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.00 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.93 (dd,  $J = 15.8$  Hz, 4.2 Hz, 1H), 6.73 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.09 (dd,  $J = 15.8$  Hz, 1.7 Hz, 1H), 5.33 ( $m_c$ , 1H), 5.11 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 5.07 (dq,  $J = 6.6$  Hz, 2.8 Hz, 1H), 4.46 ( $m_c$ , 1H), 2.71 (dd,  $J = 15.1$  Hz, 9.7 Hz, 1H), 2.62 (dd,  $J = 15.1$  Hz, 2.8 Hz, 1H), 2.43 (s, 1H), 1.48 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 1.43 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.36 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

**$^{13}C$ -NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 195.8, 170.6, 165.1, 165.1, 147.0, 133.0 (2C), 121.6, 75.7, 73.6, 72.4, 68.2, 40.9, 19.8, 15.8, 15.2.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3455 (w), 2936 (w), 1705 (s), 1382 (w), 1261 (s), 1178 (m), 1052 (s), 733 (w).

**MS** (APCI):  $m/z$  (%) = 341 (2) [ $M+H^+$ ], 255 (4), 195 (12), 127 (18), 111 (100).

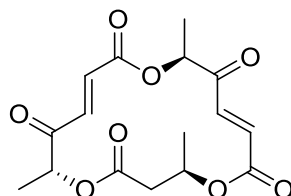
**HRMS** (CI): berechnet für  $C_{16}H_{20}O_8Na$ : 363.1050, gefunden: 363.1041.

$\alpha_D^{20} = 35^\circ$  ( $c = 9$  g/L, MeOH).

### 9. 17. Darstellung von (4*R*,7*E*,13*E*)-4,10,16-trimethyl-1,5,11-trioxacyclohexadeca-7,13-diene-2,6,9,12,15-pentaon (9*R*)-45

Das Gemisch der vier diastereomeren Macrophelid-Analoga (*cis*,9*R*)-5 (85 mg, 0.25 mmol) wird in  $CH_2Cl_2$  (1 mL) gelöst, Dess-Martin-Periodinan (159 mg, 0.375 mmol) wird zugegeben und die Reaktionslösung unter Lichtausschluss gerührt. Nach 4 h wird nochmals DESS-MARTIN-Periodinan (80 mg, 0.188 mmol) zugegeben und weiter über Nacht unter Lichtausschluss gerührt. Diethylether (~1 mL) wird zugegeben und die Reaktionsmischung über ein kurzes Kieselgelfestbett (~2 cm) filtriert, wobei der Filterkuchen mit Ethylacetat nachgewaschen wird. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand gereinigt durch

Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 1:1). Man erhält 39 mg (0.115 mmol, 46 %) (9*R*)-**45** als Diastereomerenmischung und farbloses Öl.



$R_f = 0.70$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.20 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.18 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.56 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H), 5.45 (q,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 5.37-5.46 (m, 1H), 5.39 (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J = 17.1$  Hz, 11.3 Hz, 1H), 2.66 (dd,  $J = 17.0$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 1.50 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.43 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.38 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

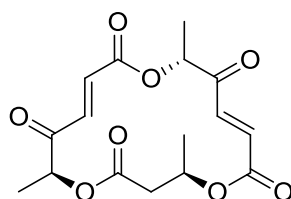
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 197.2, 195.2, 169.7, 164.0, 163.5, 135.5, 135.3, 131.6, 131.3, 75.5, 74.5, 68.8, 40.3, 19.5, 15.5, 15.1.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 1711 (s), 1273 (m), 1182 (m), 1055 (m), 989 (w).

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = 361 (100) [M+Na], 339 (21), 195 (19).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ : 361.0894, gefunden: 361.0900.

$\alpha_D^{20} = 47^\circ$  ( $c = 9$  g/L,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).



$R_f = 0.70$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.25 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 7.18 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.65 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 5.29-5.35 (m, 1H), 5.27 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 5.18 (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 2.82 (dd,  $J = 16.7$  Hz, 3.8 Hz, 1H), 2.70 (dd,  $J = 16.7$  Hz, 6.0 Hz, 1H), 1.56 (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H), 1.53 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 1.45 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

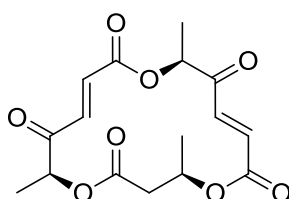
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 197.8, 195.3, 169.4, 164.1, 163.4, 134.4, 134.1, 131.8, 131.6, 76.2, 75.8, 68.3, 39.3, 18.6, 16.9, 15.3.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2364 (m), 2338 (w), 1728 (s), 1271 (s), 1177 (m), 1062 (m), 981 (m).

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = 361 (100) [M+Na], 339 (18), 310 (15), 195 (10).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ : 361.0894, gefunden: 361.0891.

$\alpha_{\text{D}}^{20} = -57^\circ$  ( $c = 1.1$  g/L,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).



$R_f = 0.70$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.28 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.90 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.57 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H), 5.41 (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.29-5.37 (m, 1H), 5.00 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 2.85 (dd,  $J = 16.6$  Hz, 3.7 Hz, 1H), 2.68 (dd,  $J = 16.6$  Hz, 6.5 Hz, 1H), 1.53 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.48 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H), 1.47 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

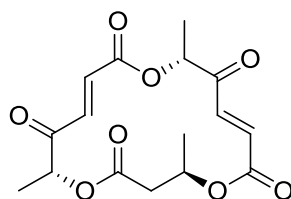
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 197.6, 195.7, 169.6, 163.9, 163.6, 135.8, 133.1, 132.0, 131.1, 76.6, 75.7, 68.3, 39.4, 18.6, 15.9, 15.9.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 1728 (s), 1271 (s), 1179 (m), 1087 (s), 1057 (s), 980 (m).

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 361 (100) [M+Na], 339 (21), 310 (36), 207 (10), 195 (10).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ : 361.0894, gefunden: 361.0892.

$\alpha_{\text{D}}^{20} = -34^\circ$  ( $c = 0.173$  g/L,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).



$R_f = 0.63$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.36 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 6.63 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 5.32-5.45 (m, 1H), 5.26 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 5.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 2.90 (dd,  $J = 16.6$  Hz, 11.3 Hz, 1H), 2.67 (dd,  $J = 16.6$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 1.58 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.46 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.41 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 197.4, 195.6, 170.1, 163.5, 163.1, 134.3, 132.3, 132.3, 132.0, 76.3, 75.5, 69.2, 40.6, 19.5, 17.1, 15.9.

**IR** (Film):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2357 (w), 1728 (s), 1711 (s), 1265 (s), 1180 (m), 1061 (m), 980 (m).

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = 361 (100) [M+Na], 339 (30), 195 (28).

**HRMS** (ESI): berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ : 361.0894, gefunden: 361.0902.

$\alpha_D^{20} = 26^\circ$  ( $c = 1.07$  g/L,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

### 9. 18. Asymmetrische Reduktion mit *L*-Weinsäure

Fein gemörstertes Natriumborhydrid (304 mg, 8 mmol) und *L*-Weinsäure (1200 mg, 8 mmol) wurden mit 4 mL abs. THF versetzt und die Suspension 4 h lang auf Rückfluss erhitzt und danach auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühlt. Der Ketoester **40** (316 mg, 2 mmol) wird in 1 mL abs. THF gelöst zugegeben und die Mischung 22 h lang gerührt. Etwa 2 mL 1 M HCl wird vorsichtig (Gasentwicklung!) bei  $-20^\circ\text{C}$  zugegeben und noch 15 min. bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt, das THF im Vakuum entfernt und der Rückstand 5mal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, nacheinander mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, die wässrigen Phasen mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird gereinigt durch Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 5:1) und man erhält 236 mg (1.5 mmol, 74 %) (*R*)-**41** als farblose Flüssigkeit. Der Enantiomerenüberschuss wurde bestimmt durch chirale HPLC (Chiracel OD, *n*-Hexan/Isopropanol 98:2;  $t_R = 22.5$  min.,  $t_S = 23.6$  min.) zu etwa 50 % (analytische Daten s. Abschn. 8. 2.).

## 10. Durchführung der Computersimulationen

### 10. 1. Erzeugen der Decoy-Bibliotheken und Vorbereiten der Dateien

Zur Erzeugung der vier Decoy-Bibliotheken für Epothilon, Dictyostatin, Macrosphehid A und B wurden in der ZINC-Datenbank Verbindungen gesucht, die jeweils vergleichbare physikalische Eigenschaften haben. Hierzu wurde die Eigenschaftssuche verwendet. Die Suchkriterien, die dabei verwendet wurden, sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Im Folgenden werden die Verbindungen aller Decoy-Bibliotheken in Form von SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) aufgelistet.

SMILES-Notationen der Decoys für Dictyostatin:

```

N(C(=O)[C@@H](NC(=O)c1c(Cl)cc(Cl)cc1)CCSC)c1sc2C[C@H](C)CCc2c1C(=O)N
N(C(=O)[C@@H](NC(=O)c1c(Cl)cc(Cl)cc1)CCSC)c1sc2C[C@@H](C)CCc2c1C(=O)N
[C@H]1([C@@]2(C)CC[C@@H]3[C@@]4(C)CC[C@H](C[C@H]4C[C@@H]([C@H]3[C@@H]2CC1)O)O)[C@H](C)CCC(=O)Nc1ccc(cc1)NC(=O)C
[C@@H]1(Cc2sc(c(c2CC1)C(=O)N)NC(=S)NC(=O)c1cc(Cl)c(c(Cl)c1)OC)C(C)(C)C
[C@H]1(Cc2sc(c(c2CC1)C(=O)N)NC(=S)NC(=O)c1cc(Cl)c(c(Cl)c1)OC)C(C)(C)C
C(=S)(NC(=O)c1cc(c(cc1)OCC(C)C)Br)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N
[C@@H]1([C@H]([C@@H]2CCCC3cccc1c23)S[C@H]1NC=C(N1N)C(F)(F)F)NS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1
[C@@H]1([C@@H]([C@@H]2CCCC3=C2[C@H]1CCC3)S[C@@H]1NC=C(N1N)C(F)(F)F)NS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1
[C@H]1([C@H](c2cccc3CCC[C@H]1c23)S[C@H]1NC=C(N1N)C(F)(F)F)NS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1
C(=S)(NC(=O)c1c(ccc(c1)Br)OCC(C)C)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N
[C@H]1([C@@]2(C)CC[C@@H]3[C@@]4(C)CC[C@H](C[C@H]4C[C@@H]([C@H]3[C@@H]2CC1)O)O)[C@H](C)CCC(=O)Nc1cc(ccc1)NC(=O)C
[C@@H]1([C@H]([C@@H]2CCCC3cccc1c23)Sc1n(c(cn1)C(F)(F)F)N)NS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1
[C@@H]1([C@@H]([C@@H]2CCCC3=C2[C@H]1CCC3)Sc1n(c(cn1)C(F)(F)F)N)NS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1
[C@H]1([C@H](c2cccc3CCC[C@H]1c23)Sc1n(c(cn1)C(F)(F)F)N)NS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1
[C@H]1([C@@]2(C)[C@H](C[C@@H]3[C@@]4(C)CC[C@H](C[C@H]4CC[C@H]3[C@@H]2CC1)O)O)[C@H](C)CCC(=O)Nc1ccc(cc1)NC(=O)C
S(=O)(=O)(c1cc(c(cc1)Oc1ccc(cc1)N)Cl)c1cc(Cl)c(cc1)Oc1ccc(cc1)N
C(=S)(NC(=O)c1oc(cc1)c1c(Cl)cc(Cl)cc1)Nc1sc2C[C@H](C)CCc2c1C(=O)N
C(=S)(NC(=O)[C@H]1OC(=CC1)c1c(Cl)cc(Cl)cc1)Nc1sc2C[C@@H](C)CCc2c1C(=O)N
Cc1c(c(sc1Cc1cccc1)NC(=S)NC(=O)c1cc(Br)c(cc1)OC)C(=O)N
C(=S)(NC(=O)COc1ccc2cccc2c1Br)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N
c1(nc(c(c(=O)[nH]1)NC(=O)c1ccc(Br)cc1)N)S[C@H](c1cccc1)c1cccc1

```

## 10. Durchführung der Computersimulationen

C[C@]12[C@@H]([C@H](N)[C@H](SCNc3ccccc3)C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)CC(=O)NCc1sc  
c1  
Cc1c(c(sc1Cc1ccccc1)NC(=S)NC(=O)c1c(ccc(Br)c1)OC)C(=O)N  
C(=S)(NC(=O)[C@H]1OC(=CC1)c1cc(Cl)c(Cl)cc1)Nc1sc2C[C@@H](C)CCc2c1C(=O)N  
C(=S)(NC(=O)[C@H]1OC(=CC1)c1cc(Cl)c(Cl)cc1)Nc1sc2C[C@H](C)CCc2c1C(=O)N  
C(=S)(NC(=O)[C@H]1OC(=CC1)c1c(Cl)ccc(Cl)c1)Nc1sc2C[C@@H](C)CCc2c1C(=O)N  
[C@H]1([C@@]2(C)[C@H](C[C@@H]3[C@@]4(C)CC[C@H](C[C@H]4C[C@H]([C@H]3[C@@H]2CC1)O)O)O)[  
C@H](C)CCC(=O)Nc1ccc(cc1)OC  
C(=S)(NC(=O)[C@H]1OC(=CC1)c1c(Cl)ccc(Cl)c1)Nc1sc2C[C@@H](C)CCc2c1C(=O)N  
C(=S)(NC(=O)[C@H]1OC(=CC1)c1ccc(Br)cc1)Nc1sc2C[C@H](C)CCc2c1C(=O)N  
C(=S)(NC(=O)[C@H]1OC(=CC1)c1ccc(Br)cc1)Nc1sc2C[C@@H](C)CCc2c1C(=O)N  
c1(c(l)cc(cc1)CNNC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1ccc(C)cc1  
C(=S)(NC(=O)COc1c(cc(cc1)Br)Cl)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N  
C1S[C@@H](C=C1C(=O)N[C@H]1c2ccccc2CCC1)N)[C@H](O)c1ccccc1.N.C1(CCCCC1)OCC  
C(=O)(N/N=C/c1cc(Br)c(c(Br)c1)O)[C@@H](CC)S[C@H]1Nc2ccccc2N1  
C(=O)(N/N=C/c1cc(Br)c(c(Br)c1)O)[C@H](CC)S[C@@H]1Nc2ccccc2N1  
[C@H](C(=O)N/N=C/c1cc(Br)c(O)c(Br)c1)(CC)S[C@H]1Nc2ccccc2N1  
[C@@H](C(=O)NN)(CC)S[C@@H]1Nc2ccccc2N1.C[C@@H]1C=C(Br)[C@H](O)C(=C1)Br  
c1(c(l)cc(cc1)CNNC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1cc(ccc1)F  
C[C@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)NCc1ccccc1  
C(NNC(=O)Cc1nc(sc1)N)c1cc(c(c(c1)Br)OCC)I  
C[C@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)NCc1sccc1  
C[C@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)Nc1ccccc1  
C[C@]12[C@@H](C(=C(SCN)C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)N)CC(=O)NCc1ccccc1.C1CCCCC1  
C1S[C@H](C=C1C(=O)N[C@H]1c2ccccc2CCC1)N)[C@H](O)c1ccccc1.N.C1(CCCCC1)OCC  
[C@@H]1(SC[C@H](C1)C(=O)Nc1c(C)cccc1)C(=O)Nc1ccc(cc1)CC.N.Nc1cc(C)c(C)cc1  
C[C@]1(C[C@H]2C(C)(C)C[C@@H]([C@@]2(CC1)CCC(=O)NCCc1c2ccccc2[nH]c1)NC(=O)C1CCCCC1)O  
[C@@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)NCc1ccccc1  
C[C@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)NCc1cc(F)cc(F)c1  
C[C@@]12[C@@H](c3[nH]c(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)NCc1sccc1  
C[C@@]12[C@@H](c3[nH]c(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)Nc1ccccc1  
C[C@H]1[C@@H]2[C@H]([C@H](CC[C@@]2(C)CC[C@@H]1NC(=O)Nc1cc(F)ccc1)[C@H](C)C(=O)NCc1sccc  
1)O  
C[C@@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)NCc1sccc1  
C[C@]12[C@@H](C(=C(SCN)[C@H]3CC=CCC3)C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)N)CC(=O)NCc1cc(  
F)cc(F)c1  
C[C@H]1[C@@H]2[C@H]([C@@H](CC[C@@]2(C)CC[C@@H]1NC(=O)Nc1cc(F)ccc1)[C@H](C)C(=O)NCc1sc  
cc1)O  
CC1(C)C[C@@H](O)[C@H]([C@H]([C@H]2CSC(=C2N)C(=O)NCCc2ccccc2)c2ccc(cc2)OC)[C@H](N)C1  
C[C@@]12[C@@H](C(=C(SCNc3ccccc3)C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)N)CC(=O)NCc1ccccc1  
C[C@@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1ccccc1)CC(=O)Nc1ccccc1



## 10. Durchführung der Computersimulationen

C[C@]1(C[C@H]2C(C)(C)C[C@@H]([C@]2(CC1)CCC(=O)NCCc1c2cccc2[nH]c1)NC(=O)C1CCCC1)O  
C[C@@]12[C@@H](C(=C(SCNc3cccc3)C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)N)CC(=O)NCc1cccc1  
c1cc(cc1)NC(=O)c1c2cccc2[nH]c(=O)c1C[C@H](c1c2cccc2[nH]c1)c1c2cccc2[nH]c1  
[C@@H]1(Cc2sc(c(c2CC1)C(=O)N)NC(=S)NC(=O)c1c(ccc(Br)c1)OC)C(C)(C)C  
[C@H]1(Cc2sc(c(c2CC1)C(=O)N)NC(=S)NC(=O)c1c(ccc(Br)c1)OC)C(C)(C)C  
N(c1sc2C[C@@H](CCc2c1C(=O)N)C(C)(C)C(=S)NC(=O)c1c(F)c(F)c(c(F)c1F)OC  
N(c1sc2C[C@H](CCc2c1C(=O)N)C(C)(C)C(=S)NC(=O)c1c(F)c(F)c(c(F)c1F)OC  
C(=S)(NC(=O)COc1c(cc(c(C)c1)Br)C(C)C)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N  
c1(c(Cl)ccc(c1)S(=O)(=O)Nc1cc(ccc1)C(F)(F)F)C(=O)NC1CC([NH2]C(C)(C)C1)(C)C  
[C@@H]1(Cc2sc(c(c2CC1)C(=O)N)NC(=S)NC(=O)c1cc(Br)c(cc1)OC)C(C)(C)C  
[C@H]1(Cc2sc(c(c2CC1)C(=O)N)NC(=S)NC(=O)c1cc(Br)c(cc1)OC)C(C)(C)C  
N(C(=O)C1=C[C@@H](Nc2c1cc(Cl)cc2)C1CCNCC1)c1sc(cc1C(=O)N)Cc1cccc1  
C[C@@]12[C@@H](c3[nH]c(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1cccc1)CC(=O)NC1CCCC1  
C(=S)(NC(=O)c1c(c(Br)c2cccc2c1)OC)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N  
C(=O)(NC(=S)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N)CC[C@H]1OC(=CC1)c1c(ccc1)Cl)Cl  
C(=O)(NC(=S)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N)CC[C@H]1OC(=CC1)c1ccc(cc1)Br  
C(=O)(NC(=S)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N)CC[C@H]1OC(=CC1)c1c(cc(cc1)Cl)Cl  
C(=O)(NC(=S)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N)CC[C@H]1CC=C(O1)c1cc(Cl)cc(Cl)c1  
C(=O)(NC(=S)Nc1sc2CCCCc2c1C(=O)N)c1c(c(Br)c2cccc2c1)OC  
c1c(ccc(c1)[C@H](O)[C@H]1SC[C@@H](CCCC2CC2)C1)[C@H](O)[C@H]1SC[C@@H](CCCC2CC2)C1.N.N.N  
.N  
c1(c(l)cc(cc1)CNNC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1cc(C)ccc1  
c1(c(l)cc(cc1)CNNC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1cccc1F  
c1(c(l)cc(cc1)CNNC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1ccc(cc1)F  
c1c(cc(Br)c(c1)OCc1c(Cl)cc(Cl)cc1)/C=N/NC(=O)Cc1nc(sc1)N  
C[C@@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1cccc1)CC(=O)NC1CCCC1  
c1(c(cc(Br)cc1)CNNC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1ccc(c(c1)Cl)Cl  
c1(c(Cl)cc(cc1Cl)/C=N/NC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1ccc(cc1)Br  
c1(c(cc(Br)cc1)/C=N/NC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1c(cc(cc1)Cl)Cl  
c1(c(Br)cc(cc1)CNNC(=O)Cc1nc(sc1)N)OCc1ccc(c(c1)Cl)Cl  
[C@@H]1([C@]2(C)CC[C@H]([C@](C)([C@H]2Cc2sc(nc12)NCc1cccc1)CO)O)CC(=O)N[C@@H](C)c1cccc1  
N(C(=O)[C@H](NC(=O)c1c(Cl)cc(Cl)cc1)CCSC)c1sc2C[C@@H](C)CCc2c1C(=O)N  
C[C@@]12[C@@H](c3nc(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1cccc1)CC(=O)NC1CCCC1  
C[C@]1(C[C@H]2C(C)(C)C[C@@H]([C@@]2(CC1)CCC(=O)NCCc1c2cccc2[nH]c1)NC(=O)[C@H]1SCCC1)O  
C[C@]1(C[C@H]2C(C)(C)C[C@@H]([C@]2(CC1)CCC(=O)NCCc1c[nH]c2cccc12)NC(=O)[C@H]1SCCC1)O  
C[C@@]12[C@@H](c3[nH]c(sc3C[C@@H]1[C@@](C)([C@@H](CC2)O)CO)NCc1cccc1)CC(=O)NCc1cccc1  
N(C(=O)[C@H](NC(=O)c1c(Cl)cc(Cl)cc1)CCSC)c1sc2C[C@H](C)CCc2c1C(=O)N

SMILES-Notationen der Decoys für Epothilon A:

c1cc2C3=C([C@@H](C4=C(N3)CCCC4=O)c3c(ccc(c3)N(=O)=O)O)C(=O)c2cc1  
c1(ccc(cc1)[C@@H]1Nc2sc3CCCCc3c2C(=O)N1)[C@@]1(C)NC(=O)NC1=O  
c1(c2[C@H](CCCc2nc2nc([nH]c(=O)c12)N1CCCC1)O)c1ccc(cc1)O  
c1(c2cc3c(=O)n(O)c4C(=O)C[C@H](Nc4c3nc2ccc1)O)Cc1cccc1  
c1(c2cc3c(=O)n(O)c4C(=O)C[C@@H](Nc4c3nc2ccc1)O)Cc1cccc1  
c1cc2C3=C([C@H](C4=C(CCC[C@H]4N3)OO)c3cccc(c3)N(=O)=O)C(=O)c2cc1  
C(=O)NC=O.C/C(=C/C/C=C\O)/N.C.C.C.C.C.C(=C\C/C=C(/C)\N)\O.C.C.C  
Cc1cc(c2oc(c(=O)c2c1)O)c1ccc(cc1)O)N1S(=O)(=O)CCC1  
c1(cc2C(=O)Nc3c(Oc2cc1)cccc3)NC(=O)c1cc2cccc2oc1=O  
c1cc2C3=NC4=C([C@@H]([C@H]3C(=O)c2cc1)c1c(O)ccc(c1)N(=O)=O)C(=O)CCC4  
c1(c2[C@H](CCCc2nc2nc([nH]c(=O)c12)N1CCCC1)O)c1ccc(cc1)O  
c1cc2c3nc(CCC)c(C)c(c3C(=O)c2cc1)c1c(ccc(c1)N(=O)=O)O.O  
c1cc2C3=C([C@@H]4C5=C(CCC[C@H]5N3)OOc3c4cc(cc3)N(=O)=O)C(=O)c2cc1  
c1cc2c3nc4CCC[C@@H](OO)c4c(c3C(=O)c2cc1)c1cccc(c1)N(=O)=O  
c1(c2[C@@H](CCCc2nc2nc([nH]c(=O)c12)N1CCCC1)O)c1ccc(cc1)O  
c1cc2C3=C([C@@H](C4=C(N3)CCCC4=O)c3c(O)ccc(c3)N(=O)=O)C(=O)c2cc1  
c1([nH]nc(n1)NC(=O)[C@@H]1C(=O)Nc2cccc2C1)c1cccc2cccc12  
c1cc2[C@H]3NC4=CCC[C@@H]5OOc6c7[C@@H]([C@H]45)[C@@H]3C(=O)c2c(c1)ON(c(cc6)c7)O  
c1(cc2C(=O)Nc3c(Oc2cc1)cccc3)NC(=O)c1cc(=O)c2cccc2o1  
C[C@H]1[C@@H](C(=O)Oc2cc(c(Cl)cc12)O)CC(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
C[C@@H]1[C@@H](C(=O)Oc2cc(c(Cl)cc12)O)CC(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
CC1(C)Oc2cc(c(cc2C[C@@H]1O)c1c(=O)c2c(O)cc(cc2oc1)OC)O  
C[C@@H]1[C@H](C(=O)Oc2cc(c(Cl)cc12)O)CC(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
c1cc2c3nc4CCC[C@H]5OOc6c(c(c45)c3C(=O)c2cc1)cc(cc6)N(=O)=O  
C1=C2N3C=C(N[C@H]4Oc5c(cccc15)[NH2]4)[C@H]([C@@H]([C@H]3OC2=O)C#N)c1cccc1  
C1=C2N3C=C(N[C@H]4Oc5c(cccc15)[NH2]4)[C@@H]([C@@H]([C@H]3OC2=O)C#N)c1cccc1  
c1(c2[C@H](CCCc2nc2nc([nH]c(=O)c12)N1CCCC1)O)c1ccc(cc1)O  
c1cc2c3nc4CCC[C@@H](O)c4c(c3C(=O)c2cc1)c1c(O)ccc(c1)N(=O)=O  
C[C@H]1[C@H](C(=O)Oc2cc(c(Cl)cc12)O)CC(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
c1(nnc([nH]1)NC(=O)[C@@H]1C(=O)Nc2cccc2C1)c1cccc2cccc12  
c1(sc2[nH]c3cc4OCOc4cc3cc2c1N)C(=O)Nc1nc(C)c(s1)C  
C([C@H]1[C@H](C)c2c(OC1=O)cc(O)c(Cl)c2)C(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
c1(c2C(=O)c3c(C(=O)c2ccc1)cccc3)NC(=O)N[C@@]1(C)CS(=O)(=O)CC1  
C([C@H]1[C@@H](C)c2c(OC1=O)cc(O)c(Cl)c2)C(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
C([C@@H]1[C@@H](C)c2c(OC1=O)cc(O)c(Cl)c2)C(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
c1(onc2ccc(cc12)C=C1C(=O)NC(=O)NC1=O)c1cccc2cccc12  
c1(nc(c(c(c1)c1cc2OCOc2cc1)C#N)N)c1cc2cccc2oc1=O  
C1[C@@H]2[C@H](CO/C/1=N[C@@H]1Nc3cccc3N1)c1c(OC2=O)cc(O)c(Cl)c1

## 10. Durchführung der Computersimulationen

---

CC1(C)Oc2cc(c(cc2C[C@H]1O)c1c(=O)c2c(cc(cc2oc1)OC)O)O  
c1(onc2ccc3c(c12)O[C@@H]1C(=C3)C(=O)NC(=O)N1)c1cccc2cccc12  
Cc1c(c(=O)oc2cc(c(Cl)cc12)O)CC(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
c1(onc2ccc(cc12)C[C@H]1C(=O)NC(=O)NC1=O)c1cccc2cccc12  
c1(sc2nc3cc4OCOc4cc3cc2c1N)C(=O)Nc1nc(C)c(s1)C  
c1(c2C(=O)c3c(C(=O)c2ccc1)cccc3)NC(=O)N[C@]1(C)CS(=O)(=O)CC1  
C(c1c(C)c2c(oc1=O)cc(O)c(Cl)c2)C(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
S(=O)(=O)(c1cc2c(cc1F)NC(=O)CC2)/N=c\1/sc2C(=O)CCCc2[nH]1  
c1(sc2nc3cc4OCOc4cc3cc2c1N)C(=O)Nc1nc(C)c(s1)C  
C(c1c(C)c2c(oc1=O)cc(O)c(Cl)c2)C(=O)/N=c\1/[nH]c2cccc2[nH]1  
n1(c(=O)[nH]c2=C(N[C@@H](Nc2c1N)c1c(Cl)cccc1F)O)c1cccc1  
N1C(=O)c2n[nH]c3CCC[C@@H](N1[C@@H]1c4ccc(ccc4NC1=O)Br)c23  
CC1(C)Oc2cc(c(cc2C[C@H]1O)c1c(=O)c2c(cc(cc2oc1)OC)O)O  
N1(C(=O)NC2=C(N[C@@H](NC2=O)c2c(Cl)cccc2F)[C@H]1N)c1cccc1  
N(c1s/c(=C\2/C(=O)Nc3cccc23)/c(=O)[nH]1)S(=O)(=O)c1cccc1  
N(C(=O)c1[nH]nc2CCCCc12)/N=C\1/c2cc(ccc2NC1=O)Br  
C(=O)NC=O.C/C(=C/C/C=C\O)/N.C.C.C.C.C.C(=C\C/C=C(/C)\N)\O.C.C.C  
N(c1s/c(=C\2/C(=O)Nc3cccc23)/c(=O)[nH]1)S(=O)(=O)c1cccc1  
N(C1=NC(=O)C(=S]1)[C@@H]1C(=O)Nc2cccc12)S(=O)(=O)c1cccc1  
c1(ccc(cc1)n1ncc(=O)[nH]c1=O)c1c(C)c(Cl)c(c(Cl)c1C#N)O  
N(C1=NC(=O)C(=S]1)[C@H]1C(=O)Nc2cccc12)S(=O)(=O)c1cccc1  
N(C1=NC(=O)C(=S]1)[C@@H]1C(=O)Nc2cccc12)S(=O)(=O)c1cccc1  
c1(ccc(cc1)n1ncc(=O)[nH]c1=O)c1c(C)c(Cl)c(O)c(Cl)c1C#N  
C[C@@]1(C(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2C1=O)c1cc(c(cc1)O)N(=O)=O  
CC1(C)Oc2cc(c(cc2C[C@H]1O)c1c(=O)c2c(O)cc(cc2oc1)OC)O  
N(C1=NC(=O)C(=S]1)[C@@H]1C(=O)Nc2cccc12)S(=O)(=O)c1cccc1  
C[C@]1(C(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2C1=O)c1cc(c(cc1)O)N(=O)=O  
c1(ccc(cc1)[C@H]1Nc2sc3CCCCc3c2C(=O)N1)[C@]1(C)NC(=O)NC1=O  
c1(ccc(cc1)n1ncc(=O)[nH]c1=O)c1c(C)c(Cl)c(O)c(Cl)c1C#N  
C[C@@]1(C(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2C1=O)c1cc(c(O)cc1)N(=O)=O  
C[C@]1(C(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2C1=O)c1cc(c(O)cc1)N(=O)=O  
N1N=C2C(=O)NC3=CC[C@@]4(Br)[C@H]5[C@@]23O[C@]25[NH]4c3cccc3N[C@@H]12  
C[C@@]1(C(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2C1=O)c1cc(c(O)cc1)N(=O)=O  
C[C@]1(C(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2C1=O)c1cc(c(O)cc1)N(=O)=O  
N1N=C2C(=O)N/C(=C\C)/C2=N[C@@H]1C(=O)/N=C/Br.C=C/C=C\C.C#C  
S(=O)(=O)(NC1=[S][C@H]2C=C(F)[C@H](F)C=C2N1)c1ccc2c(c1)oc(=O)[nH]2  
N1(C(=O)[C@]2([C@H]([C@H](Oc3c4c(oc(=O)c23)cccc4)N)C#N)c2cccc12)CCC  
c1cc(c2C(=O)N(C(=O)c2c1)c1cc(Br)c(c(Cl)c1)N)N(=O)=O  
c1(ccc(cc1)[C@H]1Nc2sc3CCCCc3c2C(=O)N1)[C@@]1(C)NC(=O)NC1=O

## 10. Durchführung der Computersimulationen

N1(C(=O)[C@@]2([C@H]([C@@H](Oc3c4c(oc(=O)c23)cccc4)N)C#N)c2cccc12)CCC  
c1(ccc(cc1)[C@H]1Nc2sc3CCCCc3c2C(=O)N1)[C@]1(C)NC(=O)NC1=O  
C(=O)NC=O.C/C(=C/C/C=C\O)/N.C.C.C.C.C.C(=C\C/C=C(/C)\N)\O.C.C.C

SMILES-Notationen der Decoys für Macrosphehid A (Decoys der Dirole 4):

C1[C@H](CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)C1)C(=O)N1CCC2(OCCO2)CC1  
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
C[NH]1CCC2(N(C)CCCN(C(=O)[C@H]3NC(=O)NC(=O)C3)C2)CC1  
[C@]123C[C@]41[C@@]1([C@H]([N@]2(O)[C@]24[C@@]3(C2)N2CCOCC2)CCc2nonc12)O  
C1C[C@@H]2[C@@]3([C@H](N(O)[C@@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)c1ccc2[nH]c(C)c([nH]c2c1)C  
N1(CCN(C(=O)N2CCOCC2)CC1)c1ccc2c(c1)[nH]c(=O)[nH]2  
c1cc2C(=O)N3[C@H](C(=O)Nc2cc1)[C@H](C=C3)NC(=O)N1CCOCC1  
CN(C(=O)N1CCN(C(=O)Nc2cc3C(=O)NCc3cc2)CC1)C  
C1C[C@]2(N(O)[C@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C[NH]1CCC2([NH](C)CCCN(C(=O)[C@H]3NC(=O)NC(=O)C3)C2)CC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@H]3CCc4nonc4[C@]3([C@@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C[C@@H]1N[C@H](c2cc3OC=COc3cc2N1)N1CCN(C(=O)N)CC1  
C1C[C@@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C[NH]1CCC2(N(C)CCCN(C(=O)[C@H]3NC(=O)NC(=O)C3)C2)CC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@H]3C=Cc4nonc4[C@]3([C@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)c1ccc2[nH]c(C)c([nH]c2c1)C  
C[NH]1c2cccc2CN(C(=O)C2=CNc3[nH]c(=O)[nH]c(=O)c3C2)CC1  
C1C[C@]2(N(O)C3=CCc4nonc4[C@]3([C@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@H]3CCc4nonc4[C@]3([C@@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C[C@@H]1N[C@H](c2cc3OCCOc3cc2N1)N1CCN(C(=O)N)CC1  
[C@]123C[C@]41[C@@]1([C@H]([N@]2(O)[C@]24[C@@]3(C2)[NH]2CCOCC2)CCc2nonc12)O  
C1C[C@@]2(N(O)C3=CCc4nonc4[C@@]3([C@@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C[NH]1c2cccc2CN(C(=O)[C@@H]2CN[C@H](N)[C@H](C(=O)NCO)C2)CC1  
CN1c2cccc2CN(C(=O)c2cnc3[nH]c(=O)[nH]c(=O)c3c2)CC1  
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
N1([C@@H](N)N([C@@H]2CN(C)C(=O)NC2=O)C[C@@H](C1)O)c1cc(C)ccc1  
N1([C@@H](N)N([C@@H]2CN(C)C(=O)NC2=O)C[C@H](C1)O)c1cc(C)ccc1  
N1(CCN(C(=O)N2CCOCC2)CC1)[C@H]1C[C@@H](Cl)N[C@H](N1)N  
N1(CCN(C(=O)N2CCOCC2)CC1)[C@H]1CC(=N[C@H](N1)N)Cl  
C1C[C@@H](C[C@@H](C[C@]2(C(=O)NC(=O)NC2=O)[C@H]2COCCN2)C)[C@@H](N)C=C1  
C1C[C@@H]2[C@@]3([C@H](N(O)[C@@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCc1nonc31)O

## 10. Durchführung der Computersimulationen

---

CN1c2ccccc2CN(C=O)[C@@H]2CN[C@@H]3NC(=O)NC(=O)C3=C2)CC1  
C1C[C@@H](C[C@H](C[C@]2([C@H](O)N[C@H](O)NC2=O)[C@@H]2COCCN2)C)[C@@H](N)CC1  
C1C[C@H](C[C@@H](C[C@]2(C(=O)NC(=O)NC2=O)[C@@H]2COCCN2)C)[C@H](N)C=C1  
C1C=C2C[C@H]3C[C@@]4([C@@H](O)N[C@@H](O)NC4=O)[C@H]4COC[C@@H]5N4[C@]35N[C@H]2CC1  
C1C[C@H]2C[C@@H]3C[C@]4([C@@H](O)NC(=O)NC4=O)[C@@H]4COCCN4[C@H]3N[C@H]2C=C1  
C1[C@H](CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)C1)C(=O)N1CC[C@@]2(OC=CO2)CC1  
N1([C@@H]2N[C@@H]3N(C)C(=O)NC(=O)[C@@H]3N2C[C@@H](C1)O)c1ccc(C)cc1  
C(=O)(N1CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)c1nc2cc(C)ccn2c1  
C1Cc2cc3C[C@]4(C(=O)NC(=O)NC4=O)[C@@H]4COCCN4c3nc2CC1  
C(=O)(N1C[C@H]2C(=O)NCC(=O)N2CC1)/C=C/1\CC(=CC=C1NN)C  
c1cc2C(=O)NC[C@]3(CN(C(=O)[C@H]4CCC(=O)NN4)CCC3)Oc2cc1  
C(=O)(N1CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1COc2ccccc2O1  
c1cc(C[C@H](C[C@@]2([C@@H](O)NC(=O)NC2=O)[C@H]2COCCN2)C)c(N)cc1  
C(=O)(N1CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@H]1COc2ccccc2O1  
C1C[C@H]2C[C@H]3C[C@]4(C(=O)NC(=O)NC4=O)[C@H]4COCCN4[C@H]3N[C@H]2CC1  
N1([C@@H](N)N([C@@H]2CN(C)C(=O)NC2=O)C[C@H](C1)O)c1ccc(C)cc1  
N1(CCN(C(=O)N2CCOCC2)CC1)c1cc(Cl)nc(n1)N  
C1C[C@@H]2[C@]3([C@H](N(O)[C@@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
N1([C@@H](N)N([C@@H]2CN(C)C(=O)NC2=O)C[C@H](C1)O)c1cc(C)ccc1  
C(=O)(N1C[C@@H]2C(=O)NCC(=O)N2CC1)Cc1cc(C)ccc1N.N  
N1([C@@H](N)N([C@@H]2CN(C)C(=O)NC2=O)C[C@@H](C1)O)c1cc(C)ccc1  
C1C[C@@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
C(=O)(N1CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1COc2ccccc2O1  
C(=O)(N1CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@H]1COc2ccccc2O1  
c1cc2CCN3[C@H]4CCC(=C4C4(C(=O)NC(=O)NC4=O)O[C@H]3c2cc1)O  
c1cc(CC)c([C@H](N)OC2([C@H]3CCC[C@H]3O)C(=O)NC(=O)NC2=O)cc1  
C[C@H]1N([C@H](N[C@H]2N(C)C(=O)NC(=O)C2)N[C@@H]1C)c1ccc(cc1)O  
C[C@@H]1N[C@H](N[C@H]2N(C)C(=O)NC(=O)C2)N[C@@H]1C.c1cc(ccc1)O  
CN1C(=S)NC(=O)/C(=C/2\NN[C@@H](C2)C2=CC=C3[C@H](C2)OCO3)/C1=O  
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)C=Cc1nonc31)O  
CN1C(=S)NC(=O)/C(=C/2\NN[C@H](C2)[C@@H]2C=C3OCO[C@H]3C=C2)/C1=O  
N1(Cc2sc3ncnc(c3c2CC1)N)[C@H]1[C@@H]2C=NN(C)[C@@H]2NC=N1  
c1cc2C(=O)NC[C@@]3(CN(C(=O)C4=CCC(=O)NN4)CCC3)Oc2cc1  
C(=O)(N1CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1C[C@H]2OCO[C@H]2[C@H](Cl)C1  
CN1C(=S)NC(=O)/C(=C/2\NN[C@@H](C2)[C@@H]2C[C@@H]3OCOC3=CC2)/C1=O  
CN1C(=S)NC(=O)[C@H]([C@H]2NN[C@H](C2)C2=C[C@@H]3OCOC3=CC2)C1=O  
C(=O)(N1CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1C[C@H]2OCO[C@H]2[C@H](Cl)C1  
CC1=CC=CN2[C@@H]1N[C@H](Cl)[C@H](C2=O)[C@@H]1NC(=O)N[C@@H]2COC(=O)[C@H]12  
CC1=CC=CN2[C@@H]1N[C@H](Cl)[C@H](C2=O)[C@H]1NC(=O)NC2=C1C(=O)OC2

N(C(=O)N1S(=O)(=O)c2sc2CC1)[C@@H]1[C@H](C)NCCN1O  
C1[C@@H](Br)C(=O)N2[C@@H]3O[C@@H]([C@H]([C@H]3O)O)Cn3nnc1c23  
N1(C(=O)NC2=CN[C@@H]3NC=C[C@@H]3[C@@H]12)[C@@H]1[C@H](C)CCN(C1)C(=O)N(C)C  
C1[C@@H](Br)CC2=C(NC(=O)[C@H]3N2C(=O)NN3)C1.CC.N.C.N  
[C@@H]1(O[C@@H]2OC(C)(C)O[C@@H]2[C@H]2OC(C)(C)O[C@@H]12)[C@@H]1[C@H](C)(C(=O)N1)O  
CN1C(=O)C[C@@H]2[C@H](Br)CC[C@H]12.Nn1c(=O)[nH][nH]c1=O  
CN1C(=O)[C@H](NNC(=O)NN)C2=C1CC=C(C2)Br.CO  
C1=CC[C@]2([C@H](C1)[C@]1([C@H](N2O)CCc2nonc12)O)[NH]1CCOCC1  
C1C[C@@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@]2(CC1)N1CCOCC1)C=Cc1nonc31)O

SMILES-Notationen der Decoys für Macrosphelid B (Decoys der Diketone **45** und Ketole **5**):

C1C[C@@H]2[C@@]3([C@H](N(O)[C@@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
C1C[C@@H]2[C@@]3([C@H](N(O)[C@@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
Cc1nc2n(C)c(=O)[nH]c(=O)c2c(c1)C(=O)N1CC[C@@]2(OCCC2)CC1  
C[C@@H]1N[C@@H]2N(C)C(=O)NC(=O)C2=C(C1)C(=O)N1C[C@H]2[C@H]3O[C@H](CC3)[C@H]2C1  
C[C@@H]1N[C@@H]2N(C)C(=O)NC(=O)C2=C(C1)C(=O)N1C[C@H]2[C@H]3O[C@H](CC3)[C@H]2C1  
c1(cnc2n(C)c(=O)n(C)c(=O)c2c1)NC(=O)N1C[C@H](C)CCC1  
CN1C(=O)[C@@H]2CN(C(=O)[C@@H]3NNC(=O)[C@@H]4CCCC[C@@H]34)CCN2CC1  
CN1C(=O)[C@H]2CN(C(=O)[C@@H]3NNC(=O)[C@H]4CCCC[C@H]34)CCN2CC1  
C1C[C@@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCC4=NON[C@@H]4[C@@]3([C@@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C(=O)(N1CCN(C(=O)N2CCCCC2)CC1)[C@H]1CN[C@@H](N)C(=C1)[C@H](C)N  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@H]2C1)O)[NH]1CCOCC1  
C[NH]1c2cccc2CN(C(=O)C2=Cc3c(NC2)[nH]c(=O)[nH]c3=O)CC1  
C1C[C@@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)c1ccc2c(c1)OCCCC2  
C[C@H]1N2[C@@H]3ONC(=O)[C@H]3[C@H]([C@@H]3C[C@@H](F)[C@@H]([C@@H](OC1)[C@H]23)N1CCNCC1)O  
CN1C(=O)[C@@H]2CN(C(=O)[C@@H]3NNC(=O)c4cccc34)CCN2CC1  
CN1C(=O)[C@H]2CN(C(=O)[C@@H]3NNC(=O)c4cccc34)CCN2CC1  
C1C[C@@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCC4=NON[C@@H]4[C@@]3([C@@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C1[C@H](CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)C1)C(=O)N1CC[C@@]2(OC=CO2)CC1  
CN1C(=O)N[C@]2(CCN(C(=O)c3c(=O)oc4cccc4c3)CC2)C1=O  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCC4=NON[C@H]4[C@@]3([C@@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C1C[C@]2(N(O)[C@@H]3CCc4nonc4[C@@]3([C@H]2C1)O)N1CCOCC1

## 10. Durchführung der Computersimulationen

C[C@H]1N[C@H]2N(C)C(=O)NC(=O)C2=C(C1)C(=O)N1CC[C@@]2(OCCC2)CC1  
C1C[C@@]2(N(O)[C@@H]3CCC4=NON[C@H]4[C@@]3([C@H]2C1)O)N1CCOCC1  
C[C@@H]1N2[C@@H]3ONC(=O)[C@H]3[C@H]([C@@H]3C[C@@H](F)[C@@H]([C@@H](OC1)[C@H]23)N1CCNCC1)O  
C[NH]1c2ccccc2CN(C(=O)[C@@H]2CN[C@@H]3NC(=O)NC(=O)[C@@H]3C2)CC1  
CN1c2ccccc2CN(C(=O)C2=C[C@@H]3[C@@H](NC2)NC(=O)NC3=O)CC1  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)c1ccc2c(c1)OCCCO2  
[C@@H]12C[C@]31[C@@]1([C@]4([N@]2(O)[C@]24[C@@]3(C2)[NH]2CCOCC2)CCc2nonc12)O  
CC(=O)N1CCN(C(=O)Nc2cc3C(=O)N(C)C(=O)c3cc2)CC1  
C[C@H]1N2[C@@H]3ONC(=O)[C@H]3[C@H]([C@@H]3C[C@@H](F)[C@@H]([C@@H](OC1)[C@H]23)N1CCNCC1)O  
C[C@@H]1N2[C@@H]3ONC(=O)[C@H]3[C@H]([C@@H]3C[C@@H](F)[C@@H]([C@@H](OC1)[C@H]23)N1CCNCC1)O  
CN1C(=O)N(C)C(=O)[C@@H]2C[C@H]3CC(=O)Nc4cc(ccc4[C@H]3N[C@@H]12)OC  
CN1c2ccccc2CN(C(=O)[C@@H]2CN=C3NC(=O)NC(=O)[C@@H]3C2)CC1  
CN1C(=O)N(C)C(=O)[C@H]2N3CCCN([C@@H]3N[C@@H]12)[C@H]1CC[C@H](CC1)O  
CC1(C)OC2=C(Cc3c(C2)non3)[C@H]([C@@H]1O)N1C(=O)CC(=O)CC1  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1COc2ccccc2O1  
C[C@H]1N2[C@H]3ONC(=O)[C@@H]3[C@H]([C@H]3C[C@H](F)[C@H](C=C23)OC1)N1CCNCC1)O  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1COc2ccccc2O1  
C1C[C@@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCC1=NON[C@@H]31)O  
C[C@H]1C(=O)[C@H]2N3[C@]4(NC(=O)OC[C@H]4[C@H]2C(=O)[C@@H]1OC)[C@H]1N(C)[C@H]1C3  
CN1C(=O)N[C@@]2(CCN(C(=O)c3cc4OCOc4cc3)CC2)C1=O  
Cn1c(=O)n(C)c(=O)c2cc(cnc12)NC(=O)N1CCSCC1  
CN1C(=O)NC(=O)[C@H]2C[C@@H](C=N[C@@H]12)C(=O)N1c2cccnc2CCC1  
C[C@H]1N2c3o[nH]c(=O)c3C(=O)[C@H]3C[C@H](F)[C@H](C=C23)OC1)N1CCNCC1  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1COc2ccccc2O1  
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)[C@@H]1COc2ccccc2O1  
Cn1c(=O)n(C)c(=O)c2[C@@H](CC(=O)Nc12)c1cc2OCOc2cc1  
C1(=C2C3=C(C(=O)OCC3)C(=O)O[C@H]2[C@@H]2[C@@H]3[C@@H](O[C@H]2C1)O[C@@H](C3)O)OC  
C1C[C@@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O  
Cn1c(=O)[nH]c(=O)c2cc(cnc12)C(=O)N1c2cccnc2CCC1  
c1(c2c3CCOC(=O)c3c(=O)oc2c2[C@H]3[C@@H](Oc2c1)O[C@@H](C3)O)OC  
C1(=C2C3=C(C(=O)OCC3)C(=O)O[C@@H]2[C@@H]2[C@@H]3[C@@H](O[C@H]2C1)O[C@@H](C3)O)OC  
c1(c2c3CCOC(=O)c3c(=O)oc2c2[C@H]3[C@@H](Oc2c1)O[C@@H](C3)O)OC  
Cn1c(=O)n(C)c(=O)c2[C@@H](CC(=O)Nc12)c1cc2OCOc2cc1  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)C1=CC(=C2[C@@H](C1)OCO2)Cl  
C(=O)(N1CC[C@@]2(NC(=O)NC2=O)CC1)C1=CC(=C2[C@@H](C1)OCO2)Cl  
C1C[C@@H]2[C@@]3([C@H](N(O)[C@@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCC1=NON[C@@H]31)O

```

C(=O)(N[C@@H]1C=C2N(C)C(=O)CS[C@@H]2CC1)NC(=N)N(C)CCO
C[C@@H]1Nc2c(ncnc2S[C@H]2N(C)C(=O)N(C)C(=O)[C@@H]12)OC
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O
C[C@H]1Nc2c(ncnc2S[C@H]2N(C)C(=O)N(C)C(=O)[C@@H]12)OC
C[C@H]1NN[C@@H]2SC[C@@H](NN2C1=O)c1cc2NC(=O)COc2cc1
CN1NC[C@H]2[C@@H]3NC(=NN3CN[C@@H]12)[C@H]1NNC[C@H]1Br
CN1N=C[C@@H]2[C@H]3NC(=NN3CN[C@H]12)[C@@H]1NNC[C@@H]1Br
CN1N=C[C@@H]2[C@H]3NC(=NN3CN[C@H]12)[C@H]1NNC[C@H]1Br
C(=O)(N1CCN(C(=O)N2CCCCC2)CC1)c1ccc2c(c1)nn[nH]2
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@]2(CC1)[NH]1CCOCC1)CCc1nonc31)O
C1C[C@H]2[C@]3([C@@H](N(O)[C@@]2(CC1)N1CCOCC1)CCc1nonc31)O
C1[C@H](CC[C@]2(NC(=O)NC2=O)C1)C(=O)N1CC[C@@]2(OC=CO2)CC1
[C@@H]12C[C@]31[C@@]1([C@H](CCc4nonc14)[C@@]1(N2O)[C@@]3(C1)N1CCOCC1)O

```

Die Dateien mit den Decoy-Strukturen wurden im 2D-sdf-Format heruntergeladen. Mit Chem3D Pro 11.0 wurden daraus 3D-Koordinaten generiert und diese Strukturen anschließend mit MM2 minimiert. Die optimierten Geometrien wurden im 3D-sdf-Format gespeichert und anschließend mit OpenBabel ins pdbqt-Format überführt. Für jede Decoy-Bibliothek wurde ein separates Verzeichnis angelegt, und die Liganden wurden fortlaufend durchnummeriert, sodass alle Dateien den Namen „ligand1.pdbqt“, „ligand2.pdbqt“ etc. tragen.

## 10. 2. Vorbereitung der Koordinaten-Dateien der Kandidaten

Die eigentlichen Kandidaten für das virtuelle Screening, d. h. die Macrosphehid-Analoga, wurden als ChemDraw-Strukturen erstellt, mit Chem3D Pro 11.0 MM2-minimiert (analog wie bei den Decoys) und die 3D-Strukturen als mol2-Dateien gespeichert. Anschließend wurden die Strukturen mit AutoDockTools (ergänzende Software zu AutoDock und Vina, basierend auf Python) ins pdbqt-Format überführt. Macrosphehid-Derivate, deren Affinitäten mit derselben Decoy-Bibliothek normalisiert wurden, wurden in dasselbe Verzeichnis gespeichert (d. h. ein Verzeichnis für die 32 Dirole **4** und ein Verzeichnis für die Ketole **5** sowie die Diketone **45**). So wie die Decoys wurden alle Kandidaten innerhalb eines Verzeichnisses in ihren Dateinamen fortlaufend durchnummeriert (ligand1.pdbqt, ligand2.pdbqt, etc.).



### 10. 3. Durchführung der Dockings

Die Rezeptor-Datei für Tubulin wurde aus der Proteindatenbank heruntergeladen (pdb.org; PDB-ID: 1tvk). Zunächst wurden aus der pdb-Datei sämtliche an das Protein gebundene Moleküle (Epothilon A, GDP, GTP) manuell entfernt. Mit AutoDockTools wurden dann H-Atome zugefügt und die Proteinstruktur anschließend ins pdbqt-Format überführt. Dabei wurden zwei Rezeptor-Dateien erzeugt, von denen eine den rigiden Teil der Proteinstruktur enthält und die andere den flexiblen Teil (d. h. His227, beide Rotationen aktiv). Die Dateien wurden entsprechend „1TVK\_rigid.pdbqt“ und „1TVK\_flex.pdbqt“ benannt.

Der Suchraum wurde zunächst weiträumig auf die  $\beta$ -Kette des Proteins gelegt, um die Bindungsregion vorherzusagen (Abschn. 4. 2. 1.). Für das virtuelle Screening wurde der Suchraum dann auf die Paclitaxel-Domäne reduziert, um den Rechenaufwand zu minimieren. Es wurde eine Konfigurationsdatei für Vina erstellt, die „config.txt“ benannt wurde. Diese Datei beinhaltet:

```
receptor = 1TVK_rigid.pdbqt
flex = 1TVK_flex.pdbqt
center_x = -2
center_y = -17
center_z = 13
size_x = 26
size_y = 24
size_z = 26
```

Für das virtuelle Screening wurde Vina innerhalb des jeweiligen Verzeichnisses für jeden Liganden durch ein Shell-Skript aufgerufen. Dieses Skript beinhaltet:

```
#!/bin/bash
for f in ligand*.pdbqt; do
    b='basename $f .pdbqt'
    echo Processing ligand $b
    vina --config config.txt --ligand ligand $f --log result_.$b.txt
done
```

Zu jedem Ligand X wird so eine Ergebnisdatei „result\_ligandX.txt“ erstellt, die die Affinitäten enthält und später vom auswertenden Programm als ASCII-Datei eingelesen werden kann.

## 10. 4. Automatische Auswertung der Dockings

Um die Ergebnisse der Dockings nicht alle manuell auswerten zu müssen, wurden zur Berechnung der p-Werte und der Distanzen zum M-Loop Programme in BASIC geschrieben, deren Quelltexte im Folgenden gezeigt werden. Zur Kompilierung der Quelltexte wurde der FreeBasic Compiler verwendet.

Damit die Programme richtig funktionieren, müssen die Vina Ergebnisdateien (sowohl \*\_out.pdbqt als auch result\_ligand\*.txt) der Liganden fortlaufend durchnummeriert sein. Die Docking-Dateien einer Decoy-Bibliothek müssen in einem Verzeichnis sein.

### 10. 4. 1. Programm zur Berechnung der p-Werte

```
dim i as integer
dim j as integer
dim decoyScore(200) as single
dim ligandScore as single
dim p as single
dim summe as single
dim decoy as string
dim cand as string
dim outfile as string
dim user as string
dim zeile as string
dim comment as string
dim position as integer
dim numLigands as integer
dim numDecoys as integer
numDecoys=1
numLigands=1

rem Benutzereingaben anfordern:
color 10,0
cls
print ""
print ""
print "  SCORE NORMALIZATION TOOL"
print "  ~~~~~"
print ""
print ""
print ""
print " Who are you (operator name)?"
input user
print ""
print " Hello "+user+", you can enter a comment (hit ENTER to skip this)"
input comment
print ""
print " Enter the path to the directory containing the decoy docking results:"
input decoy
print ""
print " Enter the path to the directory containing the candidates docking results:"
input cand

outfile=cand+"/p-values.txt"
```

```
color 10,0
cls
print ""
print ""
print "  SCORE NORMALIZATION TOOL"
print "  ~~~~~"
print ""
print " Reading decoy scores..."

rem Decoy-Scores einlesen und in Array decoyScore schreiben:

for i=1 to 500

  if open(decoy+"/result_ligand"+str$(i)+".txt" for input as #1)=0 then

    do
      line input #1, zeile
      if zeile="Reading input ... " then
        exit do
      end if
    loop until mid$(zeile,1,3)="---"

    if zeile<>"Reading input ... " then

      line input #1, zeile
      for j=1 to 50
        if mid$(zeile,j,1)="-" then
          position=j
          exit for
        end if
      next j
      decoyScore(numDecoys)=val(mid$(zeile,(position+1),4))
      numDecoys=numDecoys+1

    end if

    close #1

  end if
  sleep 1

next i

print "          ...done."
print ""
print ""
print " Detecting number of candidates..."

rem Anzahl der gedockten Liganden ermitteln:

do while open(cand+"/result_ligand"+str$(numLigands)+".txt" for input as #1)=0

  numLigands=numLigands+1
  close #1
  sleep 1
```

```

loop

print "                ...done."
print ""
print ""
print " Calculating p-values..."

rem Liganden-Scores einlesen, p-Wert berechnen und in Datei schreiben:

open outfile for append as #1
print #1, ""
print #1, ""
print #1, "          VIRTUAL SCREENING RESULTS"
print #1, " ~~~~~"
print #1, ""
print #1, date$
print #1, time$
print #1, ""
print #1, " Operator: "+user
print #1, ""
print #1, " Comment: "+comment
print #1, ""
print #1, ""
print #1, "  p-values:"
print #1, "  -----"
print #1, ""
print #1, ""
close #1

open outfile for append as #2

for i=1 to numLigands

  print "present candidate: "+str$(i)
  summe=0
  if open(cand+"/result_ligand"+str$(i)+".txt" for input as #1)=0 then

    do
      line input #1, zeile
      if zeile="Reading input ... " then
        exit do
      end if
      loop until mid$(zeile,1,3)="---"

    if zeile<>"Reading input ... " then

      line input #1, zeile
      for j=1 to 50
        if mid$(zeile,j,1)="-" then
          position=j
          exit for
        end if
      next j
      ligandScore=val(mid$(zeile,(position+1),4))

      for j=1 to numDecoys

        if ligandScore>=decoyScore(j) then

```

```
        summe=summe+1

        end if
        sleep 1

    next j

    p=1-(summe/numDecoys)

    print #2, "Candidate "+str$(i)+": "+str$(p)

end if
close #1

end if
sleep 1

next i

close #2

print "                ...done."
print ""
print ""
print " Output was written to "+cand+"/p-values.txt"
print ""
print ""
print "                FINISHED! "
```

### 10. 4. 2. Programm zur Berechnung der Distanzen zum M-Loop

Folgendes Programm berechnet von *jedem* Atom eines gedockten Liganden jeweils den Abstand zu *jedem* Atom einer Region des Proteins. Diese Region muss in der Datei „region.pdbqt“ gespeichert sein; hierzu können aus der pdbqt-Datei des Proteins beliebige Zeilen (=Atome) kopiert werden. „region.pdbqt“ muss lediglich valide Zeilen im pdbqt-Format enthalten und mit „EOF“ in der letzten Zeile enden. Die Atome in „region.pdbqt“ müssen keine zusammenhängende Aminosäuresequenz wiedergeben.

Wenn bei einem Ligand ein Atom gefunden wird, das zu *irgendeinem* Atom der Datei „region.pdbqt“ einen Abstand hat, der kleiner als der festgelegte Grenzwert ist, wird die pdbqt-Datei dieses Liganden in das Verzeichnis „positives“ kopiert. Zu beachten ist, dass der Prozedur lediglich eine Abstandsmessung unterliegt, das Programm überprüft etwa nicht, ob auch wirklich eine gute Wechselwirkung (z. B. im Sinne einer H-Brücke) möglich ist. Die Möglichkeit der Ausbildung einer H-Brücke muss also manuell überprüft werden durch Sichtung des Dockings im 3D-Molekülbetrachter. Für alle drei positiven Vorhersagen (vgl. Abschn. 4. 5.) sind H-Brücken innerhalb des maximal erlaubten Abstands von 2.4 Å denkbar.

## 10. Durchführung der Computersimulationen

---

```
rem (DON'T CHANGE ANYTHING HERE UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING!)
rem Variablen deklarieren

dim i as integer
dim j as integer
dim zeile as string
dim x as single
dim y as single
dim z as single
dim numRefAtoms as integer
dim refX() as single
dim refY() as single
dim refZ() as single
dim distance as single
dim maxDistance as single
dim k as integer
dim zeile1 as string
dim checkpoint as integer

shell "rm bestmode*.pdbqt"

k=1

do

    if open("ligand"+str$(k)+"_out.pdbqt" for input as #1)<>0 then
        exit do
    end if
    open "ligand"+str$(k)+"_out.pdbqt" for input as #1
    open "bestmode"+str$(k)+"_pdbqt" for output as #2
    line input #1, zeile1
    do
        line input #1, zeile1
        print #2, zeile1
    loop until mid$(zeile1, 1, 7)="TORSDOF"
    close #1
    close #2
    k=k+1

loop

rem Benutzerinteraktion

color 10, 0
cls
print ""
print ""
print ""
print "    Refine Vina Screening"
print "#####"
print ""
print ""
print ""
print ""
print "    A FEW THINGS TO CHECK FIRST:"
print ""
print " Make sure that all Vina output files are named 'ligandX_out.pdbqt' with"
print " 'X' being an integer number (not zero!)."
```

```

print ""
print " Make sure that the file 'region.pdbqt' contains only valid pdbqt-lines from"
print " a valid receptor pdbqt-file describing the desired binding region for active"
print " ligands. The last line of this file must be 'EOF'."
print ""
print " Make sure that all required files are in the directory from which you are"
print " running this program."
print ""
print " everything ok so far? then HIT ANY KEY..."
do
loop while inkey$=""

color 10, 0
cls
print ""
print ""
print ""
print "   R e f i n e   V i n a   S c r e e n i n g"
print "#####"
print ""
print ""
print " Enter the MAXIMAL ALLOWED DISTANCE to the binding region:"
print ""
print " (i. e. to any atom within the binding region you defined;"
print " if you don't know what to do try '3.0' or lower for a good"
print " interaction, e. g. a hydrogen bond."
print ""
input maxDistance
color 10, 0
cls

rem (DON'T CHANGE ANYTHING HERE UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING!)
rem 'numRefAtoms' bestimmen und Koordinaten der Atome der Bindungsregion einlesen und in Datenfeldern
speichern

open "region.pdbqt" for input as #2

do

    line input #2, zeile
    if mid$(zeile, 1, 3)="EOF" then
        exit do
    end if
    numRefAtoms=numRefAtoms+1
    sleep 1

loop

redim RefX(numRefAtoms)
redim RefY(numRefAtoms)
redim RefZ(numRefAtoms)

close #2
sleep 5

open "region.pdbqt" for input as #2

for j=1 to numRefAtoms

```

```

line input #2, zeile
RefX(j)=val(mid$(zeile, 32, 7))
RefY(j)=val(mid$(zeile, 40, 7))
RefZ(j)=val(mid$(zeile, 48, 7))
sleep 1

next j

close #2

rem Von jedem Kandidaten den besten Docking-Modus auslesen und kleinsten Abstand zu den Bezugsatomen
berechnen

i=1

do

  if open("bestmode"+str$(i)+".pdbqt" for input as #1)<>0 then
    exit do
  end if

  open "bestmode"+str$(i)+".pdbqt" for input as #1

  do

    line input #1, zeile

    if mid$(zeile, 1, 4)="ATOM" then

      x=val(mid$(zeile, 32, 7))
      y=val(mid$(zeile, 40, 7))
      z=val(mid$(zeile, 48, 7))

      for j=1 to numRefAtoms

        distance=((refX(j)-x)^2+(refY(j)-y)^2+(refZ(j)-z)^2)^(1/2)

        if distance<=maxDistance then
          color 10, 0
          print "candidate number: "+str$(i)+" --- in region.pdbqt line number:
"+str$(j)+" --- distance: "+str$(distance)
          checkpoint=1
          exit for
        end if

      next j

    end if

  loop until mid$(zeile, 1, 7)="TORSDOF"

close #1

if checkpoint=0 then
  shell "rm bestmode"+str$(i)+".pdbqt"
end if

```



```
checkpoint=0

i=i+1
loop

shell "mkdir positives"
sleep 5
shell "mv bestmode*.pdbqt positives"

color 10, 0
print ""
print " HIT ANY KEY ... "

rem Benutzerinteraktion

do
loop while inkey$=""
color 10, 0
cls
color 10, 0
print "  R e f i n e  V i n a  S c r e e n i n g "
print "#####"
print ""
print ""
print " Your predicted positives (if there are any) were saved"
print ""
print " into 'positives' and can be viewed with any molviewer."
print ""
print " As maximal allowed distance you chose: "+str$(maxDistance)
print ""
print " HIT ANY KEY..."
do
loop while inkey$=""
cls
```

## 11. Durchführung der Proteinassays

### 11. 1. Vorbereitung der Proben

Alle Proben wurden in trockenem DMSO gelöst. Die Probenkonzentration betrug 2 mM. Im Falle eines Diastereomeregemisches wurde die Konzentration proportional angepasst, d. h. bei einem Gemisch aus vier Komponenten wurde die Konzentration auf 8 mM, bei 16 Komponenten auf 32 mM erhöht.

Die Probenlösungen in DMSO wurden dann 10fach mit Wasser verdünnt und die verdünnten Proben mindestens eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um ausreichende Homogenisierung zu gewährleisten. Von diesen wässrigen Lösungen wurden jeweils 10 µL verwendet.

### 11. 2. Durchführung des Assays

4 mg Tubulin (>97 %, mindestens 8 U) werden mit 1 mL eiskaltem Puffer (80 mM PIPES pH 6.9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP) versetzt und 3 min. lang auf Eis inkubiert, um das Protein vollständig zu lösen. Auf eine 96 Well Half Area Mikroplatte werden die wässrigen Probelösungen (jeweils 10 µL pro Well) und zwei Minuskontrollen (d. h. jeweils 10 µL Puffer) gegeben und im 30 min. lang vorgeheizten Microtiterreader (37 °C) 2 min. lang inkubiert.

Die Tubulinpolymerisation wird gestartet durch Zugabe der (eiskalten) gepufferten Tubulinlösung (100 µL pro Well) auf die 37 °C warme Mikroplatte. Beim Pipettieren der Tubulinlösung muss darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen im Well bilden. Das Pipettieren sollte möglichst schnell erfolgen, da sonst der Beginn der Polymerisation verpasst wird.

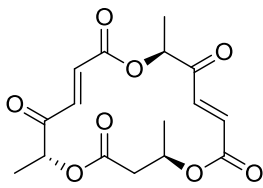
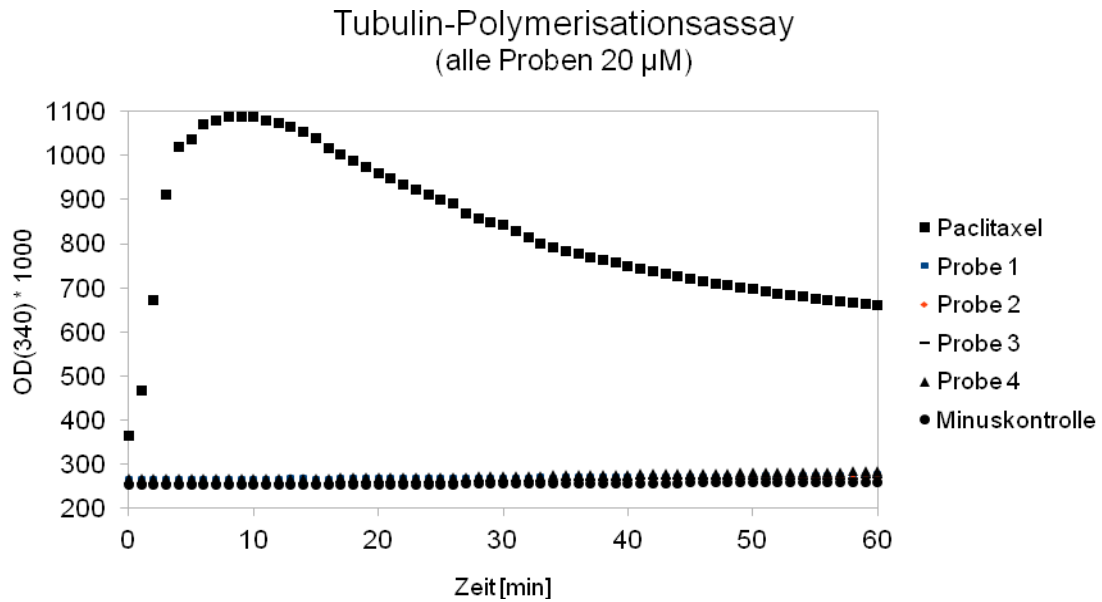
Die Polymerisation wird über 60 min. bei 37 °C (Temperaturschwankungen vermeiden!) verfolgt. Dabei wird in Intervallen von jeweils 1 min. die optische Dichte bei 340 nm gemessen. Geschüttelt wird 5 Sekunden orbital nur zu Beginn der Messung.

### 11. 3. Messkurven der nicht aktiven Kandidaten

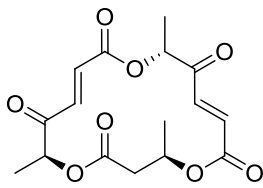
Im Folgenden sind die Messkurven aller Proben, die keinen Einfluss auf die Tubulinpolymerisation haben, gezeigt. Als Positivkontrolle wird die Polymerisationskurve in

## 11. Durchführung der Proteinassays

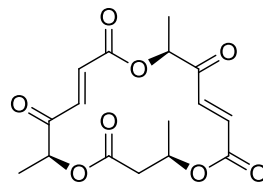
Gegenwart von Paclitaxel gegenübergestellt. Alle Messkurven sind praktisch mit der Minuskontrolle identisch.



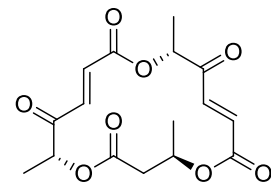
(5R,9R,15S)-45  
Probe 1



(5S,9R,15R)-45  
Probe 2

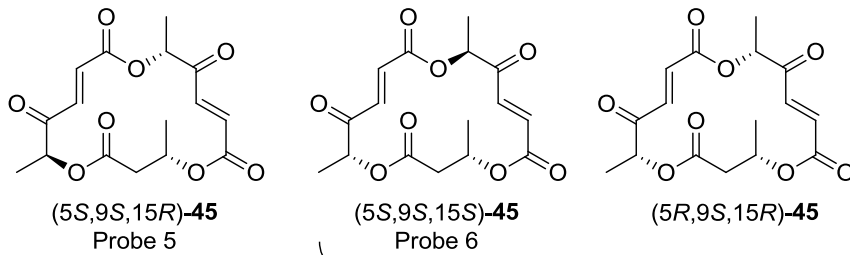
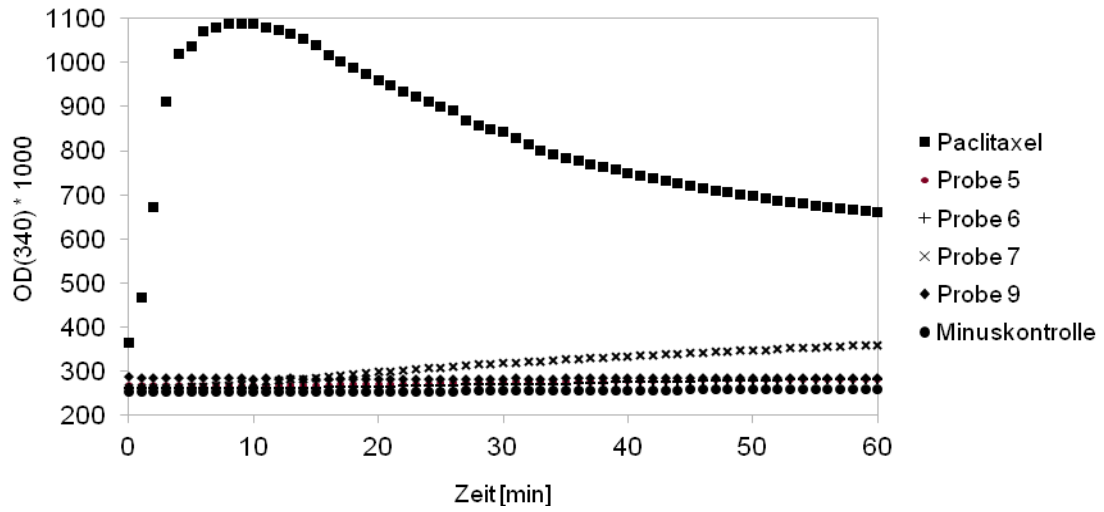


(5S,9R,15S)-45  
Probe 3

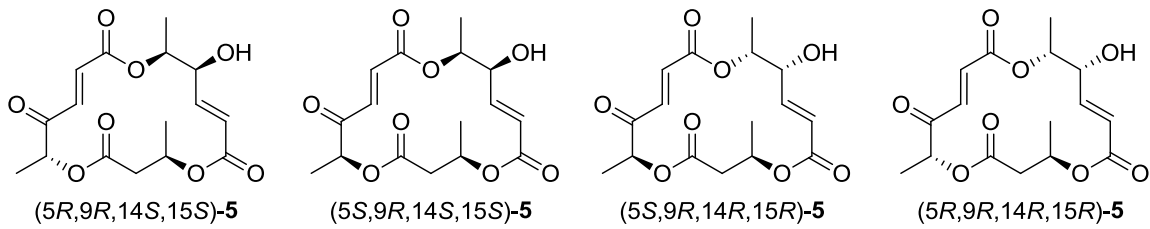


(5R,9R,15R)-45  
Probe 4

Tubulin-Polymerisationsassay  
(alle Proben 20  $\mu$ M)

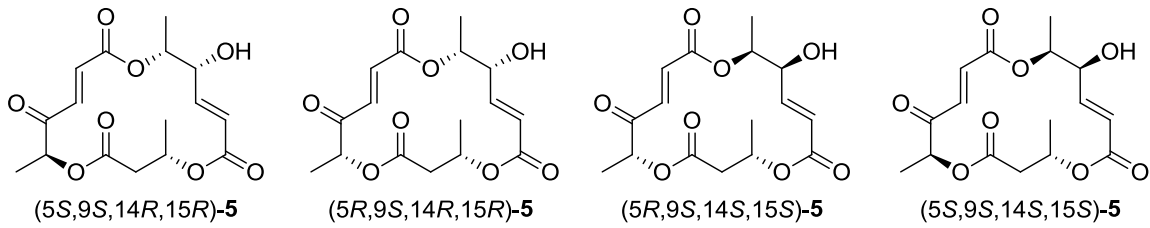
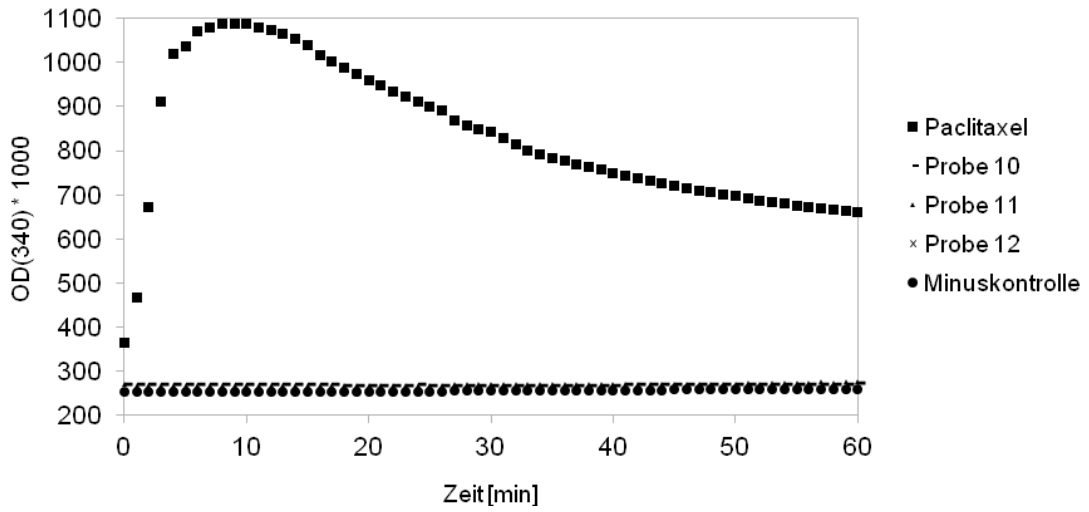


Probe 7  
(1:1 Gemisch)

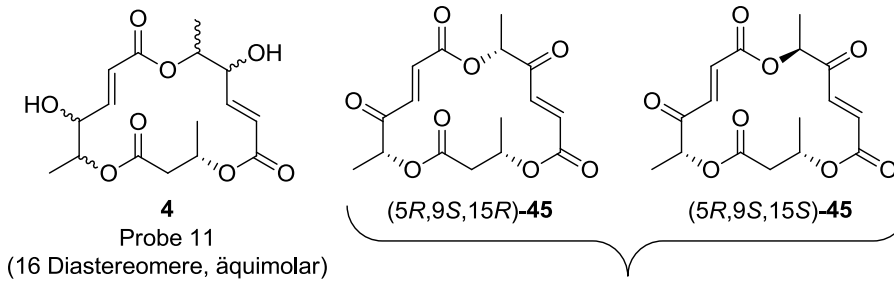


Probe 9  
(1:1:1:1 Gemisch)

Tubulin-Polymerisationsassay  
(alle Proben 20 µM)

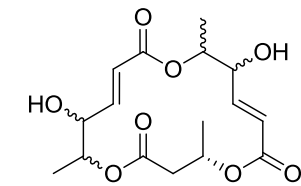
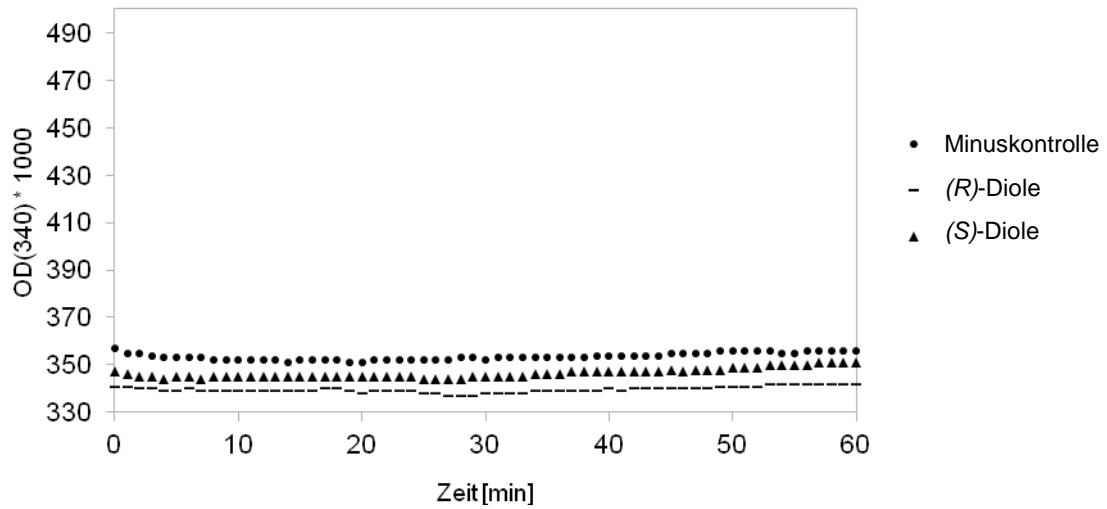


Probe 10  
(1:1:1:1 Gemisch)



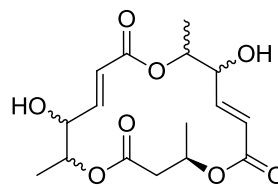
Probe 12  
(2:1 Gemisch)

Tubulin-Polymerisationsassay  
(alle Proben 20  $\mu$ M)



(9S)-4  
(S)-Dirole

(16 Diastereomere, äquimolar)

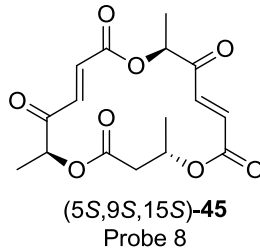
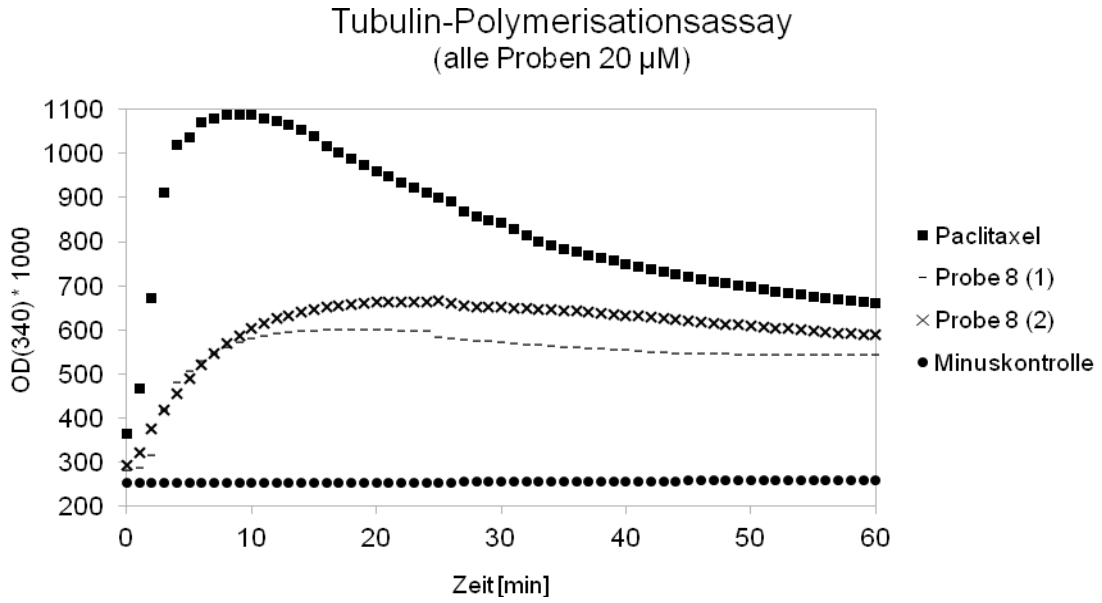


(9R)-4  
(R)-Dirole

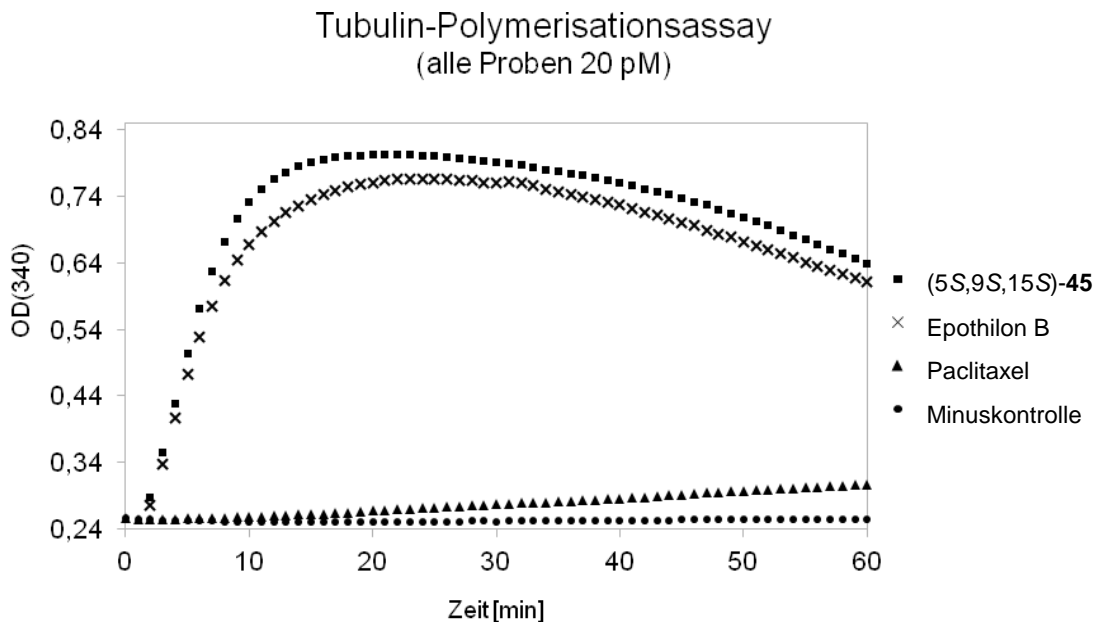
(16 Diastereomere, äquimolar)

11. 4. Messkurven des aktiven Kandidaten

Folgende Abbildung zeigt die Tubulinpolymerisation in Gegenwart des einzigen aktiven Kandidaten. Die Messung wurde zweimal durchgeführt.



Die Probenkonzentration wurde dann auf 20 pM verringert und es wurden folgende Messkurven erhalten:



### 11. 5. Rohdaten der Polymerisationsassays

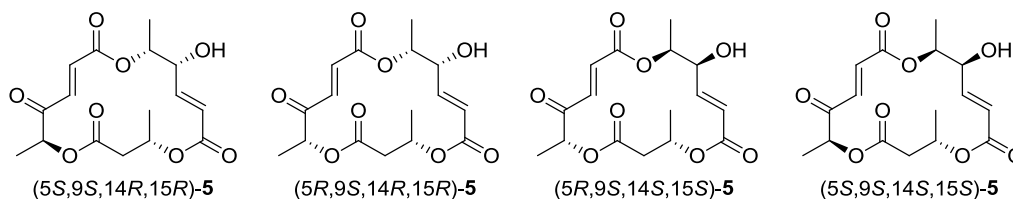
#### Minuskontrolle

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	-1	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-3	-3	-4	-3	-4	-3	-4

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-3	-4	-4

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
-4	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3

53	54	55	56	57	58	59	60
-3	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-2



äquimolares Gemisch

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2

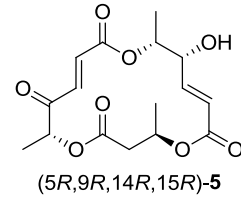
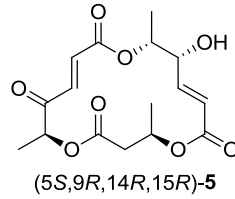
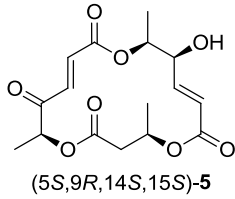
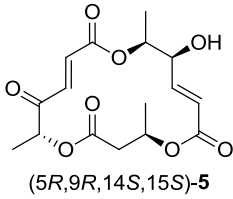
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
-2	-2	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0

53	54	55	56	57	58	59	60
0	0	0	0	0	0	0	1



# 11. Durchführung der Proteinassays



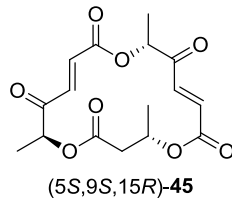
äquimolares Gemisch

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-3	-2	-2	-2	-2	-3	-2

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
-2	-3	-3	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-1	-2	-1	-2	-2

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
-2	-2	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	2

53	54	55	56	57	58	59	60
2	2	1	2	2	2	3	3



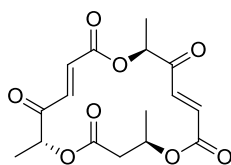
<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	1	2	2	3	3	3	3	4	4	5	5	5	6	6	7	7	7	7

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
8	8	8	9	9	10	11	11	12	12	13	13	13	13	13	14	14	15	15

53	54	55	56	57	58	59	60
15	15	15	15	15	15	15	15

## 11. Durchführung der Proteinassays



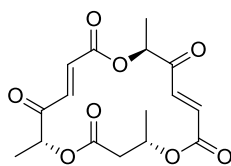
(5R,9R,15S)-45

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	7	6

53	54	55	56	57	58	59	60
6	7	7	7	7	8	8	9



(5R,9S,15S)-45

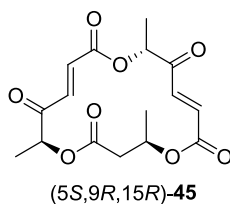
<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	1	1

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	2	2	3	3	3	4	5	5	6	7	7	8	8	8	9	10	10	10

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
10	10	11	11	12	13	13	14	14	14	15	15	16	16	17	17	17	18	18

53	54	55	56	57	58	59	60
19	19	19	19	19	20	20	20

## 11. Durchführung der Proteinassays

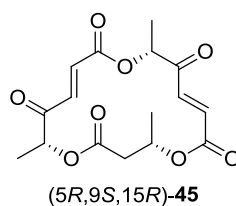


<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
5	5	6	5	5	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	8	8	8

53	54	55	56	57	58	59	60
8	9	9	10	10	10	10	10



<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

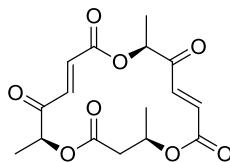
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4

53	54	55	56	57	58	59	60
5	5	5	5	5	5	5	5

Eine Mischung von (5R, 9S,15R)-45 und (5R, 9S,15S)-45 (2.3:1) wurde gemessen; als Kontroll-experiment auch eine äquimolare Mischung beider Diastereomere, das vergleichbare Ergebnisse zeigte.

## 11. Durchführung der Proteinassays



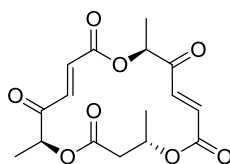
(5S,9R,15S)-45

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
0	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	5	5	5	6	6

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
6	7	7	8	8	9	9	10	10	10	11	11	11	11	10	10	11	12	12

53	54	55	56	57	58	59	60
12	12	12	12	12	12	13	14



(5S,9S,15S)-45

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000<sup>1</sup></b>	0	5	34	136	199	225	247	266	280	290	299	305	310	314	316
<b>OD(340) * 1000<sup>2</sup></b>	0	20	72	139	214	289	357	413	457	491	517	537	552	562	571

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
318	319	319	319	319	319	319	318	317	317	303	300	297	295	293	290	288	286	284
576	581	584	586	587	588	588	588	588	587	586	585	583	581	579	577	574	572	569

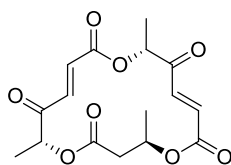
34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
282	280	279	277	276	274	273	271	269	267	266	265	264	264	264	263	263	263	262
566	563	560	557	553	549	545	541	537	533	528	522	517	512	506	500	494	488	481

53	54	55	56	57	58	59	60
263	262	262	262	262	262	262	263
475	467	461	453	446	439	432	424

<sup>1</sup> Konzentration: 20 µM

<sup>2</sup> Konzentration: 20 pM

## 11. Durchführung der Proteinassays



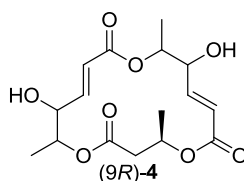
(5R,9R,15R)-45

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
7	7	8	8	8	9	9	10	10	10	11	11	12	12	12	13	13	14	14

53	54	55	56	57	58	59	60
15	15	15	15	15	16	17	17



(9R)-4

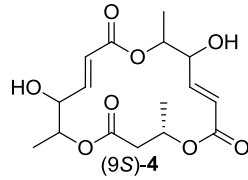
<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	0	-1	-1	-2	-2	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
-2	-2	-1	-1	-2	-3	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-4	-4	-4	-3	-3	-3	-3

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
-2	-2	-2	-2	-2	-2	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0

53	54	55	56	57	58	59	60
1	1	1	1	1	1	1	1

## 11. Durchführung der Proteinassays



<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	-1	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-3	-3	-2	-2	-2	-2	-2

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	2	2	2

53	54	55	56	57	58	59	60
3	3	3	3	4	4	4	4

### Epothilon B (20 pM)

<b>Zeit [min]</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>OD(340) * 1000</b>	0	11	57	119	188	254	310	357	395	425	449	469	484	497	507

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
516	524	530	535	539	542	545	547	547	548	548	547	546	545	542	542	543	541	537

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
533	529	525	520	516	512	508	503	498	493	488	482	477	471	465	460	453	447	441

53	54	55	56	57	58	59	60
435	429	422	416	410	404	398	393

## 11. Durchführung der Proteinassays

---

### Paclitaxel

Zeit [min]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
OD(340) * 1000 <sup>1</sup>	0	102	308	547	655	671	706	715	724	724	722	714	708	699	689
OD(340) * 1000 <sup>2</sup>	0	-1	-1	-1	-1	0	0	1	1	2	3	3	4	5	6

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
675	652	638	623	609	596	583	570	557	546	534	525	504	493	484	479	465	448	434
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	23

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
426	418	411	404	397	391	384	378	372	366	361	355	350	345	340	335	331	326	322
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	35	36	37	38	39	40	41	42	43

53	54	55	56	57	58	59	60
318	314	311	307	304	301	298	296
44	45	46	47	48	49	50	51

<sup>1</sup> Konzentration: 20 µM

<sup>2</sup> Konzentration: 20 pM

## 12. Literaturverzeichnis

1. Johnson, I. S., Armstrong, J. G., Gorman, M. & Burnett, J. P. The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents. *Cancer Res* **23**, 1390–1427 (1963).
2. Höfle, G. *et al.* Epothilon A und B – neuartige, 16gliedrige Makrolide mit cytotoxischer Wirkung: Isolierung, Struktur im Kristall und Konformation in Lösung. *Angewandte Chemie* **108**, 1671–1673 (1996).
3. Miller, R. W. A Brief Survey of Taxus Alkaloids and Other Taxane Derivatives. *J. Nat. Prod.* **43**, 425–437 (1980).
4. Firn, R. D. & Jones, C. G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 382–391 (2003).
5. Fischbach, M. A. & Clardy, J. One pathway, many products. *Nature Chemical Biology* **3**, 353–355 (2007).
6. Walters, W. P., Stahl, M. T. & Murcko, M. A. Virtual screening—an overview. *Drug Discovery Today* **3**, 160–178 (1998).
7. McInnes, C. Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 494–502 (2007).
8. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 935–949 (2004).
9. Eckert, H. & Bajorath, J. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug Discovery Today* **12**, 225–233 (2007).
10. Ji, Z. *et al.* Exploration of diverse hinge-binding scaffolds for selective Aurora kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 4528–4531 (2012).
11. Jänne, P. A., Gray, N. & Settleman, J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 709–723 (2009).
12. Forli, S. & Botta, M. Lennard-Jones Potential and Dummy Atom Settings to Overcome the AUTODOCK Limitation in Treating Flexible Ring Systems. *J. Chem. Inf. Model.* **47**, 1481–1492 (2007).
13. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785–2791 (2009).
14. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **31**, 455–461 (2010).
15. Koes, D. R. & Camacho, C. J. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Research* **40**, W409–W414 (2012).
16. Bernstein, F. C. *et al.* The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **185**, 584–591 (1978).
17. Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* **45**, 177–182 (2005).
18. Lahana How many leads from HTS? *Drug Discov. Today* **4**, 447–448 (1999).
19. Leach & Hann The in silico world of virtual libraries. *Drug Discov. Today* **5**, 326–336 (2000).
20. Clardy, J. & Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature* **432**, 829–837 (2004).



21. Feher, M. & Schmidt, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci* **43**, 218–227 (2003).
22. Brohm, D. *et al.* Natural products are biologically validated starting points in structural space for compound library development: solid-phase synthesis of dysidiolide-derived phosphatase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 307–311 (2002).
23. Harvey, A. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* **13**, 894–901 (2008).
24. Hayashi, M. *et al.* Macrospheptide, a novel inhibitor of cell-cell adhesion molecule. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **48**, 1435–1439 (1995).
25. Takamatsu, S. *et al.* Macrospheptide, a novel inhibitor of cell-cell adhesion molecule. II. Physicochemical properties and structural elucidation. *J. Antibiot.* **49**, 95–98 (1996).
26. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D. & Camphausen, R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* **103**, 467–479 (2000).
27. Kannagi, R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* **30**, 189–209 (2007).
28. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K. & Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* **95**, 377–384 (2004).
29. Fukami, A., Iijima, K., Hayashi, M., Komiyama, K. & Omura, S. Macrospheptide B suppressed metastasis through inhibition of adhesion of sLe(x)/E-selectin molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 1065–1070 (2002).
30. Ahmed, K. *et al.* Rapid and transient intracellular oxidative stress due to novel macrospheptides trigger apoptosis via Fas/caspase-8-dependent pathway in human lymphoma U937 cells. *Chemico-Biological Interactions* **170**, 86–99 (2007).
31. Matsuya, Y. *et al.* Synthesis of Macrospheptides with a Thiazole Side Chain: New Antitumor Candidates Having Apoptosis-Inducing Property. *Org. Lett.* **8**, 4609–4612 (2006).
32. Paek, S.-M. *et al.* Concise Syntheses of (+)-Macrospheptides A and B: Studies on the Macro-Ring Closure Strategy. *J. Org. Chem.* **74**, 554–561 (2009).
33. Paek, S.-M. & Suh, Y.-G. Synthetic studies on bioactive natural polyketides: intramolecular nitrile oxide-olefin cycloaddition approach for construction of a macrolactone skeleton of macrospheptide B. *Molecules* **16**, 4850–4860 (2011).
34. Takahashi, T., Kusaka, S., Doi, T., Sunazuka, T. & Ōmura, S. A Combinatorial Synthesis of a Macrospheptide Library Utilizing a Palladium-Catalyzed Carbonylation on a Polymer Support. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 5230–5234 (2003).
35. Matsuya, Y. *et al.* Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Artificial Macrospheptides in the Search for New Apoptosis-Inducing Agents. *Chemistry – A European Journal* **15**, 5799–5813 (2009).
36. Sunazuka, T. *et al.* Relative and Absolute Stereochemistries and Total Synthesis of (+)-Macrospheptides A and B, Potent, Orally Bioavailable Inhibitors of Cell–Cell Adhesion. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 10247–10248 (1997).
37. Kawaguchi, T., Funamori, N., Matsuya, Y. & Nemoto, H. Total Synthesis of Macrospheptides A, B, and E: First Application of Ring-Closing Metathesis for Macrospheptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **69**, 505–509 (2004).

38. Sharma, G. V. M. & Veera Babu, K. RCM mediated synthesis of macrospheptides I and G. *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 2175–2184 (2007).
39. Kobayashi, Y. *et al.* Furan ring oxidation strategy for the synthesis of macrospheptides A and B. *J. Org. Chem.* **66**, 2011–2018 (2001).
40. Prasad, K. R. & Gutala, P. Enantioselective total synthesis of macrospheptides A and E. *Tetrahedron* **67**, 4514–4520 (2011).
41. Sharma, G. V. M. & Reddy, P. S. Total Synthesis of Macrospheptide M from Diacetone Glucose. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, 2414–2421 (2012).
42. Kusaka, S., Dohi, S., Doi, T. & Takahashi, T. Total synthesis of macrospheptide A by way of palladium-catalyzed carbonylative esterification. *Tetrahedron Letters* **44**, 8857–8859 (2003).
43. Curran, D. P., Sinha, M. K., Zhang, K., Sabatini, J. J. & Cho, D.-H. Binary fluorine tagging enables the synthesis and separation of a 16-stereoisomer library of macrospheptides. *Nature Chemistry* **4**, 124–129 (2012).
44. Ishihara, K. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Macrospheptide Cores. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, 3973–3978 (2004).
45. Kobayashi, Y. & Wang, Y.-G. Synthesis of macrospheptides H and G. *Tetrahedron Letters* **43**, 4381–4384 (2002).
46. Sharma, G. V. M. & Mouli, C. C. The total synthesis of macrospheptides A and E from carbohydrate precursors. *Tetrahedron Letters* **43**, 9159–9161 (2002).
47. Matsuya, Y., Kawaguchi, T. & Nemoto, H. New strategy for the total synthesis of macrospheptides A and B based on ring-closing metathesis. *Org. Lett.* **5**, 2939–2941 (2003).
48. Chakraborty, T. K., Purkait, S. & Das, S. Synthesis of chiral 4-hydroxy-2,3-unsaturated carbonyl compounds from 3,4-epoxy alcohols by oxidation: application in the formal synthesis of macrospheptide A. *Tetrahedron* **59**, 9127–9135 (2003).
49. Kobayashi, Y. & Acharya, H. P. First total synthesis of macrospheptides C and F. *Tetrahedron Letters* **42**, 2817–2820 (2001).
50. Nakamura, H., Ono, M., Shida, Y. & Akita, H. New total syntheses of (+)-macrospheptides C, F and G. *Tetrahedron: Asymmetry* **13**, 705–713 (2002).
51. Yun, H. *et al.* First total syntheses of (-)-macrospheptides J and K and elucidation of their absolute configuration. *Chem. Commun. (Camb.)* 2463–2465 (2009).doi:10.1039/b817693k
52. Y, M., K, I., N, F., T, K. & H, N. PREPARATION AND DERIVATIZATION OF THE CORE COMPOUND OF MACROSPHEPTIDE E-G SERIES. *Heterocycles* at <<http://sciencelinks.jp/j-east/article/200404/000020040404A0034611.php>>
53. Yuichi Kobayashi, B. G. K. Total synthesis of macrospheptides B and A. *Tetrahedron Letters* 1559–1563doi:10.1016/S0040-4039(99)02323-0
54. Ono, M., Nakamura, H., Konno, F. & Akita \*, H. Total syntheses of macrospheptides (+)-A, (-)-A and (+)-E. *Tetrahedron: Asymmetry* **11**, 2753–2764 (2000).
55. Kobayashi, Y., Wang, Y.-G. & Acharya, H. P. Total Syntheses of Macrospheptides C, F, G and H. *Letters in Organic Chemistry* **1**, 297–307 (2004).
56. Sharma, G. V. M. & Mouli, C. C. A total synthesis of macrospheptides C and F from l-(+)-arabinose. *Tetrahedron Letters* **44**, 8161–8163 (2003).
57. Akita, H., Nakamura, H. & Ono, M. Total synthesis of (+)-macrospheptides A, C, E, F, and G based on enzymatic function. *Chirality* **15**, 352–359 (2003).

58. Altmann, K. H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 424–431 (2001).
59. Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203 (1998).
60. Desai, A. & Mitchison, T. J. Microtubule Polymerization Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 83–117 (1997).
61. Frixione, E. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: A 300-Year Epic. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **46**, 73–94 (2000).
62. Walczak, C. E. & Heald, R. in *A Survey of Cell Biology Volume 265*, 111–158 (Academic Press, 2008).
63. Orth, J. D., Loewer, A., Lahav, G. & Mitchison, T. J. Prolonged Mitotic Arrest Triggers Partial Activation of Apoptosis, Resulting in DNA Damage and p53 Induction. *Mol. Biol. Cell* (2011).doi:10.1091/mbc.E11-09-0781
64. Plietker, B. The RuO<sub>4</sub>-Catalyzed Ketohydroxylation. Part 1. Development, Scope, and Limitation. *J. Org. Chem.* **69**, 8287–8296 (2004).
65. Noyori, R. *et al.* Asymmetric hydrogenation of .beta.-keto carboxylic esters. A practical, purely chemical access to .beta.-hydroxy esters in high enantiomeric purity. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5856–5858 (1987).
66. Yotagai, M. & Ohnuki, T. Asymmetric reduction of functionalized ketones with a sodium borohydride–(L)-tartaric acid system. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1826–1828 (1990).doi:10.1039/P19900001826
67. Huckin, S. N. & Weiler, L. Alkylation of dianions of .beta.-keto esters. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 1082–1087 (1974).
68. Mori, S. *et al.* A method to greatly improve the enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis using sodium dodecyl sulfate (SDS) as an additive. *Tetrahedron: Asymmetry* **16**, 3698–3702 (2005).
69. Chataigner, I., Lebreton, J., Durand, D., Guingant, A. & Villieras, J. A new approach for the determination of the absolute configuration of secondary alcohols by <sup>1</sup>H NMR with O-substituted mandelate derivatives. *Tetrahedron Letters* **39**, 1759–1762 (1998).
70. Trost, B. M. *et al.* On the use of the O-methylmandelate ester for establishment of absolute configuration of secondary alcohols. *J. Org. Chem.* **51**, 2370–2374 (1986).
71. Heinz, D. W., Schubert, W.-D. & Höfle, G. Lange gesucht – die bioaktive Konformation von Epothilon und seine Bindung im Tubulin. *Angewandte Chemie* **117**, 1324–1327 (2005).
72. Anderson, A. C., O’Neil, R. H., Surti, T. S. & Stroud, R. M. Approaches to solving the rigid receptor problem by identifying a minimal set of flexible residues during ligand docking. *Chem. Biol.* **8**, 445–457 (2001).
73. Nettles, J. H. *et al.* The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography. *Science* **305**, 866–869 (2004).
74. Löwe, J., Li, H., Downing, K. H. & Nogales, E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **313**, 1045–1057 (2001).
75. Kikkawa, M. *et al.* Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* **411**, 439–445 (2001).
76. Gigant, B. *et al.* Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **435**, 519–522 (2005).

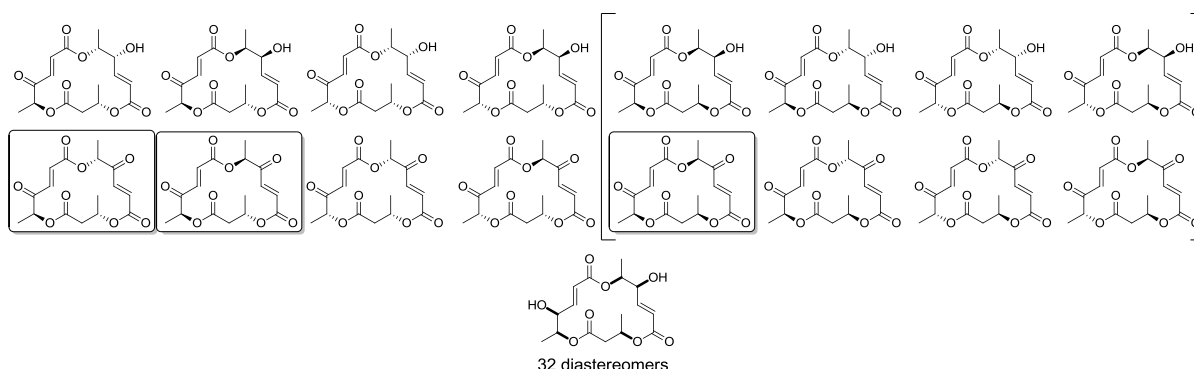
77. Shatsky, M., Nussinov, R. & Wolfson, H. J. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. *Proteins* **56**, 143–156 (2004).
78. Wallach, I., Jaitly, N., Nguyen, K., Schapira, M. & Lilien, R. Normalizing Molecular Docking Rankings using Virtually Generated Decoys. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 1817–1830 (2011).
79. Shelanski, M. L., Gaskin, F. & Cantor, C. R. Microtubule Assembly in the Absence of Added Nucleotides. *PNAS* **70**, 765–768 (1973).
80. Lee, J. C. & Timasheff, S. N. In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables. *Biochemistry* **16**, 1754–1764 (1977).
81. Kappos, L. *et al.* Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet* **372**, 1463–1472 (2008).
82. De Jong, R. *et al.* Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2067–2074 (1996).
83. Vandermeeren, M., Janssens, S., Borgers, M. & Geysen, J. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 19–23 (1997).
84. Ockenfels, H. M., Schultewolter, T., Ockenfels, G., Funk, R. & Goos, M. The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokines of the psoriatic cytokine network. *British journal of dermatology* **139**, 390–395
85. Loewe, R. *et al.* Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J. Immunol.* **168**, 4781–4787 (2002).
86. Litjens, N. H. R. *et al.* Monomethylfumarate affects polarization of monocyte-derived dendritic cells resulting in down-regulated Th1 lymphocyte responses. *Eur. J. Immunol.* **34**, 565–575 (2004).
87. Treumer, F., Zhu, K., Gläser, R. & Mrowietz, U. Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 1383–1388 (2003).
88. Duffield, A. M. *et al.* Applications of artificial intelligence for chemical inference. II. Interpretation of low-resolution mass spectra of ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2977–2981 (1969).
89. Carhart, R. E., Smith, D. H., Brown, H. & Djerassi, C. Applications of artificial intelligence for chemical inference. XVII. Approach to computer-assisted elucidation of molecular structure. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 5755–5762 (1975).
90. Carhart, R. E., Smith, D. H., Gray, N. A. B., Nourse, J. G. & Djerassi, C. Applications of artificial intelligence for chemical inference. 37. GENOA: a computer program for structure elucidation utilizing overlapping and alternative substructures. *J. Org. Chem.* **46**, 1708–1718 (1981).
91. Kudo, Y. & Sasaki, S. The Connectivity Stack, a New Format for Representation of Organic Chemical Structures. *J. Chem. Doc.* **14**, 200–202 (1974).
92. Abe, H., Okuyama, T., Fujiwara, I. & Sasaki, S. A computer program for generation of constitutionally isomeric structural formulas. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **24**, 220–229 (1984).
93. Sasaki, S. & Kudo, Y. Structure elucidation system using structural information from multisources: CHEMICS. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **25**, 252–257 (1985).
94. Funatsu, K., Miyabayashi, N. & Sasaki, S. Further development of structure generation in the automated structure elucidation system CHEMICS. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **28**, 18–28 (1988).

95. Shelley, C. & Munk, M. Case, a computer model of the structure elucidation process. *Analytica Chimica Acta* **133**, 507–516 (1981).
96. Lipkus, A. H. & Munk, M. E. Automated classification of candidate structures for computer-assisted structure elucidation. *J Chem Inf Comput Sci* **28**, 9–18 (1988).
97. Christie, B. D. & Munk, M. E. Structure generation by reduction: a new strategy for computer-assisted structure elucidation. *J Chem Inf Comput Sci* **28**, 87–93 (1988).
98. Faulon, J.-L. Stochastic Generator of Chemical Structure. 1. Application to the Structure Elucidation of Large Molecules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **34**, 1204–1218 (1994).
99. Schüller, A., Hähnke, V. & Schneider, G. SmiLib v2.0: A Java-Based Tool for Rapid Combinatorial Library Enumeration. *QSAR & Combinatorial Science* **26**, 407–410 (2007).
100. Dalby, A. *et al.* Description of several chemical structure file formats used by computer programs developed at Molecular Design Limited. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **32**, 244–255 (1992).
101. Rößler, U. Strukturformeln als Text speichern. *Nachrichten aus der Chemie* **60**, 140–142 (2012).
102. Matsumoto, M. & Nishimura, T. Mersenne twister: a 623-dimensionally equidistributed uniform pseudo-random number generator. *ACM Trans. Model. Comput. Simul.* **8**, 3–30 (1998).
103. Neisius, N. M. & Plietker, B. The Ruthenium-Catalyzed Hydrovinylation of Internal Alkynes by Acrylates: An Atom Economic Approach to Highly Substituted 1,3-Dienes. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 5752–5755 (2009).
104. Kubinyi, H. Nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character: the bilinear model. *Farmaco Sci* **34**, 248–276 (1979).
105. O’Boyle, N. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics* **3**, 33 (2011).

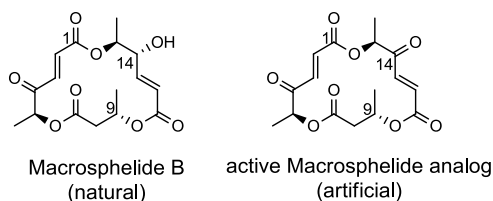
## 13. Abstract

In this work a diversity-oriented total synthesis which provides a short and straightforward access towards a macrophelide library was further extended, based on previous work by N. M. NEISIUS. The synthetic part of this work consisted in the preparation of the eight compounds in parentheses; the remaining compounds were prepared by C. HÄCKER and N. M. NEISIUS.

In the computational part of this work the accessible library was screened *in silico* by means of molecular docking which lead to the identification of a possible target, namely tubulin, and to the prediction of the three framed compounds as microtubule-stabilizing agents.



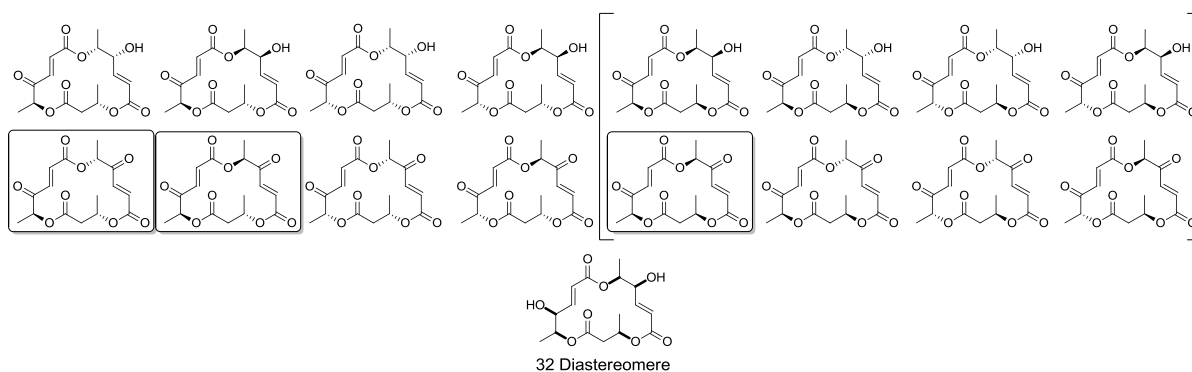
Finally, in the biochemical part, all 48 macrophelide analogs were tested in a tubulin polymerization assay. One candidate that was predicted active effectively showed microtubule-stabilizing activity while all other candidates showed no effects on tubulin polymerization. These findings confirm the results of the virtual screening except for two false positive predictions. Furthermore, the active candidate was previously reported to possess antiproliferative activity in a cellular assay by NEMOTO and co-workers. However, this study did not identify any target.



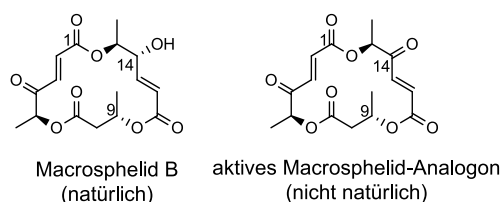
Another interesting fact is that the artificial Macrophelide analog found in this work is the formal product of oxidation of the (apoptosis-inducing) natural Macrophelide B at position 14 under retention of all stereocenters. Macrophelide B itself which was not part of the library tested herein proved to be virtually inactive *in silico*. This allows the assumption that Macrophelide B is a prodrug being oxidized intracellularly.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine einfache und kurze diversitätsorientierte Totalsynthese von Macrosphehid-Analoga erweitert, die in vorangegangenen Arbeiten von N. M. NEISIUS entwickelt wurde. Der synthetisch-präparative Teil der Arbeit bestand im Aufbau der acht Derivate in eckigen Klammern. Die anderen Derivate wurden von C. HÄCKER und N. M. NEISIUS dargestellt.

Im bioinformatischen Teil der Arbeit wurde die präparativ zugängliche Macrosphehid-Bibliothek *in silico* mit Hilfe von Docking-Studien bezüglich biologischer Aktivität untersucht. Dies führte zur Identifizierung eines potentiellen Targets, nämlich Tubulin und zur Vorhersage der drei umrahmten Vertreter als mikrotubulistabilisierende Verbindungen.



Schließlich wurden im biochemisch-experimentellen Teil der Arbeit alle 48 Macrosphehid-Analoga in einem Tubulin-Polymerisationsassay getestet. Ein Kandidat, der als aktiv vorhergesagt wurde, zeigt tatsächlich mikrotubulistabilisierende Aktivität während alle anderen Kandidaten keinen Einfluss auf die Tubulinpolymerisation zeigen. Dies bestätigt die Ergebnisse des virtuellen Screenings bis auf zwei falsch-positive Vorhersagen. Außerdem wurde das identifizierte aktive Macrosphehid-Analogon bereits früher von NEMOTO und Kollegen berichtet, die seine antiproliferatorische Wirkung in einem zellulären Assay gezeigt haben. Allerdings wurden hierbei keine Aufschlüsse bezüglich eines Targets gewonnen.



Interessant ist auch der Umstand, dass dieses künstliche Macrosphehid-Derivat formal das Produkt der Oxidation des natürlichen (apoptoseinduzierenden) Macrosphehid B an Position 14 unter Retention aller Stereozentren ist. Macrosphehid B selbst, das hier nicht getestet wurde, zeigte sich virtuell als inaktiv. Dies erlaubt die Annahme, dass Macrosphehid B nur ein Prodrug ist, das in der Zelle oxidiert wird.

## 14. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Sebastian Schmidt  
geboren am 4. Mai 1983 in Göppingen, Deutschland

### Akademische Ausbildung

02/2009 bis 05/2013 Promotion in Organischer Chemie an der Universität Stuttgart im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Plietker, Titel der Dissertation: „Chemo(und)informatik-getriebene Wirkstoffsynthese: Neuartige Macrosphelid-Analoga als potente Mikrotubuli-stabilisatoren“

11/2008 Abschluss der Diplomarbeit in Organischer Chemie, Note: „sehr gut“

04/2008 bis 11/2008 Diplomarbeit in Organischer Chemie an der Universität Stuttgart (Arbeitskreis Prof. Dr. Bernd Plietker), Titel: „Untersuchungen zur Totalsynthese von Aculeatin“

10/2007 bis 03/2008 Diplomprüfungen in Anorganischer, Organischer, Physikalischer Chemie und Biochemie (Noten: „gut“, „sehr gut“, „sehr gut“, „sehr gut“)

2005 Vordiplom in Anorganischer, Organischer, Physikalischer Chemie und Physik (Gesamturteil: „gut“)

10/2003 Beginn Studium Chemie (Diplom) an der Universität Stuttgart

### Schulische Ausbildung

06/2002 Abitur; Gesamturteil: 2,2  
1993 bis 2002 Michelberg-Gymnasium Geislingen/Steige

### Sonstiges

08/2002 bis 05/2003 Zivildienst im Katharinenhospital Stuttgart



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. BERND PLIETKER für die herausfordernde und interessante Themenstellung sowie die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, sein Vertrauen, seine Ermutigungen und seine stete Unterstützung bedanken. Die zahlreichen Diskussionen mit ihm und seine Denkanstöße haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. SABINE LASCHAT danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kollegen des Arbeitskreises PLIETKER für die Unterstützung, das entspannte Arbeitsklima und die schöne Zeit. Ganz besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen CHRISTIAN BELGER und LARA HETTMANCZYK. CHRISTINE HÄCKER und MATTHIAS NEISIUS danke ich für die Hilfe, die fachliche Unterstützung und die fruchtbaren Diskussionen sowie die gute Zusammenarbeit.

KATHARINA LINDERMAYR und CHRISTINE HÄCKER danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Serviceabteilungen des Instituts für Organische Chemie der Universität Stuttgart, insbesondere Frau Dr. BIRGIT CLAASEN, SASCHA WEGNER und Frau UTA TWIEHAUS-HEYNOLD von der NMR-Abteilung sowie Herrn JOACHIM TRINKNER und KATHRIN WOHLBOLD von der Massenspektrometrieabteilung.

Sämtliche Computersimulationen wären ohne kompetente Unterstützung nicht möglich gewesen, daher gilt Herrn Dr. BURKHARD MIEHLICH besonderer Dank.

Frau Dr. ANNE SAMLAND und SHIROMI BAIER vom Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart danke ich für die Unterstützung bei den Proteinassays.

Herrn Prof. Dr. BERNARD HAUER und CHRISTIAN KAZENWADEL vom Institut für technische Biochemie der Universität Stuttgart danke ich für die Zurverfügungstellung der Alkoholdehydrogenasen und die Unterstützung bei den enzymatischen Reduktionen.

Schließlich möchte ich mich im persönlichen Umfeld bei meinen langjährigen Studienkollegen und Mitbewohnern HEIKE VOGEL, FABIAN SANDER und MARKUS JEGELKA für die schöne Zeit und vor allem bei meiner Familie für die immerwährende Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken.