

Synthese und Struktur-Wirkungs-Beziehung von Brunsvicamid-Analoga

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von
Diplom-Chemiker
Thilo Walther
aus Hannover

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Hiersemann**

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund in der Zeit von Oktober 2004 bis Mai 2009 angefertigt.

**Meiner Familie
und
meinen Freunden**

**Man muß viel gelernt haben, um über das,
was man nicht weiß, fragen zu können.**

Jean-Jacques Rousseau

1	Einleitung	8
1.1	Notwendigkeit neuer Wirkstoffe	8
1.2	Naturstoffe als Leitstrukturen	9
2	Allgemeiner Teil	11
2.1	Sekundärmetabolite aus Cyanobakterien	11
2.2	Beispiele von cyanobakteriellen Sekundärmetaboliten	12
2.3	Anabaenopeptine und anabaenopeptinartige Naturstoffe	14
2.4	Brunsvicamide	20
2.5	Anabaenopeptin-Synthesen	22
2.6	Biologische Angriffspunkte der Brunsvicamide	27
2.6.1	Carboxypeptidasen	27
2.6.2	Phosphatasen	31
3	Motivation und Ziel der Arbeit	34
4	Spezieller Teil	36
4.1	Synthese	36
4.1.1	Retrosynthetische Analyse	36
4.1.2	Strategische Möglichkeiten	36
4.1.3	Synthesestrategie	40
4.1.4	Auswahl synthetischer Äquivalente für die Harnstoffsynthese	41
4.1.5	Auswahl der Ankergruppe und des polymeren Trägers	42
4.1.6	Erläuterung zu unterschiedlicher Stereochemie	44
4.1.7	Darstellung der Bausteine für die Harnstoffsynthese	44
4.1.8	Harnstoffsynthese in Lösung	45
4.1.9	Beladung des Harzes mit Harnstoffbausteinen	46
4.1.10	Harnstoffsynthese an fester Phase	47
4.1.11	Darstellung der Zyklisierungsvorläufer	49
4.1.12	Makrolaktamisierung an fester Phase	52
4.1.13	Makrolaktamisierung in Lösung	55
4.1.14	Aufklärung der Stereochemie von Brunsvicamid A	56
4.1.15	Synthese von Brunsvicamid A Analoga	66
4.1.16	Synthese von 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat als Substrat für Phosphatase	69

4.2	Biochemische Untersuchungen.....	70
4.2.1	<i>In vitro</i> Inhibierung von MptpB.....	71
4.2.2	<i>In vitro</i> Inhibierung von Carboxypeptidase A und B	72
4.2.3	Ermittlung des Inhibitionsmechanismus des Brunsvicamid A.....	78
4.2.4	Struktur-Wirkungsbeziehung.....	80
4.2.5	Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung	83
4.2.6	Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung.....	84
4.3	Berechnung von Konformationen und Bindungsmodi.....	85
5	Zusammenfassung	90
6	Experimenteller Teil	97
6.1	Geräte und Hilfsmittel	97
6.2	Versuche zu Kapitel 4.1.7	100
6.3	Versuche zu Kapitel 4.1.8	106
6.4	Allgemeine Vorschriften zur Synthese am festen Träger	119
6.5	Versuche zu Kapitel 4.1.12	123
6.6	Versuche zu Kapitel 4.1.13	156
6.7	Versuche zu Kapitel 4.1.16	158
6.8	Versuche zu Kapitel 4.2	164
6.9	Versuche zu Kapitel 4.3	168
7	Literaturverzeichnis	170
8	Abkürzungsverzeichnis.....	178
9	Anhang.....	182

1 Einleitung

1.1 Notwendigkeit neuer Wirkstoffe

In den letzten 140 Jahren hat sich die Lebenserwartung in Deutschland von knapp 40 auf 80 Jahre verdoppelt (siehe Abbildung 1).¹ Der rasante Anstieg bis zur Mitte des vorherigen Jahrhunderts ist zunächst auch der allgemeinen Verbesserung der Lebensumstände breiter Bevölkerungsgruppen zuzuschreiben aber besonders der kontinuierliche Anstieg in der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts ist dem medizinischen Fortschritt zu verdanken.² Mit der Entdeckung und Entwicklung immer neuer Arzneimittel haben die Naturwissenschaften hierzu einen entscheidenden Beitrag geleistet.

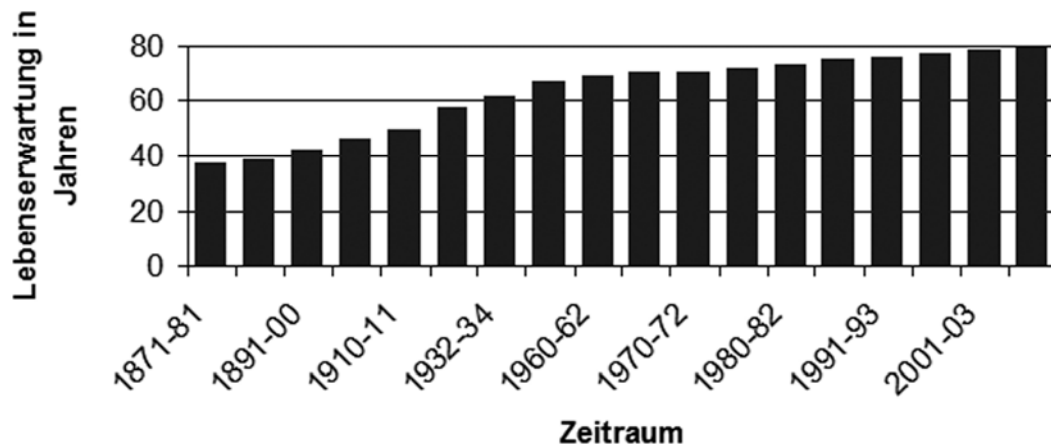


Abbildung 1 Entwicklung der durchschnittlichen Lebenserwartung in Deutschland von 1871 bis 2007.

Durch die Entwicklung von Antibiotika³ und Impfstoffen⁴ wurde vielen vorher oft tödlichen Krankheiten ihr Schrecken genommen. Dennoch sind auch heute noch viele Erkrankungen nur schlecht therapierbar, oder maßgeschneiderte Wirkstoffe müssen erst noch entwickelt werden.

So zieht der Einsatz von Antibiotika zwangsläufig die Entstehung resistenter Bakterienstämme nach sich.⁵ Veränderungen der Arbeits- und Lebensbedingungen bzw. Ernährungsgewohnheiten führten zur Ausbreitung von „Zivilisationskrankheiten“ wie Herzkreislaufbeschwerden, Übergewicht und Diabetes, die mit fortschreitender Industrialisierung immer weiter um sich greifen. Aufgrund der steigenden

Lebenserwartung sieht sich die Wirkstoffforschung mit den gesundheitlichen Problemen einer immer älter werdenden Bevölkerung konfrontiert, wie z.B. Krebs,^{6, 7} der Alzheimerschen⁸ und der Parkinsonschen Krankheit⁹. Trotz allen medizinischen Fortschritts können diese Krankheiten bisher nicht geheilt werden. Dabei sollte nicht vergessen werden, dass Infektionskrankheiten noch immer eine tödliche Bedrohung darstellen nicht nur in der dritten Welt. Besonders gefährlich sind z.B. die in Afrika immer weiter um sich greifenden Koinfektionen von HI-Viren mit multiresistenten Tuberkulosebakterien.¹⁰ Weiterhin kann sich in einer globalisierten Welt durch Migration, Handel und Reisen jede Art von Epidemie in einem nie gekannten Ausmaß und innerhalb kürzester Zeit ausbreiten.¹¹ Es besteht zudem die Möglichkeit, dass sich durch die globale Erwärmung der Lebensraum von Organismen wie der Anopheles Mücke verschiebt, dem Zwischenwirt des Malariaerregers.¹² In Europa würden sich dann ehemals „tropische“ Krankheiten ausbreiten können, wie Malaria, an der heute in Afrika jährlich 500 Millionen Menschen erkranken und ein bis drei Millionen Menschen zum Opfer fallen.¹³

Um dieser Herausforderung zu begegnen ist es nach wie vor notwendig, neue Medikamente bzw. Wirkstoffe zu entwickeln. Dafür ist die Identifizierung neuer Leitstrukturen eine entscheidende Voraussetzung.

1.2 *Naturstoffe als Leitstrukturen*

Leitstrukturen weisen bereits wesentliche Eigenschaften eines späteren Wirkstoffs auf: Aktivität, Selektivität und eine Struktur-Wirkungsbeziehung. Sie sind weithin charakterisiert durch eine potenzielle orale Verfügbarkeit und das Fehlen von reaktiven Gruppen und Toxizität.

Zu Beginn der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts stellten viele der forschenden Pharmaunternehmen ihre bis dahin auf Naturstoffe ausgerichteten Entwicklungsprogramme um. Der neue Ansatz, mittels semiautomatischer Verfahren und kombinatorischer Festphasenchemie kleine Moleküle in einer bis dahin nicht gekannten Zahl darzustellen versprach viele Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneimittel hervorzubringen.¹⁴

Es stellte sich jedoch bald heraus, dass der gewählte Ansatz die anfänglich gehegten Erwartungen nicht erfüllen konnte. Die Synthese immer größerer Substanzsammlungen allein war offenbar nicht ausreichend.¹⁵ Vielmehr erwiesen sich vor allem die biologische Relevanz aber auch die Diversität einer Substanzsammlung als ausschlaggebend.¹⁶

Naturstoffe sind durch die Evolution über Millionen von Jahren ausgewählte biologisch aktive Moleküle. Oft ermöglichen erst die Wechselwirkungen mit ihren spezifischen Zielproteinen in anderen Organismen das Überleben der den Naturstoff produzierenden Tiere, Pflanzen oder Kleinstlebewesen. Diese für Wachstum und Fortpflanzung nicht essentiellen Naturstoffe werden als Sekundärmetabolite bezeichnet. Aufgrund der Fähigkeit an Proteine zu binden und damit biologische Prozesse zu beeinflussen, weisen Naturstoffe eine hohe sogenannte biologische Relevanz auf.¹⁷ Die Grundgerüste von Naturstoffen können deshalb als privilegierte Strukturen betrachtet werden.¹⁸ Nach detaillierten Vergleichen der Eigenschaften von Molekülen aus großen kombinatorischen Substanzbibliotheken und Naturstoffen,^{19, 20} nehmen letztere folgerichtig wieder einen wichtigen Platz in der akademischen, industriellen und klinischen Forschung ein.^{21, 22} Der wohl erste chemisch reine und kommerziell erhältliche Naturstoff Morphin oder das erste auf einem Naturstoff basierende Arzneimittel Aspirin dienten lediglich zur Behandlung von Symptomen.²³ Heute dienen Naturstoffe nicht nur als Leitstrukturen für die Darstellung fokussierter Substanzbibliotheken²⁴ sondern auch zur Untersuchung biologischer Prozesse auf molekularer Ebene.^{25, 26}

2 Allgemeiner Teil

2.1 Sekundärmetabolite aus Cyanobakterien

Naturstoffe, die von Tieren, Pflanzen oder Mikroorganismen produziert werden und für deren Wachstum oder Fortpflanzung nicht essentiell sind, werden als Sekundärmetabolite bezeichnet. Für viele Sekundärmetabolite ist ihr Nutzen für den Produzenten nicht geklärt, und möglicherweise sind einige nur ein Überbleibsel eines Evolutionsprozesses. Im Allgemeinen gilt jedoch, dass die produzierenden Organismen durch die Sekundärmetabolite einen Selektionsvorteil genießen und ihre ökologische Nische leichter verteidigen können.²⁷ Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Aktivität sind sie von außerordentlichem wissenschaftlichem Interesse.

Die Cyanobakterien gehören phylogenetisch zu den prokaryotischen Bakterien. Es existieren ca. 2000 Arten, die alle zur Photosynthese befähigt sind. Sie kommen in Form von Einzellern, lockeren Zellaggregaten oder fadenförmigen Zellverbänden vor. Cyanobakterien zählen zu den ältesten Lebensformen überhaupt und existieren auf der Erde bereits seit 3.5 Milliarden Jahren, damit sind sie ungleich älter als jede Form von höheren Lebewesen.²⁸ Besonders bemerkenswert ist die Vielzahl der Ökosysteme in denen Cyanobakterien vorkommen. Sie bilden riesige Kolonien auf blanken Felsen, existieren in vulkanischer Asche und Wüstensand, heißen Quellen oder arktischen Seen. Manche Arten kommen in der Erde vor, jedoch gedeihen die meisten Cyanobakterien in Frisch-, Salz- oder Brackwasser.^{29, 30}

Im Laufe ihrer Existenz von ca. 3.5 Milliarden Jahren haben sie sich an teilweise extreme Lebensbedingungen und -umgebungen angepasst. Es verwundert daher nicht, dass sich in Cyanobakterien ein breites Spektrum an Sekundärmetaboliten findet. Die cyanobakteriellen Sekundärmetabolite (CSM) weisen häufig ungewöhnliche Strukturmerkmale und unterschiedlichste Bioaktivitäten auf.^{31, 32} Viele der CSMs sind toxisch für Eukaryoten, Pilze und Viren oder wirken antibakteriell und enzyminhibierend.^{33, 34, 35} Unter den charakterisierten Substanzklassen aus Cyanobakterien sind die Peptide die mit Abstand häufigsten Vertreter. Danach folgen Alkaloide und Polyketide.³⁶

2.2 Beispiele von cyanobakteriellen Sekundärmetaboliten

Im folgenden Abschnitt sollen einige cyanobakterielle Sekundärmetabolite vorgestellt werden: Microcystin LR (**1**, Abbildung 2) ist ein verzweigter Makrozyklus, wobei der 25-gliedrige Ring aus der nichtribosomalen Peptidsynthese hervorgeht, während die dekorierende Seitenkette vorab durch die Polyketidsynthasen dargestellt wird. Interessant ist der Ringschluss über die Seitenketten der Glutaminsäure und die ungewöhnliche Aminosäuren Adda (3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeka-4,6-diensäure), sowie D-iso-Glutamat, und D-erythro- β -methyl-iso-Aspartat, welche in allen Microcystinen vorkommen. Microcystine sind Hepatotoxine und werden über den Gallensäure-Transporter in Leberzellen eingeschleust. Die toxische Wirkung wird durch irreversible Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2A hervorgerufen. Bisher wurden mehr als 60 Strukturvarianten der Microcystine beschrieben.³⁷

Zwei Beispiele für Neurotoxine aus marinen Cyanobakterien sind das spannungsgesteuerte Natriumkanäle (NaV-Kanäle)^{38, 39} blockierende Jamaicamid A (**2**) und das NaV-Kanäle aktivierende Antillatoxin (**3**). Jamaicamid A (**2**) ist ein hochfunktionalisiertes lineares Lipopeptid aus marinen Cyanobakterien. Mit einem Alkynylbromid, einem Vinylchlorid und einem 3-Methoxy-enon weist es gleich drei für Naturstoffe ungewöhnliche Struktur motive auf. Die für die Biosynthese verantwortlichen Gene wurden identifiziert und ein Mechanismus für eine gemischte Polyketid-Peptid-Synthese vorgeschlagen.⁴⁰ Antillatoxin (ATX, **3**) ist ein zyklisch verzweigtes Lipopeptid aus Cyanobakterien marinen Ursprungs.⁴¹ Da der 15-gliedrige Ring eine Esterbindung enthält handelt es sich um ein Depsipeptid. Bemerkenswert sind der hohe Anteil an ungesättigten Bindungen und der hohe Methylierungsgrad des Polyketidteils. Die Aufklärung seiner korrekten Stereochemie erfolgte durch Totalsynthese.⁴²

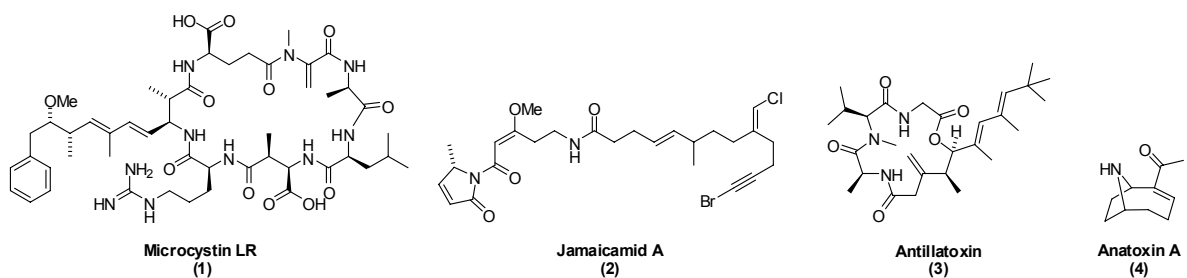


Abbildung 2 Toxische Sekundärmetabolite aus Cyanobakterien.

Neben den Peptiden und Polyketiden stellen die Alkaloide eine wichtige Gruppe der cyanobakteriellen Sekundärmetabolite. Das Anatoxin-A (ANTX-A, **4**) ist ein bizyklisches Amin, das als Agonist des Acetylcholins wirkt. Da es eine höhere Affinität zu dem postsynaptischen Acetylcholinrezeptor hat als Acetylcholin und zusätzlich nur sehr langsam wieder freigesetzt wird, wirkt es als starkes Neurotoxin und wurde früher als „very fast death factor“ bezeichnet.^{43, 44} Bei den angeführten Toxinen wie bei toxinbildenden Cyanobakterien im Allgemeinen nimmt man an, dass die Toxine zur Abwehr von Fraßfeinden produziert werden.^{45, 46}

Viele Sekundärmetaboliten aus Cyanobakterien beeinflussen die Zytoskelettproteine Tubulin oder Aktin in eukaryotischen Zellen, sie sind damit als potentielle Chemotherapeutika gegen Krebs von Interesse.⁴⁷ Das Mikrotubuli zerstörende Dolastatin 10 (**5**, Abbildung 3) ist ein lineares, stark modifiziertes Pentapeptid, das aus einer gemischten nichtribosomalen Peptid-Polyketidsynthese hervorgeht. Ein synthetisches Analogon (**6**, TZT-1027 – Soblidotin) zeigte eine größere Antitumoraktivität als die in der klinischen Anwendung befindlichen Chemotherapeutika Paclitaxel und Vincristin. **5** und **6** befinden sich zurzeit in der klinischen Erprobung.⁴⁸

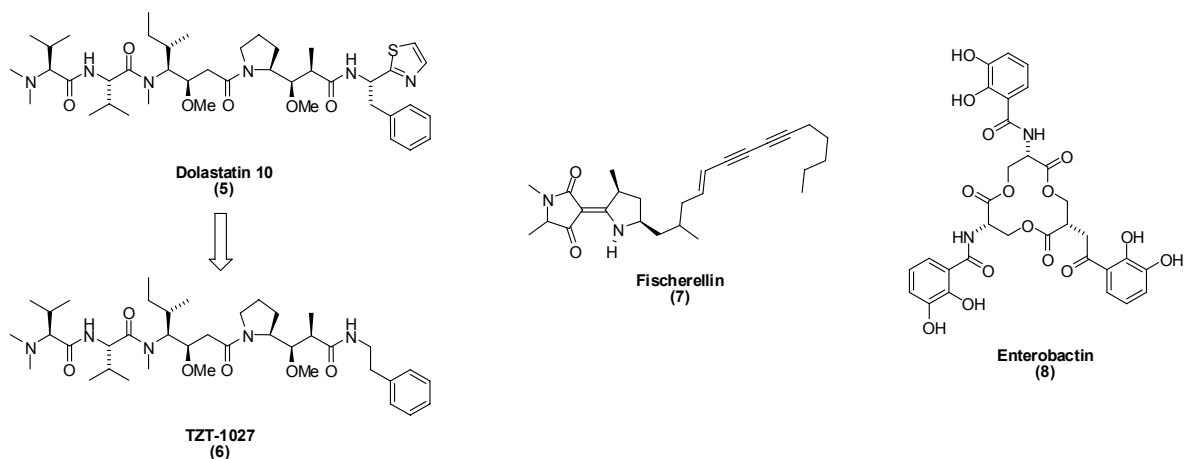


Abbildung 3 Sekundärmetabolite aus Cyanobakterien.

Fischerellin A (**7**) ist ein besonders interessanter CSM, da er gegen andere Cyanobakterien und photoautotrophe Organismen, wie z.B. Algen, gerichtet ist. Sowohl sein Grundgerüst, mit der Endinyneinheit und den zwei mit einer Doppelbindung verknüpften Heterozyklen, als auch seine inhibierende Wirkung auf

das Photosystem-II sind unter den cyanobakteriellen Sekundärmetaboliten einzigartig. Derartige die Photosynthese inhibierende Naturstoffe bergen das Potential zur Entwicklung biologisch vollständig abbaubarer Herbizide.⁴⁹

Eine weitere Interessante Funktion einiger cyanobakteriellen Sekundärmetaboliten besteht darin Metallkationen zu komplexieren.⁵⁰ Enterobactin (**8**) besteht aus jeweils drei L-Serin- und drei 2,3-Dihydroxybenzoesäureeinheiten. Der 12-gliedrige Ring mit den drei Esterbindungen und die sechs phenolischen Hydroxyfunktionen ermöglicht es **8** für den Stoffwechsel benötigte Eisenionen zu komplexieren und so auch bei niedrigen Eisenkonzentrationen in der Umgebung die Versorgung der Einzeller sicherzustellen.⁵¹ **8** ist weiterhin ein Beispiel für die häufig vorkommenden Verknüpfung von zwei oder drei identischen Grundeinheiten während der Biosynthese von cyanobakteriellen Sekundärmetaboliten, die dann ein symmetrisches Produkt liefert. Die Biosynthese von Chelatoren kann auch dem Schutz zu hohen Konzentrationen von Metallionen dienen. So ist z.B. Kupfer zwar ein essentielles Spurenelement, aber bei höheren Konzentrationen wirken Kupfersalze toxisch und werden deswegen als Algizide oder bei der übermäßigen Vermehrung von Cyanobakterien (fälschlicherweise oft als „Algenblüte“ bezeichnet) eingesetzt. Einige Cyanobakterien reagieren mit der Produktion von Microcystinen (Analoge zu **1**, Abbildung 2) um die Kupferionen durch Komplexbildung unschädlich zu machen.⁵²

Die in diesem Kapitel genannten Verbindungen können auch als Grundlage für die Synthese von fokussierten Substanzbibliotheken dienen, bei deren Darstellung noch zusätzliche Modifikationen eingebaut und so Wirkungsmechanismen aufgeklärt sowie teilweise noch potentere Verbindungen entdeckt werden können. Neben der Suche oder Kultivierung der Cyanobakterien und der Isolierung der neuen Sekundärmetabolite, stellt auch die Aufklärung der unbekanntesten Struktur eine Herausforderung da.

2.3 Anabaenopeptine und anabaenopeptinartige Naturstoffe

Die Bezeichnung Anabaenopeptine geht auf das Anabaenopeptin A (**9**, Abbildung 5) zurück, das im Jahr 1995 aus Cyanobakterien der Gattung *Anabaena* isoliert

wurde.⁵³ Heute sind insgesamt 69 Verbindungen bekannt die das gemeinsame charakterisierende Grundgerüst teilen (Abbildung 4).

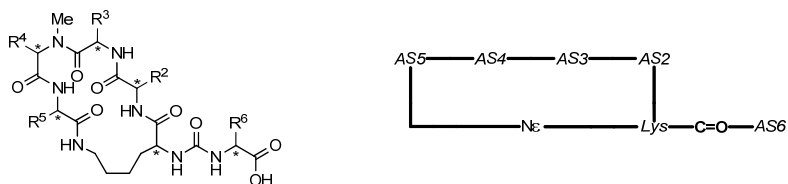


Abbildung 4 Zwei Darstellungen des Grundgerüsts der Anabaenopeptide und anabaenopeptinartigen Naturstoffe.

Bei den Anabaenopeptinen handelt es sich um zyklisch verzweigte homodetische Hexapeptide. Der 19 gliedrige Makrozyklus wird aus fünf Aminosäuren gebildet, wobei der Ringschluss durch die Verknüpfung der Aminosäure fünf (AS5) mit dem N ϵ des D-Lysins, also über die Seitenkette, erfolgt. Der azyklische Teil der Anabaenopeptide besteht aus der sechsten Aminosäure, die über einen Harnstoff und das N α des Lysins mit dem Makrozyklus verbunden ist. Die N-Methylierung der Aminosäure vier ist das dritte Kennzeichen der Anabaenopeptide.

In der Literatur wurden bis Anfang 2009 insgesamt 39 aus Cyanobakterien isolierte Naturstoffe sowie 20 synthetische Analoga beschrieben, deren Lysin jeweils eine *R*-Konfiguration aufweist. Zehn Verbindungen, die dasselbe Grundgerüst teilen (Anzahl der Aminosäuren, Ringgröße, N-Methylierung, Harnstoff, freie Säure) und deren Lysin aber eine *S*-Konfiguration aufweist, werden als anabaenopeptinartig bezeichnet. Sechs dieser anabaenopeptinartigen Verbindungen sind synthetischen Ursprungs, die anderen vier sind Naturstoffe, die nicht aus Cyanobakterien sondern aus Schwämmen stammen. Insgesamt gibt es damit 69 Anabaenopeptide und anabaenopeptinartige Strukturen, 43 davon sind Naturstoffe und 26 Verbindungen synthetischen Ursprungs.⁵⁴⁻⁶⁷

Anabaenopeptin A (**9**, Abbildung 5) wurde aus Cyanobakterien des Stamms *Anabaena flos-aquae* isoliert.⁵³ Es beinhaltet die nicht proteinogene Aminosäure *homo*-Tyrosin. Um eine oder mehrere CH₂-Einheiten verlängerte Versionen von *homo*-Aminosäuren kommen in den Anabaenopeptinen häufig vor. So zum Beispiel gleich dreimal im Pompanopeptin B (**10**), welches 2008 aus Cyanobakterien isoliert wurde und die bis dahin unbekannte Aminosäure N-Methyl-2-amino-6-(4'-

hydroxyphenyl)-hexansäure (NMe-A α) enthält. Weiterhin handelt es sich bei **10** um einen Trypsin-Inhibitor (IC_{50} 2.4 μ M).⁵⁶ Monzamid A (**11**) wurde 1997 aus einem Schwamm isoliert. Es ist nicht nur das erste Beispiel für einen anabaenopeptinartigen Naturstoff, sondern weist auch Aminosäuren mit seltener Stereochemie auf. Die Aminosäuresequenz von **11** enthält sowohl ein D-Valin, als auch ein besonders seltenes L-*allo*-Isoleucin.⁶⁵ Die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Naturstoffen aus Schwämmen und Sekundärmetaboliten von Mikroorganismen sind ein starkes Indiz dafür, dass der entsprechende Naturstoff auch in den Schwämmen tatsächlich durch symbiotisch lebende Bakterien synthetisiert wird.⁶⁶

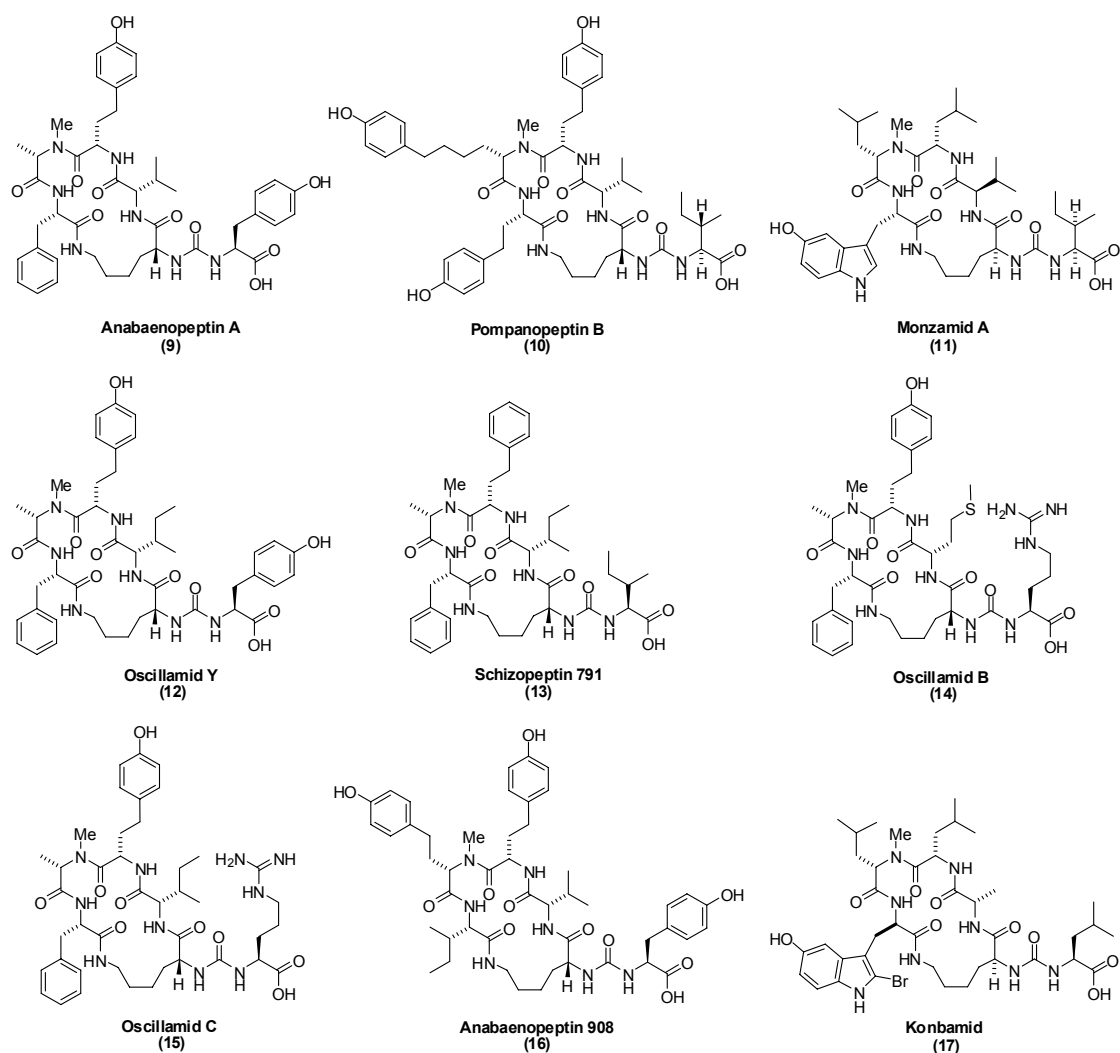


Abbildung 5 Ausgewählte Anabaenopeptide und anabaenopeptinartige Naturstoffe.

Das Oscillamid Y (**12**) wurde 1995 aus den Cyanobakterien *Oscillatoria agardhii* isoliert. Die Stereochemie des *homo*-Tyrosins und des *N*-Methylalanins konnten mit

den isolierten Mengen nicht bestimmt werden. Es wurde beschrieben, dass **12** bei einer Konzentration von 10 μM ein starker Chymotrypsininhibitor ist.⁶⁷ Die Synthese von vier Verbindungen zur Aufklärung der Konfiguration der beiden Stereozentren wird in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Interessanterweise zeigte das erhaltene synthetische Material keine inhibierende Wirkung auf Chymotrypsin.⁶⁸

Oscillamid B (**14**) und C (**15**) wurden als Serin- / Threoninproteinphosphatase (PP1 und PP2A) –Inhibitoren beschrieben.⁷² Die Unterschiede zwischen den beiden Verbindungen sind gering, bei **14** ist die Aminosäure zwei ein Methionin und bei **15** ein Isoleucin. Bei einer Konzentration von je 100 μM reduzierte **14** die Aktivität von PP1 um 43 und PP2A um 64 %, **15** um 97 bzw. 98 %. Es wurden jedoch weder IC_{50} -Werte bestimmt noch weitergehende Untersuchungen angestellt. Anabaenopeptin 908 (**16**) und 915 wurden 2008 entdeckt und sind die neusten Mitglieder der Verbindungsklasse.⁶⁹ Sie wirken weder als Trypsin- noch als Chymotrypsininhibitoren, jedoch ist **16** ein Carboxypeptidase A-Inhibitor. Das Konbamid (**17**) wurde aus Schwämmen isoliert und als Calmodulin Antagonist beschrieben. Die Stereochemie der sehr seltenen Aminosäure 2-Brom-5-hydroxytryptophan konnte nicht bestimmt werden.⁷⁰ Eine Synthese zur Bestimmung der korrekten Stereochemie wird in Kapitel 2.5.1 beschrieben.

Die Nomenklatur der cyanobakteriellen Sekundärmetabolite ist nicht konsistent, weil man aus mehreren gleichberechtigten Möglichkeiten zur Benennung einer neuen Verbindung gewählt hat.²⁷ So wurde die erste entdeckte Verbindung Anabaenopeptin A (**9**) aus Cyanobakterien der Gattung *Anabaena* isoliert und nach seiner Quelle Anabaenopeptin genannt, als erster Naturstoff wurde er mit dem Zusatz *A* versehen. Die folgenden Anabaenopeptine wurden mit den Zusätzen *B-J* versehen, während die letzten vier weniger systematisch mit *KT864*, *820*, *908* und *915* benannt wurden. Das Oscillamid Y (**12**) weist das exakt gleiche Grundgerüst wie die Anabaenopeptine auf, jedoch wurde hier als Namensgeber die Familie des Organismus *Oscillatoria agardhii* gewählt. Die Brunsvicamide wurden aus Cyanobakterien derselben Familie (*Oscillatoria*) isoliert, jedoch wurde hier als Namensgeber der Fundort des Organismus, Braunschweig, gewählt.

Die Aminosäuresequenzen, die Herkunft und die beschriebenen biologischen Aktivitäten der in Abbildung 5 gezeigten Verbindungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Weitere hier nicht näher diskutierte Anabaenopeptide und anabaenopeptinartigen Verbindungen finden sich in den Originalzitate.^{53-65, 71} Der größte Teil der genannten Publikationen beschreibt die Isolierung, Strukturaufklärung und teilweise die biologische Aktivität der entdeckten Naturstoffe. Die geringen isolierten Mengen machten mehrfach eine Strukturaufklärung durch Totalsynthese notwendig und erlaubten häufig lediglich Anfangsuntersuchungen der biologischen Aktivität, die teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen führten.

	Aminosäuresequenz						Herkunft	Biologische Aktivität
	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6		
9	D-Lys	L-Val	L-Htyr	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Tyr	Cyanobakterien, <i>Anabaena</i>	Keine Aktivität beschrieben
10	D-Lys	L-Val	L-Htyr	X ⁽¹⁾	L-Htyr	L-Ile	Cyanobakterien, <i>Lyngbya</i>	Trypsin-Inhibitor (IC ₅₀ 2.4 µM) ⁵³
11	L-Lys	D-Val	L-Leu	L-NMe-Leu	X ⁽²⁾	L-allo-Ile	Schwamm, <i>Theonella</i>	Es wurden keine für Enzymtests ausreichenden Mengen isoliert. ⁶⁵
12	D-Lys	L-Ile	L-Htyr	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Tyr	Cyanobakterien, <i>Oscillatoria</i>	Chymotrypsin-Inhibitor ⁶⁷ Kein Chymotrypsin-Inhibitor ⁶⁸
13	D-Lys	L-Ile	L-Hphe	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Ile	Cyanobakterien, <i>Schizothrix</i>	Kein Chymotrypsin-Inhibitor Trypsin-Inhibitor (IC ₅₀ 57 µM) ⁶⁰
14	D-Lys	L-Met	L-Htyr	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Tyr	Cyanobakterien, <i>Oscillatoria</i>	Serin- / Threoninproteinphosphatase (PP1 und PP2A)-Inhibitor ⁷²
15	D-Lys	L-Ile	L-Htyr	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Tyr	Cyanobakterien, <i>Oscillatoria</i>	Serin- / Threoninproteinphosphatase (PP1 und PP2A)-Inhibitor ⁷²
16	D-Lys	L-Val	L-Htyr	L-NMe-Htyr	L-Ile	L-Tyr	Cyanobakterien, <i>Oscillatoria</i>	Kein Trypsin- / Chymotrypsin-Inhibitor ⁶⁹ Carboxypeptidase A-Inhibitor (IC ₅₀ 130 nM)
17	L-Lys	X ⁽³⁾	L-Leu	L-Leu	L-Ala	L-Leu	Schwamm, <i>Theonella</i>	Bindet an die Calmodulin-aktivierte ⁷⁰ Phosphodiesterase (CalmodulinAntagonist).

(1) L-NMe-2-Amino-6-(4'-hydroxyphenyl)-hexansäure (L-NMe-Ahpha)
(2) L-5-Hydroxy-tryptophan
(3) 2-Brom-5-Hydroxy-Tryptophan

Tabelle 1 Aminosäuresequenz, Herkunft und biologische Aktivität ausgewählter Anabaenopeptide und anabaenopeptinartige Naturstoffe.

Die in den einzelnen Positionen des Grundgerüsts vorkommenden Aminosäuren sind in Abbildung 6 zusammengefasst. Hierfür wurden die Aminosäuresequenzen aller Anabaenopeptide und anabaenopeptinartigen Naturstoffe betrachtet. Aminosäuren, die ausschließlich in den anabaenopeptinartigen Naturstoffen vorkommen sind *kursiv* dargestellt. In der Position zwei überwiegen Aminosäuren mit

aliphatischen Seitenketten ganz eindeutig. *L-homo*-Tyrosin und *L*-Leucin kommen in der Position drei etwa gleich häufig vor. *L-homo*-Phenylalanin kommt lediglich in den beiden Nodulapeptinen vor. Die mit Abstand häufigste der *N*-methylierten Aminosäuren ist *L-N*-Methyl-Alanin, es folgt *L-N*-Methyl-*homo*-tyrosin und eine ganze Anzahl von *L-N*-Methyl-Tryptophanen bzw. funktionalisierten Tryptophanen. Die Aminosäuren an Position fünf weisen größtenteils aromatische Seitenketten auf.

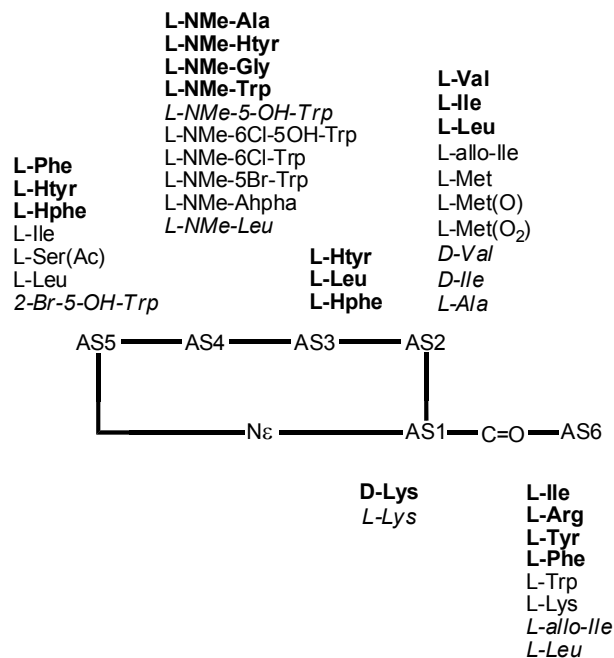


Abbildung 6 In den einzelnen Positionen des Grundgerüsts vorkommende Aminosäuren.

Aufgrund des häufigen Einbaus von *homo*-, *D*- und *allo*-Aminosäuren sowie halogenierter, *N*-methylierter und oxidierter Bausteine erscheint eine Biosynthese im Rahmen der nichtribosomalen Peptidsynthese durchaus denkbar. In der Tat erscheint eine nichtribosomale Biosynthese der Anabaenopetine wahrscheinlich,⁷² allerdings ist eine Festlegung darauf verfrüht da hierzu bisher keine detaillierten Untersuchungen durchgeführt wurden.^{73, 74}

2.4 Brunsvicamide

Die Brunsvicamide A (**18**), B (**19**) und C (**20**) (Abbildung 7) sind Hexapeptide und gehören zur Gruppe der Anabaenopeptide.^{73, 74} Sie bestehen aus dem 19-gliedrigen Makrozyklus, wobei der Ringschluss über die Seitenkette des D-Lysins erfolgt. Weiterhin ist die Aminosäure in der Position vier *N*-methyliert und das N α des Lysins und die Aminosäure sechs sind über einen Harnstoff miteinander verbunden. Die freie Säure am C-Terminus ist bei allen drei Brunsvicamiden ein L-Isoleucin und die aromatischen bzw. aliphatischen Seitenketten der Aminosäuren zwei bis fünf entsprechen den für die Anabaenopeptide charakteristischen Aminosäuren. Die Brunsvicamide wurden aus Cyanobakterien der Gattung *Oscillatoria* isoliert und für das Lysin ursprünglich eine L-Konfiguration angenommen.^{73, 74}

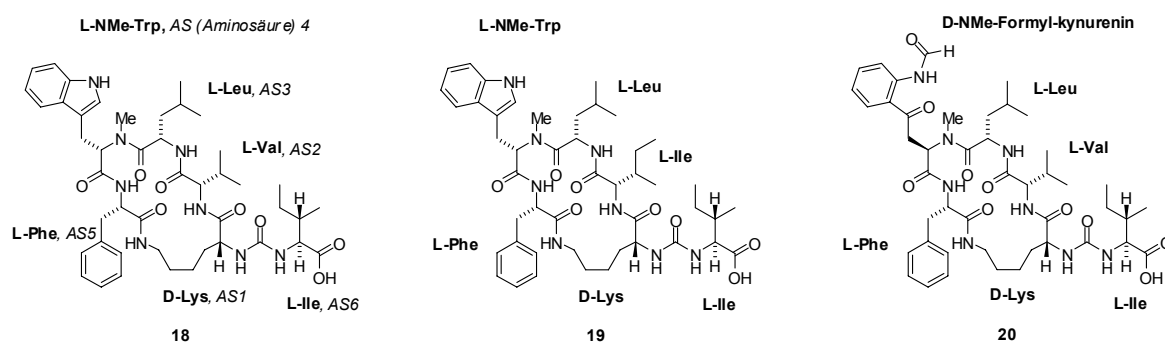


Abbildung 7 Brunsvicamid A (**18**), B (**19**) und C (**20**).

Außer dem D-Lysin enthalten **18** - **20** fast ausschließlich proteinogene L-Aminosäuren (Tabelle 2). Die einzige Ausnahme stellt das im Brunsvicamid C (**20**) enthaltene D-N-Methyl-N'-Formyl-kynurenin dar.

	Aminosäuresequenz						Herkunft
	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6	
18	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	Cyanobakterien, <i>Oscillatoria</i>
19	D-Lys	L-Ile	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	Cyanobakterien, <i>Oscillatoria</i>
20	D-Lys	L-Val	L-Leu	X ⁽¹⁾	L-Phe	L-Ile	Cyanobakterien, <i>Oscillatoria</i>

(1) D-NMe-N'-Formyl-kynurenin

Tabelle 2 Aminosäuresequenz und Herkunft der Brunsvicamide A, B und C.

Das im Brunsvicamid C (**20**) vorkommende *N'*-Formyl-kynurenin (NFK, **21**) ist ein bisher einmaliges Strukturmotiv in zyklischen Peptiden und entsteht als Zwischenprodukt im Tryptophanstoffwechsel (Abbildung 8). Der größte Teil der essentiellen Aminosäure Tryptophan (**22**) wird durch eine Tryptophan- (EC: 1.13.11.11) bzw. Indolamin-2,3-dioxygenase (EC: 1.13.11.52) in NFK (**21**) umgewandelt. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Tryptophanmetabolismus, es folgt die rasche Bildung von **23** durch eine Arylformamidase (EC: 3.5.1.9). Die beiden Dioxygenasen sind Tryptophan-spezifisch und setzen beide Enantiomere des Tryptophans um, wobei das L-Tryptophan um ein vielfaches schneller umgesetzt wird.^{75, 76, 78}

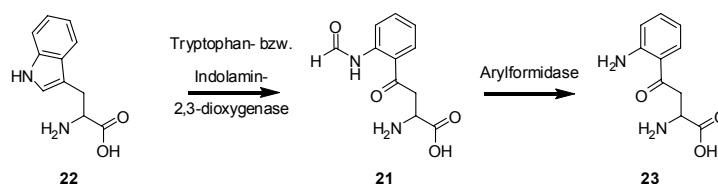


Abbildung 8 Schematische Darstellung der enzymatischen Entstehung von *N*-Formyl-kynurenin aus Tryptophan.

Die Aminosäure *D*-*N*-Methyl-*N'*-Formyl-kynurenin wurde bis heute lediglich im Brunsvicamid C (**20**) gefunden. Damit können über seine Biosynthese nur Vermutungen angestellt werden. So wären der Einbau und die Methylierung eines im Tryptophanstoffwechsel oxidierten Bausteins im Rahmen der nichtribosomalen Peptidbiosynthese durchaus denkbar. Eine nichtribosomale Biosynthese der Brunsvicamide erscheint wahrscheinlich,⁷² allerdings wurden hierzu bisher keine detaillierten Untersuchungen durchgeführt.^{73, 74}

	MptpB IC ₅₀ (μM)	CPDA K _i (μM)	CPDB K _i (μM)
18	64.2	0.015	339
19	7.3	0.020	2.0
20	8.0	0.040	0.2

Tabelle 3 Biologische Aktivitäten der isolierten Brunsvicamide.

Die Oscillamide B (**14**) und C (**15**) wurden als Phosphatase-Inhibitoren beschrieben.⁷⁷ Daher wurden die isolierten Brunsvicamide auf ihre inhibierende Wirkung auf Protein Phosphatasen (CdC25a, PTP1b, MptpB, PTP-SHP2 und VHR) hin untersucht.⁷⁸ Bei einer Konzentration von 100 μ M inhibierten die BVA lediglich MptpB (*Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase), die anschließend bestimmten IC₅₀ Werte (Tabelle 3) lagen im mikromolaren Bereich. Da die Anabaenopeptide Carboxypeptidase-Inhibitoren sind wurden auch die isolierten Brunsvicamide auf ihre inhibierende Wirkung auf Carboxypeptidasen hin untersucht.⁷⁹ Die Brunsvicamide erwiesen sich als starke Carboxypeptidase A-Inhibitoren (Tabelle 3) und auch als Carboxypeptidase B-Inhibitoren.

2.5 Anabaenopeptin-Synthesen

In der Literatur sind die Synthesen zweier Anabaenopeptide beschrieben. Beide Synthesen wurden zur Aufklärung der korrekten Stereochemie einzelner Aminosäuren unternommen, die bei der Hydrolyse der Makrozyklen racemisiert waren.

2.5.1 Lösungssynthese nach U. Schmidt und S. Weinbrenner

Bei der Hydrolyse des Konbamid (**17**) racemisierte das 2-Brom-5-hydroxytryptophan, so dass dessen Konfiguration im Naturstoff von Kobayashi *et al.* nicht ermittelt werden konnte.⁷⁰ Zur Aufklärung der Konfiguration führten Schmidt *et al.* eine Totalsynthese (Abbildung 9) durch.⁸⁰ Der Harnstoff des Konbamid (**17**) sollte durch die Umsetzung des zyklischen Pentapeptides **24** mit dem Isocyanat **25** gebildet werden. Die Syntheseplanung sah vor, dass sowohl das L- (**26**) als auch das D-5-Hydroxytryptophan (**27**) in den Makrozyklus integriert werden sollten.

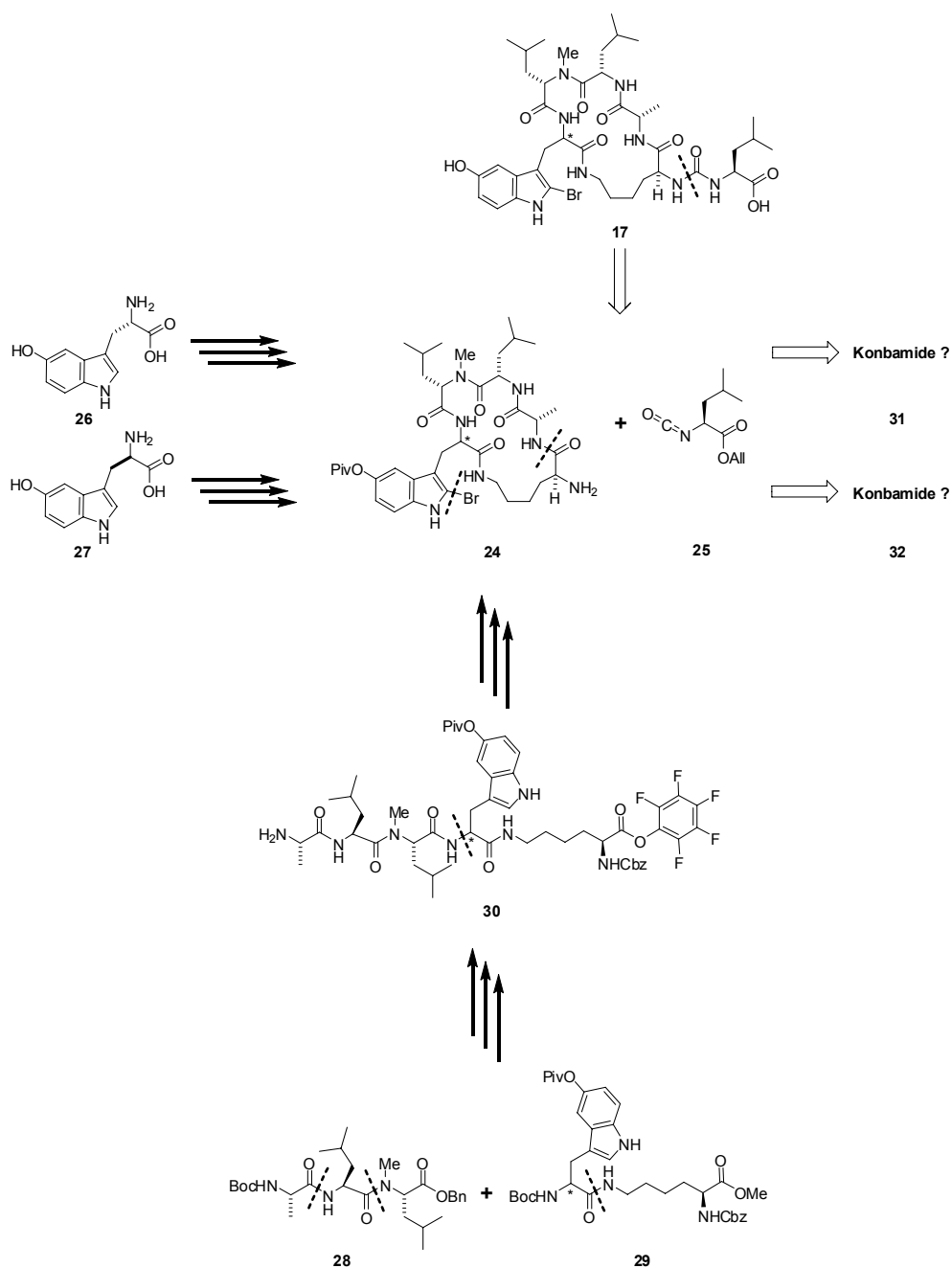


Abbildung 9 Schematische Darstellung der retrosynthetischen Betrachtungen und der Lösungssynthese-Synthese von Schmidt et al.

Zuerst wurden das Tripeptid **28** und das Dipeptid **29** in Lösung hergestellt. Es folgte die Freisetzung der Kupplungsstellen und die Verknüpfung der beiden Fragmente zum Pentapeptid, welches in den Pentafluorphenolester **30** umgewandelt wurde. Die Darstellung des zyklischen Pentapeptides gelang in einem zweiphasigen System⁸¹ und lieferte das Produkt mit einer hervorragenden Ausbeute von 63 %. Da 2-Brom-5-hydroxytryptophan nicht stabil ist,⁸⁵ erfolgte die Bromierung mit NBS erst auf der Stufe des zyklischen Peptides (75 %). Das erhaltene bromierte Produkt **24**

wurde mit dem Isocyanat **25** in einer Ausbeute von 40 % in den Harnstoff **17** überführt. Abschließend wurden die Schutzgruppen entfernt und die Verbindungen **31** und **32** in einer Gesamtausbeute von 7 % erhalten.

Keines der beiden erhaltenen Produkte war mit dem isolierten Material identisch, die korrekte Struktur des Konbamid ist bis heute nicht geklärt.

2.5.2 Festphasensynthese nach M. Bradley und I. R. Marsh

Im Falle des Oscillamides Y (**12**) konnte die Stereochemie von zwei Aminosäureresten nicht ermittelt werden.⁶⁷ Zur Aufklärung der Konfigurationen der beiden Stereozentren im Naturstoff **33** führten Bradley *et al.* eine Synthese (Abbildung 10) durch.⁶⁸ Nach der Synthese eines festphasengebundenen Harnstoffs (**34**), sollte ein Zyklisierungsvorläufer an fester Phase aufgebaut werden und zwar unter Verwendung von jeweils L- und D-N-methyl-Alanin bzw. L- und D-*homo*-Tyrosin. Durch den Vergleich der synthetischen Produkte mit isoliertem Material sollte die korrekte Struktur des Naturstoffs bestimmt werden.

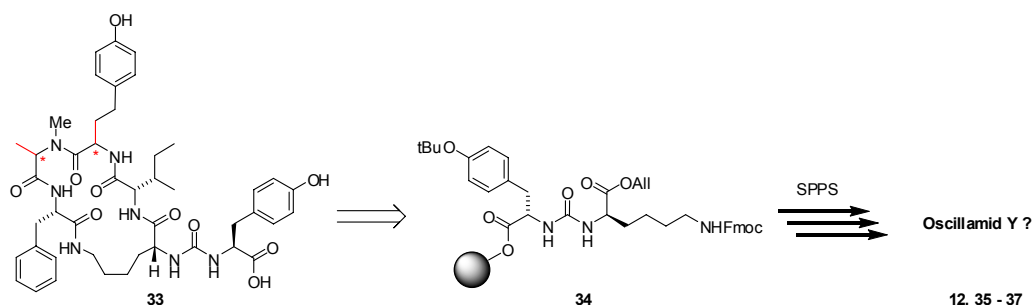


Abbildung 10 Zusammenfassung der Synthesestrategie von Bradley *et al.*

Die Synthese begann mit der Umsetzung des Lysinbausteins **38** mit dem 4-Nitrophenylchloroformiat (**39**) zum Lysin-4-nitrophenolcarbammat **40** (Abbildung 11). Dieses wurde mit einer Ausbeute von 72 % erhalten und aus ihm wurde *in situ* das Isocyanat **41** erzeugt. Durch die Umsetzung von vier Äquivalenten des Isocyanates mit dem an fester Phase befindlichen Tyrosin **42** wurde der festphasengebundene Harnstoff **34** erhalten, die Beladung betrug hier 0.4 mmol g⁻¹.

Die Darstellung des Zyklisierungsvorläufers **43** erfolgte ebenso an fester Phase wie die abschließende Makrolaktamisierung. Die Abspaltung des zyklischen Produktes **44** von der festen Phase und die Spaltung des phenolischen *tert*-Butyl-Ethers erfolgte mit 95 % TFA (aq). Das Produkt **12** und analog dazu die Verbindungen **35** - **37** wurden mit einer Ausbeute von 9 % bezogen auf **42** erhalten.

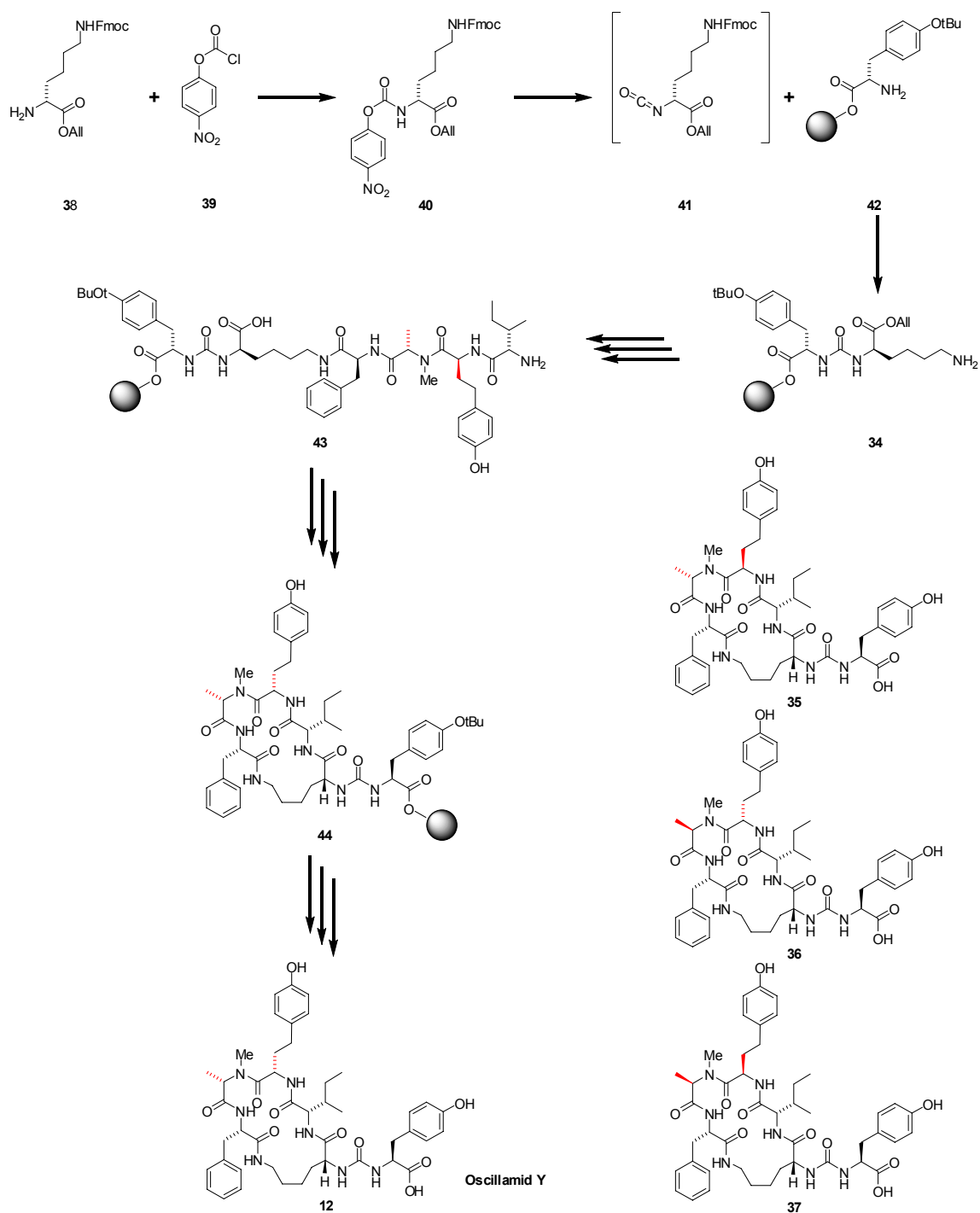


Abbildung 11 Festphasensynthese von Bradley et al.

Der Vergleich von isoliertem Material und den vier Verbindungen **12**, **35** - **37** zeigte eindeutig, dass **12** und der Naturstoff identisch sind. Die Konfiguration der beiden bisher unbekanntenen Stereozentren des Oscillamid Y (**12**) ist damit an beiden Positionen S.

2.5.3 Vergleich und Diskussion der Synthesestrategien

Das Ziel beider Synthesen und auch die grundlegende Strategie waren grundsätzlich identisch. Zur Ermittlung der korrekten Konfiguration aller Stereozentren der Naturstoffe wurden jeweils beide möglichen Enantiomere eingebaut und die zwei bzw. vier erhaltenen Diastereoisomere mit isoliertem Material verglichen.

Der diversitärerzeugende Schritt bei der Synthese von Schmidt *et al.* ist die Verwendung der beiden Enantiomere des 5-Hydroxytryptophans bei der Synthese des Dipeptids **29**. Alle weiteren Reaktionen bis zum Erhalt der beiden Produkte **31** und **32** müssen parallel durchgeführt werden. Ein Vorteil dieser Synthese ist die mit 63 % hohe Ausbeute der Makrolaktamisierung, jedoch wäre die Gesamtstrategie auf die Darstellung einer Substanzbibliothek nur sehr schwierig erweiterbar. Denkbar wäre allerdings z.B. die Darstellung einer größeren Menge eines zyklischen Pentapeptides und dessen Umsetzung mit verschiedenen Isocyanaten zur Darstellung einiger Analoga mit verschiedenen Harnstoffen.

Bei der Synthese von Bradley *et al.* erfolgt die Erzeugung von Diversität während der Synthese des Zyklisierungsvorläufers **43** aus dem Harnstoff **34**. Die Synthese an fester Phase ermöglicht die zügige Verlängerung des Peptides unter Variation der eingebauten Aminosäuren. Durch die Beladung des Harzes mit verschiedenen Aminosäuren und deren Umsetzung mit **40** oder dessen Enantiomer ließe sich auch im Harnstoff Diversität erzeugen.

Die höhere Gesamtausbeute und die Möglichkeit der einfacheren Darstellung einer größeren Substanzsammlung lässt die Synthese von Bradley *et al.* der von Schmidt *et al.* überlegen erscheinen.

2.6 Biologische Angriffspunkte der Brunsvicamide

2.6.1 Carboxypeptidasen

Die isolierten Brunsvicamide inhibierten die Metallopeptidasen Carboxypeptidase A und B, die zur Familie der Zink enthaltenden Carboxy-*exo*-Peptidasen gehören. Diese katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen am C-Terminus von Peptiden bzw. Proteinen.⁸² Diese Enzyme lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die Carboxypeptidasen vom Typ A und B werden hauptsächlich in der Bauchspeicheldrüse gebildet und die sogenannten regulatorischen Carboxypeptidasen des Typs N bzw. E.⁸³

Die Enzyme werden teilweise als inaktive Zymogene (Procarboxypeptidasen) synthetisiert und bei Bedarf durch partielle Proteolyse in ihre aktive Form umgewandelt.⁸⁴ Die Einteilung der Enzyme in A und B erfolgt nach der Art der bevorzugten Substrate. Bei einer Carboxypeptidase vom Typ A (CPDA) sind dies Peptide mit einer aliphatischen oder aromatischen Aminosäure am C-Terminus. Basische Aminosäuren am C-Terminus enthalten die Substrate der Carboxypeptidasen vom Typ B (CPDB).⁸⁵

Die Carboxypeptidasen vom Typ E bzw. N werden als regulatorische Carboxypeptidasen bezeichnet und sind in Prozesse der Blutgerinnung und der Auflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) involviert.⁸⁶ Sie spielen zudem eine wichtige Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen.⁹¹

Die CPDA (EC 3.4.17.1) besteht aus 307 Aminosäuren und einem Zink-Ion im aktivem Zentrum. Sie wird als Zymogen synthetisiert, das durch Trypsin oder Chymotrypsin aktiviert werden muss.⁸⁷ Die biologische Funktion der CPDA ist der Abbau von Peptiden durch die hydrolytische Spaltung der C-terminalen Peptidbindung von Substraten mit hydrophoben L-Aminosäuren. Dies geschieht durch die Aktivierung eines Wassermoleküles durch Koordinierung an das Zinkion im aktiven Zentrum. Obwohl die CPDA als Verdauungsenzym kein therapeutisch relevantes Ziel ist, ist sie eine prototypische Zinkprotease die als Modellsystem für zahlreiche Untersuchungen diente, z.B. als Modellenzym für die Entwicklung von Inhibitor-Designstrategien.⁸⁸ Die Röntgenkristallstrukturanalyse von CPDA mit

verschiedensten Liganden lieferte die Kristallstrukturen in einer Auflösung von bis zu 1.25 Å.⁸⁹

Die so gewonnenen Ergebnisse können häufig auf andere physiologisch und therapeutisch relevante Metallopeptidasen übertragen werden, da viele Zinkproteasen im katalytisch aktiven Zentrum ein gemeinsames Muster von Aminosäuren zur Koordination des Metallions aufweisen. Therapeutisch relevante Metallopeptidasen sind das Angiotensin umwandelnde Enzym (angiotensin converting enzyme), dessen Inhibitoren eine wichtige Klasse von Verbindungen zur Behandlung von Bluthochdruck darstellen.⁹⁰ Ein weiteres Beispiel sind die Matrixmetalloproteasen (MMPs) die am Abbau bzw. der Zerstörung von Gewebe beteiligt sind und deswegen eine Rolle bei der Therapie von Entzündungen, degenerativen Krankheiten und Krebs spielen.^{91, 92} Die Gruppe der Enzyme mit der Bezeichnung ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ist in die Proteolyse membrangebundener Proteine und die damit verbundene Modulierung von Signalwegen in Verbindung gebracht worden und stellt deswegen einen möglichen Ansatzpunkt für neue Krebstherapeutika dar.⁹³ Weiterhin hat der auch als Plasma Carboxypeptidase B bekannte Thrombin-aktivierbare Fibrinolyse Inhibitor (TAFI) bei der Blutgerinnung und damit bei der Behandlung von Thrombosen und Schlaganfällen eine entscheidende Bedeutung.^{94, 95}

Das katalytisch aktive Zentrum der CPDA ist durch das für die Hydrolyse essentielle Zinkion und die drei Aminosäuren His 69, Glu 72 und His 196 in seiner Ligandensphäre charakterisiert (Abbildung 12). Die Seitenketten der drei Aminosäuren Asn 144, Arg 145 und Tyr 248 sind an der Erkennung der C-terminalen Aminogruppe der natürlichen Substrate beteiligt. Die Aminosäuren Ile 243, Ile 247, Ala 250, Gly 252, Gly 253, Ser 254, und Ile 255 bilden eine hydrophobe Tasche, welche der Aufnahme der C-terminalen Seitenkette der peptidischen Substrate dient. Sie wird auch als Selektivitätstasche bezeichnet, da sie bevorzugt aliphatische und aromatische Seitenketten von L-Aminosäuren aufnimmt.⁹⁶

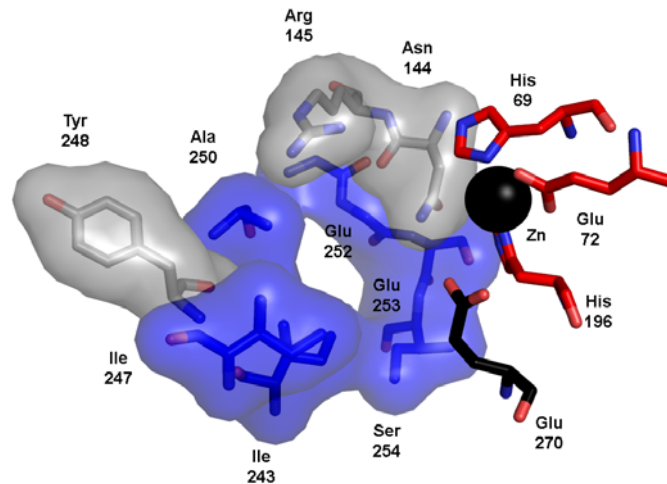


Abbildung 12 Aminosäuren des katalytischen Zentrums der CPDA (Zinkatom: schwarz, Aminosäuren der Ligandensphäre: rot, an der Erkennung der C terminalen Aminogruppe der natürlichen Substrate beteiligte Aminosäuren: grau, hydrophobe Tasche: blau).

Der Vergleich von Kristallstrukturen ligandenfreier und mit einem Substrat kokristallisierter Carboxypeptidasen offenbarte unterschiedliche Orientierungen für die Aminosäure Tyr 248. Im freien Enzym ragt die phenolische Seitenkette in das umgebende Lösungsmittel (Abbildung 13),⁹⁷ während sie nach dem Binden eines Substrates an das aktive Zentrum eine andere Position einnimmt und das Substrat wie eine Art hydrophober Deckel fixiert.⁹⁸ Diese Beobachtungen waren eines der ersten Beispiele für die substratinduzierte Konformationsänderung eines Enzymes und eine Bestätigung des „Induced fit“-Modells nach D. E. Koshland.⁹⁹

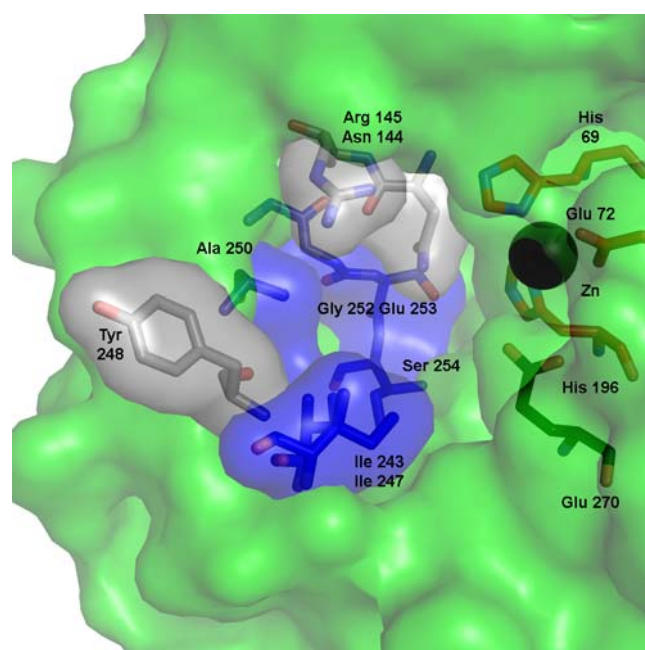


Abbildung 13 Katalytisches Zentrum der CPDA.

Bei der durch die CPDA katalysierten Reaktion handelt es sich um eine Hydrolyse, zu deren Mechanismus (Abbildung 14) zahlreiche Untersuchungen angestellt wurden.¹⁰⁰ Die freie Säure des Substrates **45** wird durch die Bildung zweier Wasserstoffbrücken mit der Guanidinium-Gruppe des Arg 145 fixiert. Die Seitenkette der L-Aminosäure ragt in die Selektivitätstasche und die Carbonylfunktion der C-terminalen Peptidbindung koordiniert an das Zinkion. Die Carbonylbindung wird so für den nukleophilen Angriff des Glu 270 aktiviert, die Peptidbindung wird gespalten und das proteingebundene Anhydrid **46** gebildet. Nach dessen Hydrolyse, durch ein an das Zinkion koordiniertes Wassermolekül, werden das um eine Aminosäure verkürzte Substrat **47** und die Aminosäure **48** freigesetzt und das Enzym regeneriert.

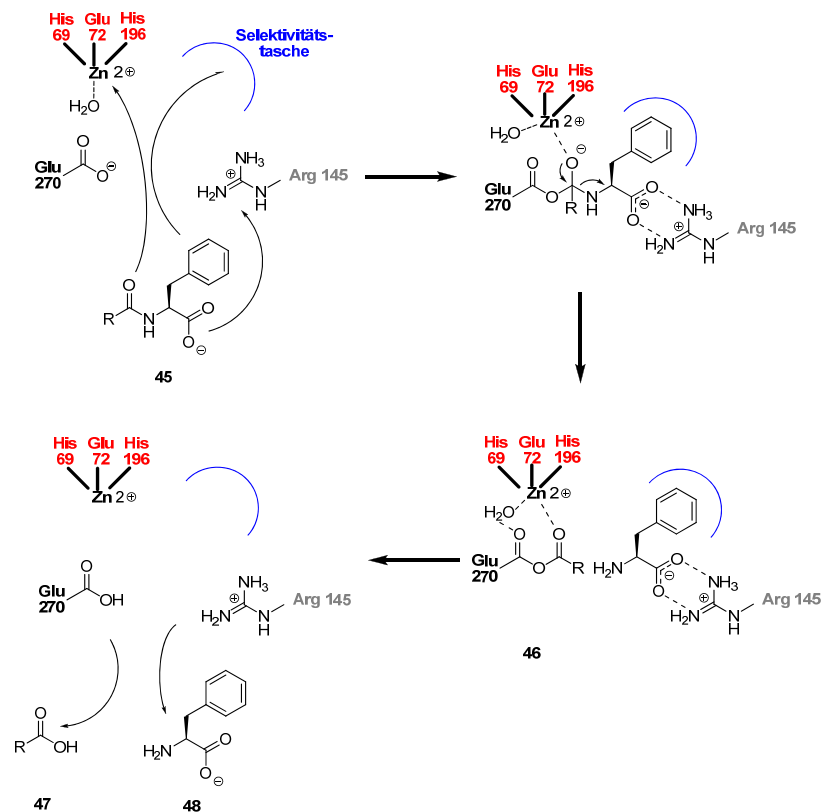


Abbildung 14 Hydrolysemechanismus der Carboxypeptidase A.

In der Natur gibt es zwei Gruppen von Carboxypeptidaseinhibitoren, bei denen es sich durchweg um substratähnliche Peptide oder Proteine handelt. Die erste Gruppe dient der Inhibition von Verdauungsenzymen und damit dem Schutz vor Frassfeinden. Der Carboxypeptidase-Inhibitor aus Lauch (Leech carboxypeptidase inhibitor, LCI) besteht aus 66 Aminosäuren und inhibiert die pankreatischen Carboxypeptidasen A und B sowie die Plasma-Carboxypeptidase B, wobei der

C-Terminus (-Pro-Tyr-Val-Glu) wie ein Substrat an das aktive Zentrum bindet.¹⁰¹ Die zweite Gruppe von Inhibitoren beeinflusst die Blutgerinnung, also regulatorische Carboxypeptidasen, und stammt aus blutsaugenden Organismen wie z.B. Blutegeln oder Zecken. Ein aus 75 Aminosäuren bestehender Carboxypeptidase Inhibitor aus Zecken (tick carboxypeptidase inhibitor, TIC) wird durch sechs Disulfidbrücken stabilisiert und bindet nicht nur mit dem C-Terminus an das aktive Zentrum der Carboxypeptidase, sondern zusätzlich mit dem N-Terminus an einer entfernten Stelle der Enzymoberfläche. TIC wird von der Zecke in die zur Blutaufnahme dienende Wunde abgegeben und verhindert durch Inhibierung der Plasmacarboxypeptidase B (TAFI, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) die Blutgerinnung.¹⁰²

Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass die als Carboxypeptidase A Inhibitoren bekannten Anabaenopeptine B und F in die Populationsdichte kontrollierende Kommunikationsprozesse von Cyanobakterien involviert sind (quorum sensing).¹⁰³ Allerdings sind bisher nur erste Untersuchungen durchgeführt wurden, über mechanistische Details ist wenig bekannt, somit ist noch unklar ob und wie Carboxypeptidasen in diese Prozesse involviert sind.¹⁰⁴

Unklar ist ebenfalls die Funktion der Anabaenopeptine. Als Peptidaseinhibitoren können sie dem indirekten Schutz vor Frassfeinden dienen, indem sie die Aufspaltung der gefressenen cyanobakteriellen Proteine und Peptide erschweren. Weiterhin ist es denkbar, dass sie als Modulatoren der Aktivierung von Proenzymen an regulatorischen Prozessen beteiligt sind.

2.6.2 Phosphatasen

Die komplexen Netzwerke der Signalwege werden ganz entscheidend durch den Phosphorylierungsgrad verschiedener Enzyme gesteuert. Daher spielen Phosphatasen in Kombination mit Kinasen eine essentielle Rolle bei der Kontrolle physiologischer Prozesse.¹⁰⁵ Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von Proteinen und stehen schon länger im Fokus der pharmazeutischen Forschung.¹⁰⁶ Die Phosphatasen katalysieren die Dephosphorylierung. Störungen der entsprechenden Gleichgewichte sind z.B. mit Krebs, Diabetes und Immunschwächekrankheiten verknüpft. Phosphatasen werden generell in zwei Klassen unterteilt, die sich strukturell und mechanistisch voneinander unterscheiden.

Die erste Gruppe umfasst die Serin- und Threonin-spezifischen Protein Phosphatasen (kurz PP),¹⁰⁷ die zweite die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP),¹⁰⁸ deren katalytisch aktives Zentrum so aufgebaut ist, dass die Phosphate an den kürzeren Seitenketten von Serin und Threonin nicht abgespalten werden können. Neben diesen klassischen Phosphotyrosin-spezifischen Phosphatasen gehören auch noch die dualspezifischen Phosphatasen (DSP) zu den PTPs.¹⁰⁹ Diese sind in der Lage, neben Phospho-Tyrosin auch Phospho-Serin und -Threonin zu dephosphorylieren.

Die Serin-/Threonin-spezifischen Protein Phosphatasen katalysieren die direkte Hydrolyse ihrer phosphorylierten Substrate durch zwei Metallionen im aktiven Zentrum (Abbildung 15). Da die Protein Phosphatasen 1 und 2A in die Regulierung des Zellzyklus involviert sind werden sie als mögliche Zielproteine für Krebstherapeutika diskutiert.¹¹⁰

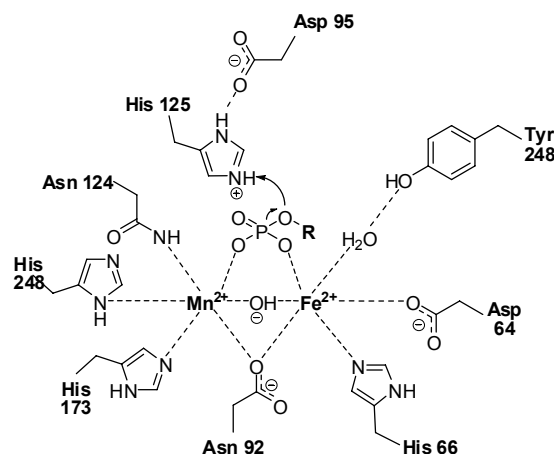


Abbildung 15 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums und des katalytischen Mechanismus der Serin- und Threonin spezifischen Protein Phosphatase 1 (PP1).

Die zweite Klasse bedient sich eines reaktiven Cysteins im aktiven Zentrum. Ein therapeutisch relevantes Beispiel ist die Proteintyrosinphosphatase B des *Mycobacterium tuberculosis*, deren katalytisch aktives Zentrum die für PTPs typische Aminosäureabfolge (H/V)C(X)_sR(S/T) aufweist.¹¹¹ Man nimmt an, dass das Substrat über Wasserstoffbrücken mit dem Arg 221 (Abbildung 16) stabilisiert wird, was zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt. Das Asp 181 kann dann eine Wasserstoffbrückenbindung zum phenolischen Sauerstoff des phosphorylierten

Tyrosins ausbilden. Nun erfolgt ein nukleophiler Angriff des deprotonierten Cys 215, aus dem die Bildung eines Phosphorsäurethioesters resultiert. Diese wird in einem zweiten Schritt hydrolysiert und das Enzym regeneriert.¹¹² Es wurde weiterhin beschrieben, dass MptpB auch Serin- und Theronin- sowie Inositoltrisphosphat desphosphoryliert.¹¹³ Die Brunsvicamide A (**18**), B (**19**) und C (**20**) wurden als Inhibitoren der *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase (MptpB) beschrieben.⁷³

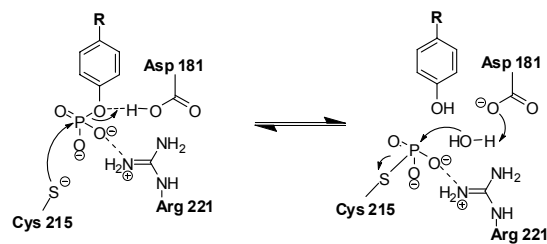


Abbildung 16 Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase (MptpB).

Der Erreger nutzt wahrscheinlich die zentrale Rolle der PTPs bei der Signalweiterleitung aus, indem er durch das Absondern von MptpB die Immunabwehr der infizierten Organismen stört.¹¹⁴ Die häufig nur als ein Schrecken aus dem 19. Jahrhundert betrachtete Tuberkulose breitet sich weltweit erneut aus, vor allem in Afrika und Osteuropa, und jährlich sterben über zwei Millionen Menschen an ihr.¹¹⁵ Neue Wirkstoffe werden benötigt um die langwierige Behandlung zu verkürzen, multiresistente Stämmen¹¹⁶ zu bekämpfen sowie Tuberkulose und HIV-Koinfektionen¹⁰ effektiv behandeln zu können.

3 Motivation und Ziel der Arbeit

In den vorstehenden Kapiteln wurde die herausragende Bedeutung von Naturstoffen für die Entwicklung von Leitstrukturen diskutiert und die Brunsvicamide als ein Vertreter der cyanobakteriellen Sekundärmetaboliten vorgestellt. Weiterhin wurde die Bedeutung der Totalsynthese für die Bestätigung von Strukturen und die Evaluierung biologischer Aktivitäten dargelegt.

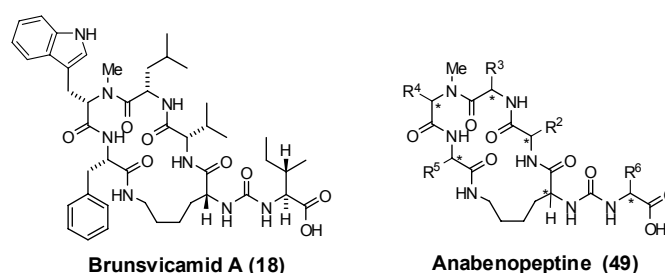


Abbildung 17 *Brunsvicamid A (18) und allgemeine Struktur der Anabaenopeptine (49).*

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte eine Synthese etabliert werden, die einen flexiblen Zugang zu Analoga der Brunsvicamide mit variierender Stereochemie und Aminosäuresequenz bietet. Für den Aufbau einer fokussierten Substanzsammlung von Brunsvicamid-Analoga bzw. Anabaenopeptinen erschienen nicht nur die Erzeugung von Diversität am polymeren Träger, sondern ebenfalls die Durchführung der Harnstoffsynthese und der Ringschluss an fester Phase wünschenswert.

Zunächst sollten die Brunsvicamide selbst synthetisiert werden, um die Struktur der isolierten Naturstoffe zu bestätigen und eine eingehende biologische Untersuchung zu ermöglichen. Dazu sollte eine möglichst breit einsetzbare Festphasenpeptidsynthese entwickelt werden. Die synthetisierten Verbindungen sollten im Rahmen von verschiedenen biochemischen Assays evaluiert werden, um die für das isolierte Material publizierte Inhibierung von MptpB und CPDA/B näher zu untersuchen. Da zahlreiche Sekundärmetaboliten von Cyanobakterien antibakterielle oder zytotoxische Eigenschaften aufweisen, sollten die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Verbindungen ebenfalls auf eine derartige Aktivität hin untersucht werden.

Erstes Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines schnellen und flexiblen synthetischen Zugangs zum Brunsvicamid-Grundgerüst. Nach der Totalsynthese des Naturstoffs sollten weitere Analoga zur systematischen Untersuchung der biologischen Aktivitäten dargestellt werden.

In der Literatur wurden bisher keine umfassenden Untersuchungen mittels systematischer Variation der Aminosäuresequenz beschrieben. Ebenso wenig wurden Analoga hergestellt, bei denen die Stereochemie im Harnstoffteil variiert wurde. Somit sollte die zu entwickelnde Synthese der verschiedenen Diastereomere und Analoga einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehung dieser interessanten Naturstoffklasse leisten.

4 Spezieller Teil

4.1 Synthese

4.1.1 Retrosynthetische Analyse

Die retrosynthetische Zerlegung (Abbildung 18) des Brunsvicamid-Grundgerüsts (**50**) berücksichtigt, dass es sich um ein Hexapeptid handelt. Weiterhin kann das Grundgerüst in den 19-gliedrigen Ring und den Harnstoff unterteilt werden. Die Spaltung der einzelnen Peptidbindungen führt zu sechs Aminosäure- und einem C1-Baustein.

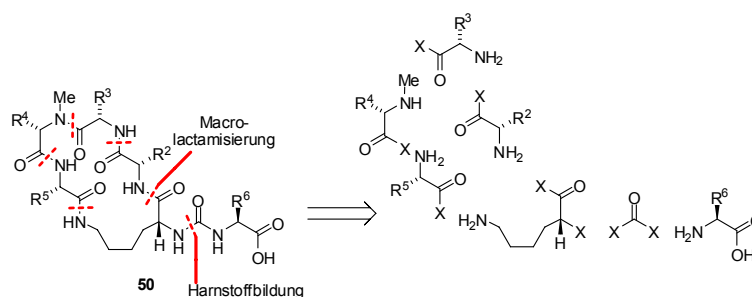


Abbildung 18 Retrosynthetische Analyse des zyklich verzweigten Makrozyklus.

Die Entwicklung einer Synthesestrategie gestaltet sich ungleich komplizierter: Der Ringschluss könnte durch die Knüpfung von fünf verschiedenen Peptidbindungen erfolgen. Jede dieser Makrolaktamierungen könnte in Lösung oder an fester Phase erfolgen, gleiches gilt für die Synthese des Zyklisierungsvorläufers. Die Harnstoffsynthese könnte vor oder nach der Zyklisierung erfolgen und ebenfalls in Lösung oder an fester Phase durchgeführt werden.

4.1.2 Strategische Möglichkeiten

Vor dem Hintergrund der angestrebten Erzeugung einer Substanzsammlung erscheint die Durchführung von Syntheseschritten an fester Phase als vorteilhaft, da diese in der Regel einen geringeren manuellen Arbeitsaufwand bedeuten und die einfache Variation der Aminosäuresequenz gestatten würden. Durch die sehr niedrigen Konzentrationen bei einer Makrolaktamisierung in Lösung könnte das Verhältnis zwischen intramolekularem Ringschluss und intermolekularem

Nebenreaktionen verbessert werden. Bei einem Ringschluß an fester Phase wären die Variation der Beladung und die daraus resultierende Variation der effektiven Konzentration für die Zyklisierung, nur zu Beginn der Reaktionssequenz möglich. Zur Betrachtung der sich bietenden strategischen Möglichkeiten sind mögliche Synthesestrategien, Reaktionsfolgen und Ankerpunkte in Abbildung 19 zusammengefasst.

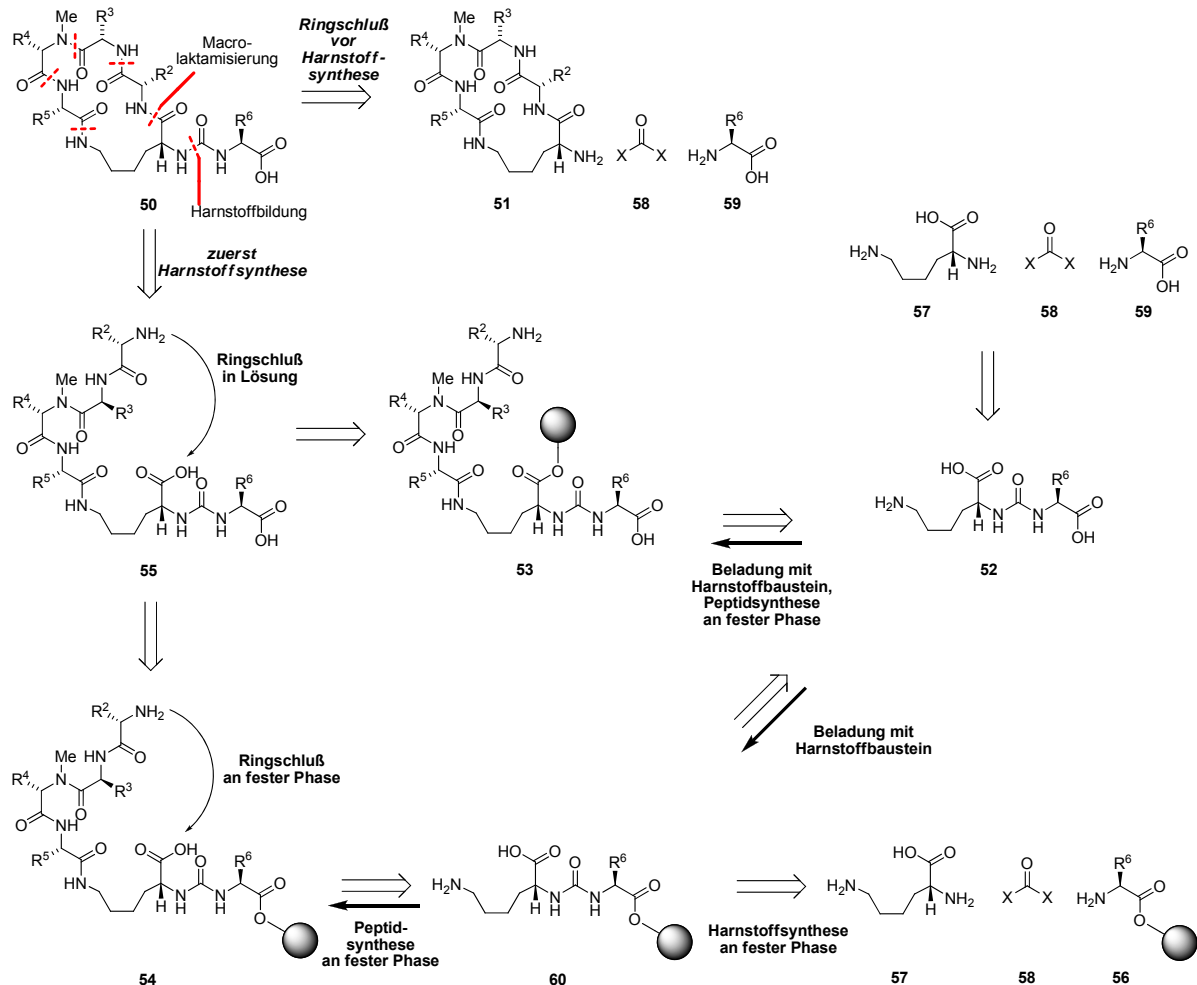


Abbildung 19 Übersicht möglicher Synthesestrategien, Reaktionsfolgen und Ankerpunkte.

Die Durchführung einer Harnstoffsynthese in Lösung mit jedem einzelnen vorab dargestellten zyklischen Pentapeptid **51** scheint für die Darstellung einer Substanzsammlung wenig geeignet. Vielversprechend erscheint hingegen die Darstellung des Harnstoffs **52** in Lösung. Durch die Beladung von Polystyrolharzen über zwei verschiedene Ankergruppen des Bausteins **52** und anschließende Peptidsynthese an fester Phase wären die festphasengebundenen Hexapeptide **53**

und **54** zugänglich. **53** könnte abgespalten und **55** in Lösung zyklisiert werden. Die Zyklisierung von **54** an fester Phase könnte nach der Abspaltung einen direkten Zugang zum Grundgerüst **50** darstellen. Die Durchführung der Harnstoffsynthese in Lösung ermöglicht sowohl die einfache Beobachtung des Reaktionsfortschrittes als auch die Aufreinigung des Rohproduktes. Nachteilig wäre, dass für jede Variation der Aminosäure **6** ein neuer Baustein in Lösung synthetisiert werden müsste. Dagegen würde eine Umsetzung von festphasengebundenen Aminosäuren **56** mit den Substanzen **57** und **58** einen schnellen Zugang zu verschiedenen Harnstoffen **52** darstellen.

Die Etablierung einer Synthese für einen vollständig orthogonal geschützten Harnstoffbaustein **52** aus den Substanzen **57** - **59** würde also den Weg zur Etablierung von gleich zwei synthetischen Zugängen zu den Brunsvicamiden ebnet. Der möglicherweise kritische Schritt der Makrolaktamisierung könnte sowohl in Lösung, als auch an fester Phase stattfinden. Die Möglichkeit den Ringschluss unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durchführen zu können erscheint vorteilhaft. Trotz vieler literaturbekannter Reaktionsbedingungen und Reagenzien für Zyklisierungen,^{69, 117, 118} ist die Auswahl eines geeigneten linearen Vorläufers von entscheidender Bedeutung.¹¹⁹ Die Zyklisierungsstelle zwischen dem Lysin und dem Valin erscheint vielversprechend. Sie liegt zwar einerseits neben dem β -verzweigten und damit sterisch anspruchsvollen Valin aber andererseits gelten lineare Pentapeptide bereits als gut geeignete Edukte für Makrolaktamierungen, wenn sie den Ringschluss erleichternde Elemente wie z.B. eine D- oder N-methylierte Aminosäure beinhalten.¹²⁰ Weiterhin wurde eine derartige Zyklisierung bei dem strukturell sehr ähnlichen Oscillamid Y bereits beschrieben.⁶⁸ Dadurch lässt sich eine erfolversprechende analoge Zyklisierung der Brunsvicamide erwarten.

Von entscheidender Bedeutung ist die Auswahl einer geeigneten Kombination von drei Schutzgruppen für **52**. Da die Anforderungen an die Schutzgruppen des Schlüsselbausteins **52** sehr vielfältig sind, sollen die Überlegungen zur Auswahl einer Kombination von drei vollständig orthogonalen Schutzgruppen eingehend diskutiert werden:

Die Schutzgruppe Nr.1 (SG1) muss für die Festphasenpeptidsynthese geeignet sein. Die SG2 muss vor allem an fester Phase entfernt werden können und SG3 muss während der Abspaltung von **53** und der Zyklisierung des offenkettigen Vorläufers **55** intakt bleiben, sowie sich nach dem Ringschluss abspalten lassen (Abbildung 20).

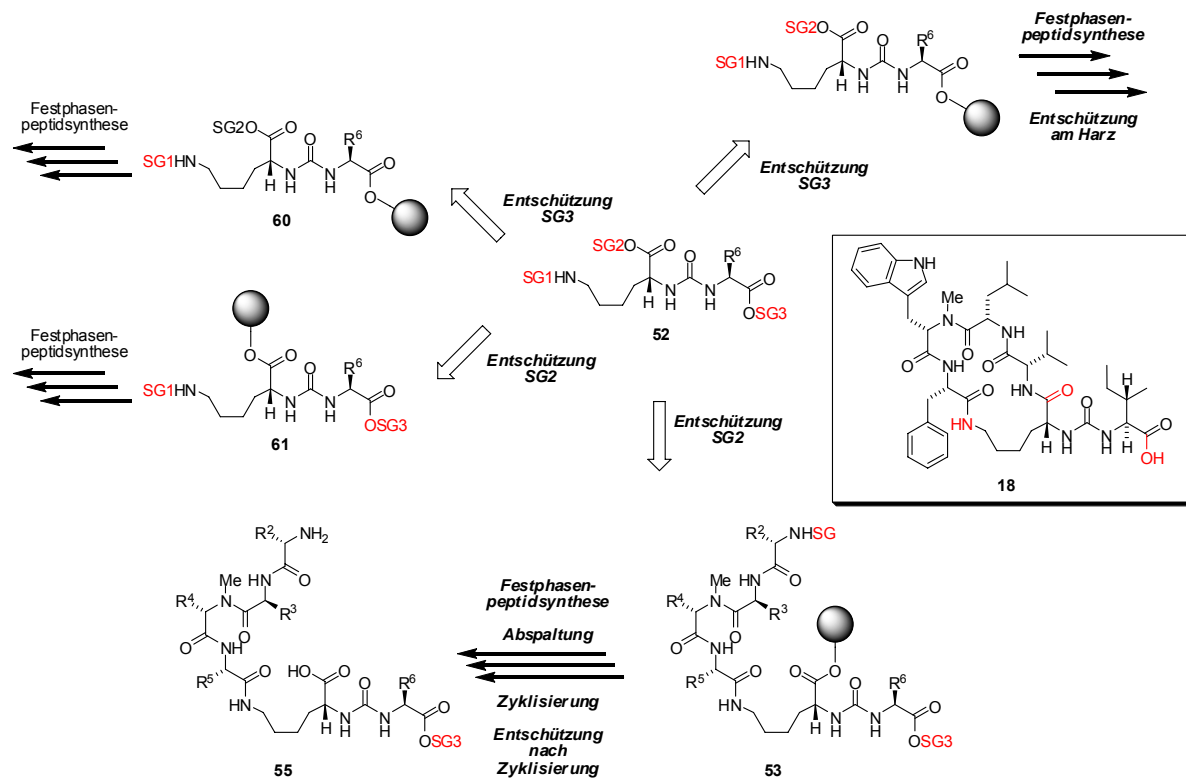


Abbildung 20 Betrachtung der potentiellen Anforderungen an mögliche Schutzgruppen des Harnstoffbausteins.

Aus der Vielzahl etablierter Schutzgruppen scheint eine Kombination besonders geeignet:¹²¹ Für das Amin in der Lysinseitenkette (SG1) wurde die Fmoc-Gruppe ausgewählt (Abbildung 21). Die Notwendigkeit der Entfernung von SG2 an fester Phase lässt die Verwendung eines Allylestere als sinnvoll erscheinen, da dieser unter milden Bedingungen Pd-katalysiert gespalten werden kann. Ein *tert*-Butylester als SG3 bleibt bei der Abspaltung des offenkettigen Zyklisierungsvorläufers **53** intakt und kann nach der Zyklisierung in einer globalen Entschützung abgespalten werden.¹²²

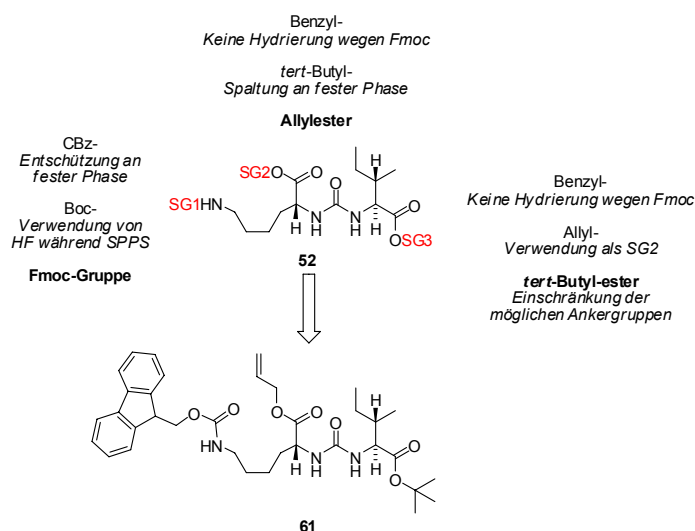


Abbildung 21 Auswahl der Schutzgruppen des Harnstoffs.

Die gewählten Schutzgruppen (Abbildung 21) sind zueinander vollständig orthogonal und erlauben nach der Synthese von **61** in Lösung die selektive Spaltung eines der beiden Ester und die anschließende Beladung des Harzes. Weiterhin ermöglichen sie die Synthese der offenkettigen Zyklisierungsvorläufer unter Verwendung der Fmoc-Strategie.

4.1.3 Synthesestrategie

Nach der ausführlichen Betrachtung der strategischen Möglichkeiten wurde folgende Synthesestrategie festgelegt (Abbildung 22):

Zuerst sollte die Synthese des Harnstoffs **61** in Lösung, dann die Beladung der polymeren Träger mit den freien Säuren erfolgen und so die festphasengebundenen Harnstoffe **62** und **63** erhalten werden.

Es war geplant die offenkettigen Zyklisierungsvorläufer **64** und **65** durch Festphasenpeptidsynthese darzustellen, die Zyklisierungsstellen zu entschützen und den Ring an fester Phase bzw. in Lösung zu schließen.

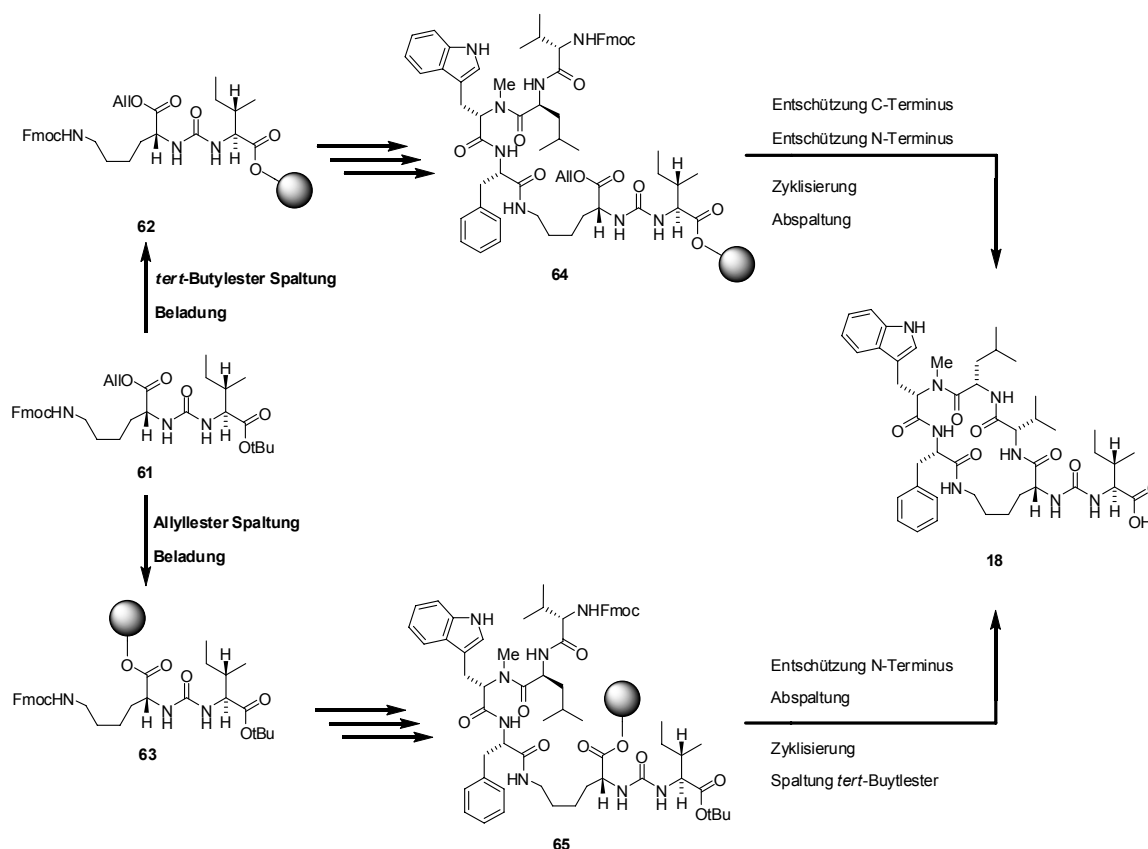


Abbildung 22 Ausgewählte synthetische Zugänge zum Brunsvicamid A (18).

Diese Synthese würde sowohl die Vorteile der Lösungs- als auch der Festphasenchemie ausnutzen: Die Synthese des Schlüsselbausteins **61** und aller hierfür benötigten Vorstufen in Lösung könnte analytisch effektiv verfolgt werden. Zusätzlich wäre jederzeit eine chromatographische Aufreinigung möglich. Die Knüpfung der Peptidbindungen an fester Phase würde den Vorteil bieten, dass die Aminosäuresequenz später einfach variiert werden könnte. Zu Bedenken ist der recht hohe Aufwand der notwendig wäre, die Aminosäuren im Harnstoff später zu variieren. Gerade deswegen erscheint es vorteilhaft, dass ausgehend von nur einem in Lösung dargestellten Baustein (**61**) gleich zwei unterschiedliche Zyklisierungsvorläufer (**64**, **65**) erhalten werden könnten.

4.1.4 Auswahl synthetischer Äquivalente für die Harnstoffsynthese

Mögliche Reagenzien zur Darstellung des Harnstoffs **61** sind die Isocyanate **66** (Abbildung 23). **66a** wurde bereits in der Konbamidsynthese von Schmidt *et al.* benutzt.⁸⁰ Eine andere Möglichkeit zur Darstellung der Carbamate **67** bietet die

4-Nitrophenylchlorameisensäure, die bereits für die Festphasensynthese von Oligoharnstoff-peptidmimetica verwendet wurde.¹²³ Hier würden die Isocyanate **66** durch Zugabe einer entsprechenden Base *in situ* erzeugt.¹²⁴ Durch die Abspaltung des 4-Nitrophenolats (**68**) tritt eine intensive Gelbfärbung auf, welche für die Verfolgung des Reaktionsfortschritts genutzt werden kann.

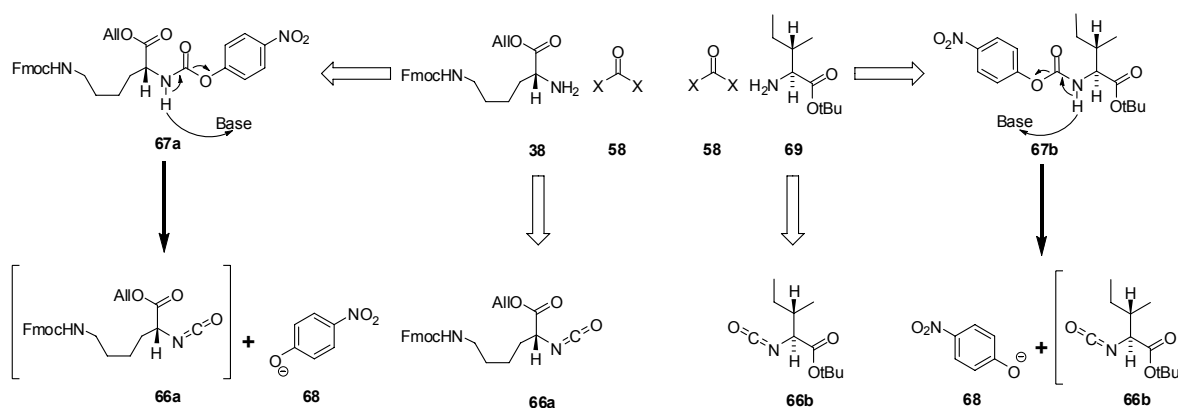


Abbildung 23 Mögliche synthetische Äquivalente für **58**.

4.1.5 Auswahl der Ankergruppe und des polymeren Trägers

Für die Festphasenpeptidsynthese wurden Fmoc-Schutzgruppen ausgewählt (Abbildung 21). Daher wurde eine basenstabile Ankergruppe für den polymeren Träger benötigt. Die 2-Chlortritylchloridankergruppe (**70**) ist extrem säurelabil und erlaubt damit die Abspaltung von **65** vom polymeren Träger ohne die Spaltung des *tert*-Butylesters oder eventuell vorhandener Schutzgruppen in offenkettigen Vorläufern für eine Zyklisierung in Lösung (Abbildung 24).¹²⁵

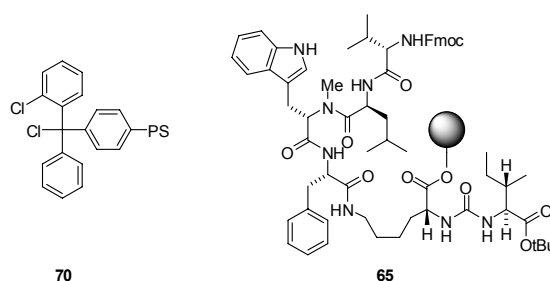


Abbildung 24 2-Chlortritylchloridharz und festphasengebundener *tert*-Butylester für eine Zyklisierung in Lösung.

Nach der Bestätigung der Struktur und der initial gefundenen biologischen Aktivitäten sollte die Synthese einer Substanzsammlung erfolgen. Für die dann notwendige Variation der Aminosäuresequenz würde sich die Verwendung der „Split-and-pool-Methode“ (siehe Kapitel 4.1.15) anbieten. Hierfür wird der verwendete polymere Träger in IRORI MacroKans™¹²⁶ (Abbildung 25) aufgeteilt. Die Polystyrolmatrix kommerziell erhältlicher Harze enthält zur Quervernetzung ein oder zwei Prozent Divinylbenzol: Zwei Prozent Quervernetzung bedeuten eine größere mechanische Stabilität, ein Prozent ein stärkeres Aufquellen des Harzes in organischen Lösungsmitteln.¹²⁷ In den IRORI MacroKans™ ist das Harz vor mechanischen Beanspruchungen gut geschützt und weiterhin bedeutet ein stärkeres Aufquellen eine geringere räumliche Dichte der festphasengebundenen Zyklisierungsvorläufer, dies erscheint im Hinblick auf eine gewünschte intramolekulare Zyklisierung vorteilhaft und führte zur Auswahl eines Polystyrolharzes mit einer geringen Quervernetzung von einem Prozent.



Abbildung 25 IRORI MacroKan™, Deckel, RFID-tag und 250 mg Harz.

Die Porengröße der IRORI MacroKans™ macht die Verwendung eines Harzes mit einem gewissen Mindestdurchmesser (mesh size¹²⁸) notwendig. Andersfalls verbleiben die Harzkügelchen während der Festphasensynthese nicht vollständig in den Reaktoren und können damit bei der kombinatorischen Festphasensynthese nicht weiter umgesetzt werden, da die räumliche Zuordnung zwischen MacroKan™/RFID-tag und synthetisierter Verbindung verloren geht. Die kommerziell erhältlichen Harze weisen meistens eine Größe von 100-200 mesh (0.15 – 0.1 mm)

auf. Das 2-Chlortritylchloridharz mit einem Prozent Quervernetzung war auf Anfrage beim Hersteller auch in einer Größenverteilung von 50-100 mesh (0.3 – 0.15 mm) erhältlich und war deswegen für die folgenden Synthesen bestens geeignet.

4.1.6 Erläuterung zu unterschiedlicher Stereochemie

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Strukturüberprüfung durch Totalsynthese durchgeführt werden. Nach der Isolierung wurde aufgrund der geringen isolierten Mengen für das Lysin der BVA eine L-Konfiguration ermittelt. Für die Abbildungen in den Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.5 (Abbildung 18 bis Abbildung 24) wurde durchgehend die Darstellung des BVA A mit der, erst im Rahmen dieser Arbeit, als korrekt identifizierten Stereochemie (D-Lysin) gewählt. Die synthetischen Arbeiten begannen jedoch unter Verwendung von Lysinbausteinen mit L-Konfiguration (Abbildung 27 bis Abbildung 40).

4.1.7 Darstellung der Bausteine für die Harnstoffsynthese

Zuerst erfolgte die Umsetzung des L-Lysinbausteins **71** mit 4-Nitrophenolchloroformiat (**39**) in Anlehnung an eine Literaturvorschrift.¹²³ Hier wurde die Base DIPEA verwendet: Eine intensive Gelbfärbung der Reaktionslösung zeigte die Eliminierung von 4-Nitrophenol (**68**) und die hier unerwünschte Entstehung des Isocyanates **72** an (Abbildung 26).

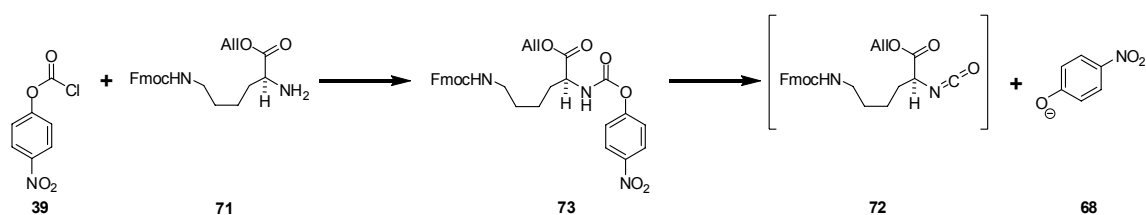


Abbildung 26 Synthese des N^α -(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-lysin-allylester (**73**):

a) 1 Äq. DIPEA (0 °C), abs. CH_2Cl_2 , 2 h RT.

Pyridin als Base führte zu besseren Ergebnissen.⁶⁸ Es war dadurch möglich, die unerwünschte Bildung des Isocyanates **72** zu unterbinden und den N^α -(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-lysin-allylester (**73**) in guten Ausbeuten zu erhalten (Abbildung 27).

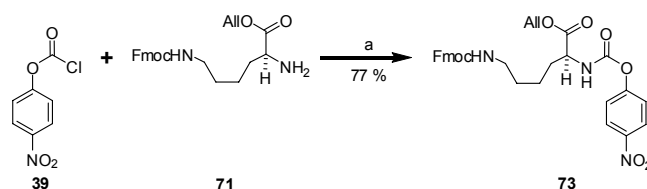


Abbildung 27 Optimierte Synthese des *N*^α-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-lysin-allylester (**73**):

a) 8 Äq. Pyridin (0 °C), abs. CH₂Cl₂, 2 h RT.

Die Synthese des *N*^α-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-isoleucin-*tert*-butylesters **74** erfolgte dann ebenfalls unter Verwendung von Pyridin als Base (Abbildung 28). Die sich an die Umsetzung von 4-Nitrophenolchloroformiat (**39**) und L-Isoleucin-*tert*-butylester (**69**) in Dichlormethan anschließende säulenchromatographische Aufreinigung erwies sich als unproblematisch und das Produkt **74** wurde in sehr guter Ausbeute (87 %) als farbloses Öl erhalten.

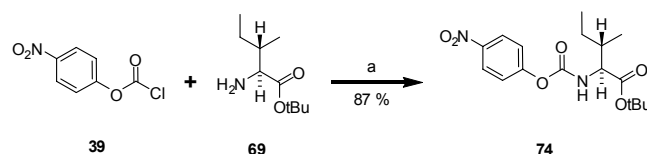


Abbildung 28 Synthese des *N*^α-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-isoleucin-*tert*-butylester (**74**):

a) 8 Äq. Pyridin, abs. CH₂Cl₂, 1 h, 0 °C, 16 h, RT.

Aufgrund des ungleich einfacheren synthetischen Zugangs zu dem *N*^α-4-Nitrophenolcarbammat des L-Isoleucin-*tert*-butylesters (**74**) wurde dieses für die Harnstoffsynthese in Lösung verwendet (Kapitel 4.1.8). Mit dem *N*^α-4-Nitrophenolcarbammat des (Fmoc)-L-Lysin-allylesters (**73**) wurden die Testreaktionen zur Harnstoffsynthese an fester Phase durchgeführt (Kapitel 4.1.10).

4.1.8 Harnstoffsynthese in Lösung

Die Lösungssynthese des Schlüsselbausteins **75** (Abbildung 29) begann mit der *in situ* Generierung des Isocyanates **66**. Nach der Zugabe von DIPEA zu dem in trockenem Dichlormethan, gelösten *N*^α-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-isoleucin-*tert*-butylester (**74**) zeigt eine sofort auftretende intensive Gelbfärbung die Bildung des Isocyanates **66** an.

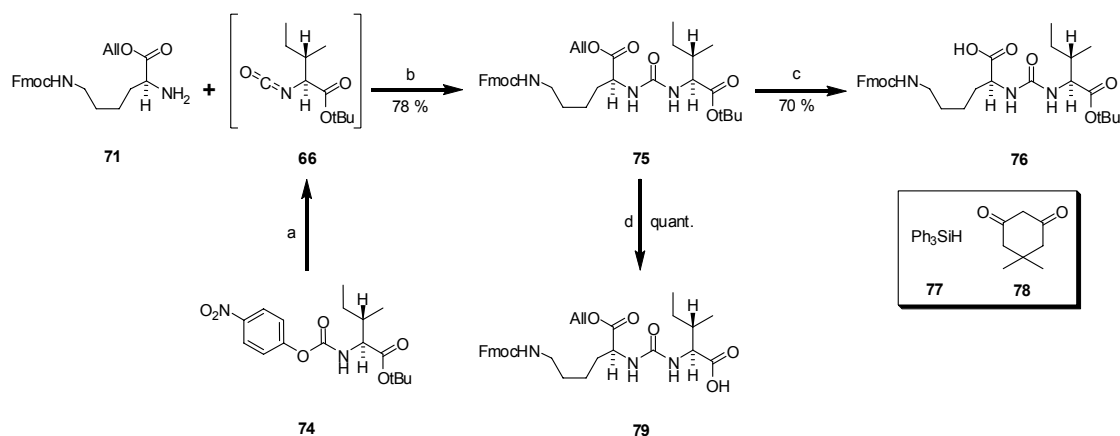


Abbildung 29 Synthese des Schlüsselbausteins **75** und selektive Spaltung der Ester:

a) abs. CH₂Cl₂, 0 °C; 2 Äq. abs. DIPEA; b) abs. CH₂Cl₂, 1 h 0 °C, 16 h RT; c) 0.1 Äq. Pd(PPh₃)₄, 10 Äq. Dimedon, abs. THF, 90 min, RT; d) CH₂Cl₂:TFA 1:1, 3 h, RT.

Die selektive Spaltung des Allylesters **75** gelang unter Verwendung von Pd(PPh₃)₄.¹²⁹ Als Allylakzeptor dienten zuerst Triphenylsilan (**77**) später Dimedon (**78**). Die vollständige Entfernung des Überschuss an eingesetztem Triphenylsilan erwies sich sowohl mittels Hochvakuum als auch durch Säulenchromatographie als schwierig, während das alternativ verwendete Diketon Dimedon (**78**) problemlos abgetrennt werden konnte.

4.1.9 Beladung des Harzes mit Harnstoffbausteinen

Die Beladung des 2-Chlortritylchloridharzes (**70**, Abbildung 30) wurde zuerst analog zur Literatur durchgeführt.¹³⁰ Allerdings wurde so nur eine Beladung von 0.1 mmol g⁻¹ erzielt.

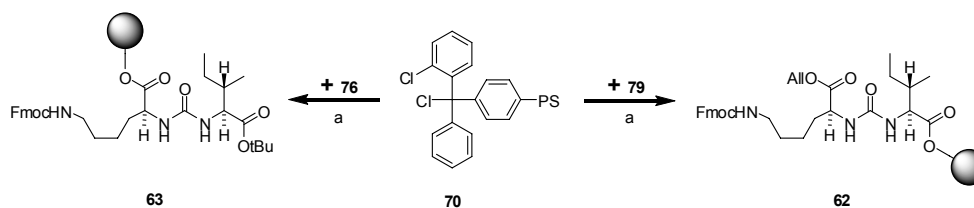


Abbildung 30 Beladung des polymeren Trägers mit den in Lösung synthetisierten Harnstoffen:

- a) i: 1.2 Äq. **76** bzw. **79**, 4.8 Äq. DIPEA, abs. CH_2Cl_2 , 16 h;
 b) ii: CH_2Cl_2 / MeOH / DIPEA (17:2:1, v/v), 30 min.

In Folge wurden die Reaktionszeit und die für die Beladung verwendeten Lösungsmittel optimiert. Die Verwendung von DMF oder einer Mischung aus DMF und Dichlormethan erhöhte die Ausbeute der Reaktion nicht. Eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeiten auf 16 h verbesserte die Ausbeute auf 75 bzw. 82 %. Die festphasengebundenen Harnstoffe **62** und **63** konnten mit einer Beladung von ca. 0.6 mmol g^{-1} erhalten werden.

Die im folgenden Absatz genannten Formeln sind in Kapitel 6.4.3 angegeben. Als Grundlagen für die Berechnungen der Beladung (in mmol g^{-1}) von Harzen (Formel 6) und Ausbeuten von Festphasenreaktionen (Formel 7 und Formel 8) dienen die Bestimmung der Massendifferenz des Harzes vor und nach einer Reaktion bzw. die Absorption einer DMF-Piperidin-Lösung (Fmoc-Test¹²⁴).

4.1.10 Harnstoffsynthese an fester Phase

Zunächst wurden zur Harnstoffsynthese an fester Phase in Anlehnung an eine Literaturvorschrift Testreaktionen durchgeführt.⁶⁸ Die Synthese an fester Phase begann mit der Beladung von 2-Chlortritylchloridharz, mit Fmoc-L-Isoleucin, der $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus für die Beladungen ist in Abbildung 31 dargestellt. Nach der Deprotonierung der Aminosäure **80** durch DIPEA (**81**) erfolgt der nukleophile Angriff des Carbonsäureanions **82** auf die 2-Chlortritylchloridankergruppe (**70**). Unter Abspaltung von HCl entsteht der am Harz verankerte Ester (**83**).

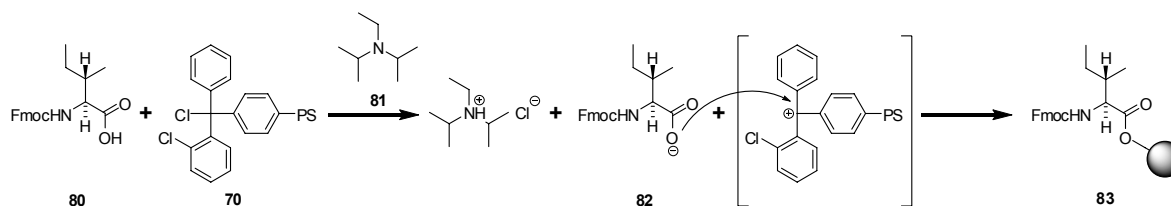


Abbildung 31 S_N1 -Mechanismus zur Beladung von 2-Chlortritylharz mit einem Fmoc-L-Isoleucin.

Die eigentliche Harnstoffsynthese an fester Phase (Abbildung 32) begann mit der Entschützung von **83** und dessen Umsetzung mit einem Überschuss des *in situ* erzeugten Isocyanats **72**. Die bei der Zugabe von DIPEA zu **73** sofort auftretende Gelbfärbung durch abgespaltenes 4-Nitrophenolat zeigte die Entstehung des Isocyanates **72** an. Nach gründlichem Waschen des Harzes wurde ein Kaiser-Test¹³¹ auf freie Amine durchgeführt. Die ausbleibende Blaufärbung zeigte die vollständige Umsetzung des freienamins **84** an und die nach einer Testabspaltung (Kapitel 6.4.6) durchgeführte Analyse mittels HPLC/MS zeigte die Entstehung des Produktes **62** an.

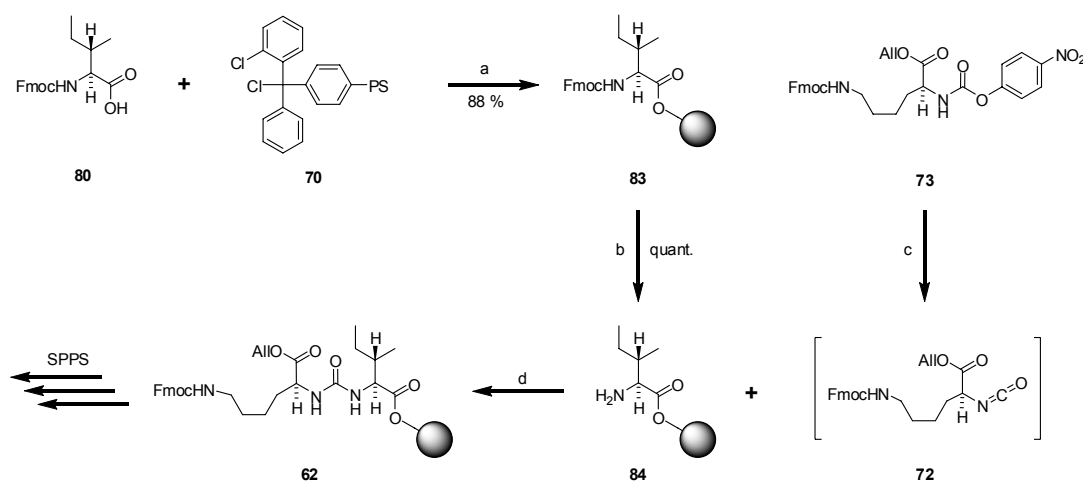


Abbildung 32 Harnstoffsynthese an fester Phase:

- a) i: 1.2 Äq. **80**, 4.8 Äq. DIPEA, abs. CH_2Cl_2 , RT, 2 h; ii: CH_2Cl_2 / MeOH / DIPEA (17:2:1, v/v), 30 min;
 b) DMF:Piperidin (4:1), 15 min; c) 1 Äq. DIPEA, DMF; d) 3 Äq. **73**, DMF, RT, 3 h.

Bei der Abspaltung der Fmoc-Gruppe von **63** durch Zugabe von DMF:Piperidin trat unerwartet eine intensive, für das 4-Nitrophenolat (**68**) charakteristische Gelbfärbung auf. Auch nach intensivem Waschen trat diese Gelbfärbung weiterhin auf, die HPLC/MS Analyse nach Testabspaltungen zeigte keine Nebenprodukte an. Nach Abschluss der Festphasensequenz wurde aber nur ein unlösliches Produkt erhalten.

Aufgrund des erfolgreichen Einsatzes des in Lösung synthetisierten Harnstoffs wurde der Ansatz der Harnstoffsynthese an fester Phase nicht weiterverfolgt, sondern die Lösungssynthese des vollständig orthogonal geschützten Harnstoffs **75** optimiert.

4.1.11 Darstellung der Zyklisierungsvorläufer

Um die spätere kombinatorische Synthese einer Substanzbibliothek zu ermöglichen bzw. die entsprechenden Reaktionsbedingungen zu erproben, erfolgte die Festphasenpeptidsynthese der offenkettigen Peptide **85** (Abbildung 34) und **86** (Abbildung 35) in IRORI MacroKans™. Das Harz wurde auf mehrere IRORI MacroKans™ aufgeteilt und diese jeweils in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß mit Lösungsmittel bedeckt. Die Knüpfung der einzelnen Peptidbindungen erfolgte jeweils mit den Kupplungsreagenzien DIC (**87**) und HOBt (**88**). Für die Kupplung auf *N*-methylierte Aminosäuren (**89**, **90**) wurden die stärker aktivierenden Kupplungsreagenzien HATU (**91**) und HOAt (**92**) verwendet (Abbildung 33).

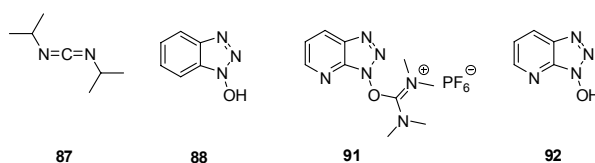


Abbildung 33 Verwendete Kupplungsreagenzien: DIC, HOBt, HATU, HOAt.

Während der Synthesen der ersten Verbindungen wurde die Vollständigkeit der Peptidkupplungen nach dem Waschen der Harze mittels Kaiser-Test¹³¹ bzw. nach der Kupplung auf die *N*-methylierten Amine **89** (Abbildung 34) und **90** (Abbildung 35) mit dem Chloranil-Test¹³² überprüft und gegebenenfalls Doppelkupplungen durchgeführt.

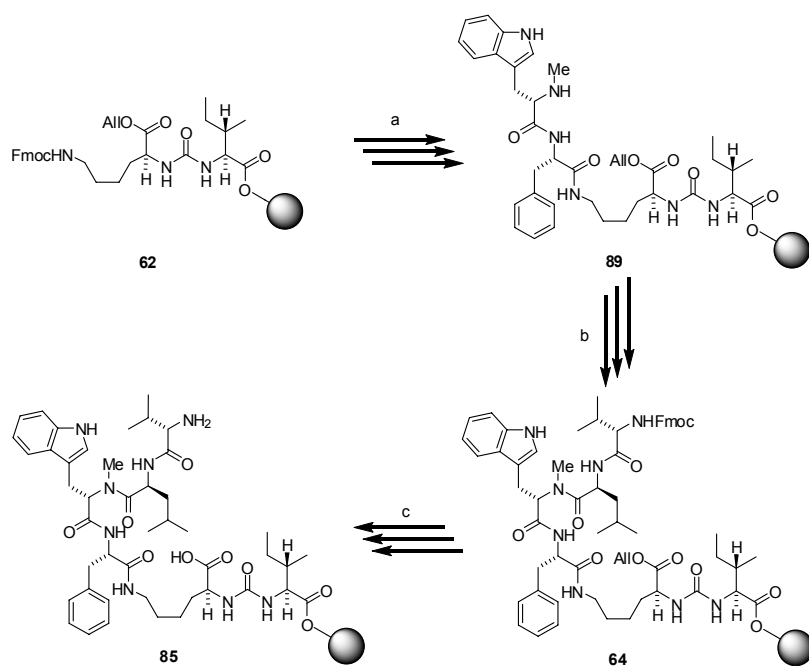


Abbildung 34 Synthese des Zyklisierungsvorläufers für die Makrolaktamisierung an fester Phase:
 a) i: DMF/Piperidin 4:1; ii: 3 Äq. Fmoc-L-Phe, 3 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 2 h; iii: DMF/Piperidin 4:1; iv: 3 Äq. Fmoc-L-NMe-Trp, 3 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 2 h; v: DMF/Piperidin 4:1; b) i: 3 Äq. Fmoc-L-Leu, 3 Äq. HATU/HOAt, 6 Äq. DIPEA, DMF, RT, 3 h; ii: DMF/Piperidin 4:1; iii: 3 Äq. Fmoc-L-Val, 3 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 2 h; c) i: 0.05 Äq. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 10 Äq. PhSO_2Na , abs. DMF, RT, 16 h; ii: DMF/Piperidin 4:1.

Ziel war es optimierte Kupplungsbedingungen zu finden, da das wiederholte Waschen, Öffnen, Testen und die Durchführung von Doppelkupplungen bei der kombinatorischen Festphasensynthese mit IRORI MacroKans™ eine deutliche Verlängerung der Gesamtzeit der Synthese bedeutet. Bei der Verwendung von je drei Äquivalenten Fmoc-geschützter Aminosäuren und Kupplungsreagenzien ($c = 150 \text{ mM}$) erwies sich eine Reaktionszeit von 2 h als stets ausreichend, um die N- und C-terminal geschützten, festphasengebundenen Hexapeptide **64** und **65** ohne Doppelkupplungen zu erhalten. Eine Teilmenge der erhaltenen Produkte wurde vom polymeren Träger abgespalten um mittels HPLC/MS bzw. NMR-Spektroskopie die erfolgreiche Synthese der noch geschützten Zyklisierungsvorläufer **64** und **65** festzustellen.

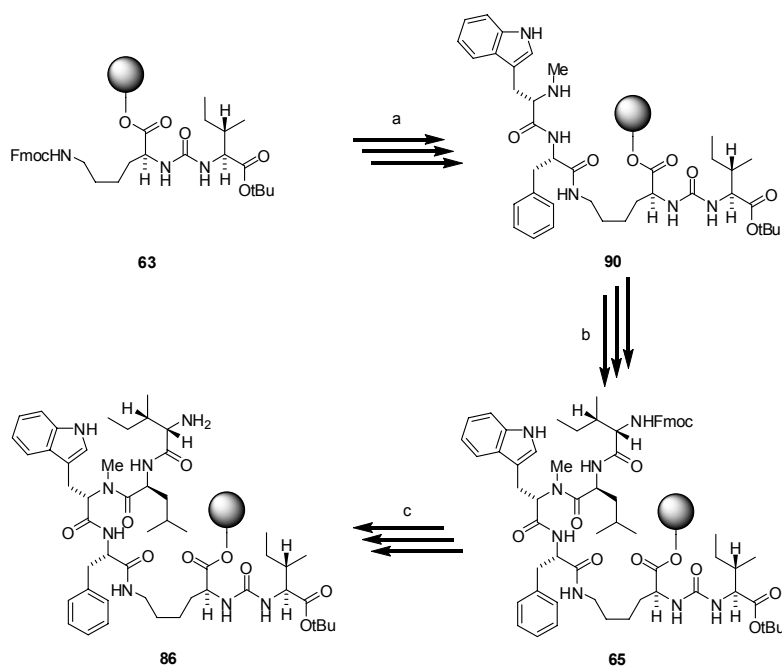


Abbildung 35 Synthese des Zyklisierungsvorläufers für die Makrolaktamisierung in Lösung:

a) i: DMF/Piperidin 4:1; ii: 3 Äq. Fmoc-L-Phe, 3 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 2 h; iii: DMF/Piperidin 4:1; iv: 3 Äq. Fmoc-L-NMe-Trp, 3 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 2 h; v: DMF/Piperidin 4:1; b) i: 3 Äq. Fmoc-L-Leu, 3 Äq. HATU/HOAt, 6 Äq. DIPEA, DMF, RT, 3 h; ii: DMF/Piperidin 4:1; iii: 3 Äq. Fmoc-L-Ile, 3 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 2 h; c) DMF/Piperidin 4:1.

Im Anschluss an die Festphasenpetidsynthese erfolgte die Freisetzung der Zyklisierungsstellen: Die Spaltung des C-terminalen Allylestere (**64**, Abbildung 34) erfolgte unter Verwendung von Tetrakis-triphenylphosphin-Paladium¹³³ (2.5 mM) und Phenylsulfinsäure-Natriumsalz (**93**, 500 mM).¹³⁴ Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 36 dargestellt.

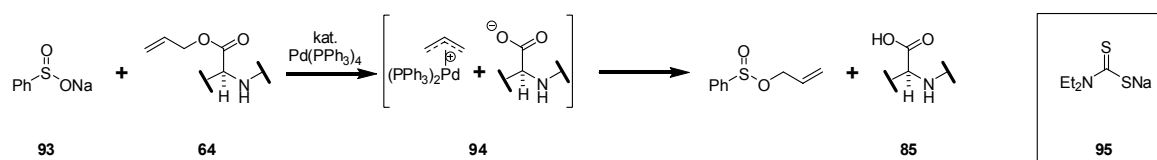


Abbildung 36 Mechanismus zur Pd(0) katalysierten Allylesterspaltung
- Freisetzung der Zyklisierungsstelle.

Pd(0) spaltet den Allylester **64** in Carbonsäureanion und Pd-Allylkomplex (**94**). Der große Überschuss an Phenylsulfinsäurenatriumsalz (**93**) dient als Akzeptor der das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der gewünschten Produkte verschiebt und die

Allylübertragung auf andere Nucleophile unterbindet. Durch Waschen mit Natriumdiethyldithiocarbamat (**95**) (0.5 % in DMF, 6 × 5 min) wurden Palladiumreste vom Harz entfernt und die harzgebundene Carbonsäure **85** erhalten.⁶⁸ Die *N*-terminalen Fluorenylmethoxygruppen (**64**, Abbildung 34 und **65**, Abbildung 35) wurden mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten.

4.1.12 Makrolaktamisierung an fester Phase

Für die Ringschlußreaktion an fester Phase wurden folgende Kupplungsreagenzien bzw. deren Kombinationen erprobt: DIC/HOBt, DIC/C₆F₅OH, DIC, HATU/HOAt, PyBrop (Abbildung 37). Das Harz mit dem offenkettigen Vorläufer **85** (Abbildung 39) wurde in DMF mit drei Äquivalenten (150 mM) der jeweiligen Kupplungsreagenzien über Nacht geschüttelt. Die HPLC/MS Analyse nach Testabspaltung zeigte mit einer Ausnahme die vollständige Umsetzung des offenkettigen Eduktes (PyBrop ca 50 %) zum gewünschten Produkt (**98**) und in geringen Mengen zum Dimer.

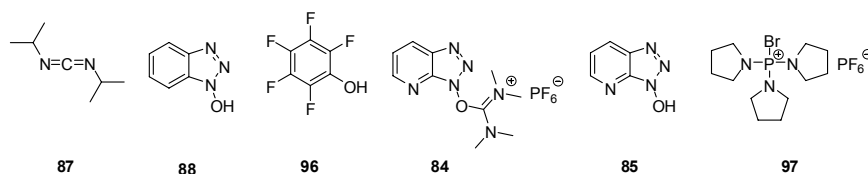


Abbildung 37 Verwendete Kupplungsreagenzien:

DIC, HOBt, C₆F₅OH, HATU, HOAt, PyBrop.

Die Oligomerisierung ist die häufigste Nebenreaktion bei der Synthese zyklischer Peptide. Anders als bei Zyklisierungen in Lösung ist ein Teil der Edukte, durch Verankerung an verschiedenen Harzpartikeln (**I**, **II**, Abbildung 38), dauerhaft räumlich voneinander getrennt. Das Verhältnis von inter- zu intramolekularen Reaktionen und damit die Ausbeute sind unter anderem abhängig von der räumlichen Nähe der offenkettigen Vorläufer auf (**85-II**, **85-III**) einem Harzpartikel (**II**). Deswegen sollte durch eine Verringerung der Beladung der intramolekulare Ringschluss begünstigt werden.

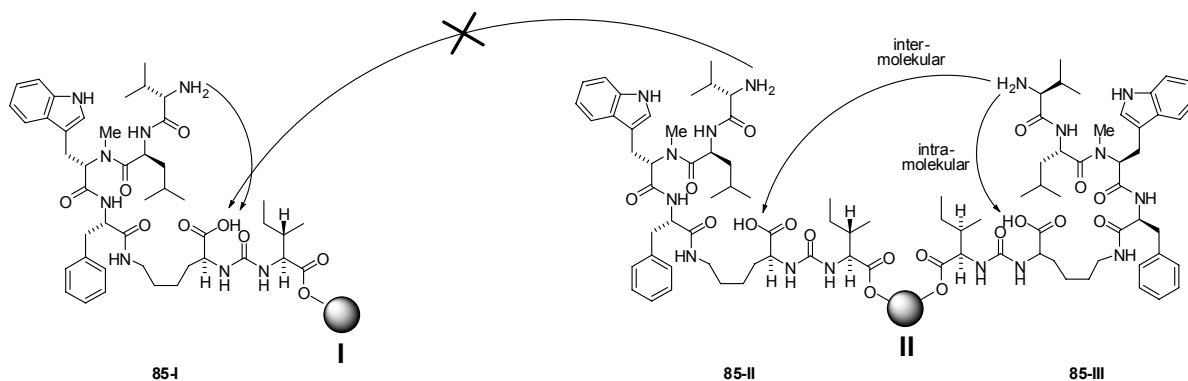


Abbildung 38 Bildung von Di- oder Oligomeren bei der Zyklisierung an fester Phase.

Eine Verringerung der bei der Beladung des 2-Chlortrityl-polystyrolharzes (Beladung mit der Ankergruppe 0.7 mmol g^{-1}) verwendeten Menge des Harnstoffs **79** (Abbildung 30) von 1.2 (30 mM) über 0.6 auf 0.3 Äquivalente führte jedoch nicht zu höheren Gesamtausbeuten an zyklisiertem Produkt **99** in Bezug auf **62** (in $\text{mg Produkt / g Harz}$). Auch die Verwendung eines in Lösung besonders stark aufquellenden TentaGel-Harzes¹²⁵ mit einer Ankergruppenbeladung von nur 0.25 mmol g^{-1} verbesserte die Gesamtausbeuten nicht.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden folgende optimierte Ringschlußbedingungen verwendet: 6 Äquivalente DIC/HOBt (300 mM) und 16 h schütteln in DMF (Abbildung 39). Die Verwendung von sechs Äquivalenten (300 mM) Kupplungsreagenz erwies sich als notwendig, da bei dem Einsatz der sonst verwendeten 3 Äquivalente (150 mM) auch bei einer Reaktionszeit von 16 h der Umsatz des offenkettigen Vorläufers **85** nicht immer vollständig war.

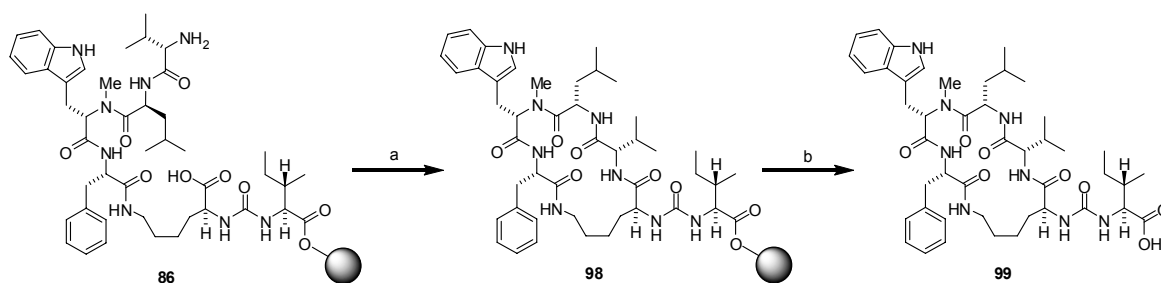


Abbildung 39 Optimierte Bedingungen für die Makrolaktamisierung an fester Phase:

a) 6 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 16 h ; b) 2% TFA in CH_2Cl_2 , RT.

Die Abspaltung des festphasengebundenen Produktes **98** vom polymeren Träger erfolgte mit zwei Prozent Trifluoressigsäure (260 mM) in Dichlormethan. Auf diese Weise konnte das zyklische Peptid als farbloser Feststoff erhalten werden. Die auf den festphasengebundenen Harnstoff **62** (Abbildung 34) bezogene Gesamtausbeute betrug 11 % über 12 Stufen.

4.1.13 Makrolaktamisierung in Lösung

Als Alternative zum Ringschluß an fester Phase wurde die Makrolaktamisierung zusätzlich in Lösung durchgeführt. Die Abspaltung des entsprechenden, an fester Phase synthetisierten Vorläufers **86** erfolgt mit zwei Prozent TFA in Dichlormethan, der *tert*-Butylester erwies sich unter diesen Bedingungen wie erwartet als stabil (Abbildung 40). Der Zyklisierungsvorläufer **100** wurde in THF gelöst und mittels einer Spritzenpumpe langsam zu einer Lösung der Kupplungsreagenzien zugetropft. Aus dieser Art der Reaktionsführung, der sogenannten Pseudohochverdünnung, resultiert eine stets niedrige Konzentration (gewöhnlich < 1 mM) von **100** in der Reaktionslösung und damit eine Bevorzugung der Zyklisierung gegenüber der Oligomerisierung.¹³⁵ Aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Reagenzien zur Synthesen zyklischer Peptide^{69, 118, 127} wurde die erfolgversprechende Kombination aus HATU und HOAt gewählt¹³⁶ und der zyklisierte *tert*-Butylester **101** in einer Ausbeute von 15 % erhalten.

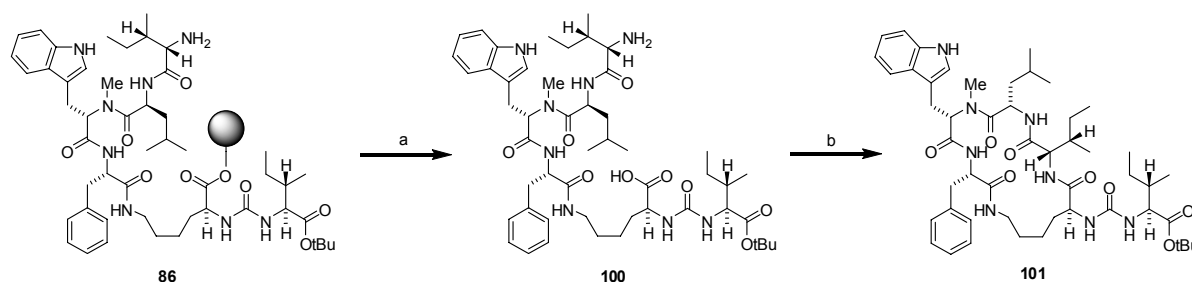


Abbildung 40 Makrolaktamisierung in Lösung:

a) 2 % TFA in CH₂Cl₂, RT; b) 1.2 Äq. HATU/HOAt, 4.8 Äq. DIPEA, THF,
Zugabe von **100** über 16 h (Endkonzentration 0.5 mM).

Die vielversprechende Ausbeute der Makrolaktamisierung in Lösung von 15 % konnte durch eine Verdoppelung der Zeitspanne für die Zugabe des Zyklisierungsvorläufers **100**, zu den Kupplungsreagenzien noch einmal deutlich auf 20 % erhöht werden (siehe Tabelle 4). Jedoch konnte auch bei noch langsamerer Zugabe und noch niedrigerer Endkonzentration die Ausbeute nicht weiter gesteigert werden. Die Reaktionslösung enthielt nach vollendeter langsamer Zugabe des Eduktes stets noch einen hohen Anteil des nicht zyklisierten Vorläufers **100**. Auch die Zugabe von weiterem Kupplungsreagenz und längere Reaktionszeiten führten nicht zu einem vollständigen Umsatz des linearen Peptids.

Zeit	Endkonzentration	Ausbeute
8 h	0.5 mM	15 %
16 h	0.5 mM	20 %
40 h	0.25 mM	21 %

Tabelle 4 Optimierung der Zyklisierung in Lösung.

Die Aufreinigung des nach der Zyklisierung erhaltenen Rohproduktes erfolgte mittels HPLC (Methanol / Wasser, 65:35, v/v). Nach der Gefriertrocknung lag das zyklische Peptid als farbloser Feststoff vor. Zwar lag die Ausbeute der Zyklisierungen in Lösung mit ca. 20 % über der Gesamtausbeute der Festphasensequenz (ca. 10 %), jedoch erscheint im Hinblick auf die Darstellung einer fokussierten Substanzsammlung der letztere synthetische Ansatz vielversprechender.

4.1.14 Aufklärung der Stereochemie von Brunsvicamid A

Das durch Zyklisierung an fester Phase erhaltene Produkt **99** wurde mittels NMR-spektroskopischer Methoden charakterisiert: Das entsprechend den in der Literatur angegebenen Messbedingungen bei 500 MHz in Methanol aufgenommene Protonenspektrum wies die für die Brunsvicamide charakteristische Merkmale auf. Beispielfhaft seien hier die beiden Signale der Harnstoffprotonen bei ca. 6 ppm genannt oder die durch den vom *N*-Methyl-tryptophan bedingten Anisotropieeffekt stark hochfeldverschobenen Signale der L-Leucin-Seitenkette bei 0 ppm bzw. -0.6 ppm. Das erhaltene Protonenspektrum war dem in der Literatur für den Naturstoff beschriebenen ähnlich, jedoch nicht mit diesem identisch.

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren sowie eine HPLC-Koinjektion, von isoliertem Naturstoff und synthetischem Material (**99**) zeigten zweifelsfrei, dass es sich bei **99** nicht um den Naturstoff handeln konnte.

Bei dem Vergleich der ¹³C-NMR-Spektren von **99** und des Naturstoffs fielen die großen Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Signale des L-Lysins und L-Isoleucins auf (Abbildung 42). Während die chemischen Verschiebungen der Signale vor allem im aromatischen Bereich fast identisch sind, weisen z.B. die Signale für die Kohlenstoffatome α bis γ des L-Lysins und des β - bzw. des

Carbonylkohlenstoffs des L-Isoleucins Unterschiede von 1.5 bis 3 ppm auf. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nummerierung der Kohlenstoffatome ist in Abbildung 41 dargestellt.

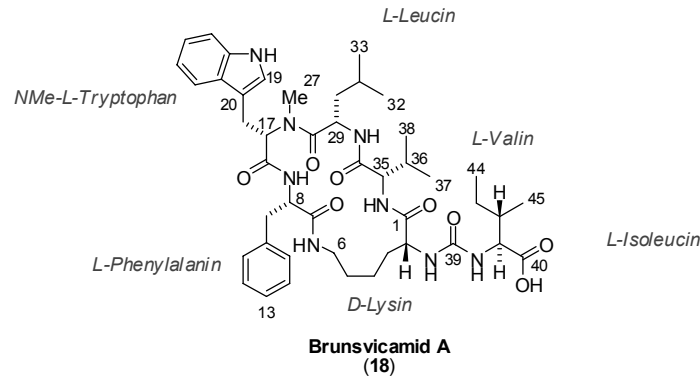


Abbildung 41 Verwendete Nummerierung der Kohlenstoffatome.

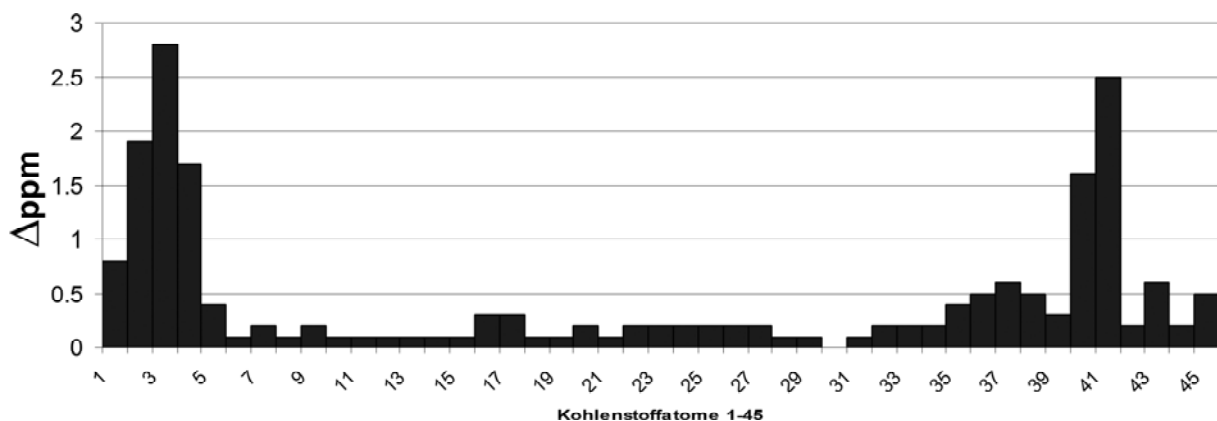


Abbildung 42 Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen der Signale in ^{13}C -NMR-Spektren von **99** und den für den Naturstoff publizierten Daten⁷³.

Da die Aminosäuresequenz des Naturstoffs nach der Isolierung zweifelsfrei ermittelt worden war, legte die Analyse der von **99** aufgenommenen NMR-Spektren den Schluss nahe, dass sich **99** in der Konfiguration von mindestens einem stereogenen Zentrum vom Naturstoff unterscheidet. Die größte Diskrepanz trat zwischen den publizierten und gemessenen Verschiebungen der Kohlenstoffsignale des L-Lysins und L-Isoleucins auf und stellte damit die Zuordnung der zugehörigen Stereozentren in Frage. In Kapitel 2.1 wurde bereits diskutiert, dass der Einbau nicht proteinogener Aminosäuren in Sekundärmetaboliten ein allgemeines Charakteristikum für die nicht ribosomale Peptidsynthese der Cyanobakterien ist. Ganz besonders bemerkenswert

ist, dass mit Ausnahme der Brunsvicamide alle aus Cyanobakterien isolierten Anabaenopeptide ein D-Lysin beinhalten. Damit erschien es naheliegend Analoga von **99** zu synthetisieren und dabei die Stereochemie des L-Lysins und des L-Isoleucins zu variieren, um so die korrekte Stereochemie des Brunsvicamid A (**18**) zu ermitteln.

Isoleucin ist neben Threonin die einzige Aminosäure, die in ihrer Seitenkette ein zweites Stereozentrum aufweist. Im proteinogenen L-Isoleucin (**102**) weisen beide Stereozentren S-Konfiguration auf, in seinem Spiegelbild dem D-Isoleucin (**103**) R-Konfiguration (Abbildung 43).

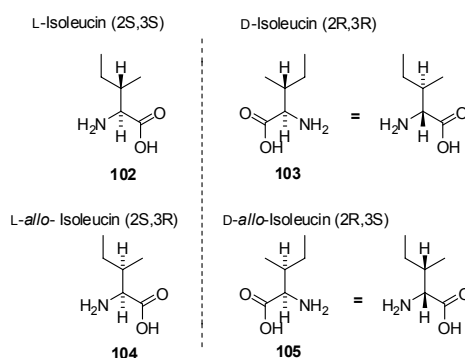


Abbildung 43 Die vier Diastereoisomere des Isoleucins.

Zu diesen beiden Enantiomeren gibt es je ein Diastereoisomer, das sich in der Konfiguration des Stereozentrums in der Seitenkette unterscheidet und als L-*allo*- (**104**) bzw. D-*allo*-Isoleucin (**105**) bezeichnet wird.

Für die Ermittlung der korrekten Stereochemie des Naturstoffs war es notwendig die, drei Stereozentren im Harnstofffragment zu variieren, also acht Analoga zu synthetisieren.

Für die Darstellung der acht Analoga war die Synthese von drei weiteren 4-Nitrophenylcarbamaten und sieben zusätzlichen Harnstoffen notwendig. Die Synthese der benötigten Bausteine begann mit der Umsetzung von 4-Nitrophenolchlorameisensäure (**39**) mit jeweils dem D-*allo*- (**106**), D- (**107**) und L-*allo*-Isoleucin-*tert*-butylester (**108**, Abbildung 44). Die 4-Nitrophenylcarbamate des

D-*allo*- (**109**), D- (**110**) und L-*allo*-Isoleucin-*tert*-butylesters (**111**) wurden jeweils als farblose Öle und in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten wurden.

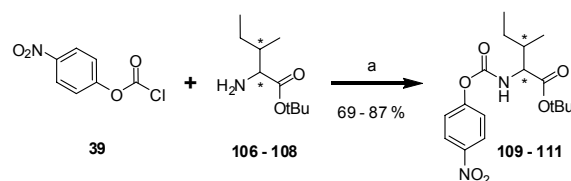


Abbildung 44 Synthese von vier Analoga zum 4-Nitrophenolcarbammat **74**:

a) 8 Äq. Pyridin, abs. CH_2Cl_2 , 1 h, 0 °C, 16 h, RT.

Diese wurden jeweils mit den L- und D-Lysinbausteinen **71**, **38** umgesetzt und so die sieben zusätzlichen Harnstoffe **112** - **118** erhalten, welche in die freien Säuren **119** - **125** überführt wurden (Abbildung 45). Die Harnstoffe wurden als farblose Feststoffe erhalten und die Gesamtausbeuten betragen 70 bis 83 %.

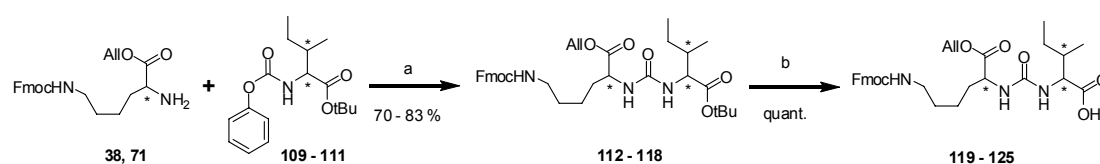


Abbildung 45 Synthese von sieben Analoga zum Harnstoff **79**:

a) 2 Äq. abs. DIPEA, abs. CH_2Cl_2 , 1 h 0 °C, 16 h RT, b) CH_2Cl_2 :TFA 1:1, 3 h RT.

Acht Portionen Harz wurde mit den Harnstoffen **79** und **119** - **125** beladen und sowohl die Festphasenpeptidsynthese als auch die Zyklisierung wurden an fester Phase durchgeführt. Nach der Abspaltung vom polymeren Träger und Aufreinigung mittels HPLC wurden die acht Brunsvicamid A Analoga **18**, **99** und **126** - **131** in Gesamtausbeuten von 11 bis 18 % erhalten (Abbildung 46).

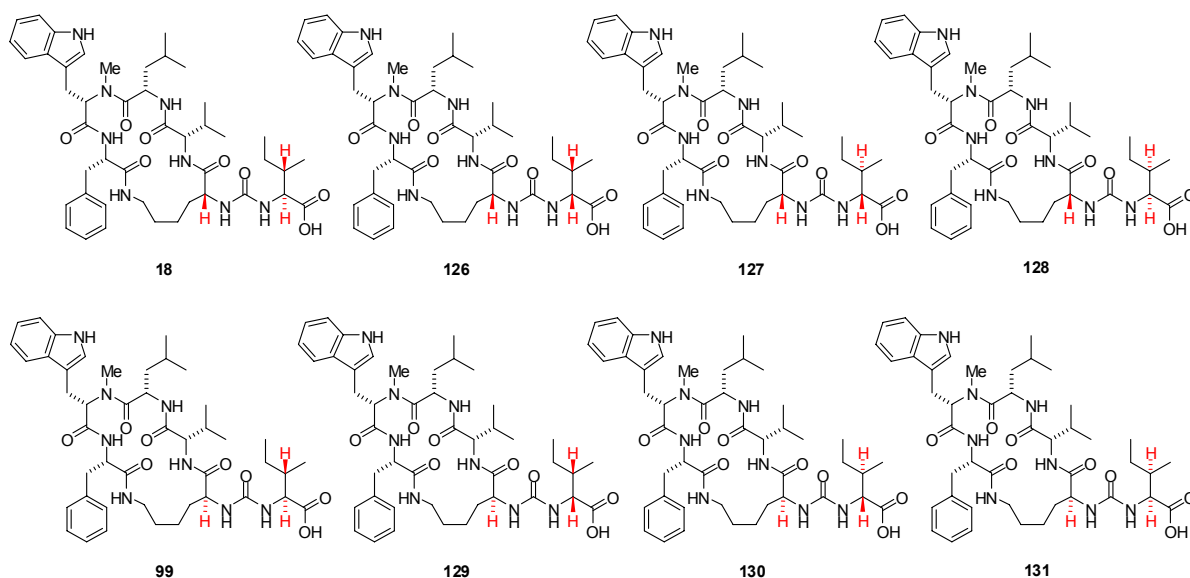


Abbildung 46 Acht durch die Variation von drei Stereozentren erhaltene Brunsvicamid A Analoga.

Es wurden für alle acht Verbindungen Protonen und Kohlenstoffspektren aufgenommen die mittels 2D-NMR-Spektren vollständig zugeordnet wurden. Die Protonenspektren der L-Lysin enthaltenen Analoga **99** und **129** – **131** sind in Abbildung 47 dargestellt.

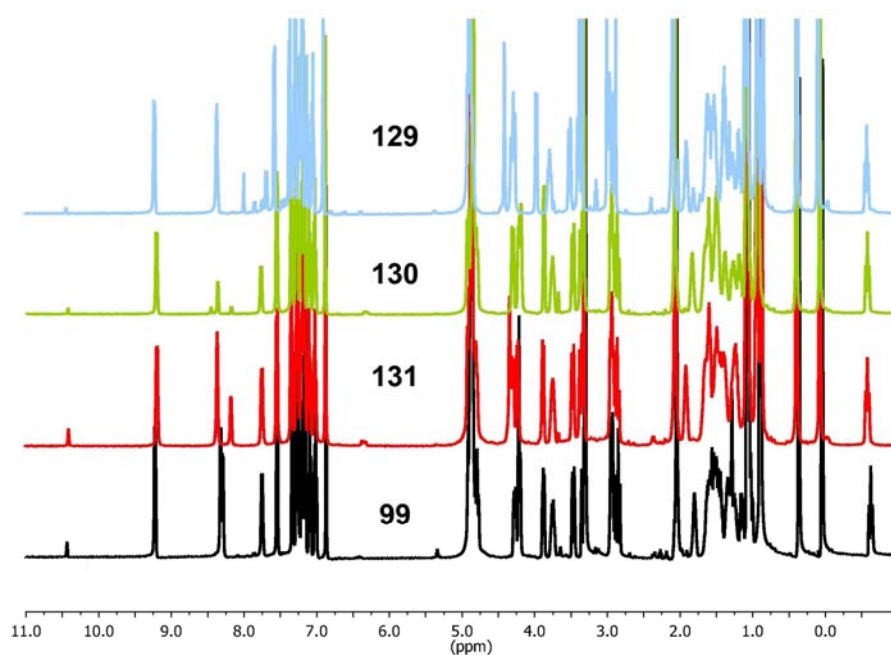


Abbildung 47 500 MHz ¹H-NMR Spektren der L-Lysin enthaltenen Brunsvicamid A Analoga **99** und **129** - **131**.

Die Protonenspektren der D-Lysin enthaltenen Analoga **18** und **126 - 128** sind in Abbildung 48 dargestellt. Die Spektren aller acht Verbindungen sind sehr ähnlich aber nicht identisch. Die Retentionszeiten von **18**, **99** und **126 - 131** und isoliertem BVA A wurden mittels analytischer HPLC verglichen. Dieser Vergleich zeigte, dass der Naturstoff kein L-Lysin enthält.

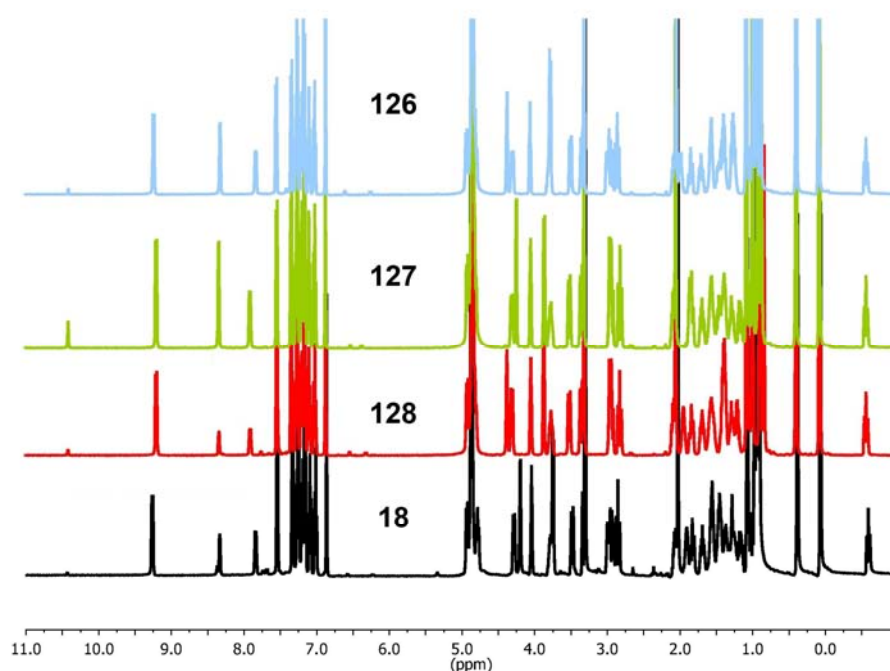


Abbildung 48 500 MHz ^1H -NMR Spektren der D-Lysin enthaltenden Brunsvicamid A Analoga **18** und **126 bis 128**.

Die charakteristischen Unterschiede der Protonenspektren der vier D-Lysin enthaltenen Brunsvicamide **18** und **126 - 128** finden sich in dem Verschiebungsbereich von 3.7 bis 4.5 ppm (Abbildung 49). Hier befinden sich in unterschiedlicher Abfolge die Signale des jeweiligen Isoleucin- H_α (**41**), L-Leucin- H_α (**29**), D-Lysin- H_α (**2**), eines D-Lysin- H_ϵ (**6**) und des L-Valin- H_α (**35**).

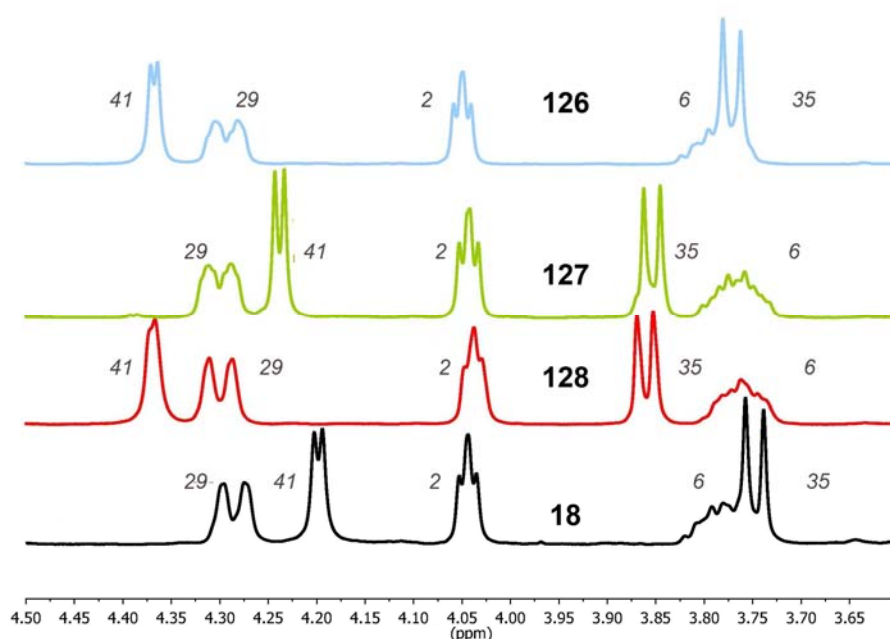


Abbildung 49 Charakteristischer Ausschnitt der 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ Spektren der *D-Lysin* enthaltenden *Brunsvicamid A* Analoga **18** und **126** bis **128**.

Die für den Naturstoff publizierten Daten beschreiben eine Überlagerung der Signale des *D-Lysin*- H_ϵ (6) und des *L-Valin*- H_α (35). Diese Überlagerung findet sich nur in den Spektren der Verbindungen **18** und **126**. Die Abfolge der Signale für *L-allo-Isoleucin*- H_α (41), *L-Leucin*- H_α (29) und *D-Lysin*- H_α (2) in den Spektren der Verbindung **126** stimmt nicht mit der Abfolge der entsprechenden Signale des Naturstoffs überein. Für Verbindung **18** stimmt zwar die Abfolge der Signale, nicht aber ihre Position zueinander überein. Keines der acht aufgenommenen Protonenspektren (Abbildung 47 und Abbildung 48) war mit dem Spektrum des Naturstoffs identisch.

Jedoch waren die Retentionszeiten und die Spektren von Verbindung **18** denen des Naturstoffs so ähnlich, dass eine Variation der NMR-Messbedingungen vielversprechend erschien. Eine Veränderung der Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Signallage, wohl aber eine Veränderung des pH-Wertes: Bei pH 10 erhaltene Spektren waren mit denen des Naturstoffs identisch (Abbildung 50).

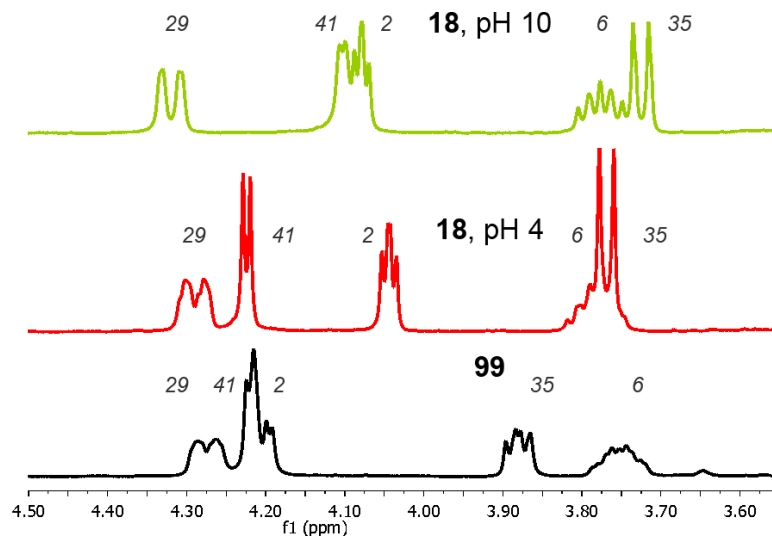


Abbildung 50 Charakteristischer Ausschnitt der bei unterschiedlichen pH-Werten aufgenommenen 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ Spektren von **18** und **99**.

Diese pH-Abhängigkeit galt nicht nur für die Protonen- sondern auch für die Kohlenstoffspektren (Abbildung 51). Besonders auffällig waren die veränderten chemischen Verschiebungen des L-Isoleucin C- α und seines Carbonylkohlenstoffs.

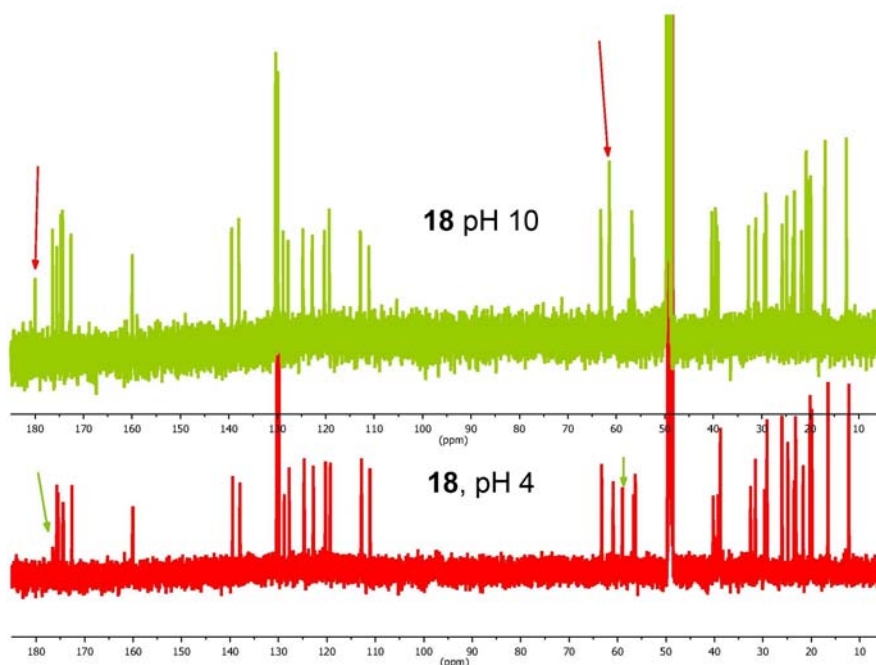


Abbildung 51 126 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ Spektren der D-Lysin enthaltenden Verbindung **18** bei unterschiedlichen pH-Werten.

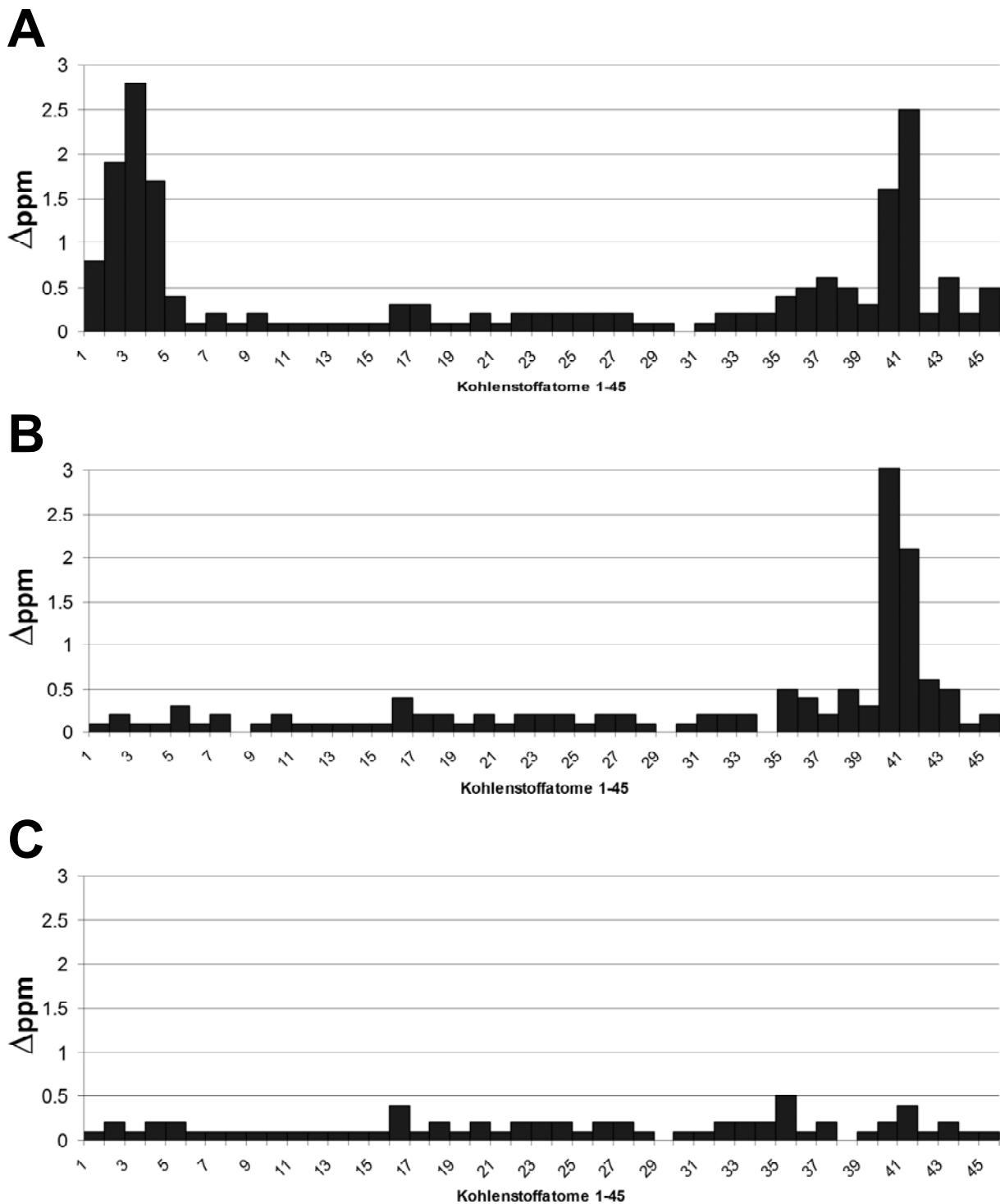


Abbildung 52 Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen der Signale in ^{13}C -NMR Spektren von **99** (L-), **18** (D-Lysin) und den für den Naturstoff publizierten Daten:
A: **99** bei pH 7, **B:** **18** bei pH 7, **C:** **18** bei pH 10.

Die Unterschiede zwischen gemessenen und für den Naturstoff publizierten Daten waren für das L-Lysin enthaltende **99** im Bereich des Lysins und L-Isoleucins besonders groß (Abbildung 52). Für das D-Lysin enthaltende **18** war die

Übereinstimmung im Bereich des Lysins bereits gut, und bei einem pH-Wert von 10 waren die für den Naturstoff publizierten Spektren nahezu identisch zu denen von **18**.

Der Vergleich von Retentionszeiten und die abschließende Koinjektion von isoliertem und synthetischem Material zeigten zweifelsfrei, dass **18** und der Naturstoff Brunsvicamid A identisch waren (Abbildung 53).

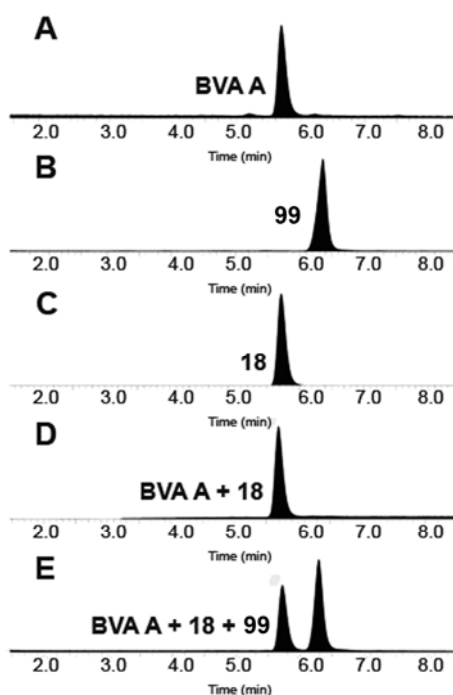


Abbildung 53 HPLC Spuren von Koinjektionen von isoliertem (**BVA A**) und synthetischem (**18**, D-; **99**, L-Lysin) Brunsvicamid A.

In Analogie zu den Verbindungen **18** und **99** wurden zwei Verbindungen mit der Aminosäuresequenz des Brunsvicamid B synthetisiert. **19** beinhaltet ein D-Lysin, **132** ein L-Lysin. Auch hier konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass **19** und der Naturstoff Brunsvicamid B identisch waren.

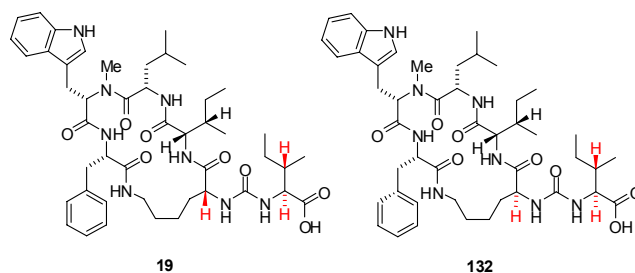


Abbildung 54 D-Lysin enthaltendes Brunsvicamid B (**19**) und L-Lysin enthaltendes Analogon (**132**).

Das Brunsvicamid C wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht synthetisiert aber da alle drei Brunsvicamide dem selben Ursprung entstammen und vermutlich durch den gleichen biosynthetischen Mechanismus hergestellt werden, weist vermutlich auch das Lysin im Brunsvicamid C (**19**) eine *R*-Konfiguration auf.

4.1.15 Synthese von Brunsvicamid A Analoga

Für die Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen wurde ein sogenannter Alanin-Scan¹³⁷ durchgeführt: Der Naturstoff Brunsvicamid A (**18**) wurde als Grundgerüst ausgewählt. Durch den Austausch jeweils nur einer Aminosäure der Sequenz sollten für die Enzym-Ligand Wechselwirkungen essentielle Aminosäuren identifiziert werden. Das L-Isoleucin des Harnstoffs sollte jetzt zu L- und D-Alanin variiert werden und die verbleibenden vier Aminosäuren jeweils zu L-Alanin und L-Serin bzw. das *N*-Methyl-L-Tryptophan zu *N*-Methyl-L-Alanin und *N*-Methyl-L-Serin.

Die Synthese der für den Alanin-Scan benötigten Harnstoffe begann mit der Umsetzung von 4-Nitrophenolchlorameisensäure (**39**) und L- bzw. D-Alanin-*tert*-butylester zu den Carbamaten **133** und **134** (Abbildung 55). Die beiden Carbamate wurden als farblose Öle in einer Ausbeute von 51 bzw. 67 % erhalten.

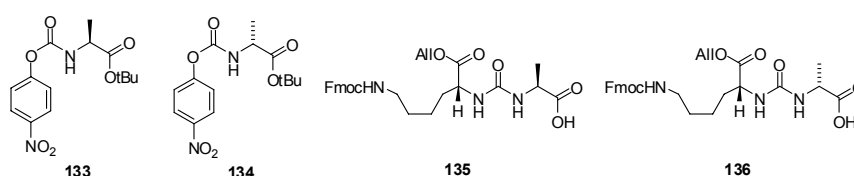


Abbildung 55 Für den Alanin-Scan dargestellte Bausteine.

Aus der Umsetzung der Carbamate **133** und **134** mit dem Lysin **38** wurden die vollständig geschützten Harnstoffe erhalten und anschließend in die freien Säuren **135** und **136** umgewandelt. Die Harnstoffe **135** und **136** wurden als farblose Feststoffe in einer guten Gesamtausbeute von jeweils 74 % erhalten.

Die Synthese dieser Substanzsammlung wurde mit zehn Portionen Harz in Analogie zu den vorherigen Synthesen durchgeführt. Die Harnstoffe **119**, **135** und **136** wurden an 2-Chlortritylchlorid-Polystyrolharz angeknüpft. Für die vier diversität-erzeugenden

Aminosäurenkupplungen erwiesen sich die vorab etablierte Festphasensynthese mit IRORI MacroKans™ (Abbildung 25) und der dafür entwickelte apparativer Aufbau (Abbildung 56) als hervorragend geeignet: Die IRORI MacroKans™ wurden auf verschiedene Flaschen aufgeteilt, flach auf dem Boden liegend mit möglichst wenig Reaktionslösung bedeckt und in jedem Reaktionsgefäß mit einem Aminosäurebaustein gekuppelt. Arbeitsschritte wie das Waschen oder Entschützen konnten gemeinsam in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden und reduzierten so den manuellen Arbeitsaufwand beträchtlich.



Abbildung 56 Apparativer Aufbau zur kombinatorischen Festphasensynthese.

Der Alanin-Scan wurde nach dem Prinzip der kombinatorischen „Split-and-Pool“ Synthese (Abbildung 57) durchgeführt.

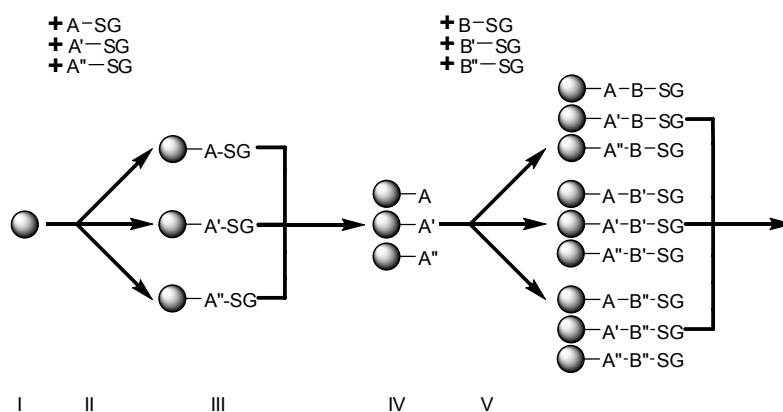


Abbildung 57 Prinzip der kombinatorischen „Split-and-Pool“ Synthese.

2-Chlortritylchloridharz (**I**) wurde mit verschiedenen Harnstoffen (**II**) beladen und so unterschiedliche festphasengebundene Harnstoffe (**III**) erhalten. Nach der Beladung konnten das Waschen und die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gemeinsam durchgeführt werden (**IV**). Nach dem manuellen Auslesen der RFID-tags (Radio Frequency IDentification-tags; tag engl. für Kennzeichnung oder Bezeichnungsschild) mit einem entsprechenden Frequenz-Scanner wurden die IRORI MacroKans™ sortiert (**V**) und in einem weiteren diversitätserzeugenden Schritt mit drei Aminosäuren gekuppelt. Die zehn offenkettigen Vorläufer wurden unter weiterer Verwendung der Split-and-Pool Methode vervollständigt, gemeinsam geschützt und der Ringschluß an fester Phase eingeleitet. Der Gesamtarbeitsaufwand konnte durch die gemeinsame Durchführung aller nicht diversitätserzeugenden Schritte stark reduziert werden. Für die Darstellung der zehn beim Alanin-Scan erhaltenen Verbindungen waren 144 statt 970 (10 × 97) Arbeitsschritte wie bei einer Parallelsynthese notwendig.

Die Synthese der Serin-haltigen Brunsvicamid Analoga erfolgte analog zu den in Abbildung 34 und Abbildung 39 gezeigten Syntheseschritten. Zusätzlich wurde der *tert*-Butylether noch mit 92.5 % TFA, 5 % Triethylsilan und 2.5 % H₂O gespalten wurden.

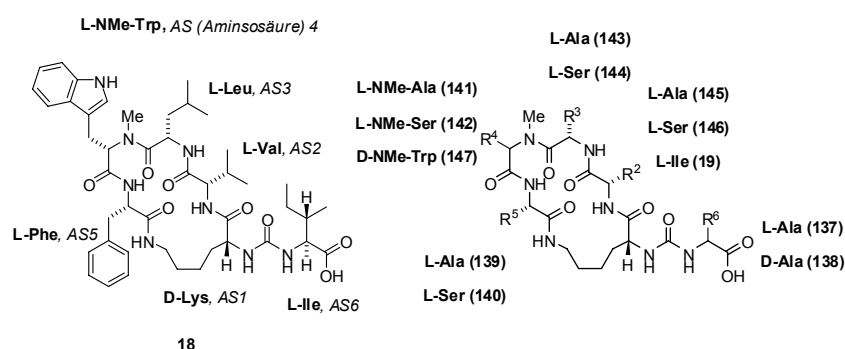


Abbildung 58 BVA A (**18**), B (**19**) und die zehn durch Einzelpositionsaustausch (Alanin-Scan) erhaltenen Analoga.

Auf diese Weise wurden elf Analoga (**137** bis **147**) des Brunsvicamids A in Gesamtausbeuten von 6 bis 16 % erhalten.

	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6
18	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
126	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D- <i>allo</i> -Ile
127	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ile
128	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L- <i>allo</i> -Ile
99	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
129	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D- <i>allo</i> -Ile
130	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ile
131	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L- <i>allo</i> -Ile
137	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ala
138	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ala
139	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Ala	L-Ile
140	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Ser	L-Ile
141	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Ile
142	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Ser	L-Phe	L-Ile
143	D-Lys	L-Val	L-Ala	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
144	D-Lys	L-Val	L-Ser	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
145	D-Lys	L-Ala	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
146	D-Lys	L-Ser	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
19	D-Lys	L-Ile	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
132	L-Lys	L-Ile	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
147	D-Lys	L-Val	L-Leu	D-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile

Tabelle 5 Aminosäuresequenzen der dargestellten Brunsvicamid Analoga.

4.1.16 Synthese von 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat als Substrat für Phosphatase-Testung

Für die Evaluierung der publizierten MptpB Inhibition durch die Brunsvicamide sollte neben einem Absorptionsassay mit kommerziell erhältlichem 4-Nitrophenolphosphat auch ein Fluoreszenzassay entwickelt werden. Das hierfür ausgewählte Substrat 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat (**148**)¹³⁸, kurz DiFUMP, wurde nach Literaturvorschriften dargestellt (Abbildung 59).

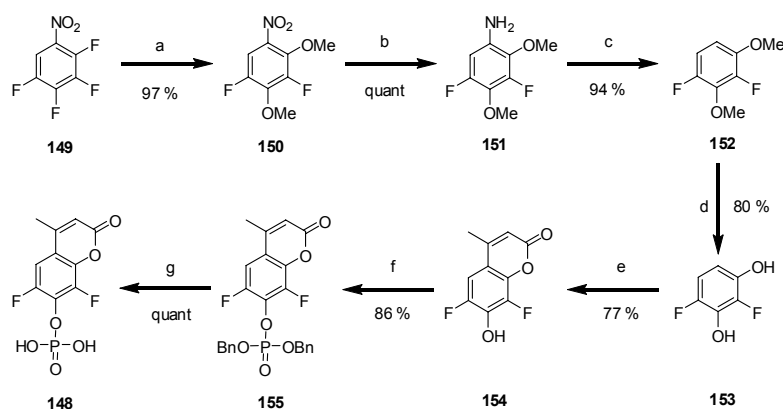


Abbildung 59 Synthese des Substrates für den Fluoreszenzassay:

a) MeOH, 0 °C, 2.4 Äq. NaOMe, 16 h RT; b) 10 % Pd(C), H₂ (10 bar), 18 h RT, AcOEt/EtOH; c) i) HCl/H₂O, 21 h 0 °C, ii) 1 Äq. NaNO₂, 2 h RT, 20 Äq. H₃PO₂; d) 3 Äq. BBr₃, abs. CH₂Cl₂, 28 h RT; e) 1 Äq. Ethylacetoacetat, 25 Äq. MeSO₃H, 28 h RT; f) - 15 °C, MeCN, 1 Äq. Dibenzylphosphonat, 5 Äq. CCl₄, 2.1 Äq. DIPEA, 0.1 Äq. DMAP, 2 h 0 °C; g) 10 % Pd(C), H₂ (1 bar), EtOH/Toluol (2:1), 4 h RT.

Durch eine nukleophile Substitution wurde aus dem 2,3,4,5-Tetrafluornitrobenzol (**149**) das 2,4-Dimethoxy-3,5-difluornitrobenzol (**150**) in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten.^{139, 150} Die Nitrogruppe wurde durch Hydrierung vollständig in das Amin (**151**) umgewandelt und im Anschluß eine Diazotierung und Reduktion durchgeführt. Die beiden Methoxygruppen des 1,3-Dimethoxy-2,4-difluorbenzol (**152**) wurden mit Bortribromid gespalten und das Resorcin **153** in guten Ausbeuten erhalten. Die Reaktion mit Ethylacetoacetat lieferte das Coumarin **154**, welches mit *in situ* generiertem Dibenzylphosphorylchlorid zum Benzylgeschützten Phosphat¹⁴⁰ **155** umgesetzt wurde. Eine abschließende Hydrierung ergab das freie Phosphat **148** mit einer Gesamtausbeute von 48 % über sieben Stufen.

4.2 Biochemische Untersuchungen

Nach der erfolgreichen Ermittlung der korrekten Stereochemie der BVA mittels Totalsynthese und der kombinatorischen Festphasensynthese von BVA-Analoga, sowie der Synthese des Substrates **148** erfolgte die Validierung der nach der Isolierung beschriebenen biochemischen Aktivitäten der Brunsvicamide.

4.2.1 *In vitro* Inhibierung von MptpB

Die natürlichen, aus Cyanobakterien isolierten, Brunsvicamide A (**18**), B (**19**) und C inhibierten in vorherigen Untersuchungen⁷³ die Proteintyrosinphosphatase B des *Mycobacterium tuberculosis* (MptpB). Zur Messung der Enzymaktivität und -inhibierung von Phosphatasen wurden verschiedene Substrate und Testsysteme beschrieben.^{141, 142} Um die Wirkung der synthetisierten Brunsvicamide A (**18**) und B (**19**) zu testen wurden zwei *in vitro* MptpB Assays durchgeführt: Ein 4-Nitrophenolphosphat (pNPP, **156**) basierter (Abbildung 60) und ein 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat (DiFUMP, **148**) basierender Enzymtest (Abbildung 61).

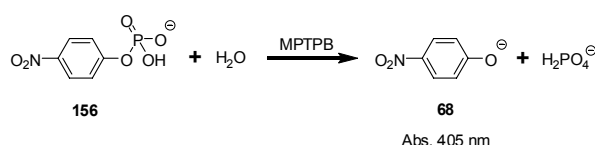


Abbildung 60 MptpB katalysierte Reaktion des Absorptionsassays.

Bei dem auf der Umsetzung von pNPP (**156**) basierenden Absorptionsassay spaltet MptpB vom pNPP Phosphat ab (Abbildung 60). Unter den Assaybedingungen entsteht das bei 405 nm stark absorbierende 4-Nitrophenolat (**68**). Analog dazu spaltet MptpB vom DiFUMP (**148**) Phosphat ab. Hier entsteht unter den Assaybedingungen das nach Anregung bei 355 nm im Bereich von 455 nm stark fluoreszierende Hydroxycoumarinanion **157** (Abbildung 61).

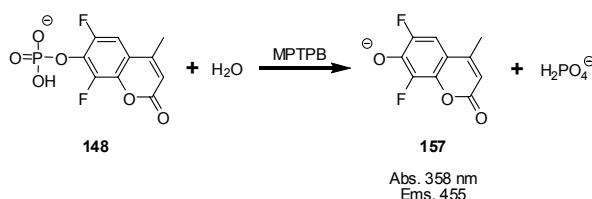


Abbildung 61 MptpB katalysierte Reaktion des Fluoreszenzassays.

Analog zu der in Kapitel 4.2.2. beschriebenen Vorgehensweise wurde aus der Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen und durch die nichtlineare Regression der Michaelis-Menten Gleichung folgende Werte für K_M erhalten: 2.3 ± 0.3 mM (MptpB und pNPP, **156**) bzw. 38 ± 2 μM (MptpB und DiFUMP, **148**).

Allerdings zeigte keine der Verbindungen **18**, **126** - **128** und **99**, **129** – **131** bei einer Konzentration von 50 μM eine inhibierende Wirkung. Es liegt die Vermutung nahe, dass die geringen aus Cyanobakterien isolierten Mengen Naturstoff verunreinigt waren und diese unbekannt Substanzen zur Inhibierung von MptpB führten. Als Vergleichssubstanz diente das als Phosphataseinhibitor bekannte bis(4-Trifluoromethylsulfonamidophenyl)-1,4-diisopropylbenzol (**158**, Abbildung 62).¹⁴³

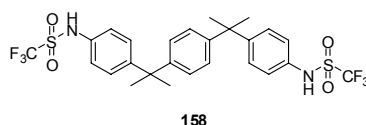


Abbildung 62 Als Vergleichssubstanz verwendeter Phosphataseinhibitor.

4.2.2 *In vitro* Inhibierung von Carboxypeptidase A und B

Die aus Cyanobakterien isolierten Brunsvicamide A (**18**), B (**19**) und C inhibierten in ersten Untersuchungen⁷⁶ die humanen Carboxypeptidasen A und B. Um die Wirkung der synthetisierten Brunsvicamide zu untersuchen wurde ein kolorimetrisches Testsystem etabliert.

Zur Messung der Enzymaktivität und -inhibierung von Carboxypeptidasen wurden verschiedene Substrate und Testformate beschrieben.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Während es sich bei den natürlichen Enzymsubstraten häufig um Proteine oder Polypeptide handelt werden für *in vitro* Tests meistens Dipeptide eingesetzt. Die ausgeprägte Substratspezifität der Carboxypeptidasen macht auch bei diesen stark vereinfachten Strukturen die Verwendung enzymespezifischer Substrate notwendig (Abbildung 63).

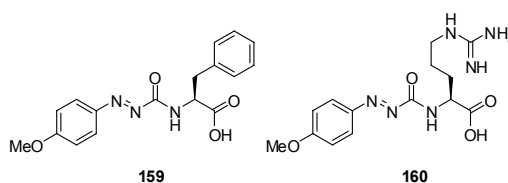


Abbildung 63 Substrate des CPDA und B Assays:

N-(4-methoxyphenylazidoformyl)phenylalanin (**159**) und -arginin (**160**).

Reaktion lässt sich mittels der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben (Abbildung 66). K_2 (auch K_{cat} oder „turnover number“ genannt) ist ein Maß für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung (V_{MAX}). Die Michaelis-Menten-Konstante K_M (Formel 1) ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes [ES]. Ist die Substratkonzentration gleich dem K_M -Wert, so liegt die Hälfte des Enzyms im [ES]-Komplex vor, die andere Hälfte ist frei ([E]).



Abbildung 66 Allgemeine Reaktionsgleichung einer Enzymreaktion.

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

Formel 1 Definition der Michaelis-Menten-Konstante.

Die Michaelis-Menten Konstante (K_M) wurde für CPDA und B in einem kontinuierlichen Verfahren bestimmt: Hierfür wurden die konzentrationsabhängigen Umsatzgeschwindigkeiten (Formel 2) bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Nach Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit V gegen die Substratkonzentration $[S]$ können K_M und V_{MAX} direkt aus dem Graphen erhalten werden (Abbildung 67).

$$V = \frac{V_{\text{MAX}} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{\text{MAX}}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

Formel 2 Michaelis-Menten Gleichung:

V = Geschwindigkeit in mmol s^{-1} , V_{MAX} = maximale Geschwindigkeit in mmol s^{-1} ,
 S = Substratkonzentration in mmol , K_M = Michaelis-Menten-Konstante in mmol .

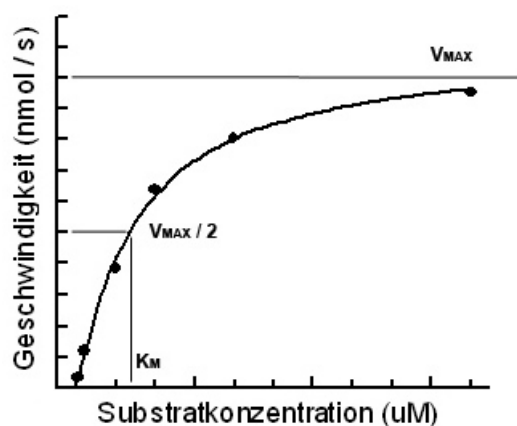


Abbildung 67 Grafische Ermittlung von K_M

durch Auftragung der Umsatzgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

Zur Bestimmung des K_M -Wertes der CPDA und B wurden die Umsatzgeschwindigkeiten bei Substratkonzentrationen (**159**, **160**) von 350 – 25 μM über die Abnahme der Absorption bei 350 nm gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen und aus einer nichtlinearen Anpassung der Michaelis-Menten Gleichung ergaben sich ein K_M von $272 \pm 49 \mu\text{M}$ (CPDA und AAF-Phe-OH, **159**) bzw. $203 \pm 20 \mu\text{M}$ (CPDB und AAF-Arg-OH, **160**).

Nach Ermittlung dieser kinetischen Parameter, wurden zunächst die synthetisierten Makrozyklen mit variierender Stereochemie (**18**, **126** - **128** und **99**, **129** - **131**) hinsichtlich ihrer inhibierenden Wirkung auf CPDA und B bei einer Konzentration von 50 μM getestet (Abbildung 68). Als Vergleichssubstanz diente ein als Carboxypeptidaseinhibitor bekanntes aus 39 Aminosäuren bestehendes Peptid.¹⁴⁷ Die Verbindungen **18** und **128** reduzierten die Aktivität von CPDA und B, **99** lediglich die von CPDA deutlich. Die durch die Variation der Aminosäuresequenz von **18** erhaltenen Verbindungen **137** - **146** wurden nur im Carboxypeptidase A Assay getestet. Die Wirkung der Analoga **137** - **146** auf die Carboxypeptidase B wurde nicht näher untersucht, da bereits der Naturstoff **18** nur ein schwacher CPDB-Inhibitor war.

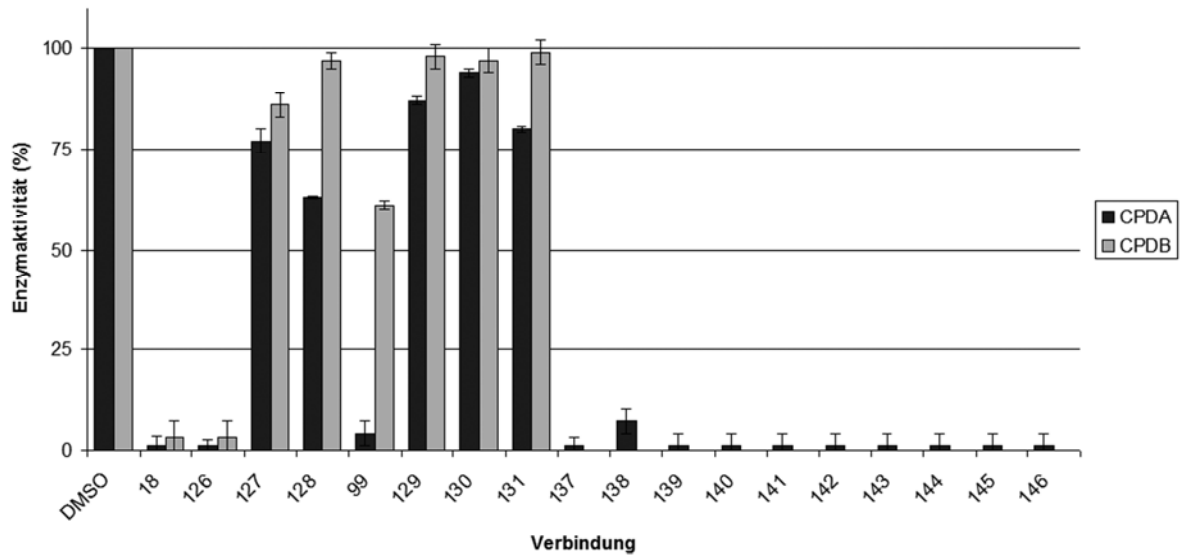


Abbildung 68 Verbleibende Enzymaktivität (in %) von CPDA und B bei einer Inkubation mit 50 μ M konzentrierten synthetisierter Verbindungen.

Zur genaueren Untersuchung der Inhibition der Peptidasen, wurden die IC_{50} -Werte der Carboxypeptidase inhibierenden Verbindungen bestimmt. Der IC_{50} -Wert stellt die Inhibitorkonzentration dar, bei der die Aktivität des untersuchten Enzyms noch 50 % der Ausgangsaktivität beträgt.

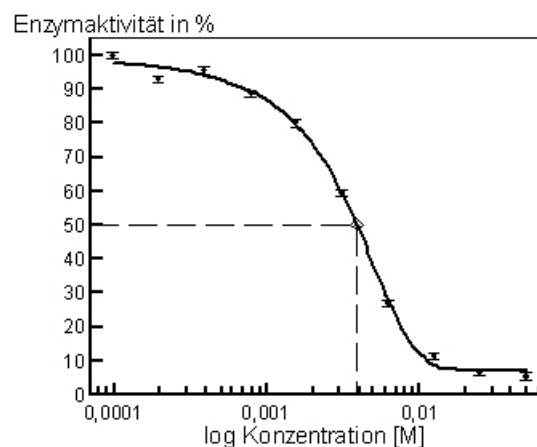


Abbildung 69 Ermittlung des IC_{50} -Wertes durch Auftragung der Enzymaktivität in % gegen die logarithmisch aufgetragene Inhibitorkonzentration in M.

Durch Auftragung der Inhibitorkonzentrationen von 50 bis 0.1 μM bzw. 100 bis 0.2 nM gegen die jeweils ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten wurden Inhibitions-Kurven erhalten aus denen der relative IC_{50} -Wert nach einer nichtlinearen Regression direkt abgelesen werden konnte (Abbildung 69).

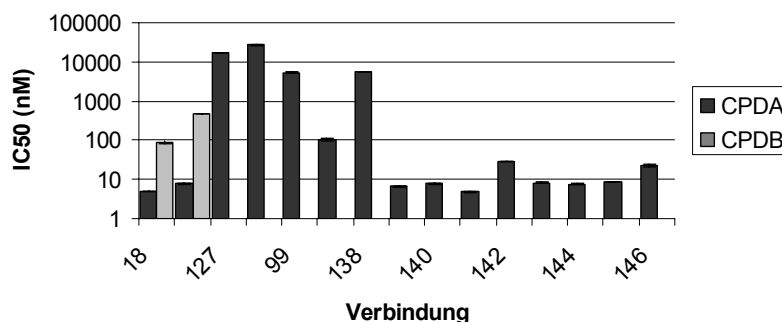


Abbildung 70 Logarithmische Darstellung der IC_{50} -Werte synthetisierter Verbindungen für CPDA und CPDB.

Für das Brunsvicamid A (**18**) und zehn weitere Analoga wurden IC_{50} -Werte von 5-102 nM und für vier Analoga IC_{50} -Werte von 5.4-27.1 μM erhalten (siehe Abbildung 70 für eine logarithmische Darstellung der erhaltenen IC_{50} -Werte). Brunsvicamid A (**18**) und ebenso die Verbindung **128** inhibieren auch die CPDB. In diesen Fällen wurden IC_{50} -Werte von 88 bzw. 480 nM erhalten. Da der IC_{50} -Wert stark von den jeweiligen Assay-Bedingungen abhängt, wurden auch die Dissoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor Komplexe (K_i) über die Cheng-Prusoff Gleichung¹⁴⁸ (Formel 3) ermittelt (Tabelle 6).

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{(1 + [S]) / K_M}$$

Formel 3 Berechnung von K_i aus dem IC_{50} -Wert, der Substratkonzentration S und der Michaelis-Menten Konstante K_M .

	IC₅₀ CPDA	K_i CPDA	IC₅₀ CPDB	K_i CPDB
18	5 ± 0.1 nM	9.1 nM	88 ± 6 nM	136 nM
126	7.7 ± 0.1 nM	14 nM	480 ± 4 nM	870 nM
127	17.1 ± 0.5 μM	31.0 μM	> 50 μM	> 50 μM
128	27.1 ± 0.6 μM	49.1 μM	> 50 μM	> 50 μM
99	5.4 ± 0.1 μM	9.8 μM	> 50 μM	> 50 μM
129	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM
130	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM
131	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM
137	102 ± 7 nM	185 nM	-	-
138	5.7 ± 0.1 μM	10.3 μM	-	-
139	6.6 ± 0.2 nM	12 nM	-	-
140	7.9 ± 0.3 nM	14.3 nM	-	-
141	4.8 ± 0.2 nM	8.7 nM	-	-
142	28.9 ± 0.5 nM	52.4 nM	-	-
143	8.3 ± 0.2 nM	15.1 nM	-	-
144	7.6 ± 0.4 nM	13.8 nM	-	-
145	8.7 ± 0.3 nM	15.8 nM	-	-
146	22.5 ± 1.5 nM	40.8 nM	-	-

Tabelle 6 Für synthetisierte Verbindungen ermittelte IC₅₀ und K_i Werte für CPDA und B.

4.2.3 Ermittlung des Inhibitionsmechanismus des Brunsvicamid A

Für den potentesten CPDA-Inhibitor, das Brunsvicamid A (**18**), sollte der Inhibitions-Typ ermittelt werden. Neben den irreversiblen gibt es die reversiblen Inhibitoren, die sich in Substrat-kompetitive, nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibitoren gliedern.¹⁴⁹ Hierfür wurden die Umsatzraten bei zehn verschiedenen Substratkonzentrationen (600 – 37.5 μM) und vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ermittelt. Die für die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen erhaltenen Umsatzraten wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 71).

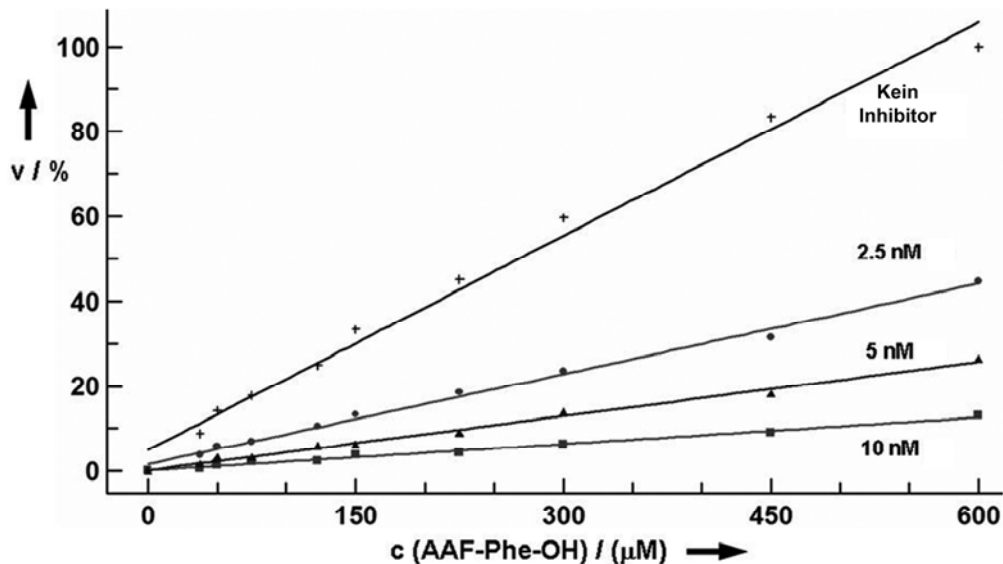


Abbildung 71 Michaelis-Menten Auftragung der CPDA katalysierten Enzymreaktion bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (18).

Aus der nichtlinearen Regression der Michaelis-Menten Gleichung (Formel 2) wurden K_M und V_{MAX} für die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen erhalten, welche mit reziproken Michaelis-Menten Gleichung (Formel 4) die Berechnung der Geschwindigkeit V für jede beliebige Substratkonzentration S bei einer der vier gegebenen Inhibitorkonzentrationen erlaubte.¹⁴⁹

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_M}{V_{MAX}} \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{MAX}}$$

Formel 4 Reziproke Michaelis-Menten Gleichung:

V = Geschwindigkeit in mmol s^{-1} , V_{MAX} = maximale Geschwindigkeit in mmol s^{-1} ,

S = Substratkonzentration in mmol , K_M = Michaelis-Menten-Konstante in mmol .

Bei der Darstellung der erhaltenen Daten nach der Lineweaver-Burk-Methode schneiden sich die Geraden im Ursprung (Abbildung 72). Demnach handelte es sich bei **18** um einen in Bezug auf das Substrat **159** kompetitiven Inhibitor von CPDA.

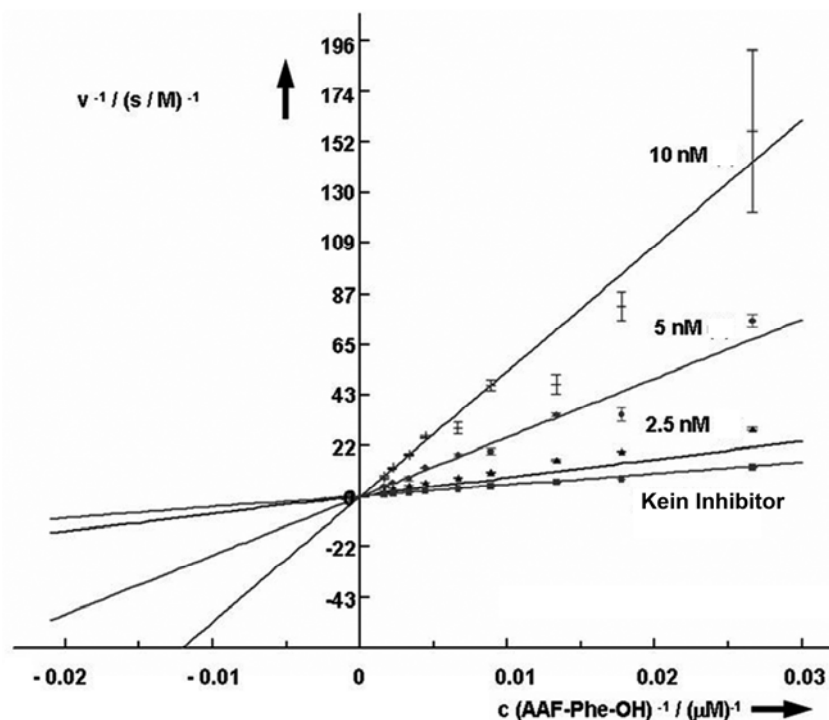


Abbildung 72 Lineweaver Burk Auftragung zur Ermittlung des Inhibitionstyps von **18**.

4.2.4 Struktur-Wirkungsbeziehung

Für die Identifizierung einer Struktur-Wirkungsbeziehung wurden die Aminosäuresequenzen und die vorab in Kapitel 4.2.2 beschriebenen IC_{50} -Werte betrachtet. Tabelle 7 zeigt im oberen Teil Einträge für die acht Verbindungen **18**, **126** – **128** und **99**, **129** - **131** welche durch die Variation der drei Stereozentren im Lysin und Isoleucin erhalten wurden, inklusive des Brunsvicamids A (**18**). Der untere Teil enthält die Einträge der zehn durch Austausch einzelner Aminosäuren des Brunsvicamid A (Alanin-Scan, siehe Kapitel 4.1.15) erhaltenen Analoga **137** – **146**.

Es fällt besonders auf, dass alle Analoga, welche ein D-Lysin als Verzweigungsstelle und eine L-Aminosäure in der Harnstoffseitenkette beinhalten, nanomolare CPDA-Inhibitoren sind (**18**, **126**, **137** und **139** - **146**). Die ein D-Lysin und am C-Terminus eine D-Aminosäure enthaltenden Verbindungen **127**, **128** und **99** sind lediglich mikromolare Inhibitoren. Von den vier L-Lysin-enthaltenden Verbindungen **99** und **129** - **131** ist mit 5.4 μ M lediglich **99** ein nennenswerter CPDA Inhibitor.

	Aminosäuresequenz						IC ₅₀ CPDA
	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6	
18	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	5 nM
126	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L- <i>allo</i> -Ile	7.7 nM
127	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ile	17.1 μM
128	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D- <i>allo</i> -Ile	27.1 μM
99	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	5.4 μM
129	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L- <i>allo</i> -Ile	> 50 μM
130	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ile	> 50 μM
131	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D- <i>allo</i> -Ile	> 50 μM
137	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ala	102 nM
138	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ala	5.7 μM
139	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Ala	L-Ile	6.6 nM
140	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Ser	L-Ile	7.9 nM
141	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Ile	4.8 nM
142	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Ser	L-Phe	L-Ile	28.9 nM
143	D-Lys	L-Val	L-Ala	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	8.3 nM
144	D-Lys	L-Val	L-Ser	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	7.6 nM
145	D-Lys	L-Ala	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	8.7 nM
146	D-Lys	L-Ser	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile	22.5 nM

Tabelle 7 Aminosäuresequenz und für CPDA ermittelte IC₅₀ Werte von BVA A (**18**) und Analoga.

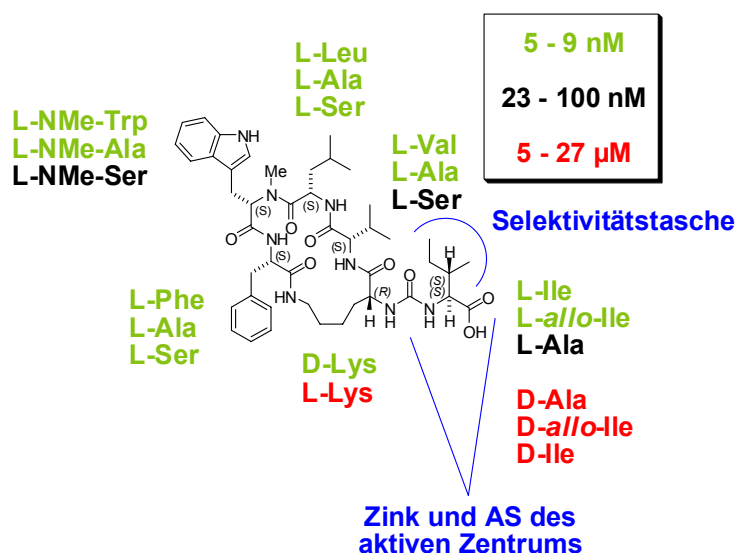


Abbildung 73 Zusammenfassung der CPDA IC₅₀-Werte und der Ergebnisse der Untersuchung zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung; Skizzierung eines möglichen Bindemodells.

Die Aktivität der dargestellten Verbindungen ist also hauptsächlich abhängig von der Stereochemie des Lysins und der C-terminalen Aminosäure. Bereits der in Kapitel 4.2.3 ermittelte kompetitive Inhibitionsmodus von **18** legt die Vermutung nahe, dass die Brunsvicamide wie ein Substrat an das aktive Zentrum der CPDA binden. Der Mechanismus und die Substratspezifität der CPDA (siehe Kapitel 2.6.1) liefern die Grundlage für eine Erklärung der gefundenen Struktur-Wirkungsbeziehung: Man kann annehmen, dass die Säure am C-Terminus des Brunsvicamides mit den Aminosäuren Asparagin 144 und Arginin 145 interagiert, die Harnstoffgruppe koordiniert an das Zinkatom und die Seitenkette der C-terminalen Aminosäure bindet in die Selektivitätstasche der CPDA, welche große aliphatische oder aromatische Seitenketten von Aminosäuren mit S-Konfiguration bevorzugt. Dies erklärt die Abhängigkeit der Aktivität der Brunsvicamid-Analoga von der Seitenkette und der stereochemischen Konfiguration der C-terminalen Aminosäure, nicht jedoch die Abhängigkeit von der Stereochemie des Lysins. Weiterhin ist es auffällig, dass alle acht Analoga **139** bis **146**, die durch den Austausch einer der Aminosäuren Nummer zwei bis fünf gegen ein Alanin bzw. Serin erhalten wurden, IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich aufweisen. Keine der dort im Naturstoff enthaltenen Seitenketten scheint für die inhibierende Wirkung des Brunsvicamids A besonders wichtig zu sein. Zum besseren Verständnis wurden daher Molekülrechnungen mit **18**, **99** und CPDA durchgeführt (siehe Kapitel 4.3).

4.2.5 Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung

Eine Vielzahl cyanobakterieller Sekundärmetaboliten zeigt zytotoxische bzw. zytostatische Eigenschaften.^{47, 50} Zum Beispiel hemmen Dolastatin 10 (**5**) und TZT-1027 (**6**) die Zellteilung. Die Entdeckung neuer Zytostatika ist ein zentrales Thema der Krebsforschung. Daher wurde mit den acht Verbindungen **18**, **126 - 128** und **99**, **129 - 131** ein Zellvitalitätsassay durchgeführt. Die im Folgenden diskutierten Zellvitalitätstests wurden mit Unterstützung von Dipl.-Biol. Karin Warburg durchgeführt.

Bei dem WST1-Test wird die Vermehrung und die Vitalität der Zellen colorimetrisch bestimmt. Hierbei nehmen lebende Zellen das Tetrazoliumsalz **161** auf und setzen es mit Hilfe der mitochondrialen Dehydrogenasen in dunkelrotes Formazan (**162**) um (Abbildung 74). Die Intensität der Rotfärbung korreliert mit der Zellzahl und der metabolischen Aktivität der Zellen.¹⁵⁰

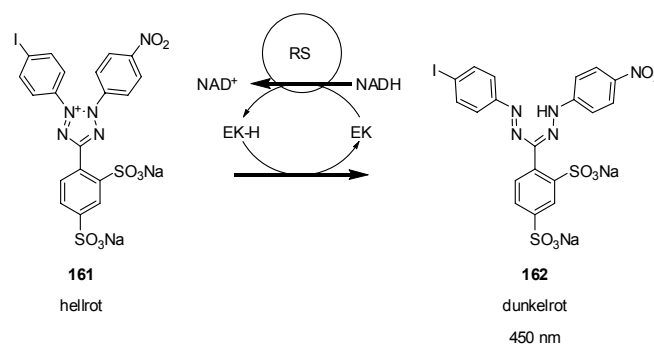


Abbildung 74 Assayreaktion des WST-1-Test: RS: mitochondriales Succinat-Tetrazolium Reduktase System; EK: Entkopplungsreagenz.

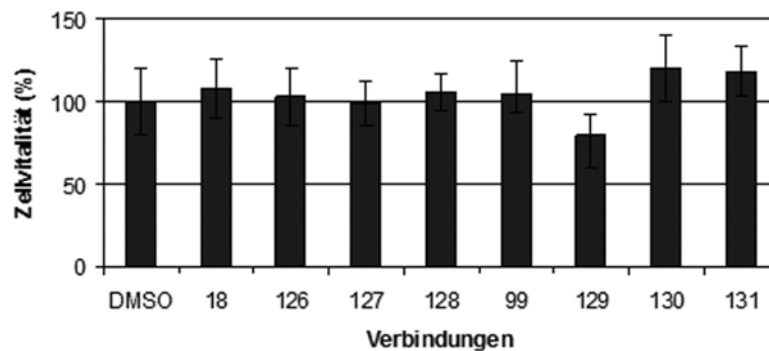


Abbildung 75 Verbleibende Zellvitalität (in %) bei einer Inkubation mit 100 μ M konzentrierten synthetisierten Verbindungen.

Weder der Naturstoff Brunsvicamid A (**18**) noch die sieben Analoga zeigten bei einer Konzentration von 100 μM nennenswerte zytotoxische Eigenschaften. Eine ausreichende Membranpermeabilität vorausgesetzt bedeutet dies, dass die BVA den beobachteten mitochondrialen Stoffwechsel weder direkt noch indirekt beeinflussen.

4.2.6 Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung

Eine Vielzahl cyanobakterieller Sekundärmetaboliten, wie zum Beispiel das Fischerellin A (**7**), weisen antibakterielle Eigenschaften auf.³¹⁻³⁵ Die Entwicklung neuer Antibiotika, mit neuen Wirkmechanismen, ist aufgrund der zunehmenden Resistenzproblematik ein zentrales Thema, sowohl von akademischer Seite aus, als auch von Seiten der pharmazeutischen Industrie. Es wurden daher verschiedene Tests mit den acht Verbindungen **18**, **126** bis **128** und **99**, **129** bis **131** von Dipl.-Biochem. Bernhard Ellinger durchgeführt. Es wurde das Wachstum eines grampositiven *Staphylococcus aureus* (SA) und eines multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) untersucht (Abbildung 76). Multiresistente *Staphylococcus aureus* Bakterien gelten als die häufigsten Verursacher von im Krankenhaus erworbenen Infektionen.

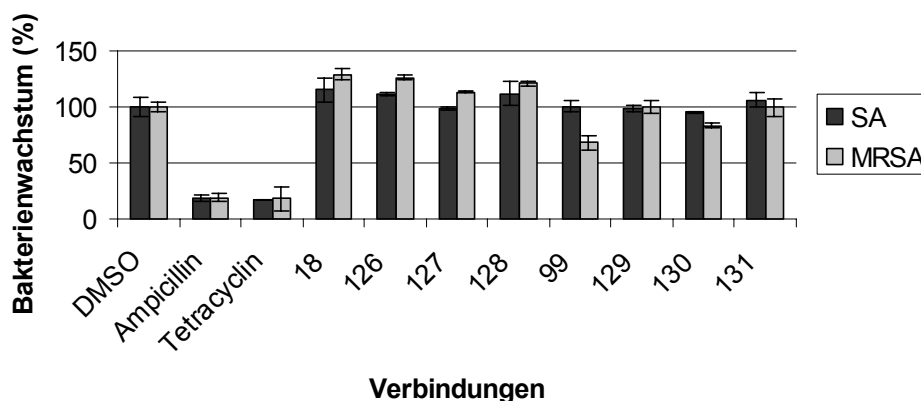


Abbildung 76 Antibakterielles Wachstum bei Inkubation mit 200 μM BVA.

Weder der Naturstoff Brunsvicamid A (**18**) noch die Analoga zeigten bei einer Konzentration von 200 μM nennenswerte antibakterielle Eigenschaften. Eine ausreichende Membranpermeabilität vorausgesetzt bedeutet dies, dass die BVA das Wachstum der Bakterien nicht beeinflussen.

4.3 Berechnung von Konformationen und Bindungsmodi

In der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (Kapitel 4.2.4) traten Hinweise zum Einfluss der Stereochemie der Makrozyklen auf die biologische Aktivität der BVA zu Tage. Daher sollten computerunterstützte Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der unterschiedlich starken Inhibierung der CPDA durch **18** (D-Lys) und **99** (L-Lys) beitragen. Es wurde dafür eine Konformationsanalyse durchgeführt, und anschließend wurden die energieminierten Strukturen in das aktive Zentrum der CPDA eingepasst („gedockt“) und mit Daten einer literaturbekannten Röntgenstruktur¹⁵¹ verglichen. Alle Kraftfeldrechnungen wurden mit Unterstützung von Dr. Steffen Renner durchgeführt.

Bei der Konformationssuche für die komplexen Makrozyklen **18** und **99** wurden Kraftfeldmethoden verwendet. Hierzu wurde ein dreidimensionales Modell des zu untersuchenden Moleküls konstruiert, in das Kraftfeldprogramm eingelesen und anschließend alle Stereozentren auf ihre korrekte Konfiguration überprüft. In den sogenannten Kraftfeldern sind Parameter und Potentialfunktionen festgelegt, die sowohl kovalente, als auch nicht kovalente Wechselwirkungen berücksichtigen. Das hier verwendete MMFF (Merck Molecular Force Field) Kraftfeld mit implementiertem GB/SA-Solvatisierungsmodell¹⁵² ist für eine Vielzahl von chemischen Systemen erfolgreich eingesetzt worden: Es erlaubt neben der Betrachtung von kleineren Molekülen und Proteinen auch die Abschätzung von intermolekularen Wechselwirkungen.¹⁵³

In Abhängigkeit von der dreidimensionalen Struktur eines Moleküls kann dessen Energie als sogenannte Hyperfläche dargestellt werden, deren lokale und globale Minima die stabilen Konformere des untersuchten Moleküls darstellen. Für das Auffinden eines Minimums der Energie-Hyperfläche wurde die sogenannte truncated Newton conjugated gradient (TNCG) Methode verwendet.¹⁵⁴ Die besondere Schwierigkeit bei der Konformationssuche für zyklische Verbindungen mit ihren Freiheitsgraden stellt die Existenz mehrerer lokaler Minima dar. Für die möglichst vollständige Abtastung der Potentialhyperfläche muss man von einem Minimum zu weiteren Minima gelangen, hierfür wurde das low-mode (LMOD) Verfahren¹⁵⁵ verwendet.

Für die Docking-Experimente wurde eine hochaufgelöste Kristallstruktur verwendet, die mit dem sehr potenten ($K_i = 11$ fM) Phosphonat Inhibitor **163** erhalten worden war (Abbildung 77).¹⁵¹ Die Verwendung einer Kristallstruktur mit einem im aktiven Zentrum gebundenen Liganden bietet zwei Vorteile: Erstens wird so die literaturbekannte (siehe Kapitel 2.6.1) Konformationsänderung einiger Aminosäuren, z.B. von Tyr 248, im aktiven Zentrum der CPDA bei der Bindung eines Substrates berücksichtigt und zweitens ist so ein Vergleich der Ergebnisse der Kraftfeldrechnungen mit einem experimentell erhaltenen Enzym-Inhibitor-Komplex möglich.

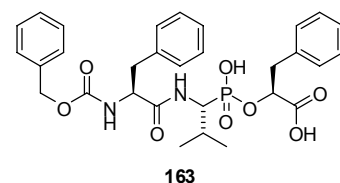
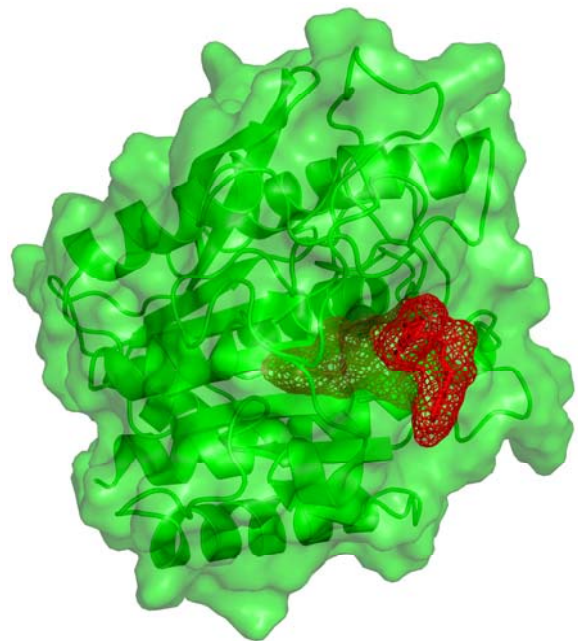
A**B**

Abbildung 77 2 Å Kristallstruktur (PDB-ID: 7CPA);

A: ohne Ligand, **B:** mit im katalytisch aktiven Zentrum gebundenem Liganden **163**

Ein repräsentatives Beispiel einer in das aktive Zentrum der CPDA gedockten energieminierten Konformationen des Brunsvicamids A (**18**) ist in Abbildung 78 dargestellt. Der aus dem D-Lysin und L-Isoleucin bestehende Harnstoffteil von **18** befindet sich im katalytisch aktiven Zentrum: Die C-terminale freie Säure und der

Harnstoff wechselwirken mit dem Enzym in einer einem Substrat ähnlichen Art und Weise. Besonders die Wechselwirkungen zwischen der Carbonsäurefunktion und dem Asparagin 144 und Arginin 145 sind hier nennenswert. In Übereinstimmung mit den bei der Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehung (Kapitel 4.2.4) angestellten Vermutungen ragt die Seitenkette des Isoleucins in die Selektivitätstasche (S1)¹⁵⁶ und die Seitenketten der Aminosäuren Nummer zwei bis fünf (L-Val, L-Leu L-NMe-Trp, L-Phe) interagieren größtenteils mit Lösungsmittelmolekülen.

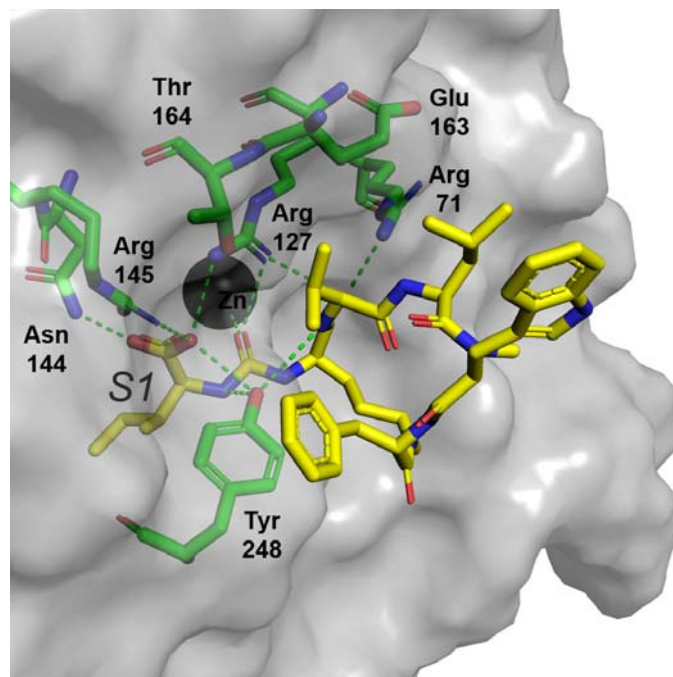


Abbildung 78 **18** (*D*-Lys) im aktiven Zentrum der CPDA.

Die durch den Alanin-Scan gewonnenen experimentellen Erkenntnisse stimmten sehr gut mit den computerunterstützten Untersuchungen überein. Die Berechnungen bestätigen die Möglichkeit einer Bindung der BVA an das aktive Zentrum der CPDA, die aufgrund der Substrat-kompetitiven Inhibierung und nach der Untersuchung der Struktur-Aktivitätsbeziehung vermutet wurde (Abbildung 73). Zusätzlich zeigt ein Vergleich der räumlichen Anordnungen von **163** (kokristallisierter Phosphonat-Inhibitor ($K_i = 11$ fM)) und **18** (gedockter Inhibitor BVA A ($K_i = 9$ nM)) im aktiven Zentrum der CPDA (Abbildung 79) eine große Übereinstimmung. Beispiele sind die Positionierung des Phenylrings und der Isoleucinseitenkette in der Selektivitätstasche sowie die Wechselwirkungen der C-terminalen Säuren mit Asparagin 144 und Arginin 145, und die Koordination des Harnstoffs und des Phosphonats an das Zink.

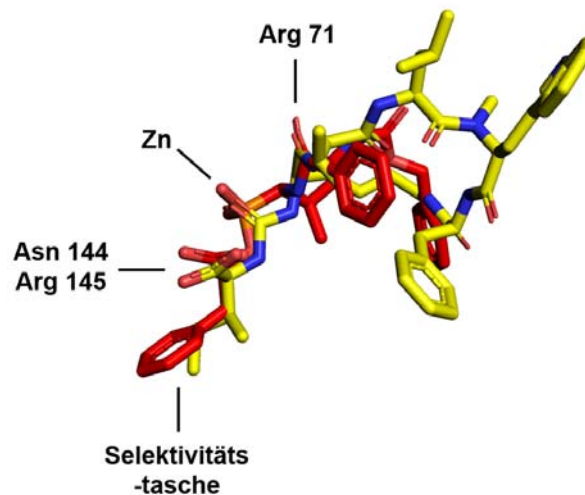


Abbildung 79 Vergleich der räumlichen Anordnung von **18** (gelb, D-Lys) und **163** (rot) im aktiven Zentrum der CPDA.

Die Energieminimierung und das Docken ins aktive Zentrum der CPDA wurden vergleichsweise für die ein L-Lysin enthaltende Verbindung **99** durchgeführt. Auch hier befindet sich der aus Isoleucin und Lysin bestehende Harnstoffteil im aktiven Zentrum der CPDA, die Selektivitätstasche wird ausgefüllt, die Wechselwirkungen mit Asparagin 144 und Arginin 145 sind vorhanden. Ein Vergleich der räumlichen Anordnungen von **18** und **99** im aktiven Zentrum der CPDA (Abbildung 80) liefert jedoch eine Erklärung für die unterschiedlich stark inhibierende Wirkung von **18** ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$) und **99** ($IC_{50} = 5 \text{ } \mu\text{M}$): Bedingt durch die S-Konfiguration des Lysins wurde die Abfolge der vier Aminosäuren im Ring invertiert. Hieraus resultiert nicht nur eine andere Konformation des Ringes sondern auch eine veränderte Positionierung des Makrozyklus oberhalb der Aktivitätstasche.

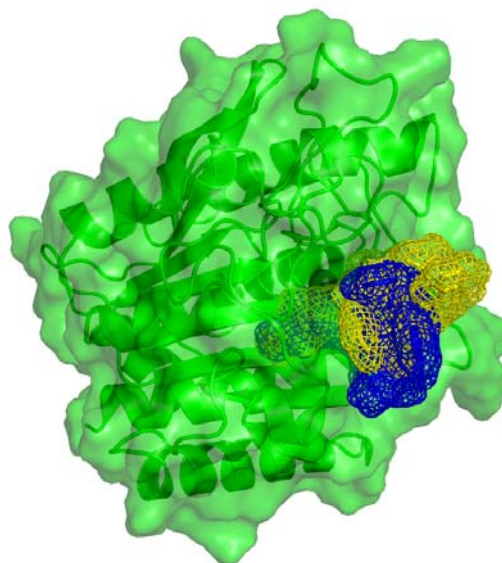


Abbildung 80 Vergleich von **18** (gelb, D-Lys) und **99** (blau, L-Lys) im aktiven Zentrum der CPDA.

Aus dieser veränderten Positionierung des Makrozyklus bei gleichbleibender Position des L-Isoleucins müsste sich ein größerer Abstand zwischen Harnstoff und Zink ergeben (Abbildung 81). Durch die *R*-Konfiguration fehlt weiterhin eine Wechselwirkung zwischen der Carbonylfunktion des Lysins und dem Arginin 71 des Enzyms.

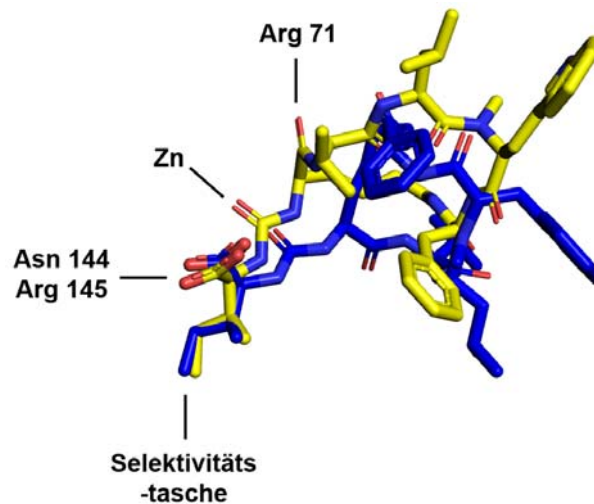


Abbildung 81 Vergleich der räumlichen Anordnung von **18** (*D*-Lys) und **99** (*L*-Lys) im aktiven Zentrum der CPDA.

5 Zusammenfassung

Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist die Identifizierung neuer Leitstrukturen von grundlegender Bedeutung. Häufig dienen Naturstoffe, vor allem Sekundärmetabolite, als Leitstrukturen für die Darstellung von Substanzbibliotheken. Da ihre Grundgerüste durch die Evolution selektiert wurden weisen sie eine hohe biologische Relevanz auf und gelten als privilegierte Strukturen. Eine reichhaltige Quelle für Sekundärmetabolite mit seltenen Strukturmerkmalen und verschiedensten biologischen Aktivitäten sind Cyanobakterien. Totalsynthesen haben in zahlreichen Beispielen wichtige Beiträge für die Bestätigung oder Aufklärung der Strukturen dieser Naturstoffe geliefert. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Brunsvicamide A (**18**) und B (**19**) sind cyanobakterielle Sekundärmetabolite und gehören zur Gruppe der Anabaenopeptine. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass sie die Aktivität der *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase B (MptpB) und der Carboxypeptidasen A und B hemmen.

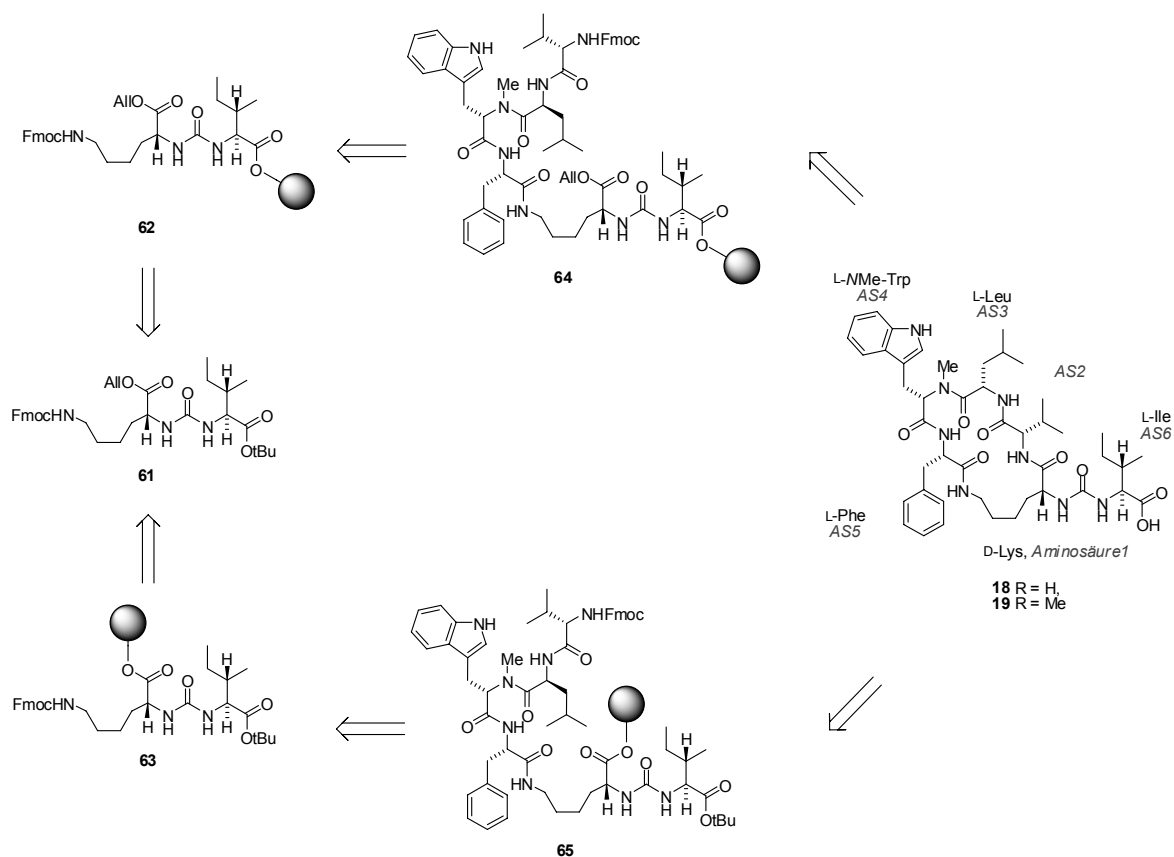


Abbildung 82 Retrosynthetische Analyse zu den Brunsvicamiden A (**18**) und B (**19**):
 Makrolaktamisierung in Lösung und an fester Phase, orthogonal geschützter Baustein (**61**).

Die zyklisch verzweigten Hexapeptide **18** und **19** lassen sich in einen 19-gliedrigen Makrozyklus und die den Harnstoff enthaltende Seitenkette zerlegen. Die Seitenkette des D-Lysins ist ein Teil des Makrozyklus, während die Aminosäure sechs über den Harnstoff mit dem D-Lysin verbunden ist. Die Aminosäure vier ist N-methyliert (Abbildung 82).

Ziel dieser Arbeit war die Bestätigung der Struktur des Naturstoffs und der gefundenen biologischen Aktivitäten durch Totalsynthese. Dazu sollte eine möglichst breit einsetzbare, modulare Festphasenpeptidsynthese etabliert werden, die einen schnellen Zugang zu einer fokussierten Substanzsammlung eröffnet und die detaillierte Evaluierung der biologischen Aktivität der Brunsvicamide ermöglicht. Verschiedene Möglichkeiten zur Darstellung des Makrozyklus und des Harnstofffragments wurden untersucht und eine Lösungs- und Festphasenchemie kombinierende breit einsetzbare Synthese etabliert (Abbildung 83). Für die Darstellung der Bausteine **75**, **112** - **118** in Lösung wurden 4-Nitrophenolchlorameisensäure (**39**) und Aminosäure-*tert*-butylester (**70**, **106** - **108**) mit unterschiedlicher Stereochemie verwendet. Die *N*^α-4-Nitrophenolcarbamate (**74**, **109** - **111**) wurden in Ausbeuten von 69 - 87 % erhalten. Deren Umsetzung mit den beiden Lysinbausteinen **165** lieferte die vollständig orthogonal geschützten Harnstoffe in Ausbeuten von 63 - 81 %. Die Möglichkeit zur selektiven Spaltung des Allyl- oder *tert*-Butylesters erlaubt die Verfolgung beider in Abbildung 82 gezeigten Zyklisierungsstrategien. Durch die Umsetzung der Harnstoffe **76** und **79** mit Polystyrol-2-chlortritylchloridharz wurden die festphasengebundenen Harnstoffe **63** und **166** mit einer Beladung von 0.6 mmol/g erhalten. Unter Verwendung der Fmoc-Strategie wurden die linearen Peptide an fester Phase synthetisiert und nach Freisetzung der Zyklisierungsstellen die Zyklisierungsvorläufer **86** und **167** erhalten.

Die Makrolaktamisierung nach der Abspaltung von **86** erfolgte in Lösung unter Pseudohochverdünnungsbedingungen. Der *tert*-Butylester **101** wurde in einer Ausbeute von 21 % erhalten. Auf die Makrolaktamisierung des Zyklisierungsvorläufers **167** an fester Phase mit DIC / HOBt folgte die Abspaltung der zyklischen Produkte **18**, **99**, **126** – **131**. Die auf den Harnstoff **166** bezogene Gesamtausbeute der 12-stufigen Festphasensequenz betrug 13-18 %.

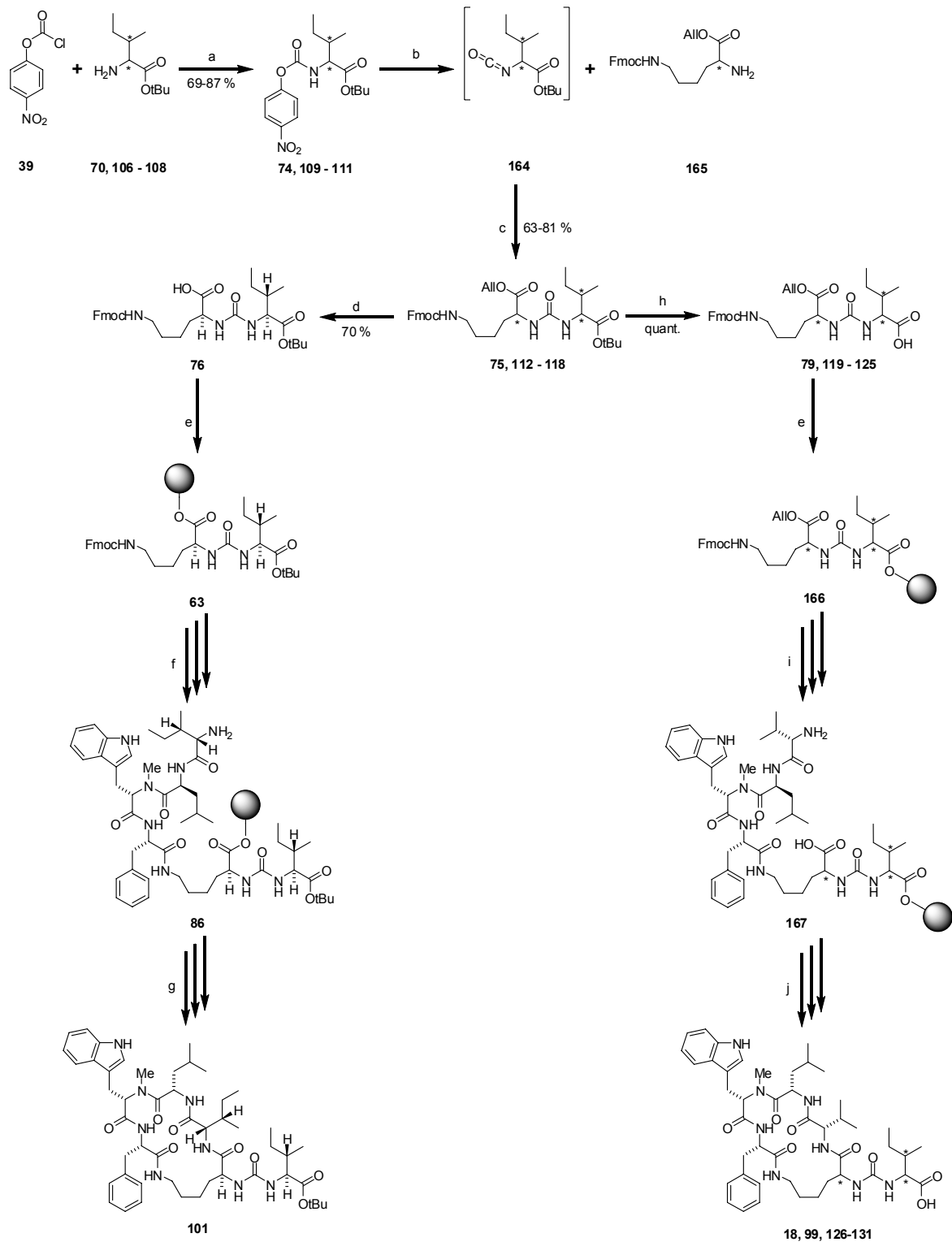


Abbildung 83 Entwickelter synthetischer Zugang zu den Brunsvicamiden:

a) 8 Äq. Pyridin, abs. CH₂Cl₂, 1 h, 0 °C, 16 h, RT; b) abs. CH₂Cl₂, 0 °C; 2 Äq. abs. DIPEA; c) abs. CH₂Cl₂, 1 h, 0 °C, 16 h, RT; d) 0.1 Äq. Pd(PPh₃)₄, 10 Äq. Dimedon, abs. THF, 90 min, RT; e) 0.83 Äq. 2-Chlortritylchlorid-Polystyrolharz, 4.8 Äq. abs. DIPEA, abs. CH₂Cl₂, 16 h, RT; f) i: DMF/Piperidin 4:1; ii: 3 Äq. Fmoc-L-Phe, 3 Äq. DIC/HOBt, DMF, RT, 2 h; iii: DMF/Piperidin 4:1; iv:

3 Äq. *Fmoc-L-NMe-Trp*, 3 Äq. *DIC/HOBt*, *DMF*, *RT*, 2 h; v: *DMF/Piperidin* 4:1; vi: 3 Äq. *Fmoc-L-Leu*, 3 Äq. *HATU/HOAt*, 6 Äq. *DIPEA*, *DMF*, *RT*, 3 h; vii: *DMF/Piperidin* 4:1; viii: 3 Äq. *Fmoc-L-Ile*, 3 Äq. *DIC/HOBt*, *DMF*, *RT*, 2 h; ix: *DMF/Piperidin* 4:1. g) i: 2 % *TFA* in *CH₂Cl₂*, *RT*; ii: 1.2 Äq. *HATU/HOAt*, 4.8 Äq. *DIPEA*, *THF*, Zugabe über 16 h (Endkonzentration 0.5 mM); h) *CH₂Cl₂:TFA* 1:1, 3 h, *RT*; i) i: *DMF/Piperidin* 4:1; ii: 3 Äq. *Fmoc-L-AS5*, 3 Äq. *DIC/HOBt*, *DMF*, *RT*, 2 h; iii: *DMF/Piperidin* 4:1; iv: 3 Äq. *Fmoc-L-NMe-AS4*, 3 Äq. *DIC/HOBt*, *DMF*, *RT*, 2 h; v: *DMF/Piperidin* 4:1; v: 3 Äq. *Fmoc-L-AS3*, 3 Äq. *HATU/HOAt*, 6 Äq. *DIPEA*, *DMF*, *RT*, 3 h; vi: *DMF/Piperidin* 4:1; vii: 3 Äq. *Fmoc-L-AS2*, 3 Äq. *DIC/HOBt*, *DMF*, *RT*, 2 h; viii: 0.05 Äq. *Pd(PPh₃)₄*, 10 Äq. *PhSO₂Na*, *abs. DMF*, *RT*, 16 h; ix: *DMF/Piperidin* 4:1; j) i: 6 Äq. *DIC/HOBt*, *DMF*, *RT*, 16 h; ii: 2 % *TFA* in *CH₂Cl₂*, *RT*.

Die erste erhaltene Verbindung **99** entsprach der publizierten Struktur für das isolierte Brunsvicamid A. Unterschiede zwischen den von **99** aufgenommenen NMR-Spektren und den für den isolierten Naturstoff publizierten Daten zeigten aber, dass es sich bei **99** nicht um den Naturstoff handelt. Die Unterschiede zwischen den publizierten und von **99** gemessenen Spektren deuteten auf eine fehlerhafte Bestimmung der Stereochemie des Lysins oder Isoleucins hin. Zur Ermittlung der korrekten Stereochemie der Brunsvicamide erfolgte die Darstellung von acht Verbindungen und zwar unter vollständiger Variation der drei Stereozentren des Lysins und Isoleucins.

Ein Vergleich der NMR-Spektren und Retentionszeiten der acht erhaltenen Verbindungen zeigte, dass die Brunsvicamide ein D-Lysin enthalten. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde eine pH-Abhängigkeit der Protonen und Kohlenstoffspektren der Brunsvicamide festgestellt und **18** durch HPLC-Koinjektion mit authentischem Material zweifelsfrei als Brunsvicamid A identifiziert.

Für die Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden weitere Analoga des Brunsvicamids A (**18**) synthetisiert. Durch den systematischen Austausch jeweils einer der Aminosäuren von **18** gegen ein Alanin oder Serin wurden die Verbindungen **137** bis **146** erhalten. Insgesamt wurde eine Substanzsammlung von 21 Brunsvicamiden generiert (Tabelle 8). Diese wurden anschließend mittels einer enzymatischen Testung auf ihre biochemische Wirksamkeit gegen Carboxypeptidase A und B, sowie die Phosphatase MptpB getestet. Hierfür wurden zwei Absorptions- und ein Fluoreszenz-Assay etabliert.

	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6
18	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
126	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D- <i>allo</i> -Ile
127	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ile
128	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L- <i>allo</i> -Ile
99	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
129	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D- <i>allo</i> -Ile
130	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ile
131	L-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L- <i>allo</i> -Ile
137	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ala
138	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	D-Ala
139	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Ala	L-Ile
140	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Ser	L-Ile
141	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Ala	L-Phe	L-Ile
142	D-Lys	L-Val	L-Leu	L-NMe-Ser	L-Phe	L-Ile
143	D-Lys	L-Val	L-Ala	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
144	D-Lys	L-Val	L-Ser	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
145	D-Lys	L-Ala	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
146	D-Lys	L-Ser	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
19	D-Lys	L-Ile	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
132	L-Lys	L-Ile	L-Leu	L-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile
147	D-Lys	L-Val	L-Leu	D-NMe-Trp	L-Phe	L-Ile

Tabelle 8 Aminosäuresequenzen der dargestellten Brunsvicamid Analoga.

Hierbei erwies sich das Brunsvicamid A (**18**) als der stärkste CPDA-Inhibitor, der IC_{50} betrug 5 nM. Ein Vergleich der für die Verbindungen **18**, **99** und **126 - 131** erhaltenen IC_{50} -Werte zeigte die essentielle Bedeutung der D-Konfiguration des Lysins und der L-Konfiguration des Isoleucins (Abbildung 84).

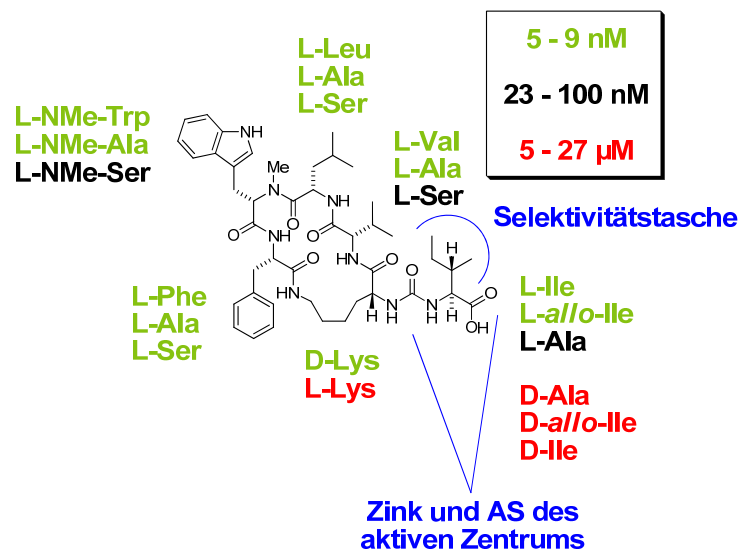


Abbildung 84 Zusammenfassung der CPDA IC_{50} -Werte und der Ergebnisse der Untersuchung zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung; Skizzierung eines möglichen Bindemodells.

Die Validierung der experimentellen Ergebnisse erfolgte durch computergestützte Konformationsanalysen. Die daraus resultierenden energieminierten Strukturen wurden in das aktive Zentrum der Carboxypeptidase A eingepasst. Der aus dem D-Lysin und L-Isoleucin bestehende Harnstoffteil von **18** (CPDA- IC_{50} = 5 nM) befindet sich im katalytisch aktiven Zentrum (Abbildung 85 A).

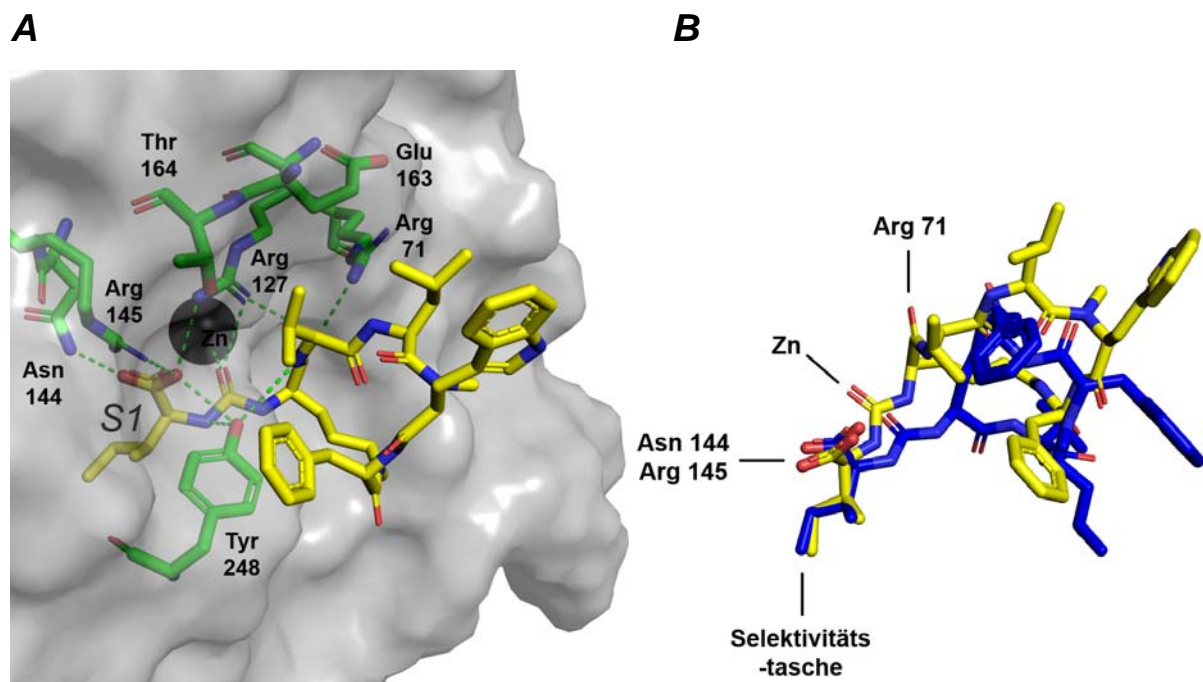


Abbildung 85 A: Brunsvicamid A (**18**, D-Lys) im aktiven Zentrum der CPDA. **B:** Vergleich der räumlichen Anordnung von **18** (D-Lys, gelb) und **99** (L-Lys, blau) im aktiven Zentrum der CPDA.

In Übereinstimmung mit den bei der Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehung angestellten Vermutungen (Abbildung 84) ragt die Seitenkette des Isoleucins in die Selektivitätstasche und die Seitenketten der Aminosäuren Nummer zwei bis fünf interagieren größtenteils mit Lösungsmittelmolekülen (Abbildung 85 A). Zum Vergleich wurden die Berechnungen auch für die ein L-Lysin enthaltende Verbindung **99** (CPDA-IC₅₀ = 5 µM) durchgeführt. Bedingt durch die S-Konfiguration des Lysins wurde die Abfolge der vier Aminosäuren im Ring invertiert. Hieraus resultiert nicht nur eine andere Konformation des Ringes sondern auch eine veränderte Positionierung des Makrozyklus oberhalb der Aktivitätstasche (Abbildung 85 B).

Die biochemischen Wechselwirkungen zwischen den Brunsvicamid Analoga und der *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase B wurden mit einem 4-Nitrophenolphosphat basierten Absorptionsassay und einem 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat basierten Fluoreszenzassay untersucht. Die bei den Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse weichen von denen für den isolierten Naturstoff publizierten ab. Keine der synthetisierten Verbindungen inhibierte bei einer Konzentration von 50 µM MtpB. Es liegt die Vermutung nahe, dass die geringen aus Cyanobakterien isolierten Mengen Naturstoff verunreinigt waren und diese unbekanntes Substanzen zur Inhibition der MtpB führten.

Die Etablierung der Syntheseroute im Rahmen dieser Arbeit war die entscheidende Voraussetzung für die Ermittlung der korrekten Stereochemie und die anschließende Untersuchung der biologischen Aktivitäten der Brunsvicamide. Die erhaltenen Erkenntnisse stellen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehung und damit auch die Basis für weitergehende Untersuchungen der Substanzklasse der Anabaenopeptide dar. Um detailliertere Einsichten in die Wirkung von Brunsvicamid Analoga auf zum Beispiel die Carboxypeptidase B zu gewinnen, werden weitere Untersuchungen nötig sein. Diese könnten zu neuen selektiven Peptidase- und Proteaseinhibitoren führen und möglicherweise könnten die erhaltenen Informationen einmal einen wertvollen Beitrag für die Identifizierung der bislang unbekanntes biologischen Bedeutung der Anabaenopeptide liefern.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Hilfsmittel

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DRX 500 (500 MHz (¹H) und 126 MHz (¹³C)), Bruker DRX 400 (400 MHz (¹H) und 101 MHz (¹³C)) und Varian Mercury-VX 400 (400 MHz (¹H) und 101 MHz (¹³C)) Spektrometern aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben, die Spektren wurden auf das jeweilige Restsignal des Lösungsmittels kalibriert: CDCl₃ (7.26 ppm (¹H) und 77.0 ppm (¹³C)), DMSO-*D*₆ (2.50 ppm (¹H) und 39.43 ppm (¹³C)), MeOD (3.31 ppm (¹H) und 49.15 ppm (¹³C)) und D₂O (4.79 ppm (¹H)). Kopplungskonstanten wurden in Hertz (Hz) angegeben und Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s (Singulett), br s (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), q (Quartet), m (Multipllett).

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einem Jeol SX 102 A (FAB; Matrix Nitrobenzylalkohol) oder mittels ESI (Elektronen Spray Ionisierung) an einem Accela LTQ Orbitrap Spektrometer der Firma Thermo Scientific gemessen.

Spezifische Drehwerte wurden mit einem Schmidt + Haensch Polartronic HH8 Polarimeter für 589 nm ermittelt. Die Konzentration *c* (in g/100 mL) und das verwendete Lösungsmittel sind bei den einzelnen Verbindungen angegeben.

Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktapparatur der Firma Büchi (BÜCHI 540) bestimmt und sind unkorrigiert.

Infrarotspektren (FT-IR) wurden mit einem Bruker Tensor 27 Spektrometer (ATR, neat) aufgenommen. Die Intensitäten der Banden sind mit w (weak), m (medium) und s (strong) angegeben.

Für **analytische HPLC/MS** wurden folgende Geräte verwendet: Hewlett Packard Series 1100/Finnigan LTQ (CC 125 Nucleodur C18 Gravity von Macherey-Nagel); Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 1 mL/min. Folgende Gradienten wurden verwendet: (Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % HCO₂H; Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % HCO₂H): 0 min: 10 % B; 1 min konstant; 10 min: 100 % B; 2 min konstant.

Folgender Gradient wurde für die **Koinjektionsexperimente** mit **18** und **99** und aus Bakterien isoliertem BVA A verwendet: (Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % HCOOH; Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % HCOOH): 0 min: 40 % B; 1 min konstant; 7 min: 53 % B; 8 min 100 % B; 3 min konstant. Flussrate: 1.0 mL/min.

Die Aufreinigung von Verbindungen mittels **präoperativer HPLC** erfolgte mit einem Agilent Series HPLC 1100 System mit LC/MSD VL (ESI-MS) Massendetektor und VP 125/21 Nucleodur C18 Gravity 5 μm Säule (Macherey-Nagel). Eluent: H₂O/MeOH, Flussrate = 25 mL/min, isokratisch: 35 % H₂O; 25 min. Für die ESI-MS Detektion wurden 0.1 % des Lösungsmittelflusses mit 10 mM HCO₂H in H₂O/Acetonitril 1:1 verdünnt.

Gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (**GC-MS**) Spektren wurden auf einem Hewlett Packard 6890 System mit einer HP-5MS, 25 m \times 0.2 mm, 0.33 μm Säule (Agilent), Helium als Trägergas und einem Massendetektor der Firma Hewlett Packard (5973) aufgenommen. Das Temperaturprogramm hielt 1 min 100 °C, heizte über 5 min auf 300 °C und hielt die Temperatur anschließend für 5 min konstant bei 300 °C.

Die **Elementaranalysen** wurden mit einem Leco CHNS-932 Gerät durchgeführt.

Für die Aufnahme von **MALDI** TOF Massenspektren wurde eine Voyager-DE Pro BioSpectrometry™ Workstation MALDI-TOF der Firma PerSeptive Biosystems verwendet. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) diente als Matrix.

Für die kombinatorische Festphasensynthese wurden IRORI MacroKans™, RFT-001 Radiofrequenz-tags und ein IRORI AccuTag™ 100 System verwendet.

Für die **Dünnschichtchromatographie** (DC) wurden Kieselgelplatten der Firma Merck verwendet (60F-254). Zur Detektion wurden UV-Licht (254 nm) oder ein Tauchbad (1 g KMnO₄, 6.6 g K₂CO₃, 1.7 mL 5% NaOH (aq), 100 mL H₂O) verwendet. Für die Säulenchromatographie wurde **Kieselgel** der Firma ACROS verwendet (Partikelgröße 35-70 μm). Das verwendete

2-Chlortritylchloridpolystyrolharz (Copolymer, 1.45 mmol/g, 1 % DVB, 50–100 mesh) stammte von der Firma CBL Patras. Alle Reaktionen, bei denen getrocknete Lösungsmittel eingesetzt wurden, wurden unter Argon als **Schutzgas** durchgeführt. Falls notwendig wurden die kommerziell erhältlichen **Lösungsmittel** unter Verwendung von Standardmethoden getrocknet.¹⁵⁷ Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Sigma, Novabiochem, Fluka, IRIS, CBL, GLS oder Bachem bezogen.

Alle Assays wurden in 96-Loch **Mikrotiterplatten** (F-Form) der Firma Greiner durchgeführt.

UV-Vis-Absorptions- und Fluoreszenzassays wurden an einem Infinite M200 **Mikrotiterplatten-Photometer** der Firma TECAN vermessen.

Enzyme

Die Phosphatase MptpB wurde freundlicherweise von A. Giffey (Arbeitsgruppe von Dr. I. Vetter (Max-Planck-Institut Dortmund)) exprimiert und isoliert. MptpB lag in einer Konzentration von 3.3 mg/mL vor. Carboxypeptidase A (24 mg/mL) und B (Feststoff) wurden von der Firma Sigma bezogen.

Inhibitoren

Die potentiellen Inhibitoren und die Kontrollsubstanzen lagen in 10 mM Stammlösungen in DMSO vor.

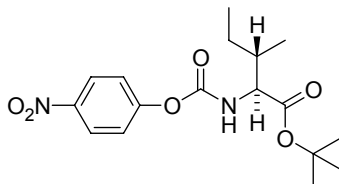
Endverdünnungen und **-konzentrationen** beziehen sich auf die Verdünnung bzw. Konzentration in 100 μ L Gesamtvolumen der Assaylösung.

Es wurden die **Bakterienstämme** *Staphylococcus aureus* (DSM Nr.: 1104) und Methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (DSM Nr.: 2569) verwendet.

Als Positivkontrollen wurden die **Antibiotika** Tetracyclin und Ampicillin (Sigma) eingesetzt.

6.2 Versuche zu Kapitel 4.1.7

6.2.1 *N*^α-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-isoleucin-*tert*-butylester (**74**):

**74**

Isoleucin-*tert*-butylester (4.0 g, 18 mmol) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt, in abs. Dichlormethan (20 mL) gelöst, abs. Pyridin (5.76 mL, 72 mmol, 4.0 Äq.) zugegeben und anschließend auf 0 °C gekühlt. Das *p*-Nitrophenylchloroformiat (3.6 g, 1.0 Äq.) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt, in abs. Dichlormethan (32 mL) gelöst und trockenes Pyridin (5.76 mL, 4.0 Äq.) zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde bei 0 °C tropfenweise in den Reaktionskolben überführt. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt. Nach 16 h Rühren bei RT (DC-Kontrolle Cyclohexan / Ethylacetat 2:1) wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen, mit 5 %iger KHSO₄ (aq) (5 × 50 mL), Wasser (1 × 50 mL), NaCl (aq) (1 × 50 mL) gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, 600 g Kieselgel) aufgereinigt. Das Carbamat **74** (5.47 g, 15.5 mmol, 87 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: Farbloses Öl, 5.47 g, 15.5 mmol, 87 %.

R_f-Wert: 0.67 (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: 13.3 (*c* = 3, CHCl₃).

IR: $\tilde{\nu}$ = 3344 (w), 2970 (w), 2938 (w), 2880 (w), 2363 (w), 2256 (w), 1727 (s), 1616 (w), 1597 (w), 1525 (s), 1488 (s), 1370 (m), 1345 (s), 1307 (w), 1207 (s), 1147 (s), 1113 (m), 1068 (w), 1001 (m), 961 (w), 862 (m), 804 (w), 750 (m), 685 (w) cm⁻¹.

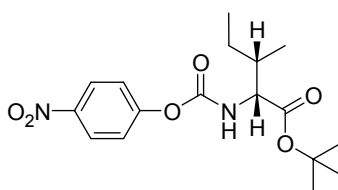
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.21 (d, 2 ArH, *J* = 9.2 Hz), 7.30 (d, 2 ArH, *J* = 8.6 Hz), 5.81 (d, 1 H, NH, *J* = 8.6 Hz), 4.26 (dd, 1 H, α -H, *J* = 8.7, 4.4 Hz),

1.99-1.87 (m, 1 H, β -H), 1.48 (s, 9 H, *tert*-Bu), 1.48-1.42 (m, 1 H, γ -H₂), 1.30-1.18 (m, 1 H, γ -H₂) 1.01-0.93 (m, 6 H, γ -H₃, δ -H₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 170.4 (C=O), 155.8 (ArC), 152.8 (C=O), 144.7 (ArC), 125.0 (2 ArC), 121.9 (2 ArC), 82.5 (C(CH₃)₃), 58.7 (C α), 38.2 (C β), 27.9 (C(CH₃)₃), 25.1 (C γ), 15.3 (CH-CH₃), 11.6 (CH₂-CH₃).

Elementaranalyse: C₁₇H₂₄N₂O₆ Berechnet: C 57.9, H 6.9; N, 8.0. Gefunden: C 57.4, H 6.9, N 7.8.

6.2.2 *N* ^{α} -(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-D-*allo*-isoleucin-*tert*-butylester (109):



109

Die Darstellung erfolgte analog zu der Verbindung **74** aus D-*allo*-Isoleucin-*tert*-butylester. Als Eluent für die Säulenchromatographie diente Cyclohexan / Ethylacetat (9:1).

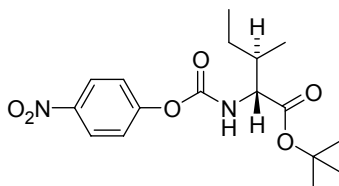
Ausbeute: Farbloses Öl, 440 mg, 1.3 mmol, 73 %.

R_f-Wert: 0.67 (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -12.3 (*c* = 3.9, CHCl₃).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.28-8.20 (m, 2 ArH), 7.37-7.30 (m, 2 ArH), 5.62 (d, 1 H, NH, *J* = 9.0 Hz), 4.37 (dd, 1 H, α -H, *J* = 3.6, 9.1 Hz), 2.03-1.94 (m, 1 H, β -H), 1.57-1.43 (m, 10 H, γ -H₂, *tert*-Bu), 1.31-1.20 (m, 1 H, γ -H₂), 0.99 (t, 3 H, δ -H₃, *J* = 7.4 Hz), 0.91 (d, 3 H, γ -H₃, *J* = 6.9 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 170.9 (C=O), 155.8 (ArC), 153.1 (C=O), 144.7 (ArC), 125.0 (2 ArC), 121.9 (2 ArC), 82.5 (C(CH₃)₃), 57.8 (C α), 37.9 (C β), 28.0 (C(CH₃)₃), 26.2 (C- γ), 14.2 (γ -Me), 11.7 (δ -Me).

6.2.3 N^{α} -(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-D-isooleucin-*tert*-butylester (110):**110**

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **74** aus D-Isoleucin-*tert*-butylester. Als Eluent für die Säulenchromatographie diente Cyclohexan / Ethylacetat (9:1).

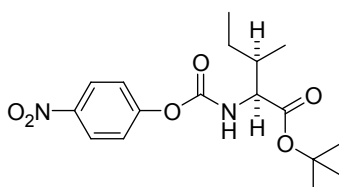
Ausbeute: Farbloses Öl, 389 mg, 1.1 mmol, 69 %.

R_f -Wert: 0.67 (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -13.7 ($c = 3.5$, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.28$ - 8.21 (m, 2 ArH), 7.37 - 7.30 (m, 2 ArH), 5.70 (d, 1 H, NH, $J = 8.6$ Hz), 4.27 (dd, 1 H, α -H, $J = 4.3, 8.7$ Hz), 2.00 - 1.90 (m, 1 H, β -H), 1.50 (s, 9 H, *tert*-Bu), 1.49 - 1.44 (m, 1 H, γ -H₂), 1.32 - 1.18 (m, 1 H, γ -H₂), 0.99 (d, 3 H, γ -H₃, $J = 6.9$ Hz), 0.97 (t, 3 H, δ -H₃, $J = 7.4$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) $\delta = 170.5$ (C=O), 155.8 (ArC), 152.8 (C=O), 144.8 (ArC), 125.0 (2 ArC), 121.9 (2 ArC), 82.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 58.8 ($\text{C}\alpha$), 38.3 ($\text{C}\beta$), 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.1 ($\text{C}\gamma$), 15.4 (γ -Me), 11.7 (δ -Me).

6.2.4 N^{α} -(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-*allo*-Isoleucin-*tert*-butylester (111):**111**

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **74** aus L-*allo*-Isoleucin-*tert*-butylester. Als Eluent für die Säulenchromatographie diente Cyclohexan / Ethylacetat (10:1).

Ausbeute: Farbloses Öl, 133 mg, 0.4 mmol, 77 %.

R_f-Wert: 0.67 (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, v/v).

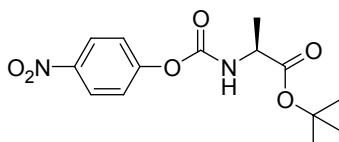
$[\alpha]_D^{20}$: 13.3 ($c = 3.9$, CHCl₃).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.27$ - 8.18 (m, 2 ArH), 7.35 - 7.28 (m, 2 ArH), 5.70 (d, 1 H, NH, $J = 9.1$ Hz), 4.36 (dd, 1 H, α -H, $J = 3.6, 9.2$ Hz), 2.02 - 1.93 (m, 1 H, β -H), 1.56 - 1.42 (m, 10 H, γ -H₂, *tert*-Bu), 1.31 - 1.18 (m, 1 H, γ -H₂), 0.97 (t, 3 H, δ -H₃, $J = 7.4$ Hz), 0.90 (d, 3 H, γ -H₃, $J = 6.9$ Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 170.9$ (C=O), 155.8 (ArC), 153.1 (C=O), 144.7 (ArC), 125.0 (2 ArC), 121.9 (2 ArC), 82.5 (C(CH₃)₃), 57.8 (C α), 37.9 (C β), 28.0 (C(CH₃)₃), 26.2 (C γ), 14.2 (C γ -Me), 11.7 (C δ -Me).

Elementaranalyse: C₁₇H₂₄N₂O₆ Berechnet: C 57.9, H 6.9; N, 8.0. Gefunden: C 58.3, H 7.5, N 8.0.

6.2.5 N^α-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-alanin-*tert*-butylester (**133**):



133

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **74**. aus L-Alanin-*tert*-butylester.

Ausbeute: Farbloses Öl, 1.09 g, 3.5 mmol, 51 %.

R_f-Wert: 0.46 (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, v/v); 0.15 (CH₂Cl₂ / Pentan 4:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -20 ($c = 2.7$, CHCl₃ / MeOH 10:1).

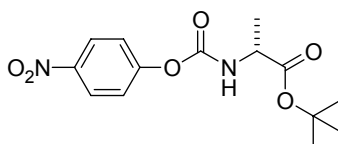
IR: $\tilde{\nu} = 3306$ (w), 2161 (w), 1735 (s), 1703 (s), 1617 (w), 1546 (m), 1527 (s), 1493 (m), 1456 (w), 1348 (s), 1260 (w), 1218 (s), 1147 (s), 1066 (w), 1004 (s), 934 (w), 867 (m), 841 (m), 761 (w), 727 (w), 664 (w) cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.24 (d, 2 ArH, J = 9.1 Hz), 7.32 (m, 2 ArH), 5.75 (d, 1 H, J = 7.2 Hz), 4.31 (qn, 1 H, α -H, J = 7.2 Hz), 1.50 (s, 9 H, *tert*-Bu), 1.47 (d, 3 H, β -H₃, J = 7.2 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 171.6 (C=O), 155.6 (C=O), 152.3 (ArC), 144.8 (ArC), 125.0 (2 ArC), 121.9 (2 ArC), 82.5 (C(CH₃)₃), 50.4 (C α), 27.9 (C(CH₃)₃), 18.6 (C β).

Elementaranalyse: C₁₄H₁₈N₂O₆ Berechnet: C 54.2, H 5.9; N, 9.0. Gefunden: C 54.0, H 5.9, N 8.8.

6.2.6 *N*^α-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-D-alanin-*tert*-butylester (134):



134

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **74** aus D-alanin-*tert*-butylester.

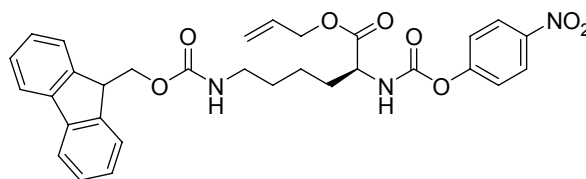
Ausbeute: Farbloses Öl, 1.39 g, 4.5 mmol, 67 %.

R_f-Wert: 0.46 (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: +22 (c = 3.0, CHCl₃ / MeOH 10:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.24 (d, 2 ArH, J = 9.2 Hz), 7.32 (d, 2 ArH, J = 9.2 Hz), 5.75 (d, 1 H, J = 7.2 Hz), 4.31 (qn, 1 H, α -H, J = 7.2 Hz), 1.50 (s, 9 H, *tert*-Bu), 1.47 (d, 3 H, β -H₃, J = 7.2 Hz).

Das Protonenspektrum ist identisch mit dem des Enantiomers (**133**), der Drehwert zeigt den für das Enantiomer zu erwartenden Wert.

6.2.7 *N*^ε-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-lysin-allylester (73):**73**

*N*_ε-Fmoc-Lysin-allylester (2.1 g, 5.2 mmol) und *p*-Nitrophenylchloroformiat (1.1 g, 1.0 Äq.) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt und in abs. Dichlormethan (175 mL) gelöst. Abs. Pyridin (3.4 mL, 42 mmol, 8 Äq.) wurde bei 0 °C tropfenweise zur Reaktionslösung gegeben und das Kühlbad anschließend entfernt. Nach 2 h Rühren bei RT (DC-Kontrolle Cyclohexan / Ethylacetat 1:1) wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (200 mL) aufgenommen, mit 1 N KHSO₄ (aq) (2 × 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert (2 × 50 mL) und die vereinigten organischen Extrakte mit NaCl (aq) (1 × 50 mL) gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan / Ethylacetat, 2:1, 300 g Kieselgel) aufgereinigt. Das Carbamat **73** (2.28 g, 4.0 mmol, 77 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 2.28 g, 4.0 mmol, 77 %.

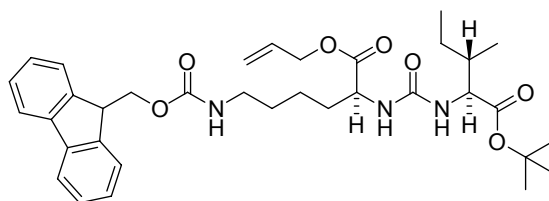
R_f-Wert: 0.51 (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1, v/v).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 8.17 (m, 2 ArH), 7.75 (m, 2 ArH), 7.56 (m, 2 ArH), 7.35-7.41 (m, 2 ArH), 7.23-7.30 (m, 4 ArH), 5.93 (m, 1 H), 5.27-5.38 (m, 2 H), 4.68 (m, 2 H), 4.35-4.50 (m, 2 H), 4.20-4.25 (m, 2 H), 3.15-3.30 (m, 2 H), 1.75-2.05 (m, 2 H), 1.35-1.70 (m, 4 H).

Die spektroskopischen Daten (¹H-NMR) stimmten mit der Literatur überein.⁶⁸

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1.8

6.3.1 L-Lysinallylester-*N*^ε-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-isoleucin-*tert*-butylester-harnstoff (75):



75

Der Fmoc-L-lysinallylester **38** (4.0 g, 9.8 mmol) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorlegt, abs. Dichlormethan (80 mL), abs. DIPEA (3.4 mL, 19.6 mmol, 2 Äq.) zugegeben und die Mischung auf 0 °C gekühlt. *N*^ε-(4-Nitrophenyloxycarbonyl)-L-isoleucin-*tert*-butylester **74** (2.7 g, 9.8 mmol, 1 Äq.) wurde in abs. Dichlormethan (10 mL) gelöst und bei 0 °C zur Reaktionslösung zugetropft. Das Eisbad wurde nach einer Stunde entfernt. Nach 16 h (DC-Kontrolle Cyclohexan / Ethylacetat, 2:1) wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck vollständig entfernt, der ölige Rückstand in Ethylacetat (160 mL) aufgenommen und mit 5%iger KHSO₄Lösung (3 × 120 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan (160 mL) aufgenommen, gewaschen mit NaHCO₃Lösung (3 × 80 mL), H₂O (1 × 80 mL), NaCl Lösung (1 × 80 mL) gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographie (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, 600 g Kieselgel) lieferte den Harnstoff **75** (4.76 g, 7.65 mmol, 78 %) als einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 4.76 g, 7.65 mmol, 78 %.

R_f-Wert: 0.22 (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1, v/v).

[α]_D²⁰: 3.84 (c = 5.4, CHCl₃).

HPLC-ESI: *t*_R = 11.0 min, *m/z* = 622.1 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3360 (w), 2963 (w), 2934 (w), 2875 (w), 2119 (w), 1726 (s), 1648 (s), 1546 (s), 1478 (w), 1450 (m), 1367 (m), 1336 (w), 1247 (s), 1138 (s), 1032 (w), 988 (w), 934 (w), 848 (w), 759 (m), 740 (s), 670 (w), 621 (w) cm⁻¹.

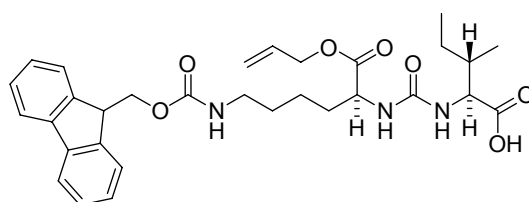
Smp.: 72 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.48 (d, 2 ArH, J = 7.5 Hz), 7.34 (d, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 7.10 (t, 2 ArH, J = 7.5 Hz), 7.02 (t, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 6.20 (bs, 1 H, Lys- α -NH), 5.84 (bs, 1 H, Ile- α -NH), 5.62 (dq, 1 H, H₂C=CH, J = 5.7, 10.7 Hz), 5.03 (d, 1 H, H_{trans} CH=CH, J = 17.2 Hz), 4.94 (d, 1 H, H_{cis} CH=CH, J = 10.4 Hz), 4.41-4.27 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.15-4.03 (m, 3 H, L-Lys-H α , CH₂-Fmoc), 3.98-3.88 (m, 2 H, Ile- α -H, CH-Fmoc), 2.90-2.80 (m, 2 H, Lys- ϵ -H₂), 1.61-1.47 (m, 2 H, Ile- β -H, Lys- β -H₂), 1.45-1.31 (m, 1 H, Lys- β -H₂), 1.30-1.20 (m, 1 H, Lys- δ -H₂), 1.20-1.05 (m, 3 H, Lys- γ -H₂, Ile- γ -H₂), 1.17 (s, 9 H, *tert*-Bu), 0.92-0.84 (m, 2 H, Ile- γ -H₂, Lys- δ -H₂), 0.71-0.54 (m, 6 H, Ile- γ -H₃, Ile- δ -H₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 173.0 (C=O), 171.9 (C=O), 158.0 (C=O), 157.0 (C=O), 143.5 (2 ArC), 140.8 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.1 (2 ArC), 126.5 (2 ArC), 124.5 (2 ArC), 119.3 (2 ArC), 117.7 (H₂C=CH), 81.1 (C(CH₃)₃), 66.1 (CH₂-Fmoc), 65.2 (CH₂-Allyl), 57.3 (Ile-C α), 52.4 (Lys-C α), 46.7 (CH-Fmoc), 39.9 (Lys-C ϵ), 37.5 (Ile-C β), 31.5 (Lys-C β), 28.1 (Lys-C δ), 27.2 (*tert*-Bu), 24.5 (Ile-C γ), 22.1 (Lys-C γ), 14.8 (γ -Me), 11.0 (δ -Me).

HR-MS (ESI): für C₃₅H₄₇N₃O₇ [M+Na]⁺ berechnet: 622.3487, Gefunden: 622.3495.

6.3.2 L-Lysinallylester-*N*'-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-iso-leucin-harnstoff (79):



79

Der *tert*-Butylester **75** (2.6 g, 4.6 mmol) wurde in Dichlormethan/Trifluoressigsäure gelöst (1:1 v/v, 30 mL). Nach 3 h (DC-Kontrolle (Cyclohexan / Essigester 2:1)) wurde Toluol (75 mL) zugeben und das Reaktionsgemisch bei vermindertem Druck aufkonzentriert. Anschließend wurde Dichlormethan (2×75 mL) zugegeben und jeweils bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in TFA (3 mL) aufgenommen, durch Zugabe von Wasser (150 mL) ausgefällt und nach

Gefriertrocknung wurde der Harnstoff **79** (2.56 g, 4.52 mmol, 99 %) als farblosen Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.56 g, 4.52 mmol, 99 %.

R_f-Wert: 0.40 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -14.0 (*c* = 1.0, CHCl₃).

HPLC-ESI: *t_R* = 9.6 min, *m/z* = 567.1 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3328 (w), 2959 (w), 1728 (s), 1691 (s), 1578 (s), 1543 (s), 1449 (w), 1383 (w), 1264 (s), 1200 (m), 1143 (m), 992 (w), 937 (w), 760 (s), 736 (w), 646 (w) cm⁻¹.

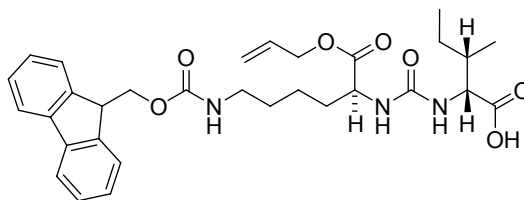
Smp.: 126 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.57 (d, 2 ArH, *J* = 7.5 Hz), 7.42 (d, 2 ArH, *J* = 7.3 Hz), 7.20 (t, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 7.11 (t, 2 ArH, *J* = 6.9 Hz), 6.14-6.04 (m, 1 H, Lys- α -NH), 5.90 (d, 1 H, Ile-NH, *J* = 8.6 Hz), 5.79-5.64 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.12 (d, 1 H, *H_{trans}*CH=CH, *J* = 17.2 Hz), 5.03 (d, 1 H, *H_{cis}*CH=CH, *J* = 10.4 Hz), 4.51-4.36 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.21-4.15 (m, 3 H, Lys- α -H, CH₂-Fmoc), 4.11 (d, 1 H, Ile- α -H, *J* = 4.8 Hz), 4.07-3.95 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.02-2.85 (m, 2 H, Lys- ϵ -H₂), 2.81 (bs, 1 H, Lys- ϵ -NH), 1.74-1.53 (m, 2 H, Ile- β -H, Lys- β -H₂), 1.52-1.38 (m, 1 H, Lys- β -H₂), 1.38-1.23 (m, 5 H, Lys- δ -H₂, Ile- γ -H₂, Lys- γ -H₂), 1.05-0.93 (m, 1 H, Ile- γ -H₂), 0.76 (d, 3 H, Ile- γ -H₃, *J* = 6.9 Hz), 0.72 (t, 3 H, Ile- δ -H₃, *J* = 0.72 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 174.7 (C=O), 173.1 (C=O), 158.1 (C=O), 157.0 (C=O), 143.6 (2 ArC), 140.9 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.3 (2 ArC), 126.7 (2 ArC), 124.6 (2 ArC), 119.5 (2 ArC), 118.0 (H₂C=CH), 66.2 (CH₂-Fmoc), 65.4 (CH₂-Allyl), 57.0 (Ile-C α), 52.4 (Lys-C α), 46.9 (CH-Fmoc), 40.1 (Lys-C ϵ), 37.3 (Ile-C β), 31.7 (Lys-C β), 28.8 (Lys-C δ), 24.4 (Ile-C γ), 22.2 (Lys-C γ), 15.1 (Ile- γ -Me), 11.1 (Ile- δ -Me).

HR-MS (ESI): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 565.2861, Gefunden: 565.2864.

6.3.3 L-Lysinallylester-*N*^F-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-D-allo-isoleucin-harnstoff (119):



119

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79** aus **112**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 398 mg, 0.7 mmol, 70 %.

R_f-Wert: 0.34 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -10 (c = 0.7, CHCl₃).

HPLC-ESI: t_R = 9.6 min, m/z = 566.1 [M+H]⁺.

IR: ν = 3369 (w), 2934 (w), 1718 (m), 1647 (m), 1556 (m), 1450 (w), 1383 (w), 1252 (m), 1168 (s), 987 (w), 937 (w), 759 (w), 740 (m), 696 (w), 621 (w) cm⁻¹.

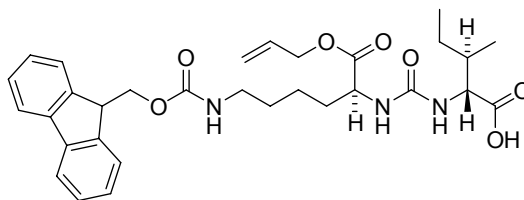
Smp.: 154 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.53 (d, 2 ArH, J = 7.5 Hz), 7.38 (d, 2 ArH, J = 7.5 Hz), 7.16 (t, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 7.07 (dt, 2 ArH, J = 1.1, 7.4 Hz), 5.72-5.61 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.08 (dd, 1 H, H_{trans} HC=CH, J = 1.4, 17.5 Hz), 4.99 (dd, 1 H, H_{cis} HC=CH, J = 1.2, 10.9 Hz), 4.42-4.34 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.18 (d, 1 H, D-allo-Ile- α -H, J = 4.0 Hz), 4.16-4.08 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, L-Lys- α -H), 4.01-3.93 (m, 1 H, CH-Fmoc), 2.95-2.83 (m, 2 H, L-Lys- ϵ -H₂), 1.76-1.64 (m, 1 H, D-allo-Ile- β -H), 1.63-1.52 (m, 1 H, L-Lys- β -H₂), 1.50-1.38 (m, 1 H, L-Lys- β -H₂), 1.34-1.25 (m, 2 H, L-Lys- δ -H₂), 1.24-1.11 (m, 3 H, D-allo-Ile- β -H, L-Lys- γ -H₂), 1.04-0.92 (m, 1 H, D-allo-Ile- β -H₂), 0.70 (t, 3 H, D-allo-Ile- δ -H₃, J = 7.4 Hz), 0.64 (d, 3 H, D-allo-Ile- γ -H₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 174.8 (C=O), 172.8 (C=O), 158.2 (C=O), 157.0 (C=O), 143.5 (2 ArC), 140.9 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.2 (2 ArC), 126.6 (2 ArC), 124.6 (2 ArC), 119.43 (2 ArC), 117.9 (H₂C=CH), 66.1 (CH₂-Fmoc), 65.3 (CH₂-Allyl), 55.5 (D-allo-Ile-C α), 52.5 (Lys-C α), 46.8 (CH-Fmoc), 40.0 (Lys-C ϵ), 37.0 (D-allo-Ile-C β), 31.8 (Lys-C β), 28.8 (Lys-C δ), 25.8 (D-allo-Ile-C γ), 22.2 (Lys- γ), 13.7 (D-allo-Ile- γ -Me), 11.1 (D-allo-Ile- δ Me).

HR-MS (FAB): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 566.2861, Gefunden: 566.2856.

6.3.4 L-Lysinallylester-*N*^F-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-D-isoleucin-harnstoff (120):



120

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79** aus **113**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 528 mg, 0.93 mmol, 83 %.

R_f-Wert: 0.31 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -10.9 (*c* = 1.5, CHCl₃).

HPLC-ESI: *t_R* = 9.5 min, *m/z* = 566.0 [M+H]⁺.

IR: ν = 3368 (w), 2963 (w), 1718 (m), 1647 (m), 1556 (m), 1450 (w), 1382 (w), 1340 (w), 1250 (m), 1166 (s), 987 (w), 936 (w), 759 (w), 740 (m), 696 (w), 621 (w) cm⁻¹.

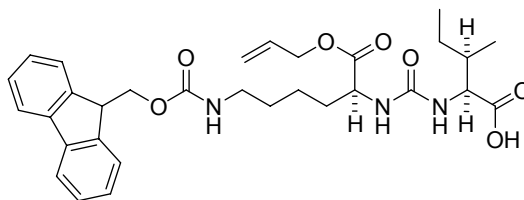
Smp.: 152 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.73 (d, 2 ArH, *J* = 7.5 Hz), 7.59 (d, 2 ArH, *J* = 7.5 Hz), 7.36 (t, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 7.28 (dt, 2 ArH, *J* = 3.7, 7.5 Hz), 5.93-5.82 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.28 (d, 1 H, *H_{trans}*HC=CH, *J* = 17.2 Hz), 5.19 (d, 1 H, *H_{cis}*HC=CH, *J* = 10.4 Hz), 4.64-4.52 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.38-4.29 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, L-Lys- α -H), 4.27 (d, 1 H, D-Ile- α -H, *J* = 4.9 Hz), 4.21-4.14 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.16-3.03 (m, 2 H, L-Lys- ϵ -H₂), 1.89-1.72 (m, 2 H, D-Ile- β -H, L-Lys- β -H₂), 1.70-1.58 (m, 1 H, L-Lys- β -H₂), 1.56-1.28 (m, 5 H, L-Lys- δ -H₂, D-Ile- β -H, L-Lys- γ -H₂), 1.22-1.08 (m, 1 H, D-Ile- β -H), 0.91 (d, 3 H, D-Ile- δ -H₃, *J* = 6.8 Hz), 0.88 (t, 3 H, D-Ile- γ -H₃, *J* = 7.4 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 174.2 (C=O), 172.8 (C=O), 158.0 (C=O), 156.9 (C=O), 143.5 (2 ArC), 140.8 (2 ArC), 131.2 (H₂C=CH), 127.1 (2 ArC), 126.5 (2 ArC), 124.5 (2 ArC), 119.3 (2 ArC), 117.7 (H₂C=CH), 66.0 (CH₂-Fmoc), 65.2 (CH₂-Allyl), 56.8 (D-Ile-C α), 52.4 (Lys-C α), 46.7 (CH-Fmoc), 39.9 (Lys-C ϵ), 37.3 (D-Ile-C β), 31.7 (Lys-C β), 28.7 (Lys-C δ), 24.4 (D-Ile-C γ), 22.1 (Lys- γ), 14.8 (D-Ile- γ -Me), 10.9 (D-Ile- δ Me).

HR-MS (FAB): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 566.2861, Gefunden: 566.2855.

6.3.5 L-Lysinylester-*N*^F-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-allo-isoleucin-harnstoff (121):



121

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79** aus **114**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 614 mg, 1.09 mmol, 73 %.

R_f-Wert: 0.34 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -3.9 (*c* = 1.9, CHCl₃).

HPLC-ESI: *t_R* = 9.6 min, *m/z* = 565.9 [M+H]⁺.

IR : ν = 3369 (w), 2934 (w), 1718 (m), 1647 (m), 1556 (m), 1450 (w), 1383 (w), 1251 (m), 1168 (s), 987 (w), 937 (w), 759 (w), 740 (m), 696 (w), 621 (w) cm⁻¹.

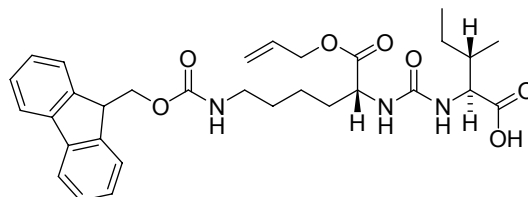
Smp.: 163 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.72 (d, 2 ArH, *J* = 7.5 Hz), 7.58 (d, 2 ArH, *J* = 7.5 Hz), 7.35 (t, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 7.27 (t, 2 ArH, *J* = 7.0 Hz), 5.93-5.80 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.28 (d, 1 H, *H_{trans}*HC=CH, *J* = 17.0 Hz), 5.19 (d, 1 H, *H_{cis}*HC=CH, *J* = 10.5 Hz), 4.65-4.49 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.40 (d, 1 H, L-allo-Ile- α -H, *J* = 3.9 Hz), 4.37-4.29 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, L-Lys- α -H), 4.20-4.13 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.15-3.03 (m, 2 H, L-Lys- ϵ -H₂), 1.99-1.87 (m, 1 H, L-allo-Ile- β -H), 1.83-1.72 (m, 1 H, L-Lys- β -H₂), 1.68-1.57 (m, 1 H, L-Lys- β -H₂), 1.53-1.31 (m, 5 H, L-Lys- δ -H₂, L-allo-Ile- β -H, L-Lys- γ -H₂), 1.26-1.14 (m, 1 H, L-allo-Ile- β -H), 0.91 (t, 3 H, L-allo-Ile- γ -H₃, *J* = 7.4 Hz), 0.85 (d, 3 H, L-allo-Ile- δ -H₃, *J* = 6.9 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 175.0 (C=O), 173.0 (C=O), 158.3 (C=O), 156.9 (C=O), 143.5 (2 ArC), 140.8 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.2 (2 ArC), 126.6 (2 ArC), 124.6 (2 ArC), 119.4 (2 ArC), 117.9 (H₂C=CH), 66.1 (CH₂-Fmoc), 65.2 (CH₂-Allyl), 55.5 (L-allo-Ile-C α), 52.4 (Lys-C α), 46.8 (CH-Fmoc), 40.0 (Lys-C ϵ), 36.8 (L-allo-Ile-C β), 31.7 (Lys-C β), 28.7 (Lys-C δ), 25.8 (L-allo-Ile-C γ), 22.1 (Lys- γ), 13.7 (L-allo-Ile- γ -Me), 11.1 (L-allo-Ile- δ Me).

HR-MS (FAB): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 566.2861, Gefunden: 566.2855.

6.3.6 D-Lysinallylester-N^ε-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-isoleucin-harnstoff (122):



122

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79** aus **115**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 1.26 g, 2.22 mmol, 98 %.

R_f-Wert: 0.44 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: 10.9 (c = 1.0, CHCl₃).

HPLC-ESI: t_R = 9.6 min, m/z = 566.1 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3367 (w), 2962 (w), 1718 (w), 1646 (s), 1556 (s), 1450 (w), 1380 (w), 1247 (s), 1187 (s), 1136 (m), 1031 (w), 985 (w), 931 (w), 759 (m), 740 (s), 658 (w) cm⁻¹.

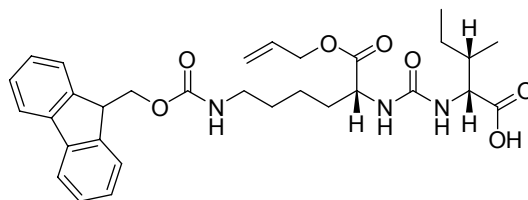
Smp.: 129 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.52 (d, 2 ArH, J = 7.5 Hz), 7.38 (d, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 7.15 (t, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 7.07 (t, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 6.18-6.07 (m, 1 H, D-Lys- α -NH), 5.91 (d, 1 H, Ile-NH, J = 9.0 Hz), 5.72-5.60 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.07 (d, 1 H, H_{trans} HC=CH, J = 17.2 Hz), 4.98 (d, 1 H, H_{cis} HC=CH, J = 10.4 Hz), 4.41-4.31 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.15-4.08 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, D-Lys- α -H), 4.03 (d, 1 H, Ile- α -H, J = 4.9 Hz), 3.96 (t, 1 H, CH-Fmoc, J = 6.8 Hz), 2.91-2.81 (m, 2 H, D-Lys- ϵ -H₂), 2.74 (bs, 1 H, D-Lys- ϵ -NH), 1.70-1.51 (m, 2 H, Ile- β -H, D-Lys- β -H₂), 1.51-1.36 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.36-1.06 (m, 5 H, D-Lys- δ -H₂, Ile- γ -H₂, D-Lys- γ -H₂), 1.02-0.86 (m, 1 H, Ile- γ -H₂), 0.70 (d, 3 H, Ile- γ -H₃, J = 7.0 Hz), 0.67 (t, 3 H, Ile- δ -H₃, J = 7.4 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 174.7 (C=O), 172.9 (C=O), 158.1 (C=O), 156.9 (C=O), 143.5 (2 ArC), 140.8 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.2 (2 ArC), 126.6 (2 ArC), 124.5 (2 ArC), 119.4 (2 ArC), 117.9 (H₂C=CH), 66.1 (CH₂-Fmoc), 65.2 (CH₂-Allyl), 57.1 (Ile-C α), 52.5 (D-Lys-C α), 46.8 (CH-Fmoc), 40.0 (D-Lys-C ϵ), 37.4 (Ile-C β), 31.7 (D-Lys-C β), 28.8 (D-Lys-C δ), 24.4 (Ile-C β), 22.2 (D-Lys-C γ), 14.9 (Ile- γ -Me), 11.1 (Ile- δ -Me).

HR-MS (ESI): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 565.2861, Gefunden: 566.2869.

6.3.7 D-Lysinallylester-N^ε-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-D-allo-isoleucin-harnstoff (123):



123

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79** aus **116**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 578 mg, 0.93 mmol, 76 %.

R_f-Wert: 0.41 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -2.2 (*c* = 1.0, CHCl₃).

HPLC-ESI: *t_R* = 9.6 min, *m/z* = 566.1 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3375 (w), 2961 (w), 1723 (m), 1683 (m), 1573 (s), 1512 (m), 1447 (w), 1379 (w), 1277 (m), 1191 (s), 1112 (w), 1033 (w), 988 (w), 931 (w), 814 (w), 759 (w), 740 (s), 620 (w) cm⁻¹.

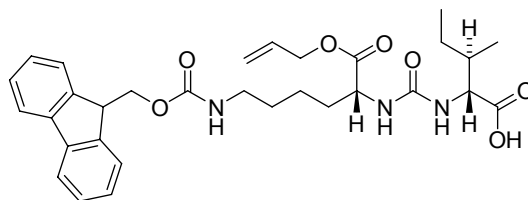
Smp.: 164 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.51 (d, 2 ArH, *J* = 7.5 Hz), 7.37 (d, 2 ArH, *J* = 7.2 Hz), 7.14 (t, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 7.06 (t, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 5.72-5.60 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.07 (d, 1 H, *H_{trans}*HC=CH, *J* = 17.2 Hz), 4.98 (d, 1 H, *H_{cis}*HC=CH, *J* = 10.4 Hz), 4.44-4.30 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.19 (d, 1 H, D-allo-Ile- α -H, *J* = 3.9 Hz), 4.15-4.09 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, D-Lys- α -H), 4.00-3.92 (m, 1 H, CH-Fmoc), 2.93-2.84 (m, 2 H, D-Lys- ϵ -H₂), 1.78-1.66 (m, 1 H, D-allo-Ile- β -H), 1.63-1.49 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.48-1.35 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.31-1.10 (m, 5 H, D-Lys- δ -H₂, D-allo-Ile- γ -H₂, D-Lys- γ -H₂), 1.07-0.93 (m, 1 H, D-allo-Ile- γ -H₂), 0.69 (t, 3 H, D-allo-Ile- δ -H₃, *J* = 7.4 Hz), 0.64 (d, 3 H, D-allo-Ile- γ -H₃, *J* = 6.9 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 175.0 (C=O), 172.9 (C=O), 158.3 (C=O), 156.9 (C=O), 143.5 (2 ArC), 140.8 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.2 (2 ArC), 126.5 (2 ArC), 124.5 (2 ArC), 119.4 (2 ArC), 117.8 (H₂C=CH), 66.1 (CH₂-Fmoc), 65.2 (CH₂-Allyl), 55.4 (D-allo-Ile-C α), 52.4 (D-Lys-C α), 46.8 (CH-Fmoc), 40.0 (D-Lys-C ϵ), 36.8 (D-allo-Ile-C β), 31.6 (D-Lys-C β), 28.7 (D-Lys-C δ), 25.8 (D-allo-Ile-C γ), 22.1 (D-Lys-C γ), 13.6 (D-allo-Ile- γ -Me), 11.0 (Ile- δ Me).

HR-MS (ESI): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 565.2861, Gefunden: 566.2856.

6.3.8 D-Lysinallylester-N^ε-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-D-isoleucin-harnstoff (124):



124

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79** aus **117**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 461 mg, 0.74 mmol, 70 %.

R_f-Wert: 0.41 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -6.1 (*c* = 1.0, CHCl₃).

HPLC-ESI: *t_R* = 9.6 min, *m/z* = 566.1 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3325 (w), 3042 (w), 2958 (w), 1769 (w), 1725 (m), 1687 (s), 1576 (s), 1539 (s), 1447 (w), 1380 (w), 1262 (s), 1196 (m), 1140 (m), 1119 (w), 989 (w), 934 (w), 799 (w), 776 (w), 758 (w), 737 (s), 644 (w), 621 (w) cm⁻¹.

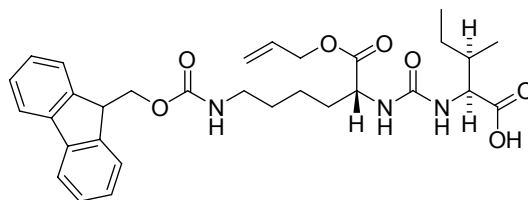
Smp.: 167 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.72 (d, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 7.58 (d, 2 ArH, *J* = 6.6 Hz), 7.35 (t, 2 ArH, *J* = 7.3 Hz), 7.27 (t, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 6.28 (bs, D-Lys- α -NH), 6.11 (bs, D-Ile-NH), 5.92-5.80 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.28 (d, 1 H, *H_{trans}*HC=CH, *J* = 17.1 Hz), 5.19 (d, 1 H, *H_{cis}*HC=CH, *J* = 10.5 Hz), 4.67-4.47 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.38-4.31 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, D-Lys- α -H), 4.28 (d, 1 H, D-Ile- α -H, *J* = 3.8 Hz), 4.24-4.10 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.13-3.05 (m, 2 H, D-Lys- ϵ -H₂), 2.95 (bs, D-Lys- ϵ -NH), 1.90-1.80 (m, D-Ile- β -H), 1.80-1.69 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.68-1.55 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.53-1.22 (m, 5 H, D-Lys- δ -H₂, D-Ile- γ -H₂, D-Lys- γ -H₂), 1.21-1.08 (m, 1 H, D-Ile- γ -H₂), 0.97-0.84 (m, 6 H, D-Ile- γ -H₃, D-Ile- δ -H₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 174.7 (C=O), 173.0 (C=O), 158.2 (C=O), 157.0 (C=O), 143.6 (2 ArC), 140.9 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.3 (2 ArC), 126.6 (2 ArC), 124.6 (2 ArC), 119.5 (2 ArC), 118.0 (H₂C=CH), 66.2 (CH₂-Fmoc), 65.3 (CH₂-Allyl), 57.0 (D-Ile-C α), 52.5 (D-Lys-C α), 46.8 (CH-Fmoc), 40.0 (D-Lys-C ϵ), 37.3 (D-Ile-C β), 31.7 (D-Lys-C β), 28.8 (D-Lys-C δ), 24.4 (D-Ile-C γ), 22.2 (D-Lys-C γ), 15.0 (D-Ile- γ -Me), 11.1 (D-Ile- δ -Me).

HR-MS (ESI): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 566.2861, Gefunden: 566.2856.

6.3.9 D-Lysinallylester-N^ε-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-allo-isoleucin-harnstoff (125):



125

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79** aus **118**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 814 mg, 1.31 mmol, 72 %.

R_f-Wert: 0.41 (CH₂Cl₂ / MeOD 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: 9.2 (c = 1.0, CHCl₃).

HPLC-ESI: t_R = 9.6 min, m/z = 566.1 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3369 (w), 2934 (w), 1718 (m), 1648 (m), 1558 (s), 1449 (m), 1381 (w), 1248 (m), 1174 (s), 1139 (s), 1033 (w), 985 (w), 938 (w), 853 (w), 759 (m), 740 (s), 697 (w), 621 (w) cm⁻¹.

Smp.: 157 °C.

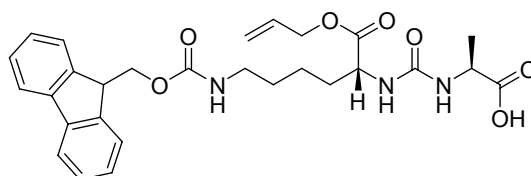
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 7.52 (d, 2 ArH, J = 7.5 Hz), 7.38 (d, 2 ArH, J = 7.3 Hz), 7.15 (t, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 7.07 (t, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 6.14 (bs, 1 H, D-Lys- α -NH), 5.90 (bs, 1 H, L-allo-Ile-NH), 5.72-5.60 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.07 (d, 1 H, H_{trans} HC=CH, J = 17.2 Hz), 4.98 (d, 1 H, H_{cis} HC=CH, J = 10.4 Hz), 4.39-4.32 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.19 (d, 1 H, L-allo-Ile- α -H, J = 3.9 Hz), 4.16-4.09 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, D-Lys- α -H), 3.99-3.92 (m, 1 H, CH-Fmoc), 2.96-2.82 (m, 2 H, D-Lys- ϵ -H₂), 2.74 (bs, D-Lys- ϵ -NH), 1.77-1.63 (m, 1 H, L-allo-Ile- β -H), 1.62-1.51 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.50-1.37 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.35-0.90 (m, 6 H, D-Lys- δ -H₂, Ile- γ -H₂, D-Lys- γ -H₂), 0.69 (t, 3 H, L-allo-Ile- γ -H₃, J = 7.4 Hz), 0.64 (d, 3 H, L-allo-Ile- δ -H₃, J = 6.9 Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 2:1): δ = 174.8 (C=O), 172.8 (C=O), 158.2 (C=O), 156.9 (C=O), 143.5 (2 ArC), 140.8 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.2 (2 ArC), 126.6 (2 ArC), 124.5 (2 ArC), 119.4 (2 ArC), 117.8 (H₂C=CH), 66.1 (CH₂-Fmoc), 65.2 (CH₂-Allyl), 55.5 (L-allo-Ile-C α), 52.4 (D-Lys-C α), 46.8 (CH-Fmoc), 40.0 (D-Lys-C ϵ),

37.0 (L-allo-Ile-C β), 31.8 (D-Lys-C β), 28.8 (D-Lys-C δ), 25.8 (L-allo-Ile-C β), 22.1 (D-Lys-C γ), 13.7 (L-allo-Ile- γ -Me), 11.0 (L-allo-Ile- δ -Me).

HR-MS (ESI): für C₃₁H₃₉N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 566.2861, Gefunden: 566.2856.

6.3.10 D-Lysinallylester-N^ε-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanin-harnstoff (135):



135

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79**.

Ausbeute: 1.17 g, 2.23 mmol, 74 %.

R_F-Wert: 0.66 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: +2.0 (c = 1.5, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 9.6 min, m/z = 524.0 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3316 (w), 2950 (w), 2161 (w), 2030 (w), 1733 (m), 1691 (s), 1633 (m), 1537 (s), 1447 (w), 1373 (w), 1333 (w), 1261 (s), 1230 (m), 1182 (m), 1135 (m), 1081 (w), 990 (w), 934 (w), 776 (w), 758 (m), 732 (m) cm⁻¹.

Smp.: 152 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 3:1): δ = 7.57 (d, 2 ArH, J = 7.5 Hz), 7.42 (d, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 7.20 (t, 2 ArH, J = 7.4 Hz), 7.12 (td, 2 ArH, J = 1.1, 7.4 Hz), 5.76-5.65 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.12 (dd, 1 H, H_{trans} HC=CH, J = 1.4, 17.2 Hz), 5.03 (dd, 1 H, H_{cis} HC=CH, J = 1.0, 10.4 Hz), 4.46-4.36 (m, 2 H, H₂-Allyl), 4.23-4.1 (m, 4 H, Ala- α -H, D-Lys- α -H, CH₂-Fmoc), 4.01 (t, 1 H, J = 6.9, CH-Fmoc), 2.99-2.87 (m, 2 H, D-Lys- ϵ -H₂), 2.8 (bs, D-Lys- ϵ -NH), 1.68-1.55 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.53-1.41 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.38-1.25 (m, 2 H, D-Lys- δ -H₂), 1.25-1.11 (m, 2 H, D-Lys- γ -H₂), 1.18 (d, 3 H, Ala- β -H₃, J = 7.2 Hz).

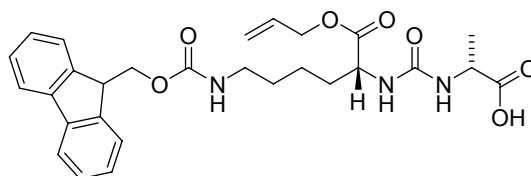
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 3:1): δ = 175.4 (C=O), 172.9 (C=O), 157.7 (C=O), 156.9 (C=O), 143.6 (2 ArC), 140.9 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.3 (2 ArC),

126.7 (2 ArC), 124.6 (2 ArC), 119.5 (2 ArC), 118.1 (H₂C=CH), 66.2 (CH₂-Fmoc), 65.4 (CH₂-Allyl), 52.4 (D-Lys-C α), 48.2 (Ala-C α), 46.9 (CH-Fmoc), 40.1 (D-Lys-C ϵ), 31.9 (D-Lys-C β), 28.8 (D-Lys-C δ), 22.2 (D-Lys-C γ), 18.1 (Ala-C β).

HR-MS (FAB): für C₂₈H₃₃N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 524.2391, Gefunden: 524.2386.

6.3.11 D-Lysinallylester-N^ε-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-D-alanin-harnstoff

(136):



136

Die Darstellung erfolgte analog zu der der Verbindung **79**.

Ausbeute: 1.66 g, 3.17 mmol, 74 %.

R_f-Wert: 0.65 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: +2.0 (c = 1.5, MeOH).

HPLC-ESI: *t_R* = 9.6 min, *m/z* = 523.9 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3311 (w), 3071 (w), 2947 (w), 2865 (w), 2161 (w), 2032 (w), 1978 (w), 1735 (s), 1688 (s), 1638 (m), 1553 (m), 1532 (m), 1464 (w), 1448 (w), 1371 (w), 1337 (w), 1297 (w), 1272 (s), 1233 (m), 1203 (m), 1183 (m), 1143 (s), 1125 (w), 1107 (m), 1080 (w), 1027 (w), 994 (m), 916 (w), 889 (w), 797 (w), 778 (w), 757 (w), 738 (w), 730 (w), 642 (w), 622 (w) cm⁻¹.

Smp.: 157 °C.

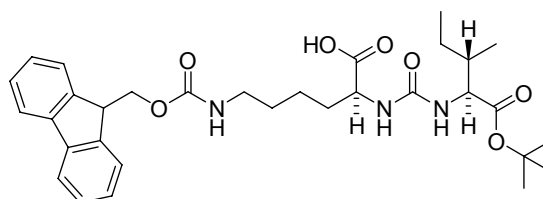
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ / MeOD 3:1): δ = 7.57 (d, 2 ArH, *J* = 7.5 Hz), 7.42 (d, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 7.20 (t, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 7.16-7.08 (m, 2 ArH, *J* = 7.4 Hz), 5.78-5.65 (m, 1 H, H₂C=CH), 5.17 (dd, 1 H, *H_{trans}*HC=CH, *J* = 1.3, 17.2 Hz), 5.04 (d, 1 H, *H_{cis}*HC=CH, *J* = 10.4 Hz), 4.49-4.36 (m, 2 H, CH₂-Allyl), 4.21-4.11 (m, 4 H, D-Lys- α -H, D-Ala- α -H, CH₂-Fmoc), 4.01 (t, 1 H, CH-Fmoc, *J* = 6.9 Hz), 3.00-2.88 (m, 2 H, D-Lys- ϵ -H₂), 1.68-1.55 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂), 1.52-1.40 (m, 1 H, D-Lys- β -H₂),

1.38-1.27 (m, 2 H, D-Lys- δ -H₂), 1.26-1.14 (m, 2 H, D-Lys- γ H₂), 1.19 (d, 3 H, D-Ala- β -H₃, $J = 7.2$ Hz).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃ / MeOD 3:1): $\delta = 175.6$ (C=O), 173.1 (C=O), 157.8 (C=O), 157.0 (C=O), 143.6 (2 ArC), 140.9 (2 ArC), 131.3 (H₂C=CH), 127.3 (2 ArC), 126.7 (2 ArC), 124.6 (2 ArC), 119.5 (2 ArC), 118.1 (H₂C=CH), 66.2 (CH₂-Fmoc), 65.4 (CH₂-Allyl), 52.4 (D-Lys-C α), 48.2 (D-Ala-C α), 46.9 (CH-Fmoc), 40.0 (D-Lys-C ϵ), 31.7 (D-Lys-C β), 28.8 (D-Lys-C δ), 22.2 (D-Lys-C γ), 17.9 (D-Ala- β H₃).

HR-MS (FAB): für C₂₈H₃₃N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 524.2391, Gefunden: 524.2386.

6.3.12 L-Lysin-N^F-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-isoleucin-*tert*-butylesterharnstoff (76):



76

Der Allylester **75** (860 mg, 1.4 mmol) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorlegt, abs. THF (43 mL) und Dimedon (1.94 g, 14 mmol, 10 Äq.) zugegeben, die Reaktionslösung entgast, und das Tetrakis-triphenylphosphin-Palladium (160 mg, 0.14 mmol, 0.1 Äq.) zugegeben. Nach 90 min (DC-Kontrolle CH₂Cl₂ / MeOH 9:1) wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck vollständig entfernt. Säulenchromatographie (1. CH₂Cl₂ / MeOH 95:5; 2. CH₂Cl₂ / MeOH 95:5 + 0.25 % AcOH, 300 g Kieselgel) lieferte den Harnstoff **76** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 564 mg, 0.97 mmol, 70 %.

R_F-Wert: 0.25 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -11.9 (c = 0.95, CH₂Cl₂).

HPLC-ESI: $t_R = 10.1$ min, $m/z = 604.2$ [M+23]⁺.

Smp.: 71 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): $\delta = 7.74$ (d, 2 ArH, $J = 7.5$ Hz), 7.59 (d, 2 ArH, $J = 6.9$ Hz), 7.36 (t, 2 ArH, $J = 7.4$ Hz), 7.28 (dt, 2 ArH, $J = 7.4, 0.9$ Hz), 6.06-5.95 (m,

1 H, NH- α -Ile), 5.93-5.84 (m, 1 H, NH- α -Lys), 5.45-5.38 (m, 1 H, NH- ϵ -Lys), 4.42-4.33 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.33-4.23 (m, 2 H, Lys- α -H, Ile- α -H), 4.19 (t, 1 H, CH-Fmoc, $J = 6.9$ Hz), 3.20-3.04 (m, 2 H, Lys- ϵ -H₂), 1.90-1.72 (m, 2 H, Ile- γ -H₂, Lys- β -H₂), 1.73-1.60 (m, 1 H, Lys- β -H₂), 1.55-1.28 (m, 5 H, Lys- δ -H₂, Lys- γ -H₂, Ile- β -H), 1.41 (s, 9 H, *tert*-Butyl), 1.19-1.04 (m, 1 H, Ile- γ -H₂), 0.89-0.80 (m, 6 H, Ile- γ -H₃, Ile- δ -H₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ = 175.3 (C=O), 172.5 (C=O), 158.9 (C=O), 157.2 (C=O), 144.2 (2 ArC), 141.4 (2 ArC), 127.7 (2 ArC), 127.1 (2 ArC), 125.2 (2 ArC), 120.0 (2 ArC), 82.0 (*tert*-Butyl), 66.8 (CH₂-Fmoc), 58.0 (Ile-C α), 53.5 (Lys-C α), 47.3 (CH-Fmoc), 40.4 (Lys-C ϵ), 38.4 (Ile-C β), 31.1 (Lys-C β), 29.6 (Lys-C δ), 27.9 (*tert*-Butyl), 25.3 (Ile-C γ), 22.4 (Lys-C γ), 15.4 (Ile-C γ), 11.6 (Ile-C δ).

HR-MS (ESI): für C₃₂H₄₄N₃O₇ [M+H]⁺ Berechnet: 582.3174, Gefunden: 582.3168.

6.4 Allgemeine Vorschriften zur Synthese am festen Träger

6.4.1 Allgemeine Vorschrift zur Beladung des polymeren Trägers

Die Carbonsäure (1.2 Äq.) wurde in einem ausgeheizten Kolben in abs. Dichlormethan gelöst (30 mM) und DIPEA (4.8 Äq.) zugegeben. Die mit jeweils 250 mg 2-Chlortritylchlorid-Polystyrolharz gefüllten IRORI MacroKans™ wurden hinzugegeben, das Harz mit zusätzlichem abs. Dichlormethan bedeckt und bei RT 16 h leicht geschüttelt. Zur Absättigung verbliebener Ankergruppen wurde abs. Methanol (10 Äq.) zugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Reaktionslösung entfernt und das Harz für 30 min mit abs. CH₂Cl₂ / MeOH / DIPEA 17:2:1, v/v bedeckt. Die Lösung wurde entfernt und das Harz mit CH₂Cl₂ (3 × 5 min) und Diethylether (2 × 5 min) gewaschen. Das Harz wurde über Nacht am Hochvakuum getrocknet und die Beladung bzw. Ausbeute mittels Fmoc-Test und Ermittlung der Massendifferenz bestimmt.

6.4.2 Vorschrift für den Fmoc-Test

Zur Bestimmung der Beladung des Trägermaterials wurde gewaschenes Harz (3 × DMF, 3 × CH₂Cl₂, 2 × Et₂O) über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden 5-7 mg des Harzes 30 min mit 10 mL DMF / Piperidin (4:1)

behandelt. Anschließend wurden 3 mL der Reaktionslösung in eine Quarzküvette gefüllt. Für den Nullabgleich wurde eine Küvette mit 3 mL DMF / Piperidin (4:1) verwendet. Nach Messung der Absorption bei 290 nm wurde die Beladung wie folgt berechnet:

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

Formel 5 Lambert Beersches Gesetz: $A = \text{Absorption}$; $\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient in } \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
 $d = \text{Durchstrahllänge in cm}$; $c = \text{Konzentration in mol L}^{-1}$.

$$B = \frac{A \cdot V \cdot 1000}{\varepsilon \cdot d \cdot m}$$

Formel 6 Berechnung der Harzbeladung mittels Fmoc-Test:

$B = \text{Beladung in mmol g}^{-1}$; $A = \text{Absorption bei } 290 \text{ nm}$; $V = \text{Volumen in mL}$; $\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient bei } 290 \text{ nm } (5253 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})^{158}$; $d = \text{Durchstrahllänge in cm}$; $m = \text{Harzmasse in mg}$.

6.4.3 Berechnung der Ausbeuten

Um die Ausbeute von Reaktionen an fester Phase zu berechnen, musste zuerst die bei vollständigem Umsatz erreichbare neue Beladung ($B_{\text{Theoretisch}}$) nach Formel 7 ermittelt werden.

$$B_{\text{Theoretisch}} = \frac{B_{\text{ALT}}}{1 + B_{\text{ALT}} \left(\frac{M_{\text{NEU}} - M_{\text{ALT}}}{1000} \right)}$$

Formel 7 Theoretische Beladung nach einer Festphasenreaktion:

$B = \text{Beladung in mmol g}^{-1}$; $M = \text{Molekulargewicht in g mol}^{-1}$.

Die Berechnung der Ausbeute einer Festphasenreaktion erfolgte dann über den Vergleich der möglichen und der tatsächlich erreichten Abnahme der Beladung (Formel 8).

$$\text{Ausbeute} = \frac{(B_{\text{ALT}} - B_{\text{NEU}})}{(B_{\text{ALT}} - B_{\text{Theoretisch}})} \cdot 100 \%$$

Formel 8 Ausbeute einer Reaktion an fester Phase: Ausbeute in %; $B = \text{Beladung in mmol g}^{-1}$.

Für die synthetisierten Brunsvicamide wurde jeweils eine Gesamtausbeute, basierend auf der Beladung des Polystyrolharzes mit der 2-Chlortritylchlorid-Gruppe berechnet (Formel 9).

$$\text{Gesamtausbeute} = \frac{m_{\text{Endprodukt}}}{B_{\text{Ankergruppe}} \cdot m_{\text{Ausgangsharz}} \cdot M_{\text{Endprodukt}}} \cdot 100\%$$

Formel 9 Gesamtausbeute einer Festphasensequenz:

Gesamtausbeute in %; $m_{\text{Endprodukt}}$ = Masse des Endprodukts in g;

$B_{\text{Ankergruppe}}$ = Beladung des Ausgangsharz in mmol g^{-1} ;

$m_{\text{Ausgangsharz}}$ = Masse des Ausgangsharz in g;

$M_{\text{Endprodukt}}$ = Molekulargewicht des Endprodukts in g mol^{-1} .

6.4.4 Harnstoffsynthese an fester Phase

Das mit Isoleucin beladene und über Nacht am Hochvakuum getrocknete Harz (1.5 mmol) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt. **73** (1.89 g, 2.2 Äq.) wurde in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt, in abs. DMF gelöst und abs. DIPEA (660 μL , 2.6 Äq.) zugetropft. Die gelbe Lösung wurde zum Harz gegeben, das Harz mit zusätzlichem abs. DMF bedeckt und anschließend bei RT 2.5 h geschüttelt. Das Harz wurde mit DMF (3 \times 5 min), CH_2Cl_2 (3 \times 5 min) und Et_2O (2 \times 5 min) gewaschen.

6.4.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Festphasenpeptidsynthese

Das Harz, die Fmoc-geschützte Aminosäure und die festen Kupplungsreagenzien wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt und mit DMF bedeckt. Nach Zugabe von DIC bzw. DIPEA für die Kupplungsreaktion wurde die Reaktionslösung bei RT 2 h leicht geschüttelt. Die Lösung wurde entfernt und das Harz mit DMF (3 \times 5 min) gewaschen.

Kupplungsbedingungen A:

Fmoc-Aminosäure (3 Äq., 0.15 M), DIC (3 Äq.), HOBt (3 Äq.).

Kupplungsbedingungen B, für Kupplungen an *N*-methylierte Aminosäuren:

Fmoc-Aminosäure (3 Äq., 0.15 M), HATU (3 Äq.), HOAt (3 Äq.), DIPEA (6 Äq.).

Für die **Fmoc-Entschützungen** wurde das Harz für 15 min mit DMF:Piperidin (4:1, v/v) leicht geschüttelt und anschließend mit DMF (3 \times 5 min) gewaschen.

6.4.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Testabspaltungen

Für Testabspaltungen wurden einige Harzkügelchen in ein Probengefäß gegeben, 1.5 mL TFA in CH_2Cl_2 (2 %) zugeben und bei RT 15 min leicht geschüttelt. Die überstehende Lösung wurde abgenommen und die flüchtigen Bestandteile im Argonstrom entfernt. Das abgespaltene Material wurde in Acetonitril aufgenommen, anschließend die Lösung filtriert und mittels HPLC/MS analysiert.

6.4.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Allylesterspaltung an fester Phase

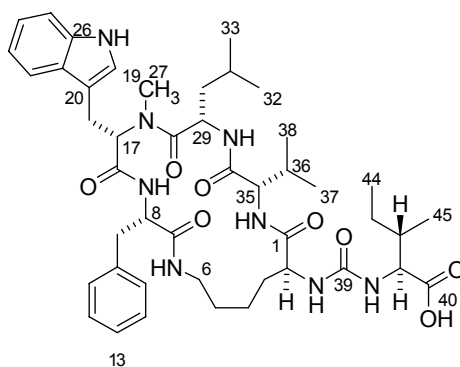
Der festphasengebundene Allylester und Natriumphenylsulfinat (10 Äq.) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt, mit abs. DMF bedeckt und die erhaltene Suspension mittels wiederholtem Anlegens von Hochvakuum und Belüftens mit Argon entgast. Nach der Zugabe von Tetrakis-triphenylphosphin-Palladium (0.05 Äq., 2.5 mM) wurde die Reaktionslösung unter Ausschluss von Licht bei RT 16 h leicht geschüttelt. Die Lösung wurde entfernt und das Harz mit DMF (3 × 5 min), 0.5 % DIPEA und 0.5 % Natriumdiethyldithiocarbamatnatrihydrat in DMF (3 × 5 min) sowie mit DMF (3 × 5 min) gewaschen.

6.4.8 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Zyklisierung an fester Phase

Der festphasengebundene offenkettige Vorläufer und HOBt (6 Äq.) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt, mit abs. DMF bedeckt. Nach der Zugabe von DIC (6 Äq., 0.3 M) wurde die Reaktionslösung bei RT 16 h leicht geschüttelt. Die Lösung wurde entfernt und das Harz mit DMF (3 × 5 min) gewaschen.

6.5 Versuche zu Kapitel 4.1.12

6.5.1 1,5-Anhydro(L-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-isoleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (**99**):



99

Die Beladung von 2-Chlortritylharz mit **79** und die anschließende Festphasenpeptidsynthese erfolgten gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschriften (siehe Kapitel 6.4.1 und 6.4.5). Es folgten die Spaltung des Allylestere (siehe Kapitel 6.4.7) und anschließend die Zyklisierung an fester Phase (siehe Kapitel 6.4.8), gemäß den allgemeinen Arbeitsvorschriften. Das Harz mit dem gebundenen Makrozyklus wurde in Dichlormethan / TFA (98:2) suspendiert und bei RT 30 min geschüttelt. Die Lösung wurde in einen Kolben mit Toluol überführt und die Abspaltreaktion wiederholt. Das Harz wurde gewaschen (3 × CH₂Cl₂ / TFA (98:2), 2 × CH₂Cl₂). Die vereinigten Abspaltungs- und Waschlösungen wurden bei vermindertem Druck eingengt und mit Dichlormethan dreimal koevaporiert. Das erhaltene Öl wurde in TFA (2 mL) aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Wasser (100 mL) ausgefällt. Nach Gefriertrocknung wurde das Rohprodukt als farbloser Feststoff erhalten, das mittels präp. HPLC (C18, MeOH / H₂O 65:35, v/v) gereinigt wurde. Das Cyclopeptid **99** (14.6 mg, 17.3 μmol, 11 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 14.6 mg, 17.3 μmol, 11 %.

R_f-Wert: 0.35 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

[α]_D²⁰: -127.7 (c = 1.8, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.4 min, m/z = 845.6 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3307 (w), 2929 (w), 1633 (s), 1541 (m), 1455 (w), 1210 (m), 1137 (w), 844 (w), 802 (w), 741 (w), 699 (w) cm^{-1} .

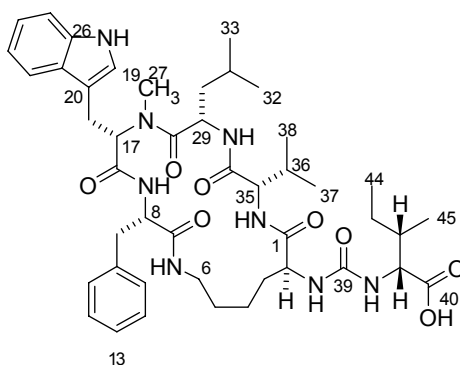
Smp.: 222 °C (Zers.).

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 10.43 (s, NH-Indol), 9.22 (d, 1 H, NH-Phe, J = 8.8 Hz), 8.32 (d, 1 H, NH-Leu, J = 4.6 Hz), 8.29 (d, 1 H, NH-Val, J = 6.2 Hz), 7.75 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 6.5 Hz), 7.55 (d, 1 ArH, 25-H, J = 7.2 Hz), 7.34 (d, 1 ArH, 22-H, J = 8.0), 7.31-7.23 (m, 2 ArH), 7.23-7.12 (m, 3 ArH), 7.10 (t, 1 ArH, 24-H, J = 7.5 Hz), 7.02 (t, 1 ArH, 23-H, J = 7.4 Hz), 6.87 (s, 1 ArH, 19-H) 4.91 (d, 1 H, 17-H; J = 10.3 Hz), 4.96-4.88 (m, 1 H, 8-H), 4.34-4.25 (d, 1 H, 29-H, J = 11.5 Hz), 4.26-4.16 (m, 2 H, 41-H, 2-H), 3.89 (d, 1 H, 35-H, J = 9.4 Hz), 3.79-3.72 (m, 1 H, 6-H₂), 3.47 (d, 1 H, 9-H₂, J = 12.1 Hz), 3.35 (d, 1 H, 18-H₂, J = 14.5 Hz), 2.98-2.90 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.86 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz), 2.14-1.95 (m, 4 H, 35-H, 27-H₃), 1.91-1.74 (m, 1 H, 42-H), 1.71-1.40 (m, 6 H, 3-H₂, 5-H₂, 43-H₂, 4-H₂), 1.40-1.31 (m, 1 H, 31-H), 1.28-1.21 (m, 1 H, 4-H₂), 1.21-1.10 (m, 1 H, 43-H₂), 1.08 (d, 3 H, 37-H₃, J = 6.8 Hz), 1.06 (d, 3 H, 38-H₃, J = 6.5 Hz), 0.93-0.87 (m, 6 H, 45-H₃, 44-H₃), 0.37 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.5 Hz), 0.05 (d, 3 H, 32-H₃, J = 6.5 Hz), -0.61 (t, 1 H, 30-H₂, J = 12.0 Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): δ = 178.2 (C=O, C40), 175.5 (C=O, C1), 175.3 (C=O, C28), 174.7 (C=O, C34), 174.4 (C=O, C7), 172.5 (C=O, C16), 159.7 (C=O, C39) 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.9 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.4 (C17), 61.0 (C35), 58.6 (C41), 56.6 (C8), 54.3 (C2), 49.3 (C29), 40.3 (C6), 39.3 (C9), 39.2 (C42), 38.9 (C30), 35.4 (C3), 31.6 (C36), 29.7 (C5), 29.2 (C27), 26.2 (C43), 24.8 (C31), 23.5 (C18), 23.3 (C4), 23.3 (C33), 20.3 (C38), 20.3 (C37), 19.9 (C32), 16.3 (C45), 12.2 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4939.

6.5.2 1,5-Anhydro(L-lysyl-(*N*^α-oxamido-D-*allo*-isoleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (129):



129

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 100 mg, 120 μmol, 18 %.

R_F-Wert: 0.37 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -164.6 (c = 2.1, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.5 min, m/z = 846.2 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3247 (w), 2958 (w), 2351 (w), 2070 (w), 1724 (w), 1660 (s), 1625 (s), 1547 (m), 1455 (m), 1340 (w), 1281 (w), 1204 (w), 1143 (w), 1118 (w), 1084 (w), 1011 (w), 975 (w), 801 (w), 744 (w), 702 (w), 661 (w), 631 (w) cm⁻¹.

Smp.: 233 °C.

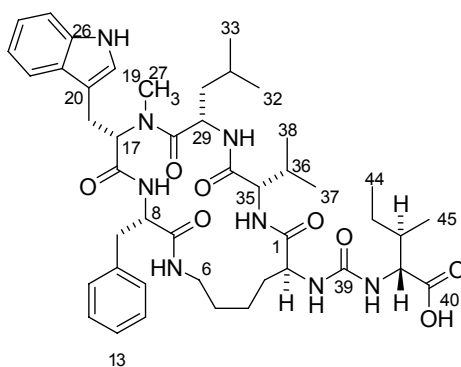
¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 10.40 (s, NH-Indol), 9.18 (d, 1 H, Phe- α -NH, J = 8.4 Hz), 8.35 (s, 1 H, Leu- α -NH), 8.16 (d, 1 H, Val- α -NH, J = 5.4 Hz), 7.74 (d, 1 H, Lys- ϵ -NH, J = 5.0 Hz), 7.53 (d, 1 ArH, H25, J = 7.7 Hz), 7.33 (d, 1 ArH, H22, J = 8.0 Hz), 7.30-7.12 (m, 5 ArH, H11-H15), 7.09 (t, 1 ArH, H24, J = 7.3 Hz), 7.01 (t, 1 ArH, H23, J = 7.2 Hz), 6.86 (s, 1 ArH, H19), 6.36 (d, 1 H, Lys- α -NH, J = 6.2 Hz), 6.32 (d, 1 H, D-allo- α -NH, J = 7.1 Hz), 4.97 – 4.74 (m, 2 H, 17-H, 8-H), 4.33 (s, 1 H, 41-H), 4.29 (d, 1 H, 29-H, J = 11.5 Hz), 4.22 (d, 1 H, 2-H, J = 8.9 Hz), 3.87 (d, 1 H, 35-H, J = 8.9 Hz), 3.79-3.69 (m, 1 H, 6-H), 3.46 (d, 1 H, 9-H₂, J = 13.9 Hz), 3.35 (d, 1 H, 18-H₂, J = 15.2 Hz), 2.97-2.89 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.85 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz), 2.11-2.00 (m, 1 H, 36-H), 2.05 (s, 3 H, 27-H₃), 1.95-1.84 (m, 1 H, 42-H), 1.71-1.54 (m, 3 H, 3-H₂, 5-H₂), 1.53-1.31 (m, 3 H, 5-H₂, 43-H₂, 4-H₂), 1.30-1.16 (m,

2 H, 43-H₂, 4-H₂), 1.12-0.99 (m, 7 H, 37-H₃, 38-H₃, 30-H₂), 0.93 (t, 3 H, 44-H₃, $J = 7.1$ Hz), 0.86 (d, 3 H, 45-H₃, $J = 6.5$ Hz), 0.38 (d, 3 H, 33-H₃, $J = 6.0$ Hz), 0.06 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 5.9$ Hz), -0.59 (t, 1 H, 30-H₂, $J = 12.3$ Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 175.5$ (C=O, C28), 175.0 (C=O, C1), 174.9 (C=O, C40), 174.7 (C=O, C34), 174.4 (C=O, C7), 172.5 (C=O, C16), 159.8 (C=O, C39), 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.3 (C17), 61.0 (C35), 57.6 (C41), 56.8 (C8), 54.4 (C2), 49.2 (C29), 40.3 (C6), 39.3 (C9), 38.9 (C42), 38.9 (C30), 35.3 (C3), 31.6 (C36), 29.6 (C5), 29.2 (C27), 27.6 (C4), 24.8 (C31), 23.6 (C18), 23.3 (C33), 23.2 (C43), 20.3 (C38), 20.2 (C37), 19.9 (C32), 15.1 (C45), 12.3 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4921.

6.5.3 1,5-Anhydro(L-lysyl-(N^α-oxamido-D-iso-leucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-N-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (130):



130

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 71 mg, 80 μ mol, 13 %.

R_f-Wert: 0.39 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -136.1 ($c = 1.8$, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.4$ min, $m/z = 846.2$ [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3270 (w), 2961 (w), 2349 (w), 2161 (w), 2033 (w), 1628 (s), 1536 (m), 1454 (m), 1335 (w), 1085 (w), 742 (w), 703 (w) cm^{-1} .

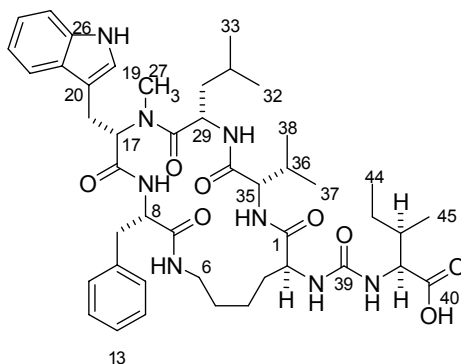
Smp.: 239 °C.

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 10.40 (s, NH-Indol), 9.21 (d, 1 H, Phe- α -NH, J = 8.8 Hz), 8.37 (s, 1 H, Leu- α -NH), 8.18 (d, 1 H, Val- α -NH, J = 5.7 Hz), 7.77 (d, 1 H, Lys- ϵ -NH, J = 5.6 Hz), 7.56 (d, 1 ArH, H25, J = 7.9 Hz), 7.36 (d, 1 ArH, H22, J = 8.1 Hz), 7.31-7.16 (m, 5 ArH, H11-H15), 7.12 (t, 1 ArH, H24, J = 7.5 Hz), 7.03 (t, 1 ArH, H23, J = 7.4 Hz), 6.89 (s, 1 ArH, H19), 6.35 (d, 1 H, Lys- α -NH, J = 7.7 Hz), 6.31 (d, 1 H, D- α -NH, J = 8.4 Hz), 4.98-4.76 (m, 2 H, 17-H, 8-H), 4.31 (d, 1 H, 29-H, J = 11.8 Hz), 4.25-4.17 (m, 2 H, 2-H, 41-H), 3.88 (d, 1 H, 35-H, J = 9.2 Hz), 3.81-3.71 (m, 1 H, 6-H), 3.48 (d, 1 H, 9-H₂, J = 13.8 Hz), 3.37 (d, 1 H, 18-H₂, J = 15.1 Hz), 2.99-2.91 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.88 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz), 2.14-2.02 (m, 1 H, 36-H), 2.08 (s, 3 H, 27-H₃), 1.90-1.80 (m, 1 H, 42-H), 1.73-1.58 (m, 3 H, 3-H₂, 5-H₂), 1.56-1.45 (m, 3 H, 5-H₂, 43-H₂, 4-H₂), 1.44-1.34 (m, 1 H, 31-H), 1.33-1.24 (m, 1 H, 43-H₂), 1.21-1.15 (m, 1 H, 4-H₂), 1.14-1.02 (m, 7 H, 37-H₃, 38-H₃, 30-H₂), 1.00-0.86 (m, 6 H, 44-H₃, 45-H₃), 0.41 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.4 Hz), 0.08 (d, 3 H, 32-H₃, J = 6.3 Hz), -0.57 (t, 1 H, 30-H₂, J = 12.2 Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): δ = 175.5 (C=O, C28), 174.9 (C=O, C1), 174.7 (C=O, C40), 174.7 (C=O, C34), 174.4 (C=O, C7), 172.5 (C=O, C16), 159.7 (C=O, C39), 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.4 (C17), 61.0 (C35), 59.5 (C41), 56.8 (C8), 54.4 (C2), 49.2 (C29), 40.3 (C6), 39.4 (C42), 39.3 (C9), 38.9 (C30), 35.3 (C3), 31.6 (C36), 29.6 (C5), 29.2 (C27), 26.2 (C4), 24.8 (C31), 23.6 (C18), 23.3 (C33), 23.2 (C43), 20.3 (C38), 20.2 (C37), 19.9 (C32), 16.4 (C45), 12.2 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4921.

6.5.4 1,5-Anhydro(L-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-*allo*-isoleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (131):



131

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 85 mg, 100 μ mol, 15 %.

R_f-Wert: 0.61 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: 199.9 (c = 2.3, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.3 min, m/z = 846.2 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3308 (w), 2961 (w), 2033 (w), 1633 (s), 1531 (m), 1455 (m), 1408 (w), 1224 (w), 1083 (w), 844 (w), 741 (w), 699 (w), 661 (w) cm⁻¹.

Smp.: 243 °C.

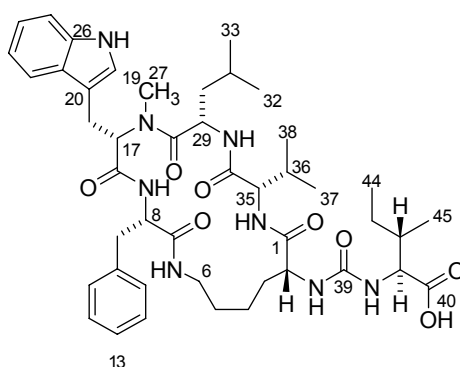
¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 10.4 (s, NH-Indol), 9.23 (d, 1 H, Phe- α -NH, J = 8.9 Hz), 7.57 (d, 1 ArH, H₂₅, J = 7.9 Hz), 7.36 (d, 1 ArH, H₂₂, J = 8.1 Hz), 7.33-7.16 (m, 5 ArH, H₁₁-H₁₅), 7.12 (t, 1 ArH, H₂₄, J = 7.2 Hz), 7.04 (t, 1 ArH, H₂₃, J = 7.5 Hz), 6.90 (s, 1 ArH, H₁₉), 4.92 (dd, 1 H, 17-H, J = 2.7, 11.3 Hz), 4.83-4.77 (m, 1 H, 8-H), 4.37-4.27 (m, 2 H, 41-H, 29-H, J = 11.8 Hz), 4.23 (dd, 1 H, 2-H, J = 3.8, 9.7 Hz), 3.93 (d, 1 H, 35-H, J = 9.4 Hz), 3.82-3.74 (m, 1 H, 6-H), 3.49 (dd, 1 H, 9-H₂, J = 3.0, 14.1 Hz), 3.40-3.35 (m, 1 H, 18-H₂), 2.99-2.92 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.89 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz), 2.14-2.03 (m, 1 H, 36-H), 2.08 (s, 3 H, 27-H₃), 1.99-1.87 (m, 1 H, 42-H), 1.70-1.57 (m, 3 H, 3-H₂, 5-H₂), 1.56-1.45 (m, 2 H, 5-H₂, 43-H₂), 1.45-1.34 (m, 2 H, 4-H₂, 31-H), 1.32-1.24 (m, 1 H, 43-H₂), 1.24-1.14 (m, 1 H, 4-H₂), 1.10 (d, 3 H, 38-H₃, J = 6.8 Hz), 1.08 (d, 3 H, 37-H₃, J = 6.8 Hz), 1.07-1.03 (m, 1 H, 30-H₂),

0.93 (t, 3 H, 44-H₃, $J = 7.4$ Hz), 0.86 (d, 3 H, 45-H₃, $J = 6.9$ Hz), 0.40 (d, 3 H, 33-H₃, $J = 6.6$ Hz), 0.09 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 6.6$ Hz), -0.57 (t, 1 H, 30-H₂, $J = 11.3$ Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 175.4$ (C=O, C40), 175.3 (C=O, C2), 174.7 (C=O, C28), 174.4 (C=O, C34), 174.3 (C=O, C7), 172.3 (C=O, C16), 159.7 (C=O, C39), 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.7 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.4 (C17), 61.0 (C35), 57.2 (C41), 56.6 (C8), 54.2 (C2), 50.0 (C29), 40.4 (C6), 39.2 (C42), 39.2 (C9), 38.8 (C30), 35.8 (C3), 31.8 (C36), 29.7 (C5), 29.3 (C27), 27.6 (C4), 24.8 (C31), 23.5 (C18), 23.5 (C43), 23.2 (C33), 20.3 (C32), 20.3 (C38), 19.9 (C37), 15.2 (C45), 12.4 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4922.

6.5.5 1,5-Anhydro(D-lysyl-(N^α-oxamido-L-isooleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-N-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (18):



18

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 20.5 mg, 24.3 μ mol, 16 %.

R_f-Wert: 0.26 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -117.9 ($c = 1.1$, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.3$ min, $m/z = 845.6$ [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu} = 3306$ (w), 3062 (w), 2960 (w), 2874 (w), 1635 (s), 1538 (m), 1456 (m), 1409 (w), 1339 (w), 1222 (w), 1086 (w), 802 (w), 741 (w), 700 (w), 626 (w) cm⁻¹.

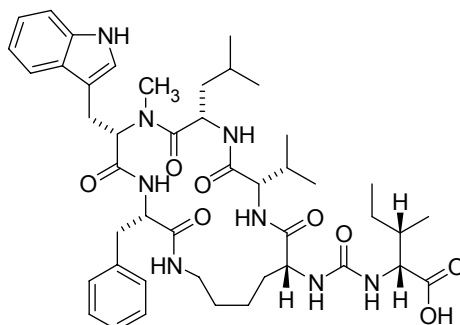
Smp.: 203 °C.

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 10.45 (s, NH-Indol), 9.25 (d, 1 H, NH-Phe, J = 8.6 Hz), 8.35 (bs, 1 H, NH-Leu), 7.84 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 8.3 Hz), 7.54 (d, 1 ArH, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.49 (d, 1 H, NH-Val, J = 5.5 Hz), 7.33 (d, 1 ArH, 22-H, J = 8.0), 7.29-7.23 (m, 2 ArH), 7.22-7.13 (m, 3 ArH), 7.09 (t, 1 ArH, 24-H, J = 7.5 Hz), 7.01 (t, 1 ArH, 23-H, J = 7.4 Hz), 6.86 (s, 1 ArH, 19-H), 6.57 (d, 1 H, NH α -Lys, J = 4.9 Hz), 6.23 (d, 1 H, NH α -Ile, J = 8.9 Hz), (4.93 (d, 1 H, 17-H, J = 9.9 Hz), 4.78 (m, 1 H, 8-H), 4.29 (d, 1 H, 29-H, J = 11.6 Hz), 4.20 (d, 1 H, 41-H, J = 3.7 Hz), 4.05 (s, 1 H, 2-H), 3.83-3.71 (m, 1 H, 6-H₂), 3.75 (d, 2 H, 35-H, J = 9.4 Hz), 3.48 (d, 1 H, 9-H₂, J = 12.1 Hz), 3.36-3.30 (m, 1 H, 18-H₂), 3.04-2.79 (m, 3 H, 18-H₂, 6-H₂, 9-H₂), 2.13-19.7 (m, 1 H, 36-H), 2.03 (s, 3 H, 27-H₃), 1.95-1.87 (m, 1 H, 42-H₂), 1.87-1.78 (m, 1 H, 2-H), 1.76-1.63 (m, 1 H, 2-H), 1.63-1.51 (m, 2 H, 5-H₂), 1.51-1.41 (m, 2 H, 43-H₂, 4-H₂), 1.41-1.32 (m, 2 H, 31-H), 1.32-1.22 (m, 1 H, 4-H₂), 1.11-1.02 (m, 1 H, 30-H₂), 1.07 (d, 3 H, 38-H₃), 0.99-0.89 (m, 9 H, 37-H₃, 44-H₃, 45-H₃), 0.38 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.6 Hz), 0.07 (d, 3 H, 32-H₃, J = 6.49 Hz), -0.59 (t, 1 H, 30-H₂, J = 12.1 Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): δ = 177.4 (C=O, C40), 175.9 (C=O, C1), 175.5 (C=O, C28), 174.5 (C=O, C34), 174.4 (C=O, C7), 172.6 (C=O, C16), 160.1 (C=O, C39), 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.4 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.3 (C17), 61.0 (C35), 59.5 (C41), 56.6 (C8), 56.4 (C2), 49.0 (C29), 40.2 (C6), 39.2 (C9), 39.0 (C30), 38.9 (C42), 32.6 (C3), 31.5 (C36), 29.6 (C5), 29.2 (C27), 26.0 (C43), 24.9 (C31), 23.6 (C18), 23.3 (C33), 21.7 (C4), 20.4 (C38), 20.3 (C32), 19.9 (C37), 16.6 (C45), 12.3 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4921.

6.5.6 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-D-*allo*-isoleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (126):

**126**

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 66 mg, 78 μmol , 14 %.

R_f-Wert: 0.17 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -131 ($c = 1.1$, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.3$ min, $m/z = 846.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu} = 3293$ (w), 2960 (w), 2873 (w), 2490 (w), 2160 (w), 2027 (w), 1632 (s), 1542 (m), 1455 (m), 1338 (w), 1222 (w), 1085 (w), 1010 (w), 801 (w), 741 (w) cm^{-1} .

Smp.: 211 °C.

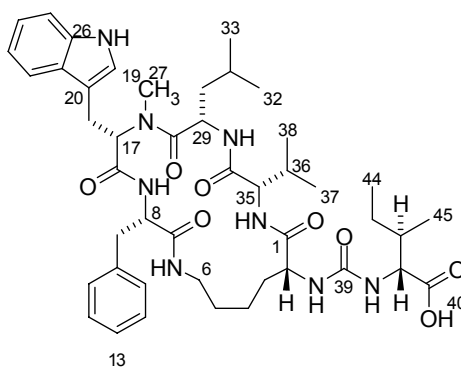
¹H-NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 10.41$ (s, NH-Indol), 9.19 (d, 1 H, NH-Phe, $J = 8.8$ Hz), 8.33 (s, 1 H, NH-Leu), 7.90 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, $J = 6.1$ Hz), 7.53 (d, 1 ArH, 25-H, $J = 7.9$ Hz), 7.33 (d, 1 ArH, 22-H, $J = 8.1$ Hz), 7.29-7.22 (m, 2 ArH, 12-H, 14-H), 7.22-7.13 (m, 3 ArH, 11-H, 15-H, 13-H), 7.09 (t, 1 ArH, 24-H, $J = 7.5$ Hz), 7.01 (t, 1 ArH, 23-H, $J = 7.4$ Hz), 6.87 (s, 1 ArH, 19-H), 6.53 (d, 1 H, NH α -Lys, $J = 4.8$ Hz), 6.31 (d, 1 H, NH-Ile, $J = 8.3$ Hz), 4.91 (d, 1 H, 17-H, $J = 11.2$ Hz), 4.82-4.77 (m, 1 H, 8-H), 4.37 (s, 1 H, 41-H), 4.30 (d, 1 H, 29-H, $J = 11.8$ Hz), 4.08-4.00 (m, 1 H, 2-H), 3.86 (d, 1 H, 35-H, $J = 8.4$ Hz), 3.82-3.71 (m, 1 H, 6-H₂), 3.51 (d, 1 H, 9-H₂, $J = 13.6$ Hz), 3.34 (d, 1 H, 18-H₂, $J = 15.0$ Hz), 3.00-2.88 (m, 2 H; 6-H₂, 18-H₂), 2.82 (t, 1 H, 9-H₂, $J = 13.3$ Hz), 2.14-2.01 (m, 1 H, 36-H), 2.05 (s, 3 H, 27-H₃), 1.99-1.89 (m, 1 H, 42-H₂), 1.89-1.78 (m, 1 H, 3-H₂), 1.75-1.64 (m, 1 H, 3-H₂), 1.63-1.47 (m, 2 H, 5-H₂), 1.46-1.33 (m, 3 H, 43-H₂, 31-H, 4-H₂), 1.32-1.25 (m, 1 H, 4-H₂), 1.25-1.15 (m, 1 H, 43-H₂), 1.07 (d, 3 H, 38-H₃, $J = 6.7$ Hz), 1.06-0.99 (m, 1 H, 30-H₂), 0.99 (d, 3 H,

37-H₃, $J = 6.6$ Hz), 0.89 (t, 3 H, 44-H₃, $J = 7.3$ Hz), 0.83 (d, 3 H, 45-H₃, $J = 6.8$ Hz), 0.39 (d, 3 H, 33-H₃, $J = 6.5$ Hz), 0.07 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 6.5$ Hz), -0.58 (t, 1 H, 30-H₂, $J = 12.2$ Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 177.1$ (C=O, C40), 175.7 (C=O, C1), 175.5 (C=O, C28), 174.5 (C=O, C34), 174.5 (C=O, C7), 172.6 (C=O, C16), 160.3 (C=O, C39) 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.3 (C17), 60.2 (C34), 57.3 (C41), 56.6 (C8), 56.6 (C2), 49.2 (C29), 40.2 (C6), 40.1 (C9), 39.3 (C30), 38.7 (C42), 32.4 (C3), 31.9 (C36), 29.6 (C5), 29.2 (C27), 27.8 (C43), 24.8 (C31), 23.6 (C18), 23.3 (C33), 21.8 (C4), 20.2 (C32), 19.9 (C37), 19.8 (C38), 15.1 (C45), 12.3 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4925.

6.5.7 1,5-Anhydro(D-lysyl-(N^α-oxamido-D-isoileucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-N-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (127):



127

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 75 mg, 89 μ mol, 15 %.

R_f-Wert: 0.22 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -141 (c = 1.8, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.3$ min, $m/z = 846.3$ [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3293 (w), 2963 (w), 2160 (w), 1633 (s), 1529 (m), 1455 (w), 1338 (w), 1207 (m), 1138 (w), 1082 (w), 802 (w), 741 (w), 700 (w) cm^{-1} .

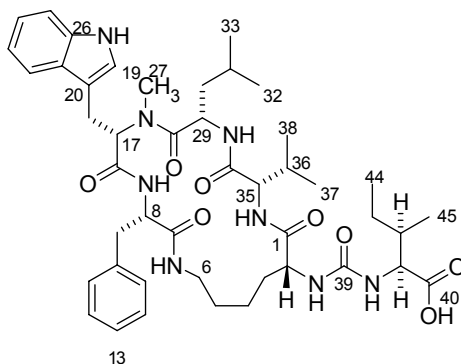
Smp.: 208 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ = 10.41 (s, NH-Indol), 9.19 (d, 1 H, NH-Phe, J = 8.8 Hz), 8.33 (d, 1 H, NH-Leu, J = 4.4 Hz), 7.90 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 5.5 Hz), 7.53 (d, 1 ArH, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.33 (d, 1 ArH, 22-H, J = 8.1 Hz), 7.30-7.23 (m, 2 ArH, 12-H, 14-H, J = 7.4 Hz), 7.22-7.13 (m, 3 ArH, 11-H, 15-H, 13-H), 7.09 (t, 1 ArH, 24-H, J = 7.5 Hz), 7.01 (t, 1 ArH, 23-H, J = 7.4 Hz), 6.86 (s, 1 ArH, 19-H), 6.52 (d, 1 H, NH α -Lys, J = 5.1 Hz), 6.37 (d, 1 H, NH-Ile, J = 8.8 Hz), 4.91 (dd, 1 H, 17-H, J = 2.7, 11.3 Hz), 4.80-4.76 (m, 1 H, 8-H), 4.30 (d, 1 H, 29-H, J = 11.3 Hz), 4.24 (d, 1 H, 41-H, J = 4.8 Hz), 4.08-4.01 (m, 1 H, 2-H), 3.85 (d, 1 H, 35-H, J = 8.5 Hz), 3.82-3.71 (m, 1 H, 6-H₂), 3.51 (dd, 1 H, 9-H₂, J = 2.7, 13.9 Hz), 3.38-3.32 (m, 1 H, 18-H₂), 2.99-2.88 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.81 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.3 Hz), 2.13-2.00 (m, 1 H, 36-H), 2.04 (s, 3 H, 27-H₃), 1.89-1.77 (m, 2 H, 42-H, 3-H), 1.74-1.63 (m, 1 H, 3-H₂), 1.63-1.49 (m, 2 H, 5-H₂), 1.49-1.33 (m, 3 H, 43-H₂, 31-H, 4-H₂), 1.33-1.22 (m, 1 H, 4-H₂), 1.21-1.11 (m, 1 H, 43-H₂), 1.07 (d, 3 H, 38-H₃, J = 6.8 Hz), 1.06-0.99 (m, 1 H, 30-H₂), 0.99 (d, 3 H, 37-H₃, J = 6.6 Hz), 0.91 (d, 3 H, 45-H₃, J = 6.8 Hz), 0.87 (t, 3 H, 44-H₃, J = 7.4 Hz), 0.39 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.6 Hz), 0.07 (d, 3 H, 32-H₃, J = 6.5 Hz), -0.58 (t, 1 H, 30-H₂, J = 11.5 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- D_6): δ = 175.8 (C=O, C1), 175.7 (C=O, C40), 175.5 (C=O, C28), 174.5 (C=O, C7), 174.4 (C=O, C34), 172.6 (C=O, C16), 160.1 (C=O, C39), 139.4 (ArC, C10), 137.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.3 (C17), 60.3 (C35), 58.7 (C41), 56.6 (C8), 56.6 (C2), 49.9 (C29), 40.2 (C6), 39.3 (C9), 39.1 (C30), 39.1 (C42), 32.5 (C3), 31.9 (C36), 29.7 (C5), 29.2 (C27), 26.2 (C43), 24.8 (C31), 23.6 (C18), 23.3 (C33), 21.8 (C4), 20.2 (C32), 19.9 (C37), 19.8 (C38), 16.5 (C45), 12.1 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4924.

6.5.8 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-*allo*-isoleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (128):



128

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 80 mg, 95 μ mol, 16 %.

R_f-Wert: 0.35 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -133 (c = 1.8, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.3 min, m/z = 846.3 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3293 (w), 2962 (w), 2161 (w), 2030 (w), 1634 (s), 1529 (m), 1456 (m), 1409 (w), 1340 (w), 1224 (w), 1084 (w), 741 (w), 700 (w) cm⁻¹.

Smp.: 213 °C.

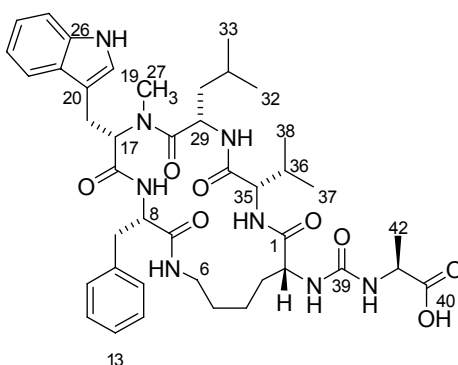
¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 10.4 (s, NH-Indol), 9.23 (d, 1 H, NH-Phe, J = 8.8 Hz), 8.31 (d, 1 H, NH-Leu, J = 4.6 Hz), 7.82 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 7.2 Hz), 7.54 (d, 1 ArH, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.40 (d, 1 H, NH-Val, J = 5.9 Hz), 7.33 (d, 1 ArH, 22-H, J = 8.1 Hz), 7.29-7.23 (m, 2 ArH, 12-H, 14-H), 7.22-7.13 (m, 3 ArH, 11-H, 15-H, 13-H), 7.09 (t, 1 ArH, 24-H, J = 7.4 Hz), 7.01 (t, 1 ArH, 23-H, J = 7.4 Hz), 6.86 (s, 1 ArH, 19-H), 6.60 (d, 1 H, NH α -Lys, J = 5.4 Hz), 6.24 (d, 1 H NH-Ile, J = 9.1 Hz), 4.92 (dd, 1 H, 17-H, J = 2.6, 11.2 Hz), 4.91 (d, 1 H, 8-H, J = 11.2 Hz), 4.37 (d, 1 H, 41-H, J = 3.5 Hz), 4.29 (d, 1 H, 29-H, J = 11.3 Hz), 4.09-4.02 (m, 1 H, 2-H), 3.84-4.74 (m, 1 H, 6-H₂), 3.77 (d, 1 H, 35-H, J = 9.1 Hz), 3.49 (dd, 1 H, 9-H₂, J = 2.7, 14.0 Hz), 3.34 (dd, 1 H, 18-H₂, J = 2.6, 15.3 Hz), 3.02-2.95 (m, 1 H, 6-H₂), 2.93 (dd, 1 H, 18-H₂, J = 11.5, 15.4 Hz), 2.85 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz), 2.13-2.02 (m, 1 H, 36-H), 2.04 (s, 3 H, 27-H₃), 2.02-1.93 (m, 1 H, 42-H₂), 1.89-1.79 (m, 1 H, 3-H₂), 1.75-1.65 (m, 1 H, 3-H₂), 1.61-1.51

(m, 2 H, 5-H₂), 1.50-1.33 (m, 3 H, 31-H, 43-H₂, 4-H₂), 1.32-1.18 (m, 2 H, 4-H₂, 43-H₂), 1.07 (d, 3 H, 38-H₃, $J = 6.8$ Hz), 1.06-0.99 (m, 1 H, 30-H₂), 1.02 (d, 3 H, 37-H₃, $J = 11.7$ Hz), 0.93 (t, 3 H, 44-H₃, $J = 7.4$ Hz), 0.87 (d, 3 H, 45-H₃, $J = 6.9$ Hz), 0.39 (d, 3 H, 33-H₃, $J = 6.6$ Hz), 0.08 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 6.5$ Hz), -0.57 (t, 1 H, 30-H₃, $J = 11.5$ Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 177.3 (C=O, C40), 175.8 (C=O, C1), 175.5 (C=O, C28), 174.5 (C=O, C34), 174.4 (C=O, C7), 172.7 (C=O, C16), 160.2 (C=O, C39) 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.3 (C17), 61.0 (C35), 57.2 (C41), 56.7 (C8), 56.3 (C2), 49.6 (C29), 40.3 (C6), 39.2 (C9), 39.0 (C30), 38.3 (C42), 32.5 (C3), 31.5 (C36), 29.6 (C5), 29.2 (C27), 27.7 (C43), 24.9 (C31), 23.6 (C18), 23.3 (C33), 21.7 (C4), 20.4 (C37), 20.3 (C32), 19.9 (C38), 15.1 (C45), 12.3 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4923.

6.5.9 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-alanyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-N-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (137):



137

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: 33 mg, 41 μ mol, 10 %.

R_f-Wert: 0.18 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -128 (c = 0.7, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.0$ min, $m/z = 803.2$ $[M+H]^+$.

IR: $\tilde{\nu} = 3294$ (w), 2958 (w), 1633 (s), 1529 (m), 1455 (m), 1340 (w), 1222 (w), 1086 (w), 928 (w), 738 (m), 700 (w), 623 (w) cm^{-1} .

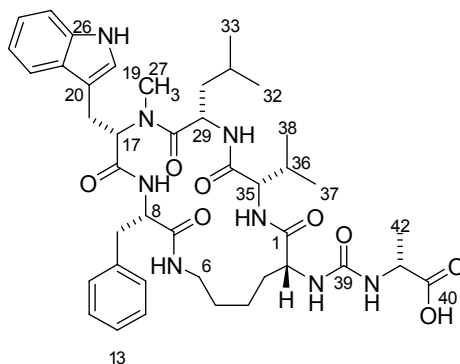
Smp.: 217 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): $\delta = 10.43$ (s, 1 H, NH-Indol), 9.25 (d, 1 H, NH-Phe, $J = 8.7$ Hz), 8.34 (s, 1 H, NH-Leu), 7.86 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, $J = 8.2$ Hz), 7.56 (d, 1 H, 22-H, $J = 7.8$ Hz), 7.36 (d, 1 H, 25-H, $J = 8.1$ Hz), 7.31–7.26 (m, 2 H, 12-H, 14-H), 7.24–7.16 (m, 3 H, 13-H, 11-H, 15-H), 7.12 (t, 1 H, 24-H, $J = 7.5$ Hz), 7.04 (t, 1 H, 23-H, $J = 7.5$ Hz), 6.89 (s, 1 H, 19-H), 4.94 (d, 1 H, H-17, $J = 11.1$ Hz), 4.81 (bs, 1 H, 8-H), 4.36–4.24 (m, 2 H, 29-H, 41-H), 4.07 (s, 1 H, 2-H), 3.86–3.75 (m, 2 H, 6-H₂, 35-H), 3.52 (d, 1 H, 18-H₂, $J = 13.8$ Hz), 3.34 (d, 1 H, 9-H₂, $J = 12.8$ Hz), 3.05–2.91 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.86 (t, 1 H, 9-H₂, $J = 13.4$ Hz), 2.13–2.08 (m, 1 H, 36-H), 2.06 (s, 3 H, 27-H₃), 1.90–1.76 (m, 1 H, 3-H₂), 1.77–1.64 (m, 1 H, 3-H₂), 1.63–1.53 (m, 2 H, 5-H₂), 1.51–1.42 (m, 1 H, 4-H₂), 1.37 (d, 3 H, 42-H₃, $J = 7.3$ Hz), 1.42–1.16 (m, 2 H, 31-H, 4-H₂), 1.10 (d, 3 H, 37-H₃, $J = 6.6$ Hz), 1.01 (d, 3 H, 38-H₃, $J = 6.5$ Hz), 0.41 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 6.5$ Hz), 0.10 (d, 3 H, 33-H₃, $J = 6.4$ Hz), -0.55 (t, 1 H, 30-H₂, $J = 12.3$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOD): $\delta = 177.5$ (C=O), 175.7 (C=O), 175.4 (C=O), 174.3 (C=O), 174.3 (C=O), 172.6 (C=O), 159.6 (C=O, C39), 139.4 (C10), 137.9 (C26), 130.3 (C11, C15), 129.9 (C12, C14), 128.7 (C21), 127.8 (C13), 124.7 (C19), 122.8 (C24), 120.3 (C23), 119.3 (C22), 112.8 (C25), 111.0 (C20), 63.2 (C17), 60.8 (C35), 56.5 (C8), 56.3 (C2), 49.9 (C41), 49.2 (C29), 40.1 (C6), 39.1 (C9), 38.9 (C30), 32.6 (C3), 31.5 (C31), 29.6 (C5), 29.1 (C27), 24.8 (C43), 23.5 (C18), 23.3 (C33), 21.7 (C7), 20.3 (C37), 20.2 (C32), 19.8 (C38), 18.7 (C42).

HR-MS (FAB): für C₄₂H₅₈N₈O₈ $[M+H]^+$ Berechnet: 803.4450, Gefunden: 803.4473.

6.5.10 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-D-alanyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (138):



138

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: 27 mg, 34 μmol , 8 %.

***R_f*-Wert:** 0.09 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -130 ($c = 1.4$, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.3$ min, $m/z = 803.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu} = 3294$ (w), 2965 (w), 1633 (s), 1541 (m), 1454 (w), 1224 (w), 1084 (w), 1048 (w), 879 (w), 741 (w), 700 (w) cm^{-1} .

Smp.: 214 °C.

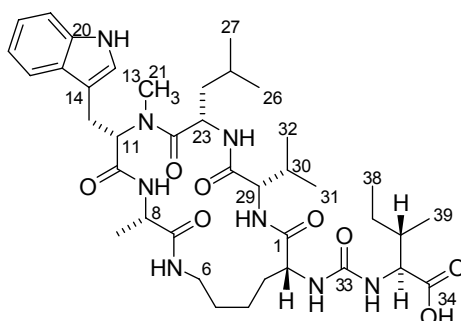
¹H-NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$): $\delta = 10.86$ (s, 1 H, NH-Indol), 8.84 (d, 1 H, NH-Phe, $J = 8.9$ Hz), 8.39 (d, 1 H, NH-Leu, $J = 4.9$ Hz), 7.55 (d, 1 H, 25-H, $J = 7.9$ Hz), 7.35-7.33 (m, 1 H, NH_ϵ), 7.31 (d, 1 H, 22-H, $J = 8.1$ Hz), 7.25-7.08 (m, 5 H, 11-H - 15-H), 7.05 (t, 1 H, 24-H, $J = 7.9$ Hz), 6.96 (t, 1 H, 23-H, $J = 7.3$ Hz), 6.93 (d, 1 H, 19-H, $J = 2.2$ Hz), 6.65 (bs, 1 H, NH-Lys), 6.34 (bs, 1 H, NH-Ile), 4.71 (dd, 1 H, 17-H, $J = 3.4, 11.1$ Hz), 4.61-4.52 (m, 1 H, 8-H), 4.25-4.18 (m, 1 H, 29-H), 3.90-3.79 (m, 2 H, 2-H, 35-H), 3.77-3.69 (m, 1 H, 41-H), 3.63-3.40 (m, 1 H, 9-H₂), 3.24-3.18 (m, 1 H, 18-H₂), 2.92-2.74 (m, 2 H, 9-H₂, 18-H₂), 2.03-1.90 (m, 1 H, 36-H), 1.93 (s, 3 H, 27-H₃), 1.60-1.44 (m, 2 H, 3-H₂), 1.45-1.33 (m, 3 H, 5-H₂, 31-H), 1.31-1.18 (m, 1 H, 4-H₂), 1.20-1.01 (m, 1 H, 4-H₂), 1.12 (d, 3-H, 42-H₃, $J = 6.4$ Hz), 0.94 (d, 3 H, 37-H₃, $J = 6.7$ Hz), 0.87 (d, 3 H, 38-H₃, $J = 6.5$ Hz), 0.86-0.83 (m, 1 H, 30-H₂), 0.30 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 6.6$ Hz), 0.16 (d, 3 H, 33-H₃, $J = 6.5$ Hz), -0.58 (t, 1 H, 30-H₂, $J = 11.5$ Hz).

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 9.27–9.20 (m, 1 H, NH-Phe), 8.39–8.32 (m, 1 H, NH-Leu), 7.95–7.86 (m, 1 H, NH-Val), 7.62–7.52 (m, 1 H, 22-H), 7.39–7.33 (m, 1 H, 25-H), 7.33–7.15 (m, 5 H, 11-H - 15-H), 7.15–7.08 (m, 1 H, 24-H), 7.08–7.00 (m, 1 H, 23-H), 6.90 (d, 1 H, 19-H), 5.01–4.92 (m, 1 H, 17-H), 4.34–4.29 (m, 1 H, 29-H), 4.27–4.14 (m, 1 H, 41-H), 4.14–3.94 (m, 1 H, 2-H), 3.83–3.74 (m, 1 H, 35-H), 3.73–3.67 (m, 1 H, 6-H₂), 3.54–3.46 (m, 1 H, 9-H₂), 3.39–3.34 (m, 1 H, 18-H₂), 3.02–2.91 (m, 2 H, 18-H₂, 6-H₂), 2.91–2.76 (m, 1 H, 9-H₂), 2.14–2.05 (m, 1 H, 36-H), 2.06 (s, 3 H, 27-H₃), 1.87–1.76 (m, 1 H, 3-H₂), 1.74–1.64 (m, 1 H, 3-H₂), 1.63–1.51 (m, 2 H, 5-H₂), 1.50–1.19 (m, 6 H, 42-H₃, 4-H₂, 31-H), 1.14–0.98 (m, 6 H, 37-H₃, 38-H₃), 0.97–0.82 (m, 1 H, 30-H₂), 0.41 (s, 3 H, 32-H₃), 0.09 (s, 3 H, 33-H₂), -0.57 (t, 1 H, 30-H₂, J = 18.5 Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): δ = 175.9 (C=O), 175.5 (C=O), 174.4 (C=O), 174.3 (C=O), 172.7 (C=O), 172.6 (C=O), 159.7 (C=O, C39), 139.4 (C10), 137.9 (C26), 130.3 (C11, C15), 129.9 (C12, C14), 128.8 (C21), 127.8 (C13), 124.7 (C19), 122.8 (C24), 120.3 (C23), 119.3 (C22), 112.8 (C25), 111.1 (C20), 63.3 (C17), 60.7 (C35), 56.6 (C8), 56.6 (C2), 50.0 (C41), 49.3 (C29), 40.1 (C6), 39.2 (C9), 39.0 (C30), 32.6 (C3), 31.6 (C31), 29.6 (C5), 29.2 (C27), 24.8 (C43), 23.5 (C18), 23.3 (C33), 21.8 (C7), 20.2 (C37), 20.1 (C32), 19.9 (C38), 19.2 (C42).

HR-MS (FAB): für C₄₂H₅₈N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 803.4450, Gefunden: 803.4471.

6.5.11 1,5-Anhydro(D-lysyl-(N^α-oxamido-L-isooleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-N-methyl-tryptophyl-L-alanin) (139):



139

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: 31 mg, 40 μmol , 9 %.

R_f-Wert: 0.28 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -91 (c = 1.8, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.0 min, m/z = 769.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3272 (w), 2971 (w), 1633 (s), 1547 (m), 1455 (w), 1258 (w), 1087 (w), 880 (w), 803 (w), 744 (w), 674 (w), 662 (w), 631 (w) cm^{-1} .

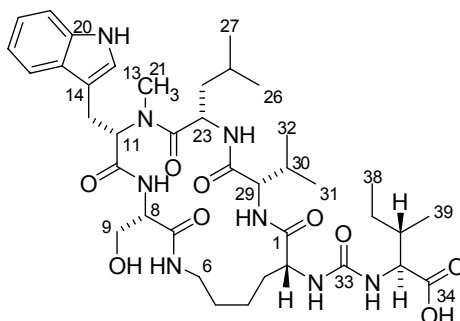
Smp.: 233 °C.

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.61–7.56 (m, 1 H, 16-H), 7.39–7.34 (m, 1 H, 19-H), 7.15–7.08 (m, 1 H, 18-H), 7.08–7.01 (m, 1 H, 17-H), 7.00–6.96 (m, 1 H, 13-H), 5.02 (d, 1 H, 11-H, J = 11.2 Hz), 4.58 (d, 1 H, 8-H, J = 7.1 Hz), 4.29 (d, 1 H, 23-H, J = 11.9 Hz), 4.20 (s, 1 H, 35-H), 4.03 (s, 1 H, 2-H), 3.84–3.79 (m, 1 H, 29-H), 3.78–3.71 (m, 1 H, 6-H₂), 3.43 (d, 1 H, 12-H₂, J = 15.3 Hz), 3.17 (t, 1 H, 12-H₂, J = 13.3 Hz), 2.93 (d, 1 H, 6-H₂, J = 13.6 Hz), 2.89 (s, 3 H, 21-H₃), 2.02–1.94 (m, 1 H, 30-H), 1.93–1.86 (m, 1 H, 36-H), 1.85–1.74 (m, 1 H, 3-H₂), 1.74–1.61 (m, 1 H, 3-H₂), 1.61–1.41 (m, 4 H, 37-H₂, 5-H₂, 4-H₂), 1.40–1.31 (m, 3 H, 9-H₃), 1.26–1.13 (m, 2 H, H-25, 37-H₂), 1.08 (t, 1 H, 24-H₂, J = 13.0 Hz), 0.97–0.85 (m, 12 H, 39-H₃, 38-H₃, 31-H₃, 32-H₃), 0.46–0.39 (m, 3 H, 26-H₃), 0.09–0.03 (m, 3 H, 27-H₃), -0.56 (t, 1 H, 24-H₂, J = 12.5 Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): δ = 176.2 (C=O), 175.7 (C=O), 175.1 (C=O), 174.1 (C=O), 172.0 (C=O), 160.1 (C=O, C33), 138.0 (C20), 128.9 (C15), 124.8 (C13), 122.8 (C18), 120.4 (C17), 119.2 (C16), 112.9 (C19), 111.2 (C14), 63.5 (C11), 60.1 (C29), 59.1 (C35), 56.2 (C2), 50.2 (C8), 49.0 (C23), 40.0 (6C), 38.9 (C24), 38.7 (C36), 32.4 (C3), 31.4 (C30), 29.9 (C21), 29.8 (C5), 26.0 (C37), 24.8 (C25), 23.9 (C12), 23.3 (C26), 21.6 (C4), 20.1 (C31), 19.8 (C32), 19.2 (C27), 18.9 (C9), 16.6 (C39), 12.3 (C38).

HR-MS (FAB): für $\text{C}_{39}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ Berechnet: 769.4607, Gefunden: 769.4624.

6.5.12 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-isoleuyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-serin) (140):



140

Die Beladung von 2-Chlortritylharz mit **79** und die anschließende Festphasenpeptidsynthese erfolgten gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschriften (siehe Kapitel 6.4.1 und 6.4.5). Es folgten die Spaltung des Allylestere (siehe Kapitel 6.4.7) und anschließend die Zyklisierung an fester Phase (siehe Kapitel 6.4.8), gemäß den allgemeinen Arbeitsvorschriften. Das Harz mit dem gebundenen Makrozyklus wurde in Dichlormethan / TFA (98:2) suspendiert und bei RT 30 min geschüttelt. Die Lösung wurde in einen Kolben mit Toluol überführt und die Abspaltung wiederholt. Das Harz wurde gewaschen (3 × CH₂Cl₂ / TFA (98:2), 2 × CH₂Cl₂). Die vereinigten Abspaltungs- und Waschlösungen wurden bei vermindertem Druck eingengt. Das abgespaltene Material wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan / Methanol, 9:1 +0.25 % Ameisensäure, 10 g Kieselgel) aufgereinigt. Das erhaltene Material wurde gelöst (92.5 % TFA, 5 % TES, 2.5 % H₂O; 10 mL) und eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Spaltung des Serin-*tert*-butylethers, erfolgte die Zugabe von Toluol (50 mL). Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile bei vermindertem Druck entfernt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels präp. HPLC (C18, MeOH / H₂O 60:40, v/v) wurde das Produkt **140** (40 mg, 47 μmol, 12 %) als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 40 mg, 47 μmol, 12 %.

R_F-Wert: 0.34 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

[α]_D²⁰: -60 (c = 2.9, MeOH).

HPLC-ESI: *t*_R = 8.2 min, *m/z* = 785.2 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3307 (w), 2964 (w), 1638 (s), 1543 (m), 1460 (m), 1341 (w), 1233 (w), 1088 (w), 744 (m), 678 (w) cm^{-1} .

Smp.: 204 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ = 10.93 (s, 1 H, NH-Indol), 8.52 (d, 1 H, NH-Ser, J = 9.2 Hz), 8.29 (d, 1 H, NH-Leu, J = 5.2 Hz), 7.57 (d, 1 H, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.55-7.51 (m, 1 H, $\text{NH}\epsilon$ -Lys), 7.35 (d, 1 H, 22-H, J = 8.1 Hz), 7.08 (t, 1 H, 24-H, J = 7.5 Hz), 7.03 (d, 1 H, 13-H, J = 2.1 Hz), 6.99 (t, 1 H, 23-H, J = 7.4 Hz), 6.61-6.56 (m, 1 H, NH-Val), 6.51-6.45 (m, 1 H, NH-Lys), 6.32-6.27 (m, 1 H, NH-Ile), 4.87-4.80 (m, 1 H, 11-H), 4.45-4.36 (m, 1 H, Ser-OH), 4.23-4.14 (m, 1 H, 8-H), 4.01-3.93 (m, 1 H, 23-H), 3.88-3.76 (m, 3 H, 2-H, 29-H, 9- H_2), 3.60-3.49 (m, 1 H, 6- H_2), 3.46-3.39 (m, 1 H, 9- H_2), 3.38-3.31 (m, 1 H, 12- H_2), 3.07-2.99 (m, 1 H, 12- H_2), 2.87-2.79 (m, 1 H, 6- H_2), 2.77 (s, 3 H, 21- H_3), 1.89-1.79 (m, 1 H, 30-H), 1.77-1.67 (m, 1 H, 36-H), 1.63-1.50 (m, 2 H, 3- H_2), 1.46-1.23 (m, 5 H, 25-H, 5- H_2 , 4- H_2 , 37- H_2), 1.16-1.04 (m, 2 H, 4- H_2 , 37- H_2), 1.00-0.78 (m, 7 H, 24- H_2 , 31- H_3 , 38- H_3 , 39- H_3), 0.75 (d, 3 H, 32- H_3 , J = 6.8 Hz), 0.35 (d, 3 H, 26- H_3 , J = 6.6 Hz), 0.09 (d, 3 H, 27- H_3 , J = 6.5 Hz), -0.59 (t, 1 H, 24- H_2 , J = 12.2 Hz).

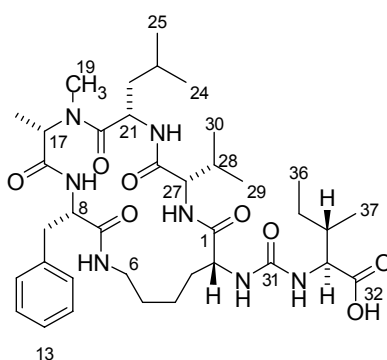
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ = 10.50 (s, Indol-NH), 9.11 (d, 1 H, Ser-NH, J = 9.0 Hz), 8.36 (d, 1 H, Leu-NH, J = 4.4 Hz), 7.96 (d, 1 H, Lys- $\text{NH}\epsilon$, J = 6.6 Hz), 7.59 (d, 1 ArH, 19-H, J = 7.9 Hz), 7.37 (d, 1 ArH, 16-H, J = 8.1 Hz), 7.12 (t, 1 ArH, 18-H, J = 7.5 Hz), 7.05 (t, 1 ArH, 17-H, J = 7.4 Hz), 6.99 (s, 1 ArH, 13-H), 6.54 (d, Lys- $\text{NH}\alpha$, J = 6.2 Hz), 6.35 (d, Ile-NH, J = 8.9 Hz), 5.05 (dd, 1 H, 11-H, J = 2.8, 11.3 Hz), 4.66-4.59 (m, 1 H, 8-H), 4.32 (d, 1 H, 35-H, J = 11.7 Hz), 4.07-4.04 (m, 1 H, 2-H), 3.91-3.82 (m, 3 H, 29-H, 9- H_2), 3.81-3.73 (m, 1 H, 6- H_2), 3.46 (dd, 1 H, 12- H_2 , J = 2.7, 15.2 Hz), 3.19 (dd, 1 H, 12- H_2 , J = 11.4, 15.3 Hz), 2.97-2.75 (m, 1 H, 6- H_2), 2.93 (s, 3 H, 21- H_3), 1.98 (dd, 1 H, 30-H, J = 6.9, 13.7 Hz), 1.93-1.77 (m, 2 H, 36-H, 3- H_2), 1.72-1.59 (m, 1 H, 3- H_2), 1.57-1.42 (m, 3 H, 5- H_2 , 37- H_2), 1.40-1.27 (m, 2 H, 25-H, 4- H_2), 1.26-1.13 (m, 2 H, 37- H_2 , 4- H_2), 1.13-1.04 (m, 1 H, 24- H_2), 1.03-0.90 (m, 9 H, 32- H_3 , 38- H_3 , 39- H_3), 0.88 (d, 3 H, 31- H_3 , J = 6.7 Hz), 0.43 (d, 3 H, 27- H_3 , J = 6.6 Hz), 0.06 (d, 3 H, 26- H_3 , J = 6.6 Hz), -0.53 (t, 1 H, 24- H_2 , J = 11.3 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOD): δ = 176.1 (C=O), 176.0 (C=O), 175.8 (C=O), 174.8 (C=O), 172.8 (C=O), 172.7 (C=O), 160.1 (C=O, C33), 138.1 (C20), 128.9 (C15), 124.9 (C13), 122.9 (C18), 120.4 (C17), 119.2 (C16), 112.9 (C19), 111.2 (C14), 64.5 (C9), 63.7 (C11), 60.1 (C29), 58.8 (C35), 57.4 (C8), 56.2 (C2), 49.1 (C23), 40.0 (C6), 38.9 (C24), 38.7 (C36), 32.2 (C3), 31.4 (C30), 30.1 (C21), 29.6 (C5), 26.1 (C37), 24.8

(C25), 23.9 (C12), 23.3 (C27), 21.9 (C4), 20.1 (C32), 19.8 (C26), 19.1 (C31), 16.5 (C39), 12.2 (C38).

HR-MS (FAB): für $C_{39}H_{61}N_8O_9$ $[M+H]^+$ Berechnet: 785.4556, Gefunden: 785.4560.

6.5.13 1,5-Anhydro(D-lysyl-(N^α -oxamido-L-iso-leucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-N-methyl-alanyl-L-phenylalanin) (141):



141

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: 24 mg, 33 μ mol, 7 %.

R_f -Wert: 0.29 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -67 (c = 0.8, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.5 min, m/z = 730.3 $[M+H]^+$.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3307 (w), 2965 (w), 1633 (s), 1548 (m), 1454 (w), 1247 (w), 1086 (m), 1048 (m), 880 (w), 744 (w), 699 (w), 662 (w) cm^{-1} .

Smp.: 226 °C.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-D_6$) δ = 8.85 (d, 1 H, NH-Phe, J = 9.1 Hz), 8.71 (d, 1 H, NH-Leu, J = 4.2 Hz), 7.41 (d, 1 H, NH- ϵ -Lys, J = 8.0 Hz), 7.23-7.04 (m, 5 H, 11-H – 15-H), 6.89 (d, 1 H, NH-Val, J = 5.2 Hz), 6.53 (d, 1 H, NH-Lys, J = 8.1 Hz), 6.26 (d, 1 H, NH-Ile, J = 7.9 Hz), 5.06-4.98 (m, 1 H, 17-H), 4.72-4.63 (m, 1 H, 21-H), 4.47-4.39 (m, 1 H, 8-H), 3.96-3.82 (m, 3 H, 33-H, 2-H, 27-H), 3.66-3.56 (m, 1 H, 6-H₂), 3.55-3.47 (m, 1 H, 9-H₂), 2.85-2.75 (m, 2 H, 6-H₂ 9-H₂), 1.98-1.88 (m, 1 H, 28-H), 1.76 (s, 3 H, 19-H₃), 1.74-1.67 (m, 1 H, 34-H), 1.68-1.61 (m, 1 H, 23-H), 1.61-1.52 (m, 3 H, 3-H₂, 22-H₂), 1.52-1.42 (m, 1 H, 5-H₂), 1.42-1.28 (m, 4 H, 35-H₂,

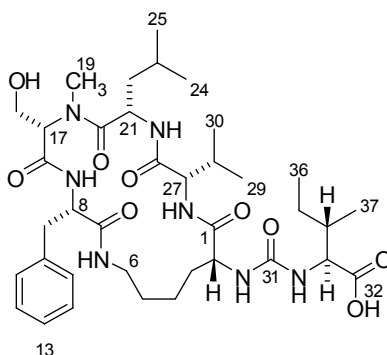
22-H₂, 5-H₂, 4-H₂), 1.27-1.20 (m, 1 H, 4-H₂), 1.17-1.06 (m, 1 H, 35-H₂), 1.09 (d, 3 H, 18-H₃, $J = 6.7$ Hz), 1.01 (d, 3 H, 29-H₃, $J = 6.7$ Hz), 0.95 (d, 3 H, 24-H₃, $J = 6.5$ Hz), 0.91 (d, 3 H, 30-H₃, $J = 6.6$ Hz), 0.88 (d, 3 H, 25-H₃, $J = 6.4$ Hz), 0.86-0.78 (m, 6 H, 36-H₃, 37-H₃).

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 9.20$ (d, 1 H, NH-Phe, $J = 8.8$ Hz), 8.70 (s, 1 H, NH-Leu), 7.77 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, $J = 7.7$ Hz), 7.53 (d, 1 H, NH-Val, $J = 4.5$ Hz), 7.27-7.21 (m, 2 H, 12-H, 14-H), 7.19-7.12 (m, 3 H, 11-H, 13-H, 15-H), 5.22 (q, 1 H, 17-H, $J = 6.4$ Hz), 4.86-4.80 (m, 1 H, 21-H), 4.65 (t, 1 H, 8-H, $J = 10.7$ Hz), 4.24 (bs, 1 H, 33-H), 4.11 (bs, 1H, 2-H), 3.91–3.85 (m, 1 H, 27-H), 3.82–3.73 (m, 1 H, 6-H₂), 3.45 (d, 1 H, 9-H₂, $J = 11.4$ Hz), 2.95 (d, 1 H, 6-H₂, $J = 12.6$ Hz), 2.83 (t, 1 H, 9-H₂, $J = 13.4$ Hz), 2.17–2.06 (m, 1 H, 28-H), 1.96-1.88 (m, 2 H, 34-H, 3-H₂), 1.86 (s, 3 H, 19-H₃), 1.77-1.65 (m, 4 H, 22-H₂, 23-H, 3-H₂, 5-H₂), 1.64-1.50 (m, 2 H, 22-H₂, 5-H₂), 1.50–1.38 (m, 1 H, 35-H₂), 1.27-1.21 (m, 1 H, 35-H₂) 1.23 (d, 3 H, 18-H₃, $J = 6.7$ Hz), 1.14 (d, 3 H, 30-H₃, $J = 6.6$ Hz), 1.05-1.00 (m, 6 H, 29-H₃, 25-H₃), 0.99-0.95 (m, 6 H, 30-H₃, 37-H₃), 0.93 (t, 3 H, 36-H₃, $J = 7.4$ Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 176.0$ (C=O), 174.4 (C=O), 174.3 (C=O), 174.2 (C=O), 172.8 (C=O), 160.2 (C=O, C31), 139.4 (C10), 130.4 (C11, C15), 129.9 (C12, C14), 127.7 (C13), 61.1 (C27), 59.1 (C33), 56.9 (C17), 56.8 (C8), 56.4 (C2), 49.2 (C21), 42.5 (C22), 40.2 (C6), 39.2 (C9), 38.7 (C34), 32.6 (C3), 31.6 (C28), 29.4 (C5), 28.6 (C19), 26.0 (C22), 26.0 (C35), 23.4 (C24), 23.4 (C25), 21.8 (C4), 20.6 (C29), 19.9 (C30), 16.6 (C37), 14.4 (C18), 12.3 (C36).

HR-MS (FAB): für C₃₇H₅₉N₇O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 730.4498, Gefunden: 730.4513.

6.5.14 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-isoleucyl)-L-valinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-serinyl-L-phenylalanin) (142):



142

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **140**.

Ausbeute: 16 mg, 20 μmol , 6 %.

R_f-Wert: 0.47 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -46 (c = 1.3, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 7.9 min, m/z = 746.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

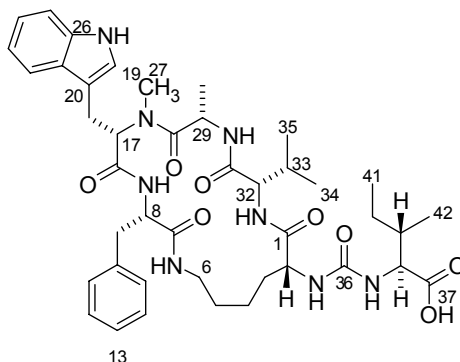
IR: $\tilde{\nu}$ = 3264 (w), 2960 (w), 1644 (s), 1541 (m), 1457 (w), 1203 (w), 1050 (s), 1024 (s), 1005 (s), 822 (w), 760 (w), 700 (w) cm^{-1} .

Smp.: 219 °C.

¹H-NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$): δ = 8.80 (d, 1 H, NH-Phe, J = 9.1 Hz), 8.68 (d, 1 H, NH-Leu, J = 4.8 Hz), 7.50 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 7.1 Hz), 7.26-7.10 (m, 3 H, 12-H, 13-H, 14-H), 7.04 (d, 1 H, 11-H, 15-H, J = 7.2 Hz), 6.81 (d, 1 H, NH-Val, J = 6.5 Hz), 6.53 (d, 1 H, NH-Lys, J = 6.9 Hz), 6.30 (d, 1 H, NH-Ile, J = 8.3 Hz), 4.90-4.84 (m, 1 H, 17-H), 4.67-4.62 (m, 1 H, 21-H), 4.46-4.38 (m, 1 H, 8-H), 4.02-3.97 (m, 1 H, 33-H), 3.94-3.84 (m, 2 H, 2-H, 27-H), 3.71-3.64 (m, 1 H, 18-H₂), 3.62-3.56 (m, 1 H, 6-H₂), 3.50-3.43 (m, 1 H, 18-H₂), 3.42-3.36 (m, 1 H, 9-H₂), 2.80 (d, 1 H, 6-H₂), 2.72 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.2 Hz), 1.98-1.90 (m, 1 H, 28-H), 1.89-1.82 (m, 1 H, 23-H), 1.80 (s, 3 H, 19-H₃), 1.77-1.68 (m, 1 H, 34-H), 1.64-1.54 (m, 3 H, 3-H₂, 22-H₂), 1.48-1.30 (m, 5 H, 5-H₂, 4-H₂, 35-H₂), 1.16-1.05 (m, 2 H, 35-H₂, 22-H₂), 1.02-0.97 (m, 3 H, 29-H₃), 0.94-0.79 (m, 15 H, 24-H₃, 25-H₃, 30-H₃, 36-H₃, 37-H₃).

¹³C-NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ = 174.9 (C=O), 173.3 (2 C=O), 173.1(C=O), 171.4(C=O), 170.0(C=O), 158.2 (C=O, C31), 139.3 (C13), 129.7 (C11, C15), 129.1 (C12, C14), 126.9 (C10), 61.8 (C17), 58.9 (C27), 58.0 (C33), 57.5 (C18), 55.3 (C2), 54.8 (C8), 48.5 (C21), 44.4 (C22), 39.2 (C6), 38.5 (C9), 38.1 (C34), 32.7 (C3), 30.8 (C28), 29.2 (C5), 27.7 (C19), 25.5 (C35), 24.9 (C23), 24.4 (C24), 22.1 (C25), 21.1 (C4), 20.0 (C29), 19.8 (C30), 16.7 (C37), 12.5 (C36).

HR-MS (FAB): für $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ Berechnet: 746.4447, Gefunden: 746.4448.

6.5.15 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-isoleucyl)-L-valinyl-L-alanyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (143):**143**

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: 56 mg, 70 μmol , 16 %.

***R*_f-Wert:** 0.28 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -122 ($c = 1.8$, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.1$ min, $m/z = 803.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu} = 3323$ (w), 2972 (w), 1640 (s), 1554 (m), 1454 (w), 1086 (m), 880 (w), 741 (w), 672 (w) cm^{-1} .

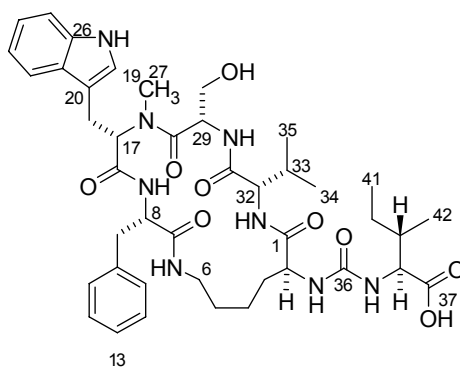
Smp.: 197 °C.

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 10.35$ (s, NH-Indol), 9.29 (d, 1 H, NH-Phe, $J = 7.3$ Hz), 8.44 (bs, 1 H, NH-Ala), 7.92 (d, 1 H, NH- ϵ -Lys, $J = 7.4$ Hz), 7.62 (d, 1 H, 20-H, $J = 7.2$ Hz), 7.48 (bs, 1 H, NH-Val), 7.35 (d, 1 H, 25-H, $J = 7.8$ Hz), 7.31–7.17 (m, 11-H, 12-H, 13-H, 14-H, 15-H, 5 H), 7.15–7.09 (m, 1 H, 24-H), 7.08–7.02 (m, 1 H, 23-H), 6.96 (s, 1 H, 19H), 5.28 (d, 1 H, 17-H, $J = 11.2$ Hz), 4.74 (d, 1 H, 8-H, $J = 9.5$ Hz), 4.42–4.31 (m, 1 H, 29-H), 4.29–4.20 (m, 1 H, 38-H), 4.14–4.04 (m, 1 H, 2-H), 3.89–3.78 (m, 1 H, 6-H₂), 3.75 (d, 1 H, 32-H, $J = 6.1$ Hz), 3.49 (d, 1 H, 9-H₂, $J = 13.8$ Hz), 3.31–3.25 (m, 1 H, 18-H₂), 3.05–2.95 (m, 2 H, 18-H₂, 6-H₂), 2.89 (t, 1 H, 9-H₂, $J = 13.4$ Hz), 2.11–2.03 (m, 1 H, 33-H), 2.00 (s, 3 H, 27-H₃), 1.96–1.82 (m, 2 H, 39-H, 3-H₂), 1.79–1.70 (m, 1 H, 3-H₂), 1.69–1.62 (m, 1 H, 5-H₂), 1.61–1.53 (m, 1 H, 5-H₂), 1.52–1.37 (m, 2 H, 40-H₂, 4-H₂), 1.35–1.15 (m, 2 H, 40-H₂, 4-H₂), 1.13–1.03 (m, 3 H, 34-H₃), 1.03–0.87 (m, 9 H, 38-H₃, 41-H₃, 42-H₃), 0.00 (bs, 3 H, 30-H₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOD): δ = 174.7 (C=O), 174.5 (C=O), 173.3 (C=O), 172.8 (C=O), 171.8 (C=O), 159.0 (C=O, C36), 138.4 (C10), 137.0 (C26), 129.3 (C11, C15), 128.7 (C12, C14), 127.5 (C21), 126.6 (C13), 123.7 (C19), 121.6 (C24), 119.0 (C23), 117.9 (C22), 111.5 (C25), 109.9 (C20), 61.6 (C17), 59.9 (C32), 57.9 (C38), 55.8 (C8), 55.2 (C2), 45.1 (C29), 39.2 (C6), 38.1 (C9), 37.6 (C39), 31.5 (C3), 30.4 (C33), 28.2 (C5), 27.7 (C27), 24.9 (C40), 22.9 (C18), 20.7 (C4), 19.3 (C37), 18.7 (C38), 15.4 (C42), 14.6 (C30), 11.1 (C41).

HR-MS (FAB): für $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_8\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ Berechnet: 803.4450, Gefunden: 803.4471.

6.5.16 1,5-Anhydro(D-lysyl-(N^{α} -oxamido-L-iso-leuyl)-L-valinyl-L-serinyl-L-N-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (**144**):



144

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **140**.

Ausbeute: 29 mg, 35 μmol , 8 %.

R_f -Wert: 0.3 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -89 (c = 2.0, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.2 min, m/z = 820.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3295 (w), 2959 (w), 1636 (s), 1544 (m), 1249 (w), 1083 (w), 741 (m), 700 (w) cm^{-1} .

Smp.: 210 °C.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 10.80 (s, 1 H, NH-Indol), 8.93 (d, 1 H, NH-Phe J = 8.8 Hz), 8.50 (s, 1 H, NH-Ser), 7.66-7.61 (m, 1 H, $\text{NH}\epsilon$ -Lys), 7.53 (d, 1 H, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.31 (d, 1 H, 22H, J = 8.1 Hz), 7.24-7.05 (m, 6 H, 11-H – 15-H, NH-Val),

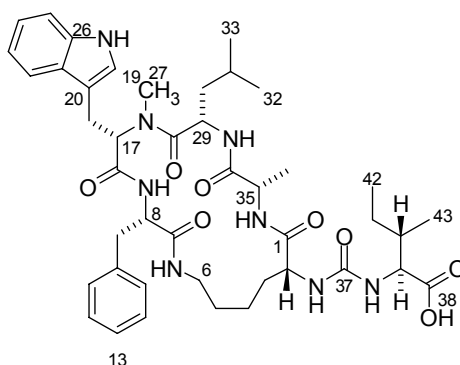
7.03 (t, 1 H, 24-H, $J = 7.5$ Hz), 6.99-6.91 (m, 2 H, 23-H, 19-H), 6.53-6.47 (m, 1 H, NH-Lys), 6.30-6.24 (m, 1 H, NH-Ile), 5.18-5.12 (m, 1 H, 17-H), 4.75-4.68 (m, 1 H, 8-H), 4.55-4.47 (m, 1 H, 29-H), 4.45-4.37 (bs, 1 H, OH-Ser), 3.99-3.91 (m, 1 H, 38-H), 3.92-3.84 (m, 2 H, 32-H, 2-H), 3.68-3.59 (m, 1 H, 6-H₂), 3.39-3.31 (m, 1 H, 9-H₂), 3.16 (dd, 1 H, 17-H₂, $J = 5.7, 15.3$ Hz), 3.01-2.92 (m, 1 H, 30-H₂), 2.86-2.72 (m, 3 H, 18-H₂, 6-H₂, 9-H₂), 2.35-2.30 (m, 1 H, 30-H₂), 1.97-1.88 (m, 1 H, 33-H), 1.87 (s, 3 H, 27-H₃), 1.77-1.66 (m, 1 H, 39-H), 1.65-1.55 (m, 2 H, 3-H₂), 1.53-1.32 (m, 4 H, 40-H₂, 5-H₂), 1.32-1.22 (m, 1 H, 4-H₂), 1.22-1.14 (m, 1 H, 4-H₂), 1.13-1.02 (m, 1 H, 40-H₂), 0.98 (d, 3 H, 34-H₃, $J = 6.7$ Hz), 0.89 (d, 3 H, 35-H₃, $J = 6.7$ Hz), 0.87-0.77 (m, 6 H, 41-H₃, 42-H₃).

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 10.35$ (s, Indol-NH), 9.18 (d, 1 H, Phe-NH, $J = 8.8$ Hz), 8.40 (d, 1 H, Ser-NH, $J = 3.4$ Hz), 7.88 (d, 1 H, Lys-NH ϵ , $J = 8.0$ Hz), 7.60 (d, 1 ArH, 25-H, $J = 7.9$ Hz), 7.36 (d, 1 ArH, 22-H, $J = 8.1$ Hz), 7.27-7.14 (m, 5 ArH, 11-H – 15-H), 7.11 (t, 1 ArH, 24-H, $J = 7.2$ Hz), 7.03 (t, 1 ArH, 23-H, $J = 7.4$ Hz), 6.99 (s, 1 ArH, 19-H), 6.61 (d, 1 H, Lys-NH α , $J = 5.5$ Hz), 6.35 (d, 1 H, Ile-NH α , $J = 8.9$ Hz), 5.29 (dd, 1 H, 17-H, $J = 4.2, 10.4$ Hz), 4.79-4.73 (m, 1 H, 8-H), 4.50-4.43 (m, 1 H, 29-H), 4.25 (d, 1 H, 38-H, $J = 4.6$ Hz), 4.08 (dd, 1 H, 2-H, $J = 4.1, 5.2$ Hz), 3.91-3.73 (m, 1 H, 6-H₂), 3.83 (d, 1 H, 32-H, $J = 10.7$ Hz), 3.49 (dd, 1 H, 9-H₂, $J = 2.8, 14.0$ Hz), 3.32-3.27 (m, 1 H, 18-H₂), 3.05-2.91 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.84 (t, 1 H, 9-H₂, $J = 13.4$ Hz), 2.70 (dd, 1 H, 30-H₂, $J = 7.8, 11.3$ Hz), 2.15-2.03 (m, 2 H, 30-H₂, 33-H), 1.99 (s, 3 H, 27-H₃), 1.96-1.81 (m, 2 H, 39-H, 3-H₂), 1.78-1.67 (m, 1 H, 3-H₂), 1.67-1.49 (m, 2 H, 5-H₂), 1.49-1.36 (m, 40-H₂), 1.35-1.12 (m, 2 H, 4-H₂, 40-H₂), 1.08 (d, 3 H, 35-H₃, $J = 6.8$ Hz), 1.00-0.87 (m, 9 H, 34-H₃, 42-H₃, 41-H₃).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 176.4$ (C=O), 175.8 (C=O), 174.6 (C=O), 174.5 (C=O), 174.3 (C=O), 172.5 (C=O), 160.1 (C=O), 139.4 (C10), 138.0 (C26), 130.4 (C11 + C15), 129.9 (C12 + C14), 128.6 (C21), 127.8 (C13), 125.0 (C19), 122.8 (C24), 120.2 (C23), 119.1 (C22), 112.8 (C25), 111.1 (C20), 63.1 (C17), 61.7 (C30), 60.9 (C32), 58.8 (C38), 56.8 (C8), 56.4 (C2), 53.0 (C29), 40.2 (C6), 39.3 (C9), 38.6 (C39), 32.5 (C3), 31.7 (C33), 29.4 (C5), 28.9 (C27), 26.1 (C40), 24.2 (C18), 21.8 (C7), 20.3 (C34), 19.8 (C35), 16.5 (C42), 12.2 (C41).

HR-MS (FAB): für C₄₂H₅₉N₈O₉ [M+H]⁺ Berechnet: 819.4400, Gefunden: 819.4402.

6.5.17 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-isoleucyl)-L-alanyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (145):



145

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: 47 mg, 58 μ mol, 13 %.

R_f-Wert: 0.22 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -118 (c = 2.0, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.6 min, m/z = 817.2 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3307 (w), 2971 (w), 1636 (s), 1551 (m), 1454 (w), 1086 (w), 879 (w), 741 (w), 699 (w), 662 (w) cm⁻¹.

Smp.: 203 °C.

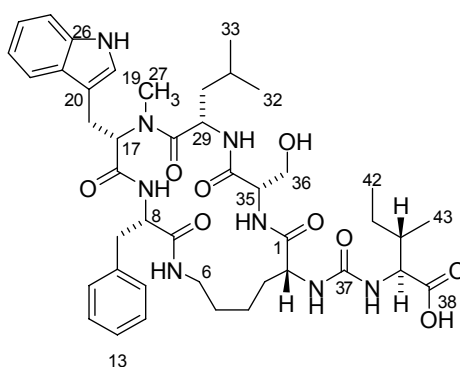
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 10.87 (s, 1 H, NH-Indol), 8.71 (d, 1 H, NH-Phe, J = 8.8 Hz), 8.45 (d, 1 H, NH-Leu J = 4.9 Hz), 7.56 (d, 1 ArH, 22-H, J = 7.7 Hz), 7.48 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 7.4 Hz), 7.32 (d, 1 ArH, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.27-7.21 (m, 2 ArH, 12-H, 14-H), 7.20-7.15 (m, 1 ArH, 13-H), 7.12-7.03 (m, 3 H, 11-H, 15-H, NH-Val), 6.99-6.94 (m, 2 ArH, 23-H, 19-H), 6.44 (d, 1 H, NH α -Lys, J = 6.2 Hz), 6.20 (d, 1 H, NH α -Ile, J = 8.3 Hz), 4.81 (d, 1 H, 17-H, J = 10.5 Hz), 4.56-4.48 (m, 1 H, 8-H), 4.24 (bs, 1 H, 29-H), 4.09-3.99 (m, 1 H, 35-H), 3.96-3.83 (m, 2 H, 39-H, 2-H), 3.67-3.54 (m, 1 H, 6-H₂), 3.37-3.35 (m, 1 H, 9-H₂), 3.14 (d, 1 H, 19-H₂), 2.93-2.79 (m, 2 H, 6-H₂, 19-H₂), 2.71 (t, 1 H, 9-H₂), 1.96 (s, 3 H, 27-H₃), 1.76-1.67 (m, 1 H, 40-H), 1.61-1.50 (m, 2 H, 3-H₂), 1.48-1.33 (m, 4 H, 5-H₂, 41-H₂, 31-H), 1.31-1.16 (m, 2 H, 4-H₂) 1.25 (d, 3 H, 36-H₃, J = 6.9 Hz), 1.15-1.02 (m, 1 H, 41-H₂), 0.94 (t, 1 H, 30-H₂, J = 12.5 Hz), 0.88-0.76 (m, 6 H, 42-H₃, 43-H₃), 0.36 (d, 3-H, 32-H₃, J = 6.4 Hz), 0.11 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.4 Hz), -0.58 (t, 1 H, 30-H₂, J = 11.6 Hz).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ = 10.45 (s, NH-Indol), 9.17 (d, 1 H, NH-Phe, J = 8.8 Hz), 8.31 (d, 1 H, NH-Leu, J = 4.3 Hz), 8.06 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 8.2 Hz), 7.57 (d, 1 H, 22-H, J = 7.8 Hz), 7.36 (d, 1 H, 25-H, J = 8.1 Hz), 7.33-7.19 (m, 5 H, 11-H - 15-H), 7.23 (d, 1 H, 24-H, J = 7.4 Hz), 7.12 (t, 1 H, 24-H, J = 7.6 Hz), 7.04 (t, 1 H, 23-H, J = 7.5 Hz), 6.91 (s, 1 H, 19-H), 5.06 (d, 1 H, 17-H, J = 11.2 Hz), 4.774.66 (m, 1 H, 8-H), 4.35 (d, 1 H, 29-H, J = 11.3 Hz), 4.27-4.21 (m, 1 H, 39-H), 4.19-4.09 (m, 2 H, 2-H, 35-H), 3.90-3.78 (m, 1 H, 6-H₂), 3.49 (d, 1 H, 9-H₂, J = 13.9 Hz), 3.27 (d, 1 H, 18-H₂, J = 12.6 Hz), 3.04-2.95 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.78 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz), 2.06 (s, 3 H, 27-H₃), 1.99-1.84 (m, 2 H, 40-H, 3-H₂), 1.74-1.49 (m, 5 H, 3-H₂, 5-H₂, 4-H₂, 41-H₂), 1.45 (d, 3 H, 36-H₃, J = 7.1 Hz), 1.38-1.15 (m, 3 H, 4-H₂, 31-H, 41-H₂), 1.14-1.04 (m, 1 H, 30-H₂), 0.98 (d, 3 H, 43-H₃, J = 6.8 Hz), 0.95 (t, 3 H, 42-H₃, J = 7.4 Hz), 0.47 (d, 3 H, 32-H₃, J = 6.6 Hz), 0.06 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.5 Hz), -0.54 (t, 1 H, 30-H₂, J = 12.2 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOD): δ = 175.9 (C=O), 175.8 (C=O), 175.7 (C=O), 175.6 (C=O), 174.3 (C=O, C7), 172.6 (C=O, C16), 160.3 (C=O, C37), 139.3 (C10), 137.9 (C26), 130.3 (C11, C15), 130.0 (C12, C14), 128.8 (C21), 127.7 (C13), 124.7 (C19), 122.8 (C24), 120.3 (C23), 119.2 (C22), 112.9 (C25), 111.1 (C20), 63.2 (C17), 59.2 (C39), 57.1 (C8), 56.0 (C2), 50.8 (C35), 48.9 (C29), 39.9 (C6), 39.6 (C9), 39.4 (C30), 38.5 (C40), 32.7 (C3), 29.4 (C5), 29.0 (C27), 26.0 (C41), 25.0 (C31), 23.5 (C18), 23.3 (C33), 21.5 (C4), 20.2 (C32), 17.3 (C36), 16.6 (C43), 12.3 (C42).

HR-MS (FAB): für C₄₃H₆₁N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 817.4607, Gefunden: 817.4627.

6.5.18 1,5-Anhydro(D-lysyl-(*N* ^{α} -oxamido-L-iso-leuyl)-L-serinyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (146):



146

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **140**.

Ausbeute: 45 mg, 54 μmol , 12 %.

R_F-Wert: 0.25 (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -89 (c = 2.2, MeOH).

HPLC-ESI: t_R = 8.6 min, m/z = 833.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3295 (w), 2932 (w), 1634 (s), 1537 (m), 1456 (m), 1226 (w), 1086 (w), 743 (m), 699 (w) cm^{-1} .

Smp.: 221 °C.

¹H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ = 10.86 (s, 1 H, NH-Indol), 8.54 (m, 2 H, NH-Phe, NH-Leu), 7.55 (d, 1 H, 22-H, J = 7.7 Hz), 7.40 (d, 1 H, NH ϵ -Lys, J = 8.0 Hz), 7.32 (d, 1 H, 25H, J = 8.1 Hz), 7.27-7.15 (m, 3 H, 12-H, 14-H, 13-H), 7.09-7.02 (m, 3 H, 11-H, 15-H, 24-H), 6.99-6.93 (m, 2 H, 23-H, 19-H), 6.56 (d, 1 H, NH-Lys, J = 6.1 Hz), 5.96 (bs, 1 H, NH-Ile), 4.80-4.73 (m, 1 H, 17-H), 4.58-4.50 (m, 1 H, 8-H), 4.27-4.19 (m, 1 H, 29-H), 4.04-3.97 (m, 1 H, 35-H), 3.94-3.88 (m, 1 H, 2-H), 3.86-3.78 (m, 1 H, 39-H), 3.67-3.57 (m, 2 H, 6-H₂, 36-H₂), 3.30-3.28 (m, 1 H, 9-H₂), 3.14 (dd, 1 H, 18-H₂, J = 2.9, 14.7 Hz), 3.01-2.95 (m, 1 H, 36-H₂), 2.89-2.80 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.68-2.61 (m, 1 H, 9-H₂), 1.92 (s, 3 H, 27-H₃), 1.81-1.72 (m, 1 H, 1 H, 40-H), 1.71-1.58 (m, 2 H, 3-H₂), 1.58-1.40 (m, 3 H, 5-H₂, 4-H₂), 1.39-1.33 (m, 1 H, 41-H₂), 1.32-1.26 (m, 1 H, 30-H₂), 1.26-1.15 (m, 1 H, 4-H₂), 1.14-1.00 (m, 1 H, 41-H₂), 0.99-0.87 (m, 1 H, 30-H₂), 0.87-0.78 (m, 6 H, 42-H₃, 43-H₃), 0.35 (d, 32-H₃, J = 6.6 Hz), 0.12 (d, 33-H₃, J = 6.6 Hz), -0.59 (d, 1 H, 30-H₂, J = 21.7 Hz).

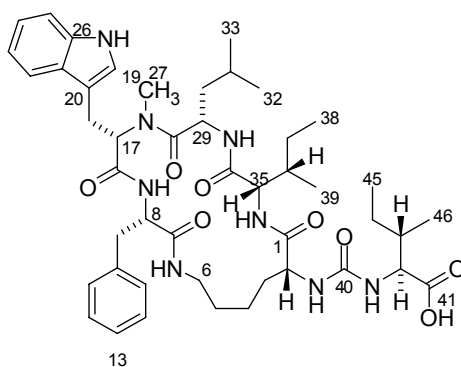
¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 10.43 (s, 1 H, Indol-NH), 8.91 (d, 1 H, Phe-NH, J = 8.9 Hz), 8.35 (d, 1 H, Leu-NH, J = 5.1 Hz), 8.05 (d, 1 H, Lys-NH ϵ , J = 6.3 Hz), 7.68 (d, 1 H, Val-NH, J = 5.1 Hz), 7.54 (d, 1 ArH, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.34 (d, 1 ArH, 22-H, J = 8.1 Hz), 7.31-7.14 (m, 5 ArH, 11, 12, 13, 14, 15-H), 7.10 (t, 1 ArH, 24-H, J = 7.4 Hz), 7.02 (t, 1 ArH, 23-H, J = 7.4 Hz), 6.88 (s, 1 ArH, 19-H), 6.65 (d, 1 H, Lys-NH α , J = 5.8 Hz), 6.38 (d, 1 H, Ile-NH α , J = 8.8 Hz), 5.02 (dd, 1 H, 17-H, J = 2.8, 11.3 Hz), 4.77-4.70 (m, 1 H, 8-H), 4.39-4.30 (m, 1 H, 29-H), 4.29-4.17 (m, 2 H, 39-H, 35-H), 4.17-4.10 (m, 1 H, 2-H), 3.99-3.77 (m, 3 H, 36-H₂, 6-H₂), 3.49-3.42 (m, 1 H, 9-H₂), 3.31-3.26 (m, 1 H, 18-H₂), 3.01-2.90 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.75 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.2 Hz), 2.03 (s, 3 H, 27-H₃), 1.98-1.80 (m, 2 H, 40-H, 3-H₂), 1.75-1.64 (m, 1 H, 3-H₂), 1.63-1.39 (m, 4 H, 4-H₂, 5-H₂, 41-H₂), 1.37-1.25 (m, 2 H, 31-H, 4-H₂), 1.25-1.14 (m, 1 H, 41-H₂), 1.13-1.03 (m, 1 H, 30-H₂), 0.96 (d, 3 H, 43-H₃, J = 6.9 Hz),

0.92 (t, 3 H, 42-H₃, $J = 7.3$ Hz), 0.44 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 6.6$ Hz), 0.03 (d, 33-H₃, $J = 6.6$ Hz), -0.56 (t, 1 H, 30-H₂, $J = 11.1$ Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): δ = 176.6 (C=O), 176.0 (C=O), 174.3 (C=O), 173.9 (C=O), 173.0 (C=O), 172.6 (C=O), 160.4 (C=O, C37), 139.4 (C10), 137.9 (C26), 130.5 (C11 + C15), 130.0 (C12 + 14), 128.8 (C21), 127.7 (C13), 124.7 (C19), 122.8 (C24), 120.3 (C23), 119.2 (C22), 112.9 (C)25, 111.1 (C20), 63.3 (C17), 62.8 (C36), 59.0 (C39), 57.3 (C8), 57.1 (C35), 56.2 (C2), 48.6 (C29), 39.9 (C6), 39.5 (C9), 39.4 (C30), 38.7 (C40), 32.7 (C3), 29.5 (C5), 29.1 (C)27, 26.2 (C41), 25.1 (C18), 23.6 (C31), 23.3 (C32), 21.6 (C4), 20.2 (C33), 16.5 (C43), 12.3 (C42).

HR-MS (FAB): für C₄₃H₆₁N₈O₉ [M+H]⁺ Berechnet: 833.4556, Gefunden: 833.4558.

6.5.19 1,5-Anhydro(D-lysyl-(N^α-oxamido-L-isoleucyl)-L-isoleucyl)-L-leucyl-L-N-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin (19):



19

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der der Verbindung **99**.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 27 mg, 31.4 μ mol, 20 %.

R_f-Wert: 0.28 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -127.7 (c = 1.5, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 6.3$ min, $m/z = 859.6$ [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu} = 3308$ (w), 2961 (w), 2874 (w), 1638 (s), 1536 (m), 1456 (w), 1354 (w), 1217 (w), 1011 (w), 741 (w), 700 (w), 627 (w) cm⁻¹.

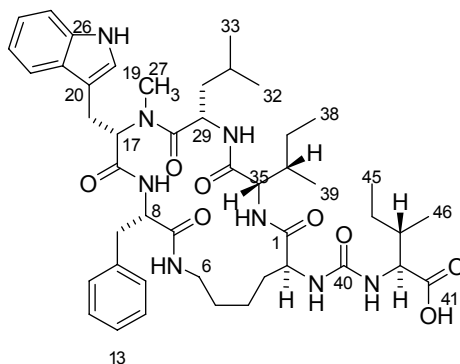
Smp.: 201 °C.

¹H-NMR (500MHz, MeOD): δ = 7.54 (d, 1 ArH, 25-H, J = 7.9 Hz), 7.33 (d, 1 ArH, 22-H, J = 8.1 Hz), 7.30-7.23 (m, 2 ArH), 7.23-7.13 (m, 3 ArH), 7.09 (t, 1 ArH, 24-H, J = 7.5 Hz), 7.01 (t, 1 ArH, 23-H, J = 7.4 Hz), 6.87 (s, 1 ArH, 19-H), 4.93 (d, 1 H, 17-H, J = 8.5 Hz), 4.79 (d, 1 H, 8-H, J = 9.6 Hz), 4.28 (d, 1 H, 29-H, J = 12.0 Hz), 4.22 (d, 1 H, 42-H, J = 4.1 Hz), 4.03 (t, 1 H, 2-H, J = 4.5 Hz), 3.86 (d, 1 H, 35-H, J = 9.4 Hz), 3.82-3.72 (m, 1 H, 6-H₂), 3.48 (d, 1 H, 9-H₂, J = 11.3 Hz), 3.59-3.30 (m, 1 H, 18-H₂), 3.02-2.90 (m, 2 H, 6-H₂, 18-H₂), 2.86 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz) 2.04 (s, 3 H, 27-H₃), 1.96-1.86 (m, 2 H, 43-H, 36-H), 1.86-1.77 (m, 1 H, 3-H₂), 1.76-1.64 (m, 1 H, 3-H₂), 1.64-1.41 (m, 5 H, 5-H₂, 37-H₂, 44-H₂, 4-H₂), 1.41-1.33 (m, 1 H, 31-H), 1.33-1.23 (m, 1 H, 4-H₂), 1.21-1.11 (m, 2 H, 37-H₂, 44-H₂), 1.04 (d, 3 H, 39-H₃, J = 6.4 Hz), 1.04-0.99 (m, 1 H, 30-H₂), 0.94 (d, 3 H, 46-H₃, J = 6.9 Hz), 0.91 (t, 3 H, 45-H₃, J = 7.5 Hz), 0.88 (t, 3 H, 38-H₃, J = 7.4 Hz), 0.38 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.6 Hz), 0.07 (d, 3 H, 32-H₃, J = 6.5 Hz), -0.59 (t, 1 H, 30-H₂, J = 11.4 Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): δ = 177.3 (C=O, C41), 176.0 (C=O, C1), 175.5 (C=O, C28), 174.6 (C=O, C34), 174.4 (C=O, C7), 172.6 (C=O, C16), 159.9 (C=O, C40) 139.4 (ArC, C10), 138.1 (ArC, C26), 130.5 (2 ArC, C11, C15), 130.0 (2 ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.8 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.3 (C17), 59.4 (C42), 59.4 (C35), 56.6 (C8), 56.4 (C2), 49.5 (C29), 40.2 (C6), 39.2 (C9), 39.1 (C43), 39.0 (C30), 37.2 (C36), 32.6 (C3), 29.6 (C5), 29.2 (C27), 26.8 (C37), 26.0 (C44), 24.9 (C31), 23.6 (C18), 23.3 (C33), 21.7 (C4), 20.3 (C32), 16.6 (C46), 15.9 (C39), 12.3 (C46), 10.9 (C38).

HR-MS (FAB): für C₄₆H₆₆N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 859.5076, Gefunden: 859.5095.

6.5.20 1,5-Anhydro(L-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-isoleucyl)-L-isoleucyl-L-leucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (132):



132

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der Verbindung **99**.

Ausbeute: 14.4 mg, 16.8 μmol, 11 %.

R_f-Wert: 0.34 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

[α]_D²⁰: -127.6 (c = 0.7, MeOH).

HPLC-ESI: *t*_R = 7.3 min, *m/z* = 860.6 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3308 (w), 2929 (w), 1633 (s), 1539 (m), 1456 (m), 1408 (w), 1356 (w), 1221 (w), 1087 (w), 1026 (w), 741 (w), 699 (w) cm⁻¹.

Smp.: 217 °C.

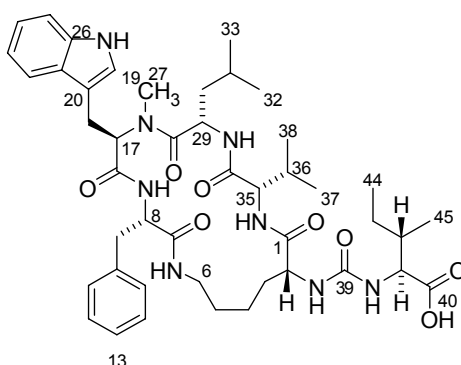
¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.54 (d, 1 ArH, 22-H, *J* = 7.9 Hz), 7.33 (d, 1 ArH, 25-H, *J* = 8.1 Hz), 7.30-7.24 (m, 2 ArH), 7.23-7.14 (m, 3 ArH), 7.09 (t, 1 ArH, 24-H, *J* = 7.4 Hz), 7.01 (t, 1 ArH, 23-H, *J* = 7.4 Hz), 6.87 (s, 1 ArH, 19-H), 4.92-4.88 (m, 1, 17-H), 4.79 (dd, 1 H, 8-H, *J* = 3.2, 12.6 Hz), 4.28 (d, 1 H, 29-H, *J* = 10.2 Hz), 4.19 (dd, 1 H, 2-H, *J* = 3.6, 9.8 Hz), 4.14 (d, 1 H, 42-H, *J* = 4.1 Hz), 4.02 (d, 1 H, 35-H, *J* = 9.7 Hz), 3.80-3.71 (m, 1 H, 6-H₂), 3.46 (dd, 1 H, 9-H, *J* = 2.8, 14.1 Hz), 3.35 (dd, 1 H, 18-H₂, *J* = 2.2, 15.2 Hz), 2.98-2.84 (m, 3 H, 6-H₂, 18-H₂, 9-H₂), 2.06 (s, 3 H, 27-H₃), 1.92-1.83 (m, 1 H, 36-H), 1.83-1.75 (m, 1 H, 43-H), 1.75-1.65 (m, 1 H, 37-H₂), 1.65-1.42 (m, 5 H, 3-H₂, 44-H₂, 5-H₂), 1.41-1.35 (m, 1 H, 31-H), 1.34-1.27 (m, 1 H, 37-H₂), 1.27-1.16 (m, 2 H, 4-H₂), 1.16-1.08 (m, 1 H, 44-H₂), 1.04 (d, 3 H, 39-H₃, *J* = 6.8 Hz), 1.08-0.99 (m, 1 H, 30-H₂), 0.89 (m, 9 H, 38-H₃, 46-H₃, 45-H₃), 0.36 (d,

3 H, 33-H₃, $J = 6.6$ Hz), 0.06 (d, 3 H, 32-H₃, $J = 6.5$ Hz), -0.62 (t, 1 H, 30-H₂, $J = 11.8$ Hz).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 175.8$ (C=O, C41), 175.4 (C=O, C2), 175.3 (C=O, C28), 174.8 (C=O, C34), 174.3 (C=O, C7), 172.4 (C=O, C16), 159.7 (C=O, C40), 139.4 (ArC, C10), 138.0 (ArC, C26), 130.3 (2 ArC, C11, C15), 129.9 (ArC, C12, C14), 128.8 (ArC, C21), 127.8 (ArC, C13), 124.7 (ArC, C19), 122.8 (ArC, C24), 120.3 (ArC, C23), 119.3 (ArC, C22), 112.8 (ArC, C25), 111.1 (ArC, C20), 63.4 (C17), 60.3 (C42), 59.3 (C35), 56.6 (C8), 54.4 (C2), 49.1 (C29), 40.4 (C6), 39.8 (C43), 39.2 (C9), 38.8 (C30), 37.5 (C36), 35.5 (C3), 29.7 (C5), 29.3 (C27), 26.8 (C37), 26.1 (C4), 26.1 (C44), 24.8 (C31), 23.5 (C18), 23.3 (C33), 20.3 (C32), 16.5 (C46), 15.9 (C39), 12.4 (C45), 11.1 (C38).

HR-MS (FAB): für C₄₆H₆₆N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 859.5076, Gefunden: 859.5101.

6.5.21 1,5-anhydro(D-lysyl-(N^α-oxamido-L-iso-leucyl)-L-leucyl-L-valinyl-D-N-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (147):



147

Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgten analog zu der der Verbindung **99**.

Ausbeute: 105 mg, 120 μ mol, 14 %.

R_f-Wert: 0.37 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1 + 0.25 % AcOH, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: 119.3 (c = 1.0, MeOH).

HPLC-ESI: $t_R = 8.4$ min, $m/z = 845.6$ [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu} = 3339$ (w), 2962 (w), 1640 (s), 1539 (m), 1457 (w), 1279 (w), 1201 (w), 1105 (w), 740 (w), 702 (w), 665 (w) cm⁻¹.

Smp.: 221 °C.

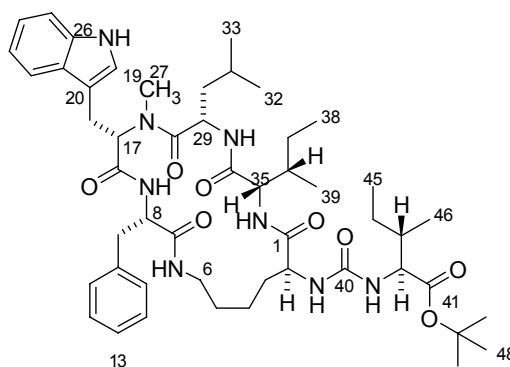
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 10.80 (s, 1 H, NH-Indol), 8.13 (s, 1 H, NH-Leu), 7.93 (d, 1 H, NH-Phe, *J* = 8.8 Hz), 7.46 (d, 1 H, H22, *J* = 7.8 Hz), 7.30 (d, 1 H, H25, *J* = 8.0 Hz), 7.28-7.17 (m, 5 ArH, C11-C15, *J* = 7.1, 30.7 Hz), 7.13 (bs, 2 H, NH-Val, NH ϵ -Lys), 7.05 (s, 1 ArH, H19), 7.03 (t, 1 H, H24, *J* = 7.7 Hz), 6.95 (t, 1 H, H23, *J* = 7.3 Hz), 6.46 (d, 1 H, NH α -Lys, *J* = 5.7 Hz), 6.29 (d, 1 H, NH-Ile, *J* = 8.6 Hz), 5.33 (dd, 1 H, H17, *J* = 3.6, 11.8 Hz), 4.50-4.41 (m, 1 H, H8), 4.23 (s, 1 H, H29), 4.08-3.99 (m, 1 H, H41), 3.86 (d, 1 H, H2, *J* = 4.5 Hz), 3.71 (t, 1 H, H35, *J* = 7.4 Hz), 3.52-3.42 (m, 1 H, H6), 3.19 (d, 1 H, H9, *J* = 10.7 Hz), 3.13 (d, 1 H, H18, *J* = 11.7 Hz), 2.99 (s, 3 H, H27), 2.96 (d, 1 H, H18, *J* = 15.4 Hz), 2.86 (m, 1 H, H6), 2.71 (t, 1 H, H9, *J* = 12.3 Hz), 1.92-1.81 (m, 1 H, H36), 1.79-1.68 (m, 1 H, H42), 1.69-1.61 (m, 1 H, H3), 1.60-1.49 (m, 1 H, H3), 1.47-1.30 (m, 4 H, H5, H43, H4), 1.30-1.20 (m, 3 H, H4, H30), 0.93-0.77 (m, 12 H, H33, H32, H38, H37), 0.55-0.38 (m, 6 H, H44, H45).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 173.8 (C=O, C40), 172.7 (C=O, C1), 172.6 (C=O, C28), 172.0 (C=O, C34), 170.8 (C=O, C7), 170.3 (C=O, C16), 157.3 (C=O, C39), 138.2 (ArC, C10), 136.2 (ArC, C26), 129.2 (2 ArC, C11, C15), 128.0 (2 ArC, C12, C14), 126.9 (ArC, C21), 126.2 (ArC, C13), 123.2 (ArC, C19), 120.7 (ArC, C24), 118.1 (ArC, C23), 118.1 (ArC, C22), 111.2 (ArC, C25), 109.8 (ArC, C20), 59.2 (C35), 56.9 (C41), 56.8 (C17), 54.9 (C8), 54.7 (C2), 47.8 (C29), 40.6 (C30), 38.1 (C6), 37.4 (C9), 37.1 (C42), 31.5 (C27), 31.2 (C3), 29.4 (C36), 28.4 (C5), 24.6 (C43), 23.3 (C19), 23.1 (C31), 22.8 (C33), 22.0 (C32), 20.3 (C4), 19.2 (C38), 19.0 (C37), 15.7 (C45), 11.5 (C44).

HR-MS (FAB): für C₄₅H₆₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 845.4920, Gefunden: 845.4924.

6.6 Versuche zu Kapitel 4.1.13

6.6.1 1,5-Anhydro(L-lysyl-(*N*^α-oxamido-L-isoleucyl-*tert*-butylester)-L-isoleucyl-L-*N*-methyl-tryptophyl-L-phenylalanin) (101):



101

Die Beladung von 2-Chlortritylharz mit **76** und die anschließende Festphasenpeptidsynthese erfolgten gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschriften (siehe Kapitel 6.4.1 und 6.4.5). Das Harz wurde in Dichlormethan / TFA (98:2) suspendiert und bei RT 30 min geschüttelt. Die Lösung wurde in einen Kolben mit Toluol überführt und die Abspaltung wiederholt. Das Harz wurde gewaschen (3 × CH₂Cl₂ / TFA (98:2), 2 × CH₂Cl₂). Die vereinigten Abspaltungs- und Waschlösungen wurden bei vermindertem Druck eingengt. Das abgespaltene Material wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan / Methanol, 9:1 +0.25 % Ameisensäure, 10 g Kieselgel) aufgereinigt und der Zyklisierungsläufer als farbloser Feststoff erhalten.

Die Kupplungsreagenzien HATU (24 mg, 64 μmol, 1.2 Äq.), HOAt (9 mg, 1.2 Äq.) und DIPEA (19 μL, 4.8 Äq.) wurden in THF gelöst (100 mL, Endkonzentration 0.5 mM). Der Zyklisierungsvorläufer (50 mg, 54 μmol) wurde in THF gelöst (20 mL) und unter starkem Rühren über einen Zeitraum von 16 h zugetropft. Zusätzliches Kupplungsreagenz HATU (24 mg, 64 μmol, 1.2 Äq.), HOAt (9 mg, 1.2 Äq.) und DIPEA (19 μL, 4.8 Äq.) wurden zur Reaktionslösung hinzugefügt und für weitere 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt in Ethylacetat (5 mL) aufgenommen. Die Lösung mit KHSO₄ (5 % aq, 3 × 2.5 mL), NaHCO₃ (5 % aq, 3 × 2.5 mL) und NaCl (aq, 2.5 mL) gewaschen. Nach

Reinigung mittels präp. HPLC (C18, MeOH / H₂O, 65:35, v/v) wurde Cyclopeptid **101** als farbloser Feststoff erhalten (12.2 mg, 13.3 μ mol, 21 %).

Ausbeute: 12.2 mg, 13.3 μ mol, 21 %.

R_f-Wert: 0.56 (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1).

$[\alpha]_D^{20}$: 105.4 (c = 0.7, CHCl₃).

HPLC-ESI: t_R = 10.0 min, m/z = 916.6 [M+H]⁺

IR: $\tilde{\nu}$ = 3307 (w), 2962 (w), 2930 (w), 2874 (w), 1636 (s), 1525 (m), 1456 (w), 1367 (w), 1220 (w), 1155 (w), 1087 (w), 846 (w), 740 (w), 699 (w), 622 (w) cm⁻¹.

Smp.: 204 °C.

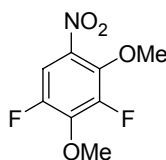
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.37 (d, 1 H, NH-Phe, J = 8.7 Hz), 8.22 (bs, 1 H, NH-Ile), 8.05 (bs, 1 H, NH-Leu), 7.56 (d, 1 ArH, 22-H, J = 7.8 Hz), 7.33 (d, 1 ArH, 25-H, J = 8.1 Hz), 7.31-7.23 (m, 2 ArH), 7.21-7.08 (m, 5 ArH), 6.84 (s, 1 ArH, 19-H), 6.59 (bs, 1 H, NH-Ile (Urea)), 6.49 (d, 1 H, NH α -Lys, J = 6.1 Hz), 6.27 (bs, 1 H, NH ϵ -Lys), 4.96-4.88 (m, 1 H, 8-H), 4.48-4.36 (m, 2 H, 17-H, 2-H), 4.32-4.16 (m, 2 H, 35-H, 29-H), 4.07 (dd, 1 H, 42-H, J = 6.8, 9.8 Hz), 3.78-3.67 (m, 1 H, 6-H₂), 3.61 (dd, 1 H, 9-H₂, J = 2.7, 15.0 Hz), 3.50 (dd, 1 H, 18-H₂, J = 3.3, 14.2 Hz), 3.06-2.96 (m, 1 H, 6-H₂), 2.86 (dd, 1 H, 18-H₂, J = 10.5, 15.4 Hz), 2.78 (t, 1 H, 9-H₂, J = 13.4 Hz), 2.11 (s, 3 H, 27-H₃), 1.88-1.74 (m, 1 H, 43-H), 1.72-1.55 (m, 2 H, 36-H, 37-H₂), 1.56-1.16 (m, 8 H, 3-H₂, 31-H, 44-H₂, 4-H₂, 5-H₂), 1.02 (d, 3 H, 46-H₃, J = 6.6 Hz), 0.81-0.80 (m, 6 H, 38-H₃, 45-H₃), 0.72 (d, 3 H, 39-H₃, J = 6.7 Hz), 0.18 (d, 3 H, 32-H₃, J = 6.6 Hz), 0.06 (d, 3 H, 33-H₃, J = 6.4 Hz), -0.53 (t, 1 H, 30-H₂, J = 12.0 Hz).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 179.2 (C=O), 172.8 (C=O), 172.2 (C=O), 172.1 (C=O), 169.2 (C=O), 156.7 (C=O, C39) 137.4 (ArC, C10), 136.0 (ArC, C26), 128.9 (2 ArC, C11, C15), 128.7 (2 ArC, C12, C14), 126.9 (ArC, C21), 126.7 (ArC, C13), 123.1 (ArC, C19), 122.4 (ArC, C24), 119.9 (ArC, C23), 118.2 (ArC, C22), 111.4 (ArC, C25), 110.9 (ArC, C20), 82.7 (C46), 61.9 (C2), 58.3 (C42), 55.6 (C17), 52.5 (C35), 48.0 (C29), 39.8 (C6), 39.8 (C36), 38.4 (C9), 37.0 (C30), 36.0 (C42), 34.5 (C3), 29.7 (C5), 29.3 (C4), 28.5 (C27), 28.2 (C47), 25.5 (C37), 25.2 (C31), 23.2 (C43) 22.4 (C32), 18.9 (C33), 15.2 (C46), 15.1 (C39), 11.8 (C45) 10.6 (C38).

HR-MS (FAB): für C₅₀H₇₄N₈O₈ [M+H]⁺ Berechnet: 915.5743, Gefunden: 915.5702.

6.7 Versuche zu Kapitel 4.1.16

6.7.1 3,5-Difluor-2,4-dimethoxynitrobenzol (**150**):



150

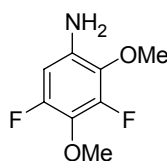
2,3,4,5-Tetrafluornitrobenzol (**149**, 5.0 g, 26 mmol) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt, in abs. Methanol (70 mL) gelöst und bei 0 °C eine methanolische Natriummethanolat-Lösung (62.4 mmol, 11 mL, 2.4 Äq.) tropfenweise zugegeben. Nach 15 h rühren bei RT (DC-Kontrolle Cyclohexan / Ethylacetat, 6:1) wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M Zitronensäure (aq) (0.1 Äq.) beendet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der gelbe, feste Rückstand wurde in Diethylether (100 mL) aufgenommen und mit 1 M Zitronensäure (aq) (2 × 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert (1 × 50 mL), die vereinigten Etherextrakte mit NaCl (aq) (1 × 100 mL) gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt (gelbes Öl) säulenchromatographisch (Petrolether / Ethylacetat 40:1, 180 g Kieselgel) aufgereinigt. Das Produkt **150** (5.44 g, 24.8 mmol, 97 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 5.44 g, 24.8 mmol, 97 %.

R_f-Wert: 0.53 (Cyclohexan / Ethylacetat 64:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.53 (dd, 1 ArH, *J* = 2.3, 10.9 Hz), 4.15-4.12 (m, 3 H, OMe), 4.04-4.02 (m, 3 H, OMe).

Die spektroskopischen Daten (¹H-NMR) stimmten mit der Literatur überein.^{139, 159}

6.7.2 3,5-Difluor-2,4-dimethoxyanilin (151):**151**

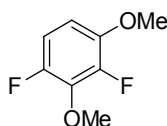
3,5-Difluor-2,4-dimethoxynitrobenzol (**150**, 5.34 g, 24 mmol) wurde in einem 250 mL Druck-Autoklaven vorgelegt, in Ethylacetat / Ethanol (14 mL, 1:1) gelöst. Die Reaktionslösung wurde 5 min mit Argon gespült, Palladium (5 Gew.-%) auf Aktivkohle (0.53 g, 10 Gew.-%) zugegeben und anschließend erneut 5 min mit Argon gespült. Der Autoklav wurde mit Wasserstoff befüllt (10 bar) und für 60 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und das Anilin **151** (4.61 g, 24.4 mmol, quant.) als klares, braunes Öl erhalten.

Ausbeute: Klares braunes Öl, 4.61 g, 24.4 mmol, quant.

R_f-Wert: 0.18 (Cyclohexan / Ethylacetat 1:9).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.25 (dd, 1 ArH, J = 2.3, 12.0 Hz), 3.87 (s, 3 H, OMe), 3.87 (d, 3 H, OMe, J = 1.1 Hz).

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^{139, 159}

6.7.3 3,5-Difluor-2,4-dimethoxybenzol (152):**152**

3,5-Difluor-2,4-dimethoxyaminobenzol (**151**, 4.39 g, 23 mmol) wurden in einem 250 mL Rundkolben vorgelegt, in H₂O:konz. HCl (aq) (75 mL, 2:1) gelöst. Die graue Lösung wurde mit einem Eis-Kochsalzbad gekühlt, die Konzentration von **151** betrug 0.3 M. Eiskalte wässrige Natriumnitritlösung (3 mL, 1.05 Äq.) wurde zugetropft, wobei sich die Lösung braun-grün verfärbte. Die Lösung wurde unter Eiskühlung 15 min gerührt, anschließend binnen 5 min Phosphinsäure (51 mL, 20 Äq. 50 % (aq)) zugegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei 4 °C stengelassen, (Gasentwicklung !) und anschließend 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (100 mL) verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert (3 × 150 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen (150 mL H₂O, 150 mL NaCl (aq)), mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan:Ethylacetat 95:5, 100 g Kieselgel) wurde das Benzolderivat **152** (3.8 g, 22 mmol, 94 %) als klares braunes Öl erhalten.

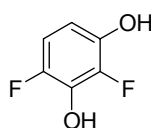
Ausbeute: Klares braunes Öl, 3.8 g, 22 mmol, 94 %.

R_f-Wert: 0.44 (Cyclohexan / Ethylacetat 95:5).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.83-6.76 (m, 1 ArH), 6.61-6.54 (m, 1 ArH), 4.00 (t, 3 H, CH₃, *J* = 1.1 Hz), 3.85 (s, 3 H, CH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^{139, 159}

6.7.4 2,4-Difluorbenzolresorcin (**153**):



153

3,5-Difluor-2,4-dimethoxyanilin (**152**, 3.2 g, 18 mmol) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt, in abs. Dichlormethan (60 mL) gelöst, 1 M BBr₃ (CH₂Cl₂) (54 mL, 54 mmol, 3 Äq.) bei RT zugegeben und die Mischung anschließend 24 h bei RT gerührt. Die Kontrolle des Reaktionsfortschrittes erfolgte mittels GC-MS. Die Reaktion wurde durch vorsichtige (Gasentwicklung !) Zugabe von Wasser (2 mL)

beendet, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Unter Rühren wurde Wasser (60 mL) bis zur Auflösung des Feststoffs zugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (2 × 125 mL) extrahiert, die organischen Extrakte mit NaCl (aq) (1 × 125 mL) gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet, und das Lösungsmittel entfernt. Nach Säulenchromatographie (Cyclohexan / Ethylacetat 70:30, 100 g Kieselgel) wurde das Resorcin **153** (2.15 g, 14.7 mmol, 80 %) als farbloser Feststoff erhalten.

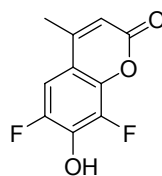
Ausbeute: Farbloser Feststoff, 2.15 g, 14.7 mmol, 80 %.

R_f-Wert: 0.28 (Cyclohexan / Ethylacetat 7:3).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.53 (ddd, 1 ArH, *J* = 2.4, 9.2, 10.4 Hz), 6.21 (td, 1 ArH, *J* = 4.9, 9.1 Hz).

Die spektroskopischen Daten (¹H-NMR) stimmten mit der Literatur überein.^{139, 159}

6.7.5 6,8-Difluor-7-hydroxy-4-methylcumarin (**154**):



154

2,4-Difluorresorcin (**153**, 1.95 g, 13 mmol) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt, Acetessigsäureethylester (1.73 g, 13 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und anschließend auf 0 °C gekühlt. Nun wurde Methylsulfonsäure (21.6 mL, 25 Äq.) tropfenweise zugegeben und die Mischung 20 min bei 0 °C gerührt. Nach 28 h Rühren bei RT (DC-Kontrolle Cyclohexan / Ethylacetat, 1:1) wurde auf 0 °C gekühlt, Wasser (25 mL) zur Reaktionslösung gegeben, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen (3 × 20 mL). Der gewaschene Rückstand wurde in 1 M NaOH (60 mL) gelöst, die Lösung über einen Glasfilter filtriert und auf 0 °C gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurde durch Zugabe von konz. Schwefelsäure auf pH = 1 angesäuert. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit Eiswasser

(3 × 20 mL) gewaschen und getrocknet. Das Coumarin **154** (2.19 g, 10.3 mmol, 77 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

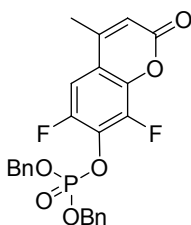
Ausbeute: Farbloser Feststoff, 2.19 g, 10.3 mmol, 77 %.

R_f-Wert: 0.17 (fluoresziert) (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 7.47 (dd, 1 ArH, *J* = 2.2, 11.4 Hz), 6.30 (s, 1 ArH), 2.36 (d, 3 H, *J* = 1.2 Hz).

Die spektroskopischen Daten (¹H-NMR) stimmten mit der Literatur überein.^{139, 159}

6.7.6 6,8-Difluor-4-methylumbelliferyldibenzylphosphat (**155**):



155

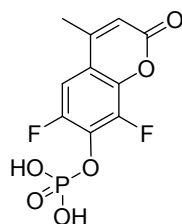
6,8-Difluor-7-hydroxy-4-methylcoumarin **154** (200 mg, 0.94 mmol) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon vorgelegt und in abs. Acetonitril (6 mL) suspendiert. Nun wurden Tetrachlormethan (0.46 mL, 4.71 mmol, 5.0 Äq.), DIPEA (0.34 mL, 1.98 mmol, 2.1 Äq.) und 4-Dimethylaminopyridin (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.1 Äq.) zugegeben und anschließend mittels Eiskochsalzmischung auf -15 °C gekühlt (Kontaktthermometer in der Reaktionslösung). Die Zugabe des Dibenzylphosphit (300 µL, 1.37 mmol, 1.45 Äq.) erfolgte tropfenweise (Temperatur durchgehend = -11 °C). Die Mischung wurde unter langsamen Erwärmen auf -5 °C für 2 h gerührt, (DC-Kontrolle Cyclohexan:Ethylacetat 1:1 und 2:1) und dann 0.5 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (aq) (2 mL) zugegeben. Nach dem Erwärmen auf RT wurde die Mischung mit Ethylacetat extrahiert (3 × 10 mL), die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (10 mL) und NaCl (aq) (10 mL) gewaschen, anschließend mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i.V. entfernt. Säulenchromatographie (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1, 25 g Kieselgel) ergab den Phosphorsäuretriester **155** (381 mg, 0.8 mmol, 86 %) als farblosen Feststoff.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 381 mg, 0.8 mmol, 86 %.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 7.69 (dd, 1 ArH, *J* = 2.0, 10.7 Hz), 7.42-7.35 (m, 10 ArH), 6.53 (s, 1 ArH), 5.25 (d, 4 H, CH₂, *J* = 8.4 Hz), 2.40 (d, 3 H, *J* = 1.2 Hz).

Die spektroskopischen Daten (¹H-NMR) stimmten mit der Literatur überein.¹⁴⁰

6.7.7 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat (**148**):



148

6,8-Difluor-4-methylumbelliferyldibenzylphosphat **155** (351 mg, 0.74 mmol) wurde in Ethanol:Toluol (9 mL, 2:1) gelöst. Die Reaktionslösung wurde 5 min mit Argon gespült, Palladium (5 Gew.-%) auf Aktivkohle (35 mg, 10 Gew.-%) zugegeben und anschließend erneut für 5 min mit Argon gespült. Der Kolben wurde mit Wasserstoff befüllt (1 bar) und die Mischung für 4 h (DC-Kontrolle Cyclohexan / Ethylacetat, 1:1) bei RT gerührt. Die Mischung wurde über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und so Phosphorsäureester **148** (217 mg, 0.7 mmol, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: Farbloser Feststoff, 217 mg, 0.7 mmol, quant.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 7.67 (dd, 1 ArH, *J* = 2.0, 10.7 Hz), 7.39-7.32 (m, 10 ArH), 6.51 (s, 1 ArH), 5.23 (d, 4 H, CH₂, *J* = 8.4 Hz), 2.38 (d, 3 H, *J* = 1.2 Hz).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.52-7.37 (m, 1 ArH), 6.38 (s, 1 ArH), 2.41 (s, 3 H).

Die spektroskopischen Daten (¹H-NMR) stimmten mit der Literatur überein.¹³⁸

6.8 Versuche zu Kapitel 4.2

6.8.1 Bestimmung der Inhibierung der Aktivität von MptpB über Absorptionsmessung

In einer Mikrotiterplatte wurden Inhibitorlösungen (20 μ L, Endkonzentrationen 100 / 80 / 60 / 50 / 40 / 30 / 20 / 10 / 5 / 2.5 und 1.25 μ M, Puffer: 25 mM HEPES / 50 mM NaCl / Na₂*EDTA 2.5 mM / NP-40 0.025 % / DTE 2 nM / 1 % DMSO, pH 7.2) vorgelegt und 15 min mit MptpB (20 μ L, Endkonzentration 50 nM, Puffer: 25 mM HEPES / 50 mM NaCl / Na₂*EDTA 2.5 mM / NP-40 0.025 % / DTE 2 nM, pH 7.2) bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Substrats pNPP (60 μ L, Endkonzentration 1 mM, Puffer: 25 mM HEPES / 50 mM NaCl / Na₂*EDTA 2.5 mM / NP-40 0.025 % / DTE 2 nM, pH 7.2,) wurde bei 37 °C über 30 min alle 60 s die Absorption bei 405 nm detektiert. Als Kontrollen wurden parallel die Absorptionsänderung bei einer Reaktion ohne Enzym (Hintergrund) und einer Reaktion ohne Inhibitor (Positivkontrolle) vermessen. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse des MptpB Absorbenzassay sind in Kapitel 4.2.1 angegeben.

6.8.2 Bestimmung der Inhibierung der Aktivität von MptpB über Fluoreszenzmessung

In einer Mikrotiterplatte wurden Inhibitorlösungen (60 μ L, Endkonzentrationen 100 / 80 / 60 / 50 / 40 / 30 / 20 / 10 / 5 / 2.5 und 1.25 μ M, Puffer: 25 mM HEPES / 50 mM NaCl / Na₂*EDTA 2.5 mM / NP-40 0.025 % / DTE 2 nM / 1 % DMSO, pH 7.2) und Substrat DiFUMP (20 μ L, Endkonzentration 125 μ M, Puffer: 25 mM HEPES / 50 mM NaCl / Na₂*EDTA 2.5 mM / NP-40 0.025 % / DTE 2 nM, pH 7.2) vorgelegt. Nach der Zugabe von MptpB (20 μ L, Endkonzentration 1.3 nM, Puffer: 25 mM HEPES / 50 mM NaCl / Na₂*EDTA 2.5 mM / NP-40 0.025 % / DTE 2 nM, pH 7.2) wurde bei 37 °C über 30 min alle 60 s die Fluoreszenz bei 455 nm detektiert (Anregung bei 358 nm). Als Kontrollen wurden parallel die Absorptionsänderung bei einer Reaktion ohne Enzym (Hintergrund) und einer Reaktion ohne Inhibitor (Positivkontrolle) vermessen. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse des MptpB Fluoreszenzassay sind in Kapitel 4.2.1 angegeben.

6.8.3 Bestimmung der Inhibition der Aktivität von CPDA über Absorptionsmessung

In einer Mikrotiterplatte wurden zehn Inhibitorlösungen (25 μL , Endkonzentrationen 100-0.2 μM , 10-0.02 μM oder 100-0.2 nM, Puffer: 1.0 M Tris-HCl / 0.5 M NaCl / 0.025 % NP-40 / 1 % DMSO, pH 7.5) vorgelegt und 15 min mit CPDA (65 μL , Endkonzentration 7 nM, Puffer: 1.0 M Tris-HCl / 0.5 M NaCl / 0.025 % NP-40 / pH 7.5) und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Substrats AAF-Phe-OH (10 μL , Endkonzentration 150 μM , Puffer: 1.0 M Tris-HCl / 0.5 M NaCl / 0.025 % NP-40 / pH 7.5) wurde bei 37 °C über 30 min alle 75 s die Absorption bei 350 nm detektiert. Als Kontrollen wurden parallel die Absorptionsänderung bei einer Reaktion ohne Enzym (Hintergrund) und einer Reaktion ohne Inhibitor (Positivkontrolle) vermessen. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse des CPDA Absorbenzassay sind in Kapitel 4.2.2 angegeben.

6.8.4 Bestimmung der Inhibition der Aktivität von CPDB über Absorptionsmessung

Der Carboxypeptidase B Assay wurde analog zum CPDA Assay (Kapitel 6.8.3) durchgeführt. Die Ergebnisse des CPDB Absorbenzassay sind in Kapitel 4.2.2 angegeben.

6.8.5 Bestimmung von K_M und K_{cat}

Zur Bestimmung der Enzymkonstanten K_M und K_{cat} wurden Enzymreaktionen bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt (pNPP: 40 – 0.625 mM, DiFUMP: 400 – 6.25 μM , AAF-Phe-OH: 350 – 25 μM und AAF-Arg-OH: 350 – 25 μM). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der jeweiligen Enzyme gestartet und bei 37 °C über 30 min die Absorptions- bzw. Fluoreszenzänderung detektiert. Als Kontrolle wurde parallel die Reaktion ohne Enzym (Hintergrund) vermessen. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Durch Auftragung der Absorption bzw. Fluoreszenz gegen die Substratkonzentration wurden mit Hilfe einer Regressionskurve (Michaelis-Menten Fit, Programm XL Fit), die Lineweaver-Burk und durch die Hanes-Auftragung folgende Werte für K_M und K_{cat} bestimmt:

MptpB mit pNPP: K_M 2.3 (± 0.3) mM und K_{cat} 5 s⁻¹ ($K_{cat}/K_M = 2300$ s⁻¹ M⁻¹).

MptpB mit DiFUMP: K_M 38 (± 2) mM und K_{cat} 70 s⁻¹ ($K_{cat}/K_M = 41000$ s⁻¹ M⁻¹).

CPDA mit AAF-Phe-OH: K_M 272 (± 49) μ M und K_{cat} 5 s⁻¹ ($K_{cat}/K_M = 18000$ s⁻¹ M⁻¹).

CPDB mit AAF-Arg-OH: K_M 203 (± 20) μ M und K_{cat} 5 s⁻¹ ($K_{cat}/K_M = 24000$ s⁻¹ M⁻¹).

6.8.6 Bestimmung der IC₅₀ Werte

Die Durchführung der Experimente erfolgte analog zu Kapitel 6.8.3. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt, als Kontrollen wurden parallel die Absorptionsänderung bei einer Reaktion ohne Enzym (Hintergrund) und einer Reaktion ohne Inhibitor (Positivkontrolle) vermessen. Durch Auftragung der normierten Reaktionsgeschwindigkeiten (Positivkontrolle entspricht 100 %) gegen die logarithmische Inhibitorkonzentration konnten mit einer sigmoiden Regressionskurve (Boltzmann Fit, Programm XL Fit), die IC₅₀-Werte ermittelt werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Dreifachbestimmung des IC ₅₀ für Verbindung 1											
C												
D												
E	Dreifachbestimmung des IC ₅₀ für Verbindung 2											
F												
G	Verdünnungsreihe Verbindung 1											
H	Verdünnungsreihe Verbindung 2											

Abbildung 86 Standardisierte Plattenbelegung für die Bestimmung der IC₅₀-Werte.

6.8.7 WST1-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität von Verbindungen

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden mit Unterstützung von Dipl.-Biol. Karin Warburg durchgeführt. HeLa Zellen (Henrietta Lacks, humanes Cervixkarzinom) wurden in 75 cm² Kulturflaschen in DMEM mit 5 % essentiellen Aminosäuren, 5 % L-Glutamin, 0.5 % Penicillin/Streptomycin, 10 % fötalem Kälberserum bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Untersuchung der Zytotoxizität von Verbindungen wurden in

den Vertiefungen einer 96-Loch-Platte je 1×10^4 Hela Zellen in 100 μL Medium ausgesät. Auf jeder Platte wurden in vier Vertiefungen 100 μL Medium ohne Zellen pipettiert und die Platte anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurden die Verbindungen **18**, **126 - 128** und **99**, **129 - 131** (100 μM) und einmal nur DMSO zu den Zellen gegeben und für weitere 18 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde in jede Vertiefung 10 μL WST-1 Reagenz (siehe Kapitel 4.2.5, Abbildung 74) pipettiert und vorsichtig durchmischt. Die Zellen wurden für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Die gemittelten Werte aus den Vertiefungen ohne Zellen wurden von den übrigen Werten der jeweiligen Vertiefung subtrahiert und die Ergebnisse auf die Werte ohne Inhibitor (DMSO) normiert.

6.8.8 Antibakterielle Assays

Die Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biochem. Bernhard Ellinger durchgeführt. Die antibakterielle Wirkung wurde mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode nach der DIN-Norm 58940 bestimmt. Die verwendeten Bakterienstämme waren *Staphylococcus aureus* (DSM Nr.: 1104 und DSM Nr.: 2569). Ein Müller/Hinton Medium (Fleischinfus 2.0 mg / mL, Caseinhydrolysat 17.5 mg / mL, Stärke 1.5 mg / mL) mit 2 % NaCl wurde hierzu mit fünf unabhängigen Kolonien der zu testenden Bakterien beimpft. Die Bakterien wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf 1×10^6 bis 5×10^6 Kolonie bildende Einheiten pro mL verdünnt und für die Testung genutzt (DIN 58940-81). Die Testung wurde in 96-Loch-Platten mit zwei Antibiotika (Tetracyclin 1 mg / L; Ampicillin 0,26 mg / L) als Kontrollen durchgeführt. Die Inhibitorkonzentrationen wurden so gewählt, dass die geringste getestete Konzentration wenigstens 2 Verdünnungsstufen über der minimalen inhibitorischen Konzentration lag. Die Bakterien wurden 24 h mit System Duetz Abdeckungen (System Duetz, Niederlande) bei 37 °C mit 180 Umdrehungen pro Minute in einem linearen Schüttler kultiviert. Das Wachstum der Bakterien wurde anschließend über die Absorption bei 543 nm oder 575 nm bestimmt. Zur Kontrolle wurde das Wachstum der Bakterien ohne Inhibitor verfolgt. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt.

6.9 Versuche zu Kapitel 4.3

6.9.1 Berechnung von Konformationen der Makrozyklen

Die folgenden Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Steffen Renner durchgeführt. Alle Rechnungen wurden mit dem Programm MacroModel 9.1 von Schrödinger Software durchgeführt. Die Auswertungen erfolgten über das integrierte, graphische Interface Maestro 7.5 und soweit nicht anders angegeben, wurden Standardparameter benutzt. Die Molekülstrukturen wurden aus ChemDraw-Dateien (CambridgeSoft) in Maestro importiert und nach einer kurzen Energieminimierung hinsichtlich ihrer Atombindungen und Stereochemie überprüft. Die Energieminimierungen wurden im MMFF Kraftfeld¹⁵³ mit implementiertem GB/SA-(Generalized Born Surface Area)-Solvatisierungsmodell¹⁵² durchgeführt. Von den Makrozyklen **18** und **99** wurden durch Verwendung des LMOD (low mode)-Verfahrens je 35.000 Startkonformationen generiert.¹⁵⁵ Zur Identifizierung neuer, noch nicht bereits gefundener Konformationen wurde dabei der RMSD (root mean square deviation) Wert der Nicht-Wasserstoff Atome des Makrozyklus und des ersten Seitenkettenatoms herangezogen, wobei ein Schwellenwert von $\geq 0.25 \text{ \AA}$ eingesetzt wurde. Alle Konformationen mit konformationeller Energie weniger als 50 kJ mol^{-1} über dem globalen Minimum wurden behalten. Weitere Energieminimierung erfolgte unter Verwendung der TNCG (truncated Newton conjugated gradient) Methode,¹⁵⁴ mit dem Konvergenzkriterium eines minimalen Gradienten von $0.05 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, welcher nach maximal 10.000 Iterationen erreicht war. Durch die Änderung des sogenannten „line search“ Parameters, der die Richtung der Minimierungsschritte zum lokalen Minimum bestimmt, vom Standardwert 0 auf 1, wurde statt des im TNCG-Algorithmus festgelegten Verfahrens das MacroModel Standardverfahren verwendet und dadurch vorangegangene Konvergenzprobleme vollständig behoben.

6.9.2 Dockingstudie

Die so erhaltenen Konformationen wurden mit GOLD¹⁶⁰ 4.0 unter Verwendung der Chemscore Bewertungsfunktion in das aktive Zentrum der CPDA (PDB-Eintrag: 7CPA) eingepasst. Als Bindungsstelle wurde ein Bereich im Umkreis von 20 \AA um das Kohlenstoffatom der Carbonylfunktion des Zink-koordinierenden Glu72 festgelegt. Für den genetischen Algorithmus wurde die automatische Parameterwahl

verwendet, mit einem Autoskalierungsfaktor für die Genauigkeit der Berechnung von 1 (100 % Genauigkeit). Für jede der zuvor berechneten Konformationen des Makrozyklus wurden zehn Docking-Lösungen erzeugt. Aus der Menge der vorhergesagten Bindungsmodi der Liganden in der Bindungstasche wurden diejenigen mit günstigen Enzym-Ligand-Wechselwirkungen (nach der Chemscore Bewertung), als auch einer Konformationsenergie von maximal 10 kJ mol^{-1} über dem globalen Minimum (nach MMFF aus MacroModel), ausgewählt.

Bei ChemScore handelt es sich um eine Funktion, welche die Bindungsenergie eines Protein-Ligand Komplexes abschätzt. Diese Energie setzt sich zusammen aus den Anteilen für Wasserstoffbrücken, Metallkomplexbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen sowie der Rotationsenergie des Moleküls. Von diesem Wert werden Beiträge für ungünstige sterische Wechselwirkungen sowie interne sterische Hinderung abgezogen. Der resultierende Wert entspricht dem ChemScore und dient zur qualitativ-vergleichenden Bewertung verschiedener Dockinglösungen. Die in ChemScore verwendeten Parameter wurde empirisch aus den gemessenen Affinitätsdaten von 82 Protein-Ligand ermittelt.^{161, 162} ChemScore gehört zu den am häufigsten implementierten und meistgenutzten Scoringfunktionen, die verfügbar sind.¹⁶³

Um einen Vergleich zwischen dem Naturstoff **18** und der Verbindung **99**, mit L-Lysin, zu ermöglichen wurde für **99** eine Koordination des C-Terminus an Asn144 und Arg145 sowie des Harnstoff-carbonyls an das Zink Atom vorgegeben.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden, Periodensterbetafeln für Deutschland 1871/81 - 2005/07, <http://www-ec.destatis.de/>, **2008**.
- [2] Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden, Todesursachen in Deutschland 2007, <http://www-ec.destatis.de/>. **2008**.
- [3] R. Frechette, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2007**, *42*, 349-364.
- [4] H. O. Alpar, M. J. Groves, *Pharm. Biotechnol.* **2006**, 307-332.
- [5] D. M. Livermore, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**, *29*, 1-7.
- [6] B. A. Chabner, T. G. Roberts, *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 65-72.
- [7] T. Finkel, M. Serrano, M. A. Blasco, *Nature* **2007**, *448*, 767-774.
- [8] K. E. Neet, G. Thinakaran, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29613-29614.
- [9] M. A. Mena, J. A. Rodriguez-Navarro, R. Ros, J. G. de Yebenes, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2305-2320.
- [10] C. D. Wells, J. P. Cegielski, L. J. Nelson, K. F. Laserson, T. H. Holtz, A. Finlay, K. G. Castro, K. Weyer, *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 86-107.
- [11] L. Hufnagel, D. Brockmann, T. Geisel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 15124-15129.
- [12] T. Ikemoto, *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 963-969.
- [13] R. W. Snow, C. A. Guerra, A. M. Noor, H. Y. Myint, S. I. Hay, *Nature* **2005**, *434*, 214-217.
- [14] J.-Y. Ortholand, A. Ganesan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 271-280.
- [15] J. P. Kennedy, L. Williams, T. M. Bridges, R. N. Daniels, D. Weaver, C. W. Lindsley, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 345-354.
- [16] W. H. B. Sauer, M. K. Schwarz, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 987-1003.
- [17] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2878-2890.
- [18] M. A. Koch, H. Waldmann, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 471-483.
- [19] M. Feher, J. M. Schmidt, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218-227.
- [20] K. Grabowski, G. Schneider, *Curr. Chem. Biol.* **2007**, *1*, 115-127.
- [21] U. Galm, B. Shen, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1098-1104.
- [22] A. L. Harvey, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 894-901.
- [23] S. Grabley, R. Thiericke, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1999**, *64*, 101-154.

- [24] M. Kaiser, S. Wetzel, K. Kumar, H. Waldmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1186-1201.
- [25] B. R. Stockwell, *Nature* **2004**, *432*, 846-854.
- [26] B. S. Sekhon, *Curr. Chem. Biol.* **2008**, *2*, 278-311.
- [27] R. M. Van Wagoner, A. K. Drummond, J. L. C. Wright, *Adv. Appl. Microbiol.* **2007**, *61*, 89-217.
- [28] N. A. Campbell, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2003**.
- [29] N. G. Carr, *Botanical Monographs* **1973**, *9*, 39-65.
- [30] D. A. Bryant, *The molecular biology of cyanobacteria*, Kluwer, Dordrecht (Neth.), **1994**.
- [31] W. C. Dunlap, C. N. Battershill, C. H. Liptrot, R. E. Cobb, D. G. Bourne, M. Jaspars, P. F. Long, D. J. Newman, *Methods* **2007**, *42*, 358-376.
- [32] K. Gademann, C. Portmann, *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 326-341.
- [33] A. Bubik, B. Sedmak, M. Novinec, B. Lenarcic, T. T. Lah, *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 1339-1346.
- [34] L. T. Tan, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 954-979.
- [35] M. Welker, H. von Doehren, *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 530-563.
- [36] M. Guyot, J. C. Dore, J. Devillers, *SAR QSAR Environ. Res.* **2004**, *15*, 101-114.
- [37] Y. Hamada, T. Shioiri, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4441-4482.
- [38] W. A. Catterall, *Neuron* **2000**, *26*, 13-25.
- [39] F. H. Yu, V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman, W. A. Catterall, *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 387-395.
- [40] D. J. Edwards, B. L. Marquez, L. M. Nogle, K. McPhail, D. E. Goeger, M. A. Roberts, W. H. Gerwick, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 817-833.
- [41] W. I. Li, F. W. Berman, T. Okino, F. Yokokawa, T. Shioiri, W. H. Gerwick, T. F. Murray, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 7599-7604.
- [42] F. Yokokawa, T. Shioiri, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8638-8639.
F. Yokokawa, H. Fujiwara, T. Shioiri, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1759-1775.
F. Yokokawa, H. Fujiwara, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1915-1916.
- [43] W. W. Carmichael, D. F. Biggs, M. A. Peterson, *Toxicon* **1979**, *17*, 229-236.
- [44] J. Osswald, S. Rellan, A. Gago, V. Vasconcelos, *Environment International* **2007**, *33*, 1070-1089.
- [45] W. W. Carmichael, *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *72*, 445-459.

- [46] M. E. van Apeldoorn, H. P. van Egmond, G. J. A. Speijers, G. J. I. Bakker, *Molecular Nutrition & Food Research* **2007**, *51*, 7-60.
- [47] M. A. Jordan, L. Wilson, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 123-130.
- [48] J. Watanabe, M. Minami, M. Kobayashi, *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 1973-1982.
- [49] L. Hagmann, F. Juettner, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6539-6542.
- [50] J. B. Neilands, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 715-731.
- [51] A. M. Gehring, I. Mori, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2648-2659.
- [52] A. V. Humble, G. M. Gadd, G. A. Codd, *Water Res.* **1997**, *31*, 1679-1686.
- [53] K. Harada, K. Fujii, T. Shimada, M. Suzuki, H. Sano, K. Adachi, W. W. Carmichael, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1511-1514.
- [54] K. Fujii, K. Sivonen, K. Adachi, K. Noguchi, H. Sano, K. Hirayama, M. Suzuki, K.-I. Harada, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5525-5528.
- [55] D. E. Williams, M. Craig, C. F. B. Holmes, R. J. Andersen, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 570-575.
- [56] S. Matthew, C. Ross, V. J. Paul, H. Luesch, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4081-4089.
- [57] O. Grach-Pogrebinsky, S. Carmeli, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10233-10238.
- [58] S. J. Robinson, K. Tenney, D. F. Yee, L. Martinez, J. E. Media, F. A. Valeriote, R. W. M. Van Soest, P. Crews, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1002-1009.
- [59] E. W. Schmidt, M. K. Harper, D. J. Faulkner, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 779-782.
D. Beresovsky, O. Hadas, A. Livne, A. Sukenik, A. Kaplan, S. Carmeli, *Isr. J. Chem.* **2006**, *46*, 79-87.
- [60] V. Reshef, S. Carmeli, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1187-1189.
- [61] M. Murakami, S. Suzuki, Y. Itou, S. Kodani, K. Ishida, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1280-1282.
- [62] H. Uemoto, Y. Yahiro, H. Shigemori, M. Tsuda, T. Takao, Y. Shimonishi, J. i. Kobayashi, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6719-6724.
- [63] H. J. Shin, H. Matsuda, M. Murakami, K. Yamaguchi, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 139-141.
- [64] Y. Itou, S. Suzuki, K. Ishida, M. Murakami, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1243-1246.
- [65] E. W. Schmidt, M. K. Harper, D. J. Faulkner, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 779-782.
- [66] J. Kobayashi, M. Ishibashi, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1753-1769.
- [67] T. Sano, K. Kaya, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5933-5936.
- [68] I. R. Marsh, M. Bradley, S. J. Teague, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6199-6203.

- [69] J. S. Davies, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471-501.
- [70] J. Kobayashi, M. Sato, T. Murayama, M. Ishibashi, M. R. Walchi, M. Kanai, J. Shoji, Y. Ohizumi, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1991**, 1050-1052.
- [71] P. Bjoerquist, M. Buchanan, M. Campitelli, A. Carroll, E. Hyde, J. Neve, M. Polla, R. Quinn, (Astrazeneca AB, Swed.). WO, **2005**, 73.
- [72] E. Dittmann, B. A. Neilan, T. Borner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 467-473.
- [73] D. Mueller, A. Krick, S. Kehraus, C. Mehner, M. Hart, F. C. Kuepper, K. Saxena, H. Prinz, H. Schwalbe, P. Janning, H. Waldmann, G. M. Koenig, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4871-4878.
- [74] D. Müller, Dissertation, Universität Bonn, **2005**.
- [75] T. K. Littlejohn, O. Takikawa, R. J. W. Truscott, M. J. Walker, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29525-29531.
- [76] S. Ren, H. Liu, E. Licad, M. A. Correia, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 96-102.
- [77] T. Sano, T. Usui, K. Ueda, H. Osada, K. Kaya, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1052-1055.
- [78] S. M. Dirk Brohm, Ajay Bhargava, Oliver Müller, Folker Lieb, Herbert Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 319-323.
- [79] I. Pallares, R. Bonet, R. Garcia-Castellanos, S. Ventura, F. X. Aviles, J. Vendrell, F. X. Gomis-Rueth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 3978-3983.
- [80] U. Schmidt, S. Weinbrenner, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1336-1338.
- [81] U. Schmidt, A. Lieberknecht, H. Griesser, J. Talbiersky, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3261-3264.
- [82] W. N. Lipscomb, N. Straeter, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2375-2433.
- [83] J. Vendrell, E. Querol, F. X. Aviles, *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1477*, 284-298.
- [84] A. Guasch, M. Coll, F. X. Aviles, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 141-157.
- [85] D. W. Christianson, W. N. Lipscomb, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 62-69.
- [86] B. N. Bouma, J. C. M. Meijers, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2003**, *1*, 1566-1574.

- [87] K. S. Kumar, J. B. Clegg, K. A. Walsh, *Biochemistry* **1964**, *3*, 1728-1732.
- [88] D. H. Kim, *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1217-1226.
- [89] A. Kilshtain-Vardi, M. Glick, H. M. Greenblatt, A. Goldblum, G. Shoham, *Acta Crystallogr.* **2003**, *D59*, 323-333.
- [90] K. M. K. Swamy, M.-J. Lin, C.-M. Sun, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 621-631.
- [91] M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown, A. J. H. Gearing, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2735-2776.
- [92] L. M. Coussens, B. Fingleton, L. M. Matrisian, *Science* **2002**, *295*, 2387-2392.
- [93] G. Murphy, *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 929-941.
- [94] R. F. Franco, M. G. Fagundes, J. C. M. Meuers, P. H. Reitsma, D. Lourenco, V. Morelli, F. H. Maffei, I. C. Ferrari, C. E. Piccinato, W. A. Silva, Jr., M. A. Zago, *Haematologica* **2001**, *86*, 510-517.
- [95] S. Eichinger, V. Schoenauer, A. Weltermann, E. Minar, C. Bialonczyk, M. Hirschi, B. Schneider, P. Quehenberger, P. A. Kyrle, *Blood* **2004**, *103*, 3773-3776.
- [96] A. L. Osterman, N. V. Grishin, S. V. Smulevich, M. V. Mats, O. P. Zagnitko, L. P. Revina, V. M. Stepanov, *J. Protein Chem.* **1992**, *11*, 561-570.
- [97] D. C. Rees, M. Lewis, W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **1983**, *168*, 367-387.
- [98] J. T. Bukrinsky, M. J. Bjerrum, A. Kadziola, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16555-16564.
- D. Hilvert, S. J. Gardell, W. J. Rutter, E. T. Kaiser, *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 5298-5304.
- [99] D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 98-105.
- [100] J. Vendrell, F. X. Aviles, L. D. Fricker, in *Handbook of Metalloproteins, Vol. 3*, **2004**, 176-189.
- [101] D. Reverter, C. Fernandez-Catalan, R. Baumgartner, R. Pfander, R. Huber, W. Bode, J. Vendrell, T. A. Holak, F. X. Aviles, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 322-328.
- [102] B. J. Mans, A. W. H. Neitz, *Insect Biochem.* **2004**, *34*, 1-17.
- J. L. Arolas, G. M. Popowicz, J. Lorenzo, C. P. Sommerhoff, R. Huber, F. X. Aviles, T. A. Holak, *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 489-498.
- [103] C. M. Waters, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 319-346.
- [104] B. Sedmak, S. Carmeli, T. Elersek, *Microb. Ecol.* **2008**, *56*, 201-209.

- [105] G. B. G. Moorhead, L. Trinkle-Mulcahy, A. Ulke-Lemee, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 234-244.
- [106] P. Cohen, *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1*, 309-315.
- [107] D. Barford, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 407-412.
- [108] L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3814-3839.
- [109] J. M. Denu, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5910-5914.
- [110] A. McCluskey, S. P. Ackland, E. Gardiner, C. C. Walkom, J. A. Sakoff, *Anticancer. Drug Des.* **2001**, *16*, 291-303.
- [111] C. Grundner, H.-L. Ng, T. Alber, *Structure* **2005**, *13*, 1625-1634.
- [112] Z. Y. Zhang, Y. Wang, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 1624-1627.
- [113] N. Beresford, S. Patel, J. Armstrong, B. Szoor, A. P. Fordham-Skelton, L. Taberner, *Biochem. J.* **2007**, *406*, 13-18.
- [114] R. Singh, V. Rao, H. Shakila, R. Gupta, A. Khera, N. Dhar, A. Singh, A. Koul, Y. Singh, M. Naseema, P. R. Narayanan, C. N. Paramasivan, V. D. Ramanathan, A. K. Tyagi, *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 751-762.
- [115] J. C. Sacchettini, E. J. Rubin, J. S. Freundlich, *Nature reviews. Microbiology* **2008**, *6*, 41-52.
- [116] F. L. Lado Lado, R. Garcia Ramos, *New Topics in Tuberculosis Research* **2007**, 173-192.
- [117] P. Li, P. P. Roller, J. Xu, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 411-440.]
- [118] P. Wipf, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115-2134.
- [119] J. Blankenstein, J. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1949-1964.
- [120] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.
- [121] P. J. Kocienski, *Protecting groups*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [122] M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056-2083.
- [123] A. Boeijen, R. M. J. Liskamp, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2127-2135.
- [124] J. A. W. Kruijtzter, D. J. Lefeber, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5335-5338.
- [125] F. Z. Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley, Weinheim, **2002**.
- [126] <http://www.irori.com/>.
- [127] R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951-8954.

- [128] <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/stockroom-reagents/learning-center/technical-library/particle-size-conversion.html>.
- [129] H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 49-50.
- [130] *Novabiochem Catalog*, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, **2006**.
- [131] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [132] T. Christensen, *Acta Chem. Scand.* **1979**, *B33*, 763-766.
- [133] D. R. Coulson, *Inorg. Synth.* **1990**, *28*, 107-109.
- [134] M. Honda, H. Morita, I. Nagakura, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8932-8936.
- [135] M. Malesevic, U. Strijowski, D. Bachle, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73-77.
- [136] H. Waldmann, Y.-P. He, H. Tan, L. Arve, H.-D. Arndt, *Chem. Commun.* **2008**, 5562-5564.
- [137] G. R. Marshall, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3547-3558.
- [138] K. R. Gee, W.-C. Sun, M. K. Bhalgat, R. H. Upson, D. H. Klaubert, K. A. Latham, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 41-48.
- [139] W.-C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert, R. P. Haugland, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.
- [140] L. J. Silverberg, J. L. Dillon, P. Vemishetti, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 771-774.
- [141] D. F. McCain, Z.-Y. Zhang, *Methods Enzymol.* **2001**, *345*, 507-518.
- [142] J. Montalibet, K. I. Skorey, B. P. Kennedy, *Methods* **2005**, *35*, 2-8.
- [143] J. Phan, J. E. Tropea, D. S. Waugh, *Acta Crystallogr.* **2007**, *D63*, 698-704.
- [144] R. G. Woodbury, M. T. Everitt, H. Neurath, *Methods Enzymol.* **1981**, *80*, 588-609.
- [145] R. J. P. Cannell, S. J. Kellam, A. M. Owsianka, J. M. Walker, *Planta Med.* **1988**, *54*, 10-14.
- [146] W. L. Mock, Y. Liu, D. J. Stanford, *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 218-222.
- [147] D. C. Rees, W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **1982**, *160*, 475-498.
- [148] Y.-C. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [149] R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley, New York, **2000**.
- [150] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- [151] H. Kim, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8171-8180.

-
- [152] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.
- [153] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.
- [154] J. W. Ponder, F. M. Richards, *J. Comput. Chem.* **1987**, *8*, 1016-1024.
- [155] F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.
- [156] N. Abramowitz, I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *29*, 862-867.
- [157] W. L. F. Armarego, C. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals, 5th Edition*, **2003**.
- [158] W. C. Chan, P. D. White, Editors, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [159] W.-C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107-3110.
- [160] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748.
- [161] M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini, R. P. Mee, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-445.
- [162] C. A. Baxter, C. W. Murray, D. E. Clark, D. R. Westhead, M. D. Eldridge, *Proteins* **1998**, *33*, 367-382.
- [163] G. L. Warren, C. W. Andrews, A.-M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M. H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S. F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I. D. Wall, J. M. Woolven, C. E. Peishoff, M. S. Head, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5912-5931.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abs. absolut

$[\alpha]_D^{20}$ Optische Rotation bei 20 °C und 589 nm

AAF-Arg-OH $N\alpha(4\text{-Methoxyphenylazoformyl})\text{-}\gamma\text{-phenylarginin}$

AAF-Phe-OH $N\alpha(4\text{-Methoxyphenylazoformyl})\text{-}\gamma\text{-phenylalanin}$

ADAMS „a disintegrin and metalloproteinase“

All allyl

Å Angström = 10^{-10} m

aq wässrig

AS Aminosäure

BVA Brunsvicamid

Cbz Benzylcarbamat

CPD Carboxypeptidase

CPDA Carboxypeptidase A

CPDB Carboxypeptidase B

CSM Cyanobakterieller Sekundärmetabolit

DC Dünnschichtchromatographie

DIC N,N' -Diisopropylcarbodiimid

DiFUMP Difluorumbelliferylphosphat

DIPEA Diisopropylethylamin

DMF N,N' -Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

DSP dualspezifische Phosphatasen

EC EC Nummer „Enzyme Commission number“

ESI Elektronen-Spray-Ionisation

FDLA 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucinamid

Fmoc Fluorenylmethoxycarbonyl

g Gramm

GB/SA „generalized Born equation, solvation solvent-accessible surface area“

HATU 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HMBC „Heteronuclear Multiple Bond Coherence“

HOAt 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol

HOBt N -Hydroxybenzotriazol

HPLC „High Performance Liquid Chromatography“

Hz Hertz = s^{-1}

HIV Humanes Immundefizienz-Virus

HR-MS (FAB) hochaufgelöste Massenspektrometrie „High Resolution-Mass Spectrometry (Fast Atom Bombardment)“

SG Schutzgruppe

IC₅₀ Inhibitor Konzentration bei der die Reaktionsrate des Enzyms auf 50 % sinkt

K_{cat} Umsatzzahl des Enzymsubstrat Komplexes „turnover number“

K_M Michaelis Menten Konstante

L Liter

LCI „Leech carboxypeptidase inhibitor“

LMOD „low mode conformational search method“

m Meter oder milli = 10^{-3}

M molar mol/L

min Minute(n)

MMFF „Merck Molecular Force Field“

MMPs Matrixmetalloproteasen

MptpB *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase B

mRNA messenger RNA

MS Massenspektrometrie

N normal

NaV-Kanäle spannungsgesteuerte Natriumkanäle

NFK *N*'-Formyl-kynurenin

NMR Nuclear Magnet Resonanz (Spektroskopie)

NOE „Nuclear Overhauser Effect“

NP 40 nicht-ionisches Detergenz

NRPS Nichtribosomale Peptid Synthetasen

PDB Protein Data Bank

pNPP para-Nitrophenolphosphat

PP Protein Phosphatase

PP1 und PP2A Serin- / Threoninproteinphosphatase 1 und 2A

ppm „parts per million“

PS Polystyrol(harz)

PTP Protein Tyrosin Phosphatasen

PyBrop Bromo-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RFID Radiofrequenzidentifikation „Radio Frequency Identification“
RMSD Root mean square deviation
RNA Ribonukleinsäure
RT Raumtemperatur
SPPS Festphasenpeptidsynthese (Solid Phase Peptid Synthesis)
TAFI Thrombin-aktivierbare Fibrinolyse Inhibitor
TES Triethylsilyl
TFA Trifluoressigsäure
TIC „tick carboxypeptidase inhibitor“
TNCG „truncated Newton conjugated gradient“
TOCSY „Total Correlation Spectroscopy“
tRNA transfer-RNA
Tris 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UV Ultraviolet
 V_{MAX} maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gluc	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

9 Anhang

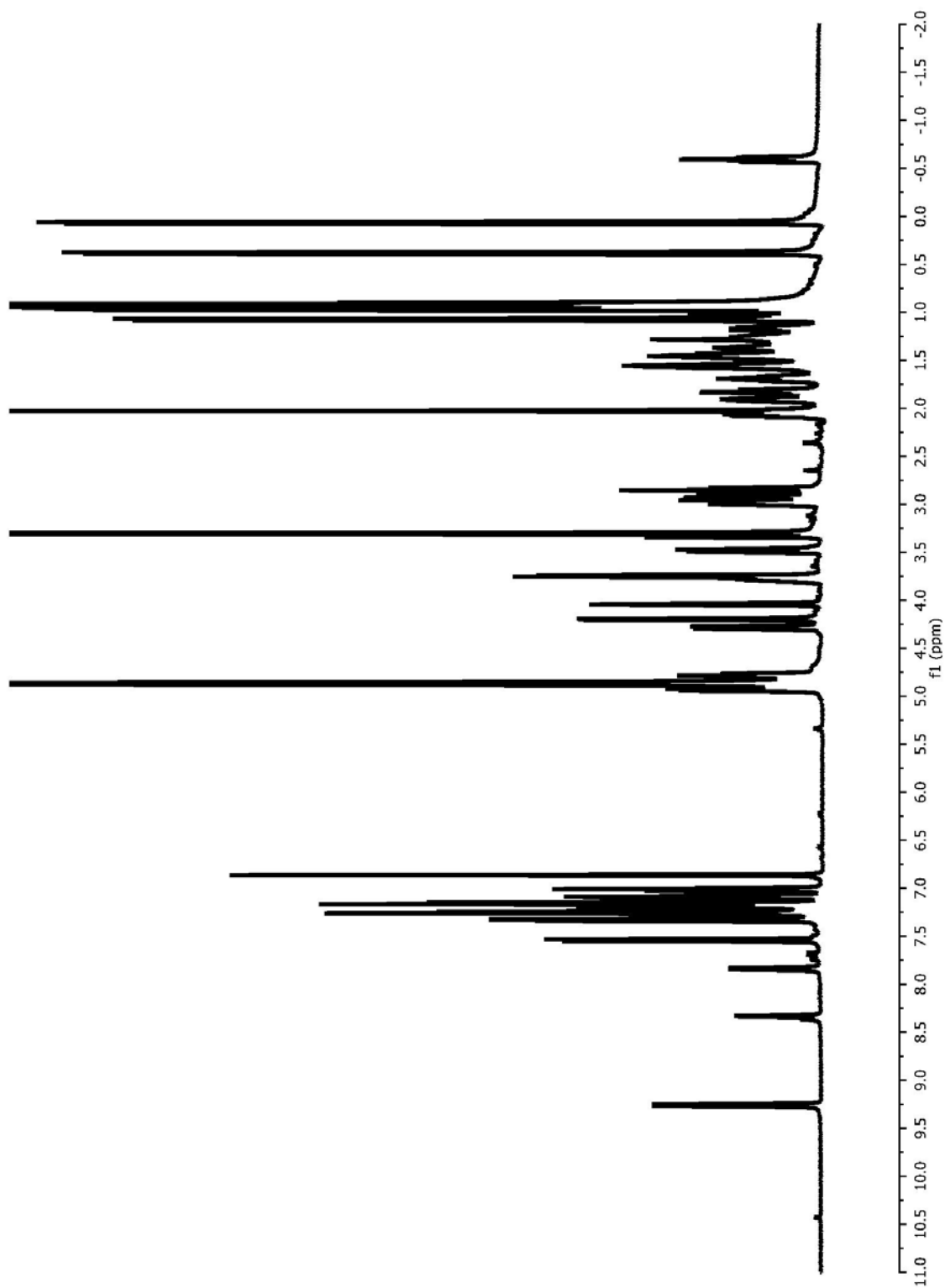


Abbildung 87 Brunsvicamid A (18): 500 MHz ^1H -Spektrum in MeOD.

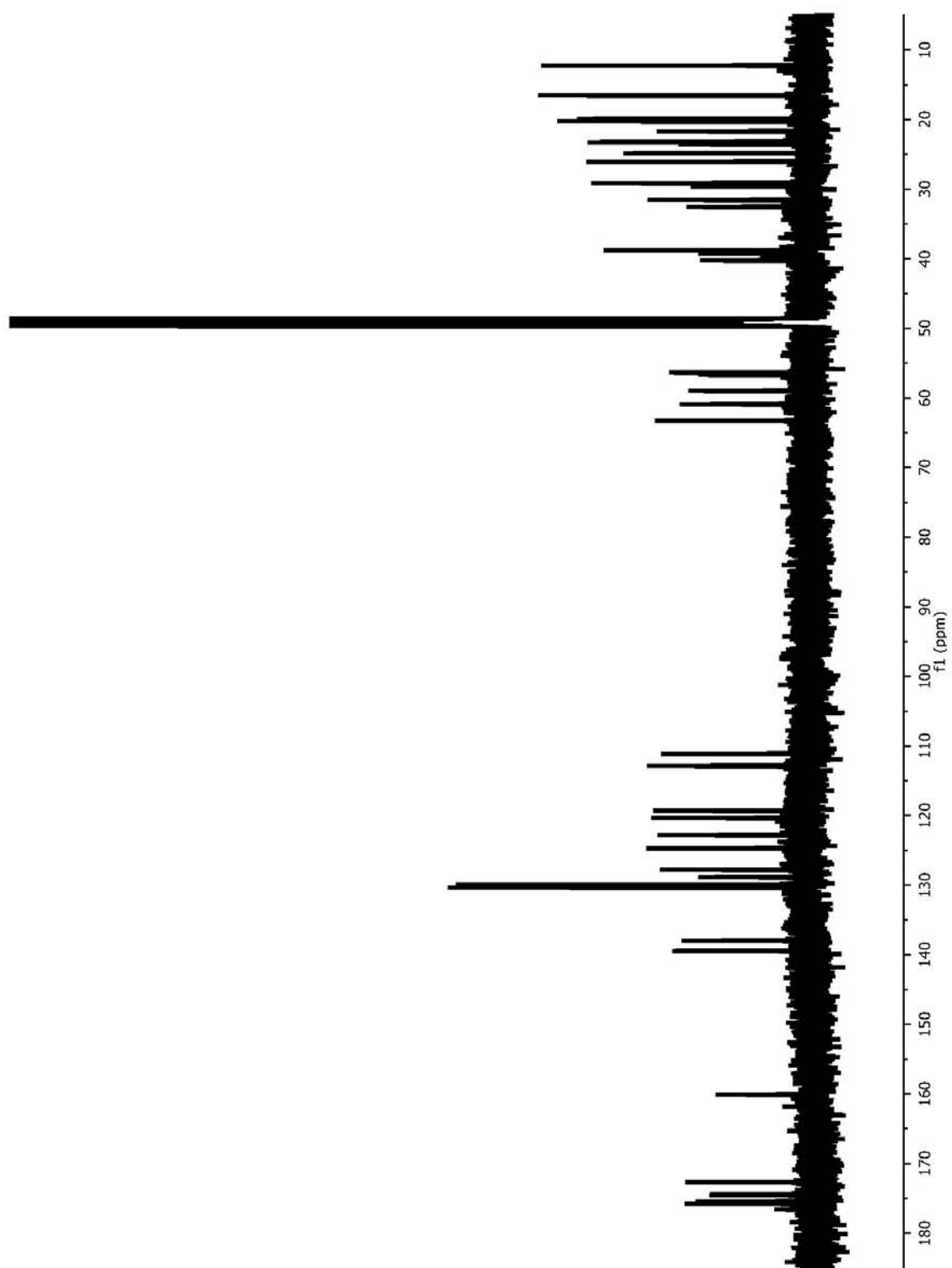


Abbildung 88 Brunsvicamid A (18): 126 MHz ^{13}C -Spektrum in MeOD .

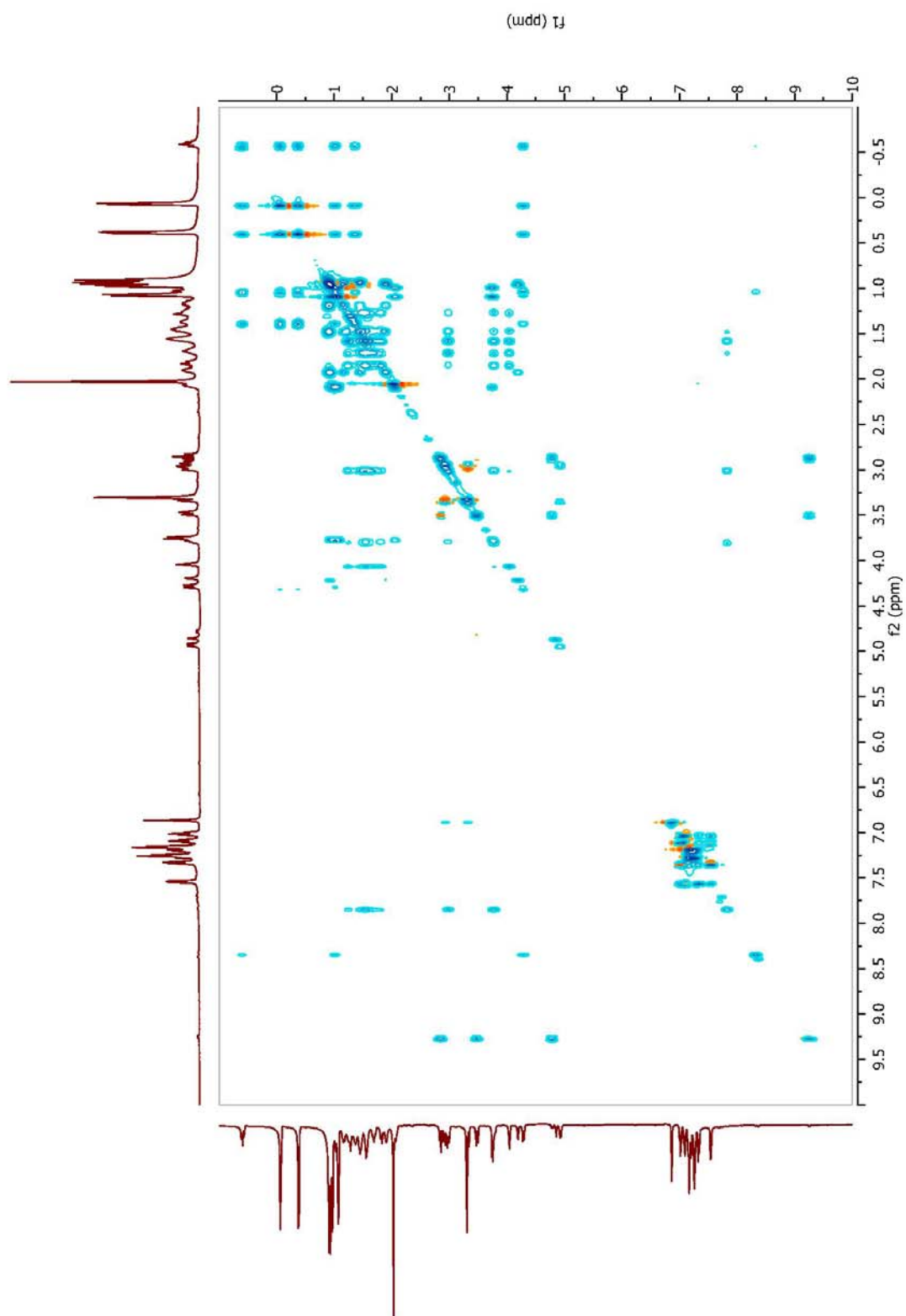


Abbildung 89 Brunsvicamid A (18): 500 MHz TOCSY-Spektrum in MeOD.

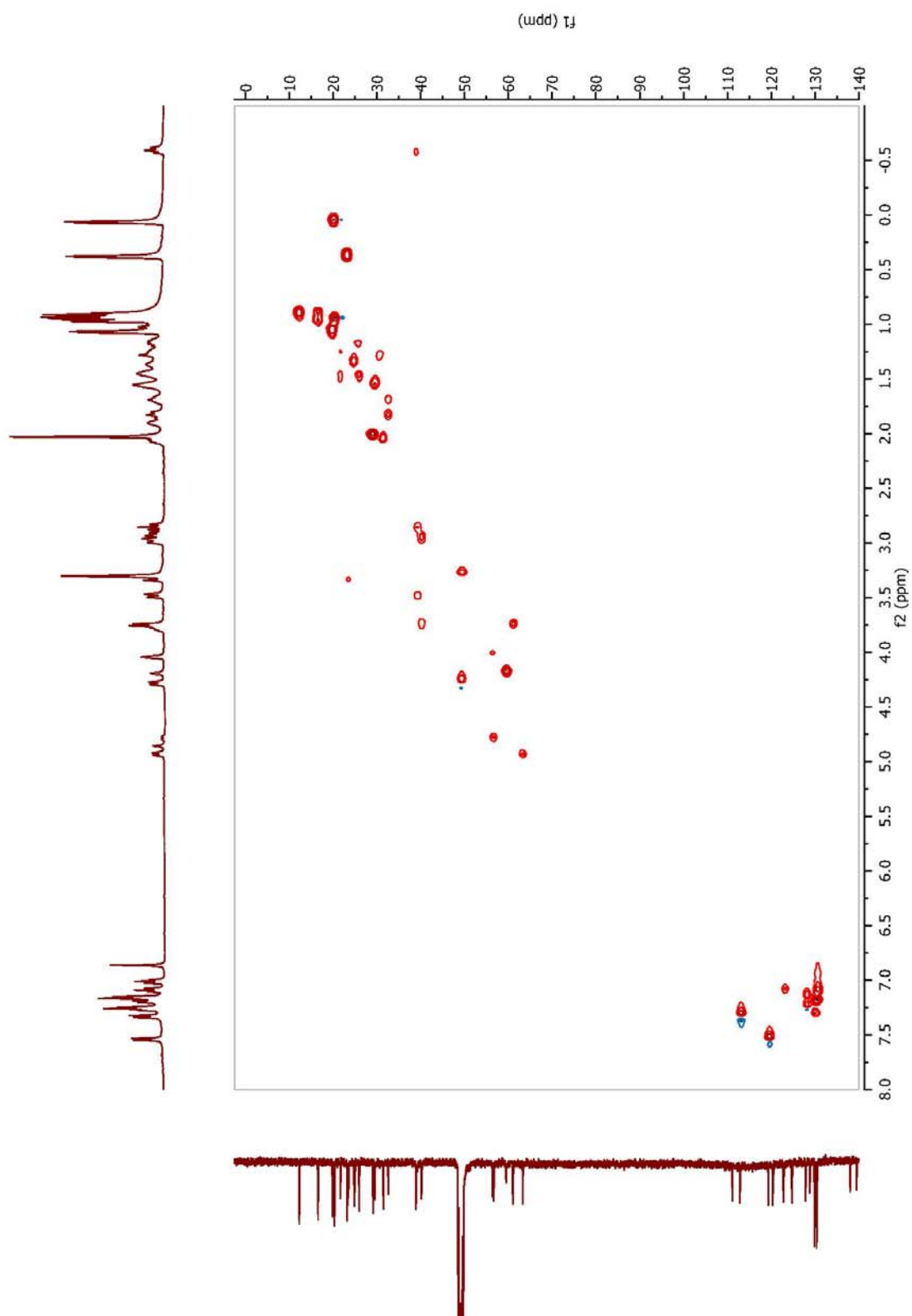


Abbildung 90 Brunsvicamid A (18): 500 MHz gHSQC-Spektrum in MeOD.

Danksagung

Zuerst danke ich Prof. Dr. Herbert Waldmann für die Überlassung des interessanten Themas, die damit verbundene finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung einer exzellenten Arbeitsumgebung. Herrn Dr. Hans-Dieter Arndt danke ich für die fachliche Betreuung, die Unterstützung in der Endphase und die Korrektur der Arbeit. Prof. Dr. Martin Hiersemann möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bei Bernhard Griewel und Dr. Wolf Hiller (NMR), Andreas Brockmeyer und Nina Mészáros (HRMS), Dr. Petra Janning und Evelyne Merten (HPLC-MS) sowie Markus Hüffner (Elementaranalysen) möchte ich mich für die Durchführung zahlreicher Messungen bedanken.

Meinen Laborkollegen Lars Arve, Marc Kühn, Dr. Gemma Triola, Heiko Dücker, Kristina Görmer und Hanna Bruss danke ich für die fröhlich verrückte und lehrreiche Zeit in A3.15 und für das Korrekturlesen des Manuskriptes. Ohne Herrn Dr. Frank Dekker und Herrn Dr. Christian Hedberg wäre meine Zeit als Jungdoktorand um einiges härter und weniger lustig gewesen, ihnen bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Meinen Eltern danke ich für die stets bedingungslose Unterstützung und Christian, Morti, Conny, Bettina, Anika, Bernhard, Stefan, Lars, Tobias, Ralph und Lara für ihre Freundschaft in den letzten und hoffentlich auch kommenden Jahren.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Karin für ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, 28.04.2009

Thilo Walther