

SYNTHESE VON LIPIDEN
FÜR
DIE LIPOSOMALE GENTRANSFEKTION

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl. Pharm. Ingo Christian Schulze

geb. am 8. Oktober 1975 in Leverkusen

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. B. Dobner
2. Prof. Dr. habil. A. Langner
3. Doz. Dr. habil. G. Brezesinski

Halle (Saale), den 07.04.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010121

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010121>]

Ingo Christian Schulze

Synthese von Lipiden für die liposomale Gentransfektion

Dissertation, (2006)

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie, Institut für

Pharmazeutische Chemie

123 Seiten, 56 Abbildungen

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	3
3. Einleitung	5
4. Problemstellung	10
5. Synthesekonzeption	12
6. Darstellung von lipophilen Malonsäurediamiden als Transfektionslipide.....	16
6.1. Malonsäureester als Ausgangsverbindungen für die Synthese neuartiger Transfektionslipide	16
6.2. Alkylierung von unterschiedlichen Malonsäureestern	16
6.3. Malonsäuremonoamide	18
6.4. Malonsäurediamide.....	22
7. Darstellung von Gemini-Lipiden als Transfektionslipide	24
7.1. Gemini-Lipide	24
7.2. Gemini-Lipide ausgehend von alkylierten Malonsäureestern	24
8. Darstellung von α -verzweigten Säureamiden als Transfektionslipide	28
8.1. α -Verzweigte Carbonsäuren	28
8.2. α -Verzweigte Säureamide.....	29
8.3. α -Verzweigte Säurediamide.....	30
9. Darstellung hydrophober TRIS-Derivate als Transfektionslipide	33
9.1. Tris-(2-amino-2-hydroxymethyl)-1,3-propandiol (TRIS)	33
9.2. Hydrophobe TRIS-Derivate.....	34
10. Darstellung hydrophober Pentaerythritol-Derivate als Transfektionslipide	40
10.1. Pentaerythritol	40
10.2. Hydrophobe Pentaerythritol-Derivate.....	41
11. Darstellung hydrophober Glycerol-Derivate als Transfektionslipide	44
11.1. Glycerol	44
11.2. Hydrophobe Glycerol-Derivate mit Ketalstruktur.....	44
12. Darstellung von Phospholipiden als Transfektionslipide.....	47
12.1. Lysophosphatidylserin-Analoga	48
12.2. Quarternierung von Phospholipiden	50
12.3. Phospholipide als neutrale Helferlipide für die Gentransfektion.....	51
13. Physikochemische Untersuchungen.....	56
13.1. Monoschichtuntersuchungen	56
13.2. Interpretation der Druck-Flächen-Diagramme.....	57
13.3. GIXD-Untersuchungen.....	58

13.4. IRRAS-Spektroskopie	60
14. Transfektionsuntersuchungen	61
15. Zusammenfassung	66
16. Arbeitsvorschriften	68
16.1. Allgemeine Angaben	68
16.2. Kommerziell erworbene Chemikalien.....	70
16.3. Synthese der Ausgangsverbindungen	71
16.4. Synthese der Verbindungen	76
16.4.1. Synthese der Malonsäurediamide.....	76
16.4.2. Synthese der Gemini-Lipide	86
16.4.3. Synthese der α -verzweigten Säurediamide	91
16.4.4. Darstellung hydrophober TRIS-Derivate	103
16.4.5. Darstellung hydrophober Pentaerythritol-Derivate	107
16.4.6. Darstellung hydrophober Glycerol-Derivate	110
16.4.7. Darstellung von Phospholipiden.....	111
17. Literaturverzeichnis.....	117
18. Danksagung	
19. Lebenslauf	
20. Anhang	

2. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
β -Gal	β -Galactosidase
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)- phosphoniumhexafluorophosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium- methylsulfat
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
E. coli	Escherichia coli
EEDQ	2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
ESI-MS	Elektronenstoß-Ionisations MS
EtAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
exp.	experimentell
Fp.	Festpunkt, Schmelzbereich
g	Gramm
gef.	gefunden
GIXD	Synchrotron Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall
h	Stunde
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
kDa	kilo Dalton
KOtBu	Kalium- <i>tert.</i> butylat
LM	Laufmittel
m	Multiplett
MHz	Megahertz

MsCl	Methansulfonylchlorid
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PEG	Polyethylenglykol
PETN	Pentaerythritoltetranitrat
p-TsOH	p-Toluolsulfonsäure
q	Quartett
Rf-Wert	Retentionsfaktor
s	Singulett
t	Triplett
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indol-3-yl- β -D-galactopyranosid

3. Einleitung

Einige Krankheiten können zurzeit mit herkömmlichen medizinischen Methoden nur unzureichend oder gar nicht geheilt werden. Neben anderen Therapieformen sind insbesondere mit der Gentherapie große Hoffnungen verbunden, in Zukunft unter anderem Erbkrankheiten sowie chronische Krankheiten und einige Krebserkrankungen nachhaltig behandeln zu können. Das Konzept basiert auf der Grundlage, eine Krankheit durch gezielte Übertragung fremden genetischen Materials in bestimmte Zellen eines Patienten zu korrigieren¹. Die Suche nach geeigneten Strategien um DNA in eine Zelle einzuschleusen ist einer der Schwerpunkte auf diesem Forschungsgebiet. Die gegenwärtig eingesetzten Gentransfersysteme lassen sich in biologische, physikalische und chemische Methoden unterteilen.

Mit bestimmten Viren ließen sich bisher recht große Erfolge erzielen. Vor allen Dingen Adeno- und Retroviren erwiesen sich als sehr effiziente Vektoren^{2,3}. Dabei werden modifizierte Virusgenome verwendet, damit sichergestellt ist, dass die Viren die transduzierten Zellen nicht wieder verlassen können⁴. Allerdings ist die Virus-vermittelte Gentransduktion mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. Adenovirale Vektoren lösen eine sehr starke Immunantwort aus. Dies führte in klinischen Studien bereits zu einem Todesfall⁵. Retrovirale Vektoren werden vom unspezifischen Immunsystem sehr schnell zerstört, so dass sie nur an isolierten Zellen unter Laborbedingungen angewendet werden können⁴. Die aufwendige Produktion und die abschließenden Qualitäts- und Sicherheitskontrollen stellen einen zusätzlichen Nachteil dar. Es besteht außerdem die Gefahr der potenziellen Induktion von Onkogenen durch Viren^{6,7}. Auf der Suche nach Alternativen wurden unterschiedliche physikalische^{8,9} und vor allen Dingen chemische Gentransfersysteme entwickelt. Besonders vielversprechend sind Liposomen, Polymernanopartikel und Polylysinpartikel. Diese sind weder immunogen noch onkogen. In der Regel sind sie leicht herzustellen und erfordern weniger aufwendige Kontrollen. Sie stellen deshalb eine sichere Transfektionsmethode dar¹⁰. Nachteilig wirken sich kurze Halbwertszeiten und eine im Vergleich zu viralen Vektoren schlechte Transfektionsrate aus¹¹. Trotzdem besitzen besonders die Liposomen ein großes Potential für den Gentransfer. Sie haben eine hohe Beladungskapazität und schützen die DNA vor dem Abbau durch Nukleasen. Liposomen, die im Zusammenhang mit Gentransfersystemen genannt werden, bezeichnet man auch als Lipoplexe. Sie setzen sich aus kationischen und bestimmten neutralen Lipiden zusammen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen interagieren die kationischen Lipide spontan mit negativ geladenen Phosphorsäureresten der DNA¹². Die Liposomen-DNA-Komplexe sollten nach außen positiv geladen sein, damit sie aktiv oder passiv von den allgemein negativ geladenen Zellen aufgenommen werden können. Bei negativer Außenladung der Lipoplexe sinkt die

Endozytoserate und es kommt zu einem raschen Abbau^{13,14}. Um eine längere Zirkulationszeit im Organismus zu gewährleisten werden häufig pegylierte Verbindungen verwendet¹⁵. In letzter Zeit konnte zudem herausgefunden werden, dass der pH-Wert des Lipoplexes einen hohen Einfluss auf die intrazelluläre Stabilität, die DNA-Freisetzung aus dem Komplex und die Applizierbarkeit hat¹⁶. Im folgenden werden die unterschiedlichen Bausteine der Lipoplexe näher erläutert.

Neutrale Lipide

Neutrale Lipide sind aufgrund ihrer Eigenschaften selbst nicht transfizierend wirksam. Sie werden vor allen Dingen als so genannte Helferlipide bei der Darstellung der Lipoplexe für eine Vielzahl von Aufgaben benötigt. Unter anderem verringern neutrale Lipide die Toxizität, sorgen damit für eine gute Allgemeinverträglichkeit und verbessern aufgrund ihrer Struktur die Transfektionsrate¹⁷. Weiterhin beteiligen sie sich entscheidend am strukturellen Aufbau der Lipoplexe¹⁸. Mischungen aus dem natürlich vorkommenden Lipid DOPE und einem kationischen Lipid bilden zum Beispiel invers hexagonale Mizellen¹⁹. Es wird diskutiert, dass DOPE eine Fusion zwischen Lipoplex und Endosomenmembran vermittelt. Dies führt möglicherweise zu einer Destabilisierung der Endosomenmembran und damit zu einer verbesserten Freisetzung der DNA²⁰. Cholesterol und seine Derivate eignen sich ebenfalls gut als Helferlipide, da sie in Kombination mit kationischen Lipiden in vielen Organen gute Transfektionsraten erzielen konnten^{21,22}. Eine Weiterentwicklung stellen fluorierte Helferlipide dar, die in vivo und in vitro zu einer effizienteren Transfektion führten als die bisher beschriebenen Helferlipide²³.

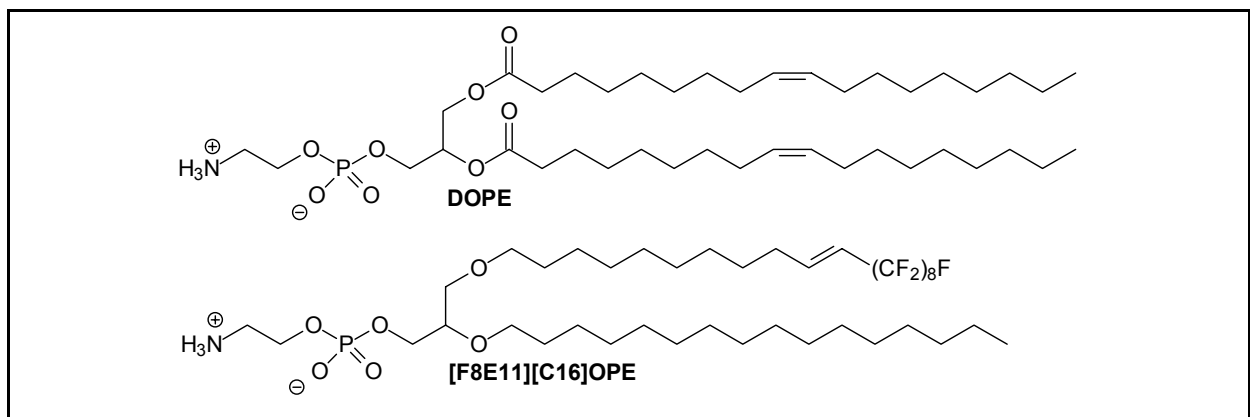


Abb. 1: Chemische Strukturen neutraler Lipide.

Kationische Lipide

Kationische Lipide bestehen aus einer positiv geladenen Kopfgruppe, die über einen Linker mit einer hydrophoben Einheit verbunden ist. Sie ermöglichen als amphiphile Verbindungen die Komplexierung mit negativ geladener DNA. Auf dem Gebiet der nicht-viralen Gentransfersysteme entwickelte *Felgner*²⁴ 1987 DOTMA, das erste für die Transfektion geeignete kationische Lipid.

Heute differenziert man zwischen zwei Hauptgruppen; monovalente und polyvalente kationische Lipide. Bei den monovalenten kationischen Lipiden handelt es sich hauptsächlich um quaternäre Ammoniumsalze mit einer oder zwei langen Alkylketten. CTAB, ein Ammoniumsalz mit nur einer Kette, transfiziert zwar, bildet jedoch nur schlecht Liposomen und ist aufgrund lytischer Eigenschaften ausgesprochen toxisch²⁵. Besser geeignet sind die Lipide DOTMA²⁴ und das analoge DOTAP²⁶. Diese besitzen immer noch eine hohe Toxizität und müssen deshalb in Mischungen mit dem Helferlipid DOPE verwendet werden¹². DOTAP besitzt im Gegensatz zu DOTMA Esterstrukturen. Diese lassen sich durch Esterasen im Organismus leicht spalten und führen möglicherweise zu einer besseren Metabolisierung der Verbindung. Lipide, die über eine Pyridinium-Kopfgruppe verfügen, erwiesen sich in der Gruppe der monovalenten Substanzen als überlegen, da sie eine geringe Toxizität bei gleichzeitig guter Transfektionsrate aufweisen²⁷. Aufgrund der bisher ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind bei allen Lipiden, die eine verhältnismäßig gute Transfektionsrate zeigen, folgende Merkmale erforderlich:

- Aminogruppen (als basischer bzw. kationischer Rest),
- zwei hydrophobe aliphatische Ketten mit jeweils 12-18 Kohlenstoffatomen (diese können gesättigt bzw. ungesättigt sein) oder
- Cholesterin als lipophiler Rest.

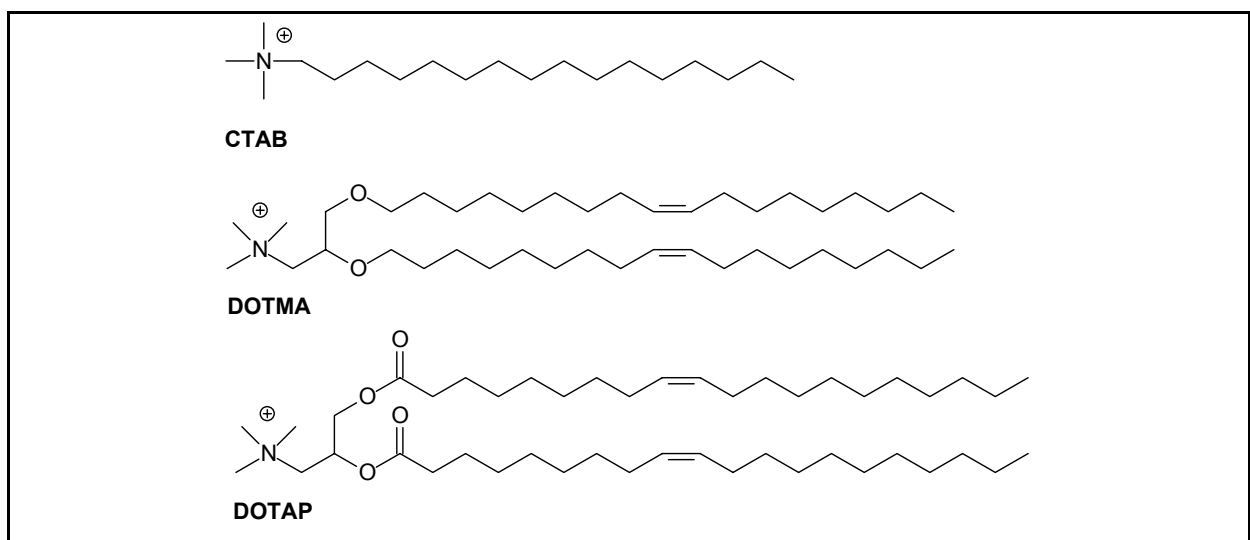


Abb. 2: Chemische Strukturen monovalenter kationischer Lipide.

Multivalente Kopfgruppen erhöhen generell die Transfektionsrate²⁸. Bei Lipiden mit Spermin als Kopfgruppe, etwa bei DOGS, nimmt man an, dass diese mit der „minor groove“ der DNA interagiert²⁹. MLV5 ist ein neuartiges Lipid mit 5 Ladungen und zwei ungesättigten Ketten auf der Basis von 3,4-Dihydroxybenzoesäure³⁰. Ein weiteres viel versprechendes System basiert auf Glycinbetainen, die mit Acylketten kovalent gebunden sind. Sie verfügen über Peptid- und Esterbindungen und sollten somit optimal metabolisierbar sein³¹. Weiterhin sind Amid- und Carbamoylbindungen sehr gut geeignet, da sie chemisch stabil aber bioabbaubar sind. Polyamine sind bei neutralen pH-Werten nur partiell protoniert und die einzelnen primären, sekundären bzw. tertiären Aminofunktionen weisen unterschiedliche pK_s -Werte auf. Sie wirken deshalb als Puffer und schützen die DNA somit ausreichend vor dem sauren Milieu im Endosom³². Ein neues Konzept basiert auf Guanidinen, die an ein ungesättigtes Glycosidgerüst gebunden werden. Man verspricht sich hiervon eine gesteigerte Transfektionsrate³³. Neben aliphatischen Alkylketten wird häufig auch Cholesterin im hydrophoben Bereich verwendet. Ein sehr gut transfizierendes Lipid auf Cholesterinbasis, DC-Chol, hat sich leider als zelltoxisch erwiesen und kann nur in Mischungen mit DOPE verwendet werden¹². Deshalb zielte die Entwicklung auf galactosylierte Cholesterolderivate mit großen Spacern³⁴. Sie stellen eine moderne Gruppe von Transfektionslipiden mit hoher Transfektionsrate dar. Zudem haben cholesterinhaltige Lipide eine hohe Affinität zu Bronchoepithelzellen, besitzen jedoch nur geringe Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen¹⁴. Dies ist ein großer Vorteil, da viele kationische Lipide und Liposomen durch Wechselwirkungen mit negativ geladenen Plasmaproteinen inaktiviert werden können.

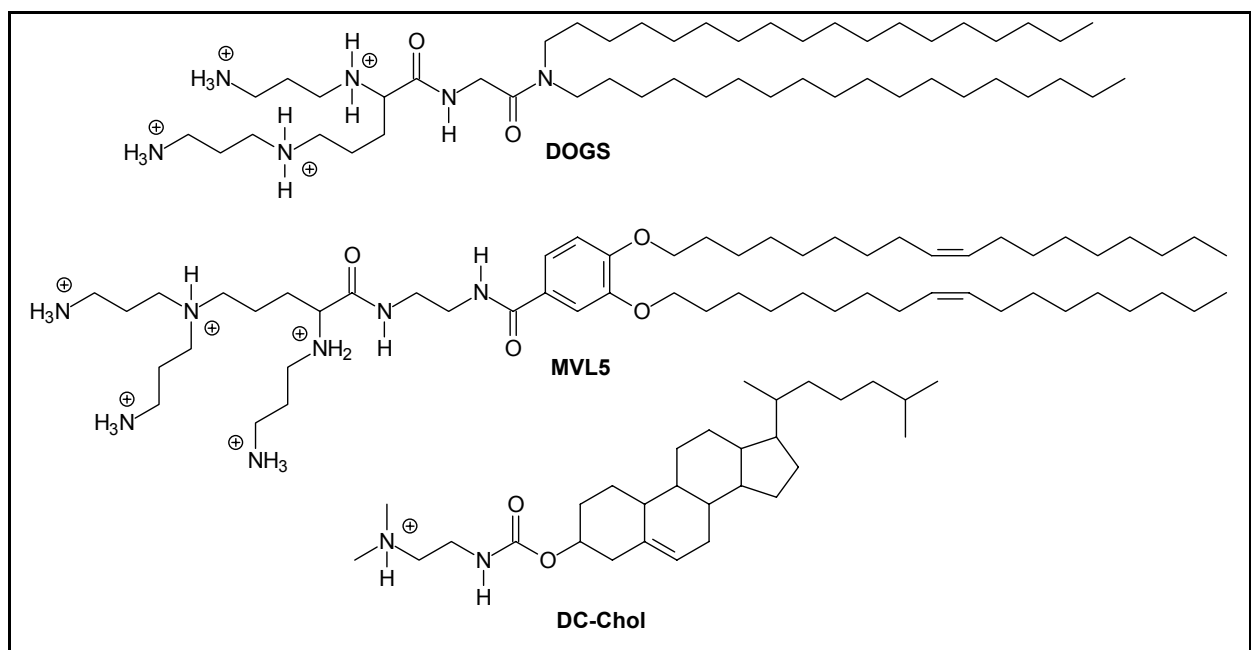


Abb. 3: Chemische Strukturen polyvalenter kationischer Lipide.

Polyplexe

Neben den Lipoplexen werden hauptsächlich Polyplexe für die Gentransfektion eingesetzt. Es handelt sich hierbei vor allen Dingen um kationische Polymere. Diese komprimieren die DNA auf eine relativ geringe Größe und werden ebenfalls als Polymer-DNA-Komplexe durch Endozytose von der Zelle aufgenommen. Ähnlich den polyvalenten kationischen Lipiden besitzen sie aufgrund vieler basischer Reste eine intrinsische Pufferkapazität. Man geht davon aus, dass einige Polymere als so genannter „Protonenschwamm“ im Endosom wirken. Aufgrund des damit verbundenen Konzentrationsunterschiedes kommt es zu einem osmotischen Gefälle an der Endosomenmembran, das zu einem Einströmen von Wasser führt und damit eine Destabilisierung der Struktur verursacht. Dies kann wiederum zu einer besseren Freisetzung der DNA führen³⁵. Das molekulare Gewicht, der Verzweigungsgrad, die Ionenstärke, das Zeta-Potential und die Partikelgröße der Polymere sind Faktoren, die einen entscheidenden Einfluss auf die Transfektionseffizienz, aber auch auf die Zytotoxizität der Polyplexe haben³⁶. Es zeichnet sich ab, dass es schwierig wird, diese Faktoren untereinander abzustimmen und zu optimieren. Um die Toxizität zu senken werden die Polymer-DNA-Komplexe pegyliert. Ein hoher Pegylierungsgrad senkt jedoch die zelluläre Aufnahme und folglich wird die Transfektionsleistung gemindert³⁷. Poly(ethylenimin) (PEI) ein Polymer, das durch kationische Polymerisierung, ausgehend von einem 2-substituierten 2-Oxazolidin-Monomer und anschließender Hydrolyse gewonnen wird, stellt ein viel versprechendes Gentransfersystem dar³⁸. PEI-Moleküle, die größer als 10 kDa sind, konnten bereits erfolgreich bei der Gentransfektion eingesetzt werden³⁹. Das Einführen von Antikörperstrukturen ermöglichte bei diesem Polymer zudem ein gewisses Zelltargeting⁴⁰. Um die Effizienz weiter zu steigern sind auch Kombinationen mit kationischen Lipiden denkbar⁴¹.

Poly(L-Lysin) und Poly(L-Arginin), lineare Polypeptide der Aminosäuren Lysin bzw. Arginin, stellen weitere Vertreter der Klasse der kationischen Polymere dar. Aufgrund der vorliegenden Amidbindungen besitzen sie Vorteile bei der Metabolisierung in vivo. Allerdings werden sie unter Umständen sehr schnell abgebaut um ausreichend effizient zu sein. Eine Co-Applizierung von Chlorochin hat sich als günstig erwiesen, erhöhte jedoch die Toxizität⁴². Schlechte Transfektionsraten lassen zudem PLL und PLA als wenig geeignete Vektoren erscheinen. In Kombination mit PEG und Fettsäureestern konnten jedoch Verbesserungen hinsichtlich Effizienz und Toxizität erzielt werden⁴³. Protamin, selbst kleiner als PLA, dafür aber aufgrund von 21 Arginin-Resten hochgradig positiv geladen, wechselwirkt ausgezeichnet mit Phosphorsäureresten und kondensiert DNA entsprechend gut. Es verhindert eine Zerstörung durch Nukleasen und ermöglicht eine bessere Aufnahme der DNA in den Zellkern. Der Grund dafür liegt möglicherweise in einer Nachahmung der nuclear localization signals (NLS)⁴⁴. Als weitere Substanzen für die nicht virale Gentransfektion seien

noch Chitosan⁴⁵, Dendrimere vom Polyamidoamin Typ⁴⁶ und so genannte Block-Copolymere⁴⁷ erwähnt.

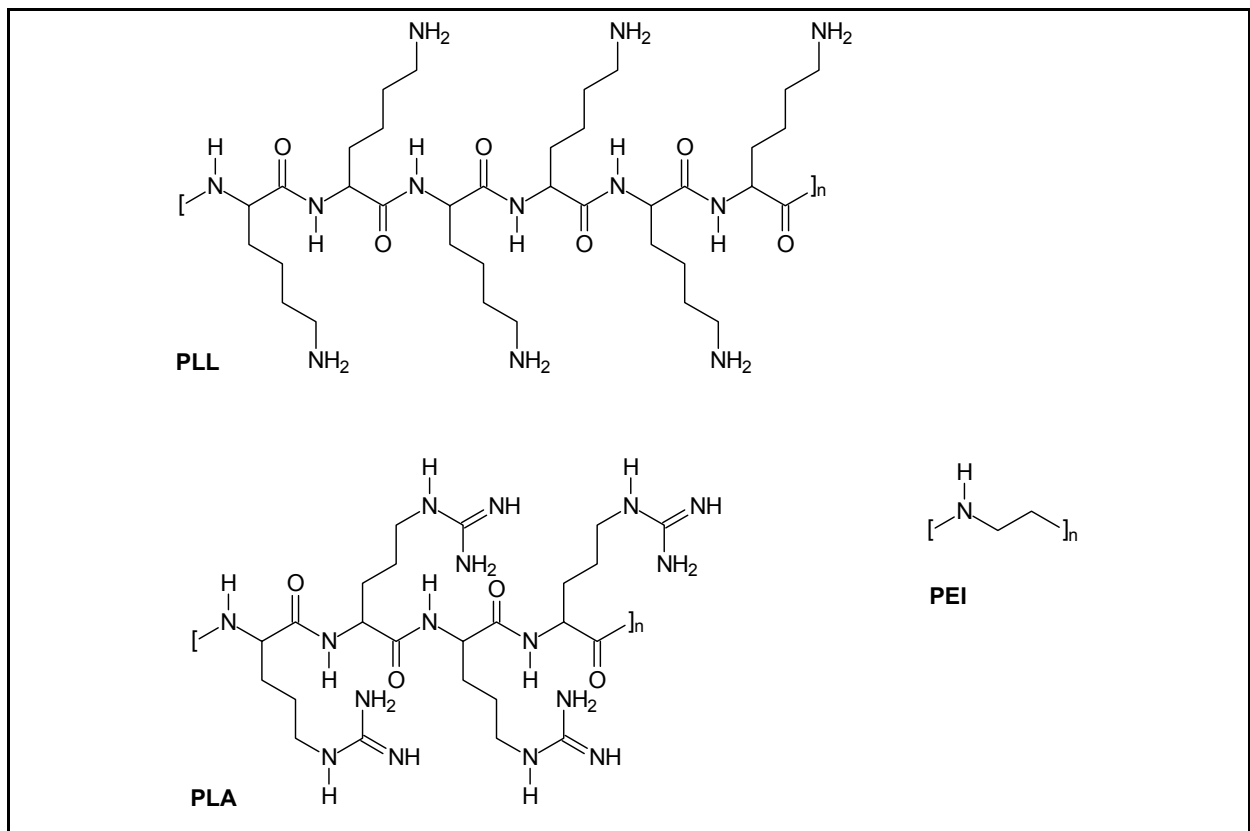


Abb. 4: Chemische Strukturen kationischer Polymere.

4. Problemstellung

Die beschriebenen nicht-viralen Gentransfersysteme stellen eine sichere und effiziente Methode für die Gentherapie dar. Besonders die liposomalen Systeme besitzen gegenüber den viralen Vektoren einige Vorteile. Sie sind weder infektiös noch lösen sie eine Immunantwort im Organismus aus. Dadurch wird eine wiederholte Applikation möglich. Im Vergleich zu viralen Vektoren gestatten Liposomen eine wesentlich höhere DNA-Beladungsrate und können somit auch komplexe Gene in die Zellen einschleusen. Die Synthesen der notwendigen Lipide sind einfach und die Darstellungsmethoden der Liposomen zum Teil in der pharmazeutischen Technologie etabliert. Dadurch lassen sich die Herstellungsverfahren optimieren und die Produktionskosten reduzieren. Dennoch besitzen Liposomen für die Gentransfektion zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine Reihe von Nachteilen. Sie besitzen keine Gewebespezifität und führen lediglich zu einer transienten Genexpression, da die transfizierte DNA nicht dauerhaft in das Wirtsgenom integriert wird.

Das Hauptproblem der liposomalen Gentransfektion stellt jedoch die grundsätzlich geringe Transfektionsrate dar. Aus diesem Grund ist es nach wie vor notwendig, neue Lipide für die Gentransfektion zu synthetisieren. Die Entwicklung eines erweiterbaren Synthesekonzeptes zur Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen stellt einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Durch die physikochemische Charakterisierung und die in-vitro Testung sollten die dargestellten Lipide direkt weiterentwickelt und optimiert werden. Es wurde vorausgesetzt, nach Möglichkeit kostengünstige Ausgangssubstanzen und einfache Synthesewege zu verwenden.

5. Synthesekonzeption

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, neuartige Lipide zu entwickeln, die bei der nicht-viralen Gentransfektion eingesetzt werden sollten. Die Synthesen erfolgten auf der Grundlage folgender Aspekte:

1. kostengünstige Ausgangsstoffe
2. einfache Methoden
3. gute Reproduzierbarkeit
4. hohe Variabilität.

Zur Realisierung dieser Kernpunkte wurde für diese Problematik ein neuartiges Bausteinprinzip entwickelt. Die synthetisierten Zielverbindungen bestehen grundsätzlich aus Einheiten, die variabel zusammengesetzt werden konnten. Die einzelnen Bausteine ließen sich im Rahmen effizienter Synthesen modifizieren.

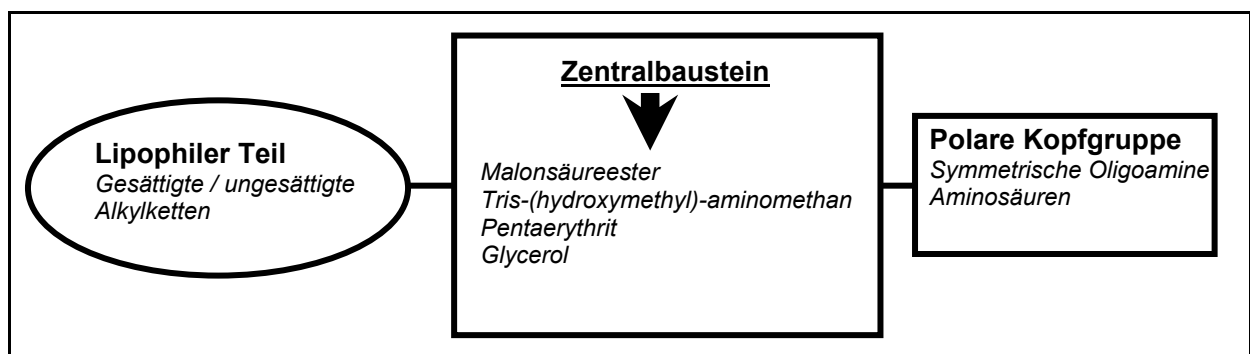


Abb. 5: Bausteinprinzip

Als Ausgangsverbindungen wurden folgende Substanzen verwendet:

- unterschiedliche Malonsäureester (I)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (V)
- Pentaerythrit (VII)
- Glycerol (IX).

Diese sind nicht toxisch, kostengünstig, leicht zu erwerben und in der Industrie allgemein etabliert. Aufgrund ihrer Eigenschaften, Reaktivität und funktionellen Gruppen konnten sie sehr gut für die Darstellung von Lipiden verwendet werden. Bei den angewandten Synthesen handelt es sich um einfache und reproduzierbare Methoden. Diese wurden unter Umständen modifiziert und generell auf ihre allgemeine Anwendbarkeit überprüft.

Die Malonsäureester **I** wurden in einem ersten Schritt mit hydrophoben Alkylhalogeniden umgesetzt. Nach selektiver Esterspaltung war es möglich via Amidbindung eine weitere gesättigte/ungesättigte Alkylkette einzuführen. Im Anschluss daran konnte der verbliebene Ester verseift werden und es gelang, die resultierende Säure mit unterschiedlichen Aminen zu verbinden **II**. Die monoalkylierten Malonsäureester ließen sich außerdem durch Bisalkylierung zu so genannten Gemini-Lipiden **IIIa,b** umsetzen. Weiterhin wurden ausgehend vom Malonsäurediethylester in α -Position verzweigte Säuren synthetisiert, die mit unterschiedlichen Aminen gekuppelt werden konnten **IVa**. Hierbei war es möglich, die polare Kopfgruppe durch unterschiedliche Aminosäuren zu erweitern **IVb**.

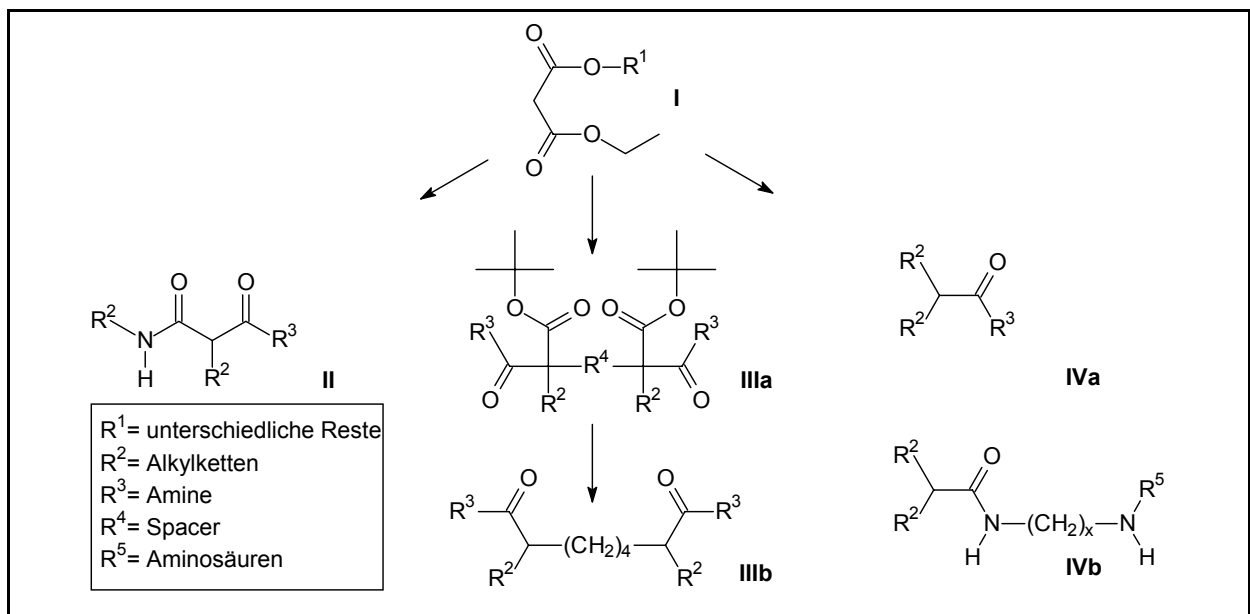


Abb. 6: Malonsäurederivate

Es ließ sich zeigen, dass Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) **V** durch Anwendung einer gezielten Schutzgruppenstrategie selektiv alkyliert werden kann. Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Substanzen für die Gentransfektion besitzt diese hydrophobe Verbindung zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen, die eine Erweiterung der Synthesestrategie erlauben.

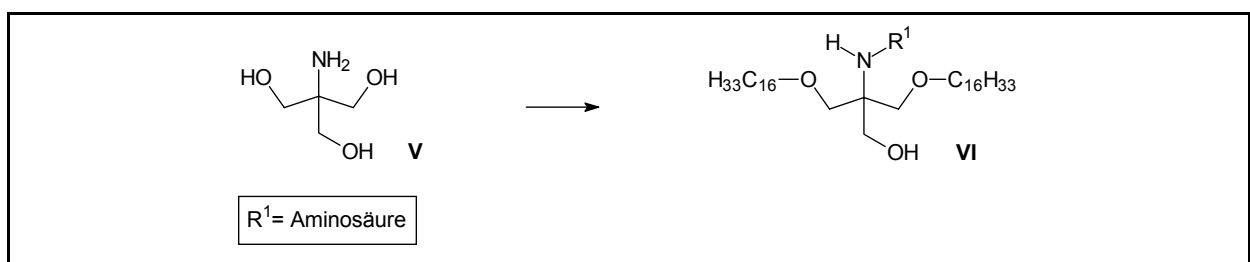


Abb. 7: TRIS-Derivate

Pentaerythrit **VII** wurde ähnlich wie Tris(hydroxymethyl)aminomethan **V** durch eine Schutzgruppenstrategie modifiziert. Auch hierbei war es möglich, ein hydrophobes Molekül **VIII** darzustellen, das über zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen verfügt. Zusätzlich war die OH-Gruppe durch einen Benzylether vor weiteren Umsetzungen geschützt.

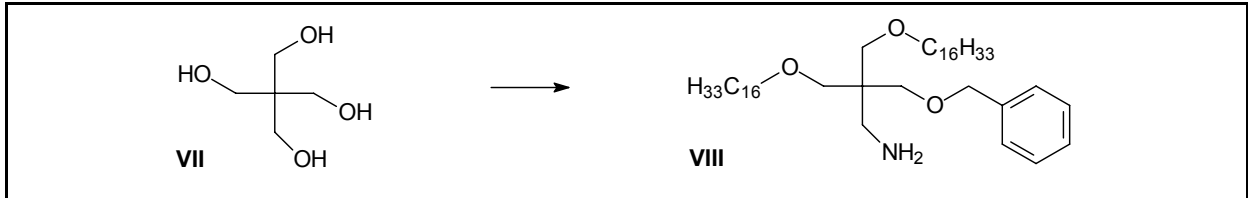


Abb. 8: Pentaerythrit-Derivate

Ausgehend vom Glycerol **IX** wurden so genannte pH-sensitive Verbindungen synthetisiert. Es handelt sich hierbei um hydrophobe Ketale mit freier OH-Gruppe. Diese wurde via Mesylat in das entsprechende Amin umgewandelt. Als funktionelle Gruppe konnte das Amin mit einer Aminosäure zum Amid **X** umgesetzt werden.

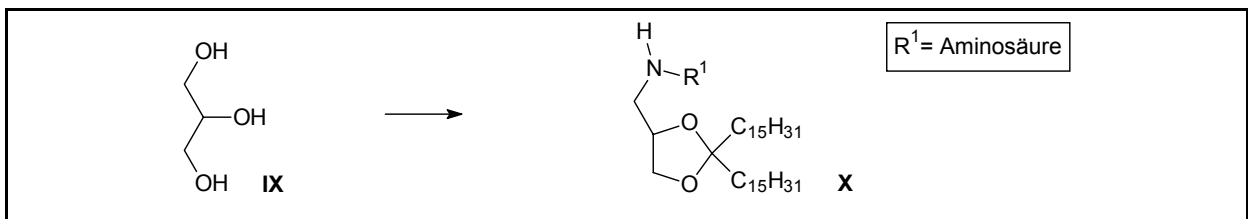


Abb. 9: Glycerolderivate

Glycerol **IX** wurde weiterhin als Ausgangsstoff für die Synthese eines neuartigen Helferlipides mit zwei bzw. drei hydrophoben Alkylketten verwendet **XI**. Für diese Verbindungen waren bereits Synthesen beschrieben, die jedoch hinsichtlich Darstellung, Aufarbeitung und Ausbeuten modifiziert wurden. Sie basieren auf den Grundlagen der Phospholipidsynthesen.

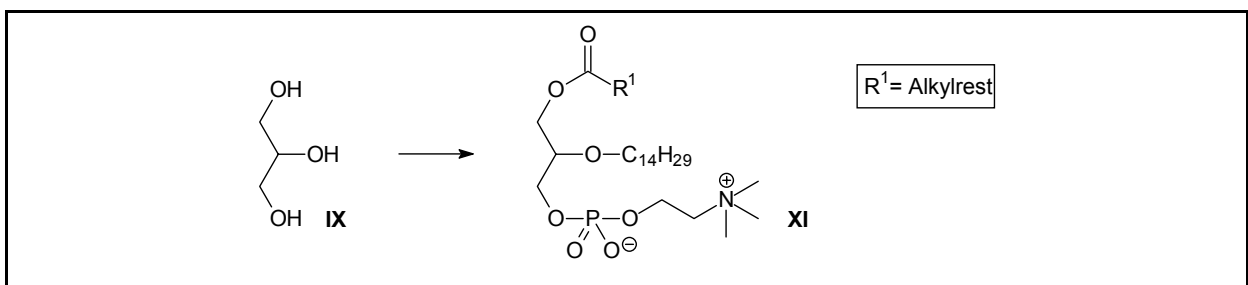


Abb. 10: Helferlipide

Weiterhin sollten die dargestellten Lipide nach Möglichkeit eine hohe Transfektionsrate bei gleichzeitig niedriger Toxizität gewährleisten. Durch Verwendung geeigneter Kopfgruppen konnte die Transfektionsrate im Vergleich zu bekannten Transfektionslipiden gesteigert werden. Um die Toxizität möglichst niedrig zu halten, wurden gering bis nicht toxische Ausgangsverbindungen verwendet. Bei den Bindungen in den Molekülen handelt es sich hauptsächlich um die auch natürlich vorkommenden Amidbindungen.

6. Darstellung von lipophilen Malonsäurediamiden als Transfektionslipide

6.1. Malonsäureester als Ausgangsverbindungen für die Synthese neuartiger Transfektionslipide

Im Rahmen der Aufgabenstellung wurden neuartige Verbindungen synthetisiert, die für die nicht virale Gentransfektion eingesetzt werden sollten. Aufgrund ihrer vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten erwies sich die Malonsäure als eine sehr gut geeignete Ausgangsverbindung. Sie wird, zumeist in Form ihres Diethylesters, für zahlreiche Synthesen genutzt. Als reaktive Methylenkomponente wird der Malonsäureester zum Beispiel bei der *Knoevenagel-Reaktion*⁴⁸, einem Spezialfall der Aldolkondensation, verwendet. Unter reaktiven Methylenverbindungen oder CH-aciden Komponenten versteht man Verbindungen, in denen eine CH₂-Gruppierung von zwei elektronenziehenden Substituenten flankiert wird.

Weiterhin sind die *Malonestersynthesen*⁴⁸ von großer präparativer Bedeutung. Bei ihnen ist das Carbanion der entscheidende Reaktionsträger. Wie beschrieben⁴⁸, weist die im Malonester enthaltene CH₂-Gruppe eine hohe CH-Acidität auf, und kann durch Basen in das Anion überführt werden. Dieses Anion reagiert leicht mit Elektrophilen und kann mit Alkylhalogeniden zum Alkylmalonester umgesetzt werden. Es handelt sich um eine nukleophile Substitution am Alkylhalogenid, wobei das Anion der CH-aciden Komponente als nukleophiles Reagens fungiert. Eine Wiederholung dieses Prozesses ermöglicht die Einführung eines weiteren Alkyl-Restes unter Bildung des Dialkylmalonesters, der via Malonsäure in die freie Monocarbonsäure umgewandelt werden kann. Aufgrund dieser Eigenschaften und der sich damit ergebenden mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeiten, wurde der Malonsäureester als eine neue Ausgangsverbindung für die Synthese von Transfektionslipiden gewählt.

6.2. Alkylierung von unterschiedlichen Malonsäureestern

Entsprechend der in der Einleitung erwähnten Forderung an die Struktur effizienter Transfektionslipide sollten die Verbindungen im hydrophoben Bereich über zwei Alkylketten verfügen. In einem ersten Schritt wurden die Malonsäureester mit Natriumhydrid als Base und Hexadecylbromid **2a** als alkylierendem Agens in absolutem Toluol nach einer in der Arbeitsgruppe erprobten Vorschrift umgesetzt. Diese bekannte Reaktion führte im Fall des

Malonsäurediethylesters **1a** zu einem nahezu DC-reinen Produkt. Um jedoch eine größere Variabilität für weitere Reaktionen zu gewährleisten, sollte mit gemischten Malonsäureestern als Ausgangsverbindungen gearbeitet werden. Es handelte sich um Verbindungen, bei denen die Esterfunktionen selektiv und unabhängig voneinander verseift werden konnten. Es wurden Substanzen mit Benzylesterstruktur **1b**, die sich zur Carbonsäure hydrieren lassen, und Tertiärbutylester **1c** ausgewählt. Ester tertiärer Alkohole lassen sich basisch nur noch sehr schwer verseifen. Die sauer katalysierte Reaktion verläuft hingegen sehr leicht. Dabei entsteht über den protonierten Ester die Carbonsäure und ein energiearmes tertiäres Alkylkation, das je nach Reaktionsbedingungen zu einem tertiär-Alkanol oder/und Isobuten weiterreagiert.

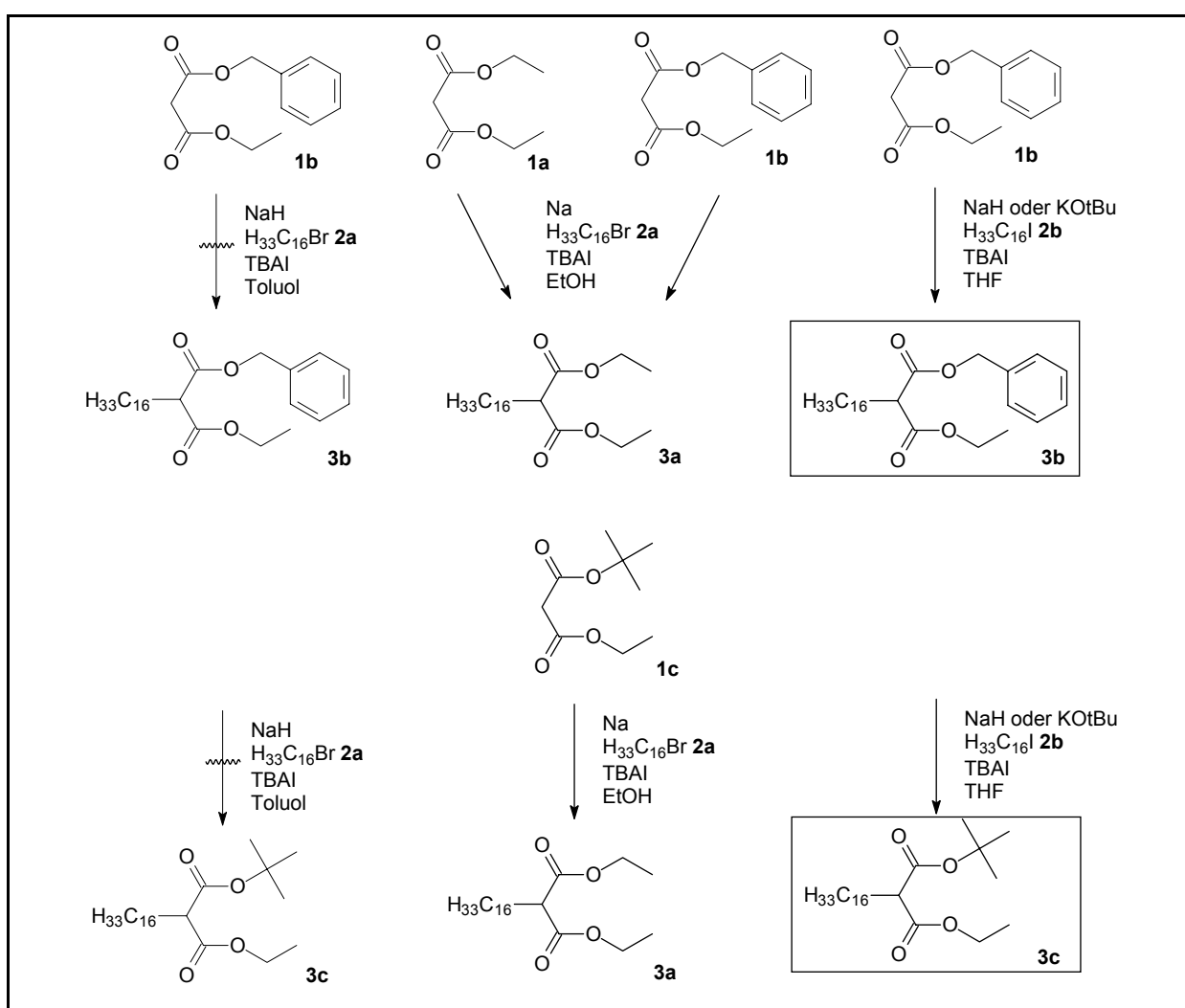


Abb. 11: Alkylierung unterschiedlicher Malonsäureester.

Die Alkylierung des gewählten Malonsäurebenzylethylesters **1b** und des Malonsäure-tertiärbutylethylesters **1c** erwies sich als weitaus schwieriger als erwartet. Die bekannte Alkylierungsmethode unter Verwendung von Toluol als Lösungsmittel führte in beiden Fällen

zu einer intermolekularen Umesterung. Ethanol führte sogar zu vollständiger Alkohololyse. Wie in der Literatur⁴⁹ beschrieben, kann diese Reaktion, im Gegensatz zur Veresterung, durch Basen katalysiert werden. Der sehr reaktive Malonsäurebenzylethylester **1b** konnte im basischen Reaktionsmilieu relativ leicht umestern. Im Allgemeinen findet eine Umesterung, genau wie die Verseifung, umso leichter statt, je einfacher die Ester gebildet werden. Sie ist stark vom Lösungsmittel, der elektrophilen Aktivität der Carbonylgruppe und von sterischen Faktoren abhängig.

Die Ester der sterisch anspruchsvollen tertiären Alkohole sind nicht durch Veresterung von Carbonsäuren darstellbar. Mit steigender Raumfüllung des Alkohols sollte die Fähigkeit zur Veresterung und Umesterung somit erschwert sein. Die Ergebnisse widersprachen jedoch diesen bei normalen Carbonsäureestern allgemeingültigen Aussagen. Entweder lag der Grund für die Umesterung beim Malonsäuremolekül selbst, oder bei den verwendeten Lösungsmitteln. Die elektrophile Aktivität der beiden Carbonylgruppen schien sich gegenseitig im besonderen Maße zu steigern, was zu einer erleichterten Umesterung auch der sterisch anspruchsvollen Ester führte. Durch seine hohe Siedetemperatur erleichterte Toluol die Umesterung zusätzlich. Im Rahmen weiterer Untersuchungen zur Alkylierung der gemischten Malonsäureester **1b,c** ergab sich, dass bei der Verwendung von Tetrahydrofuran als Lösungsmittel die Umesterung bei der Monoalkylierung weitgehend unterdrückt werden konnte. Zur weiteren Optimierung der Reaktion wurden als Alkylierungsmittel reaktive Alkyljodide **2b** eingesetzt. Diese konnten durch *Finkelstein-Reaktion*⁵⁰ aus den entsprechenden Alkylbromiden **2a** dargestellt werden. Zur Deprotonierung eignete sich neben Natriumhydrid auch sehr gut Kalium-*tert.*butylat. Aufgrund der Probleme, die sich bei der Bisalkylierung der Malonester bezüglich einer selektiven Synthese unterschiedlicher Esterkomponenten ergaben, wurde ein neues Konzept verfolgt, bei dem eine zweite lipophile Kette über eine Säureamidstruktur eingeführt werden sollte.

6.3. Malonsäuremonoamide

In einem weiteren Schritt sollte eine Estergruppe der Malonsäure mit unterschiedlichen, langkettigen primären Aminen zum Malonsäuremonoamid umgesetzt werden. Die direkte Aminolyse der Carbonsäureester erschien als sehr einfache Methode und lässt sich in der Regel bereits unter relativ milden Bedingungen durchführen. Leider konnten bei den durchgeführten Synthesen auch nach mehreren Stunden keine Umsetzungen festgestellt werden. Es kam lediglich zu den schon bekannten Umesterungen.

Es gibt jedoch eine Vielzahl weiterer Methoden um N-substituierte Amide zu synthetisieren. Diese verlaufen immer über eine freie Carboxylfunktion. Deshalb erfolgte zunächst die

Monoverseifung der Alkylmalonsäureester **3a-c** zu den Monoestern **4a,b**. Die Hydrierung von **3b** an Pd/C 5% gelang in einem Schritt und erfolgte nahezu quantitativ. Bei den alkalischen Verseifungsreaktionen musste in einem zweiten Schritt die Säure aus ihren Salzen freigesetzt werden. Dies erfolgte unter Eiskühlung mit verdünnter Salzsäure.

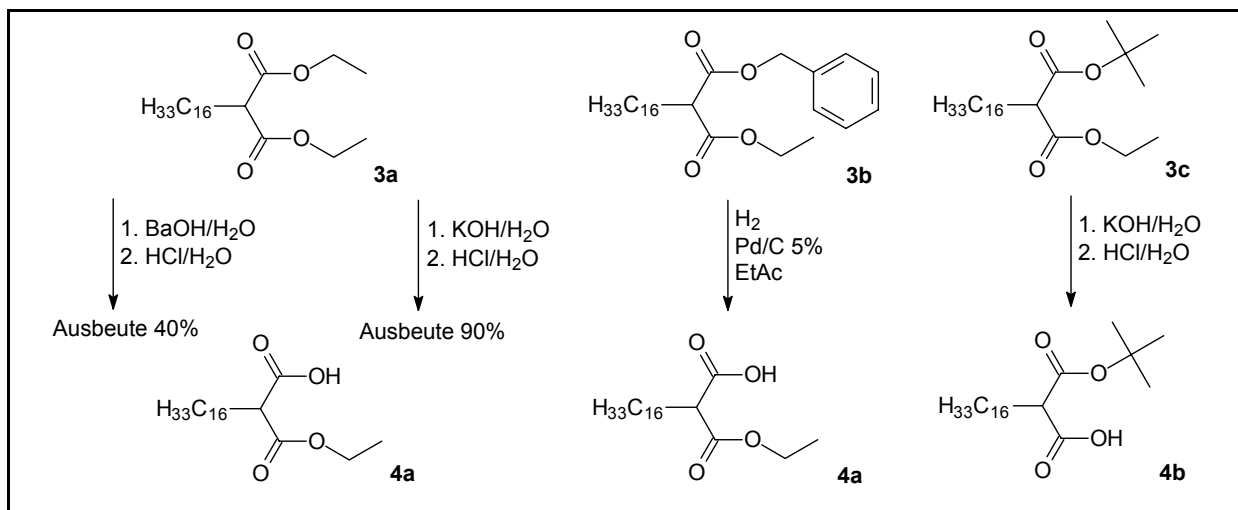


Abb. 12: Verseifungsreaktion unterschiedlicher Alkylmalonester.

Bei der Hydrolyse von Malonsäureestern ist die erste Estergruppe nach *Breslow*⁵¹ leichter hydrolysierbar als die zweite. Um daher auch aus dem Diethylester **3a** den entsprechende Halbester **4a** zu erhalten, wurde auf eine in der Literatur beschriebene Methode zurückgegriffen, bei welcher der Dimethylester mit der für eine Halbverseifung berechneten Menge Bariumhydroxid umgesetzt wird⁵². Bei der Verwendung von Kaliumhydroxid anstelle von Bariumhydroxid konnten die Ausbeuten um einiges gesteigert werden, so dass dieses Verfahren auch aufgrund seiner sehr einfachen Durchführung zur Methode der Wahl bei der Darstellung von Halbestern wurde. Auch Verbindung **3c** konnte unter Erhalt der Tertiärbutylesterstruktur mit Kaliumhydroxid verseift werden. Die Kaliumsalze ließen sich gut absaugen und somit von nicht umgesetzten Diestern abtrennen. Das Waschen des Rückstandes mit Ether lieferte diesterfreie Produkte. Der in der Mutter- bzw. Waschlauge enthaltene Diester konnte erneut eingesetzt werden. Nach dem Ansäuern des Kaliumsalz-Niederschlags und Extrahieren mit Ether befanden sich lediglich die Halbestern **4a,b** in Lösung. Nach dem Einengen und der Umkristallisation aus Heptan wurden die Halbestern DC-rein erhalten. Destillation und aufwendiges Chromatographieren entfielen somit.

Auf direktem Wege ließen sich die freigesetzten Säuren **4a,b** nicht mit langkettigen Aminen **7a,b** umsetzen, weil hierbei die erwartete Salzbildung einsetzte. Außerdem ist die Carbonylaktivität der Carbonsäuren nur sehr gering.

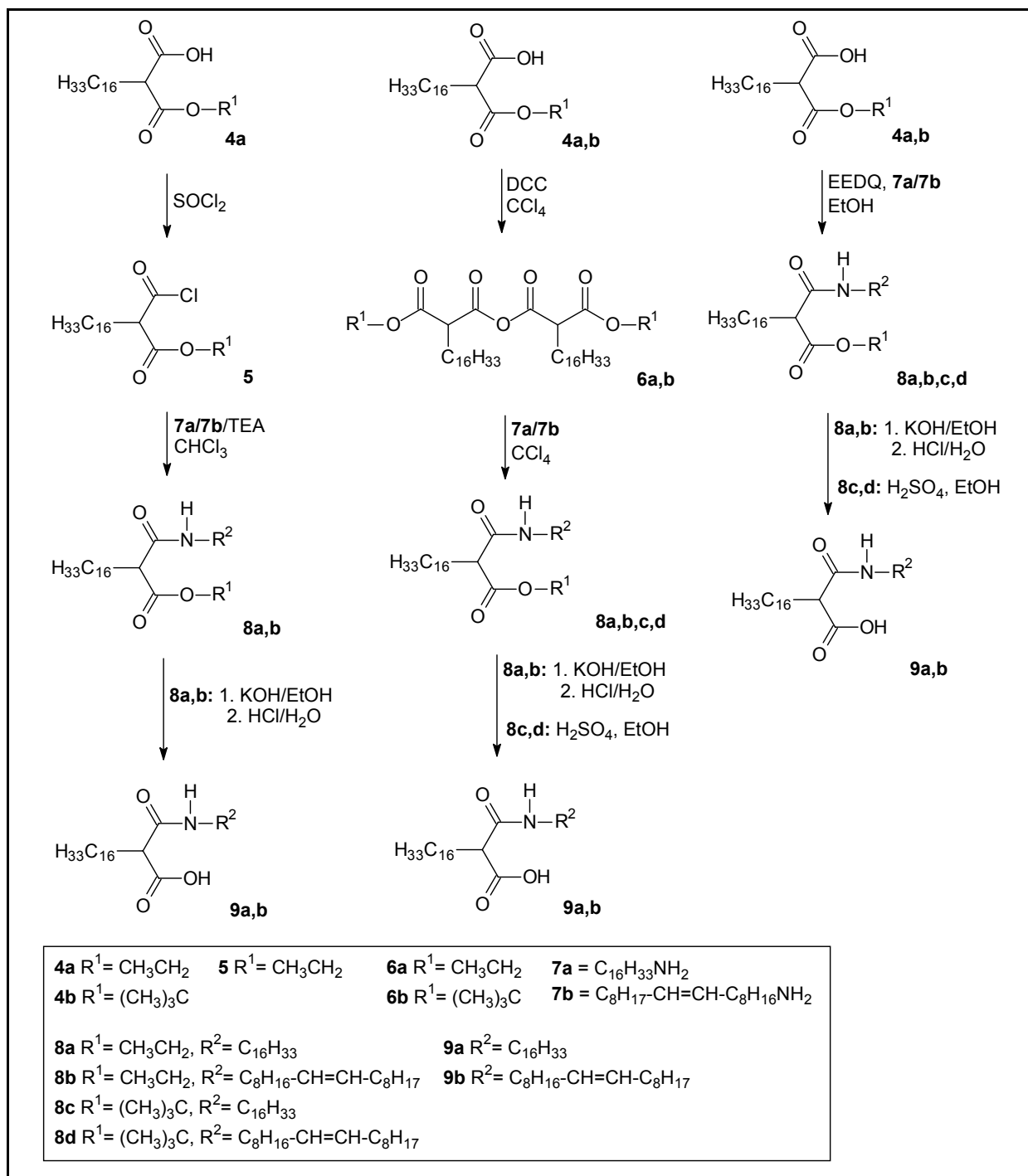


Abb. 13: Kupplungsreaktionen der Carbonsäuren zum Amid.

Nach der Säurechlorid-Methode wurde der Malonsäuremonoethylester **4a** zunächst in das reaktive Säurechlorid **5** überführt, und dieses dann mit Hexadecylamin **7a** oder Oleylamin **7b** umgesetzt. Die Darstellung von **5** aus den Halbestern erfolgte durch Umsetzung mit Thionylchlorid und bereitete keine Schwierigkeiten. Die Aminolyse der Acylhalogenide wurde unter Eiskühlung und Zusatz von Triethylamin als säurebindendem Mittel durchgeführt. Das entstandene Amid **8a** fiel aus und konnte abgesaugt werden. Um von ebenfalls entstandenem Triethylaminhydrochlorid abzutrennen, wurde der Rückstand mehrmals mit

Wasser gewaschen, dann im Exsikkator getrocknet und aus Aceton umkristallisiert. Im Gegensatz dazu konnte das wesentlich besser lösliche Produkt **8b** aus der Umsetzung mit Oleylamin **7b** nicht umkristallisiert werden, so dass eine säulenchromatographische Aufreinigung erforderlich war. Für die weiteren Umsetzungen sollte sich die höhere Fluidität dieser Verbindung jedoch als sehr vorteilhaft erweisen. Neben der Darstellung der Amide über die entsprechenden Säurechloride kam auch das energiereiche Säureanhydrid **6** unter Verwendung der *Carbodiimid-Methode* zum Einsatz. Hierbei erfolgte die Überführung der Säure in sein Anhydrid mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) unter Abspaltung von N,N'-Dicyclohexylharnstoff⁵³. Bei der Verwendung von Tetrachlormethan als Lösungsmittel konnte dieser durch einfaches Abfiltrieren leicht aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Das in Lösung vorliegende Anhydrid wurde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Amin versetzt und, um die Ausbeute zu verbessern, mit weiterem DCC versetzt. Nach einer Reaktionszeit von etwa 5 Stunden war die Bildung des Amides praktisch abgeschlossen. Auch bei dieser Reaktion erhielt man das Produkt nahezu DC-rein und es konnte durch einfache Umkristallisation oder Chromatographie weiter aufgereinigt werden. Als weitere recht interessante Möglichkeit wurde ein Kupplungsreagenz verwendet, welches bei der Knüpfung von Peptidbindungen Anwendung findet. Die Pseudobase EEDQ erlaubt es, Aminosäuren in einem Schritt mit hohen Ausbeuten und ohne Racemisierung miteinander zu koppeln^{54,55}. Mit großem Erfolg konnte dieses Reagenz auch bei den dargestellten Amidien verwendet werden. Eine Suspension aus Halbester, Amin und Reagens in abs. Ethanol wurde für 24 Stunden bei 50 °C gerührt. Wiederum konnte das Produkt, nach Aufarbeitung, zur Aufreinigung aus Aceton umkristallisiert oder chromatographiert werden. Es gelang weiterhin die Halbester **4a,b** mit den entsprechenden Aminen sowohl nach der *Carbodiimid-Methode* als auch unter Verwendung von EEDQ zum Amid umzusetzen.

Mit den vorgestellten Methoden wurden die gewünschten Produkte in guter Ausbeute und Reinheit erhalten. Die Synthesen ließen sich mit geringem präparativen Aufwand durchführen, wobei die Umsetzung mit EEDQ als Einstufenreaktion durchgeführt werden konnte. In einem weiteren Schritt wurde die am Molekül verbliebene Esterstruktur zu den Carbonsäuren **9a,b** hydrolysiert. Dies erfolgte im Fall der Ethylester **8a,b** im stark alkalischen Milieu durch Kaliumhydroxid. Die freien Carbonsäuren **9a,b** wurden aus dem entstandenen Kaliumsalz durch Zusatz der äquivalenten Menge Salzsäure freigesetzt. Die Hydrolyse des Tertiärbutylesters erfolgte unter Verwendung von verdünnter Schwefelsäure. In beiden Fällen und sowohl bei der Verbindung mit der gesättigten **9a**, als auch der ungesättigten **9b** Kette konnte das Rohprodukt aus Heptan umkristallisiert werden. Dies stellte eine sehr effiziente Methode der Reinigung dar. Die weiter herabgesetzte Löslichkeit der Verbindung mit der gesättigten Kette **9a** erwies sich für weitere Umsetzungen jedoch als erschwerend.

6.4. Malonsäurediamide

Die erhaltene, freie Carboxylfunktion wurde in einem letzten Schritt mit unterschiedlich strukturierten Aminen zum Amid gekuppelt. Die Amine sollten nach Möglichkeit, unter Umgehung einer eventuell auftretenden Schutzgruppenproblematik, direkt mit der Säure umgesetzt werden. Es wurden die Amine **14a-c** als hydrophiler Bestandteil der Lipide ausgewählt. In Erwartung ähnlicher Erfolge wurden die schon angewandten Methoden zur Amidknüpfung genutzt. Leider blieben die Ergebnisse weit hinter den Erwartungen zurück. Lediglich die *Carbodiimid-Methode* erwies sich in modifizierter Variante als hinreichend sinnvoll. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen herkömmlichen Überführung der Säure in ihre Anhydride mit DCC erfolgte nun die Aktivierung mit N-Hydroxysuccinimid/DCC und anschließender Umsetzung mit Amin⁵⁶, wie sie auch schon *Schmidt*⁵⁷ erfolgreich genutzt hat. Eine mögliche, direkte Aminolyse des ursprünglichen Ethylesters führte auch bei hohen Temperaturen in keinem Fall zum gewünschten Umsatz. Die Überführung der Carbonsäuren in die entsprechenden Säurechloride durch Thionylchlorid konnte aufgrund der starken Zersetzungserscheinungen des Malonsäuremonoamides keine Verwendung finden. Selbst das bisher mit einigem Erfolg eingesetzte Kupplungsreagenz EEDQ führte nur zu sehr geringen Umsetzungen. Da die Malonsäurediamide **15a-f** aber die vorerst letzte Stufe dieser Synthesestrategie sein sollten, wurden weitere Untersuchungen zur Amidknüpfung durchgeführt. Die sogenannte *Azolid-Methode*^{58,59,60} stellte sich als eine sehr vielversprechende Möglichkeit heraus. Bei der Umsetzung der Carbonsäure **9a,b** mit der äquimolaren Menge N,N'-Carbonyldiimidazol bei Raumtemperatur in Tetrahydrofuran bildete sich intermediär ein energiereiches Säureimidazolid **11a,b**, das mit dem entsprechenden Amin leicht zu dem betreffenden Amid reagierte. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das finale Produkt in moderaten Ausbeuten erhalten. Dies war Grund genug, weitere Kupplungsreagenzien zu testen. BOP stellte ein weiteres aus der Peptidsynthese sehr bekanntes Reagens dar^{61,62}. Die Carbonsäure reagierte mit BOP unter Bildung eines sehr reaktiven Phosphoniumsalzes **12a,b**, welches unter den gegebenen Bedingungen zu einem Benzotriazolylester weiterreagierte. Die Amine waren nukleophil genug um sowohl mit dem Zwischenprodukt, als auch dem weniger reaktiven Benzotriazolylester **13a,b** unter Ausbildung einer Amidbindung zu reagieren⁶³. Bei Raumtemperatur wurden zu einer Lösung der Säure, des entsprechenden Amins und BOP in Methylenchlorid einige Tropfen Triethylamin als Hilfsbase hinzugefügt. Die Reaktion setzte praktisch sofort ein und war dünnschichtchromatographisch verfolgt, nach 4 Stunden abgeschlossen. Im Falle der gesättigten Malonsäurediamide **15a-c** konnte das erhaltene Rohprodukt durch Umkristallisation aus Heptan gereinigt werden.

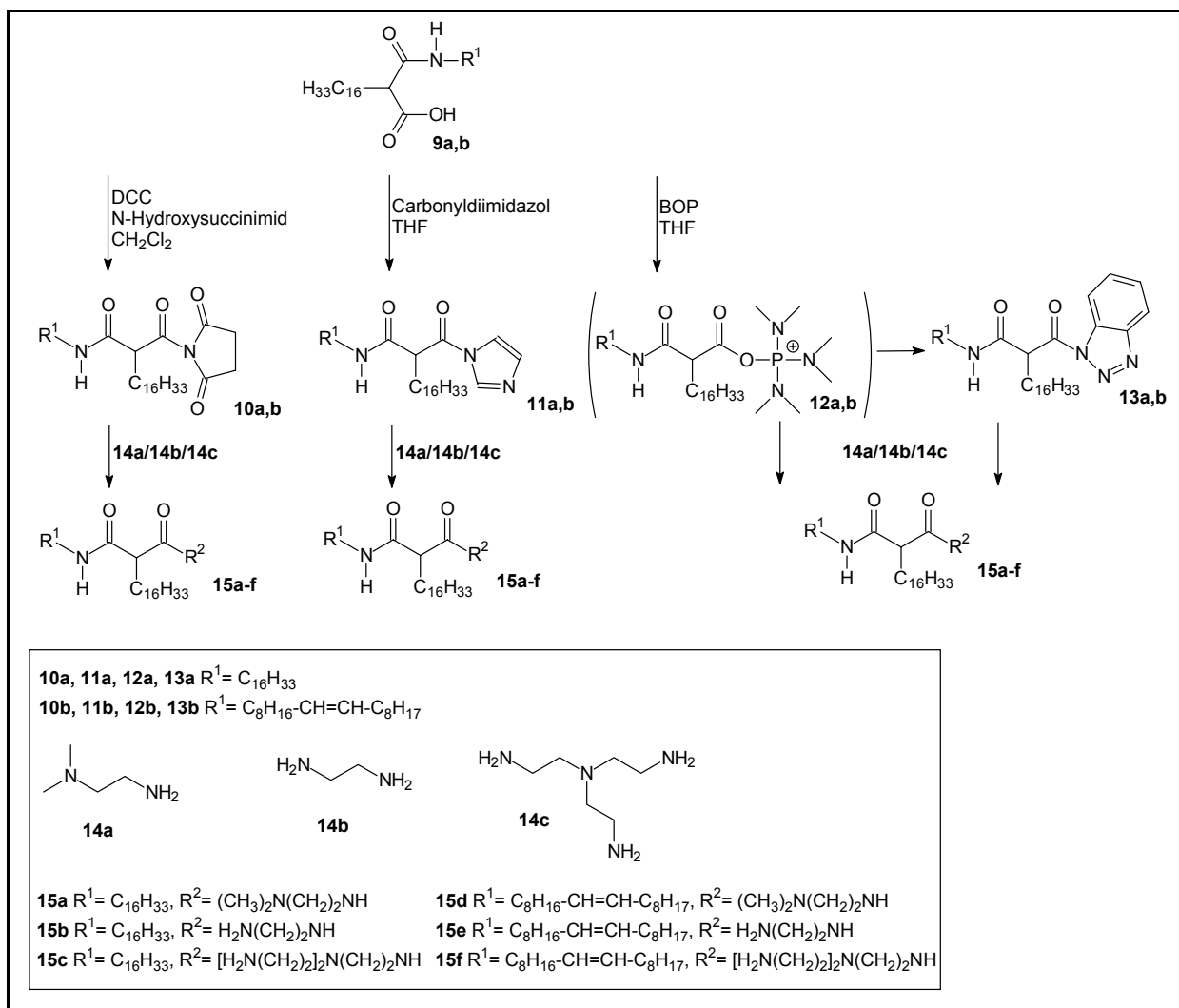


Abb. 14: Darstellung der Malonsäurediamide.

Die Reaktionsbedingungen waren sehr mild, die Reaktionsführung war denkbar einfach und auch die Aufreinigung der in guten Ausbeuten erhaltenen Produkte erwies sich in den meisten Fällen als einfach und schnell. Die Malonsäurediamide **15a-f** standen nun als Substanzen für die Gentransfektion zur Verfügung.

7. Darstellung von Gemini-Lipiden als Transfektionslipide

7.1. Gemini-Lipide

Gemini-Lipide stellen eine relativ junge Klasse von Verbindungen dar⁶⁴. Es handelt sich hierbei um amphiphile Moleküle mit zwei hydrophilen Kopfgruppen und zwei lipophilen aliphatischen Ketten, die durch einen starren^{65,66,67} oder flexiblen^{68,69,70} Spacer (Abstandshalter) miteinander verbunden sind.

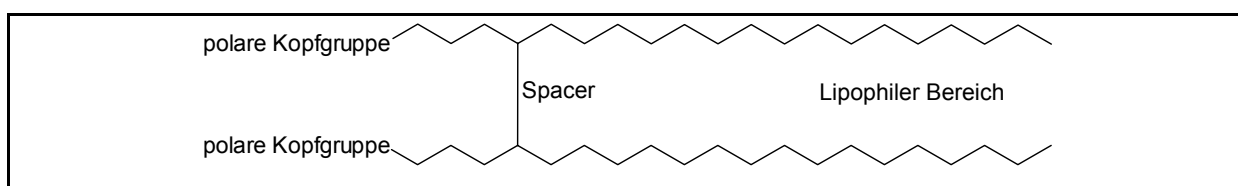


Abb. 15: Allgemeiner Aufbau von Gemini Lipiden.

Das Gemini-Design erlaubt es, durch unterschiedliche Synthesestrategien, einen sehr großen Pool an Verbindungen darzustellen^{71,72,73,74}. Dies sollte intensive Untersuchungen zur Strukturaktivität ermöglichen^{75,76,77,78}. Der zentrale Spacer kann von jedem beliebigen System mit zweifacher Symmetrie abgeleitet werden, oder selbst durch Verknüpfung zweier ausgesuchter Moleküle synthetisiert werden⁷⁹. Im Gegensatz zu den entsprechenden monovalenten Substanzen verfügen Gemini-Lipide über eine wesentlich höhere Oberflächenaktivität, die nicht nur der Verdopplung der Eigenschaften „normaler“ amphiphiler Moleküle entspricht⁸⁰. Dies macht diese Verbindungsklasse für naturwissenschaftliche Anwendungen besonders interessant. Ihre Verwendung auf dem Gebiet der Gentransfektion sollte Fortschritte in Effizienz und Handhabung erbringen⁸¹. Aus diesem Grund wurden neue Substanzen synthetisiert⁸², die das Spektrum der schon bekannten Verbindungen erweitern. Um eventuelle Toxizitätsprobleme zu minimieren, basierten die dargestellten Verbindungen auf natürlich vorkommenden Untereinheiten, so dass sie nach Möglichkeit biologisch abbaubar sein sollten.

7.2. Gemini-Lipide ausgehend von alkylierten Malonsäureestern

Aufgrund der vorliegenden Erfahrung dienten als Ausgangsverbindungen wiederum die homogenen und gemischten Ester der Malonsäure. Diese wurden einer Alkylierungsreaktion mit langkettigen Alkylhalogeniden unterworfen.

Im Anschluss daran wurden die Monoalkyl- β -dicarbonylverbindungen **3b,c** über Spacer durch eine Bisalkylierungsreaktion miteinander verknüpft. Bei den Alkylierungsreagenzien handelte es sich um die unterschiedlichen Dihalogenide **16a,b,c**.

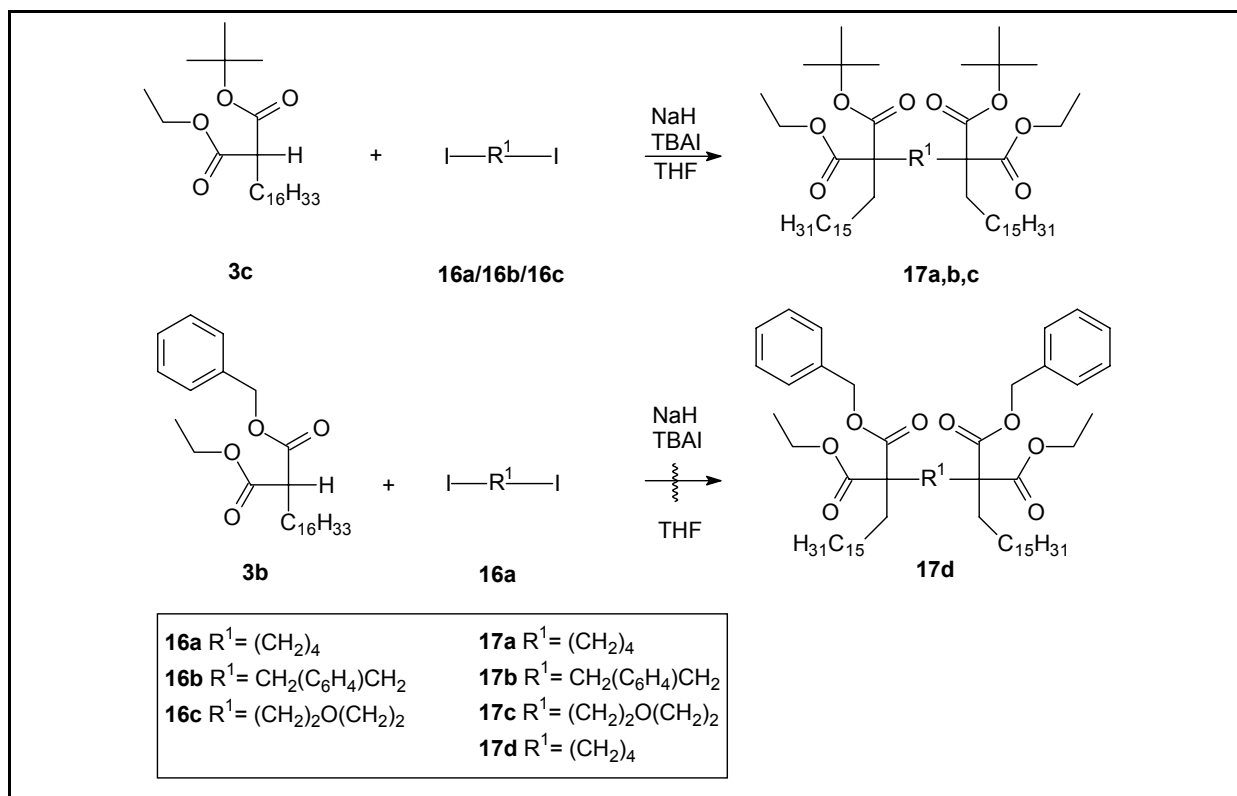


Abb. 16: Verknüpfung von alkylierten Malonsäurederivaten.

Generell war damit zu rechnen, dass diese Reaktion nur unvollständig erfolgt, da die Acidität der Monoalkyl- β -dicarbonylverbindungen geringer ist, als die der unsubstituierten Grundkörper. Außerdem ist bekannt, dass die Reaktionsfähigkeit der Alkylierungsreagenzien mit sinkender Bindungsstärke des Halogenatoms abnimmt⁴⁹. Da Iod im Vergleich zu Brom die bessere Abgangsgruppe bei C-Alkylierungsreaktionen darstellt, wurden die entsprechenden Bis-Iodide verwendet. Die für das Gemini-Design erforderliche Verknüpfung sollte nach Möglichkeit in einer Stufe durchgeführt werden. Um den Anteil an nicht verbrückten Nebenprodukten möglichst gering zu halten, wurde deshalb der alkylierte Malonester im molaren Verhältnis zwei zu eins mit den entsprechenden Dihalogeniden bisalkyliert. Die Überführung der β -Dicarbonylverbindungen in ihre Salze erfolgte üblicherweise mit Natriumhydrid oder Kalium-*tert.*butylat in absolutem Tetrahydrofuran. Wie erwartet, erfolgte die Bildung der Produkte nur sehr langsam, so dass Reaktionszeiten von bis zu 20 Stunden in Kauf genommen werden mussten. Möglicherweise führte dies im Fall der gemischten Ester zu der schon bekannten Umesterung. Neben nicht verbrückten Substanzen wurden bei den Produkten mit Benzylesterstrukturen **17d** alle theoretisch

möglichen Umesterungsvarianten erhalten. Dies konnte durch massenspektroskopische Untersuchungen belegt werden. Weitere Untersuchungen hinsichtlich Deprotonierungsreagenz, Lösungsmittel und Alkylierungsmittel bestätigten die Tendenz zur Umesterung und führten zu keinem einheitlichen Produkt. Eine Zweitalkylierung von Malonsäurebenzylethylester **3b** war aus diesem Grund nicht realisierbar. Interessanterweise ließ sich der alkylierte Malonsäure-*tert.*butylethylester **3c** relativ glatt bisalkylieren. Es erfolgten auch Umesterungsreaktionen welche jedoch vermieden werden konnten, wenn die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes unmittelbar nach der etwa zehnstündigen Reaktionszeit erfolgte. Dies führte zu einem höheren Anteil an Monoalkylierungsprodukt, das jedoch relativ einfach säulenchromatographisch abgetrennt und für weitere Reaktionen eingesetzt werden konnte. Ohne Probleme ließ sich der Malonsäurediethylester **3a** zu den entsprechenden Geminstrukturen umsetzen.

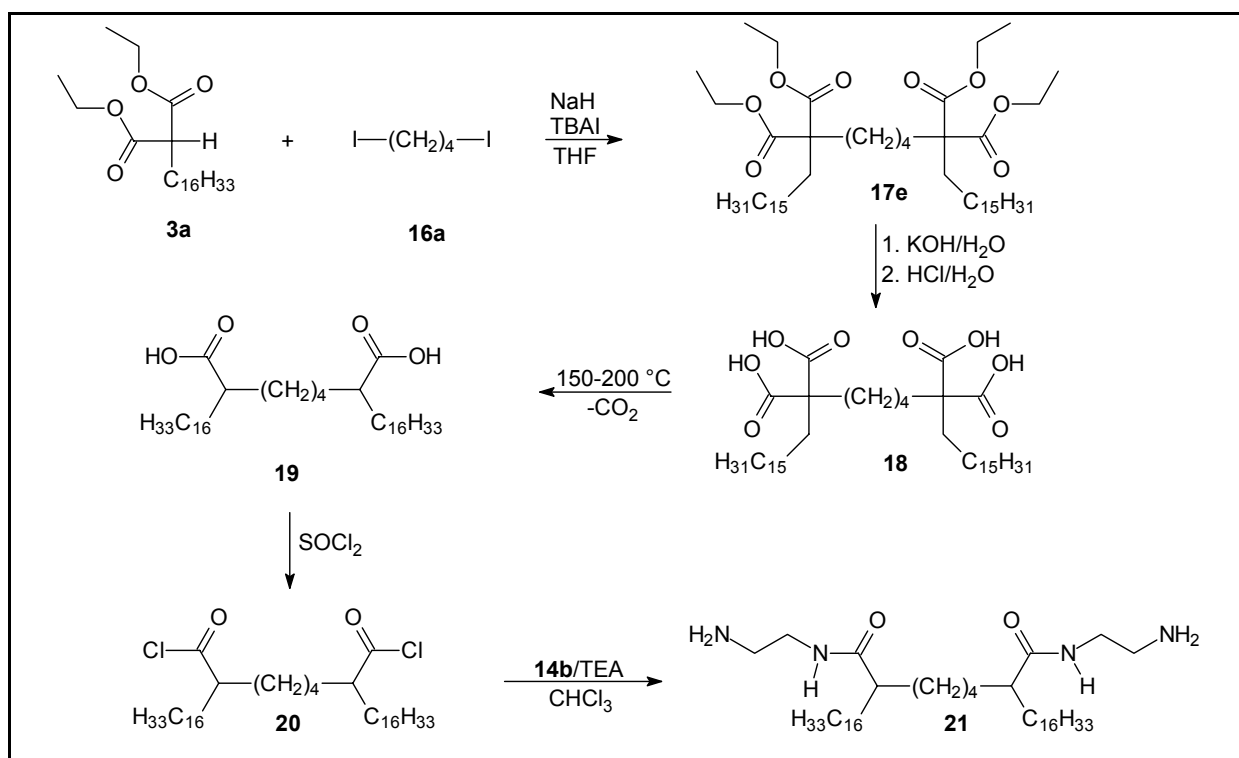


Abb. 17: Darstellung von Dihexadecyloctandiamid.

Eine selektive Hydrolyse konnte bei ihm jedoch nicht durchgeführt werden. Deshalb wurden in einer Reaktion alle vorhandenen Esterstrukturen verseift. Die vollständige Hydrolyse erfolgte nur sehr schwer. Sie erforderte lange Reaktionszeiten, hohe Temperaturen und stark alkalische Reaktionsbedingungen. Die Tetracarbonsäure **18** wurde aus dem entstandenen Kaliumsalz durch Zugabe von Salzsäure freigesetzt und aus Heptan umkristallisiert. Weiterhin wurden diese Verbindungen trocken und bei hohen Temperaturen decarboxyliert,

so dass die nahezu DC-reine Dicarbonsäure **19** zurückblieb. Der Mechanismus der Decarboxylierung wird im Kapitel 8 näher erläutert.

Bei den gemischten Estern **17a,b,c** konnte eine selektive Hydrolyse durchgeführt werden. Die Tertiärbutylester blieben unter den alkalischen Bedingungen der Verseifung stabil. Die Carbonsäuren **22a,b** ließen sich durch vorsichtige Zugabe von verdünnter Schwefelsäure aus ihren Salzen freisetzen.

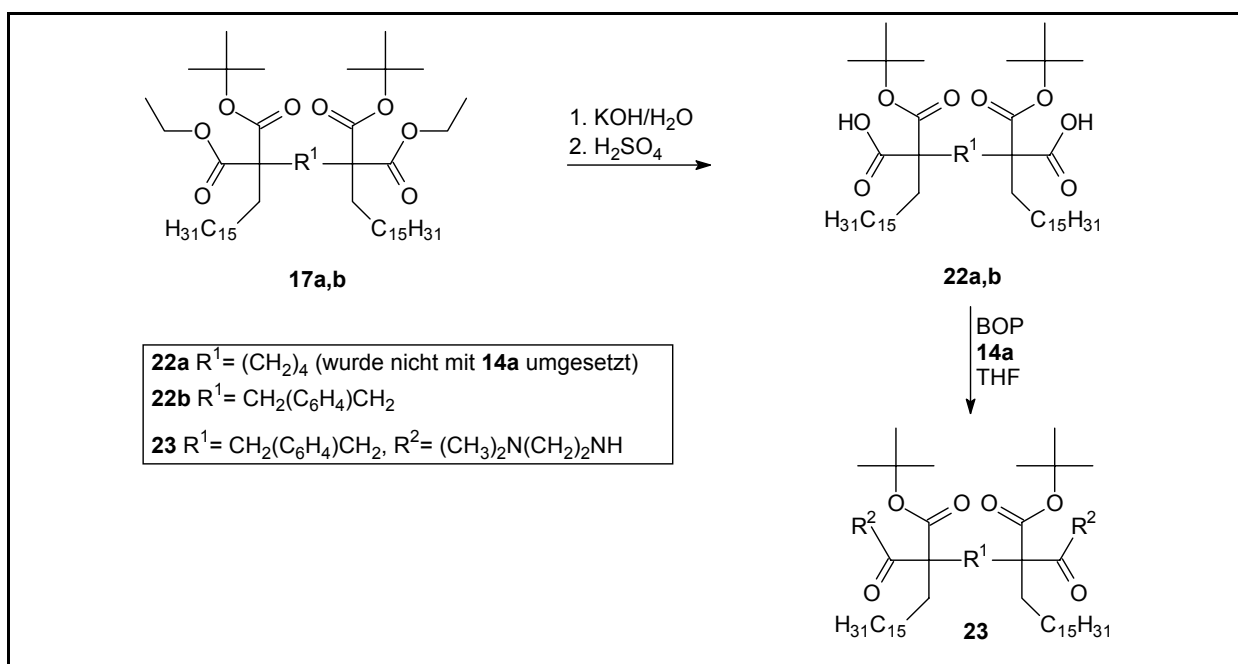


Abb. 18: Darstellung der Amide.

Als potentielle DNA-Bindungsstellen sollten in einem weiteren Schritt unterschiedliche Amine eingeführt werden. Bei der Dicarbonsäure **19** gelang dies recht einfach nach der *Säurechlorid-Methode*. Bei dem gemischten Ester **22b** wurden die bekannten Kupplungsreagenzien zur Knüpfung von Amidbindungen verwendet. Aufgrund der sterischen Hinderung durch die Tertiärbutylesterstrukturen gelangen die Umsetzungen jedoch nur schlecht und erfordern für die Zukunft weitere Untersuchungen. Polyamine ohne Schutzgruppen ließen sich gar nicht einführen. Laut Massenspektrum wurden die gewünschten Produkte erhalten, aufgrund der geringen Unterschiede der R_f-Werte war eine säulenchromatographische Auftrennung jedoch nicht möglich. So konnten die Verbindungen lediglich mit einem Amin erfolgreich umgesetzt werden, wenn auch nur mit geringen Ausbeuten.

8. Darstellung von α -verzweigten Säureamiden als Transfektionslipide

8.1. α -Verzweigte Carbonsäuren

Eine sehr einfache Methode zur Darstellung der hydrophoben Einheit von Transfektionslipiden führte über langkettig α -verzweigte Carbonsäuren. In Analogie zu bereits publizierten Arbeiten^{83,84,85} wurde die Einführung von Alkylverzweigungen unterschiedlicher Kettenlänge in die 2-Position langkettiger Carbonsäuren über eine Zweitalkylierung der entsprechenden Monoalkylmalonester **3a,d,e** durchgeführt. Die Einführung von Alkylsubstituenten in die 2-Position von Carbonsäuren über die entsprechenden Dianionen ist ebenfalls beschrieben worden⁸⁶. Aufgrund der gesammelten Erfahrungen in der Arbeitsgruppe, wurde die Methode über eine Zweitalkylierung favorisiert⁸⁷. Die Hexadecylmalonsäurediethylester sind durch Monoalkylierung von Malonsäurediethylester sowie durch Kondensation von Carbonsäureestern und Oxalsäureestern zugänglich^{88,89}. Wie in der Literatur^{90,91,92} beschrieben, entstanden bei der Monoalkylierung der Malonsäurediethylester auch Dialkylmalonsäurediethylester als Nebenprodukte, deren Bildung sich nicht unterdrücken lässt. Deshalb wurden die langkettigen Alkylmalonester im Anschluss an die Alkylierung destilliert, um sie in ausreichender Reinheit zu erhalten. Da die Acidität der synthetisierten Monoalkyl- β -dicarbonylverbindungen geringer ist, als die der unsubstituierten Grundkörper und die Dialkyl- β -dicarbonylprodukte unter den allgemeinen Bedingungen der Alkylierungsreaktion (alkoholisches Alkalialkoholat) leicht solvolytisch zu spalten sind⁹³, mussten definierte Reaktionsbedingungen für die Zweitalkylierung eingehalten werden. Auch die Ausbeuten waren in hohem Maße vom Lösungsmittel, dem Deprotonierungsreagenz und dem Alkylierungsmittel abhängig. Aus diesem Grund wurden Toluol bzw. Xylol als Lösungsmittel mit hohen Siedepunkten verwendet. Die Deprotonierung der Alkylmalonsäurediethylester erfolgte mit Natriumhydrid. Eine Alkylierungszeit von 12-16 Stunden erwies sich als optimal. Die nach der Aufarbeitung erhaltenen rohen Dialkylmalonester **24a,b,c** wurden nicht destillativ gereinigt, sondern gleich durch alkalische Hydrolyse mit Kaliumhydroxid verseift. Die Freisetzung der Dicarbonsäuren **25a,b,c** aus ihren Salzen erfolgte durch Salzsäure in wässriger Suspension. Durch Umkristallisation aus geeigneten Lösungsmitteln wurden die Dialkylmalonsäuren DC-rein erhalten und anschließend zu den verzweigten Monocarbonsäuren **26a,b,c** decarboxyliert. Die Abspaltung von Kohlendioxid erfolgte zwischen 150-200 °C. Die Decarboxylierung ließ sich durch Säuren und schwache Basen katalytisch beschleunigen. Diese Reaktion verläuft ähnlich dem cyclischen Mechanismus,

wie er bei den Esterpyrolysen formuliert ist. Es handelt sich dabei um die pyrolytische Bildung eines Olefins, das aber in diesem Fall ein Enol ist und sofort in die energieärmere Ketoform übergeht. Dünnschichtchromatographisch nachweisbare unverzweigte Säuren konnten durch KOH-Extraktion leicht entfernt werden. Wiederum konnten die Rohprodukte durch einfaches Umkristallisieren gereinigt werden.

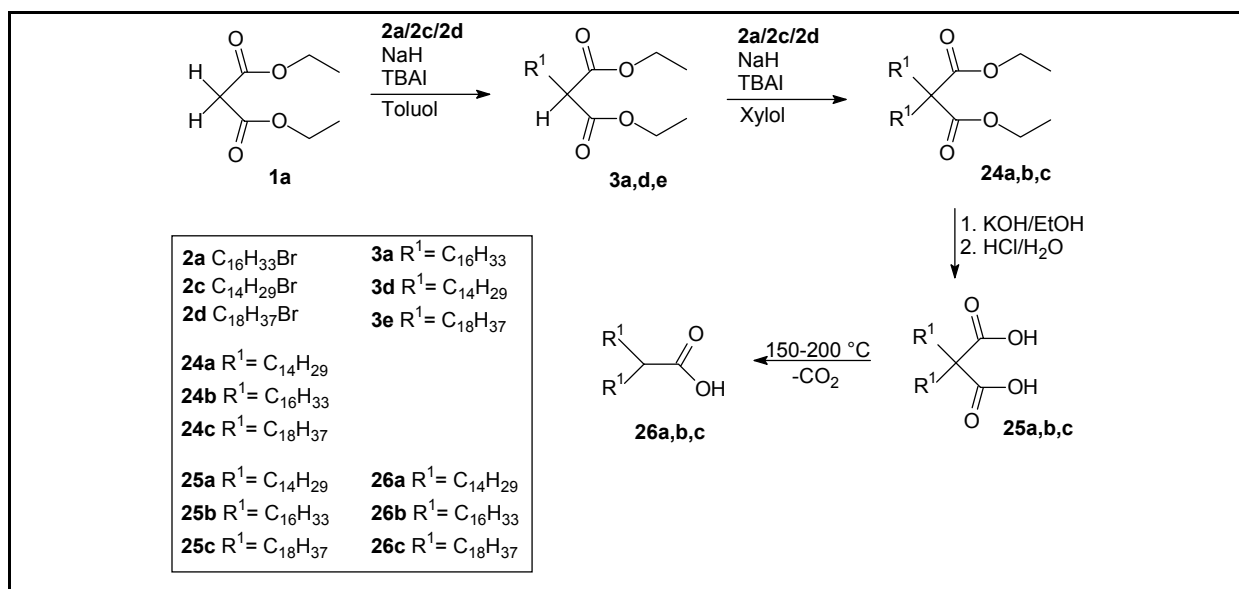


Abb. 19: Darstellung der α -verzweigten Carbonsäuren.

8.2. α -Verzweigte Säureamide

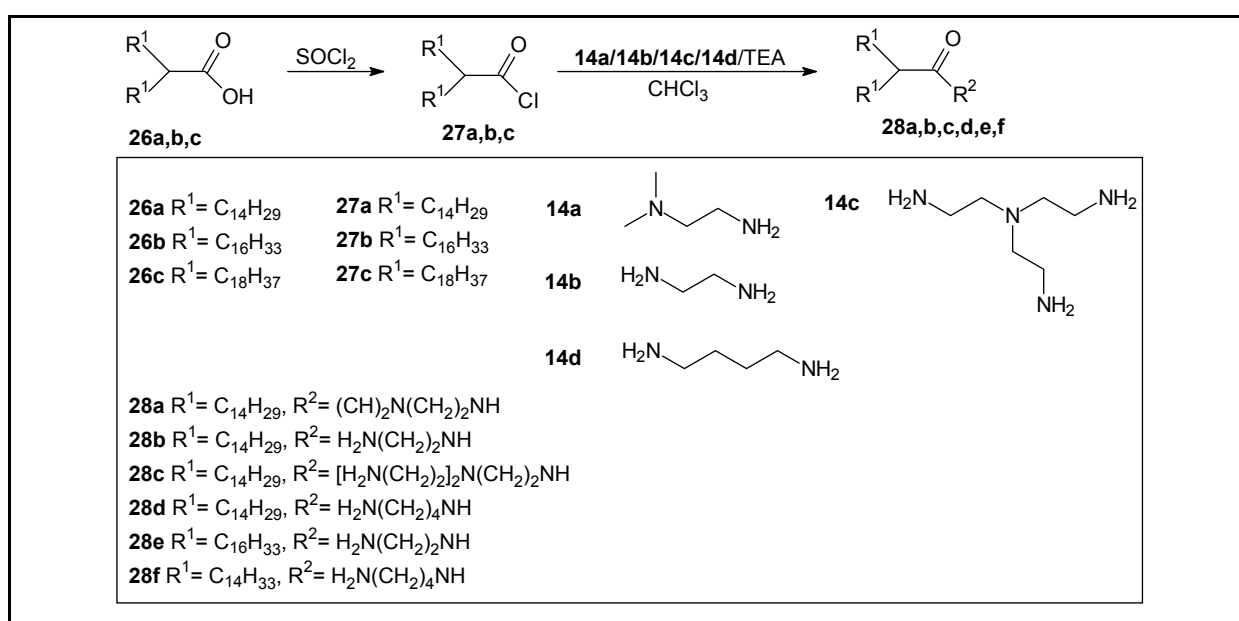


Abb. 20: Darstellung der α -verzweigten Säureamide.

Um Amine als Kopfgruppen einzuführen, wurde auf die bewährte Kupplung zu Amidien zurückgegriffen. Die α -verzweigten Säuren ließen sich durch einen Überschuss an Thionylchlorid in die entsprechend reaktiven Säurechloride überführen. Die anschließende Aminolyse war mit guten Ausbeuten verbunden. Die entstandenen Amide **28a-f** konnten aufgrund ihrer kristallinen Eigenschaften aus Heptan umkristallisiert werden.

8.3. α -Verzweigte Säurediamide

Die Verwendung der Diamine **14b,d** als Spacer ermöglichte es, die Synthesestrategie erheblich zu erweitern. Es bot sich an, die freie Aminfunktion für weitere Umsetzungen zu nutzen. Unter Verwendung einer Kombination aus DCC und 1-Hydroxybenzotriazol wurden unterschiedliche geschützte Aminosäuren **29a-h** gekuppelt⁹⁴. Als Schutzgruppen eigneten sich die Benzyloxycarbonyl- und *tert.*-Butyloxycarbonyl-Reste sehr gut. Bei der Benzyloxycarbonyl-Methode benutzt man als schützende Gruppe am Stickstoff den Benzyloxycarbonyl-Rest (früher als Carbobenzoxy-Rest (Cbo- oder Z-Rest) bezeichnet⁴⁸). Zunehmende Bedeutung erlangt weiterhin der *tert.*-Butyloxycarbonyl-Rest (BOC-Rest) als Schutzgruppe am Stickstoff. Im Fall der Aminosäure Lysin **29d** wurden die N-Schutzgruppen durch Umsetzen mit Di-*tert.*butyldicarbonat erhalten⁹⁵.

Nach erfolgter Amidbildung **30a-j** ließ sich der Cbo-Rest durch katalytische Hydrierung leicht wieder abspalten, wobei Toluol, Kohlendioxid und das gewünschte Produkt entstanden. Der *tert.*-Butyloxycarbonyl-Rest zeichnet sich dadurch aus, dass er mit starken Säuren abgespalten werden kann. Die erhaltenen Produkte **31a-j** mussten jedoch durch chromatographische Operationen aufgereinigt werden und ließen sich nicht umkristallisieren. Das vorgestellte synthetische Schema ermöglichte es, auf einfachem Wege Lipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen, Spacer oder Kettenlänge zu synthetisieren.

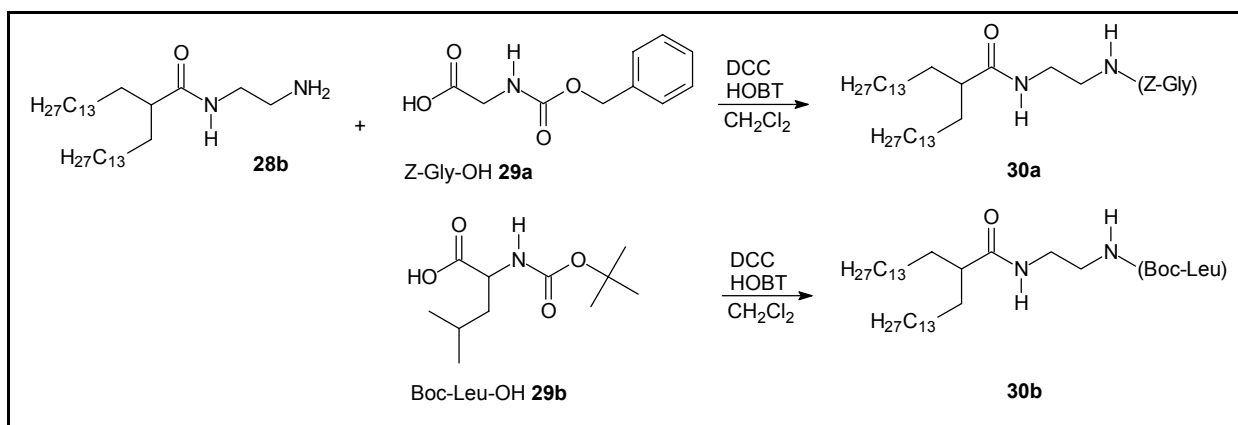
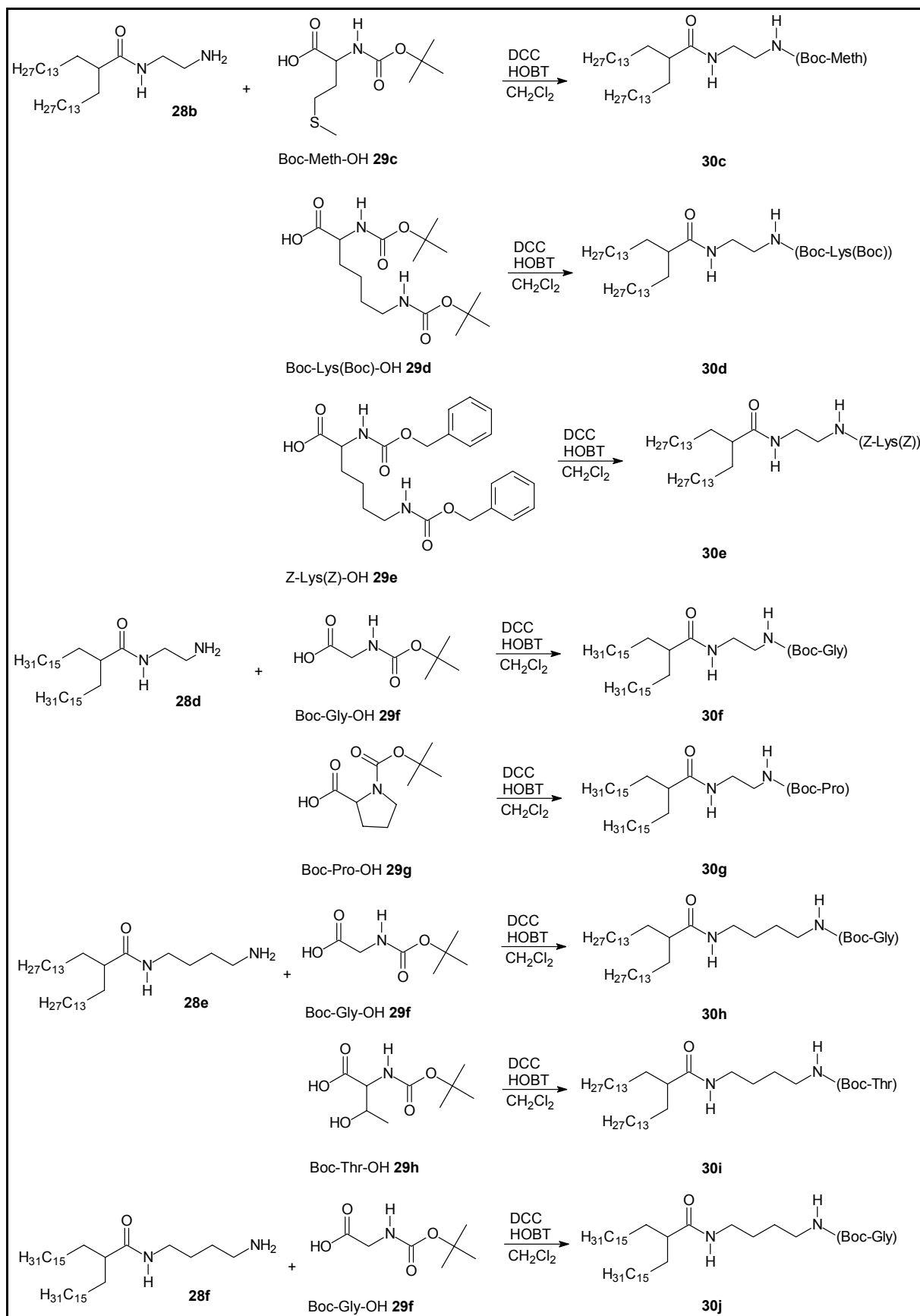


Abb. 21: Darstellung der α -verzweigten Säurediamide I.

Abb. 21b: Darstellung der α -verzweigten Säurediamide II.

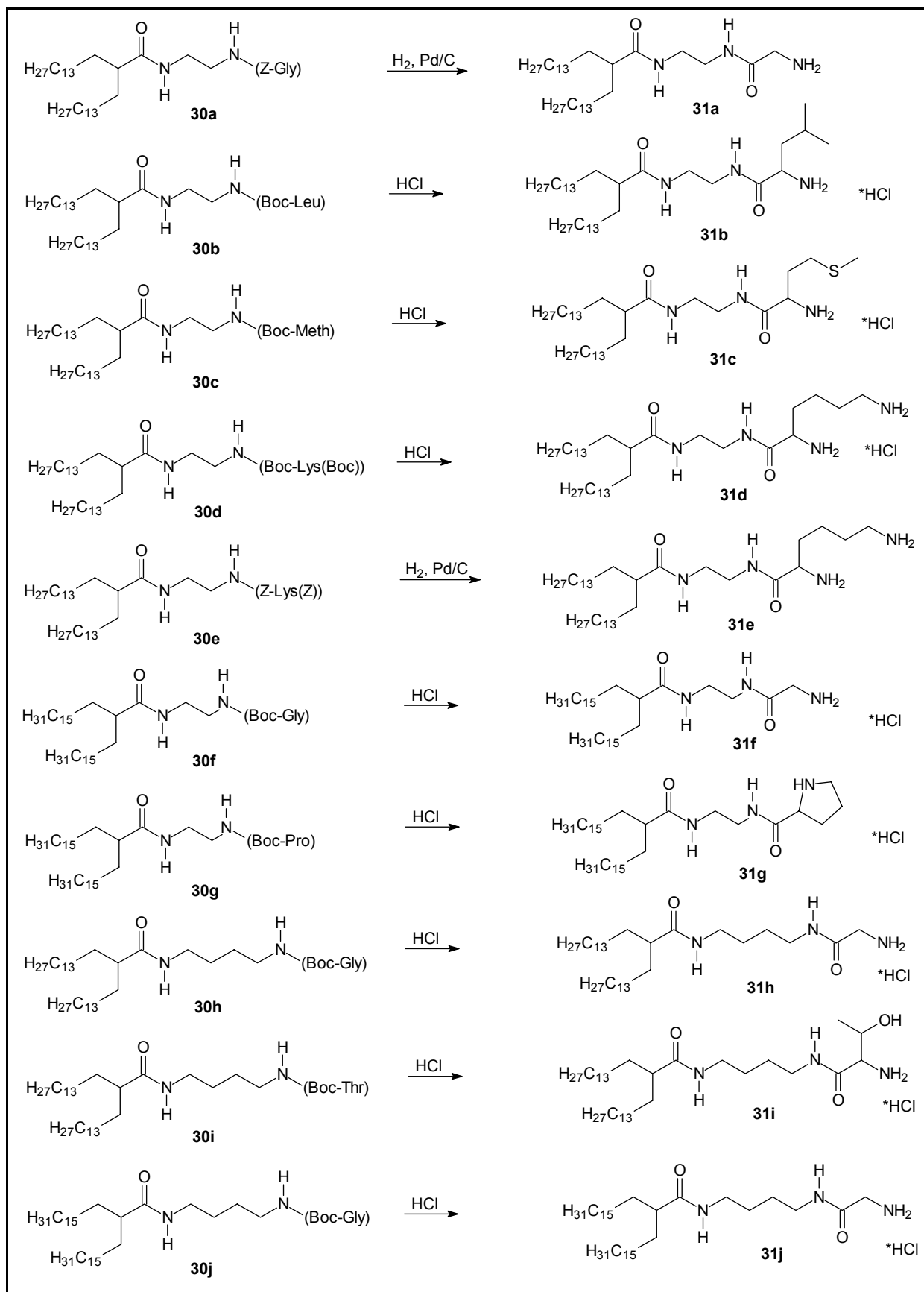


Abb. 22: Abspaltung der Schutzgruppen.

9. Darstellung hydrophober TRIS-Derivate als Transfektionslipide

9.1. Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

Als weiteres zentrales Grundgerüst kam im Rahmen dieser Arbeit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) **33** zur Anwendung. TRIS wird in vielen naturwissenschaftlichen Bereichen als Puffersubstanz verwendet. Als dreiwertiger Alkohol hat es strukturelle Ähnlichkeiten mit Glycerol **32**.

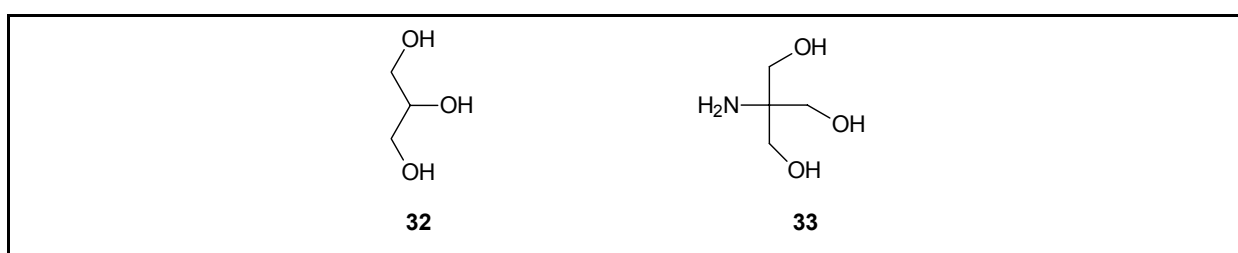


Abb. 23: Ähnlichkeiten zwischen Glycerol und TRIS.

Aufgrund seiner Eigenschaften wird TRIS darüber hinaus als Grundbaustein komplexer Moleküle verwendet. Es dient zum Beispiel als Zentralbaustein für Fettsäurekonjugate^{96,97,98} oder Cluster Galactoside⁹⁹. Die Hydroxylgruppen können acyliert oder alkyliert werden. Durch die Äquivalenz der drei Hydroxylfunktionen kommt es bei der Synthese nicht zu der Bildung von Strukturisomeren. Im Gegensatz dazu sind die Hydroxylfunktionen beim Glycerol nicht äquivalent. Es können unterschiedlich alkylierte bzw. acylierte TRIS-Verbindungen dargestellt werden, die über eine weitere funktionelle Gruppe verfügen. Auch dies ist beim Glycerol nicht möglich. Zusätzlich stellt die Aminofunktion eine ideale Struktur zur Knüpfung komplexer Moleküle dar^{100,101}.

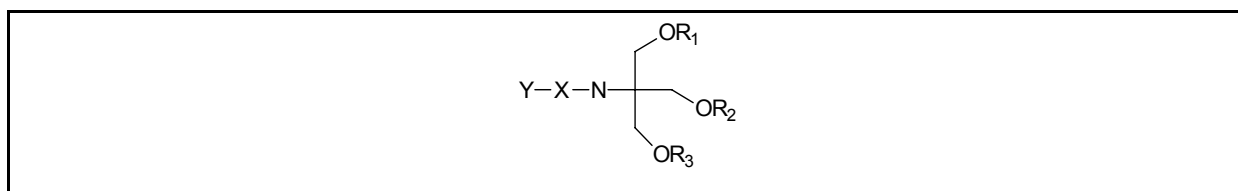


Abb. 24: Mögliche Strukturvariationen von TRIS.

TRIS ist einfach zu beziehen, kostengünstig, untoxisch und hat den Vorteil der großen Akzeptanz in der pharmazeutischen Industrie.

9.2. Hydrophobe TRIS-Derivate

Zur Darstellung von hydrophoben Verbindungen sollten langkettige Alkyl- bzw. Acylderivate in das TRIS-Gerüst eingeführt werden. Im ersten Schritt musste die Aminofunktion vor einem möglichen Angriff bei den folgenden Syntheseoperationen geschützt werden. TRIS wurde mit N-(Benzyloxycarbonyl)glycin **29a** unter Verwendung von EEDQ zum Glycinamidderivat **34** umgesetzt¹⁰². EEDQ wurde als Kupplungsreagenz eingesetzt, weil bereits Erfahrungen aus vorhergehenden Untersuchungen bestanden und sich der Reaktionsansatz sehr einfach aufarbeiten ließ. Das Rohprodukt konnte mit Ether gefällt werden und ließ sich aus Methanol umkristallisieren. Bei der weiteren Umsetzung von N-geschütztem TRIS mit langkettigen Alkylbromiden wurden neben Mono- auch Bis- und Trisalkylierungen festgestellt, die sich durch Chromatographie nicht trennen ließen. Dies wurde durch die Zunahme der hydrophoben Eigenschaften der Zwischenprodukte während der Reaktion plausibel und konnte auch schon von *Adhikari*¹⁰⁰ beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die Einführung weiterer Schutzgruppen erforderlich. Zur Blockierung von zwei Hydroxylfunktionen ließ sich die aus der Glycerolchemie bekannte Ketalisierung nutzen¹⁰³. 1895 führte *E. Fischer* die Kondensation von Aceton mit cis-Diolen in die Kohlenhydratchemie ein. Im alkalischen Medium, wie es etwa bei Alkylierungsreaktionen der Fall ist, sind Ketale beständig.

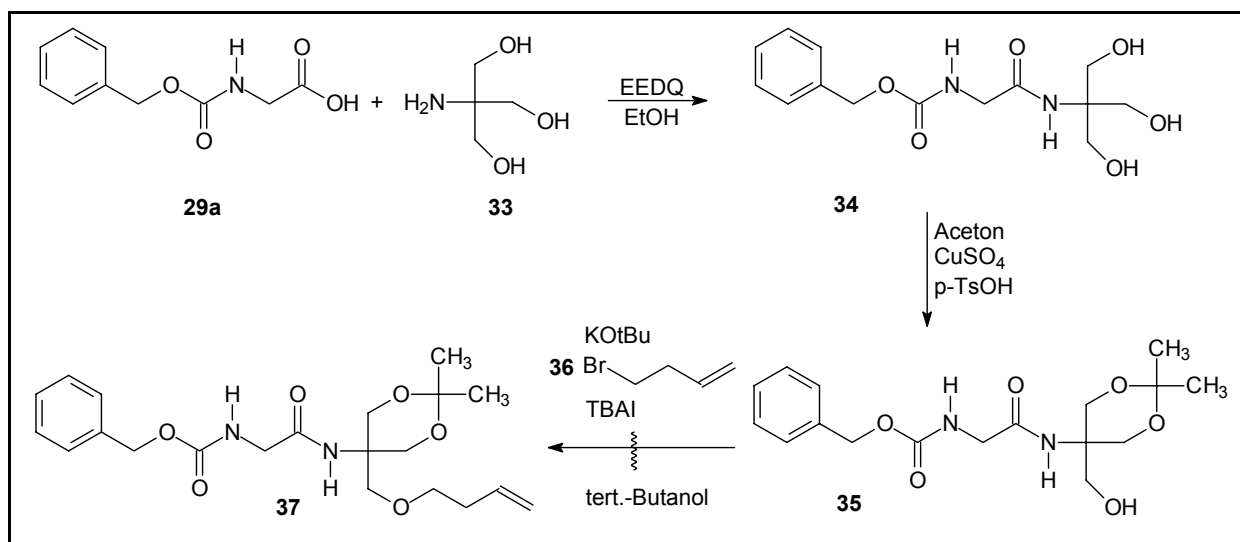


Abb. 25: Darstellung des Glycinamid-Derivates.

Unter Verwendung von p-Toluolsulfonsäure als Katalysatorsäure und einem Wasser entziehenden Mittel wurde das TRIS-Derivat **34** in absolutem Aceton zum Ketal **35** umgesetzt¹⁰⁴. Das Rohprodukt konnte wiederum mit Ether gefällt und aus Petrolether umkristallisiert werden. Das gewünschte Zwischenprodukt **35** wurde jedoch nur mit

schlechten Ausbeuten erhalten. Für eine Mono-O-Alkylierung wurde es in *tert.*-Butanol suspendiert und in Gegenwart von Kalium-*tert.*butylat umgesetzt. Es kam spontan zur Salzbildung. Die Alkylierungsreaktion war nach 4-6 Stunden unter Verwendung von Tetrabutylammoniumiodid als Katalysator abgeschlossen. Es erschien daher unverständlich, weshalb das Produkt auch diesmal nur in sehr geringen Ausbeuten erhalten wurde. Auch wiederholte Versuche führten nicht zum gewünschten Erfolg. Möglicherweise wurde die im Molekül vorliegende Ketalstruktur unter den Reaktionsbedingungen durch *tert.*-Butanol gespalten, da sich Fragmente der ursprünglichen Ausgangsverbindungen detektieren ließen. Auch die Variation von Lösungsmittel und Deprotonierungsreagenz, die bei den Malonsäurederivaten bereits zum Erfolg führte, blieb ergebnislos. Auch wenn die beschriebene Synthesestrategie aussichtsreich erschien, musste sie auf der Stufe der Alkylierungsreaktionen abgebrochen werden. Aufgrund der zu Beginn erläuterten Vorteile des TRIS-Moleküls musste eine alternative Schutzgruppenstrategie zur selektiven Blockierung der Hydroxylgruppen entwickelt werden. Die Schutzgruppen sollten ohne großen synthesespezifischen Aufwand in das Molekül eingeführt werden und dabei eine relative Selektion der zu blockierenden Gruppierung gewährleisten. Die TRIS-Molekülstruktur ermöglichte die Synthese von Oxazolidinen¹⁰⁵. Diese erhält man durch Umsetzen von β -Aminoalkoholen mit Aldehyden. Sie stellen cyclische Schutzgruppen dar, die ihre Anwendung bei der Synthese von chiralen Aminen, Aminoalkoholen und Aminosäuren findet^{106,107}. Bei bestimmten Arzneistoffen wurden sie zusätzlich als sogenannte Prodrugs verwendet^{108,109}. Aus TRIS **33** und Benzaldehyd **38** wurde, wie bei *Selambarom*¹¹⁰ beschrieben, nach Erhitzen in Toluol am Wasserabscheider das gewünschte 5,5-Di(hydroxymethyl)-2-phenyl-1,3-oxazolidin **39** synthetisiert.

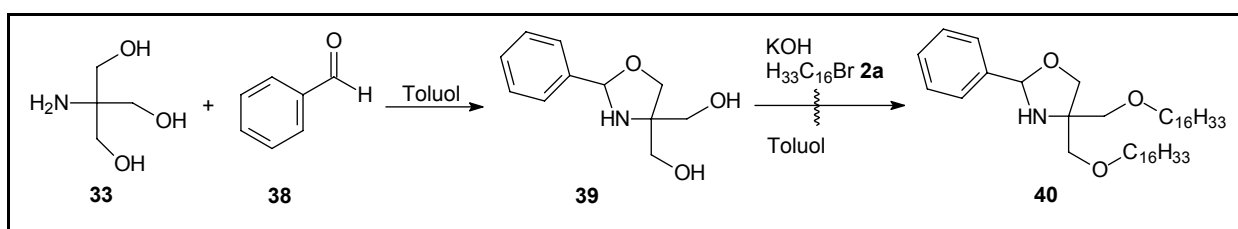


Abb. 26: Darstellung des 5,5-Di(hydroxymethyl)-2-phenyl-1,3-oxazolidins.

Dieses wurde in sehr guten Ausbeuten erhalten und ließ sich aus Essigsäureethylester umkristallisieren. Durch den Schutz einer Hydroxy- und einer Aminogruppe und der damit verbundenen Einführung eines aromatischen Restes wurde zusätzlich die Lipophilie erhöht. Eine mögliche Bis-O-alkylierung sollte durch Verwendung von Natriumhydrid zur Bildung der Alkoholate und Toluol als Lösungsmittel realisiert werden. Als Alkylierungsmittel wurde Hexadecylbromid **2a** verwendet. Die Gefahr der Stickstoffalkylierung wurde bei der Reaktion

als Nebenprodukt in Kauf genommen. Es wurde damit gerechnet, dass das Stickstoffatom bis zu einem bestimmten Grad sterisch abgeschirmt war. Neben der N-Alkylierung kam es jedoch auch zur unerwarteten Spaltung der Oxazolidinstruktur und im Folgenden konnten diverse Alkylierungsprodukte detektiert werden. Somit wurde eine komplexe Erweiterung der Schutzgruppenstrategie erforderlich. Seit langem ist bekannt, dass sich das Oxazolidin-Ringgerüst regioselektiv spalten lässt¹¹⁰. Die während der C-O Spaltung intermediär auftretenden Iminiumderivate weisen im Gegensatz zu den nach C-N Spaltung entstehenden Oxocarbeniumionen eine höhere Stabilität auf. Eine mögliche stereoselektive Ringöffnung der 5,5-Dihydroxymethyl-2-phenyl-1,3-oxazolidine **39** brachte für weitere Umsetzungen jedoch keine Vorteile. Deshalb wurde nach *Pierce*^{111,112} ein Mol TRIS mit zwei Mol Benzaldehyd **38** umgesetzt, um die entsprechende 3,5-Diphenyl-1*H*,3*H*,5*H*-oxazolo-7*a*-(7*H*)-methanol-Verbindungen **41** zu erhalten.

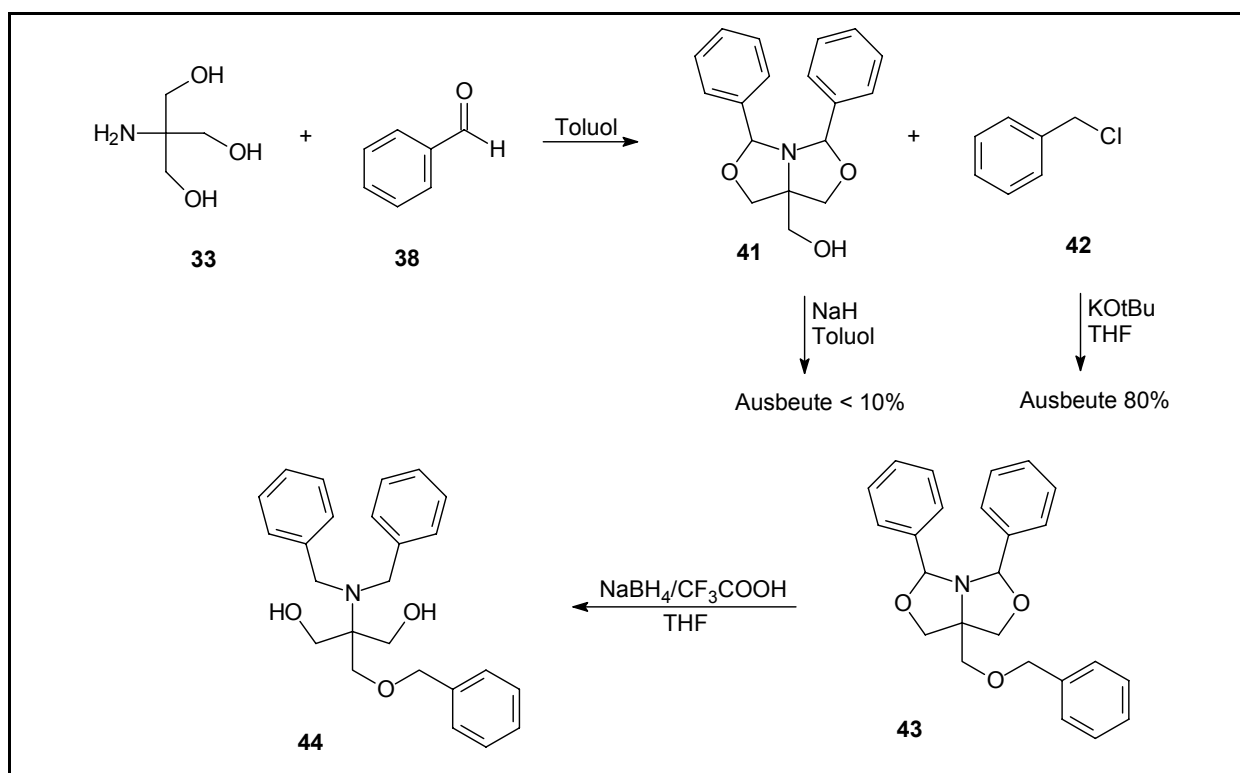


Abb. 27: Darstellung von 2-Dibenzylamino-2-benzyloxymethyl-1,3-propandiol.

Bei der alkalistabilen Substanz war lediglich eine Hydroxylfunktion für weitere Umsetzungen ungeschützt und konnte alkyliert werden. Auf dieser Synthesestufe wurde jedoch noch keine Lipidkette eingeführt, denn das Endprodukt sollte mindestens über zwei lipophile Reste verfügen. Die Einführung einer weiteren Schutzgruppe erfolgte nach dem Prinzip der *Williamson-Ethersynthese* mit Benzylchlorid **42**. Bei dem resultierenden TRIS-Derivat **43** waren alle vorhandenen funktionellen Gruppen durch Schutzgruppen für weitere

Umsetzungen blockiert. Das anfänglich ölige Rohprodukt konnte nach dem Abdestillieren von überschüssigem Benzylchlorid **42** problemlos aus Heptan umkristallisiert werden. Die synthetische Darstellung der neuen Verbindung gelang sehr zufriedenstellend. Im weiteren Verlauf der Mehrstufensynthese wurde die Verbindung reaktiv zum 2-Dibenzylamino-2-benzoxymethyl-1,3-propandiol **44** umgesetzt. Unter den üblichen Bedingungen mit Natriumborhydrid konnte das Ringsystem nicht aufgespalten werden. Es kam erst zur erwünschten Ringöffnung, nachdem Natriumborhydrid in einer vorgelagerten Reaktion mit Trifluoressigsäure reagierte. Dabei war höchstwahrscheinlich BH_3 als Lewis-Säure-Spezies in situ entstanden. Es ist bekannt, dass die Bildung von Borhydriden nach folgender Reaktion stattfindet^{113,114}.

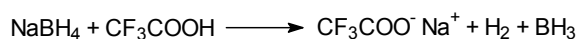


Abb. 28: Darstellung von Borhydrid aus Natriumborhydrid und Trifluoressigsäure.

BH_3 ging aller Voraussicht nach als Lewis-Säure eine koordinative Bindung mit dem Sauerstoffatom ein. Dies führte zu einer Schwächung der C-O Bindung und erleichterte dadurch die reduktive Ringöffnung. Denkbar ist weiterhin auch die Protonierung der Sauerstoffatome des Oxazolidin-Gerüsts durch Trifluoressigsäure und eine damit verbundene Erleichterung der reduktiven Ringöffnung. Einen weiteren Punkt stellt die hohe Affinität des Boratoms zum Sauerstoff dar. Dies kann an der Bindungsstärke von Bor-Sauerstoff Verbindungen mit 808 kJ/mol verdeutlicht werden. Im Gegensatz dazu ist die Bindungsstärke von Bor-Stickstoff Bindungen mit 380 kJ/mol wesentlich geringer¹¹⁵. Dieses Ergebnis konnte durch bereits vorhandene Untersuchungen^{116,117,118} bestätigt werden, in denen eine effektive Oxazolidinringöffnung die Gegenwart von oxophilen Katalysatoren erforderte und erklärt die Regioselektivität der Ringöffnung. Das Produkt **44** wurde nach chromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 80 Prozent erhalten. Verbindung **44** sollte als zentrale Zwischenverbindung mit langkettigen Alkylhalogeniden zur Dietherverbindung **45** umgesetzt werden. Durch eine recht drastische Methode gelang es die Verbindung mit einem Überschuss an Hexadecylbromid **2a** in Gegenwart von gepulvertem Kaliumhydroxid in abs. Xylol zum Dietherprodukt **45** zu alkylieren. Die so erhaltene Dietherverbindung wurde durch Flash-Chromatographie aufgereinigt.

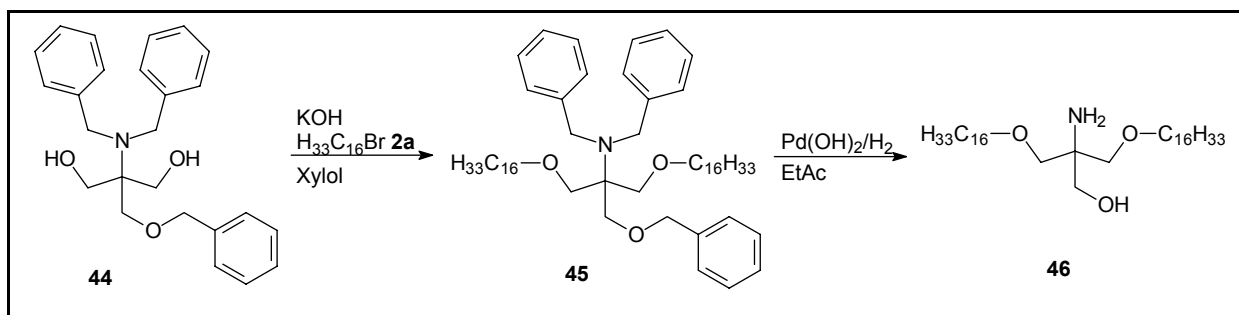


Abb. 29: Darstellung alkylierter hydrophober TRIS-Derivate.

Dabei konnten neben überschüssigem Hexadecylbromid auch Hexadecanol und Dihexadecylether als Nebenprodukte isoliert werden. Dies erscheint nachvollziehbar, weil in Nebenreaktionen aus dem Alkylierungsmittel auch Alkohole, Ether und Olefine entstehen können. Das Bromid wurde durch Hydroxidionen nukleophil angegriffen und es entstand intermediär der entsprechende Alkohol. Dieser reagierte dann mit weiterem Hexadecylbromid zum symmetrischen Diether. Es konnte sogar ein recht großer Anteil Ether als Nebenprodukt isoliert werden.

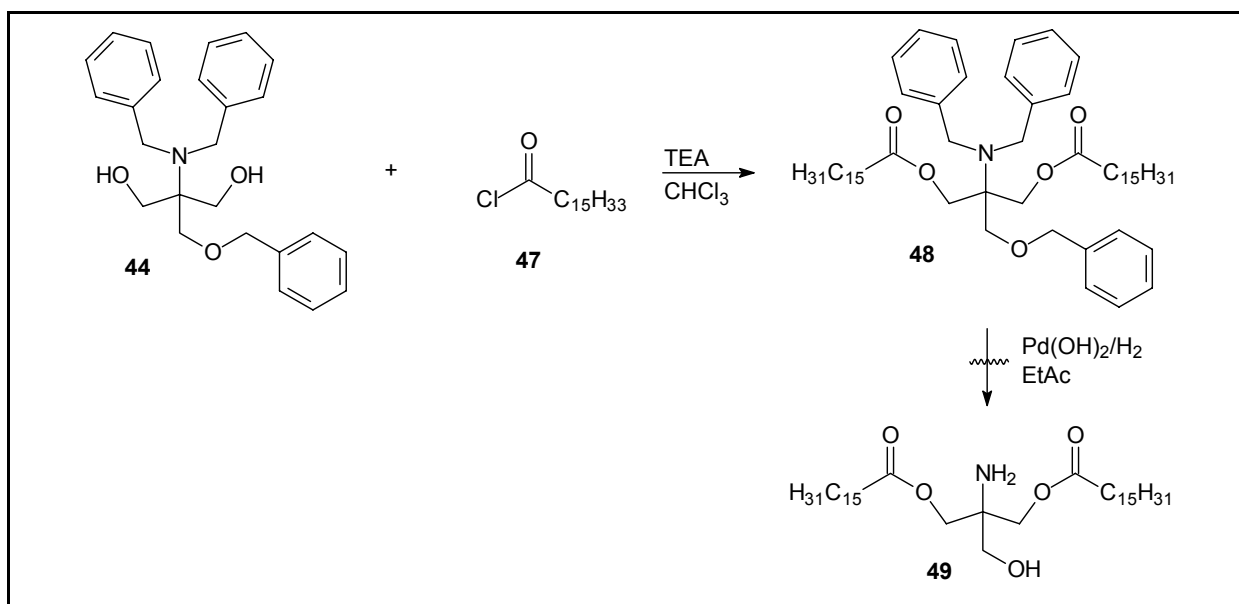


Abb. 30: Darstellung acylierter hydrophober TRIS-Derivate.

Neben der Alkylierungsreaktion erfolgte auch eine Acylierung des Diols **44**. Diese wurde mit Hexadecanoylchlorid **47** in Gegenwart von abs. TEA in abs. Chloroform durchgeführt. Das Rohprodukt **48** wurde chromatographisch gereinigt und in guten Ausbeuten erhalten. Die im Molekül vorhandenen Schutzgruppen sollten in einem weiteren Schritt hydrogenolytisch an Palladium/Kohle entfernt werden. Bei den Etherstrukturen **45** konnten an Pd/C 10% in

Essigsäureethylester bei Zimmertemperatur und Normaldruck lediglich zwei Benzylschutzgruppen abgespalten werden. Die Monobenzylaminstruktur blieb bei weiteren Versuchen unter Normaldruck beständig. Auch bei den Esterstrukturen stellte sich nicht der gewünschte Erfolg ein. Unerwartet waren die zahlreichen Umesterungsreaktionen, die auch bei weiteren Untersuchungen nicht unterdrückt werden konnten. Recht gute Ergebnisse erbrachte die Hydrierung der Etherverbindung an Palladiumhydroxid im Autoklaven. So wurden nach 24 h bei einem Druck von 20 bar und leicht erhöhter Temperatur Ausbeuten bis zu 50 Prozent erzielt. Die resultierende Verbindung **46** verfügte über eine freie Amin- und Alkoholfunktion. Die Anwendungsmöglichkeiten für dieses Lipid waren sehr vielfältig, ein Hauptaugenmerk sollte jedoch auf die Synthese von Transfektionslipiden geworfen werden. Durch die Einführung der N-blockierten Aminosäure Glycin **29a** konnte gleichzeitig die Aminofunktion effektiv geschützt werden. Die Hydrierung der CBZ- Schutzgruppe konnte unter Normaldruck an Palladiumhydroxid innerhalb von 4 Stunden durchgeführt werden. Die Umsetzung verlief quantitativ und das Produkt ließ sich aus Ethanol umkristallisieren. Für zukünftige Untersuchungen steht die freie Hydroxylgruppe als idealer Reaktionspartner zur Verfügung.

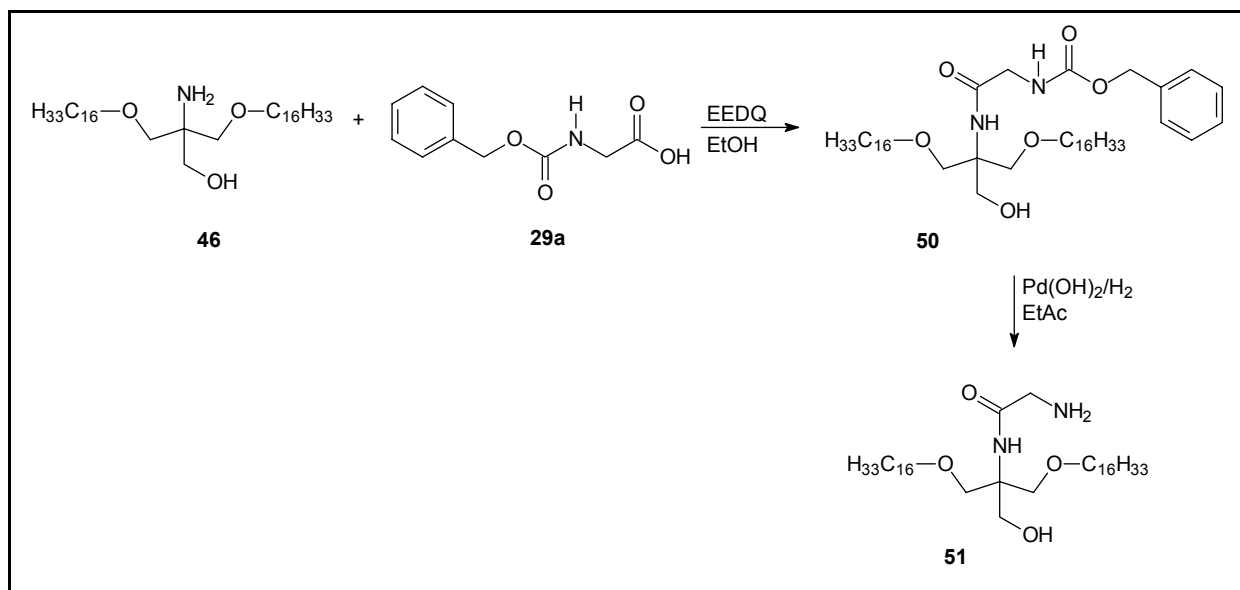


Abb. 31: Amidkupplung und Abspaltung der Schutzgruppe.

10. Darstellung hydrophober Pentaerythritol-Derivate als Transfektionslipide

10.1. Pentaerythritol

Pentaerythritol **52** kann aufgrund seiner chemischen Struktur sehr gut als funktionelle Ausgangssubstanz für Lipidsynthesen genutzt werden. Strukturell bestehen große Ähnlichkeiten sowohl mit TRIS **33** als auch mit Glycerol **32**.

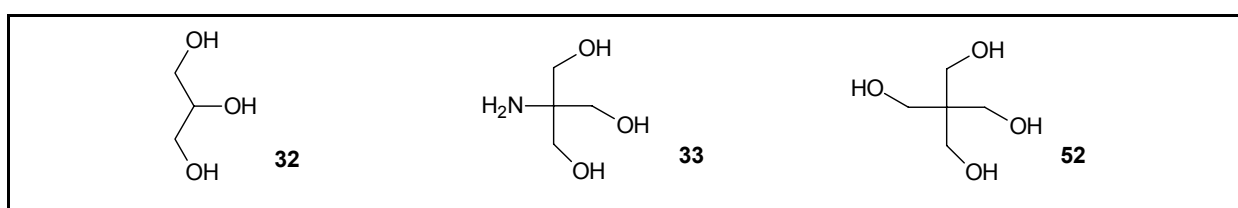


Abb. 32: Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Glycerol, TRIS und Pentaerythritol.

Es handelt sich um einen vierwertigen, verzweigten Alkohol, der durch Einwirkung von Calciumhydroxid auf Acetaldehyd und Formaldehyd in Form einer gekreuzten *Cannizzaro-Reaktion* dargestellt wird. Pentaerythritol dient der Herstellung von Alkyd- und anderen Polyesterharzen, sowie zur Verbesserung der Qualität trocknender Öle. Durch die Veresterung des Alkohols mit einem Salpetersäure-Schwefelsäure-Gemisch entsteht Pentaerythrittetranitrat. Hierbei handelt es sich um einen Sprengstoff (Nitropenta, PETN), der als Gemisch mit Hexogen in organischen Bindemitteln unter dem Namen *Semtex* bekannt ist⁴⁸. Zudem handelt es sich beim Pentaerythrittetranitrat um eine pharmakologisch wirksame Verbindung, die als so genannter Vasodilatator wirkt. Hierbei kommt es zu einer Relaxation der glatten Muskulatur. Diese führt am Herzen zu einer Gefäßerweiterung und damit zu einem verminderten venösen Rückstrom. Als Folge kommt es zu einer Abnahme der diastolischen Wandspannung. Diese Faktoren sorgen für eine ökonomische Arbeit des Herzens und manifestieren sich in einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs¹¹⁹.

Weiterhin wird Pentaerythritol als Ausgangssubstanz für diverse Makromoleküle^{120,121} und zur Darstellung von Glykolipiden⁷⁴ verwendet.

10.2. Hydrophobe Pentaerythritol-Derivate

Um Pentaerythritol als Ausgangssubstanz für Lipidsynthesen zu nutzen ist eine komplexe Schutzgruppenstrategie erforderlich. Die im Molekül vorhandenen Hydroxygruppen lassen sich selektiv durch Ketalisierung mit geeigneten Carbonylverbindungen schützen. Ketale sind gegenüber alkalischen und oxidierenden Reagenzien sehr beständig, lassen sich jedoch im sauren Milieu relativ einfach spalten. Um lipophile Reste in das Molekül einzubinden wurde deshalb zunächst eine Benzylidenschutzgruppe eingeführt. Dieses Dioxanderivat stellt eine seit langem bekannte Schutzgruppe für 1,2- und 1,3-Diole dar und ermöglicht im Fall des Pentaerythrits eine selektive Bisalkylierung.

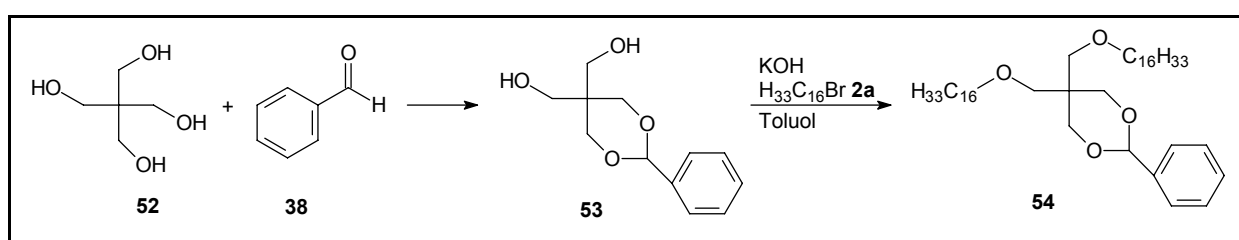


Abb. 33: Pentaerythritol mit hydrophobem Lipidanker.

Die Umsetzung des Alkohols **52** mit Benzaldehyd **38** zum Dioxanderivat **53** erfolgte in Gegenwart starker Säuren nach einer modifizierten Vorschrift von *Issidorides et al.*¹²². Neben dem Schutz von zwei Hydroxygruppen wurde durch die Einführung eines aromatischen Restes die Lipophilie des Moleküls erhöht. Dies sollte die sich anschließende Alkylierungsreaktion erleichtern. Die Bis-Alkylierung des Pentaerythritolderivates erfolgte nach dem Prinzip der *Williamsonschen-Ethersynthese*. Dafür wurde der Alkohol mit gepulvertem Kaliumhydroxid in Toluol am Wasserabscheider unter Rühren gekocht. Zu dieser Suspension wurde nach 45 min das Alkylhalogenid **2a** getropft. Nach etwa 24 Stunden war die Alkylierungsreaktion quantitativ abgeschlossen. Im Vergleich zu *Chierici et al.*⁷⁴, dessen Methode NaH zur Bildung der Alkoholate vorsieht, konnte die Ausbeute durch Verwendung von Kaliumhydroxid und Kochen am Wasserabscheider um ca. 20% gesteigert werden. Als lipophiler Rest kam bei den Umsetzungen Hexadecylbromid **2a** zur Anwendung, wobei auch die Möglichkeit zur Variation im lipophilen Teil des Moleküls gegeben ist. In einem weiteren Schritt sollte die Acetalstruktur **54** selektiv gespalten werden, um eine freie Alkoholfunktion und eine Benzyletherstruktur zu erhalten. Der Benzylether stellt ebenfalls eine gute Schutzgruppe für Alkohole dar, und lässt sich einfach und mit nahezu quantitativen Ausbeuten hydrogenolytisch an Palladium/Kohle entfernen. Aufgrund der bereits gesammelten Erfahrungen bei der Spaltung des Oxazolidin-Gerüsts wurde die reduktive Ringöffnung mit Trifluoressigsäure/Natriumborhydrid versucht. Leider erwies sich die

vorliegende Dioxanstruktur als außerordentlich stabil gegenüber dem Reaktionsmittel, so dass keine Umsetzungen festgestellt werden konnten. Weitere Untersuchungen bewiesen die bereits von *Schmidt*⁵⁷ beschriebene schlechte Spaltbarkeit des vorliegenden Dioxangerüsts. Auf die Einführung einer Anisylidenschutzgruppe, die sich mit einem BH_3 -THF/ AlCl_3 Gemisch nach *Kloosterman*¹²³ selektiv spalten lässt, wurde aus Zeitgründen verzichtet.

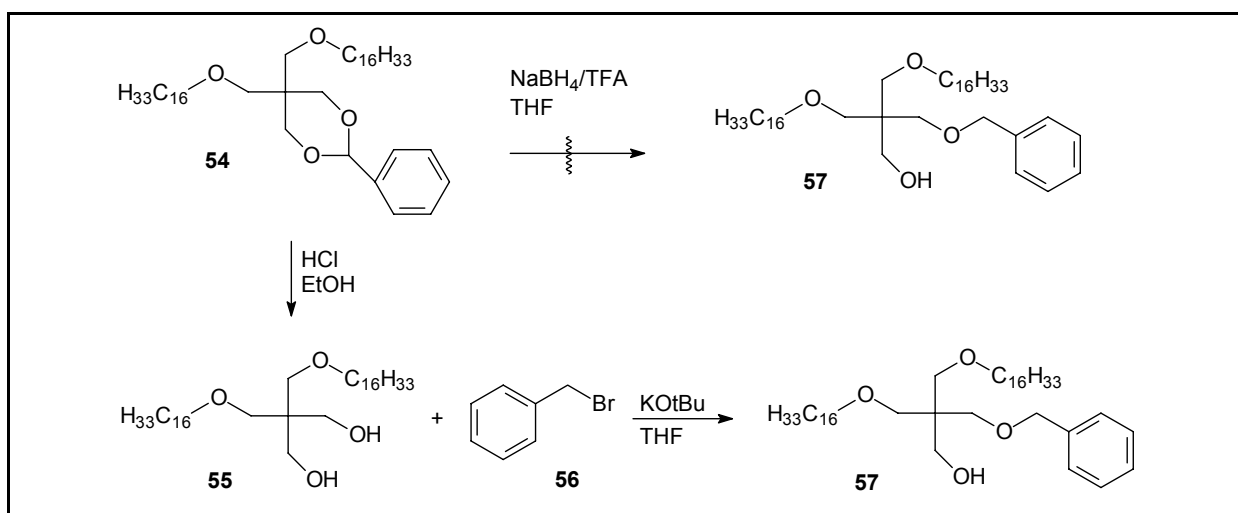


Abb. 34: Einführung einer Benzylschutzgruppe in das hydrophobe Pentaerythritol-Derivat.

Als alternative Synthesestrategie wurde ein Umweg in Kauf genommen und die Benzylidenschutzgruppe mit Salzsäure zunächst komplett abgespalten, um zwei freie Alkoholfunktionen zu erhalten. Analog zu umfangreichen Arbeiten von *Schmidt*⁵⁷ erfolgte die Spaltung der erwiesenermaßen stabilen Benzylidenderivate durch 12 Stunden Erhitzen der in Ethanol gelösten Verbindung in Gegenwart von 5N Salzsäure. Das Rohprodukt **55** konnte durch Umkristallisation aus Heptan gereinigt werden. An dieser Stelle sollte eine der beiden Alkoholfunktionen selektiv benzyliert werden. Hierbei wurde versucht, die Bildung des bis-Benzylierungsproduktes möglichst weitgehend zu unterdrücken, um das Monoalkylierungsprodukt relativ rein zu erhalten und die Einführung der Zwischenstufe zu rechtfertigen. Die Mono-O-benzylierung erfolgte in Tetrahydrofuran mit Benzylbromid **56** als Alkylierungsreagenz unter Verwendung von Kalium-*tert*.butylat zur Deprotonierung und katalytischen Mengen an Tetrabutylammoniumiodid. Der Ansatz wurde 16 Stunden unter Rückfluss und Argonatmosphäre erhitzt und dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Bei dieser Verfahrensweise wurde das Produkt **57** nahezu quantitativ erhalten. Eine Gesamtausbeute von 60% über beide Stufen rechtfertigte die alternative Synthesestrategie gegenüber der reduktiven Ringöffnung nach *Kloosterman*¹²³ mit lediglich 30% Ausbeute. Zur

weiteren Funktionalisierung und um ein für die Gentransfektion geeignetes Molekül zu erhalten, wurde die verbleibende Hydroxyfunktion in eine Aminfunktion überführt.

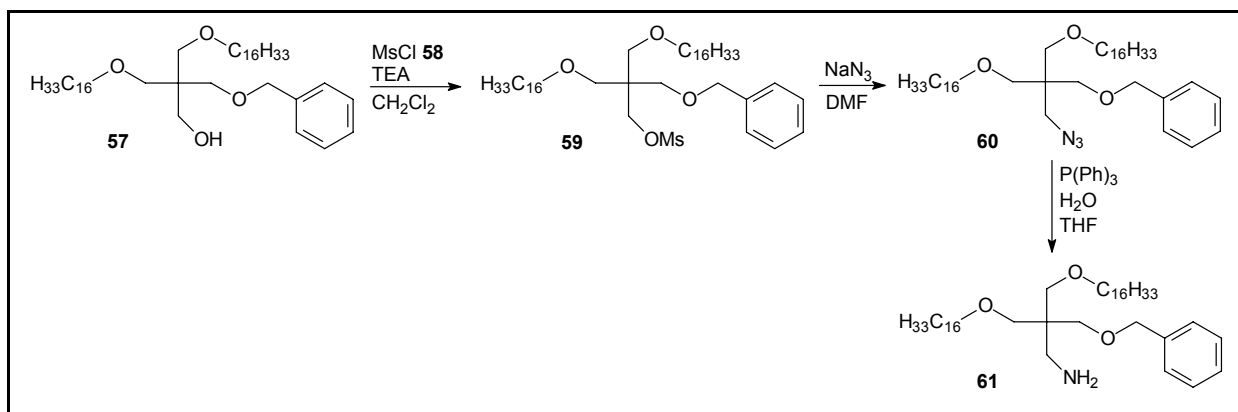


Abb. 35: Überführung der Alkoholfunktion in ein Amin.

Eine sehr effektive Methode für die Darstellung von Aminoderivaten erfolgt durch die Umsetzung der Hydroxygruppe zum Azid über das Mesylat und anschließender Reduktion zum Amin^{124,125}. Zur Darstellung des Mesylates **59** wurde der Alkohol **57** in Methylenchlorid gelöst und mit Triethylamin versetzt. Zu diesem Produktgemisch wurde bei 0 °C die entsprechende Menge Methansulfonylchlorid **58** langsam zugetropft. Die Reaktion war nach 30 min abgeschlossen. Das Rohprodukt **59** konnte problemlos aus Aceton umkristallisiert werden. Die Darstellung des Mesylates gewährleistete eine ausreichende Aktivierung für die anschließende Reaktion mit Natriumazid. Die Reduktion des Azides **60** erfolgte mit Triphenylphosphin und führte nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes zu akzeptablen Ausbeuten des Amins **61**. In Analogie zu den TRIS-Derivaten ist es für die Zukunft möglich, diesen zentralen Grundkörper mit entsprechend geschützten Aminosäuren selektiv zu koppeln. In einem weiteren Schritt könnte die Benzylschutzgruppe hydrogenolytisch abgespalten werden und man erhält eine weitere für Umsetzungen geeignete funktionelle Gruppe.

11. Darstellung hydrophober Glycerol-Derivate als Transfektionslipide

11.1. Glycerol

Bei der Entwicklung von Lipiden auf dem Gebiet der liposomalen Gentransfersysteme werden bereits seit längerem Derivate des Glycerols als Ausgangsverbindung verwendet. Glycerol, ein 1,2,3-Propantriol, ist der wichtigste dreiwertige Alkohol, kommt als Baustein der Glyceride in fast allen tierischen Fetten sowie pflanzlichen Ölen vor und wurde von *Scheele* (1779) bei der Hydrolyse von Olivenöl entdeckt. Es findet zahlreiche technische Anwendungen. In der Pharmazie wird Glycerol unter anderem bei der Herstellung von Salben, Zahncremes und Kosmetika verwendet⁴⁸.

Die Struktur dieses dreiwertigen Alkohols ermöglicht eine große Anzahl von Synthesestrategien, besonders im Bereich der Lipide¹²⁶. 1987 wurde die erste kationische Verbindung mit Glycerolgrundgerüst für den Einsatz bei der nicht viralen Gentransfektion entwickelt²⁴. Seitdem diente Glycerol wiederholt als Ausgangssubstanz für derartige Verbindungen^{127,128}. Außerdem ist es Bestandteil von neutralen Helferlipiden bei der Formulierung von Liposomen, wie zum Beispiel Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE)¹²⁹. Ausgehend vom Glycerol wurden zur Erweiterung des Spektrums an bekannten Substanzen einige neuartige Verbindungen dargestellt. In Analogie zu den bereits beschriebenen Synthesen in den vorhergehenden Kapiteln ist auch beim Glycerol unbedingt eine Schutzgruppenstrategie notwendig, um definierte Zielverbindungen zu erhalten. Hierbei bieten sich wiederum Ketalstrukturen an. Die so geschützten Glycerolderivate werden in der Regel weiteren Umsetzungen unterworfen, so dass als Endverbindungen O-Acyl- oder O-Alkylderivate erhalten werden¹³⁰. Die Etherlipide zeichnen sich im Gegensatz zu den Esterlipiden durch eine hohe chemische und enzymatische Beständigkeit aus¹³¹. Werden Etherlipide mit kationischen Kopfgruppen für die nichtvirale Gentransfektion eingesetzt, zeigen derartige Verbindungen eine erhöhte Toxizität. Dies kann möglicherweise mit ihrer hohen Stabilität in Verbindung gebracht werden. Esterlipide neigen in vitro und in vivo bei der Gegenwart von Lipasen zu Hydrolysereaktionen und verminderter Stabilität.

11.2. Hydrophobe Glycerol-Derivate mit Ketalstruktur

Von sogenannten Ketalipiden sollten gegenüber den Ester- und Etherlipiden veränderte chemische Eigenschaften und gegenüber den Esterlipiden eine höhere enzymatische

Stabilität zu erwarten sein. Hierbei wird ein langkettiges Keton mit Glycerol zum Ketal umgesetzt. Das Ketal dient hierbei nicht nur als Schutzgruppe, sondern bleibt auch in der Zielverbindung erhalten. Gerade auf der Suche nach so genannten pH-sensitiven Lipiden^{132,133,134} stellen die Ketale eine sehr interessante Verbindungsklasse dar. Sie zeigen gegenüber Basen und enzymatischen Einflüssen hohe Stabilität, werden jedoch im sauren Milieu relativ leicht hydrolysiert. Bei der Veränderung des pH-Wertes im Endosom kommt es möglicherweise zur Spaltung der Moleküle. Dies könnte durch eine Veränderung der Struktur zu einer verbesserten Freisetzung von DNA aus dem Endosom führen¹³⁵.

Zur Darstellung des langkettigen Ketons Hentriacontan-16-on **62** wurde das Calciumsalz der Palmitinsäure im Vakuum auf 400 °C erhitzt, wobei das reine Produkt stetig abdestillierte. Im Anschluss wurde zusätzlich der Reaktionskolben mit Ethanol ausgekocht, weil eine große Menge des Produktes bei der Destillation dort zurückblieb. Das Rohprodukt wurde mehrfach aus Ethanol umkristallisiert.

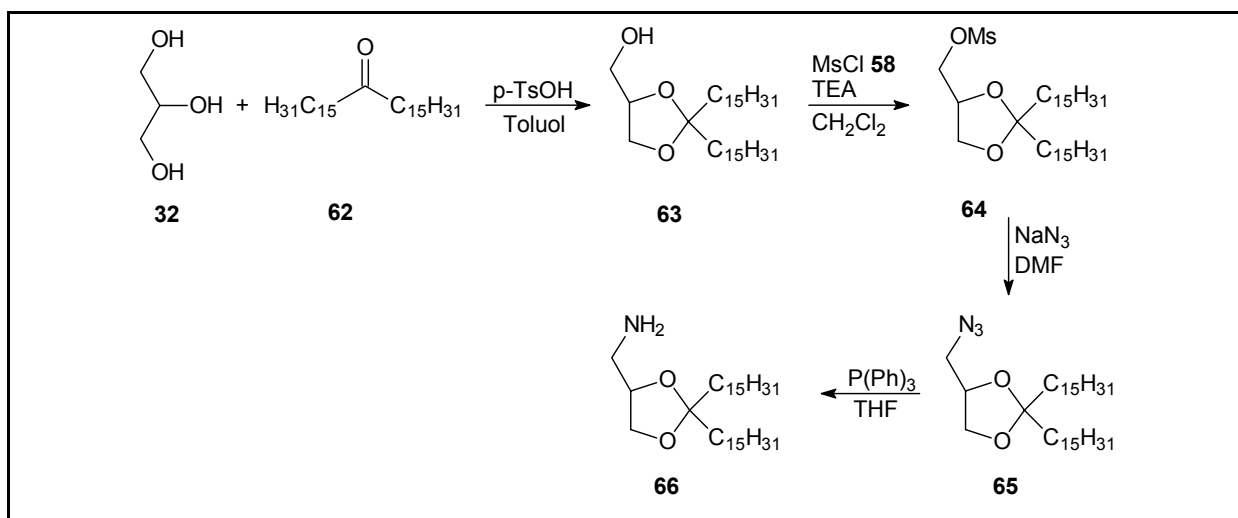


Abb. 36: Darstellung eines pH-sensitiven Lipides auf Glycerolbasis.

Danach wurde das reine Keton **62** durch Erhitzen unter Rückfluss am Wasserabscheider mit Glycerol **32** und *p*-Toluolsulfonsäure erhitzt¹³⁶. In einem weiteren Schritt wurde das resultierende Hydroxyketal **63** zum Methansulfonat **64** umgesetzt. Dazu wurde analog zu der bereits beschriebenen Mesylierung zu einer eisgekühlten Lösung des Ketals **63** und Triethylamin in Methylenechlorid innerhalb von 15 min die entsprechende Menge Mesitylchlorid **58** zugetropft. Nach weiteren 30 min bei -5 °C war die Reaktion abgeschlossen und das Reaktionsgemisch ließ sich in mehreren Reinigungsoperationen aufarbeiten. Das rohe Mesylat **64** konnte durch Umkristallisation aus Aceton sehr gut aufgereinigt werden. Im Anschluss an diese Reaktion wurde versucht, die Mesylate in Amine umzuwandeln. Dies gelang jedoch lediglich mit der schon bekannten Methode via Azide und

anschließender Reduktion mit Triphenylphosphin. Eine direkte Umsetzung des Mesylates und auch der entsprechenden Bromide brachte nicht den gewünschten Erfolg. Zur Darstellung des Azides **65** wurde das Mesylat in DMF gelöst, mit Natriumazid versetzt und diese Suspension unter Rühren auf 90 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 8 h abgeschlossen. Nach der Aufarbeitung konnte das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung in THF mit Triphenylphosphin reduziert werden. Im Gegensatz dazu erwies sich die Darstellung der Amine über die Cyanisierung¹³⁷ des primären Alkohols als problematisch. Der die Ausbeute limitierende Schritt stellte die Umsetzung des Mesylates mit Kaliumcyanid dar. So erfolgte auch nach mehrtägigem Rühren unter Rückfluss nur minimale Umsetzung. Auch die Variation des Lösungsmittels konnte die Ausbeute nicht steigern. Somit lieferte nur die Überführung der Ausgangsverbindung in ihre Azide und die anschließende Reduktion mit Triphenylphosphin zufrieden stellende Ergebnisse. Einerseits konnte das resultierende Amin **66** nach chromatographischer Aufreinigung direkt für Transfektionsversuche eingesetzt werden, andererseits wurden geschützte Aminosäuren nach bekannten Methoden in das Molekül eingebunden. Dies erfolgte im Fall der Aminosäure Glycin **29a** mit EEDQ als Kupplungsreagenz in Ethanol innerhalb von 4 h unter Rückfluss. Die CBZ-Schutzgruppe konnte in einem abschließenden Schritt an Palladium/Kohle 10% in Ethanol hydrogenolytisch abgespalten werden.

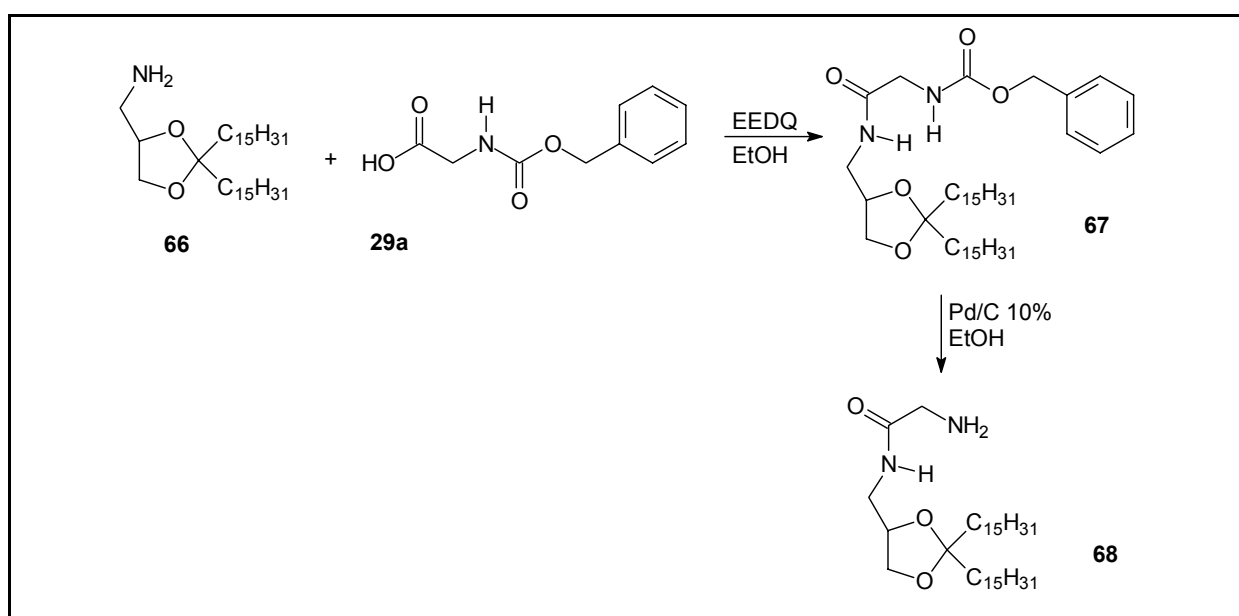


Abb. 37: Kupplung des Glycerolderivates mit Glycin.

12. Darstellung von Phospholipiden als Transfektionslipide

1964 wurde zum ersten Mal über die Totalsynthese eines Di-O-Alkylglycerophospholipides berichtet¹³⁸. In den darauf folgenden Jahren erschien eine große Anzahl an Publikationen über die unterschiedlichen Synthesemöglichkeiten dieser Verbindungsklasse. Einen Überblick über ihre Darstellung veröffentlichte *Paltauf*¹³⁹ in einem Übersichtsartikel.

Auf der Suche nach geeigneten Vektoren für die Gentransfektion wurden bereits unterschiedliche Phospholipide synthetisiert. Um die Kopplung von DNA zu gewährleisten sollte eine basische bzw. kationische Kopfgruppe in die Moleküle eingeführt werden. Die zentrale Ausgangsverbindung 1,2-Di-O-Hexadecylglycerol **73** wurde durch Alkylierung von 3-O-Benzylglycerol **71** mit Hexadecylbromid **2a** in abs. Xylol in Gegenwart von gepulvertem Kaliumhydroxid dargestellt. Die Reinigung des so erhaltenen 1,2-Di-O-Hexadecyl-3-O-benzylglycerols **72** erfolgte durch Säulenchromatographie. Im Anschluss daran konnte das Produkt zusätzlich umkristallisiert werden. Wie in den vorhergehenden Kapiteln erwähnt, entstand als Nebenprodukt dieser Methode eine große Menge an Dihexadecylether. Im Anschluss an die Alkylierungsreaktion ließ sich der Benzylrest, der bislang als Schutzgruppe diente, durch Hydrierung mit Pd/C als Katalysator in Ethanol abspalten.

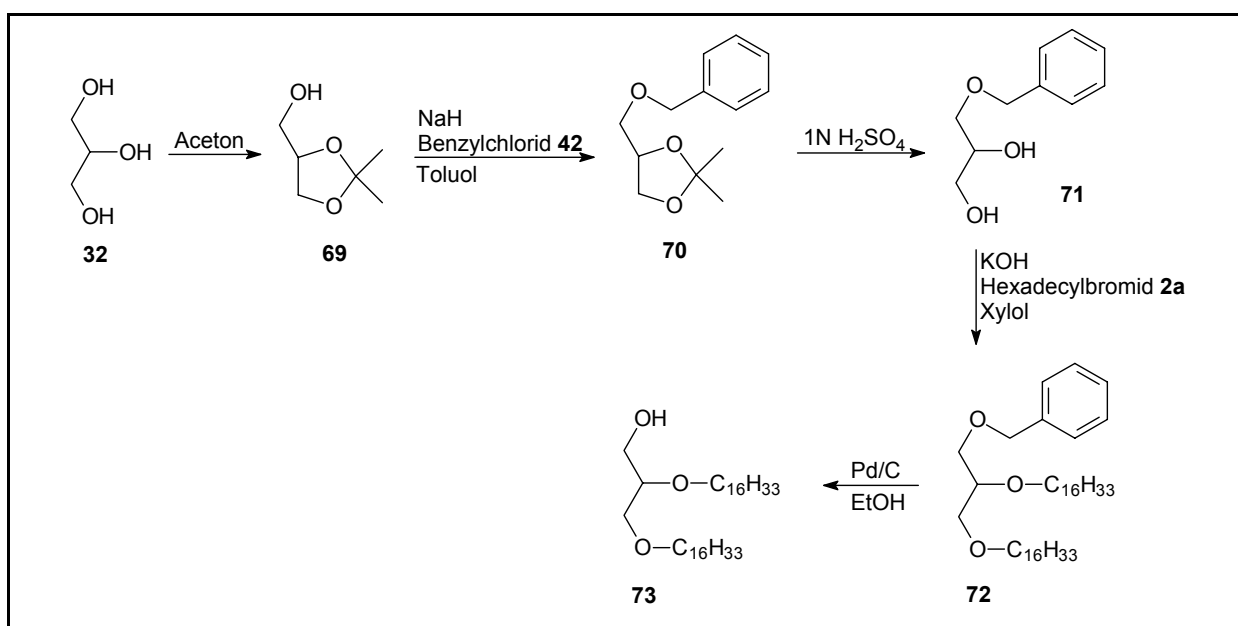


Abb. 38: Darstellung von 1,2-Di-O-Hexadecylglycerol.

In einem weiteren Schritt wurde der resultierende Alkohol **73** nach einer Vorschrift von *Rueger* phosphoryliert¹³⁰. Als Phosphorylierungsreagens wurde frisch destilliertes Phosphoroxychlorid verwendet. Zur Feinreinigung wurde das erhaltene Natriumsalz **75** in Chloroform gelöst und anschließend mit 96 %igem Ethanol wieder ausgefällt. Nach

Wiederholung dieser Reinigungsoperation erhielt man ein dünnschichtchromatographisch reines Produkt in Form eines weißen feinkristallinen Pulvers. Durch die Zugabe von ethanolischer Salzsäurelösung wurde aus dem 1,2-Di-O-Hexadecylglycero-3-dinatriumphosphat **75** die entsprechende Phosphatidsäure **76** freigesetzt. Diese ließ sich als Zwischenverbindung für weitere Derivatisierungen nutzen.

Als weiteres Phosphorylierungsreagens wurde 2-Bromethylphosphorsäuredichlorid **77** verwendet. Dieses erhielt man nach einer modifizierten Vorschrift von *Hirt*¹⁴⁰ durch Veresterung von frisch destilliertem Phosphoroxychlorid mit Bromethanol in Tetrachlorkohlenstoff. Die Phosphorylierung erfolgte analog einer Vorschrift von *Westphal*¹⁴¹.

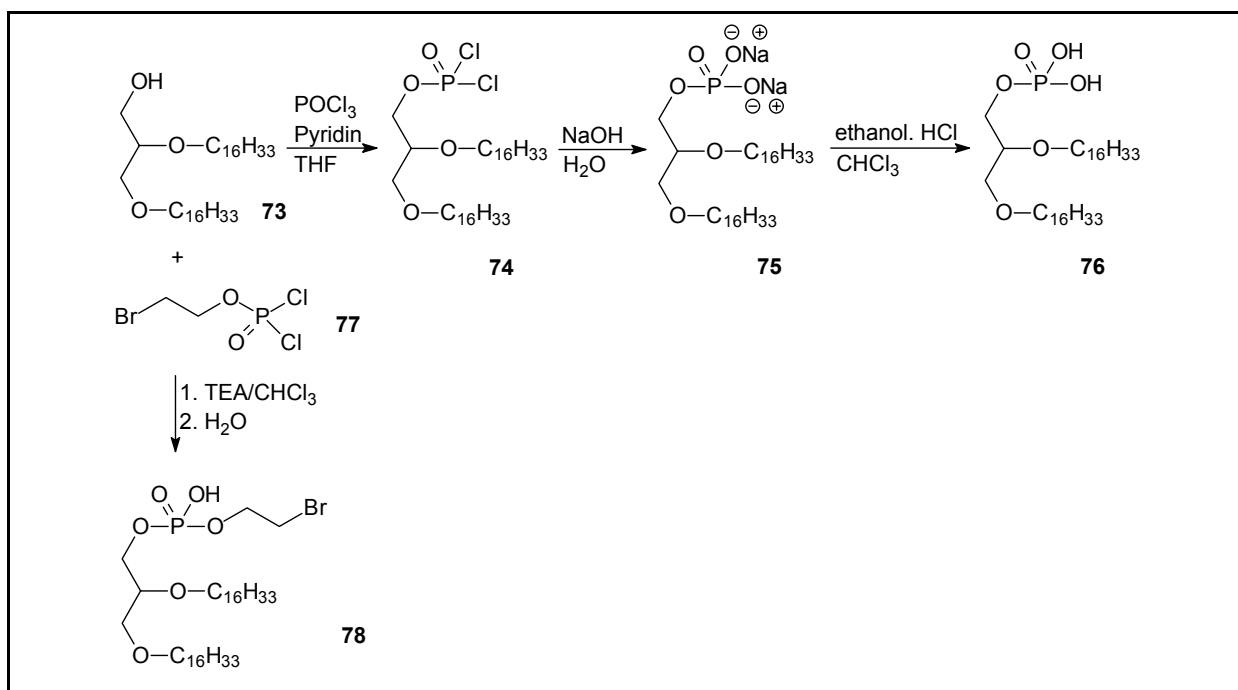


Abb. 39: Phosphorylierung von 1,2-Di-O-Hexadecylglycerol.

12.1. Lysophosphatidylserin-Analoga

Die freie Phosphatidsäure **76** sollte in einem weiteren Schritt mit der Cbo geschützten Aminosäure Serin nach der Methode von *Aneja*¹⁴² gekuppelt werden. Als Kupplungsreagenz wurde 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) verwendet. Dieses hat gegenüber den sonst üblichen Kondensationsmitteln, wie zum Beispiel DCC, eine Reihe von Vorteilen¹⁴³. Ein Hauptgrund für die Verwendung von TPS war, dass sich bei einem Molverhältnis Phosphatidsäure/Serin/TPS von 1:2:3 keine Diphosphatidsäure bildet. Im Gegensatz dazu entsteht bei der Verwendung von DCC immer eine geringe Menge an Diphosphat, selbst wenn mit einem großen Überschuss an Alkoholkomponente gearbeitet wurde. Auch die Bildung von gemischten Anhydriden aus Phosphatidsäure und TPS sollte durch die sterische

Hinderung der Isopropylgruppe im TPS-Molekül unterbleiben. Außerdem läuft die Kondensation mit TPS im Vergleich zur *Carbodiimid-Methode* bis zu zehnmals schneller ab. Für die Umsetzung wurde der N-Cbo-Serinbenzylester **79** mit der entsprechenden Menge an TPS in abs. Pyridin gelöst und 15 min gerührt. Zu dieser Mischung wurde eine Lösung der Phosphatidsäure in Pyridin hinzugefügt. Anhand der chromatographischen Kontrolle der Reaktion konnte festgestellt werden, dass die Umsetzung nach 4 h Rühren abgeschlossen war. Nach der Isolierung des Phosphatidylserins **80** durch Säulenchromatographie sollte in einer weiteren Synthesestufe die basische Kopfgruppe eingeführt werden. In einer Aminolysereaktion wurde der vorliegende Methylester mit Ethylendiamin **14b** zum Amid umgesetzt. Das gewünschte Produkt **82** ließ sich sowohl dünnschichtchromatographisch als auch durch Massenspektroskopie eindeutig detektieren. Leider konnte die Verbindung aufgrund ihrer extrem schlechten Löslichkeit bisher nicht aufgereinigt und für weitere Umsetzungen verwendet werden. Sowohl die Säulenchromatographie, als auch die Umkristallisation waren als Reinigungsoperationen ungeeignet, da kein geeignetes Lauf- bzw. Lösungsmittel gefunden wurde. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindung erfolgte auch die Abspaltung der Cbo-Schutzgruppe durch Hydrierung an Pd/C in Eisessig nur unvollständig. Im Allgemeinen lässt sich eine derartige Schutzgruppe hydrogenolytisch sehr leicht abspalten. Bei den hier vorliegenden Verbindungen waren somit die Grenzen der synthetischen Handhabung erreicht. Eine weitere Untersuchung der Substanzen erschien wenig sinnvoll.

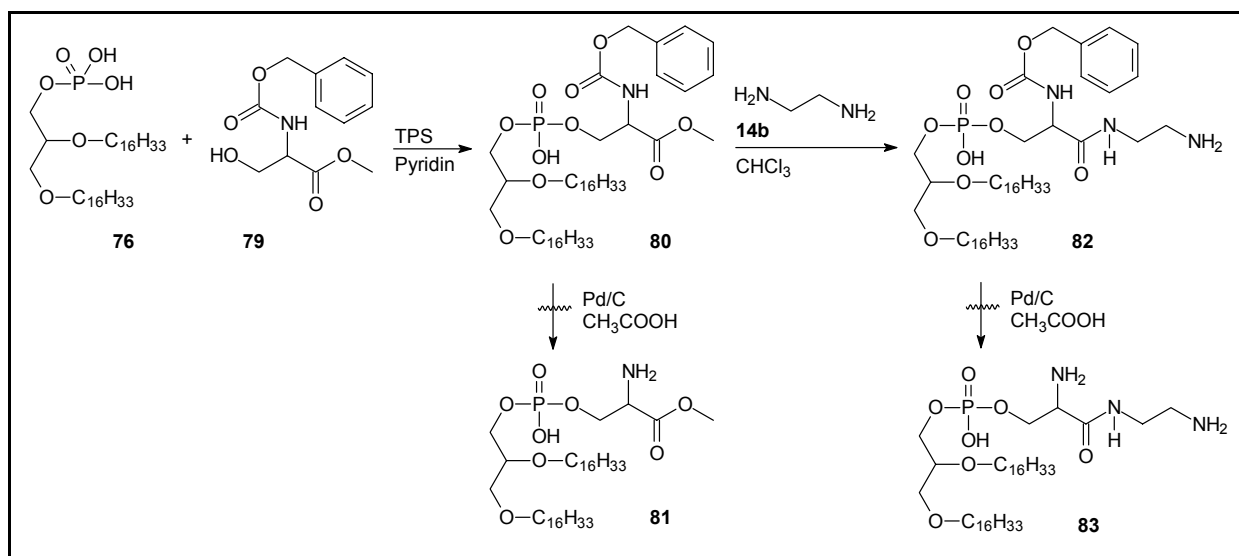


Abb. 40: Umsetzungsversuche der Phosphatidsäure.

12.2. Quarternierung von Phospholipiden

Als Alternative sollte das ebenfalls synthetisierte 1,2-Di-O-Hexadecylglycero-3-(2-bromethylphosphat) **78** weiter verwendet werden. Dazu wurde die Verbindung nach *Eibl* und *Nicksch*¹⁴⁴ mit unterschiedlichen Aminen umgesetzt. Die Bildung dieser Phospholipide beruht auf einer nucleophilen Substitution des Bromatoms der Kopfgruppe. Wie in der Literatur beschrieben, ließ sich die Reaktion mit Tri-, Di-, Monomethylamin und Ammoniak sehr gut durchführen. Nach den üblichen Methoden wurde zusätzlich versucht, eine derartige Quarternisierung mit Polyaminen durchzuführen. Aufgrund ausgeprägter Zersetzungsreaktionen ließ sich das Produkt **84** leider nicht isolieren. Schon nach kurzer Zeit entstand eine Vielzahl von Nebenprodukten mit ähnlichen Rf-Werten wie die Zielverbindung. Interessanterweise ist bisher auch kein Polyamin als Kopfgruppe beschrieben.

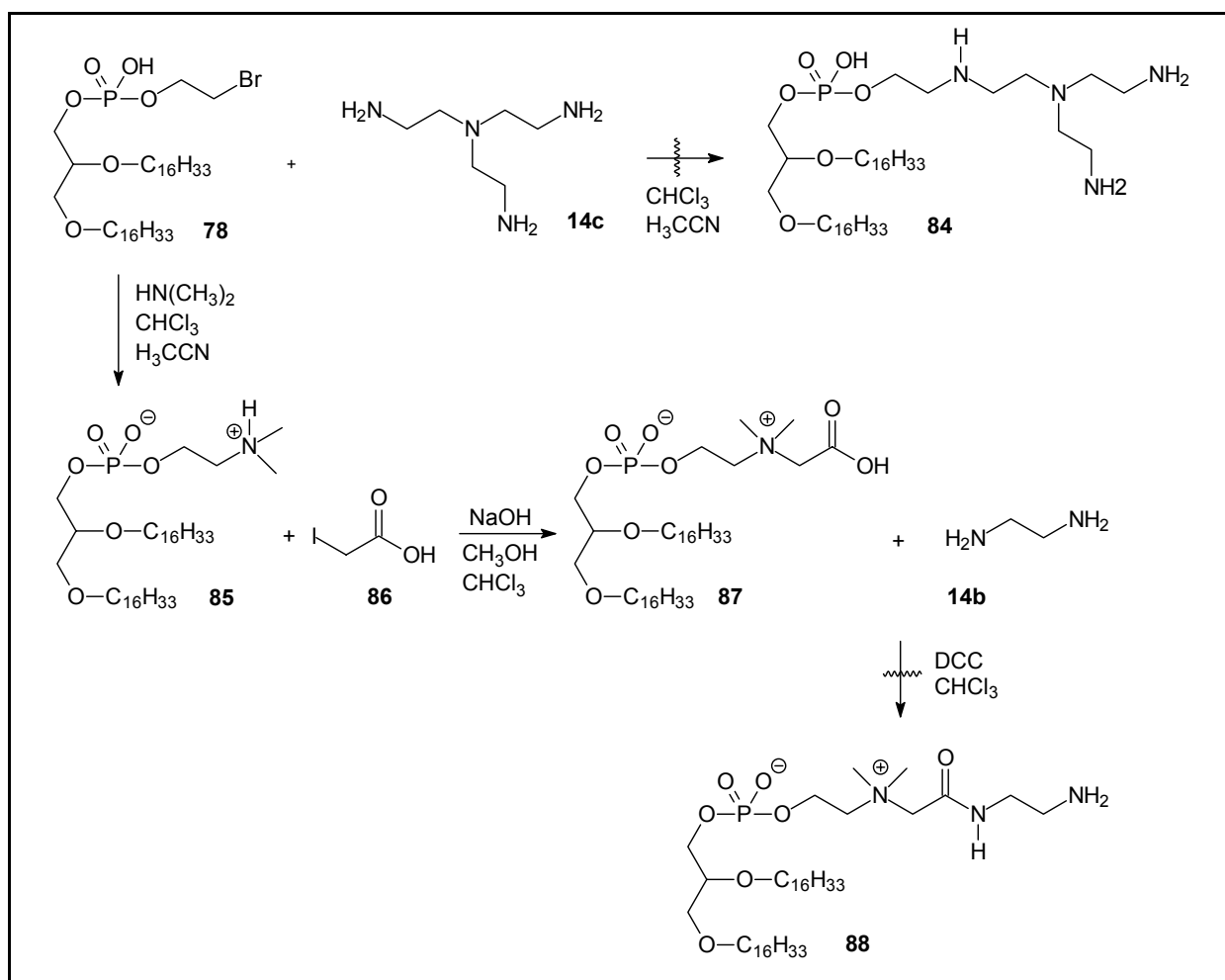


Abb. 41: Quarternierung der Phosphatidsäure.

Als weitere Möglichkeit bot sich die Einführung einer Carbonsäure als Kopfgruppe an. Dies sollte die Möglichkeit eröffnen, Substanzen mit freier Amino- oder Hydroxylfunktion kovalent

(amid- oder esterartig) unter Verwendung von Kondensationsmitteln (z. B. DCC) zu binden. Durch Stickstoffalkylierung von 1,2-Di-O-Hexadecylglycero-3-phosphorsäure-2'-N,N-dimethylaminoethylester **85** mit Iodessigsäure **86** wurde eine Verbindung mit Säurefunktion synthetisiert. Die Umsetzung erfolgte quantitativ. Der resultierende 1,2-Di-O-Hexadecylglycero-3-phosphorsäure-2'-carboxymethyl-N,N-dimethylammoniummethylester **87** sollte in einer abschließenden Reaktion mit unterschiedlichen Aminen gekuppelt werden. Leider konnte bei diesen Kondensationsreaktionen keinerlei Umsetzung festgestellt werden. Auch die Variation von Kondensations- und Lösungsmittel brachte nicht den gewünschten Erfolg. Möglicherweise kam es nicht zur Reaktion, weil der Phosphorsäureester selbst acider reagierte als die freie Carbonsäure. Abschließend lässt sich sagen, dass die verwendeten Phospholipide als Ausgangsverbindungen für die Darstellung von Vektoren bei der Gentransfektion unter den beschriebenen Bedingungen ungeeignet sind.

12.3. Phospholipide als neutrale Helferlipide für die Gentransfektion

Als Vektoren für die nicht-virale Gentransfektion werden unter anderem Liposomen verwendet. Diese bestehen meist aus einem kationischen Lipid und einem neutralen Helferlipid¹⁴⁵. Obwohl die meisten kationischen Lipide direkt für die Gentransfektion eingesetzt werden können, ist es vorteilhaft und vielfach auch notwendig, neutrale Lipide als sogenannte Helferlipide zu verwenden. Oftmals sind sie in der Lage die Transfektionsrate zu steigern^{20,23,146}. Unter Umständen wird erst durch die Zumischung von Helferlipiden die Formulierung und Stabilisierung von Liposomen durchführbar¹⁴⁷. Zudem fördern sie möglicherweise die Fusion mit der Endosomenmembran. Es wird diskutiert, dass damit eine Destabilisierung dieser Membran einhergeht. Damit ermöglichen Helferlipide eventuell die Freisetzung der DNA und verhindern deren Zerstörung im Endosom¹⁴⁸. Der exakte Mechanismus der endocytotischen Aufnahme von Liposomen und die Freisetzung der DNA aus dem Endosom ist jedoch weiterhin unklar. Im Allgemeinen werden als Helferlipide DOPC, DOPE oder Cholesterin verwendet. Diese besitzen selbst keinerlei transfizierende Eigenschaften¹²⁹. Ihre Rolle bei den unterschiedlichen Prozessen der Gentransfektion wurde bereits intensiv untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sich bei der Formulierung von DOTAP-Liposomen mit DOPC als Helferlipid lamellare Strukturen ausbilden, während sich mit DOPE invers hexagonale Mizellen bilden. Durch die unterschiedliche Phasenlage ergeben sich somit auch verschiedene biopharmazeutische Aspekte¹⁹. Zudem lässt sich sagen, dass Liposomen, die aus einer Mischung von kationischen und neutralen Lipiden bestehen, eine gute Allgemeinverträglichkeit zeigen und weder immunogene noch toxische Effekte haben¹⁷. Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass der Weg in die Zelle nicht allein

von der Wahl des kationischen Lipids abhängt, sondern auch das Helferlipid einen entscheidenden Einfluss hat.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand nun darin, neuartige Helferlipide zu synthetisieren. Dafür wurden zwei unterschiedliche Phospholipide dargestellt, die eine gewisse Ähnlichkeit mit existierenden Helferlipiden besitzen. Die physikochemischen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse wurden bereits eingehend untersucht^{149,150}. Ausgehend von Glycerol **32** wurde mit Benzaldehyd **38** nach dem Verfahren von *Verkade* und *Roon* das entsprechende Acetal **89** synthetisiert¹⁵¹. Dieses konnte anschließend an der freien sekundären OH-Gruppe mit Tetradecylbromid **2c** verethert werden. Die bisher erfolgreich angewandte Methode der Deprotonierung mit Kaliumhydroxid in Toluol erwies sich aufgrund der geringen Ausbeute als ungeeignet. Deshalb wurde für weitere Untersuchungen auf das bereits bekannte Repertoire von Deprotonierungsreagenzien und Lösungsmitteln zurückgegriffen. Neben Kalium-*tert.*butylat zeigte sich NaH als gutes Deprotonierungsreagenz. Toluol zeigte sich als wenig geeignetes Lösungsmittel, da sich hierbei eine große Anzahl an Nebenprodukten bildete. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass bei der Verwendung von THF als Lösungsmittel und NaH als Deprotonierungsreagens die besten Ausbeuten erzielt wurden. In jedem Fall wurde das Alkylierungsmittel im Überschuss verwendet. Wie in der Literatur beschrieben, erfolgte die Umsetzung generell mit der doppelt molaren Menge an Alkylierungsmittel^{130,152}. Bei äquimolaren Verhältnissen der Reaktanden lagen die Ausbeuten wesentlich niedriger. Das rohe 2-Phenyl-5-tetradecyloxy-[1,3]-dioxan **90** konnte ohne weitere Reinigung zum 2-O-Tetradecylglycerol **91** verseift werden.

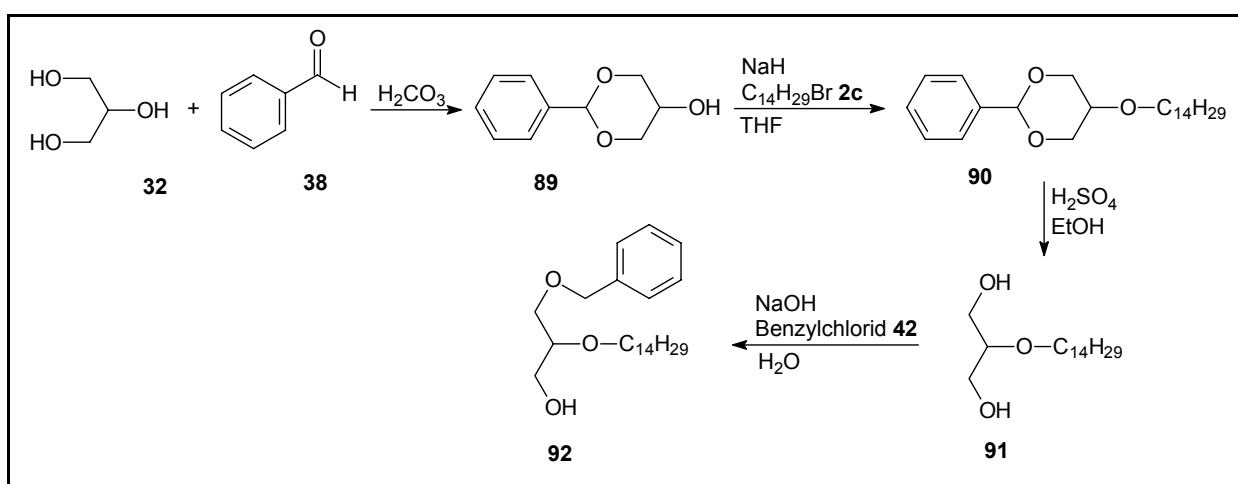


Abb. 43: Darstellung von 3-Phenylmethoxy-2-tetradecyloxy-1-propanol.

In einem weiteren Schritt wurde durch Monobenzilylierung mit Benzylchlorid **42** eine freie OH-Gruppe geschützt. Dabei wurde auf eine von *Dobner*¹⁵³ optimierte Vorschrift nach *Arnold*¹⁵² zurückgegriffen. Die Reaktionszeit für die Benzilylierung wurde verkürzt und gleichzeitig die

Reaktionstemperatur exakt kontrolliert. Dadurch ließ sich eine Bis-benzilylierung weitgehend unterdrücken. Die Verbindung wurde dabei mit Benzylchlorid **42** in einem Wasserbad auf 90 °C erhitzt und mit einer 50 %igen Natronlauge 15 min turbinert, sehr schnell abgekühlt und aufgearbeitet. Überschüssiges Benzylchlorid konnte durch Abdestillieren zurück gewonnen werden. Das erhaltene Rohprodukt **92** wurde ohne säulenchromatographische Aufreinigung mit 2-Bromethylphosphorsäuredichlorid **77** nach einer Vorschrift von *Eibl* und *Nicksch*¹⁴⁴ phosphoryliert und im Anschluss mit Trimethylamin quarterniert.

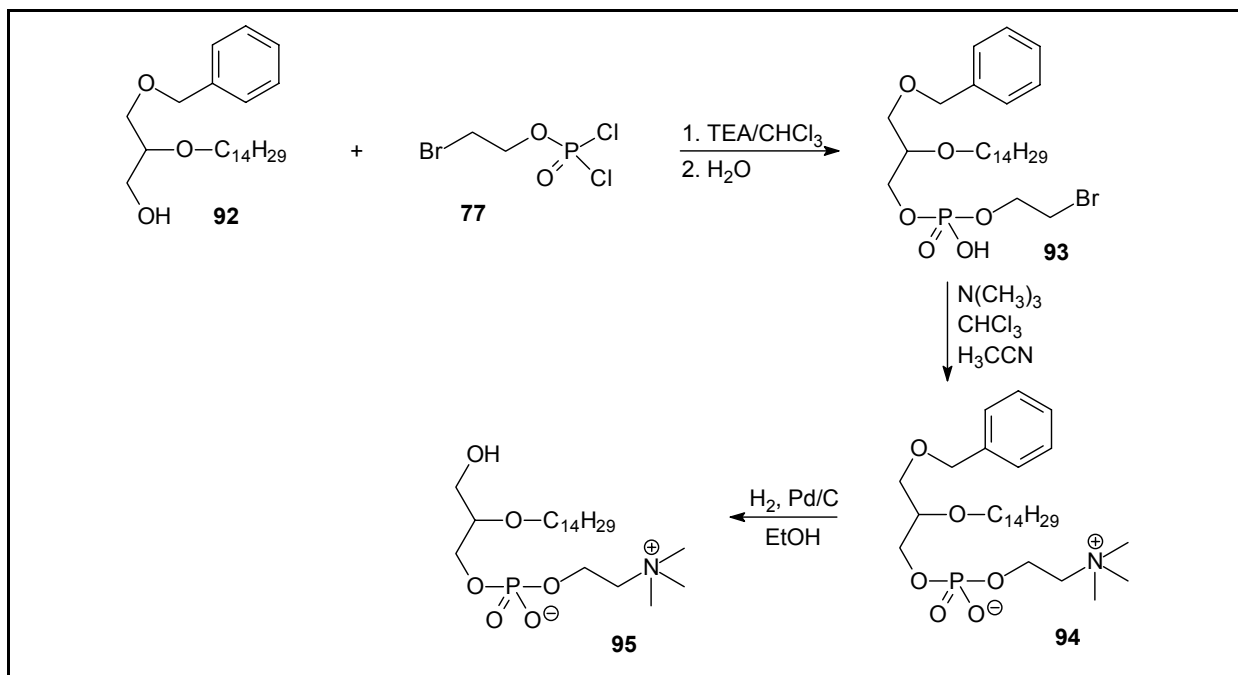


Abb. 44: Darstellung von 2-O-Tetradecylglycero-3-phosphorsäure-3'-N,N,N-trimethylammoniummethylester.

Bei der Berechnung der molaren Mengen der Reaktanden wurde von jeweils DC-reinen Ausgangsprodukten ausgegangen. Die DC-Untersuchung nach beiden Synthesestufen zeigte neben dem Cholin **94** sehr wenige Nebenprodukte. Als günstig erwies sich dabei die bereits von *Dobner*¹⁵³ beschriebene Erhöhung der Aminkonzentration. Zur Aufreinigung des Rohproduktes sollte eine säulenchromatographische Trennung durchgeführt werden. Allerdings konnte erfolgreich die mit wesentlich geringerem Zeitaufwand verbundene Methode der Umkristallisation genutzt werden. Es war bekannt, dass Phosphatidylcholine in den meisten polaren Lösungsmitteln mit der Ausnahme von Aceton sehr gut löslich sind. Deshalb wurde das vorliegende braune Öl mit wenigen Tropfen Methanol angelöst und nach Zugabe von Aceton im Eisbad heftig gerührt. Bereits nach kurzer Zeit bildete sich ein Präzipitat, das nach Zugabe von weiterem Aceton sehr gut abgesaugt werden konnte und durch Waschen mit eiskaltem Aceton vorgereinigt wurde. Danach wurde der Rückstand in

Aceton suspendiert und in der Siedehitze gelöst. Das beim Abkühlen der Lösung auskristallisierende Produkt war nur noch geringfügig verunreinigt. Bei wiederholter Umkristallisation löste sich das Produkt nicht mehr in der Siedehitze. Aus dem so gereinigten Lecithin **94** konnte nach Abhydrierung der Benzylschutzgruppe an Pd/C 5 % das 2-O-Tetradecylglycero-3-phosphocholin **95** als zentrale Zwischenverbindung erhalten werden. Das nach der Hydrierung erhaltene Rohprodukt konnte durch Filtration über Kieselgel aufgereinigt werden.

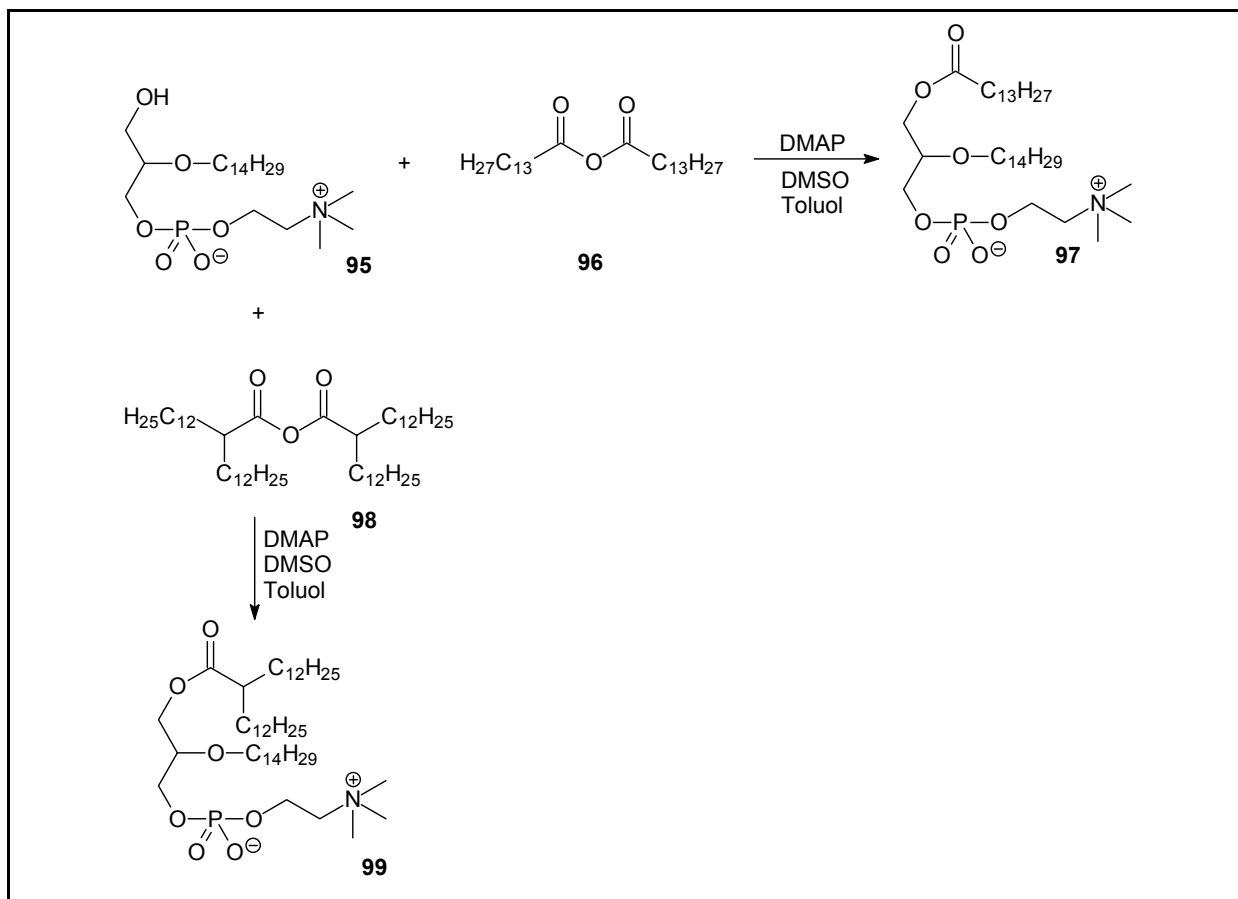


Abb. 45: Darstellung unterschiedlicher Phospholipide.

Die Acylierung der freien primären OH-Gruppe erfolgte einerseits mit einer langkettigen Säure, andererseits mit einer in α -Position zum Carbonylkohlenstoff verzweigten Säure. Dazu wurden die entsprechenden Säuren in ihre Anhydride überführt. Myristinsäure konnte in Tetrachlorkohlenstoff gelöst, mit DCC versetzt, kurz geschüttelt und 12 h stehen gelassen werden. Anschließend wurde vom gebildeten Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat ließ sich am Rotationsvakuumverdampfer einengen. Der Rückstand enthielt das Anhydrid **96** und es war möglich, diesen direkt für weitere Umsetzungen zu verwenden. Mit der α -verzweigten Säure konnte nach derselben Methode verfahren werden. Für die eigentliche Acylierungsreaktion wurde der Ester in wenig DMSO angelöst und mit etwas Toluol versetzt.

Das Anhydrid **96,98** wurde in wenig Toluol gelöst und der Mischung hinzugefügt. Als Katalysator diente bei dieser Reaktion DMAP. Während die Acylierung mit Myristinsäureanhydrid **96** innerhalb kurzer Zeit quantitativ erfolgte, gestaltete sich die Reaktion mit der alpha-verzweigten Säure als komplizierter. Die Umsetzung verlief nur schlecht. Deshalb wurde das Reaktionsgemisch auf etwa 50 °C erwärmt und dem Reaktionsansatz noch weiteres DCC hinzugefügt. Nach 60 h Reaktionszeit waren jedoch weiterhin Ausgangsprodukte nachweisbar. Trotzdem wurde nach dieser Zeit die Reaktion abgebrochen, selbst wenn eine Verlängerung der Reaktionszeit zu einer Steigerung der Ausbeute führen sollte. Die Aufarbeitung erfolgte bei beiden Acylierungsprodukten **97,99** nach demselben Schema. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum gelang es den Rückstand in wenig Chloroform zu lösen und mit einer Chloroform/Methanol/Ammoniak-Mischung mit steigender Polarität zu chromatographieren. Der chromatographischen Reinigung schloss sich ein Präzipitationsschritt an. Das entsprechende Phospholipid wurde in einem Zentrifugenglas in 2 bis 3 ml Chloroform gelöst. Unter Erwärmen wurde die Lösung im Argonstrom bis zur einsetzenden Trübung reduziert. Danach wurde vorsichtig erwärmt, bis sich die Suspension wieder aufklärte und das Zentrifugenglas mit abs. Aceton aufgefüllt. Dann wurde für 2 h im Kühlschrank stehengelassen. Im Anschluss daran wurde bei 0 °C 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert, vom Lösungsmittel abdekantiert und das ausgefallene Lipid im Exsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die so erhaltenen Lipide konnten als neutrale Helferlipide für die Gentransfektion eingesetzt werden.

13. Physikochemische Untersuchungen

Das physikochemische Verhalten einiger der in dieser Arbeit synthetisierten Lipide ist umfangreich durch Monoschichtuntersuchungen an der Grenzfläche Wasser/Luft charakterisiert worden. Um die physikochemischen Parameter möglichst wenig zu beeinflussen, wurden die Verbindungen vor den Untersuchungen hoch gereinigt. Die Untersuchungen wurden von Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm durchgeführt. Deshalb werden in diesem Kapitel nur noch einmal die wesentlichen Punkte in komprimierter Form dargestellt.

13.1. Monoschichtuntersuchungen

Die in dieser Arbeit beschriebenen amphiphilen Moleküle bilden an der Wasser-Luft-Grenzfläche monomolekulare Schichten, wobei die hydrophile Kopfgruppe mit der Subphase und der hydrophobe Teil mit der Atmosphäre in Verbindung stehen. Aus diesem Grund kam eine Langmuir-Filmwaage zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften zum Einsatz^{154,155}. Hierbei handelt es sich um einen mit Teflon beschichteten Trog, der die Subphase enthält, meist hochreines Wasser oder einen Puffer. Das Lipid wird in einem geeigneten, mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel gelöst und dann auf der Oberfläche gespreitet. Durch eine bewegliche Barriere kann die der Monoschicht zur Verfügung stehende Oberfläche variiert werden. Bei der Kompression durchläuft die quasi-zweidimensionale Monoschicht den dreidimensionalen Systemen analoge Aggregatzustände: gasförmig ungeordnet, flüssig-analog und kondensiert (Rotatorphasen oder ein- bis zweidimensionale flüssig-kristalline Phasen). Aufgrund der besonderen molekularen Struktur der Lipide sind die aufgefundenen kondensierten Phasen den smektischen flüssigkristallinen Phasen verwandt. Der Lateraldruck π kann direkt aus der Kraft auf die Barriere berechnet werden. Technisch einfacher ist die Bestimmung des Lateraldruckes aus der Oberflächenspannung gemäß,

$$\pi = \mu_0 - \mu$$

Abb. 46: Bestimmung des Lateraldruckes.

als Differenz zwischen Oberflächenspannung des Wassers ohne (μ_0) bzw. mit (μ) Lipidfilm definiert. π wird über die an einem Blättchen angreifenden Kräfte durch ein *Wilhelmy-Meßsystem* bestimmt.

13.2. Interpretation der Druck-Flächen ($\pi - \text{Å}^2$) Diagramme (Isothermen)

Die Monoschichtuntersuchungen wurden bei den Lipiden **15a-c** mit Citrat-Puffer (pH=4) in der Subphase durchgeführt. Bei der Untersuchung der Verbindung **9a** kam hochreines Wasser zum Einsatz. Die Messungen konnten in der Regel bei 20 °C durchgeführt werden. Die Malonsäurediamide wurden bei unterschiedlichen Temperaturen beginnend mit 15 °C, dann aufsteigend bis 30 °C in 5 °C Stufen vermessen.

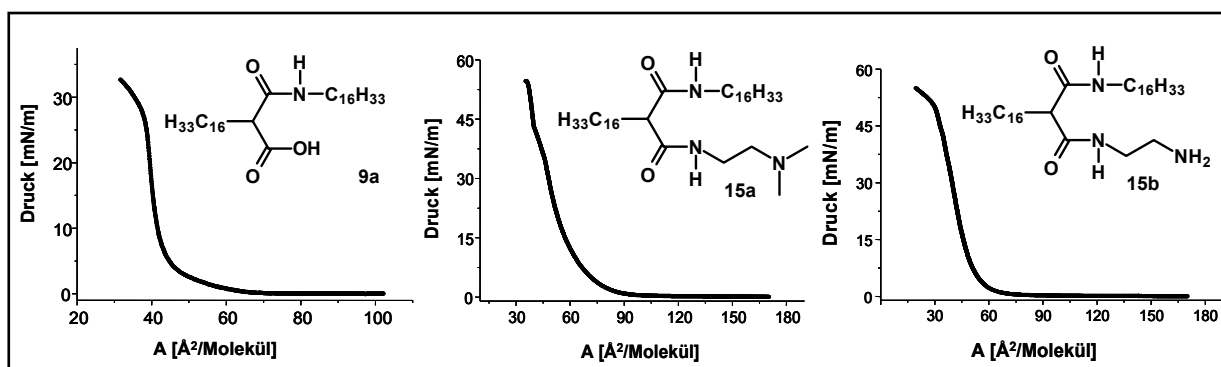


Abb. 47: Isothermen der Verbindungen **9a**, **15a** und **15b**.

Sowohl das Malonsäuremonoamid **9a**, als auch die Malonsäurediamide **15a,b** mit kleinen Kopfgruppen wandeln sich unter Druck von der gas-analogen direkt in die kondensierte Phase um. Bei sehr großen molekularen Flächen liegen die Moleküle in der Form eines „zweidimensionalen Gases“ vor, das heißt, es existieren keine Wechselwirkungen der Moleküle untereinander. Erst die Kompression führt zu einer Umwandlung in die kondensierte Phase. Die Umwandlung ist erster Ordnung und daher mit einem Zweiphasen-Koexistenzgebiet verbunden. Der Umwandlungsdruck zwischen den beiden Phasen ist sehr klein und daher in der Isotherme nicht zu detektieren. In der kondensierten Phase liegen die Moleküle in hoher Packungsdichte vor. Für Zweikettenlipide sind molekulare Flächen zwischen 40-45 Å² typisch.

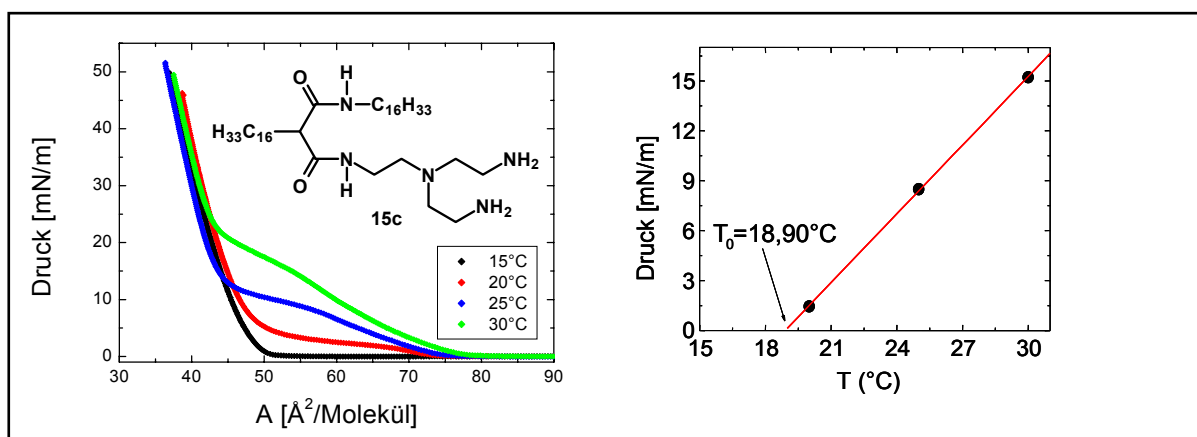


Abb. 48: Isotherme der Verbindung **15c**.

Das Malonsäurediamid **15c** mit großer Kopfgruppe zeigt bei etwa 15 °C das gleiche Verhalten einer direkten Umwandlung vom gas-analogen Zustand in die kondensierte Phase. Oberhalb dieser Temperatur ist jedoch ein weiterer charakteristischer Phasenübergang 1. Ordnung zu erkennen. Die in etwa horizontal verlaufenden Teile der Isothermen entsprechen der so genannten Hauptumwandlung des Lipides, den Übergang vom fluiden in den kondensierten Zustand. Dies ist vergleichbar mit dem Koexistenzgebiet flüssig/fest in dreidimensionalen Systemen. Der Druckanstieg, der den Übergang vom gas-analogen in den flüssig-expandierten Zustand anzeigt, setzt bei diesem Lipid bereits bei einer Fläche von 70-80 Å² ein, um in einem Plateau zwischen 50-60 Å² zu münden. Der Umwandlungsdruck der sich bei 25 °C am Beginn des Plateaus bestimmen lässt, liegt bei 10 mN/m. Die Temperaturerhöhung auf 30 °C zeigt ein weiteres Ansteigen des Phasenübergangsdruckes. Als Schlussfolgerung wird der Druckbereich in dem die flüssiganaloge Phase vorliegt, durch die Erhöhung der thermischen Energie der Moleküle erweitert.

13.3. GIXD-Untersuchungen

Um genauere Aussagen über die Gitterparameter und Neigungswinkel der hydrophoben Ketten zu ermöglichen, wurden Beugungsexperimente an den kondensierten Phasen durchgeführt^{156,157,158,159}. Dabei macht man sich zu nutze, dass die Wellenlänge der Röntgenstrahlung im Bereich eines Atomabstandes liegt (0,1-0,3 nm). Um Beugungseffekte beobachten zu können, werden daraus folgend Gitter oder Periodizitäten benötigt, die Gitterabstände bzw. Spaltbreiten von ähnlicher Größe aufweisen. Als Methode wurde dazu die Synchrotron Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (GIXD) verwendet. Hierbei wird die Probe mit einem „quasi-parallelen“ Röntgenstrahl hoher Intensität in einem Winkel von

$0,11^\circ$ (streifend) bestrahlt. Die gebeugte Strahlung wird als Funktion des vertikalen und des horizontalen Streuwinkels detektiert. In einem Diagramm wird die Streuintensität als Funktion der zur Wasseroberfläche parallelen (in-plane) Komponente Q_{xy} und der zur Wasseroberfläche senkrechten (out-of-plane) Komponente Q_z aufgetragen.

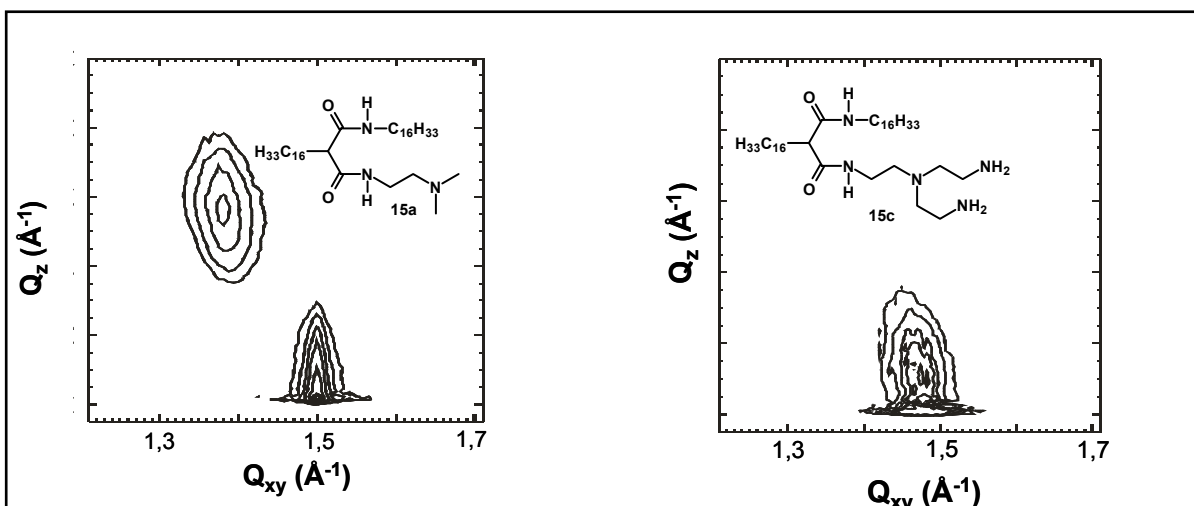


Abb. 49: GIXD Diagramme der Verbindung **15a** und **15c**.

Die Messungen ergaben für Verbindung **15a** eine sehr dichte, orthorhombische Packung der Ketten. Das Beugungsmuster der kondensierten Phase zeigt eindeutig, dass die Ketten ungeneigt sind. Ein zusätzliches Signal bei $1,32 \text{ \AA}^{-1}$ deutet auf die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Amidfunktionen hin.

Verbindung **15c** zeigt im Vergleich dazu ein anderes Beugungsmuster. Bei niedrigen Drücken ist eine deutliche Gitterverzerrung zu erkennen, die jedoch bei hohen Drücken abnimmt. Für eine Gitterverzerrung kommen zwei Ursachen in Frage. Einerseits kann eine Neigung der Ketten die Gitterverzerrung verursachen, andererseits führt eine sehr dichte Packung der Ketten (herringbone packing) zu einem derartigen Effekt. Eine geringere Verzerrung bei hohem Druck spricht jedoch gegen die „herringbone“ Packung. Folglich liegen die Ketten bei einem Druck von 10 mN/m geneigt vor. Weitere Messungen ergaben, dass der Neigungswinkel von 23° bei 7 mN/m auf 0° bei 25 mN/m abnimmt. Im nicht geneigten Zustand liegen die Moleküle in hexagonaler Symmetrie in einer Rotatorphase vor (LS Phase). Die Packungsdichte ist verglichen mit Verbindung **15a** deutlich geringer.

13.4. IRRAS-Spektroskopie

Zusätzlich zu den Monoschicht- und GIXD-Untersuchungen wurden IRRAS Messungen durchgeführt, um erste Informationen über die Wechselwirkungen von DNA mit den Lipidmonoschichten zu erhalten. Die Infrarot Reflexions Absorptions Spektroskopie (IRRAS) wurde zur Charakterisierung von Monoschichten an der Luft/Wasser Grenzfläche entwickelt¹⁶⁰. Diese Experimente stellen eine Überleitung zu den biologischen Testungen dar, die darüber hinaus an der Martin-Luther-Universität durchgeführt wurden. Sie zeigen eindeutig die Adsorption von DNA an den Monoschichten. Diese biophysikalische Methode stellt somit ein erstes Screening für weiterführende Untersuchungen dar.

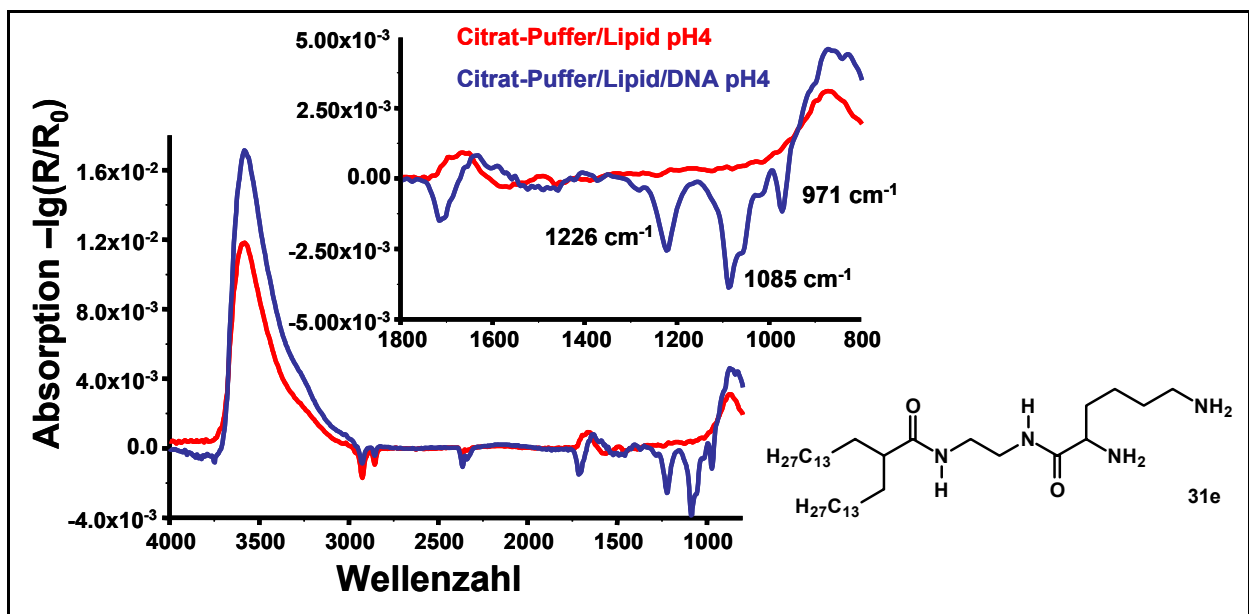


Abb. 50: IRRAS Messung am Beispiel von Verbindung 31e.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass

- alle untersuchten Malonsäurediamide stabile Monoschichten bilden
- die Struktur und Bildung der kondensierten Phase von der Art der Kopfgruppe abhängt
- DNA an den untersuchten Monoschichten adsorbiert.

14. Transfektionsuntersuchungen

Einige der dargestellten Transfektionslipide wurden von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. *Langner* in einem in-vitro Testsystem auf ihre Transfektionsleistung untersucht¹⁶¹. Die Verbindungen ließen sich in Kombination mit geeigneten Helferlipiden, meist diente dazu das neutrale DOPE, zu Liposomen formulieren. Zur Anwendung kam die Filmbildungsmethode mit anschließender Hydratisierung des Lipidfilmes¹⁶². Als Testsystem wurde die Zelllinie NIH 3T3 ausgesucht¹⁶³. Hierbei handelt es sich um immortalisierte Fibroblastenzellen der Maus, die unter anderem aufgrund ihrer relativ problemlosen Kultivierung häufig für Transfektionsexperimente eingesetzt werden. Die Testung erfolgte sowohl in serumfreiem als auch serumhaltigem Medium um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die im Serum enthaltenen Proteine die Transfektion einschränken. Als interner Standard und Referenzsubstanz wurde die bei der Firma Gibco erhältliche Liposomenpräparation Lipofectamine[®] verwendet. Diese setzt sich aus den Lipiden DOSPA und DOPE im Verhältnis 3:1 zusammen. Die von der Arbeitsgruppe formulierten Liposomen wurden so hergestellt, dass je nach Präparation die Zusammensetzung aus Transfektions- und Helferlipid in den molaren Verhältnissen 1:1, 2:1, 3:1 und 1:2 vorlag. Für die Versuche wurden nur Proben verwendet, bei denen aus der jeweiligen Kombination der Ausgangsstoffe auch Liposomen dargestellt werden konnten. Zur Charakterisierung der Liposomen wurde die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) verwendet. Als Marker-DNA wurde das Plasmid pELI 92 verwendet. Es codiert für das Enzym β -Galactosidase und wird aus transfizierten *E. coli* Zellen gewonnen. Die Transfektionsrate ließ sich bestimmen, indem die Konzentration des Produktes der enzymatischen Umsetzung in transfizierten Zellen ermittelt wurde. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten. Nach der X-Gal-Methode färben sich die transfizierten Zellen durch die enzymatische Reaktion der β -Galactosidase blau und lassen sich direkt unter dem Mikroskop auszählen. Im Vergleich zu dieser Methode ist das so genannte ONPG-Assay wesentlich genauer und lässt sich besser reproduzieren. Hierbei erfolgt eine Lyse der Zellen und die isolierte β -Galactosidase wird außerhalb der Zellen durch eine photometrische Bestimmung quantifiziert¹⁶⁴.

Zudem wurde die Zytotoxizität der dargestellten Liposomen untersucht. Auch hierbei können unterschiedliche Methoden angewandt werden. Durch den MTT-Test wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen, unabhängig davon, ob diese momentan DNA synthetisieren oder nicht. Der bei dem Neutralrot-Test verwendete Farbstoff wird von lebenden Zellen aufgenommen und färbt diese an. Der Anteil an Neutralrot in der Zelle stellt demzufolge ein Maß für die Vitalität dar.

Unter anderem wurde das Malonsäurediamid **15b** und das α -verzweigte Säureamid **31d** auf ihre Eignung für die Gentransfektion untersucht. Als polare Kopfgruppe der Verbindung **15b**

diente Ethylendiamin, das via Amidbindung direkt an den Zentralbaustein angeknüpft wurde. Dieses Lipid zeigte in den dargestellten Liposomenpräparationen keinerlei Transfektion. Sowohl die X-Gal Bestimmung als auch das ONPG-Assay zeigten negative Ergebnisse. Die durchgeführten Zytotoxizitätstests ergaben für die Liposomenpräparationen im Verhältnis 1:1 und 1:2 eine gute Viabilität der Zellen. Aufgrund der ungenügenden Transfektion wurde diese Verbindung jedoch nicht weiter untersucht.

Das Lipid **31d** verfügt mit der Aminosäure Lysin im Gegensatz zur Verbindung **15b** über eine Kopfgruppe mit einer großen räumlichen Ausdehnung, die zudem über einen Spacer mit der Kernstruktur verbunden ist.

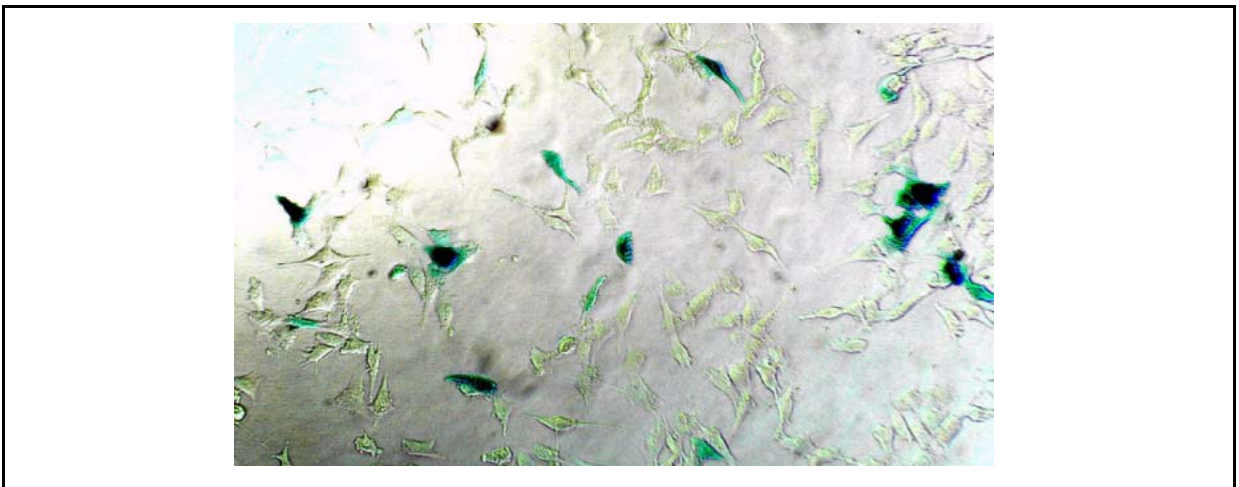


Abb. 51: Transfizierte Zellen nach der X-Gal-Färbung unter dem Mikroskop.

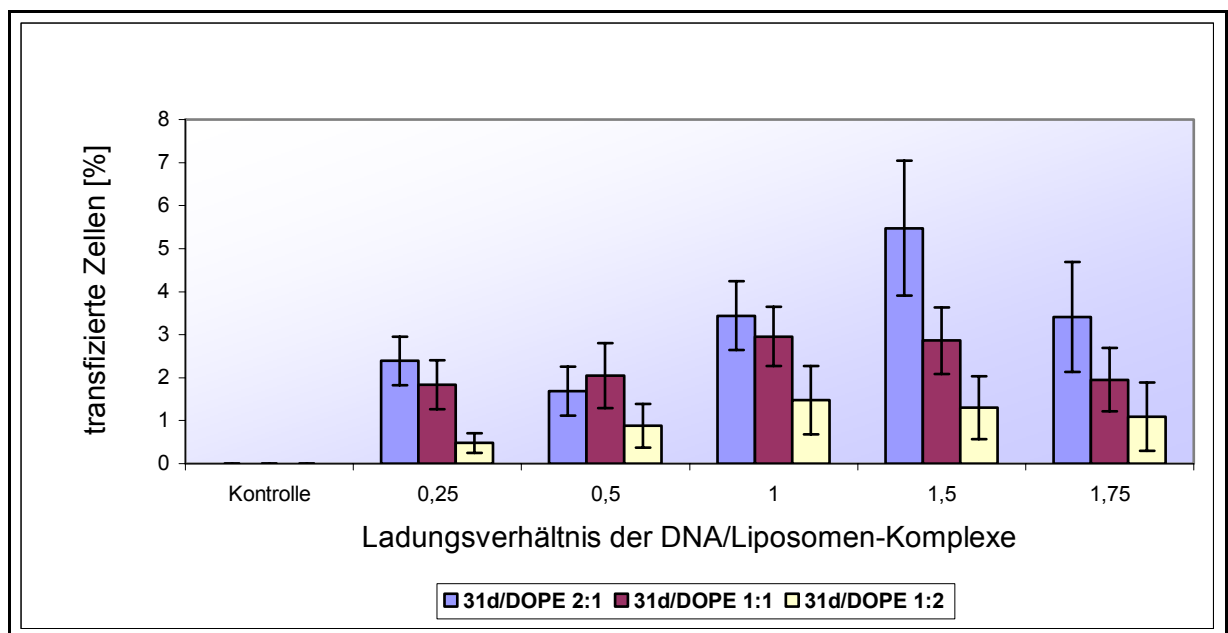


Abb. 52: Transfektionsrate der Liposomenpräparation **31d**/DOPE nach der X-Gal-Färbung.

Die durchgeführte X-Gal Methode zeigt deutlich die Blaufärbung einiger Zellen, was auf eine gelungene Transfektion hinweist. Bedingt durch die manuelle Auszählung bei dieser Methode erhielt man jedoch eine recht große Abweichung der Ergebnisse. Es konnte trotzdem eindeutig gezeigt werden, dass mit zunehmendem Anteil des Transfektionslipides in den Liposomen die Transfektionsrate anstieg. Der wesentlich genauere ONPG-Assay bestätigte diese Aussage.

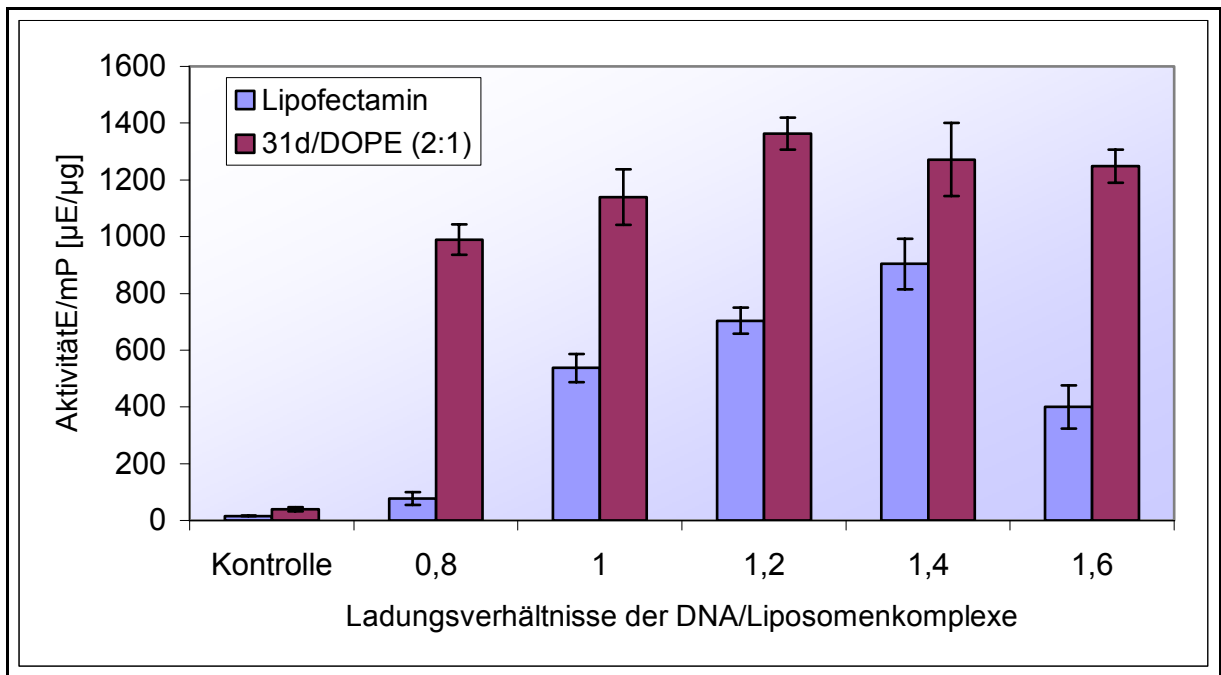


Abb. 53: Transfektionseffizienz der Liposomen aus **31d/DOPE (2:1)** in serumfreien Medium nach ONPG-Assay.

Der Maximalwert für die enzymatische Reaktion liegt bei einer Liposomenpräparation mit einem Verhältnis von Transfektionslipid zu Helferlipid von 2:1 und einem positiven Ladungsverhältnis von 1,2. Dieser Wert übertrifft das Maximum der Referenzsubstanz Lipofectamine[®] um etwa 30 %. Damit konnte das Ergebnis bestätigt werden, das sich bereits bei der X-Gal Färbung andeutete. Liposomen, die aus dem Lipid **31d** und DOPE bestehen, sind demzufolge besser in der Lage, die DNA für das β -Gal codierende Gen in die Zellen zu transportieren als das kommerziell erhältliche Transfektionsagens. In einer weiteren Untersuchung sollte gezeigt werden, dass dieses Lipid auch in serumhaltigen Medium für die Gentransfektion geeignet ist. Da sich die Liposomen der Zusammensetzung 1:1, 2:1 und 3:1 in serumfreien Medium als sehr effizient erwiesen, wurden auch nur diese in serumhaltigen Medium untersucht. Wie erwartet nahm die Transfektionsleistung insgesamt ab, da einige Lipide mit Serumproteinen interagierten und dadurch inaktiviert wurden.

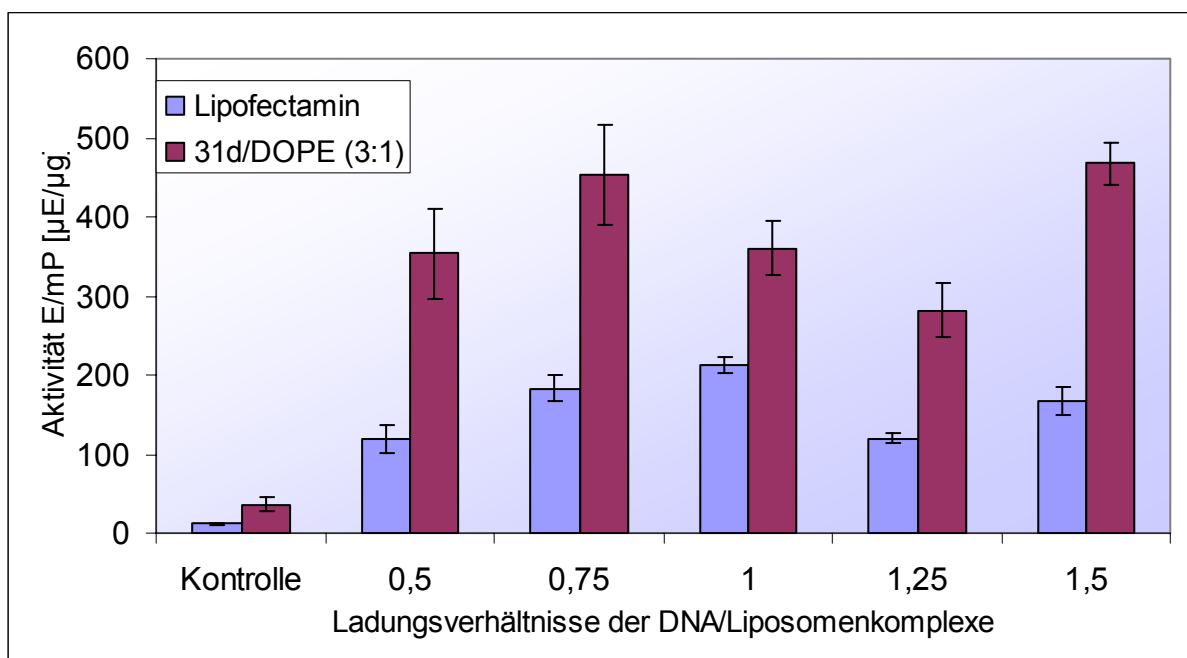


Abb. 54: Transfektionseffizienz der Liposomen aus **31d/DOPE (3:1)** in serumhaltigen Medium nach ONPG-Assay.

Liposomen mit einem hohen Anteil an Transfektionslipid konnten jedoch trotz der partiellen Inaktivierung durch Proteine immer noch stark genug DNA binden und transfizieren. Bemerkenswert ist, dass Liposomen, die im Verhältnis 3:1 zusammengesetzt waren, im Vergleich zu Lipofectamine® eine rund doppelt so hohe Transfektionsrate in serumhaltigem Medium aufwiesen. Auch wenn der Versuch im serumhaltigem Intervall gestartet wurde, war diese Präparation der Transfektionsrate von Lipofectamine® überlegen. Die abschließende Auswertung der Untersuchungen in serumhaltigen Medium führte zu folgenden Schlussfolgerungen. Einerseits erhöhte ein steigender Anteil des Lipides **31d** in den Liposomen die Menge an transfizierter DNA, andererseits lagen die Maxima bei kleineren Ladungsverhältnissen als das für die DNA/Liposomen-Komplexe nachgewiesen werden konnte, die nicht mit Serum behandelt wurden. Nach Abschluss der Transfektionsuntersuchungen wurden die Liposomen auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Der MTT-Test ergab einen geringen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Leider wurde beim Neutralrottest eine erhöhte Mortalität der Zellen nachgewiesen. Im Vergleich zu der Kontrollreihe waren die Wells mit den Proben, die einen großen Überschuss an Transfektionslipid aufwiesen, geringer besiedelt. Warum die beiden Testsysteme, die Aufschluss über die Viabilität der Zellen geben, in diesem Fall so stark voneinander abwichen, konnte nicht geklärt werden. Generell scheinen diese Liposomenpräparationen die erhöhte Transfektionseffizienz nur mit einer verminderten Verträglichkeit zu ermöglichen.

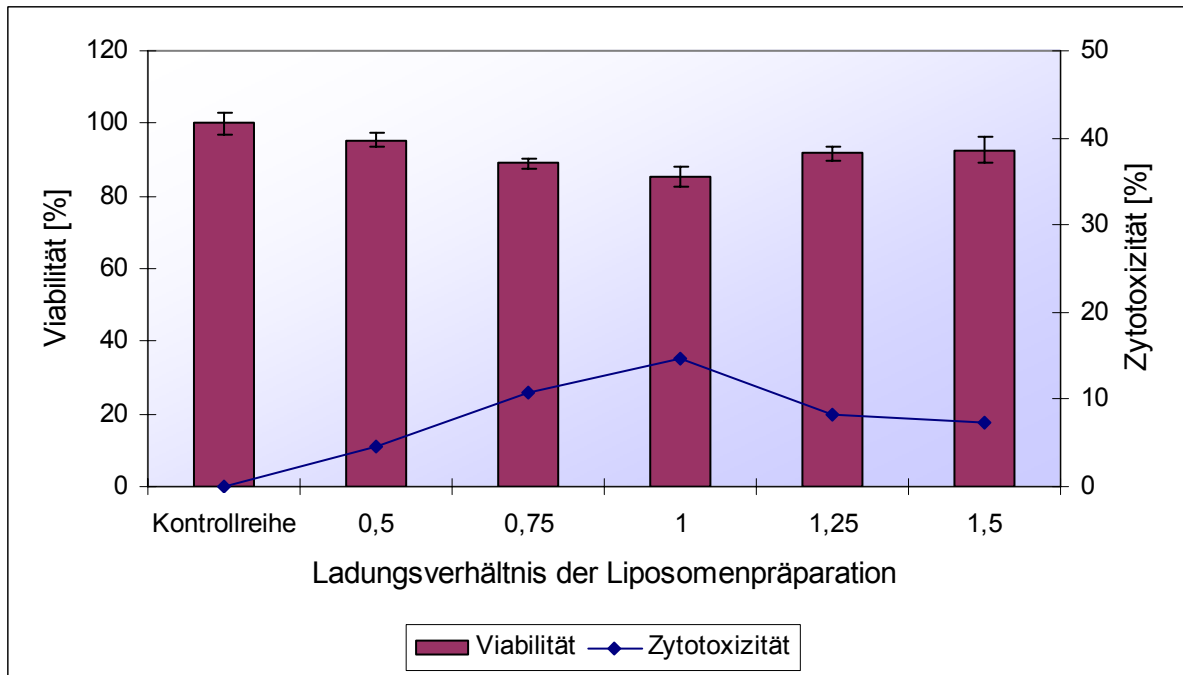


Abb. 55: MTT-Test der Liposomen 31d/DOPE (3:1).

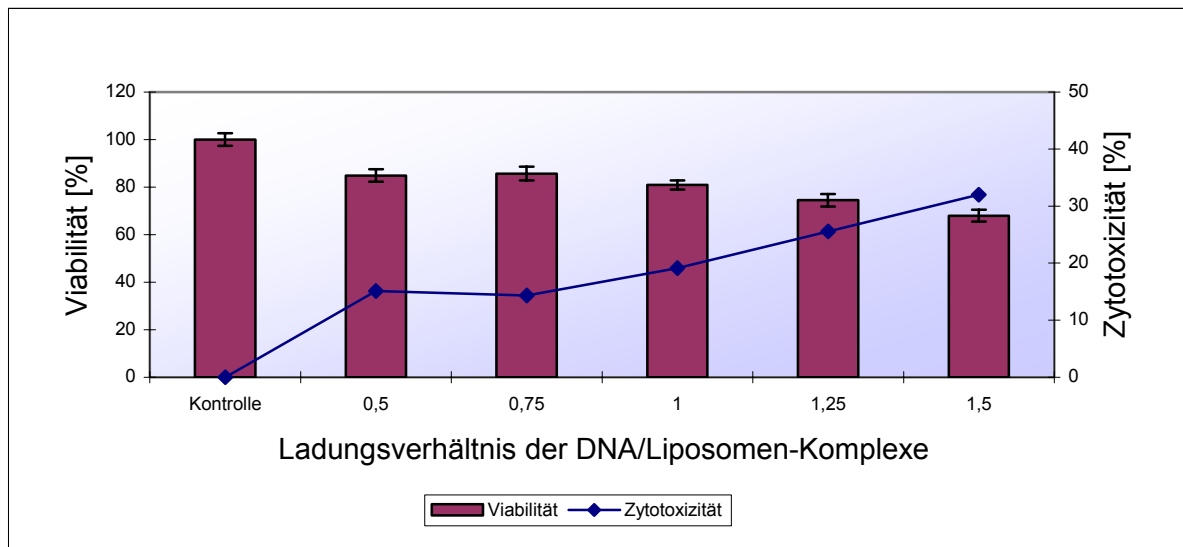


Abb. 56: Neutralrottest der Liposomen 31d/DOPE (3:1).

15. Zusammenfassung

Die somatische Gentherapie stellt für die Zukunft eine der Therapieformen zur Behandlung von Erbkrankheiten und bestimmten erworbenen genetischen Defekten dar. Als Transportvehikel für Erbinformationen bieten Liposomen einige entscheidende Vorteile gegenüber physikalischen Gentransfersystemen und viralen Vektoren. Selbst in hohen Konzentrationen sind sie weder immunogen noch onkogen und zeigen eine sehr gute Allgemeinverträglichkeit. Die liposomal vermittelte Gentransfektion wird hauptsächlich durch die ineffiziente Einschleusung von DNA in Zellen des Organismus limitiert. Deshalb ist es besonders wichtig, neue und vor allen Dingen effiziente Liposomen für die Gentransfektion zu entwickeln. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit unterschiedliche, neuartige Lipide synthetisiert.

Die in der Problemstellung und der Synthesekonzeption geforderten Aspekte ließen sich durch die Anwendung eines für diese Problematik entwickelten Bausteinprinzips umsetzen. Als Ausgangs- und Zentralbaustein dienten unterschiedliche Malonsäureester, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Pentaerythritol und Glycerol. Durch die Einführung von zwei Alkylketten wurden amphiphile Moleküle erhalten, die durch die Umsetzung mit symmetrischen Polyaminen bzw. Aminosäuren in geeignete Lipide für die Gentransfektion umgewandelt werden konnten. Bei der Verknüpfung der unterschiedlichen Komponenten wurden hauptsächlich bioabbaubare Amidbindungen verwendet.

Sowohl die Tris- als auch die Pentaerythritolderivate boten durch eine zusätzliche freie funktionelle Gruppe weitere Variationsmöglichkeiten. Generell besteht die Möglichkeit, in zukünftigen Arbeiten die durchgeführte Synthesekonzeption zu erweitern. Denkbar ist die Einführung ungesättigter bzw. verzweigter Alkylketten um die Fluidität der Moleküle zu erhöhen. Zusätzlich ist es möglich weitere Polyamine einzusetzen und unter Verwendung geeigneter Schutzgruppen unsymmetrische Kopfgruppen zu bilden. Besonders die dargestellten pH-sensitiven Acetale bieten vielfältige Entwicklungs- und Optimierungsmöglichkeiten.

Die dargestellten Verbindungen erfüllten mit Ausnahme der Neutrallipide die theoretischen Voraussetzungen, um für die liposomale Gentransfektion angewendet zu werden. Es sind ausnahmslos amphiphile Moleküle, die je nach Verwendungszweck als Transfektions- oder Helferlipide zum Einsatz kamen.

Die Fähigkeit, sich an Grenzflächen anzulagern und DNA zu binden, wurde am MPI Potsdam durch unterschiedliche analytische Methoden an Monoschichten untersucht. Die Messungen ergaben, dass sich Lipide mit kleinen Kopfgruppen unter Druck direkt von der gas-analogen in die kondensierte Phase umwandeln ließen. Im Gegensatz dazu zeigten Lipide mit großen, raumfüllenden Kopfgruppen einen charakteristischen Phasenübergang 1. Ordnung.

Durch IRRAS Messungen konnten wichtige Informationen über die Wechselwirkungen von DNA mit den Lipidmonoschichten gesammelt werden. Alle untersuchten Verbindungen, die das theoretische Konzept erfüllten, adsorbierten DNA. Es deutete sich jedoch an, dass die physikochemischen Methoden keine sicheren Aussagen über die Effizienz von Transfektionslipiden zulassen. Dessen ungeachtet konnte neben einer sehr genauen physikochemischen Charakterisierung bewiesen werden, dass auch schwache Wechselwirkungen ausreichen, um DNA zu adsorbieren. Die IRRAS-Messungen stellten somit eine erste Screening-Methode für die sich anschließende biologische Testung dar. Ausschließlich Substanzen, die an der Monoschicht die Fähigkeit aufwiesen, mit DNA zu interagieren, wurden am Zellkulturmodell getestet.

Für die biologische Testung war es möglich, aus den dargestellten Lipiden durch die Filmbildungsmethode Liposomen zu formulieren. Im Anschluss daran wurden diese mit einem enzymcodierenden Plasmid versetzt und auf eine Zellkultur aufgebracht, um zu untersuchen, ob die Zellen die fremde DNA in ihr Genom aufnahmen. Einige Lipidkombinationen waren in der Lage Liposomen auszubilden, konnten die DNA aber nicht ausreichend transfizieren. Es stellte sich heraus, dass sich Lipide mit kleinen Kopfgruppen nicht für die Gentransfektion eigneten. Lipide mit großen Kopfgruppen zeigten hingegen sehr gute Transfektionsergebnisse und übertrafen Lipofectamin um bis zu 30%.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Erkenntnisse liefern einen Beitrag zur Entwicklung der liposomalen Gentherapie. Welche Form der Gentransfektion, ob viral oder nonviral, sich letztendlich durchsetzen wird, bleibt fraglich. Die Zukunft liegt wahrscheinlich in so genannten Hybridvektoren, die eine Kombination von viralen und nicht-viralen Gentransfersystemen darstellen. Innovativ wäre zum Beispiel die Anbindung von viralen Hüllproteinen auf Liposomen. In Zukunft müssen vor allen Dingen die unspezifischen und spezifischen intrazellulären Transportmechanismen der DNA und neue Drug Delivery Systeme untersucht und entwickelt werden.

16. Arbeitsvorschriften

16.1. Allgemeine Angaben

Schmelzpunktbestimmung

Die angegebenen Schmelzbereiche wurden mit einem Heitzschmikroskop nach *Boetius* bestimmt und stellen unkorrigierte Werte dar.

Elementaranalyse

Die Elementaranalyse zur Bestimmung des C-, H-, N- und S-Gehaltes erfolgte an einem Gerät von *Leco* im automatischen Mikroverfahren, der Halogengehalt wurde im Halbmikroverfahren titrimetrisch ermittelt.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem *Finnigen MAT 710 C* aufgenommen. Zur Injektion der Substanzen diente eine Spritzenpumpe *Havard Apparatus 22*. Die Ionisation wurde im Elektronenspray bei 4,5 kV positiv und negativ durchgeführt. Das Gerät verfügt über eine beheizbare Kapillare (200 °C) und weist eine Flussrate von 20 µl/min auf. Zum Lösen der Proben wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol, Wasser und Chloroform unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet.

NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR Spektren wurden bei einer Frequenz von 400 MHz an einem *Bruker AC 500* mit Tetramethylsilan als inneren Standard aufgezeichnet. Als Lösungsmittel für die Proben diente deuteriertes Chloroform und deuterierte Chloroform/Methanol-Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktionsverläufe und zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Zwischenprodukte und Endprodukte wurden DC-Alufohlen mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Die Substanzen wurden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst, dünn aufgetragen und in Chromatographiekammern unter Kammersättigung entwickelt.

Als mobile Phase dienten Standardlaufmittel folgender Zusammensetzung:

Laufmittel 1: Chloroform/Heptan 6:4

Laufmittel 2: Chloroform/Ether 8:2

Laufmittel 3: Chloroform/Methanol 8:2

Laufmittel 4: Chloroform/Methanol/Ammoniak 65:35:5

Laufmittel 5: Chloroform/Methanol 9:1

Die Detektion der Chromatogramme erfolgte nach dem Trocknen mit:

- UV-Licht der Wellenlänge 254nm und 366nm.
- Bromthymolblau-Lösung (0,4g KOH und 0,2g Bromthymolblau auf 1000ml Wasser)
Mit Bromthymolblau lassen sich bereits Spuren von Verbindungen mit lipophilen Charakter nachweisen. Die Empfindlichkeit kann durch Bedampfen mit Ammoniak erhöht werden.
- Molybdänspray wurde speziell für phosphorhaltige Verbindungen verwendet. In Abhängigkeit von der Konzentration erschienen rotbraune bis dunkelblaue Flecke.
- Brom/Methanol-Lösung wurde zur Detektion ungesättigter Verbindungen verwendet.

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie diente zur Reinigung der Zwischen- und Endprodukte. Als Trennmittel wurde Kieselgel 60 (*Merck*) mit der Korngröße 0,063 – 0,200 mm für drucklose Chromatographie und Kieselgel 60 der Korngröße 0,04 – 0,063 mm für Flash-Chromatographie verwendet. Als Elutionsmittel dienten Heptan-Diethylether-Mischungen, Chloroform-Diethylether-Mischungen, Chloroform-Methanol-Mischungen und Chloroform-Methanol-Ammoniak-Mischungen, wobei die Polarität diskontinuierlich erhöht wurde.

Zirkulare Chromatographie

Für die zirkulare Entwicklung von präparativen Platten wurde das *Chromatotron*-Gerät der Firma Harrison Research verwendet. Die zu trennenden Substanzen wurden auf eine konzentrische Platte um den Mittelpunkt aufgetragen. Das Elutionsmittel wurde von der Plattenmitte zugeführt und die Platte nach außen entwickelt.

Vorbehandlung der eingesetzten Lösungsmittel

Alle eingesetzten Lösungsmittel wurden nach den in der Literatur⁴⁹ angegebenen Vorschriften getrocknet und frisch destilliert.

Verbindungen die mit (*) gekennzeichnet sind wurden im Rahmen einer Diplomarbeit synthetisiert.

16.2. Kommerziell erworbene Chemikalien

Benzaldehyd (<i>Fluka</i>)	Myristinsäure (<i>Aldrich</i>)
(Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)- phosphoniumhexafluorophosphat (<i>Aldrich</i>)	Natrium (<i>Fluka</i>)
Benzylchlorid (<i>Fluka</i>)	Natriumazid (<i>Aldrich</i>)
Bis-(2-bromethyl)ether (<i>Aldrich</i>)	Natriumborhydrid (<i>Aldrich</i>)
Boc-Gly-OH (<i>Aldrich</i>)	Natriumhydrid 60% in Mineralöl (<i>Aldrich</i>)
Boc-Leu-OH (<i>Aldrich</i>)	Octadecylbromid (<i>Aldrich</i>)
Boc-Lys(Boc)-OH (<i>Aldrich</i>)	Oleylamin (<i>Aldrich</i>)
Boc-Met-OH (<i>Aldrich</i>)	Palladium auf Kohle 5%/10% (<i>Aldrich</i>)
Boc-Pro-OH (<i>Aldrich</i>)	Palladiumhydroxyd auf Kohle (<i>Aldrich</i>)
Boc-Thr-OH (<i>Aldrich</i>)	Palmitinsäure (<i>Fluka</i>)
4-Brom-1-buten (<i>Aldrich</i>)	Palmitoylchlorid (<i>Aldrich</i>)
2-Bromethanol (<i>Aldrich</i>)	Pentaerythritol (<i>Aldrich</i>)
1,1'-Carbonyldiimidazol (<i>Aldrich</i>)	Phosphoroxychlorid (<i>Aldrich</i>)
1,4-Diaminobutan (<i>Aldrich</i>)	Pyridin (<i>Aldrich</i>)
1,4-Dibrombutan (<i>Aldrich</i>)	Tetrabutylammoniumiodid (<i>Aldrich</i>)
α,α' -Dibrom-p-xylol (<i>Aldrich</i>)	Tetradecylbromid (<i>Aldrich</i>)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (<i>Aldrich</i>)	Thionylchlorid (<i>Fluka</i>)
N,N-Dimethylethyldiamin (<i>Aldrich</i>)	p-Toluolsulfonsäure (<i>Fluka</i>)
2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydro- chinolin (<i>Aldrich</i>)	Triethylamin (<i>Aldrich</i>)
Ethyldiamin (<i>Aldrich</i>)	Trifluoressigsäure (<i>Aldrich</i>)
Glycerol (<i>Fluka</i>)	1-(2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl)- imidazol (<i>Aldrich</i>)
Hexadecylamin (<i>Aldrich</i>)	Trimethylamin (<i>Aldrich</i>)
Hexadecylbromid (<i>Fluka</i>)	Triphenylphosphin (<i>Fluka</i>)
1-Hydroxybenzotriazol (<i>Aldrich</i>)	Tris-(2-aminoethyl)-amin (<i>Aldrich</i>)
N-Hydroxysuccinimid (<i>Aldrich</i>)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (<i>Aldrich</i>)
Iodessigsäure (<i>Aldrich</i>)	Z-Gly-OH (<i>Aldrich</i>)
Kalium- <i>tert.</i> -butylat (<i>Aldrich</i>)	Z-Lys(Z)-OH (<i>Aldrich</i>)
Kupfersulfat (<i>Fluka</i>)	N-Z-Serinbenzylester (<i>Aldrich</i>)
Malonsäurebenzylethylester (<i>Aldrich</i>)	
Malonsäurediethylester (<i>Aldrich</i>)	
Malonsäure- <i>tert.</i> -butylethylester (<i>Aldrich</i>)	
Methansulfonylchlorid (<i>Aldrich</i>)	

16.3. Synthese der Ausgangsverbindungen

Alkyljodide (2b), (16a-c)

Die Synthese der Alkyljodide **2b**, **16a-c** erfolgte durch die *Finkelstein* Reaktion⁵⁰ der entsprechenden Bromide. Die Rohprodukte wurden unter Verwendung von Heptan chromatographiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

Alkylmalonsäureester (3a,d,e)

Durch Umsetzung von Malonsäurediethylester **1a** mit den entsprechenden Alkylhalogeniden **2a-d** wurden nach Literaturvorschriften¹⁶⁵ die Alkylmalonsäurediethylester **3a,d,e** synthetisiert. Die Rohprodukte wurden unter Verwendung eines Heptan/Diethylether Gradienten chromatographiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

Hexadecylmalonsäuremonoethylester (4a)

Der Malonsäuremonoethylester **4a** wurde durch partielle Verseifung des entsprechenden Diesters **3a** mit der äquimolaren Menge an Bariumhydroxid bzw. Kaliumhydroxid analog Literatur¹⁶⁶ erhalten. Im Fall der Verbindung **3b** wurde der Benzylester mit Pd/C 5% in Essigsäureethylester abhydriert. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Heptan. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

Bisalkylmalonsäureester (24a-c)

Die Darstellung der Verbindungen **24a-c** erfolgte durch Alkylierung der entsprechenden Alkylmalonsäureester **3a,d,e** mit den Alkylhalogeniden **2a,c,d** analog der Vorschrift von *Staudinger*^{167,168}. Die Rohprodukte wurden unter Verwendung eines Heptan/Diethylether Gradienten chromatographiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

Bisalkylmalonsäuren (25a-c)

Die Bisalkylmalonsäureester **24a-c** wurden analog der Literatur¹⁶⁹ mit Kaliumhydroxid verseift. Durch Ansäuern der Kaliumsalze erhielt man die freien Säuren **25a-c**, die sich durch Umkristallisation aus Methanol reinigen ließen. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

2-Alkylfettsäuren (26a-c)

Nach Literaturangaben¹⁷⁰ wurden die Bisalkylmalonsäuren **25a-c** innerhalb von 30 min trocken auf 180 °C erhitzt um die 2-Alkylfettsäuren **26a-c** zu erhalten. Diese ließen sich durch Umkristallisation aus Methanol reinigen. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

([1-Hydroxy-2,2-bis(hydroxymethyl)]ethan-2-yl)amino)-2-oxoethyl-carbaminsäurebenzylester (34)

Durch Kupplung von 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol **33** mit N-[(Phenylmethoxy)carbonyl]glycin **29a** unter Verwendung von EEDQ als Kupplungsreagenz wurde Verbindung **34** laut Literatur¹⁰² erhalten. Das Rohprodukt wurde aus Methanol/Ether umkristallisiert. Die experimentellen Daten entsprechen der Literatur.

(2-{[5-(Hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-yl]amino}-2-oxoethyl)-carbaminsäurebenzylester (35)

Verbindung **35** wurde durch Ketalisierung von **34** mit Aceton laut Literatur¹⁰² erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

4,4-Bis(hydroxymethyl)-2-phenyl-1,3-oxazolidin (39)

Die Acetalisierung von 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol **33** wurde analog einer Literaturvorschrift¹¹⁰ mit der äquimolaren Menge an Benzaldehyd **38** in Toluol durch Erhitzen am Wasserabscheider durchgeführt. Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan umkristallisiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

(3,5-Diphenyl-oxazolo[3,4-c]oxazol-7a-yl)methanol (41)

Die Acetalisierung von Verbindung **33** mit Benzaldehyd **38** in Toluol erfolgte laut Literatur^{111,112} am Wasserabscheider. Das Rohprodukt konnte aus Cyclohexan umkristallisiert werden. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

5,5-Bis(hydroxymethyl)-2-phenyl-1,3-dioxan (53)

Diese Verbindung wurde aus 2,2-Bis(hydroxymethyl)-1,3-propandiol **52** und Benzaldehyd **38** laut Literatur¹²² synthetisiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

5,5-Bis(hexadecyloxymethyl)-2-phenyl-1,3-dioxan (54)

Verbindung **54** wurde nach einem anderen Verfahren hergestellt, als in der Literatur⁷⁴ beschrieben.

11,2 g (0,05 mol) 5,5-Bis(hydroxymethyl)-2-phenyl-1,3-dioxan **53** und 11,2 g (0,2 mol) gepulvertes Kaliumhydroxid wurden unter Rühren in 300 ml Toluol am Wasserabscheider gekocht. Zu dieser Suspension wurden nach 45 min 45,8 g (0,15 mol) Hexadecylbromid **2a** zugegeben. Nach 24-stündigem Erhitzen wurde abgekühlt und das Reaktionsgemisch mit 200 ml Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde im Scheidetrichter abgetrennt und die organische Phase wurde nacheinander mit 1 N Salzsäure, 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über

Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wurde unter Verwendung eines Heptan/Ether Gradienten chromatographiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. Dieses Verfahren führte zu einer Erhöhung der Ausbeute um etwa 20%.

2,2-Bis(hexadecyloxymethyl)propan-1,3-diol (55)

Das Acetal **54** wurde analog Literatur⁷⁴ mit Salzsäure gespalten. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus Heptan gereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

Hentriacontan-16-on (62)

Das Kaliumsalz der Palmitinsäure wurde im Hochvakuum auf 400 °C erhitzt wobei Hentriacontan-16-on **62** stetig abdestillierte. Zusätzlich wurde im Anschluss an die Destillation der Reaktionskolben mit Ethanol ausgekocht, weil eine große Menge des Produktes dort zurückblieb. Das Produkt wurde mehrfach aus Ethanol umkristallisiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. 1,2-Dipentadecylmethyldenglycerol (63)

Verbindung **63** wurde durch Erhitzen am Wasserabscheider mit Glycerol und p-Toluolsulfonsäure in Toluol erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie gereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. (2,2-Dipentadecyl-1,3-dioxolan-4-yl)methylmethansulfonat (64)

Die Umsetzung erfolgte entsprechend der Vorschrift von *Hanessian*¹²⁴. Das Rohprodukt konnte durch Umkristallisation aus Aceton gereinigt werden. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. 1,2-Isopropylidenglycerol, rac. (2,2-Dimethyl)-[1,3]-dioxolan-4-yl)methanol (69)

69 wurde durch Ketalisierung von Glycerol mit Aceton in Gegenwart von p-Toluolsulfonsäure analog Literatur¹⁰³ hergestellt. Das Rohprodukt wurde durch Destillation gereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. 1-O-Benzyl-2,3-O-isopropylidenglycerol,

rac. 4-Benzyloxymethyl-2,2-dimethyl-[1,3]-dioxolan (70)

Durch Umsetzung von 2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-methanol **69** mit Benzylchlorid **42** wurde Verbindung **70** laut Literatur¹⁷¹ erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Destillation gereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. Benzylglycerol, rac. 3-Benzoyloxypropan-1,2-diol (71)

60g (270 mmol) 4-Benzoyloxymethyl-2,2-dimethyl-[1,3]-dioxolan **70** wurden mit 10 ml 1 N Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wurde 4 Stunden am Rotationsverdampfer bei 40 °C erwärmt wobei ständig Aceton abdestillierte. Im Anschluss wurden 2 g Natriumhydrogencarbonat und 20 ml Ethanol zur Neutralisation hinzu gegeben. Nach Filtration wurde im Vakuum eingeeengt und der ölige Rückstand im Feinvakuum destilliert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. 1,2-Di-O-hexadecyl-3-O-benzylglycerol,**rac. (2,3-Bis-hexadecyloxy-propoxymethyl)-benzen (72)**

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift von Verbindung **54**. Statt Toluol als Lösungsmittel wurde jedoch Xylol verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach demselben Schema und das Rohprodukt wurde durch Chromatographie mit einem Heptan/Ether-Gradienten aufgereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. 1,2-Di-O-hexadecylglycerol, rac. 2,3-Bis-hexadecyloxy-propan-1-ol (73)

Die Benzylgruppe der Verbindung **72** wurde unter Normaldruck mit einem 10%igen Palladium/Kohle Katalysator innerhalb von 2 Stunden vollständig abhydriert. Das Rohprodukt ließ sich durch Umkristallisation aus Ethanol reinigen. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. 1,2-Di-O-hexadecylglycero-3-dinatriumphosphat (75)

Die Phosphorylierung erfolgte nach bekannter Vorschrift¹³⁰. Zur Feinreinigung wurde das erhaltene Natriumsalz in Chloroform gelöst und anschließend mit 96%igen Ethanol wieder ausgefällt. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Reinigungsoperation wurde ein dünn-schichtchromatographisch reines Produkt in Form eines weißen feinkristallinen Pulvers erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

rac. 1,2-Di-O-hexadecylglycero-3-phosphorsäure (76)

9,5 g (14,3 mmol) der Verbindung **75** wurden in 380 ml Chloroform unter gelindem Erwärmen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden 190 ml ethanol. Salzsäure (10 Volumenanteile reiner Alkohol und ein Volumenanteil konz. Salzsäure) und 190 ml Wasser zugegeben. Die Mischung wurde kurzzeitig geschüttelt, die organische Phase abgetrennt, zweimal mit 100 ml Wasser gewaschen und anschließend i. Vak. bei einer Badtemperatur von 35 °C zur Trockne eingeeengt. Die zurückbleibende weiße, feinkristalline Substanz wurde zweimal mit 50 ml kaltem Aceton gewaschen und anschließend im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

2-Bromethylphosphorsäuredichlorid (77)

124 g (0,8 mol) frisch destilliertes Phosphoroxychlorid wurden in 60 ml abs. Tetrachlorkohlenstoff gelöst und unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss bei Raumtemperatur tropfenweise mit einer Lösung von 64 g (0,5 mol) frisch destilliertem 2-Bromethanol in 40 ml abs. Tetrachlorkohlenstoff versetzt. Der entstehende Chlorwasserstoff wurde mit einem trockenen Argonstrom entfernt. Nach 16 h wurden Tetrachlorkohlenstoff und überschüssiges Phosphoroxychlorid am Rotationsvakuumverdampfer bei einer Badtemperatur bis 45 °C abgezogen. Der Rückstand wurde zweimal im Vakuum destilliert.

rac. 1,2-Di-O-hexadecylglycero-3-(2-bromethyl)phosphorsäureester (78)

Die Phosphorylierung von Verbindung **73** mit 2-Bromethylphosphorsäuredichlorid **77** erfolgte nach Literaturvorschrift¹³⁰. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgenden Synthesen verwendet.

rac. 1,2-Di-O-hexadecylglycero-3-phosphorsäure-3'-N,N-dimethylaminoethylester (85)

Ausgehend vom rac. 1,2-Di-O-hexadecylglycerol **73** wurde über die Zwischenstufe des rac. 1,2-Di-O-hexadecylglycero-3-(2-bromethyl)phosphorsäureester **78** die Verbindung **85** durch Umsetzung mit Dimethylamin erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

1,2-Benzylidenglycerol, 2-Phenyl-[1,3]-dioxan-5-ol (89)

Diese Verbindung wurde laut Literatur¹⁷² erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Destillation gereinigt. Die experimentellen Daten entsprechen der Literatur.

1,3-Benzyliden-2-O-tetradecylglycerol, 2-Phenyl-5-(tetradecyloxy)-1,3-dioxan (90)

Die Umsetzung von 2-Phenyl-1,3-dioxan mit Tetradecylbromid **2c** wurde analog Literatur¹⁷³ durchgeführt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

2-O-Tetradecylglycerol, 2-Tetradecyloxy-propan-1,3-diol (91)

Die Spaltung des Acetals **90** erfolgte laut Literatur¹⁷³ mit Schwefelsäure. Durch Umkristallisation aus Heptan wurde das Rohprodukt gereinigt.

16.4. Synthese der Verbindungen

16.4.1. Synthese der Malonsäurediamide

Hexadecylmalonsäure-ethyl-benzylester (**3b**)

Variante A:

Zu einer Suspension von 1,8 g (75 mmol) Natriumhydrid in 100 ml abs. THF wurden 10 g (45 mmol) Malonsäure-ethyl-benzylester **1b** langsam zugetropft und bis zur vollständigen Salzbildung 1h bei RT gerührt. Nach dem Zutropfen von 15,8 g (45 mmol) Hexadecyliodid **2b** wurde der Ansatz 3 h unter Rückfluss gerührt, die erkaltete Mischung anschließend mit Wasser hydrolysiert, die organische Phase mit gesättigter Ammoniumchloridlösung neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt mit einem Heptan/Ether Gradienten über eine Flash-Säule chromatographiert.

Variante B:

Zu einer Suspension von 3,03 g (27 mmol) Kalium-*tert.*butylat in 40 ml abs. Tetrahydrofuran wurden unter Rühren 6 g (27 mmol) Malonsäureethylbenzylester **1b** langsam zugetropft. Nach 1 h wurden 9,5 g (27 mmol) Hexadecyliodid **2b** zugetropft und die Mischung 5 h unter Rückfluss gerührt (DC-Kontrolle des Umsatzes). Dann wurde mit 100 ml Ether versetzt, mit Wasser hydrolysiert, die organische Phase mit gesättigter Ammoniumchloridlösung neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt mit einem Heptan/Ether Gradienten über eine Flash Säule chromatographiert.

Summenformel: $C_{28}H_{46}O_4$

Molare Masse: 446,67 g/mol

Fp: Öl

R_f (LM 1): 0,38

Massenspektrum: M+Na

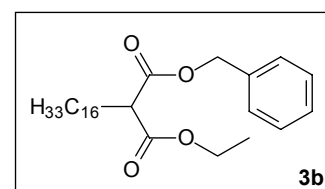
Ausbeute Var. A: 73%

Ausbeute Var. B: 80%

Elementaranalyse: theoret. : C 75,29 H 10,38

gef. : C 75,25 H 10,52

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.86$ (t, 3H, [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2-$]), 1.17-1.25 (m, 31H, [$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-}$], [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2-$]), 1.55-1.89 (m, 2H, [$\text{CH}_3[\text{CH}_2]_{14}\text{CH}_2-$]), 3.35 (t, 1H, [$-\text{CH-}$]), 4.11-4.16 (m, 2H, [$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-}$]), 5.12-5.19 (m, 2H, [$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O-}$]), 7.29-7.34 (m, 5H, [C_6H_5-])



Hexadecylmalonsäure-*tert.*butylester (3c)

Die Darstellung der Verbindung **3c** erfolgte sowohl nach Variante A als auch Variante B der Synthesemethode von **3b**.

Summenformel: $C_{25}H_{48}O_4$

Molare Masse: 412,66 g/mol

Fp: Öl

R_f (LM 1): 0,38

Massenspektrum: M+Na

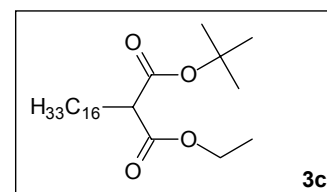
Ausbeute Var. A: 68%

Ausbeute Var. B: 72%

Elementaranalyse: theoret. : C 72,77 H 11,72

gef. : C 72,52 H 11,25

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0.85 (t, 3H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$], 1.23-1.28 (m, 31H, [CH_3CH_2O-], [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.43 (s, 9H, 3[CH_3-]), 1.78-1.84 (m, 2H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 3.18 (t, 1H, [$-CH-$]), 4.11-4.20 (m, 2H, [CH_3CH_2O-])

**Hexadecylmalonsäuremonotert-butylester (4b)**

In einem Rundkolben mit Rückflusskühler wurden 2,1 g (5 mmol) des Esters **3c** mit dem 5-fachen Überschuss 1,4 g (25 mmol) Kaliumhydroxid in 20 ml Ethanol 5 h unter Rückfluss erhitzt und danach bis zur Hälfte eingeeengt. Nach Zugabe von 40 ml Wasser wurde, unter Eiskühlung, mit Schwefelsäure (1 ml auf 100 ml Wasser) angesäuert. Die ausfallende Säure wurde mit Ether extrahiert, mehrmals mit Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt ließ sich aus Heptan umkristallisieren.

Summenformel: $C_{23}H_{44}O_4$

Molare Masse: 384,6 g/mol

Fp: 180-185 °C

R_f (LM 2): 0,47

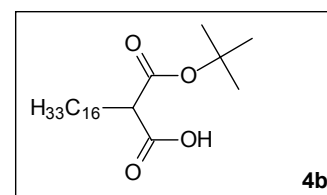
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 91%

Elementaranalyse: theoret. : C 71,83 H 11,35

gef. : C 71,79 H 11,16

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0.86 (t, 3H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.17-1.23 (m, 28H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.46 (s, 9H, [(CH_3)₃-], 1.83-1.90 (m, 2H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 3,25 (t, 1H, [$-CH-$])



2-[(Hexadecylamino)carbonyl]-octadecansäureethylester (8a)

Variante A:

Eine Suspension aus 5 g (14 mmol) der Verbindung **4a**, 3,4 g (14 mmol) Hexadecylamin **7a** und 3,5 g (14 mmol) EEDQ in 100 ml abs. Ethanol wurden für 24 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde auf die Hälfte eingengt, mit 100 ml Chloroform verdünnt und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde eingengt und aus Aceton umkristallisiert.

Variante B:

5 g (14 mmol) der Verbindung **4a** wurden in 100 ml abs. Tetrachlormethan gelöst, mit 3,3 g (16 mmol) DCC versetzt und 12 h gerührt um das Anhydrid **6a** zu bilden. Der feste Niederschlag aus Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und die klare Lösung mit 3,4 g (14 mmol) Hexadecylamin **7a**, gelöst in 50 ml Tetrachlormethan, bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 5 h abgeschlossen. Zur Aufarbeitung wurde die organische Phase mit Wasser und abschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Es wurde aus Aceton umkristallisiert.

Variante C:

5 g (14 mmol) der Verbindung **4a** wurden mit 10 ml Thionylchlorid übergossen und die Mischung 12 h bei Raumtemperatur stehengelassen bis sich eine klare Lösung bildete. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid am Rotationsvakuumverdampfer abgezogen. Der das Säurechlorid **5** enthaltende Rückstand wurde im Vakuum über Kaliumhydroxid getrocknet. Danach wurden 5 g (13 mmol) des Säurechlorides **5** in 50 ml abs. Chloroform gelöst. Man versetzte, unter Eiskühlung, tropfenweise mit einer Lösung von 3,1 g (13 mmol) Hexadecylamin **7a** und 1,3 g (13 mmol) Triethylamin in 10 ml Chloroform. Abschließend wurde 2 h gerührt, abfiltriert, die organische Phase mehrfach mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und aus Aceton umkristallisiert.

Summenformel: $C_{37}H_{73}N_1O_3$

Molare Masse: 580,0 g/mol

Fp: 72 – 73 °C

 R_f (LM 1): 0,13

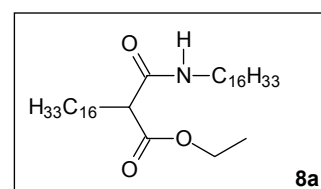
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute Var. A: 86%

Ausbeute Var. B: 75%

Ausbeute Var. C: 91%

Elementaranalyse: theoret. : C 76,62 H 12,69 N 2,41



gef. : C 76,58 H 12,70 N 2,37

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.85$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), 1.23-1.86 (m, 61H, $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH}-]$), 3.14-3.18 (m, 2H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH}-]$), 3.22 (q, 1H $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}-]$), 4.11-4.22 (q, 2H, $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-]$), 6.52 (t, 1H, $[-\text{NH}-]$)

{[(9Z)-9-Octadecenylamino]carbonyl}octadecansäureethylester (**8b**)

Verbindung **8b** wurde aus **4a** durch Umsetzung mit Oleylamin **7b** nach Variante A, B und C der Synthesemethode von **8a** dargestellt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingengt und das Rohprodukt mit einem Chloroform/Ether Gradienten durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{39}\text{H}_{75}\text{N}_1\text{O}_3$

Molare Masse: 606,03 g/mol

Fp: 45-47 °C

R_f (LM 1): 0,19

Massenspektrum: M+H

Ausbeute Var. A: 83%

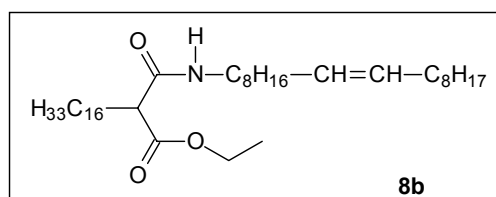
Ausbeute Var. B: 77%

Ausbeute Var. C: 89%

Elementaranalyse: theoret. : C 77,29 H 12,47 N 2,31

gef. : C 76,96 H 12,43 N 2,37

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.85$ (t, 6H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}-]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_8\text{NH}-]$), 1.18-1.99 (m, 59H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}-]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7-]$, $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-]$), 3.14-3.27 (m, 3H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}-]$, $[-\text{CH}-]$), 4.10-4.23 (m, 2H, $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-]$), 5.30-5.35 (m, 2H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}-]$), 6.53 (t, 1H, $[-\text{NH}-]$)



2-[(Hexadecylamino)carbonyl]-octadecansäure-tert.butylester (**8c**)

Verbindung **8c** wurde nach Variante A und B der Synthese von **8a** dargestellt. Nach dem trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde eingengt und aus Aceton umkristallisiert.

Summenformel: $\text{C}_{39}\text{H}_{77}\text{N}_1\text{O}_3$

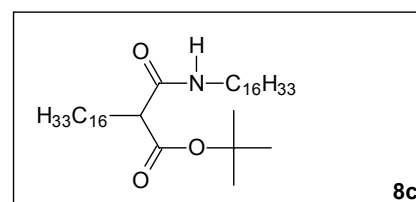
Molare Masse: 608,03 g/mol

Fp: 75-78 °C

R_f (LM 1): 0,15

Massenspektrum: M+Na

Ausbeute Var. A: 83%



Ausbeute Var. B: 72%

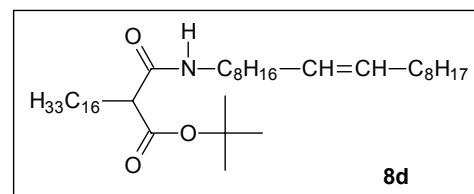
Elementaranalyse: theoret. : C 77,04 H 12,76 N 2,30
 gef. : C 76,98 H 12,61 N 2,35

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.85$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), 1.23-1.42 (m, 56H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2-]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH}-]$), 1.43 (s, 9H, $[(\text{CH}_3)_3-]$), 1.59-2.01 (m, 2H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2-]$), 3.14-3.18 (m, 2H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH}]$), 3.22 (q, 1H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}-]$), 6.52 (t, 1H, $[-\text{NH}-]$)

2-**[9Z]-9-Octadecenylamino**]carbonyl]-octadecansäure-*tert.*butylester (**8d**)

Verbindung **8d** wurde aus **4b** durch Umsetzung mit Oleylamin **7b** nach Variante A und B der Synthesemethode von **8a** dargestellt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingengt und das Rohprodukt mit einem Chloroform/Ether Gradienten durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{41}\text{H}_{79}\text{N}_1\text{O}_3$
 Molare Masse: 634,07 g/mol
 Fp: 48-50 °C
 R_f (LM 1): 0,22



Massenspektrum: M+H

Ausbeute Var. A: 92%

Ausbeute Var. B: 78%

Elementaranalyse: theoret. : C 77,66 H 12,56 N 2,21
 gef. : C 77,35 H 12,24 N 2,18

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.85$ (t, 6H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}-]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_8\text{NH}-]$), 1.18-1.99 (m, 65H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}-]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}-]$, $[(\text{CH}_3)_3-]$), 3.14-3.27 (m, 3H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}-]$, $[-\text{CH}-]$), 5.30-5.35 (m, 2H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}-]$), 6.53 (t, 1H, $[-\text{NH}-]$)

2-**[(Hexadecylamino)carbonyl]-octadecansäure** (**9a**)

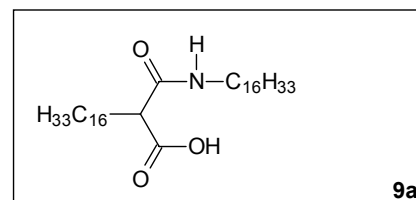
Variante A:

Zu einer Suspension von 5,8 g (10 mmol) des Esters **8a** in 100 ml Ethanol wurden 1,12 g (20 mmol) Kaliumhydroxid gegeben und die Mischung wurde für 5 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde das Kaliumsalz der Säure **9a**, welches beim Abkühlen des Ansatzes ausfällt, abgesaugt, mit wenig Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Dann wurden unter Eiskühlung und Rühren zu einer Suspension von 6,0 g (9,9 mmol) des Kaliumsalzes in 100 ml Wasser 2,5 ml Salzsäure vorsichtig zugetropft. Nach 1 h Rühren wurde die Mischung mehrfach mit Chloroform extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und der Rückstand aus Heptan umkristallisiert.

Variante B:

Zu einer Suspension von 6,1 g (10 mmol) des Esters **8c** in 100 ml Ethanol wurden 2 ml Schwefelsäure gegeben und die Mischung für 5 h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit 100 ml Wasser versetzt und mehrfach mit Chloroform extrahiert. Dann wurde die Chloroformphase dreimal mit Wasser gewaschen um Reste der Schwefelsäure zu entfernen. Abschließend wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeignet und der Rückstand aus Heptan umkristallisiert.

Summenformel: $C_{35}H_{69}N_1O_3$
 Molare Masse: 551,93 g/mol
 Fp: 95-100 °C
 R_f (LM 3): 0,46
 Massenspektrum: M-H
 Ausbeute Var. A: 85%
 Ausbeute Var. B: 85%



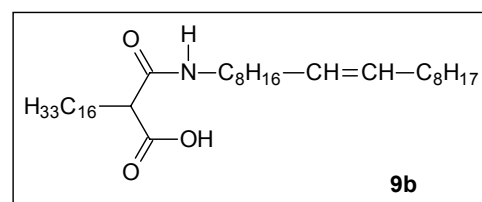
Elementaranalyse: theoret. : C 76,16 H 12,6 N 2,54
 gef. : C 76,16 H 12,67 N 2,54

1H -NMR δ = 0.85 (t, 6H, 2[$CH_3(CH_2)_{15}$ -]), 1.23-1.95 (m, 58H, [$CH_3(CH_2)_{15}$ -],
 (CDCl₃/CD₃OD): [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2NH$ -]), 3.09 (t, 2H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2NH$ -]), 3.26-3.35 (m,
 1H, [$CH_3(CH_2)_{15}CH$ -]), 5.89 (t, 1H, [-NH-])

2-[(9Z)-9-Octadecenylamino]carbonyl-octadecansäure (9b)

Verbindung **9b** wurde durch alkalische Verseifung des Esters **8b** nach Variante A (Verbindung **9a**) erhalten oder durch saure Verseifung des Esters **8d** nach Variante B (Verbindung **9a**) dargestellt. Das Rohprodukt wurde aus Heptan umkristallisiert.

Summenformel: $C_{37}H_{71}N_1O_3$
 Molare Masse: 577,96 g/mol
 Fp: 74-76 °C
 R_f (LM 2): 0,52
 Massenspektrum: M-H
 Ausbeute Var. A: 82%
 Ausbeute Var. B: 79%



Elementaranalyse: theoret. : C 76,89 H 12,38 N 2,42
 gef. : C 76,91 H 12,36 N 2,42

1H -NMR δ = 0.86 (t, 6H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH$ -], [$CH_3(CH_2)_7(CH)_2(CH_2)_8NH$ -]), 1.18-
 (CDCl₃/CD₃OD): 1.99 (m, 56H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH$ -], [$CH_3(CH_2)_7(CH)_2(CH_2)_7CH_2NH$ -]), 3.14-
 3.30 (m, 3H, [$CH_3(CH_2)_7(CH)_2(CH_2)_7CH_2NH$ -], [-CH-]), 5.30-5.36 (m,
 2H, [$CH_3(CH_2)_7(CH)_2(CH_2)_7CH_2NH$ -]), 6.45 (t, 1H, [-NH-])

N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-N'-2-dihexadecylpropandiamid (15a)

Variante A:

Es wurden 552 mg (1 mmol) der Säure **9a** in 50 ml Methylenchlorid gelöst und mit 140 mg (1,2 mmol) N-Hydroxysuccinimid versetzt. Zu dieser Suspension wurden 288 mg (1,4 mmol) DCC gegeben und 12 h gerührt. Der feste Niederschlag aus Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und die klare Lösung mit 88 mg (1 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin **14a** versetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 4 h abgeschlossen. Zur Aufarbeitung wurde die organische Phase erst filtriert, dann mit Wasser und anschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde durch zirkulare Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol Gradienten steigender Polarität gereinigt.

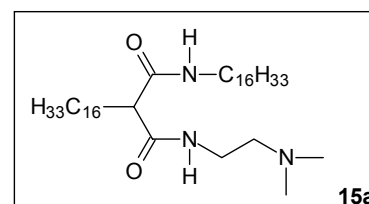
Variante B:

Zu einer Lösung von 552 mg (1 mmol) der Säure **9a**, 88 mg (1 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin **14a** und 442 mg (1 mmol) BOP in 20 ml Methylenchlorid wurden 152 mg (1,5 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 4 h abgeschlossen. Zur Aufarbeitung wurde die organische Phase filtriert, dann mit Wasser und anschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Umkristallisation aus Heptan gereinigt.

Variante C:

552 mg (1 mmol) der Säure **9a** wurden in 10 ml Tetrahydrofuran angelöst, etwas erwärmt und mit 146 mg (1 mmol) Carbonyldiimidazol versetzt. Die Mischung wurde 12 h gerührt und dann mit 88 mg (1 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin **14a** versetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 6 h abgeschlossen. Im Anschluss daran wurde mit einem Chloroform/Methanol Gemisch verdünnt und die organische Phase mit Wasser gewaschen. Dann wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde durch zirkulare Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{39}H_{79}N_3O_2$
Molare Masse: 622,06 g/mol
Fp: 65-67 °C
 R_f (LM 2): 0,48
Massenspektrum: M+H
Ausbeute Var. A: 68%
Ausbeute Var. B: 57%



Ausbeute Var. C: 63%

Elementaranalyse: theoret. : C 75,30 H 12,8 N 6,75
gef. : C 75,26 H 12,74 N 6,69

$^1\text{H-NMR}$ $\delta = 0.84$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-}]$), 1.22-1.78 (m, 58H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-}]$,
($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH-}]$, 2.24 (s, 6H, $2[\text{CH}_3\text{-}]$), 2.42 (t, 2H, $[(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{-}]$),
2.92 (t, 2H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH}]$), 3.15 (m, 2H, $[(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{-}]$), 3.25-
3.31(m, 1H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH-}]$), 4.51 (s, 2H, $2[\text{-NH-}]$)

N-(2-Aminoethyl)-N'-2-dihexadecylpropandiamid (15b)

Verbindung **15b** wurde nach Variante A, B und C der Synthese von **15a** durch Umsetzung von **9a** mit Ethylendiamin **14b** dargestellt. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde eingengt und aus Heptan umkristallisiert.

Summenformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_2$

Molare Masse: 594,01 g/mol

Fp: 74-76 °C

R_f (LM 4): 0,78

Massenspektrum: M+H

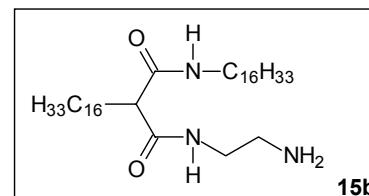
Ausbeute Var. A: 43%

Ausbeute Var. B: 47%

Ausbeute Var. C: 39%

Elementaranalyse: theoret. : C 74,81 H 12,73 N 7,07
gef. : C 74,75 H 12,69 N 7,05

$^1\text{H-NMR}$ $\delta = 0.11$ (s, 2H, $[\text{H}_2\text{N-}]$), 0.63 (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-}]$), 1.00-1.57 (m, 58H,
($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-}]$, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH-}]$), 2.72 (t, 2H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{-}]$), 2.79 (t, 2H,
 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{NH-}]$), 2.90-3.10 (m, 2H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{-}]$), 3.15-3.21 (m,
1H, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH-}]$), 4.15 (t, 2H, $2[\text{-NH-}]$)



N-{2-[Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-N'-2-dihexadecylpropandiamid (15c)

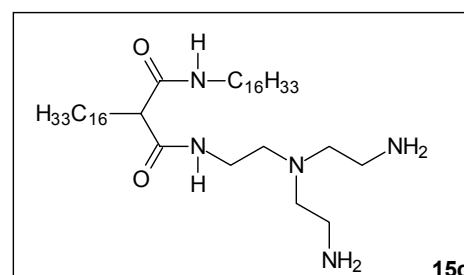
Verbindung **15c** wurde nach Variante A, B und C der Synthese von **15a** durch Umsetzung von **9a** mit Tris(2-aminoethyl)amin **14c** dargestellt. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde eingengt und aus Heptan umkristallisiert.

Summenformel: $\text{C}_{41}\text{H}_{85}\text{N}_5\text{O}_2$

Molare Masse: 680,15 g/mol

Fp: 84-86 °C

R_f (LM 4): 0,11



Massenspektrum:	M+H
Ausbeute Var. A:	39%
Ausbeute Var. B:	35%
Ausbeute Var. C:	34%
Elementaranalyse:	theoret. : C 72,4 H 12,6 N 10,3
	gef. : C 72,27 H 12,48 N 10,25
¹ H-NMR	δ = 0.86 (t, 6H, 2[CH ₃ (CH ₂) ₁₅ -]), 1.22-1.79 (m, 58H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ -], (CDCl ₃ /CD ₃ OD): [CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH ₂ NH-]), 2.03 (s, 4H, 2[NH ₂ -]), 2.51-2.56 (m, 4H, 2[NH ₂ CH ₂ CH ₂ -]), 2.73-2.76 (m, 4H, 2[NH ₂ CH ₂ CH ₂ -]), 2.96 (t, 2H, [-NCH ₂ CH ₂ NH-]), 3.13-3.20 (m, 2H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH ₂ NH-]), 3.21-3.35 (m, 2H, [-NCH ₂ CH ₂ NH-]), 3.60-3.63 (m, 1H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ CH-]), 6.89 (t, 1H, [-CONH(CH ₂) ₁₅ -]), 8.34 (t, 1H, [-CONH(CH ₂) ₂ -])

N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-2-hexadecyl-N'-[(9Z)-9-octadecenyl]-propandiamid (**15d**)

Verbindung **15d** wurde nach Variante A, B und C der Synthese von **15a** durch Umsetzung von **9b** mit N,N-Dimethylethylendiamin **14a** dargestellt. Der Rückstand wurde durch zirkulare Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel:	C ₄₁ H ₈₁ N ₃ O ₂
Molare Masse:	648,1 g/mol
Fp:	wachsartige Substanz

R_f (LM 2): 0,51

Massenspektrum: M+H

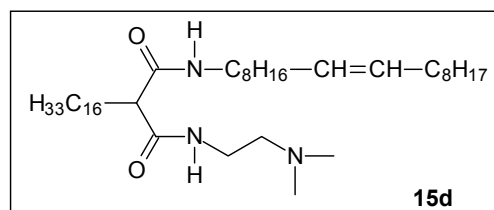
Ausbeute Var. A: 61%

Ausbeute Var. B: 47%

Ausbeute Var. C: 53%

Elementaranalyse:	theoret. : C 75,98 H 12,6 N 6,48
	gef. : C 75,73 H 12,36 N 6,41

¹ H-NMR	δ = 0.84 (t, 6H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH-], [CH ₃ (CH ₂) ₇ (CH ₂) ₈ NH-]), 1.20-1.98 (m, (CDCl ₃ /CD ₃ OD): 56H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH-], [CH ₃ (CH ₂) ₇ (CH) ₂ (CH ₂) ₇ CH ₂ NH-]), 2.19 (s, 6H, [(CH ₃) ₂ N-]), 2.36 (t, 2H, [(CH ₃) ₂ NCH ₂ -]), 2.34-3.21 (m, 4H, [CH ₃ (CH ₂) ₇ (CH) ₂ (CH ₂) ₇ CH ₂ NH-], [(CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ -]), 3.25-3.30 (m, 1H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ CH-]), 5.28-5.32 (m, 2H, [CH ₃ (CH ₂) ₇ (CH) ₂ (CH ₂) ₇ CH ₂ NH-]), 6.83-6.95 (m, 2H, 2[-CONH-])
--------------------	---

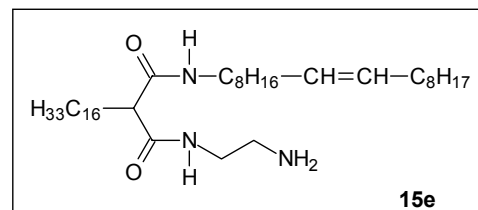


N-(2-Aminoethyl)-2-hexadecyl-N'-[(9Z)-9-octadecenyl]-propandiamid (**15e**)

Verbindung **15e** wurde nach Variante A, B und C der Synthese von **15a** durch Umsetzung von **9b** mit Ethylendiamin **14b** dargestellt. Der Rückstand wurde durch zirkulare

Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol/Ammoniak Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{39}H_{77}N_3O_2$
 Molare Masse: 620,05 g/mol
 Fp: 68-71 °C
 R_f (LM 4): 0,72
 Massenspektrum: M+H
 Ausbeute Var. A: 41%
 Ausbeute Var. B: 40%
 Ausbeute Var. C: 45%



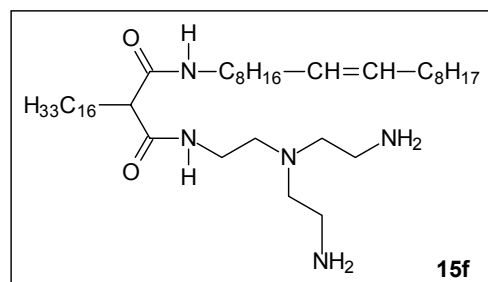
Elementaranalyse: theoret. : C 75,55 H 12,52 N 6,78
 gef. : C 75,43 H 12,37 N 6,69

1H -NMR (CDCl₃/CD₃OD): δ = 0.85 (t, 6H, [CH₃(CH₂)₁₄CH-], [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₈NH-]), 1.20-2.00 (m, 56H, [CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₇CH₂NH-]), 2.79-2.81 (t, 2H, [H₂NCH₂-]), 2.94-3.23 (m, 4H, [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₇CH₂NH-], [H₂NCH₂CH₂-]), 3.26-3.3 (m, 1H, [CH₃(CH₂)₁₅CH-]), 5.29-5.35 (m, 2H, [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₇CH₂NH-]), 6.77-6.8 (m, 2H, 2[-CONH-]), 7.15-7.17 (m, 2H [H₂N-])

N-2-[Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl]-2-hexadecyl-N'-[(9Z)-9-octadecenyl]-propandiamid (15f)

Verbindung **15f** wurde nach Variante A, B und C der Synthese von **15a** durch Umsetzung von **9b** mit Trisaminoethylamin **14c** dargestellt. Der Rückstand wurde durch zirkulare Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol/Ammoniak Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{43}H_{87}N_5O_2$
 Molare Masse: 706,18 g/mol
 Fp: 35 °C
 R_f (LM 4): 0,09
 Massenspektrum: M+H
 Ausbeute Var. A: 19%
 Ausbeute Var. B: 21%
 Ausbeute Var. C: 24%



Elementaranalyse: theoret. : C 73,13 H 12,42 N 9,92
 gef. : C 72,87 H 12,25 N 9,78

1H -NMR (CDCl₃/CD₃OD): δ = 0.86 (t, 6H, [CH₃(CH₂)₁₄CH-], [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₈NH-]), 1.15-2.00 (m, 56H, [CH₃(CH₂)₁₄CH-], [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₇CH₂NH-]), 2.47-

2.52 (m, 10H, [CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂], 3.25-3.28 (m, 4H, [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₇CH₂NH-], [CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]), 3,86-3,91 (m, 1H, [CH₃(CH₂)₁₅CH-]), 5,30-5,38 (m, 2H, [CH₃(CH₂)₇(CH)₂(CH₂)₇CH₂NH-])

16.4.2. Synthese der Gemini Lipide

Octatriacontan-17,17,22,22-tetracarbonsäure-17,22-bis-(1,1-dimethylethyl)-17,22-diethylester (17a)

17a Wurde durch C-Alkylierung von **3c** mit 1,4-Diodbutan **16a** hergestellt. Dazu wurden 0,3 g (13 mmol) Natriumhydrid in 20 ml abs. THF suspendiert und 2,9 g (7 mmol) **3c** hinzugegeben. Nach 2 h wurde für 5 h auf 60 °C erhitzt, bis die Bildung des Natriumsalzes abgeschlossen war. Anschließend wurden in Gegenwart von katalytischen Mengen Tetrabutylammoniumiodid 0,93 g (3 mmol) 1,4-Diodbutan **16a** zum Reaktionsansatz gegeben. Die Mischung wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt und dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Zur Aufarbeitung des Ansatzes wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit Diethylether verdünnt und die organische Phase mit gesättigter Ammoniumchloridlösung neutral gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingengt und das Rohprodukt mit einem Heptan/Ether Gradienten durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Summenformel: C₅₄H₁₀₂O₈

Molare Masse: 879,42 g/mol

Fp: 37-39 °C

R_f (LM 1): 0,36

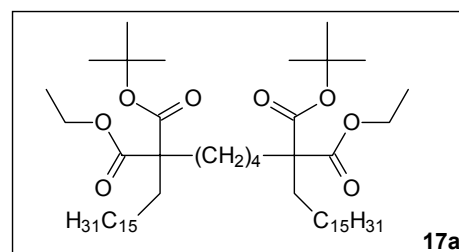
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 58%

Elementaranalyse: theoret. : C 73,75 H 11,69

gef. : C 73,77 H 11,77

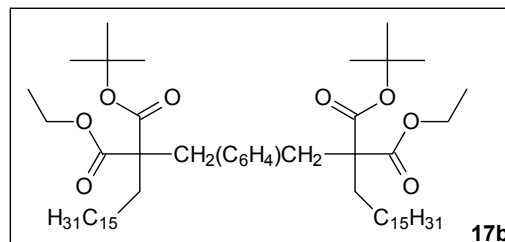
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], 1.12-1.4 (m, 66H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], [-CCH₂(CH₂)₂CH₂C-], 2[CH₃CH₂O-]), 1.41 (s, 18H, 2[(CH₃)₃-]), 1.42-1.8 (m, 8H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], [-CCH₂(CH₂)₂CH₂C-]), 4.11-4.17 (q, 4H, 2[CH₃CH₂O-])



2,2'-Bis(ethoxycarbonyl)-2,2'-dihexadecyl-1,4-benzendipropansäure-bis-*tert.*butylester (17b)

17b wurde nach den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei **17a** aus **3c** und **16b** hergestellt.

Summenformel: $C_{58}H_{102}O_8$
 Molare Masse: 927,44 g/mol
 Fp: 58-60 °C
 R_f (LM 1): 0,36
 Massenspektrum: M+Na
 Ausbeute: 71%



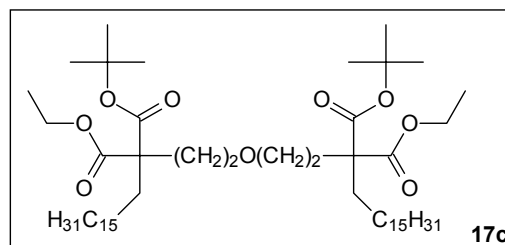
Elementaranalyse: theoret. : C 75,11 H 11,09
 gef. : C 75,09 H 11,11

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0.86 (t, 6H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.22-1.39 (m, 62H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$], 2[CH_3CH_2O-]), 1.4 (s, 18H, 2[(CH_3) $_3-$]), 1.41-1.69 (m, 4H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 3.10-3.12 (m, 4H, [$-CH_2C_6H_4CH_2-$]), 4.1-4.15 (q, 4H, 2[CH_3CH_2O-]), 6.95 (s, 4H, [$-CH_2C_6H_4CH_2-$])

2,2'-Di-Hexadecyl-2,2'-bis(*tert.*butoxycarbonyl)-5-oxanonandisäurediethylester(17c)

17c wurde nach den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei **17a** aus **3c** und **16c** hergestellt.

Summenformel: $C_{54}H_{102}O_9$
 Molare Masse: 895,39 g/mol
 Fp: 35-37 °C
 R_f (LM 1): 0,3
 Massenspektrum: M+Na
 Ausbeute: 39%



Elementaranalyse: theoret. : C 72,44 H 11,48
 gef. : C 72,20 H 11,59

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0.86 (t, 6H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.19-1.39 (m, 62H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$], 2[CH_3CH_2O-]), 1.4 (s, 18H, 2[(CH_3) $_3-$]), 1.54-2.08 (m, 8H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$], [$-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$]), 3.28-3.35 (t, 4H, [$-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$]), 4.09-3.35 (m, 4H, 2[CH_3CH_2O-])

Octatriacontan-17,17,22,22-tetracarbonsäuretetraethyl ester (17e)

17e wurde nach den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei **17a** aus **3a** und **16a** hergestellt.

Summenformel: $C_{50}H_{94}O_8$

Molare Masse: 823,26 g/mol

Fp: 40 °C

R_f (LM 1): 0,36

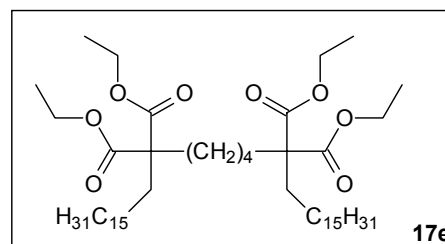
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 65%

Elementaranalyse: theoret. : C 72,94 H 11,51

gef. : C 72,94 H 11,50

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.88-0.92$ (t, 6H, $2[CH_3(CH_2)_{15}-]$), $1.14-1.77$ (m, 52H, $[CH_3(CH_2)_{15}-]$), $1.23-1.27$ (t, 12H, $4[CH_3CH_2O-]$), $1.31-1.42$ (m, 4H, $[-CCH_2CH_2CH_2CH_2C-]$), $1.70-1.80$ (m, 4H, $[-CCH_2CH_2CH_2CH_2C-]$), $4.15-4.21$ (q, 8H, $4[CH_3CH_2O-]$)

**2,7-Dihexadecyloctandisäure (19)**

5 g (6 mmol) der Verbindung **17e** wurden in einer Mischung von 100 ml Ethanol und 13,5 g (240 mmol) Kaliumhydroxid 10 h unter Rückfluss erhitzt und danach bis zur Hälfte eingengt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser und 50 ml Heptan wurde geschüttelt, die Heptanphase verworfen und die nach Ansäuern der wässrigen Schicht ausfallende freie Säure **18** in Ether aufgenommen. Das Rohprodukt wurde nach dem Entfernen des Lösungsmittels innerhalb von 1 h auf 250 °C erhitzt und nach dem Abkühlen aus Methanol umkristallisiert.

Summenformel: $C_{40}H_{78}O_4$

Molare Masse: 623,05 g/mol

Fp: 93 °C

R_f (LM 4): 0,67

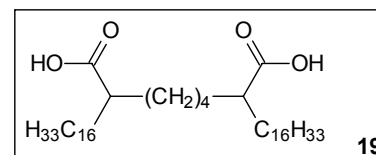
Massenspektrum: M-H

Ausbeute: 65%

Elementaranalyse: theoret. : C 77,11 H 12,62

gef. : C 77,19 H 12,59

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.88-0.92$ (t, 6H, $2[CH_3(CH_2)_{15}-]$), $1.19-1.40$ (m, 56H, $2[CH_3(CH_2)_{14}CH_2-]$), $1.33-1.43$ (m, 4H, $[-CHCH_2(CH_2)_2CH_2CH-]$), $1.41-1.75$ (m, 8H, $[-CH_2CHCH_2(CH_2)_2CH_2CHCH_2-]$), $2.21-2.27$ (m, 2H, $[-CH_2CH(CH_2)_4CHCH_2-]$)



2,7-Dihexadecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid* (21)

5 g (8 mmol) der Verbindung **19** wurden mit 10 ml Thionylchlorid übergossen und die Mischung 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen bis sich eine klare Lösung bildete. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid am Rotationsvakuumverdampfer abgezogen. Der das Säurechlorid **20** enthaltende Rückstand wurde im Vakuum über Kaliumhydroxid getrocknet. Danach wurden 5 g (7 mmol) des Säurechlorides **5** in 50 ml abs. Chloroform gelöst. Man versetzte, unter Eiskühlung, tropfenweise mit einer Lösung von 6,0 g (0,1 mol) Ethylendiamin **14a** und 2 g (20 mmol) Triethylamin in 10 ml Chloroform. Abschließend wurde 2 h gerührt, abfiltriert, die organische Phase mehrfach mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und aus Aceton umkristallisiert.

Summenformel: C₄₄H₉₀N₄O₂

Molare Masse: 707,21 g/mol

Fp: Öl

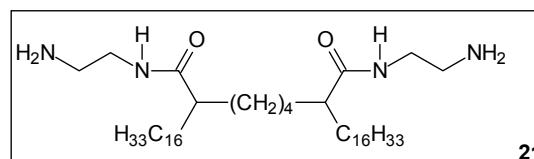
R_f (LM 4): 0,17

Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 40%

¹H-NMR δ = 0.88-0.90 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.20-1.60 (m, 60H,

(CDCl₃/CD₃OD): 2[CH₃(CH₂)₁₅-], 1.37-1.62 (m, 8H, [-CH(CH₂)₄CH-]), 2.95-3.00 (t, 2H, [-CH(CH₂)₄CH-]), 2.98-3.02 (t, 4H, 2[H₂NCH₂CH₂NH-]), 3.30-3.33 (t, 4H, 2[H₂NCH₂CH₂NH-])

**Octatriacontan-17,17,22,22-tetracarbonsäure-17,22-bis-tert.butylester (22a)**

Verbindung **22a** wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie Verbindung **4b** hergestellt.

Summenformel: C₅₂H₉₈O₈

Molare Masse: 851,33 g/mol

Fp: Öl

R_f (LM 2): 0,53

Massenspektrum: M-H

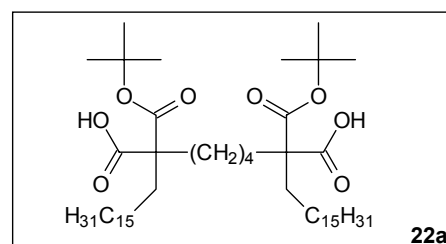
Ausbeute: 46%

Elementaranalyse: theoret. : C 73,36 H 11,60

gef. : C 73,18 H 11,62

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-]), 1.06-1.29 (m, 60H,

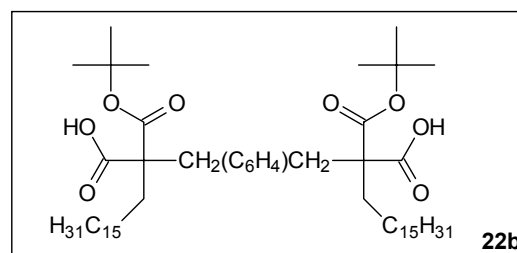
2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], [-CCH₂(CH₂)₂CH₂C-]), 1.4 (s, 18H, 2[(CH₃)₃-]), 1.48-1.92 (m, 8H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], [-CCH₂(CH₂)₂CH₂C-])



2,2'-Dicarboxy-2,2'-dihexadecyl-1,4-benzendipropansäure-bis-*tert.*butylester (22b)

Verbindung **22b** wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie Verbindung **4b** hergestellt.

Summenformel: $C_{54}H_{94}O_8$
 Molare Masse: 871,32 g/mol
 Fp: 98-101 °C
 R_f (LM 2): 0,16
 Massenspektrum: M+Na
 Ausbeute: 72%



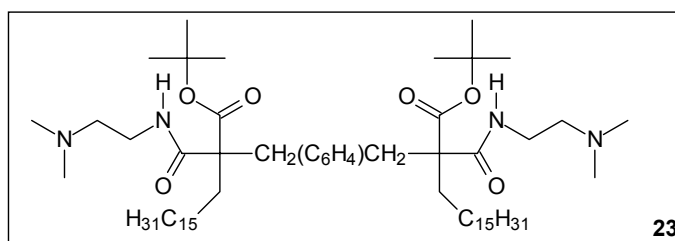
Elementaranalyse: theoret. : C 74,44 H 10,87
 gef. : C 74,64 H 10,84

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0.86 (t, 6H, [$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.11-1.41 (m, 56H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.42 (s, 18H, [$(CH_3)_3-$]), 1.43-1.95 (m, 4H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 3.14-3.38 (m, 4H, [$-CCH_2C_6H_4CH_2C-$]), 7.53-7.54 (m, 4H, [$-CCH_2C_6H_4CH_2C-$])

2,2'-Bis({[2-(dimethylamino)ethyl]amino}carbonyl)-2,2'-dihexadecylbenzen-1,4-dipropansäure-bis-*tert.*butylester (23)

Verbindung **23** wurde aus **22b** durch Umsetzung mit N,N-Dimethylethylendiamin **14a** nach Variante B der Synthesemethode von **15a** dargestellt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingeeengt und das Rohprodukt mit einem Chloroform/Methanol Gradienten durch zirkulare Chromatographie gereinigt.

Summenformel: $C_{62}H_{111}N_4O_6$
 Molare Masse: 1011,6 g/mol
 Fp: 90-92 °C
 R_f (LM 3): 0,46
 Massenspektrum: M+H
 Ausbeute: 10%



Elementaranalyse: theoret. : C 73,61 H 11,36 N 5,54
 gef. : C 73,55 H 11,38 N 5,47

1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$): δ = 0.86 (t, 6H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.11-1.35 (m, 56H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 1.4 (s, 18H, 2[$(CH_3)_3C-$]), 1.7-1.98 (m, 4H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-$]), 2.16 (s, 12H, 2[$(CH_3)_2N-$]), 2.25-2.34 (m, 4H, 2[$(CH_3)_2N-CH_2-$]), 2.91-2.96 (m, 4H, [$-CH_2-C_6H_4-CH_2-$]), 3.21-3.32 (m, 4H, 2[$(CH_3)_2N-CH_2-CH_2-$]), 6.96 (s, 4H, [$-CH_2-C_6H_4-CH_2-$])

16.4.3. Synthese der α -verzweigten Säurediamide

2-Tetradecylhexadecansäure-(2-dimethylaminoethyl)amid (**28a**)

1 g (2,5 mmol) der Verbindung **26a** wurde mit 5 ml Thionylchlorid übergossen und die Mischung 12 h bei Raumtemperatur stehengelassen, bis sich eine klare Lösung bildete. Im Anschluss daran wurde das überschüssige Thionylchlorid am Rotationsvakuumverdampfer abgezogen. Der das Säurechlorid **27a** enthaltende Rückstand wurde im Vakuum über Kaliumhydroxid getrocknet. Danach wurde 1 g (2,1 mmol) des Säurechlorides **27a** in 10 ml abs. Chloroform gelöst. Man versetzte, unter Eiskühlung, tropfenweise mit einer Lösung von 2,2 g (2,5 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin **14a** in 10 ml Chloroform. Abschließend wurde 2 h Rühren gelassen, abfiltriert, die organische Phase mehrfach mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und aus Heptan umkristallisiert.

Summenformel: $C_{34}H_{70}N_2O$

Molare Masse: 522,93 g/mol

Fp: 76-78 °C

R_f (LM 4): 0,8

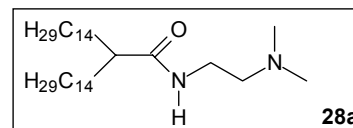
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 95%

Elementaranalyse: theoret. : C 78,09 H 13,49 N 5,36

gef. : C 77,99 H 13,35 N 5,30

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.86$ (t, 6H, $2[CH_3(CH_2)_{15}-]$), 1.22-1.59 (m, 60H, $2[CH_3(CH_2)_{15}-]$), 2.00-2.15 (m, 1H, [-CH-]), 2.32 (s, 6H, $[(CH_3)_2-]$), 2.49-2.51 (m, 2H, $[(CH_3)_2NCH_2CH_2NH-]$), 3.36-3.40 (m, 2H, $[(CH_3)_2NCH_2CH_2NH-]$), 6.30 (t, 1H, [-CONH-])



2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid (**28b**)

Verbindung **28b** wurde analog der Synthese von Verbindung **28a** dargestellt.

Summenformel: $C_{32}H_{66}N_2O$

Molare Masse: 494,9 g/mol

Fp: 95-97 °C

R_f (LM 4): 0,79

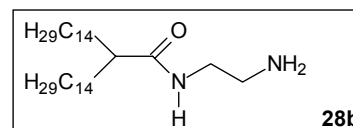
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 80%

Elementaranalyse: theoret. : C 77,66 H 13,44 N 5,66

gef. : C 77,50 H 13,38 N 5,70

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.91$ (t, 6H, $2[CH_3(CH_2)_{15}-]$), 1.22-1.99 (m, 60H, $2[CH_3(CH_2)_{15}-]$), 2.83-2.87 (m, 3H, [-CH-], $[H_2NCH_2CH_2NH-]$), 3.31-3.46 (m, 2H,



[H₂NCH₂CH₂NH-]), 6.00 (t, 1H, [H₂NCH₂CH₂NH-])

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}amid (28c)

Verbindung **28c** wurde analog der Synthese von Verbindung **28a** dargestellt.

Summenformel: C₃₆H₇₆N₄O

Molare Masse: 581,02 g/mol

Fp: 73-75 °C

R_f (LM 4): 0,06

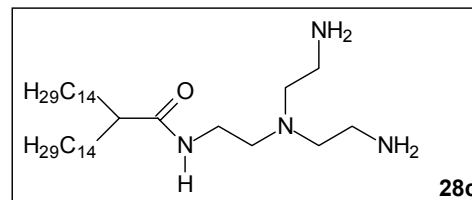
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 80%

Elementaranalyse: theoret. : C 74,42 H 13,18 N 9,64

gef. : C 74,32 H 13,11 N 9,70

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.85 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.21-1.57 (m, 64H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-], 2[H₂N-]), 2.00-2.14 (m, 4H, 2[H₂NCH₂CH₂-]), 2.53-2.58 (m, 4H, 2[H₂NCH₂CH₂-]), 2.78 (t, 2H, [-NCH₂CH₂NH-]), 3.13-3.20 (m, 1H, [-CH-]), 3.29-3.34 (m, 2H, [-NCH₂CH₂NH-]), 7.06 (s, 1H, [-CONH-])



2-Tetradecylhexadecansäure-(4-aminobutyl)amid* (28d)

Verbindung **28d** wurde analog der Synthese von Verbindung **28a** dargestellt.

Summenformel: C₃₄H₇₀N₂O

Molare Masse: 522,93 g/mol

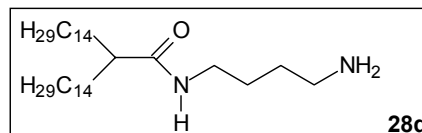
Fp: 71 °C

R_f (LM 5): 0,9

Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 63%

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86-0.90 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.22-1.60 (m, 52H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.46-1.59 (m, 4H, [H₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NH-]), 2.60-2.67 (m, 2H, [H₂NCH₂(CH₂)₃NH-]), 2.77-2.86 (m, 1H, [-CH-]), 3.02-3.14 (m, 2H, [H₂N(CH₂)₃CH₂NH-])



2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid* (28e)

Verbindung **28e** wurde analog der Synthese von Verbindung **28a** dargestellt.

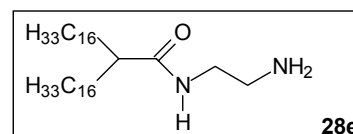
Summenformel: C₃₆H₇₄N₂O

Molare Masse: 550,9 g/mol

Fp: 87 °C

R_f (LM 5): 0,59

Massenspektrum: M+H



Ausbeute: 25%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.88-0.92$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), $1.22-1.60$ (m, 60H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), $2.95-3.02$ (m, 1H, $[-\text{COCH}-]$), $2.98-3.02$ (m, 2H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-]$), $3.30-3.33$ (t, 2H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-]$)

2-Hexadecyloctadecansäure-(4-aminobutyl)amid* (28f)

Verbindung **28f** wurde analog der Synthese von Verbindung **28a** dargestellt.

Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}$

Molare Masse: 579,04 g/mol

Fp: 77 °C

R_f (LM 5): 0,67

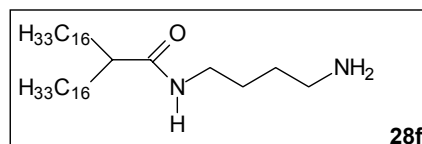
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 22%

Elementaranalyse: theoret. : C 78,82 H 13,58 N 4,84

gef. : C 78,38 H 13,02 N 4,67

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.88-0.92$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), $1.19-1.60$ (m, 60H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), $1.47-1.59$ (m, 4H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NH}-]$), $2.60-2.67$ (m, 2H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}-]$), $2.77-2.86$ (m, 1H, $[-\text{COCH}-]$), $3.02-3.14$ (m, 2H, $[-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}-]$)



2-Tetradecylhexadecansäure-2-([2-(carbonylbenzyl)amino-1-oxyethyl]amino)ethyl)amid* (30a)

500 mg (1 mmol) der Verbindung **28b**, 210 mg (1 mmol) der Z-geschützten Aminosäure Z-Gly-OH **29a** und 135 mg (1 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol wurden in 10 ml abs. Methylenechlorid gelöst. Zu dieser Lösung wurden 300 mg (1,5 mmol) DCC hinzugefügt. Diese Mischung wurde 6 h gerührt. DC-Kontrolle des Ansatzes. Dann wurde die gesamte Mischung am Rotationsvakuumverdampfer eingengt und der Rückstand durch zirkulare Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{42}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_4$

Molare Masse: 686,06 g/mol

Fp: 80 °C

R_f (LM 5): 0,14

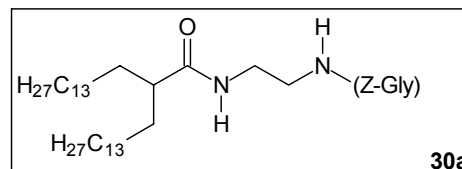
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 70%

Elementaranalyse: theoret. : C 73,53 H 11,02 N 6,12

gef. : C 73,65 H 10,98 N 6,35

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.86-0.90$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}-]$), $1.20-1.60$ (m, 52H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}-]$)



), 2.93-3.02 (m, 1H, [-COCH-]), 3.32-3.35 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.52-3.55 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.70 (s, 2H, [-NHCH₂CO-]), 5.11 (s, 2H, [C₆H₅CH₂O-]), 7.27-7.39 (m, 5H, [C₆H₅CH₂O-])

2-Tetradecylhexadecansäure-2-([2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-3-methyl-1-oxybutyl]amino)butyl)amid* (30b)

Verbindung **30b** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28b** mit Boc-Leu-OH **29b** dargestellt.

Summenformel: C₄₃H₈₅N₃O₄

Molare Masse: 708,15 g/mol

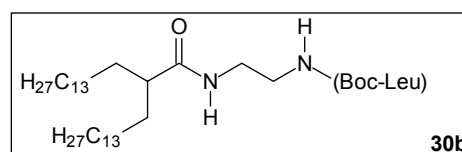
R_f (LM 2): 0,63

Massenspektrum: M+Na

Elementaranalyse: theoret. : C 72,93 H 12,10 N 5,93

gef. : C 73,00 H 11,89 N 6,05

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.85-0.87 (d, 6H, [CH₃CHCH₃]), 0.86-0.90 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.22-1.60 (m, 52H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.29-1.53 (m, 2H, [(CH₃)₂CHCH₂CH-]), 1.39 (s, 9H, [(CH₃)₃C-]), 1.57-1.68 (m, 1H, [(CH₃)₂CHCH₂-]), 2.93-3.02 (m, 1H, [-COCH-]), 3.32-3.35 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.52-3.55 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 4.17-4.21 (t, 1H, [-NHCHCO-])



2-Tetradecylhexadecansäure-2-([2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-2-(2-methylthio)ethyl-1-oxyethyl]amino)ethyl)amid* (30c)

Verbindung **30c** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28b** mit Boc-Meth-OH **29c** dargestellt.

Summenformel: C₄₂H₈₃N₃O₄S₁

Molare Masse: 726,19 g/mol

Fp: 113 °C

R_f (LM 5): 0,17

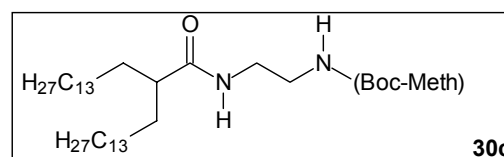
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 60%

Elementaranalyse: theoret. : C 69,46 H 11,52 N 5,79 S 4,42

gef. : C 69,77 H 11,31 N 5,99 S 3,95

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86-0.90 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.18-1.60 (m, 52H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.40 (s, 9H, [(CH₃)₃C-]), 1.87-2.11 (m, 2H, [CH₃SCH₂CH₂-]), 2.07 (s, 3H, [CH₃SCH₂CH₂-]), 2.54-2.58 (t, 2H,



[CH₃SCH₂CH₂-], 2.92-3.02 (m, 1H, [-COCH-]), 3.32-3.35 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.52-3.55 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 4.22-4.25 (d, 1H, [-NHCHCO-])

2-Tetradecylhexadecansäure-2-[(2-(*tert*.butoxycarbonyl)amino-1-[4-(*tert*.butoxycarbonyl)amino]butyl-1-oxyethyl)amino)ethyl]amid (30d)

Verbindung **30d** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28b** mit Boc-Lys(Boc)-OH **29d** dargestellt.

Summenformel: C₄₈H₉₄N₄O₆

Molare Masse: 823,29 g/mol

Fp: 121-122 °C

R_f (LM4): 0,78

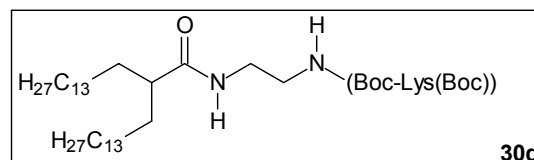
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 70%

Elementaranalyse: theoret. : C 70,0 H 11,5 N 6,81

gef. : C 69,96 H 11,35 N 6,64

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.01-1.39 (m, 56H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-]), 1.42 (s, 18H, 2[(CH₃)₃-]), 1.45-2.15 (m, 10H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], [-CONHCH₂(CH₂)₃CH-]), 3.0-3.1 (m, 1H, [(CH₃(CH₂)₁₅)₂CH-]), 3.27-3.36 (m, 6H, [-CONHCH₂(CH₂)₃CH-], [-CONH(CH₂)₂NHCO-]), 4.00-4.13 (m, 1H, [-CHCONH-])



30d

2-Tetradecylhexadecansäure-2-[(2-(carboxybenzyl)amino-1-[4-(carboxybenzyl)amino]butyl-1-oxyethyl)amino)ethyl]amid* (30e)

Verbindung **30e** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28b** mit Z-Lys(Z)-OH **29e** dargestellt.

Summenformel: C₅₄H₉₀N₄O₆

Molare Masse: 891,32 g/mol

Fp: 163 °C

R_f (LM 5): 0,15

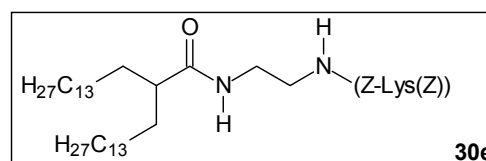
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 55%

Elementaranalyse: theoret. : C 72,77 H 10,18 N 6,29

gef. : C 72,30 H 10,21 N 6,41

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86-0.90 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.18-1.60 (m, 52H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.51-1.83 (m, 6H, [-NHCH(CH₂)₃CH₂NH-]), 2.94-3.02 (m, 1H, [-NHCOCH-]), 3.10-3.14 (t, 2H, [-NHCH(CH₂)₃CH₂NH-]), 3.32-



30e

3.35 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.52-3.55 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NHCOCH-]), 4.01-4.04 (m, 1H, [-NHCHCO-]), 5.06-5.08 (d, 4H, 2[C₆H₅CH₂O-]), 7.25-7.35 (m, 10H, 2[C₆H₅CH₂O-])

2-Hexadecyloctadecansäure-2-([2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-1-oxyethyl]amino)ethyl)amid* (30f)

Verbindung **30f** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28d** mit Boc-Gly-OH **29f** dargestellt.

Summenformel: C₄₃H₈₅N₃O₄

Molare Masse: 708,15 g/mol

Fp: 81 °C

R_f (LM 5): 0,17

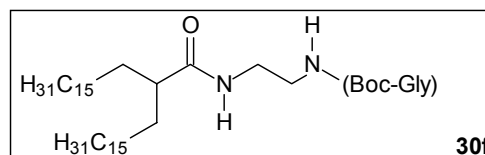
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 70%

Elementaranalyse: theoret. : C 72,93 H 12,10 N 5,93

gef. : C 72,50 H 11,82 N 6,20

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.88-0.92 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.19-1.60 (m, 60H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.42 (s, 9H, [(CH₃)₃C-]), 2.93-3.02 (m, 1H, [-COCH-]), 3.32-3.35 (t, 2H, [-HNCH₂CONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.52-3.55 (t, 2H, [-HNCH₂CONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.55 (s, 2H, [-NHCH₂CO-])



2-Hexadecyloctadecansäure-2-([(N-*tert.*butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl-carbonylamino]ethyl)amid* (30g)

Verbindung **30g** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28d** mit Boc-Pro-OH **29g** dargestellt.

Summenformel: C₄₆H₈₉N₃O₄

Molare Masse: 748,22 g/mol

Fp: 87 °C

R_f (LM 5): 0,16

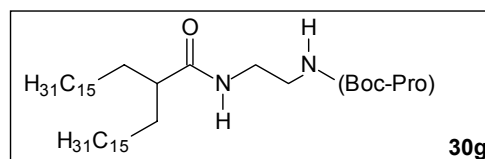
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 60%

Elementaranalyse: theoret. : C 73,84 H 11,99 N 5,62

gef. : C 73,83 H 11,69 N 5,65

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.88-0.92 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.19-1.60 (m, 60H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.46 (s, 9H, [(CH₃)₃C-]), 1.68-2.05 (m, 2H, [-NH(CH₂)₂CH₂CHCO-]), 1.71-1.87 (m, 2H, [-NHCH₂CH₂CH₂CHCO-]), 2.92-3.02 (m, 1H,



[-NHCOCH-], 3.27-3.35 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂CH₂CO-]), 3.32-3.35 (t, 2H, [-NHCHCONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.39-3.42 (t, 2H, [-NHCHCONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 4.37-4.40 (t, 1H, [-NHCHCO-])

2-Tetradecylhexadecansäure-2-([2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-1-oxyethyl]amino)butyl)amid* (30h)

Verbindung **30h** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28e** mit Boc-Gly-OH **29f** dargestellt.

Summenformel: C₄₁H₈₁N₃O₄

Molare Masse: 680,10 g/mol

Fp: 69 °C

R_f (LM 5): 0,16

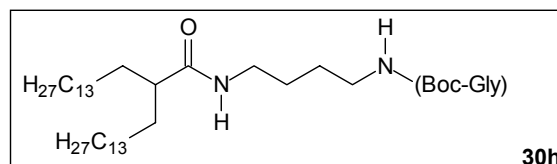
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 75%

Elementaranalyse: theoret. : C 72,41 H 12,00 N 6,18

gef. : C 72,24 H 11,82 N 6,40

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86-0.90 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.18-1.60 (m, 52H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.28-1.38 (m, 4H, [-CH₂CONHCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO-]), 1.42 (s, 9H, [(CH₃)₃C-]), 2.80-2.86 (m, 1H, [-COCH-]), 3.07-3.32 (m, 4H, [-CH₂CONHCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO-]), 3.73 (m, 1H, [-COHNCH₂CO-])



2-Tetradecylhexadecansäure-2-([2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-2-(1-hydroxy)ethyl-1-oxyethyl]amino)butyl)amid* (30i)

Verbindung **30i** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28e** mit Boc-Thr-OH **29h** dargestellt.

Summenformel: C₄₃H₈₅N₃O₅

Molare Masse: 724,15 g/mol

R_f (LM 5): 0,15

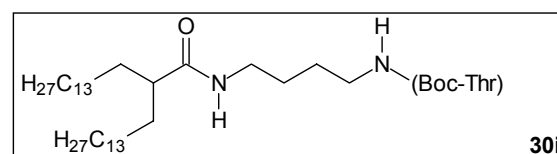
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 65%

Elementaranalyse: theoret. : C 71,32 H 11,83 N 5,80

gef. : C 71,45 H 11,66 N 5,80

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86-0.90 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.18-1.60 (m, 52H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.23-1.25 (d, 3H, [CH₃CHOH]), 1.28-1.38 (m, 4H, [-NHCH₂(CH₂)₂CH₂NHCOCH-]), 1.46 (s, 9H, [(CH₃)₃C-]), 1.57-1.68 (m, 1H, [(CH₃)₂CHCH₂-]), 2.77-2.86 (m, 1H, [-COCH-]), 3.07-3.33 (m, 4H, [-NHCH₂(CH₂)₂CH₂NHCOCH-]), 4.11-4.17 (m, 1H, [CH₃CHOH]), 4.48-



4.49 (d, 1H, [-NHCHCO])

2-Hexadecyloctadecansäure-2-({[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-1-oxyethyl]amino}butyl)amid* (30j)

Verbindung **30j** wurde analog der Synthese von Verbindung **30a** durch Umsetzung von **28f** mit Boc-Gly-OH **29f** dargestellt.

Summenformel: C₄₅H₈₉N₃O₄

Molare Masse: 736,21 g/mol

Fp: 75 °C

R_f (LM 5): 0,14

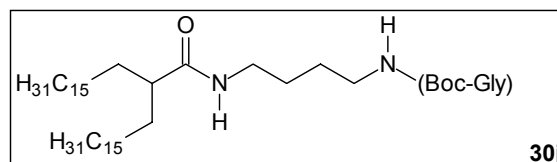
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 65%

Elementaranalyse: theoret. : C 73,41 H 12,18 N 5,71

gef. : C 73,45 H 12,15 N 5,57

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.88-0.92 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.19-1.60 (m, 60H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.28-1.37 (m, 4H, [-CH₂CONHCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO-]), 1.42 (s, 9H, [(CH₃)₃C-]), 2.77-2.86 (m, 1H, [-COCH-]), 3.08-3.32 (m, 4H, [-CH₂CONHCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO-]), 3.73 (m, 1H, [-COHNCH₂CO-])

**30j****2-Tetradecylhexadecansäure-2-({[2-amino-1-oxyethyl]amino}ethyl)amid* (31a)**

0,5 g (0,7 mmol) der Verbindung **30a** wurden in einer Mischung von 25 ml Isopropanol und 25 ml Ethylacetat suspendiert. Nach der Zugabe von 50 mg 5%-Pd/C-Katalysator wurde bei Normaldruck und Raumtemperatur 24 h hydriert. Danach wurde der Katalysator von der Lösung abfiltriert, mit Ethylacetat nachgewaschen und die vereinigten Filtrate nochmals filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsvakuumverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol/Ammoniak Gradienten steigender Polarität gereinigt.

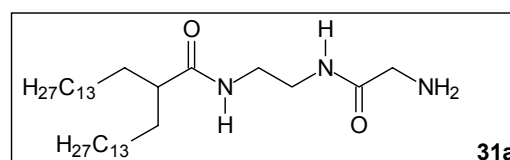
Summenformel: C₃₄H₆₉N₃O₄

Molare Masse: 551,93 g/mol

R_f (LM 5): 0,43

Massenspektrum: M+Na

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86-0.92 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 1.19-1.60 (m, 52H, 2[CH₃(CH₂)₁₃-]), 2.92-3.02 (m, 1H, [-COCH-]), 3.32-3.35 (t, 2H, [H₂NCH₂CONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.45-3.49 (t, 2H, [H₂NCH₂CONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.55 (s, 2H, [-NHCH₂CO-])

**31a**

2-Tetradecylhexadecansäure-2-[[2-amino-3-methyl-1-oxobutyl]amino]butylamid*
(31b)

Variante A:

Zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wurden 250 mg (0,35 mmol) der Verbindung **30b** in 5 ml Chloroform gelöst, mit 0,5 ml konz. Salzsäure versetzt und 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden zu dieser Mischung 5 ml abs. Ethanol gegeben und die Lösung am Rotationsvakuumverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus einer Mischung aus Ethylacetat und wenig Methanol umkristallisiert oder durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

Variante B:

Zu einer Suspension von 250 mg (0,35 mmol) der Verbindung **30b** in 10 ml Essigsäureethylester, wurden 10 ml einer mit Salzsäuregas gesättigten Lösung Essigsäureethylester gegeben. Die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsvakuumverdampfer abgezogen. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus einer Mischung von Essigsäureethylester und wenig Methanol umkristallisiert oder durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

Summenformel: $C_{38}H_{77}N_3O_2$

Molare Masse: 608,04 g/mol

R_f (LM 3): 0,24

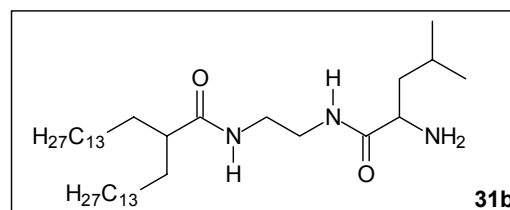
Fp: 124 °C

Massenspektrum: M+Na

Elementaranalyse: theoret. : C 70,82 H 12,20 N 6,52

(als Hydrochlorid)

gef. : C 70,29 H 11,88 N 6,49



2-Tetradecylhexadecansäure-2-[[2-amino-2-(2-methylthio)ethyl-1-oxoethyl]amino]ethylamid* (31c)

Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31b** unter Verwendung von Verbindung **30c**.

Summenformel: $C_{37}H_{75}N_3O_2S_1$

Molare Masse: 626,08 g/mol

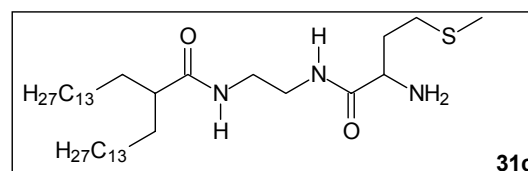
Fp: 112 °C

R_f (LM 5): 0,24

Massenspektrum: M+Na

Elementaranalyse: theoret. : C 65,28 H 11,33 N 6,17

gef. : C 65,60 H 11,18 N 6,44



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.86\text{-}0.90$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{-}]$), $1.19\text{-}1.60$ (m, 52H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{-}]$), $1.66\text{-}1.87$ (m, 2H, $[\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}\text{-}]$), 2.03 (s, 3H, $[\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{-}]$), $2.55\text{-}2.61$ (t, 2H, $[\text{CH}_3\text{SCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{-}]$), $2.92\text{-}3.02$ (m, 1H, $[\text{-NHCOCH}\text{-}]$), $3.32\text{-}3.35$ (t, 2H, $[\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}\text{-}]$), $3.45\text{-}3.48$ (t, 2H, $[\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}\text{-}]$), $4.01\text{-}4.03$ (d, 1H, $[\text{-NHCHCO}\text{-}]$)

2-Tetradecylhexadecansäure-2-[[2,6-diamino-1-oxihexyl]amino]ethylamid (31d)

Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31b** unter Verwendung von Verbindung **30d**.

Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_2$

Molare Masse: 623,05 g/mol

Fp: $^{\circ}\text{C}$

R_f (LM 4): 0,53

Massenspektrum: M+Na

Elementaranalyse: theoret. : C 65,58 H 11,59 N 8,05

(als Hydrochlorid)

gef. : C 65,24 H 11,43 N 7,89

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.86$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-}]$), $1.23\text{-}1.45$ (m, 56H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{-}]$), $1.66\text{-}2.16$ (m, 10H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{-}]$), 2.95 (t, 2H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}\text{-}]$), $3.18\text{-}3.3$ (m, 5H, $[(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15})_2\text{CH}\text{-}]$, $[\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}]$), $4.06\text{-}4.13$ (m, 1H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}\text{-}]$)

2-Tetradecylhexadecansäure-2-[[2,6-diamino-1-oxihexyl]amino]ethylamid* (31e)

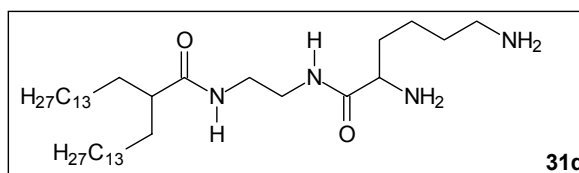
Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31a** unter Verwendung von Verbindung **30e**.

Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_2$

Molare Masse: 623,05 g/mol

Fp: 176°C

Massenspektrum: M+Na



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.86\text{-}0.90$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{-}]$), $1.19\text{-}1.60$ (m, 52H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{-}]$), $1.29\text{-}1.44$ (m, 2H, $[\text{H}_2\text{NCHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]$), $1.60\text{-}1.79$ (m, 4H, $[\text{H}_2\text{NCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2]$), $2.72\text{-}2.78$ (m, 2H, $[\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2]$), $2.94\text{-}3.02$ (m, 1H, $[\text{-NHCOCH}\text{-}]$), $3.32\text{-}3.35$ (t, 2H, $[\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}\text{-}]$), $3.45\text{-}3.48$ (t, 2H, $[\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}\text{-}]$), $4.46\text{-}4.50$ (m, 2H, $[\text{-NHCH}_2\text{CO}\text{-}]$)

2-Hexadecyloctadecansäure-2-[[2-(2-amino-1-oxoethyl)amino]ethyl]amid* (31f)

Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31b** unter Verwendung von Verbindung **30f**.

Summenformel: $C_{38}H_{77}N_3O_2$

Molare Masse: 608,04 g/mol

Fp: 77 °C

R_f (LM 5): 0,53

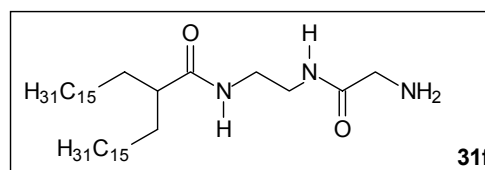
Massenspektrum: M+Na

Elementaranalyse: theoret. : C 70,60 H 12,01 N 6,68

(als Hydrochlorid)

gef. : C 70,57 H 11,57 N 6,14

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.88-0.92 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.21-1.60 (m, 60H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 2.93-3.02 (m, 1H, [-COCH-]), 3.32-3.35 (t, 2H, [H₂NCH₂CONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.45-3.49 (t, 2H, [H₂NCH₂CONHCH₂CH₂NHCOCH-]), 3.55 (s, 2H, [-NHCH₂CO-])

**2-Hexadecyloctadecansäure-2-[(pyrrolidin-2-yl-carbonylamino)ethyl]amid* (31g)**

Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31b** unter Verwendung von Verbindung **30g**.

Summenformel: $C_{41}H_{81}N_3O_2$

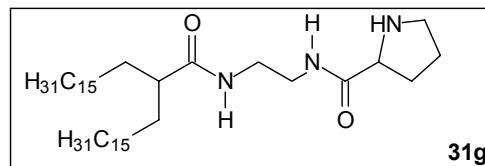
Molare Masse: 648,1 g/mol

Fp: 78 °C

R_f (LM 5): 0,37

Massenspektrum: M+Na

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.88-0.92 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.21-1.60 (m, 60H, 2[CH₃(CH₂)₁₅-]), 1.98-2.14 (m, 2H, [-NHCH₂CH₂CH₂CHCO-]), 2.18-2.54 (m, 2H, [-NH(CH₂)₂CH₂CHCO-]), 2.92-3.02 (m, 1H, [-NHCOCH-]), 3.29-3.38 (t, 2H, [-NHCH₂(CH₂)₂CO-]), 3.31-3.35 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NH-]), 3.38-3.39 (t, 2H, [-NHCH₂CH₂NH-]), 4.36-4.41 (t, 1H, [-NHCHCO-])

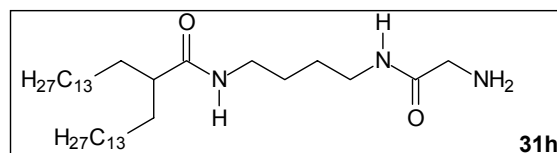
**2-Tetradecylhexadecansäure-2-[[2-(2-amino-1-oxoethyl)amino]butyl]amid* (31h)**

Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31b** unter Verwendung von Verbindung **30h**.

Summenformel: $C_{36}H_{73}N_3O_2$

Molare Masse: 579,98 g/mol

Fp: 105 °C

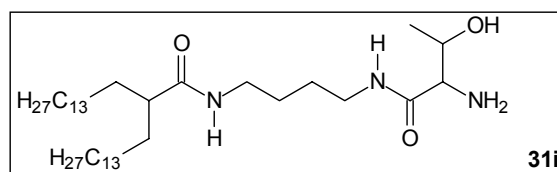


R _f (LM 5):	0,48		
Massenspektrum:	M+Na		
Elementaranalyse:	theoret. :	C 66,22	H 11,58
(als Hydrochlorid)			N 6,44
	gef. :	C 66,80	H 11,57
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0.87-0.89 (t, 6H, 2[CH ₃ (CH ₂) ₁₃ -]),		
	1.20-1.59 (m, 52H,		
	2[CH ₃ (CH ₂) ₁₃ -]),		
	1.30-1.37 (m, 4H, [-NHCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ NH-]),		
	2.78-2.85		
	(m, 1H, [-COCH-]),		
	3.09-3.23 (m, 4H,		
	[-NHCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ NH-]),		
	3.57 (m, 2H, [H ₂ NCH ₂ CO-])		

2-Tetradecylhexadecansäure-2-[[[(2-amino-3-hydroxy-1-oxybutyl)amino]butyl]amid* (31i)

Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31b** unter Verwendung von Verbindung **30i**.

Summenformel:	C ₃₈ H ₇₇ N ₃ O ₃
Molare Masse:	624,04 g/mol
Fp:	79 °C
R _f (LM 5):	0,4



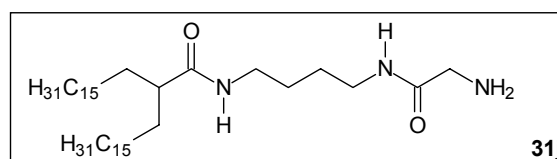
Massenspektrum:	M+Na		
Elementaranalyse:	theoret. :	C 69,10	H 11,90
(als Hydrochlorid)			N 6,36
	gef. :	C 68,60	H 12,04
			N 6,33

¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0.86-0.90 (t, 6H, 2[CH ₃ (CH ₂) ₁₃ -]),		
	1.20-1.60 (m, 52H,		
	2[CH ₃ (CH ₂) ₁₃ -]),		
	1.22-1.25 (d, 3H, [CH ₃ CHOH]),		
	1.27-1.38 (m, 4H,		
	[-NHCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ NH-]),		
	2.79-2.86 (m, 1H, [-COCH-]),		
	3.07-3.26 (m,		
	4H, [-NHCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ NH-]),		
	4.05-4.06 (m, 1H, [H ₂ NCHCO-]),		
	4.06-4.11 (m, 1H, [CH ₃ CHOH])		

2-Hexadecyloctadecansäure-2-[[[(2-amino-1-oxyethyl)amino]butyl]amid* (31j)

Synthese und Aufarbeitung erfolgten analog Verbindung **31b** unter Verwendung von Verbindung **30j**.

Summenformel:	C ₄₀ H ₈₁ N ₃ O ₂
Molare Masse:	636,09 g/mol
Fp:	74 °C
R _f (LM 5):	0,5



Massenspektrum:	M+Na		
Elementaranalyse:	theoret. :	C 71,43	H 12,29
			N 6,25

(als Hydrochlorid)

gef. : C 71,07 H 12,39 N 5,88

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.88-0.92$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), $1.19-1.60$ (m, 60H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-]$), $1.28-1.38$ (m, 4H, $[-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}-]$), $2.77-2.86$ (m, 1H, $[-\text{COCH}-]$), $3.07-3.25$ (m, 4H, $[-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}-]$), 3.57 (m, 1H, $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}-]$)

16.4.4. Darstellung hydrophober TRIS-Derivate als Transfektionslipide

3,5-Diphenyl-7a-[(benzyloxy)methyl]-2,5-dihydro-oxazolo[3,4c]-2,5-dihydro-oxazol (**43**)

Variante A:

Zur Darstellung von Verbindung **43** wurden 3 g (10 mmol) der Verbindung **41** in 50 ml abs. Toluol suspendiert und bei Raumtemperatur mit 240 mg (10 mmol) Natriumhydrid versetzt. Nach 1 h wurde für 2 h auf $60\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt bis die Bildung des Natriumalkoholates abgeschlossen war. Anschließend wurden in Gegenwart von katalytischen Mengen Tetrabutylammoniumiodid 2,4 g (20 mmol) Benzylchlorid **42** zum Reaktionsansatz getropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 10 h abgeschlossen. Zur Aufarbeitung des Ansatzes wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit Ether verdünnt und die organische Phase mehrmals mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch wiederholte Umkristallisation aus Heptan gereinigt.

Variante B:

Zur Einführung der Benzylschutzgruppe nach Variante B wurden 3 g (10 mmol) der Verbindung **41** in 50 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und bei Raumtemperatur mit 1,35 g (12 mmol) Kalium-*tert.*butylat versetzt. Nach Zugabe von 2,56 g (15 mmol) Benzylchlorid **42** wurde langsam zur Siedehitze erwärmt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 2 h abgeschlossen. Die Aufarbeitung erfolgte durch Zugabe von Wasser und Chloroform. Die organische Phase wurde abgetrennt mehrmals mit Wasser und abschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand aus Heptan umkristallisiert.

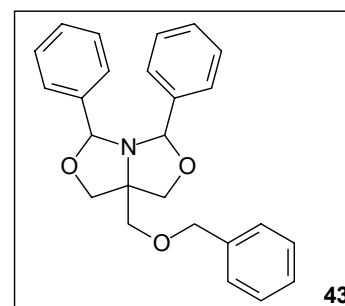
Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_1\text{O}_3$

Molare Masse: 387,48 g/mol

Fp: $80-82\text{ }^\circ\text{C}$

R_f (LM 2): 0,6

Massenspektrum: M+H



Ausbeute Var. A: < 10%

Ausbeute Var. B: 82%

Elementaranalyse: theoret. : C 77,49 H 6,5 N 3,61

gef. : C 77,84 H 6,43 N 4,07

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 3.59\text{-}3.64$ (m, 4H, 2[-OCH₂C-]), 3.74-3.78 (m, 2H, [-CCH₂OCH₂-]), 4.60-4.61 (m, 2H, [-CCH₂OCH₂-]), 5.23-5.25 (m, 2H, [C₆H₅CHNCHC₆H₅]), 7.04-7.4 (m, 15H, 3[C₆H₅-])

2-[Dibenzylamino-2-(benzyloxy)methyl]-1,3-propandiol (**44**)

1,14 g (10 mmol) Trifluoressigsäure wurden unter Eiskühlung und Rühren bei 0 °C tropfenweise zu einer Suspension des Metallhydrides in 5 ml abs. Tetrahydrofuran gegeben. Zu dieser Mischung wurde anschließend eine Lösung der Verbindung **43** in 5 ml abs. Tetrahydrofuran unter Eiskühlung und Rühren zugetropft. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Mischung wiederum gekühlt und vorsichtig mit 10%iger wässriger Natriumhydroxidlösung zersetzt. Dann wurde die Mischung eingeeengt und dreimal mit je 25 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mit einem Chloroform/Ether Gradienten durch Chromatographie gereinigt.

Summenformel: C₂₅H₂₉N₁O₃

Molare Masse: 391,5 g/mol

Fp: 65-67 °C

R_f (LM 2): 0,27

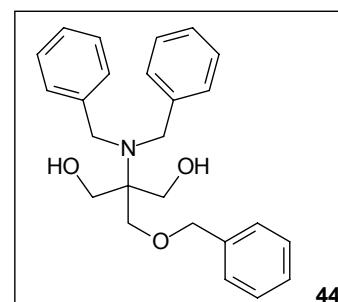
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 87%

Elementaranalyse: theoret. : C 76,7 H 7,47 N 3,58

gef. : C 76,21 H 7,13 N 3,29

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.66$ (s, 2H, 2[HO-]), 3.77-3.98 (m, 10H, [-OCH₂C-], [HOCH₂CCH₂OH]), [C₆H₅CH₂NCH₂C₆H₅]), 4.60-4.61 (m, 2H, [C₆H₅CH₂O-]), 7.10-7.43 (m, 15H, 3[C₆H₅-])



2-Benzyloxymethyl-2'-di-benzylamino-propan-1,3-bis-hexadecylether (**45**)

10 g (25 mmol) der Verbindung **44** und 5,61 g (100 mmol) gepulvertes Kaliumhydroxid wurden unter heftigem Rühren und Feuchtigkeitsausschluss in 200 ml abs. Xylol am Wasserabscheider bis zum Sieden des Lösungsmittels erwärmt. Zu dieser Suspension wurden nach 45 min 23 g (75 mmol) Hexadecylbromid **2a** zugegeben. Nach 24-stündigem Erhitzen wurde abgekühlt, die anorganischen Bestandteile abfiltriert und die Xylollösung mit 200 ml Diethylether versetzt. Nacheinander wurde mit Wasser, 1 N Salzsäure, 5%iger

Natriumhydrogencarbonatlösung und wiederum mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsvakuumverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie mit einem Heptan/Diethylether Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{57}H_{93}N_1O_3$

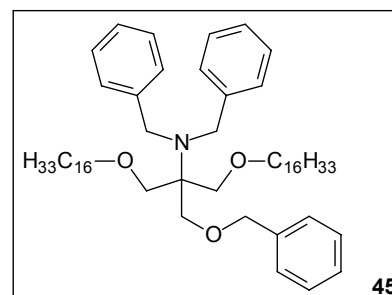
Molare Masse: 840,37 g/mol

Fp: 30-31 °C

R_f (LM 1): 0,44

Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 68 %



Elementaranalyse: theoret. : C 81,47 H 11,15 N 1,67

gef. : C 81,38 H 11,21 N 1,51

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0.87 (t, 6H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2O$ -]), 1.19-1.53 (m, 56H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2O$ -]), 3.29 (t, 4H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2O$ -]), 3.55-3.99 (m, 10H, [$C_6H_5CH_2NCH_2C_6H_5$], [$-OCH_2CCH_2O$ -], [$-OCH_2C-N$ -]), 4.39 (m, 2H, [$C_6H_5CH_2O$ -]), 7.03-7.32 (m, 15H, 3[C_6H_5 -])

2-Amino-3-hexadecyloxy-2-[(hexadecyloxy)methyl]-1-propanol (46)

1 g (1,2 mmol) der Verbindung **45** wurden unter Erwärmen in 30 ml Ethylacetat gelöst. Nach der Zugabe von 50 mg $Pd(OH)_2$ -Katalysator wurde bei 40 bar und 60 °C 48 h hydriert. Danach wurde der Katalysator von der Lösung abfiltriert, mit Ethylacetat nachgewaschen und die vereinigten Filtrate nochmals filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsvakuumverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{36}H_{75}N_1O_3$

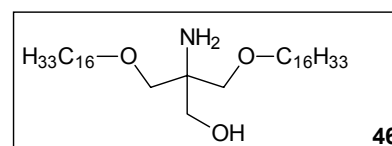
Molare Masse: 569,98 g/mol

Fp: 76-77 °C

R_f (LM 5): 0,44

Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 48%



Elementaranalyse: theoret. : C 75,86 H 13,25 N 2,46

gef. : C 75,57 H 13,11 N 2,41

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0,86 (t, 6H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2$ -]), 1,23-1,55 (m, 56H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2$ -]), 3,30-3,41 (m, 8H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}CH_2$ -]), [$-OCH_2CCH_2O$ -]), 3,48 (s, 2H, [$HOCH_2$ -])

2-Benzyloxymethyl-2'-di-benzylamino-propan-1,3-diyl-bis-hexadecansäureester (48)

10 g (25,5 mmol) der Verbindung **44** wurden in 100 ml Chloroform gelöst und mit 7,75 g (76,6 mmol) Triethylamin versetzt. Zu dieser Mischung wurden unter Eiskühlung 15 g (51 mmol) Palmitoylchlorid **47** getropft und 12 h Rühren gelassen. Dann wurde die Mischung am Rotationsvakuumverdampfer eingeengt, der Rückstand in Diethylether aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingeengt und das Rohprodukt mit einem Heptan/Ether Gradienten durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Summenformel: $C_{57}H_{89}N_1O_5$

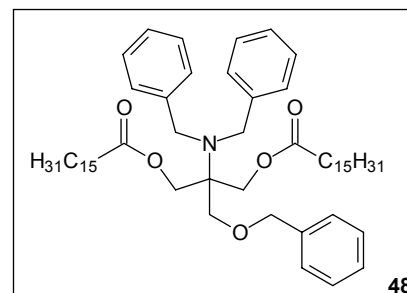
Molare Masse: 868,32 g/mol

Fp: 32-33 °C

R_f (LM 1): 0,48

Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 93%



Elementaranalyse: theoret. : C 78,84 H 10,33 N 1,61

gef. : C 78,82 H 10,25 N 1,55

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.89 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₂CH₂CH₂-]), 1.20-1.37 (m, 48H, 2[CH₃(CH₂)₁₂CH₂CH₂-]), 1.52-1.59 (m, 4H, 2[CH₃(CH₂)₁₂CH₂CH₂-]), 2.57 (t, 4H, 2[CH₃(CH₂)₁₂CH₂CH₂-]), 3.86-4.06 (m, 10H, [C₆H₅CH₂NCH₂C₆H₅], [-OCH₂CCH₂O-], [-OCH₂C-N-]), 4.32 (s, 2H, [C₆H₅CH₂O-]), 7.10-7.33 (m, 15H, 3[C₆H₅-])

(2-[[2-(Hexadecyloxy)-1-[(hexadecyloxy)methyl]-1-(hydroxymethyl)ethyl]amino]-2-oxoethyl)-carbamidsäurebenzylester (50)

Z-Glycin-OH **29a** 100 mg (0,5 mmol) und Verbindung **46** 285 mg (0,5 mmol) wurden in 10 ml abs. Ethanol suspendiert. Nach der Zugabe von EEDQ 247 mg (1 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 6 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss daran wurde die Lösung am Rotationsvakuumverdampfer eingeengt und das resultierende Rohprodukt mit einem Chloroform/Ether Gradienten durch Säulenchromatographie gereinigt.

Summenformel: $C_{46}H_{84}N_2O_6$

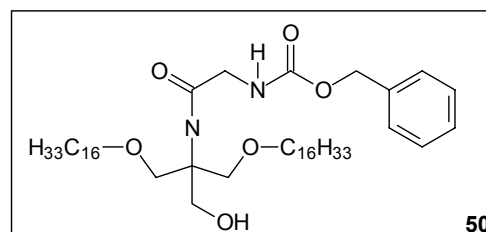
Molare Masse: 761,18 g/mol

Fp: 52-54 °C

R_f (LM 2): 0,71

Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 84%



Elementaranalyse: theoret. : C 72,58 H 11,12 N 3,68

gef. : C 72,24 H 11,01 N 3,61

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.83-0.87 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅O-]), 1.18-1.52 (m, 56H,

2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂O-], 3.36-3.41 (m, 4H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂O-]), 3.56-4.1 (m, 8H, [-CONHCH₂CONH-], [-CONHC(-CH₂O-)₂(-CH₂OH)]), 5.09 (s, 2H, [C₆H₅CH₂O-]), 7.27-7.33 (m, 5H, [C₆H₅-])

2-Amino-N-[2-(hexadecyloxy)-1-[(hexadecyloxy)methyl]-1-(hydroxymethyl)ethyl]-acetamid (51)

250 mg (0,3 mmol) der Verbindung **50** wurden unter Erwärmen in 10 ml Ethylacetat gelöst. Nach der Zugabe von Pd/C 5% Katalysator wurde bei Normaldruck 4 h hydriert. Danach wurde der Katalysator von der Lösung abfiltriert, mit Ethylacetat nachgewaschen und die vereinigten Filtrate nochmals filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsvakuumverdampfer entfernt. Das Rohprodukt konnte aus Ethanol umkristallisiert werden.

Summenformel: C₃₈H₇₈N₂O₄

Molare Masse: 627,04 g/mol

Fp: 68-70 °C

R_f (LM 5): 0,5

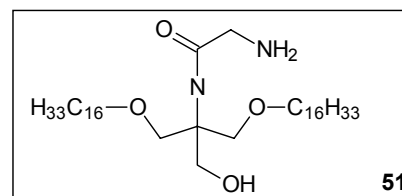
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 88%

Elementaranalyse: theoret. : C 72,79 H 12,54 N 4,47

gef. : C 72,68 H 12,38 N 4,41

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.82-0.85 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₅O-]), 1.17-1.53 (m, 56H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂O-]), 3.29-3.80 (m, 12H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂O-]), [-CONHCH₂CONH-], [-CONHC(-CH₂O-)₂(-CH₂OH)], 4.2-4.24 (m, 2H, [H₂N-])



16.4.5. Darstellung hydrophober Pentaerythritol-Derivate

3-(Hexadecyloxy)-2-[(hexadecyloxy)methyl]-2-[(phenylmethoxy)methyl]-1-propanol (57)

Die Einführung der Benzylschutzgruppe erfolgte analog Variante B der Synthese von Verbindung **43**. Das Rohprodukt wurde mit einem Chloroform/Ether Gradienten durch Säulenchromatographie gereinigt.

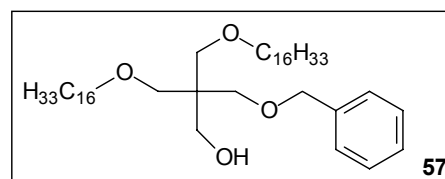
Summenformel: C₄₄H₈₂O₄

Molare Masse: 675,12 g/mol

Fp: <30 °C

R_f (LM 2): 0,72

Massenspektrum: M+Na



Ausbeute: 61%

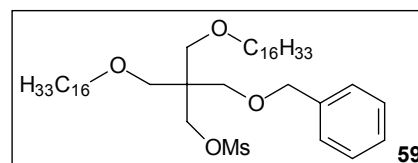
Elementaranalyse: theoret. : C 78,28 H 12,24
 gef. : C 78,19 H 12,14

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.84\text{-}0.88$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{O-}]$), $1.20\text{-}1.54$ (m, 56H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{O-}]$), $3.35\text{-}3.71$ (m, 12H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{O-}]$, $[\text{C}(\text{CH}_2\text{O-})_3(\text{CH}_2\text{OH})]$), 4.48 (s, 2H, $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O-}]$), $7.24\text{-}7.34$ (m, 5H, $[\text{C}_6\text{H}_5\text{-}]$)

3-(Hexadecyloxy)-2-[hexadecyloxy)methyl]-2-[(benzyloxy)methyl]-1-propanolmethansulfonat (**59**)

Zu einer eisgekühlten Lösung der Verbindung **57** 2,57 g (3,8 mmol) und Triethylamin 770 mg (7,6 mmol) in 20 ml Methylenchlorid wurden innerhalb von 15 min 460 mg (4 mmol) Methansulfonsäurechlorid **58** unter Rühren zugetropft. Nach weiteren 30 min bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ wurde das Reaktionsgemisch mit eiskaltem Wasser, eisgekühlter Salzsäurelösung (10%), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsvakuumverdampfer eingeeengt. Das resultierende Produkt ließ sich aus Aceton umkristallisieren.

Summenformel: $\text{C}_{45}\text{H}_{84}\text{O}_6\text{S}_1$
 Molare Masse: 753,21 g/mol
 Fp: $<30\text{ }^\circ\text{C}$
 R_f (LM 2): 0,76
 Massenspektrum: M+Na
 Ausbeute: 90%



Elementaranalyse: theoret. : C 71,76 H 11,24
 gef. : C 71,71 H 11,24

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.84\text{-}0.88$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{O-}]$), $1.20\text{-}1.54$ (m, 56H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{O-}]$), 2.97 (s, 3H, $[\text{CH}_3\text{SO}_3\text{-}]$), $3.35\text{-}3.71$ (m, 12H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{O-}]$, $[\text{C}(\text{CH}_2\text{O-})_3(\text{CH}_2\text{OH})]$), 4.48 (s, 2H, $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O-}]$), $7.24\text{-}7.34$ (m, 5H, $[\text{C}_6\text{H}_5\text{-}]$)

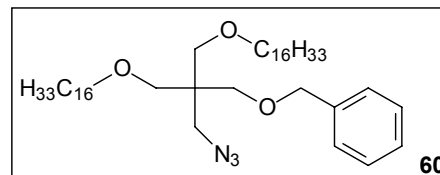
1-[3-(Hexadecyloxy)-2-[(hexadecyloxy)methyl]-2-[(benzyloxy)methyl]propyl]-azid (**60**)

Zur Darstellung des Azides **60** wurde das Mesylat **59** 2,36 g (3,1 mmol) in 50 ml Dimethylformamid gelöst und mit Natriumazid 400 mg (6,3 mmol) versetzt. Diese Suspension wurde unter Rühren auf $90\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und war nach 8 h abgeschlossen. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch in Wasser aufgenommen und mit 50 ml Chloroform

ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mehrmals mit Wasser und abschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und abschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsvakuumverdampfer konnte das Rohprodukt ohne weitere Reinigung weiter verarbeitet werden.

Summenformel: $C_{44}H_{82}N_3O_3$

Molare Masse: 701,14 g/mol



3-(Hexadecyloxy)-2-[(hexadecyloxy)methyl]-2-[(benzyloxy)methyl]-1-propanamin (61)

Zur Darstellung des Amins **61** wurde das Azid **60** 700 mg (1 mmol) in 10 ml Tetrahydrofuran aufgenommen und mit 1 g Triphenylphosphin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Entwicklung von Stickstoff in Form von Gasbläschen zu beobachten war. Nach dem Abklingen der Gasentwicklung wurde 1 ml Wasser zugetropft und weitere 24 h gerührt. Zur Aufarbeitung des Ansatzes wurde mit Wasser verdünnt und mit 50 ml eines Chloroform/Methanol Gradienten 8:2 ausgeschüttelt. Im Anschluss daran wurde die organische Phase abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit einem Chloroform/Methanol Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{44}H_{83}N_1O_3$

Molare Masse: 674,14 g/mol

Fp: Öl

R_f (LM 3): 0,64

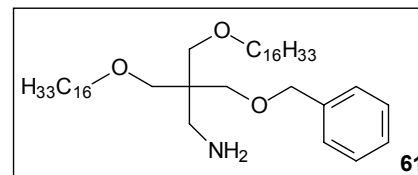
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 78%

Elementaranalyse: theoret. : C 78,39 H 12,41 N 2,08

gef. : C 77,90 H 12,06 N 1,91

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.85-0.88$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{O-}]$), $1.24-1.52$ (m, 56H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{O-}]$), $3.32-3.40$ (m, 12H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{O-}]$), 4.48 (s, 2H, $[\text{C}(-\text{CH}_2\text{O})_3(-\text{CH}_2\text{NH}_2)]$), $7.24-7.32$ (m, 5H, $[\text{C}_6\text{H}_5-]$)



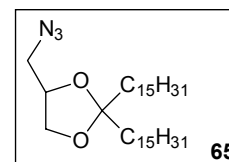
16.4.6. Darstellung hydrophober Glycerol-Derivate

3-[(2,2-Dipentadecyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl]-azid (65)

Die Darstellung des Azides **65** wurde analog der Synthese von Verbindung **60** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung zum Amin **66** reduziert.

Summenformel: $C_{34}H_{68}N_3O_2$

Molare Masse: 550,9 g/mol



2,2-Dipentadecyl-1,3-dioxolan-4-methylamin (66)

Die Darstellung desamins **66** wurde analog der Synthese von Verbindung **61** durchgeführt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit einem Heptan/Ether Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{34}H_{69}N_1O_2$

Molare Masse: 523,92 g/mol

Fp: 26-28 °C

R_f (LM 3): 0,46

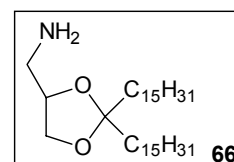
Massenspektrum: M+H

Ausbeute: 63%

Elementaranalyse: theoret. : C 77,94 H 13,27 N 2,67

gef. : C 77,69 H 13,21 N 2,58

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 0.85 (t, 6H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}$ -]), 1.23-1.60 (m, 56H, 2[$CH_3(CH_2)_{14}$ -]), 2.77-2.80 (m, 2H, [H_2NCH_2 -]), 3.56-3.59 (t, 2H, [- OCH_2 -]), 3.98-4.09 (m, 1H, [- OCH -])



(2-[(2,2-Dipentadecyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl]amino)-2-oxoethyl)carbamidsäurephenylmethylester (67)

Die Darstellung der Verbindung **67** wurde analog der Synthese von Verbindung **50** durchgeführt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit einem Heptan/Ether Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{44}H_{78}N_2O_5$

Molare Masse: 715,10 g/mol

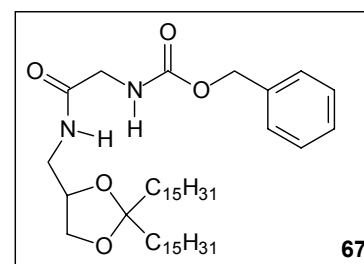
Fp: 42-44 °C

R_f (LM 2): 0,27

Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 72%

Elementaranalyse: theoret. : C 73,90 H 10,99 N 3,92



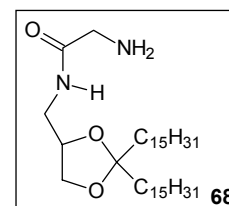
gef. : C 73,59 H 11,05 N 3,70

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.84-0.87$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-]$), $1.18-1.65$ (m, 56H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-]$), 3.35 (s, 2H, $[-\text{CONHCH}_2\text{CONH}-]$), $3.26-4.16$ (m, 5H, $[-\text{CONHCH}_2\text{CHCH}_2\text{O}-]$), 5.11 (s, 2H, $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-]$), $7.27-7.33$ (m, 5H, $[\text{C}_6\text{H}_5-]$)

2-Amino-N-[(2,2-dipentadecyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl]-acetamid (**68**)

Die Darstellung der Verbindung **68** wurde analog der Synthese von Verbindung **51** durchgeführt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit einem Chloroform/Ether Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_3$
 Molare Masse: 580,79 g/mol
 Fp: 50-52 °C
 R_f (LM 3): 0,65
 Massenspektrum: M+H
 Ausbeute: 68%



Elementaranalyse: theoret. : C 74,42 H 12,49 N 4,82
 gef. : C 74,07 H 12,28 N 4,52

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.84-0.87$ (t, 6H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-]$), $1.23-1.62$ (m, 56H, $2[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-]$), 3.35 (s, 2H, $[-\text{CONHCH}_2\text{CONH}-]$), $3.37-4.21$ (m, 5H, $[-\text{CONHCH}_2\text{CHCH}_2\text{O}-]$)

16.4.7. Darstellung von Phospholipiden

O-[[2,3-Bis(hexadecyloxy)propox]]hydroxyphosphinyl]-N-[(benzyloxy)carbonyl]-serinmethylester (**80**)

Es wurden 760 mg (3 mmol) N-(Benzyloxy)carbonylserinmethylester **79** und 1,36 g (4,5 mmol) 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid in 25 ml trockenem Pyridin gelöst und 15 min gerührt. 920 mg (1,5 mmol) Phosphorsäuremono-(2,3-bis-hexadecyloxypropyl)ester **76** wurden unter gelindem Erwärmen in 3 ml abs. Pyridin gelöst und zur bereits hergestellten Lösung hinzugefügt. Anhand der chromatographischen Kontrolle der Umsetzung konnte festgestellt werden, dass die Reaktion nach 4 h Rühren beendet war. Es wurde mit 10 ml Wasser hydrolysiert und eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Abtrennen der wässrigen Phase wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch mit einem Chloroform/Methanol/Ammoniak Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: $C_{47}H_{86}N_1O_{10}P_1$

Molare Masse: 856,17 g/mol

Fp: 76-78 °C

 R_f (LM 4): 0,8

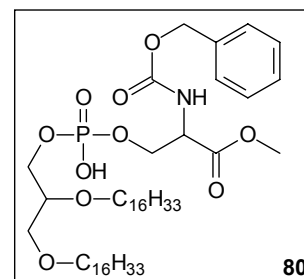
Massenspektrum: M-H

Ausbeute: 44%

Elementaranalyse: theoret. : C 63,27 H 10,17 N 1,57

(*2H₂O) gef. : C 63,87 H 9,81 N 1,64

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂]), 1.23-1.46 (m, 56H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-]), 3.33-3.64 (m, 10H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-], [-OCHCH₂O-], [CH₃O-]), 3.75-3.82 (m, 2H, [-OCH₂CH-]), 4.07-4.13 (m, 1H, [-OCH₂CH-]), 5.05-5.1 (m, 2H, [C₆H₅CH₂O-]), 7.24-7.29 (m, 5H, [C₆H₅-])



80

1,2-Di-O-hexadecylglycero-3-phosphorsäure-3'-carboxymethyl-N,N-dimethylammoniummethylester (87)

1,04 g (1,5 mmol) der Verbindung **85**, 1,12 g (6 mmol) Iodessigsäure und 0,34 g (8,5 mmol) gepulvertes Natriumhydroxid wurden in 20 ml abs. Methanol und 3 ml Chloroform gelöst und im gut verschlossenen Kolben bei 35 °C temperiert. Nach 10 h war die Ausgangsverbindung vollständig umgesetzt (DC-Kontrolle). Die abgekühlte Reaktionslösung wurde mit 15 ml Wasser und 15 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde abgetrennt, mit 20 ml Methanol versetzt und mit 1 N Salzsäure angesäuert. Nach dem Hinzufügen von 15 ml Wasser wurde die Chloroformphase abgetrennt, mit 20 ml Methanol versetzt und dreimal mit 15 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsvakuumverdampfer wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie weitergereinigt. Es wurde mit Chloroform/Methanol/Wasser unter kontinuierlicher Erhöhung der Polarität chromatographiert.

Summenformel: $C_{41}H_{84}N_1O_8P_1$

Molare Masse: 750.1 g/mol

Fp: 218-220°C

 R_f (LM 4): 0,14

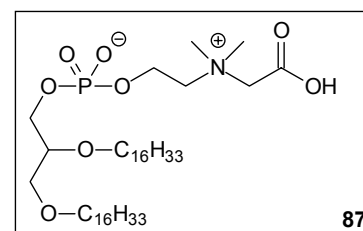
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 74%

Elementaranalyse: theoret. : C 64,11 H 11,29 N 1,82

(*H₂O) gef. : C 64,00 H 11,09 N 1,67

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, 6H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-]), 1.23-1.51 (m, 56H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-]), 3.37-3.55 (m, 13H, 2[CH₃(CH₂)₁₄CH₂-]),



87

$[-OCHCH_2O-]$, $[CH_3N^+CH_3]$, 3.8-3.9 (m, 4H, $[-CHCH_2O-]$,
 $[-N^+CH_2CH_2-]$), 4.26-4.35 (m, 4H, $[-N^+CH_2CH_2-]$, $[-N^+CH_2CO-]$)

rac. 1-O-Benzyl-2-O-tetradecylglycero-3-phosphocholin (94)

1. Phosphorylierungsschritt

Eine Lösung von 4,35 g (18 mmol) 2-Bromethylphosphorsäuredichlorid **77** in 10 ml abs. Chloroform wurde unter Eiskühlung und Rühren mit 3,64 g (36 mmol) Triethylamin in 5 ml abs. Chloroform versetzt. Dann wurde das Eisbad durch ein Wasserbad von 20 °C ersetzt und es wurde unter Rühren eine Lösung von 3,1 g (8,2 mmol) 1-O-Benzyl-2-O-tetradecylglycerol **92** in 45 ml abs. Chloroform zugetropft. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur war das Ausgangsprodukt nahezu vollständig umgesetzt. Zur Hydrolyse wurden 30 ml Wasser unter Eiskühlung und heftigem Rühren zugetropft. Nach 1 h wurde die Chloroformphase abgetrennt und am Rotationsvakuumverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 45 ml Tetrahydrofuran und 100 ml Wasser gelöst und 2 h gerührt. Nach der Zugabe von 60 ml Diisopropylether und 12,5 ml Methanol wurde die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase am Rotationsvakuumverdampfer von den Lösungsmitteln befreit. Das verbleibende Öl enthielt den 1-O-Benzyl-2-O-tetradecylglycero-3-phosphorsäure-3'-bromethylester **93**. Dieser wurde ohne weitere Reinigung mit Trimethylamin umgesetzt.

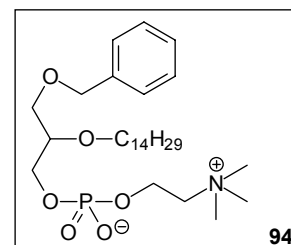
2. Quarternisierungsschritt

Das zentrale Zwischenprodukt, des Bromethylesters **93** aus Reaktion 1, wurde in einem 500 ml Rundkolben in 100 ml Chloroform gelöst und mit 100 ml Acetonitril versetzt. Dazu wurden 50 ml Trimethylamin (33 prozentige Lösung in Alkohol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gut verschlossen aufbewahrt, dann 2 h bei 50 °C erwärmt, anschließend das Lösungsmittel am Rotationsvakuumverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde in 50 ml Chloroform gelöst und die Lösung nacheinander mit 50 ml 2,5 prozentiger Ameisensäure und 60 ml Methanol, 50 ml 0,1 N Natriumacetatlösung und 60 ml Methanol sowie 50 ml Wasser und 60 ml Methanol gewaschen. Nach dem Trocknen der Chloroformphase über Natriumsulfat wurde die Lösung am Rotationsvakuumverdampfer eingengt und der Rückstand in wenig Chloroform/Methanol 1:1 gelöst und auf 50 °C erwärmt. Dann wurde solange Aceton zugefügt bis sich erste Kristalle bilden. Diese Mischung wurde 12h im Kühlschrank stengelassen. Abschließend wurde abgesaugt und zweimal aus Aceton umkristallisiert.

Summenformel: $C_{29}H_{54}N_1O_6P_1$

Molare Masse: 543,72 g/mol

R_f (LM 4): 0,4



Massenspektrum:	M+Na			
Ausbeute:	68%			
Elementaranalyse:	theoret. :	C 62,01	H 10,05	N 2,49
(*H ₂ O)	gef. :	C 62,36	H 9,80	N 2,49
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0.86 (t, 3H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH ₂ CH ₂ -]),	1.18-1.28 (m, 22H,		
	[CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH ₂ CH ₂ -]),	1.47-1.53 (m, 2H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH ₂ CH ₂ -]),	3.19	
	(s, 9H, [(CH ₃) ₃ N ⁺]),	3.47-3.62 (m, 7H, [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH ₂ CH ₂ -]),		
	[-OCHCH ₂ O-], [(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ -]),	4.15-4.24 (m, 2H, [(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ CH ₂ -]),		
	4.47-4.55 (m, 2H, [C ₆ H ₅ CH ₂ -]),	7.22-7.31 (m, 5H, [C ₆ H ₅ -])		

rac. 2-O-Tetradecylglycero-3-phosphorsäure-3'-N,N,N-trimethylammoniummethylester (95)

1,6 g (3 mmol) der Verbindung **94** wurden in 50 ml abs. Ethanol gelöst. Nach der Zugabe von 50 mg 5%-Pd/C-Katalysator wurde bei Normaldruck und Raumtemperatur 6 h hydriert. Danach wurde der Katalysator von der ethanolischen Lösung abfiltriert, mit Ethanol nachgewaschen und die vereinigten Filtrate nochmals filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsvakuumverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie mit einem Chloroform/Methanol/Ammoniak Gradienten steigender Polarität gereinigt.

Summenformel: C₂₂H₄₉N₁O₆P₁

Molare Masse: 454,60 g/mol

R_f (LM 4): 0,27

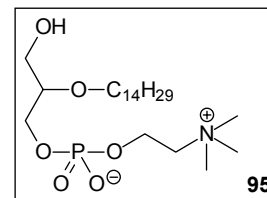
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 90%

Elementaranalyse: theoret. : C 56,03 H 10,69 N 2,97

(*H₂O) gef. : C 56,37 H 10,68 N 3,28

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.85 (t, 3H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂-]), 1.19-1.29 (m, 22H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂-]), 1.46-1.48 (m, 2H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂-]), 3.3 (m, 9H, [(CH₃)₃N⁺-]), 3.37-3.6 (m, 7H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂-], [-OCHCH₂O-], [(CH₃)₃N⁺CH₂-]), 3.66-3.90 (m, 2H, [-OCH₂CH-]), 4.2-4.3 (m, 2H, [(CH₃)₃N⁺CH₂CH₂-])



rac. 1-O-Myristoyl-2-O-tetradecylglycero-3-phosphorsäure-3'-N,N,N-trimethylammoniummethylester (97)

1,0 g (4 mmol) Myristinsäure wurden in 20 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Anschließend wurden der Lösung 450 mg (2 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt, kurz durchgeschüttelt und 12 h stehengelassen. Dann wurde vom entstandenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und am Rotationsvakuumverdampfer eingengt. Weiterhin wurde das Myristinsäureanhydrid in wenig Toluol gelöst und einer Lösung der Verbindung **95** in Dimethylsulfoxid/Toluol 1:1 hinzugefügt. Als Katalysator wurde eine Spatelspitze Dimethylaminopyridin verwendet. Es wurde auf 50 °C erwärmt und nach 4 h weitere 200 mg (1 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt und 12 h Rühren gelassen. Danach wurde das Reaktionsgemisch filtriert, das Filtrat am Rotationsvakuumverdampfer eingengt und der Rückstand mit einem Chloroform/Methanol/Ammoniak Gradienten durch Säulenchromatographie gereinigt. Der chromatographischen Reinigung schloss sich ein Präzipitationsschritt an. 100 mg (0,15 mmol) der Verbindung **97** wurden in einem Zentrifugenglas in 2 ml abs. Chloroform gelöst. Unter gelindem Erwärmen wurde die Lösung dann im Argonstrom bis zur einsetzenden Trübung eingengt. Danach wurde vorsichtig erwärmt, bis sich die Lösung wieder aufklärte, und das Zentrifugenglas bis 10 mm unterhalb der Öffnung mit abs. Aceton aufgefüllt. Abschließend wurde für 2 h im Kühlschrank stehen gelassen, 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert und das ausgefallene Lipid im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Summenformel: $C_{36}H_{74}N_1O_7P_1$

Molare Masse: 663,95 g/mol

Fp: <30 °C

R_f (LM 4): 0,43

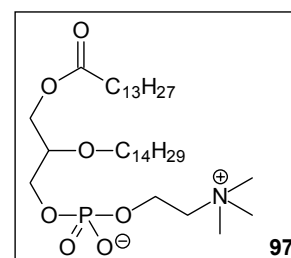
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 67%

Elementaranalyse: theoret. : C 63,40 H 11,23 N 2,05

(*H₂O) gef. : C 63,76 H 11,23 N 2,09

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, 6H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂O-], [CH₃(CH₂)₁₀CH₂CH₂CO-]), 1.18-1.32 (m, 42H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂O-], [CH₃(CH₂)₁₀CH₂CH₂CO-]), 1.45-1.59 (m, 4H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂O-], [CH₃(CH₂)₁₀CH₂CH₂CO-]), 2.26 (t, 2H, [CH₃(CH₂)₁₀CH₂CH₂CO-]), 3.36 (s, 9H, [(CH₃)₃N⁺-]), 3.43-3.64 (m, 2H, [CH₃(CH₂)₁₁CH₂CH₂O-]), 3.76-3.82 (m, 2H, [(CH₃)₃N⁺CH₂]), 3.87-4.06 (m, 3H, [-OCHCH₂O-]), 4.24-4.28 (m, 4H, [(CH₃)₃N⁺CH₂CH₂-], [-COOCH₂CH-])



rac. 1-(2-Dodecylmyristoyl)-2-O-tetradecylglycero-3-phosphorsäure-3'-N,N,N-trimethylammoniummethylester (99)

Verbindung **99** wurde aus **95** durch Umsetzung mit 2-Dodecyltetradecansäure nach der Synthesemethode von **97** dargestellt. Die Reinigung erfolgte wiederum durch einen Präzipitationsschritt.

Summenformel: $C_{48}H_{98}N_1O_7P_1$

Molare Masse: 832,28 g/mol

Fp: <30 °C

R_f: 0,45 CHCl₃/MeOH/NH₃

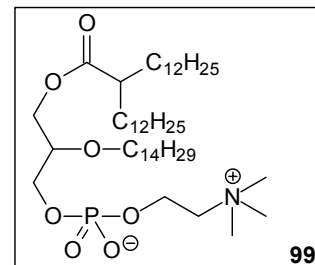
Massenspektrum: M+Na

Ausbeute: 56%

Elementaranalyse: theoret. : C 66,40 H 11,84 N 1,61

(*H₂O) gef. : C 66,49 H 12,03 N 1,65

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.85 (t, 9H, 2[CH₃(CH₂)₁₁-], [CH₃(CH₂)₁₂CH₂O-]), 1.17-1.56 [m, 68 H, 2[CH₃(CH₂)₁₁-], [CH₃(CH₂)₁₂CH₂O-]), 2.27-2.31 (m, 1H, [-CHCOO]), 3.34 (s, 9H, [(CH₃)₃N⁺-]), 3.43-3.64 (m, 2H, [CH₃(CH₂)₁₂CH₂O-]), 3.76-3.82 (m, 2H, [(CH₃)₃N⁺CH₂-]), 3.87-4.06 (m, 3H, [-OCHCH₂O-]), 4.24-4.28 (m, 4H, [(CH₃)₃N⁺CH₂CH₂-], [-COOCH₂CH-])



17. Literaturverzeichnis

- 1 T. Dingermann, *Gentechnik-Biotechnik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart* **1999**
- 2 F. L. Graham, A. J. van der Eb, *J. Virol.* **1973**, *54*, 536
- 3 C. L. Cepko, B. E. Roberts, R. C. Mulligan, *Cell* **1984**, *37*, 1053
- 4 V. Gieselmann, *Naturwissenschaftliche Rundschau* **2001**, *10*, 513
- 5 D. Ferber, *Science* **2001**, *294*, 1638
- 6 G. Romano, P. P. Claudio, H. E. Kaiser, A. Giordano, *In Vivo* **1998**, *12*, 59
- 7 A. Fischer, *Cell Mol. Biol.* **2001**, *47*, 1269
- 8 S. Satkauskas, M. F. Bureau, M. Puc, *Mol. Ther.* **2002**, *5*, 133
- 9 T. L. Burkoth, B. J. Bellhouse, G. Hewson, D. J. Longridge, A. G. Muddle, D. F. Sarphe, *Drug Carrier Syst.* **1999**, *16*, 331
- 10 D. D. Lasic, N. S. Templeton, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *20*, 221
- 11 K. K. Hunt, S. A. Vorburger, *Science* **2002**, *294*, 415
- 12 I. Koltover, K. Wagner, C. R. Safinya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14046
- 13 E. R. Lee, J. Marshall, C. S. Siegel, *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1701
- 14 C. Wheeler, P. L. Felgner, Y. J. Tsai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 11454
- 15 R. Z. Yu, R. S. Geary, J. M. Leeds, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1309
- 16 D. V. Schaffer, N. A. Fidelman, N. Dan, D. A. Lauffenburger, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 598
- 17 N. S. Templeton, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2003**, *3*, 57
- 18 C. R. Safinya, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 440
- 19 J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, C. R. Safinya, *Science* **1997**, *275*, 810
- 20 H. Farhood, N. Serbina, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 289
- 21 N. S. Templeton, D. D. Lasic, P. M. Frederik, H. H. Strey, D. D. Roberts, G. N. Palvakis, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 647
- 22 M. J. Bennet, M. H. Nantz, R. P. Balasubramanian, D. C. Gruenert, R. W. Malone, *Biosci. Rep.* **1995**, *15*, 47
- 23 B. Otmane, J. Gaucheron, C. Santaella, H. V. J. Kolbe, P. Vierling, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 109
- 24 P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413
- 25 P. Pinnaduwege, L. Schmitt, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *985*, 33
- 26 R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1023*, 124
- 27 M. A. Illies, W. A. Seitz, M. T. Caproiu, M. Wentz, R. E. Garfield, A. T. Balaban, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2645

- 28 X. Gao, L. Huang, *Gene Ther.* **1995**, *2*, 710
- 29 J. P. Berh, B. Demeneix, J. P. Loeffler, J. P. Mutul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6982
- 30 K. Ewert, A. Ahmad, H. M. Evans, H. W. Schmidt, C. R. Safinya, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5023
- 31 D. Gilot, M. L. Miramon, T. Benvegnu, V. Ferrieres, O. Loreal, C. Guguen-Guillouzo, D. Plusquellec, P. Loyer, *J. Gene Med.* **2002**, *4*, 415
- 32 A. Aissaoui, N. Oudrhiri, L. Petit, M. Hauchecorne, E. Kan, M. Sainlos, S. Julia, J. Navarro, J. P. Vigneron, J. M. Lehn, P. Lehn, *Current Drug Targets* **2002**, *3*, 1
- 33 J. Herscovici, M. J. Egron, A. Quenot, F. Leclercq, N. Leforestier, N. Mignet, B. Wetzler, D. Scherman, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1893
- 34 S. Kawakami, F. Yamashita, M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *252*, 78
- 35 J. Behr, *Chimia* **1997**, *51*, 34
- 36 K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, T. Kissel, *J. Control Release* **2003**, *89*, 113
- 37 H. Petersen, P. M. Fechner, A. L. Martin, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 845
- 38 J. L. Merlin, A. N'Doye, T. Bouriez, G. Dolivet, *Drug News Perspect.* **2002**, *15*, 445
- 39 D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H. P. Elsasser, T. Kissel, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1273
- 40 R. Kircheis, S. Schuller, S. Brunner, M. Ogris, K. H. Heider, W. Zauner, E. Wagner, *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 111
- 41 P. Lampel, M. Eloma, M. Ruponen, A. Urtti, P. T. Männistö, A. Raasmaja, *J. Control. Release* **2003**, *88*, 173
- 42 C. W. Pouton, P. Lucas, B. J. Thomas, A. N. Uduehi, D. A. Milroy, S. H. Moss, *J. Control Release* **1998**, *53*, 289
- 43 M. D. Brown, A. Schatzlein, A. Brownlie, V. Jack, W. Wang, L. Tetley, A. I. Gray, I. F. Uchegbu, *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 880
- 44 A. Ziemienowicz, D. Gorlich, E. Lanka, B. Hohn, L. Rossi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3729
- 45 R. J. Mumper, J. Wang, J. M. Claspell, A. P. Rolland, *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* **1995**, *22*, 178
- 46 L. Vincent, J. Varet, J. Y. Pille, H. Bompais, P. Opolon, A. Maksimenko, C. Malvy, M. Mirshahi, H. Lu, J. P. Vannier, C. Soria, H. Li, *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 419
- 47 A. V. Kabanov, P. Lemieux, S. Vinogradov, V. Alakhov, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 223
- 48 H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart **1991**, 22. Auflage

- 49 *Organikum, Johann Ambrosius Barth Verlag Heidelberg - Leipzig* **1996**, 20. Auflage
- 50 H. Finkelstein, *Chem. Ber.* **1910**, 43, 1528
- 51 D. S. Breslow, E. Baumgarten, C. R. Hauser, *Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 1286
- 52 G. Ställberg, *Arkiv Kemi* **1958**, 12, 153
- 53 Z. Selinger, V. Lapidot, *J. Lipid Res.* **1966**, 7, 174
- 54 B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 1651
- 55 S. Müller, R. R. Schmidt, *J. Prakt. Chem.* **2000**, 8, 779
- 56 H. W. I. Peerlings, S. Nepogodiev, J. F. Stoddart, E. W. Meijer, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1879
- 57 M. Schmidt, *Dissertation* **2000**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 58 G. W. Anderson, R. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 4423
- 59 G. W. Anderson, R. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4596
- 60 H. A. Staab, *Angew. Chem.* **1962**, 74, 407
- 61 B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 14, 1219
- 62 B. Castro, J. R. Dormoy, B. Dourtoglou, G. Evin, C. Selve, J. C. Ziegler, *Synthesis* **1976**, 751
- 63 M. H. Kim, D. V. Patel, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5603
- 64 F. M. Menger, C. A. Littau, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1451
- 65 F. M. Menger, C. A. Littau, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10083
- 66 R. Zana, M. Benraou, R. Rueff, *Langmuir* **1991**, 7, 1072
- 67 R. Zana, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, 97, 205
- 68 R. Zana, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, 248, 203
- 69 R. Zana, Y. Talmon, *Nature* **1993**, 362, 228
- 70 S. Karaborni, K. Esselink, P. A. J. Hilbers, B. Smit, J. Karthaus, N. M. van Os, R. Zana, *Science* **1994**, 266, 254
- 71 G. Ronsin, C. Perrin, P. Guédât, A. Kremer, P. Camilleri, A. J. Kirby, *Chem. Commun.* **2001**, 2234
- 72 P. J. J. A. Buijnster, C. L. G. Rodríguez, E. L. Willighagen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kremer, P. Camilleri, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, B. Zwanenburg, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1397
- 73 C. G. Ricci, M. I. Cabrera, J. A. Luna, R. J. Grau, *Synlett* **2002**, 11, 1811
- 74 S. Chierici, P. Boullanger, L. Marron-Brignone, R. M. Morelis, P. R. Coulet, *Chem. Phys. Lipids* **1997**, 87, 91
- 75 A. A. Yaroslavov, O. Y. Udalykh, N. S. Melik-Nubarov, V. Kabanov, Y. A. Ermakov, V. A. Azov, F. M. Menger, *Chem. Eur.* **2001**, 22, 4853
- 76 K. Sugiyasu, S. Tamaru, M. Takeuchi, D. Berthier, I. Huc, R. Oda, S. Shinkai, *Chem. Commun.* **2002**, 1212

- 77 P. C. Bell, M. Bergsma, I. P. Dolbnya, W. Bras, M. C. A. Stuart, A. E. Rowan, M. C. Feiters, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1551
- 78 M. Castro, D. Griffiths, A. Patel, N. Patrick, C. Kitson, M. Ladlow, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2814
- 79 F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1980
- 80 M. J. Rosen, *CHEMTECH* **1993**, *23*, 30
- 81 C. McGregor, C. Perrin, M. Monck, P. Camilleri, A. J. Kirby, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6215
- 82 A. J. Kirby, P. Camilleri, J. B. F. N. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. Söderman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. G. Rodriguez, P. Guédât, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1486
- 83 K. E. Schulte, W. Weißkopf, J. Kirschner, *Z. physiol. Chem.* **1951**, *288*, 69
- 84 F. L. Breusch, E. Ulusoy; *Chem. Ber.* **1953**, *86*, 688
- 85 E. Ulusoy, *Rev. Fac. Sci. Istanbul (C)* **1954**, *19*, 46
- 86 P. L. Creger, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1397
- 87 B. Dobner, *persönliche Mitteilung*
- 88 R. F. B. Cox, S. M. McElvain, *Org. Synth.* **1937**, *17*, 54
- 89 R. F. B. Cox, S. M. McElvain, *Org. Synth.* **1937**, *17*, 56
- 90 A. C. Cope, H. L. Holms, H. O. House, *Org. Reactions* **1957**, *9*, 107
- 91 H. O. House, *Modern Synthetic Reaktionen* **1965**, W. A. Benjamin Inc., New York, Kap. 7
- 92 D. C. Ayres, *Carbanions in Synthesis* **1966**, Oldbourne Press London, 142
- 93 A. C. Cope, S. M. McElvain, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 4319
- 94 K. Ewert, A. Ahmad, H. M. Evans, H. W. Schmidt, C. R. Safinya, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5023
- 95 O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org. Synth. Coll. Vol. VII*, 70
- 96 F. H. Cameron, M. J. Moghaddam, V. J. Bender, R. G. Whittaker, T. J. Lockett, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1417*, 37
- 97 T. J. Lockett, W. G. Reilly, M. K. Manthey, X. E. Wells, F. H. Cameron, M. J. Moghaddam, J. Johnston, K. Smith, C. L. Francis, Q. Yang, R. G. Whittaker, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, *27*, 563
- 98 R. G. Whittaker, X. E. Wells, W. G. Reilly, PCT Int. Appl. WO 00 34,281, **2000** (*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 30964)
- 99 E. A. L. Biessen, D. M. Beuting, H. C. P. F. Rooelen, G. A. van de Marel, J. H. van Boom, T. J. C. van Berkel, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1538
- 100 R. Adhikari, C. L. Francis, G. W. Simpson, Q. Yang, *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 629

- 101 C. L. Francis, Q. Yang, N. K. Hart, F. Widmer, M. K. Manthey, H. M. He-Williams, *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 635
- 102 H. J. M. Kempen, C. Hoes, J. H. Van Boom, H. H. Spanjer, J. de Lange, A. Langendoen, T. J. C. van Berkel, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1306
- 103 M. S. Newman, M. Renoll, *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 1621
- 104 A. Polidori, B. Pucci, L. Zarif, J. M. Lacombe, J. G. Riess, A. A. Pavia, *Chem. Phys. Lip.* **1995**, *77*, 225
- 105 S. Monge, J. Sélambarom, F. Carré, J. Verducci, J. P. Roque, A. A. Pavia, *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 123
- 106 J. F. Berrien, J. Royer, H. P. Husson, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3769
- 107 C. Herdeis, A. Aschenbrenner, A. Kirfel, F. Schwabenländer, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2421
- 108 B. Wagner, G. I. Gonzalez, M. E. Tran Hun Dau, J. Zhu, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 737
- 109 L. Guerrier, J. Royer, D. S. Grierson, H. P. Husson, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7754
- 110 J. Sélambarom, S. Monge, F. Carré, J. P. Roque, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9559
- 111 J. S. Pierce, C. D. Lunsford, R. W. Raiford, J. L. Rush, D. W. Riley, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2595
- 112 J. S. Pierce, C. D. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2596
- 113 H. C. Brown, B. C. Subba Rao, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 681
- 114 G. W. Gribble, D. C. Ferguson, *Chem. Commun.* **1975**, 535
- 115 D. R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC: New York, 78. Auflage, **1997**
- 116 M. J. Wu, L. N. Pridgen, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1340
- 117 L. N. Pridgen, M. K. Mokhallalati, M. J. Wu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1237
- 118 C. Andres, A. Gonzales, R. Pedrosa, A. Perez-Encabo, S. Garcia-Granda, M. A. Salvado, F. Gomez-Beltran, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4743
- 119 H. Auterhoff, J. Knabe, H. D. Hölftje, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart **1999**, 14. Auflage
- 120 J. Chang, O. Oyelaran, C. K. Esser, G. S. Kath, G. W. King, B. G. Uhrig, Z. Konteatis, R. M. Kim, K. T. Chapman, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 4477
- 121 J. A. Kremers, E. W. Meijer, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4262
- 122 C. H. Issidorides, R. Galn, *Org. Synth.* **1963**, *4*, 679
- 123 M. Kloosterman, T. Slaghek, J. P. G. Hermans, J. H. Van Boom, *Recl: J. R. Neth. Chem. Soc.* **1984**, *28*, 3835
- 124 S. Hanessian, H. Prabhanjan, D. Qui, S. Nambiar, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 1731

- 125 L. Banfi, G. Guanti, R. Riva, *Tetrahedron: Asym.* **1999**, *10*, 3571
- 126 P. Nuhn, *Chemie der Naturstoffe, Akademie-Verlag Berlin* **1981**, 1. Auflage
- 127 E. Guenin, A. C. Herve, V. Floch, S. Loisel, J. J. Yaounac, J. C. Clement, C. Ferec, H. des Abbayas, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 629
- 128 V. Floch, S. Loisel, E. Guenin, A. C. Herve, J. C. Clement, J. J. Yaounac, H. des Abbayas, C. Ferec, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4617
- 129 J. Zabner, *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, *27*, 17
- 130 H. J. Rüger, H. P. Kertscher, *Diss. A Leipzig* **1979**
- 131 P. Nuhn, H. J. Rüger, P. Kertscher, K. Gawrisch, K. Arnold, *Pharmazie* **1978**, *33*, 181
- 132 J. A. Boomer, D. H. Thompson, S. M. Sullivan, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1292
- 133 J. Zhu, R. J. Munn, M. H. Nantz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2645
- 134 A. Aissaoui, B. Martin, E. Kan, N. Oudrhiri, M. Hauchecorne, J. P. Vigneron, J. M. Lehn, P. Lehn, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5210
- 135 X. Guo, F. C. Szoka, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 335
- 136 P. Nuhn, B. Dobner, P. Kertscher, W. Weissflog, G. Brezesinski, *Pharmazie* **1981**, *36*, 537
- 137 J. R. Ruhoff, *Org. Synth.* **1943**, *2*, 292
- 138 N. Z. Stanacev, E. Baer, M. Kates, *J. Biol. Chem* **1964**, *239*, 410
- 139 F. Paltauf, *Chem. Phys. Lipids* **1978**, *11*, 276
- 140 R. Hirt, R. Berchthold, *Pharmac. Acta Helvetiae* **1958**, *33*, 349
- 141 D. Arnold, H. Eibl, H. U. Weltzien, O. Westphal, *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *709*, 226
- 142 R. Aneja, J. S. Chadha, A. P. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *218*, 102
- 143 J. M. Jacob, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1630
- 144 H. Eibl, A. Nicksch, *Ger. Offen* **1973**, 2345 059 6.09
- 145 H. G. Gassen, *Gentechnische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin*
- 146 J. H. Felgner, R. Kumar, C. N. Sridhar, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2550
- 147 S. W. Hui, M. Langner, Y. L. Zhao, P. Ross, E. Hurley, K. Chan, *Biophys. J.* **1996**, *74*, 590
- 148 I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler, C. R. Safinya, *Science* **1998**, *281*, 78
- 149 F. Bringezu, B. Dobner, G. Brezesinski, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3203
- 150 D. Mirska, K. Schirmer, S. S. Funari, A. Langner, B. Dobner, G. Brezesinski, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *40*, 51
- 151 P. E. Verkade, J. D. van Roon, *Rec. Trav. Chim. Bays-Pas* **1940**, *61*, 831
- 152 D. Arnold, H. U. Weltzien, O. Westphal, *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *70*, 234
- 153 B. Dobner, *Dissertation B* **1990**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 154 G. Brezesinski, H.-J. Mögel: *Grenzflächen und Kolloide, Spektrum Akademischer*

- Verlag GmbH; Heidelberg, Berlin, Oxford* **1993**, 63
- 155 H. Möhwald, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 441
- 156 J. Als-Nielsen, D. Jaquemain, K. Kjaer, M. Lahav, F. Leveiller, L. Leiserowitz, *Phys. Rep.* **1994**, *246*, 251
- 157 D. Jaquemain, F. Leveiller, S. Weinbach, M. Lahav, L. Leiserowitz, K. Kjaer, J. Als-Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7684
- 158 V. M. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta, *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779
- 159 V. M. Kaganer, I. R. Peterson, R. M. Kenn, M. C. Shih, M. Durbin, P. Dutta, *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 9412
- 160 A. M. Kerth, *Promotion* **2003**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 161 M. Heinze, *Diplomarbeit* **2005**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 162 R.R.C. New; *Liposomes: a practical approach Oxford Univ. Press* **1994** ISBN 0-19-963077-1
- 163 P. M. Fechner, *Diplomarbeit* Marburg
- 164 Gassen, Gangolf; *Gentechnische Methoden, 2. Auflage Spektrum akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin* **1999** ISBN 3-8274-0789-2
- 165 R. R. Schmidt, K. Jankowski, *Liebigs Ann.* **1996**, 867
- 166 U. Eisner, J. Polonsky, E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1955**, *212*, 217
- 167 G. Bier, *Makromol. Chem.* **1949**, *4*, 124
- 168 H. Staudinger, G. Bier, G. Lorentz, *Makromol. Chem.* **1949**, *4*, 264
- 169 M. Guthzeit, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1881**, *206*, 354
- 170 H. Staudinger, *Chem. Ber.* **1933**, *66*, 378
- 171 T. Eichert, A. Regelin, U. Massing, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *8*, 787
- 172 Y. Kim, K. Myoung-Soon, H. Young, S. Han, *Tetrahedron* **2003**, *16*, 2921
- 173 A. Terjung, K. H. Jung, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Org. Bioorg. Chem.* **1996**, *8*, 1313

18. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im Folgenden herzlich bedanken möchte.

Herrn Institutsdirektor Prof. Langner danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dobner für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie die vielen Anregungen und Diskussionen. Nicht zu vergessen sind zahlreiche sehr wertvolle Tipps, praktische Ratschläge, aufmunternde Worte und ab und an eine zünftige Anekdote. Der gesamten Arbeitsgruppe, vor allen Dingen Frau Dipl. Pharm. Doreen Otto und Herrn Dipl. Pharm. Simon Drescher gilt mein Dank für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die kooperative Zusammenarbeit. Besonders die zahlreichen Diskussionen bleiben unvergessen. Dank an alle, die durch ihre freundliche Unterstützung geholfen haben, besonders Frau Apothekerin Manuela Folz mit ihrer Diplomarbeit.

Prof. Langner und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Daten der Transfektionsuntersuchungen und die stetige Diskussionsbereitschaft. Mein spezieller Dank gilt Frau Munk und Frau Tannhäuser für ihre Unterstützung in organisatorischen Fragen.

Für die physikochemische Charakterisierung danke ich Herrn Dr. Brezesinski und seiner Arbeitsgruppe vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm. Vor allen Dingen gilt mein Dank für die fachlichen Hinweise und Anmerkungen und natürlich auch für die netten Gespräche außerhalb wissenschaftlicher Fragestellungen.

Für die schnelle und sorgfältige Anfertigung der Massenspektren danke ich Frau Woigk. Frau Brandt danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der NMR-Abteilung des Fachbereiches Chemie für die Erstellung der entsprechenden Spektren.

Schließlich danke ich Frau Apothekerin Sandra Strübing für die Unterstützung in allen Lebenslagen und besonders im Kampf mit der Rechtschreibung ganz herzlich.

Auch allen, die nicht namentlich erwähnt wurden, gilt mein herzlicher Dank für die moralische Unterstützung.

19. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliches

Ingo Christian Schulze
geboren am 08.10.1975 in Leverkusen
ledig

Schulbildung

1982 - 1986 Grundschule in Euskirchen
1986 - 1995 Gymnasium mit Abitur in Euskirchen

Hochschulbildung

1995 - 2000 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
Feb. 1996 Famulatur in der Apotheke am Bahnhof in Euskirchen
Feb. 1997 Famulatur in der Universitätsapotheke der
Martin-Luther-Universität
Aug. 1997 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Aug. 1999 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Praktisches Jahr:
Okt. 1999 – März 2000 Apotheke im Halle-Center
Apr. 2000 – Sept. 2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische
Chemie der Martin-Luther-Universität
Okt. 2000 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Nov. 2000 Approbation als Apotheker
März 2001 Diplom
Thema: Synthese von Inhibitoren der Lipoxygenase und ESR-
spektroskopische Untersuchung eines stabilen Radikals mit
Amidrazonstruktur

Berufstätigkeit

Jan. 2001 – Okt. 2001 Apotheker in der Apotheke im Halle-Center
Nov. 2001 – Okt. 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische
Chemie der Martin-Luther-Universität
Forschungsschwerpunkt: Gentransfektion
seit 1. Nov. 2005 Leiter der Apotheke im Klinikum Mansfelder Land

Erklärung

Erklärung

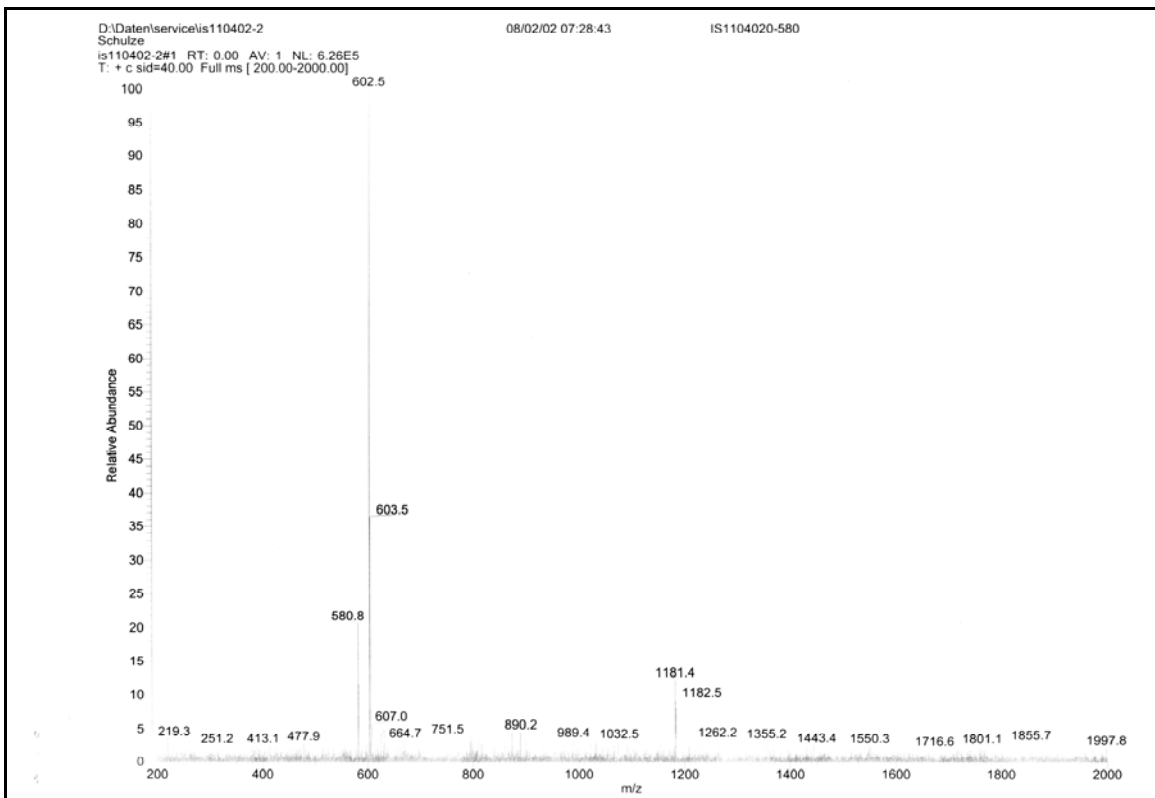
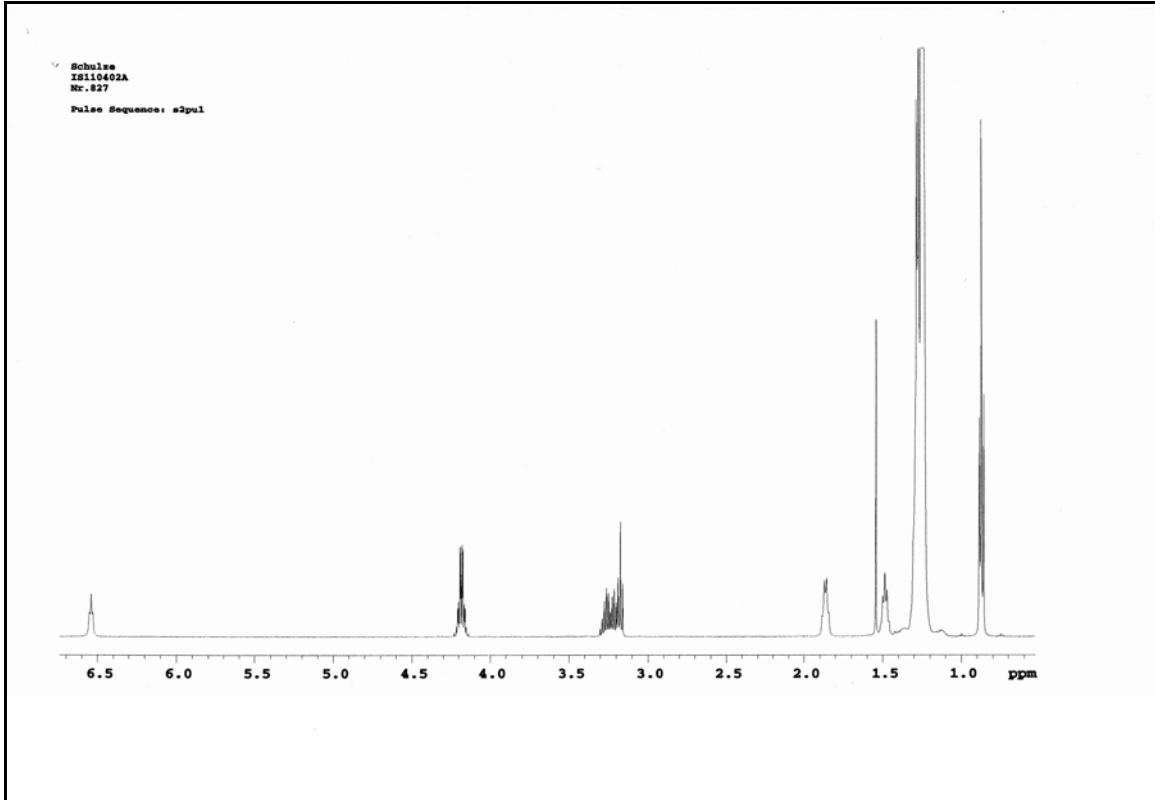
Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt.

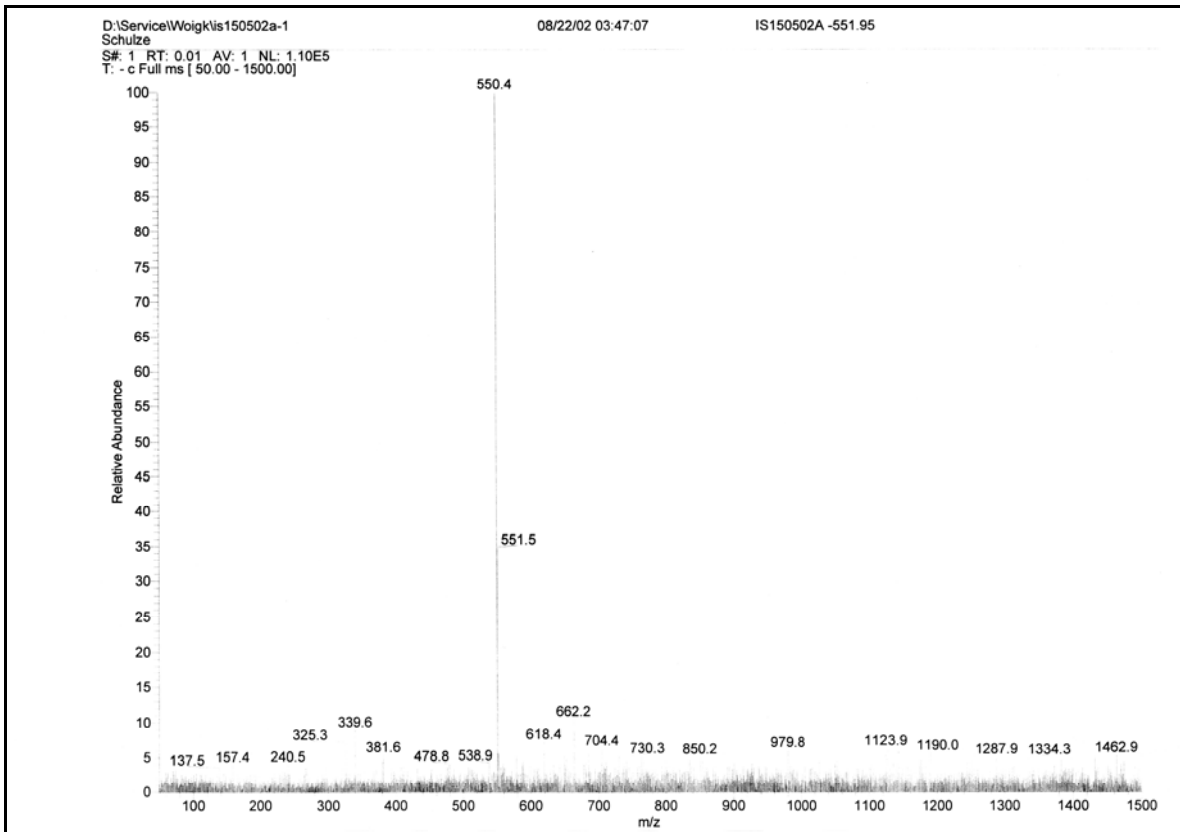
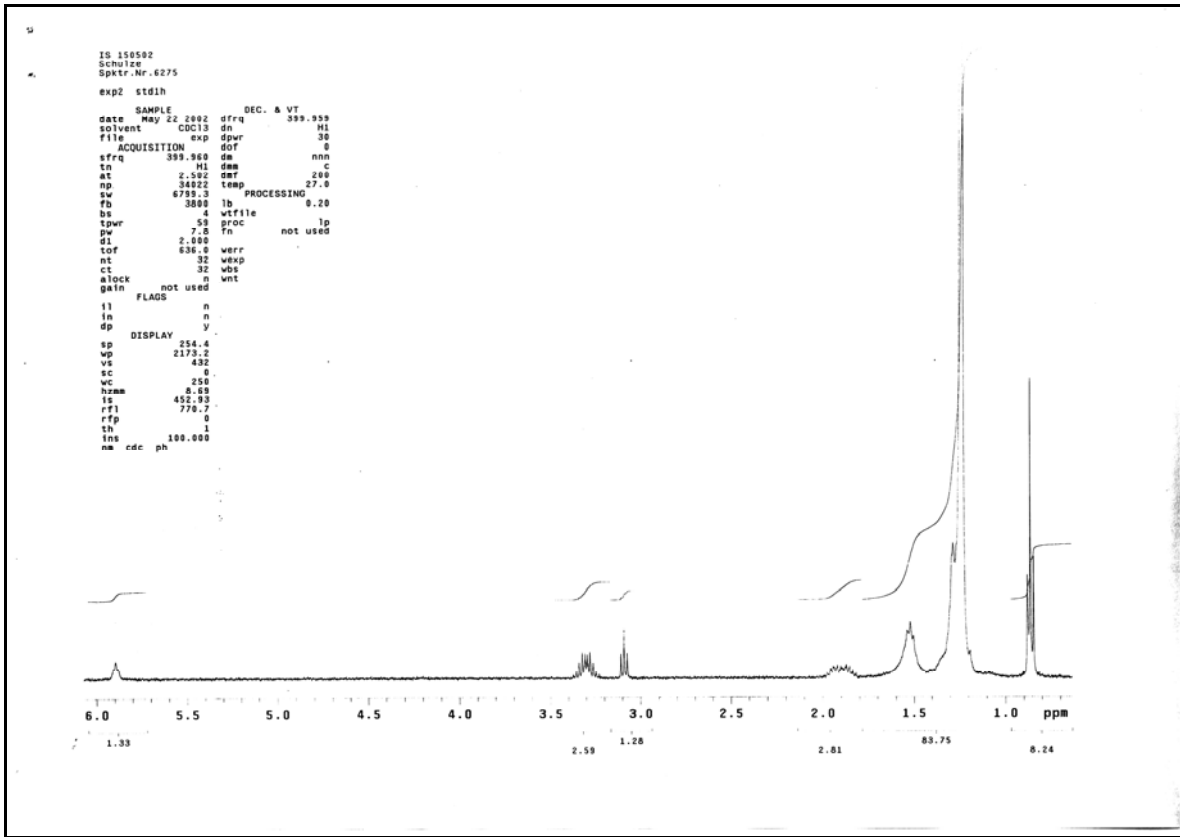
Halle, Januar 2006

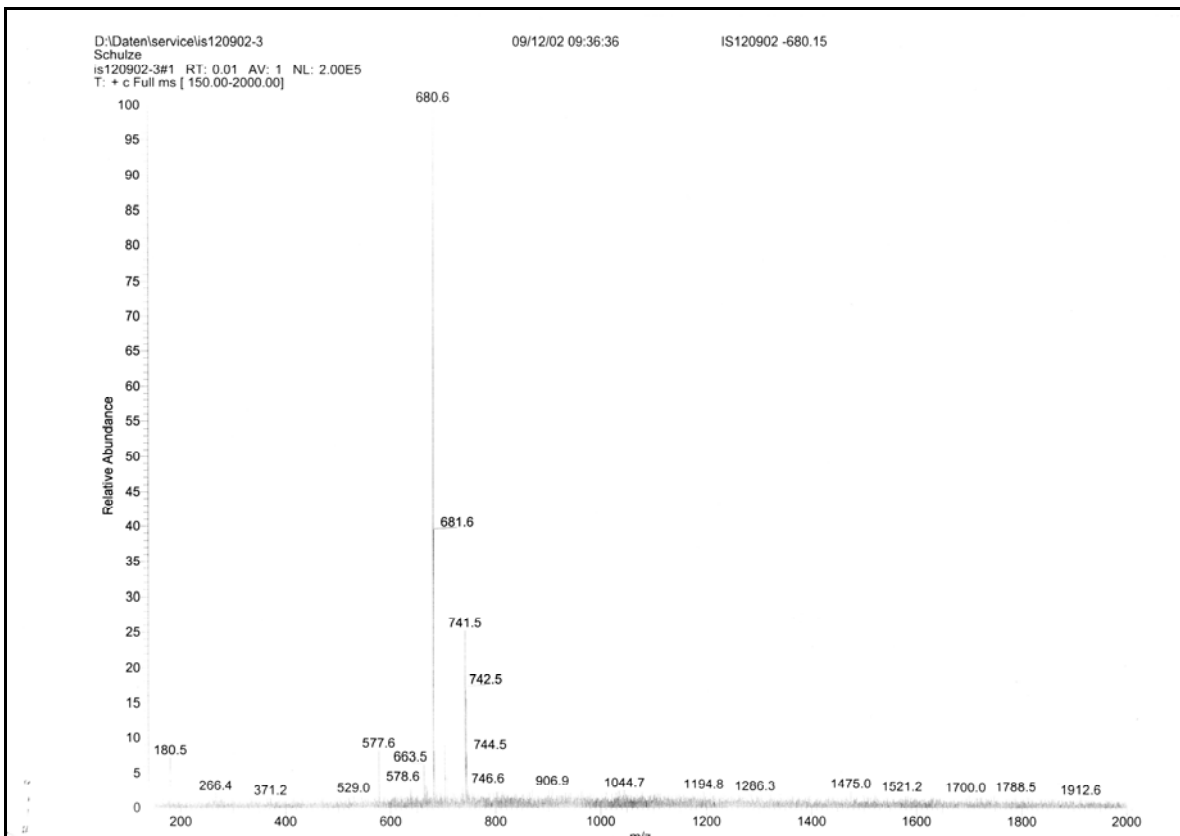
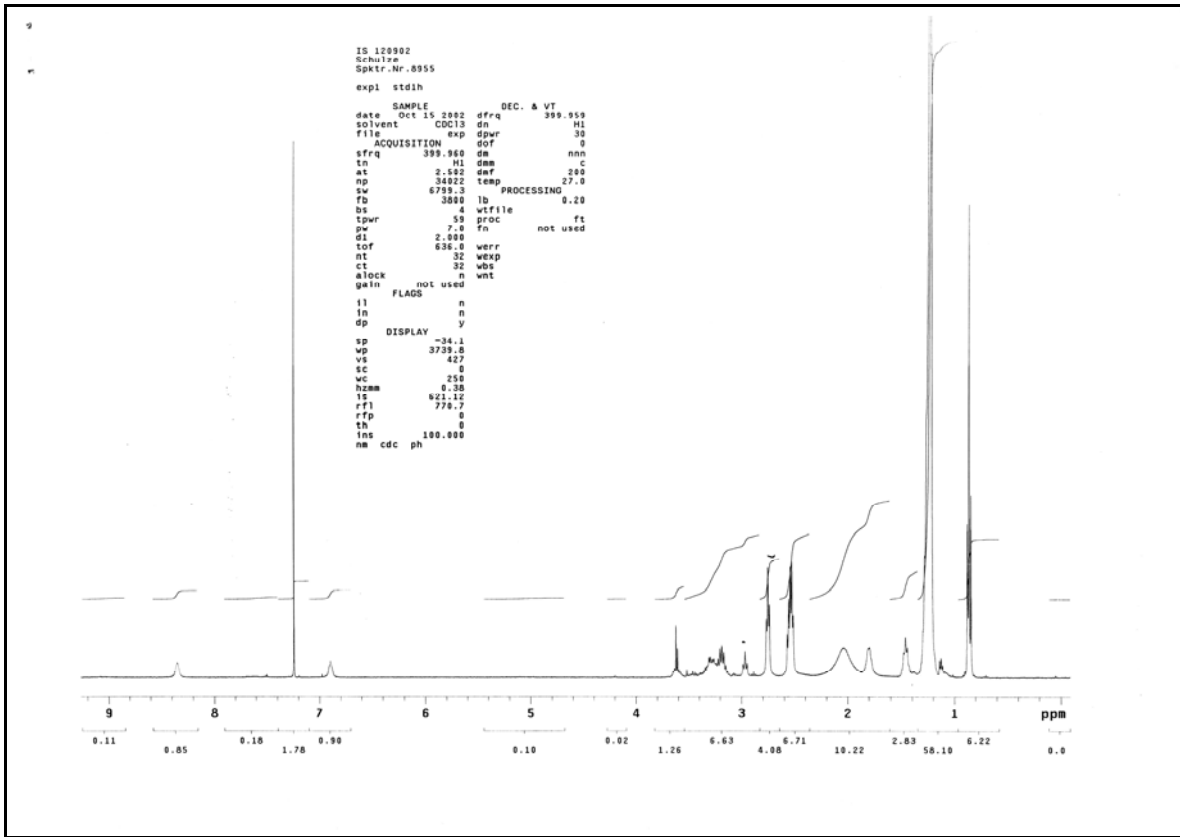
20. ^1H NMR-Spektren und ESI-Massenspektren ausgewählter Verbindungen

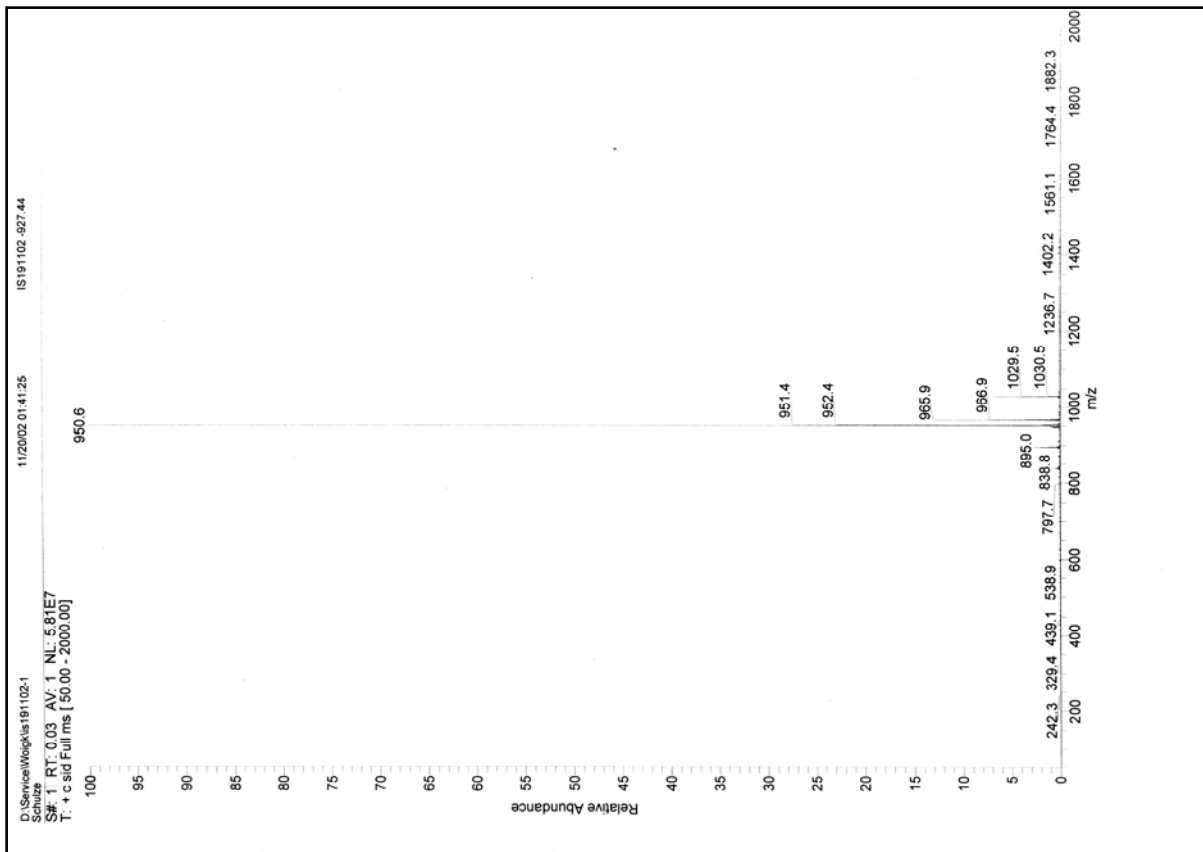
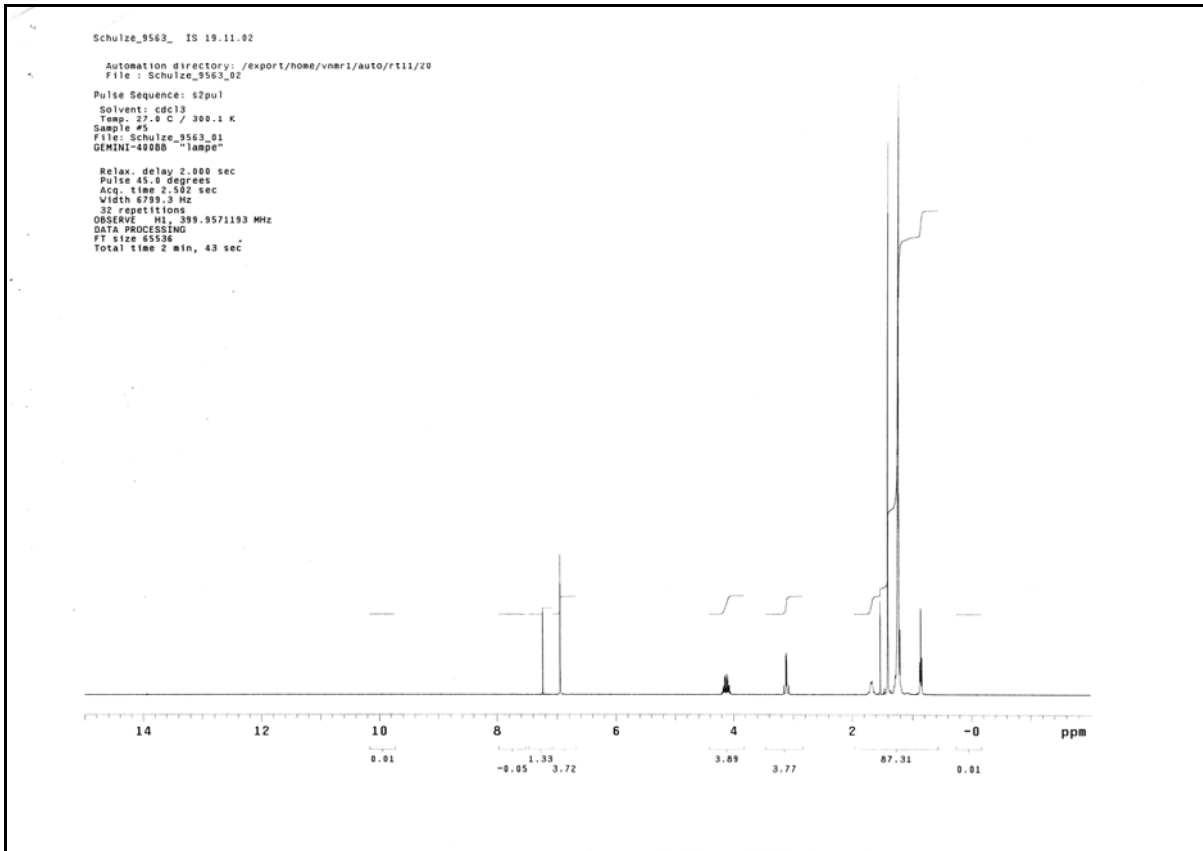
2-[(Hexadecylamino)carbonyl]-octadecansäureethylester (**8a**)

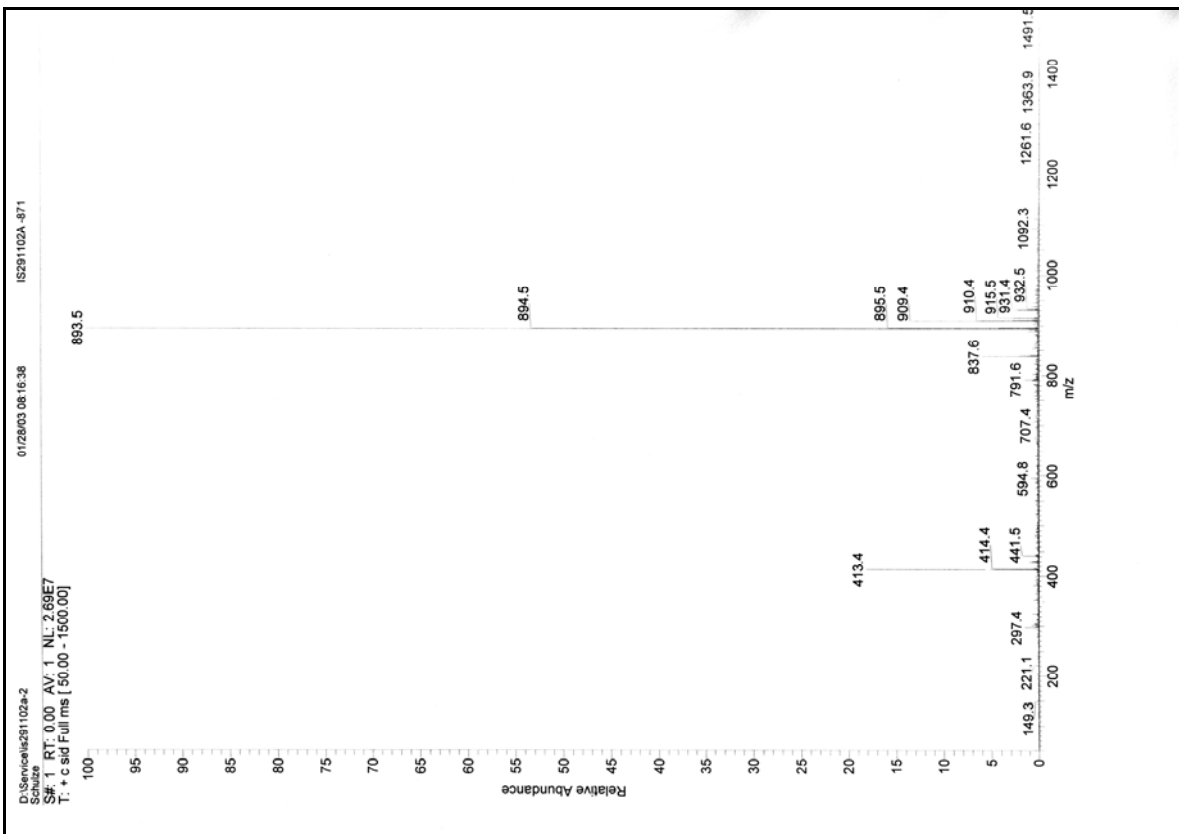
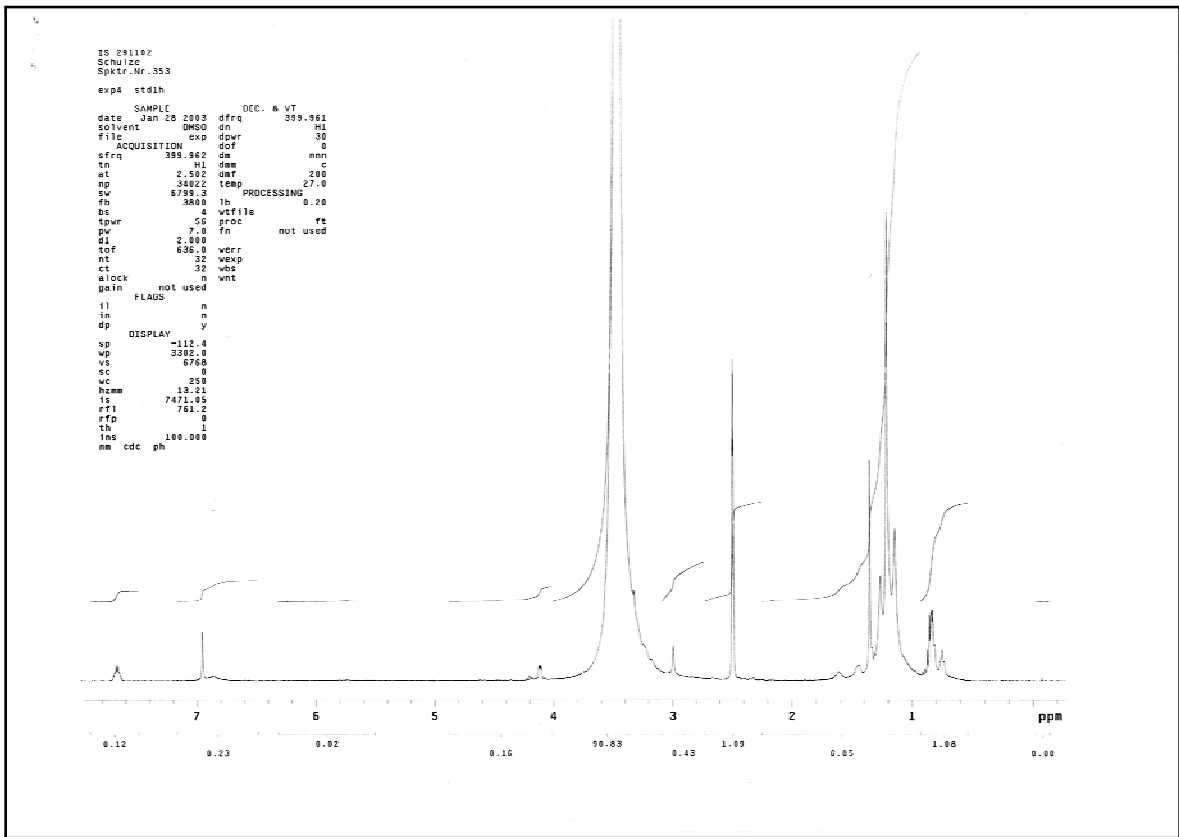


2-[(Hexadecylamino)carbonyl]-octadecansäure (9a)

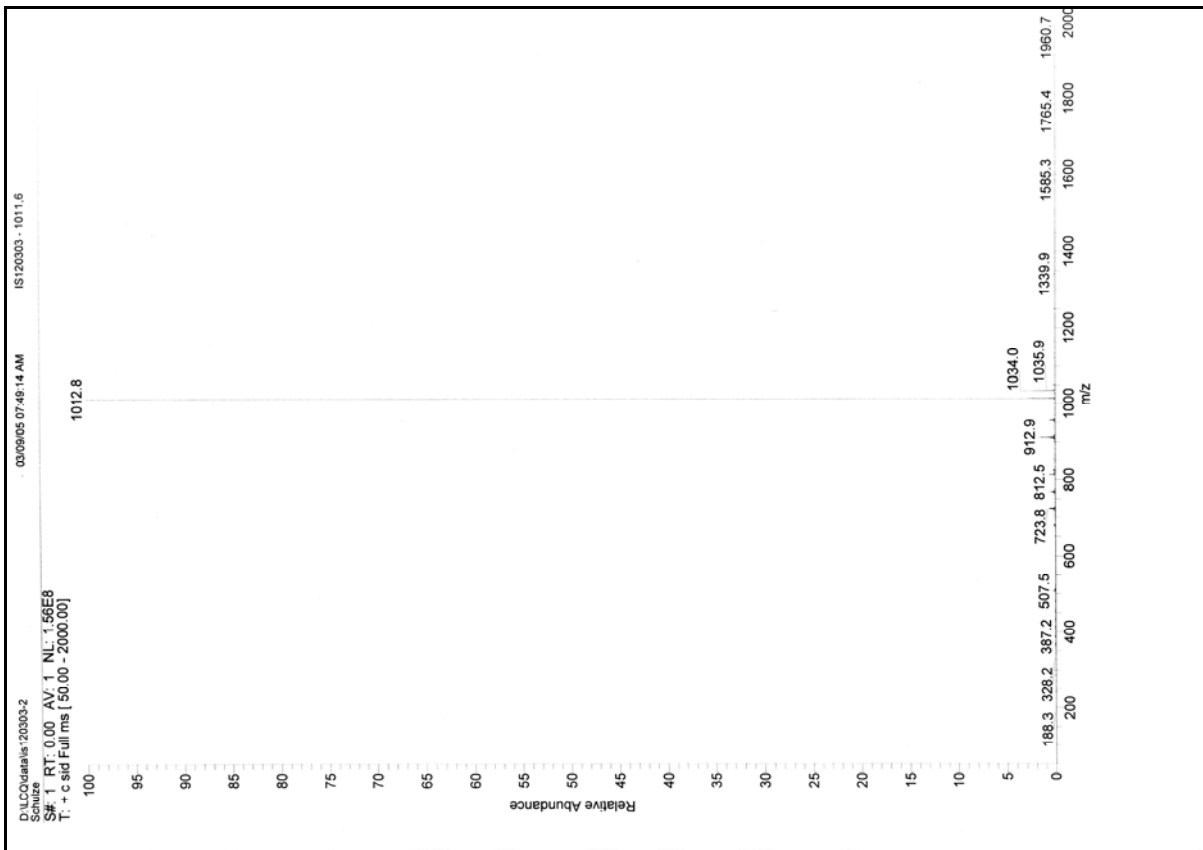
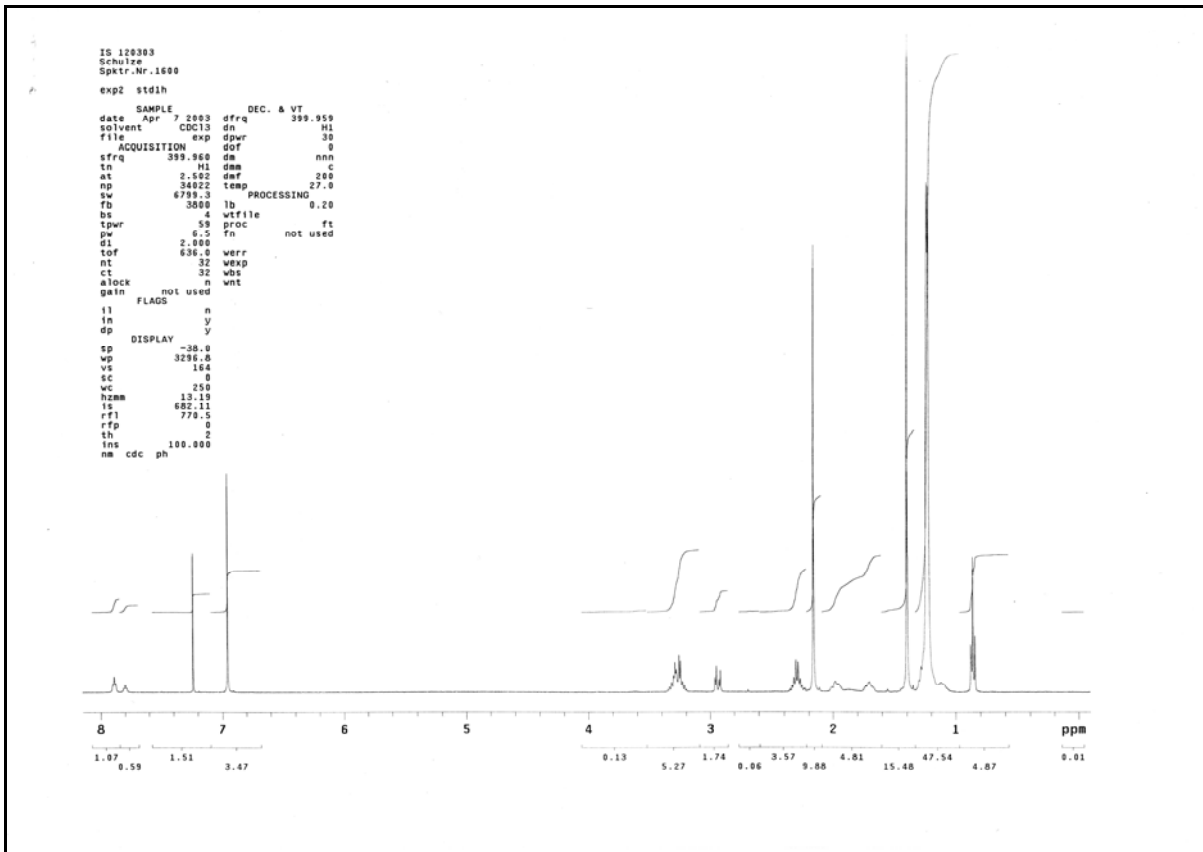


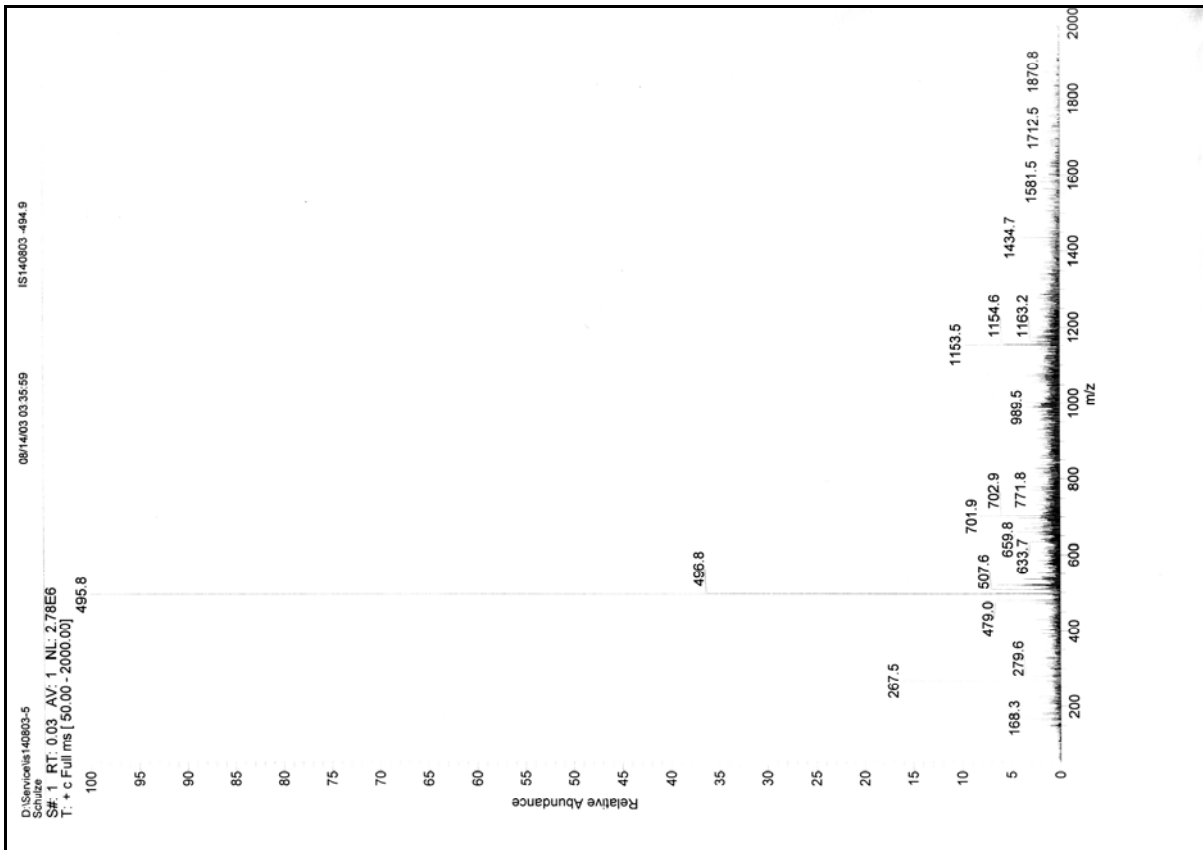
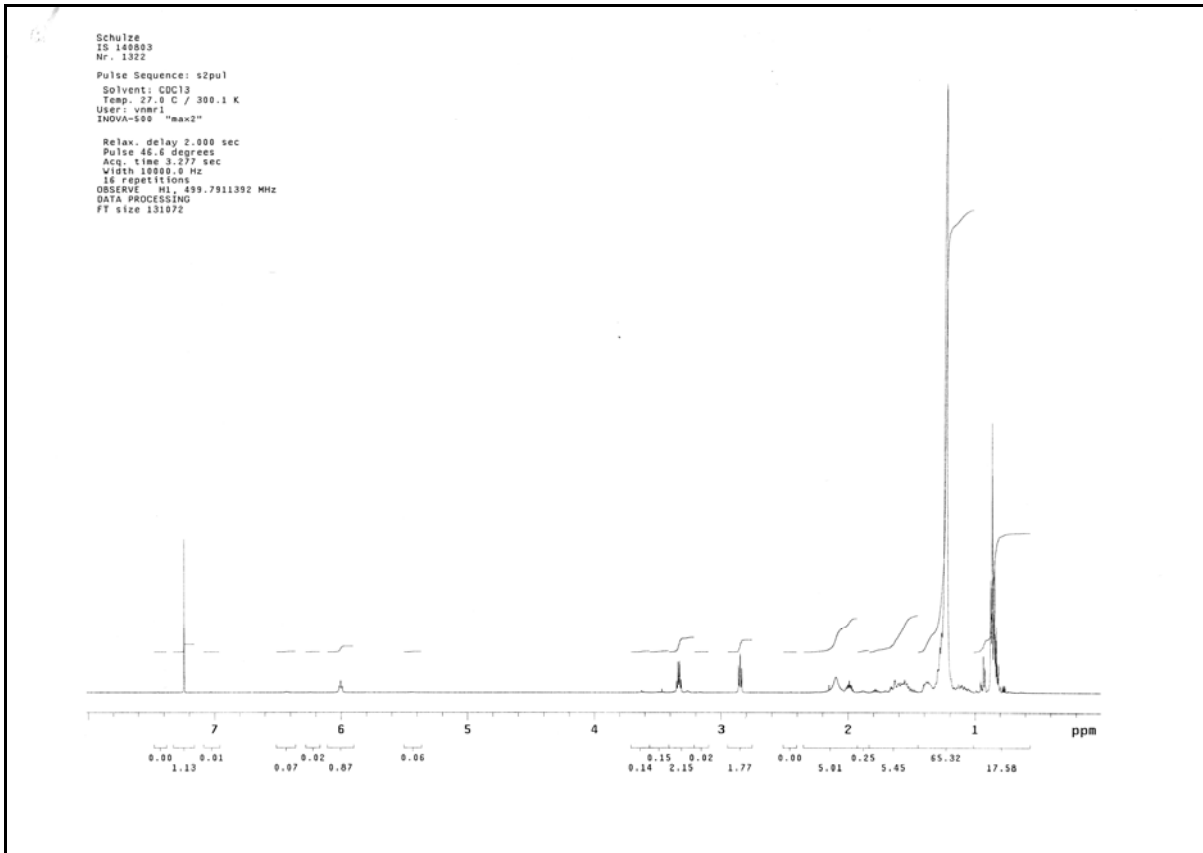
N-{2-[Bis(2aminoethyl)amino]ethyl}-N'-2-dihexadecylpropandiamid (**15c**)

2,2'-Bis(etoxy-carbonyl)-2,2'-dihexadecyl-1,4-benzendipropansäure-bis-*tert*.butylester (**17b**)

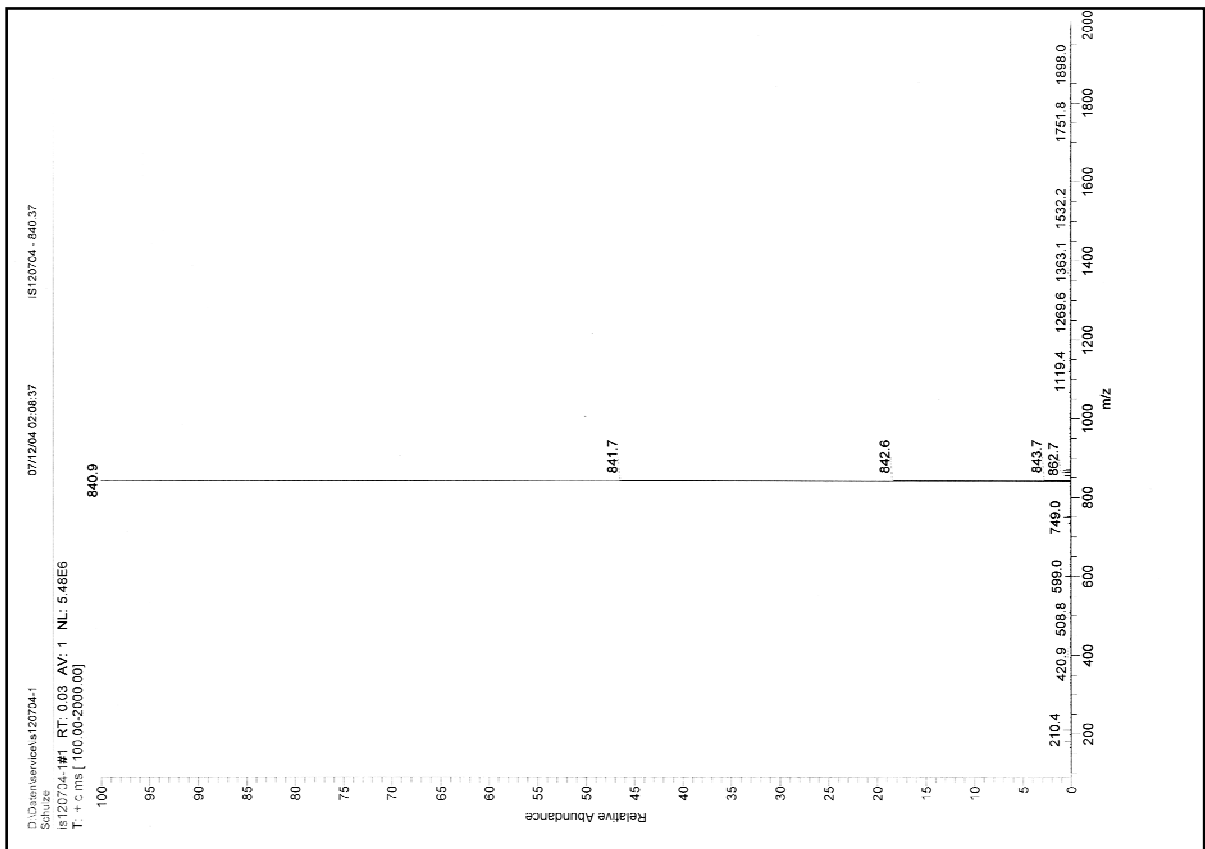
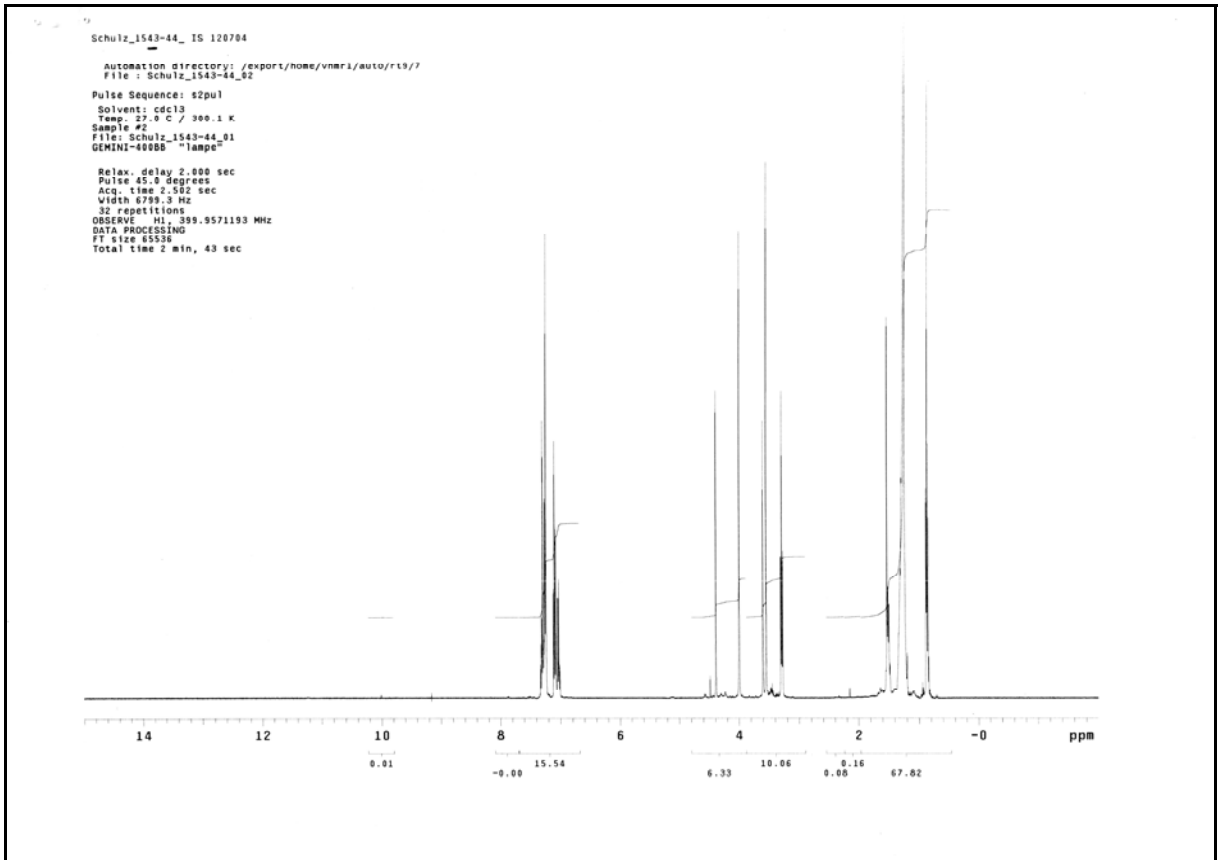
2,2'-Dicarboxy-2,2'-dihexadecyl-1,4-benzendipropansäure-bis-*tert*.butylester (**22b**)

2,2'-Bis([2-(dimethylamino)ethyl]amino)carbonyl)-2,2'-dihexadecylbenzen-1,4-dipropansäure-bis-*tert*.butylester (**23**)

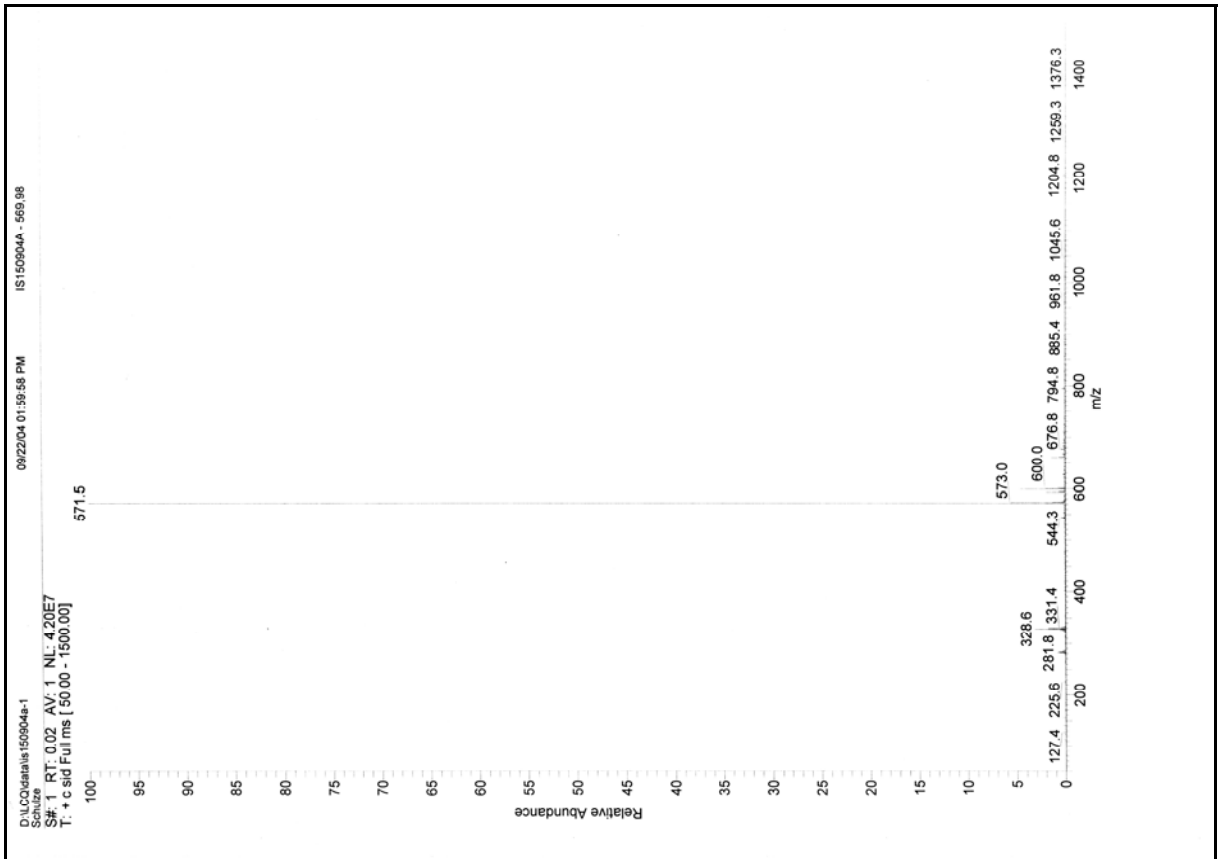
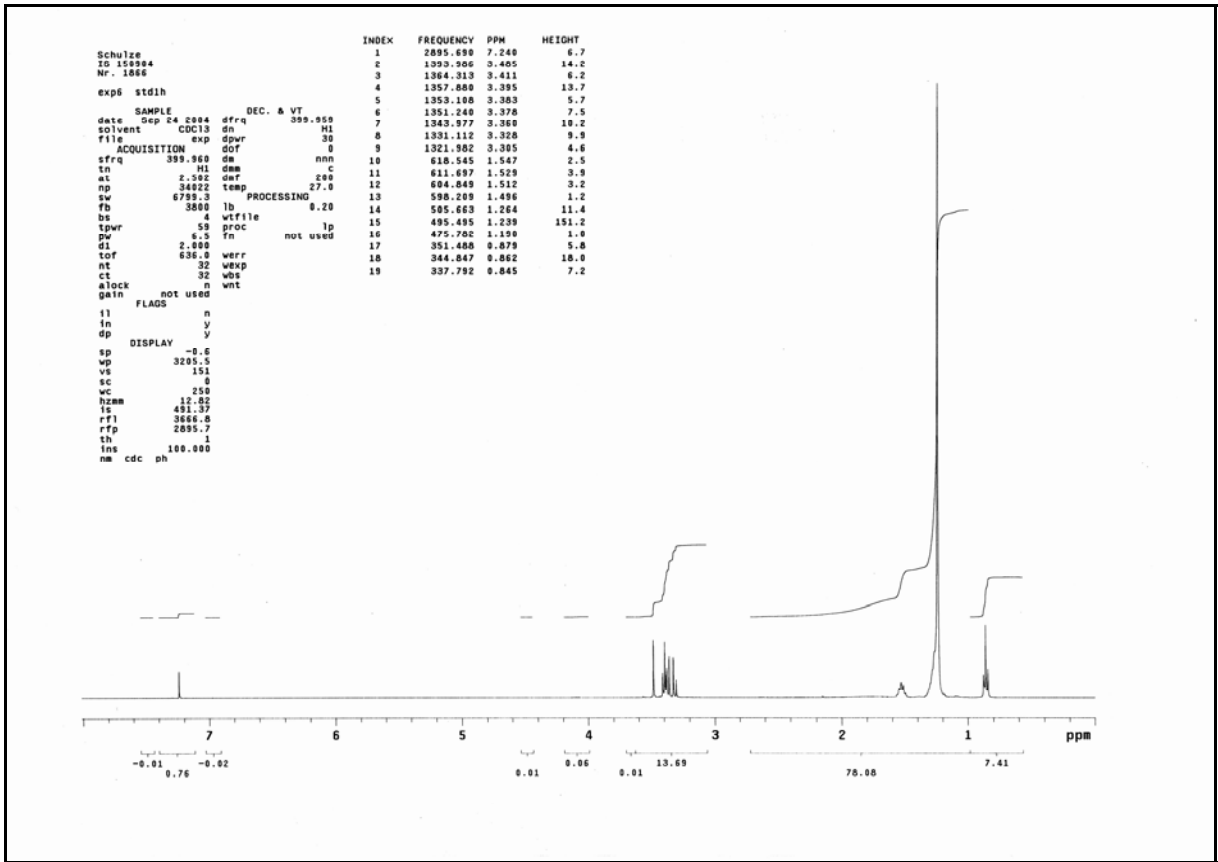


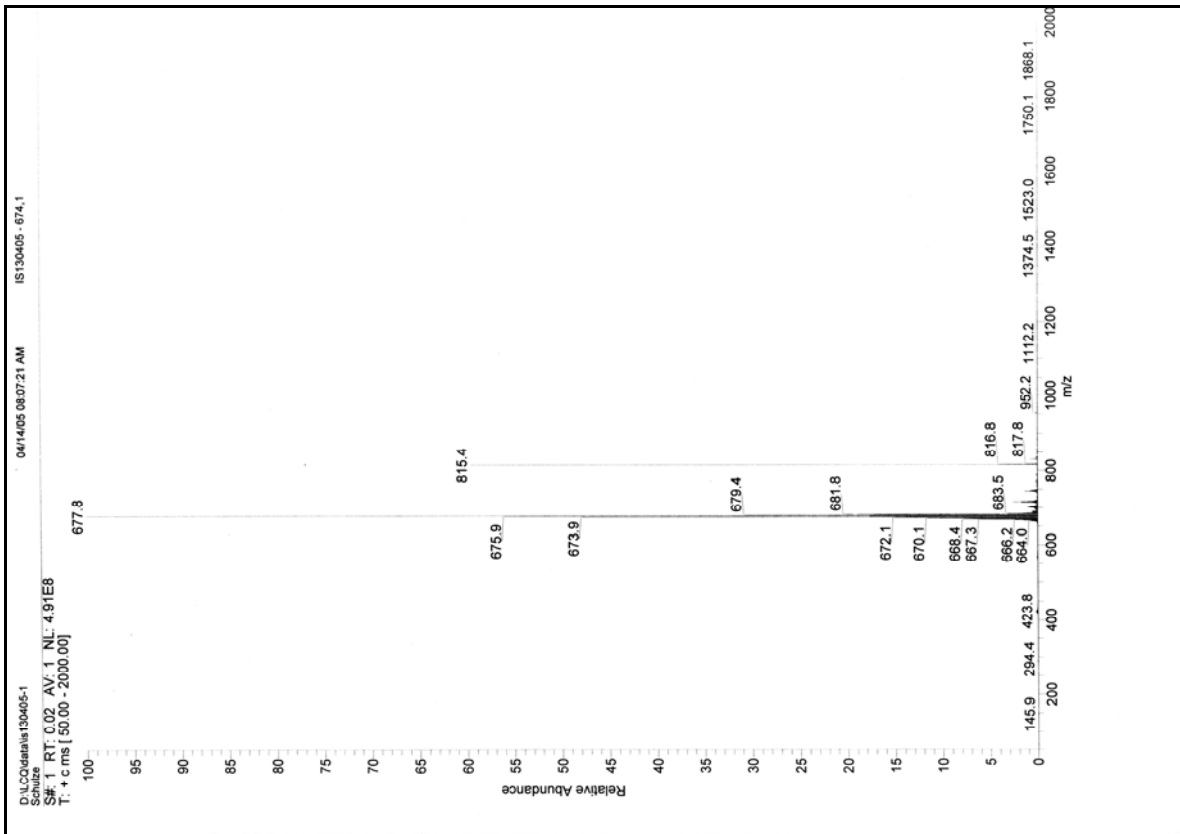
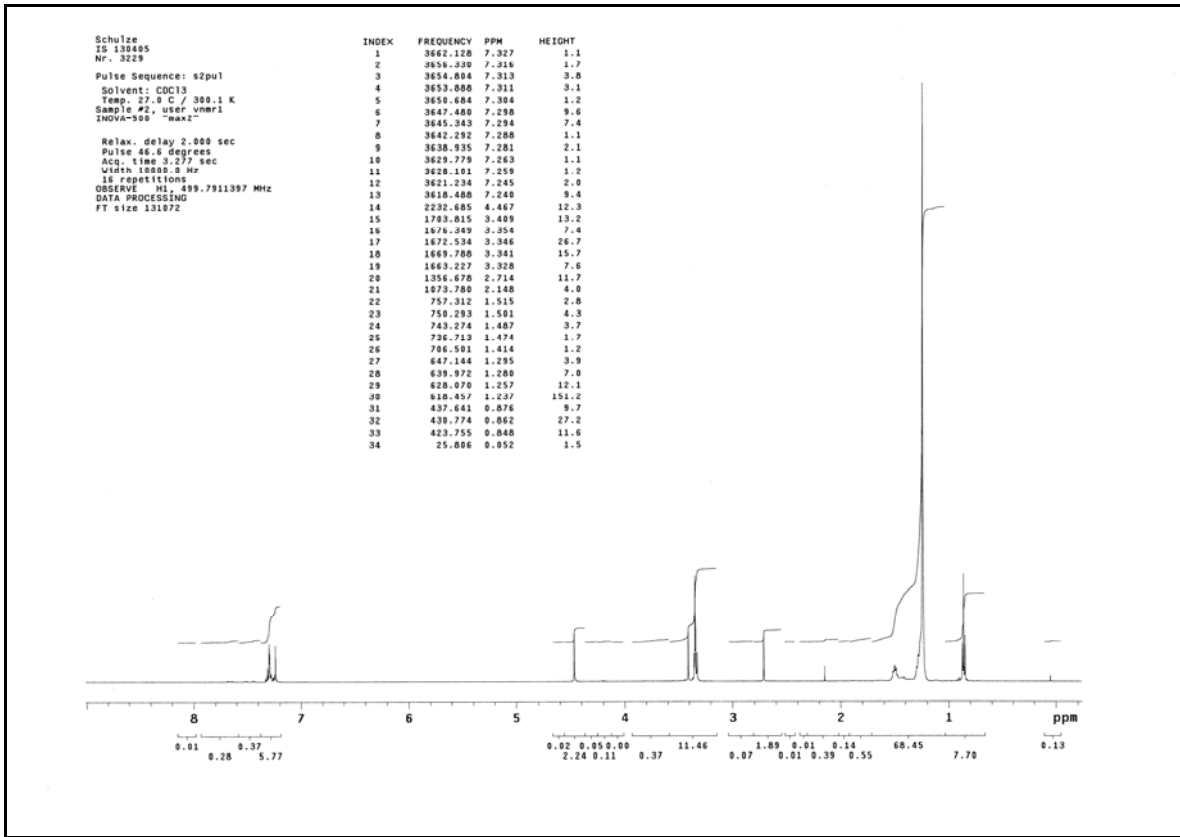
2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminethyl)amid (**28b**)

2-Benzyloxymethyl-2'-di-benzylamino-propan-1,3-bis-hexadecylether (45)



2-Amino-3-hexadecyloxy-2-[(hexadecyloxy)methyl]-1-propanol (46)



3-(Hexadecyloxy)-2-[(hexadecyloxy)methyl]-2-[(benzyloxy)methyl]-1-propanamin (**61**)

2,2-Dipentadecyl-1,3-dioxolan-4-methylamin (66)

