

Synthese und Konformationsanalyse von Stevastelin C3 Analoga als Phosphataseinhibitoren

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-Chemikerin

Nicola Bisek

aus Heiligenhaus

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Krause

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2008

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 Juli 2003 bis Oktober 2008 angefertigt.

„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.“

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	4
2.1 <i>Zyklische Peptide und Depsipeptide</i>	4
2.1.1 Allgemein	4
2.1.2 Zyklische Peptide als rigide Template	7
2.1.3 Makrozyklisierungen	9
2.2 <i>Stevasteline</i>	11
2.2.1 Isolierung und Biologie	11
2.2.2 Stevastelin Synthesen	12
2.3 <i>Konformationsanalyse</i>	15
2.3.1 Peptidische Strukturelemente	15
2.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen	18
2.3.3 Moleküldynamische Simulationen	21
2.4 <i>Biologische Zielverbindungen</i>	23
2.4.1 Phosphatasen.....	23
2.4.2 VHR	25
2.4.3 Bakterien.....	27
3. Ziel der Arbeit	29
4. Spezieller Teil	32
4.1 <i>Synthese</i>	32
4.1.1 Synthesepplan	32
4.1.2 Darstellung der Bausteine	34
4.1.3 Festphasensynthese.....	38
4.1.4 Makrolaktamisierung.....	41
4.1.5 Derivatisierung.....	46
4.1.6 Globale Debenzylierung	50
4.2 <i>Konformationsanalyse</i>	51
4.2.1 NMR-Experimente	51
4.2.2 Kraftfeldrechnungen	63
4.3 <i>Biochemische Untersuchungen</i>	73
4.3.1 Phosphatase-Inhibition <i>in vitro</i>	73

4.3.2	Zelluläre Untersuchungen.....	82
4.3.3	Antibakterielle Assays.....	85
5.	Zusammenfassung.....	88
6.	Experimenteller Teil	96
6.1	<i>Synthese.....</i>	96
6.1.1	Messgeräte und Hilfsmittel	96
6.1.2	Versuche zur Herstellung der Synthesebausteine.....	99
6.1.3	Immobilisierung und Veresterung an fester Phase	127
6.1.4	Versuche zur Peptidsynthese an fester Phase	134
6.1.5	Abspaltung der linearen Depsipeptide von der Festphase	136
6.1.6	Versuche zur Makrolaktamisierung	142
6.1.7	Versuche zur Phosphorylierung der Zyklodepsipeptide.....	164
6.1.8	Versuche zur globalen Debenzylierung	169
6.2	<i>Zweidimensionale NMR-Experimente</i>	176
6.3	<i>Molekülrechnungen</i>	177
6.3.1	Allgemeines	177
6.3.2	Konformationsanalyse	177
6.4	<i>Biochemische Untersuchungen.....</i>	179
6.4.1	Reagenzien und Instrumente.....	179
6.4.2	Phosphatase Aktivitätsscreen.....	181
6.4.3	Untersuchungen der VHR-Inhibition <i>in vitro</i>	182
6.4.4	Zelluläre Untersuchungen zum ERK-Phosphorylierungsgrad	184
6.4.5	Antibakterielle Assays.....	186
7.	Literaturverzeichnis	187
8.	Abkürzungsverzeichnis	195
9.	Anhang	200
9.1	<i>NMR-Spektren</i>	200
9.2	<i>Randbedingungen für die Molekülrechnungen.....</i>	232

1. Einleitung

Die Funktionsweise von Lebewesen ist auch nach der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms eines der größten Rätsel unserer Zeit.^[1-3] Da bei der direkten Regulierung der zellulären Prozesse im Wesentlichen Proteine involviert sind, kommt dem deutlich komplexeren Proteom eine besondere Bedeutung zu.^[4, 5] Neben zahlreichen posttranslationalen Modifikationen und äußeren Einwirkungen wie Stress oder zellabhängigen Reaktionen entsteht ein kompliziertes Netzwerk, das die Signalweiterleitung der Zellen -und somit unser Leben- reguliert.

Im Körper entsteht eine selektive biologische Wirkung in der Regel durch die Interaktion eines Proteins mit seinem Substrat, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die zu einer zellulären Antwort führt. Eine Inhibition oder Hyperaktivierung solcher Signalwege kann zu schwerwiegenden Krankheiten führen.^[6] Ist jedoch ein Wirkstoff in der Lage mit einem der endogenen Liganden zu konkurrieren, kann der Signalweg gezielt gesteuert und im Idealfall der gesunde Zustand wieder hergestellt werden. Für das detaillierte Verständnis physiologischer Prozesse und das Design neuer Wirkstoffe zur Therapie unterschiedlichster Krankheiten ist die Entwicklung effektiver und selektiver Inhibitoren in der aktuellen Forschung deshalb von erheblicher Bedeutung.

Die chemische Biologie konzentriert sich hierbei auf die Synthese organischer Moleküle, die in der Lage sind reversibel an biologische Zielverbindungen zu binden und so physiologische Vorgänge zu beeinflussen (Abbildung 1).^[7] Naturstoffe, die durch Jahre der Evolution von der Natur optimiert wurden, um eine spezifische Funktion auszuüben, sind hierbei gute Ausgangspunkte.^[8] Gemeinsam mit ihren Derivaten und Mimetika führen sie bei der Suche nach selektiven, biologischen Aktivitäten im Vergleich zu anderen Wirkstoffen zu wesentlich höheren Erfolgsraten. Rund 35-40% aller Arzneimittel im Handel basieren deshalb auf Naturstoffen.^[9]

In der aktuellen Forschung wird eine stetige Zunahme isolierter Zylopeptide und -depsipeptide verzeichnet.^[10, 11] Diese häufig sehr komplexen Strukturen werden vor allem aus marinen sowie terrestrischen Mikroorganismen gewonnen und weisen eine Vielzahl interessanter biologischer Aktivitäten auf. Da diese Naturstoffe jedoch oft nur begrenzt verfügbar und schwierig zu isolieren sind, werden Alternativen zur Bereitstellung dieser Substanzen benötigt. Durch die Totalsynthese erschließt sich zudem ein Zugang zur Strukturbestimmung und zum anderen zur Untersuchung der biologischen Wirkungen. Die Synthese verschiedener Analoga bietet schließlich einen Einblick in den Zusammenhang der Wirkstoffstruktur und ihrer biologischen Aktivität.

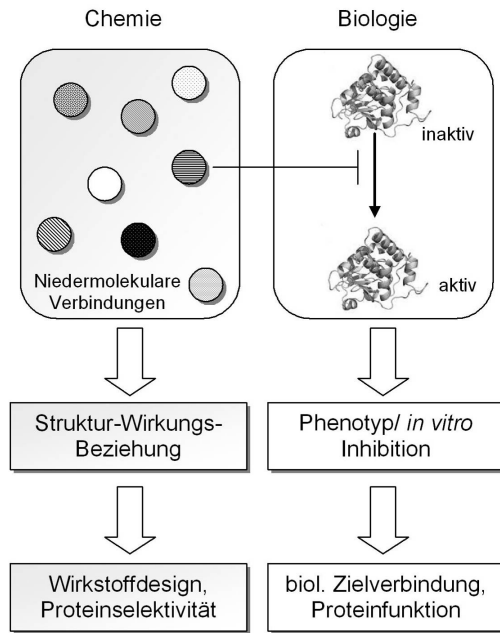


Abbildung 1: Chemisch hergestellte Verbindungen zur selektiven Inhibition biologischer Zielverbindungen und daraus gewonnene Informationen.

Besonders interessant ist die Untersuchung zyklischer Peptide und Depsipeptide auch, da diese im Körper gegenüber linearen Peptiden wesentlich stabiler sind und besser ihren Zielort erreichen.^[12, 13] Weiterhin wird die biologische Aktivität einer Substanz stark von ihrer dreidimensionalen Struktur beeinflusst, so dass eine Konformationsanalyse wertvolle Informationen für das Wirkstoffdesign liefert.^[14] Peptidische Makrozyklen stehen auch hier im Mittelpunkt des Interesses, da ihre gespannten Ringe zu einer eingeschränkten Flexibilität der Verbindungen führen können. Die so erhaltenen starren 3-D Template können verwendet werden, um funktionelle Gruppen definiert im Raum anzuordnen und mögliche Bindungsstellen der Proteine zu adressieren.^[15-17] Unterschiedliche 3-D Strukturen können auf diese Weise die biologische Aktivität einer Substanz beeinflussen. Diese Veränderungen können schließlich durch gezielte Untersuchungen getestet werden, wodurch ein differenziertes biologisches Profil der aktiven Substanz sowie der untersuchten Enzyme erhalten werden kann.

Die aus solchen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse können sowohl zur Entwicklung effektiver, neuer Medikamente herangezogen werden, als auch Einsichten in bisher wenig untersuchte physiologische Vorgänge geben, um z.B. Informationen über bisher nicht bekannte Funktionen bestimmter Enzyme oder Wirkstoffe zu erhalten.

Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit neben der Synthese von auf Naturstoffen basierenden Zyklodepsipeptiden auch die Konformationsanalyse der gespannten Makrozyklen eine Rolle spielen. Die anschließende Überprüfung auf ihre biologische Aktivität soll zu neuen Erkenntnissen bezüglich der physiologischen Bedeutung 13-gliedriger Zyklodepsipeptide und ihrer biologischen Ziele führen.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Zyklische Peptide und Depsipeptide

2.1.1 Allgemein

Natürliche Peptide und Proteine sind aus den 22 DNA-kodierten Aminosäuren aufgebaut und werden häufig posttranslational modifiziert.^[18] Unter physiologischen Bedingungen sind sie oft natürliche Bindungspartner der regulatorischen Enzyme. Bei der Entwicklung geeigneter Inhibitoren liegt es deshalb nahe, zunächst auf diese Peptide als Leitstrukturen zurückzugreifen. Da lineare Peptide jedoch in der Zelle enzymatisch abgebaut werden können und durch ihre schlechte Membranpermeabilität nur eingeschränkt oral verfügbar sind, müssen modifizierte Strukturen gefunden werden. Die Zyklisierung von Peptiden oder Depsipeptiden stellt eine solche Modifikation dar. Neben der verbesserten Aufnahme in die Zelle und erhöhter Stabilität, wird auch häufig ein Anstieg der biologischen Aktivität beobachtet.^[15, 19-21] Durch die zyklische Struktur kann das Peptid zudem bereits in einer vororientierten Konformation vorliegen, wodurch die Bindung an das Enzym gegenüber dem flexibleren, linearen Peptid energetisch begünstigt wird.^[13, 16, 22, 23] Die Selektivität bezüglich der Bindung an spezifische Rezeptoren wird durch die eingeschränkte Flexibilität ebenfalls stark beeinflusst.

Zyklisierungen können über die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen *N*- und *C*-Terminus erfolgen (*head to tail*) oder unter Einbindung der Seitenketten verschiedener Aminosäuren (Abbildung 2). Hierzu gehören z.B. die Ausbildungen von Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen oder von Laktambindungen zwischen einem Glutaminsäurerest und der Aminogruppe der Seitenkette eines Lysins oder des *N*-Terminus'.

Das „*head to tail*“ zyklisierte Peptid **1** z.B. bindet über das Aminosäuremotiv Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) selektiv an $\alpha_v\beta_{3/5}$ -Integrine.^[24] Über diese Rezeptoren sind die für das Knochenwachstum wichtigen Osteoblasten in der Lage an Oberflächen zu binden, die mit RGD-Peptid **1** beschichtet sind, wodurch z.B. Implantate besser in das regenerierende Knochengewebe integriert werden.^[25] Das über zwei Cysteinseitenketten zyklisierte Oxytocin (**2**) ist ein natürliches Hormon, welches als Neurotransmitter im Gehirn fungiert.^[26] Kürzlich veröffentlichte Studien weisen auf einen möglichen Einsatz zur Behandlung von Sozialphobie und Stimmungsschwankungen hin.^[27] Vincent du Vigneaud erhielt für die Isolierung und Synthese dieses Zylopeptids 1955 den Nobelpreis in Chemie.^[28]

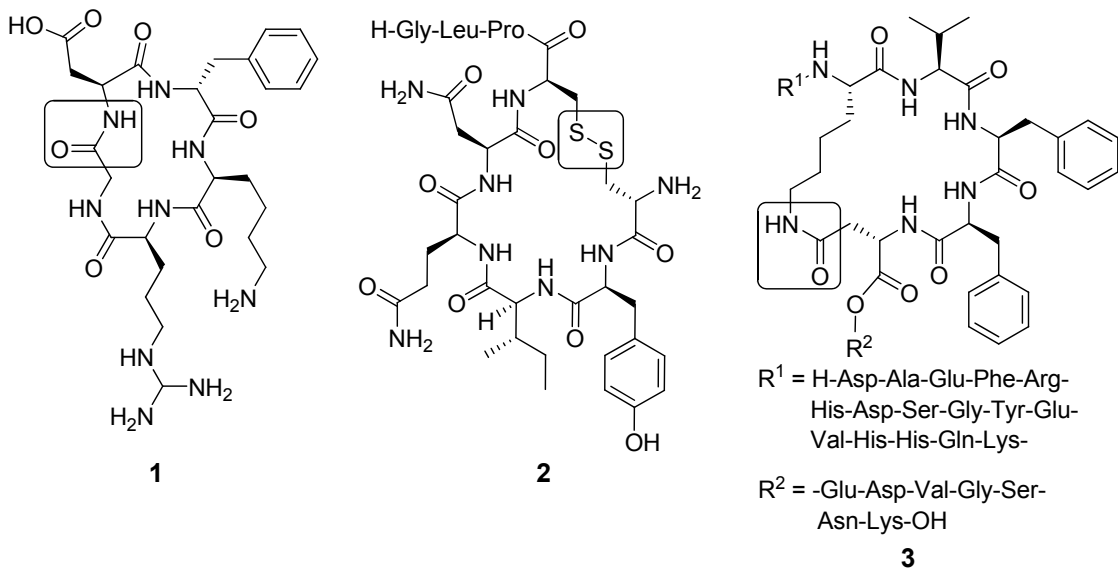


Abbildung 2: An unterschiedlichen Positionen zyklisierte Peptide mit biologischen Wirkungen.

Mit Hilfe einer Zyklisierung über die Lysin- und Asparaginsäureseitenketten konnte die Flexibilität des Peptids **3** eingeschränkt werden, was den linearen Vorläufer in einen aktiven Inhibitor der Amyloidentstehung und Zytotoxizität umwandelte.^[29] Dies spielt insbesondere bei der Behandlung von Alzheimerpatienten eine große Rolle, bei denen sich fehlerhaft gefaltete β -Amyloid-Peptide im Gehirn ablagern.^[30, 31]

Zyklische Depsipeptide sind durch eine Esterbindung im makrozyklischen Rückgrat gekennzeichnet. Diese kann entweder über die Seitenketten der Aminosäuren Serin oder Threonin ausgebildet werden oder durch eine integrierte Hydroxysäure. Die Bedeutung der Esterbindung in Depsipeptiden ist nicht eindeutig geklärt, aber es konnte gezeigt werden, dass eine Peptidbindung an dieser Stelle zum Verlust der biologischen Aktivität führen kann.^[32]

Natürlich vorkommende zyklische Depsipeptide weisen neben ihrer häufig komplexen Struktur zahlreiche interessante biologische Aktivitäten auf (Abbildung 3). Einige vielversprechende Arzneimittel-Kandidaten befinden sich dabei in klinischen Studien, z.B. wird Kahalalid F (**4**) zur Zeit wegen seiner selektiven Veränderung lysosomaler Membranen in Tumorzellen als Krebsmittel gegen Melanome und Lungenkarzinome in der klinischen Phase II getestet.^[33] Des Weiteren wird seine Eignung zur Behandlung von Schuppenflechte ebenfalls in der klinischen Phase II detailliert geprüft.

Einen weiteren Vertreter der Klasse zyklischer Depsipeptide stellt Globomycin (**5**) dar.^[34] Dieses Lipopeptid führt aufgrund seines Einflusses auf die Akkumulation von Vorläufern der Membranlipoproteine in Bakterien zum Zelltod. In biologischen Studien

konnte die antibakterielle Wirkung auf eine spezifische Inhibition der Lipoprotein-Signalpeptidase II zurückgeführt werden.^[35]

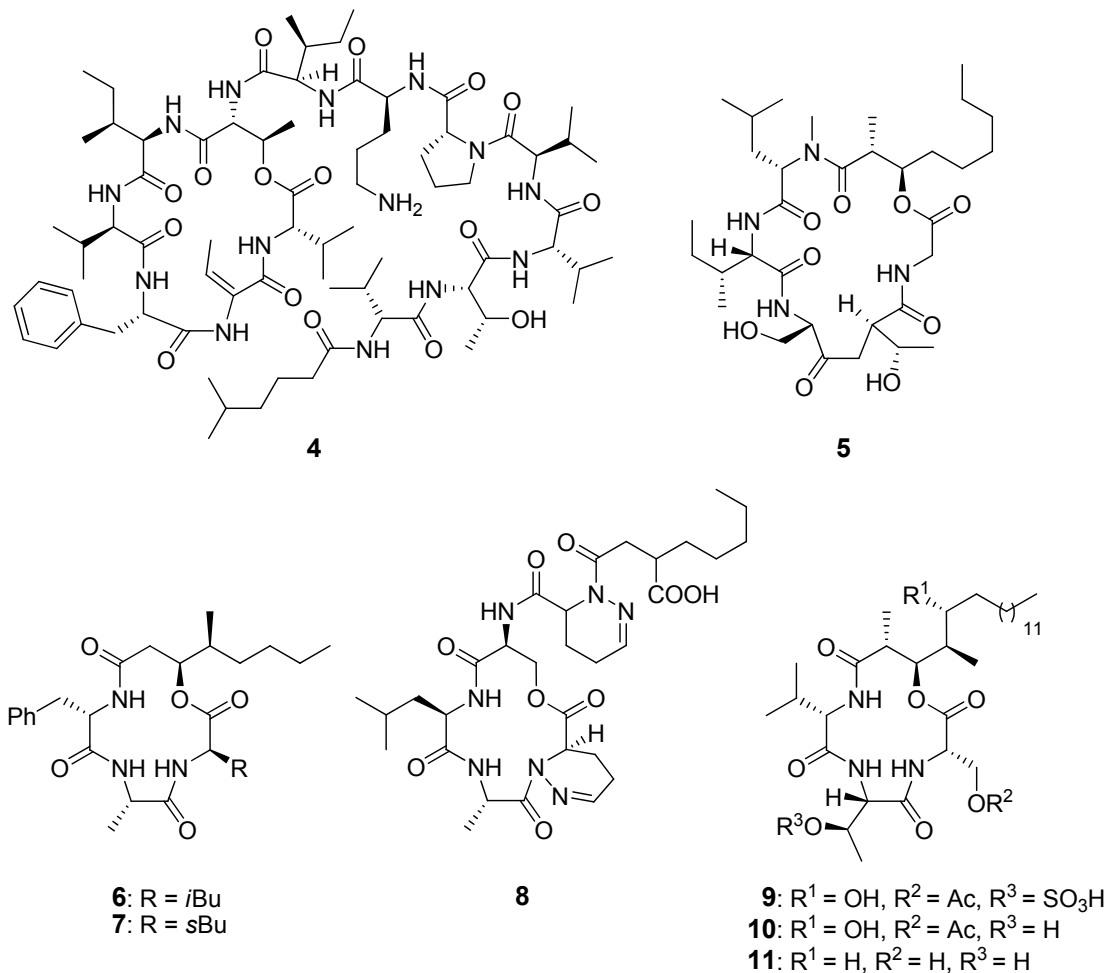


Abbildung 3: Biologisch aktive, natürlich vorkommende Zyklopeptide.

Trotz der stetig steigenden Zahl vor allem aus Pilzen oder marinen Schwämmen isolierter zyklischer Depsipeptide, wurden bisher nur 39 13-gliedrige Depsipeptide aus natürlichen Ressourcen isoliert, welche in sieben verschiedene Verbindungsklassen unterteilt werden können.^[36] Beauveriolid I und III (**6**, **7**) repräsentieren eine der größten Verbindungsklassen 13-gliedriger Zyklopeptide.^[37] Diese Makrozyklen haben einen antiatherosklerotischen Effekt, was sie zu bedeutenden Ausgangsstrukturen für die Wirkstoffsuche macht. Lydiamycin A (**8**) zeigte hingegen eine antibakterielle Wirkung gegen eine Serie von Mykobakterien, unter anderem gegen *Mycobacterium tuberculosis*.^[38] Neben ihrer antibakteriellen und krebshemmenden Aktivitäten zeigen einige zyklische Depsipeptide auch immunosuppressive Eigenschaften. Unter ihnen befinden sich Stevastelin A3 (**9**), B3 (**10**) und C3 (**11**), welche neben ihrer Wirkung auf die Immunantwort der Zelle auch

Phosphataseinhibition zeigten.^[39, 40] Diese vielversprechenden Eigenschaften und biologischen Aktivitäten machen zyklische Depsipeptide zu einem interessanten Ziel der Wirkstoffforschung und -entwicklung, sowie zu hervorragenden Startpunkten für grundlegende Forschung im Bereich der chemischen Biologie.

2.1.2 Zyklische Peptide als rigide Template

Die biologische Wirkung zyklischer Peptide und Depsipeptide steht in direktem Zusammenhang mit ihrer Konformation und der selektiven Interaktion mit den zu inhibierenden Enzymen.^[17, 23, 41] Hierbei konkurrieren die Makrozyklen mit den natürlichen Bindungspartnern, zumeist anderen Proteinen. Bei der Wechselwirkung zweier Proteine, und somit der Kontrolle wichtiger physiologischer Prozesse, spielen besonders β - und γ -Schleifen eine entscheidende Rolle, die durch die räumliche Anordnung dreier oder vierer Aminosäuren einer Peptidsequenz definiert werden. Um konkurrenzfähige Bindungspartner zu generieren können diese Protein-Schleifen imitiert werden, indem anstelle flexibler, linearer Peptide rigide, zyklische Peptide verwendet werden.

Um die Flexibilität von Peptiden durch Makrozyklisierung einzuschränken und so konformativ homogene Strukturen zu generieren, sind in der Literatur verschiedene Methoden bekannt.^[12, 15, 29, 42] 12-gliedrige Tetrapeptide sind durch ihre hohe Ringspannung und ungünstige Orientierung funktioneller Gruppen zueinander häufig sehr instabil. Ihre Synthese ist oft auf Tetrapeptide beschränkt, welche sogenannte Proteinschleifen-induzierende Bausteine enthalten, wie z.B. D-Aminosäuren oder Prolin. 13-gliedrige zyklische Peptide, die eine β -Aminosäure enthalten sind hingegen wesentlich stabiler und konnten bereits als β - oder γ -Schleifen-Mimetika eingesetzt werden.^[16, 43] Dennoch weist nicht jeder 13-gliedrige Makrozyklus eine homogene Konformation auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Position der β -Aminosäure in der Peptidsequenz dabei eine entscheidende Rolle spielt (Abbildung 4).^[16] Während das Zylopeptid **12** in Lösung mehrere Konformationen aufwies, konnte durch die veränderte Position des β -Phenylalanins in der Aminosäuresequenz ausschließlich eine einzige, rigide Konformation für Makrozyklus **13** ermittelt werden.

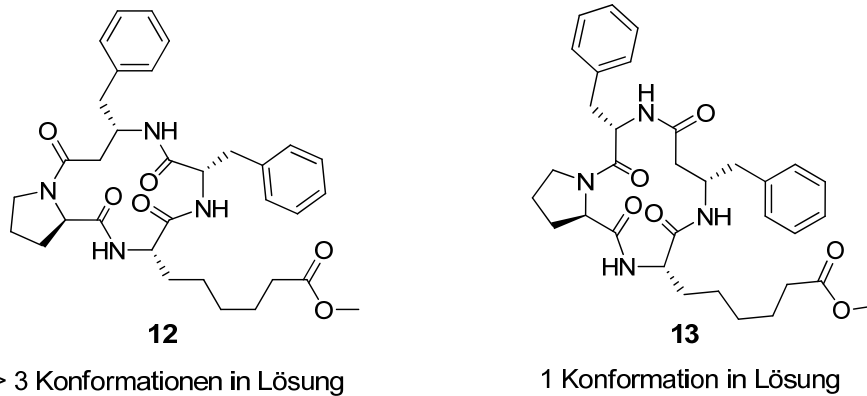


Abbildung 4: Beeinflussung der Flexibilität eines Makrozyklus' durch die Position der β -Aminosäure in der Peptidsequenz.

Zur Nachahmung verschiedener Schleifen und anderer homogener, Struktur motive kann auch die Ringgröße des Makrozyklus' variiert werden. Neben den 13-gliedrigen Peptiden sind so auch 15-gliedrige Pentapeptide geeignet, um rigide Template zu liefern.^[44-46] Der Einsatz von D-Aminosäuren kann zu β 1'-Schleifen-Konformationen führen, wobei die D-Aminosäure bevorzugt die i+1 Position der Schleifen einnimmt.^[47, 48] Weiterhin kann die Energiebarriere zwischen *cis*- und *trans*-Peptidbindungen durch N-Methylierung von Peptiden herabgesetzt werden. Durch die daraufhin eingeschränkte Möglichkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, können neue, rigide Konformationen bevorzugt sein.^[22, 48]

Die so generierten starren Template können anschließend bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe verwendet werden oder für sogenannte „*spatial screenings*“ herangezogen werden.^[22, 23, 49, 50] Bei einem solchen räumlichen Abtasten des aktiven Zentrums eines Proteins wird die Möglichkeit genutzt auf dem starren Templat bestimmte funktionelle Gruppen zur Interaktion mit dem Enzym in vorhersagbarer und definierter Weise räumlich anzuordnen. Durch die anschließende Überprüfung ihrer inhibitorischen Eigenschaften, kann eine Aussage über die Affinität und Selektivität der untersuchten Enzyme getroffen werden. Anhand der starren Konformation der zyklischen Peptide bzw. Depsipeptide kann schließlich ein häufig bevorzugter, nicht peptidischer Inhibitor entwickelt werden.^[16]

Dies macht zyklische Depsipeptide zu vielseitigen Instrumenten zur detaillierten Untersuchung der physiologischen Bedeutung untersuchter Enzyme.

2.1.3 Makrozyklisierungen

Die effiziente Darstellung zyklischer Peptide und Depsipeptide steht seit langem im Zentrum der Aufmerksamkeit der organischen Synthese.^[11, 32] Aber auch wenn die moderne Chemie eine Vielzahl effizienter Synthesemethoden kennt, erweist sich die Darstellung makrozyklischer Moleküle häufig als problematisch.

Die Monozyklisierung steht stets in Konkurrenz zur Oligomerisierung. Im Allgemeinen werden deshalb Makrozyklisierungen unter Hochverdünnung ($<10^{-3}$ M) durchgeführt, um diese Nebenreaktion zu unterdrücken.^[51] Durch die damit häufig verlängerte Reaktionszeit können jedoch neue Nebenreaktionen wie Epimerisierung, Zersetzung oder Zyklodimerisierung auftreten. Auch trägt die Konformation des Vorläufers einen großen Teil zum Gelingen der Reaktion bei. Vorläufer mit ungünstiger Konformation können häufig gar nicht oder in nur sehr geringen Ausbeuten zyklisiert werden.^[42] Da die Zyklisierung normalerweise einen der letzten Schritte in der Synthese darstellt, ist es besonders aufwendig nach fehlgeschlagenen Versuchen den linearen Vorläufer zu modifizieren, weshalb häufig versucht wird die Konformation des linearen Zyklisierungsvorläufers zu steuern oder zu berechnen.^[42]

Zyklische Depsipeptide können sowohl über eine Makrolaktonisierung als auch über eine Makrolaktamisierung hergestellt werden. Da die Einführung einer Ester- anstelle einer Peptidbindung häufig schwieriger ist und Epimerisierung mit sich bringen kann, wird diese oft schon im linearen Vorläufer aufgebaut, so dass der Ringschluss über eine Makrolaktamisierung erfolgt. Ein Beispiel hierfür stellen die Zyklisierungen zu Beauveriolid I und III (**6** bzw. **7**) an verschiedenen Positionen des Makrozyklus' dar (Abbildung 5). Xie *et al.* berichteten von einer erfolgreichen Makrolaktamisierung zwischen dem Amin des Phenylalanins und der Säurefunktion der β -Hydroxysäure in 68% Ausbeute (**7**).^[52] Ein Makrolaktonisierungsversuch mit 2-Methyl-6-nitrobenzoesäure-anhydrid (MNBA) zu Zyklodepsipeptid **7** schlug jedoch fehl. Durch eine 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) vermittelte Peptidkupplung zwischen Alanin und Isoleucin erhielten Takahashi *et al.* Beauveriolid I (**6**) schließlich in 51% Ausbeute.^[53] Der gespannte 13-gliedrige Ring des Naturstoffes konnte somit an zwei verschiedenen Positionen des Zyklus durch Makrolaktamisierung geschlossen werden, jedoch nicht durch Makrolaktonisierung.

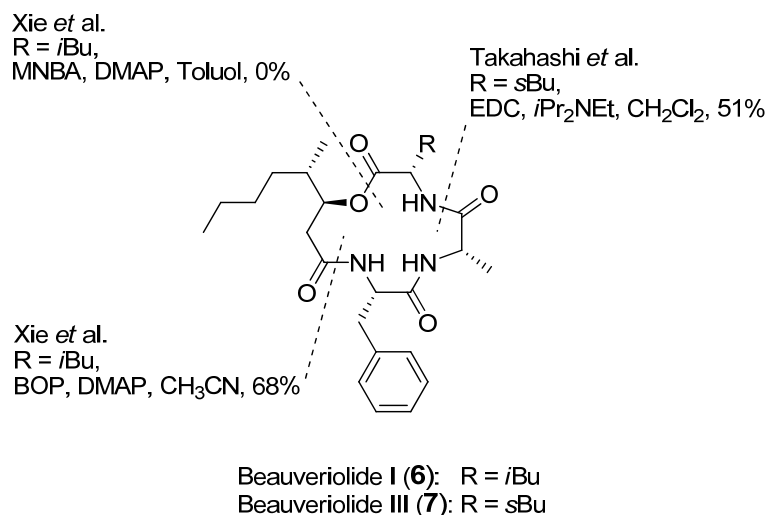


Abbildung 5: Makrozyklisierungsversuche an verschiedenen Positionen der zyklischen Depsipeptide Beauveriolid I und III.

In der Vergangenheit wurden unterschiedlichste Kupplungsreagenzien für effiziente Zyklisierungsreaktionen eingeführt (Tabelle 1). Klassische Uronium-Reagenzien wie HATU^[54] oder HBTU^[55, 56] wurden z.B. bei der Synthese der Depsipeptide Globomycin^[34] oder Phakellistatin 13^[57] verwendet. Aber auch Phosphonium basierte Reagenzien wie BOP^[58] oder PyBrOP^[59] wurden erfolgreich eingesetzt.^[55] Organophosphorsäure basierte Kupplungsreagenzien wie DPPA^[60] oder DEPC^[61] führten schließlich erfolgreich zu zyklischen Depsipeptiden wie Mollamid^[62] und Aminoisobutylsäure (Aib) enthaltenden Zyklohexapeptiden.^[63]

Name	Art des Makrozyklus	Reagenzien	Ausbeute
Globomycin	19-gliedriges Depsipeptid	HATU, DIPEA	45% ^[34]
Phakellistatin 13	21-gliedriges Peptid	HBTU, HOBt, DIPEA	60% ^[57]
Beauveriolid I	13-gliedriges Depsipeptid	BOP, DMAP	68% ^[52]
Didemnin A	23-gliedriges Depsipeptid	PyBrOP	37% ^[55]
Mollamid	21-gliedriges Peptid	DPPA, DIPEA	52% ^[62]
Zyko(Gly-Aib-Leu-Aib-Phe-Aib)	18-gliedriges Peptid	DEPC, DIPEA	53% ^[63]

Tabelle 1: Makrozyklisierungen mit verschiedenen Kupplungsreagenzien.

In zahlreichen Studien wurde festgestellt, dass jeder Makrozyklus eine neue Herausforderung darstellt, bei dem es die optimale Zyklisierungsposition, sowie das ideale Kupplungsreagenz zu finden gilt.

2.2 Stevasteline

2.2.1 Isolierung und Biologie

Stevasteline gehören zu einer Familie zyklischer Depsipeptide, welche 1994 aus *Penicillium* sp. NK374186 isoliert wurden (Abbildung 6).^[39] Sie bestehen aus den L-Aminosäuren Serin, Threonin und Valin, sowie einer langkettigen Fettsäure. Je nach Zyklisierungsposition in der Hydroxysäure liegen 15- bzw. 13-gliedrige Makrozyklen vor. Neben den am Threonin unsubstituierten Zyklen **10**, **11**, **15** und **17** kommen in der Natur auch sulfatierte Derivate (**9**, **14**, **16**) vor.

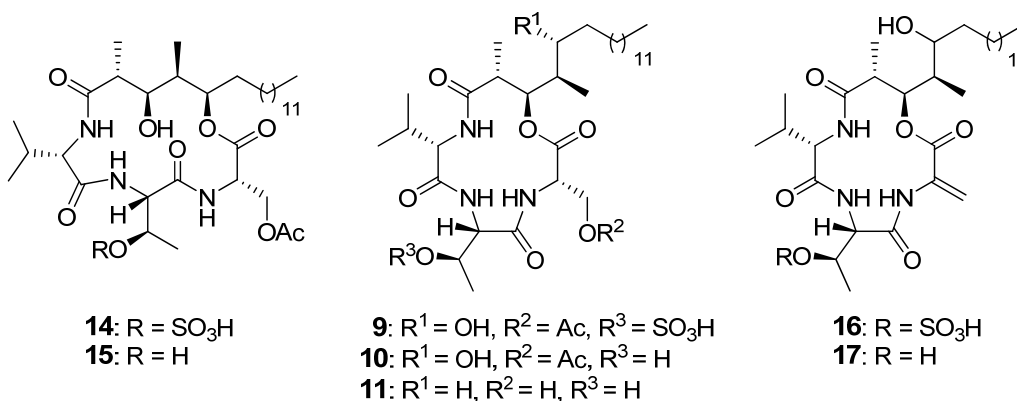


Abbildung 6: Aus *Penicillium* isolierte 13- und 15-gliedrige Stevasteline. Stevastelin A (**14**), B (**15**), A3 (**9**), B3 (**10**), C3 (**11**), D3 (**16**), E3 (**17**).

In ersten biologischen Untersuchungen wurde eine immunosuppressive Aktivität einiger Derivate gegen OKT-3 stimulierte Proliferation menschlicher T-Zellen festgestellt. Da eine ähnliche Wirkung bekannter Immunosuppressiva wie FK506 und Cyclosporin A auf der Inhibierung der Protein Phosphatase PP2B (Calcineurin) beruht, wurden die Stevasteline und einige Analoga auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegen verschiedene Phosphatasen getestet (Tabelle 2).^[40] Stevastelin P wies hierbei anstelle des Sulfats von Stevastelin A ein Phosphat auf, während Stevastelin H an dieser Stelle ein Acetat trug. Zwar konnte keine Aktivität der Stevasteline gegen PP2B beobachtet werden, jedoch wurde die dual spezifische Phosphatase VHR inhibiert. Weiterhin wurde festgestellt, dass sulfatierte und phosphorylierte Derivate stärkere *in vitro* Aktivitäten gegen VHR aufzeigten als die unsulfatierten Verbindungen. Letztere hingegen wiesen eine stärkere Wirkung gegen IL-2 bzw. IL-6 abhängige Gen-Expression *in situ* auf. Aufgrund dieses Zusammenhangs wurde die Hypothese formuliert, dass unsubstituierte Stevasteline im Gegensatz zu geladenen Sulfat- oder Phosphat-Derivaten durch die Zellmembran

penetrieren und erst in der Zelle sulfatiert oder phosphoryliert werden, um dort schließlich als Phosphatase-Inhibitoren zu wirken.

Stevastelin	Thr(OR)	IC ₅₀ / μ M			
		IL-2*	IL-6**	VHR [§]	PPasen [§]
A	SO ₃ H	>25	>25	2.7	> 1000
A3	SO ₃ H	>25	>25	3.6	> 1000
D3	SO ₃ H	>25	>25	1.7	> 1000
P	PO ₃ H ₂	>25	>25	4.0	> 1000
H	Ac	11.5	5.7	24.0	> 1000
B	H	4.6	3.1	19.8	> 1000
B3	H	4.6	3.1	13.7	> 1000
C3	H	4.9	4.9	16.0	> 1000
E3	H	5.0	3.4	13.6	> 1000

Tabelle 2: Biologische Wirkungen verschiedener Stevasteline. *IL-2 Promoter abhängige Gen-Expression (PMA induziert). **IL-6 Promoter abhängige Gen-Expression (LPS induziert). [§]Phosphatase Aktivität (VHR, PP1, PP2A) wurde mit pNPP bestimmt.^[40]

In vorangegangenen biologischen Studien verschiedener Stevastelin C3 Analoga konnte gezeigt werden, dass die Stereochemie der Fettsäurekette eine wichtige Rolle in der Inhibierung der dualspezifischen Phosphatase VHR spielt.^[64] Da die biologisch aktive Konformation eines Inhibitors eine essentielle Rolle bei der Enzym-Affinität und -Selektivität spielt, kann spekuliert werden, dass der gespannte 13-gliedrige Ring eine eingeschränkte Konformation annimmt, welche durch die Stereochemie im Rückgrat des Makrozyklus bestimmt wird.

2.2.2 Stevastelin Synthesen

Die erste Totalsynthese von Stevastelin B wurde 2001 von Yamamoto *et al.* veröffentlicht.^[65] Chida *et al.* folgten mit Synthesen von Stevastelin B, B3 und C3.^[66, 67] Yamamoto *et al.* erhielten nach asymmetrischer Aldoladdition und nachfolgender Reduktion den Alkohol **19** in 88% Ausbeute (Abbildung 7). Nachdem der primäre Alkohol TBS-geschützt worden war konnte Diisopropylcarbodiimid (DCC) vermittelt mit Boc-Ser(OBzl)-OH verestert werden und anschließend die TBS-Schutzgruppe wieder entfernt werden (**20**). Nach Oxidation zum Aldehyd wurde Alken **21** über eine Roush-Allylierung mit Boronat **23** in 57% Ausbeute erhalten. Ozonolyse und Oxidation ergaben schließlich Säure **22** in 85% Ausbeute.

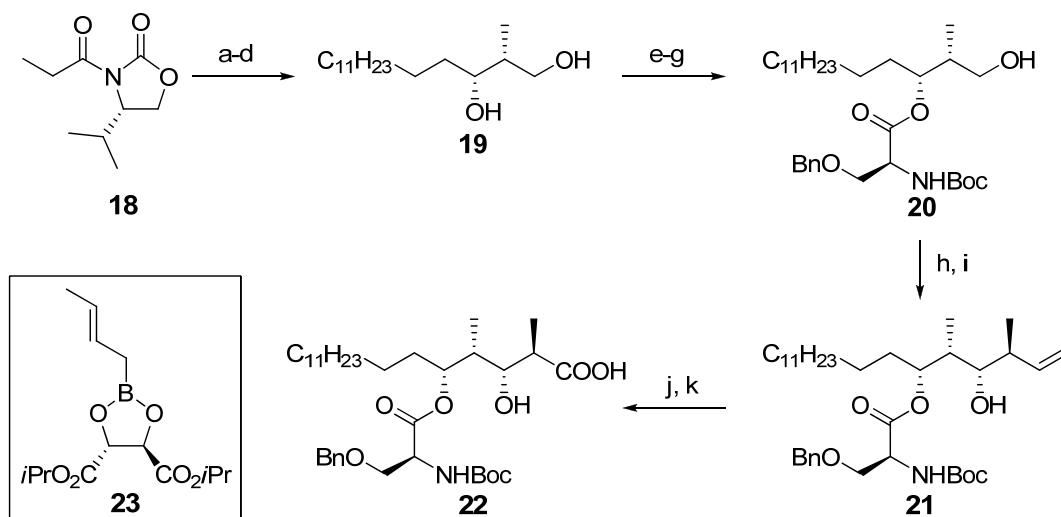


Abbildung 7: Bausteinsynthese Yamamoto et al.^[65]: a) $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$, NEt_3 , $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{CHO}$; b) H_2O_2 , LiOH ; c) CH_2N_2 , 89% über 3 Schritte; d) LiBH_4 , MeOH , 99%; e) TBSCl , NEt_3 , DMAP , 86%; f) Boc-Ser(Obzl)-OH , DCC , HOBT , quant.; g) $3\text{N HCl}_{aq}/\text{THF}$, 92%; h) TPAP , NMO , 70%; i) **23**, -78°C , 82%; j) O_3 , Ph_3P , -78°C , 85%; k) NaClO_2 , NaH_2PO_4 , 2-Methyl-2-buten, $\text{THF}/t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$, quant.

Chida et al. hingegen gingen bei ihrer Fettsäuresynthese von L-Quebrachitol (**24**) aus (Abbildung 8). In acht Schritten konnte daraus Zyklohexanon **25** in 25% Ausbeute erhalten werden. Einen Schlüsselschritt stellte in diesem Fall eine Baeyer-Villiger Oxidation von Keton **25** zu Laktone **26** in 81% Ausbeute dar.

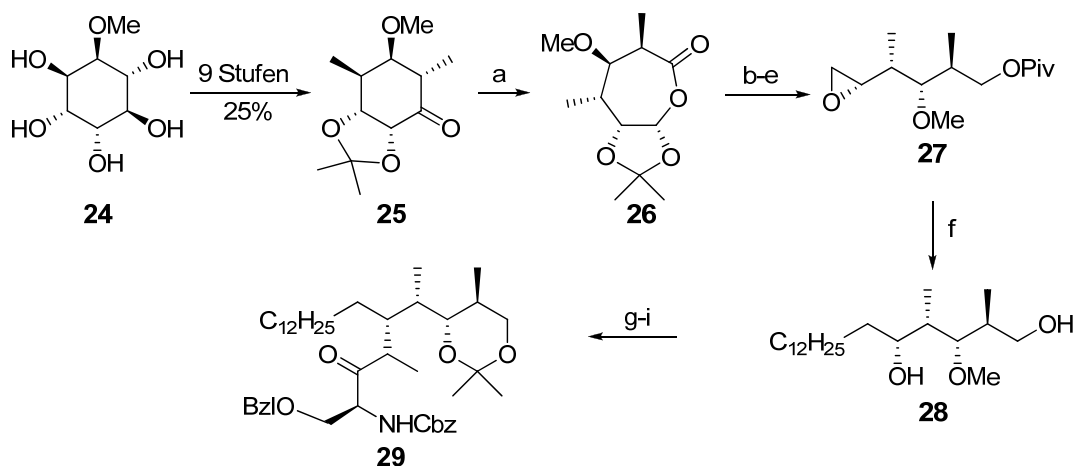


Abbildung 8: Bausteinsynthese von Chida et al.^[66, 67]: a) $m\text{CPBA}$, KHCO_3 , $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$, 81%; b) LiAlH_4 , THF , dann Ac_2O , Pyridin , 98%; d) MeONa , MeOH ; e) PivCl , DMAP , Pyridin , dann MsCl , Pyridin , 67% über 2 Schritte; e) MeONa , MeOH , 96%; f) $(n\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{Mg}$, CuCN (10 mol%), Et_2O , 87%; g) TMSI , CH_2Cl_2 , 85%; h) 2-Methoxypropen, CSA , CH_2Cl_2 , 76%; i) Cbz-Ser(Obzl)-OH , 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, NEt_3 , THF , dann **28**, DMAP , Toluol/THF , 73%; d.r. 6:1.

Reduktion des Esters **26** und Einführung des Epoxids lieferte **27** in 63% Ausbeute, welches durch nukleophile Öffnung des Epoxids mit Dodecylcuprat in 87% Ausbeute zu Baustein **28** führte. Nach einem Wechsel der Schutzgruppen wurde unter Yamaguchi-Bedingungen^[68] (2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, NEt_3 , DMAP) mit Cbz-Ser(OBzl)-OH verestert, was schließlich über drei Schritte in einer Ausbeute von 47% ein 6:1 Epimerengemisch des Esters **29** ergab.

In beiden Syntheserouten wurden die Fettsäurebausteine durch Peptidkupplungen verlängert und anschließend die Zyklen über eine Makrolaktamisierung zwischen dem *N*-Terminus des Valins und der Fettsäurekette geschlossen (Abbildung 9). Die Zyklisierungen zu 15-gliedrigen Ringen (**15**) verliefen sowohl mit Hilfe eines Pentafluorphenolesters als auch Diethylphosphorylcyanid (DEPC) vermittelt in guten Ausbeuten von 47% bzw. 41%. Die wesentlich gespannten 13-gliedrigen Ringe der Stevasteline B3 und C3 hingegen wurden mit Hilfe von DEPC in geringeren Ausbeuten von 29% und 28% erhalten.

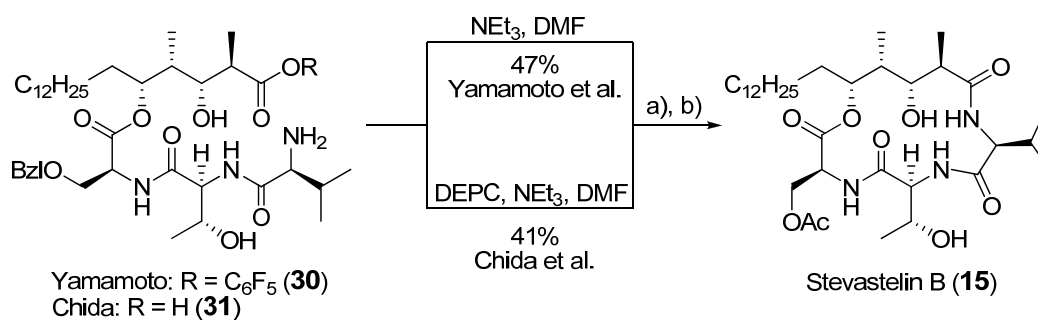


Abbildung 9: Erste Totalsynthesen von Stevastelin B: a) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 ; b) Ac_2O , Pyridin.

Chakraborty *et al.* gelang die Zyklisierung von Stevastelin B3 über eine selektive Makrolaktonisierung unter Yamaguchi Bedingungen^[68] in 45% Ausbeute (Abbildung 10).^[69] Diese Reaktion ist besonders bemerkenswert, da bei der Synthese zyklischer Peptide in den meisten Fällen eine Makrolaktamisierung gegenüber einer Makrolaktonisierung bevorzugt wird. Der Zyklisierungsvorläufer wurde aus (*S*)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäuremethylester mittels Horner-Wadsworth-Emmons Olefinierung und radikalischer Epoxidöffnung erhalten.

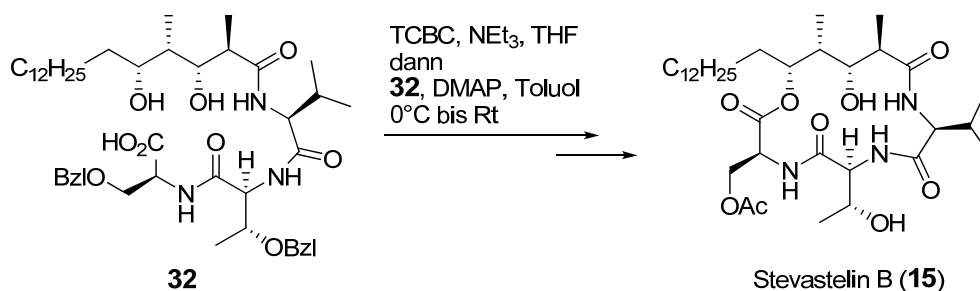


Abbildung 10: Makrolaktonisierung als Schlüsselschritt der Totalsynthese von Stevastelin B3.

Eine interessante, alternative Synthese des 13-gliedrigen Stevastelins B3 gelang schließlich Sarabia *et al.*, die ausgehend von partiell geschütztem Stevastelin B (**33**) über eine ringverengende Umesterung Stevastelin B3 (**10**) in 50% Ausbeute erhielten (Abbildung 11).^[70]

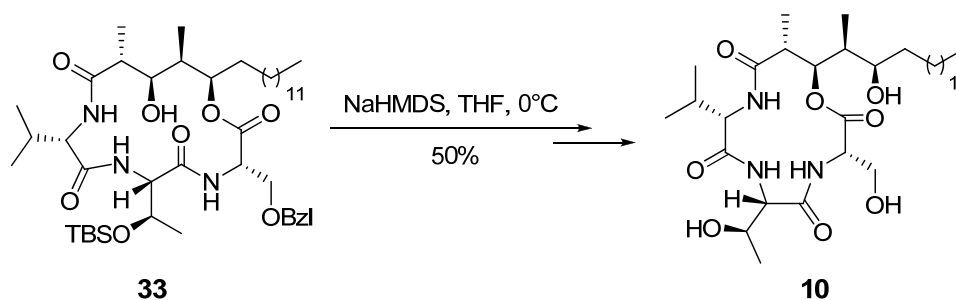


Abbildung 11: Umesterung von teilweise geschütztem Stevastelin B zu Stevastelin B3 (**10**).

Durch seine vielversprechende biologische Aktivität und den sehr kleinen 13-gliedrigen Makrozyklus, stellt besonders Stevastelin C3 ein interessantes Depsipeptid dar, welches möglicherweise als rigides Templat zur Untersuchung konformations-abhängiger biologischer Aktivität verwendet werden kann.

2.3 Konformationsanalyse

2.3.1 Peptidische Strukturelemente

Peptide sind aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaut, unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, sondern auch in der räumlichen Anordnung der Aminosäurereste und des Rückgrats. Da sowohl die selektiven biologischen Eigenschaften zyklischer Depsipeptide als auch der Zyklisierungserfolg eng mit der Konformation der betrachteten Verbindungen zusammenhängt, sind in der heutigen

Forschung Konformationsuntersuchungen unerlässlich. Hierbei werden unterschiedliche Strukturelemente der zyklischen Verbindungen untersucht.

Die Konformation des Peptidrückgrats wird durch Bindungslängen und -winkel, sterische Hinderung, intramolekulare Wechselwirkungen sowie drei Torsionswinkel bestimmt. Auch äußere Einflüsse wie die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel oder intermolekulare Wechselwirkungen mit anderen Molekülen beeinflussen die Geometrie des Peptids. Die Diederwinkel des Rückgrats eines Peptides werden hierbei jeweils durch vier Atome angegeben (Abbildung 12).

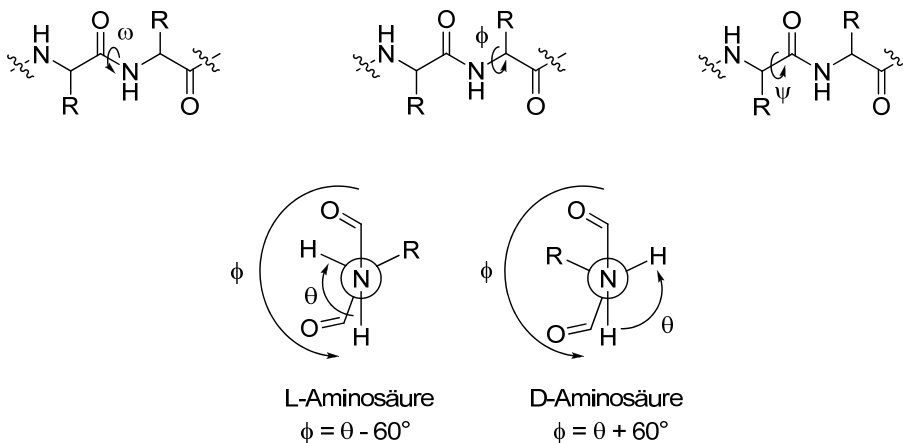


Abbildung 12: Verschiedene Torsionswinkel einer Peptidbindung.

Durch den partiellen Doppelbindungscharakter der C'-N Bindung liegt der Winkel ω , der durch die Atome C $^\alpha$ -C'-N-C $^\alpha$ definiert wird, in der Regel in 180° (*trans*-Peptidbindung) oder 0° (*cis*-Peptidbindung) vor. Die *trans*-Peptidbindung ist in den meisten Fällen energetisch begünstigt, in zyklischen Peptiden können jedoch durch auftretende Ringspannung Abweichungen auftreten. Der Diederwinkel ϕ wird von den Atomen C'-N-C $^\alpha$ -C' aufgespannt, und die Atome N-C $^\alpha$ -C'-N definieren den Torsionswinkel ψ .

Häufig wird zur Beschreibung der Konformation zyklischer Peptide das Rückgrat des Rings mit Sekundärstrukturelementen für Proteine verglichen. Hierbei nehmen besonders die sogenannten Schleifen eine wichtige Rolle ein, welche in Proteinen oft in intermolekularen Erkennungsprozessen involviert sind. Die sogenannten β -Schleifen sind durch vier Aminosäuren definiert (Tabelle 3), die durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe einer Aminosäure i und dem Amin der dazugehörigen Aminosäure $i+3$ gekennzeichnet sind. Fehlt diese Wasserstoffbrückenbindung, bezeichnet man dieses Strukturelement als offene Schleife.

Winkel	β -Schleifen Klassifizierung					
	I	I'	II	II'	III	III'
ϕ_{i+1}	-60	60	-60	60	-60	60
ψ_{i+1}	-30	30	120	120	-30	30
ϕ_{i+2}	-90	90	80	80	-60	60
ψ_{i+2}	0	0	0	0	-30	30
Häufigkeit	42%	3%	15%	5%	18%	3%

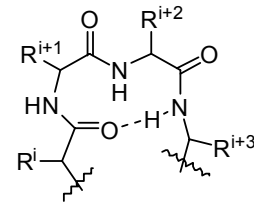


Tabelle 3: Durch Torsionswinkel definierte β -Schleifen.

Durch definierte Diederwinkel im peptidischen Rückgrat des Makrozyklus sowie durch die Angabe von Bindungslängen und -winkel kann so die dreidimensionale Struktur eines gegebenen zyklischen Depsipeptides beschrieben werden. Durch sie wird auch die Ausrichtung der Aminosäurereste bestimmt. Bei einer starren Struktur ergibt sich dadurch eine definierte Ausrichtung möglicher Enzym-Bindungsstellen.

Um nun die Konformation eines Peptides zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Kristallstrukturen liefern genaue Bindungslängen und Winkel, haben aber den Nachteil, dass sie ausschließlich die dreidimensionale Struktur der kristallinen Verbindung zeigen. Diese kann zum einen von der in Lösung vorliegenden Konformation abweichen und gibt zum anderen keinerlei Hinweise auf die Flexibilität und den Konformationsraum des betrachteten Moleküls. In Kraftfeldrechnungen hingegen kann neben der energieärmsten Konformation die Flexibilität untersucht werden. Durch das Absuchen des gesamten Konformationsraumes ist es zudem möglich weitere lokale Minima zu ermitteln. Da wegen eines immensen Rechenaufwandes jedoch in den seltensten Fällen Wasser als Lösungsmittel explizit berücksichtigt wird, kann sich auch diese ermittelte Konformation von der in natürlicher Umgebung vorliegenden unterscheiden. Mit Hilfe von experimentell ermittelten Daten, wie zum Beispiel Proton-Proton Abständen aus NMR-Experimenten, können diese Rechnungen weiter verfeinert werden, um ein möglichst realistisches Ergebnis zu liefern. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch die berechnete Konformation in Lösung von der aktiven Konformation am Rezeptor abweichen kann, die z.B. durch eine wesentlich hydrophobere Umgebung beeinflusst werden kann.

2.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen

NMR-spektroskopische Untersuchungen liefern wichtige Hinweise auf die Konformationen untersuchter Peptide. Des Weiteren können aus NMR-Experimenten gewonnene Informationen als Randbedingungen in computerunterstützte Konformationssuchen einfließen.

Zunächst müssen alle Protonresonanzen des untersuchten Moleküls korrekt zugeordnet werden. Hierzu bedient man sich zweidimensionaler Spektren, die auf der Korrelation skalar koppelnder Kerne beruhen. Homonukleare TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)-Spektren^[71] zeigen im Gegensatz zu den verwandten COSY (Correlation Spectroscopy)-Spektren^[72] nicht nur Kreuzkopplungen über 2-3 Bindungen, sondern über das gesamte Spinsystem. So können innerhalb eines Spinsystems alle Kerne miteinander korreliert und somit im Fall von Peptiden einer einzelnen Aminosäure zugeordnet werden. Bei Problemen durch Signalüberlagerungen und zur Zuordnung von ¹³C-Signalen werden heteronukleare Korrelationsspektren gemessen. Wenn die Anregung und Detektion über die Protonkerne erfolgt, wird eine drastische Erhöhung der Empfindlichkeit für die ¹³C-Kerne erreicht. ¹H-¹³C-gHSQC (Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence)-Spektren^[73] zeigen Kreuzsignale für Kerne mit direkter Konnektivität. Aus diesem Grund sind weder quartäre Kohlenstoffe noch Protonen, welche nicht an Kohlenstoffatome gebunden sind (NH, OH,...) zu erkennen. Um diese dennoch zuordnen zu können, werden gHMBC (Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence)-Spektren^[74, 75] benötigt. Über ein ¹H-¹³C-gHMBC können heteronukleare Kopplungen über 2-3 Bindungen sichtbar gemacht werden, wodurch neben der Sequenzaufklärung unbekannter Peptide auch die Zuordnung quartärer Kohlenstoffe und NH-Protonen möglich ist.

Nach Zuordnung aller Signale können konformationsrelevante Parameter ermittelt werden. Da vicinale Kopplungskonstanten von der räumlichen Anordnung der koppelnden Kerne zueinander abhängen, können mit Hilfe der Karplus-Gleichung Diederwinkel berechnet werden (Formel 1).^[76, 77]

$${}^3J(\text{NH} - \text{CH}^\alpha) = A \cdot \cos^2(\theta) + B \cdot \cos(\theta) + C \quad \text{Formel 1}$$

Der Diederwinkel θ wird von den Atomen $\text{HNC}^\alpha\text{H}^\alpha$ aufgespannt und kann in den gebräuchlicheren Winkel ϕ ($\text{C}'\text{NC}^\alpha\text{C}'$) umgerechnet werden (vgl. Abbildung 12). Die Konstanten A, B und C sind hierbei empirisch ermittelte Werte aus intensiven Studien verschiedener Peptide und Modelverbindungen^[78] (Abbildung 13).

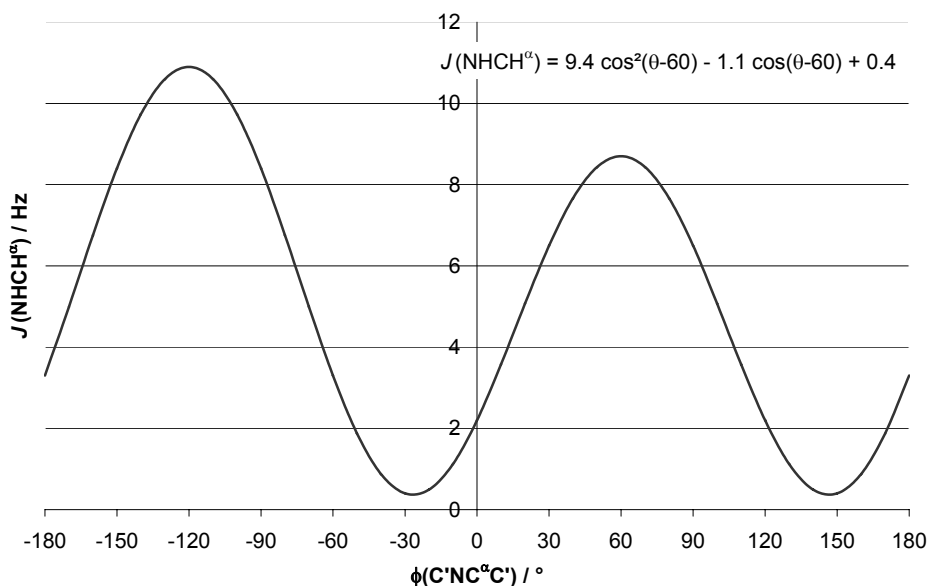


Abbildung 13: Karplus-Kurve mit den von Bystrov ermittelten Werten für Peptide.^[76, 77]

Da sich bei der Lösung der *Formel 1* jedoch mehrere mögliche Winkel pro Kopplungskonstante ergeben können und zudem eine Mittelung über Fluktuationen des Moleküls eintritt, fehlt zunächst die Eindeutigkeit dieses Parameters. Es bietet sich daher an ihn erst zur Validierung berechneter Strukturen heranzuziehen.

Um schließlich Proton-Proton Abstände ermitteln zu können, werden NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)-Spektren^[79] oder ROESY (Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)-Spektren^[80] gemessen. Aus den Volumina der Kreuzsignale können Abstände von Protonen in räumlichen Nähe ($< 5 \text{ \AA}$) abgeleitet werden. Da NOE-Signale von der Korrelationszeit τ_c und somit vom Molekulargewicht abhängen, können sie sowohl negativ (große Moleküle), positiv (kleine Moleküle) als auch Null (mittelgroße Moleküle) sein. Besonders bei einem Molekulargewicht von 500-800 g/mol besteht die Gefahr, dass die Korrelationszeit τ_c den NOE aufhebt und somit kein Signal zu beobachten ist (Abbildung 14).

Dieses Problem kann mit ROESY-Experimenten umgangen werden, welche ebenso Informationen über den Abstand verschiedener Nuklei zueinander liefern, jedoch immer positive Werte liefern. Des Weiteren ist der ROE weniger abhängig von der Korrelationszeit τ_c und Austauschsignale, die durch gleichartige Protonen in unterschiedlichen Konformationen eines Peptides hervorgerufen werden, sind einfacher von ROESY-Signalen zu unterscheiden, da sie ein umgekehrtes Vorzeichen aufweisen.

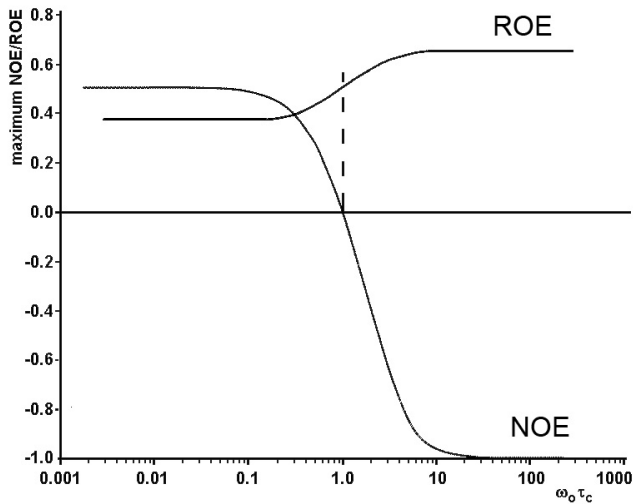


Abbildung 14: Abhängigkeit der NOE- bzw. ROE-Signale von der Korrelationszeit.

Da die Intensität der ROE-Signale umgekehrtproportional zur sechsten Potenz des Abstands der beobachteten Kerne i und j ist (r_{ij}^{-6}), können nach Berechnung der Volumina aller Kreuzsignale Abstände berechnet werden. Hierbei wird angenommen, dass das Molekül während der Relaxation starr ist, so dass eine einheitliche und ortsunabhängige Korrelationszeit der einzelnen Kerne vorliegt. Weiterhin wird angenommen, dass die Wechselwirkung zwischen zwei Kernen stattfindet (Zwei-Spin-Näherung). Aufgrund dieser Näherungen weisen alle berechneten Abstände (r_{ij}) mindestens eine Ungenauigkeit von $\pm 10\%$ auf. Durch die Abhängigkeit der ROE-Signale von der Spinlockfeldstärke ist außerdem eine Offset-Korrektur erforderlich, bei der die Abnahme der Signalintensität in Abhängigkeit von der Entfernung zum Transmitterzentrum, also der Spektrumdiagonale, korrigiert wird.^[81]

Zur Kalibrierung der Abstände werden meist zwei geminale Protonen einer Methylengruppe herangezogen, die 1.8 \AA voneinander entfernt sind. Anschließend kann der Abstand r der beiden Protonen i und j über ihr Signalvolumen V_{ij} berechnet werden (Formel 2).

$$r_{ij} = r_{ref} \sqrt[6]{\frac{V_{ref}}{V_{ij}}}$$

Formel 2

2.3.3 Moleküldynamische Simulationen

In den letzten Jahren ist die computerunterstützte Konformationsanalyse nicht mehr aus der modernen Chemie wegzudenken. Sie trägt in Kombination mit NMR- und Röntgen-Analysen zur Konformationsaufklärung zahlreicher Moleküle bei und unterstützt das logische Inhibitoren-Design zur Entwicklung neuer Medikamente sowie zum Verständnis wichtiger enzymatischer Prozesse.

Statt komplizierter und rechenaufwendiger „*ab initio*“ oder semiempirischer Rechnungen bedient man sich bei der Konformationssuche für komplexe Moleküle der Kraftfeldmethoden. Hierzu wird davon ausgegangen, dass es je nach Art der Atomkerne sowohl ideale Bindungslängen als auch Bindungswinkel gibt. Wird aufgrund gegebener Molekülstrukturen eine Abweichung von diesen Idealen beobachtet, so kann über klassische Potentialfunktionen die dadurch verursachte Energieerhöhung berechnet werden (Formel 3).

$$E = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsionswinkel}} + E_{\text{elektrostatisch}} + E_{\text{vanderWaals}} \quad \text{Formel 3}$$

In diesen Berechnungen werden sowohl kovalente als auch nicht kovalente Wechselwirkungen berücksichtigt. In Abhängigkeit von der dreidimensionalen Struktur eines Moleküls kann dessen Energie in der sogenannten Energie-Hyperfläche aufgetragen werden (Abbildung 15). Die hierfür verwendeten Parameter und Potentialfunktionen sind in den sogenannten Kraftfeldern festgelegt. Das OPLS_2005 (optimized potentials for liquid simulations) Kraftfeld wurde speziell für solvatisierte und zyklische Peptide entwickelt.^[82]

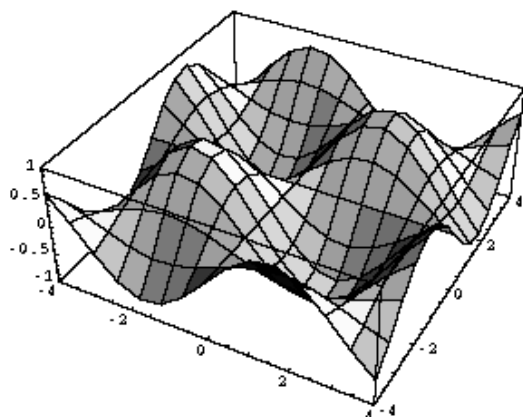


Abbildung 15: Potential-Hyperfläche einer Struktur in Abhängigkeit von ihrer Konformation.

Besonders wichtig für die Konformationssuche ist das Auffinden der lokalen und des globalen Minimums der Energie-Hyperfläche, da diese die stabilen Konformere des untersuchten Moleküls darstellen. Um von einem beliebigen Punkt auf der Energie-Hyperfläche das nächstgelegene Energieminimum zu finden, wurden unterschiedliche Methoden entwickelt. Eine sehr häufig verwendete Methode wird „truncated Newton conjugated gradient“ (TNCG)^[83] genannt. In den verschiedenen Newton Verfahren werden sowohl die erste als auch die zweite Ableitung der Energiepotentialgleichung berechnet. Da dies ein zeitaufwendiges Unterfangen ist, werden mit Hilfe des konjugierten Gradienten die zweiten Ableitungen nur indirekt behandelt ohne wirklich berechnet zu werden. So kann mit Hilfe des eingeschränkten Newton Verfahrens (truncated Newton) wesentlich schneller Konvergenz erreicht werden.

Da jedoch mehrere Energieminima existieren, die bei einer Konformationssuche möglichst alle gefunden werden sollten, wird eine weitere Methode benötigt, um aus einem gefundenen Minimum heraus das nächste zu finden. Eine Möglichkeit hierfür stellt das 1997 von István Kolossváry entwickelte „low-mode“ (LMOD) Verfahren dar.^[84] Der Suchalgorithmus basiert auf Eigenvektoren der Hesse-Matrix, also der zweiten Ableitung der Energiefunktion und tastet die Oberfläche über die miteinander verbundenen Sattelpunkte ab. Somit wird die Energiehyperfläche durch behutsame aber effektive Störungen der Molekülstruktur mit Hilfe niederfrequenter Schwingungen systematisch nach Minima abgesucht.

Eine besondere Schwierigkeit für die Konformationssuche stellen zyklische Verbindungen mit vielen Freiheitsgraden dar, da diese häufig mehrere energetisch niedrige Konformationen aufweisen. Aus diesem Grund ist darauf zu achten, dass die gesamte Energiehyperfläche abgesucht wird und die Suche nicht vorzeitig abgebrochen wird. Weiterhin ist die Generierung geeigneter Startstrukturen ein nicht zu unterschätzendes Problem, da eine wahllose Rotation um Bindungen in einem geschlossenen Ring nicht möglich ist. Um dieses Problem zu adressieren, können die durchgeführten Rechnungen zur Kontrolle mit neuen, manuell generierten Startgeometrien wiederholt werden.

2.4 Biologische Zielverbindungen

2.4.1 Phosphatasen

Phosphatasen spielen eine essentielle Rolle bei der Kontrolle physiologischer Prozesse.^[85-87] Besonders viele Signalwege werden innerhalb komplexer Netzwerke über den Phosphorylierungsgrad verschiedener Enzyme gesteuert. Kinasen katalysieren hierbei die Phosphorylierung und Phosphatasen die Dephosphorylierung. Störungen der normalen Aktivitäten der beiden entgegengesetzt wirkenden Enzymklassen zeichnen Krankheiten wie Diabetes, Krebs oder Immunschwächen aus. Während Kinasen in der pharmazeutischen Industrie bereits die zweithäufigste Zielverbindung darstellen, werden Phosphatasen gerade erst als solche entdeckt.^[87, 88]

Phosphatasen können in zwei verschiedene Klassen unterteilt werden, die sich sowohl strukturell als auch mechanistisch voneinander unterscheiden. Die Serin/Threonin spezifischen Protein Phosphatasen liegen als Holoenzyme vor und katalysieren durch zwei Metallionen im aktiven Zentrum die direkte Hydrolyse ihrer phosphorylierten Substrate (Abbildung 16). Die Art der Metallionen ist in vielen Phosphatasen unbekannt, häufig liegen jedoch Fe^{2+} , Mn^{2+} oder Zn^{2+} Ionen vor. Diese koordinieren ein Wassermolekül oder Hydroxidion, welches am ebenfalls vorkoordinierten Phosphoserin oder -threonin zu einer direkten Hydrolyse des phosphorylierten Substrates führt. Serin/Threonin spezifische Phosphatasen kontrollieren durch verschiedenste Kombinationen katalytischer und regulierender Domänen eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. die Muskelkontraktion, den Zellzyklusverlauf und den Glycogen Metabolismus.^[89]

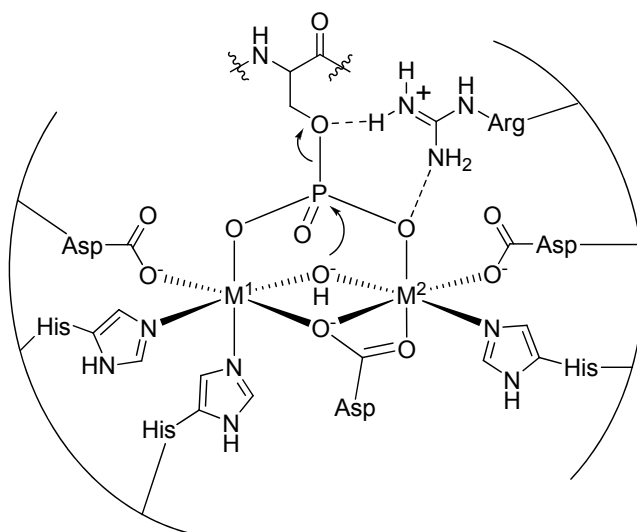


Abbildung 16: Hydrolyse-Mechanismus der Serin/Threonin spezifischen Phosphatasen.

Die zweite Klasse der Phosphatasen wird von den Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP) gebildet, welche das gemeinsame Aminosäure-Motiv HCX₅R im aktiven Zentrum aufweisen. Das Phosphotyrosin (pTyr) wird für den Hydrolyseschritt zunächst vom Arginin des PTP-Motivs vorkoordiniert und bringt es so in die direkte Nachbarschaft des Cysteins (Abbildung 17). Ein Asparaginsäure katalysierter nukleophiler Angriff der Cysteinseitenkette auf das pTyr führt zu einem Phosphocystein-Intermediat, welches schließlich durch ein aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert wird. Durch die Rolle der Cysteins im katalytischen Mechanismus ist diese Enzymklasse sensibel gegenüber reversibler Oxidation. Es konnte gezeigt werden, dass PTPs in der Signalweiterleitung sowohl als positive als auch als negative Regulatoren eine wichtige Rolle spielen können.^[90-93]

Neben den klassischen Phosphotyrosin-spezifischen Phosphatasen gehören auch die dualspezifischen Phosphatasen (DSP) zu den PTPs.^[94-96] Diese besitzen zwar das gleiche Aminosäure-Motiv im aktiven Zentrum wie die klassischen PTPs, sind jedoch in der Lage neben pTyr auch pSer bzw. pThr zu dephosphorylieren. Über das klassische HCX₅R Motiv hinaus zeigen sie untereinander wenig Ähnlichkeit in Struktur und Sequenz.

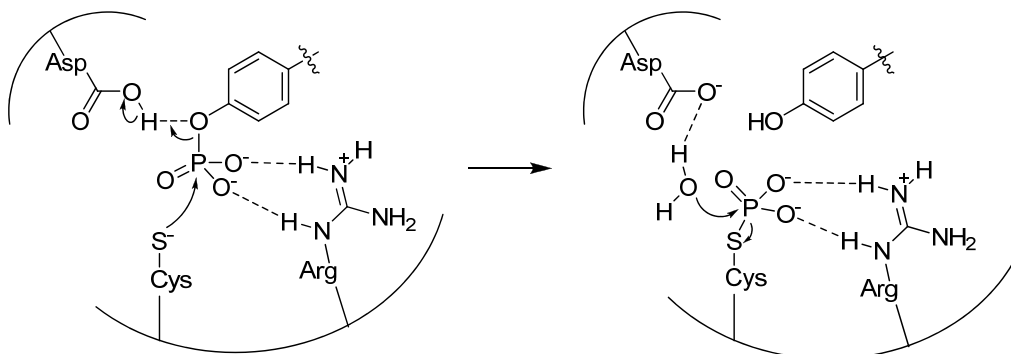


Abbildung 17: Hydrolyse-Mechanismus der Tyrosin spezifischen Phosphatasen.

Eine große Gruppe der DSPs spielt eine bedeutende Rolle bei der Deaktivierung der Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK), welche ein YXT Phosphorylierungs-Motiv in der Kinase-Aktivierungsschleife aufzeigen. Diese sogenannten MAPK Phosphatasen (MKP) zeigen hohe Spezifität gegenüber verschiedenen MAPKs. Sie wirken nach kontrollierter Aktivierung den MAPK induzierten Signalwegen durch Dephosphorylierung beider phosphorylierten Aminosäuren entgegen.

2.4.2 VHR

Die erste dualspezifische Phosphatase VH-1 wurde 1991 aus dem *vaccinia* Virus isoliert.^[97] Die humane Variante VHR (VH-1 related) ist eine 21 kDa große Phosphatase, die ausschließlich aus einer katalytisch aktiven Domäne besteht.^[98, 99]

Es konnte gezeigt werden, dass VHR durch die Kinase ZAP-70 phosphoryliert und somit aktiviert wird (Abbildung 18).^[100] ZAP-70 spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort der Zelle und wird nach Stimulierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) aktiviert.

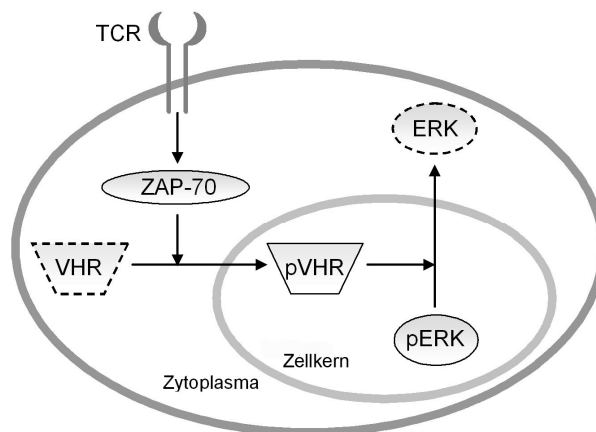


Abbildung 18: VHR Aktivierung durch ZAP-70 vermittelte Phosphorylierung während der Immunantwort.

Auch die Kinase VRK3 (vaccinia related kinase 3) ist in der Lage VHR zu aktivieren (Abbildung 19), jedoch phosphoryliert sie VHR nicht, sondern bindet direkt an die dualspezifische Phosphatase.^[101] VRK3 wird im Gegensatz zu ZAP-70 nicht nur im Immunewebe, sondern auch in Hoden, Gebärmutterhals und Niere exprimiert.

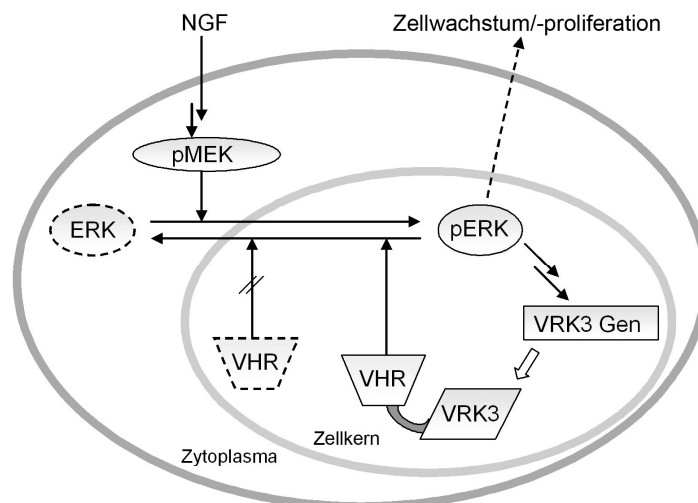


Abbildung 19: Aktivierung der VHR durch direkte Bindung der Kinase VRK3.

Substrate für VHR sind die Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) ERK und JNK.^[102-104] Interessanterweise besitzt VHR jedoch keine MAPK-Bindungsdomäne, was sie von anderen MAPK-Phosphatasen (MKP) unterscheidet.^[95] Da das phosphorylierte ERK seinerseits in der Lage ist VRK3 Expression zu induzieren, stellt die VRK3 vermittelte Aktivierung von VHR eine Feedback-Schleife zur Aktivierung des ERK-Signalweges dar (Abbildung 19).^[101] Neben der negativen Regulierung der T-Zell-Rezeptor induzierten ERK und JNK Aktivierung sowie der Kontrolle des ERK-Signalweges über die Feedback-Schleife spielt VHR bei der Regulierung des Zellzyklus eine wichtige Rolle.^[105] Die Unterdrückung der VHR Expression durch iRNA (interference RNA) führte zu einem Stillstand des Zellzyklus in der G1/S und G2/M Phase und zu Anzeichen von Zellalterung. Der Stillstand ist von einer Hyperphosphorylierung von ERK und JNK abhängig, welche bei Inaktivierung von VHR auftritt.

Bisher sind neben den Stevastelinen nur wenige VHR-Inhibitoren bekannt (Abbildung 20).^[40, 106-109] 4-Isoavenaciolid (4-iA; **34**) ist aufgrund seines Michael-Akzeptors ein irreversibler und noch dazu unspezifischer Inhibitor, der auch verschiedene andere PTPs inhibiert. In VHR banden zwei Moleküle kovalent an das sich im aktiven Zentrum befindende Cystein (Cys-124), sowie an ein weiteres Cystein an der Enzymoberfläche (Cys-171). Einige Tetronsäuren, die auf der Grundstruktur des RK-682 (**35**) basieren, inhibierten ebenso die Phosphatase-Aktivität der VHR, wobei der genaue Wirkmechanismus trotz intensiver Untersuchungen ungeklärt blieb.^[108]

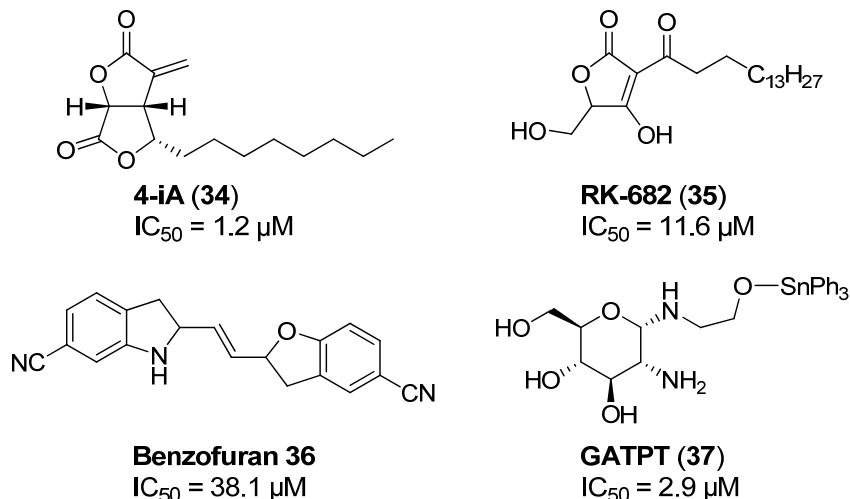


Abbildung 20: Bekannte Inhibitoren der dualspezifischen Phosphatase VHR.

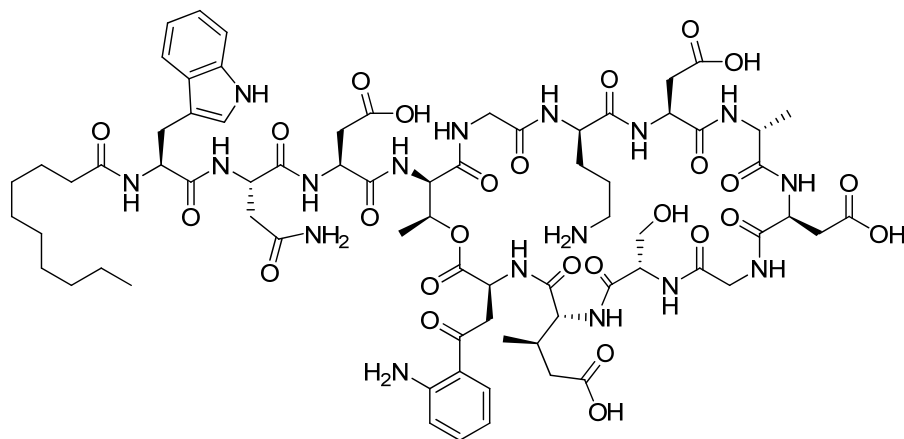
Weiterhin wurde Benzofuran **36** als Inhibitor identifiziert, welcher selektiv in Bezug auf die dualspezifischen Phosphatasen MKP-3 und cdc25 wirkt, jedoch MKP-1 in etwa gleicher Effektivität inhibiert.^[107] Vor kurzem wurde schließlich GATPT (**37**,

(*glucosamine-aminoethoxy*)*triphenyltin*) entwickelt, dass *in vitro* sehr gute Inhibition von VHR aufwies und in zellulären Studien Auswirkungen auf den Phosphorylierungsgrad der MAP Kinase ERK zeigte.^[106]

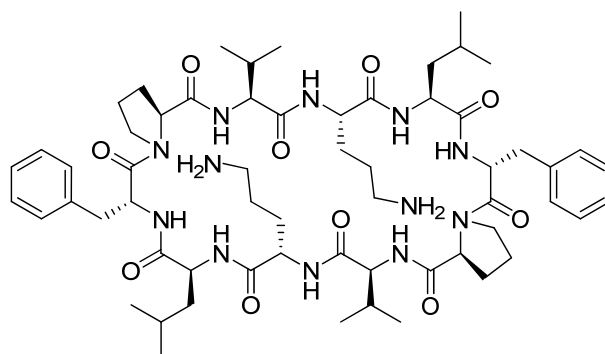
Zusätzliche, wirksame VHR-Inhibitoren könnten zur weiteren Untersuchung der physiologischen Funktion der dualspezifischen Phosphatase beitragen und als Startstrukturen zur Entwicklung von Immunsuppressiva dienen.

2.4.3 Bakterien

Einige zyklische Depsipeptide weisen antibakterielle Eigenschaften auf. Insbesondere zyklische Lipopeptide (CLP) sind für ihre antibiotische Wirkung bekannt (Abbildung 21). Daptomycin (**38**, Handelsname: Cubicin[®], europäische Zulassung 2006) ist der erste Vertreter dieser Klasse, der sich als Arzneistoff gegen Haut- und Weichteilinfektionen mit grampositiven Bakterien auf dem Markt befindet.^[110] Er ist auch dann noch wirksam, wenn bereits Resistenzen gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin auftreten.



Daptomycin (Cubicin); **38**



Gramicidin S (**39**)

Abbildung 21: Das bakterizid wirkende zyklische Depsipeptid Daptomycin und das antibakterielle Zykloopeptid Gramicidin S.

Daptomycin (**38**) ist ein Depsipeptid, dessen Makrozyklus aus zehn Aminosäuren aufgebaut ist und das wegen seiner hydrophobe Decanoylkette den Lipopeptiden zugeordnet wird. Nach einem Calcium abhängigen Einbau des Lipopeptides in die Zellmembran von grampositiven Bakterien strömen durch die gebildeten Poren vermehrt Kaliumionen aus der Zelle. Die so verursachte Depolarisierung des Membranpotentials führt schließlich zum bakteriziden Effekt des Wirkstoffes.

Auch das zyklische Decapeptid Gramicidin S (**39**) lagert sich in die Zellmembran ein und verändert die Ionenpermeabilität der Membran.^[111] Gramicidin S weist sowohl antibiotische Wirkung gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien auf.

Neben diesen relativ großen zyklischen Peptiden und Depsipeptiden, treten jedoch auch kleinere Makrozyklen mit antibiotischer Wirkung auf. Die Klasse der bereits erwähnten 13-gliedrigen Lydiamycine (vgl. **8**, Abbildung 3) zeigte z.B. antibakterielle Wirkung gegen verschiedene Mykobakterien.^[38]

Wegen der häufig auftretenden Resistenzen gegen bereits bekannte Antibiotika ist die Nachfrage nach neuen Wirkstoffen immens. Insbesondere Verbindungen mit neuen Wirkmechanismen sind von großer Bedeutung und ständiges Ziel der Pharmaforschung.

3. Ziel der Arbeit

Für das detaillierte Verständnis physiologischer Vorgänge und die Bereitstellung neuer Wirkstoffe ist die Entwicklung effektiver und selektiver Inhibitoren in der aktuellen Forschung von immenser Bedeutung. Naturstoffe spielen hierbei eine Schlüsselrolle. Besonders peptidische und depsipeptidische Makrozyklen, die durch ihre Sequenz und Größe oft eine eingeschränkte Flexibilität aufweisen und häufig gerade deshalb zu einer starken Proteinbindung führen, stellen attraktive Ziele der Wirkstoffsynthese und -entwicklung dar.

Um die Rolle der dreidimensionalen Struktur gespannter Makrozyklen für ihre biologische Aktivität zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit 13-gliedrige Zyklodepsipeptide untersucht werden, die auf der Struktur des Naturstoffs Stevastelin C3 (**11**) beruhen.^[39, 112] Diese Zyklodepsipeptid-Analoga (**40**) sind aus den drei natürlichen Aminosäuren L-Ser, L-Thr und L-Val sowie einer β -Hydroxysäure aufgebaut (Abbildung 22). Im Gegensatz zum natürlichen Stevastelin C3 (**11**, vgl. Abbildung 3) liegt die Serinseitenkette benzyliert vor. Auf diese Weise wird eine weitere, selektive Derivatisierung am freien Threonin möglich. Desweiteren kann die β -Hydroxysäure ohne Verlust der biologischen Aktivität vereinfacht werden.^[64] Das Stereozentrum an Position C-4 scheint nicht essentiell für die Inhibition zu sein.

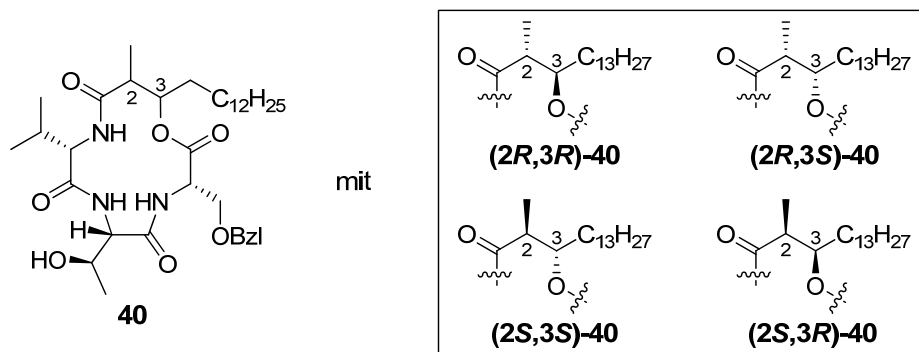


Abbildung 22: Diastereomere Stevastelin C3 Analoga.

Zunächst sollte eine einfache und flexible Strategie zur Synthese einer Serie von Stevastelin C3 Analoga (**40**) entwickelt werden, die sich insbesondere durch die Konfiguration verschiedener Stereozentren im zyklischen Rückgrat unterscheiden. Im Anschluss sollte der Einfluss dieser strukturellen Veränderungen auf die Konformation der gespannten 13-gliedrigen Makrozyklen untersucht werden, wozu NMR-Experimente sowie computerunterstützte Kraftfeldrechnungen herangezogen werden sollten.

3. Ziel der Arbeit

In der Natur werden Konformationsänderungen häufig durch selektive Phosphorylierungen erzielt. In Anlehnung an dieses Phänomen sollte auch der Einfluss einer Phosphorylierung auf die Konformation der Zyklodepsipeptide untersucht werden. Hierzu sollte in dieser Arbeit ausgehend von den Stevastelin Analoga **40** eine Syntheseroute zu den phosphorylierten Derivaten **41** entwickelt werden (Abbildung 23).

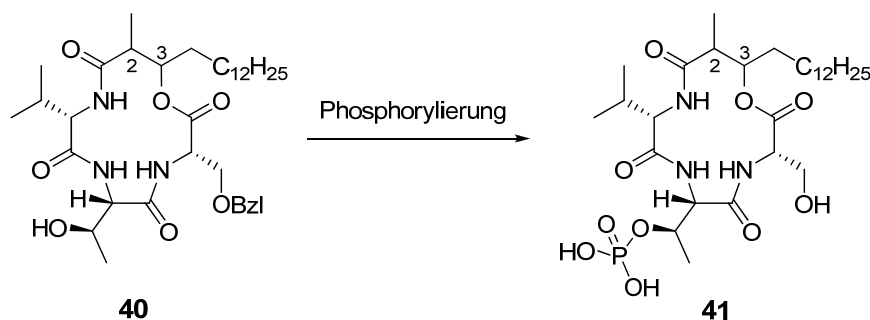


Abbildung 23: Synthese phosphorylierter Stevastelin C3 Analoga.

Neben den Unterschieden in der Stereochemie der Stevastelin C3 Analoga (**40**) sowie der Phosphorylierung sollten zudem einige 13-gliedrige Zyklodepsipeptide mit veränderter Aminosäuresequenz hergestellt werden. Durch zusätzliche hydrophobe oder sterisch anspruchsvollere Reste könnte so z.B. ein neues Bindungsmuster entstehen, das Einblicke in Art und Selektivität der Bindung an Zielproteine geben könnte.

Die synthetisch erzeugten Unterschiede in der Stereochemie des makrozyklischen Depsipeptides sowie die Phosphorylierung könnten somit durch ihren Einfluss auf die Konformation der Makrozyklen Auswirkungen auf die biologische Aktivität der Verbindungen haben. Die Analoga mit veränderter Aminosäuresequenz könnten vollkommen neue Bindungspartner für Enzyme darstellen.

Erste Anhaltspunkte zur biologischen Aktivität der synthetisierten Stevastelin C3 Analoga (**40**) liefern die Aktivitäten der Naturstoffe. Natürliche Stevasteline zeigten in vorangegangenen Untersuchungen neben immunsuppressiver Aktivität Inhibition der dualspezifischen Phosphatase VHR (Abbildung 24).^[40]

Dualspezifische Phosphatasen sind insbesondere bei der Regulierung des Zell-Zyklus und der Signalweiterleitung durch mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) von großer Bedeutung, die wiederum die Immunantwort regulieren.^[95, 96]

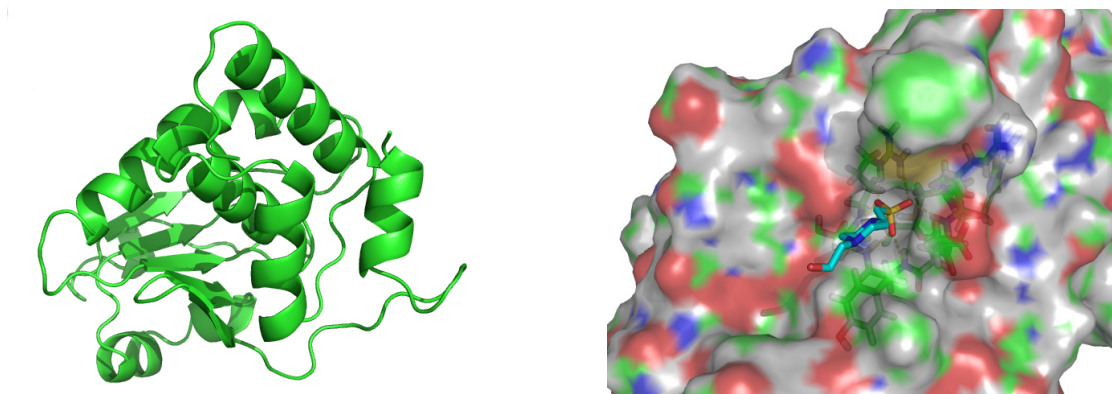


Abbildung 24: Kristallstruktur der dualspezifischen Phosphatase VHR.^[113]

Aus diesem Grund könnte ein besseres Verständnis der physiologischen Rolle dualspezifischer Phosphatasen wie VHR oder eine medikamentöse Unterbrechung bestimmter Signalweiterleitungen zur Therapie verschiedener Immunkrankheiten wie allergischem Asthma oder Rheumatoider Arthritis führen.^[96] Es sind jedoch bisher nur wenige VHR-Inhibitoren bekannt.^[40, 106-109] Die zu synthetisierenden Stevastelin C3 Analoga (**40**, **41**) sollten deshalb in einem Phosphatase Assay auf ihre inhibitorischen Eigenschaften bezüglich dieses Enzym untersucht werden.

Des Weiteren sind einige Zyko(depsi)peptide bekannt, die eine antibakterielle Wirkung aufweisen, weswegen die hergestellten zyklischen Lipopeptide zusätzlich auf diese Eigenschaft getestet werden sollten.^[10, 114, 115]

Durch gezielte synthetische Variation der Naturstoffanaloga, der Untersuchung des Einflusses der Modifikationen auf die Konformation und Flexibilität der Makrozyklen sowie die Auswirkung der erzielten strukturellen Veränderungen auf die biologische Wirkung der Zyklodepsipeptide sollte ein Einblick in die Wirkungsweise gespannter 13-gliedriger Ringe auf ihre biologische Aktivität ermöglicht werden.

Basierend auf diesen Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob 13-gliedrige Depsipeptide als rigide Template zur definierten räumlichen Anordnung potentieller Enzymbindungsgruppen im Raum geeignet sind. Durch den Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität und Konformation der Depsipeptide sollte eine Aussage über die Affinität und Selektivität der untersuchten dualspezifischen Phosphatase VHR erarbeitet werden. Dies sollte schließlich zu einem tieferen Verständnis der physiologischen Aufgaben der Phosphatase oder zu neuen Leitstrukturen für die Entwicklung von Therapeutika führen.

4. Spezieller Teil

4.1 Synthese

4.1.1 Syntheseplan

Zunächst sollten die Stevastelin C3 Analoga **40** (Abbildung 25) mit Variation der Stereochemie an Position C-2 und C-3 der β -Hydroxysäure hergestellt werden. Diese können auf die drei L-Aminosäuren Serin, Threonin und Valin, sowie eine β -Hydroxysäure zurückgeführt werden.

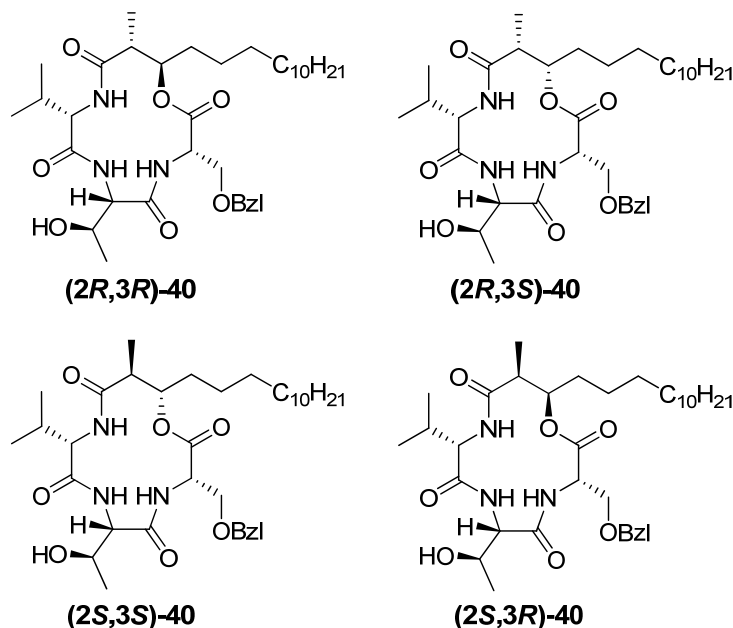


Abbildung 25: Geplante Zyklodepsipeptide.

Den Schlüsselschritt der Synthese stellte die Makrozyklisierung dar. Da eine Makrolaktamisierung wegen der höheren Nucleophilie des Amins gegenüber der Makrolaktonisierung häufig begünstigt ist, wurden drei mögliche Zyklisierungsstellen in Betracht gezogen: zwischen Valin und der β -Hydroxysäure (**A**), zwischen Valin und Threonin (**B**) oder zwischen Threonin und Serin (**C**) (Abbildung 26).

Wegen häufig benötigter harscher Bedingungen wurde angestrebt, die Veresterung möglichst früh in der Synthese durchzuführen, um eventuelle Nebenreaktionen zu vermeiden. Bei einem klassischen Aufbau des Depsipeptids vom C zum N-Terminus führten diese Überlegungen zu dem Zyklisierungsvorläufer **42** (retrosynthetischer Schnitt **A**), der durch eine Makrolaktamisierung zwischen der Säurefunktion der Hydroxysäure und dem Amin des Valins geschlossen werden sollte.

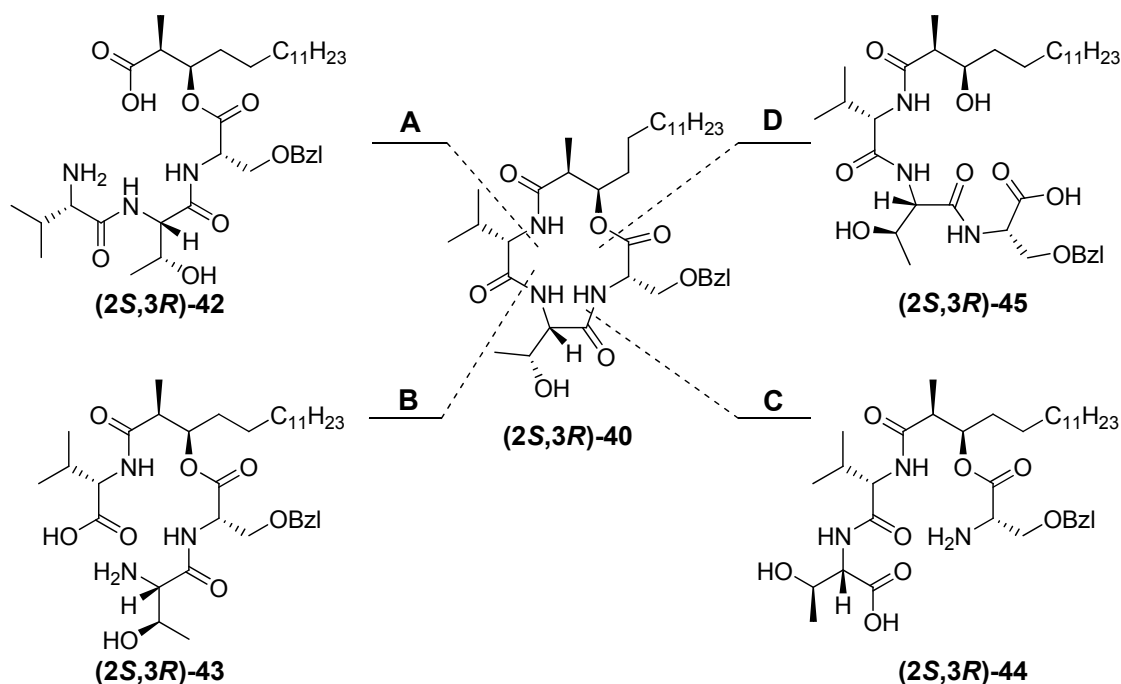


Abbildung 26: Retrosynthetische Überlegungen zur Öffnung des Makrozyklus’.

Um die Synthese des Esters **42** möglichst flexibel zu gestalten, wurde dessen Herstellung an der festen Phase geplant. Hierzu könnten verschiedene Harze verwendet werden. Würde ein sogenannter „safty-catch“ Linker verwendet,^[116, 117] so könnte das Depsipeptid nach Aktivierung des Linkers durch den Zyklisierungsschritt von der Festphase gespalten werden. Diese Art von Zyklisierungen ist jedoch häufig durch geringe Ausbeuten gekennzeichnet, und die Beladung des Harzes ist sehr empfindlich gegenüber Racemisierung des ersten Bausteins.

Alternativ kann ein 2-Chlorotrytylchloridharz verwendet werden,^[118, 119] von dem der Ester **42** unter milden, sauren Bedingungen abgespalten werden kann, um schließlich in Lösung zyklisiert zu werden.

Das immobilisierte Peptid **46** kann durch geeignete Schutzgruppenwahl und zweifache Peptidkupplung aus den beiden L-Aminosäuren Valin und Threonin sowie dem immobilisierten Ester **47** aufgebaut werden (Abbildung 27). Durch eine Veresterung kann dieser ausgehend von dem immobilisierten Alkohol **48** und Fmoc-Ser(OBzl)-OH hergestellt werden. Ein weiterer retrosynthetischer Schritt führt schließlich zur β -Hydroxysäure **49**.

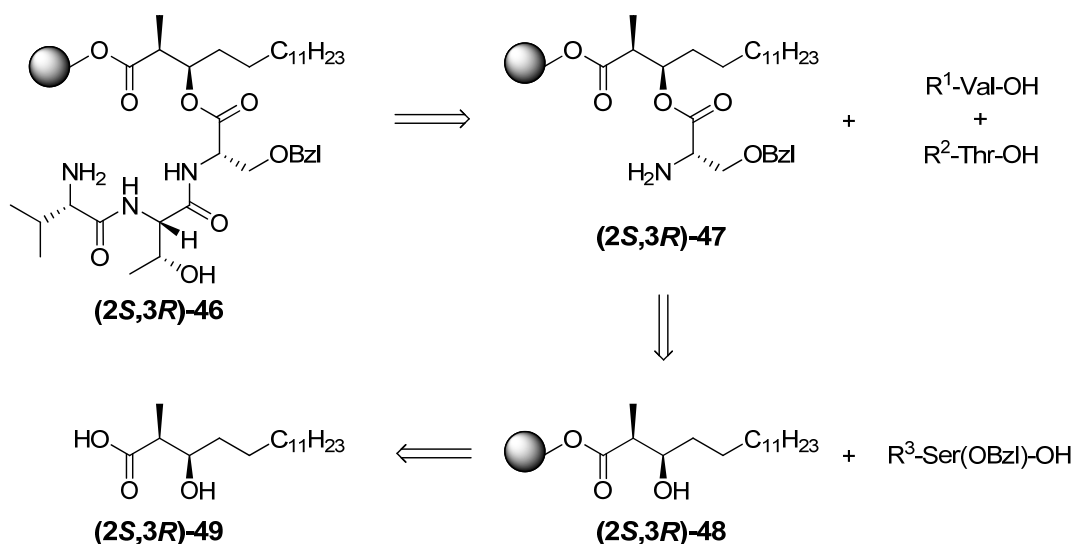


Abbildung 27: Retrosynthetische Betrachtung des Zyklisierungsvorläufers.

Da bei der Synthese die Stereochemie der Hydroxysäure variiert werden sollte, wurden Methoden benötigt, um diese stereoselektiv herzustellen. Die diastereomeren Säuren **49**, **ent-49**, **52** und **ent-52** können durch asymmetrische, auxiliargesteuerte Aldolreaktionen^[120-122] auf Tetradecanal (**51**) und chirale Propionsäureester **53** bzw. -amide **50** zurück geführt werden (Abbildung 28).

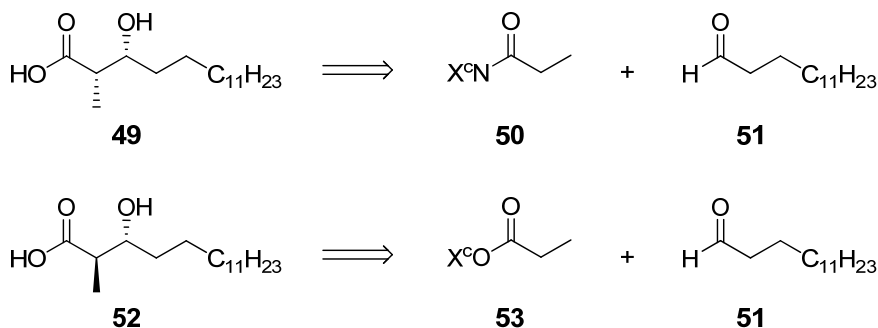


Abbildung 28: Retrosynthetische Betrachtung der Bausteinsynthese: X^c = chirales Auxiliar.

4.1.2 Darstellung der Bausteine

Die zur geplanten Synthese benötigten β -Hydroxysäuren **49**, **ent-49**, **52** und **ent-52** wurden mittels asymmetrischer Aldol-Additionen hergestellt. Tetradecanal (**51**) wurde durch Oxidation mit *o*-Iodoxybenzoesäure (IBX, **55**)^[123, 124] aus dem kommerziell erhältlichen Tetradecanol (**56**) in 89% Ausbeute synthetisiert (Abbildung 29). Das hypervalente Iodreagenz IBX (**55**) wurde mit Kaliumbromat aus 2-Iodbenzoesäure

(**54**) dargestellt.^[125] Die Oxidationen mit PCC^[126] lieferte Tetradecanal (**51**) in etwas geringerer Ausbeuten (75%).

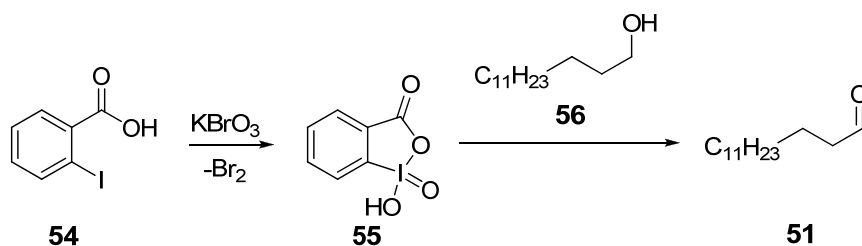


Abbildung 29: IBX vermittelte Oxidation von Tetradecanol zu Tetradecanal.

Durch eine asymmetrische Evans Aldol-Addition^[120, 122] wurden die *syn*-konfigurierten β -Hydroxysäuren **49** und **ent-49** synthetisiert. Die hierfür benötigten acylierten Oxazolidinone **60** und **ent-60** wurden in drei Schritten nach bekannten Verfahren in sehr hohen Ausbeuten aus L- bzw. D-Phenylalanin (**57**, **ent-57**) hergestellt (Abbildung 30).^[127] Mit aus Iod und Natriumborhydrid *in situ* generiertem BH_3 wurde zunächst die Carbonsäure **57** in 92% Ausbeute zum Alkohol **58** reduzierte. Anschließend wurde der Aminoalkohol **58** mit Diethylcarbonat in das Oxazolidinon **59** überführt und mit Propionylchlorid in 88% Ausbeute zu Imid **60** umgesetzt.

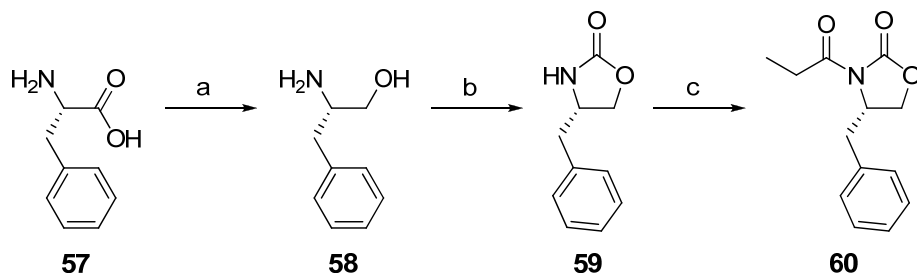


Abbildung 30: Synthese der acylierten Evans-Auxiliare: a) NaBH_4 , I_2 , THF, Rückfluss, 92%; b) $(\text{EtO})_2\text{CO}$, K_2CO_3 , Δ , 77%; c) $n\text{BuLi}$, Propionylchlorid, THF, -78°C , 88%.

Die durch $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$ und DIPEA generierten *Z*-konfigurierten Borenolate (**61**) der Imide **60** bzw. **ent-60** wurden bei -78°C mit frisch destilliertem Tetradecanal (**51**) versetzt. Die *syn*-Aldol Produkte **62** und **ent-62** wurden so in einem Diastereomerenverhältnis von 92:8 erhalten (Abbildung 31). Nach erfolgreicher Trennung der Diastereomere wurden die in 80% Ausbeute erhaltenen enantiomerenreinen Imide **62** bzw. **ent-62** mit LiOH und H_2O_2 versetzt und lieferten die β -Hydroxysäuren **49** und **49** in jeweils 77% Ausbeute. Das abgespaltene Oxazolidinon **59** konnte in großen Teilen wiedergewonnen werden und nach erneuter Acylierung mit Propionylchlorid für weitere Aldolreaktionen verwendet werden.

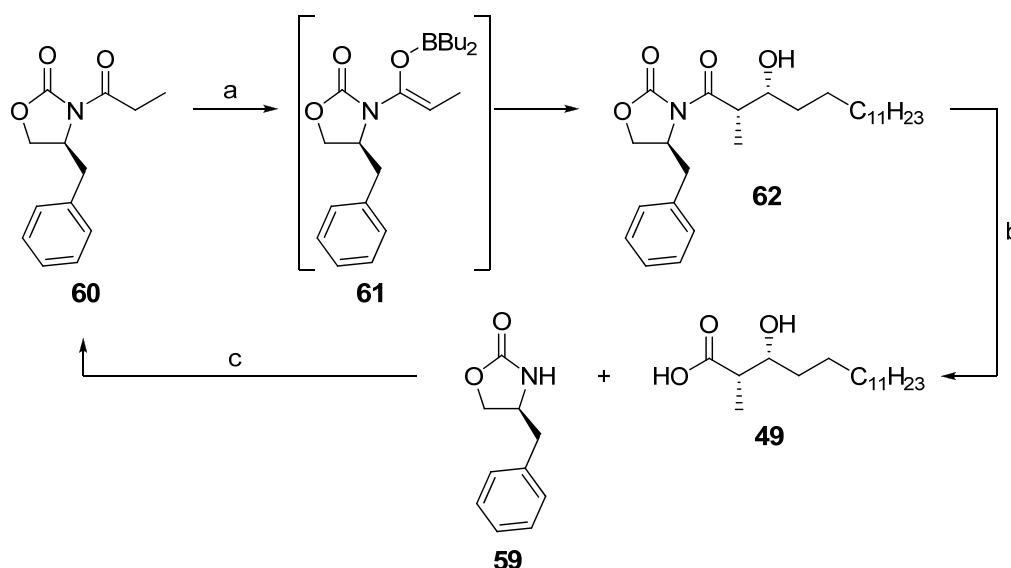


Abbildung 31: Enantioselektive *syn*-Aldoladdition: a) $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$, DIPEA, CH_2Cl_2 , -78°C , dann Tetradecanal, CH_2Cl_2 , -78°C bis 0°C , 80%; b) LiOH , H_2O_2 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, 77%; c) $n\text{BuLi}$, Propionylchlorid, THF , -78°C , 88%.

Um die *anti*-konfigurierten Aldoladdukte **52** und *ent*-**52** zu erhalten, wurde die von Masamune und Abiko entwickelte asymmetrische Aldol-Reaktion verwendet.^[121] Die chiralen Ester **66** bzw. *ent*-**66** wurden in drei Stufen ausgehend von kommerziell erhältlichem (–)-(1*R*,2*S*)- oder (+)-(1*S*,2*R*)-Norephedrin (**63**, *ent*-**63**) in sehr hohen Ausbeuten hergestellt (Abbildung 32).^[128] Nach Reaktion des Amins **63** mit Mesitylsulfonylchlorid und Triethylamin wurde das quantitativ erhaltene Sulfonamid **64** selektiv mit Benzylbromid und Cäsiumcarbonat in 97% Ausbeute zum benzylierten Sulfonamid **65** umgesetzt. Das doppelt benzylierte Nebenprodukt wurde nur in Spuren detektiert. Der Alkohol **65** konnte schließlich mit Propionylchlorid und Pyridin in 96% Ausbeute zum Ester **66** acyliert werden.

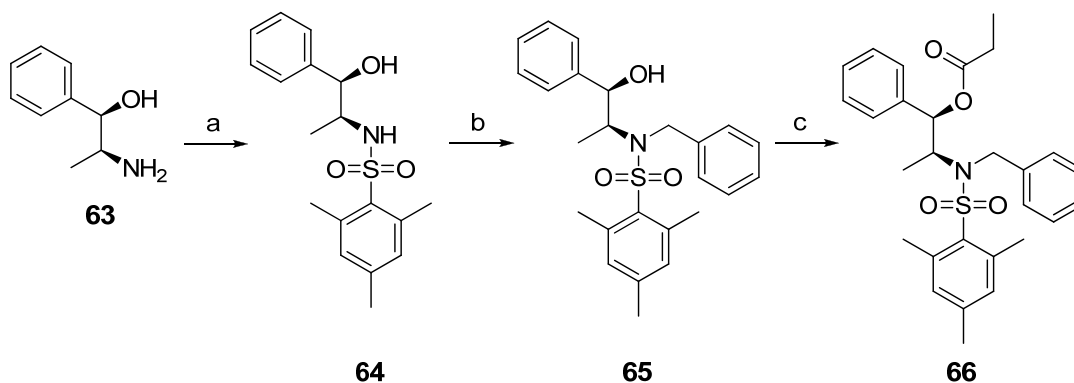


Abbildung 32: Synthese der acylierten Masamune-Auxiliare: a) Mesitylsulfonylchlorid, NEt_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 99%; b) BzI , CsCO_3 , MeCN , Rückfluss, 79%; c) Propionylchlorid, Pyridin, CH_2Cl_2 , 0°C bis Rt , 91%.

Die *anti*-Aldol Produkte **68** und *ent*-**68** wurden durch asymmetrische Addition des Tetradecanals (**51**) an das aus *c*Hex₂BOTf und Triethylamin erhaltene *E*-konfigurierte Borenolat (**67**; *ent*-**67**) des Esters **66** bzw. *ent*-**66** in einem Diastereomerenverhältnis von 96:4 erhalten (Abbildung 33). Die in 71% isolierten enantiomerenreinen Aldoladdukte **68** und *ent*-**68** wurden schließlich in einer Ausbeute von 86% durch *n*Bu₄NOH und H₂O₂ zu den β -Hydroxysäuren **52** und *ent*-**52** gespalten. Die zuvor verwendeten Bedingungen (LiOH/H₂O₂) führten hingegen nur zu geringer Hydrolyse des Esters.

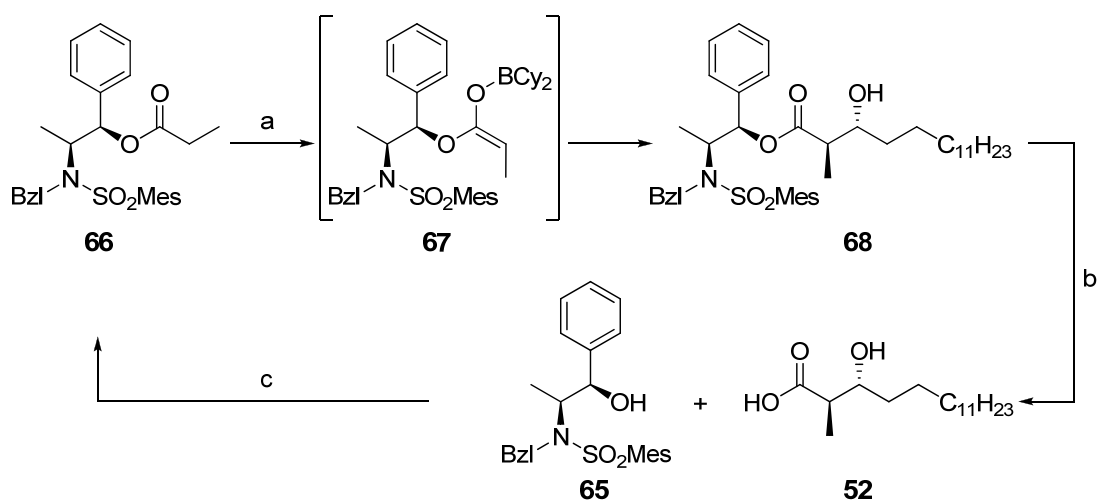


Abbildung 33: Enantioselective *anti*-Aldoladdition: a) *c*Hex₂BOTf, NEt₃, CH₂Cl₂, -78°C, dann Tetradecanal, CH₂Cl₂, -78°C bis 0°C, 71%; b) *n*Bu₄NOH, H₂O₂, THF, 0°C bis Rt, 86%; c) Propionylchlorid, Pyridin, CH₂Cl₂, 0°C bis Rt, 91%.

Zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit wurden die vier diastereomeren β -Hydroxysäuren **49**, *ent*-**49**, **52** und *ent*-**52** mit 2-Brom-4'-phenylacetophenon (**69**) acetyliert (Abbildung 34). Die in sehr hohen Ausbeuten erhaltenen *p*-Phenylphenacylester **70**, *ent*-**70**, **71** und *ent*-**71** konnten anschließend über eine chirale HPLC-Säule (IA) analysiert werden. Sowohl *trans*- als auch *syn*-Aldolprodukte lagen in hohen Enantiomerenüberschüssen (90-99% ee) vor und konnten in der weiteren Synthese erfolgreich als chirale Bausteine verwendet werden.

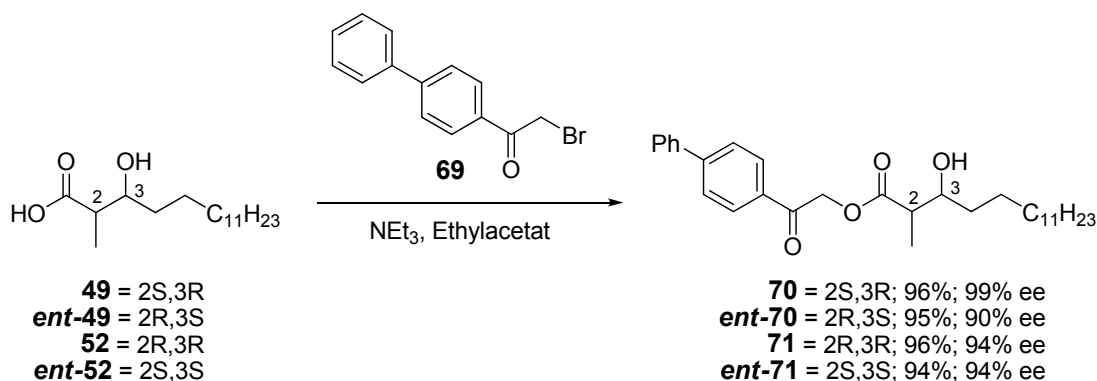


Abbildung 34: Synthese der diastereomeren β -Hydroxysäurederivate **70**, **ent-70**, **71** und **ent-71** zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit.

4.1.3 Festphasensynthese

Um die offenkettigen Zyklisierungsvorläufer zu synthetisieren wurde eine flexible Festphasensynthese entwickelt. Die Verwendung des 2-Chlortritylchlorid-Harzes^[119] ermöglichte eine Abspaltung des Depsipeptides unter milden Bedingungen. Gleichzeitig konnten (Boc-) und (tBu-) Schutzgruppen entfernt werden. Exemplarisch ist die Synthese des offenkettigen Depsipeptids **(2R,3S)-42** gezeigt (Abbildung 35).

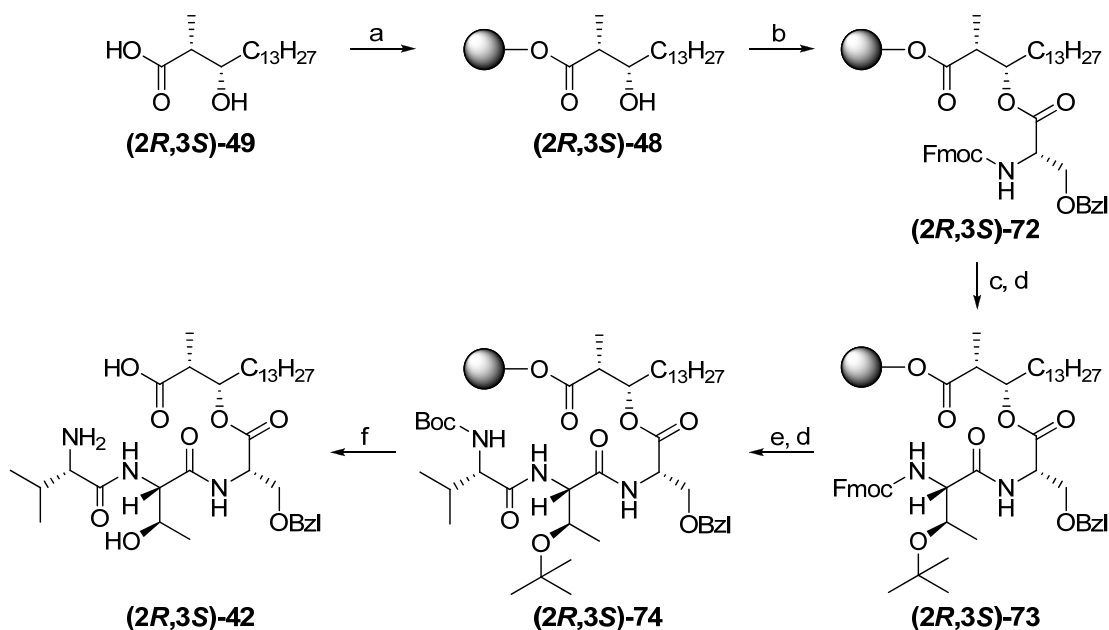
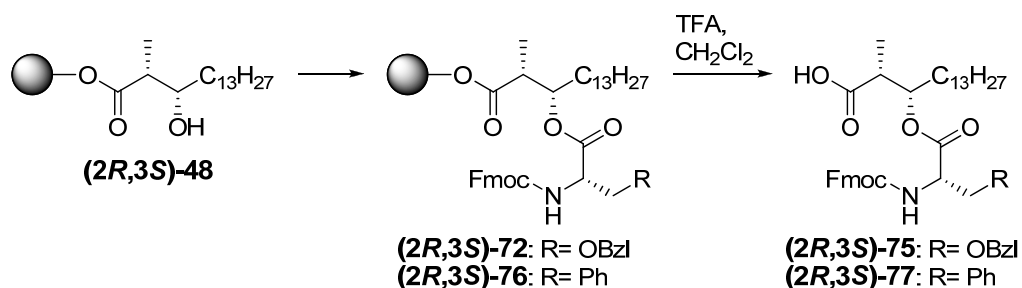


Abbildung 35: Festphasensynthese der offenkettigen Depsipeptide. a) 2-Chlortritylchlorid-PS-Harz, DIPEA, CH_2Cl_2 , quant.; b) Fmoc-Ser(OBzl)-OH, DIC, DMAP, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$, 89%, d.r. 8:1; c) 20% Piperidin in DMF, quant.; d) Fmoc-Thr(OtBu)-OH, DIC, HOBt, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$, 93%; e) Boc-Val-OH, DIC, HOBt, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$, 93%; f) 50% TFA in CH_2Cl_2 , quant..

4. Spezieller Teil

Zunächst wurde die synthetisierte β -Hydroxysäure **49** in Gegenwart von DIPEA quantitativ an 2-Chlortritylchlorid-PS-Harz gebunden ((**2R,3S**)-**48**). Anschließende Veresterung mit Fmoc-Ser(OBzl)-OH lieferte den immobilisierten Ester ((**2R,3S**)-**72**) in sehr hoher Ausbeute, welche sowohl durch einen Fmoc-Test als auch durch eine Testabspaltung des Produkts bestätigt wurde. Allerdings trat bei Verwendung von 5 Äq. DIC und 0.5 Äq. DMAP bei Raumtemperatur starke Epimerisierung an der α -Position des Serins auf (3:1 Produkt/Epimer).



	R	Veresterungsbedingungen*	Ausbeute	d.r.
1	Ph	5 Äq. DIC, 0.5 Äq. DMAP, Rt, 14 h	99%	3:1
2	Ph	5 Äq. DIC, 10 Äq. Imidazol, Rt, 14 h	0%	-
3	Ph	5 Äq. DIC, 10 Äq. Collidin, Rt, 14 h	0%	-
4	Ph	5 Äq. DIC, 0.2 Äq. DMAP, Rt, 4 h	91%	6:1
5	Ph	5 Äq. DIC, 0.2 Äq. DMAP, 0°C, 4 h	90%	9:1
6	Ph	5 Äq. DIC, 0.2 Äq. DMAP, 0°C, 2 h	62%	-
7	Ph	5 Äq. DIC, 0.1 Äq. DMAP, 0°C, 4 h	63%	6:1
8	Ph	5 Äq. EDC, 0.2 Äq. DMAP, 0°C, 4 h	89%	6:1
9	Ph	5 Äq. MSNT, 3.8 Äq. Methylimidazol, Rt, 8 h	10%	-
10	Ph	5 Äq. DIAD, 5 Äq. PPh ₃ , Rt, 14 h	0%	-
11	Ph	9 Äq. TCBC, 9 Äq. NEt ₃ , 10 Äq. DMAP, 0°C bis Rt, 14 h	98%	2:1
12	Ph	9 Äq. TCBC, 9 Äq. NEt ₃ , 0.5 Äq. DMAP, 0°C, 4 h	89%	9:1
13	Ph	5 Äq. PyBrop, 0.2 Äq. DMAP, 10 Äq. DIPEA, Rt, 14 h	2%	-
14	OBzl	5 Äq. DIC, 0.5 Äq. DMAP, Rt, 14 h	98%	5:1
15	OBzl	5 Äq. DIC, 0.2 Äq. DMAP, 0°C, 3 h	89%	8:1
16	OBzl	9 Äq. TCBC, 9 Äq. NEt ₃ , 0.3 Äq. DMAP, 0°C, 4 h	88%	8:1

Tabelle 4: Optimierung der Veresterungsbedingungen. TCBC = 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid; MSNT = 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol; PyBrop = Brom-tris-pyrrolidin-phosphonium-hexafluorophosphat. *Alle Reaktionen wurden mit 5 Äq. Aminosäure (Fmoc-Phe-OH bzw. Fmoc-Ser(OBzl)-OH) durchgeführt.

Um die Ergebnisse zu optimieren wurden Testreaktionen mit kommerziell erhältlichem L- und D-Fmoc-Phe-OH durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht (Tabelle 4). Zunächst wurden mildere Basen wie Imidazolderivate und Collidin verwendet, die jedoch für eine Veresterung nicht stark genug waren. Daraufhin wurde die eingesetzte Menge an DMAP herabgesetzt und die Reaktionszeit verkürzt. Durch einen Wechsel der Reaktionstemperatur von Rt auf 0°C konnten erste Erfolge erzielt werden. Eine verkürzte Reaktionszeit führte schließlich zu einer Verbesserung des Produkt/Epimer-Verhältnisses auf 9:1. Unter Verwendung von Yamaguchi-Veresterungsbedingungen (2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, NEt₃)^[68, 129] konnten ähnliche Ausbeuten und Diastereomerenverhältnisse erzielt werden, während eine Mitsunobu-Reaktion^[130, 131] nicht zum erwünschten Produkt führte. Hier trat hauptsächlich Eliminierung von Wasser auf, was zur 2-Methylhexadec-2-ensäure führte. Weder der Wechsel des Kupplungsreagenzes zu EDC oder PyBrop^[58], noch die MSNT-Methode^[132] führten zu Verbesserungen.

Schließlich wurden die optimierten DIC/DMAP Bedingungen sowie die ähnlich erfolgreichen Yamaguchi-Bedingungen^[68, 129] zur Veresterung mit Fmoc-Ser(OBzl)-OH herangezogen und lieferten den erforderlichen Serinester (**2R,3S**)-**75** im präparativen Maßstab in 89% Ausbeute und mit einem Diastereomerenverhältnis von 8:1.

Nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in DMF wurde der mit Hilfe von DIC und HOBt gebildete Aktivester der L-Aminosäure Fmoc-Thr(OtBu)-OH an das freie Amin gekuppelt (Abbildung 35). Das Depsipeptid (**2R,3S**)-**73** konnte so in 93% Ausbeute erhalten werden. Auch konnte das an der Seitenkette ungeschützte Fmoc-Thr-OH ohne unerwünschte Nebenreaktionen eingesetzt werden. Erneutes Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe und Kupplung von Boc-Val-OH als HOBt Aktivester führte zum immobilisierten Depsipeptid (**2R,3S**)-**74**. Dieses wurde schließlich mit 50% TFA in CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten, wobei gleichzeitig sowohl die tBu- als auch die Boc-Schutzgruppe von Threonin und Valin entfernt wurden. Nach Aufreinigung mit Hilfe einer präparativen HPLC wurde das Depsipeptid ausgehend von β -Hydroxysäure **49** in 77% Gesamtausbeute erhalten. Da sich die Trennung der Diastereomere durch die teilweise Epimerisierung des α -Serin-Zentrums an dieser Stelle als sehr schwierig erwies, wurde das Gemisch in der nächsten Reaktion eingesetzt und erst nach erfolgter Zyklisierung getrennt.

Mit Hilfe dieser Strategie konnten die Depsipeptide **42** in hohen Ausbeuten synthetisiert werden (Abbildung 36). Weiterhin wurden sechs Depsipeptide (**78-83**) mit variiert Aminosäuresequenz hergestellt, die ohne weitere Aufreinigung in der weiteren Synthese eingesetzt werden konnten.

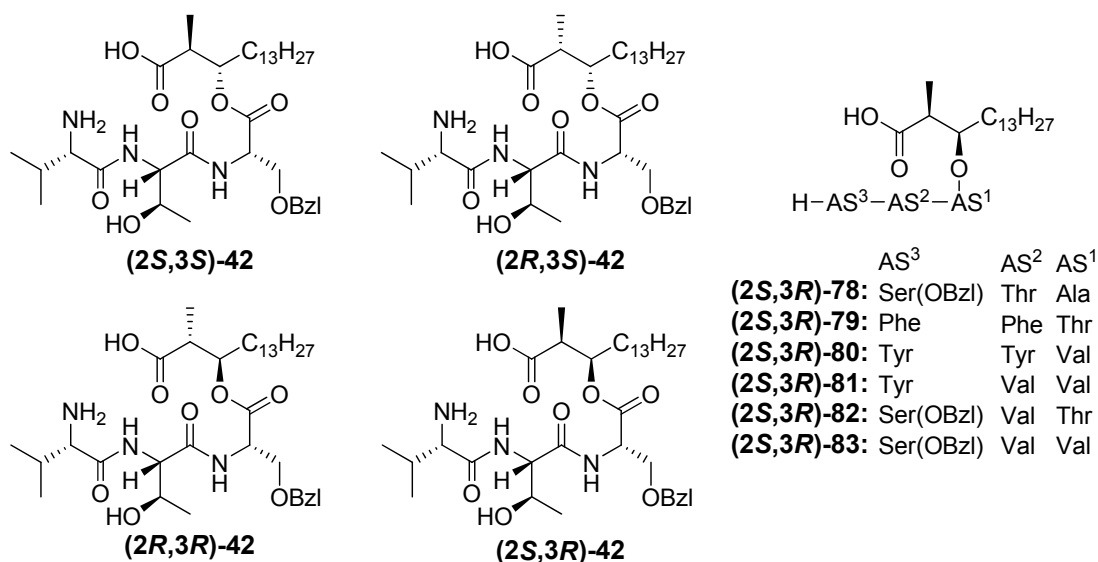


Abbildung 36: Synthetisierte, diastereomere Depsipeptide.

Durch die sehr hohen Ausbeuten, eine einfache Schutzgruppenstrategie und einen einzigen Aufreinigungsschritt nach der Abspaltung vom polymeren Träger stellt dieser Syntheseweg eine sehr gute Alternative zur Lösungssynthese linearer Depsipeptide dar. Die flexible Bausteinsynthese könnte außerdem zur Gewinnung weiter modifizierter Moleküle herangezogen werden, z.B. könnten β -Aminosäuren anstelle der β -Hydroxysäuren oder D-Aminosäuren statt der verwendeten natürlichen L-Aminosäuren eingesetzt werden. Auch nicht-natürliche Aminosäuren könnten auf diese Weise in ein Depsipeptid inkorporiert werden.

4.1.4 Makrolaktamisierung

Die Zyklisierung der synthetisierten Depsipeptide zu 13-gliedrigen Ringen stellt eine besondere Herausforderung dar. Gerade Zyklisierungen zu Ringen mittlerer Größe ($n = 7-13$) neigen stark zu Nebenreaktionen, wie Oligomerisierung, oder zur Ausbildung von Zykloclimere, da die Zyklisierung zum gespannten Monozyklus energetisch ungünstig ist. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit alle Makrozyklisierungen unter Hochverdünnung (10^{-3} M) durchgeführt.^[51] Zusätzlich wurde das Prinzip der pseudo-Hochverdünnung angewendet, bei dem der Zyklisierungsvorläufer langsam zu einer Lösung der Kupplungsreagenzien getropft wird, um die tatsächliche Konzentration der noch nicht abreagierten Verbindung möglichst gering zu halten. In diesem Fall wird normalerweise die intramolekulare gegenüber der intermolekularen Reaktion bevorzugt.

Des Weiteren spielt die Geometrie des Zyklisierungsvorläufers eine besondere Rolle. Da durch den partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung nicht alle

Bindungen in einem Peptid frei rotieren, kommt der Stereochemie verschiedener Zentren im Rückgrat des Peptids eine besondere Bedeutung zu. So kann eine stabile Konformation vorliegen, die nur schwierig und unter hohem Energieaufwand zu zyklisieren ist. Bei zu flexiblen Molekülen hingegen ergeben sich Probleme, da aus der Vielzahl möglicher Konformationen nur wenige zur Zyklisierung geeignet sind. Dieses Problem der ausgewogenen Balance zwischen Enthalpie und Entropie gilt es zu lösen. Ein Parameter, der hierzu variiert wurde, ist die Reaktionstemperatur. Bei Erhöhung der Temperatur wird einerseits die Flexibilität der linearen Depsipeptide erhöht, was eine ungünstige, starre Konformationen in eine Konformationen überführen kann, in der sich *N*- und *C*-Terminus räumlich näher sind. Andererseits wird die Diffusionsgeschwindigkeit erhöht, wodurch eine intermolekulare Nebenreaktion zu Oligomeren oder Zyklodimeren wahrscheinlicher wird. Durch die Vororientierung des Zyklisierungsvorläufers sowie die durch die Ringspannung beeinflusste Energie des Makrozyklus wird somit die Ausbeute der Zyklisierungsreaktion beeinträchtigt.

Anhand des Depsipeptides **(2S,3R)-42** wurden verschiedene Methoden zur Makrolaktamisierung untersucht. Es wurden Uronium-basierte Kupplungsreagenzien wie HBTU **(84)**^[56] und HATU **(85)**,^[54, 133] Phosphonium-basiertes PyBOP **(87)**,^[59] aber auch Organophosphorverbindungen wie DEPC **(86)**^[61] eingesetzt (Abbildung 37). Uronium-basierte Reagenzien bilden hierbei unter Abspaltung von Harnstoff mit der Carbonsäure zunächst die Hydroxybenzotriazolester. Diese Aktivester reagieren anschließend mit dem freien Amin einer Aminosäure zum Peptid.

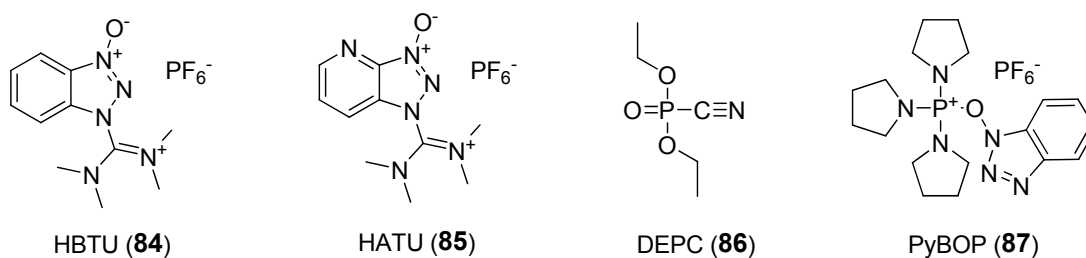


Abbildung 37: Kupplungsreagenzien für die Makrozyklisierung.

HBTU **(84)** lieferte bereits in den ersten Versuchen das Zyklodepsipeptid **(2S,3R)-40** in 26% Ausbeute (Tabelle 5). Durch die den *N*-Terminus **(88)** koordinierende Wirkung des Pyridin-Stickstoffs in HATU **(91)**; (Abbildung 38) wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach eine merkliche Verbesserung verschiedener Zyklisierungsreaktionen beim Wechsel des Uronium-Reagenzes erzielt.^[134] Die erhoffte Steigerung der Ausbeute blieb im vorliegenden Fall jedoch aus.

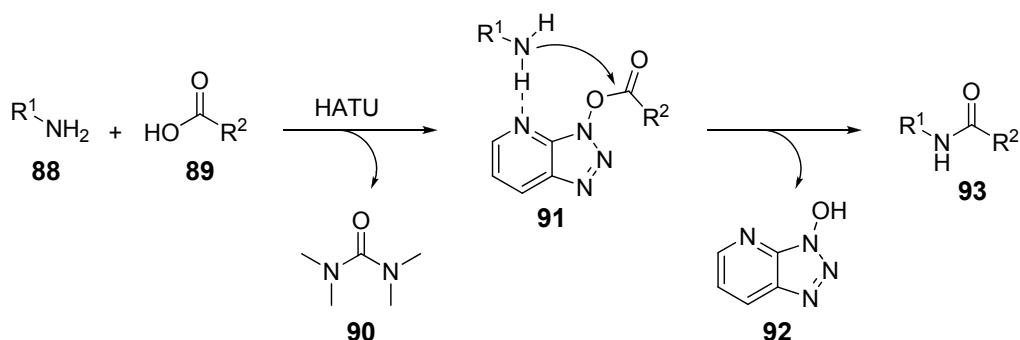


Abbildung 38: Vorkoordinierende Wirkung des HATU (**85**).

In DEPC (**86**) vermittelten Peptidkupplungen entsteht zunächst ein gemischtes Carbonsäure-Phosphorigsäure-Anhydrid (**94**), welches durch nukleophilen Angriff des freien Amins einer Aminosäure zur Peptidbindung (**93**) führt (Abbildung 39). Die untersuchte, DEPC-vermittelte Zyklisierung lief in nahezu gleichhohen Ausbeuten ab, wie die Uronium-Reagenz vermittelten. Ein Hindernis in der Synthese wurde bei der Verwendung von Tyrosin-enthaltenden Peptidsequenzen festgestellt, da hier als Nebenreaktion teilweise Phosphorylierung dieses Aminosäurerestes auftrat.

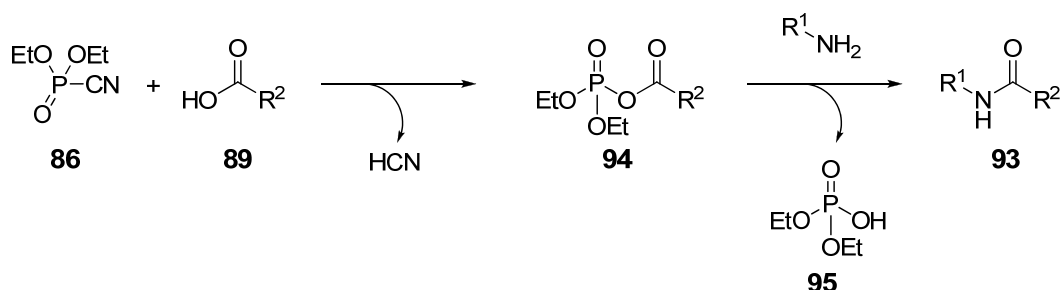
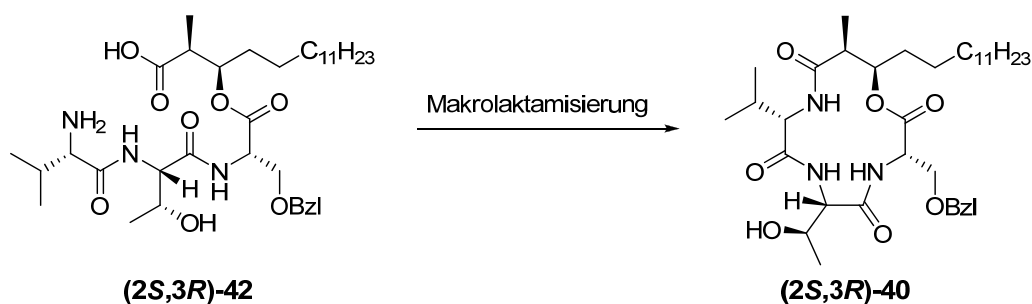


Abbildung 39: Mechanismus der DEPC (**86**) vermittelten Peptidkupplung.

Das Phosphonium-basierte Kupplungsreagenz PyBOP (**87**) führte lediglich zu Spuren des gewünschten Monozyklisierungsprodukt. Hauptsächlich wurde Oligomerisierung und Zyklodimerisierung beobachtet.

Um eine möglichst effektive aber dennoch günstige und allgemein verwendbare Zyklisierungsmethode finden zu können, wurde schließlich die Zyklisierung mittels HBTU optimiert (Tabelle 5). Hierzu wurden die Reaktionen zunächst bei Raumtemperatur sowie bei 50°C durchgeführt. Bei 50°C wurde jedoch wesentlich mehr Oligomerisierung beobachtet als bei Raumtemperatur, so dass höhere Temperaturen vermieden wurden.



Makrolaktamisierungsbedingungen						
	Reagenz	Base	Konz.*	Temp.	Lösungsm.	Ausbeute
1	HBTU	DIPEA	15 mM	Rt	CH ₂ Cl ₂ /DMF	26%
2	HATU	DIPEA	15 mM	Rt	CH ₂ Cl ₂ /DMF	24%
3	DEPC	NEt ₃	15 mM	Rt	DMF	25%
4	PyBOP	DIPEA	15 mM	Rt	CH ₂ Cl ₂ /DMF	Spuren
5	HBTU	DIPEA	15 mM	50°C	CH ₂ Cl ₂ /DMF	0%
6	HBTU	DIPEA	8 mM	Rt	CH ₂ Cl ₂ /DMF	45%
7	HBTU	DIPEA	8 mM	Rt	THF	24%
8	DEPC	NEt ₃	8 mM	Rt	DMF	39%

Tabelle 5: Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Makrolaktamisierung. In jeder Reaktion wurde eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids von 1.3 mM eingestellt. * Konzentration der Zutropflösung, Zutropfgeschwindigkeit: 2 ml/h.

Durch den Einsatz einer Spritzenpumpe und die sehr langsame Zugabe des Zyklisierungsvorläufers zu einer Lösung mit einer Endkonzentration von 1.3 mM sowie die Verringerung der Konzentration der zugegebenen Lösung aus offenkettigem Depsipeptid **(2S,3R)-42** und DIPEA, konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Es wurde so auch keinerlei Bildung von Zyklodimeren beobachtet. Ein Wechsel des Lösungsmittels zu THF führte zu niedrigeren Ausbeuten und Anpassung der DEPC vermittelten Kupplung an die verbesserten Zyklisierungsbedingungen lieferte ähnliche Ergebnisse wie die Makrolaktamisierung mit Hilfe von HBTU. Die optimierte Methode (Tabelle 5, Eintrag 6) wurde anschließend zur Zyklisierung weiterer Depsipeptide herangezogen und lieferte die erforderlichen Monozyklen in hohen Ausbeuten.

An dieser Stelle der Synthese konnten schließlich mittels eines optimierten HPLC-Gradienten auch die α -Serin-Epimere voneinander getrennt werden, wodurch zusätzliche Zyklodepsipeptide mit einem weiteren variierten Stereozentrum isoliert werden konnten (**(2S,3R)-96**, **(2R,3S)-96**). Sechs diastereomere Stevastelin C3 Analoga wurden auf diese Weise erfolgreich hergestellt (Abbildung 40).

Bei verschiedener Konfiguration im Rückgrat des Depsipeptids wurden die diastereomeren Verbindungen **40** in unterschiedlichen Ausbeuten erhalten. Diese Beobachtung lässt sich durch veränderte Konformationen der Zyklisierungsvorläufer erklären, welche durch die Ausrichtung des *N*- und des *C*-Terminus' zueinander unterschiedlich gut geeignet sind, Monozyklen zu liefern. Verbindung **(2*S*,3*S*)-40** (62%) schien hierbei besonders begünstigt, während Verbindung **(2*R*,3*R*)-40** (36%) anscheinend eine ungünstigere Ausgangskonformation aufwies.

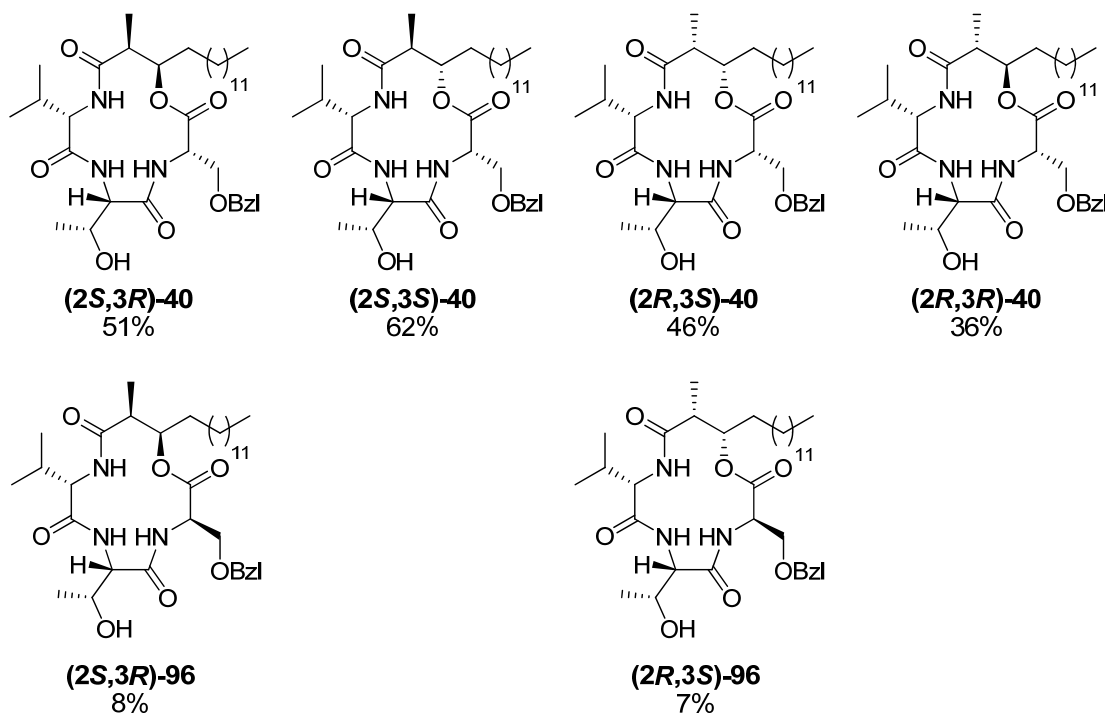


Abbildung 40: Synthetisierte Stevastelin C3 Analoga und Ausbeuten der Makrolaktamisierung.

Neben den Veränderungen in der Stereochemie des makrozyklischen Rückgrats zur Generierung neuer Konformationen wurden auch Modifikationen in der Aminosäuresequenz vorgenommen (Abbildung 41). Dazu wurden hydrophile, hydrophobe und aromatische Aminosäuren im Makrozyklus unterschiedlich angeordnet. Zunächst wurden die Positionen von Threonin und Valin in der Aminosäuresequenz vertauscht (**97**, **98**), wodurch zwar ein ähnlicher sterischer Anspruch gegeben blieb, jedoch veränderte Voraussetzungen für Wasserstoffbrückenbindungen geschaffen wurden. Das Zyklodepsipeptid **99** enthält anstelle des Valins ein Alanin, welches kleiner als das ursprüngliche Valin ist. Durch die Synthese des Zyklodepsipeptides **100** wurde ein Makrozyklus ohne jegliche Hydroxygruppe erhalten, indem das in den Stevastelin Analoga vorliegende Threonin durch Valin ersetzt wurde. Anschließend wurde das Zyklodepsipeptid **101** synthetisiert, welches anstelle des Serins und Threonins zwei Tyrosine enthielt, um

den Effekt auf die dualspezifische Phosphatase VHR zu untersuchen. Auch sterisch weniger anspruchsvolle Kandidaten (**102**, **103**) mit nur einem Tyrosin wurden hergestellt.

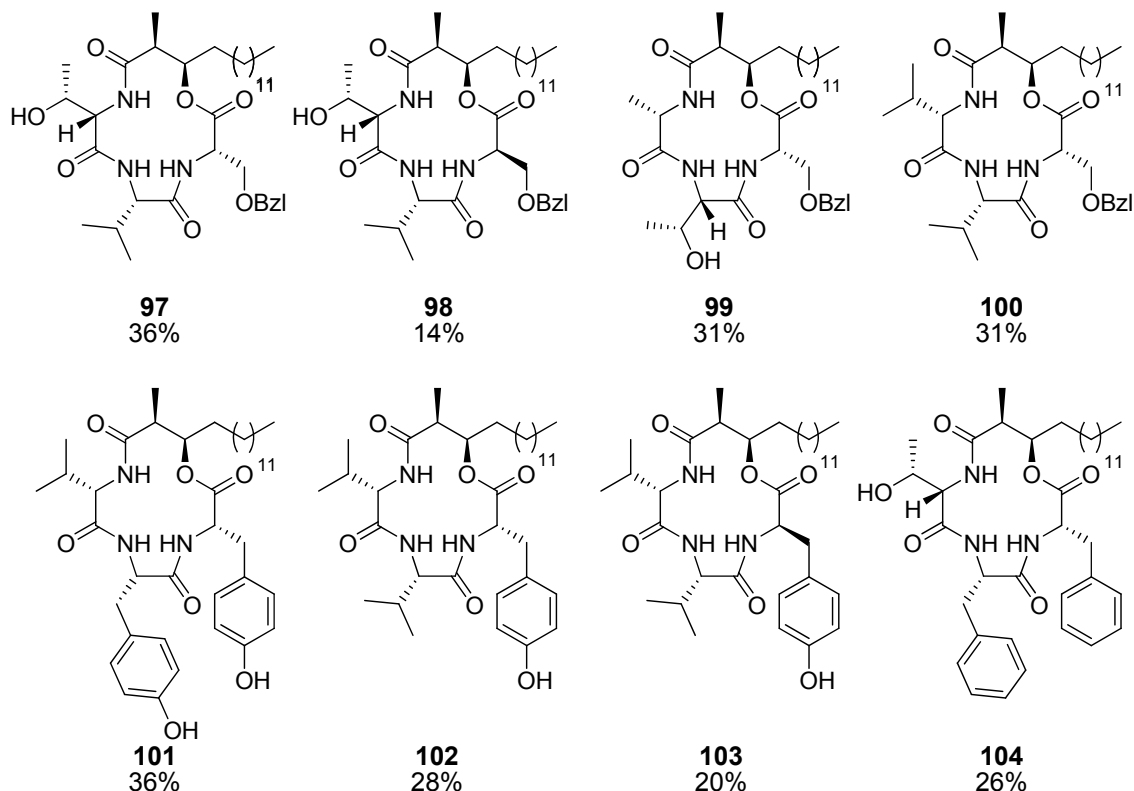


Abbildung 41: Synthetisierte Zyklodepsipeptide mit variierter Aminosäuresequenz.

Durch die Einführung zweier Phenylalanine wurde zudem ein sterisch anspruchsvoller Makrozyklus mit hydrophoben Aromaten generiert (**104**), welcher ausschließlich durch seinen Threoninrest in der Lage ist über seine Aminosäureseitenketten Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen.

Die insgesamt 14 in hohen Ausbeuten erhaltenen 13-gliedrigen Zyklodepsipeptide sollten durch die veränderte Stereochemie im Rückgrat des Makrozyklus' und die modifizierte Aminosäuresequenz Unterschiede in ihren biochemischen Eigenschaften aufweisen.

4.1.5 Derivatisierung

Da bereits für die natürlichen Stevasteline gezeigt werden konnte, dass phosphorylierte oder sulfatierte Analoga *in vitro* stärkere Phosphatase-Inhibitoren sind als ihre unsubstituierten Analoga (vgl. Tabelle 2), wurde eine Derivatisierung der

Makrozyklen **40** geplant. Auch die Hypothese, dass unsubstituierte Stevasteline die Zellmembran durchdringen und innerhalb der Zelle phosphoryliert oder sulfatiert werden, um schließlich biologisch aktiv zu werden, sollte so überprüft werden.

Zu einer selektiven Phosphorylierung wurden die Makrozyklen **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40**, **(2S,3S)-40** und **(2S,3R)-40** herangezogen. Wegen der größeren Reaktivität von P(III)- gegenüber P(IV)-Reagenzien werden heute weitestgehend Synthesen verwendet, die über einen Phosphitriester verlaufen.^[135] Die bahnbrechende Entwicklung der Phosphoramidit-Chemie durch Caruthers und Matteucci wird heute in zahlreichen Phosphorylierungsreaktionen verschiedenster Substrate verwendet (Abbildung 42).^[135, 136] Hierbei protoniert zunächst das leicht saure Tetrazol (**106**) das Stickstoffatom eines Phosphoramidits (**105**) und wandelt so den *N*-Substituenten in eine gute Abgangsgruppe um. Das entstehende Tetrazolid (**107**) reagiert sofort mit dem vorhandenen Alkohol zum Trialkylphosphit (**108**). Diese sehr instabile Verbindung wird in der Regel zügig zum Phosphotriester **109** oxidiert.

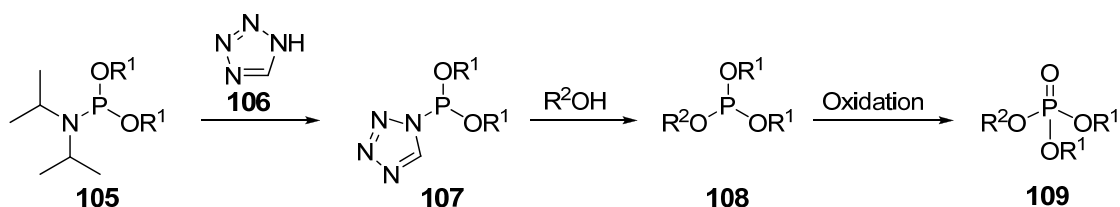


Abbildung 42: Phosphorylierung.

Da diese Reaktion sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen ist, ist die richtige Wahl der Reagenzien von immenser Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass *t*Bu-substituierte Phosphite (**114**) besonders anfällig für Nebenreaktionen sind (Abbildung 43).^[137] Hier kann durch Säure oder Hitze ein Phosponat (**112**) ausgebildet werden, das nur durch Iod teilweise zum Phosphat oxidiert werden kann. Auch in der Reaktion vorhandenes Wasser kann zu dieser unerwünschten Nebenreaktion führen (**110**). Wesentlich besser geeignet sind Benzyl-substituierte Phosphoramidite.

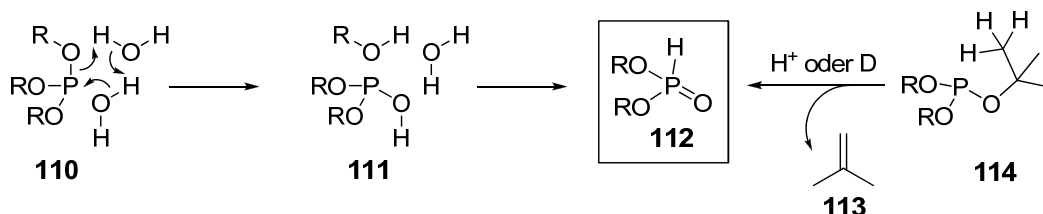


Abbildung 43: Unerwünschte Nebenreaktionen führen zu Phosponaten.

Auch die Substituenten des Stickstoffs im Phosphoramidit spielen eine Rolle. Durch ihren höheren sterischen Anspruch ist die Stabilität der Isopropyl-substituierten

4. Spezieller Teil

Reagenzien gegen Wasser wesentlich höher als die ihrer Ethyl-substituierten Analoga. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit Dibenzyldiisopropylphosphoramidit (**115**) für die Phosphorylierung der Zyklopeptide **40** verwendet.

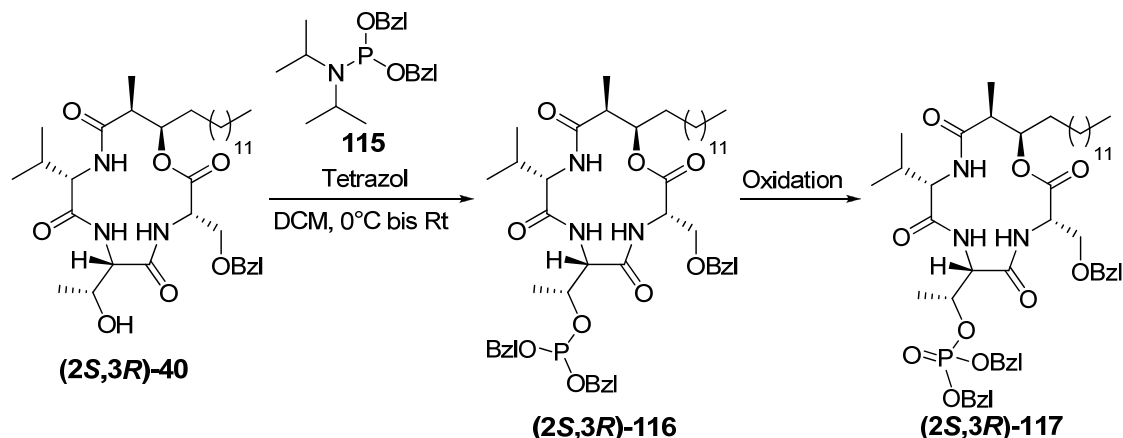


Abbildung 44: Phosphorylierung des Monobenzyl-geschützten Makrozyklus **(2S,3R)-40**.

Die Oxidation des labilen Phosphittriesters stellte einen kritischen Schritt dar, da sowohl die Wahl des richtigen Oxidationsmittels, als auch die der richtigen Reaktionsbedingungen einen starken Einfluss auf die Produktbildung hatten. Die Phosphorylierungsreaktion für den Makrozyklus **(2S,3R)-40** wurde diesbezüglich optimiert (Tabelle 6).

	Phosphitylierung	Oxidation	Umsatz	isoliert
1	0.5 h, Rt, CH ₂ Cl ₂	<i>m</i> CPBA, 20 min 0°C, 10 min Rt	2%	-
2	"	<i>t</i> BuOOH, 20 min 0°C, 10 min Rt	0%	-
3	"	I ₂ , Pyridin, 20 min 0°C, 10 min Rt	0%	-
4	1 h, Rt, CH ₂ Cl ₂ *	<i>m</i> CPBA, 10 min 0°C	54%	-
5	"	<i>t</i> BuOOH, 10 min 0°C	60%	-
6	"	I ₂ , Pyridin, 10 min 0°C	62%	-
7	3 h, Rt, CH ₂ Cl ₂ *	<i>m</i> CPBA, 10 min 0°C	72%	60%
8	"	<i>t</i> BuOOH, 10 min 0°C	99%	96%
9	"	I ₂ , Pyridin, 10 min 0°C	99%	81%
10	3 h, Rt, THF*	<i>t</i> BuOOH, 10 min 0°C	99%	95%

Tabelle 6: Optimierung der Phosphorylierungsreaktion. *Entgaste Lösungsmittel.

Hierbei konnte beobachtet werden, dass für die Phosphitylierungsreaktion entgaste und getrocknete Lösungsmittel essentiell sind. Nur bei sofortiger Oxidation nach erfolgter Phosphitylierung konnten reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Die Durchführung der Oxidation unter Argon führte zu weiter verbesserten Ausbeuten und Reproduzierbarkeiten.

Wurde *m*CPBA zur Oxidation verwendet, so trat häufig Phosphonatbildung auf, da *m*CPBA-Reagenzien sowohl *meta*-Chlorbenzoesäure als auch Wasser enthält (vgl. Abbildung 43). Die in der Literatur häufig verwendete Methode der Oxidation mit Iod in Pyridin führte auch in der vorliegenden Reaktion zu vollständigem Umsatz, jedoch nach Aufarbeitung zu geringeren Ausbeuten. Als optimales Oxidationsmittel erwies sich das sehr milde *t*BuOOH, welches nur einen geringen Wasseranteil und keinerlei Säurespuren beinhaltet. Weiterhin konnten Nebenreaktionen verhindert werden, indem die Temperatur während der Oxidation auf 0°C gehalten wurde. Bei Raumtemperatur wurde vermehrt Phosphonatbildung und Zerfall des Triesters beobachtet.

Mit Hilfe der optimierten Reaktionsbedingungen (Eintrag 8, Tabelle 6) konnten die phosphorylierten Makrozyklen **(2*R*,3*R*)-117**, **(2*R*,3*S*)-117**, **(2*S*,3*S*)-117** und **(2*S*,3*R*)-117** in Ausbeuten von 70-84% isoliert werden (Abbildung 45).

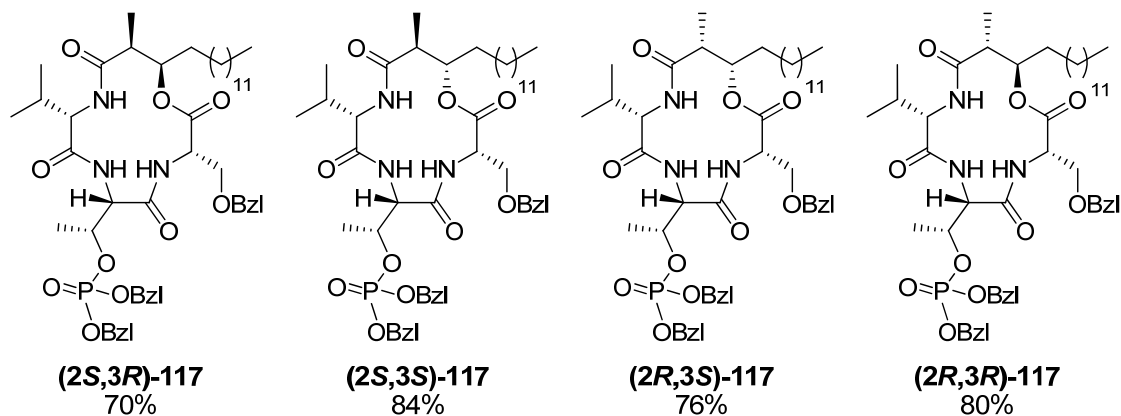


Abbildung 45: Phosphorylierte Stevastelin C3 Analoga.

Die entstandenen Dibenzylester neigten sowohl zu basenkatalysierten β -Eliminierungen als auch zum Verlust einer Benzylschutzgruppe durch Säure. Tatsächlich wurde bereits während der Reinigung der Triester mittels präparativer HPLC ein geringer Verlust einer Benzylschutzgruppe beobachtet. Wegen dieser Labilität wurden die benzylierten Verbindungen direkt weiter umgesetzt.

4.1.6 Globale Debenzylierung

Pd/C katalysierte Hydrierung der phosphorylierten Makrozyklen **(2R,3R)-117**, **(2R,3S)-117**, **(2S,3S)-117** und **(2S,3R)-117** lieferte in 4h und sehr hohen Ausbeuten die vollständig debenzylierten, phosphorylierten Stevastelin C3 Analoga **(2R,3R)-41**, **(2R,3S)-41**, **(2S,3S)-41** und **(2S,3R)-41** (Abbildung 46).

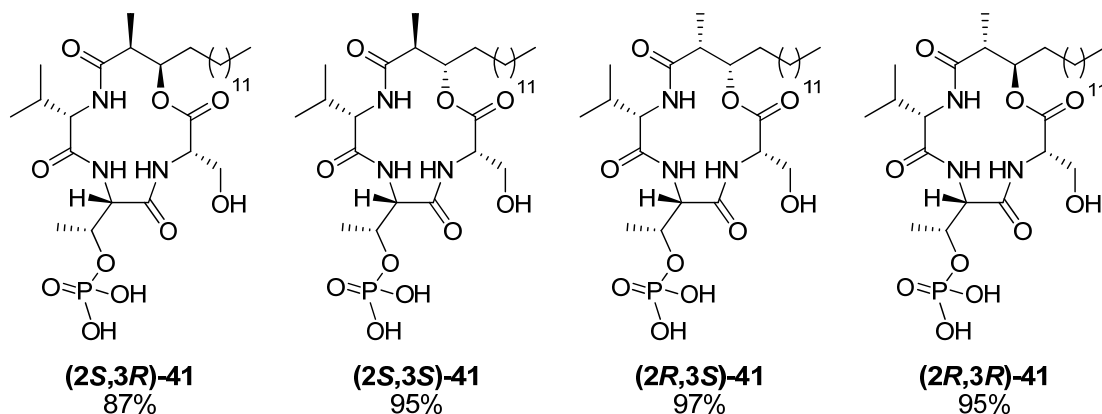


Abbildung 46: Phosphorylierte und debenzylierte Zyklopeptide.

Zu Vergleichszwecken wurde auch der Makrozyklus **(2S,3R)-40** debenzyliert, was unter Verwendung der bereits angewendeten Reaktionsbedingungen jedoch nur unvollständig möglich war. Erst nach Zugabe von einem Äquivalent HCl konnte das Produkt **(2S,3R)-118** über Nacht in 96% Ausbeute erhalten werden.

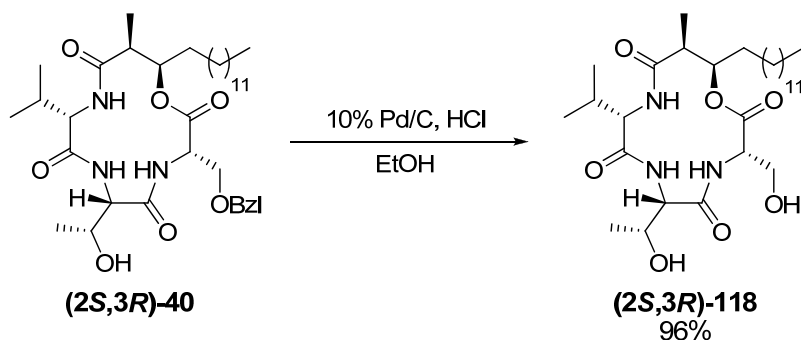


Abbildung 47: Debenzylierung eines unphosphorylierten Zyklopeptides unter Zugabe von einem Äquivalent HCl.

Zusammenfassend wurden neben acht Depsipeptiden mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz auch sechs diastereomere, benzylierte Zyklopeptide mit identischer Sequenz, sowie vier phosphorylierte Diastereomere hergestellt. Außerdem wurde zum Vergleich mit den phosphorylierten Zyklopeptiden ein benzylierter Makrozyklus debenzyliert. Um nun den Einfluss der variierten Stereozentren auf die gesamte Konformation der Depsipeptide zu untersuchen, wurden die Makrozyklen detaillierter studiert.

4.2 Konformationsanalyse

4.2.1 NMR-Experimente

4.2.1.1 Allgemein

Um die Vorzugskonformation der synthetisierten Stevastelin C3 Analoga **40**, **96** und **41** zu untersuchen, wurden verschiedene NMR-Experimente durchgeführt. Zur eindeutigen Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoff-Signale aus ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden zusätzlich APT^[138] (attached proton test), TOCSY^[71] (Total Correlation Spectroscopy), gHSQC^[73] (gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence) und gHMBC^[75] (gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence) Spektren aufgenommen. Aus der chemischen Verschiebung und Kopplungskonstanten verschiedener Signale konnten so erste Informationen erhalten werden.

Anschließend wurden 2D-ROESY^[81, 139] Spektren aufgenommen, um Proton-Proton Abstände zu ermitteln. Durch Integration der Signalvolumina der Kreuzsignale und den bekannten Abstand zweier Methylen-Protonen von 1.8 Å konnten diese berechnet werden und sollten später als Randbedingungen in Computer unterstützte Konformationsanalysen eingehen.

Zunächst wurden die diastereomeren Verbindungen **(2S,3R)-40**, **(2R,3S)-40**, **(2R,3R)-40** und **(2S,3S)-40** sowie die D-Serin enthaltenden Makrozyklen **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** betrachtet. Im Anschluss wurde mit Hilfe der Verbindungen **(2S,3R)-41**, **(2R,3S)-41**, **(2R,3R)-41** und **(2S,3S)-41** der Einfluss der Phosphorylierung auf die Konformation der Makrozyklen und deren Flexibilität untersucht.

4.2.1.2 Zuordnung der NMR-Signale

Nahezu alle Signale konnten eindeutig zugeordnet werden. Lediglich die Zuordnung diastereotoper Protonen, die aufgrund eingeschränkter Flexibilität unterschiedliche chemische Verschiebungen aufwiesen, war nicht eindeutig möglich. Die Protonen und Kohlenstoffe wurden mit Hilfe der Aminosäuren-Nomenklatur benannt (Abbildung 48) und die im Depsipeptid enthaltene Fettsäure mit BHA (β -hydroxy acid) abgekürzt.

4. Spezieller Teil

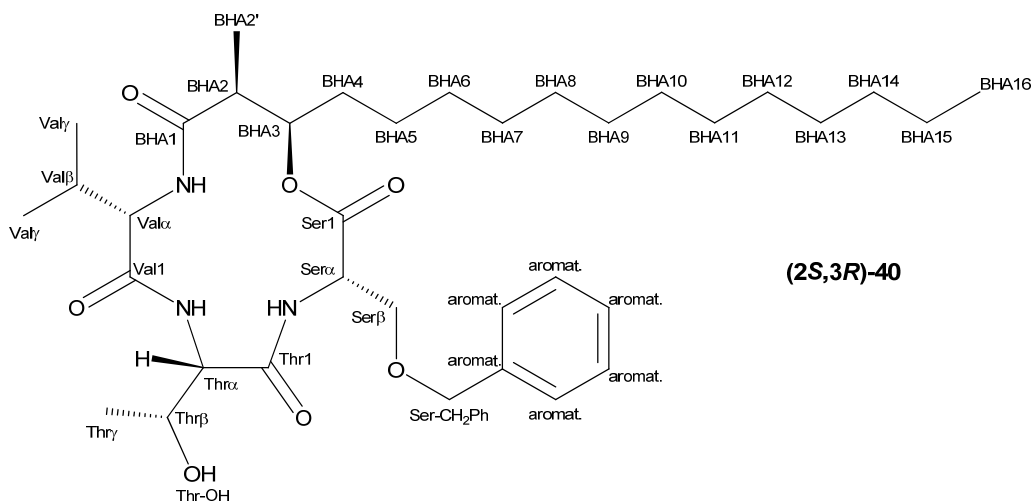


Abbildung 48: Systematische Benennung der Kohlenstoffe des Zyklopeptides **(2S,3R)-40**. BHA = β -Hydroxysäure (β -hydroxy acid).

In TOCSY Experimenten wird die Kopplung aller Protonen gleicher Spinsysteme detektiert. Es werden hierbei auch Kreuzsignale über mehr als drei Bindungen sichtbar. Da so alle Protonen einer Aminosäure in spezifischen Mustern miteinander koppeln, können alle Signale einem bestimmten Spinsystem (hier Aminosäure) zugeordnet werden.

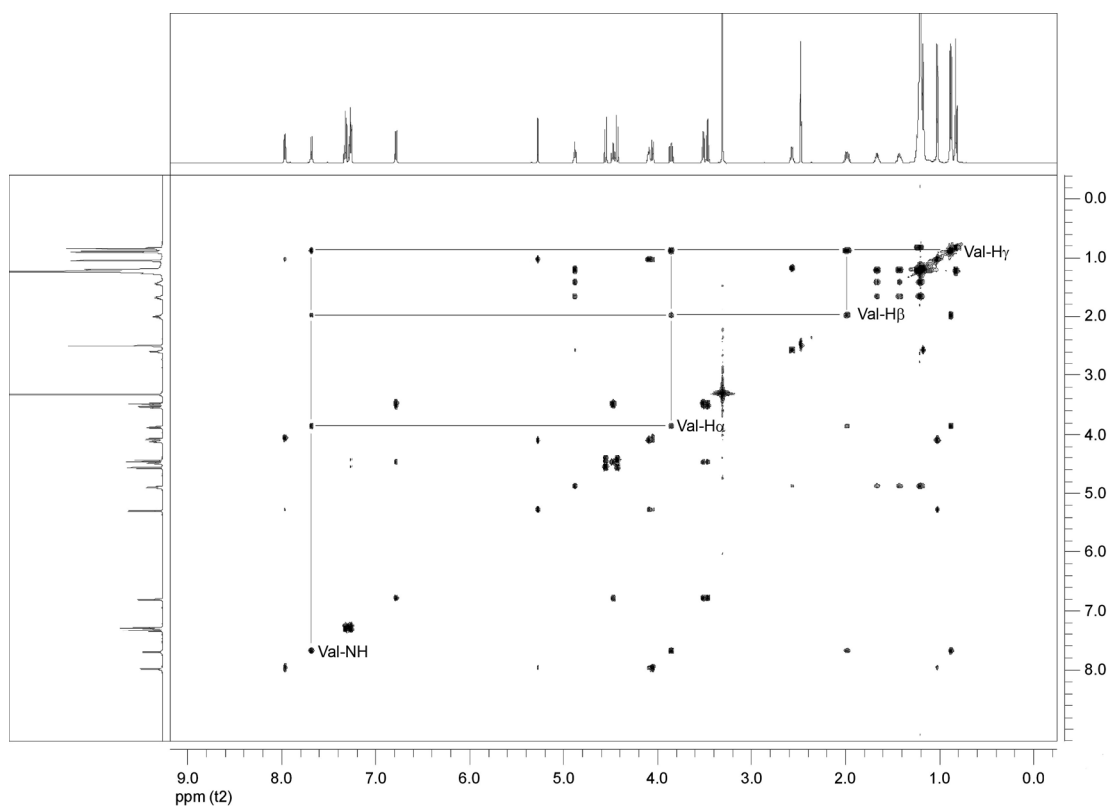


Abbildung 49: TOCSY-Spektrum von **(2R,3S)-40** in d_6 -DMSO mit exemplarischer Zuordnung der Valin-Protonen.

In Abbildung 49 wird exemplarisch die Zuordnung der Valin-Protonen des Makrozyklus **(2R,3S)-40** gezeigt. Das Val-NH Proton koppelt über drei Bindungen mit dem α -Proton, über vier Bindungen mit dem β -Proton und schließlich über fünf Bindungen mit den γ -Protonen des Valins, jedoch nicht mit dem vier Bindungen entfernten α -Proton der benachbarten Aminosäure. Mit Hilfe dieser TOCSY-Spektren konnten auch die eng beieinander liegende Signale der verschiedenen Methylgruppen aus Valin, Threonin und der β -Hydroxykette differenziert und zugeordnet werden.

Um die ^{13}C -Signale zuordnen zu können wurden zunächst gHSQC-Spektren verwendet (Abbildung 50). In diesen lässt sich neben der Verknüpfung der Protonen und Kohlenstoffe auch eine Aussage über die Anzahl der Protonen am Kohlenstoff treffen. Bei ein oder drei Protonen erhält man ein negatives Signal, bei zwei Protonen ein positives. So konnten auch stark überlagerte Signale wie das β -Valin Signal identifiziert werden, welches in einigen ^1H -Spektren vom DMSO-Signal verdeckt wurde.

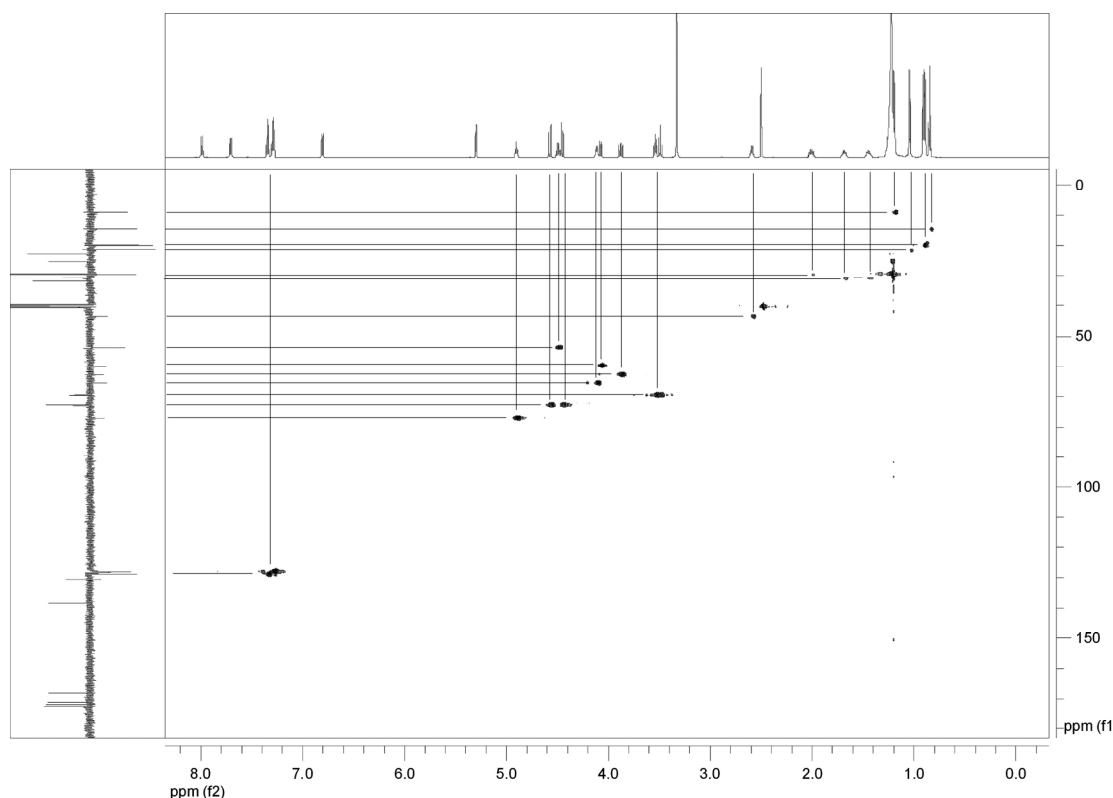


Abbildung 50: gHSQC Spektrum von **(2R,3S)-40** zur Zuordnung der ^{13}C -Signale.

Da quartäre Kohlenstoffe, wie z.B. Amid-Kohlenstoffe, keine Kreuzsignale im gHSQC Experiment zeigen, werden für die Zuordnung dieser Signale weitere Spektren benötigt. In gHMBC Spektren können ^1H - ^{13}C -Kopplungen über mehrere Bindungen sichtbar gemacht werden (Abbildung 51). Durch Kreuzsignale der Carbonyl-

Kohlenstoffe mit den α - und β -Protonen derselben Aminosäure oder dem NH-Proton der benachbarten Aminosäure können auch diese Signale eindeutig zugeordnet werden. In Abbildung 51 ist z.B. die Zuordnung des Serin-Carbonyls aus Zyklopeptid **(2R,3S)-40** gezeigt. Es sind Kreuzsignale mit α -, β - und NH-Protonen des Serins zu sehen. Gleichzeitig fällt aber auch der intensive Kreuzpeak des Ser-NH Protons mit einem anderen Carbonyl-Kohlenstoff auf. Dieses Signal kann deswegen, in Einklang mit einem weiteren Kreuzpeak mit dem Thr- α Proton, dem sequentiell benachbarten Threonin zugeordnet werden. Über verschiedene zweidimensionale NMR-Spektren konnten so alle Signale definierten Protonen und Kohlenstoffen der untersuchten Verbindung zugeordnet werden.

Die 2D NMR-Spektren der anderen Zyklopeptide befinden sich im Anhang.

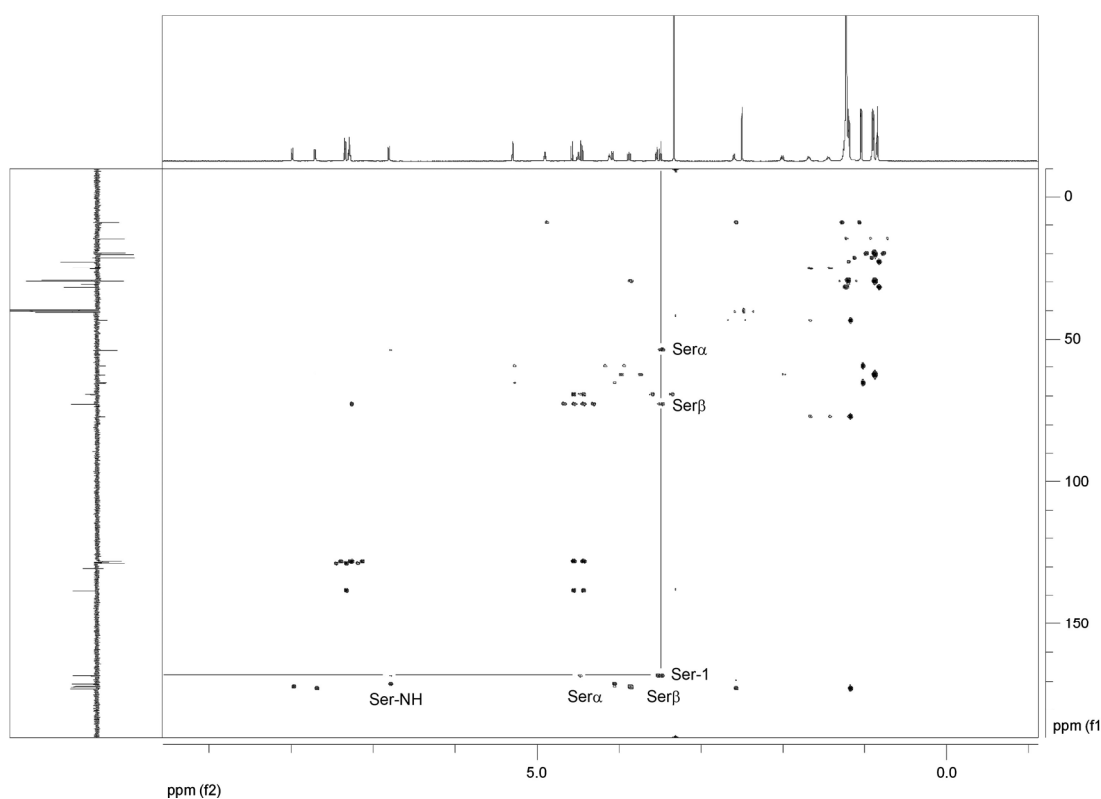


Abbildung 51: gHMBC Spektrum von **(2R,3S)-40** für die Zuordnung der Carbonyl-Kohlenstoffe.

4.2.1.3 Konformationsrelevante NMR-Parameter

Nach eindeutiger Korrelation aller Signale mit bestimmten Protonen und Kohlenstoffatomen der Makrozyklen, wurden diese detaillierter untersucht.

Bereits im Vergleich der ^1H -NMR Spektren der diastereomeren Verbindungen **40** und **96** konnten interessante Beobachtungen gemacht werden (Abbildung 52). Es wurde für jede Verbindung ein einziges Spektrum mit scharfen Signalen aufgenommen, was auf eine sehr rigide Konformation innerhalb der NMR-Zeitskala oder ein extrem schnelles Mitteln verschiedener Konformationen hinweist. In Kombination mit relativ großen $^3J(\text{NH-H}^\alpha)$ Kopplungskonstanten (8-10 Hz) ist erstere Vermutung allerdings wahrscheinlicher, da bei einer Mittelung verschiedener Strukturgeometrien wesentlich breitere Signale oder zumindest kleinere Kopplungskonstanten erwartet werden würden.

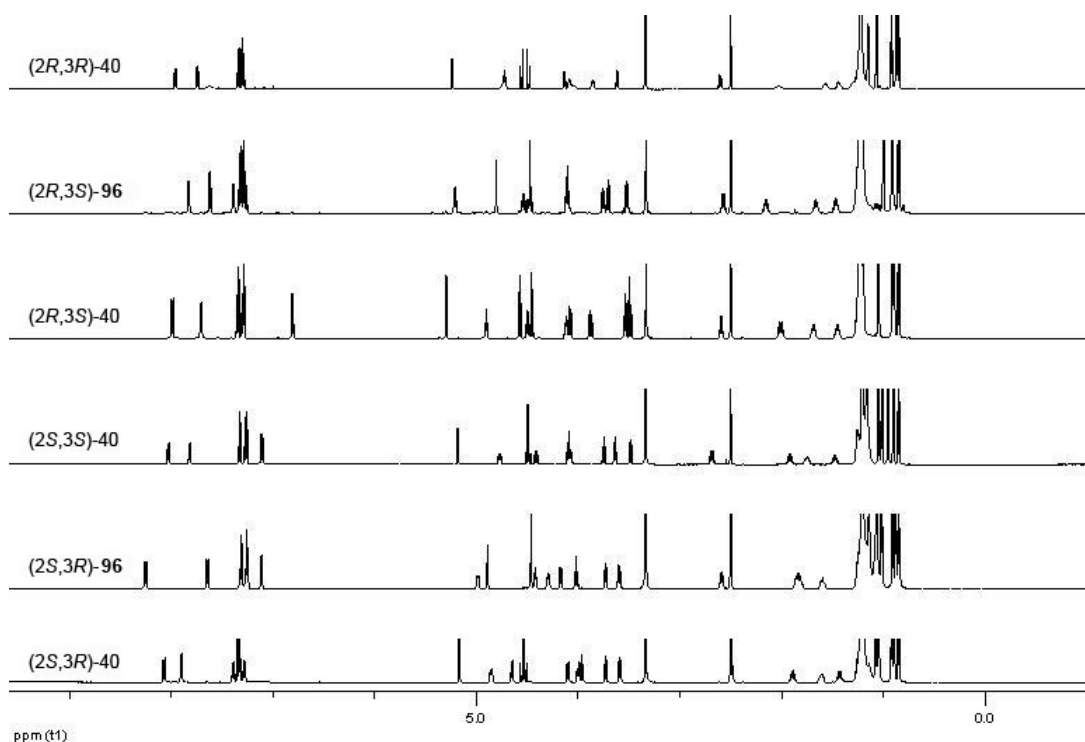


Abbildung 52: Vergleich der ^1H -NMR Spektren diastereomerer Makrozyklen in DMSO.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Proteine oder Peptide je nach Sekundärstruktur unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen.^[140, 141] Eine Hochfeld-Verschiebung der NH und H^α Protonen im Vergleich zur zufällig angeordneten Struktur weist hier auf vorhandene α -Helices hin, wohingegen eine Verschiebung dieser Signale in die entgegengesetzte Richtung auf β -Faltblätter hindeutet. Somit besteht eine eindeutige Verbindung zwischen der Konformation eines Peptids und der chemischen Verschiebung einiger Signale im NMR-Spektrum. Diese Beobachtungen lassen sich jedoch nicht problemlos auf Makrozyklen übertragen, die keine

Möglichkeit zur Ausbildung solcher Strukturelemente haben. Dennoch lässt sich feststellen, ob signifikante Unterschiede in der Konformation unterschiedlicher Makrozyklen gleicher Aminosäuresequenz vorliegen.^[142]

In einem Vergleich der ¹H-Spektren der offenkettigen Zyklisierungsvorläufer **42** untereinander wurden durch die hohe Flexibilität nur sehr geringe Unterschiede in der chemischen Verschiebung beobachtet, da diese hier nahezu ausschließlich von der Aminosäuresequenz abhängig sind.

Vergleicht man nun aber die in d₆-DMSO aufgenommenen ¹H-NMR Spektren der Verbindungen **(2S,3R)-40**, **(2R,3S)-40**, **(2R,3R)-40** und **(2S,3S)-40** sowie der Makrozyklen **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96**, so fallen signifikante Unterschiede auf (Abbildung 52).

Besonders deutliche Unterschiede wurden vor allem im Bereich der NH-Protonen erkennbar (Abbildung 53). Während das Dublett des Threonin-NH Protons bei Verbindung **(2R,3R)-40** mit einer chemischen Verschiebung von 7.94 ppm weit tieffeldverschoben ist, zeigt die epimere Verbindung **(2S,3R)-40** für das gleiche Signal eine wesentlich geringere chemische Verschiebung von 7.37 ppm. Durch die Variation eines einzigen Stereozentrums im Rückgrat des Makrozyklus kann so eine erhebliche Veränderung im Proton-NMR der Verbindung hervorgerufen werden. Besonders große Unterschiede sind auch in den Spektren der Epimere **(2R,3S)-40** und **(2R,3S)-96** zu erkennen. Im Vergleich zur L-Serin enthaltenden Verbindung **(2R,3S)-40** weist die D-Serin enthaltende Verbindung **(2R,3S)-96** eine wesentlich größere chemische Verschiebung des Serin-NH Protons auf, dafür aber eine kleinere Verschiebung der Threonin-NH Protonen. Neben den NH-Verschiebungen weisen auch die Thr-OH, BHA3-H und Val-H^α Protonen unterschiedliche Verschiebungen auf.

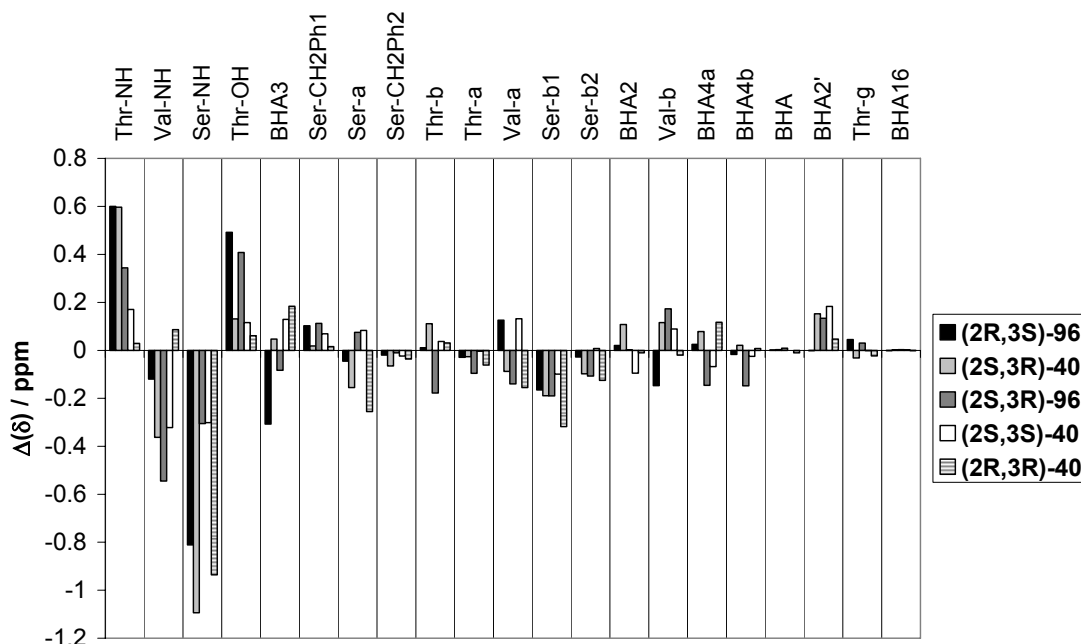


Abbildung 53: Unterschied ausgewählter chemischer Verschiebungen der Zyklodepsipeptide **40** und **96** im Vergleich zu Zyklus **(2R,3S)-40** zu.

Die deutlichen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen lassen auf unterschiedliche chemische Umgebungen der Protonen schließen.^[142] Da aber in allen Makrozyklen identische Aminosäuresequenzen vorliegen, muss dieser Unterschied durch Veränderungen in der Konformation der Makrozyklen hervorgerufen werden.

Neben den Hinweisen aus unterschiedlichen chemischen Verschiebungen auf verschiedene Konformationen der diastereomeren Makrozyklen, können aus den $^3J(\text{NH-H}^\alpha)$ Kopplungskonstanten wertvolle Informationen über die ϕ -Diederwinkel im Peptidrückgrat der Makrozyklen erhalten werden. Über die Karplus-Gleichung^[77] mit den von Bystrov *et al.*^[78] empirisch ermittelten Konstanten für Peptide (Abbildung 13, Kapitel 2.3.2) ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für die Torsionswinkel (Tabelle 7). Da die Kopplungskonstanten jedoch aus gemittelten Konformationen hervorgehen und die Karplus-Gleichung mehrdeutig ist, gingen die berechneten Torsionswinkel nicht als Randbedingungen in computerunterstützte Konformationsanalysen ein, sondern dienen lediglich zur Validierung erhaltener Strukturen.

Zudem wurden über NOE-Signale *trans*-Peptidbindungen bestätigt. Um genauere Aussagen über die Konformation der vorliegenden 13-gliedrigen Makrozyklen treffen zu können, werden weitere NMR-Experimente benötigt.

4. Spezieller Teil

Verbindung		δ / ppm	3J / Hz	θ ($C'NC^\alpha C'$)
(2S,3S)-40	Ser-NH	7.09	8.3	-90°, -150°, +48°, +72°
	Thr-NH	7.80	9.3	-96°, -144°
	Val-NH	8.01	8.2	-89°, -151°, +46°, +74°
(2S,3R)-40	Ser-NH	7.88	8.7	-92°, -148°
	Thr-NH	7.37	9.7	-120°
	Val-NH	8.05	10.1	-104°, -136°
(2R,3R)-40	Ser-NH	7.72	9.0	-94°, -196°
	Thr-NH	7.94	10.1	-103°, -137°
	Val-NH	7.60	/	/
(2R,3S)-40	Ser-NH	6.78	9.3	-96°, -144°
	Thr-NH	7.97	9.6	-98°, -142°
	Val-NH	7.68	9.2	-96°, -144°
(2R,3S)-96	Ser-NH	7.60	8.4	+90°, +150°, -71°, -41°
	Thr-NH	7.37	9.3	-96°, -144°
	Val-NH	7.81	7.5	-84°, -156°, +38°, +82°
(2S,3R)-96	Ser-NH	7.09	6.5	+79°, +161°, -90°, -30°
	Thr-NH	7.62	9.3	-96°, -144°
	Val-NH	8.23	9.8	-101°, -139°

Tabelle 7: Mögliche Torsionswinkel aus Kopplungskonstanten.

Da es bei den untersuchten Makrozyklen **40** und **96**, wie bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben, zu Auslöschungen des NOEs kommen kann, wurden stattdessen ROESY-Experimente (Rotating Frame NOESY) durchgeführt. Auf diese Weise waren innerhalb der Fehlergrenzen zuverlässige Aussagen über Proton-Proton-Abstände ($r^{-6} \sim \text{NOE}$) möglich.

Zu beachten galt hierbei, dass die Signalvolumina nicht nur vom Abstand der koppelnden Kerne, sondern auch von der Mischzeit der NMR-Experimente abhängig waren. Aus diesem Grund wurden Experimente mit vier verschiedenen Mischzeiten (150, 200, 300, 500 ms) durchgeführt. Eine Mischzeit von 300 ms erwies sich hierbei als ideal (Abbildung 54).

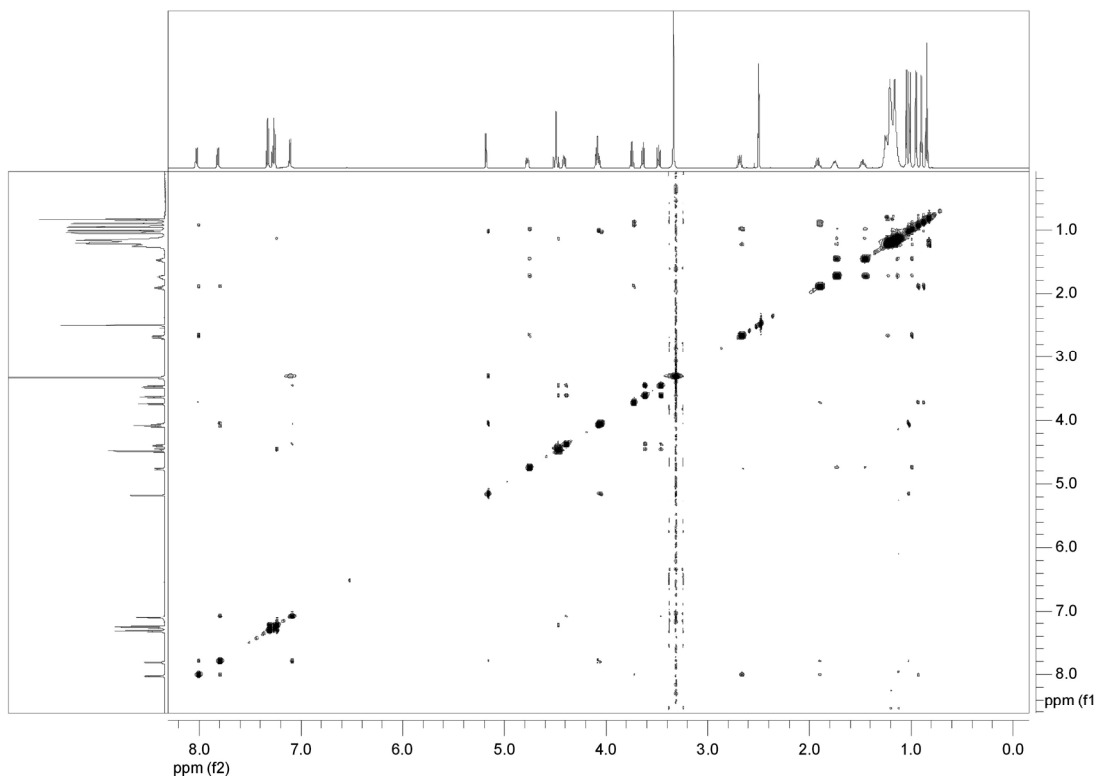


Abbildung 54: ROESY-Spektrum des Zyklopeptides **(2S,3R)-40** bei 300 ms Mischzeit.

Die Signale konnten eindeutig zugeordnet und integriert werden. Die Berechnung der Signalvolumina erfolgte mit Hilfe des Programms Aurelia der Firma Bruker. Eine bei ROESY Spektren benötigte „offset“-Korrektur erfolgte mit einem in dem Programm Aurelia implementierten Verfahren^[139]. Als Referenz diente der Abstand der geminalen Protonen BHA4-H₂ zueinander, der auf 1.8 Å gesetzt wurde. Exemplarisch zeigt Abbildung 55 ausgewählte, sequentielle ROESY Korrelationen für Makrozyklus **(2S,3R)-40**.

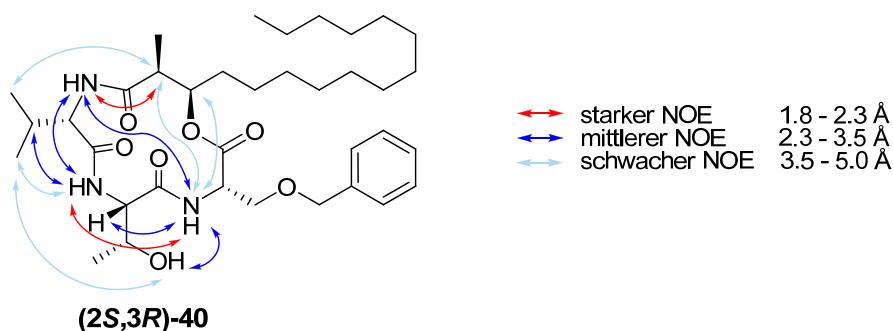


Abbildung 55: Ausgewählte ROE-Kontakte des Makrozyklus **(2S,3R)-40**.

Besonders wichtig zur Konformationsanalyse der Makrozyklen sind hierbei die beobachteten Proton-Proton Abstände entlang des Peptidrückgrats. Klassisch werden auftretende Signale nach unterschiedlichen Kriterien in verschiedene Gruppen

4. Spezieller Teil

unterteilt (Tabelle 8). Die Sequenz gibt an in welchem Abstand zueinander sich die beiden Bausteine (Aminosäuren bzw. β -Hydroxysäure) befinden, aus denen die beiden betrachteten Protonen stammen. Hierbei bedeutet interresidual (i), dass beide Protonen sich im gleichen Aminosäurerest befinden, während sequentiell (s) bedeutet, dass die Bausteine direkt benachbart sind. Befinden sich die Reste in einem größeren Abstand (i+2) zueinander, so wird das als mittlere Reichweite (m) bezeichnet. Des Weiteren werden die Abstände klassisch in drei Reichweiten unterteilt. Bei einem Abstand von 1.8 - 2.3 Å zweier Protonen voneinander wird dieser als „strong“ (s) klassifiziert, bei 1.8 - 3.5 Å als „medium“ (m) und bei 1.8 - 5 Å als „weak“ (w).

ROE	Proton	Proton	Sequenz	Stärke	Randbedingung*
1	Val-NH	BHA2'-H ₃	s	m	n
2	Val-NH	Ser-NH	m	m	j
3	Val-NH	Val-H γ a	i	m	n
4	Val-NH	Val-H β	i	m	j
5	Val-NH	Thr-NH	s	m	j
6	Val-NH	BHA2-H	s	s	j
7	Val-NH	Val-H γ b	i	m	n
8	Thr-NH	Val-H γ a	s	m	n
9	Thr-NH	Val-H γ b	s	m	n
10	Thr-NH	Thr-OH	i	m	j
11	Thr-NH	Thr-H γ	i	m	n
12	Thr-NH	Val-H β	s	m	j
13	Thr-NH	Ser-NH	s	s	j
14	Ser-NH	Ser-H β a	i	m	j
15	Ser-NH	Ser-CH ₂ Ph	i	m	j
16	Ser-NH	Thr-OH	s	w	j
17	Ser-NH	Ser-H β b	i	m	j
18	Thr-OH	Thr-H γ	i	m	n
19	BHA3-H	BHA2-H	i	m	j
20	BHA3-H	BHA4-Hb	i	m	j
21	BHA3-H	BHA4-Ha	i	m	j
22	BHA3-H	BHA2'-H ₃	i	m	n
23	Ser-CH ₂ Ph	Ser-H β b	i	m	j

24	Ser-CH ₂ Ph	Ser-H β a	i	m	j
25	Ser-H α	Ser-H β b	i	m	j
26	Ser-H α	Ser-H β a	i	m	j
27	Ser-H β a	Ser-H β b	i	s	j
28	BHA2-H	BHA2'-H ₃	i	s	n
29	BHA2-H	BHA4-Hb	i	m	j
30	Val-H β	Val-H γ a	i	s	n
31	BHA4-Ha	BHA4-Hb	i	s	j
32	BHA4-Ha	BHA2'-H ₃	i	m	n
33	BHA4-Hb	BHA2'-H ₃	i	m	n
34	BHA2'-H ₃	Val-H α	s	w	n

Tabelle 8: Zuordnung und Klassifizierung aller ROE-Kontakte des Makrozyklus (2S,3S)-40. *Als Randbedingung in computerunterstützter Konformationsanalyse verwendet, j = ja, n = nein.

Für die Makrozyklen **40** und **96** wurden zwischen 33 und 40 NOE-Kontakte ermittelt, also ca. 9 pro Aminosäure bzw. Hydroxysäure. Etwa 24 von diesen Signalen stellten intraresiduale Kontakte dar, 12 sequentielle und einer einen Kontakt mittlerer Reichweite.

Einige Abstände beziehen sich auf Methylgruppen, bei denen die drei Protonen nicht differenziert werden können und durch die freie Drehbarkeit der Methylgruppe als ein Signal auftreten. Der Abstand kann in diesem Fall auf ein sogenanntes Pseudoatom bezogen werden, welches sich im Zentrum der drei Wasserstoffatome befindet. Durch diese Näherung besteht bei diesen Abständen jedoch ein größerer Fehler als bei den anderen Abständen zu definierten Protonen.

Außer den diastereomeren Makrozyklen wurden phosphorylierte Zyklopeptide synthetisiert. Die Phosphorylierung von Peptiden und Enzymen stellt in der Natur ein wichtiges Werkzeug zur Aktivierung oder Deaktivierung verschiedener Enzyme dar. Diese Wirkung wird meist durch eine bedeutende Veränderung der Konformation des phosphorylierten Enzyms durch den veränderten sterischen Anspruch und vor allem durch die Einführung eines geladenen Restes erzielt.

Betrachtet man die ¹H-NMR Spektren der synthetisierten Phosphozyklen **41**, so lässt sich teilweise eine Signalverbreiterung feststellen, was auf eine erhöhte Flexibilität hinweisen kann. Abgesehen davon lässt sich eindeutig eine drastische Verschiebung einiger Protonen im Vergleich zu den unphosphorylierten Makrozyklen erkennen (Abbildung 56).

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Phosphorylierung von Threoninresten in Peptiden zur Koordination des zugehörigen Amidprotons führt.^[143] In NMR-Studien konnte beobachtet werden, dass eine deutliche Verschiebung des koordinierten Amidsignals sowie des Thr-H^β Protons im ¹H-NMR-Spektrum zu tieferem Feld hin auftrat. Beim Vergleich der chemischen Verschiebungen der benzylierten und der phosphorylierten Zyklen **40** und **41** miteinander, konnte jedoch nur eine allgemeine Verschiebung aller Amidprotonen zu tieferem Feld beobachtet werden (Abbildung 56).

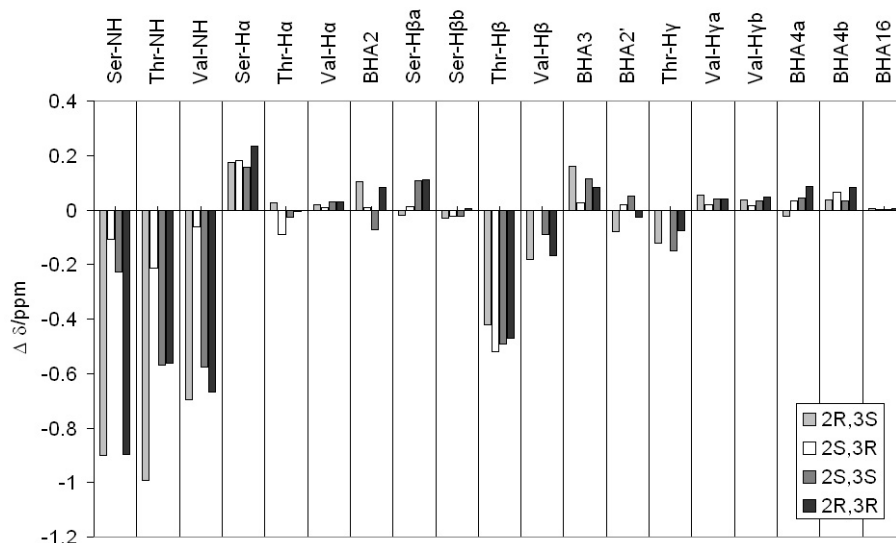


Abbildung 56: Durch Phosphorylierung erhaltene Veränderungen der chemischen Verschiebungen der diastereomeren Makrozyklen **40** und **41** mit $\Delta\delta = \delta(\mathbf{41}) - \delta(\mathbf{40})$.

Aus diesen Daten ging nicht eindeutig hervor, welches der Amidprotonen vom Phosphat koordiniert wird. Es konnte eher davon ausgegangen werden, dass für alle drei Amidprotonen die Möglichkeit zur Phosphatkoordination bestand.

Wegen der beobachteten Signalverbreiterungen im ¹H-NMR Spektrum wurde auf die Durchführung von ROESY-Experimenten verzichtet und stattdessen eine Konformationsanalyse und eine Flexibilitätsanalyse ohne Randbedingungen aus NMR-Studien durchgeführt. Ergebnisse aus diesen Studien sollten einen unverfälschten Einblick in die 3D-Struktur der phosphorylierten Makrozyklen **41** und einen Vergleich mit den unphosphorylierten Verbindungen **40** ermöglichen.

4.2.2 Kraftfeldrechnungen

4.2.2.1 Allgemein

Nachdem bereits aus NMR-Experimenten vielversprechende Hinweise auf unterschiedliche und stabile Konformationen der benzylierten Makrozyklen **(2S,3R)-40**, **(2R,3S)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2S,3S)-40** sowie **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** gewonnenen werden konnten, sollten nun Kraftfeldrechnungen dieser 13-gliedrigen Ringe weitere Einblicke in ihre Konformationen geben.

Hierzu wurde zunächst ein dreidimensionales Model des zu untersuchenden Moleküls konstruiert und in das Kraftfeldprogramm eingelesen (Abbildung 57). Hierbei war es wichtig, alle Stereozentren auf ihre korrekte Konfiguration zu überprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren.

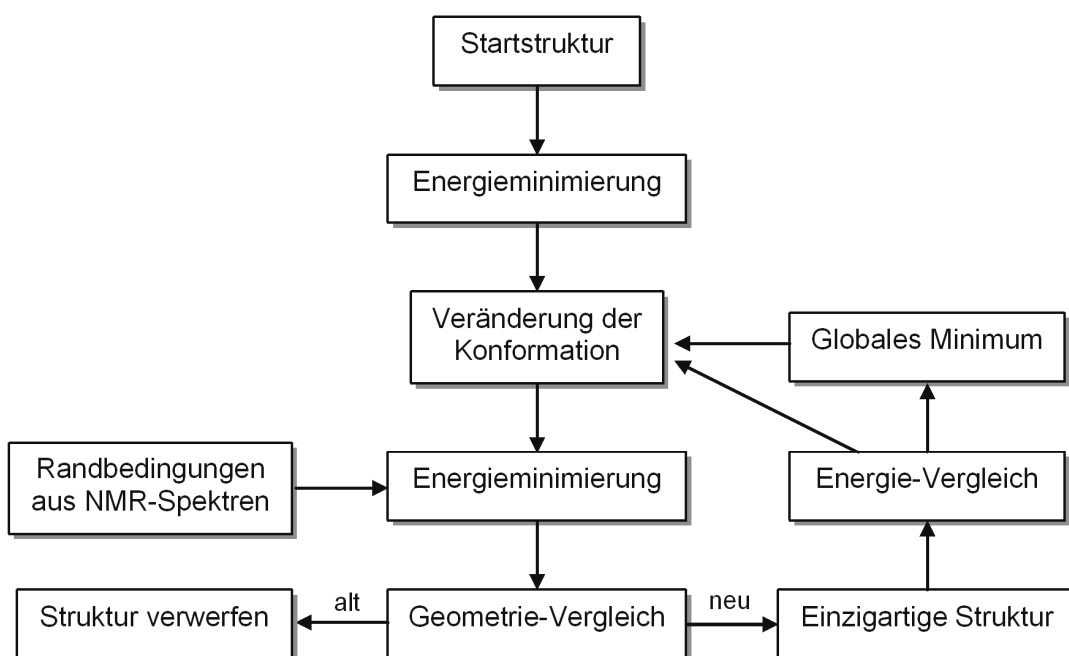


Abbildung 57: Flussdiagramm der Kraftfeldrechnungen.

Zur möglichst vollständigen Absuche der Potentialhyperfläche wurde das bereits diskutierte LMOD-Verfahren^[84] verwendet (Kapitel 2.3.3). Dieses generierte aus der gegebenen Struktur verschiedene Startgeometrien, welche in ihrer Energie minimiert wurden. Aus einem ermittelten lokalen Energieminimum wurde über die Sattelpunkte der Energiehyperfläche das nächste benachbarte Minimum ermittelt. Diese sehr systematische Methode reduziert die Rechenzeit im Vergleich zu anderen sehr sprunghaften Verfahren wie der stochastischen Monte-Carlo-Methode enorm.

Die Energieminimierungen erhaltener Strukturen wurden im OPLS2005-Kraftfeld^[144] mit implementiertem GB/SA-Solvatisierungsmodell^[145] durchgeführt, dessen

Parameter besonders für zyklische Peptide in Lösung optimiert wurden. Ein TNCG-Algorithmus^[83] lieferte in maximal 10 000 Schritten erfolgreich konvergierte Strukturen. Um zu entscheiden, ob eine erhaltene Geometrie eine neue, einzigartige oder eine bereits gefundene war, wurden die untersuchten Strukturen überlagert. Die sehr flexible Alkylkette der Fettsäure wurde hierbei auf sechs Kohlenstoffe verkürzt. Auch die relativ frei rotierbare Benzylgruppe der Serinseitenkette wurde für diese Betrachtung außer Acht gelassen. Die Ähnlichkeit zweier Strukturen wurde schließlich über den RMSD-Wert (root mean square deviation) beschrieben. Je weiter zwei zu vergleichende Atome in einer Überlagerung voneinander entfernt sind, desto höher ist dieser Wert. Eine einzigartige Konformation wurde durch einen RMSD-Wert von 0.25 Å definiert.

Um die besonders interessante Konformation des globalen Energieminimums zu finden, musste gewährleistet sein, dass die Potentialhyperfläche vollständig abgesucht wurde. Als Indikator hierfür wurde die Anzahl der Wiederholungen, mit denen ein und dieselbe Konformation berechnet wurde, verwendet. Wenn keine neuen Geometrien sondern immer wieder eine bereits gefundene Konformation ermittelt wurde, wurde die Konformationsanalyse als weitgehend vollständig betrachtet und beendet. Zur Kontrolle wurde eine andere Ausgangsgeometrie zur Generierung neuer Startkonformationen verwendet. Wurden in der darauf folgenden Rechnung keine neuen Strukturen gefunden, war die Konformationsanalyse abgeschlossen.

Zur Analyse der erhaltenen Konformationen eines Makrozyklus wurden diese nach Ähnlichkeiten (RMSD = 0.1) sortiert und in Gruppen (Cluster) eingeteilt.

Die Kraftfeldrechnungen wurden zunächst mit Randbedingungen aus NMR-Experimenten durchgeführt. Hierzu wurden aus ROESY-Experimenten berechnete Proton-Proton Abstände (siehe Anhang) über harmonische Potentialfunktionen mit in die Energieminimierung einbezogen.^[146] Außerhalb der gegebenen Fehlergrenzen von $\pm 10\%$ hatten Abweichungen eine Erhöhung der Gesamtenergie der erhaltenen Konformation zur Folge, wodurch die Bewertung einzelner Molekülgeometrien beeinflusst wurde.

Anschließend wurden zur Untersuchung des kompletten Konformationsraumes der Makrozyklen und somit auch zur Feststellung ihrer Flexibilität Rechnungen ohne Randbedingungen durchgeführt.

Die im Folgenden diskutierten Kraftfeldrechnungen wurden mit Unterstützung von Dipl.-Chem. Stefan Wetzel durchgeführt.

4.2.2.2 Kraftfeldrechnungen mit Randbedingungen aus NMR-Studien

Zunächst wurden die diastereomeren Makrozyklen **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40** sowie **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** bezüglich ihrer Konformationen untersucht. Durch die Verwendung der berechneten Proton-Proton Abstände sollte so ein möglichst realistisches Bild der Konformation in Lösung ermittelt werden.

Versuche Abstände zu Methylgruppen über Pseudoatome zu berücksichtigen führten nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen, daher wurden die Rechnungen ohne Abstände zu Methylgruppen durchgeführt, was zu konsistenten und reproduzierbaren Ergebnissen führte. Andere diastereotope Atome, die wie die Protonen C4-H₂ der β -Hydroxysäure unterschiedliche chemische Verschiebungen aufwiesen, konnten hingegen in die Rechnung mit einbezogen werden. Wenn sie nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wählte das Programm während der Energieminimierung das Wasserstoffatom, welches zur energetisch begünstigten Konformation führte. Insgesamt konnten so pro Makrozyklus ca. 26 Proton-Proton Abstände als Randbedingungen für die Konformationssuche verwendet werden (siehe Anhang).

Mit Hilfe dieser experimentell ermittelten Randbedingungen konnten nun verschiedene Konformationen für die Makrozyklen berechnet werden. Dramatische Verletzungen der Randbedingungen traten bei diesen Rechnungen nicht auf.

Betrachtet man zunächst die vier Makrozyklen **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40** und **(2R,3S)-40** die sich ausschließlich durch die Variation zweier Stereozentren der β -Hydroxysäure voneinander unterscheiden, wies eine der ermittelten Konformationen des Stevastelin-Analogons **(2S,3S)-40** (-258.3 kJ/mol) die niedrigste Energie auf (Tabelle 9).

	Makrozyklus	Randbed.*	E _{min} /kJ mol ⁻¹	Konformationen	Cluster
1	(2S,3S)-40	23	-258.3	355	19
2	(2S,3R)-40	28	-239.4	261	4
3	(2R,3R)-40	26	-229.3	259	21
4	(2R,3S)-40	23	-237.0	160	2
5	(2S,3R)-96	26	-147.6	322	14
6	(2R,3S)-96	30	-226.9	175	2

Tabelle 9: Ergebnisse der Kraftfeldrechnungen mit NMR-Randbedingungen. *Anzahl.

Die energieärmsten Konformationen der Makrozyklen **(2S,3R)-40** und **(2R,3S)-40** folgten mit -239.4 bzw. -237.0 kJ/mol, während Makrozyklus **(2R,3R)-40** schließlich

mit einem Energieunterschied von 29 kJ/mol zum zyklischen Depsipeptid **(2S,3S)-40** die höchste Energie (-229.3 kJ/mol) aufwies. Interessanterweise korrelierten diese Ergebnisse mit den Zyklisierungsausbeuten für die gespannten Ringe, so dass der Ring mit der geringsten Energie mit der höchsten Ausbeute zyklisiert werden konnte. Die D-Serin enthaltenden Ringe **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** wiesen vergleichsweise hohe Energien auf.

In den berechneten energieärmsten Konformationen der Zyklodepsipeptide **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40** und **(2R,3S)-40** war die Orientierung der Aminosäurereste vergleichbar, da sie alle auf eine Seite der Ringebene zeigten (Abbildung 58). Im Gegensatz hierzu konnte die Orientierung der langen Alkylkette der Hydroxysäure durch die Stereochemie an Kohlenstoff C-3 der Säure bestimmt werden. Der peptidische Teil des Zyklus schien somit die Konformation des Rückgrats des Makrozyklus zu bestimmen, während die Wahl der Konfiguration an C-3 den sterischen Anspruch des rigiden Gerüsts vorgab.

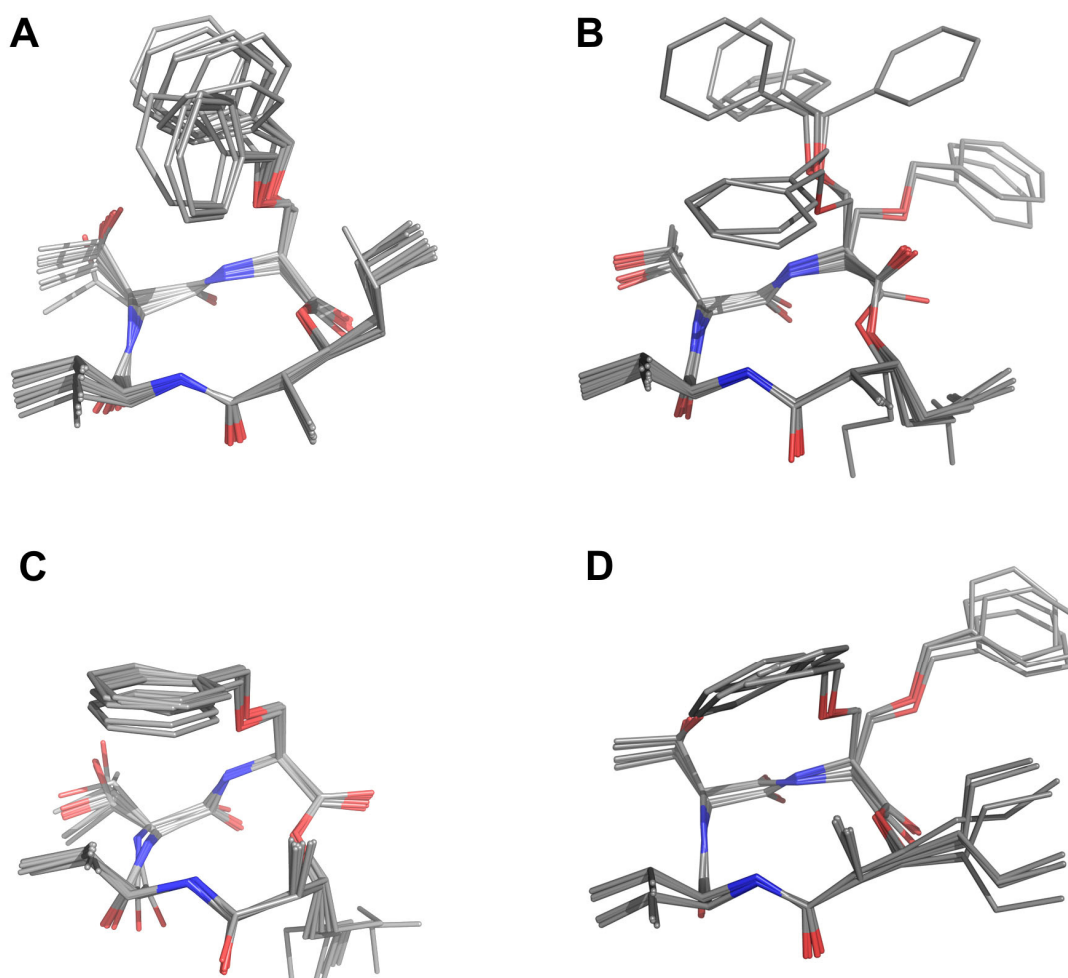


Abbildung 58: Die jeweils 10 energieärmsten Konformationen der diastereomeren Zyklodepsipeptide aus Kraftfeldrechnungen mit Randbedingungen aus ROESY-Experimenten: A) **(2S,3S)-40**; B) **(2S,3R)-40**; C) **(2R,3R)-40**; D) **(2R,3S)-40**.

Genauer betrachtet weisen die Makrozyklen **(2S,3S)-40** und **(2R,3S)-40** nahezu identische Rückgrat-Konformationen auf. Sie unterscheiden sich nur durch die Orientierung der Methylgruppe, was durch das invertierte Stereozentrum an dieser Position hervorgerufen wird. Daraus lässt sich schließen, dass die Konfiguration an dieser Stelle die Topologie des rigiden Templates wesentlich weniger beeinflusst als der peptidische Teil des Zyklus und die Konfiguration des C-3 Stereozentrums.

Vergleicht man jedoch die Makrozyklen mit *R*-konfiguriertem C-3, so zeigt sich ein anderes Bild. Die Epimere **(2R,3R)-40** und **(2S,3R)-40** unterscheiden sich deutlich in ihren Rückgratkonformationen. Verbindung **(2R,3R)-40** hat hierbei die gleiche Konfiguration der Stereozentren wie das natürliche Stevastelin C3. Die *R*-Konfiguration des Stereozentrums an C-3 zwingt den Makrozyklus in eine leicht verdrehte Ringstruktur, in der der Threoninrest im Vergleich zu den Konformationen der Makrozyklen **(2S,3S)-40** und **(2R,3S)-40** nach unten gedrückt wird, während das Serin-Carbonyl nach oben aus der Ringebene gedreht wird. Bei Stevastelin-Analogon **(2S,3R)-40** führt die *R*-Konfiguration an C-3 zu einer noch extremeren Veränderung der Ausrichtung des Serin-Carbonyls, welches in diesem Fall in die entgegengesetzte Richtung weist. Der Threoninrest behält dafür die Ausrichtung bei, die er auch in den Depsipeptiden **(2S,3S)-40** und **(2R,3S)-40** aufzeigte.

Wesentlich drastischer verändert sich die Konformation der Makrozyklen bei einer Veränderung der Stereochemie des α -Serins. Wird hier ein *D*-Serin anstelle des bisher untersuchten *L*-Serins eingebaut (**(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96**), so verändert sich die Geometrie des Makrozyklus' vollständig (Abbildung 59).

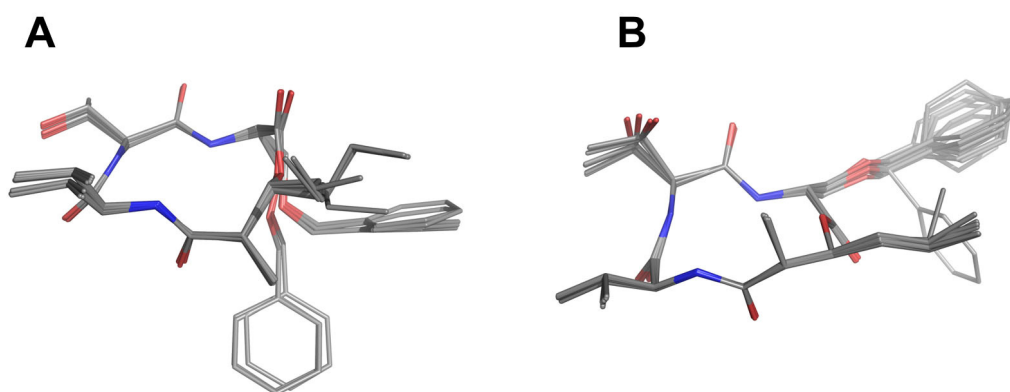


Abbildung 59: Die jeweils 10 energieärmsten Konformationen der *D*-Serin enthaltenden Zyklodepsipeptide aus Kraftfeldrechnungen mit Randbedingungen: A) **(2S,3R)-96** und B) **(2R,3S)-96**.

Im Zyklodepsipeptid **(2S,3R)-96** weisen nun nicht mehr alle Carbonyle auf eine Seite der Ringebene, sondern zwei auf die eine Seite und zwei auf die andere. Außerdem ragt der benzylierte Serinrest durch das invertierte Stereozentrum auf die andere

Seite des Ringes, wodurch sich der sterische Anspruch des Zyklodepsipeptides deutlich verändert. Auch das Zyklodepsipeptid **(2R,3S)-96** verändert bei der Einführung eines D-Serins seine Konformation drastisch. Dadurch dass der Serinrest nach unten gedreht wird, wird das Threonincarboxyl nach oben gebogen, wodurch eine Art Wanne entsteht. Durch den Austausch von L-Serin gegen D-Serin wird durch die veränderte Ausrichtung der Carbonyle und Aminosäurereste ein modifizierter sterischer Anspruch sowie neuartige Möglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindung generiert.

Insgesamt kann also für die diastereomeren Zyklodepsipeptide **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40** sowie **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** festgestellt werden, dass die Konformation des Makrozyklus hauptsächlich durch den peptidischen Teil des Ringes bestimmt wird. Bereits die Inversion eines einzigen Stereozentrums in diesem Teil führt zu einer drastischen Veränderung der Konformation, während eine Inversion der Stereochemie an C-2 der β -Hydroxysäure nur einen sehr kleinen Einfluss auf die Gesamtgeometrie der Verbindung ausübt. Die Stereochemie an C-3 der β -Hydroxysäure hingegen hat einen Einfluss auf die dreidimensionale Struktur des Makrozyklus, verändert diese aber nicht so stark wie eine Änderung der Serin-Konfiguration. Vielmehr entsteht durch die Inversion des Stereozentrums C-3 der β -Hydroxysäure ein neuer sterischer Anspruch, da dadurch die lange Alkylkette in die andere Richtung der Ringebene zeigt.

Im direkten Vergleich der D-Ser und L-Ser enthaltenden Zyklodepsipeptide (Abbildung 60) ist der veränderte sterische Anspruch besonders gut zu erkennen.

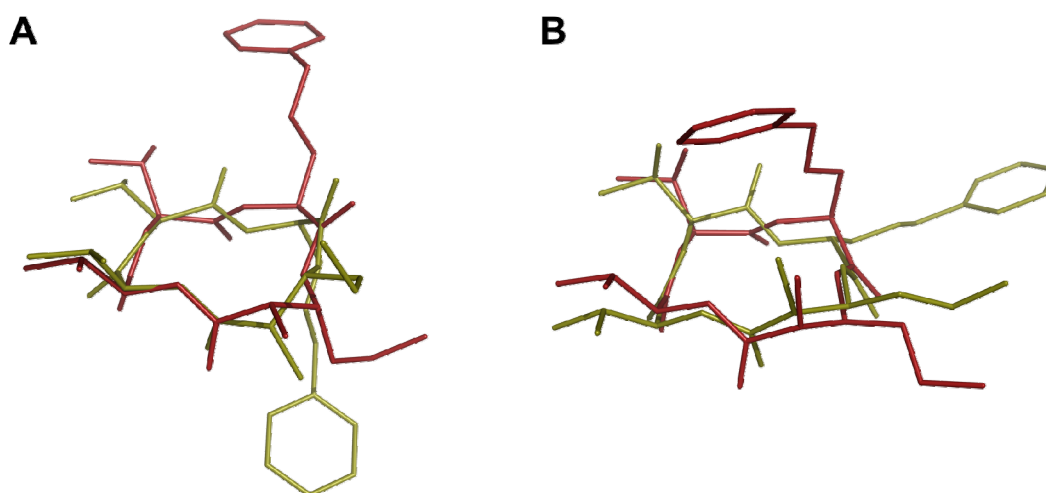


Abbildung 60: Vergleich der Konformationen mit L-Ser und D-Ser: A) rot = **(2S,3R)-40**, olive = **(2S,3R)-96**; B) rot = **(2R,3S)-40**, olive = **(2R,3S)-96**.

Insgesamt konnte mit Hilfe dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass die Einführung einer β -Hydroxysäure in einen gespannten Makrozyklus zu stabilen, homogenen Templaten führen kann. Durch Veränderung der Serin-Konfiguration kann die Geometrie des Makrozyklus' grundlegend verändert werden, während die Variation der Stereochemie in der β -Hydroxysäure nahezu ausschließlich die Orientierung der Alkylkette beeinflusst. 13-gliedrige Depsipeptide eignen sich somit zur Darstellung rigider Template, welche z.B. als Modellsysteme für natürliche Proteinschleifen dienen könnten.

4.2.2.3 Einfluss der Phosphorylierung auf Konformation und Flexibilität

In natürlicher Umgebung wird eine Aktivierung oder Deaktivierung bestimmter Enzyme oft durch eine induzierte Konformationsänderung erreicht. Eines der wichtigsten Werkzeuge der Natur hierfür stellt die reversible Phosphorylierung dar. Durch die eingeführte Ladung und den erhöhten sterischen Anspruch sowie neue Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbindung können so Veränderungen in der Konformation die biologische Aktivität der Enzyme modifizieren.

Durch die Phosphorylierung der Zyklodepsipeptide sollte der Einfluss dieser Modifikation auf die Konformation der Makrozyklen studiert werden. Da jedoch bereits in den vorangegangenen NMR-Studien gezeigt werden konnte, dass in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindungen **(2S,3S)-41**, **(2S,3R)-41**, **(2R,3R)-41** und **(2R,3S)-41** (Abbildung 61) Linienverbreiterung einiger Signale auftrat, wurde erhöhte Flexibilität der Zyklen vermutet. Aus diesem Grund wurden statt Kraftfeldrechnungen mit eventuell verfälschten oder über verschiedene Strukturen gemittelten Proton-Proton Abständen Konformationsanalysen ohne Randbedingungen durchgeführt.

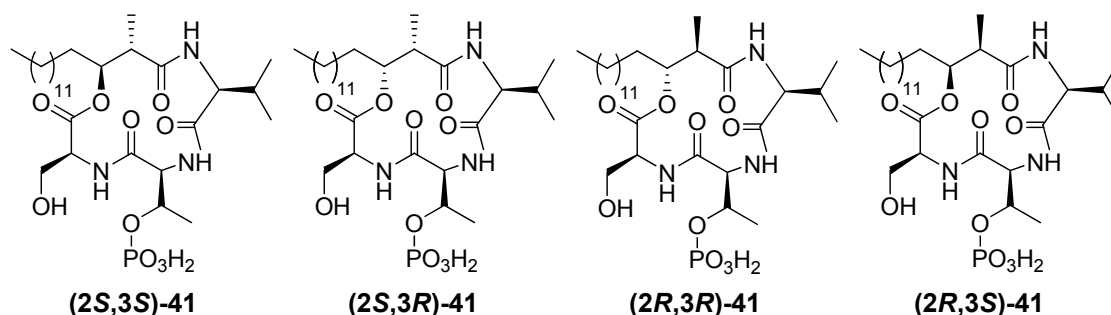


Abbildung 61: Phosphorylierte Zyklodepsipeptide **41** zur Untersuchung ihrer Flexibilität und Konformation.

Neben der energieniedrigsten Konformation sollte auch die Flexibilität der Makrozyklen untersucht werden. Ein Maß hierfür stellt die Anzahl der gefundenen einzigartigen Strukturen oder die Anzahl der Cluster dar. Um die Ergebnisse der

phosphorylierten Makrozyklen **41** nicht zu verfälschen und sicher zu gehen, dass sie mit den Ergebnissen der benzylierten und nicht phosphorylierten Makrozyklen **40** vergleichbar blieben, wurden beide Rechnungen ohne Randbedingungen durchgeführt. Das Phosphat wurde hierbei einfach deprotoniert (R-OPO₃H⁻) berechnet.

Vergleicht man die Anzahl der gefundenen einzigartigen Strukturen in einem Energiefenster von 50 kJ/mol, so fällt ein signifikanter Unterschied zwischen den phosphorylierten und den benzylierten Verbindungen auf (Tabelle 10). Während nur 87-148 einzigartige Konformationen für die benzylierten Strukturen **40** gefunden wurden, ergaben die Berechnungen bis zu zehnmal mehr Konformationen für die phosphorylierten Makrozyklen **41**. Auch die Anzahl der Cluster verdeutlicht dieses Phänomen. Bei einem Clusterkriterium von RMSD < 0.1 wurden 14-38 Konformationscluster für die benzylierten Verbindungen **40** gefunden, während 106-147 Konformationscluster für die phosphorylierten Analoga **41** berechnet wurden. Diese Zahlen zeigen, dass durch die Phosphorylierung der Zyklodepsipeptide eine signifikante Erhöhung der Flexibilität auftritt. Um den Einfluss der Benzylgruppe auf die Flexibilität zu untersuchen wurde zudem der debenzylierte und unphosphorylierte Makrozyklus **(2S,3R)-118** näher betrachtet. Es wurden 170 einzigartige Konformationen berechnet, was auf eine ähnlich rigide Struktur wie die der benzylierten Zyklodepsipeptide **40** hinweist.

Eintrag	Makrozyklus	E _{min} / kJ mol ⁻¹	Konformationen	Cluster
1	(2S,3S)-40	-292.1	132	37
2	(2S,3R)-40	-289.8	87	32
3	(2R,3R)-40	-287.4	117	14
4	(2R,3S)-40	-290.7	148	38
5	(2S,3S)-41	-1023.2	336	106
6	(2S,3R)-41	-1021.5	952	106
7	(2R,3R)-41	-1017.5	1101	147
8	(2R,3S)-41	-1015.1	745	115

Tabelle 10: Anzahl der gefundenen einzigartigen Strukturen und Cluster innerhalb von 50 kJ/mol vom globalen Energieminimum als Maß der Flexibilität.

Betrachtet man nun die berechneten Konformationen der globalen Energieminima der phosphorylierten Verbindungen, so wird deutlich, dass das Phosphat in allen vier Fällen direkt über der Ringebene liegt (Abbildung 62). Diese Anordnung ermöglicht

dem Phosphat neben der klassischen Bindung an das Amidproton der eigenen Aminosäure auch die Koordination der anderen beiden Amidprotonen sowie der Hydroxyfunktion des Serins. Die erhöhte Anzahl an gefundenen Konformationen korreliert dementsprechend mit der Möglichkeit zur Koordination unterschiedlichster Gruppen innerhalb des 13-gliedrigen Ringes.

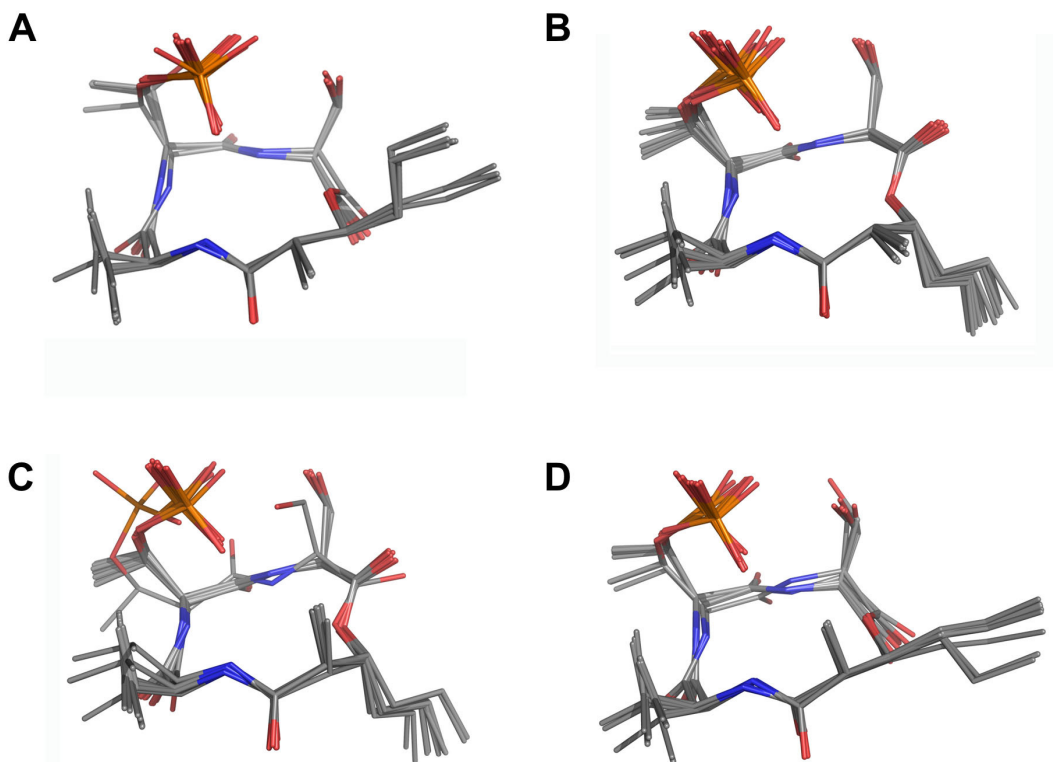


Abbildung 62: Die jeweils 10 energieärmsten Konformationen der phosphorylierten Stevastelin C3 Analoga aus Kraftfeldrechnungen ohne Randbedingungen: A) (2S,3S)-41; B) (2S,3R)-41; C) (2R,3R)-41; D) (2R,3S)-41. Zur deutlicheren Darstellung wurde die Fettsäurekette verkürzt.

Innerhalb von 10 kJ/mol lagen hingegen nur 14-22 einzigartige Strukturen vor, während bei den unphosphorylierten Zyklen 18-41 einzigartige Konformationen berechnet wurden. Dies bedeutet, dass die höhere Flexibilität der phosphorylierten Verbindungen erst durch höheren Energieaufwand entsteht, während in der Nähe des Energieminimums eine vergleichsweise rigide Ringgeometrie durch Fixierung des peptidischen Teils beobachtet wird.

Vergleicht man letztlich die energieärmsten Konformationen der benzylierten Makrozyklen **40** mit denen der phosphorylierten Zyklodepsipeptide **41**, so lässt sich ein deutlicher Unterschied erkennen. Während sich die Konformationen der benzylierten Verbindungen **40** relativ stark voneinander unterscheiden (**A**), treten in den phosphorylierten Verbindungen **41** (**B**) nur zwei dominante Konformationen auf (Abbildung 63).

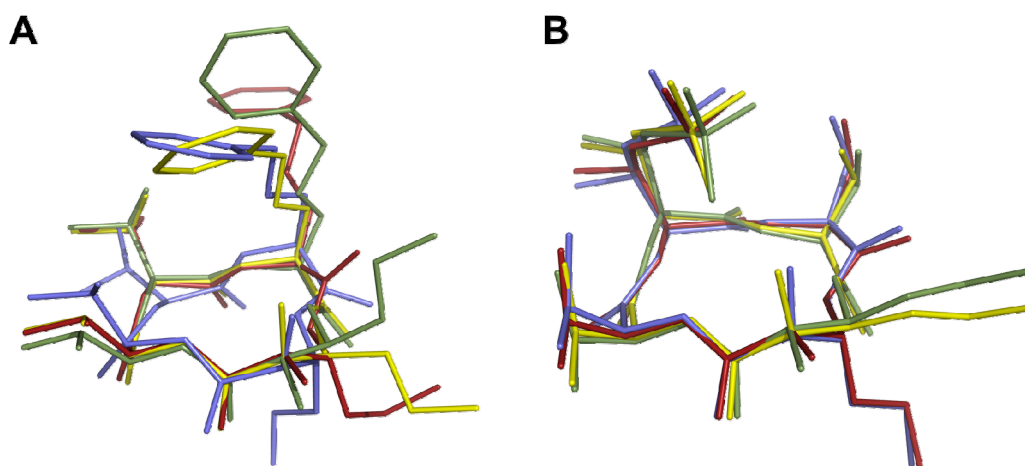


Abbildung 63: Überlagerung der energieärmsten Konformationen aus Kraftfeldrechnungen ohne Randbedingungen: A) benzylierte Verbindungen $(2S,3S)$ -40 = grün, $(2S,3R)$ -40 = rot, $(2R,3R)$ -40 = blau, $(2R,3S)$ -40 = gelb; B) phosphorylierte Verbindungen $(2S,3S)$ -41 = grün, $(2S,3R)$ -41 = rot, $(2R,3R)$ -41 = blau, $(2R,3S)$ -41 = gelb.

In den phosphorylierten Verbindungen bestimmt eindeutig das Stereozentrum C-3 der β -Hydroxysäure die Konformation des Makrozyklus, während die Konfiguration des Stereozentrums C-2 ausschließlich die Ausrichtung der direkt betroffenen Methylgruppe verändert. Vergleicht man also Verbindung $(2S,3S)$ -41 und $(2R,3S)$ -41, zeigen in beiden Fällen alle Carbonyle auf eine Seite der Ringebene. Die lange Alkylkette hingegen zeigt mit den Aminosäureresten auf die andere Seite der Ringebene. Invertiert man jedoch die Stereochemie in C-3, erhält man Verbindung $(2R,3R)$ -41 und $(2S,3R)$ -41, bei denen das Carbonyl des Serins auf die andere Seite der Ringebene gebogen wird und dafür der Alkylrest in Richtung der anderen Carbonyle zeigt.

Ausgehend von diesen Strukturen scheint das Phosphat den Peptidrest in einer Konformation zu fixieren, während die flexiblere Esterbindung die entstehende Ringspannung zu kompensieren versucht.

In einem biologischen Medium treten jedoch zusätzliche Lösungsmittel- und Ligandeneffekte auf. Die berechneten Konformationen können somit ausschließlich untereinander verglichen werden und zeigen nicht unbedingt die aktive Konformation des Inhibitors am Rezeptor.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Phosphorylierung der gespannten 13-gliedrigen Depsipeptide ihre Flexibilität stark erhöht. In der Nähe des globalen Minimums führt das Phosphat jedoch zu einer Fixierung der Konformation des peptidischen Teils des Makrozyklus, während die Esterbindung ein geeignetes

Ventil zur Verringerung der Ringspannung liefert. Der Einbau von β -Hydroxysäuren in kleine zyklische Peptide dient somit als neue Methode zur Synthese von starren Templaten, deren Geometrie durch Phosphorylierung beeinflusst werden kann. Mit Hilfe solcher Modelle sollte es nicht nur möglich sein die Affinität und Selektivität verschiedener Enzyme zu untersuchen, sondern diese und verwandte Strukturen könnten auch Einblicke in die Konformationsänderung von Aktivierungsloops durch das meistgenutzte Werkzeug der Natur bieten: der Phosphorylierung.

4.3 Biochemische Untersuchungen

4.3.1 Phosphatase-Inhibition *in vitro*

Die aus *Penicillium* isolierten, natürlichen Stevasteline zeigten in vorangegangenen Untersuchungen neben ihrer immunosuppressiven Wirkung auch Inhibition der dual spezifischen Phosphatase VHR.^[40] Um die Wirkung der synthetisierten Stevastelin C3 Analoga **40**, **96**, der debenzylierten Variante (**2S,3R**)-**118** und der phosphorylierten Derivate **41** auf diese Phosphatase zu untersuchen, wurde ein VHR Assay durchgeführt.

Zur Messung der Dephosphorylierung durch Phosphatasen wurden verschiedene Substrate und Assays beschrieben.^[147, 148] Unter anderem kann die Freisetzung von Phosphat über radioaktiv markiertes ^{32}P , Antikörper oder kolorimetrische Verfahren verfolgt werden. Da die natürlichen Enzymsubstrate häufig noch unbekannt oder hoch kompliziert sind, werden normalerweise synthetische Varianten eingesetzt. Durch ihre einfache Struktur sind sie zudem weniger spezifisch und können so in verschiedenen Phosphatase Assay eingesetzt werden.

Um die Dephosphorylierung zu verfolgen, muss ein Weg gefunden werden, entweder die Menge an dephosphoryliertem Substrat oder die des freigesetzten Phosphats zu bestimmen. Beide Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Zunächst wurde in einem kolorimetrischen Assay zur Detektion des umgesetzten Substrats das farblose *para*-Nitrophenylphosphat **119** (*p*NPP) eingesetzt.

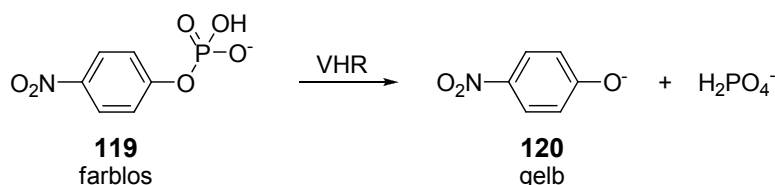


Abbildung 64: Farbreaktion durch enzymatische Dephosphorylierung des Substrates *para*-Nitrophenolphosphat.

Wird dieses von einer Phosphatase hydrolysiert, entsteht das gelbe *para*-Nitrophenolat **120** (Abbildung 64). Die direkte Beobachtung der Entstehung des *para*-Nitrophenolats durch UV-Messung bei 405 nm ermöglichte eine kontinuierliche Beobachtung des Prozesses. Über das Lambert Beersche Gesetz (Formel 4) konnte aus der gemessenen Absorption die Phosphat-Konzentration berechnet werden.

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

Formel 4

Lambert-Beersches Gesetz. A = Absorption; ε = Extinktionskoeffizient; c = Konzentration; d = Durchstrahlänge.

Da der pKa des *para*-Nitrophenols bei 7.2 liegt, ist die Detektion bei basischem pH besonders empfindlich. Der VHR-Assay wurde jedoch wegen des optimalen pH-Bereiches der Phosphatase unter leicht sauren Bedingungen (pH 6.5) durchgeführt. Aus diesem Grund empfahl sich eine zusätzliche Endpunktbestimmung, bei der nach einem definierten Zeitpunkt Natriumhydroxidlösung zur enzymatischen Reaktionsmischung gegeben wurde, um anschließend ein vollständig deprotoniertes *para*-Nitrophenol zu messen. Endpunktmethoden sind jedoch diskontinuierliche Verfahren und liefern nur einen Messpunkt pro Reaktion, was einen höheren Fehler zur Folge hat. Aus diesem Grund wurden im vorliegenden Fall die kontinuierliche Methode verwendet und mit Hilfe der Endpunktbestimmung kontrolliert.

Um die Aktivität der Phosphatase zu gewährleisten, mussten einige Parameter bei der Puffer-Zusammensetzung beachtet werden. Da VHR zur Klasse der Proteintyrosinphosphatasen (PTP) gehört, enthält es im katalytischen Zentrum ein Cystein, welches für den Dephosphorylierungsmechanismus eine essentielle Rolle spielt.^[94] Um zu gewährleisten, dass dieses benötigte Cystein im aktiven Zustand vorliegt, wurde VHR in Dithiothreitol (DTE) haltigem Puffer verwendet. Wegen seiner hydrophoben Oberflächen neigt VHR zudem zur Selbstaggregation. Dies konnte durch Zugabe des Detergents NP-40 unterbunden werden. Der optimale pH der DSP VHR von 6.5^[99] wurde im verwendeten Puffer eingestellt.

Da neben der Aktivität der Phosphatase und der Detektierbarkeit der Dephosphorylierung auch die Affinität des Substrats zur Phosphatase eine Rolle spielt, wurde zunächst die *p*NPP-Methode herangezogen, um in einem kontinuierlichen Verfahren die Michaelis-Menten Konstante (K_m) zu bestimmen. In der enzymatischen Reaktion (Abbildung 65) stellt diese Konstante die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes [ES] dar. Ist die Substratkonzentration gleich dem K_m -Wert, so liegt die Hälfte des Enzyms im [ES]-Komplex vor, die andere Hälfte ist frei ([E]).

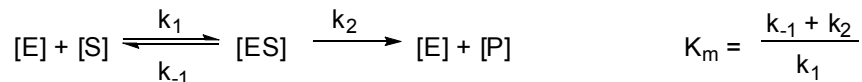


Abbildung 65: Enzymatische Reaktion und Definition der Michaelis-Menten-Konstante K_m .

Um nun diese Konstante bestimmen zu können, müssen Umsatzgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen werden. Nach Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit v gegen die Substratkonzentration [S] können K_m und v_{\max} direkt aus dem erhaltenen Graphen abgelesen werden (Abbildung 66).

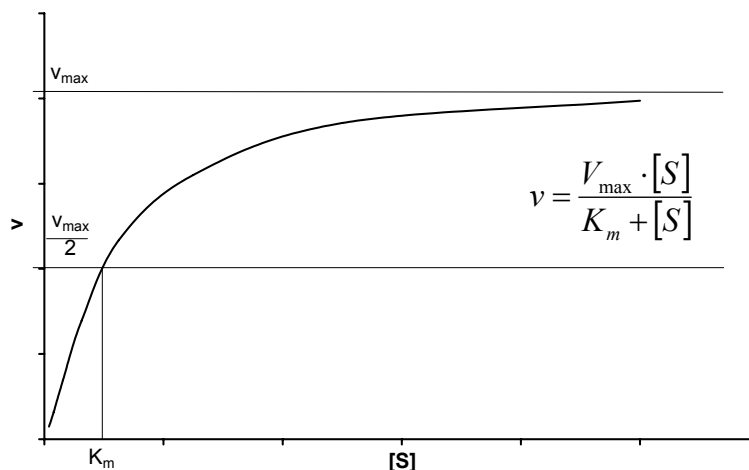


Abbildung 66: Michaelis-Menten Graph und Gleichung.

Um die Bestimmung zu vereinfachen, wurden linearisierte Verfahren entwickelt. In der Hanes-Woolf Auftragung wird $[S]/v$ gegen [S] aufgetragen (Abbildung 67). Im Gegensatz zur weitverbreiteten Lineweaver-Burk Auftragung ($1/v$ vs. $1/[S]$) liegen hier wesentlich bessere Fehler- und Datenpunktverteilungen entlang der [S]-Achse vor. Der K_m -Wert kann mit Hilfe der Steigung aus dem Achsenabschnitt berechnet werden.

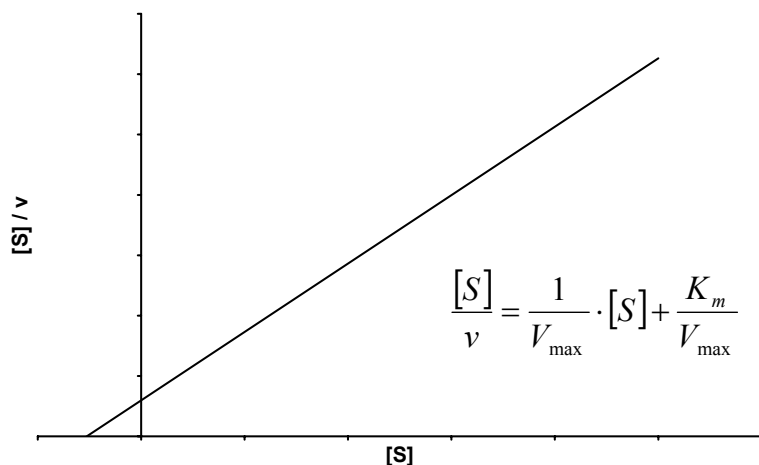
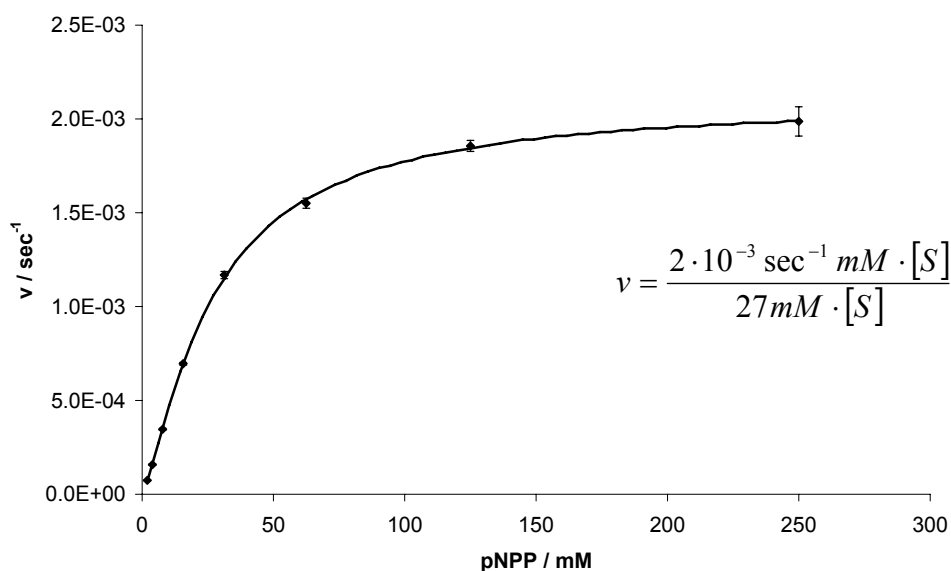


Abbildung 67: Hanes-Woolf Auftragung.

Im vorliegenden Versuch wurden Substratkonzentrationen von 0 bis 250 mM pNPP verwendet. Die Absorption wurde alle 2 min über einen Zeitraum von 40 min gemessen, um die Reaktionsgeschwindigkeit der Dephosphorylierung durch VHR zu bestimmen. Nach der Durchführung zweier unabhängiger Experimente in jeweils dreifacher Ausführung wurde die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Aus der nichtlinearen Regression der Michaelis-Menten Gleichung (Origin: OriginLab, Northampton, MA, USA) sowie der linearen Hanes-Woolf Auftragung ergab sich ein K_m von 27 ± 2.7 mM. (Abbildung 68).

Abbildung 68: Graphische Ermittlung der Michaelis-Menten Konstante K_m .

Nach Feststellung der kinetischen Parameter, wurden die hergestellten Zyklopeptide mit variiertem Aminosäuresequenz (**97-104**) auf ihre biochemische Wirkung gegen VHR getestet. Weiterhin wurden auch die diastereomeren Stevastelin

Analoga **40** und **96** sowie ihre phosphorylierten Derivate **41** bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität untersucht. Als Vergleich wurden ein debenzylierter Makrozyklus (**118**) sowie ein bekannter PTP Inhibitor (PTP Inhibitor IV der Firma Calbiochem) herangezogen. In einem ersten Test war bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM und einer Substratkonzentration von 10 mM bereits ein deutlicher Trend erkennbar (Abbildung 69). Während die benzylierten und debenzylierten Verbindungen (**40**, **96**, **118**) sowie Zyklodepsipeptide mit modifizierter Aminosäuresequenz (**97-104**) inaktiv waren, inhibierten die phosphorylierten Makrozyklen **41** die enzymatische Dephosphorylierung des pNPP.

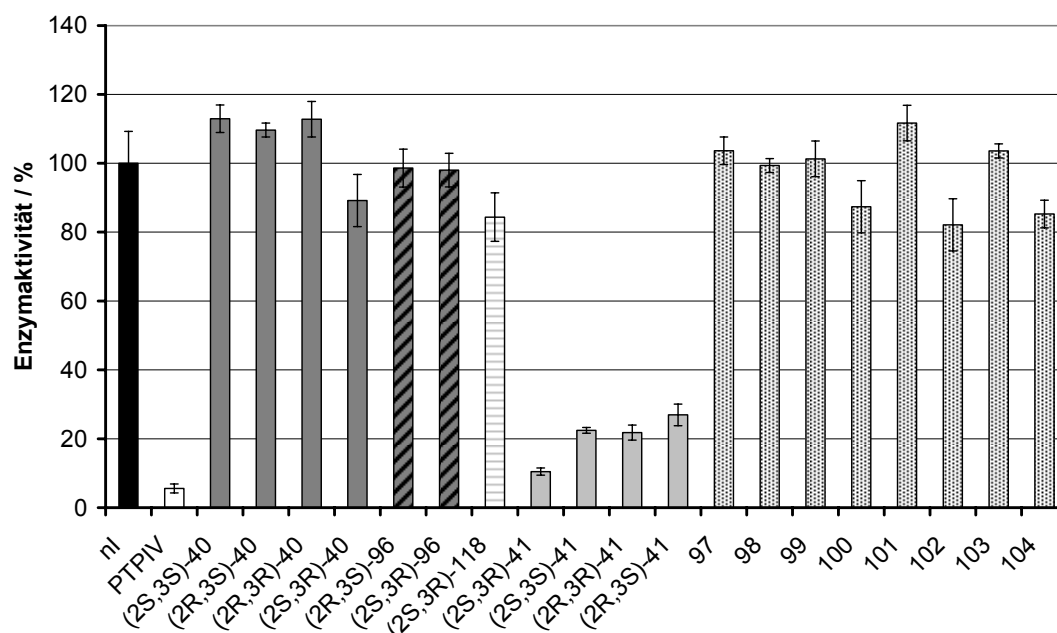


Abbildung 69: VHR-Screen mit 100 μM Substanzen.

Um diese Inhibition detaillierter zu untersuchen, wurden IC_{50} -Werte der aktiven Substanzen **41** gemessen. Der IC_{50} -Wert stellt hierbei die Inhibitorkonzentration dar, bei der die Umsatzgeschwindigkeit des untersuchten Enzyms um genau 50% reduziert wird.

Durch die Auftragung verschiedener Inhibitorkonzentrationen von 1.6 μM bis 300 μM gegen die jeweilig ermittelten Dephosphorylierungs-Geschwindigkeiten wurden Inhibitions-Kurven erhalten aus denen der relative IC_{50} -Wert nach einer nichtlinearen Regression (Origin) direkt abgelesen werden konnte (Abbildung 70).

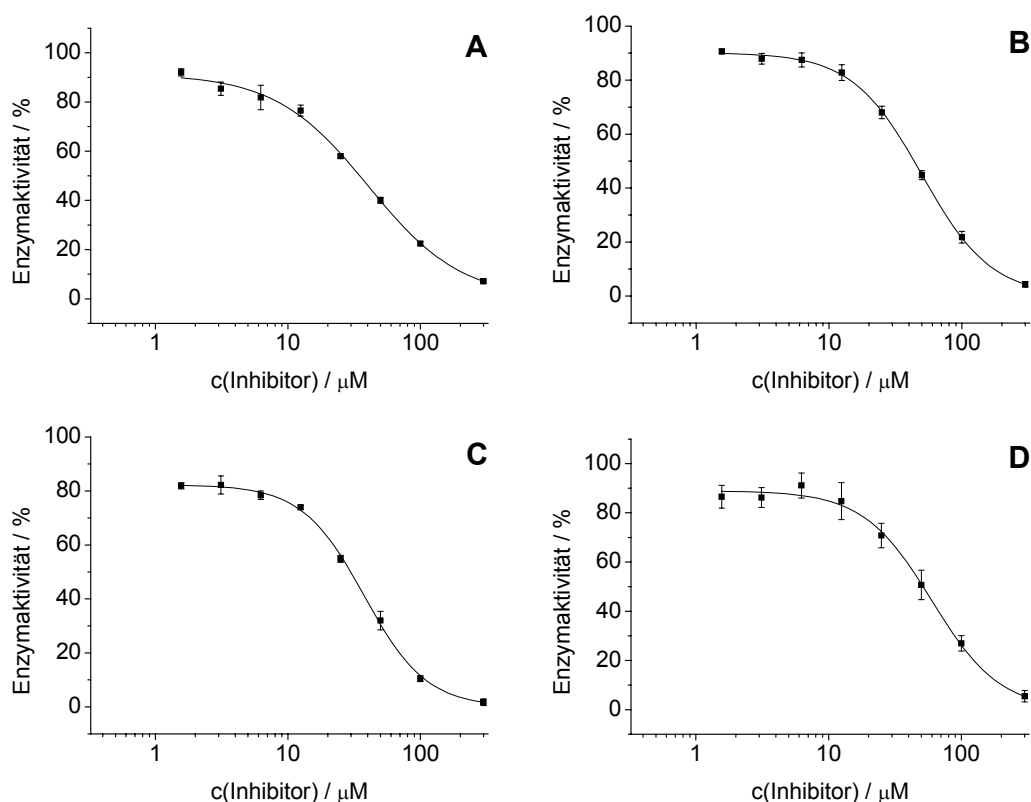


Abbildung 70: Ermittlung der relativen IC_{50} -Werte gegen die dualspezifische Phosphatase VHR: A) (2S,3S)-41; B) (2R,3R)-41; C) (2S,3R)-41; D) (2R,3S)-41.

Für die phosphorylierten Analoga **41** wurden IC_{50} -Werte von 38-60 μM erhalten (Tabelle 11). Da der IC_{50} -Wert jedoch stark von den jeweiligen Assay-Bedingungen abhängt, wurden auch die Dissoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor Komplexe (K_i) bestimmt. Über die Cheng-Prusoff Gleichung^[149] (Formel 5) und die ermittelten K_m -Werte unter gleichen Assay-Bedingungen wurden Werte zwischen 28 und 44 μM erhalten.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_m} \quad \text{Formel 5}$$

Die Ergebnisse des Assays verdeutlichen den starken Einfluss der Threonin-Derivatisierung. Ausschließlich phosphorylierte Makrozyklen zeigten eine Inhibition der VHR-Aktivität. Interessanterweise wurde nur eine geringfügige Abhängigkeit der Aktivität von der Stereochemie im Rückgrat des Makrozyklus festgestellt. Eine S-Konfiguration in Position C-2 scheint hier leicht bevorzugt, wohingegen eine R-Konfiguration in C-3 verglichen mit dem entsprechenden Epimer zu besserer Inhibition führt. Dieses Ergebnis widerspricht vorangegangenen Studien, in denen auch unphosphorylierte Stevastelin Analoga aktiv waren.^[64] Während der hier

beschriebenen Untersuchungen konnte jedoch festgestellt werden, dass VHR sehr sensibel gegenüber Veränderungen der Assay-Parameter ist, was den Vergleich der Daten erschwert.

Verbindung	Thr(OR)	Ser(OR)	IC ₅₀ / μ M	K _i / μ M
(2S,3R)-40	H	Bzl	>100	>100
(2S,3S)-40	H	Bzl	>100	>100
(2R,3S)-40	H	Bzl	>100	>100
(2R,3R)-40	H	Bzl	>100	>100
(2S,3R)-96	H	Bzl*	>100	>100
(2R,3S)-96	H	Bzl*	>100	>100
(2S,3R)-118	H	H	>100	>100
(2S,3R)-41	PO ₃ H ₂	H	37.7 \pm 1.2	27.5 \pm 1.6
(2S,3S)-41	PO ₃ H ₂	H	40.5 \pm 2.7	29.6 \pm 2.8
(2R,3S)-41	PO ₃ H ₂	H	59.7 \pm 3.6	43.6 \pm 3.8
(2R,3R)-41	PO ₃ H ₂	H	49.8 \pm 1.0	36.3 \pm 1.7

Tabelle 11: Inhibierung der dualspezifischen Phosphatase VHR durch die diastereomeren Zyklodepsipeptide **40**, **96** und die phosphorylierten Analoga **41** *in vitro*. * D-Ser.

Der relativ geringe Unterschied zwischen den phosphorylierten Makrozyklen **(2S,3S)-41**, **(2S,3R)-41**, **(2R,3R)-41** und **(2R,3S)-41** bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität wurde durch die Ergebnisse der Konformationsstudien unterstützt. Hier konnte eine erhöhte Flexibilität der Makrozyklen nach Phosphorylierung des Threoninrestes gezeigt werden.

Auch die anfänglichen Beobachtungen, dass phosphorylierte oder sulfatierte Stevasteline *in vitro* stärker inhibieren als ihre nicht phosphorylierten Analoga konnten durch diese Untersuchungen bestätigt werden.

Malachitgrün

Da die phosphorylierten Makrozyklen nicht nur als Inhibitor, sondern auch als Substrat für die dual spezifische Phosphatase VHR dienen, also vom Enzym dephosphoryliert werden könnten, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen. Der vorangegangene Assay wurde ohne pNPP wiederholt, so dass als einziges mögliches Substrat der am Threoninrest phosphorylierte Inhibitor **(2S,3R)-41** zur Verfügung stand. Da in diesem Fall nicht mehr das dephosphorylierte Substrat UV-spektroskopisch detektiert werden konnte, musste ein Assay verwendet werden, in

dem die Menge des entstehenden Phosphats ermittelt werden konnte. Hierzu wurde ein Malachitgrün Assay verwendet.^[150]

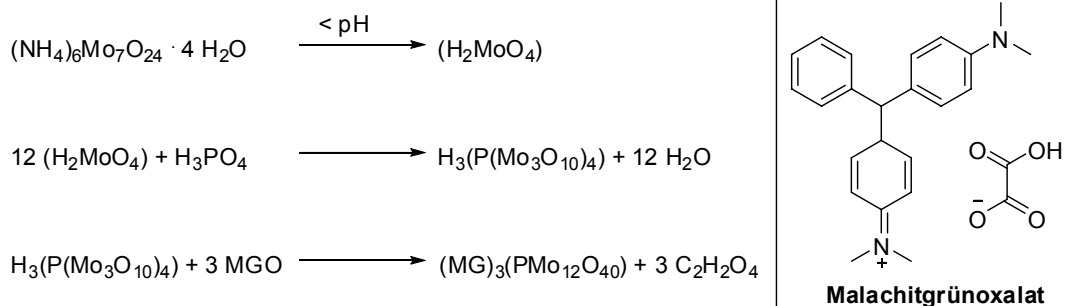


Abbildung 71: Malachitgrün Nachweis von freiem Phosphat. MG = Malachitgrün; MGO = Malachitgrünoxalat.

In diesem diskontinuierlichen Verfahren wird das enzymatisch freigesetzte Phosphat über einen Komplex mit Molybdänsäure und Malachitgrün (MG) bei 620 nm detektiert. Zunächst reagiert das Ammoniumheptamolybdat in saurer Lösung zur Isopolysäure, welche mit freiem Phosphat zur Phosphormolybdänsäure reagiert (Abbildung 71). Schließlich findet im sauren Milieu eine Ionen-Austausch-Reaktion des basischen Malachitgrünoxalats (MGO) gegen die Protonen der Heteropolysäure statt, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums hervorgerufen wird.

Mit dieser Methode können kleinste Phosphat-Konzentrationen bestimmt werden.^[150] Da zum Aufbau des detektierbaren Komplexes jedoch verschiedene Reagenzien bei kleinem pH zur Reaktionslösung gegeben werden müssen, wird die enzymatische Reaktion hierdurch gestoppt. Somit sind mit diesem Verfahren ausschließlich Endpunktbestimmungen möglich.

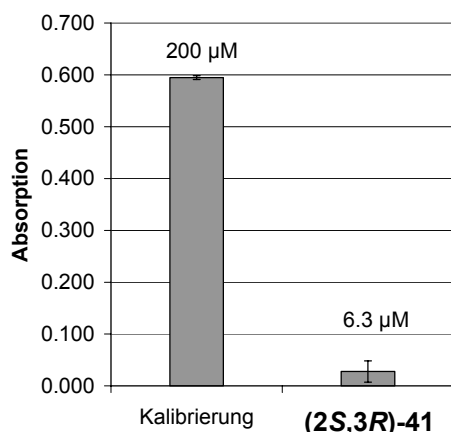


Abbildung 72: Malachitgrüntest.

Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der gemessenen 45 Minuten lediglich 3% Dephosphorylierung des Inhibitors auftrat (Abbildung 72). Hieraus lässt sich schließen, dass die phosphorylierten Makrozyklen auch als Substrate fungieren, welche jedoch sehr langsam hydrolysiert werden. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen aus kinetischen Untersuchungen zur Phosphataseaktivität der VHR. Ihre natürlichen Substrate sind die diphosphorylierten MAPKs ERK und JNK, welche besonders schnell dephosphoryliert werden. In Experimenten mit MAP₁₇₇₋₁₈₉ Kinase wurde Phosphotyrosin (pTyr; $k_{cat}/K_m = 32000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) im Gegensatz zu pNPP ($k_{cat}/K_m = 3240 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und Phosphothreonin (pThr; $k_{cat}/K_m = 13.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) besonders schnell dephosphoryliert.^[99]

$$\frac{v_S}{v_I} = \frac{(k_{cat} / K_m)_S \cdot [S]}{(k_{cat} / K_m)_I \cdot [I]} \quad \text{Formel 6}$$

Anhand der Substratspezifität von VHR und den eingesetzten Konzentrationen von Substrat (10 mM) und Inhibitor (max. 100 μM) kann davon ausgegangen werden, dass während des pNPP Assays der phosphorylierte Makrozyklus **(2R,3S)-41** ausschließlich als Inhibitor wirkt und seine Dephosphorylierung nicht ins Gewicht fällt (Formel 6).

Neben ihrer Wirkung auf die Aktivität der dualspezifischen Phosphatase VHR wurden die Makrozyklen **40** und **96** bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf verschiedene andere Phosphatasen überprüft. Neben der Serin/Threonin spezifischen Phosphatase PP1 wurden verschiedene PTPs getestet, unter anderem eine Rezeptor-ähnliche PTP (VE-PTP), eine weitere DSP (cdc25A) und fünf klassische PTPs (PTP1B, MPTPA, MPTPB, SHP2, PTPN2). Ausschließlich Verbindung **(2R,3S)-40** zeigte bei einer Inhibitorenkonzentration von 100 μM eine leichte Beeinträchtigung einiger klassischer PTPs, jedoch konnte kein Inhibitor mit einem IC_{50} unter 100 μM gefunden werden (Abbildung 73).

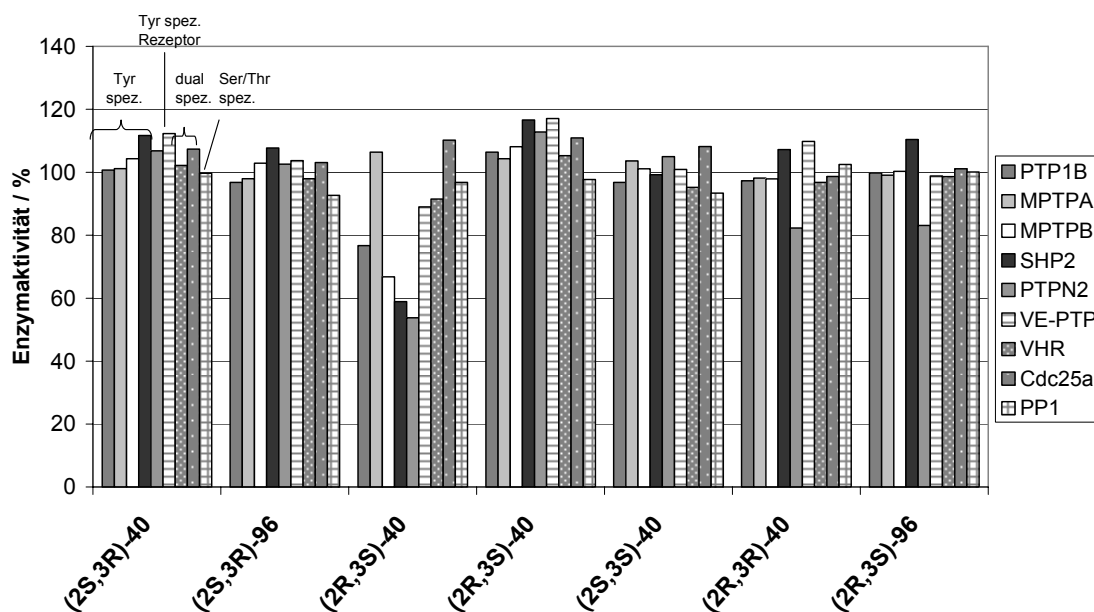


Abbildung 73: Phosphatase Screen bei 100 μ M Inhibitor.

4.3.2 Zelluläre Untersuchungen

In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von HeLa-Zellen mit VHR-siRNA in zellulären Experimenten zu einer unnatürlich lang anhaltenden Phosphorylierung von ERK führt.^[106] Da die phosphorylierten Zyklopeptide **41** jedoch wegen ihrer Ladung wenig geeignet erscheinen die Zellmembran zu durchdringen, wurde auf die bereits diskutierte Theorie zurückgegriffen, dass unsubstituierte Stevasteline nach Durchdringen der Zellmembran durch Derivatisierung (z.B. Phosphorylierung oder Sulfatierung) aktiviert werden.^[40]

Um die Auswirkung des potentiellen VHR Inhibitors **(2S,3R)-40** auf den Phosphorylierungsgrad der MAP Kinase ERK zu untersuchen, wurden ausgehungerte HeLa-Zellen für eine Stunde mit dem Zyklopeptide **(2S,3R)-40** inkubiert und anschließend mit Serum stimuliert. In einer Zeitreihe wurden die Zellen lysiert und die erhaltenen Proteine auf einem Elektrophorese-Gel getrennt. Nach Übertragung auf eine Membran konnten diese daraufhin mit Hilfe eines pERK-Antikörpers in einem Westernblot untersucht werden (Abbildung 74). Als Kontrolle dienten Experimente ohne Inhibitor (DMSO-Kontrolle), sowie Westernblots mit ERK-Antikörpern, die sowohl ERK als auch pERK anfärben.

In diesen vorläufigen Studien konnten erste Anzeichen einer Beeinflussung des ERK-Phosphorylierungsgrades erkannt werden.

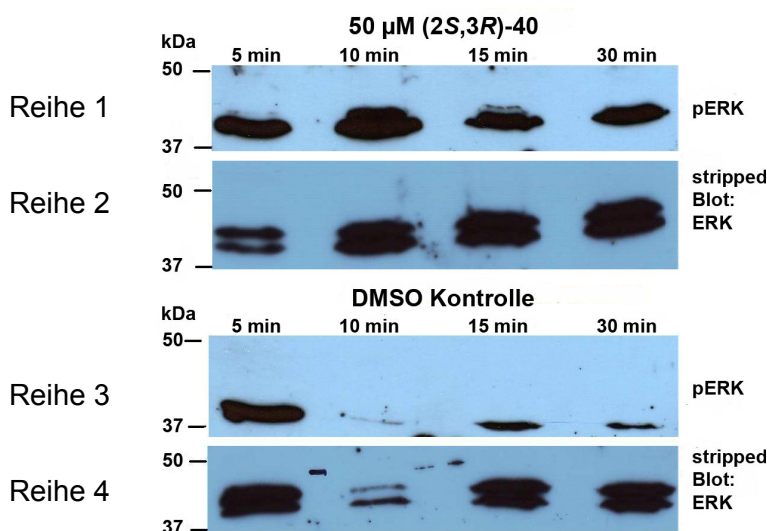


Abbildung 74: Einfluss der Verbindung **(2S,3R)-40** auf den zeitabhängigen Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinase ERK. Ausgehungerten HeLa-Zellen wurden für 1 h mit Inhibitor **(2S,3R)-40** (50 µM; Reihe 1, 2) oder DMSO (Reihe 3, 4) inkubiert und anschließend mit Serum stimuliert. Nach 5, 10, 15 und 30 min wurden die Zellen lysiert und mit Antikörpern gegen pERK (Reihe 1, 3) und ERK (Reihe 2, 4) in einem Immunblot analysiert.

In der Reihe 3 ohne Inhibitor ist zu sehen, dass die Stimulierung mit Serum nach ca. 5 min zu einer hohen pERK-Konzentration führt, die durch verschiedene in der Zelle vorhandenen Signalwege nach wenigen Minuten stark zurück geht. Bereits nach ca. 15 min ist kaum noch phosphoryliertes ERK zu sehen. Diese Beobachtungen werden von Literaturdaten bestätigt und sind Zelllinien-spezifisch.^[105]

Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit denen nach Inkubation mit Inhibitor **(2S,3R)-40** (Reihen 1), so lässt sich ein erheblicher Unterschied erkennen. Bei einer 50 µM Konzentration der Verbindung **(2S,3R)-40** konnte über den beobachteten Zeitraum ein deutlicher Effekt auf den Phosphorylierungsgrad der MAP Kinase ERK festgestellt werden. Weder nach 15 noch nach 30 min konnte eine Verringerung der pERK-Konzentration beobachtet werden. Im Vergleich zum Kontrollexperiment ohne Inhibitor (Reihe 3) war nach 30 min noch wesentlich mehr pERK vorhanden, was auf eine Inhibierung der Dephosphorylierung schließen lässt.

Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen erste Anzeichen dafür, dass der benzylierte Inhibitor **(2S,3R)-40** keine *in vitro* Aktivität gegen VHR, jedoch in zellulären Studien eine deutliche Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad von pERK aufweist. Da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Threoninderivatisierung benötigt wurde, um *in vitro* eine Wirkung auf die VHR-Aktivität zu erzielen, liegt es nahe zur Erklärung die bereits erwähnten Theorie heranzuziehen, dass die benzylierten Verbindungen **40** in der Zelle durch Derivatisierung aktiviert werden.

Betrachtet man weiterhin die Wirkungsweise der Phosphatase VHR, so stellt man fest, dass VHR eine Aktivierung durch andere Enzyme benötigt, um pERK zu dephosphorylieren. Bis jetzt sind zwei Enzyme bekannt, die diese Aktivierung auf sehr unterschiedliche Weise hervorrufen. ZAP-70 ist eine Kinase, die während der Immunantwort der Zelle durch Stimulierung des T-Zellrezeptors aktiviert wird (s.o. Abbildung 18). Sie ist in der Lage VHR durch Phosphorylierung zu aktivieren.^[100] Wenig später wurde jedoch entdeckt, dass VHR nicht nur in T- und NK-Zellen aktiv ist. In diesem Zusammenhang wurde eine weitere VHR-aktivierende Kinase (VRK3) gefunden.^[101] VRK3 wird besonders stark in Hoden- und Nieren- aber auch Gebärmutterhals-Zellen exprimiert und stellt eine so genannte pseudo-Kinase dar.^[151] Das heisst, sie weist zwar ein Kinase-Motiv auf, wirkt aber nicht als solche. VRK3 aktiviert die Phosphatase VHR, indem sie direkt an sie bindet.

Da die hier durchgeführten *in vivo* Experimente in Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa-Zellen) stattfanden, in denen nahezu kein ZAP-70 exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass eine VRK3-Aktivierung vorlag. Hierdurch erweitern sich die Möglichkeiten der Wirkungsweise des Makrozyklus **40**. Neben der direkten Inhibierung der Phosphatase-Aktivität durch Blockierung der aktiven Tasche, ist auch eine Blockierung der VRK3-Bindungsstelle denkbar. Selbst eine direkte Inhibierung der Kinase kann nicht ausgeschlossen werden. Neben diesen Vermutungen besteht schließlich auch die Möglichkeit, dass eine weitere MKP inhibiert wird, die sonst für die Dephosphorylierung von pERK zuständig ist (z.B. MKP3).^[151]

Um nun die These der *in vivo* Derivatisierung der Stevastelin C3 Analoga näher zu untersuchen, werden weitere zelluläre Untersuchungen benötigt. Um einzugrenzen, ob wirklich eine Threoninderivatisierung zum beobachteten Effekt führt, könnte in zukünftigen Studien Zyklodepsipeptid **100** herangezogen werden. Dieser dem aktiven Zyklodepsipeptid **(2S,3R)-40** sehr ähnliche Makrozyklus (**100**) trägt, anstelle des zu derivatisierenden, freien Threoninrestes ein Valin (Abbildung 75).

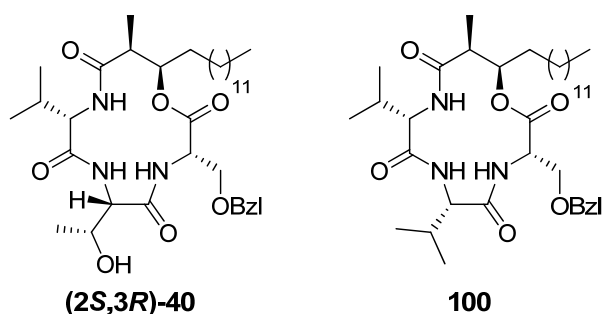


Abbildung 75: In zellulären Experimenten untersuchte Zyklodepsipeptide.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die unphosphorylierte Verbindung **(2S,3R)-40** in ersten zellulären Untersuchungen eine deutlichen Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad der Mitogen aktivierten Kinase ERK hatte, wohingegen *in vitro* keine Wirkung auf die dualspezifische Phosphatase VHR beobachtet wurde. Das jedoch die phosphorylierte Verbindung **(2S,3R)-41** *in vitro* eine Inhibition der Phosphatase VHR bewirkte, könnte die These untermauern, dass Verbindungen mit freiem Threoninrest in der Zelle phosphoryliert oder sulfatiert werden, um in ihre aktive Form überführt zu werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass eine andere MKP inhibiert wird, die sonst zur Dephosphorylierung von pERK beiträgt. Auch eine Inhibition VHR aktivierender Enzyme wie ZAP-70 oder VRK3 ist generell möglich. Da die untersuchten HeLa-Zellen Gebärmutterhals-Zellen sind und ZAP-70 hier nicht exprimiert wird, bleibt von den bekannten Aktivierungsenzymen nur VRK3. Die genaue zelluläre Wirkung der benzylierten Zyklodepsipeptide **40** muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

4.3.3 Antibakterielle Assays

Unabhängig von ihrer Wirkung auf den Phosphorylierungsgrad von ERK und der VHR-Inhibierung, gibt es jedoch auch weitere interessante Eigenschaften zyklischer Depsipeptide. Eine Vielzahl von zyklischen Depsipeptiden ist dafür bekannt antibakterielle Eigenschaften aufzuweisen.^[115] Zumeist sind dies relativ große zyklische Peptide wie etwa Gramicidin, jedoch liegen auch kleinere, zyklische Lipopeptide wie das eingangs erwähnte Lydiamycin vor, die ebenfalls eine antibakterielle Wirkung zeigen. Mechanistisch betrachtet wird entweder die Lipopolysaccharid (LPS) Synthese inhibiert oder die Potentialverteilung der Phospholipid-Membran gestört, was zur bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung der zyklischen Lipopeptide führt.

Die hergestellten Stevastelin Analoga und insbesondere die phosphorylierten Derivate stellen amphiphile Moleküle mit einer langen Alkylkette und einem hydrophilen Aminosäureteil dar und ähneln damit Bausteinen der Zellmembranen, den Phospholipiden **121** (Abbildung 76).

Es könnte also möglich sein, dass die Stevastelin Analoga z.B. über eine Insertion in die Zellmembran eine antibakterielle Wirkung zeigen. Daher wurden verschiedene Bakterien-Assays mit den Verbindungen **40**, **(2S,3R)-118** und **(2S,3R)-41** von Dipl.-Biol. Bernhard Ellinger (MPI Dortmund) durchgeführt.

Zunächst wurden die gram-positiven *Staphylococcus aureus* Bakterien untersucht. *Staphylococcus aureus* gilt als der wichtigste Erreger von im Krankenhaus

erworbenen Infektionen und kann eine Reihe von Resistenzen gegen bekannte Antibiotika aufweisen. Neue, gegen diese Bakterien wirksame Verbindungen werden deswegen stets gesucht.

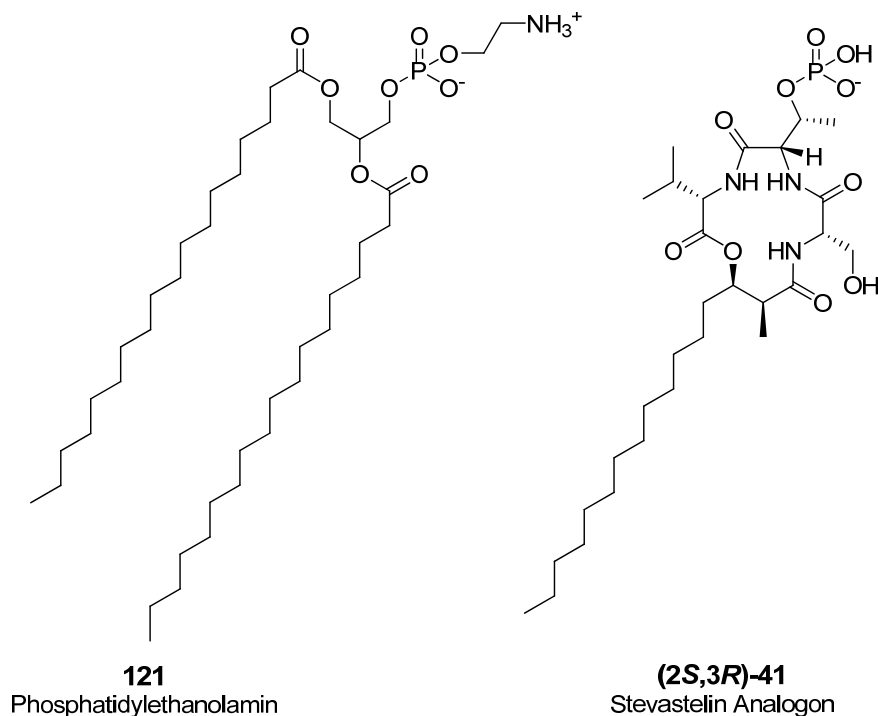


Abbildung 76: Vergleich eines Membran bildenden Phospholipids und eines phosphorylierten Stevastelin Analogons.

In den durchgeführten Untersuchungen erzielte ausschließlich die phosphorylierte Verbindung **(2S,3R)-41** eine Wirkung (Abbildung 77). Bei einer Konzentration von 50 μM (32 mg/l) ging das Bakterienwachstum auf 20% zurück. Auch bei Bakterien des aerob wachsenden Stammes *Bacillus subtilis* führte bei einer Inhibitorenkonzentration von 50 μM nur die phosphorylierte Verbindung zu einem Wachstumsrückgang bis auf etwa 20%. Das Wachstum des *Micrococcus luteus* konnte hingegen von nahezu allen Verbindungen schwach beeinflusst werden.

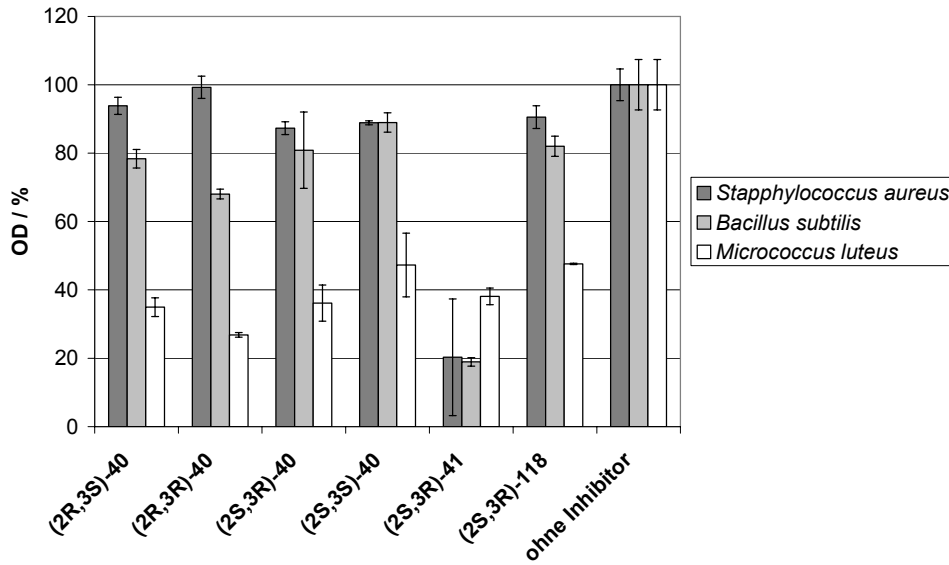


Abbildung 77: Antibakterielle Wirkung der Zyklodepsipeptide (50 μ M) gegen verschiedene Bakterienstämme.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass besonders die phosphorylierte Verbindung **(2S,3R)-41** eine schwache antibakterielle Wirkung gegen die untersuchten Bakterienstämme aufwies, jedoch keine starkes Antibiotikum unter den betrachteten Zyklodepsipeptiden gefunden wurde.

5. Zusammenfassung

Naturstoffe sind durch jahrelange Evolution optimiert, um eine spezifische biologische Funktion auszuüben. Aus diesem Grund stellen sie ideale Ausgangspunkte für die Entwicklung effizienter Inhibitoren dar. Die durch Naturstoffanaloga erhaltenen Informationen zu Enzym-Affinitäten und -Selektivitäten liefern wertvolle Erkenntnisse für das Verständnis komplizierter physiologischer Prozesse. Besonders die Synthese von bisher schwierig zugänglichen natürlichen Zyklopeptiden und -depsipeptiden sowie ihrer synthetischen Analoga führte zu einer Anwendung dieser Strukturen in der Therapie zahlreicher Krankheiten.^[24, 33, 38]

Das natürlich vorkommende 13-gliedrige Zyklopepsipeptid Stevastelin C3 (**11**, Abbildung 78) inhibierte in vorangegangenen Studien die dualspezifische Phosphatase VHR.^[39, 40] Da die physiologische Funktion dieses Enzyms noch nicht vollständig verstanden ist und nur wenige Inhibitoren bekannt sind, wären weiterführende Erkenntnisse über die Voraussetzungen zur VHR-Inhibierung hilfreich.^[106-108, 152]

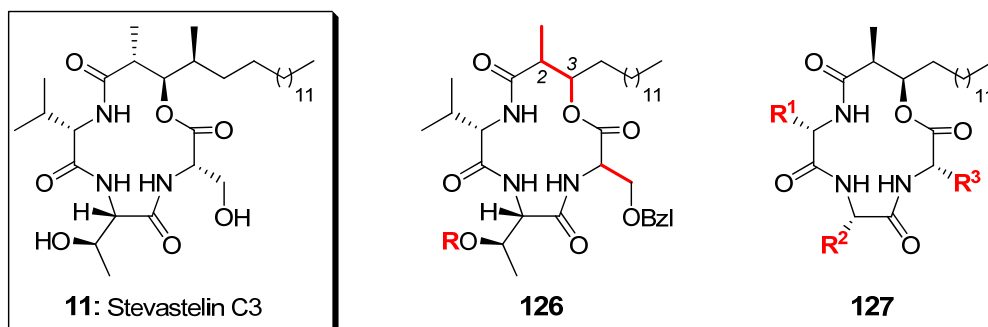


Abbildung 78: Stevastelin C3 und Analoga mit veränderter Konfiguration und Substitution des makrozyklischen Rückgrats.

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese 13-gliedriger Zyklopepsipeptide (**126**, **127**), die sich am Grundgerüst des Naturstoffs Stevastelin C3 (**11**) orientieren sowie die Untersuchung des Einflusses eingeführter Modifikationen auf die dreidimensionale Struktur und biochemische Wirkung der Zyklopepsipeptide (Abbildung 78).

Basierend auf diesen Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob 13-gliedrige Zyklopepsipeptide als Gerüste zur definierten Ausrichtung potentieller Enzymbindungsgruppen im Raum geeignet sind. Anschließende Untersuchungen zur Auswirkung synthetisch eingeführter Modifikationen auf die Phosphataseinhibierung sollten schließlich neue Erkenntnisse über die Voraussetzungen 13-gliedriger Zyklopepsipeptide für die Phosphataseinhibierung liefern.

In dieser Arbeit konnte eine flexible Synthese 13-gliedriger Stevastelin C3 Analoga entwickelt werden, die in Abbildung 79 beispielhaft für Zyklodepsipeptid **(2R,3S)-40** und **(2R,3S)-118** gezeigt ist.

Ausgehend von β -Hydroxysäure **(2R,3S)-49**, die aus einer asymmetrischen Aldolreaktion erhaltenen wurde, konnte zunächst eine hocheffiziente Festphasensynthese für die Synthese des offenkettigen Depsipeptides **(2R,3S)-42** entwickelt werden. Hierzu wurde die β -Hydroxysäure **(2R,3S)-49** quantitativ an 2-Chlortritylchlorid-Harz gebunden und anschließend mit Fmoc-Ser(OBzl)-OH in 89% Ausbeute verestert. Anschließende Peptidverlängerung mit Fmoc-Thr(OtBu)-OH und Boc-Val-OH unter Standardbedingungen lieferte das immobilisierte Depsipeptid **(2R,3S)-74**.

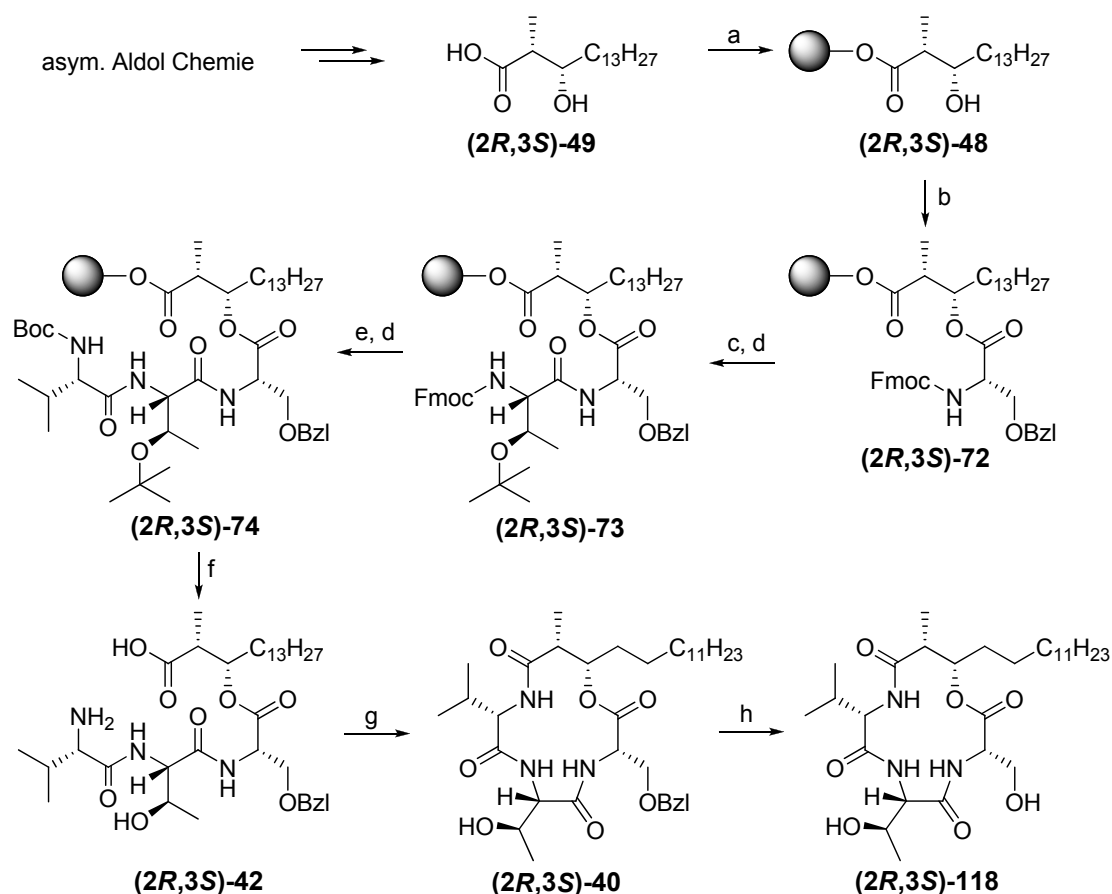


Abbildung 79: Exemplarische Synthese des Zyklodepsipeptides **(2R,3S)-40** und seines debenzylierten Analogons **(2R,3S)-118**: a) 2-Chlortritylchlorid-PS-Harz, DIPEA, CH_2Cl_2 , quant.; b) Fmoc-Ser(OBzl)-OH, DIC, DMAP, CH_2Cl_2/DMF , 89%, d.r. 8:1; c) 20% Piperidin in DMF, quant.; d) Fmoc-Thr(OtBu)-OH, DIC, HOBT, CH_2Cl_2/DMF , 93%; e) Boc-Val-OH, DIC, HOBT, CH_2Cl_2/DMF , 93%; f) 50% TFA in CH_2Cl_2 , quant.; g) HBTU, DIPEA, CH_2Cl_2/DMF , 45%; h) Pd/C, H_2 , HCl, EtOH, 96%.

Nach Abspaltung vom polymeren Träger und simultaner Entfernung der Boc- und *t*Bu-Schutzgruppen, konnte das Depsipeptid **(2R,3S)-42** HBTU vermittelt in hohen

Ausbeuten zyklisiert werden. Eine Hydrierung lieferte schließlich das debenzilylierte Zyklodepsipeptid **(2R,3S)-118** in 96% Ausbeute.

Diese Synthese weist im Vergleich zu bisherigen Synthesen in Lösung deutliche Vorteile auf. Zum einen verwendet sie eine einfache Schutzgruppenstrategie, da der C-Terminus bis zur Darstellung der Zyklisierungsvorläufer an der festen Phase immobilisiert ist. Zum anderen wurde durch den Einsatz von Synthesebausteinen aus dem chiralen Pool und asymmetrischen Aldolreaktionen nur ein einziger Aufreinigungsschritt benötigt, der nach erfolgter Makrolaktamisierung durchgeführt wurde. Die Veresterung der immobilisierten β -Hydroxysäure **48** erwies sich als erste Hürde in der Synthese, da unter den verwendeten Reaktionsbedingungen Epimerisierung am α -Serin auftrat.

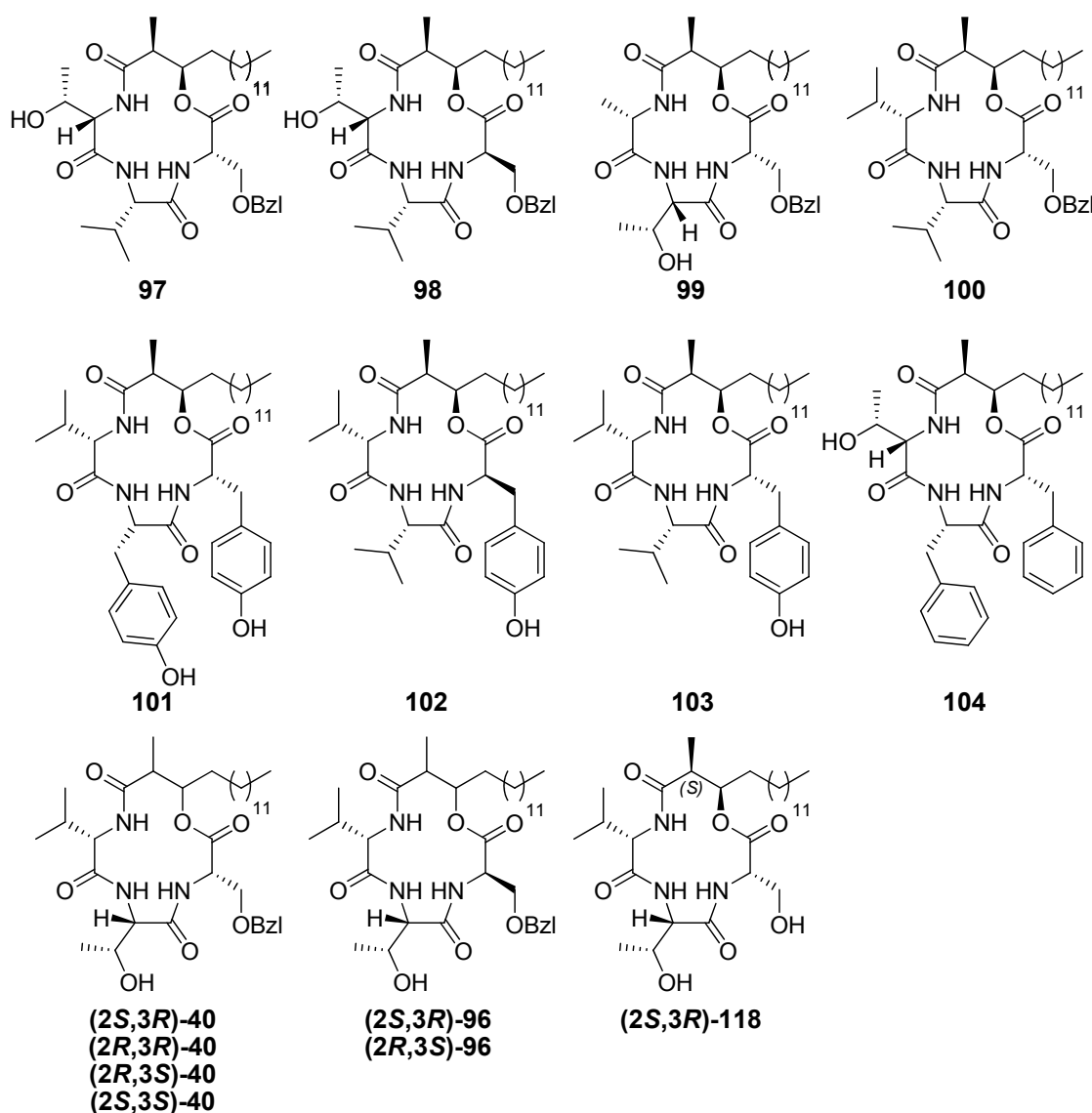


Abbildung 80: Synthetisierte 13-gliedrige Zyklodepsipeptide.

Eine weitere Schwierigkeit ergab die Zyklisierung zum 13-gliedrigen Makrozyklus **40**. Beide Reaktionsschritte konnten erfolgreich optimiert werden, so dass mit Hilfe dieser Synthesestrategie eine kleine Kollektion zyklischer Depsipeptide dargestellt werden konnte (Abbildung 80). Durch Variation der Stereochemie in der eingesetzten β -Hydroxysäure und Isolierung der Nebenprodukte aus α -Serin-Epimerisierung konnten auf diesem Weg die diastereomeren Zyklodepsipeptide **40** und **96** ausgehend von β -Hydroxysäuren über acht Schritte in Gesamtausbeuten von 36-62% dargestellt werden. Durch den Einsatz anderer Aminosäuren konnten acht weitere 13-gliedrige Zyklodepsipeptide mit modifizierten Eigenschaften synthetisiert werden (**97-104**).

Durch selektive Phosphorylierung des Threoninrestes in den Makrozyklen (**2S,3S**)-**40**, (**2S,3R**)-**40**, (**2R,3R**)-**40** und (**2R,3S**)-**40** konnten nach optimierten Reaktionsbedingungen zudem vier weitere Stevastelin C3 Derivate (**41**) in sehr hohen Ausbeuten hergestellt werden (Abbildung 81).

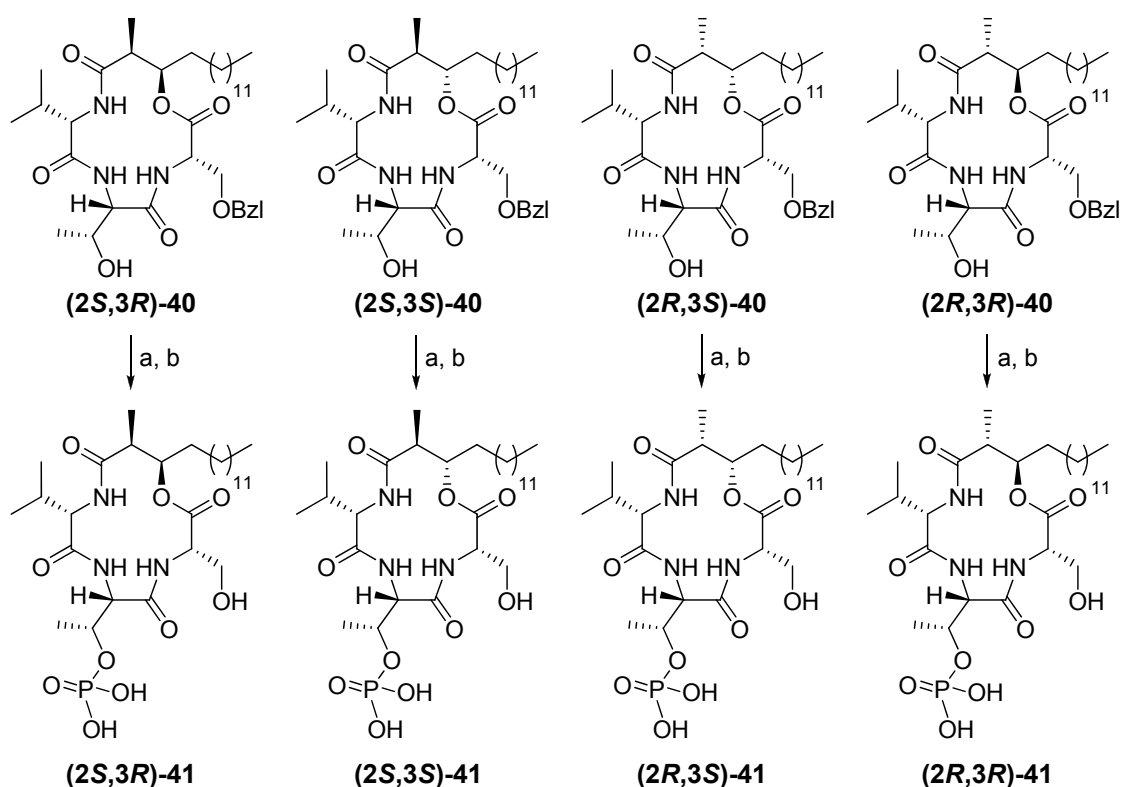


Abbildung 81: Phosphorylierung einiger diastereomeren Zyklodepsipeptide: a) $iPrNP(OBzl)_2$, Tetrazol, CH_2Cl_2 , dann $tBuOOH$, $0^\circ C$, 70-84%; b) Pd/C , H_2 , $EtOH$, 87-97%.

Anhand der vorliegenden neunzehn synthetisierten Stevastelin C3-Analoga, sollte die Eignung 13-gliedriger Zyklodepsipeptide als rigide Template untersucht werden. Hierzu wurden zunächst NMR-Untersuchungen der sechs diastereomeren

Verbindungen **40** und **96** vorgenommen. Die aus diesen Untersuchungen erhaltenen Informationen wurden anschließend in computerunterstützten Konformationsanalysen verwendet, um durch Kraftfeldrechnungen die energieärmsten Konformationen der Zyklodepsipeptide miteinander zu vergleichen.

Diese Untersuchungen ergaben, dass der Einbau von β -Hydroxysäuren in gespannte Makrozyklen als Instrument zur Generierung starrer Template verwendet werden kann, auf denen bestimmte Substituenten (hier Aminosäurereste) in vorhersagbarer, definierter Form ausgerichtet werden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Stereochemie der β -Hydroxysäure einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Gesamtgeometrie des Makrozyklus' hat als die Konfiguration des Serins. Besonders die Ausrichtung der Methylgruppe der 3-Methyl-2-hydroxyhexadecansäure scheint nahezu keinen Einfluss zu haben, während die Stereochemie an C-2 der Säure vor allem die Ausrichtung der langen Alkylkette steuert, wodurch sich der sterische Anspruch des Moleküls verändert.

Die Ergebnisse können so interpretiert werden, dass der peptidische Teil des Zyklodepsipeptides die Konformation des Makrozyklus' weitgehend bestimmt, während die flexiblere Esterbindung im makrozyklischen Rückgrat genutzt wird, um die Ringspannung auszugleichen. Diese Eigenschaften machen 13-gliedrige Zyklodepsipeptide zu interessanten Kandidaten für die Untersuchung von Enzymselektivitäten und Affinitäten, da durch den peptidischen Teil z.B. Protein-Schleifen imitiert werden könnten, welche häufig wichtige Erkennungs- oder Aktivierungsmotive verschiedenster Enzyme darstellen.

In der Natur werden häufig Konformationsänderungen durch Phosphorylierungen beobachtet. Um das Verhalten der synthetisierten Makrozyklen nach erfolgter Phosphorylierung zu studieren, wurden die Verbindungen **(2S,3S)-41**, **(2S,3R)-41**, **(2R,3R)-41** und **(2R,3S)-41** untersucht. Während in einem Energiefenster von 50 kJ/mol eine erhöhte Flexibilität der Makrozyklen im Vergleich zu den nicht phosphorylierten Verbindungen beobachtet werden konnte, wurden nahe dem globalen Minimum sehr einheitliche Strukturen ermittelt. In diesen Konformationen unterstützte das Phosphat den strukturgebenden Charakter des peptidischen Teils zusätzlich, indem es ihn durch verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen fixierte. Da nun ausschließlich die Esterbindung für eine veränderte Konformation sorgen konnte, wurden abhängig von der Konfiguration an C-3 der β -Hydroxysäure zwei verschiedene Geometrien des phosphorylierten Zyklodepsipeptides berechnet (Abbildung 82).

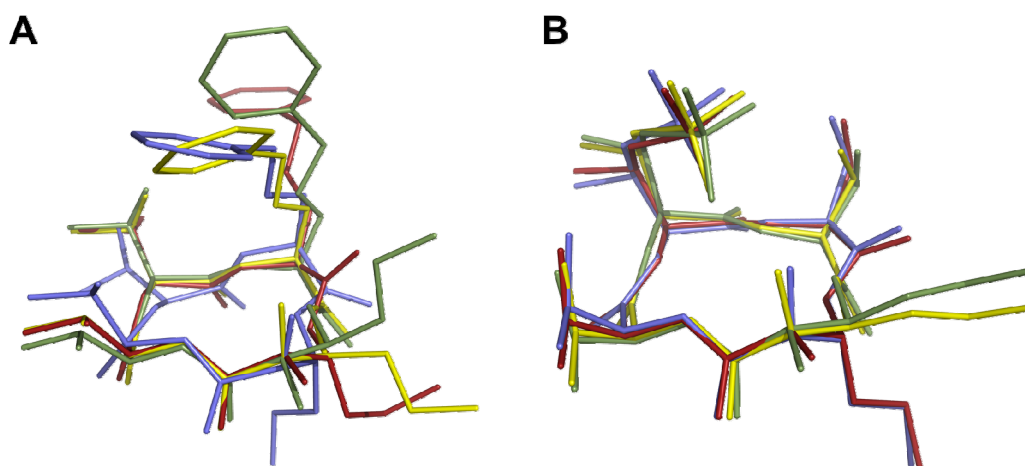


Abbildung 82: Überlagerung der energieärmsten Konformationen aus Kraftfeldrechnungen ohne Randbedingungen: A) benzylierte Verbindungen $(2S,3S)$ -40 = grün, $(2S,3R)$ -40 = rot, $(2R,3R)$ -40 = blau, $(2R,3S)$ -40 = gelb; B) phosphorylierte Verbindungen $(2S,3S)$ -41 = grün, $(2S,3R)$ -41 = rot, $(2R,3R)$ -41 = blau, $(2R,3S)$ -41 = gelb.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass rigide, homogene Konformationen einzelner Stevastelin Analoga vorlagen, sollte der Einfluss der unterschiedlichen Konformationen auf die biochemische Aktivität ermittelt werden. Hierzu wurden zunächst die inhibitorischen Eigenschaften der unphosphorylierten Verbindungen gegen verschiedene Phosphatasen *in vitro* untersucht. Es konnte jedoch keine Inhibition beobachtet werden. Da für die dualspezifische Phosphatase VHR bereits gezeigt werden konnte, dass phosphorylierte und sulfatierte Verbindungen *in vitro* aktiver waren als ihre unsubstituierten Analoga, wurden die phosphorylierten Zyklopeptide $(2S,3S)$ -41, $(2S,3R)$ -41, $(2R,3R)$ -41 und $(2R,3S)$ -41 gegen VHR getestet.

In diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass eine Phosphorylierung der Analoga essentiell für ihre Aktivität gegen die dualspezifische Phosphatase VHR war. Um die Theorie aus ersten Untersuchungen zu überprüfen, in denen davon ausgegangen wurde, dass unsubstituierte Analoga *in vivo* die Zellmembran penetrieren und anschließend durch Phosphorylierung oder Sulfatierung in ihre aktive Form überführt werden (Abbildung 83), wurden erste zelluläre Untersuchungen mit HeLa-Zellen vorgenommen.

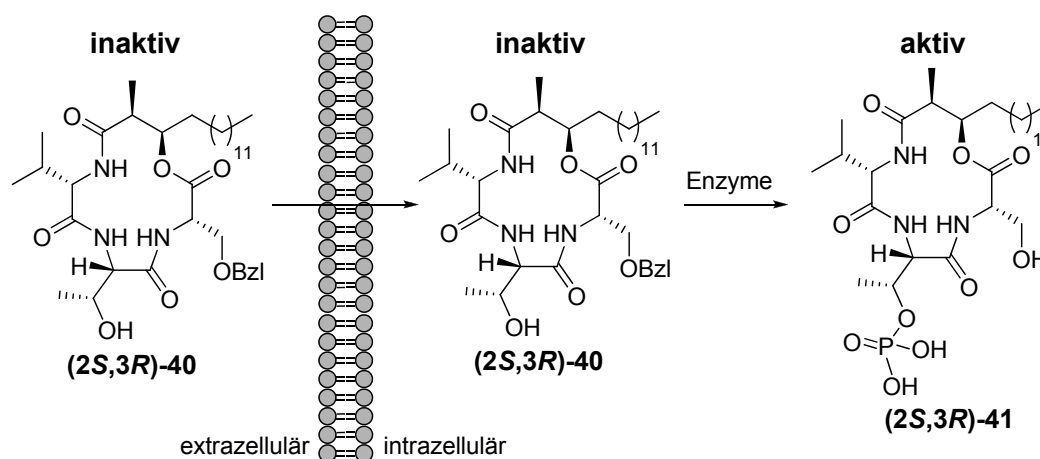


Abbildung 83: Theorie zur *in vivo* Aktivierung unphosphorylierter Stevastelin Analoga.

Da VHR unter physiologischen Bedingungen pERK dephosphoryliert und somit deaktiviert, wurde der Einfluss der unphosphorylierten Verbindung **(2S,3R)-40** auf den Phosphorylierungsgrad dieser MAP Kinase studiert. In diesen Untersuchungen konnten erste Anzeichen eines zellulären Effekts beobachtet werden. Während bei den Kontrollen nach Stimulierung der Zelle der Anteil an phosphoryliertem ERK schnell wieder abnahm, konnte durch Inkubation mit dem unphosphorylierten Inhibitor **(2S,3R)-40** auch nach 30 min noch eine deutliche pERK Bande erkannt werden (Abbildung 84).

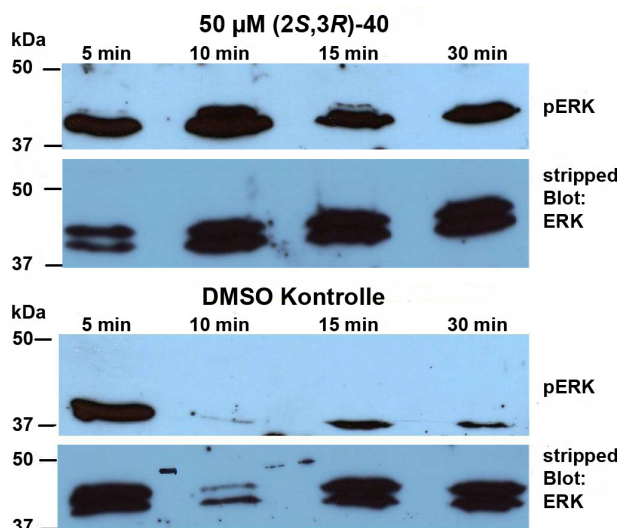


Abbildung 84: ERK-Phosphorylierungsgrad nach Zellinkubation mit **(2S,3R)-40**.

Somit war das Zyklodepsipeptid in der Lage, die Dephosphorylierung der MAP Kinase pERK zu verändern. Zu klären bleibt, ob dies eindeutig über die Inhibition der dualspezifischen Phosphatase VHR geschieht oder über einen anderen Weg. Des Weiteren bleibt zu klären, ob das Stevastelin Analog **(2S,3R)-40** *in vivo* durch eine

Phosphorylierung oder eine andersartige Derivatisierung aktiviert wird, wozu eder synthetisierte Makrozyklus **100** herangezogen werden kann, der anstelle des Threonins ein Valin aufweist. Um detailliertere Einsichten in die Wirkung von Stevastelin Analoga auf den Phosphorylierungsgrad von VHR zu gewinnen, werden deshalb weitere Untersuchungen nötig sein. Diese sollten zu neuen Erkenntnissen zur Funktion und Ansteuerbarkeit von VHR in der Zelle beitragen. Über die Aktivierung der Phosphatase mit ZAP-70 ergeben sich möglicherweise auch neue Wege zur Entwicklung von Immunsuppressiva.

6. Experimenteller Teil

6.1 Synthese

6.1.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Optische Drehungen wurden auf einem Schmidt + Hänsch Polartronic HH8 Polarimeter ermittelt und sind auf die Wellenlänge der Natrium-D-Linie (589 nm) bezogen. Die Konzentration c in g/100 ml und das verwendete Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktapparatur 540 der Firma Büchi gemessen und sind unkorrigiert.

NMR-Spektren wurden mit einem Varian Mercury-VX 400, einem Bruker Avance DRX 500 und einem Varian Unity Inova 600 aufgenommen. Die in ppm angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das jeweilige Restsignal des nicht deuterierten Lösungsmittels (CDCl_3 : $\delta = 7.26$ bzw. 77.00 ppm; $[\text{D}_6]\text{DMSO}$: $\delta = 2.50$ bzw. 39.43 ppm; MeOD : $\delta = 3.31$ bzw. 49.05 ppm). Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, b = breites Signal, m = Multiplett.

IR-Spektren wurden von Reinsubstanzen an einem Tensor 27 FT-IR Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt (ATR). Es wurden die charakteristischen Banden zwischen 4000 und 1200 cm^{-1} angegeben.

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem JEOL SX-102A Spektrometer gemessen. Als Ionisierungsmethode wurde Fast Atom Bombardment (FAB) mit *m*-Nitrobenzylalkohol als Matrix verwendet. Alternativ wurden hochaufgelöste Massenspektren mittels ESI (Elektronen Spray Ionisierung) an einem Accela/LTQ Orbitrap (LC/ESI) System oder mittels Elektronenstoß Ionisierung (EI) an TRACE GC Ultra/DFS (GC/EI) Geräten der Firma Thermo Scientific gemessen.

MALDI-TOF Massenspektren wurden an einem Voyager DETM Pro Biospectrometry Workstation Spektrometer der Firma PerSeptive Biosystems gemessen, als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) eingesetzt.

Gekoppelte Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde an einem Agilent Series 1100-System der Firma Hewlett Packard mit einer CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4 Säule der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Das ESI-Massenspektrometer war ein LCQ Advantage MAX der Firma Finnigan.

Bei einer Flussrate von 1 ml/min (Laufmittel A: 0.1% HCOOH in H₂O; Laufmittel B: 0.1% HCOOH in Acetonitril) wurden folgende Gradienten verwendet:

C4-10: 0-1 min 10% B, 1-10 min linearer Anstieg von 10 bis 100% B, 10-12 min 100% B;

C4-50: 0-1 min 50% B, 1-10 min linearer Anstieg von 50 bis 80% B, 10-11 min linearer Anstieg von 80 bis 100% B, 11-14 min 100% B;

C4-70: 0-1 min 70% B, 1-11 min linearer Anstieg von 70 to 100% B, 11-14 min 100% B.

Gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurde mit einem Gaschromatographen 6890 und einem Massendetektor 5973 der Firma Hewlett Packard durchgeführt. Es wurde eine Kapillarsäule HP-5MS, 25 m x 0.2 mm x 0.33 µm der Firma Agilent mit Helium als Trägergas verwendet.

Es wurde das folgende Temperaturprogramm verwendet:

GC100: 1 min 100 °C, dann 40 °C/min auf 300 °C, dann 5 min 300°C.

Für die **analytische chirale HPLC** wurde ein Agilent Serie 1100-System mit einer Chiralpak OD-H oder einer Chiralpak IA Säule (Daicel Chemical Industries) eingesetzt. Es wurden isochratische Trennungen durchgeführt.

OD-H-17: 17% *i*-Propanol, 83% *n*-Hexan;

IA-10: 10% *i*-Propanol, 90% *n*-Hexan.

Für die **MS-gekoppelte, präparative HPLC** wurden Agilent Systeme der Serie 1100/LC/MSD VL (ESI) und Säulen der Firma Macherey-Nagel verwendet:

Vorsäule: VP 50/21 Nucleodur C4 Gravity 5 µm,

Hauptsäule: VP 125/21 Nucleodur C4 Gravity 5 µm; Flussrate: 25 ml/min

oder

Vorsäule: VP 50/10 Nucleodur C4 Gravity 5 µm,

Hauptsäule: VP 125/10 Nucleodur C4 Gravity 5 µm, Flussrate: 10 ml/min;

Detektion: 210 und 254 nm sowie Massendetektor (ESI); Wasser für HPLC-Trennungen wurde durch ein Milli-Q-System mit Q-Gard 2-Kartuschen der Firma Millipore gereinigt. Eluent A: Acetonitril + 0.1% TFA; Eluent B: Wasser + 0.1% TFA.

Als Lösungsmittel für die Ionisierung wurde Wasser/Acetonitril 1:1 + 0.1% Ameisensäure verwendet.

Es wurden folgende Gradienten verwendet:

Prep21: 21mm: für 3 min 50% A, dann in 27 min auf 80% A, in 1 min auf 100% A, 6 min 100% A halten, dann für 2 min 50% A halten.

Prep10: für 1 min 60% A, dann in 19 min auf 100% A, 5 min 100% A halten, dann für 3 min 60% A halten.

Zum Einengen der Substanzen nach der präparativen HPLC-Trennung wurde ein alpha 2-4 Gefriertrockner der Firma Christ verwendet.

Für die **Dünnschichtchromatographie (DC)** wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck verwendet. Laufmittel und R_F-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Zur Detektion wurden UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sowie folgende Anfärbereagenzien verwendet:

Reagenz A: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat und 6 ml konz. Schwefelsäure in 94 ml Wasser;

Reagenz B: 0.5%ige Lösung von Kaliumpermanganat in Wasser.

Für die **präparative Säulenchromatographie** wurde Kieselgel der Firma Acros mit der Korngröße 35-70 μm verwendet.

Alle **Reaktionen** fanden unter einer Inert-Atmosphäre aus Argon statt. Glasgeräte wurden vor dem Einsatz im Hochvakuum ausgeheizt und nach Abkühlen mit Argon befüllt. Lösungsmittel wurden in wasserfreier Form eingesetzt:

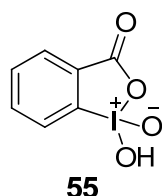
Diethylether, Tetrahydrofuran und Methanol wurden in getrockneter Form über Molsieb von der Firma Fluka bezogen.

Dichlormethan und Acetonitril wurden über Calciumhydrid getrocknet und vor Gebrauch destilliert. Pentan wurde über basischem Aluminiumoxid vorgetrocknet und von Natrium-Ketyl destilliert.

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Novabiochem, SIGMA-ALDRICH, ACROS, Fluka oder ABCR erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

6.1.2 Versuche zur Herstellung der Synthesebausteine

o-Iodoxybenzoesäure (IBX, 55):^[124]



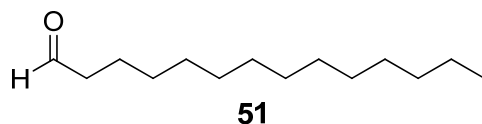
2-Iodbenzoesäure (16.6 g, 66.2 mmol) wurden in 0.5 M Schwefelsäure (250 ml) suspendiert und auf 57°C erwärmt. Bei konstanter Temperatur wurde Kaliumbromat (14.4 g, 86.2 mmol) portionsweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h auf 65-70°C erhitzt, während die entstehenden Bromdämpfe in eine gesättigte Thiosulfatlösung eingeleitet wurden. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene weiße Feststoff abfiltriert, mit Wasser (500 ml) und 1:1 Cyclohexan/Ethylacetat (150 ml) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 15.8 g, 56.3 mmol, 85%.

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 8.13 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 2-H), 8.06-7.95 (m, 2H, 3-H, 5-H), 7.83 (dd, J = 7.1 Hz, J = 7.1 Hz, 1H, 4-H).

¹³C NMR (101 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 124.9 (1C, C-4), 130.0 (1C, C-5), 131.3 (1C, C-6), 132.9 (1C, C-2), 133.3 (1C, C-3), 146.5 (1C, C-1), 167.4 (1C, C-7).

Tetradecan-1-al (51):



Zu einer Lösung von IBX (**55**, 1.1 Äq., 22.40 g, 105.48 mmol) in abs. DMSO (40 ml) wurde bei Raumtemperatur eine Lösung von Tetradecan-1-ol (1 Äq., 14.97 g, 69.81 mmol) in abs. THF (40 ml) gegeben. Nach 3 h Rühren bei Rt wurde langsam Wasser (40 ml) zugegeben. Nach erfolgter Filtration durch Celite und Kieselgel (je

10 g) wurde das Filtrat mit Diethylether (3 x 100 ml) extrahiert und die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Aldehyd destilliert und das erhaltene farblose Öl sofort weiter eingesetzt.

Ausbeute: 13.2 g, 62.1 mmol, 89%.

Alternativ konnte eine Oxidation mit PCC durchgeführt werden.

Zu einer Lösung aus PCC (1.65 g, 7.65 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (10 ml) wurde Tetradecan-1-ol (1.10 g, 5.11 mmol) gegeben und 2 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde Diethylether (20 ml) zur Reaktionslösung gegeben und der flüssige Überstand mit Wasser (3 x 10 ml) und ges. NaCl (2 x 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und über Celite und Kieselgel filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand destilliert und der als farbloses Öl erhaltene Aldehyd sofort weiter eingesetzt.

Ausbeute: 1.22 g, 5.74 mmol, 75%.

R_f -Wert: 0.67 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

Siedep.: 85°C bei 0.01 bar.

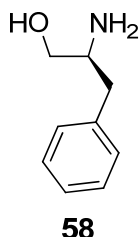
GC-MS (GC100): $t_R = 3.93$ min; $m/z = 212$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR (in Substanz): $\nu = 2953, 2849, 1693, 1471, 1442$ cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.74 (t, 1.7 Hz, 1H; C1-H), 2.36 (dt, 7.4, 1.9 Hz, 2H; C2-H₂), 1.59 (m, 2H; C3-H), 1.4-1.2 (m, 20H; 10x CH₂), 0.84 (t, 6.5 Hz, 3H; C14-H₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 202.4 (C-1), 43.9 (C-2), 32.0 (C-12), 29.7 (2C; 2x CH₂), 29.4 (3C; 3x CH₂), 29.2 (4C; 4x CH₂), 22.7 (C-3), 22.1 (C-13), 14.2 (C-14).

HR-MS (GC-MS): ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$ $[\text{M}]^{+\cdot}$: 212.2135, gef.: 212.2142.

(2S)-2-Amino-3-phenylpropan-1-ol (58):^[153]

Natriumborhydrid (2.4 Äq., 2.75 g, 72.6 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in trockenem THF (80 ml) suspendiert. Anschließend wurde L-Phenylalanin (1 Äq., 5.00 g, 30.2 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde eine Lösung von Iod (1 Äq., 7.69 g, 30.2 mmol) in trockenem THF (20 ml) langsam über 1.5 h zugetropft. Nach beendeter Gasentwicklung wurde die Reaktion über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Schließlich wurde die Reaktion bei 0°C mit MeOH (20 ml) beendet und im Vakuum aufkonzentriert. Der Rückstand wurde für 4 h in 20%iger KOH Lösung (60 ml) gerührt und anschließend mit CH₂Cl₂ (3 x 30 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene farblose Öl konnte ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt eingesetzt werden.

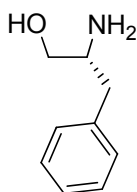
Ausbeute: 4.2 g, 27.8 mmol, 92%.

$[\alpha]_D^{20}$: -20° (c = 1, 1 M HCl).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.20 (dd, J = 10.9, 4.08 Hz, 1H), 7.15-7.07 (m, 1H), 3.64-3.43 (m, 1H), 3.33 (dd, J = 10.9, 7.3 Hz, 1H), 3.12-2.99 (m, 1H), 2.70 (dd, J = 13.6, 5.4 Hz, 1H), 2.48 (dd, J = 13.5, 8.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 138.2 (ipso), 129.2 (ortho), 128.5 (meta), 126.5 (para), 65.4 (CH₂OH), 54.2 (CHNH₂), 40.0 (CH₂Ph).

HR-MS (LC-MS): ber. für C₉H₁₄NO⁺ [M+H]⁺: 152.1070, gef.: 152.1065.

(2R)-2-Amino-3-phenylpropan-1-ol (ent-58):**ent-58**

Das Produkt wurde analog zu seinem Enantiomer **58** (s.o.) aus D-Phenylalanin (5.00 g, 30.2 mmol) durch Reduktion mit Natriumborhydrid (2.4 Äq., 2.75 g, 72.5 mmol) und Iod (1 Äq., 7.69 g, 30.2 mmol) hergestellt. Das Aminol **ent-58** wurde als farbloses Öl erhalten.

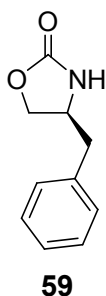
Ausbeute: 4.1 g, 27.2 mmol, 90%.

$[\alpha]_D^{20}$: +19° (c = 1, 1 M HCl).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.20 (dd, J = 10.9, 4.08 Hz, 1H), 7.15-7.07 (m, 1H), 3.64-3.43 (m, 1H), 3.33 (dd, J = 10.9, 7.3 Hz, 1H), 3.12-2.99 (m, 1H), 2.70 (dd, J = 13.6, 5.4 Hz, 1H), 2.48 (dd, J = 13.5, 8.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 138.2 (ipso), 129.2 (ortho), 128.5 (meta), 126.5 (para), 65.4 (CH₂OH), 54.2 (CHNH₂), 40.0 (CH₂Ph).

HR-MS (LC-MS): C₉H₁₄NO⁺ [M+H]⁺, ber.: 152.1070, gef.: 152.1063.

(4S)-4-Benzyl-1,3-oxazolidin-2-on (59):^[127]

Aminoalkohol **58** (4.00 g, 26.5 mmol) wurde mit Diethylcarbonat (2 Äq., 6.42 ml, 53.0 mmol) und Kaliumcarbonat (1 Äq., 3.66 g, 26.5 mmol) zum Sieden erhitzt, wobei das dabei entstandene Ethanol laufend über eine Vigreuxkolonne abdestilliert wurde. Sobald kein weiteres Ethanol mehr entstand (nach ca. 4-5 h), wurde der Rückstand nach Abkühlen auf Rt in CH₂Cl₂ (50 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 20 ml), 0.5 M HCl (2 x 20 ml) und ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt konnte säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 bis Ethylacetat pur) gereinigt und als farbloser Feststoff aus *n*-Heptan gefällt werden.

Ausbeute: 3.6 g, 20.37 mmol, 77%.

R_f-Wert: 0.29 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1, v/v).

[α]_D²⁰: -62.3° (c = 1, CHCl₃).

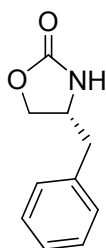
Schmp.: 86°C.

GC-MS (GC100): *t_R* = 5.30 min; *m/z* = 177 [M+H]⁺, 92, 91, 86, 65.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.36-7.24 (m, 3H, arom. H), 7.19-7.15 (m, 2H, arom. H), 5.79 (s, 1H, NH), 4.43 (dd, *J* = 8.4, 8.0 Hz, 1H, CH₂O-a), 4.14 (dd, *J* = 8.4, 5.6 Hz, 1H, CH₂O-b), 4.12-4.05 (m, 1H, CHN), 2.90 (dd, *J* = 13.6, 7.0 Hz, 1H, CH₂Ph-a), 2.85 (dd, *J* = 13.6, 6.4 Hz, 1H, CH₂Ph-b).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 159.3 (C=O), 135.9 (C-Aromat ipso), 129.0 (C-Aromat ortho, meta), 127.2 (C-Aromat para), 69.6 (CH₂OR), 53.7 (CHNH), 41.4 (CH₂Ph).

HR-MS (GC-MS): ber. für: C₁₀H₁₁NO₂ [M]⁺: 177.0784, gef.: 177.0756.

(4R)-4-Benzyl-1,3-oxazolidin-2-on (ent-59):^[127]**ent-59**

Das Produkt wurde analog zu seinem Enantiomer **59** (s.o.) hergestellt. Aus Aminoalkohol **ent-58** (4.00 g, 26.5 mmol), (2 Äq., 6.42 ml, 53.0 mmol) und Kaliumcarbonat (1 Äq., 3.66 g, 26.5 mmol) wurde das Oxazolidinon **ent-59** so als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.6 g, 20.37 mmol, 77%.

$[\alpha]_D^{20}$: +61.5° (c = 1, CHCl₃).

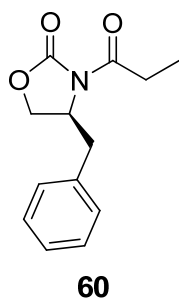
Schmp.: 87°C.

GC-MS (GC100): $t_R = 5.28$ min; $m/z = 177$ [M+H]⁺, 92, 91, 86, 65.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.36-7.24 (m, 3H, arom. H), 7.19-7.15 (m, 2H, arom. H), 5.79 (s, 1H, NH), 4.43 (dd, $J = 8.4, 8.0$ Hz, 1H, CH₂O-a), 4.14 (dd, $J = 8.4, 5.6$ Hz, 1H, CH₂O-b), 4.12-4.05 (m, 1H, CHN), 2.90 (dd, $J = 13.6, 7.0$ Hz, 1H, CH₂Ph-a), 2.85 (dd, $J = 13.6, 6.4$ Hz, 1H, CH₂Ph-b).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 159.3 (C=O), 135.9 (C-Aromat ipso), 129.0 (C-Aromat ortho, meta), 127.2 (C-Aromat para), 69.6 (CH₂OR), 53.7 (CHNH), 41.4 (CH₂Ph).

HR-MS (GC-MS): ber. für: C₁₀H₁₁NO₂ [M]⁺: 177.0784, gef.: 177.0757.

(4S)-4-Benzyl-3-propionyl-1,3-oxazolidin-2-on (60):^[120]

Oxazolidinon **59** (8.65 g, 48.8 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (150 ml) gelöst. Bei -78°C wurde innerhalb von 15 min 1.6 M *n*BuLi-Lösung in Hexan (1.12 Äq., 33.9 ml, 54.7 mmol) zugetropft und 30 min bei -78°C gerührt. Anschließend wurde mit Propionylchlorid (1.12 Äq., 4.77 ml, 54.7 mmol) versetzt und 3 h bei 0°C gerührt. Schließlich wurde 1 M K_2CO_3 -Lösung (65 ml) zugegeben und das organische Lösungsmittel entfernt. Daraufhin wurde mit CH_2Cl_2 (5 x 40 ml) extrahiert und die organischen Phasen mit ges. K_2CO_3 -Lösung (3 x 80 ml) und ges. NaCl-Lösung (2 x 80 ml) gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 bis 3:1) ergab Imid **60** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 10.0 g, 42.9 mmol, 88%.

R_f -Wert: 0.29 (5:1 Cyclohexan/Ethylacetat, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: $+56.3^{\circ}$ ($c = 1$, CHCl_3).

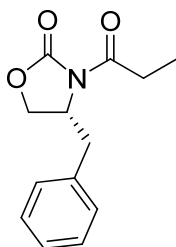
Schmelzpunkt: 45°C .

GC-MS (GC100): $t_R = 5.28$ min, $m/z = 233$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 142, 91, 57.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.36-7.20 (m, 5H; arom. H), 4.67 (tdd, $J = 9.7$, 7.2, 3.30 Hz, 1H; C4-H), 4.28-4.07 (m, 2H; C5-H), 3.31 (dd, $J = 13.4$, 3.3 Hz, 1H; CH_2Ph), 2.99 (qd, $J = 17.9$, 7.4 Hz, 1H; C2'b-H₂), 2.93 (qd, $J = 17.9$, 7.3 Hz, 1H; C2'a-H₂), 2.77 (dd, $J = 13.4$, 9.6 Hz, 1H; CH_2Ph), 1.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H; C3'-H₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 174.0 (C-1'), 153.4 (C-2), 135.3 (*ipso*-aromat. C), 129.3 (2C; *m*-aromat. C), 128.9 (2C; *o*-aromat. C), 127.3 (*p*-aromat. C), 66.2 (C-5), 55.1 (C-4), 37.9 (CH_2Ph), 29.1 (C-2'), 8.2 (C-3').

HR-MS (GCMS): ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_3$ $[\text{M}]^+$: 233.1046, gef.: 233.1041.

(4R)-4-Benzyl-3-propionyl-1,3-oxazolidin-2-on (ent-60):^[120]**ent-60**

Das acylierte Oxazolidinon **ent-60** wurde ausgehend von Oxazolidinon **ent-59** (10.39 g, 58.6 mmol) mit Hilfe von 1.6 M *n*BuLi-Lösung in Hexan (1.12 Äq., 40.7 ml, 65.6 mmol) und Propionylchlorid (1.12 Äq., 5.72 ml, 65.6 mmol) wie sein Enantiomer **60** (s.o.) hergestellt. Das Imid **ent-60** konnte nach säulenchromatischer Aufreinigung als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 8.82 g, 49.8 mmol, 85%.

$[\alpha]_D^{20}$: -56.1° (*c* = 1, CHCl₃).

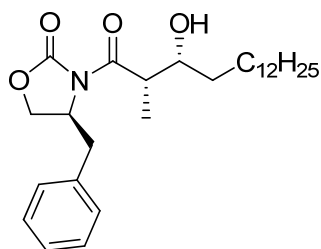
Schmelzpunkt: 45°C.

GC-MS (GC100): t_R = 5.28 min, *m/z* = 233 [M+H]⁺, 142, 91, 57.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.36-7.20 (m, 5H; arom. H), 4.67 (tdd, *J* = 9.7, 7.2, 3.30 Hz, 1H; C4-H), 4.28-4.07 (m, 2H; C5-H), 3.31 (dd, *J* = 13.4, 3.3 Hz, 1H; CH₂Ph), 2.99 (qd, *J* = 17.9, 7.4 Hz, 1H; C2'b-H₂), 2.93 (qd, *J* = 17.9, 7.3 Hz, 1H; C2'a-H₂), 2.77 (dd, *J* = 13.4, 9.6 Hz, 1H; CH₂Ph), 1.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H; C3'-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 174.0 (C-1'), 153.4 (C-2), 135.3 (*ipso*-aromat. C), 129.3 (2C; *m*-aromat. C), 128.9 (2C; *o*-aromat. C), 127.3 (*p*-aromat. C), 66.2 (C-5), 55.1 (C-4), 37.9 (CH₂Ph), 29.1 (C-2'), 8.2 (C-3').

HR-MS (GCMS): für C₁₃H₁₆NO₃ [M]⁺⁺ ber.: 233.1046, gef.: 233.1041.

(4S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methylhexadecanoyl)oxazolidin-2-on (62):**62**

Zu einer Lösung von (4S)-4-Benzyl-3-propionyl-1,3-oxazolidin-2-on (**60**, 4.19 g, 18.0 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (40 ml) wurde bei -78°C DIPEA (1.3 Äq., 3.87 ml, 23.4 mmol) und anschließend innerhalb von 10 min *n*BuBOTf (1 M in *n*-Hexan, 1.2 Äq., 21.6 ml, 21.6 mmol) gegeben. Nach 20 min Rühren bei -78°C wurde eine weitere Stunde bei 0°C gerührt.

Nachdem wieder auf -78°C gekühlt worden war, wurde langsam frisch destilliertes Tetradecanal (**51**, 1.1 Äq., 4.20 g, 19.8 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (1 ml) zugegeben. Nach 30 min wurde weitere 2 h bei 0°C gerührt.

Bei 0°C wurde Phosphatpuffer (pH 7, 20 ml), MeOH (30 ml) und anschließend langsam MeOH/30%ige H₂O₂ (1:1, 20 ml) zugegeben (T<10°C) und eine weitere Stunde bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von Wasser (15 ml) wurden die Phasen getrennt und die wässrige dreimal mit CH₂Cl₂ (je 20 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Im Rohprodukt wurde mit Hilfe einer chiralen HPLC ein Diastereomerenverhältnis von 92:8 bestimmt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde säulenchromatografisch (10:1 bis 5:1) aufgereinigt und ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 6.42 g, 14.4 mmol, 80% diastereomerenreines Produkt.

R_f-Wert: 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

[α]_D²⁰: +39.3° (c = 1, CHCl₃).

HPLC-ESI (LC10): t_R = 11.5 min; m/z = 446.0 [M+H]⁺, 428.1 [M-H₂O+H]⁺.

IR (in Substanz): ν = 3520, 2923, 2853, 1778, 1697, 1455, 1383, 1351 cm⁻¹.

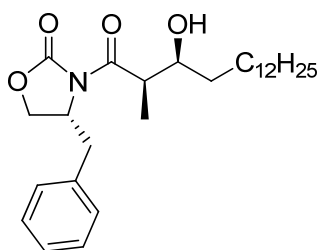
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.40-7.15 (m, 5H, arom. H), 4.70 (tdd, J = 9.7, 7.1, 3.2 Hz, 1H; C4-H), 4.22 (dd, J = 9.1, 7.5 Hz, 1H; C5b-H₂), 4.18 (dd, J = 9.1, 3.1 Hz, 1H; C5a-H₂), 3.94 (ddd, J = 8.3, 4.1, 2.9 Hz, 1H; C3'-H), 3.76 (dq, J = 7.0, 2.7 Hz,

^1H ; C2'-H), 3.25 (dd, $J = 13.4, 3.3$ Hz, 1H; CH₂Ph), 2.79 (dd, $J = 13.4, 9.4$ Hz, 1H; CH₂Ph), 1.60-1.38 (m, 2H; C4'-H₂), 1.35-1.22 (m, 25H; C1''-H₃, 11x CH₂), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H; C16'-H₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177.5 (C-1'), 153.0 (C-2), 135.0 (*ipso*-aromat. C), 129.4 (*m*-aromat. C), 128.9 (*o*-aromat. C), 128.9 (*o*-aromat. C), 127.4 (*p*-aromat. C), 71.5 (C-3'), 66.1 (C-5), 55.1 (C-4), 42.1 (C-2'), 37.8 (CH₂Ph), 33.8 (C-4'), 31.9 (C-14'), 29.7 (C-Kette), 29.6 (3C; C- Kette), 29.5 (3C; C- Kette), 29.3 (C- Kette), 26.0 (C- Kette), 22.6 (C-15'), 14.1 (C-16'), 10.4 (C-1'').

HR-MS (FAB): ber. für C₂₇H₄₄NO₄⁺ [M+H]⁺: 446.3265, gef.: 446.3260.

(4R)-4-Benzyl-3-((2R,3S)-3-hydroxy-2-methylhexadecanoyl)oxazolidin-2-on
(ent-62):



ent-62

Das *syn*-Aldolprodukt **ent-62** wurde mit Hilfe der gleichen Synthesemethode wie sein Enantiomer **62** (s.o.) hergestellt. Ausgehend von (4R)-4-Benzyl-3-propionyl-1,3-oxazolidin-2-on (**ent-60**, 3.84 g, 16.5 mmol), DIPEA (1.3 Äq., 3.55 ml, 21.5 mmol) und 1 M *n*BuBOTf in Hexan (1.2 Äq., 19.8 ml, 19.8 mmol), sowie frisch destilliertem Tetradecanal (**51**, 1.1 Äq., 3.85 g, 18.2 mmol) konnte das Produkt nach säulenchromatografischer Aufreinigung als farbloses Öl erhalten werden.

Ausbeute: 6.03 g, 13.5 mmol, 82% diastereomerenreines Produkt.

R_f-Wert: 0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -38.9° ($c = 1$, CHCl₃).

HPLC-ESI (LC10): $t_R = 11.5$ min; $m/z = 446.0$ [M+H]⁺, 428.1 [M-H₂O+H]⁺.

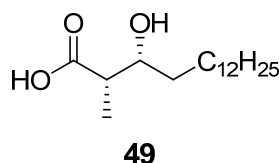
IR (in Substanz): $\nu = 3521, 2923, 2853, 1778, 1697, 1456, 1383, 1351$ cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.40-7.16 (m, 5H, arom. H), 4.70 (tdd, J = 9.7, 7.1, 3.2 Hz, 1H; C4-H), 4.22 (dd, J = 9.1, 7.5 Hz, 1H; C5b-H₂), 4.18 (dd, J = 9.1, 3.1 Hz, 1H; C5a-H₂), 3.94 (ddd, J = 8.3, 4.1, 2.9 Hz, 1H; C3'-H), 3.76 (dq, J = 7.0, 2.7 Hz, 1H; C2'-H), 3.25 (dd, J = 13.4, 3.3 Hz, 1H; CH₂Ph), 2.80 (dd, J = 13.4, 9.4 Hz, 1H; CH₂Ph), 1.59-1.38 (m, 2H; C4'-H₂), 1.35-1.23 (m, 25H; C1''-H₃, 11x CH₂), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H; C16'-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177.4 (C-1'), 153.0 (C-2), 135.0 (*ipso*-aromat. C), 129.4 (*m*-aromat. C), 128.9 (*o*-aromat. C), 128.9 (*o*-aromat. C), 127.4 (*p*-aromat. C), 71.5 (C-3'), 66.1 (C-5), 55.1 (C-4), 42.2 (C-2'), 37.8 (CH₂Ph), 33.8 (C-4'), 31.9 (C-14'), 29.7 (C- Kette), 29.6 (3C; C- Kette), 29.5 (3C; C- Kette), 29.3 (C- Kette), 26.0 (C- Kette), 22.6 (C-15'), 14.1 (C-16'), 10.3 (C-1'').

HR-MS (FAB): ber. für C₂₇H₄₄NO₄⁺ [M+H]⁺: 446.3265, gef.: 446.3261.

(2S,3R)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (49):



Imid **62** (4.26 g, 9.55 mmol) wurde in 3:1 THF/H₂O (70 ml) suspendiert und auf 0°C gekühlt. Langsam wurde 30%iges H₂O₂ (4 Äq., 4.33 g, 38.2 mmol) zugetropft. Nach portionsweiser Zugabe von LiOH (2 Äq., 802 mg, 19.1 mmol) wurde 2 h bei 0°C gerührt und anschließend Na₂SO₃ Lösung (4.8 g in 30 ml H₂O) zugegeben. Nach weiterem Rühren für 30 min bei 0°C wurde das THF am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Phase mit HCl auf pH 2 angesäuert. Nach Extraktion mit CH₂Cl₂ (3 x 20 ml) wurde die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch (CH₂Cl₂/MeOH 40:1 bis 20:1) gereinigt und lieferte die Säure **49** als farblosen Feststoff. Das chirale Auxiliar **59** konnte in 65% Ausbeute wiedergewonnen werden.

Ausbeute: 2.11 g, 7.35 mmol, 77%.

R_f-Wert: 0.18 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: +8.2° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 70°C.

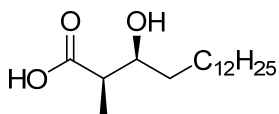
IR (in Substanz): ν = 2914, 2849, 1697, 1470, 1422 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.95 (dt, J = 8.5, 3.5 Hz, 1H; C3-H), 2.59 (dq, J = 7.3, 3.5 Hz, 1H; C2-H), 1.55-1.38 (m, 2H; C4-H₂), 1.33-1.23 (m, 22H; 11x CH₂), 1.20 (d, J = 7.2 Hz, 3H; C1'-H₃), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H; C16-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 181.2 (C-1), 71.8 (C-3), 44.1 (C-2), 33.7 (C-14), 31.9 (C-chain), 29.7 (2C; C-chain), 29.6 (4C; C-chain), 29.5 (C-chain), 29.3 (C-chain), 26.0 (C-4), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16), 10.3 (C-1').

HR-MS (FAB): ber. für C₁₇H₃₅O₃⁺ [M+H]⁺: 287.2581, gef: 287.2582.

(2R,3S)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (ent-49):



ent-49

Die β -Hydroxysäure **ent-49** wurde analog zu Enantiomer **49** erhalten. Ausgehend von Aldolprodukt **ent-62** (3.51 g, 7.87 mmol) konnte mit 30%iger H₂O₂ (4 Äq., 3.57 g, 31.5 mmol) und portionsweiser Zugabe von LiOH (2 Äq., 661 mg, 15.7 mmol) das chirale Auxiliar entfernt werden. Die β -Hydroxysäure **ent-49** wurde als farbloser Feststoff isoliert. Das chirale Auxiliar **ent-59** konnte in 61% Ausbeute wiedergewonnen werden.

Ausbeute: 1.76 g, 6.14 mmol, 78%.

R_F-Wert: 0.18 (Dichlormethan/Methanol 20:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -7.9° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 71°C.

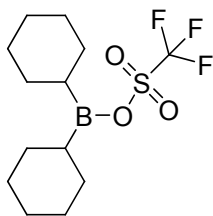
IR (in Substanz): ν = 2915, 2849, 1697, 1470, 1422 cm⁻¹.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.96 (dt, J = 8.5, 3.5 Hz, 1H; C3-H), 2.59 (dq, J = 7.3, 3.5 Hz, 1H; C2-H), 1.56-1.38 (m, 2H; C4-H₂), 1.34-1.22 (m, 22H; 11x CH₂), 1.20 (d, J = 7.2 Hz, 3H; C1'-H₃), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H; C16-H₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 181.3 (C-1), 71.8 (C-3), 44.1 (C-2), 33.7 (C-14), 31.9 (C-chain), 29.7 (2C; C-chain), 29.6 (4C; C-chain), 29.5 (C-chain), 29.3 (C-chain), 26.0 (C-4), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16), 10.4 (C-1').

HR-MS (FAB): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{O}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 287.2581, gef.: 287.2581.

Dicyclohexylborontriflat (122):

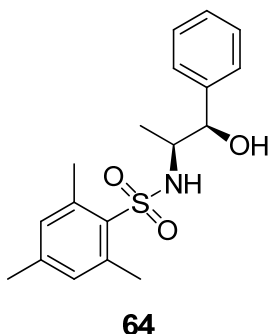


122

Cyclohexen (20.0 ml, 197 mmol) wurde mit trockenem Diethylether (57 ml) in einem ausgeheizten Kolben auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde Boran-Dimethylsulfid-Komplex (8.9 ml, 94 mmol) über 30 min langsam zugetropft. Nach 3 h Rühren bei 0°C wurde die überstehende Flüssigkeit mit einer Spritze entfernt und der weiße Feststoff am Hochvakuum getrocknet.

Anschließend wurde das erhaltene Dicyclohexylboran (16 g, 89.8 mmol) in absolutem Pentan (60 ml) suspendiert. Zu der gut gerührten Suspension wurde unter starker Gasentwicklung langsam trockene Trifluormethansulfonsäure (7.97 ml, 89.8 mmol) getropft. Nach erfolgter Zugabe wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und nach weiteren 1.5 h ohne Rühren konnte die obere, klare Phase in einen trockenen und tarierten Kolben überführt werden. Nach 24 h bei -20°C entstanden große farblose Kristalle. Nach Entfernung der Mutterlauge wurden die Kristalle getrocknet und gewogen. Anschließend wurde eine 1 M Stammlösung des Dicyclohexylborontriflats in Pentan hergestellt.

Ausbeute: 24.22 g, 74.3 mmol, 79%.

(1*R*,2*S*)-2-(*N*-Mesitylsulfonyl)amin-1-phenyl-1-propanol (64):

(-)-Norephedrin (**63**, 8.00 g, 52.9 mmol) wurde in abs. CH₂Cl₂ (120 ml) gelöst und bei 0°C mit Triethylamin (1.2 Äq., 8.60 ml, 63.5 mmol) versetzt. Anschließend wurde Mesitylsulfonylchlorid (1 Äq., 11.6 g, 52.9 mmol) in einer Portion zugegeben. Nach 3 h bei 0°C wurde die Lösung mit 180 ml Diethylether versetzt und die organische Phase mit 1 M HCl (30 ml), Wasser (30 ml) und ges. NaHCO₃ (30 ml) sowie ges. NaCl Lösung (30 ml) gewaschen. Nachdem die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet worden war, wurde das Lösungsmittel entfernt, wobei das Sulfonamid **64** in farblosen Nadeln kristallisierte.

Ausbeute: 17.5 g, 52.6 mmol, 99%.

R_f-Wert: 0.44 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1, v/v).

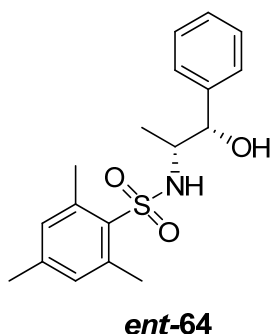
[α]_D²⁰: -12.2° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 120°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.33-7.19 (m, 5H; arom. H), 6.95 (s, 2H; arom. H), 5.06 (d, *J* = 8.30 Hz, 1H; NH), 4.78 (d, *J* = 3.15 Hz, 1H; C1-H), 3.55-3.42 (m, 1H; C2-H), 2.81 (s, 1H; OH), 2.65 (s, 6H; Mes), 2.29 (s, 3H; Mes), 0.86 (d, *J* = 6.83 Hz, 3H; C3-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 142.2 (Aromat), 140.3 (Aromat), 138.9 (Aromat), 134.3 (Aromat), 132.0 (Aromat), 128.3 (Aromat), 127.6 (Aromat), 126.0 (Aromat), 75.7 (C-1), 54.6 (C-2), 22.9 (Mes-*ortho*-CH₃), 20.9 (Mes-*para*-CH₃), 14.5 (C-3).

HR-MS (FAB): ber. für C₁₈H₂₄NO₃S⁺ [M+H]⁺: 334.1471, gef.: 334.1475.

(1*S*,2*R*)-2-(*N*-Mesitylsulfonyl)amin-1-phenyl-1-propanol (*ent*-64):

Das Sulfonamid ***ent*-64** konnte analog zu seinem Enantiomer **64** (s.o.) synthetisiert werden. Ausgehend von (+)-Norephedrin (***ent*-63**, 8.00 g, 52.9 mmol), Mesitylsulfonylchlorid (1 Äq., 11.6 g, 52.9 mmol) und Triethylamin (1.2 Äq., 8.60 ml, 63.5 mmol) wurde es als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 17.5 g, 52.6 mmol, 99%.

***R_f*-Wert:** 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1, v/v).

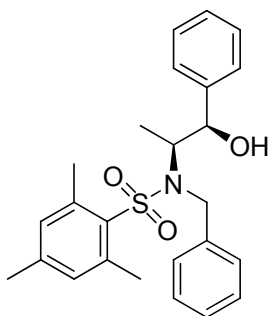
$[\alpha]_D^{20}$: +12.5° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 121°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.33-7.19 (m, 5H; arom. H), 6.95 (s, 2H; arom. H), 5.06 (d, *J* = 8.30 Hz, 1H; NH), 4.78 (d, *J* = 3.15 Hz, 1H; C1-H), 3.55-3.42 (m, 1H; C2-H), 2.81 (s, 1H; OH), 2.65 (s, 6H; Mes), 2.29 (s, 3H; Mes), 0.86 (d, *J* = 6.83 Hz, 3H; C3-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 142.2 (Aromat), 140.3 (Aromat), 138.9 (Aromat), 134.3 (Aromat), 132.0 (Aromat), 128.3 (Aromat), 127.6 (Aromat), 126.0 (Aromat), 75.7 (C-1), 54.6 (C-2), 22.9 (Mes-*ortho*-CH₃), 20.9 (Mes-*para*-CH₃), 14.5 (C-3).

HR-MS (FAB): ber. für C₁₈H₂₄NO₃S⁺ [M+H]⁺: 334.1471, gef.: 334.1475.

(1R,2S)-2-(N-Benzyl-N-mesitylsulfonyl)amin-1-phenyl-1-propanol (65):**65**

Zu **64** (8.0 g, 24.0 mmol) in CH₃CN (100 ml) wurden Benzylbromid (1.2 Äq., 3.44 ml, 28.8 mmol) und CsCO₃ (1.5 Äq., 11.7 g, 36.0 mmol) gegeben und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nachdem die Reaktionsmischung abgekühlt war, wurde filtriert und der Feststoff mit Diethylether (50 ml) gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde entfernt und das Produkt nach Säulenchromatografie als farbloser Feststoff in 79% erhalten. Alternativ konnte das Produkt **65** sauber aus Cyclohexan gefällt werden.

Ausbeute: 8.03 g, 19.0 mmol, 79%.

R_f-Wert: 0.19 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1, v/v).

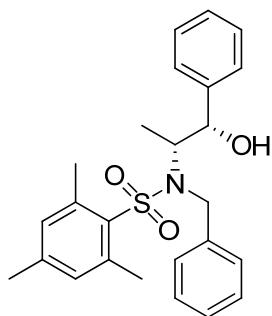
[α]_D²⁰: -6.0° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 121°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.37-7.17 (m, 8H; arom. H), 7.11-7.06 (m, 2H, arom. H), 6.93 (s, 2H; arom. H), 5.00 (bs, 1H; C1-H), 4.78 (d, *J* = 16.02 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.55 (d, *J* = 16.13 Hz, 1H; CH₂Ph), 3.84 (dq, *J* = 7.08, 1.94 Hz, 1H; C2-H), 2.65 (s, 6H; Mes), 2.29 (s, 3H; Mes), 2.11 (m, 1H; OH), 1.04 (d, *J* = 7.09 Hz, 3H; C3-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 142.6 (aromat. C), 142.2 (aromat. C), 140.2 (aromat. C), 138.6 (aromat. C), 133.5 (aromat. C), 132.2 (aromat. C), 128.6 (aromat. C), 128.2 (aromat. C), 127.7 (aromat. C), 127.4 (aromat. C), 127.2 (aromat. C), 125.5 (aromat. C), 59.8 (C2), 49.1 (CH₂Ph), 23.0 (2x Mes), 20.9 (Mes), 9.9 (C3).

HR-MS (ESI): ber. für C₂₅H₃₀NO₃S [M+H]⁺: 424.1941, gef.: 424.1926.

(1*S*,2*R*)-2-(*N*-Benzyl-*N*-mesitylsulfonyl)amin-1-phenyl-1-propanol (*ent*-65):***ent*-65**

Ausgehend von Mesitylsulfonylamid ***ent*-64** (17.0 g, 51.0 mmol) und Benzylbromid (1.2 Äq., 7.31 ml, 61.2 mmol) wurde mit CsCO₃ (1.5 Äq., 24.9 g, 76.5 mmol) das benzylierte Produkt ***ent*-65** analog zu seinem Enantiomer **65** (s.o.) hergestellt. Nach erfolgter Säulenchromatografie wurde ***ent*-65** als farbloser Feststoff erhalten. Alternativ konnte das Produkt sauber aus Cyclohexan gefällt werden.

Ausbeute: 17.1 g, 40.27 mmol, 79%.

***R*_f-Wert:** 0.62 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1, v/v).

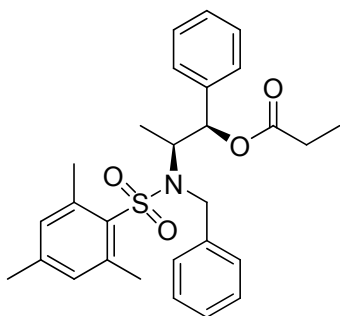
[α]_D²⁰: +6.3° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 123°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.37-7.17 (m, 8H; aromat. H), 7.11-7.06 (m, 2H, aromat. H), 6.93 (s, 2H; aromat. H), 5.00 (bs, 1H; C1-H), 4.78 (d, *J* = 16.02 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.55 (d, *J* = 16.13 Hz, 1H; CH₂Ph), 3.84 (dq, *J* = 7.08, 1.94 Hz, 1H; C2-H), 2.65 (s, 6H; Mes), 2.29 (s, 3H; Mes), 2.11 (m, 1H; OH), 1.04 (d, *J* = 7.09 Hz, 3H; C3-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 142.6 (aromat. C), 142.2 (aromat. C), 140.2 (aromat. C), 138.6 (aromat. C), 133.5 (aromat. C), 132.2 (aromat. C), 128.6 (aromat. C), 128.2 (aromat. C), 127.7 (aromat. C), 127.4 (aromat. C), 127.2 (aromat. C), 125.5 (aromat. C), 59.8 (C2), 49.1 (CH₂Ph), 23.0 (2x Mes), 20.9 (Mes), 9.9 (C3).

HR-MS (ESI): ber. für C₂₅H₃₀NO₃S [M+H]⁺: 424.1941, gef.: 424.1936.

(1*R*,2*S*)-2-(*N*-Benzyl-*N*-mesitylsulfonyl)amin-1-phenyl-1-propyl-propionat (66):**66**

Zum chiralen Auxiliar **65** (8.18 g, 19.3 mmol) in abs. CH₂Cl₂ (80 ml) wurde Pyridin (1.3 Äq., 2.05 ml, 25.1 mmol) und anschließend bei 0°C langsam Propionylchlorid (1.2 Äq., 2.02 ml, 23.2 mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Zugabe von 125 ml Diethylether wurde mit 1M HCl (40 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (40 ml) und ges. NaCl-Lösung (40 ml) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und das farblose Rohprodukt aus Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 16.8 g, 35.02 mmol, 91%.

R_f-Wert: 0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1, v/v).

[α]_D²⁰: +10.7° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 147°C.

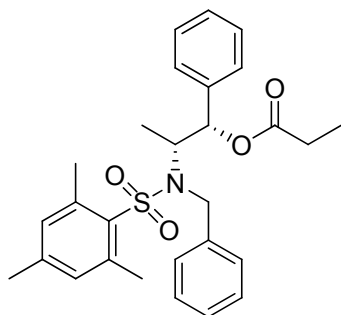
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.25 (m, 8H, arom. H), 6.95-6.85 (m, 4 H; arom. H), 5.85 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H; C1-H), 4.72 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.61 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.06 (dq, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 1H; C2-H), 2.52 (s, 6H; Mes-H₃), 2.28 (s, 3H; Mes-H₃), 2.20 (dq, *J* = 7.6, 16.8 Hz, 1H; C2'b-H₂), 2.12 (dq, *J* = 7.5, 16.8 Hz, 1H; C2'a-H₂), 1.13 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H; C3-H₃), 1.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H; C3'-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.5 (C-1'), 142.5 (aromat. C), 140.2 (2C; arom. C), 138.6 (2C; arom. C), 133.4 (aromat. C), 132.1 (2C; arom. C), 128.4 (2C; arom. C), 128.3 (2C; arom. C), 127.8 (aromat. C), 127.3 (2C; arom. C),

127.1 (aromat. C), 125.9 (2C; aromat. C), 77.9 (C-1), 56.7 (C-2), 48.1 (CH₂Ph), 27.5 (C-2'), 23.0 (Mes), 20.9 (Mes), 12.7 (C-3), 8.8 (C-3').

HR-MS (FAB): ber. für C₂₈H₃₄O₄NS [M+H]⁺: 480.2203, gef.: 480.2247.

(1S,2R)-2-(N-Benzyl-N-mesitylsulfonyl)amin-1-phenyl-1-propyl-propionat
(ent-66):



ent-66

Das acylierte Auxiliar **ent-66** wurde analog zu seinem Enantiomer **66** (s.o.) hergestellt. Aus Alkohol **ent-65** (10.00 g, 23.6 mmol), Pyridin (1.3 Äq., 2.51 ml, 30.7 mmol) und Propionylchlorid (1.2 Äq., 2.47 ml, 28.3 mmol) konnte der Ester **ent-66** nach Umkristallisation aus Diethylether als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 11.0 g, 22.9 mmol, 97%.

R_f-Wert: 0.35 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1, v/v).

[α]_D²⁰: -10.7° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 147°C.

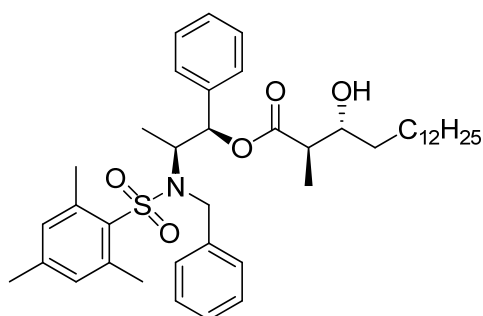
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.25 (m, 8H, aromat. H), 6.95-6.85 (m, 4 H; aromat. H), 5.85 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H; C1-H), 4.72 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.61 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.06 (dq, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 1H; C2-H), 2.52 (s, 6H; Mes-H₃), 2.28 (s, 3H; Mes-H₃), 2.20 (dq, *J* = 7.6, 16.8 Hz, 1H; C2'b-H₂), 2.12 (dq, *J* = 7.5, 16.8 Hz, 1H; C2'a-H₂), 1.13 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H; C3-H₃), 1.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H; C3'-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.5 (C-1'), 142.5 (aromat. C), 140.2 (2C; aromat. C), 138.6 (2C; aromat. C), 133.4 (aromat. C), 132.1 (2C; aromat. C), 128.4

(2C; aromat. C), 128.3 (2C; aromat. C), 127.8 (aromat. C), 127.3 (2C; aromat. C), 127.1 (aromat. C), 125.9 (2C; aromat. C), 77.9 (C-1), 56.7 (C-2), 48.1 (CH₂Ph), 27.5 (C-2'), 23.0 (Mes), 20.9 (Mes), 12.7 (C-3), 8.8 (C-3').

HR-MS (FAB): ber. für C₂₈H₃₄O₄NS [M+H]⁺: 480.2203, gef.: 480.2247.

(2R,3R)-((1R,2S)-2-(N-Benzyl-mesitylsulfonyl)-1-phenylpropyl)3-hydroxy-2-methylhexadecanat (68):



68

Zu einer Lösung von Propionat **66** (1.2 g, 2.5 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (25 ml) wurde NEt₃ (333 µl, 6 mmol) gegeben. Die Lösung wurde auf -78°C gekühlt und eine ebenfalls vorgekühlte Lösung von cHex₂BOTf (1 M in Pentan, 5.0 ml, 5.0 mmol) wurde langsam zugetropft. Nach 2 h bei -78°C wurde Tetradecanal (**51**, 637 mg, 3 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ langsam zugegeben und eine weitere Stunde bei -78°C gerührt. Nach weiteren 1.5 h bei 0°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Phosphatpuffer (pH 7, 10 ml), MeOH (25 ml) und 30%iger H₂O₂-Lösung (25 ml) beendet. Nach 30 min Rühren bei 0°C wurden die organische und wässrige Phase getrennt. Die wässrige Lösung wurde mit Diethylether (3 x 20 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Lösungen wurden mit ges. NaHCO₃ (2 x 20 ml) und ges. NaCl-Lösung (2 x 20 ml) gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatografie (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1) gereinigt. Das Aldoladdukt wurde als farbloses Öl erhalten (dr = 96:4). Nach Trennung der Diastereomere wurde das diastereomerenreine Produkt **68** in 70% erhalten.

Ausbeute: 1.20 g, 1.75 mmol, 70% diastereomerenreines Produkt.

R_f-Wert: 0.38 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: +18.3° (c = 1, CHCl₃).

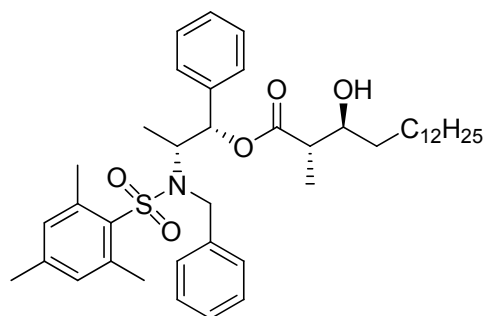
IR (in Substanz): ν = 2926, 2855, 1743, 1606, 1456, 1382, 1324 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.23 (m, 8H; arom. H), 6.91-6.83 (m, 4 H; arom. H), 5.84 (d, J = 4.4 Hz, 1H; C1-H), 5.29 (s, 1H; OH), 4.76 (d, J = 16.5 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.54 (d, J = 16.5 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.13 (dq, J = 7.0, 4.42 Hz, 1H; C2-H), 3.62 (t, J = 6.8 Hz, 1H; C3'-H), 2.49 (m, 7H; C2'-H, 2x Mes-H₃), 2.28 (s, 3H; Mes-H₃), 1.52-1.39 (m, 2H; C4'-H₂), 1.35-1.22 (m, 22H; 11x CH₂), 1.18 (d, J = 7.0 Hz, 3H; C3-H₃), 1.13 (d, J = 7.2 Hz, 3H; C1''-H₃), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H; C16'-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 174.8 (C-1'), 142.8 (aromat. C), 140.5 (2C; aromat. C), 138.7 (aromat. C), 138.4 (aromat. C), 133.6 (aromat. C), 132.3 (2C; aromat. C), 128.6 (2C; aromat. C), 128.5 (2C; aromat. C), 128.2 (aromat. C), 127.9 (2C; aromat. C), 127.4 (aromat. C), 126.2 (2C; aromat. C), 78.4 (C-1), 73.4 (C-3'), 56.9 (C-2), 48.5 (CH₂Ph), 45.7 (C-2'), 34.7 (C-14'), 32.1 (C-chain), 29.9 (6C; C-chain), 29.8 (C-chain), 29.6 (C-chain), 25.6 (C-4'), 23.1 (2C; 2x Mes), 22.9 (C-15'), 21.1 (Mes), 14.3 (2C; C-16', C-1''), 13.7 (C-3).

HR-MS (FAB): ber. für C₂₇H₄₄NO₄ [M+H]⁺: 446.3265, gef. 446.3265.

(2S,3S)-((1S,2R)-2-(N-Benzyl-mesitylsulfonyl)-1-phenylpropyl)3-hydroxy-2-methylhexadecanat (*ent*-68):



***ent*-68**

Zu einer Lösung von (2S,3S)-((1S,2R)-2-(N-Benzyl-mesitylsulfonyl)-1-phenylpropyl)propionat (*ent*-66, 2.43 g, 5.07 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (50 ml) wurde NEt₃ (666 μ l, 12 mmol) gegeben. Die Lösung wurde auf -78°C gekühlt und eine ebenfalls vorgekühlte Lösung von cHex₂BOTf (1 M in Pentan, 10.0 ml, 10.0 mmol)

wurde langsam zugetropft. Nach 2 h bei -78°C wurde Tetradecanal (**51**, 1.27 g, 6 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 langsam zugegeben und eine weitere Stunde bei -78°C gerührt. Nach weiteren 1.5 h bei 0°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Phosphatpuffer (pH 7, 20 ml), MeOH (50 ml) und 30%iger H_2O_2 -Lösung (50 ml) gequenchet. Nach 30 min Rühren bei 0°C wurden die organische und wässrige Phase getrennt. Die wässrige Lösung wurde mit Diethylether (3 x 40 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Lösungen wurden mit ges. NaHCO_3 (2 x 40 ml) und ges. NaCl -Lösung (2 x 40 ml) gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatografie (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1) gereinigt. Das Aldoladdukt wurde als farbloses Öl erhalten (dr = 96:4). Nach Trennung der Diastereomere wurde das diastereomerenreine Produkt **ent-68** in 73% erhalten.

Ausbeute: 2.54 g, 3.70 mmol, 73% diastereomerenreines Produkt.

R_f-Wert: 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

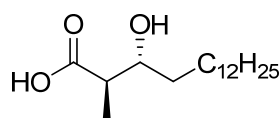
$[\alpha]_D^{20}$: -18.3° ($c = 1$, CHCl_3).

IR (in Substanz): $\nu = 2926, 2855, 1743, 1606, 1456, 1382, 1324 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.23 (m, 8H; arom. H), 6.91-6.83 (m, 4 H; arom. H), 5.84 (d, $J = 4.4 \text{ Hz}$, 1H; C1-H), 5.29 (s, 1H; OH), 4.76 (d, $J = 16.5 \text{ Hz}$, 1H; CH_2Ph), 4.54 (d, $J = 16.5 \text{ Hz}$, 1H; CH_2Ph), 4.13 (dq, $J = 7.0, 4.42 \text{ Hz}$, 1H; C2-H), 3.62 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H; C3'-H), 2.49 (m, 7H; C2'-H, 2x Mes-H₃), 2.28 (s, 3H; Mes-H₃), 1.52-1.39 (m, 2H; C4'-H₂), 1.35-1.22 (m, 22H; 11x CH₂), 1.18 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H; C3-H₃), 1.13 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 3H; C1''-H₃), 0.88 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H; C16'-H₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 174.8 (C-1'), 142.8 (aromat. C), 140.5 (2C; aromat. C), 138.7 (aromat. C), 138.4 (aromat. C), 133.6 (aromat. C), 132.3 (2C; aromat. C), 128.6 (2C; aromat. C), 128.5 (2C; aromat. C), 128.2 (aromat. C), 127.9 (2C; aromat. C), 127.4 (aromat. C), 126.2 (2C; aromat. C), 78.4 (C-1), 73.4 (C-3'), 56.9 (C-2), 48.5 (CH_2Ph), 45.7 (C-2'), 34.7 (C-14'), 32.1 (C-chain), 29.9 (6C; C-chain), 29.8 (C-chain), 29.6 (C-chain), 25.6 (C-4'), 23.1 (2C; 2x Mes), 22.9 (C-15'), 21.1 (Mes), 14.3 (2C; C-16', C-1''), 13.7 (C-3).

HR-MS (FAB): ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 446.3265, gef.: 446.3265.

(2R,3R)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (52):**52**

Zu einer Lösung des *anti*-Aldolprodukts **68** (2.88 g, 4.16 mmol) in THF (14 ml) wurde bei 0°C langsam 30%ige H₂O₂-Lösung (944 mg, 8.32 mmol) getropft. Anschließend wurde *n*Bu₄NOH-Lösung (40% in H₂O, 2.42 ml, 8.32 mmol) zugegeben und für 14 h bei Rt gerührt. Dann wurde die Reaktion mit 1.6 M Na₂SO₃-Lösung abgebrochen und eine weitere Stunde bei Rt gerührt. Nachdem das THF entfernt worden war, wurde die verbleibende Lösung mit 1M HCl auf pH 2 gebracht. Die Lösung wurde mit Diethylether (4 x 20 ml) extrahiert und die vereinten organischen Lösungen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vacuum entfernt. Säulenchromatografische Aufreinigung (CH₂Cl₂/MeOH 20:1) lieferte β -Hydroxysäure **52** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 980 mg, 3.42 mmol, 84%.

R_f-Wert: 0.36 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1, v/v).

[α]_D²⁰: +2.4° (c = 1, CHCl₃).

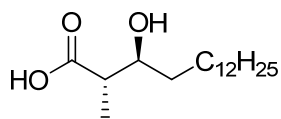
Schmp.: 44°C.

IR (in Substanz): ν = 3257, 2946, 2915, 2849, 1707, 1470 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.63 (m, 1H; C3-H), 2.49 (dq, *J* = 7.0, 7.0 Hz, 1H; C2-H), 1.59-1.30 (m, 4H; 2x CH₂), 1.29-1.15 (m, 23H; C1'-H₃, 10x CH₂), 0.81 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; C16-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 180.9 (C-1), 73.3 (C-3), 45.2 (C-2), 34.6 (C-14), 31.9 (C-chain), 29.7 (C-chain), 29.6 (C-chain), 29.5 (C-chain), 29.4 (C-chain), 25.4 (C-4), 22.7 (C-15), 14.2 (C-16), 14.1 (C-1').

HR-MS (ESI): ber. für C₁₇H₃₅O₃⁺ [M+H]⁺: 287.2581, gef. 287.2581.

(2S,3S)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (ent-52):**ent-52**

Zu einer Lösung des *anti*-Aldolprodukts **ent-68** (2.90 g, 4.19 mmol) in THF (14 ml) wurde bei 0°C langsam 30%ige H₂O₂-Lösung (944 mg, 8.32 mmol) getropft. Anschließend wurde *n*Bu₄NOH-Lösung (40% in H₂O, 2.42 ml, 8.32 mmol) zugegeben und für 14 h bei Rt gerührt. Dann wurde die Reaktion mit 1.6 M Na₂SO₃-Lösung abgebrochen und eine weitere Stunde bei Rt gerührt. Nachdem das THF entfernt worden war, wurde die verbleibende Lösung mit 1M HCl auf pH 2 gebracht. Die Lösung wurde mit Diethylether (4 x 20 ml) extrahiert und die vereinten organischen Lösungen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatografische Reinigung (CH₂Cl₂/MeOH 20:1) lieferte β -Hydroxysäure **ent-52** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 1.03 mg, 3.60 mmol, 86%.

R_f-Wert: 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1, v/v).

[α]_D²⁰: -2.7° (c = 1, CHCl₃).

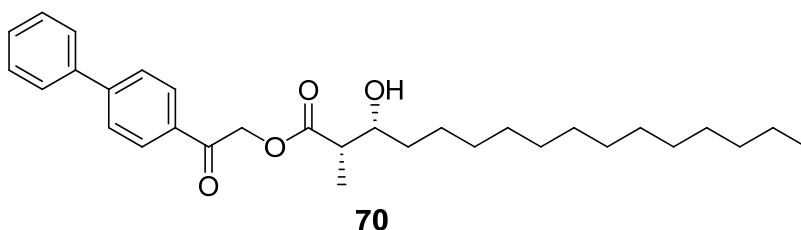
Schmp.: 43°C.

IR (in Substanz): ν = 3258, 2946, 2914, 2849, 1707, 1470 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.63 (m, 1H; C3-H), 2.49 (dq, *J* = 7.0, 7.0 Hz, 1H; C2-H), 1.59-1.30 (m, 4H; 2x CH₂), 1.29-1.15 (m, 23H; C1'-H₃, 10x CH₂), 0.81 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; C16-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 180.9 (C-1), 73.3 (C-3), 45.2 (C-2), 34.6 (C-14), 31.9 (C-chain), 29.7 (C-chain), 29.6 (C-chain), 29.5 (C-chain), 29.4 (C-chain), 25.4 (C-4), 22.7 (C-15), 14.2 (C-16), 14.1 (C-1').

HR-MS (ESI): ber. für C₁₇H₃₅O₃⁺ [M+H]⁺: 287.2581, gef. 287.2581.

(2S,3R)-(pPhenylacetophenon)-3-hydroxy-2-methylhexadecansäureester (70):

2-Brom-4'-phenylacetophenon (1.2 Äq., 115 mg, 0.419 mmol) wurde in Ethylacetat (15 ml) gelöst. Bei 0°C wurden dann β -Hydroxysäure **49** (100 mg, 0.349 mmol) und NEt_3 (2 Äq., 73 μl , 0.524 mmol) zugegeben. Anschließend wurde 14 h bei 45°C gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Die Filtrate wurden mit ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen, die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der entstandene gelbe Feststoff wurde mit Cyclohexan/Ethylacetat (5:1) kurz über Kieselgel (8 g) filtriert und das Lösungsmittel wurde erneut entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 161 mg, 0.335 mmol, 96%.

R_f -Wert: 0.29 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: +24.7° ($c = 1$, CHCl_3).

IR (in Substanz): $\nu = 3562, 2928, 2855, 1733, 1602, 1462, 1412 \text{ cm}^{-1}$.

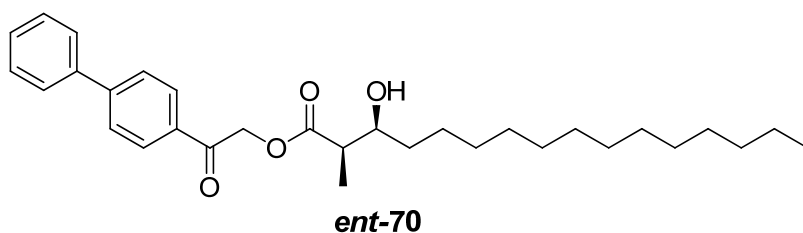
HPLC (IA-10): $t_R = 23.4 \text{ min}$; 99% ee.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.00 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, C4"-H), 7.72 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, C5"), 7.65-7.61 (m, 2H, C8"), 7.48 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, C9"), 7.43 (d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 1H, C10"), 5.59 (d, $J = 16.4 \text{ Hz}$, 1H, C1"a), 5.33 (d, $J = 16.4 \text{ Hz}$, 1H, C1"b), 4.14 (ddd, $J = 8.5, 4.3, 3.3 \text{ Hz}$, 1H, C3-H), 2.77 (dq, $J = 7.1, 3.1 \text{ Hz}$, 1H, C2-H), 1.68-1.50 (m, 2H, C4), 1.38-1.26 (m, 22H, CKette), 1.25 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, C2'), 0.88 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, C16).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 192.5 (C-2"), 175.0 (C-1), 146.9 (C-6"), 139.5 (C-7"), 132.5 (C-3"), 129.0 (Caromat), 128.5 (C-10", C-aromat), 127.5 (C-aromat), 127.3 (C-aromat), 72.1 (C-3), 65.8 (C-1"), 44.7 (C-2), 33.5 (C-Kette), 31.9 (C-Kette), 29.7 (4 C-Kette), 29.6 (2 C-Kette), 29.4 (C-Kette), 26.9 (C-Kette), 26.3 (C-4), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16), 9.5 (C-2').

HR-MS (ESI): ber. für $C_{17}H_{35}O_3^+$ $[M+H]^+$: 481.3312, gef. 481.3315.

(2*R*,3*S*)-(pPhenylacetophenon)-3-hydroxy-2-methylhexadecansäureester
(ent-70):



Der Ester **ent-70** wurde aus 2-Brom-4'-phenylacetophenon (1.2 Äq., 117 mg, 0.426 mmol) und β -Hydroxysäure **ent-49** (102 mg, 0.355 mmol) hergestellt und konnte als farbloser Feststoff isoliert werden. Auf einer chiralen HPLC-Säule (IA) konnte die Enantiomerenreinheit überprüft werden.

Ausbeute: 162 mg, 0.337 mmol, 95%.

R_f -Wert: 0.27 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -24.6° ($c = 1$, $CHCl_3$).

IR (in Substanz): $\nu = 3561, 2927, 2856, 1732, 1601, 1461, 1412 \text{ cm}^{-1}$.

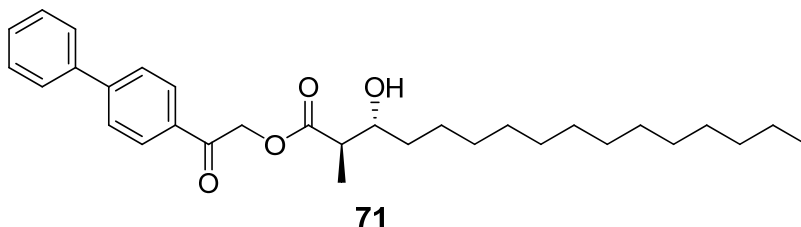
HPLC (IA-10): $t_R = 26.0 \text{ min}$; 90% ee.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.00 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, C4"-H), 7.72 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, C5"), 7.65-7.61 (m, 2H, C8"), 7.48 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, C9"), 7.43 (d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 1H, C10"), 5.59 (d, $J = 16.4 \text{ Hz}$, 1H, C1"a), 5.33 (d, $J = 16.4 \text{ Hz}$, 1H, C1"b), 4.14 (ddd, $J = 8.5, 4.3, 3.3 \text{ Hz}$, 1H, C3-H), 2.77 (dq, $J = 7.1, 3.1 \text{ Hz}$, 1H, C2-H), 1.68-1.50 (m, 2H, C4), 1.38-1.26 (m, 22H, Kette), 1.25 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, C2'), 0.88 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, C16).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 192.5 (C-2"), 175.0 (C-1), 146.9 (C-6"), 139.5 (C-7"), 132.5 (C-3"), 129.0 (C-Aromat), 128.5 (C-10", C-Aromat), 127.5 (C-Aromat), 127.3 (C-Aromat), 72.1 (C-3), 65.8 (C-1"), 44.7 (C-2), 33.5 (C-Kette), 31.9 (C-Kette), 29.7 (4 C-Kette), 29.6 (2 C-Kette), 29.4 (C-Kette), 26.9 (C-Kette), 26.3 (C-4), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16), 9.5 (C-2').

HR-MS (ESI): ber. für $C_{17}H_{35}O_3^+$ $[M+H]^+$: 481.3312, gef. 481.3315.

(2*R*,3*R*)-(pPhenylacetophenon)-3-hydroxy-2-methylhexadecansäureester (71):



2-Brom-4'-phenylacetophenon (1.2 Äq., 115 mg, 0.419 mmol) wurde in Ethylacetat (15 ml) gelöst. Bei 0°C wurden dann β -Hydroxysäure **52** (100 mg, 0.349 mmol) und NEt_3 (2 Äq., 73 μ l, 0.524 mmol) zugegeben. Anschließend wurde 14 h bei 45°C gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Daraufhin wurden die Filtrate mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung und ges. $NaCl$ -Lösung gewaschen, die organische Phase mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der entstandene gelbe Feststoff wurde mit Cyclohexan/Ethylacetat (5:1) kurz über Kieselgel (8 g) filtriert und das Lösungsmittel wurde erneut entfernt. Das Produkt **71** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 161 mg, 0.335 mmol, 96%.

R_f -Wert: 0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: +1.6° ($c=1$, $CHCl_3$).

IR (in Substanz): $\nu = 3365, 2924, 2857, 2360, 1738, 1605, 1461\text{ cm}^{-1}$.

HPLC (IA-10): $t_R = 24.0\text{ min}$, 94% ee.

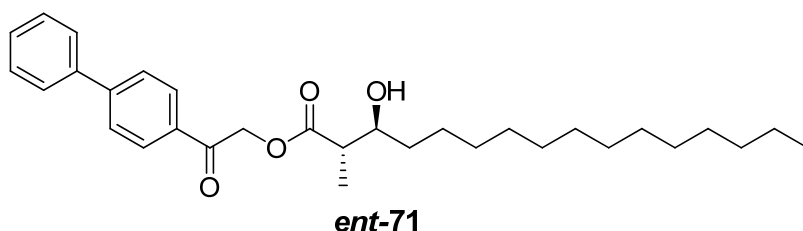
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.00 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 2H, C4"-H), 7.72 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 2H, C5"-H), 7.63 (d, $J = 7.1\text{ Hz}$, 2H, C8"-H), 7.48 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2H, C9"-H), 7.45-7.39 (m, 1H, C10"-H), 5.53 (d, $J = 16.4\text{ Hz}$, 1H, C1"a-H₂), 5.39 (d, $J = 16.4\text{ Hz}$, 1H, C1"b-H₂), 3.77 (dt, $J = 7.8, 7.4, 3.3\text{ Hz}$, 1H, C3-H), 2.71 (dq, $J = 7.1, 7.1\text{ Hz}$, 1H, C2-H), 1.71-1.40 (m, 4H, C4-H₂, CH₂), 1.28 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 3H, C2'-H₃), 1.27-1.24 (m, 20H, Kette-H₂), 0.88 (t, $J = 6.8\text{ Hz}$, 3H, C16-H₃).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 192.5 (C-2"), 174.9 (C-1), 146.9 (C-6"), 139.5 (C-7"), 132.5 (C-3"), 129.0 (C-Aromat), 128.5 (C-10", C-Aromat), 127.5 (C-Aromat),

127.3 (C-Aromat), 73.7 (C-3), 65.8 (C-1^{''}), 46.3 (C-2), 34.4 (C-Kette), 31.9 (C-Kette), 29.9 (C-Kette), 29.6 (C-Kette), 29.4 (C-Kette), 25.5 (C-4), 22.7 (C-15), 14.2 (C-2'), 14.1 (C-16).

HR-MS (ESI): ber. für C₁₇H₃₅O₃⁺ [M+H]⁺: 481.3312, gef. 481.3315.

**(2S,3S)-(pPhenylacetophenon)-3-hydroxy-2-methylhexadecansäureester
(ent-71)**



Der Ester **ent-71** wurde aus 2-Brom-4'-phenylacetophenon (1.2 Äq., 69 mg, 0.251 mmol) und β -Hydroxysäure **ent-52** (60 mg, 0.209 mmol) hergestellt. Er konnte als farbloser Feststoff isoliert werden und zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit auf einer chiralen HPLC-Säule (IA) analysiert werden.

Ausbeute: 94.6 mg, 0.197 mmol, 94%.

R_f-Wert: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1, v/v).

[α]_D²⁰: -1.7° (c = 1, CHCl₃).

IR (in Substanz): ν = 3365, 2943, 2857, 2361, 1737, 1604, 1462 cm⁻¹.

HPLC (IA-10): t_R = 28.5 min, 94% ee.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.99 (d, J = 8.5 Hz, 2H, C4^{''}-H), 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 2H, C5^{''}-H), 7.62 (d, J = 7.0 Hz, 2H, C8^{''}-H), 7.51-7.37 (m, 3H, C9^{''}-H), 5.53 (d, J = 16.4 Hz, 1H, C1^{''}a-H₂), 5.39 (d, J = 16.4 Hz, 1H, C1^{''}b-H₂), 3.78 (dt, J = 7.9, 7.6, 3.2 Hz, 1H, C3-H), 2.71 (dq, J = 7.1, 7.1 Hz, 1H, C2-H), 1.72-1.39 (m, 4H, C4-H₂, CH₂), 1.39-1.15 (m, 23H, C2'-H₃, CKette-H₂), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, C16-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 192.5 (C-2^{''}), 174.9 (C-1), 146.9 (C-6^{''}), 139.5 (C-7^{''}), 132.5 (C-3^{''}), 129.0 (C-aromat), 128.5 (C-10^{''}, C-aromat), 127.5 (C-aromat), 127.3 (C-aromat), 73.7 (C-3), 65.8 (C-1^{''}), 46.3 (C-2), 34.4 (C-Kette), 31.9 (C-Kette),

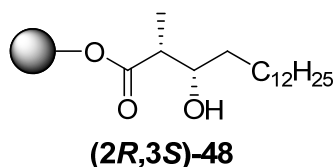
29.9 (C-Kette), 29.6 (C-Kette), 29.4 (C-Kette), 25.5 (C-4), 22.7 (C-15), 14.2 (C-2'), 14.1 (C-16).

HR-MS (ESI): ber. für $C_{17}H_{35}O_3^+$ $[M+H]^+$: 481.3312, gef. 481.3315.

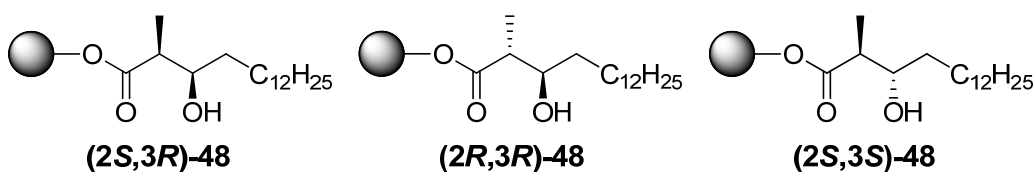
6.1.3 Immobilisierung und Veresterung an fester Phase

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Immobilisierung der 3-Hydroxy-2-methylhexadecansäuren



In einem Spritzenreaktor wurde 2-Chlorotriylchlorid-Harz (1.4 mmol g^{-1} , 1.85 g, 2.59 mmol) für 10 min in trockenem CH_2Cl_2 (10 ml) gequollen und das Lösungsmittel anschließend wieder abgelassen. Daraufhin wurden (2S,3R)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (**ent-49**, 965 mg, 3.37 mmol) und DIPEA (2.23 ml, 13.5 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (10 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2.5 h bei Rt geschüttelt. Dann wurde das Harz mit CH_2Cl_2 (3 x 10 ml), CH_2Cl_2 /MeOH/DIPEA (17:2:1, 3 x 10 ml), CH_2Cl_2 (3 x 10 ml), MeOH (3 x 10 ml) und CH_2Cl_2 (4 x 10 ml) gewaschen und anschließend über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Immobilisierung wurde die Massendifferenz des Harzes vor und nach der Beladung bestimmt. Desweiteren wurde eine Testabspaltung durchgeführt. Hierzu wurde 2 x 30 min lang TFA (10% in CH_2Cl_2 , je 10 ml) zum Harz gegeben. Anschließend wurde dieses mit CH_2Cl_2 (5 x 8 ml) gewaschen, mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Beide Verfahren zeigten eine quantitative Beladung (1.04 mmol g^{-1}) des Chlorotriylharzes mit (2S,3R)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure (**(2S,3R)-48**).



Auch 3-Hydroxy-2-methylhexadecansäuren **49**, **52** und **ent-52** konnten nach dem gleichen Verfahren quantitativ an 2-Chlorotriylchlorid-Harz (1.4 mmol g^{-1}) gebunden werden und lieferten die immobilisierten Alkohole **(2R,3S)-48**, **(2R,3R)-48** und **(2S,3S)-48** (1.04 mmol g^{-1}).

Fmoc-Test

Zur quantitativen Bestimmung der Harzbeladung nach Kupplung einer Fmoc-Aminosäure wurde sorgfältig gewaschenes Harz über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden 5 mg des trockenen Harzes 30 min in 4 ml DMF suspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Piperidin wurde 30 min vorsichtig geschüttelt. Dann wurde 1 ml der Reaktionslösung mit 2 ml DMF/Piperidin (4:1) in eine Küvette gefüllt. Für den Nullabgleich wurde eine Küvette mit 3 ml DMF/Piperidin (4:1) vorbereitet. Nach Messung der Absorption bei 301 nm wurde die Beladung (c_B in mmol/g) mittels folgender Formel berechnet:

$$c_B = \frac{Abs \cdot V \cdot 1000}{\varepsilon \cdot d \cdot m} = \frac{Abs}{m} \cdot 1.923 \mu\text{mol}$$

Formel 7: c_B = Beladung in mmol/g; Abs = Absorption bei 301 nm; V = Volumen in ml; ε = Extinktionskoeffizient in $\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; d = Weglänge in cm; m = Harzmenge in mg.

Um die Ausbeute der Reaktion zu berechnen wurde zusätzlich die theoretische Beladung ($c_B(\text{neu})$ in mmol/g) berechnet:

$$c_B(\text{neu}) = \frac{c_B(\text{alt})}{1 + c_B(\text{alt}) \left(\frac{MW(\text{neu}) - MW(\text{alt})}{1000} \right)}$$

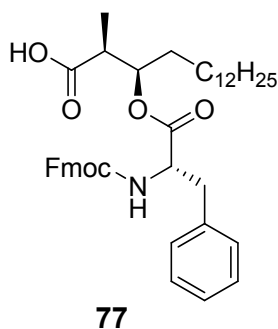
Formel 8: c_B = Beladung in mmol/g; MW = Molekulargewicht in g/mol.

Kaiser-Test

Die Vollständigkeit einer Peptidkupplung wurde durch die Reaktion freier Amingruppen mit Ninhydrin überprüft. Hierzu wurden wenige Harzkügelchen mit Ethanol gewaschen und anschließend mit zwei Tropfen Ninhydrinlösung (250 mg Ninhydrin in 5 ml Ethanol) und zwei Tropfen KCN-Lösung (2% einer 10 mM wässrigen KCN-Lösung in Pyridin) versetzt. Entstand nach vorsichtigem Erhitzen auf ca. 120°C eine Blaufärbung des Harzes, so lagen noch freie Aminogruppen vor und die Aminosäurekupplung wurde wiederholt. Blieben die Harzkügelchen gelb, so lag eine

vollständige Reaktion vor. Zu jedem Kaiser-Test wurde zur Kontrolle eine Positiv-Probe mit freier Aminogruppe durchgeführt.

Veresterungen der immobilisierten (2S,3R)-3-Hydroxy-2-methylhexadecansäure mit Fmoc-Phe-OH



A) Erste Veresterung mit DIC/DMAP bzw. DIC/Collidin bzw. DIC/Imidazol

Das Harz (**2R,3S**)-**48** (1 Äq., 41.2 mg, 42.8 μmol) wurde 15 min in einem Spritzenreaktor mit CH_2Cl_2 vorgequollen, während Fmoc-Phe-OH (5 Äq., 83 mg, 214 μmol) und DIC (5.5 Äq., 37 μl , 236 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (10:2, 1.5 ml) gelöst wurde. Nach Zugabe von DMAP (0.5 Äq., 3 mg, 21 μmol) wurde die Lösung zum Harz gegeben und 14 h bei Rt geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}/\text{DIPEA}$ (17:2:1), CH_2Cl_2 (4 x), DMF (4 x), MeOH (4 x) und CH_2Cl_2 (5 x) gewaschen. Als Kontrolle wurde dieses Experiment mit Fmoc-D-Phe-OH wiederholt. Zur Überprüfung des Epimerisierungsgrades wurde der Ester **77** mit TFA/ CH_2Cl_2 (1:1, 2 x 40 min, je 1.5 ml) vom Harz gespalten. Nach Filtration wurde das Harz mit CH_2Cl_2 gewaschen und das Lösungsmittel entfernt.

Beladung: 0.74 mmol/g (theoretische Beladung: 0.75 mmol/g).

Ausbeute: 99% (Fmoc-Bestimmung, s.o.).

dr: 3:1 (OD-H, 17% *i*-Propanol in *n*-Hexan, isochratisch).

Weitere Versuche mit 10 Äq. Collidin oder 10 Äq. Imidazol anstelle der 0.5 Äq. DMAP wurde durchgeführt, jedoch wurde keinerlei Umsatz beobachtet.

B) Optimierte Veresterung mit DIC/DMAP

In einem Glaskolben wurde das Harz **(2R,3S)-48** (1 Äq., 41.2 mg, 42.8 μmol) 15 min in CH_2Cl_2 vorgequollen, während Fmoc-Phe-OH (5 Äq., 83 mg, 214 μmol) und DIC (5.5 Äq., 37 μl , 236 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (2:1, 1.5 ml) gelöst wurden und dann auf 0°C gekühlt wurden. Nach Zugabe von DMAP (0.3 Äq., 1.8 mg, 12.6 μmol) wurde die Lösung zum Harz gegeben und 3 h bei 0°C und anschließend 1.5 h bei Rt geschüttelt. Dann wurde das Harz mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}/\text{DIPEA}$ (17:2:1), CH_2Cl_2 (4 x), DMF (4 x), MeOH (4 x) und CH_2Cl_2 (5 x) gewaschen.

Zur Überprüfung des Epimerisierungsgrades wurde der Ester **77** mit TFA/ CH_2Cl_2 (1:1, 2 x 40 min, je 1.5 ml) vom Harz gespalten. Nach Filtration wurde das Harz gut mit CH_2Cl_2 gewaschen und das Lösungsmittel entfernt.

Beladung: 0.68 mmol/g (theoretische Beladung: 0.75 mmol/g).

Ausbeute: 90% (Fmoc-Bestimmung, s.o.).

dr: 9:1 (OD-H, 17% *i*-Propanol in *n*-Hexan, isochratisch).

Weitere Versuche wurden mit EDC anstelle des DICs durchgeführt und lieferten die gleichen Ergebnisse.

C) Optimierte Veresterung unter Yamaguchi Bedingungen

Das Harz **(2R,3S)-48** (41.7 mg, 43.4 μmol OH) wurde in THF 10 min quellen gelassen. Anschließend wurde Fmoc-Phe-OH (6.4 Äq., 108 mg, 278 μmol) in THF/Toluol (1:1, 1 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde dann NEt_3 (9 Äq., 55 μl , 390 μmol) und Trichlorbenzoylchlorid (9 Äq., 61 μl , 390 μmol) zugegeben und die Lösung 15 min gerührt. Anschließend wurde diese Lösung bei 0°C mit DMAP (0.5 Äq., 2.7 mg, 22 μmol) zum immobilisierten Alkohol **(2R,3S)-48** gegeben und für 4 h geschüttelt. Das Harz wurde mit DMF (5 x), CH_2Cl_2 (5 x), MeOH (5 x) und CH_2Cl_2 (5 x) gewaschen.

Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt. Zur Überprüfung des Epimerisierungsgrades wurde der Ester **77** mit TFA/ CH_2Cl_2 (1:1, 2 x 40 min, je 1.5 ml) vom Harz gespalten. Nach Filtration wurde das Harz gut mit CH_2Cl_2 gewaschen und das Lösungsmittel entfernt.

Beladung: 0.67 mmol/g (theoretische Beladung: 0.75 mmol/g).

Ausbeute: 89% (Fmoc-Test, s.o.).

dr: 9:1 (OD-H, 17% *i*-Propanol in *n*-Hexan, isochratisch).

D) Veresterung unter Mitsunobu Bedingungen

Zu einer Lösung aus Fmoc-Phe-OH (4 Äq., 70 mg, 181 μmol) in trockenem THF (1.5 ml) wurde PPh_3 (5 Äq., 59 mg, 226 μmol) gegeben. Diese Lösung wurde zu vorgequollenem Harz **(2R,3S)-48** (1 Äq., 43.4 mg, 45.1 μmol) gegeben. Anschließend wurde DIAD (5 Äq., 44 μl , 226 μmol) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Rt in einem Spritzenreaktor geschüttelt. Das Harz wurde mit THF (6 x), CH_2Cl_2 (3 x), MeOH (3 x), CH_2Cl_2 (3 x) gewaschen.

Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt.

Beladung: 0 mmol/g (theoretische Beladung: 0.75 mmol/g).

Ausbeute: 0%.

E) Veresterung mit PyBrOP/DMAP

Der immobilisierte Alkohol **(2R,3S)-48** (30 mg, 0.031 mmol) wurde für 10 min in CH_2Cl_2 quellen gelassen. Währenddessen wurden Fmoc-Phe-OH (5 Äq., 60 mg, 0.155 mmol) und DIPEA (10 Äq., 48 μl , 0.310 mmol) bei 0°C in CH_2Cl_2 (1 ml) gelöst und anschließend PyBrOP (5 Äq., 72 mg, 0.155 mmol) und DMAP (0.2 Äq., 0.8 mg, 6 μmol) zugegeben. Diese Lösung wurde daraufhin bei 0°C zum gequollenen Harz gegeben und 2 h bei dieser Temperatur und anschließend 14 bei Rt geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (5 x), CH_2Cl_2 (5 x), MeOH (5 x) und CH_2Cl_2 (5 x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt. Es konnte jedoch nur wenig Veresterung beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde auf die Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses verzichtet.

Beladung: 0.02 mmol/g (theoretische Beladung: 0.75 mmol/g).

Ausbeute: 2%.

F) Veresterung mit MSNT/Melm

Der immobilisierte Alkohol **(2R,3S)-48** (30 mg, 0.031 mmol) wurde für 10 min in CH_2Cl_2 quellen gelassen. Währenddessen wurden Fmoc-Phe-OH (5 Äq., 60 mg, 0.155 mmol) und Melm (3.75 Äq., 9.3 μl , 0.116 mmol) in CH_2Cl_2 (1 ml) gelöst und anschließend MSNT (5 Äq., 46 mg, 0.155 mmol) zugegeben. Diese Lösung wurde daraufhin zum gequollenen Harz gegeben und 8 h bei Rt geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (5 x), CH_2Cl_2 (5 x), MeOH (5 x) und CH_2Cl_2 (5 x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

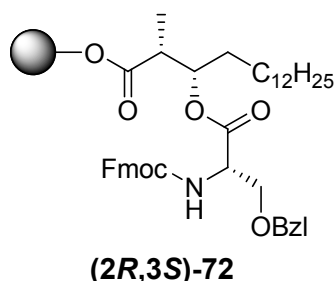
Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt. Es konnte jedoch nahezu keinerlei Veresterung beobachtet werden, woraufhin eine Überprüfung des Diastereomerenverhältnisses verzichtet wurde.

Beladung: 0.08 mmol/g (theoretische Beladung: 0.75 mmol/g).

Ausbeute: 10%.

Ergebnisse der optimierten Veresterungsbedingungen:

Veresterung mit Fmoc-Ser(OBzl)-OH



In einem Glaskolben wurde das Harz **(2R,3S)-48** (1 Äq., 41.2 mg, 42.8 μmol) 15 min in CH_2Cl_2 vorgequollen, während Fmoc-Ser(OBzl)-OH (5 Äq., 83 mg, 214 μmol) und DIC (5.5 Äq., 37 μl , 236 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (2:1, 1.5 ml) gelöst wurden und dann auf 0°C gekühlt wurden. Nach Zugabe von DMAP (0.3 Äq., 1.6 mg, 12.8 μmol) wurde die Lösung zum Harz gegeben und 3 h bei 0°C und anschließend 1.5 h bei Rt geschüttelt. Dann wurde das Harz mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}/\text{DIPEA}$ (17:2:1), CH_2Cl_2 (4x), DMF (4x), MeOH (4x) und CH_2Cl_2 (5x) gewaschen.

Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt. Zur Überprüfung des Grads der Epimerisierung wurde der Ester **(2R,3S)-75** mit TFA/ CH_2Cl_2 (1:1, 2 x 1.5 ml, je 40 min) vom Harz gespalten. Nach Filtration wurde das Harz gut mit CH_2Cl_2 gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses wurde eine chirale HPLC verwendet.

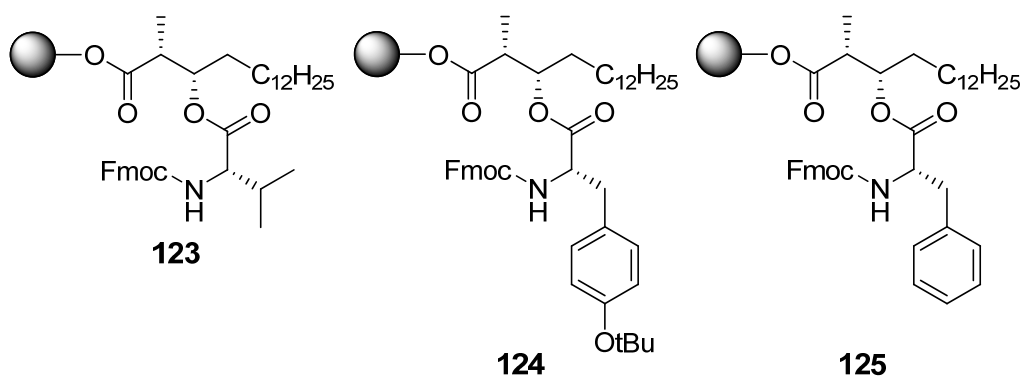
Beladung: 0.65 mmol/g (theoretische Beladung: 0.73 mmol/g).

Ausbeute: 89%.

dr: 8:1 (OD-H, 17% *i*-Propanol in *n*-Hexan, isochratisch).

R_f -Wert: 0.58 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1, v/v).

Veresterung mit anderen Aminosäuren



In einem Glaskolben wurde das Harz (**2R,3S**)-**48** (1 Äq., 50.0 mg, 51.8 μmol) 15 min in CH_2Cl_2 vorgequollen, während die geschützte Aminosäure (5 Äq., 259 μmol) mit DIC (5 Äq., 40 μl , 259 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (2:1, 2 ml) gelöst und dann auf 0°C gekühlt wurde. Nach Zugabe von DMAP (0.3 Äq., 1.8 mg, 12.6 μmol) wurde die Lösung zum Harz gegeben und 3 h bei 0°C und anschließend 1.5 h bei Rt geschüttelt. Dann wurde das Harz mit DMF (17:2:1), CH_2Cl_2 (4 x), DMF (4 x), MeOH (4 x) und CH_2Cl_2 (5 x) gewaschen. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt.

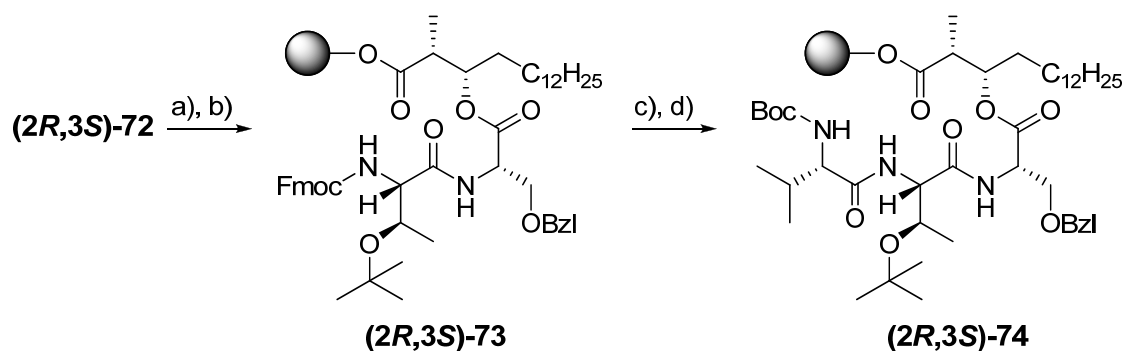
Kupplungs-Ausbeuten:

mit Fmoc-Val-OH	92%.
mit Fmoc-Tyr(OtBu)-OH	89%.
mit Fmoc-Phe-OH	90%.

6.1.4 Versuche zur Peptidsynthese an fester Phase

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Festphasenpeptidsynthese der immobilisierten Depsipeptide 74



- a) Zur Fmoc-Entschützung wurde das Harz **72** im Spritzenreaktor zweimal für 15 min mit Piperidin (20% in DMF, 10 ml/g Harz) geschüttelt. Anschließend wurde es mit DMF (4 x 10 ml) und CH₂Cl₂ (4 x 10 ml) gewaschen.
- b) Für die erste Peptidkupplung wurde eine Lösung aus Fmoc-Thr(OtBu)-OH (5 Äq.), HOBt (5 Äq.) and DIC (5 Äq.) in CH₂Cl₂/DMF (2:1, 10 ml/g Harz) 15 min bei Rt gerührt und anschließend zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Rt geschüttelt und anschließend mit DMF, MeOH and CH₂Cl₂ (je 3 x 10 ml) gewaschen und über Nacht am Hochvakuum getrocknet.
Zur Bestimmung der Ausbeute dieser Reaktion wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt.

Kupplungs-Ausbeuten:

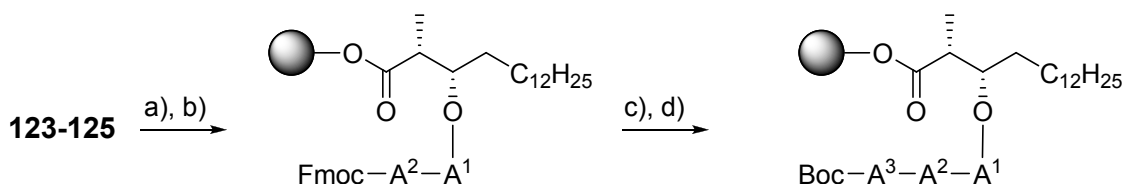
(2R,3S)-73:	93%.
(2S,3R)-73:	91%.
(2S,3S)-73:	92%.
(2R,3R)-73:	91%.

- c) Das Harz wurde zur zweiten Fmoc-Entschützung wieder zweimal für 15 min mit Piperidin (20% in DMF, 10 ml/g Harz) geschüttelt. Anschließend wurde es mit DMF (4 x 10 ml) und CH₂Cl₂ (4 x 10 ml) gewaschen.
- d) Für die zweite Peptidkupplung wurde eine Lösung aus Boc-Val-OH (5 Äq.), HOBt (5 Äq.) and DIC (5 Äq.) in CH₂Cl₂/DMF (2:1, 10 ml/g Harz) 15 min bei Rt gerührt und anschließend zum Harz gegeben. Nach 3 h Schütteln bei Rt wurde das Harz

mit DMF, MeOH and CH_2Cl_2 (je 4x) gewaschen und über Nacht am Hochvakuum getrocknet.

Um die Vollständigkeit dieser Reaktion zu überprüfen wurde ein Kaiser-Test (s.o.) durchgeführt.

Festphasenpeptidsynthese der Depsipeptide 78-83



- a) Zur Fmoc-Entschützung wurde das Harz (**123-125**) im Spritzenreaktor zweimal für 15 min mit Piperidin (20% in DMF, 10 ml/g Harz) geschüttelt. Anschließend wurde es mit DMF (4 x 10 ml) und CH_2Cl_2 (4 x 10 ml) gewaschen.
- b) Für die erste Peptidkupplung wurde eine Lösung aus geschützter Aminosäure (5 Äq.), HOBt (5 Äq.) und DIC (5 Äq.) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (2:1, 10 ml/g Harz) 15 min bei Rt gerührt und anschließend zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Rt geschüttelt und anschließend mit DMF, MeOH and CH_2Cl_2 (je 3 x 10 ml) gewaschen und über Nacht am Hochvakuum getrocknet.
- Zur Bestimmung der Ausbeute dieser Reaktion wurde ein Fmoc-Test (s.o.) durchgeführt.

	A ¹	A ²	A ³	Kupplungs-Ausbeute
78	Ser(OBzl)	Thr(OtBu)	Ala	92%
79	Phe	Phe	Thr(OtBu)	91%
80	Tyr(OtBu)	Tyr(OtBu)	Val	92%
81	Tyr(OtBu)	Val	Val	92%
82	Ser(OBzl)	Val	Thr(OtBu)	93%
83	Ser(OBzl)	Val	Val	93%

Tabelle 12: Kupplungs-Ausbeuten der Peptidverlängerung.

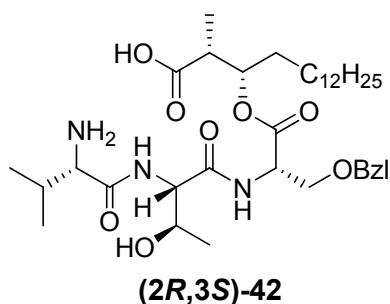
- c) Das Harz wurde zur zweiten Fmoc-Entschützung wieder zweimal für 15 min mit Piperidin (20% in DMF, 10 ml/g Harz) geschüttelt. Anschließend wurde es mit DMF (4 x 10 ml) und CH_2Cl_2 (4 x 10 ml) gewaschen.

d) Für die zweite Peptidkupplung wurde eine Lösung aus Boc-geschützter Aminosäure (5 Äq.), HOBt (5 Äq.) and DIC (5 Äq.) in CH₂Cl₂/DMF (2:1, 10 ml/g Harz) 15 min bei Rt gerührt und anschließend zum Harz gegeben. Nach 3 h Schütteln bei Rt wurde das Harz mit DMF, MeOH and CH₂Cl₂ (je 4x) gewaschen und über Nacht am Hochvakuum getrocknet.

Um die Vollständigkeit dieser Reaktion zu überprüfen wurde ein Kaiser-Test (s.o.) durchgeführt.

6.1.5 Abspaltung der linearen Depsipeptide von der Festphase

L-Valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2*R*,3*S*)-2-methyl-3-hydroxyhexadecan-säure ((2*R*,3*S*)-42):



Das immobilisierte Depsipeptid **(2*R*,3*S*)-74** wurde zweimal für 30 min mit TFA/CH₂Cl₂ (1:1, 10 ml/g Harz) bei Rt geschüttelt und anschließend ausführlich mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden mit Toluol koevaporiert und am Hochvakuum getrocknet. Die erhaltenen Rohprodukte lagen in einem Diastereomerenverhältnis von 8:1 (Produkt/Ser^α-Epimer) vor. Da die Diastereomere an dieser Stelle nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten, wurden sie als Gemisch weiter umgesetzt und erst nach der Zyklisierung voneinander getrennt. Die Rohprodukte konnten ohne Verluste in der Ausbeute direkt zur Zyklisierung verwendet werden oder zunächst mittels preparativer HPLC aufgereinigt werden. In letzterem Fall wurde das offenkettige Depsipeptid **(2*R*,3*S*)-42** gemeinsam mit seinem Ser^α-Epimer nach Gefriertrocknung als farbloser Feststoff erhalten. Die Ausbeute bezieht sich auf die sieben schrittige Festphasensynthese ausgehend von β -Hydroxysäure **(2*R*,3*S*)-49**.

Ausbeute: 220 mg, 331 μ mol, dr 8:1, 88% über sieben Stufen.

Hauptisomer:

IR (in Substanz): $\nu = 3306, 3072, 2921, 2853, 1740, 1666, 1639, 1537, 1467 \text{ cm}^{-1}$.

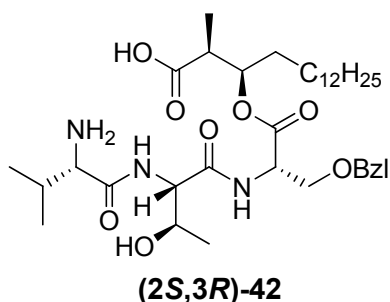
HPLC-ESI (C4-10): $t_R = 8.32 \text{ min}, m/z = 664.19 [M+H]^+, 1326.84 [2M+H]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.51 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 1H; NH), 7.93 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 1H; NH), 7.29-7.11 (m, 6H; arom. H; NH), 5.26-5.19 (m, 1H; BHA3-H), 4.61-4.55 (m, 1H; Ser- H^α), 4.48 (d, $J = 11.9 \text{ Hz}$, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.44 (d, $J = 11.9 \text{ Hz}$, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.39 (d, $J = 4.6 \text{ Hz}$, 1H; Thr- H^α), 4.07-3.97 (m, 1H; Thr- H^β), 3.90 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H; Val- H^α), 3.82 (dd, $J = 9.5, 4.1 \text{ Hz}$, 1H; Ser- $\text{H}^{\beta a}$), 3.65 (dd, $J = 9.2, 3.2 \text{ Hz}$, 1H; Ser- $\text{H}^{\beta b}$), 2.59 (dq, $J = 6.9, 2.6 \text{ Hz}$, 1H; BHA2-H), 2.15 (qd, $J = 13.5, 6.8 \text{ Hz}$, 1H; Val- H^β), 1.60-1.47 (m, 1H; BHA4a- H_2), 1.45-1.33 (m, 1H; BHA4b- H_2), 1.26-1.09 (m, 23H; BHA), 1.13 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 3H; Thr- H^γ), 1.09 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H; BHA2'- H_3), 0.95 (d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 6H; Val- H^γ), 0.86 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H; BHA16- H_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 177.3 (BHA-1), 170.5 (Thr-1), 169.9 (Ser-1), 169.6 (Val-1), 137.1 (aromat. C), 128.3 (aromat. C), 127.8 (aromat. C), 127.6 (aromat. C), 75.9 (BHA-3), 73.4 (Ser- CH_2Ph), 69.0 (Ser- β), 67.2 (Thr- β), 59.4 (Thr- α), 58.7 (Val- α), 52.8 (Ser- α), 42.3 (BHA-2), 31.9 (BHA), 31.7 (BHA), 30.2 (Val- β), 29.7 (BHA), 29.6 (BHA), 29.4 (BHA), 29.3 (BHA), 25.5 (BHA), 22.6 (BHA), 18.8 (Thr- γ), 18.1 (Val- γa), 17.3 (Val- γb), 14.0 (BHA-16), 9.9 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{O}_8 [M+H]^+$: 664.4531, gef.: 664.4528.

L-Valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecan-säure ((2S,3R)-42):



Das immobilisierte Depsipeptid **(2S,3R)-74** wurde zweimal für 30 min mit TFA/CH₂Cl₂ (1:1, 10 ml/g Harz) bei Rt geschüttelt und anschließend ausführlich mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden mit Toluol eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukte wies ein Diastereomerenverhältnis von 8:1 (Produkt/Ser^α-Epimer) auf. Da die Diastereomere an dieser Stelle nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten, wurden sie als Gemisch weiter umgesetzt und erst nach der Zyklisierung voneinander getrennt. Die Rohprodukte konnten ohne Verluste in der Ausbeute direkt zur Zyklisierung verwendet werden oder zunächst mittels preparativer HPLC aufgereinigt werden. In letzterem Fall wurde das offenkettige Depsipeptid **(2S,3R)-42** gemeinsam mit seinem Ser^α-Epimer nach Gefriertrocknung als farbloser Feststoff erhalten. Die Ausbeute bezieht sich auf die sieben schrittige Festphasensynthese ausgehend von β -Hydroxysäure **(2S,3R)-49**.

Ausbeute: 267 mg, 402 μ mol, dr 8:1, 87%.

Hauptisomer:

IR (in Substanz): ν = 3292, 3066, 2922, 2852, 1740, 1688, 1666, 1658, 1641, 1544, 1536, 1468, 1454 cm⁻¹.

HPLC-ESI (C4-10): t_R = 8.39 min, m/z = 664.13 [M+H]⁺, 1326.84 [2M+H]⁺.

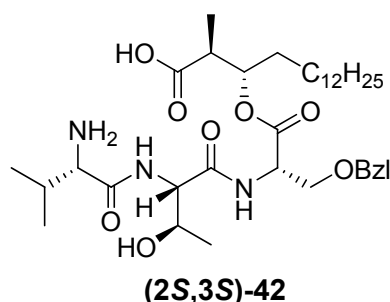
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/MeOD 4:1): δ (ppm) = 8.13 (d, J = 8.2 Hz, 1H; NH), 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 1H; NH), 7.24-7.09 (m, 5H; arom. H), 5.12 (td, J = 8.34, 4.96 Hz, 1H; BHA3-H), 4.55 (t, J = 3.5 Hz, 1H; Ser-H^α), 4.38 (s, 2H; Ser-CH₂Ph), 4.34 (d, J = 4.6 Hz, 1H; Thr-H^α), 4.01 (dq, J = 6.4, 4.6 Hz, 1H; Thr-H^β), 3.79 (dd, J = 9.6, 3.7 Hz, 1H; Ser-H^βa), 3.66 (d, J = 6.1 Hz, 1H; Val-H^α), 3.57 (dd, J = 9.6, 3.4 Hz, 1H; Ser-H^βb), 2.52 (dq, J = 7.0, 5.2 Hz, 1H; BHA2-H), 2.05 (qd, J = 13.6, 6.9 Hz, 1H; Val-H^β), 1.56-1.35 (m, 2H; BHA4-H₂), 1.23-1.11 (m, 22H; BHA), 1.11 (d, J = 6.5 Hz, 3H; Thr-H^γ), 1.03 (d, J = 7.1 Hz, 3H; BHA2'-H₃), 0.89 (d, J = 6.9 Hz, 3H; Val-H^γa), 0.88 (d, J = 6.9 Hz, 3H; Val-H^γb), 0.75 (t, J = 6.9 Hz, 3H; BHA16-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 175.9 (BHA-1), 169.9 (Thr-1), 169.4 (Ser-1), 168.4 (Val-1), 137.0 (aromat. C), 128.2 (aromat. C), 127.7 (aromat. C), 127.4 (aromat. C), 75.9 (BHA-3), 73.2 (Ser-CH₂Ph), 69.2 (Ser- β), 67.2 (Thr- β), 58.4 (Thr- α), 58.3 (Val- α), 52.6 (Ser- α), 42.6 (BHA-2), 31.7 (BHA-4), 30.0 (Val- β), 29.4 (BHA), 29.2

(BHA), 29.1 (BHA), 25.1 (BHA), 22.4 (BHA), 18.3 (Thr- γ), 17.9 (Val- γ a), 17.2 (Val- γ b), 13.7 (BHA-16), 11.3 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₆H₆₂N₃O₈ [M+H]⁺: 664.4531, gef.: 664.4528.

L-Valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecan-säure ((2S,3S)-42):



Das immobilisierte Depsipeptid **(2S,3S)-74** wurde zweimal für 30 min mit TFA/CH₂Cl₂ (1:1, 10 ml/g Harz) bei Rt geschüttelt und anschließend ausführlich mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden mit Toluol ko-evaporiert und am Hochvakuum getrocknet. Die erhaltenen Rohprodukte lagen in einem Diastereomerenverhältnis von 8:1 (Produkt/Ser^α-Epimer) vor. Da die Diastereomere an dieser Stelle nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten, wurden sie als Gemisch weiter umgesetzt und erst nach der Zyklisierung voneinander getrennt. Die Rohprodukte konnten ohne Verluste in der Ausbeute direkt zur Zyklisierung verwendet werden oder zunächst mittels preparativer HPLC aufgereinigt werden. In letzterem Fall wurde das offenkettige Depsipeptid **(2S,3S)-42** gemeinsam mit seinem Ser^α-Epimer nach Gefriertrocknung als farbloser Feststoff erhalten. Die Ausbeute bezieht sich auf die sieben schrittige Festphasensynthese ausgehend von β -Hydroxysäure **(2S,3S)-52**.

Ausbeute: 252 mg, 380 μ mol, dr 8:1, 80%.

Hauptisomer:

IR (in Substanz): ν = 3277, 3066, 2924, 2853, 1742, 1659, 1525, 1465 cm⁻¹.

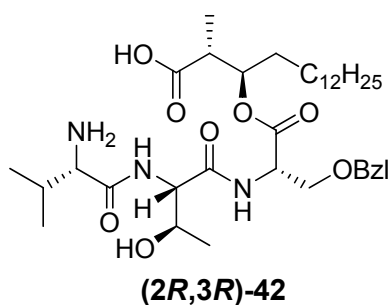
HPLC-ESI (C4-10): t_R = 8.44 min, m/z = 664.15 [M+H]⁺, 1326.89 [2M+H]⁺.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.24-7.07 (m, 5H; arom. H), 5.07-4.97 (m, 1H; BHA3-H), 4.57 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H; Ser- H^α), 4.40-4.36 (m, 2H; Ser- CH_2Ph), 4.31 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H; Thr- H^α), 4.07-3.98 (m, 1H; Thr- H^β), 3.79 (dd, $J = 9.5, 3.6$ Hz, 1H; Ser- H^βa), 3.67 (dd, $J = 10.1, 6.0$ Hz, 1H; Val- H^α), 3.56 (dd, $J = 9.5, 3.3$ Hz, 1H; Ser- H^βb), 2.66-2.55 (m, 1H; BHA2-H), 2.11-1.97 (m, 1H; Val- H^β), 1.53-1.41 (m, 2H; BHA-4), 1.21-1.07 (m, 22H; BHA), 1.05 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Thr- H^γ), 1.03-0.97 (m, 3H; BHA2'- H_3), 0.91-0.84 (m, 6H; Val- γ), 0.75 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H; BHA16- H_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 175.5 (BHA-1), 169.7 (Thr-1), 168.7 (Ser-1), 168.4 (Val-1), 136.9 (aromat. C), 128.1 (aromat. C), 127.6 (aromat. C), 127.3 (aromat. C), 76.6 (BHA-3), 73.1 (Ser- CH_2Ph), 69.3 (Ser- β), 66.9 (Thr- β), 58.6 (Thr- α), 58.3 (Val- α), 52.6 (Ser- α), 42.7 (BHA-2), 31.6 (BHA), 31.0 (BHA), 30.8 (BHA), 30.0 (Val- β), 29.4 (BHA), 29.2 (BHA), 29.1 (BHA), 24.9 (BHA), 24.7 (BHA), 22.4 (BHA), 18.3 (Thr- γ), 17.9 (Val- γa), 17.0 (Val- γb), 13.7 (BHA-16), 12.7 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 664.4531, gef.: 664.4528.

L-Valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2*R*,3*R*)-2-methyl-3-hydroxyhexadecan-säure ((2*R*,3*R*)-42):



Das immobilisierte Depsipeptid **(2*R*,3*R*)-74** wurde zweimal für 30 min mit $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1, 10 ml/g Harz) bei Rt geschüttelt und anschließend ausführlich mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden mit Toluol koevaporiert und am Hochvakuum getrocknet. Die erhaltenen Rohprodukte lagen in einem Diastereomerenverhältnis von 8:1 (Produkt/Ser $^\alpha$ -Epimer) vor. Da die Diastereomere an dieser Stelle nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten, wurden sie als Gemisch weiter umgesetzt und erst nach der Zyklisierung voneinander getrennt. Die Rohprodukte konnten ohne Verluste in der Ausbeute direkt zur Zyklisierung

verwendet werden oder zunächst mittels preparativer HPLC aufgereinigt werden. In letzterem Fall wurde das offenkettige Depsipeptid **(2R,3R)-42** gemeinsam mit seinem Ser^α-Epimer nach Gefriertrocknung als farbloser Feststoff erhalten. Die Ausbeute bezieht sich auf die sieben schrittige Festphasensynthese ausgehend von β-Hydroxysäure **(2R,3R)-52**.

Ausbeute: 133 mg, 200 μmol, dr 8:1, 82%.

Hauptisomer:

IR (in Substanz): $\nu = 3291, 3066, 2923, 2853, 1735, 1652, 1533, 1465 \text{ cm}^{-1}$.

HPLC-ESI (C4-10): $t_R = 8.46 \text{ min}$, $m/z = 664.16 [M+H]^+$, $1326.71 [2M+H]^+$.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.24-7.06 (m, 5H; arom. H), 5.05-4.97 (m, 1H; BHA3-H), 4.51 (t, $J = 3.5 \text{ Hz}$, 1H; Ser-H^α), 4.35 (s, 2H; Ser-CH₂Ph), 4.34-4.29 (m, 1H; Thr-H^α), 4.04-3.95 (m, 1H; Thr-H^β), 3.77 (dd, $J = 9.6, 3.7 \text{ Hz}$, 1H; Ser-H^{βa}), 3.65 (d, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 1H; Val-H^α), 3.54 (dd, $J = 9.6, 3.4 \text{ Hz}$, 1H; Ser-H^{βb}), 2.64-2.52 (m, 1H; BHA2-H), 2.02 (qd, $J = 13.6, 6.9 \text{ Hz}$, 1H; Val-H^β), 1.52-1.37 (m, 2H; BHA-4), 1.18-1.03 (m, 25H; BHA, Thr-γ), 1.00 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H; BHA2'-H₃), 0.88-0.82 (m, 6H; Val-γ), 0.72 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H; BHA16-H₃).

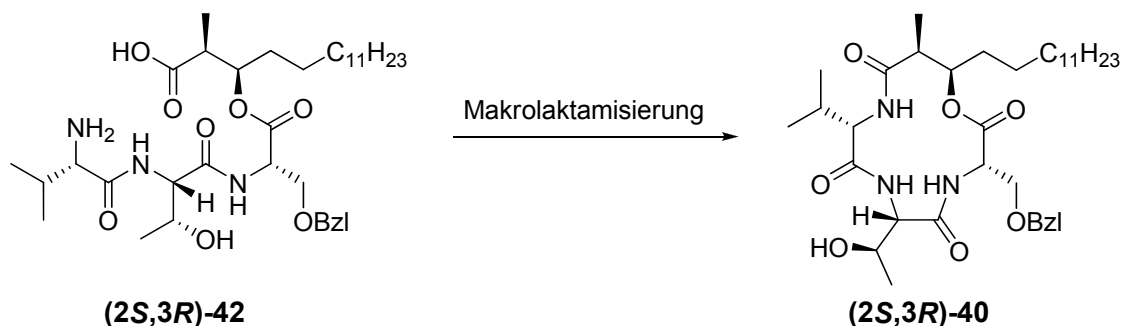
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 175.9 (BHA-1), 169.9 (Thr-1), 169.2 (Ser-1), 168.4 (Val-1), 136.9 (aromat. C), 128.1 (aromat. C), 127.5 (aromat. C), 127.2 (aromat. C), 76.4 (BHA-3), 73.1 (Ser-CH₂Ph), 69.2 (Ser-β), 67.2 (Thr-β), 58.3 (Thr-α), 58.2 (Val-α), 52.6 (Ser-α), 42.9 (BHA-2), 31.6 (BHA), 30.8 (BHA), 29.9 (Val-β), 29.3 (BHA), 29.2 (BHA), 29.0 (BHA), 24.6 (BHA), 22.3 (BHA), 18.3 (Thr-γ), 17.8 (Val-γa), 17.0 (Val-γb), 13.6 (BHA-16), 12.5 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₆H₆₂N₃O₈ [M+H]⁺: 664.4531, gef.: 664.4529.

Die offenkettigen Depsipeptide **78-83** wurden nach der gleichen Methode vom Harz gespalten und in der folgenden Reaktion ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

6.1.6 Versuche zur Makrolaktamisierung

Optimierung der Reaktionsbedingungen:



A) Makrozyklisierung mit PyBOP

PyBOP (2 Äq., 78.5 mg, 0.151 mmol) und DIPEA (2 Äq., 25.0 µl, 0.151 mmol) wurden in CH₂Cl₂/DMF (10:1, 47 ml) gelöst. Anschließend wurde eine Lösung des offenkettigen Depsipeptids **(2S,3R)-42** (1 Äq., 50 mg, 75 µmol) und DIPEA (1 Äq., 12.5 µl, 75 µmol) in CH₂Cl₂/DMF (10:1, 3 ml) mit Hilfe einer Spritzenpumpe langsam (2.5 ml/h) zugetropft (Endkonzentration 1.5 mM). Nach erfolgter Zugabe wurde über Nacht bei Rt gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser und ges. NaCl Lösung gewaschen. Nachdem die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet worden war, wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit Hilfe einer HPLC analysiert.

In der komplexen Produktmischung konnten nur Spuren des erwünschten Monozyklus' **(2S,3R)-40** detektiert werden, weswegen auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde.

B) Makrozyklisierung mit DEPC

Das offenkettige Depsipeptid **(2S,3R)-42** (1 Äq., 50 mg, 75 µmol) wurde in trockenem DMF (50 ml) gelöst. Bei 0°C wurde anschließend langsam DEPC (5 Äq., 57 µl, 0.375 mmol) zugetropft und 1.5 h gerührt. Dann wurde Triethylamin (5.5 Äq., 57 µl, 0.413 mmol) zugetropft und die Reaktionsmischung wurde von 0°C auf Rt erwärmt. Nach 5 h bei Rt wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mit einer präparativen HPLC aufgereinigt. Nach Entfernung des

Acetonitrils am Rotationsverdampfer wurde das restliche Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Das zyklische Depsipeptid **(2S,3R)-40** konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 18.9 mg, 29 μ mol, 39%.

C) Makrozyklisierung mit HBTU

HBTU (2 Äq., 57 mg, 0.151 mmol) und DIPEA (25.0 μ l, 0.151 mmol) wurden in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 110 ml) gelöst. Eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **(2S,3R)-42** (50 mg, 75 μ mol) und DIPEA (1 Äq., 12.5 μ l, 75 μ mol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 8 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugetropft, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Zyklodepsipeptids **(2S,3R)-42** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 10 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt. Das Zyklodepsipeptid **(2S,3R)-40** wurde als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 21.6 mg, 33 μ mol, 45%.

D) Makrozyklisierung mit HBTU bei 50°C

HBTU (2 Äq., 57 mg, 0.151 mmol) und DIPEA (2 Äq., 25 μ l, 0.151 mmol) wurden in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 48 ml) in einem 2-Halskolben gelöst und auf 50°C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurde eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **(2S,3R)-42** (50 mg, 0.075 mmol) in CH₂Cl₂/DMF (10:1, 10 ml) mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/min) zugetropft und anschließend für 7 h bei Rt gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser und ges. NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

Mit Hilfe einer analytischen HPLC konnte festgestellt werden, dass hauptsächlich Oligomerisierung und Zyklodimerisierung auftrat. Da der erwünschte Monozyklus

(2S,3R)-40 nur in Spuren detektiert werden konnte, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

E) Makrozyklisierung mit HATU

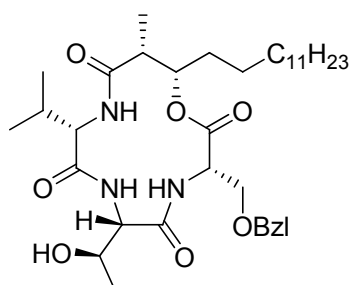
HATU (2 Äq., 57 mg, 0.151 mmol) und DIPEA (1 Äq., 12 µl, 0.075 mmol) wurden in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 48 ml) gelöst. Eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **(2S,3R)-42** (50 mg, 0.075 mmol) und DIPEA (1 Äq., 12 µl, 0.075 mmol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 10 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugegeben, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **(2S,3R)-42** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (20 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 20 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt. Das Zyklodepsipeptid **(2S,3R)-40** wurde als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 18.9 mg, 29 µmol, 39%.

Makrolaktamierungen nach optimierten Bedingungen:

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2R,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3S)-40):



(2R,3S)-40

HBTU (2 Äq., 137 mg, 360 µmol) und DIPEA (2 Äq., 59 µl, 360 µmol) wurden in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 128 ml) gelöst. Eine Lösung des offenkettigen Vorläufers

(2R,3S)-42 (119.7 mg, 180 μ mol) und DIPEA (1 Äq., 30 μ l, 180 μ mol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 10 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugetropft, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **(2R,3S)-42** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden. Auch die α -Serin Epimere konnten an dieser Stelle der Synthese voneinander getrennt werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und die Epimere **(2R,3S)-40** und **(2R,3S)-96** als farblose Feststoffe erhalten.

Hauptisomer **(2R,3S)-40**:

Ausbeute: 53.5 mg, 82.8 μ mol, 46%.

$[\alpha]_D^{20}$: -45.9° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 197°C.

IR (in Substanz): ν = 3424, 3283, 2923, 2853, 1745, 1671, 1656, 1536, 1468 cm⁻¹.

HPLC-ESI (C4-70): t_R = 5.13 min; m/z = 646.3 [M+H]⁺, 668.5 [M+Na]⁺.

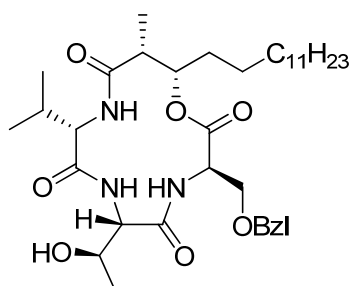
¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 7.97 (d, J = 9.6 Hz, 1H; Thr-NH), 7.68 (d, J = 9.2 Hz, 1H; Val-NH), 7.35-7.24 (m, 5H; aromat. H), 6.78 (d, J = 9.3 Hz, 1H; Ser-NH), 5.28 (d, J = 4.4 Hz, 1H; Thr-OH), 4.88 (ddd, J = 8.4, 5.9, 2.3 Hz, 1H; BHA3-H), 4.55 (d, J = 12.2 Hz, 1H; Ser-CH₂Ph), 4.47 (dt, J = 9.1, 5.4 Hz, 1H; Ser-H ^{α}), 4.43 (d, J = 12.2 Hz, 1H; Ser-CH₂Ph), 4.12-4.07 (m, 1H; Thr-H ^{β}), 4.05 (dd, J = 9.6, 2.4 Hz, 1H; Thr-H ^{α}), 3.86 (dd, J = 11.1, 9.3 Hz, 1H; Val-H ^{α}), 3.52 (dd, J = 9.2, 5.4 Hz, 1H; Ser-H ^{β a}), 3.47 (dd, J = 9.1, 9.1 Hz, 1H; Ser-H ^{β b}), 2.57 (dq, J = 7.2, 2.1 Hz, 1H; BHA2-H), 2.03-1.95 (m, 1H; Val-H ^{β}), 1.71-1.62 (m, 1H; BHA4a-H₂), 1.47-1.38 (m, 1H; BHA4b-H₂), 1.26-1.19 (m, 22H; BHA5-15-H₂), 1.17 (d, J = 7.3 Hz, 3H; BHA2'-H₃), 1.02 (d, J = 6.3 Hz, 3H; Thr-H ^{γ}), 0.89 (d, J = 6.5 Hz, 3H; Val-H ^{γ a}), 0.87 (d, J = 6.7 Hz, 3H; Val-H ^{γ b}), 0.83 (t, J = 7.0 Hz, 3H; BHA16-H₃).

^{13}C NMR (151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 171.8 (BHA-1), 171.2 (Val-1), 170.2 (Thr-1), 167.4 (Ser-1), 137.6 (aromat. C), 128.1 (aromat. C), 127.5 (aromat. C), 127.4 (aromat. C), 76.4 (BHA-3), 72.1 (Ser- CH_2Ph), 68.8 (Ser- β), 64.8 (Thr- β), 62.0 (Val- α), 59.0 (Thr- α), 53.0 (Ser- α), 42.8 (BHA-2), 31.2 (BHA), 30.1 (BHA), 29.0 (Val- β), 28.9 (BHA), 28.7 (BHA), 28.6 (BHA), 24.5 (BHA), 22.0 (BHA), 20.7 (Thr- γ), 19.3 (Val- γa), 19.0 (Val- γb), 13.9 (BHA-16), 8.3 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 646.4426, gef.: 646.4426.

Bei der Aufreinigung des Zyklopeptides (**2R,3S**)-**40** konnte auch das kleinere Isomer (**2R,3S**)-**96** (Epimer an α -Serin) isoliert werden:

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-D-seryl-(2R,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3S)-96):



(2R,3S)-96

Ausbeute: 8.1 mg, 12.6 μmol , 7%.

Schmp.: 178°C.

IR (in Substanz): ν = 3394, 3299, 3062, 2959, 2921, 2852, 1741, 1651, 1537, 1463 cm^{-1} .

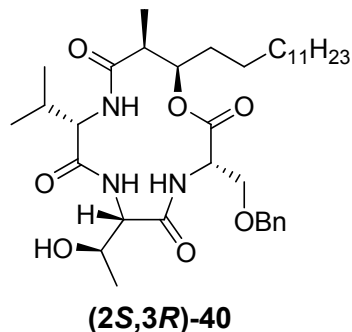
^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 7.81 (d, J = 7.5 Hz, 1H; Val-NH), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 1H; Ser-NH), 7.37 (d, J = 9.3 Hz, 1H; Thr-NH), 7.33-7.21 (m, 5H; aromat. H), 5.19 (dt, J = 7.3, 2.4 Hz, 1H; BHA3-H), 4.78 (d, J = 4.5 Hz, 1H; Thr-OH), 4.52 (ddd, J = 8.1, 7.1, 5.4 Hz, 1H; Ser- H^α), 4.48-4.42 (m, 2H; Ser- CH_2Ph), 4.11-4.04 (m, 2H; Thr- H^β , Thr- H^α), 3.73 (dd, J = 9.8, 7.5 Hz, 1H; Val- H^α), 3.68 (dd, J = 9.7, 7.1 Hz, 1H; Ser- H^βa), 3.50 (dd, J = 9.7, 5.3 Hz, 1H; Ser- H^βb), 2.55 (dq, J = 7.2, 2.3 Hz, 1H;

BHA2-H), 2.18-2.08 (m, 1H; Val-H^β), 1.64 (qd, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 1H; BHA4a-H₂), 1.48-1.40 (m, 1H; BHA4b-H₂), 1.26-1.19 (m, 22H; BHA5-15-H₂), 1.18 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H; BHA2'-H₃), 0.98 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H; Thr-H^γ), 0.90 (d, $J = 3.3$ Hz, 3H; Val-H^γa), 0.88 (d, $J = 3.4$ Hz, 3H; Val-H^γb), 0.83 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H; BHA16-H₃).

¹³C NMR (151 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 173.3 (BHA-1), 171.8 (Val-1), 169.8 (Thr-1), 169.0 (Ser-1), 138.2 (aromat. H), 128.1 (aromat. H), 127.2 (aromat. H), 75.8 (BHA-3), 72.1 (Ser-CH₂Ph), 67.5 (Ser- β), 64.3 (Thr- β), 62.9 (Val- α), 57.0 (Thr- α), 51.0 (Ser- α), 41.6 (BHA-2), 31.2 (BHA), 30.4 (BHA), 29.0 (BHA), 28.9 (BHA), 28.8 (BHA), 28.6 (BHA), 28.0 (Val- β), 24.9 (BHA), 22.0 (BHA), 20.1 (Thr- γ), 19.8 (Val- γ a), 19.2 (Val- γ b), 13.9 (BHA-16), 9.3 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₆H₆₀N₃O₇ [M+H]⁺: 646.4426, gef.: 646.4425.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3R)-40):



HBTU (2 Äq., 137 mg, 362 μ mol) und DIPEA (2 Äq., 60 μ l, 362 μ mol) wurden in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 128 ml) gelöst. Eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **(2S,3R)-42** (120 mg, 181 μ mol) und DIPEA (1 Äq., 30 μ l, 181 μ mol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 10 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugetropft, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **(2S,3R)-42** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden. Auch die α -Serin Epimere konnten an dieser Stelle der Synthese

voneinander getrennt werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und die Epimere **(2S,3R)-40** und **(2S,3R)-96** als farblose Feststoffe erhalten.

Hauptisomer (2S,3R)-40:

Ausbeute: 59.3 mg, 91.8 μmol , 51%.

$[\alpha]_D^{20}$: -37.8° ($c = 1$, CHCl_3).

Schmp.: 226°C .

IR (in Substanz): $\nu = 3311, 2963, 2919, 2852, 1726, 1673, 1642, 1556, 1508, 1469 \text{ cm}^{-1}$.

HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 5.00 \text{ min}$, $m/z = 646.41 [M+H]^+$, $668.51 [M+Na]^+$

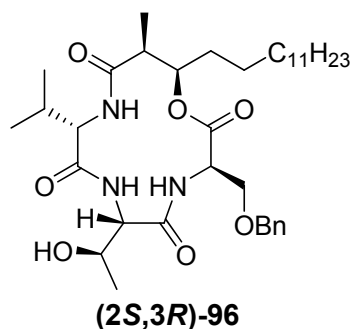
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 8.05 (d, $J = 10.1 \text{ Hz}$, 1H; Val-NH), 7.88 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 1H; Ser-NH), 7.37 (d, $J = 9.7 \text{ Hz}$, 1H; Thr-NH), 7.35-7.23 (m, 5H; arom. H), 5.14 (d, $J = 5.1 \text{ Hz}$, 1H; Thr-OH), 4.83 (ddd, $J = 10.0, 3.8, 3.0 \text{ Hz}$, 1H; BHA3-H), 4.63 (td, $J = 8.5, 4.2 \text{ Hz}$, 1H; Ser- H^α), 4.53 (d, $J = 12.6 \text{ Hz}$, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.50 (d, $J = 12.6 \text{ Hz}$, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.08 (dd, $J = 9.7, 3.4 \text{ Hz}$, 1H; Thr- H^α), 4.01-3.96 (m, 1H; Thr- H^β), 3.97-3.91 (m, 1H; Val- H^α), 3.71 (dd, $J = 9.8, 4.0 \text{ Hz}$, 1H; Ser- $\text{H}^{\beta\text{a}}$), 3.57 (dd, $J = 9.8, 4.4 \text{ Hz}$, 1H; Ser- $\text{H}^{\beta\text{b}}$), 2.47-2.44 (m, 1H; BHA2-H), 1.63-1.54 (m, 1H; BHA4a- H_2), 1.92-1.82 (m, 1H; Val- H^β), 1.45-1.36 (m, 1H; BHA4b- H_2), 1.26-1.14 (m, 22H; BHA5-15- H_2), 1.06 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 3H; Thr- H^γ), 1.02 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H; BHA2'- H_3), 0.90 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 1H; Val- $\text{H}^{\gamma\text{a}}$), 0.87 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H; Val- $\text{H}^{\gamma\text{b}}$), 0.82 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H; BHA16- H_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 170.9 (BHA-1, Val-1), 170.3 (Thr-1), 168.7 (Ser-1), 138.0 (aromat. C), 128.2 (aromat. C), 127.4 (aromat. C), 76.6 (BHA-3), 72.2 (Ser- CH_2Ph), 68.7 (Ser- β), 65.3 (Thr- β), 61.3 (Val- α), 59.7 (Thr- α), 51.4 (Ser- α), 43.2 (BHA-2), 31.2 (BHA), 29.4 (Val- β), 29.0 (BHA), 28.9 (BHA), 28.9 (BHA), 28.8 (BHA), 28.6 (BHA), 28.4 (BHA), 25.7 (BHA), 22.0 (BHA), 20.9 (Thr- γ), 19.1 (Val- γa), 19.0 (Val- γb), 14.0 (BHA-2'), 13.9 (BHA-16).

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_7 [M+H]^+$: 646.4426, gef.: 646.4424.

Bei der Aufreinigung des Zyklopeptides (**2S,3R**)-**40** konnte auch das kleinere Isomer (**2S,3R**)-**96** (Epimer an α -Serin) isoliert werden:

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-D-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3R)-96):



Ausbeute: 9.3 mg, 14.4 μ mol, 8%.

Schmp.: 212°C.

IR (in Substanz): $\nu = 3313, 2964, 2918, 2852, 1720, 1672, 1638, 1541, 1507, 1468 \text{ cm}^{-1}$.

HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 5.57 \text{ min}$, $m/z = 646.41 [M+H]^+$, 668.53.

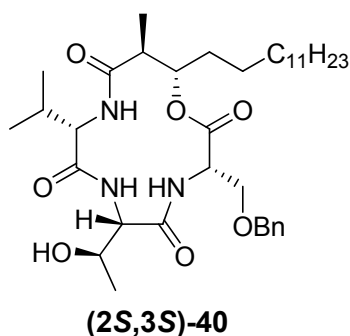
¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 8.23 (d, $J = 9.8 \text{ Hz}$, 1H; Val-NH), 7.62 (d, $J = 9.3 \text{ Hz}$, 1H; Thr-NH), 7.35-7.17 (m, 5H; aromat. H), 7.09 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 1H; Ser-NH), 4.96 (ddd, $J = 10.4, 4.8, 2.6 \text{ Hz}$, 1H; BHA3-H), 4.87 (d, $J = 4.5 \text{ Hz}$, 1H; Thr-OH), 4.44 (s, 2H; Ser-CH₂Ph), 4.40 (td, $J = 6.2, 4.6 \text{ Hz}$, 1H; Ser-H ^{α}), 4.30-4.24 (m, 1H; Thr-H ^{β}), 4.15 (dd, $J = 9.2, 2.9 \text{ Hz}$, 1H; Thr-H ^{α}), 4.00 (t, $J = 10.0 \text{ Hz}$, 1H; Val-H ^{α}), 3.71 (dd, $J = 9.5, 4.4 \text{ Hz}$, 1H; Ser-H ^{β a}), 3.58 (dd, $J = 9.5, 6.1 \text{ Hz}$, 1H; Ser-H ^{β b}), 2.60-2.53 (m, 1H; BHA2-H), 1.88-1.74 (m, 2H; Val-H ^{β} , BHA4a-H₂), 1.62-1.51 (m, 1H; BHA4b-H₂), 1.29-1.07 (m, 22H; BHA5-15-H₂), 1.04 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H; BHA2'-H₃), 0.99 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H; Thr-H ^{γ}), 0.89 (d, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 3H; Val-H ^{γ a}), 0.86 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H; Val-H ^{γ b}), 0.82 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H; BHA16-H₃).

¹³C NMR (151 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 171.8 (Val-1), 171.5 (BHA-1), 169.5 (Thr-1), 167.4 (Ser-1), 137.6 (aromat. H), 128.0 (aromat. H), 127.4 (aromat. H), 127.2 (aromat. H), 76.5 (BHA-3), 72.2 (Ser-CH₂Ph), 68.9 (Ser- β), 63.9 (Thr- β), 60.8 (Val- α), 56.9 (Thr- α), 54.3 (Ser- α), 42.8 (BHA-2), 31.2 (BHA), 29.7 (Val- β), 29.0 (BHA), 28.9

(BHA), 28.8 (BHA), 28.6 (BHA), 28.1 (BHA), 25.4 (BHA), 22.0 (BHA), 20.5 (Thr- γ), 19.1 (Val- γ a), 19.0 (Val- γ b), 13.9 (BHA-16, BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₆H₆₀N₃O₇ [M+H]⁺: 646.4426, gef.: 646.4425.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3S)-40):



HBTU (2 Äq., 137 mg, 362 μ mol) und DIPEA (2 Äq., 60 μ l, 362 μ mol) wurden in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 128 ml) gelöst. Eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **(2S,3S)-42** (120 mg, 181 μ mol) und DIPEA (1 Äq., 30 μ l, 180 μ mol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 10 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugetropft, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **(2S,3S)-42** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden. Das unerwünschte α -Serin Epimere konnte an dieser Stelle der Synthese vom Produkt getrennt werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und das Zyklodepsipeptid **(2S,3S)-40** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 72.1 mg, 0.112 mmol, 62%.

$[\alpha]_D^{20}$: -58.2° (c = 1, CHCl₃).

Schmp.: 235°C.

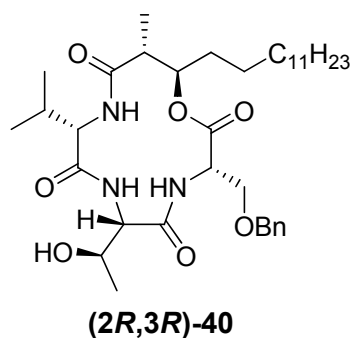
IR (in Substanz): $\nu = 3333, 2958, 2921, 2852, 1739, 1660, 1530, 1503, 1469 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 8.01 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H; Val-NH), 7.80 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H; Thr-NH), 7.33-7.20 (m, 5H; aromat. H), 7.09 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H; Ser-NH), 5.16 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H; Thr-OH), 4.75 (ddd, $J = 10.5, 5.0, 3.9$ Hz, 1H; BHA3-H), 4.48 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.46 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.39 (ddd, $J = 8.2, 6.9, 4.7$ Hz, 1H; Ser- H^α), 4.09-4.02 (m, 2H; Thr- H^β , Thr- H^α), 3.73 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H; Val- H^α), 3.62 (dd, $J = 9.5, 4.7$ Hz, 1H; Ser- $\text{H}^{\beta\text{a}}$), 3.46 (dd, $J = 9.5, 6.9$ Hz, 1H; Ser- $\text{H}^{\beta\text{b}}$), 2.72-2.61 (m, 1H; BHA2-H), 1.77-1.69 (m, 1H; BHA4a- H_2), 1.94-1.84 (m, 1H; Val- H^β), 1.50-1.41 (m, 1H; BHA4b- H_2), 1.28-1.08 (m, 22H; BHA5-15- H_3), 1.02 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H; Thr- H^γ), 0.99 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H; BHA2'- H_3), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H; Val- $\text{H}^{\gamma\text{a}}$), 0.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H; Val- $\text{H}^{\gamma\text{b}}$), 0.82 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H; BHA16- H_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 173.3 (BHA-1), 171.6 (Val-1), 170.2 (Thr-1), 167.2 (Ser-1), 137.6 (*ipso*-aromat. C), 128.1 (2x *m*-aromat. C), 127.4 (*p*-aromat. C), 127.1 (2x *o*-aromat. C), 76.6 (BHA-3), 72.1 (Ser- CH_2Ph), 69.6 (Ser- β), 64.9 (Thr- β), 61.6 (Val- α), 59.5 (Thr- α), 53.3 (Ser- α), 42.8 (BHA-2), 31.2 (BHA), 29.9 (BHA), 29.1 (Val- β), 28.9 (7x BHA), 28.6 (BHA), 22.8 (BHA), 22.0 (BHA), 20.8 (Thr- γ), 19.3 (Val- γa), 19.0 (Val- γb), 14.7 (BHA-2'), 13.9 (BHA-16).

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 646.4426, gef.: 646.4425.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2*R*,3*R*)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2*R*,3*R*)-40):



HBTU (2 Äq., 137 mg, 360 μmol) und DIPEA (2 Äq., 59 μl , 360 μmol) wurden in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (15:1, 128 ml) gelöst. Eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **(2R,3R)-42** (119 mg, 180 μmol) und DIPEA (1 Äq., 30 μl , 180 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (15:1, 10 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugetropft, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **(2R,3R)-42** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden. Das unerwünschte α -Serin Epimere konnte an dieser Stelle der Synthese vom Produkt getrennt werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und das Zyklodepsipeptid **(2R,3R)-40** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 41.8 mg, 64.8 μmol , 36%.

$[\alpha]_D^{20}$: -49.3° ($c = 1$, CHCl_3).

Schmp.: 234°C.

IR (in Substanz): $\nu = 3285, 2923, 2853, 1725, 1684, 1637, 1544, 1455 \text{ cm}^{-1}$.

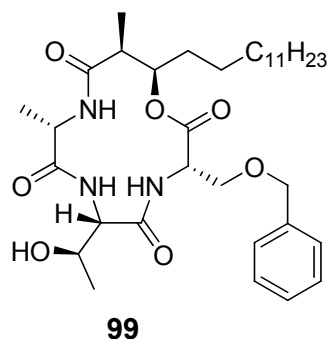
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 7.94 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H; Thr-NH), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H; Ser-NH), 7.60 (b, 1H; Val-NH), 7.40-7.20 (m, 5H; arom. H), 5.21 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H; Thr-OH), 4.77-4.73 (m, 1H; Ser- H^α), 4.70 (ddd, $J = 8.0, 6.2, 2.0$ Hz, 1H; BHA3-H), 4.54 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.47 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.11 (dd, $J = 10.1, 2.6$ Hz, 1H; Thr- H^α), 4.06 (m, 1H; Thr- H^β), 4.06-4.01 (m, 1H; Val- H^α), 3.84 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H; Ser- H^βa), 3.59 (dd, $J = 9.6, 3.0$ Hz, 1H; Ser- H^βb), 2.58 (dq, $J = 7.3, 1.90$ Hz, 1H; BHA2-H), 2.09-1.95 (m, 1H; Val- H^β), 1.61-1.52 (m, 1H; BHA4a- H_2), 1.48-1.40 (m, 1H; BHA4b- H_2), 1.33-1.17 (m, 22H; BHA5-15- H_2), 1.13 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H; BHA2'- H_3), 1.05 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H; Thr- H^γ), 0.90 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H; Val- H^γa), 0.85 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Val- H^γb), 0.83 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H; BHA16- H_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 171.0 (BHA-1), 170.8 (Val-1), 170.3 (Thr-1), 168.9 (Ser-1), 137.9 (aromat. C), 129.8 (aromat. C), 128.1 (aromat. C), 127.3

(aromat. C), 77.9 (BHA-3), 72.4 (Ser-CH₂Ph), 70.0 (Ser-β), 65.2 (Thr-β), 61.3 (Val-α), 59.1 (Thr-α), 52.5 (Ser-α), 52.4, 42.8 (BHA-2), 40.0 (BHA), 31.7 (BHA), 31.2 (BHA), 29.0 (BHA), 29.1 (Val-β), 28.9 (BHA), 28.8 (BHA), 28.7 (BHA), 28.6 (BHA), 24.8 (BHA), 22.0 (BHA), 20.9 (Thr-γ), 19.2 (Val-γa), 18.9 (Val-γb), 13.9 (BHA-16, BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₆H₆₀N₃O₇ [M+H]⁺: 646.4426, gef.: 646.4425.

1,3,4-Anhydro(L-alanyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) (99):



Das offenkettige Depsipeptid **78** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt nach Abspaltung vom Harz zyklisiert. Hierzu wurde eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **78** (52.2 μmol) und DIPEA (1 Äq., 8.6 μl, 52.2 μmol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 8 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2.5 ml/h) zu einer Lösung aus HBTU (2 Äq., 39 mg, 104 μmol) und DIPEA (2 Äq., 17 μl, 104 μmol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 32 ml) zugetropft, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **78** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden, wobei auch das unerwünschte α-Serin Epimere vom Produkt abgetrennt werden konnte. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und das Zyklopeptide **99** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 10.1 mg, 16.3 μmol, 31%.

HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 4.35$ min, $m/z = 618.15$ $[M+H]^+$.

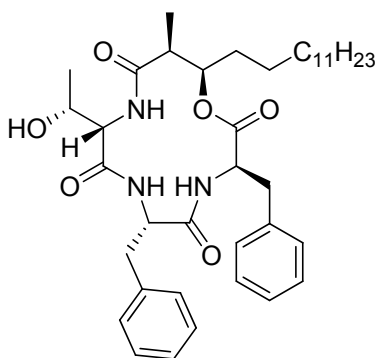
IR (in Substanz): $\nu = 3307, 3087, 2924, 2855, 1729, 1679, 1552, 1511, 1461, 1369, 1300$ cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 7.45 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, Ala-NH), 7.35-7.25 (m, 5H, Aromat), 4.98 (ddd, $J = 9.9, 4.7, 3.1$ Hz, 1H, BHA3-H), 4.70-4.60 (m, 2H, Ser $^\alpha$, Ala $^\alpha$), 4.53 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, CH $_2$ Ph-a), 4.49 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, CH $_2$ Ph-b), 4.43 (dq, $J = 6.4, 4.4$ Hz, 1H, Thr $^\beta$), 4.03 (dd, $J = 9.6, 2.9$ Hz, 1H, Ser $^\beta$ a), 3.99 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, Thr $^\alpha$), 3.81 (dd, $J = 9.6, 3.0$ Hz, 1H, Ser $^\beta$ b), 2.41 (dq, $J = 7.1, 5.0$ Hz, 1H, BHA2-H), 1.74-1.53 (m, 2H, BHA4-H $_2$), 1.29 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, Ala $^\beta$), 1.26-1.18 (m, 20H, Kette), 1.16 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, Thr $^\gamma$), 1.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, BHA2'-H $_3$), 0.83 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, BHA16-H $_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 173.1 (Ala-1), 172.4 (BHA-1), 170.5 (Thr-1), 167.9 (Ser-1), 136.5 (Aromat), 128.3 (Aromat), 128.1 (Aromat), 128.0 (Aromat), 77.8 (BHA-3), 73.8 (CH $_2$ Ph), 69.4 (Ser- β), 65.3 (Thr- β), 61.3 (Thr- α), 52.6 (Ser- α), 49.1 (Ala- α), 43.8 (BHA-2), 31.6 (CH $_2$ -Kette), 29.3 (CH $_2$ -Kette), 29.2 (CH $_2$ -Kette), 29.1 (CH $_2$ -Kette), 29.0 (CH $_2$ -Kette), 28.7 (BHA-4), 26.1 (CH $_2$ -Kette), 22.3 (CH $_2$ -Kette), 19.9 (Thr- γ), 15.7 (Ala- β), 13.6 (BHA-16), 13.1 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_7$ $[M+H]^+$: 618.4113, gef.: 618.4122.

1,3,4-Anhydro(L-threonyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) (104):



104

Das offenkettige Depsipeptid **79** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt nach Abspaltung vom Harz zyklisiert. Hierzu wurden HBTU (2 Äq., 43 mg, 114 μmol) und DIPEA (2 Äq., 19 μl , 114 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (15:1, 36 ml) gelöst. Eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **79** (56.9 μmol) und DIPEA (1 Äq., 9.4 μl , 56.9 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (15:1, 8 ml) wurde mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugetropft, so dass eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **79** von 1.3 mM erreicht wurde. Anschließend wurde bei Rt über Nacht gerührt.

Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Nachdem die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet worden war, wurde das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und das Zyklodepsipeptid **104** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 9.8 mg, 14.8 μmol , 26%.

IR (in Substanz): $\nu = 3305, 3062, 2923, 2852, 1733, 1652, 1547 \text{ cm}^{-1}$.

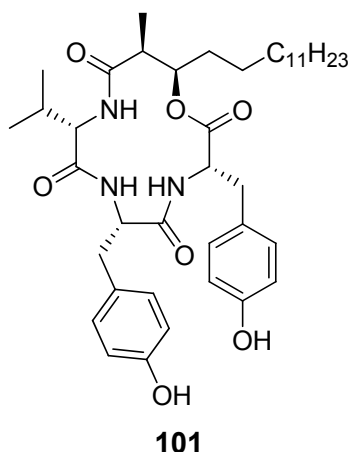
HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 5.31 \text{ min}$, $m/z = 664.16 [\text{M}+\text{H}]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 7.32 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, Phe2-NH), 7.27-7.07 (m, 8H, Aromat), 6.98-6.92 (m, 2H, Aromat), 6.50 (d, $J = 9.4 \text{ Hz}$, 1H, Thr-NH), 4.83-4.74 (m, 2H, Phe2 $^\alpha$, BHA3-H), 4.29 (dd, $J = 8.3, 5.6 \text{ Hz}$, 1H, Phe3 $^\alpha$), 4.22-4.17 (m, 1H, Thr $^\alpha$), 4.04 (dq, $J = 6.2, 3.3 \text{ Hz}$, 1H, Thr $^\beta$), 3.22 (dd, $J = 13.8, 8.4 \text{ Hz}$, 1H, Phe3 $^\beta\text{a}$), 3.12 (dd, $J = 13.8, 4.7 \text{ Hz}$, 1H, Phe2 $^\beta\text{a}$), 3.05 (dd, $J = 13.8, 6.7 \text{ Hz}$, 1H, Phe2 $^\beta\text{b}$), 2.98 (dd, $J = 13.8, 5.5 \text{ Hz}$, 1H, Phe3 $^\beta\text{b}$), 2.08-1.98 (m, 1H, BHA2-H), 1.69-1.54 (m, 1H, BHA4a), 1.53-1.41 (m, 1H, BHA4b), 1.28-1.10 (m, 22H, Kette), 1.04 (t, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 6H, Thr $^\gamma$, BHA2'-H₃), 0.83 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, BHA16-H₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 173.2 (BHA-1), 173.2 (Phe2-1), 170.7 (Thr-1), 169.2 (Phe3-1), 136.2 (Aromat), 129.4 (Aromat), 129.1 (Aromat), 128.4 (Aromat), 128.2 (Aromat), 126.8 (Aromat), 126.7 (Aromat), 77.5 (BHA-3), 65.2 (Thr- β), 57.7 (Thr- α), 56.6 (Phe3- α), 53.2 (Phe2- α), 43.9 (BHA-2), 37.1 (Phe2- β), 36.1 (Phe3- β), 31.6 (CH_2 -Kette), 29.4 (CH_2 -Kette), 29.3 (CH_2 -Kette), 29.2 (CH_2 -Kette), 29.1 (CH_2 -Kette), 28.8 (BHA-4), 26.1 (CH_2 -Kette), 22.4 (CH_2 -Kette), 19.4 (Thr- γ), 13.7 (BHA-16), 13.2 (BHA2').

HR-MS (ESI): ber. für $C_{39}H_{58}N_3O_6$ $[M+H]^+$: 664.4320, gef.: 664.4333.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-tyrosinyl-L-tyrosinyl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) (101):



Das offenkettige Depsipeptid **80** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt nach Abspaltung vom Harz eingesetzt. HBTU (2 Äq., 37.7 mg, 99.3 μ mol) und DIPEA (2 Äq., 16 μ l, 99.3 μ mol) wurden in CH_2Cl_2/DMF (15:1, 30 ml) gelöst. Anschließend wurde eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **80** (49.6 μ mol) und DIPEA (1 Äq., 8.2 μ l, 49.6 μ mol) in CH_2Cl_2/DMF (15:1, 8 ml) mit einer Spritzenpumpe langsam (2 ml/h) zugetropft. Es wurde eine theoretische Endkonzentration des offenkettigen Depsipeptids **80** von 1.3 mM erreicht. Nachdem die reaktionsmischung bei Rt über Nacht gerührt worden war, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen. Die Lösung wurde mit ges. NaCl Lösung (5 ml) gewaschen und die organische Phase mit $MgSO_4$ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt. Das Produkt konnte ohne sein α -Serin Epimer isoliert werden. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und das Zyklodepsipeptid **101** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 12.4 mg, 17.9 μ mol, 36%.

IR (in Substanz): $\nu = 3305, 2927, 2856, 1730, 1681, 1545, 1459, 1378$ cm^{-1} .

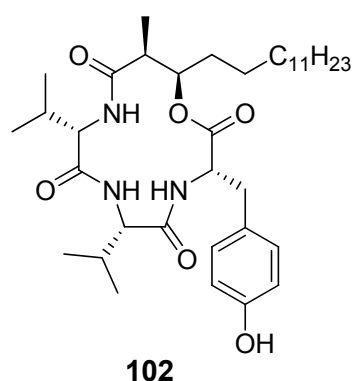
HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 3.99$ min, $m/z = 694.24$ $[M+H]^+$

¹H NMR (400 MHz, 4:1 CDCl₃/MeOD): δ (ppm) = 7.66 (d, J = 8.79 Hz, 1H, Val-NH), 7.00-6.81 (m, 4H, Tyr-Aromat), 6.69-6.59 (m, 4H, Tyr-Aromat), 4.93 (td, J = 9.30, 4.24 Hz, 1H, BHA3-H), 4.68-4.58 (m, 1H, Tyr-H ^{α}), 4.04 (dd, J = 7.92, 6.76 Hz, 1H, Tyr-H ^{α}), 3.83-3.74 (m, 1H, Val-H ^{α}), 3.09 (dd, J = 14.21, 6.37 Hz, 1H, Tyr-H ^{β a}), 2.96 (dd, J = 13.94, 6.21 Hz, 1H, Tyr-H ^{β a}), 2.86 (dd, J = 14.78, 9.32 Hz, 1H, Tyr-H ^{β b}), 2.80 (dd, J = 14.30, 8.45 Hz, 1H, Tyr-H ^{β b}), 2.67-2.53 (m, 1H, BHA2-H), 1.87-1.72 (m, 2H, BHA4-H_{2a}, Val-H ^{β}), 1.67-1.52 (m, 1H, BHA4-H_{2b}), 1.31-1.14 (m, 22H, Kette), 1.12 (d, J = 7.07 Hz, 3H, BHA2'-H₃), 0.89-0.76 (m, 9H, Val-H ^{γ} , BHA16-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, 4:1 CDCl₃/MeOD): δ (ppm) = 174.8 (BHA-1), 172.4 (Val-1), 170.9 (Tyr-1), 169.7 (Tyr-1), 155.4 (Aromat), 129.8 (Aromat), 129.7 (Aromat), 128.5 (Aromat), 126.8 (Aromat), 115.0 (Aromat), 115.1 (Aromat), 77.1 (BHA-3), 61.2 (Val- α), 56.0 (Tyr- α), 55.5 (Tyr- α), 42.0 (BHA-2), 37.5 (Tyr- β), 34.4 (Tyr- β), 32.0 (CH₂-Kette), 31.7 (Val- β), 29.8 (CH₂-Kette), 29.7 (CH₂-Kette), 29.6 (CH₂-Kette), 29.1 (BHA-4), 26.3 (CH₂-Kette), 23.1 (CH₂-Kette), 19.2 (Val- γ), 14.2 (BHA-16), 13.2 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₄₀H₆₀N₃O₇ [M+H]⁺: 694.4426, gef.: 694.4439.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-valyl-L-tyrosyl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) (102):



Das offenkettige Depsipeptid **81** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt nach Abspaltung vom Harz eingesetzt. Zu einer Lösung aus HBTU (2 Äq., 37.7 mg, 99.3 μ mol) und DIPEA (2 Äq., 16 μ l, 99.3 μ mol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 30 ml) wurde eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **81** (49.6 μ mol) und DIPEA (1 Äq., 8.2 μ l, 49.6 μ mol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 8 ml) langsam mit einer Spritzenpumpe (2 ml/h)

zutropft. Die 1.3 mM Lösung des offenkettigen Depsipeptids **81** wurde anschließend über Nacht bei Rt gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden, wobei die α -Serin Epimere separat isoliert werden konnten. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und die Zyklodepsipeptide **102** und **103** als farblose Feststoffe erhalten.

Hauptisomer:

Ausbeute: 8.8 mg, 13.9 μ mol, 28%.

IR (in Substanz): $\nu = 3305, 2967, 2860, 1729, 1683, 1611, 1546 \text{ cm}^{-1}$.

HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 4.99 \text{ min}, m/z = 630.22 [M+H]^+$.

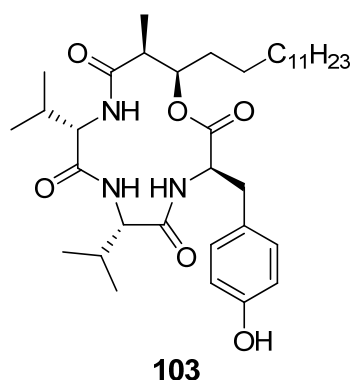
¹H NMR (400 MHz, 4:1 CDCl₃/MeOD): δ (ppm) = 7.95 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, Tyr-NH), 7.44 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, Val-NH), 6.88 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H, Tyr-ortho-Aromat), 6.58 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H, Tyr-meta-Aromat), 4.87 (ddd, $J = 10.3, 4.7, 2.7 \text{ Hz}$, 1H, BHA3-H), 4.44 (ddd, $J = 10.4, 8.4, 4.7 \text{ Hz}$, 1H, Tyr-H $^\alpha$), 3.81 (d, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 1H, Val-H $^\alpha$), 3.69 (d, $J = 10.0 \text{ Hz}$, 1H, Val-H $^\alpha$), 2.97 (dd, $J = 14.1, 4.6 \text{ Hz}$, 1H, Tyr-H $^{\beta a}$), 2.65 (dd, $J = 14.0, 10.5 \text{ Hz}$, 1H, Tyr-H $^{\beta b}$), 2.43 (dq, $J = 7.1, 5.0 \text{ Hz}$, 1H, BHA2-H), 1.93-1.75 (m, 2H, Val-H $^\beta$, BHA4-Ha), 1.60-1.52 (m, 1H, Val-H $^\beta$), 1.60-1.52 (m, 1H, BHA4-Hb), 1.19-1.07 (m, 22H, BHA-CH₂), 1.06 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 3H, BHA2'-H₃), 0.81 (dd, $J = 9.9, 6.6 \text{ Hz}$, 6H, 2x Val-H $^\gamma$), 0.75-0.69 (m, 6H, Val-H $^\gamma$, BHA-16), 0.53 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, Val-H $^\gamma$).

¹³C NMR (101 MHz, 4:1 CDCl₃/MeOD): δ (ppm) = 174.1 (BHA-1), 173.4 (Val-1), 171.8 (Val-1), 170.1 (Tyr-1), 155.6 (Tyr-para-Aromat), 129.6 (Tyr-ortho-Aromat), 127.1 (Tyr-ipso-Aromat), 115.1 (Tyr-meta-Aromat), 77.1 (BHA-3), 62.1 (Val- α), 59.5 (Val- α), 55.2 (Tyr- α), 43.2 (BHA-2), 36.7 (Tyr- β), 31.6 (BHA-CH₂), 29.4 (BHA-CH₂), 29.3 (BHA-CH₂), 29.1 (BHA-CH₂), 29.0 (Val- β), 28.7 (Val- β), 28.4 (BHA-CH₂), 26.2 (BHA-CH₂), 22.4 (BHA-CH₂), 18.9 (Val- γ), 18.8 (Val- γ), 18.7 (Val- γ), 18.0 (Val- γ), 14.2 (BHA-16), 13.7 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₆H₆₀N₃O₆ [M+H]⁺: 630.4477, gef.: 630.4489.

Aus dem gleichen Versuch konnte auch das kleinere Isomer, welches während der Veresterung am Ser- α epimerisiert war isoliert werden:

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-valyl-D-tyrosyl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) (103):



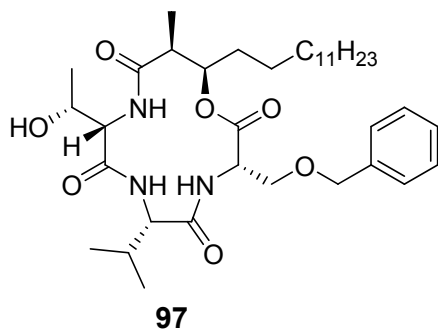
Ausbeute: 6.4 mg, 10.1 μ mol, 20%.

¹H NMR (400 MHz, 4:1 CDCl₃/MeOD): δ (ppm) = 7.82 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Tyr-NH), 6.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Tyr-*ortho*-Aromat), 6.70 (d, J = 9.6 Hz, 1H, Val-NH), 6.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Tyr-*meta*-Aromat), 4.83 (ddd, J = 8.3, 4.4, 3.3 Hz, 1H, BHA3-H), 4.49 (dd, J = 9.5, 4.2 Hz, 1H, Tyr-H ^{α}), 3.80-3.69 (m, 1H, Val1-H ^{α}), 3.10-2.96 (m, 2H, Tyr-H ^{β} _a, Val2-H ^{α}), 2.79 (dd, J = 14.2, 9.5 Hz, 1H, Tyr-H ^{β} _b), 2.45-2.34 (m, 1H, Val2-H ^{β}), 2.33-2.25 (m, 1H, BHA2-H), 1.85 (dq, J = 13.3, 13.1, 6.4 Hz, 1H, Val1-H ^{β}), 1.56-1.37 (m, 2H, BHA4-H₂), 1.21-1.02 (m, 22H, BHA-CH₂), 0.97 (d, J = 7.1 Hz, 3H, BHA2'-H₃), 0.78 (dd, J = 6.6, 1.7 Hz, 6H, 2x Val1-H ^{γ}), 0.76-0.69 (m, 6H, Val2-H ^{γ} , BHA-16), 0.48 (d, J = 6.6 Hz, 3H, Val2-H ^{γ}).

¹³C NMR (101 MHz, 4:1 CDCl₃/MeOD): δ (ppm) = 173.4 (BHA-1), 172.6 (Val-1), 171.5 (Val-1), 170.3 (Tyr-1), 155.6 (Tyr-*para*-Aromat), 130.3 (Tyr-*ortho*-Aromat), 127.4 (Tyr-*ipso*-Aromat), 115.1 (Tyr-*meta*-Aromat), 76.6 (BHA-3), 65.3 (Val- α), 60.6 (Val- α), 52.8 (Tyr- α), 43.5 (BHA-2), 35.3 (Tyr- β), 31.4 (BHA-CH₂), 29.4 (BHA-CH₂), 29.3 (BHA-CH₂), 29.0 (BHA-CH₂), 28.2 (Val- β), 27.8 (Val- β), 26.1 (BHA-CH₂), 22.0 (BHA-CH₂), 19.3 (Val- γ), 18.6 (Val- γ), 18.5 (Val- γ), 18.1 (Val- γ), 13.8 (BHA-16), 13.4 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₆H₆₀N₃O₆ [M+H]⁺: 630.4477, gef.: 694.4489.

1,3,4-Anhydro(L-threonyl-L-valyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-hexadecansäure) (97):



Das offenkettige Depsipeptid **82** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt nach Abspaltung vom Harz eingesetzt. Zu einer Lösung aus HBTU (2 Äq., 43 mg, 113 µmol) und DIPEA (2 Äq., 19 µl, 113 µmol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 36 ml) wurde eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **82** (56.3 µmol) und DIPEA (1 Äq., 9 µl, 56.3 µmol) in CH₂Cl₂/DMF (15:1, 8 ml) langsam mit einer Spritzenpumpe (2 ml/h) zugetropft. Die 1.3 mM Lösung des offenkettigen Zyklodepsipeptids **82** wurde anschließend über Nacht bei Rt gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden, wobei die α-Serin Epimere separat isoliert werden konnten. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und die Zyklodepsipeptide **97** und **98** als farblose Feststoffe erhalten.

Hauptisomer:

Ausbeute: 13.1 mg, 20.3 µmol, 36%.

IR (in Substanz): $\nu = 3317, 3062, 2924, 2855, 1722, 1662, 1547, 1464, 1382 \text{ cm}^{-1}$

HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 5.61 \text{ min}, m/z = 646.19 [M+H]^+$.

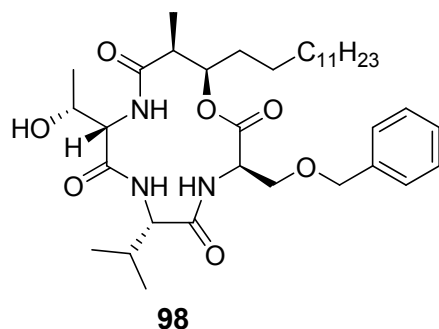
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 7.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ser-NH), 7.45 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, Val-NH), 7.24 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, Thr-NH), 7.21-7.09 (m, 5H, Aromat), 4.92 (ddd, $J = 10.0, 4.2, 2.7$ Hz, 1H, BHA3-H), 4.63 (td, $J = 8.3, 4.1$ Hz, 1H, Ser- H^α), 4.39 (s, 2H, CH_2Ph), 4.23 (dd, $J = 9.1, 3.3$ Hz, 1H, Thr- H^α), 3.99-3.86 (m, 2H, Thr- H^β , Val- H^α), 3.74 (dd, $J = 9.5, 4.3$ Hz, 1H, Ser- H^βa), 3.47 (dd, $J = 9.4, 4.1$ Hz, 1H, Ser- H^βb), 2.53 (dq, $J = 7.1, 4.7$ Hz, 1H, BHA2-H), 2.03 (qd, $J = 13.4, 6.7$ Hz, 1H, Val- H^β), 1.73-1.51 (m, 2H, BHA4- H_2), 1.19-1.08 (m, 22H, BHA- CH_2), 1.07 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, Thr- H^γ), 1.04 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, BHA2'- H_3), 0.80 (dd, $J = 6.6, 3.7$ Hz, 6H, Val- H^γ), 0.73 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, BHA-16).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 173.9 (BHA-1), 172.3 (Thr-1), 171.6 (Val-1), 168.8 (Ser-1), 137.0 (Aromat), 128.1 (Aromat), 127.5 (Aromat), 127.4 (Aromat), 77.7 (BHA-3), 73.0 (Ser- CH_2Ph), 69.7 (Ser- β), 65.4 (Thr- β), 58.9 (Val- α), 58.7 (Thr- α), 53.2 (Ser- α), 43.3 (BHA-2), 31.6 (BHA- CH_2), 29.4 (BHA- CH_2), 29.3 (BHA- CH_2), 29.1 (BHA- CH_2), 29.0 (BHA- CH_2), 28.6 (BHA-4), 28.1 (Val- β), 25.9 (BHA- CH_2), 22.4 (BHA- CH_2), 20.0 (Thr- γ), 19.2 (Val- γ), 17.9 (Val- γ), 13.8 (BHA-2'), 13.7 (BHA-16).

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 646.4426, gef.: 646.4436.

Aus dem gleichen Versuch konnte auch das kleinere Isomer, welches während der Veresterung am Ser- α epimerisiert war isoliert werden:

1,3,4-Anhydro(L-threonyl-L-valyl-3-O-benzyl-D-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-hexadecansäure) (98):



Ausbeute: 5.3 mg, 8.2 μmol , 14%.

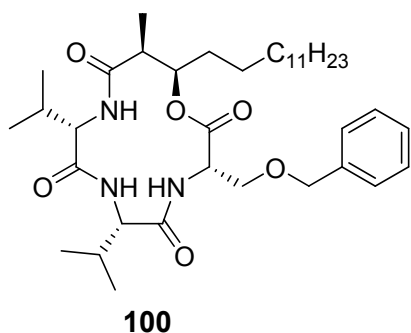
HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 4.95$ min, $m/z = 646.18$ $[M+H]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 7.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Val-NH), 7.54 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, Thr-NH), 7.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ser-NH), 7.25-7.12 (m, 5H, Aromat), 4.89 (ddd, $J = 9.9, 3.9, 2.8$ Hz, 1H, BHA3-H), 4.61-4.54 (m, 1H, Ser- H^α), 4.40 (q, $J = 11.3$ Hz, 2H, Ser- CH_2Ph), 4.32 (dd, $J = 9.9, 2.7$ Hz, 1H, Thr- H^α), 4.01 (dq, $J = 6.2, 2.7$ Hz, 1H, Thr- H^β), 3.96-3.93 (m, 1H, Ser- H^βa), 3.90-3.87 (m, 1H, Val- H^α), 3.66 (dd, $J = 9.5, 2.9$ Hz, 1H, Ser- H^β), 2.49 (dq, $J = 6.9, 4.7$ Hz, 1H, BHA2-H), 2.28 (qd, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 1H, Val- H^β), 1.65-1.52 (m, 1H, BHA4-Ha), 1.47-1.34 (m, 1H, BHA4-Hb), 1.21-1.07 (m, 22H, BHA- CH_2), 1.04 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, Thr- H^γ), 1.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, BHA2'- H_3), 0.83 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, Val- H^γa), 0.78 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, Val- H^γb), 0.73 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, BHA-16).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 174.5 (BHA-1), 173.3 (Val-1), 171.4 (Thr-1), 168.0 (Ser-1), 136.4 (Aromat), 128.4 (Aromat), 128.2 (Aromat), 128.1 (Aromat), 77.9 (BHA-3), 73.9 (Ser- CH_2Ph), 69.5 (Ser- β), 65.5 (Thr- β), 60.5 (Val- α), 57.9 (Thr- α), 52.5 (Ser- α), 43.7 (BHA-2), 31.6 (BHA- CH_2), 29.4 (BHA- CH_2), 29.3 (BHA- CH_2), 29.2 (BHA- CH_2), 29.1 (BHA- CH_2), 29.0 (BHA- CH_2), 28.7 (Val- β), 26.1 (BHA- CH_2), 22.4 (BHA- CH_2), 19.7 (Thr- γ), 19.1 (Val- γa), 17.5 (Val- γb), 13.7 (BHA-16), 13.3 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_7$ $[M+H]^+$: 646.4426, gef.: 646.4437.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-valyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-hexadecansäure) (100):



Das offenkettige Depsipeptid **83** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt nach Abspaltung vom Harz eingesetzt. Zu einer Lösung aus HBTU (2 Äq., 43 mg, 113 μmol) und DIPEA (2 Äq., 19 μl , 113 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (15:1, 36 ml) wurde eine Lösung des offenkettigen Vorläufers **83** (56.3 μmol) und DIPEA (1 Äq., 9 μl , 56.3 μmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (15:1, 8 ml) langsam mit einer Spritzenpumpe (2 ml/h) zugetropft. Die 1.3 mM Lösung des offenkettigen Depsipeptids **83** wurde anschließend über Nacht bei Rt gerührt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (2 x 5 ml) und ges. NaCl Lösung (2 x 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt werden, wobei das α -Serin Epimere nicht vom Produkt abgetrennt werden konnte. Nachdem das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde das restliche Lösungsmittel am Gefriertrockner entfernt und das Zyklopeptide **100** als farblose Feststoffe erhalten.

Ausbeute: 13.1 mg, 20.3 μmol , 36% dr: 4:1.

Hauptisomer:

IR (in Substanz): $\nu = 3350, 3303, 2921, 2855, 1732, 1648, 1546, 1387 \text{ cm}^{-1}$.

HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 7.41 \text{ min}$, $m/z = 644.21 [\text{M}+\text{H}]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 8.15 (t, $J = 7.69 \text{ Hz}$, 1H, Ser-NH), 7.51-7.30 (m, 5H, Aromat), 6.54 (d, $J = 5.45 \text{ Hz}$, 1H, Val1-NH), 5.30 (d, $J = 9.58 \text{ Hz}$, 1H, Val2-NH), 5.05 (ddd, $J = 9.86, 5.01, 3.12 \text{ Hz}$, 1H, BHA3-H), 4.56 (d, $J = 10.62 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2\text{Ph-a}$), 4.51 (d, $J = 8.06 \text{ Hz}$, 1H, Ser- H^α), 4.47 (d, $J = 10.56 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2\text{Ph-b}$), 4.12 (dd, $J = 9.00, 1.94 \text{ Hz}$, 1H, Ser- $\text{H}^{\beta\text{a}}$), 3.96 (t, $J = 10.43 \text{ Hz}$, 1H, Val2- H^α), 3.77 (dd, $J = 8.96, 1.96 \text{ Hz}$, 1H, Ser- $\text{H}^{\beta\text{b}}$), 3.11 (dd, $J = 10.96, 6.35 \text{ Hz}$, 1H, Val1- H^α), 3.04-2.94 (m, 1H, Val1- H^β), 2.20-2.10 (m, 1H, BHA2-H), 1.86-1.78 (m, 1H, Val2- H^β), 1.68-1.56 (m, 2H, BHA4- H_2), 1.39-1.18 (m, 22H, Kette), 1.07 (d, $J = 7.01 \text{ Hz}$, 3H, BHA2'- H_3), 0.95 (d, $J = 6.50 \text{ Hz}$, 6H, 2x Val1- H^γ), 0.92 (d, $J = 6.50 \text{ Hz}$, 3H, Val2- H^γ), 0.88 (t, $J = 6.96 \text{ Hz}$, 3H, BHA16- H_3), 0.79 (d, $J = 6.65 \text{ Hz}$, 3H, Val2- H^γ).

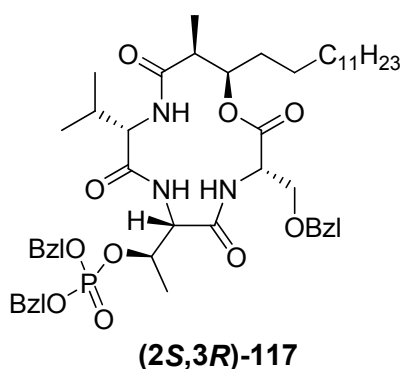
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, 4:1 $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ (ppm) = 174.2 (BHA-1, Val2-1), 173.3 (Val1-1), 170.3 (Ser-1), 138.2 (Aromat), 134.0 (Aromat), 130.4 (Aromat), 128.8

(Aromat), 77.7 (BHA-3), 74.4 (Ser-CH₂Ph), 70.7 (Ser-β), 68.8 (Val1-α), 60.3 (Val2-α), 54.2 (Ser-α), 45.1 (BHA-2), 32.5 (BHA-CH₂), 30.2 (BHA-CH₂), 29.9 (BHA-CH₂), 29.3 (BHA-CH₂), 28.2 (Val1-β), 28.0 (Val2-β), 26.5 (BHA-CH₂), 23.2 (BHA-CH₂), 20.4 (Val-γ), 20.0 (Val-γ), 19.3 (Val-γ), 18.9 (Val-γ), 14.8 (BHA-16), 14.1 (BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₃₇H₆₂N₃O₆ [M+H]⁺: 644.4633, gef.: 644.4632.

6.1.7 Versuche zur Phosphorylierung der Zyklodepsipeptide

**1,3,4-Anhydro(L-valyl-3-O-dibenzylphospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-
(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3R)-117):**



Tetrazol (5 Äq., 0.45 M in Acetonitril, 353 µl, 0.159 mmol) wurde mit dem benzylierten Makrozyklus **(2S,3R)-40** (20.5 mg, 31.7 µmol) in abs. CH₂Cl₂ (634 µl) gelöst und 10 min bei Rt gerührt. Nach Zugabe von Dibenzylisopropylphosphoramidit (6 Äq., 626 µl, 190 µmol) wurde weitere 3 h bei Rt gerührt und anschließend durch Zugabe einer *t*BuOOH-Lösung (6 Äq., 5.5 M, 35 µl, 190 µmol) 15 min lang bei 0°C oxidiert. Dann wurde mit 10%iger Na₂S₂O₃-Lösung (2 ml) gequenchet und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat (je 2 ml) extrahiert. Das Trocknen der organischen Phase erfolgte mit MgSO₄ woraufhin das Lösungsmittel entfernt wurde.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über eine präparative HPLC. Der relativ instabile Phosphotriester **(2S,3R)-117** lag zusammen mit Spuren des monodebenzylierten Produkts vor. Ohne weitere Trennung dieser Produkte wurde das Gemisch direkt weiter eingesetzt.

Ausbeute: 20.1 mg, 22.2 µmol, 70%.

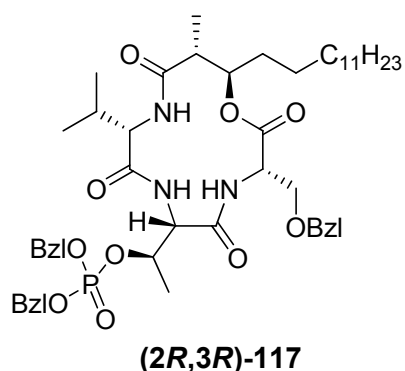
HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 8.01$ min, $m/z = 906.06$ $[M+H]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.63 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H; Ser-NH), 7.35-7.15 (m, 15H; aromat. H), 7.00 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H; Thr-NH), 6.46 (bs, 1H; Val-NH), 5.41-5.30 (m, 1H; Thr- H^β), 4.98-4.89 (m, 5H; POCH_2Ph , BHA3-H), 4.50 (td, $J = 7.1, 2.0$ Hz, 1H; Ser- H^α), 4.32 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.24 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.23-4.18 (m, 1H; Thr- H^α), 4.15 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H; Val- H^α), 3.88 (dd, $J = 9.2, 2.1$ Hz, 1H; Ser- H^βa), 3.70 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1H; Ser- H^βb), 2.24-2.15 (m, 1H; BHA2-H), 1.73-1.60 (m, 2H; Val- H^β , BHA4a- H_2), 1.59-1.49 (m, 1H; BHA4b- H_2), 1.32 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Thr- H^γ), 1.25-1.13 (m, 25H; BHA), 1.05 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H; BHA2'- H_3), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H; Val- H^γa), 0.81 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H; BHA16- H_3), 0.79 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Val- H^γb).

$^{31}\text{P NMR}$ (162.1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = -1.26.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ $[M+H]^+$: 906.5028, gef.: 906.5040.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-3-O-dibenzylphospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2R,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3R)-117):



Tetrazol (5 Äq., 0.45 M in Acetonitril, 340 μl , 153 μmol) wurde mit dem benzylierten Makrozyklus **(2R,3R)-40** (19.7 mg, 30.5 μmol) in abs. CH_2Cl_2 (610 μl) gelöst und 10 min bei Rt gerührt. Nach Zugabe von Dibenzylisopropylphosphoramidit (6 Äq., 626 μl , 183 μmol) wurde weitere 3 h bei Rt gerührt und anschließend durch Zugabe einer $t\text{BuOOH}$ -Lösung (6 Äq., 5.5 M, 34 μl , 183 μmol) 15 min lang bei 0°C oxidiert. Dann wurde mit 10%iger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (2 ml) gequenchet und die wässrige Phase

viermal mit Ethylacetat (je 2 ml) extrahiert. Das Trocknen der organischen Phase erfolgte mit MgSO_4 woraufhin das Lösungsmittel entfernt wurde.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über eine präparative HPLC. Der relativ instabile Phosphotriester **(2R,3R)-117** lag zusammen mit Spuren des monodebenzylierten Produkts vor. Ohne weitere Trennung dieser Produkte wurde das Gemisch direkt weiter eingesetzt.

Ausbeute: 22.1 mg, 24.4 μmol , 80%.

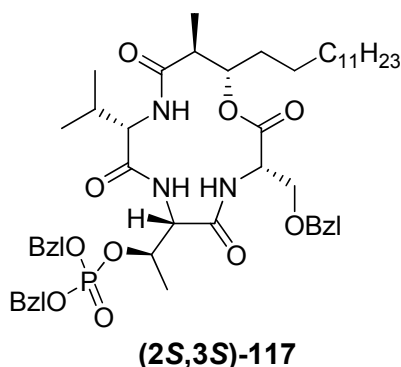
HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 8.03$ min, $m/z = 906.08$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.67 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H; Ser-NH), 7.24 (m, 15H; arom. H), 7.08 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H; Thr-NH), 6.04 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H; Val-NH), 5.44-5.32 (m, 1H; Thr- H^β), 4.99-4.92 (m, 4H; POCH_2Ph), 4.71 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H; BHA3-H), 4.47 (td, $J = 7.3, 2.2$ Hz, 1H; Ser- H^α), 4.36 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.25 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.18-4.01 (m, 2H; Thr- H^α , Val- H^α), 3.86 (dd, $J = 9.1, 2.2$ Hz, 1H; Ser- H^βa), 3.65 (dd, $J = 9.1, 2.5$ Hz, 1H; Ser- H^βb), 2.56 (dq, $J = 7.1, 0.55$ Hz, 1H; BHA2-H), 1.95-1.82 (m, 1H; Val- H^β), 1.76-1.55 (m, 2H; BHA4- H_2), 1.31 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Thr- H^γ), 1.26-1.09 (m, 25H; BHA, BHA2'- H_3), 0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H; Val- H^γa), 0.82 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H; Val- H^γa), 0.81 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H; BHA16- H_3).

^{31}P NMR (162.1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = -1.10.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 906.5028, gef.: 906.5035.

**1,3,4-Anhydro(L-valyl-3-O-dibenzylphospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-
(2S,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3S)-117):**



Tetrazol (5 Äq., 0.45 M in Acetonitril, 352 μ l, 157 μ mol) wurde mit dem benzylierten Makrozyklus **(2S,3S)-40** (20.2 mg, 31.3 μ mol) in abs. CH_2Cl_2 (634 μ l) gelöst und 10 min bei Rt gerührt. Nach Zugabe von Dibenzylisopropylphosphoramidit (6 Äq., 619 μ l, 188 μ mol) wurde weitere 3 h bei Rt gerührt und anschließend durch Zugabe einer *t*BuOOH-Lösung (6 Äq., 5.5 M, 35 μ l, 188 μ mol) 15 min lang bei 0°C oxidiert. Dann wurde mit 10%iger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (2 ml) gequench und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat (je 2 ml) extrahiert. Das Trocknen der organischen Phase erfolgte mit MgSO_4 woraufhin das Lösungsmittel entfernt wurde.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über eine präparative HPLC. Der relativ instabile Phosphotriester **(2S,3S)-117** lag zusammen mit Spuren des monodebenzylierten Produkts vor. Ohne weitere Trennung dieser Produkte wurde das Gemisch direkt weiter eingesetzt.

Ausbeute: 23.8 mg, 26.3 μ mol, 84%.

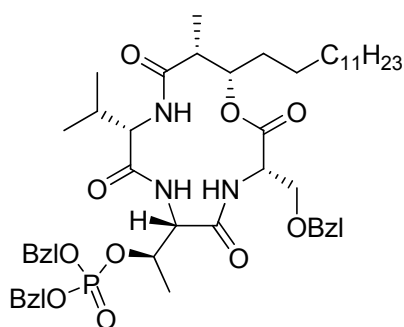
HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 7.41$ min, $m/z = 906.10$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.70 (bs, 1H; Thr-NH), 7.37-7.02 (m, 15H; aromat. H), 6.87 (bs, 1H; Ser-NH), 6.30 (bs, 1H; Val-NH), 5.02 (ddd, $J = 14.4, 6.6, 3.9$ Hz, 1H; Thr- H^β), 4.96-4.87 (m, 5H; BHA3-H, POCH_2Ph), 4.51 (dd, $J = 9.0, 3.4$ Hz, 1H; Thr- H^α), 4.44 (dd, $J = 9.8, 5.4$ Hz, 1H; Ser- H^α), 4.26 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H; Ser- CH_2Ph), 4.02-3.94 (m, 1H; Val- H^α), 3.70 (dd, $J = 9.5, 4.0$ Hz, 1H; Ser- H^βa), 3.60 (dd, $J = 9.5, 5.6$ Hz, 1H; Ser- H^βb), 2.59 (qd, $J = 13.9, 6.9$ Hz, 1H; BHA2-H), 2.04-1.77 (m, 2H; Val- H^β , BHA4a- H_2), 1.44 (ddd, $J = 14.9, 10.3, 5.1$ Hz, 1H; BHA4b- H_2), 1.31 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H; Thr- H^γ), 1.28-1.12 (m, 22H; BHA), 1.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H; BHA2'- H_3), 0.97 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H; Val- H^γa), 0.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H; Val- H^γb), 0.81 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H; BHA16- H_3).

^{31}P NMR (162.1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = -1.11.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 906.5028, gef.: 906.5039.

**1,3,4-Anhydro(L-valyl-3-O-dibenzylphospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-
(2R,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3S)-117):**



(2R,3S)-117

Tetrazol (5 Äq., 0.45 M in Acetonitril, 353 μ l, 0.159 mmol) wurde mit dem benzylierten Makrozyklus **(2R,3S)-40** (20.5 mg, 31.7 μ mol) in abs. CH_2Cl_2 (634 μ l) gelöst und 10 min bei Rt gerührt. Nach Zugabe von Dibenzylisopropylphosphoramidit (6 Äq., 626 μ l, 190 μ mol) wurde weitere 3 h bei Rt gerührt und anschließend durch Zugabe einer *t*BuOOH-Lösung (6 Äq., 5.5 M, 35 μ l, 190 μ mol) 15 min lang bei 0°C oxidiert. Dann wurde mit 10%iger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (2 ml) gequenchet und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat (je 2 ml) extrahiert. Das Trocknen der organischen Phase erfolgte mit MgSO_4 woraufhin das Lösungsmittel entfernt wurde.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über eine präparative HPLC. Der relativ instabile Phosphotriester **(2R,3S)-117** lag zusammen mit Spuren des monodebenzylierten Produkts vor. Ohne weitere Trennung dieser Produkte wurde das Gemisch direkt weiter eingesetzt.

Ausbeute: 21.8 mg, 24.1 μ mol, 76%.

HPLC-ESI (C4-70): $t_R = 7.84$ min, $m/z = 906.17$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.14 (bs, 1H; Thr-NH), 7.42-6.99 (m, 15H; arom. H), 6.80 (bs, 1H; Ser-NH), 6.43 (bs, 1H; Val-NH), 5.24-5.15 (m, 1H; BHA3-H), 5.02 (ddd, $J = 16.7, 6.4, 3.4$ Hz, 1H; Thr- H^β), 4.93-4.81 (m, 4H; POCH_2Ph), 4.53-4.44 (m, 2H; Thr- H^α , Ser- H^α), 4.29 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.22 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; Ser- CH_2Ph), 4.00 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H; Val- H^α), 3.65 (dd, $J = 9.5, 4.4$ Hz, 1H; Ser- H^βa), 3.55 (dd, $J = 8.8, 6.9$ Hz, 1H; Ser- H^βb), 2.76-2.59 (m, 1H; BHA2-H), 2.09-1.97 (m, 1H; Val- H^β), 1.98-1.69 (m, 2H; BHA4- H_2), 1.32 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H; Thr- H^γ),

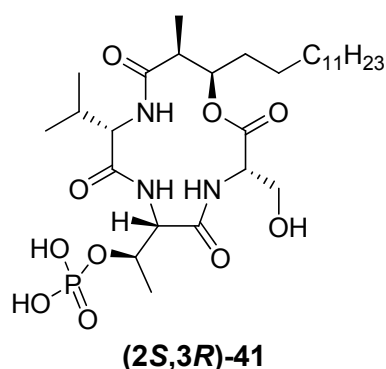
1.21 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H; BHA2'-H₃), 1.18 (s, 22H; BHA), 1.00-0.90 (m, 6H; Val-H^γ), 0.81 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H; BHA16-H₃).

³¹P NMR (162.1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -1.24.

HR-MS (ESI): ber. für C₅₀H₇₃N₃O₁₀P [M+H]⁺: 906.5028, gef.: 906.5038.

6.1.8 Versuche zur globalen Debenzylierung

1,3,4-Anhydro(L-valyl-phospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3R)-41):



Der benzylierte Makrozyklus ((**2S,3R**)-117, 15.3 mg, 16.9 μ mol) wurde in 3 ml EtOH suspendiert. Nach Zugabe von 10% Pd/C (6 mg) wurde die Reaktion 4 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt und anschließend über Celite filtriert. Nachdem gut mit Ethanol nachgewaschen worden war, wurde das Lösungsmittel entfernt. Über eine präparative HPLC wurde das Rohprodukt schließlich aufgereinigt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt, wodurch das phosphorylierte Zyklopeptid (**2S,3R**)-41 als farbloser Feststoff isoliert werden konnte.

Ausbeute: 8.2 mg, 14.7 μ mol, 87%.

HPLC-ESI (C4-50): $t_R = 6.35$ min; $m/z = 636.12$ [M+H]⁺, 658.33 [M+Na]⁺.

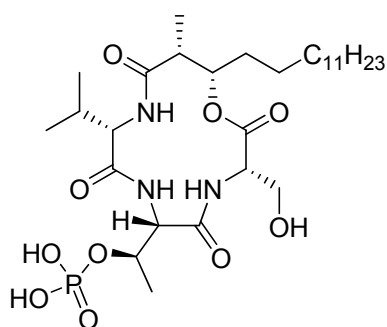
¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 1H; Val-NH), 8.01 (d, J = 7.9 Hz, 1H; Ser-NH), 7.61 (d, J = 8.9 Hz, 1H; Thr-NH), 4.85-4.77 (m, 1H; BHA3-H), 4.53-4.47 (m, 1H; Thr-H ^{β}), 4.45 (dt, J = 8.7, 4.3 Hz, 1H; Ser-H ^{α}), 4.19 (dd, J = 9.0, 4.6 Hz, 1H; Thr-H ^{α}), 3.97 (dd, J = 10.7, 10.7 Hz, 1H; Val-H ^{α}), 3.72 (dd, J = 11.3, 4.5 Hz, 1H; Ser-H ^{β a}), 3.62 (dd, J = 11.3, 4.1 Hz, 1H; Ser-H ^{β b}), 2.47-2.43 (m, 1H; BHA2-H), 1.96-1.80 (m, 1H; Val-H ^{β}), 1.63-1.51 (m, 1H; BHA4a-H₂), 1.42-1.29 (m, 1H; BHA4b-H₂), 1.30-1.12 (m, 25H; Thr-H ^{γ} , BHA), 1.03 (d, J = 7.0 Hz, 1H; BHA2'-H₃), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3H; Val-H ^{γ a}), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 3H; Val-H ^{γ b}), 0.85 (t, J = 6.9 Hz, 3H; BHA16-H₃).

¹³C NMR (151 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 170.8 (BHA-1, Val-1), 169.0 (Ser-1), 168.8 (Thr-1), 76.3 (BHA-3), 71.1 (Thr- β), 61.3 (Val- α), 60.3 (Ser- β), 59.3 (Thr- α), 53.4 (Ser- α), 43.3 (BHA-2), 31.3 (BHA), 29.3 (Val- β), 29.0 (BHA), 28.9 (BHA), 28.8 (BHA), 28.7 (BHA), 28.5 (BHA), 25.7 (BHA), 22.1 (BHA), 19.1 (Val- γ), 18.9 (Thr- γ), 13.9 (BHA-2', BHA-16).

³¹P NMR (162.1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -0.46.

HR-MS (ESI): ber. für C₂₉H₅₅N₃O₁₀P [M+H]⁺: 636.3620, gef.: 636.3619.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-phospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2R,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3S)-41):



(2R,3S)-41

Das benzylierte Zyklodepsipeptid ((2R,3S)-117, 19.0 mg, 21.0 μ mol) wurde in 3 ml EtOH suspendiert. Nach Zugabe von 10% Pd/C (7 mg) wurde die Suspension 4 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Die entstandene klare Lösung wurde anschließend über Celite filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer

entfernt. Das debenzilylierte Produkt **(2R,3S)-41** wurde ohne weitere Aufreinigung als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 13.1 mg, 20.3 μmol , 97%.

HPLC-ESI (C4-50): $t_R = 5.98$ min; $m/z = 636.15$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 658.35 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

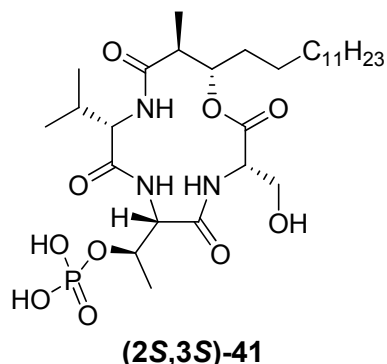
^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ (ppm) = 9.01 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H; Thr-NH), 8.38 (bs, 1H; Val-NH), 7.69 (bs, 1H; Ser-NH), 4.75 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.7$ Hz, 1H; BHA3-H), 4.58-4.47 (m, 1H; Thr- H^β), 4.32 (td, $J = 9.8, 6.1$ Hz, 1H; Ser- H^α), 4.05 (dd, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 1H; Thr- H^α), 3.87 (dd, $J = 10.8, 9.8$ Hz, 1H; Val- H^α), 3.59-3.45 (m, 2H; Ser- H^β), 2.50 (m, 1H; BHA2-H), 2.24-2.13 (m, 1H; Val- H^β), 1.77-1.63 (m, 1H; BHA4a- H_2), 1.47-1.35 (m, 1H; BHA4b- H_2), 1.32-1.12 (m, 28H; BHA2'- H_3 , BHA, Thr- H^γ), 0.93-0.73 (m, 9H; Val- H^γ , BHA16- H_3).

^{13}C NMR (151 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ (ppm) = 172.2 (BHA-1), 171.6 (Val-1), 170.1 (Thr-1), 168.8 (Ser-1), 76.1 (BHA-3), 69.2 (Thr- β), 62.0 (Val- α Ser- β), 59.6 (Thr- α), 55.8 (Ser- α), 43.0 (BHA-2), 31.3 (BHA), 29.8 (BHA), 29.0 (BHA), 28.9 (BHA), 28.8 (BHA), 28.7 (Val- β), 24.4 (BHA), 22.1 (BHA), 19.6 (Thr- γ), 19.1 (Val- γ), 13.9 (BHA-16), 8.8 (BHA-2').

^{31}P NMR (162.1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = -0.87.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 636.3620, gef.: 636.3619.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-phospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3S)-41):



Der benzylierte Makrozyklus ((**2S,3S**)-**117**, 22.9 mg, 25.3 μmol) wurde in 3 ml EtOH suspendiert. Nach Zugabe von 10% Pd/C (7 mg) wurde die Suspension 4 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt und anschließend die klare Lösung über Celite filtriert. Nachdem gut mit Ethanol nachgewaschen worden war, wurde das Lösungsmittel entfernt. Über eine präparative HPLC wurde das Rohprodukt aufgereinigt und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Das phosphorylierte Zyklopeptide (**2S,3S**)-**41** konnte als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 13.3 mg, 24.0 μmol , 95%.

HPLC-ESI (C4-50): $t_R = 5.52$ min; $m/z = 636.12$ [M+H]⁺, 658.35 [M+Na]⁺.

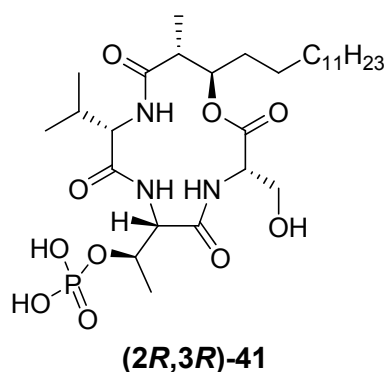
¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 8.59 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H; Val-NH), 8.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H; Thr-NH), 7.33 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H; Ser-NH), 4.66 (td, $J = 9.3, 4.4$ Hz, 1H; BHA3-H), 4.58-4.51 (m, 1H; Thr-H ^{β}), 4.25 (td, $J = 9.4, 5.5$ Hz, 1H; Ser-H ^{α}), 4.11 (dd, $J = 8.8, 4.1$ Hz, 1H; Thr-H ^{α}), 3.72 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H; Val-H ^{α}), 3.52 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H; Ser-H ^{β}), 2.76 (qd, $J = 13.7, 6.7$ Hz, 1H; BHA2-H), 2.07-1.95 (m, 1H; Val-H ^{β}), 1.78-1.67 (m, 1H; BHA4a-H₂), 1.50-1.39 (m, 1H; BHA4b-H₂), 1.32-1.14 (m, 25H; BHA, Thr-H ^{γ}), 0.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H; BHA2'-H₃), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Val-H ^{γ} a), 0.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; ; Val-H ^{γ} b), 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H; BHA16-H₃).

¹³C NMR (151 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 173.3 (BHA-1), 171.8 (Val-1), 169.4 (Thr-1), 168.1 (Ser-1), 76.5 (BHA-3), 69.5 (Thr- β), 62.0 (Ser- β), 61.8 (Val- α), 59.6 (Thr- α), 55.7 (Ser- α), 42.9 (BHA-2), 31.2 (BHA), 30.0 (BHA-4), 29.1 (BHA), 29.0 (Val- β), 28.8 (BHA), 28.7 (BHA), 22.6 (BHA), 22.0 (BHA), 19.5 (Val- γ a), 19.4 (Thr- γ), 19.1 (Val- γ b), 14.5 (BHA-2'), 13.9 (BHA-16).

³¹P NMR (162.1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -0.37.

HR-MS (ESI): ber. für C₂₉H₅₅N₃O₁₀P [M+H]⁺: 636.3620, gef.: 636.3619.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-phospho-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2*R*,3*R*)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2*R*,3*R*)-41):



Der benzylierte Makrozyklus ((2*R*,3*R*)-117, 22.0 mg, 24.3 μ mol) wurde in 3 ml EtOH suspendiert. Nach Zugabe von 10% Pd/C (7 mg) wurde die Suspension 4 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt und anschließend die klare Lösung über Celite filtriert. Nachdem gut mit Ethanol nachgewaschen worden war, wurde das Lösungsmittel entfernt. Über eine präparative HPLC wurde das Rohprodukt aufgereinigt und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Das phosphorylierte Zyklopeptid ((2*R*,3*R*)-41 konnte als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 12.8 mg, 23.1 μ mol, 95%.

HPLC-ESI (C4-50): $t_R = 6.98$ min; $m/z = 636.16$ [M+H]⁺, 658.35 [M+Na]⁺.

¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 8.79-8.41 (m, 2H; Ser-NH, Thr-NH) 8.26 (bs, 1H; Val-NH), 4.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H; BHA3-H), 4.59-4.46 (m, 2H; Ser-H ^{α} , Thr-H ^{β}), 4.15 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H; Thr-H ^{α}), 4.01 (dd, $J = 10.8, 10.8$ Hz, 1H; Val-H ^{α}), 3.75 (dd, $J = 11.2, 6.0$ Hz, 1H; Ser-H ^{β} a), 3.61 (dd, $J = 10.9, 2.3$ Hz, 1H; Ser-H ^{β} b), 2.53-2.51 (m, 1H; BHA2-H), 2.22-2.13 (m, 1H; Val-H ^{β}), 1.56-1.44 (m, 1H; BHA4a-H₂), 1.42-1.32 (m, 1H; BHA4b-H₂), 1.32-1.08 (m, 28H; BHA2'-H₃, BHA, Thr-H ^{γ}), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Val-H ^{γ} a), 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H; BHA16-H₃), 0.84 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H; Val-H ^{γ} b).

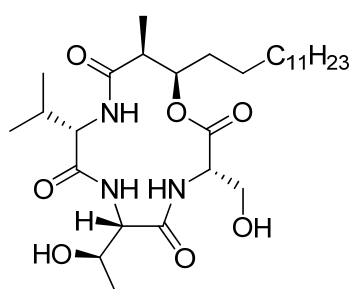
¹³C NMR (151 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 171.2 (Val-1), 170.2 (BHA-1), 170.0 (Thr-1), 169.7 (Ser-1), 76.9 (BHA-3), 70.0 (Thr- β), 61.6 (Val- α), 61.5 (Ser- β), 59.1 (Thr- α), 54.5 (Ser- α), 43.5 (BHA-2), 32.0 (BHA-4), 31.2 (BHA), 29.0 (BHA), 28.9 (BHA), 28.7

(BHA), 28.5 (Val- β), 25.0 (BHA), 22.0 (BHA), 20.0 (Thr- γ), 19.2 (Val- γ a), 19.0 (Val- γ b), 14.1 (BHA-2'), 13.9 (BHA-16).

^{31}P NMR (162.1 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = -1.26.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 636.3620, gef.: 636.3618.

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3R)-118):



(2S,3R)-118

Makrozyklus **(2S,3R)-40** (15.8 mg, 24.6 μmol) wurde mit 10% Pd/C (7 mg) in EtOH (2.5 ml) suspendiert. Nach Zugabe von HCl (25 μl , 1 N) wurde bei Rt über Nacht mit Hilfe eines Wasserstoffballons hydriert. Nach Filtration über Celite und waschen mit EtOH wurde das Lösungsmittel entfernt. Nach präparativer HPLC wurden 91% debenzyliertes Produkt **(2S,3R)-118** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 12.4 mg, 22.4 μmol , 91%.

R_f -Wert: 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1, v/v).

$[\alpha]_D^{20}$: -30.0° ($c = 0.5$, 1:1 MeOH/ CHCl_3).

IR (in Substanz): $\nu = 3444, 3333, 3085, 2922, 2852, 1729, 1656, 1550, 1466, 1367 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 8.12 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H; Val-NH), 7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H; Ser-NH), 7.46 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H; Thr-NH), 5.10 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H; Thr-OH), 4.88-4.77 (m, 2H; Ser-OH, BHA3-H), 4.49-4.42 (m, 1H; Ser- H^α), 4.10 (dd, $J = 9.8, 3.0$ Hz, 1H; Thr- H^α), 4.06-3.94 (m, 2H; Thr- H^β , Val-H α), 3.78 (ddd, $J = 10.2, 5.5,$

6. Experimenteller Teil

3.6 Hz, 1H; Ser-H^βa), 3.57 (dd, $J = 10.8, 4.5$ Hz, 1H; Ser-H^βb), 2.48-2.43 (m, 1H; BHA2-H), 1.91 (dq, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 1H; Val-H^β), 1.67-1.56 (m, 1H; BHA4a-H₂), 1.46-1.33 (m, 1H; BHA4b-H₂), 1.33-1.11 (m, 22H; BHA), 1.07 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H; Thr-H^γ), 1.04 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H; BHA2'-H₃), 0.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H; Val-H^γa), 0.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H; Val-H^γb), 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H; BHA16-H₃).

¹³C NMR (101 MHz, [D₆]DMSO): δ (ppm) = 170.9 (BHA-1), 170.8 (Val-1), 170.1 (Thr-1), 169.0 (Ser-1), 76.3 (BHA-3), 65.3 (Thr- β), 61.5 (Thr- α), 61.1 (Ser- β), 60.2 (Val- α), 53.5 (Ser- α), 43.1 (BHA-2), 39.7 (Val- β), 31.2 (BHA), 28.9 (BHA), 28.9 (BHA), 28.9 (BHA), 28.8 (BHA), 28.6 (BHA), 25.7 (BHA), 22.0 (BHA), 20.7 (Thr- γ), 19.1 (Val- γ a), 19.0 (Val- γ b), 13.9 (BHA-16; BHA-2').

HR-MS (ESI): ber. für C₂₉H₅₄N₃O₇ [M+H]⁺: 556.3956, gef.: 556.3950.

6.2 Zweidimensionale NMR-Experimente

Alle Spektren wurden auf einem Varian Unity Inova 600 NMR-Gerät durchgeführt. Zur eindeutigen Signalzuordnung wurden ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C gHSQC und ^1H - ^{13}C gHMBC Experimente durchgeführt.

Für ROESY Experimente wurden Proben unter Argon Atmosphäre in trockenem und sauerstofffreiem $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ gelöst, um Störungen paramagnetischer Verunreinigungen zu vermeiden. Es wurden jeweils 8 mg der Zyklodepsipeptide **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40** sowie **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** in 0.5 ml $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ gemessen. Zur Bestimmung der optimalen Parameter wurden ROESY-Spektren der Verbindung **(2R,3S)-40** mit verschiedenen Mischzeiten (150, 200, 300, 500 ms) aufgenommen. Der höchste Wert, welcher noch einen linearen Zusammenhang zwischen Signalvolumen und Abstand garantierte (300 ms), wurde für alle weiteren Messungen verwendet.

Die Aufnahme-Parameter der 2-D-NMR Experimente waren wie folgt:

TOCSY: 16 Scans, 512 Spuren, 80 ms Mischzeit

gHSQC: 16 Scans, 512 Spuren

gHMBC: 16 Scans, 400 Spuren, 8 Hz gHMBC Kopplungskonstante

ROESY: 16 Scans, 512 Spuren, 300 ms Mischzeit, 2 s Relaxationszeit

Abbildungen der 2D-Spektren der Verbindungen **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40** sowie **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** befinden sich im Anhang und werden in Kapitel 4.2.1 diskutiert.

Zur Integration der Kreuzsignalvolumina aus 2D-ROESY Spektren wurde das Programm Aurelia der Firma Bruker mit implementierter off-set Korrektur verwendet.^[139] Als Referenz diente der Abstand zweier geminaler Protonen (BHA4-H₂) von 1.8 Å.

Die berechneten Abstände für die Zyklodepsipeptide **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40** sowie **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** werden im Anhang angegeben und klassifiziert.

6.3 Molekülrechnungen

6.3.1 Allgemeines

Alle Rechnungen wurden mit Hilfe des Programmpakets MakroModel 9.1 der Firma Schrödinger Software (Portland, Oregon, USA, www.schrodinger.com) auf einem Linux-Cluster der transtec AG (Tübingen, Deutschland) mit zehn Opteron-Prozessoren durchgeführt. Die Auswertungen erfolgten über das integrierte, graphische Interface Maestro 7.5. 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.

Alle Energieminimierungen wurden im Kraftfeld OPLS2005^[82] (Optimized Potential for Liquid Simulations) durchgeführt, welches explizit für zyklische Peptide in Lösung optimiert wurde. Das implementierte GB/SA (Generalized Born Surface Area)-Kontinuum-Modell^[145] wurde für Simulationen in Lösung benutzt. Als Energie-Optimierungsverfahren wurde die TNCG (truncated Newton conjugated gradient) Methode^[83] mit einem Konvergenzkriterium eines maximalen Gradient von 0.01 kJ/mol/Å gewählt, welcher nach maximal 10.000 Iterationen erreicht wurde. Um die Richtung der Minimierungsschritte zum lokalen Minimum zu bestimmen, wird der sogenannte „line search“ Parameter benötigt. Durch eine Änderung des Standardwertes von 0 auf 1, wurde statt des im TNCG-Algorithmus festgelegten Verfahrens das MakroModel Standardverfahren verwendet, wodurch vorangegangene Konvergenzprobleme vollständig behoben werden konnten.

6.3.2 Konformationsanalyse

Zur Konformationsanalyse der Makrozyklen wurde das speziell für Proteinschleifen und zyklische Peptide entwickelte LMOD (low mode)-Verfahren^[84] herangezogen, mit dessen Hilfe 35.000 Startgeometrien erzeugt und in ihrer Energie minimiert wurden.

Ein bereits gefundenes Konformer wurde mit einem neu generierten verglichen, indem alle Nicht-Wasserstoff Atome übereinander gelegt. In dieser Betrachtung wurde die frei rotierbare Fettsäurekette auf drei Kohlenstoffatome verkürzt und die Benzylgruppe außer Acht gelassen. Die Abweichung der Strukturen voneinander wurde durch den rmsd-Wert (root mean square deviation) angegeben. Bei einer Abweichung von ≥ 5 Å wurde die Struktur als neues Konformer („unique structure“) abgespeichert. Alle Konformationen, die in einem Bereich bis 50 kJ/mol über dem globalen Minimum gefunden wurden, wurden gespeichert.

Für Analysen mit Randbedingungen wurden die durch ROESY-Experimente erhaltenen Proton-Proton Abstände mit einer erlaubten Abweichung von 10% verwendet. Hierbei wurden ausschließlich eindeutig zuzuordnende Abstände verwendet. Es wurden keine Pseudoatome für Abstände zu Methylgruppen generiert. Im ROESY unterscheidbare, diastereotope Protonen konnten ohne Definition der Chiralität des betroffenen Kohlenstoffes verwendet werden, wodurch das Programm selbstständig die energieärmste Zuordnung vornahm. Berechnete Torsionswinkel gingen hingegen nicht in die Randbedingungen mit ein, sondern wurden nur zur anschließenden Validierung der berechneten Konformationen eingesetzt.

Als Kriterium für die Vollständigkeit der Konformationssuche wurde die Anzahl der Wiederholungen herangezogen, die für das Auffinden eines Konformers angegeben wurde. Des Weiteren wurden die Rechnungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit mit verschiedenen Startgeometrien wiederholt. Wurden keine neuen Konformere gefunden, wurde die Konformationssuche als vollständig angesehen.

Nach Beendigung aller Rechnungen wurden die erhaltenen Konformationen mit dem Programm XCluster (Firma Schrödinger) nach berechneten Ähnlichkeiten gruppiert. Dies geschah mit Hilfe eines RMSD-Kriteriums von 0.1 Å, mit dem alle Konformere, die bei einem Übereinanderlegen der gefundenen Strukturen weniger als 0.1 Å voneinander abwichen einem Konformationscluster zugeordnet wurden.

Unter diesen Bedingungen wurden Konformationsanalysen für alle synthetisierten Analoga der Makrozyklen **40**, **96**, **118** und **41** durchgeführt. Konformationen mit Randbedingungen aus NMR-Experimenten wurden ausschließlich für die Makrozyklen **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40** sowie **(2S,3R)-96** und **(2R,3S)-96** ermittelt.

6.4 Biochemische Untersuchungen

6.4.1 Reagenzien und Instrumente

6.4.1.1 Phosphatase Inhibierung

Inhibitoren:

Die potentiellen Inhibitoren lagen alle in 10 mM Stammlösungen in DMSO vor.

Enzyme:

Die Phosphatasen VHR, PTP1B und PP1 wurden von Dr. K. Alexandrov (Max-Planck-Institut Dortmund) exprimiert und isoliert. VHR lag in einer Konzentration von 12.5 mg/ml vor, PTP1B in 13 mg/ml und PP1 in 0.6 mg/ml.

Die Phosphatasen Cdc25a (0.5 mg/ml), MPTPA (0.4 mg/ml), MPTPB (1.2 mg/ml) und SHP2 (0.4 mg/ml) wurden freundlicherweise von Prof. H. Schwalbe (Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt.

Die mit einem GST-Label versehene Phosphatase PTPN2 (1.35 mg/ml) wurde von der Firma Stratagene (Amsterdam, NL) bezogen.

Die Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase VE-PTP wurde von Dr. G. Cagna (Institut für Zellbiologie, ZMBE Münster) erhalten.

Malachitgrün-Lösung:

Malachitgrünnoxalat (350 mg, 0.38 mmol) und Ammoniummolybdat (3.2 g, 2.59 mmol) wurden in 33%iger HCl (45 ml) gelöst und mit Millipore-Wasser auf 150 ml aufgefüllt. Nach Rühren über Nacht wurde die orange Lösung zweimal filtriert und lichtgeschützt bei +4°C aufbewahrt.

Angaben:

Endverdünnungen und -konzentrationen beziehen sich auf die Verdünnung/Konzentration in 100 µl Gesamtvolumen der Assaylösung.

Instrumente und Hilfsmittel:

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

UV-Vis-Absorptionen wurden an einem Multiskan Ascent Mikrotiterplatten-Photometer der Firma Thermo detektiert.

6.4.1.2 Zelluläre Untersuchungen

Zellen:

HeLa (Gebärmutterhalskrebszellen von Henrietta Lacks)

Gele/ Membranen:

Für die Auftrennung der Proteine aus Zelllysaten wurden 10% SDS-Gele und für Westernblots 0.45 µm, 88518 PVDF-Transfermembranen (Pierce, USA); verwendet.

TBS-T:

0.1% Tween-20, 100 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5 in H₂O.

Antikörper:

Es wurde der pERK-Antikörper pERK 1/2, sc-16982-R (Santa Cruz Biotechnology; USA), sowie der ERK-Antikörper p44/42 MAP Kinase Antikörper #9102 (Cell Signaling, USA) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde der HRP-konjugierte Anti-Kaninchen IgG Antikörper Produktnr. 31460 (Pierce, USA) verwendet.

Instrumente und Hilfsmittel:

Protean II xi XL Gelelektrophorese System (BioRad, Hercules, USA);
Röntgenfilm, CL-Xposure, 8"x10", 34091 (Pierce, Rockford, USA);
Trans-Blot, Transferkammer, 170-3940 (BioRad, Hercules, USA).

6.4.1.3 Assays zur antibakteriellen Wirkung

Bakterien:

Es wurden die Bakterienstämme *Staphylococcus Aureus* (DSM Nr.: 1104), *Bacillus Subtilis* (DSM Nr.: 10) und *Micrococcus Luteus* (DSM Nr.: 348) verwendet.

Antibiotika:

Als Kontrollen wurden Tetracyclin und Ampicillin (Sigma-Aldrich) eingesetzt.

6.4.2 Phosphatase Aktivitätsscreen

Enzym-Assay für die dualspezifische Phosphatase VHR

In einer Mikrotiterplatte wurde eine Inhibitorlösung (50 μ l, Endverdünnung 100 μ M, Puffer: 25 mM MOPS, 5 mM EDTA, 1 mM DTE, 0.025% NP-40, pH 6.5) vorgelegt und 30 min mit VHR in Pufferlösung (30 μ l, Endverdünnung 1:1600, Puffer: 25 mM MOPS, 5 mM EDTA, 1 mM DTE, 0.025% NP-40, pH 6.5) bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von pNPP (20 μ l, 10 mM Endverdünnung) wurde 40 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 405 nm die Absorption detektiert. Zur Überprüfung der so erhaltenen Ergebnisse wurde anschließend eine weitere Endpunktbestimmung durchgeführt, indem zu jedem Reaktionsvolumen NaOH (10 μ l einer 2 N Lösung) gegeben wurde und erneut bei 405 nm die Absorption im Mikrotiterplattenleser gemessen wurde. Als Hintergrundmessung wurde parallel eine Reaktion ohne Enzym und als Positivkontrolle eine Reaktion ohne Inhibitor vermessen.

Die Ergebnisse des *in vitro* Phosphatase-Screens sind in Abbildung 69 (Kapitel 4.3.1) angegeben.

Enzym-Assay für die dualspezifische Phosphatase Cdc25a

In einer Mikrotiterplatte wurde das Enzym in Puffer (80 μ l, Puffer: 50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM DTE, 0.0025% NP-40, pH 8.0) vorgelegt und Inhibitor in Puffer (10 μ l, 100 μ M Endkonzentration) zugegeben. Nach 10 min wurde pNPP (10 μ l, 50 mM Endkonzentration) zupipettiert und nach weiteren 40 min bei Rt wurde an einem Plattenleser die Absorption bei 405 nm detektiert. Als Hintergrundmessung wurde parallel eine Reaktion ohne Enzym und als Positivkontrolle eine Reaktion ohne Inhibitor vermessen.

Die Ergebnisse des *in vitro* Phosphatase-Screens sind in Abbildung 73 (Kapitel 4.3.1) angegeben.

Enzym-Assay für die Phosphatasen MPTPA, MPTPB, PTP1B, SHP2

In einer Mikrotiterplatte wurde das Enzym in Puffer (80 μ l, Puffer: 25 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTE, 0.0025% NP-40, pH 7.2) vorgelegt und 10 min mit Inhibitorlösung (10 μ l, 100 μ M Endkonzentration) bei Rt inkubiert. Anschließend wurde pNPP-Lösung (10 μ l, 1 mM Endkonzentration) zugegeben und nach 30 min Reaktionszeit die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplattenleser detektiert. Als Hintergrundmessung wurde parallel eine Reaktion ohne Enzym und als Positivkontrolle eine Reaktion ohne Inhibitor vermessen.

Die Ergebnisse des *in vitro* Phosphatase-Screens sind in Abbildung 73 (Kapitel 4.3.1) angegeben.

Enzym-Assay für die Phosphatase VE-PTP

In einer Mikrotiterplatte wurde VE-PTP in Puffer (80 µl, Puffer: 50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTE, 0.0025% NP-40, pH 8.0) vorgelegt und 10 min mit Inhibitorlösung (10 µl, 100 µM Endkonzentration) bei Rt inkubiert. Anschließend wurde pNPP (10 µl, 1 mM Endkonzentration) zugegeben und nach 30 min Reaktionszeit bei Rt die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplattenleser detektiert. Als Hintergrundmessung wurde parallel eine Reaktion ohne Enzym und als Positivkontrolle eine Reaktion ohne Inhibitor vermessen.

Die Ergebnisse des *in vitro* Phosphatase-Screens sind in Abbildung 73 (Kapitel 4.3.1) angegeben.

Enzym-Assay für die Serin/Threonin-spezifische Phosphatase PP1

In einer Mikrotiterplatte wurde PP1 in Puffer (80 µl, Puffer: 40 mM TRIS, 20 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 2 mM DTT, pH 8.1) vorgelegt und 10 min mit Inhibitorlösung (10 µl, 100 µM Endkonzentration) bei Rt inkubiert. Anschließend wurde pNPP-Lösung (10 µl, 5 mM Endkonzentration) zugegeben und nach 15 min Reaktionszeit die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplattenleser detektiert. Als Hintergrundmessung wurde parallel eine Reaktion ohne Enzym und als Positivkontrolle eine Reaktion ohne Inhibitor vermessen.

Die Ergebnisse des *in vitro* Phosphatase-Screens sind in Abbildung 73 (Kapitel 4.3.1) angegeben.

6.4.3 Untersuchungen der VHR-Inhibition *in vitro*

Test der Enzymaktivität des erhaltenen VHRs:

In einer Mikrotiterplatte wurden zu 50 µl VHR (Endverdünnungen von 1:50 bis 1:6400 mit Puffer B) jeweils 50 µl 20 mM pNPP-Lösung (Endverdünnung 10 mM) pipettiert. Bei 405 nm und 37°C konnte die Extinktion des dephosphorylierten Substrats alle 2 min für 40 min gemessen werden. Alle Messungen wurden dreifach ausgeführt und zur Bestimmung des Hintergrundes wurden 50 µl Puffer B mit 50 µl 20 mM pNPP vermessen.

Schließlich wurde eine Enzymverdünnung gewählt, bei der ein linearer Anstieg der Extinktion um ca. 0.5 innerhalb von 30 min gewährleistet werden konnte. Bei der von mir benutzten VHR-Charge war dies eine Verdünnung von 1:1600 (ca. 0.37 $\mu\text{mol/l}$).

K_M-Bestimmung

Zur Bestimmung des K_M-Wertes wurden verschiedene Konzentrationen des Substrates pNPP (Endkonzentrationen von 250 bis 1.95 mM in Puffer B) verwendet. Die Dephosphorylierung wurde durch Zugabe der dualspezifischen Phosphatase VHR in der zuvor bestimmten optimalen Endverdünnung von 1:1600 gestartet. Bei 37°C und 405 nm wurden alle 2 min insgesamt 20 Messpunkte gesammelt. Auch in diesem Experiment wurden Dreifachbestimmungen, sowie eine Hintergrundmessung durchgeführt. Für diese Messung wurde reines Substrat in Puffer bei identischen Konzentrationen zur Dephosphorylierungs-Reaktion vermessen. Als Kontrolle wurde anschließend nach Zugabe von je 10 μl 2 N NaOH-Lösung eine Endpunktbestimmung bei 405 nm durchgeführt.

Durch Auftragung der Extinktion gegen die Substratkonzentration konnte mit Hilfe einer durch Origin ermittelten Regressionskurve wie auch durch die Hanes-Auftragung ein K_M von 27 mM bestimmt werden.

Allgemeine Durchführung von IC₅₀-Bestimmungen

In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 μl Inhibitor-Lösung (Endkonzentrationen von 0-100 μM in Puffer B) vorgelegt und mit jeweils 30 μl VHR (Endverdünnung 1:1600) bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von jeweils 20 μl pNPP (10 mM Endkonzentration) die Dephosphorylierungsreaktion in Gang gesetzt und umgehend die Absorption bei 405 nm für 60 min gemessen (alle zwei Minuten ein Messpunkt).

Anschließend wurde nach Zugabe von je 10 μl 2N NaOH-Lösung eine Endpunktbestimmung bei 405 nm durchgeführt.

Als Positiv-Kontrollen dienten Messungen ohne Inhibitor und mit dem bekannten PTP Inhibitor IV von Calbiochem. Als Hintergrund wurde die Absorption von Puffer B mit pNPP bestimmt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die relativen IC₅₀-Werte wurden nach einer grafischen Auswertung mit Hilfe des Programms Origin ermittelt.

Ergebnisse der IC₅₀-Bestimmungen werden in Tabelle 11 in Kapitel 4.3.1 aufgeführt.

Malachitgrün-Test

In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden zur Kalibrierung zunächst jeweils 50 µl verschiedener Konzentrationen (200 bis 1.56 µM) von Na₂HPO₄ in Puffer B vorgelegt. Analog wurden jeweils 50 µl 200 bis 1.56 µM Lösungen der phosphorylierten Verbindung **(2S,3R)-41** vorpipettiert. Anschließend wurde in alle Wells 30 µl 1:480 verdünnte VHR-Lösung gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Malachitgrün-Lösung wurden weitere 15 min bei Rt inkubiert und schließlich bei einer Wellenlänge von 620 nm die Absorption gemessen.

Als Kontrollen dienten 80 µl Puffer B, sowie 50 µl Puffer B mit 30 µl VHR-Lösung und 30 µl Puffer B mit 50 µl Inhibitor. Zu allen Kontrollen wurden ebenfalls 50 µl Malachitgrün-Lösung gegeben.

Ergebnisse der Malachitgrün-Untersuchungen werden in Kapitel 4.3.1 diskutiert.

6.4.4 Zelluläre Untersuchungen zum ERK-Phosphorylierungsgrad

Zelllyse

Die zu untersuchenden HeLa-Zellen wurden mit PBS (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4 in H₂O) gewaschen und anschließend bei 0°C für 10 min mit RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF) lysiert. Nachdem die Zellen mit einem Schaber von der Kulturschale gelöst worden waren, wurden die Zellen durch Ultraschall auf Eis aufgeschlossen (2 x 10 sec, 40 Watt). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (15 min bei 14000 rpm und 4°C) und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Der Überstand wurde sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

Gel-Elektrophorese

Um die im Zelllysats enthaltenen Proteine aufzutrennen, wurde eine SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis) durchgeführt. Hierzu wurden ca. 17 µg Gesamtprotein (50 µl Überstand des Zelllysats) mit 5x SDS-Probenpuffer (312 mM Tris-Cl, 10% SDS, 50% Glycerol, 10 mM DTT in H₂O) in die Taschen des Trenngels pipettiert und das Gel in Laufpuffer (0.025 M Tris, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS in H₂O) bei konstanten 20 mA laufen gelassen.

Westernblot

Für einen Westernblot (Immunblot) wurden die gelelektrophoretisch getrennten Proteine durch ein elektrisches Feld auf eine Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel kurz mit Blotpuffer (48 mM Tris, 39 mM Lysin, 20 % Methanol, 1.3 mM SDS; pH 9.2) gewaschen und anschließend auf die in Methanol aktivierten und in Blotpuffer inkubierten Membran gelegt. Bei einem konstanten Feld von 22 V wurden die Proteine für 45 min auf die Membran übertragen, welche anschließend für 60 min mit 3% SlimFast in TBS-T blockiert wurde. Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären pERK-Antikörper (1:2000 pERK-Antikörper/(1.5% SlimFast in TBS-T) inkubiert. Nachdem die Antikörper-Lösung entfernt worden war, wurde die Membran mit TBS-T (3 x 10 min) gewaschen. Anschließend wurde zur Signalverstärkung mit einem sekundären Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen Meerrettichperoxidase konjugiert 1:15000 in TBS-T) für mindestens 1 h inkubiert. Nachdem die Membran erneut mit TBS-T (3 x 10 min) gewaschen worden war, wurde 5 min mit einer Luminol/Peroxid Lösung (1:1 Super Signal West Pico Enhancer Lösung/Super Signal West Pico Peroxid Lösung) inkubiert und die abgetropfte Membran in einer Belichtungskassette mit einem Röntgenfilm 20 min belichtet. Schließlich wurde der Röntgenfilm entwickelt und fixiert.

Zur Kontrolle wurden die Antikörper von der Membran entfernt (gestrippt), indem sie eine Stunde bei 55°C mit Stripping-Puffer (100 mM NaOH, 2% SDS und 0.5% DTT) behandelt wurden. Nach mehrmaligem kurzen Waschen mit Wasser und zuletzt TBS-T konnte die Membran anschließend analog zu der vorangegangenen Methode nach dem Blockieren mit 5% Magermilchpulver in TBS-T mit ERK-Antikörpern (1:1000 in TBS-T mit 5% Magermilchpulver) behandelt werden, um sowohl die Menge des phosphorylierten als auch des unphosphorylierten ERKs sichtbar zu machen.

Auf diese Weise wurden bei konstanter Menge an gesamtem ERK unterschiedlich starke Banden für das phosphorylierte Protein (pERK) detektiert.

Zeitreihe

HeLa-Zellen wurden durch Trypsinierung passagiert und anschließend auf Kulturschalen ausgesät. Nach Aushungern der Zellen über Nacht wurden diese für eine Stunde bei 37°C mit dem Inhibitor **(2S,3R)-40** (50 µM) inkubiert. Anschließend wurde mit 10% Serum stimuliert und nach 5, 10, 15, 30 und 60 min lysiert. Die erhaltenen Proteine wurden auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden sie in einem Westernblot (Immunoblot) auf eine PVDF-Membran übertragen und mit pERK-Antikörpern angefärbt. Zur Kontrolle wurden die gleichen Gele anschließend gestrippt und mit einem ERK-Antikörper geblottet.

Zum Vergleich wurde das Experiment parallel ohne Inhibitor durchgeführt.

Alle zellulären Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Karin Warburg (MPI Dortmund) durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.3.2 diskutiert.

6.4.5 Antibakterielle Assays

Die antibakterielle Aktivität gegen die Bakterienstämme *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Subtilis* und *Micrococcus Luteus* wurde mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode nach der DIN-Norm 58940 bestimmt. Ein Müller/Hinton Medium (Fleischinfus 2.0 mg/ml, Kaseinhydrolysat 17.5 mg/ml, Stärke 1.5 mg/ml) wurde hierzu mit fünf unabhängigen Kolonien der zu testenden Bakterien beimpft. Die Bakterien wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf 10000 bis 50000 Kolonie bildende Einheiten pro ml verdünnt und für die Untersuchung genutzt (DIN 58940-81). Der Test wurde in 96-Well-Platten mit zwei Antibiotika (Tetracyclin; Ampicillin) als Kontrollen durchgeführt. Die Inhibitoren **(2S,3S)-40**, **(2S,3R)-40**, **(2R,3R)-40**, **(2R,3S)-40**, **(2S,3R)-118** und **(2S,3R)-41** wurden bei einer Konzentration von 50 µM getestet. Die Bakterien wurden 24 Stunden mit System Duetz Abdeckungen (System Duetz, Niederlande) bei 37°C mit 180 Umdrehungen pro Minute kultiviert. Das Wachstum der Bakterien wurde anschließend über die optische Streuung bei 543 nm bestimmt. Als Kontrolle diente das Bakterien-Wachstum ohne Inhibitor. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt.

Die Ergebnisse der antibakteriellen Assays werden in Kapitel 4.3.3 besprochen.

Die Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Bernhard Ellinger (MPI Dortmund) durchgeführt.

7. Literaturverzeichnis

- [1] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al., *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [2] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. Q. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. H. Zhang, G. L. G. Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, C. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. M. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. M. Ge, F. C. Gong, Z. P. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. X. Ke, K. A. Ketchum, Z. W. Lai, Y. D. Lei, Z. Y. Li, J. Y. Li, Y. Liang, X. Y. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. X. Shue, J. T. Sun, Z. Y. Wang, A. H. Wang, X. Wang, J. Wang, M. H. Wei, R. Wides, C. L. Xiao, C. H. Yan, et al., *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.

- [3] S. G. Gregory, K. F. Barlow, K. E. Mclay, R. Kaul, D. Swarbreck, A. Dunham, C. E. Scott, K. L. Howe, K. Woodfine, C. C. A. Spencer, M. C. Jones, C. Gillson, S. Searle, Y. Zhou, F. Kokocinski, L. McDonald, R. Evans, K. Phillips, A. Atkinson, R. Cooper, C. Jones, R. E. Hall, T. D. Andrews, C. Lloyd, R. Ainscough, J. P. Almeida, K. D. Ambrose, F. Anderson, R. W. Andrew, R. I. S. Ashwell, K. Aubin, A. K. Babbage, C. L. Bagguley, J. Bailey, H. Beasley, G. Bethel, C. P. Bird, S. Bray-Allen, J. Y. Brown, A. J. Brown, D. Buckley, J. Burton, J. Bye, C. Carder, J. C. Chapman, S. Y. Clark, G. Clarke, C. Clee, V. Copley, R. E. Collier, N. Corby, G. J. Coville, J. Davies, R. Deadman, M. Dunn, M. Earthrowl, A. G. Ellington, H. Errington, A. Frankish, J. Frankland, L. French, P. Garner, J. Garnett, L. Gay, M. R. J. Ghori, R. Gibson, L. M. Gilby, W. Gillett, R. J. Glithero, D. V. Grafham, C. Griffiths, S. Griffiths-Jones, R. Grocock, S. Hammond, E. S. I. Harrison, E. Hart, E. Haugen, P. D. Heath, S. Holmes, K. Holt, P. J. Howden, A. R. Hunt, S. E. Hunt, G. Hunter, J. Isherwood, R. James, C. Johnson, D. Johnson, A. Joy, M. Kay, J. K. Kershaw, M. Kibukawa, A. M. Kimberley, A. King, A. J. Knights, H. Lad, G. Laird, S. Lawlor, D. A. Leongamornlert, D. M. Lloyd, et al., *Nature* **2006**, *441*, 315-321.
- [4] S. Hanash, *Nature* **2003**, *422*, 226-232.
- [5] S. D. Patterson, R. H. Aebersold, *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 311-323.
- [6] A. Schratzenholz, V. Soskic, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1520-1528.
- [7] K. Hübel, T. Leßmann, H. Waldmann, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1361-1374.
- [8] D. J. Newman, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589-2599.
- [9] L. A. Wessjohann, E. Ruijter, D. Garcia-Rivera, W. Brandt, *Mol. Diversity* **2005**, *9*, 171-186.
- [10] F. Sarabia, S. Chammaa, A. S. Ruiz, L. M. Ortiz, F. J. L. Herrera, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1309-1332.
- [11] Y. Hamada, T. Shioiri, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4441-4482.
- [12] S. Hess, O. Ovadia, D. E. Shalev, H. Senderovich, B. Qadri, T. Yehezkel, Y. Salitra, T. Sheynis, R. Jelinek, C. Gilon, A. Hoffman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6201-6211.
- [13] J. Matsoukas, V. Apostolopoulos, H. Kalbacher, A. M. Papini, T. Tselios, K. Chatzantoni, T. Biagioli, F. Lolli, S. Deraos, P. Papatthanassopoulos, A. Troganis, E. Mantzourani, T. Mavromoustakos, A. Mouzaki, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1470-1480.
- [14] S. Fung, V. J. Hruby, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 352-358.
- [15] C. Gilon, D. Halle, M. Chorev, Z. Selinger, G. Byk, *Biopolymers* **1991**, *31*, 745-750.

- [16] M. P. Glenn, M. J. Kelso, J. D. A. Tyndall, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 640-641.
- [17] A. R. Dentino, P. A. Raj, K. K. Bhandary, M. E. Wilson, M. J. Levine, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18460-18468.
- [18] J. F. Atkins, R. Gesteland, *Science* **2002**, *296*, 1409-1410.
- [19] D. R. March, G. Abbenante, D. A. Bergman, R. I. Brinkworth, W. Wickramasinghe, J. Begun, J. L. Martin, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3375-3379.
- [20] V. J. Hruby, F. Alobeidi, W. Kazmierski, *Biochem. J.* **1990**, *268*, 249-262.
- [21] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623.
- [22] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164-15172.
- [23] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201-1205.
- [24] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461-7472.
- [25] M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Holzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 107-114.
- [26] V. du Vigneaud, C. Ressler, S. Trippett, *J. Biol. Chem.* **1953**, *205*, 949-957.
- [27] P. Petrovic, R. Kalisch, T. Singer, R. J. Dolan, *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 6607-6615.
- [28] *Nobel Lectures, Chemistry 1942-1962*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, **1964**.
- [29] A. Kapurniotu, A. Buck, M. Weber, A. Schmauder, T. Hirsch, J. Bernhagen, M. Tatarek-Nossol, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 149-159.
- [30] D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741-766.
- [31] E. H. Koo, P. T. Lansbury, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9989-9990.
- [32] J. S. Davies, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471-501.
- [33] Y. Suarez, L. Gonzalez, A. Cuadrado, M. Berciano, M. Lafarga, A. Munoz, *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 863-872.
- [34] H. Kogen, T. Kiho, M. Nakayama, Y. Furukawa, T. Kinoshita, M. Inukai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10214-10215.
- [35] I. K. Dev, R. J. Harvey, P. H. Ray, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 5891-5894.

- [36] *Dictionary of Natural Products*, 16.1 ed., Chapman&Hall/CRC press, London, **2008**.
- [37] I. Namatame, H. Tomoda, S. Ishibashi, S. Omura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 737-742.
- [38] X. Huang, E. Roemer, I. Sattler, U. Moellmann, A. Christner, S. Grabley, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 3067-3072.
- [39] T. Morino, A. Masuda, M. Yamada, M. Nishimoto, T. Nishikiori, S. Saito, N. Shimada, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1341-1343.
- [40] T. Hamaguchi, A. Masuda, T. Morino, H. Osada, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 279-286.
- [41] R. E. Shute, M. Kawai, D. H. Rich, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 685-695.
- [42] J. Blankenstein, J. P. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1949-1964.
- [43] F. Schumann, A. Müller, M. Kocsch, G. Muller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009-12010.
- [44] H. Weisshoff, C. Prasang, P. Henklein, C. Frommel, A. Zschunke, C. Mügge, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 776-788.
- [45] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233-20238.
- [46] M. Malesevic, Z. Majer, E. Vass, T. Huber, U. Strijowski, M. Hollosi, N. Sewald, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2006**, *12*, 165-177.
- [47] M. Heller, M. Sukopp, N. Tsomaia, M. John, D. F. Mierke, B. Reif, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13806-13814.
- [48] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.
- [49] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1997**, *36*, 1375-1389.
- [50] H. Kessler, B. Diefenbach, D. Finsinger, A. Geyer, M. Gurrath, S. L. Goodman, G. Holzemann, R. Haubner, A. Jonczyk, G. Muller, E. G. vonRoedern, J. Wermuth, *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 155-160.
- [51] M. Malesevic, U. Strijowski, D. Bachle, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73-77.
- [52] H. Tian, X. Z. Jiao, P. Xie, X. T. Liang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8579-8581.
- [53] K. Nagai, T. Doi, T. Sekiguchi, I. Namatame, T. Sunazuka, H. Tomoda, S. Omura, T. Takahashi, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 103-109.
- [54] L. A. Carpino, A. Elfaham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279-2282.
- [55] G. Jou, I. Gonzalez, F. Albericio, P. LloydWilliams, E. Giralt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 354-366.

- [56] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- [57] K. L. Greenman, D. M. Hach, D. L. Van Vranken, *Org. Lett.* **2004**, 6, 1713-1716.
- [58] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1967-1970.
- [59] J. Coste, D. Lenguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205-208.
- [60] S. I. Yamada, N. Ikota, T. Shioiri, S. Tachibana, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 7174-7175.
- [61] S. I. Yamada, Y. Kasai, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 1595-1598.
- [62] B. McKeever, G. Pattenden, *Tetrahedron* **2003**, 59, 2701-2712.
- [63] T. Jeremic, A. Linden, K. M. H. Heimgartner, *Tetrahedron* **2005**, 61, 1871-1883.
- [64] M. Manger, M. Scheck, H. Prinz, J. P. von Kries, T. Langer, K. Saxena, H. Schwalbe, A. Fürstner, J. Rademann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1749-1753.
- [65] N. Kohyama, Y. Yamamoto, *Synlett* **2001**, 694-696.
- [66] K. Kurosawa, T. Nagase, N. Chida, *Chem. Commun.* **2002**, 1280-1281.
- [67] K. Kurosawa, K. Matsuura, N. Chida, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 389-392.
- [68] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1989-1993.
- [69] T. K. Chakraborty, S. Ghosh, P. Laxman, S. Dutta, R. Samanta, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 5447-5450.
- [70] F. Sarabia, S. Chammaa, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7846-7857.
- [71] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528.
- [72] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246.
- [73] A. Bax, S. S. Pochapsky, *J. Magn. Reson.* **1992**, 99, 638-643.
- [74] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2093-2094.
- [75] R. E. Hurd, B. K. John, *J. Magn. Reson.* **1991**, 91, 648-653.
- [76] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, 30, 11-15.
- [77] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870-2871.
- [78] V. F. Bystrov, V. T. Ivanov, S. L. Portnova, T. A. Balashova, Y. A. Ovchinnikov, *Tetrahedron* **1973**, 29, 873-877.
- [79] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546-4553.
- [80] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207-213.
- [81] E. Ammalahiti, M. Bardet, D. Molko, J. Cadet, *J. Magn. Reson., Series A* **1996**, 122, 230-232.

- [82] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657-1666.
- [83] J. W. Ponder, F. M. Richards, *J. Comput. Chem.* **1987**, *8*, 1016-1024.
- [84] I. Kolossvary, W. C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5011-5019.
- [85] N. K. Tonks, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 833-846.
- [86] J. W. Eckstein, *Invest. New Drugs* **2000**, *18*, 149-156.
- [87] G. B. G. Moorhead, L. Trinkle-Mulcahy, A. Ulke-Lemee, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 234-244.
- [88] L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3814-3839.
- [89] P. T. W. Cohen, *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 241-256.
- [90] E. G. Arias-Salgado, F. Haj, C. Dubois, B. Moran, A. Kasirer-Friede, B. C. Furie, B. Furie, B. G. Neel, S. J. Shattil, *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 837-845.
- [91] P. Chiarugi, M. L. Taddei, N. Schiavone, L. Papucci, E. Giannoni, T. Fiaschi, S. Capaccioli, G. Rauegi, G. Ramponi, *Oncogene* **2004**, *23*, 3905-3914.
- [92] K. S. Erdmann, *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 4789-4798.
- [93] B. Stiles, Y. Wang, A. Stahl, S. Bassilian, W. P. Lee, Y. J. Kim, R. Sherwin, S. Devaskar, R. Lesche, M. A. Magnuson, H. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 2082-2087.
- [94] J. M. Denu, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5910-5914.
- [95] K. Kondoh, E. Nishida, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2007**, *1773*, 1227-1237.
- [96] Y. S. Liu, E. G. Shepherd, L. D. Nelin, *Nat. Rev Immunol.* **2007**, *7*, 202-212.
- [97] K. L. Guan, S. S. Broyles, J. E. Dixon, *Nature* **1991**, *350*, 359-362.
- [98] T. Ishibashi, D. P. Bottaro, A. Chan, T. Miki, S. A. Aaronson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 12170-12174.
- [99] J. M. Denu, G. C. Zhou, L. Wu, R. Zhao, J. D. Yuvaniyama, M. A. Saper, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3796-3803.
- [100] A. Alonso, S. Rahmouni, S. Williams, M. van Stipdonk, L. Jaroszewski, A. Godzik, R. T. Abraham, S. P. Schoenberger, T. Mustelin, *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 44-48.
- [101] T. H. Kang, K. T. Kim, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 863-869.
- [102] J. L. Todd, K. G. Tanner, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13271-13280.
- [103] J. L. Todd, J. D. Rigas, L. A. Rafty, J. M. Denu, *Oncogene* **2002**, *21*, 2573-2583.
- [104] A. Alonso, M. Saxena, S. Williams, T. Mustelin, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4766-4771.

- [105] S. Rahmouni, F. Cerignoli, A. Alonso, T. Tsutji, R. Henkens, C. J. Zhu, C. Louis-dit-Sully, M. Moutschen, W. Jiang, T. Mustelin, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 524-531.
- [106] Z. Shi, S. Tabassum, W. Jiang, J. H. Zhang, S. Mathur, J. H. Wu, Y. Shi, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2092-2099.
- [107] J. S. Lazo, R. Nunes, J. J. Skoko, P. E. Q. de Oliveira, A. Vogt, P. Wipf, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5643-5650.
- [108] K. Ueda, T. Usui, H. Nakayama, M. Ueki, K. Takio, M. Ubukata, H. Osada, *FEBS Lett.* **2002**, *525*, 48-52.
- [109] M. Sodeoka, R. Sampe, S. Kojima, Y. Baba, T. Usui, K. Ueda, H. Osada, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3216-3222.
- [110] D. A. Enoch, J. M. Bygott, M. L. Daly, J. A. Karas, *J. Infect.* **2007**, *55*, 205-213.
- [111] E. J. Prenner, M. Kiricsi, M. Jelokhani-Niaraki, R. N. A. H. Lewis, R. S. Hodges, R. N. McElhaney, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2002-2011.
- [112] T. Morino, K. Shimada, A. Masuda, N. Yamashita, M. Nishimoto, T. Nishikiori, S. Saito, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 564-568.
- [113] J. Yuvaniyama, J. M. Denu, J. E. Dixon, M. A. Saper, *Science* **1996**, *272*, 1328-1331.
- [114] Q. Xiao, D. H. Pei, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3132-3137.
- [115] S. K. Straus, R. E. W. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 1215-1223.
- [116] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- [117] G. W. Kenner, Mcdermot.Jr, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. D, Chem. Comm.* **1971**, 636-&.
- [118] K. Barlos, D. Gatos, I. Kallitsis, D. Papaioannou, P. Sotiriou, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1079-1081.
- [119] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, W. Q. Yao, W. Schafer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [120] J. R. Gage, D. A. Evans, *Organic Syntheses* **1990**, *68*, 83-91.
- [121] A. Abiko, J. F. Liu, S. Masamune, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2586-2587.
- [122] D. A. Evans, J. V. Nelson, E. Vogel, T. R. Taber, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3099-3111.
- [123] M. Frigerio, M. Santagostino, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8019-8022.
- [124] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
- [125] R. K. Boeckmann, P. Shao, J. J. Mullins, *Org. Synth. Coll.* **2004**, *10*, 696-701.
- [126] E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 2647-2650.
- [127] J. R. Gage, D. A. Evans, *Organic Syntheses* **1990**, *68*, 77-82.

- [128] T. Inoue, J. F. Liu, D. C. Buske, A. Abiko, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5250-5256.
- [129] H. Dhimitruka, J. SantaLucia, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 47-50.
- [130] Mitsunobu.O, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380-2382.
- [131] C. J. Ahn, R. Correia, P. DeShong, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1751-1753.
- [132] B. Blankemeyermenge, M. Nimitz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701-1704.
- [133] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [134] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [135] G. K. Toth, Z. Kele, G. Varadi, *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 409-426.
- [136] J. S. McMurray, D. R. Coleman, W. Wang, M. L. Campbell, *Biopolymers* **2001**, *60*, 3-31.
- [137] Q. H. Xu, E. A. Ottinger, N. A. Sole, G. Barany, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 333-342.
- [138] S. L. Patt, J. N. Shoolery, *J. Magn. Reson.* **1982**, *46*, 535-539.
- [139] T. E. Bull, *J. Magn. Reson.* **1988**, *80*, 470-481.
- [140] D. C. Dalgarno, B. A. Levine, R. J. P. Williams, *Biosci. Rep.* **1983**, *3*, 443-452.
- [141] Y. J. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 852-861.
- [142] Y. J. Wang, O. Jardetzky, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14075-14084.
- [143] A. Tholey, A. Lindemann, V. Kinzel, J. Reed, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 76-87.
- [144] W. L. Jorgensen, J. Tiradorives, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657-1666.
- [145] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.
- [146] 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.
- [147] J. Montalibet, K. I. Skorey, B. P. Kennedy, *Methods* **2005**, *35*, 2-8.
- [148] M. B. Tierno, P. A. Johnston, C. Foster, J. J. Skoko, S. N. Shinde, T. Y. Shun, J. S. Lazo, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1134-1144.
- [149] Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [150] T. P. Geladopoulos, T. G. Sotiroudis, A. E. Evangelopoulos, *Anal. Biochem.* **1991**, *192*, 112-116.
- [151] T. H. Kang, K. T. Kim, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2008**, *1783*, 49-58.
- [152] T. Hamaguchi, T. Sudo, H. Osada, *FEBS Lett.* **1995**, *372*, 54-58.
- [153] M. J. McKennon, A. I. Meyers, K. Drauz, M. Schwarm, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3568-3571.

8. Abkürzungsverzeichnis

4-iA	4-Isoavenaciolid
abs.	absolut (wasser- und sauerstofffrei)
APT	attached proton test
Äq.	Äquivalent
ber.	berechnet
BHA	β -hydroxy acid; hier: 2-Methyl-3-hydroxyhexadecansäure
BLA	biologic license application
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluoro-phosphat
Bzl	Benzyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
cdc25A	cell division cycle phosphatase 25A
cHex	cyclohexyl
CLP	zyklisches Lipopeptid
COSY	Correlation Spectroscopy
CSA	Camphersulfonsäure
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyanohydrochinon
DEPC	Diethylphosphorcyanidat
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIBAL-H	Diibutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DSP	dualspezifische Phosphatase
DTE	Dithiothreitol
DUSP3	dualspezifische Phosphatase 3
[E]	Enzymkonzentration

8. Abkürzungsverzeichnis

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl-)carbodiimid
EDT	Ethandithiol
ee	enantiomeric excess, Enantiomerenüberschuss
E_{\min}	Energieminimum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
[ES]	Konzentration an Enzym-Substrat Komplex
ESI	Electronen Spray Ionisierung
F&E	Forschung und Entwicklung
FAB	fast atom bombardment
FDA	food and drug administration (Arzneizulassungsbehörde in den USA)
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GATPT	(Glucosaminaminoethoxy)triphenylzinn
GB/SA	Generalized Born Surface Area
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massendetektion
gCOSY	gradient enhanced Correlation Spectroscopy
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
gHMBC	gradient enhanced Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHSQC	gradient enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation
GST	Glutathion S Transferase
h	Stunde
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HeLa	Henrietta Lacks
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-MS	high resolution mass spectrometry
[I]	InhibitorKonzentration
IBX	<i>o</i> -Iodoxybenzoesäure
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
iRNA	internierende Ribonukleinsäure
<i>J</i>	Kopplungskonstante

JNK	c-Jun <i>N</i> -terminale Kinase
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante
K_i	Dissoziationskonstante des Inhibitors
K_m	Michaelis-Menten Konstante
LC	liquid phase chromatography
LMOD	low-mode
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MG	Malachitgrün
MGO	Malachitgrünoxalat
MKP	Mitogen aktivierte Protein Kinase Phosphatase
MNBA	2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid
MPTPA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein Tyrosin Phosphatase A
MPTPB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein Tyrosin Phosphatase B
MsCl	Methansulfonylchlorid
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol
NaHMDS	Natriumhexamethyldisilazid
NDA	new drug application (neue Wirkstoffanwendung)
NGF	nerve growth factor
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NME	new molecular entity (neue molekulare Verbindung)
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernresonanzspektroskopie)
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NP-40	Polyethylenglycol-40-nonylphenoether
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
OKT3	monoklonaler Antikörper, auch: Muromonab-CD3
OPLS	optimized potentials for liquid simulations
[P]	Produktkonzentration
PCC	Pyridiniumchlorochromat
pERK	phosphorylierte Extrazellulär-Signal regulierte Kinase

8. Abkürzungsverzeichnis

Piv	Pivaloyl
PMA	Plasma Membran Proton ATPase
pMEK	phosphorylierte Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenolphosphat
PP1	Protein-Phosphatase 1
PP2B	Protein-Phosphatase 2B
PPTS	Pyridyl- <i>para</i> -toluylsulfonat
pSer	Phosphoserin
pThr	Phosphothreonin
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PTPN2	Protein Tyrosin Phosphatase, non-Rezeptor Typ 2
pTyr	Phosphotyrosin
PyBrOP	Brom-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorosphat
quant.	Quantitativ
r	Abstand
Randbed.	Randbedingung
R _f	Retentionsfaktor
RMSD	root mean square deviation
RNA	Ribonukleinsäure
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Rt	Raumtemperatur
[S]	Substratkonzentration
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SHP2	Src Homologie 2 enthaltende Tyrosine Phosphatase
τ_c	Korrelationszeit
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS	tert.-Butyldimethylsilyl
TCBC	2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid
TCR	T-Zellrezeptor
TES	Triethylsilan
Tf	Triflat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNCG	truncated Newton conjugated gradient
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy

8. Abkürzungsverzeichnis

TPAP	Tetrapropylammoniumperruthenat
TPPTS	Triphenylphosphintrisulfonsäure
t_R	Retentionszeit
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V	Volumen
VE-PTP	Vasculär endotheliale Protein Tyrosin Phosphatase
VH1	<i>Vaccinia</i> open reading frame H1 phosphatase
VHR	VH1 related phosphatase (DUSP3)
VRK3	<i>Vaccinia</i> related kinase 3
ZAP-70	Zeta-assoziierte Protein Kinase 70

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1517 und 1525).

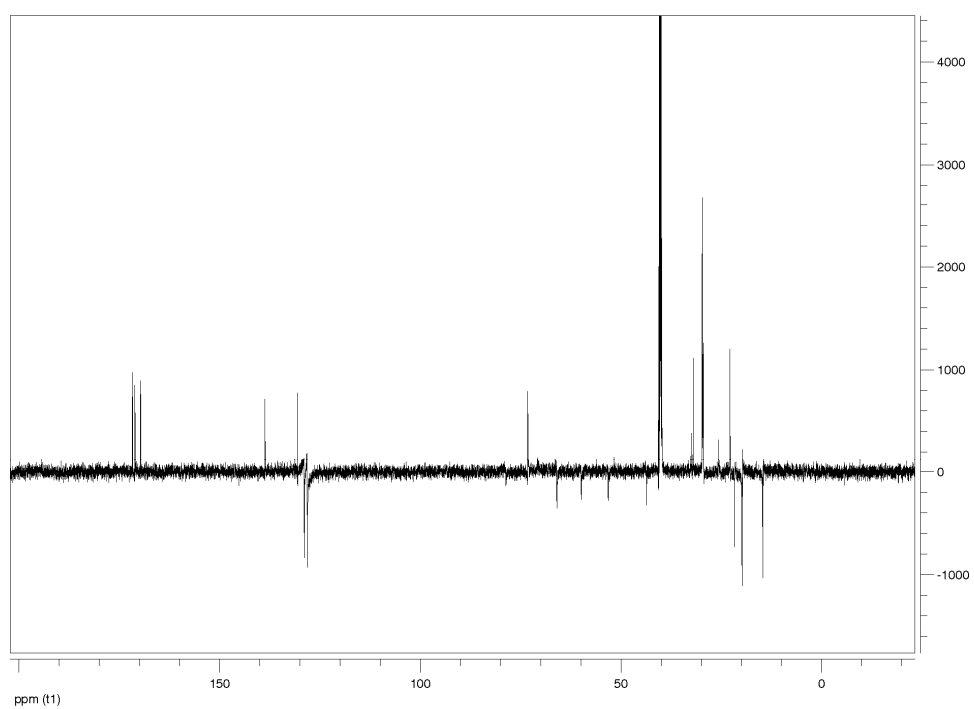
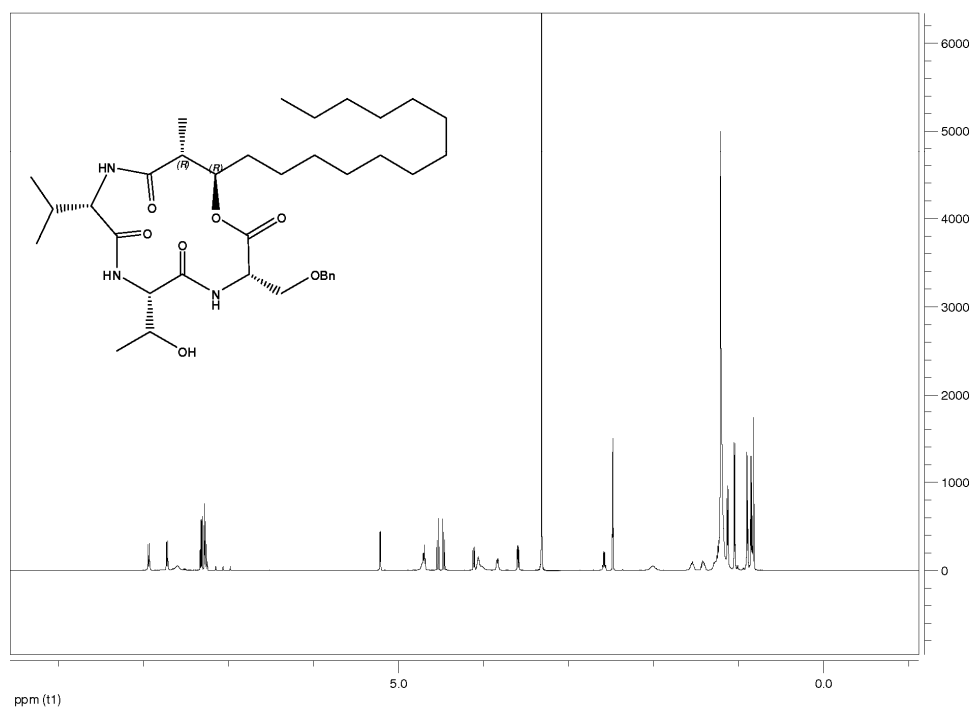
9. Anhang

9.1 NMR-Spektren

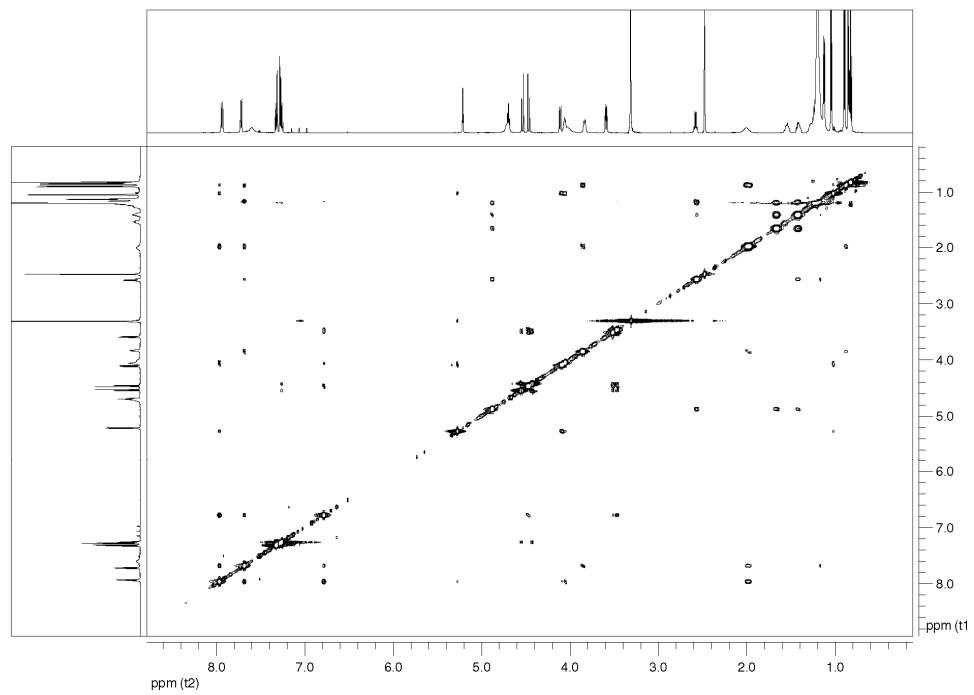
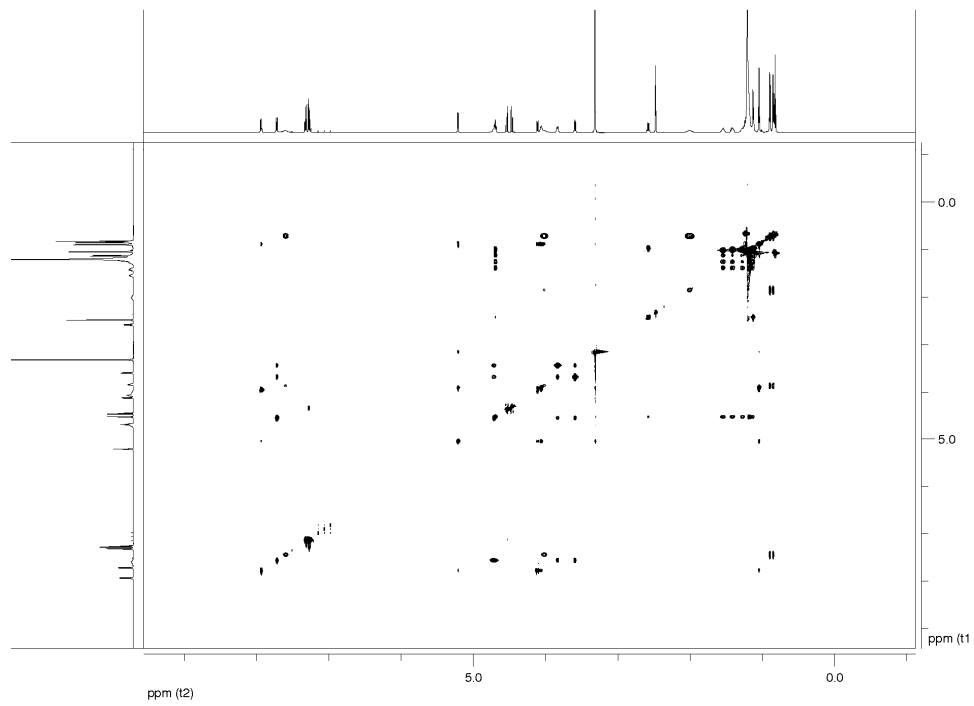
NMR-Spektren der Zyklodepsipeptide **40**, **96**, **118** und **41**.

(2*R*,3*R*)-40:

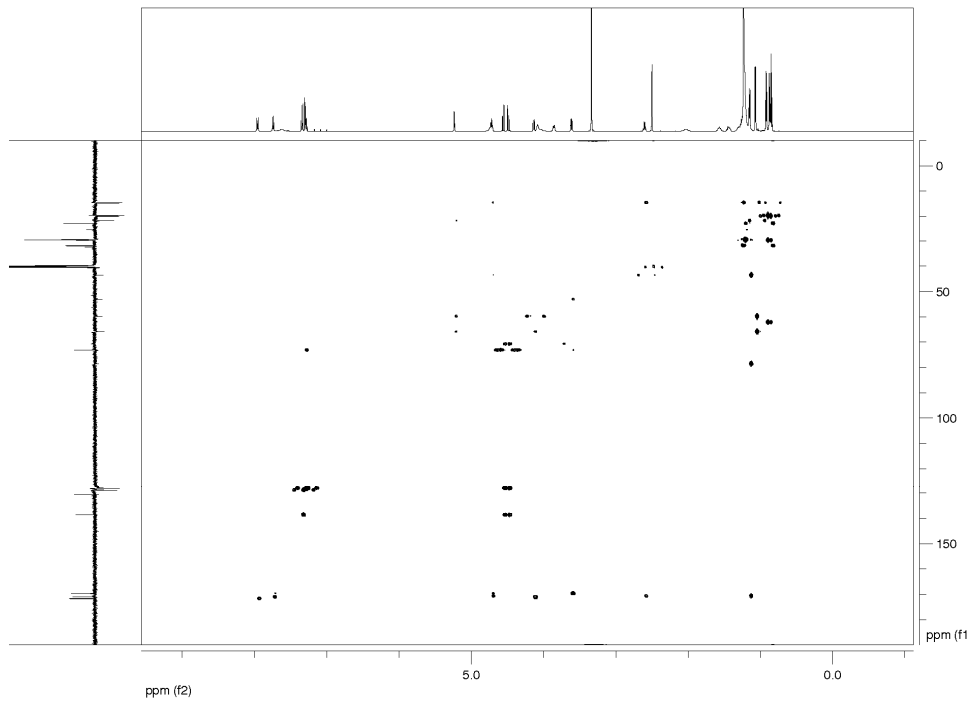
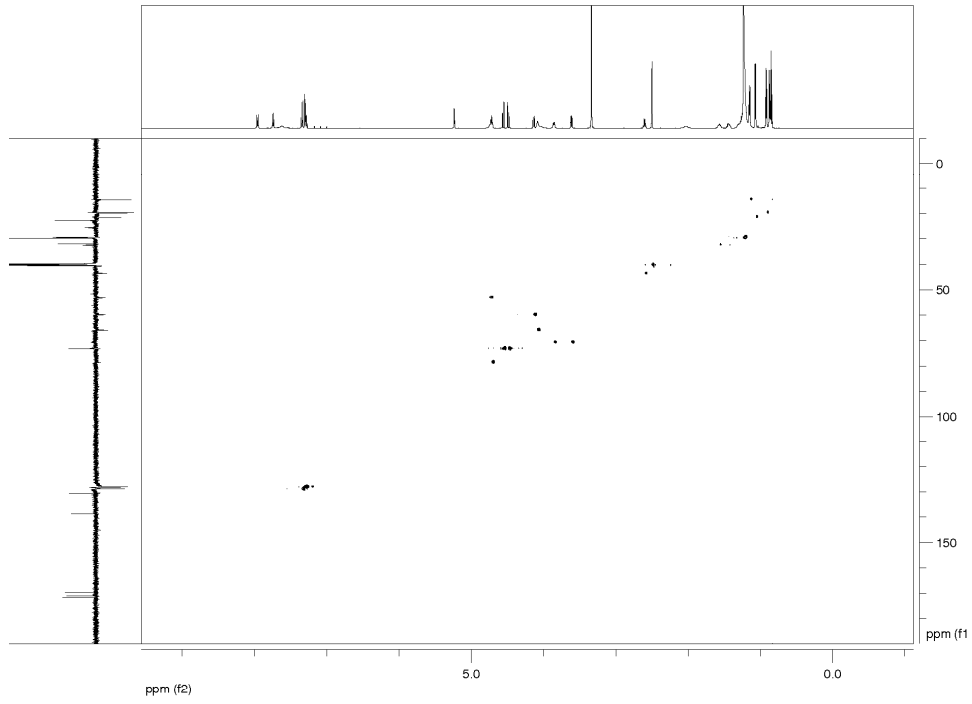
^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$); APT-NMR (151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);

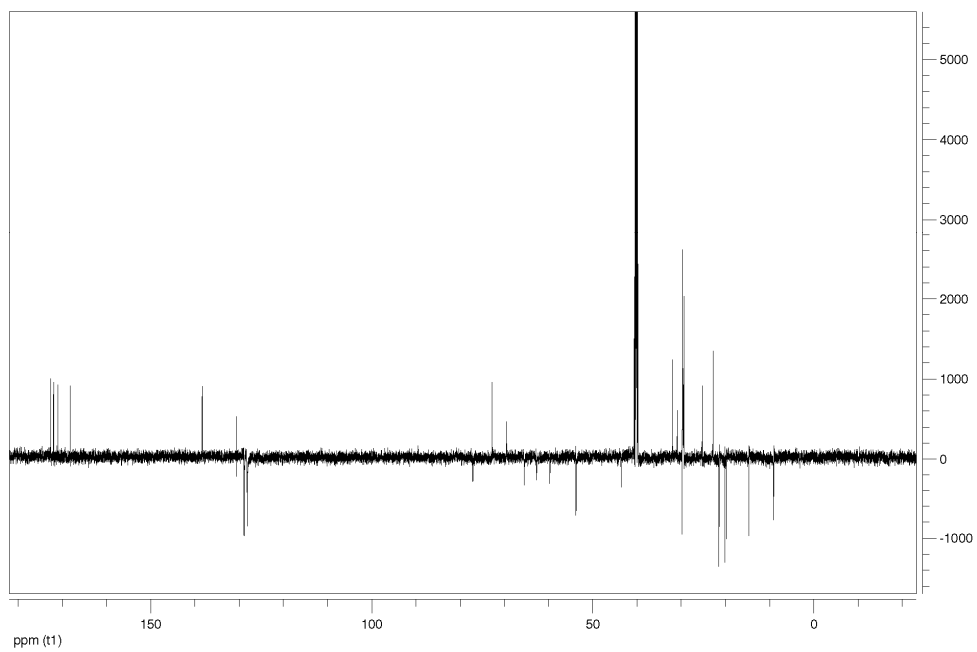
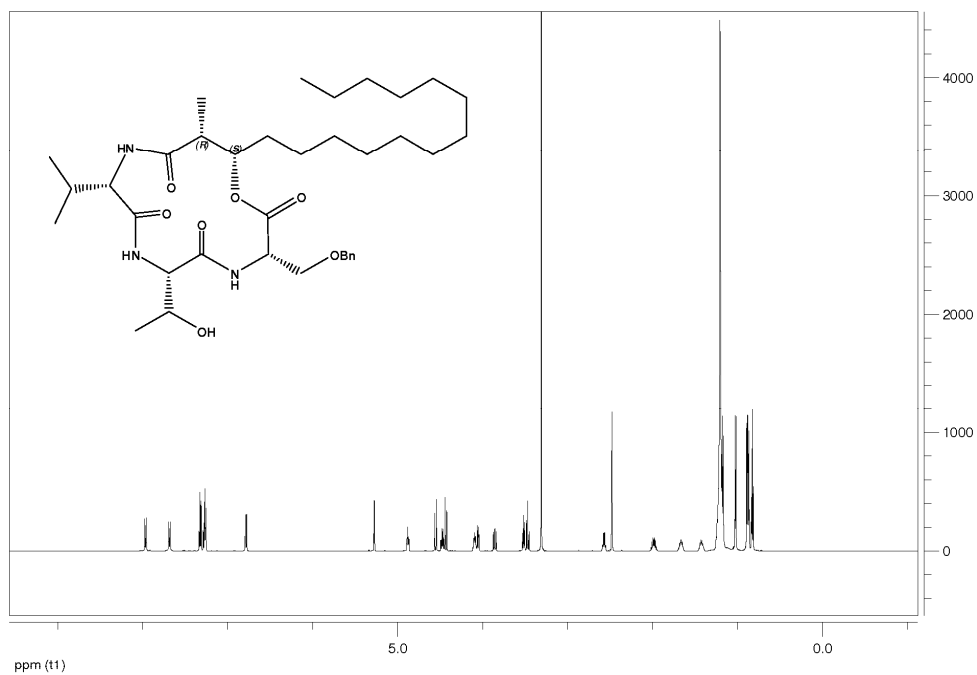


TOCSY (600 MHz, [D₆]DMSO);
 ROESY (600 MHz, [D₆]DMSO, 300 ms Mischzeit, 2 s delay)



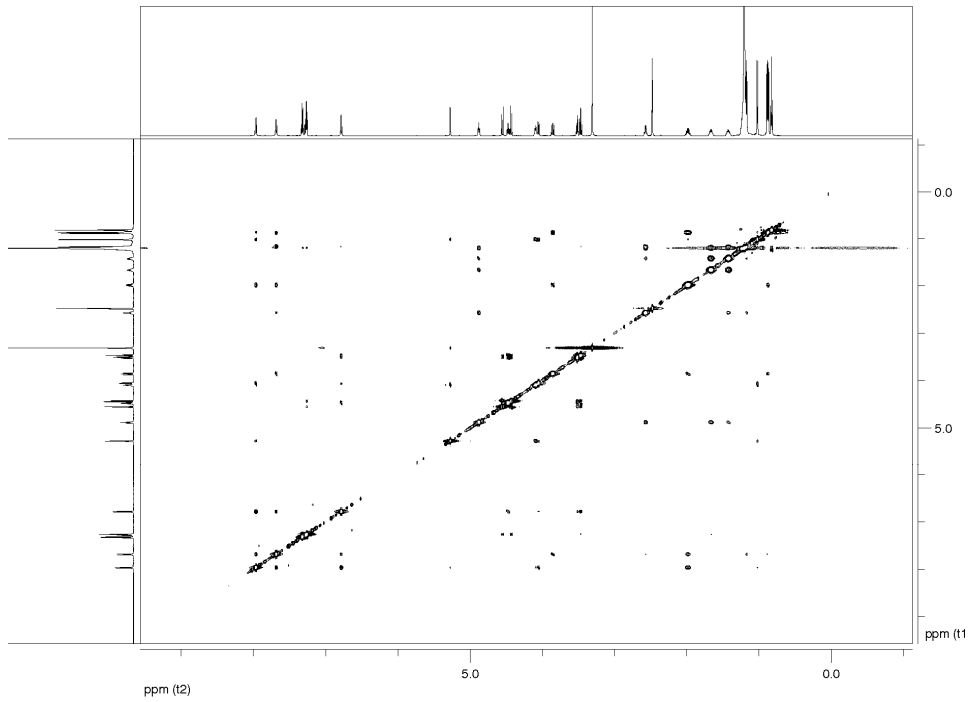
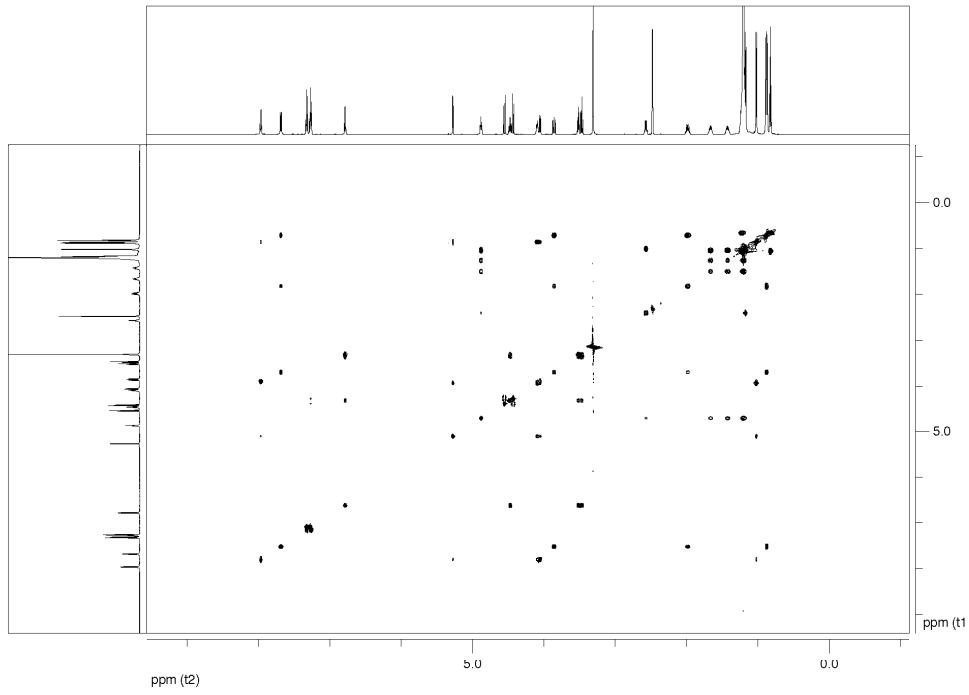
gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

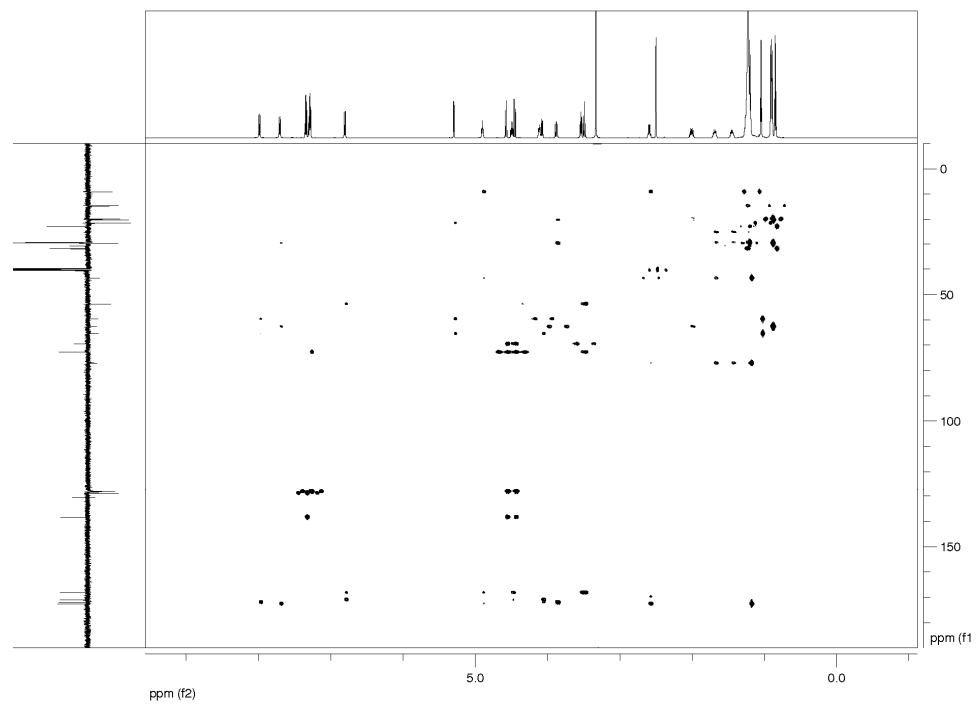
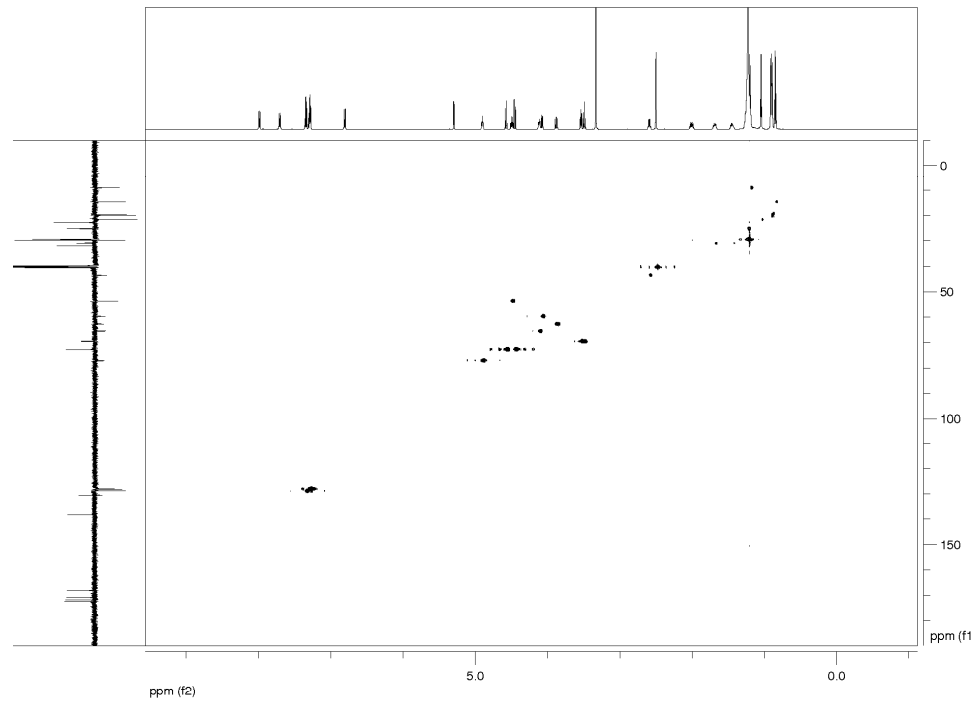


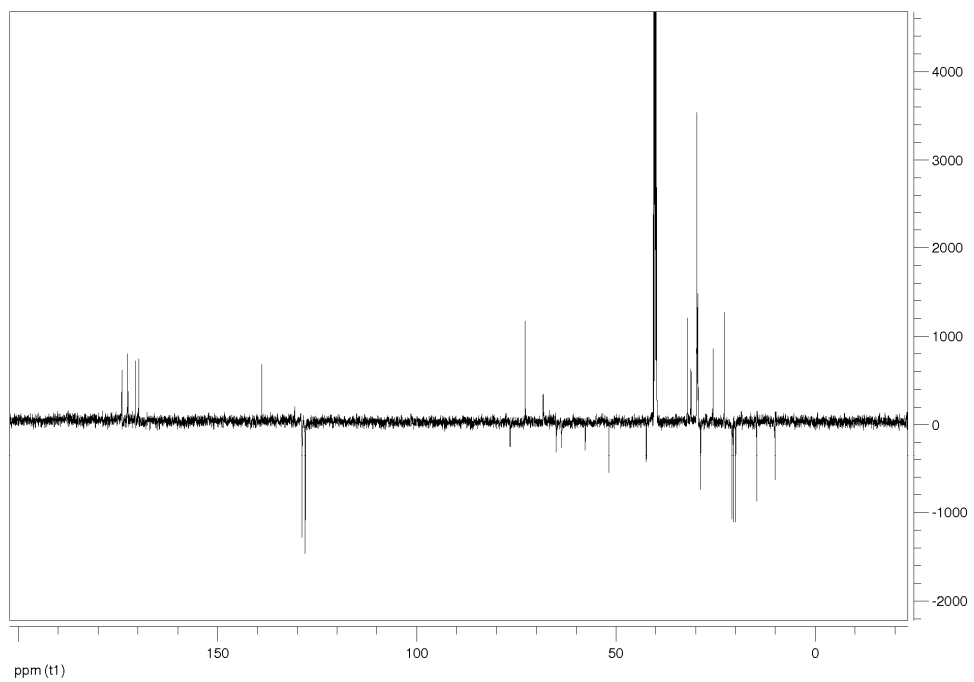
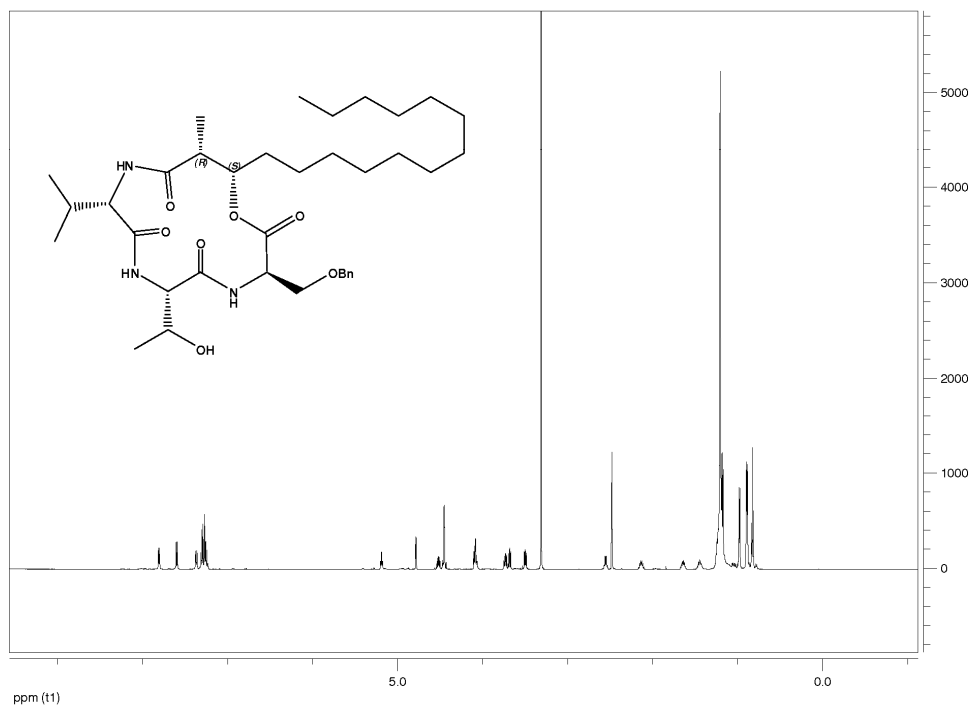
(2*R*,3*S*)-40:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

9. Anhang

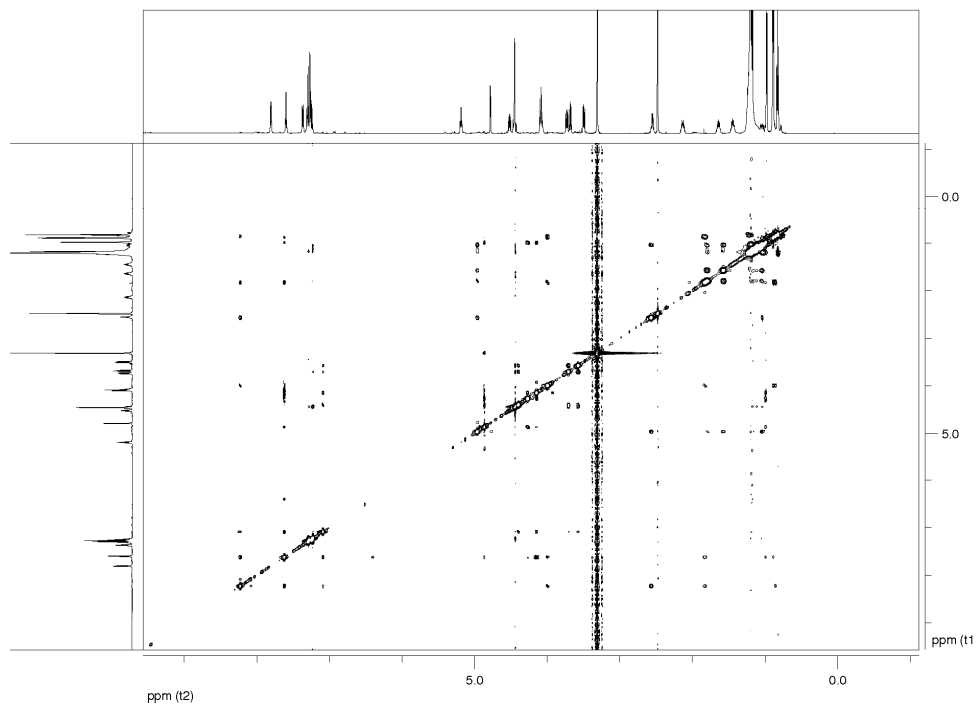
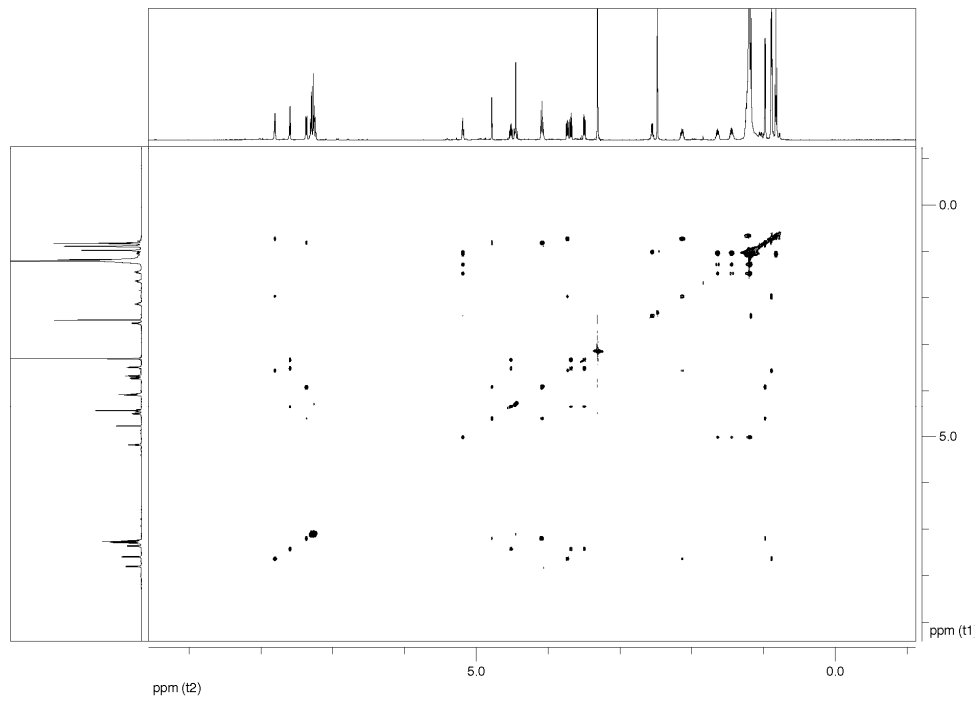
TOCSY (600 MHz, [D₆]DMSO);
ROESY (600 MHz, [D₆]DMSO, 300 ms Mischzeit, 2 s delay)



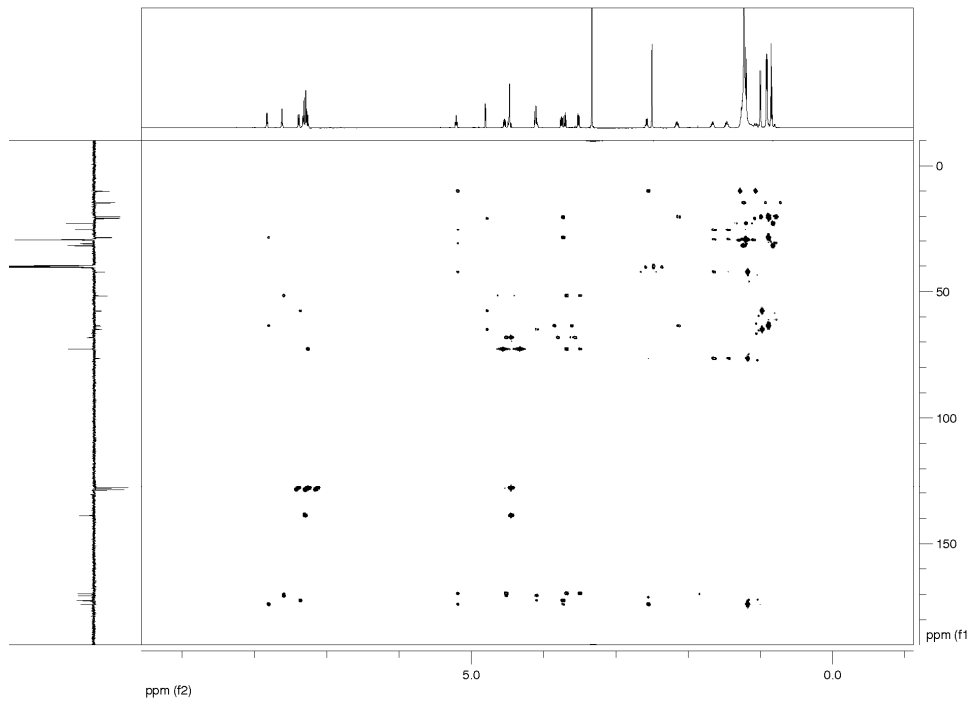
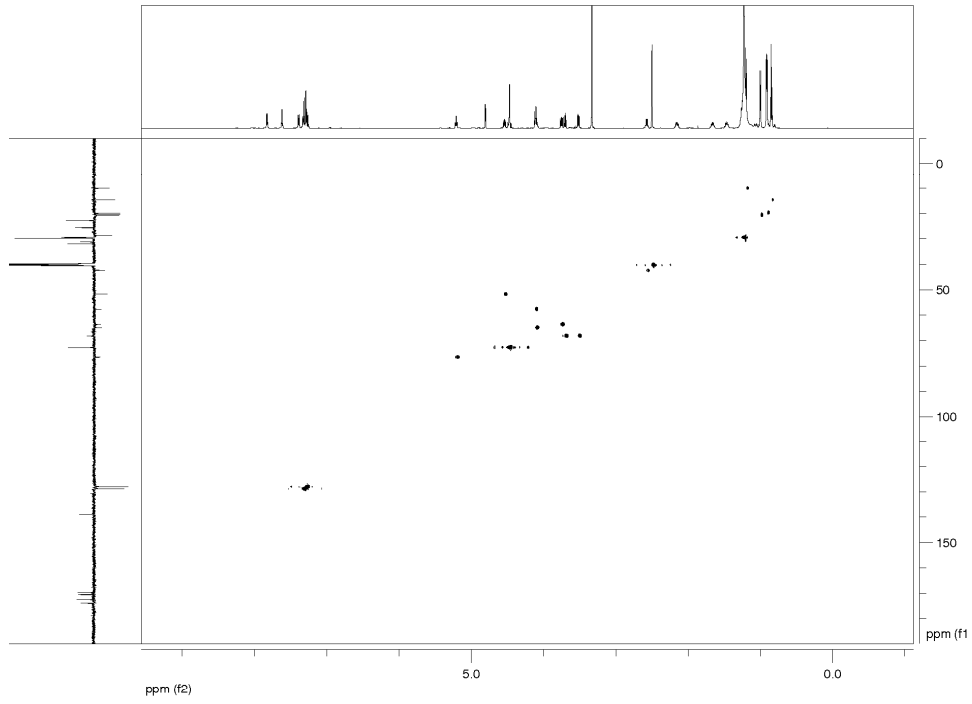
gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

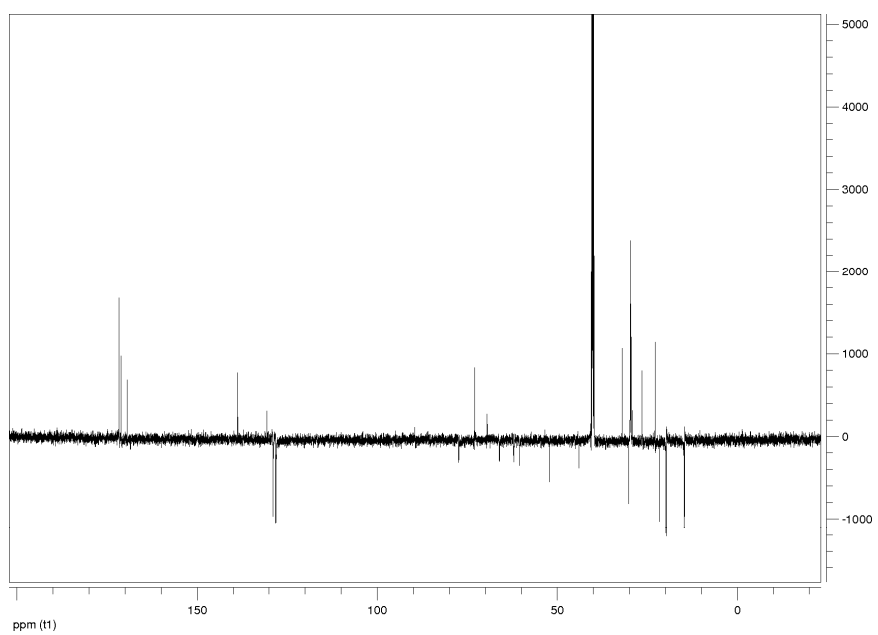
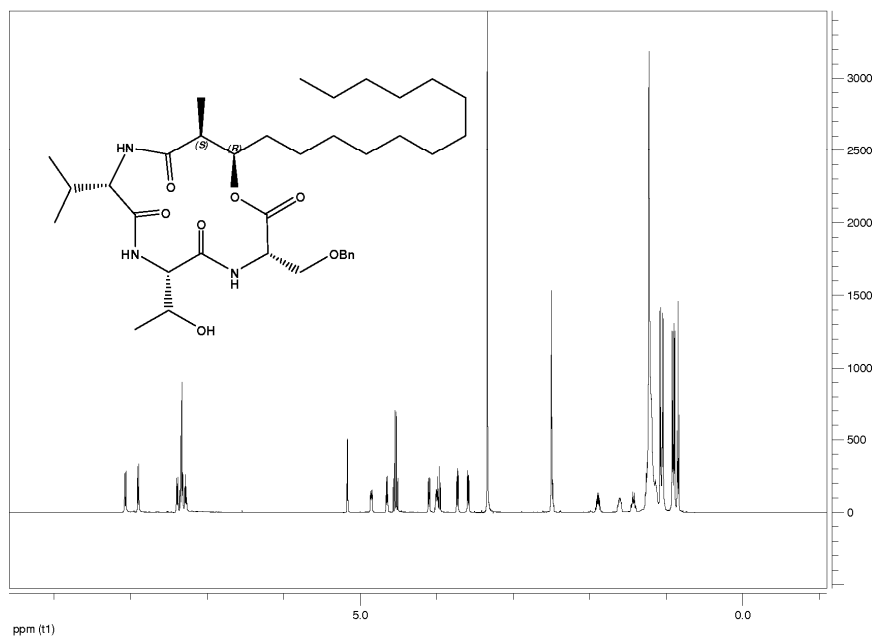
(2*R*,3*S*)-96:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

TOCSY (600 MHz, [D₆]DMSO);
ROESY (600 MHz, [D₆]DMSO, 300 ms Mischzeit, 2 s delay)



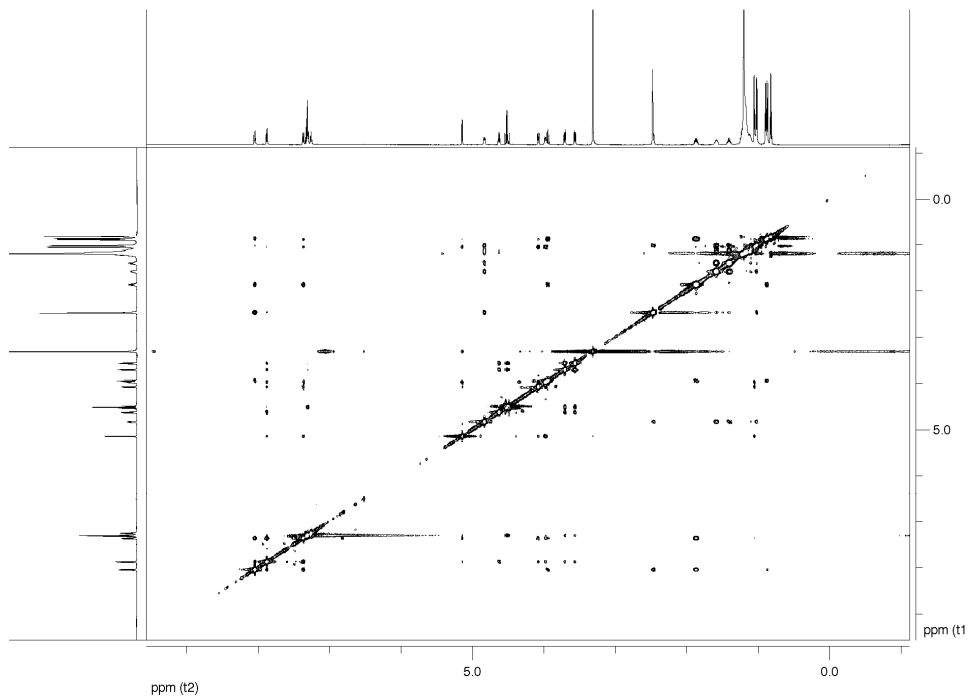
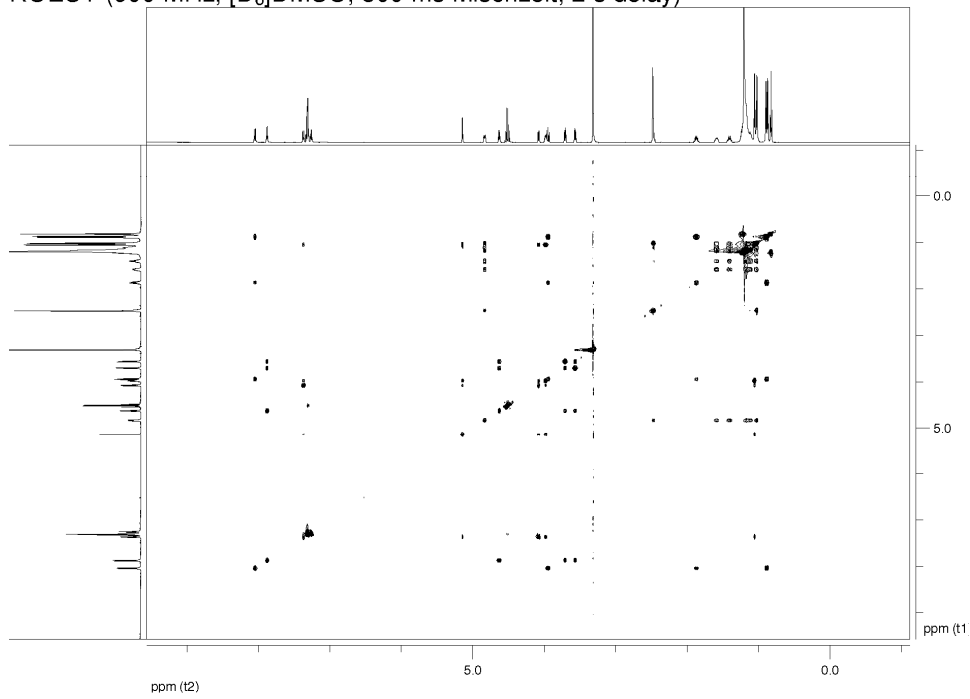
gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

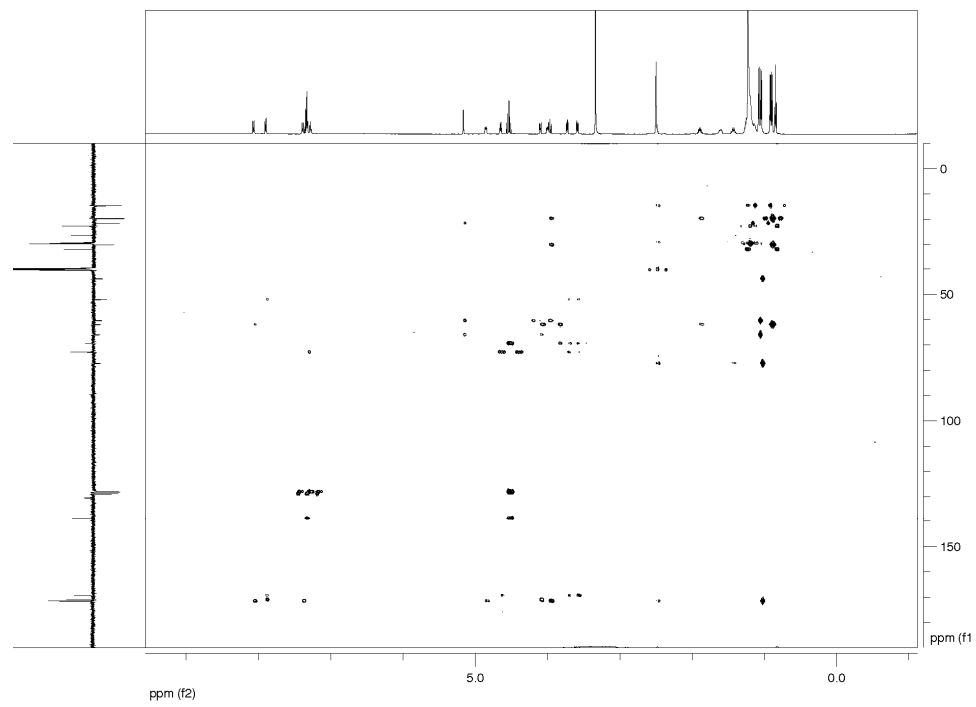
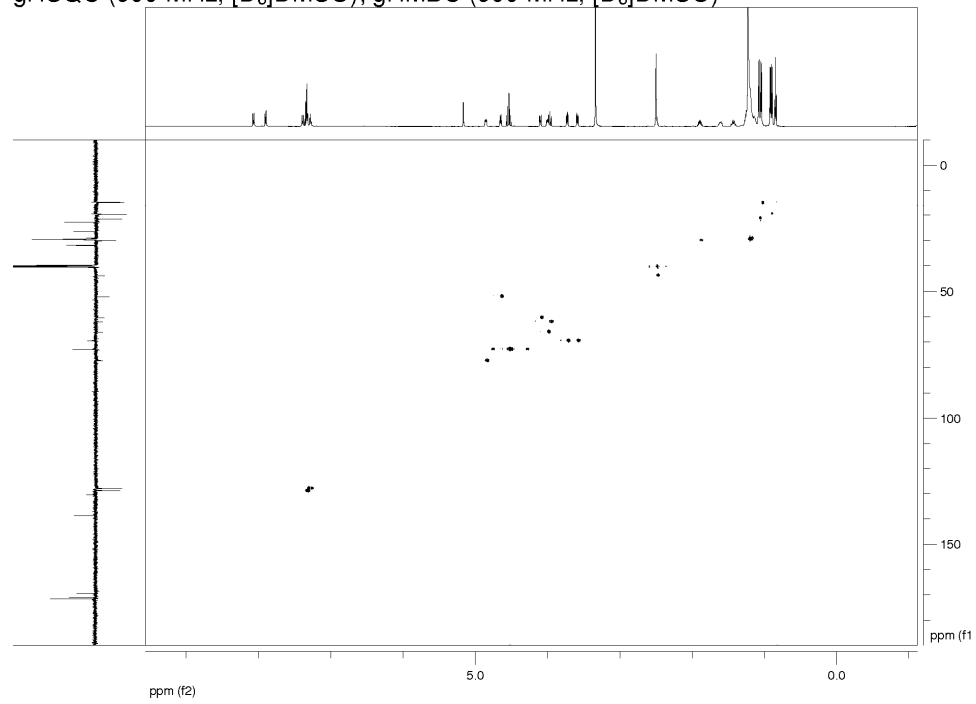


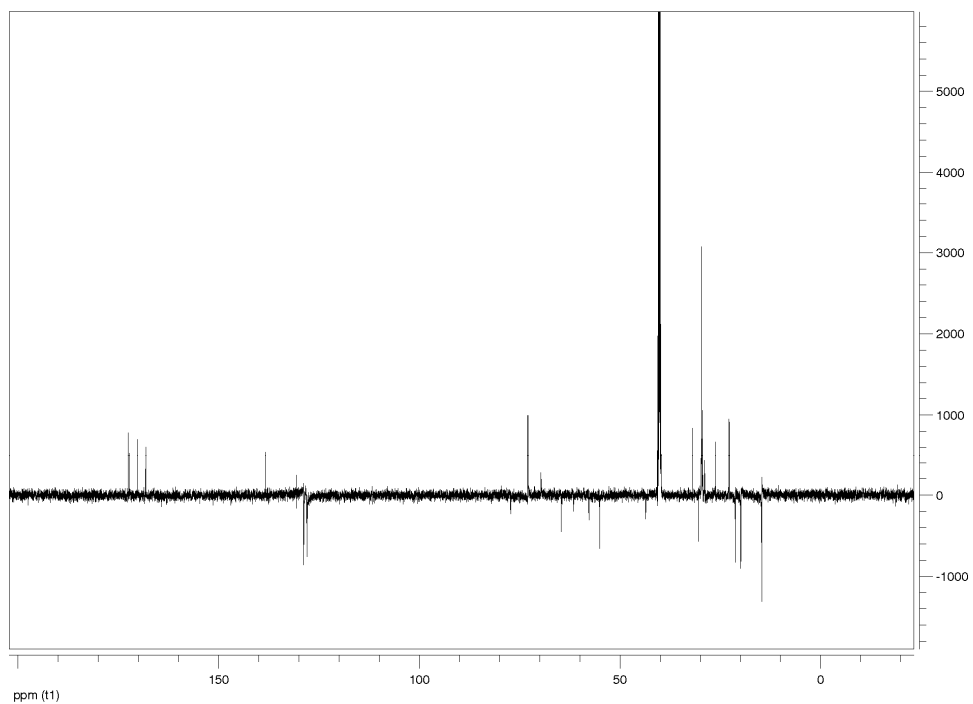
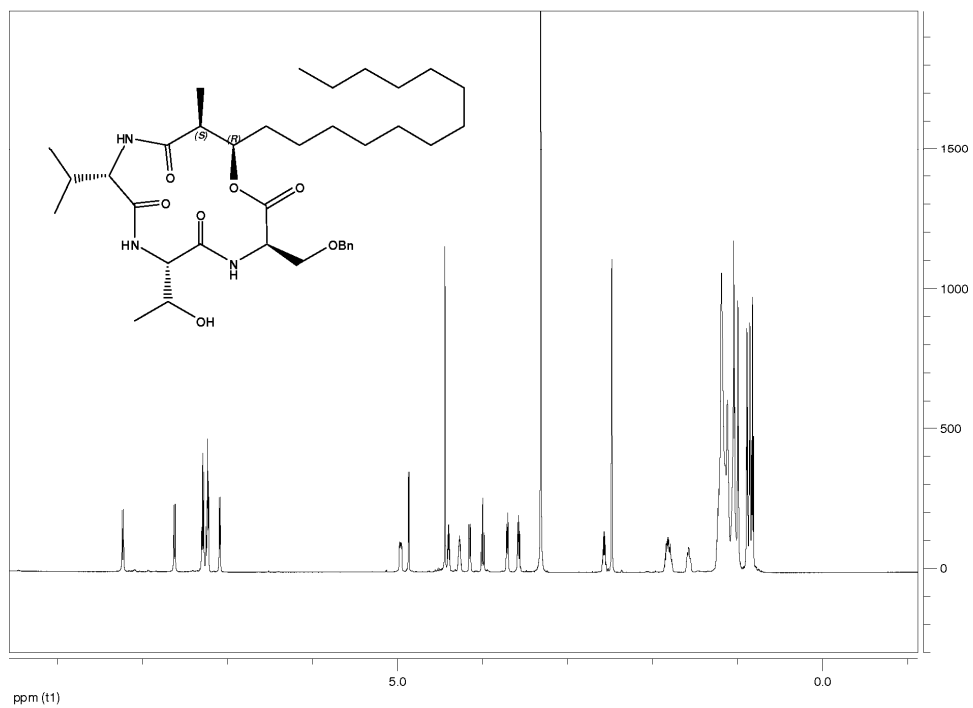
(2*S*,3*R*)-40:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

9. Anhang

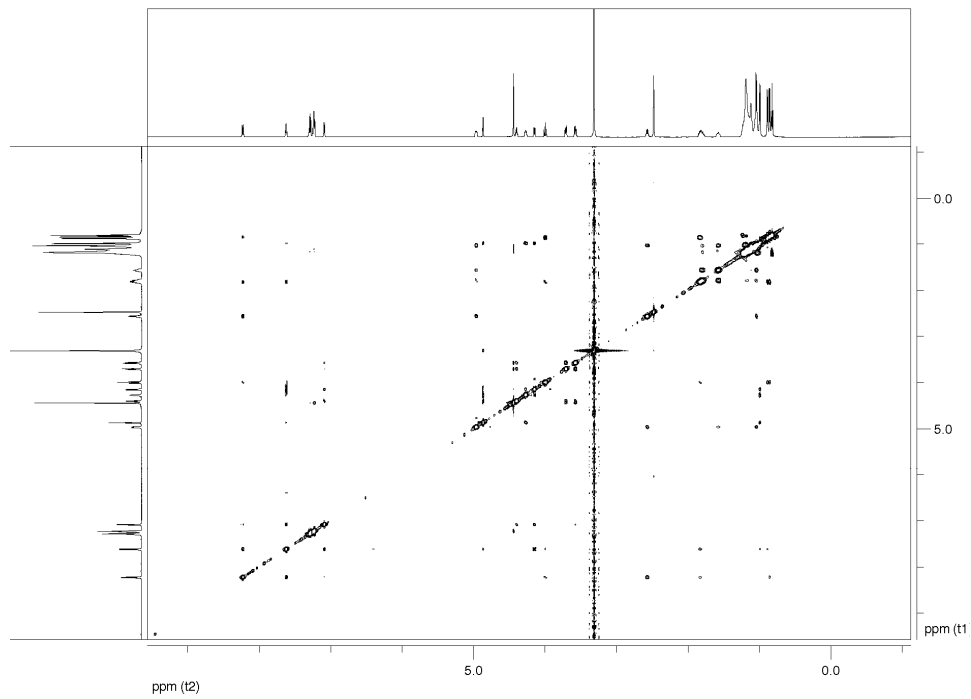
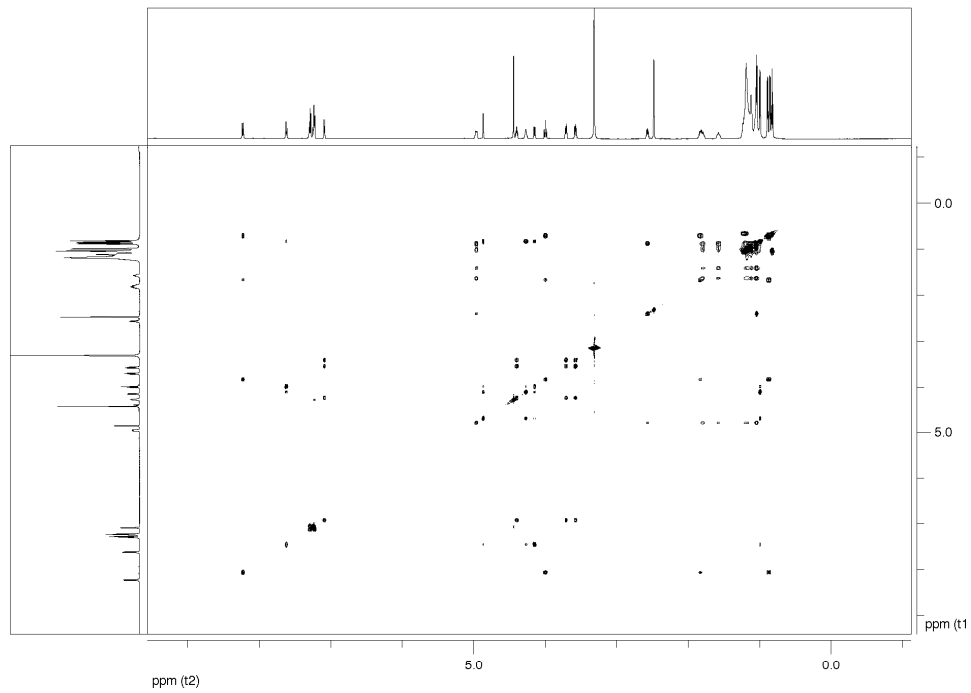
TOCSY (600 MHz, [D₆]DMSO);
ROESY (600 MHz, [D₆]DMSO, 300 ms Mischzeit, 2 s delay)



gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

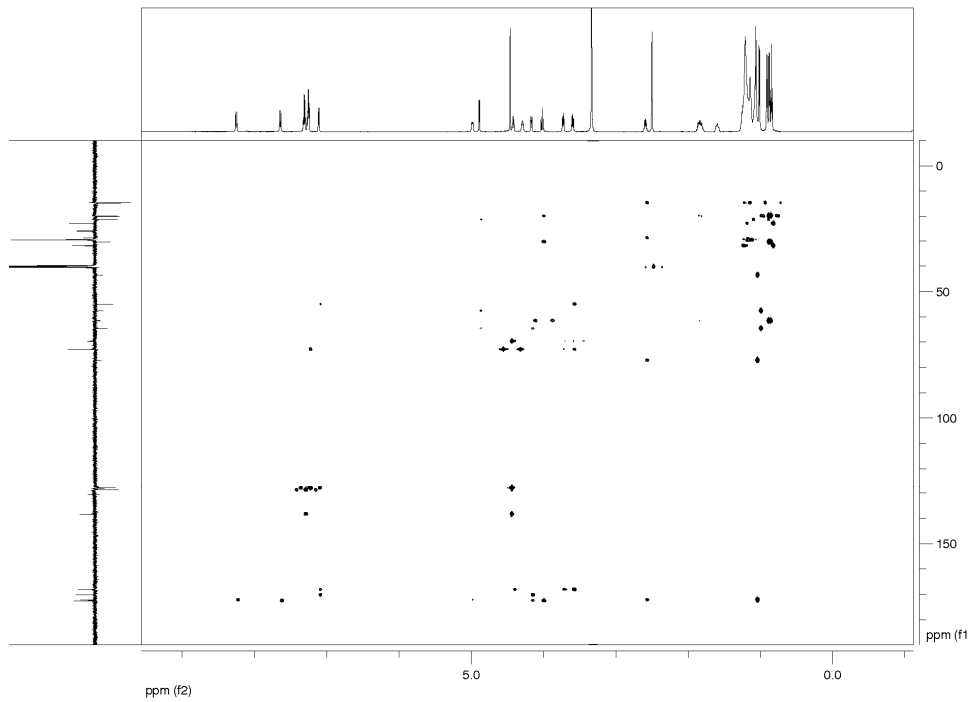
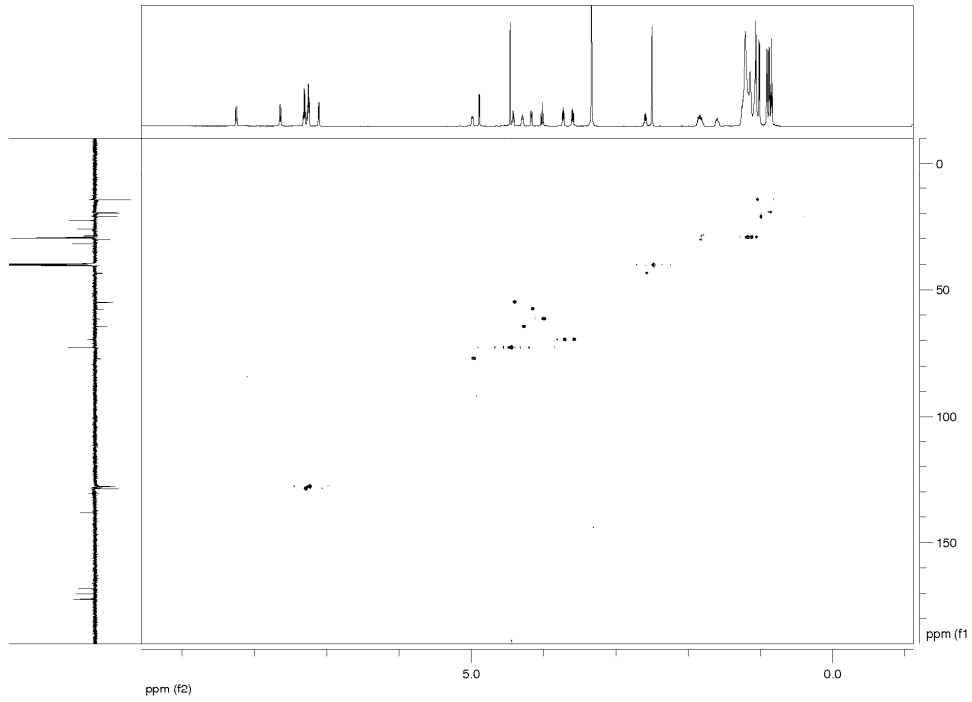
(2*S*,3*R*)-96:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

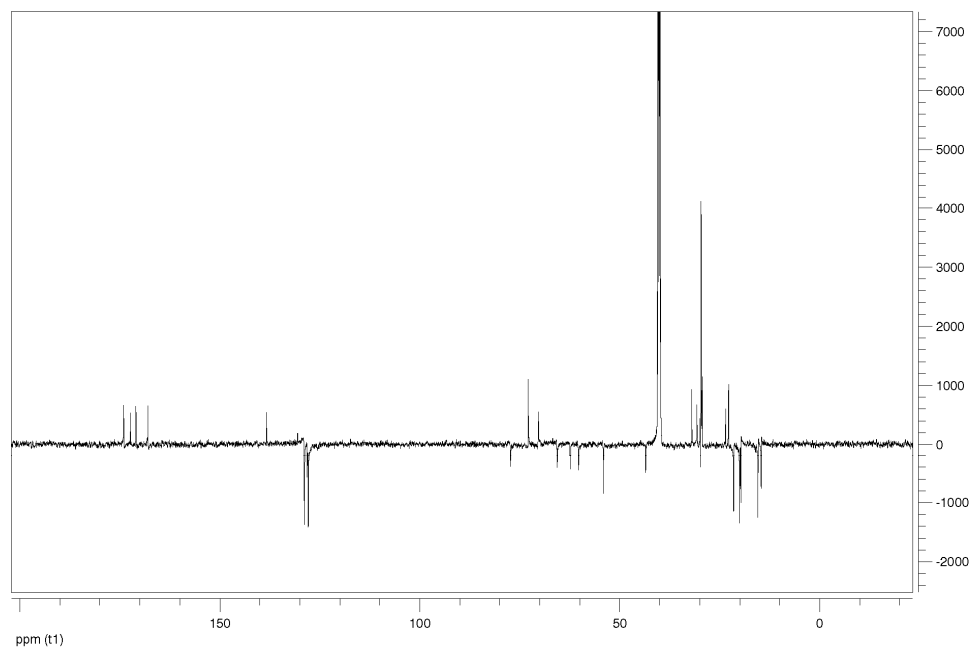
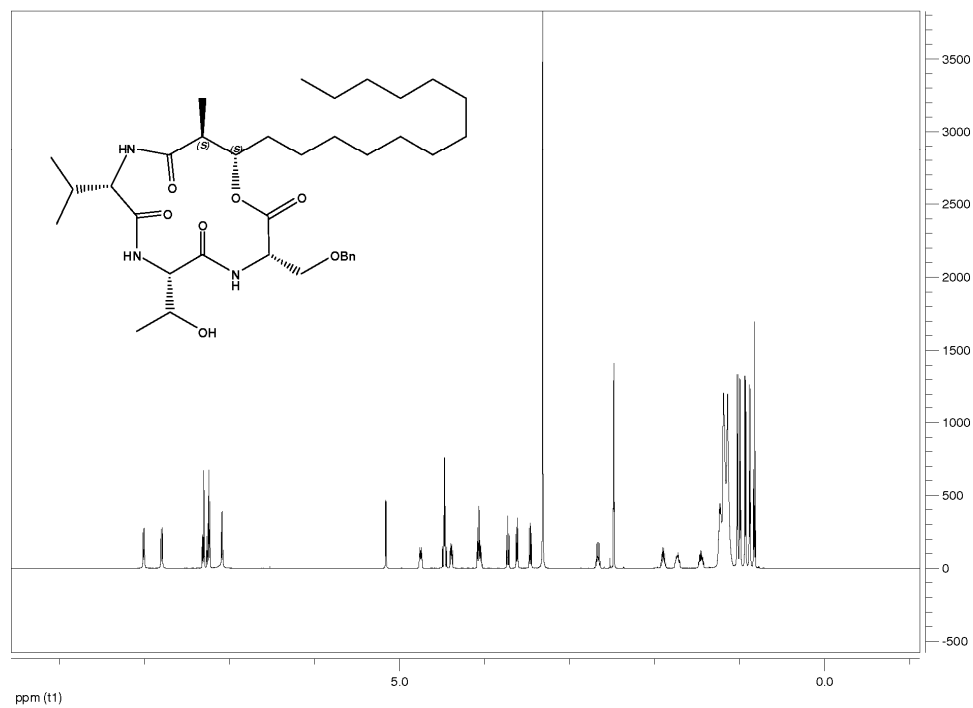
TOCSY (600 MHz, [D₆]DMSO);
ROESY (600 MHz, [D₆]DMSO, 300 ms Mischzeit, 2 s delay)



9. Anhang

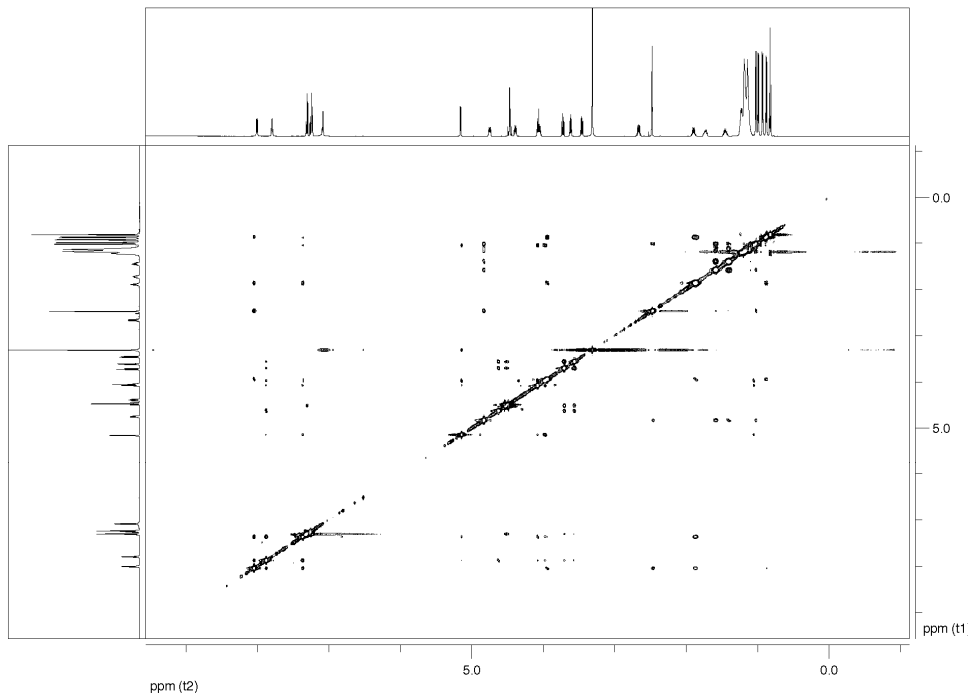
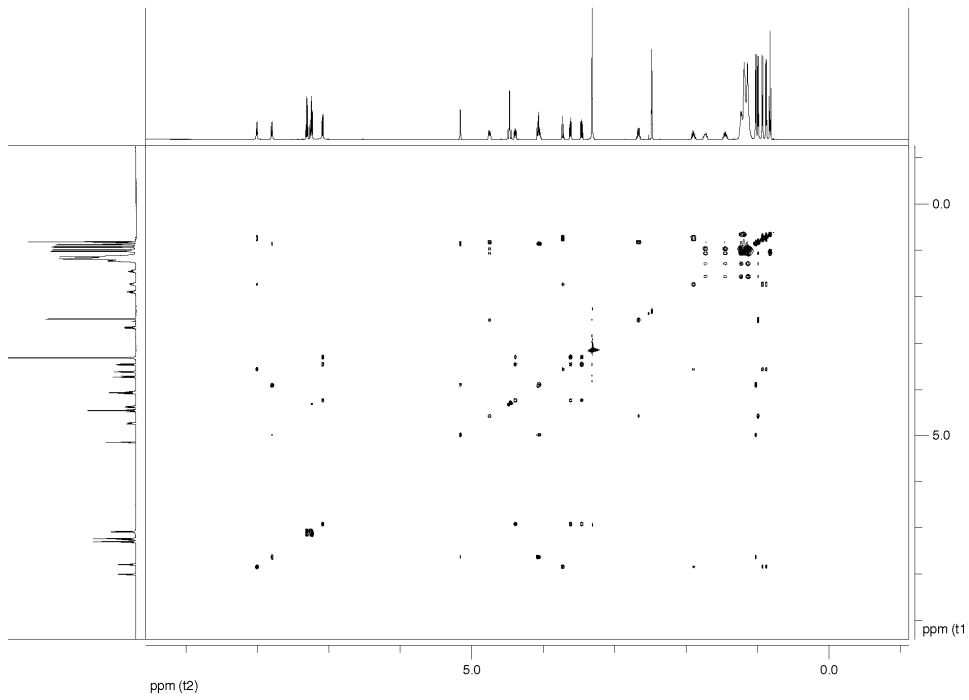
gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

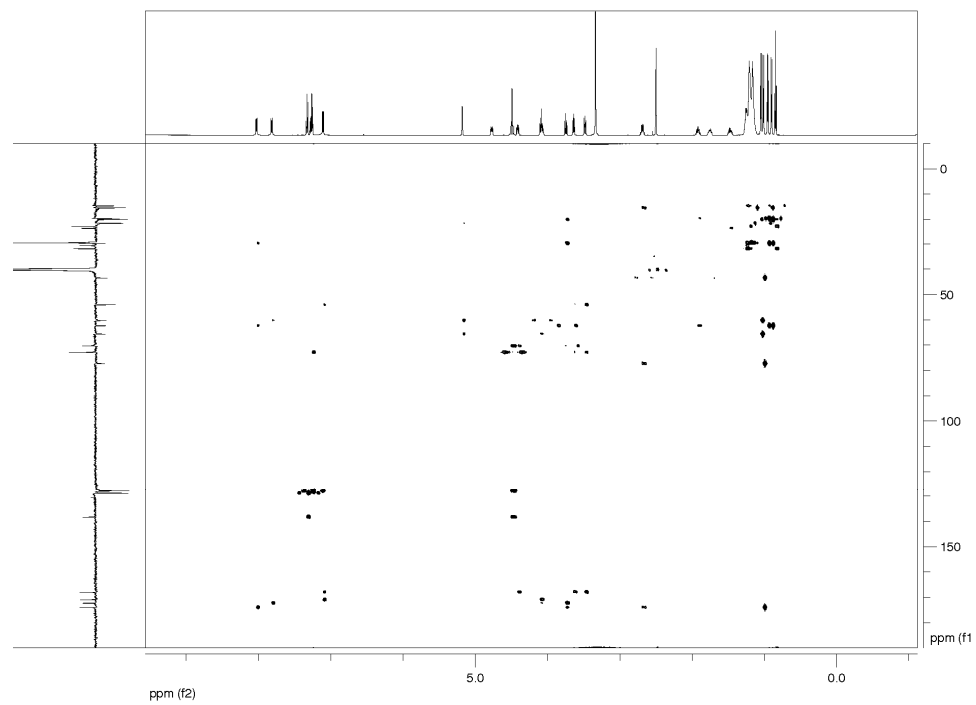
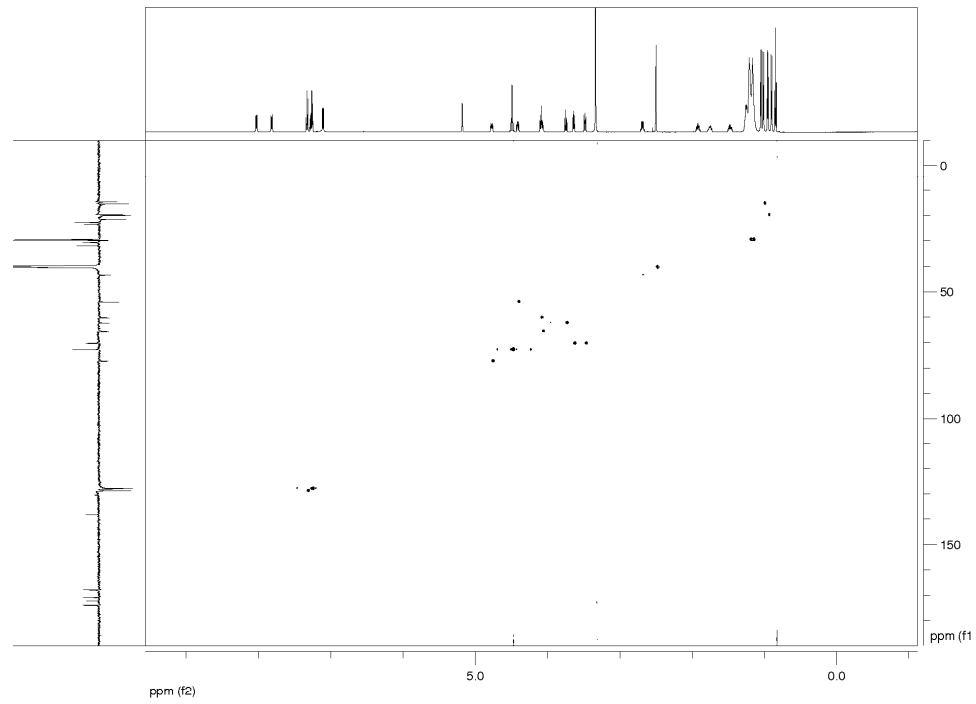


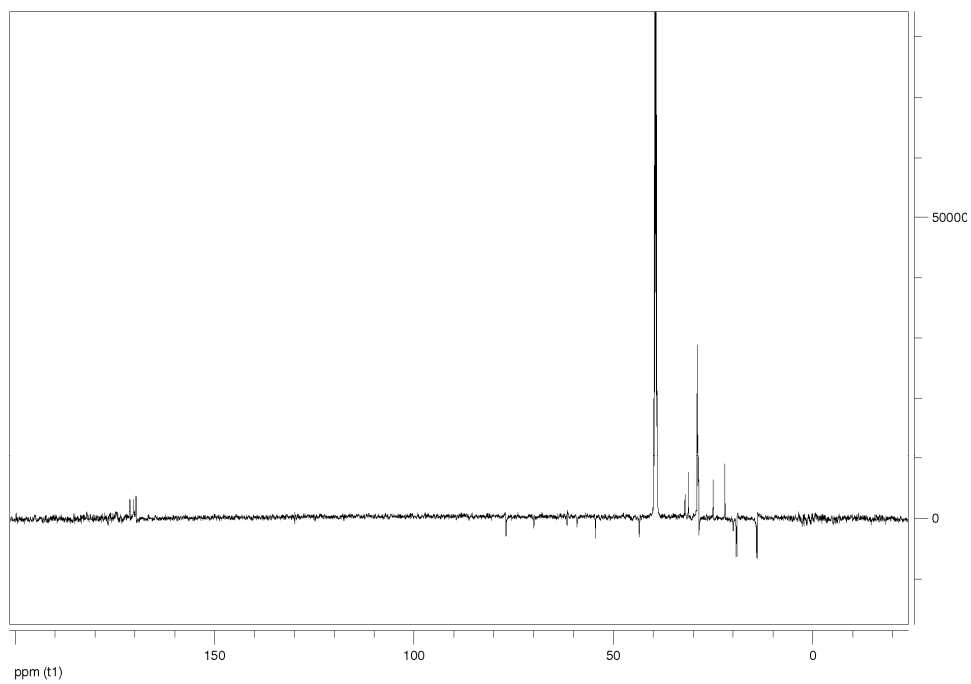
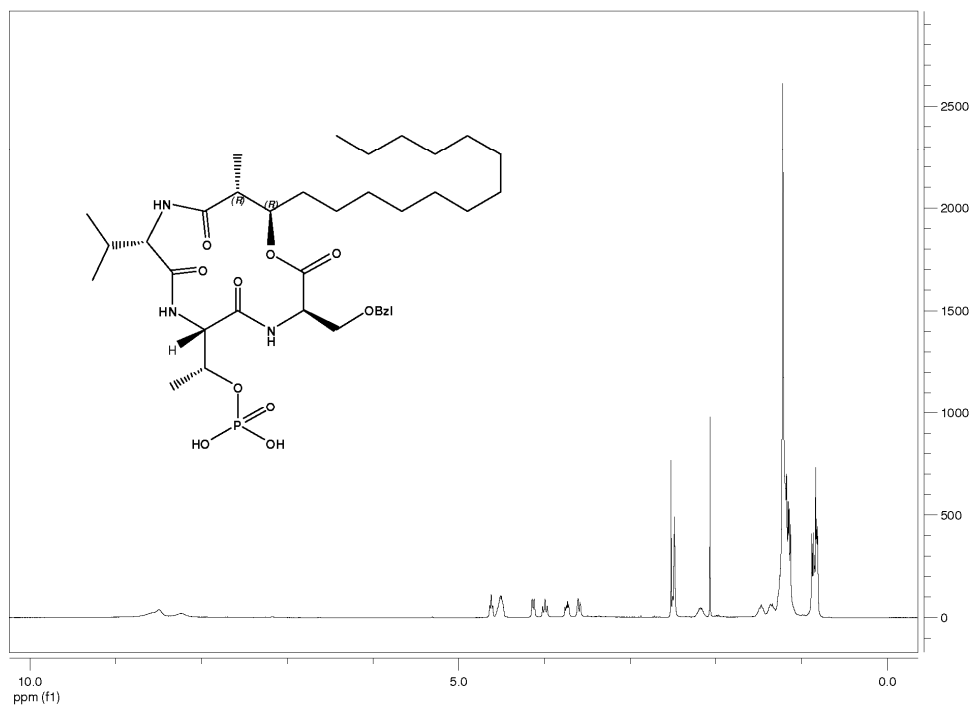
(2S,3S)-40: ^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$); APT-NMR (151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);

9. Anhang

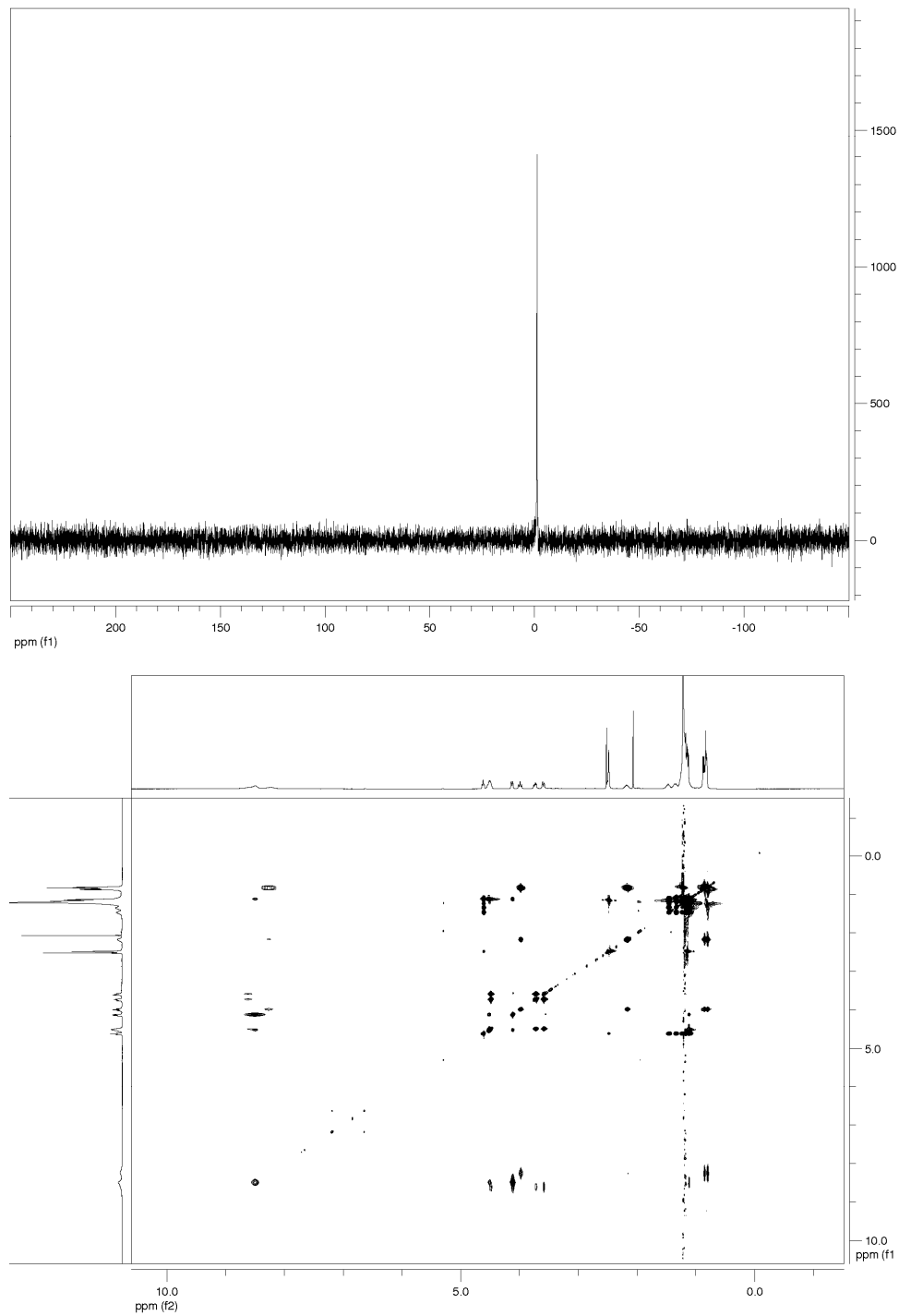
TOCSY (600 MHz, [D₆]DMSO);
ROESY (600 MHz, [D₆]DMSO, 300 ms Mischzeit, 2 s delay)



gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

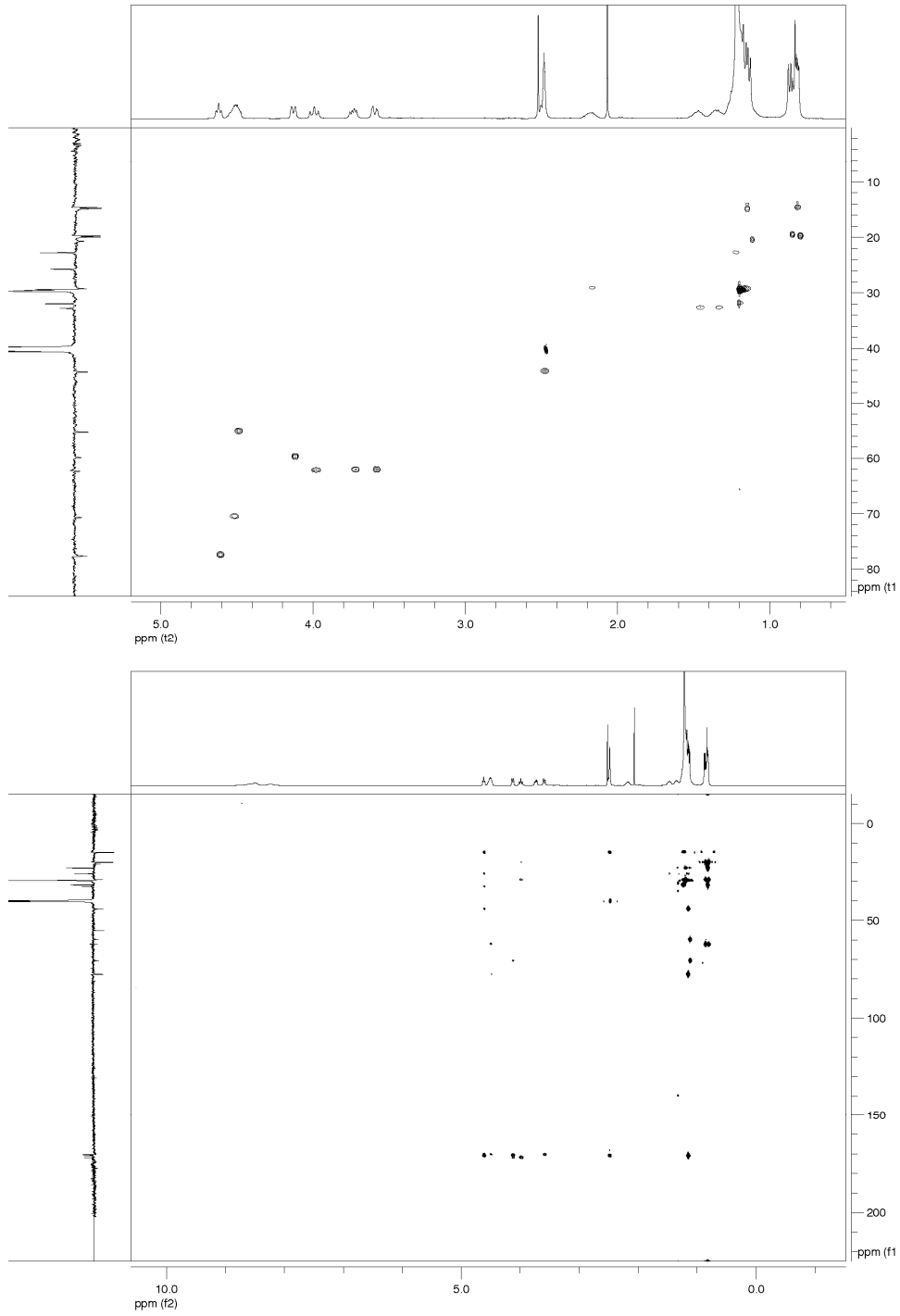
(2*R*,3*R*)-41:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

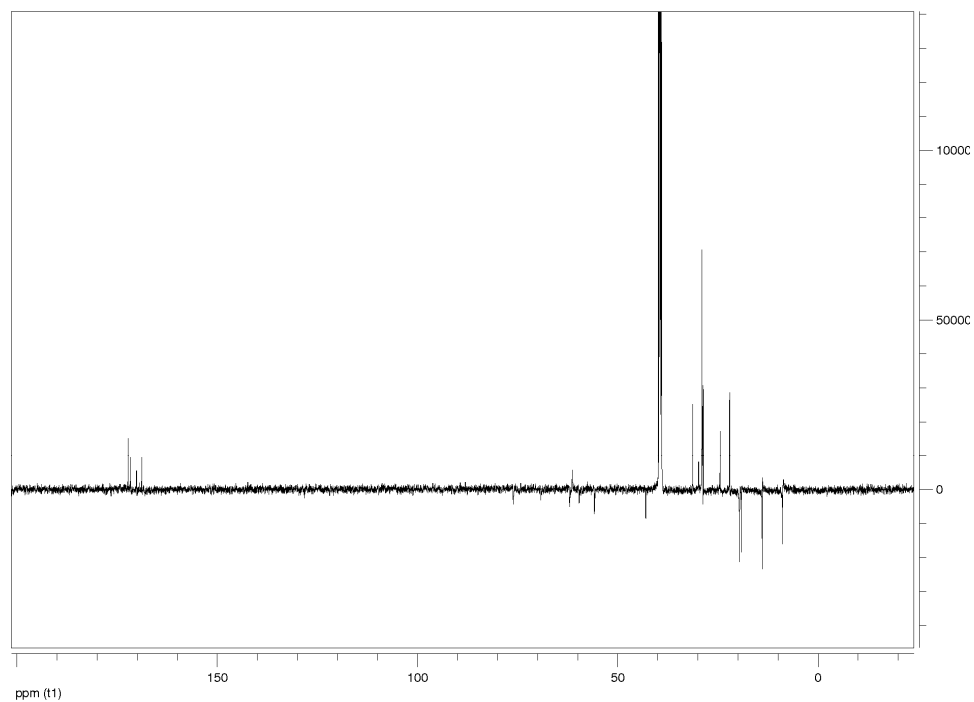
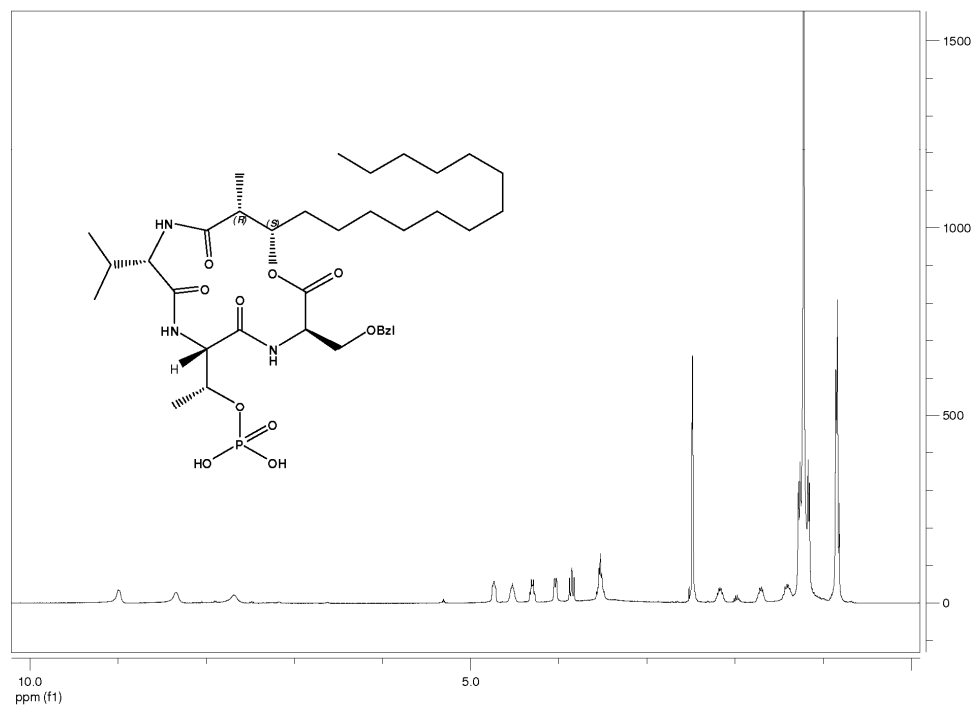
^{31}P (162 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);
TOCSY (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);



9. Anhang

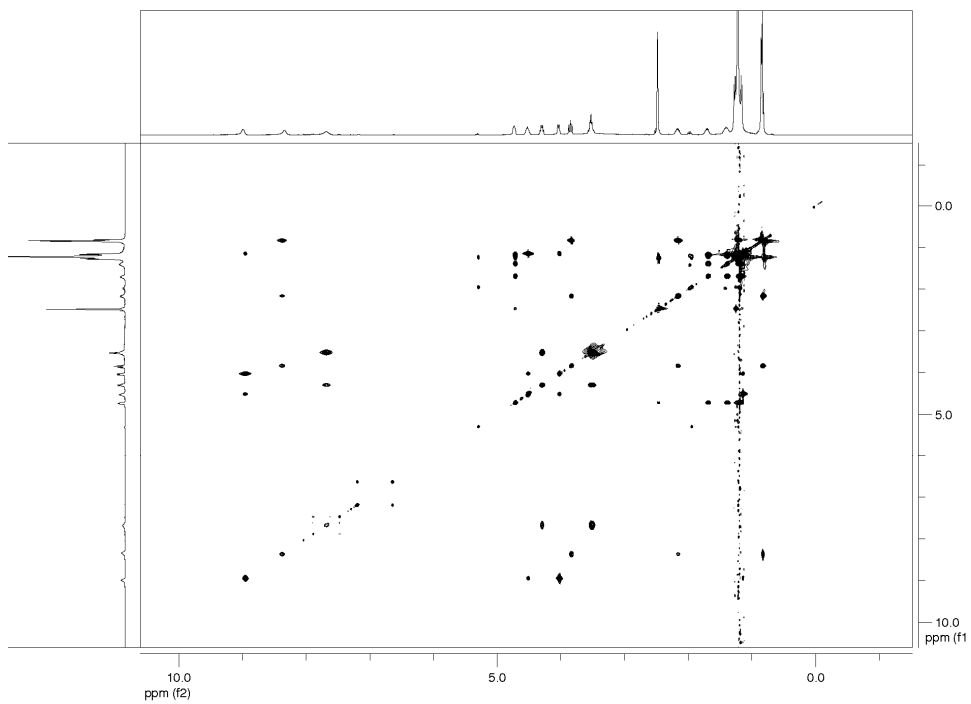
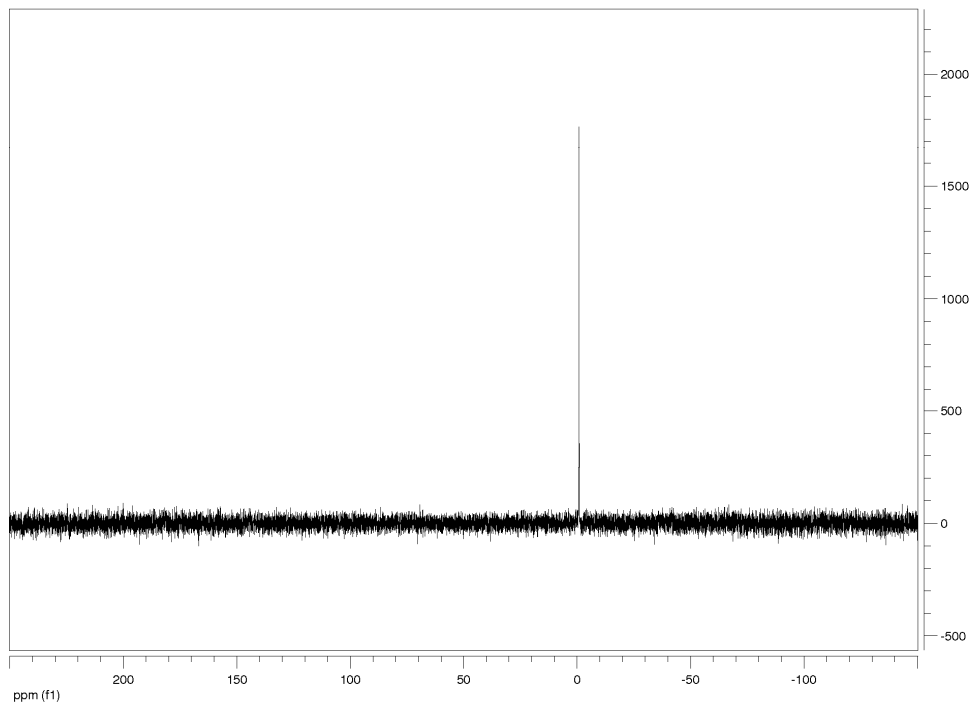
gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

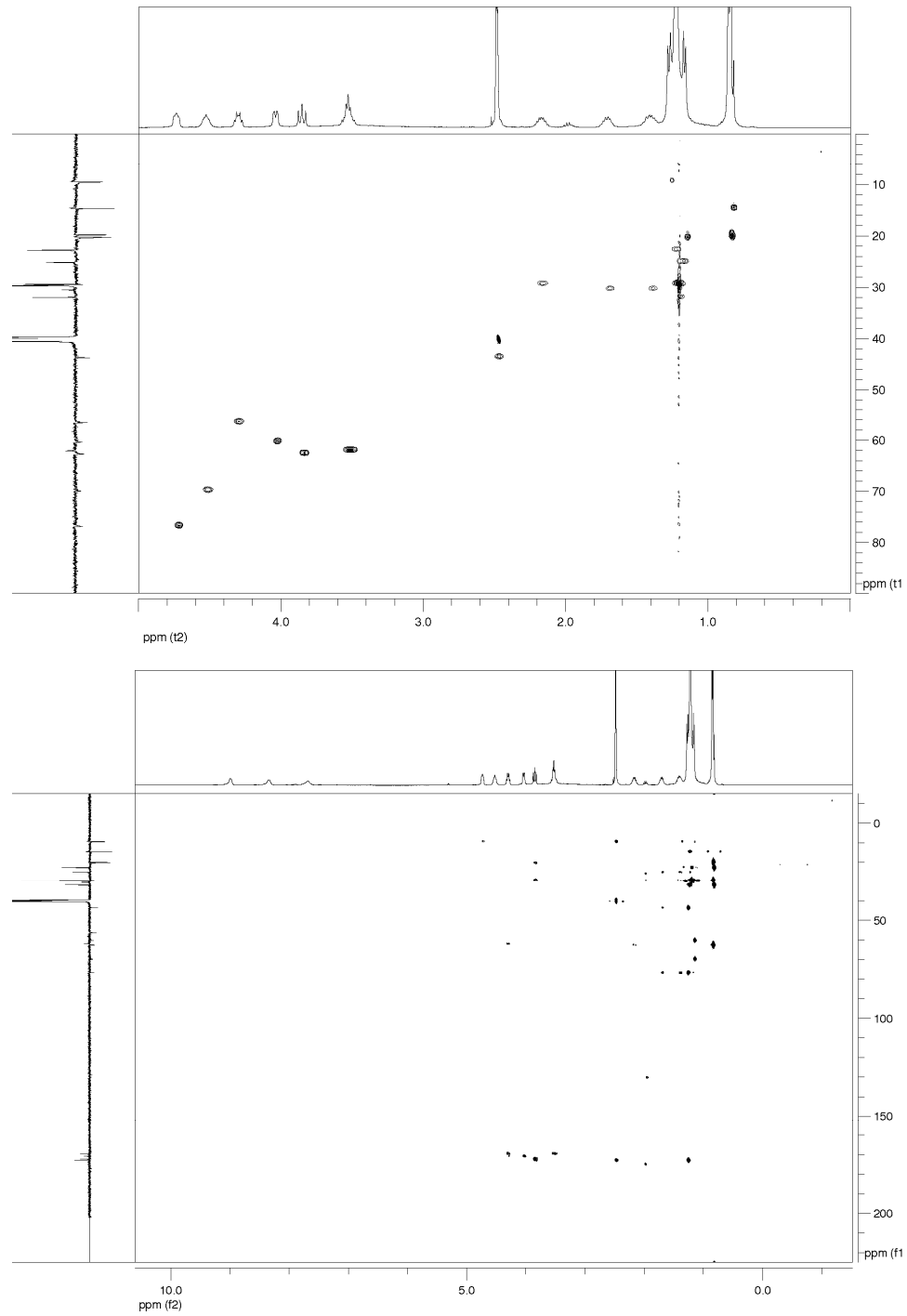


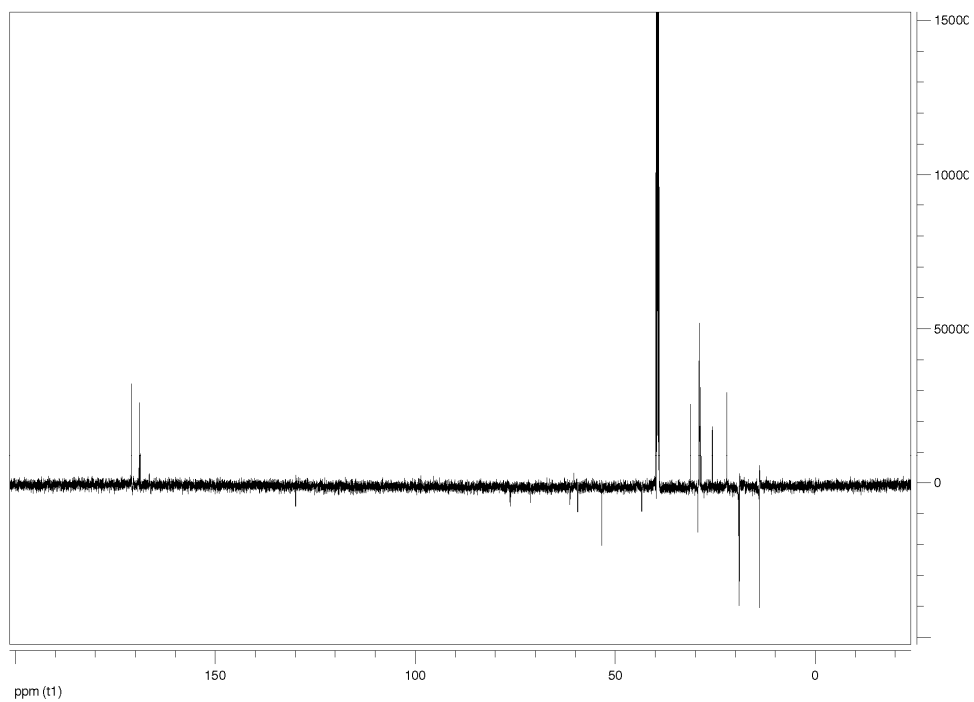
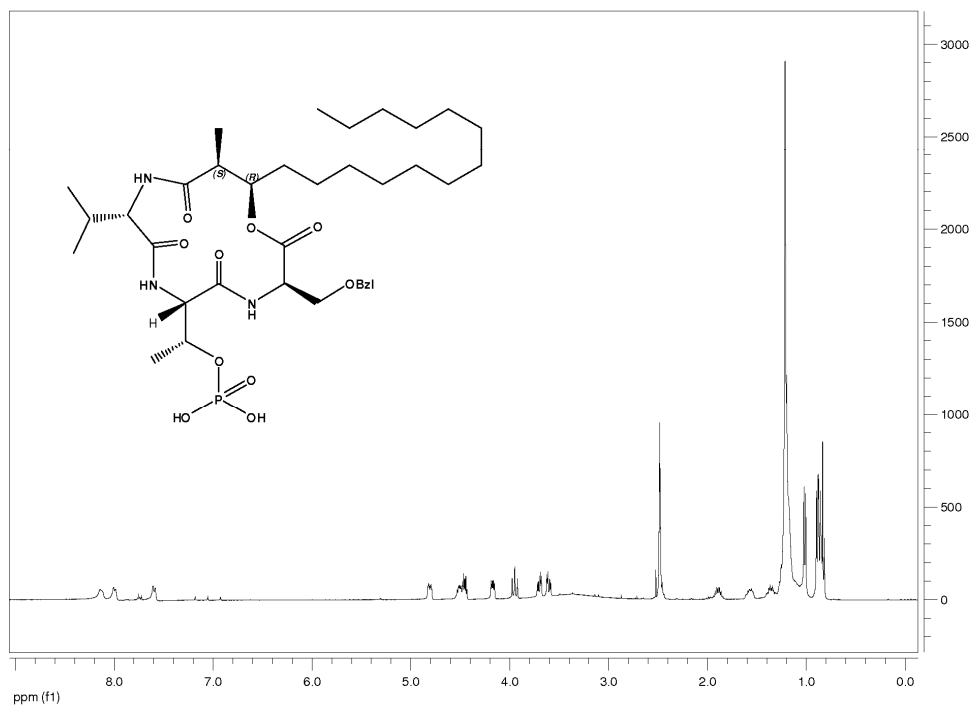
(2*R*,3*S*)-41:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

9. Anhang

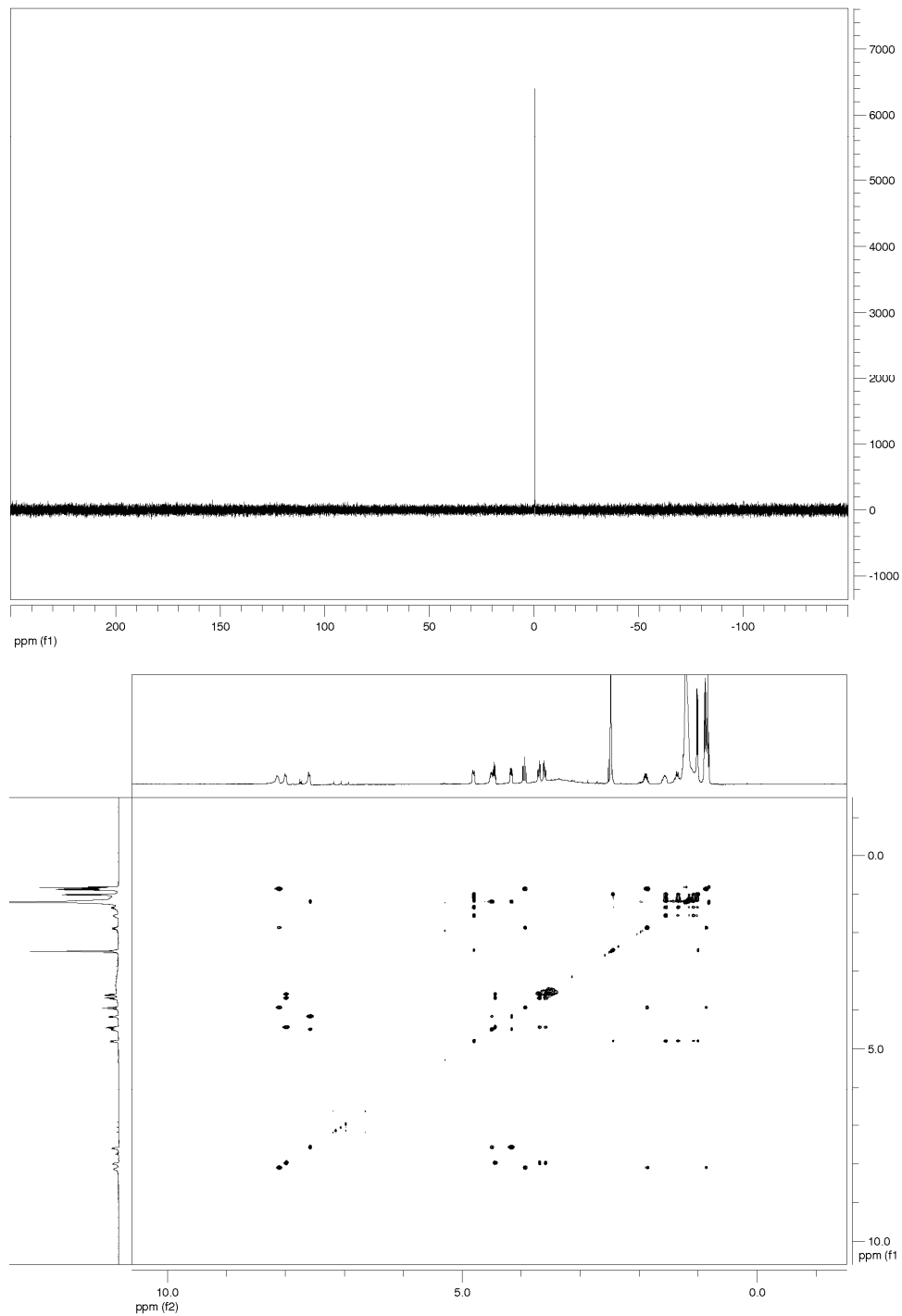
^{31}P (162 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);
TOCSY (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);



gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

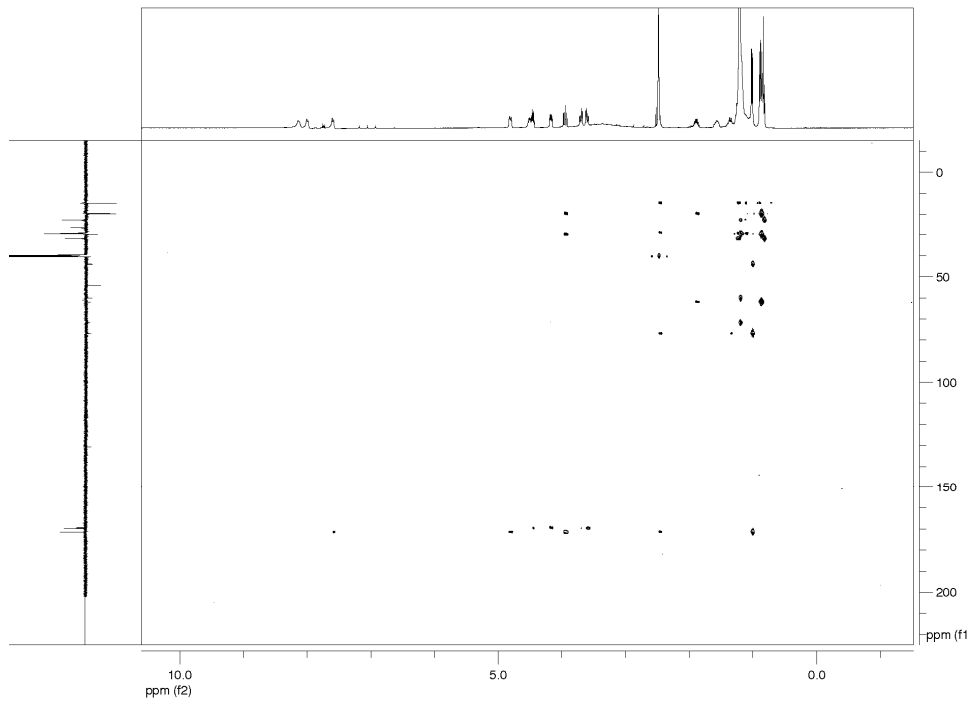
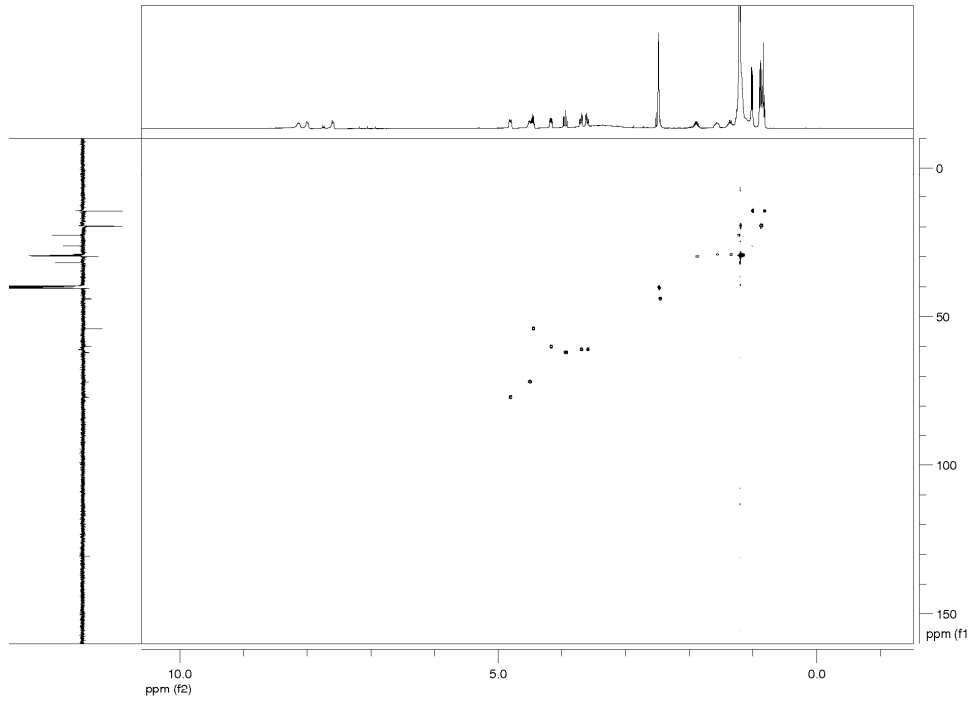
(2S,3R)-41:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

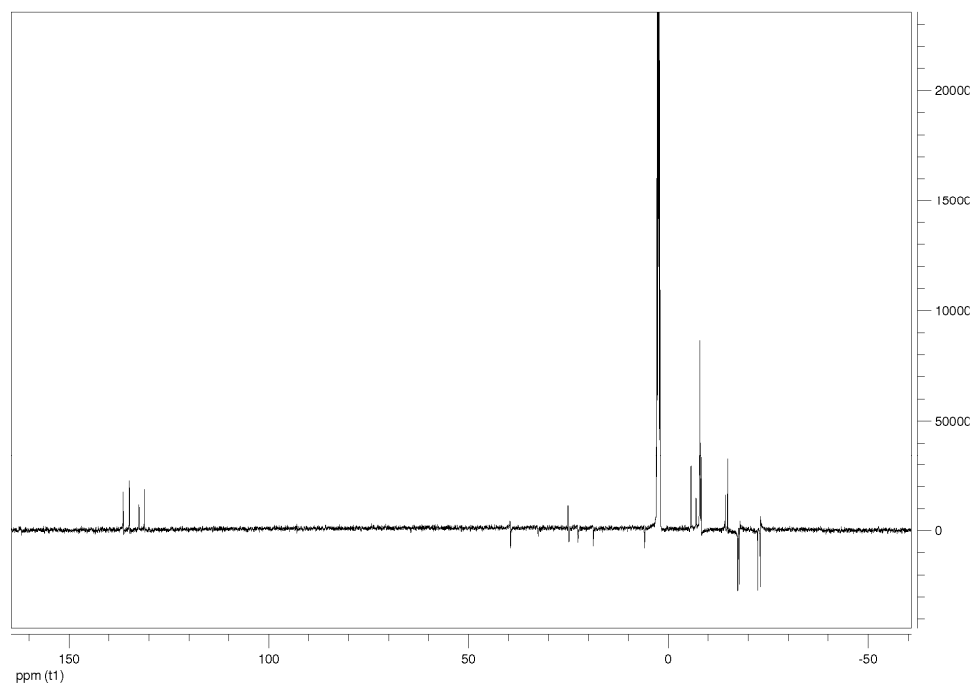
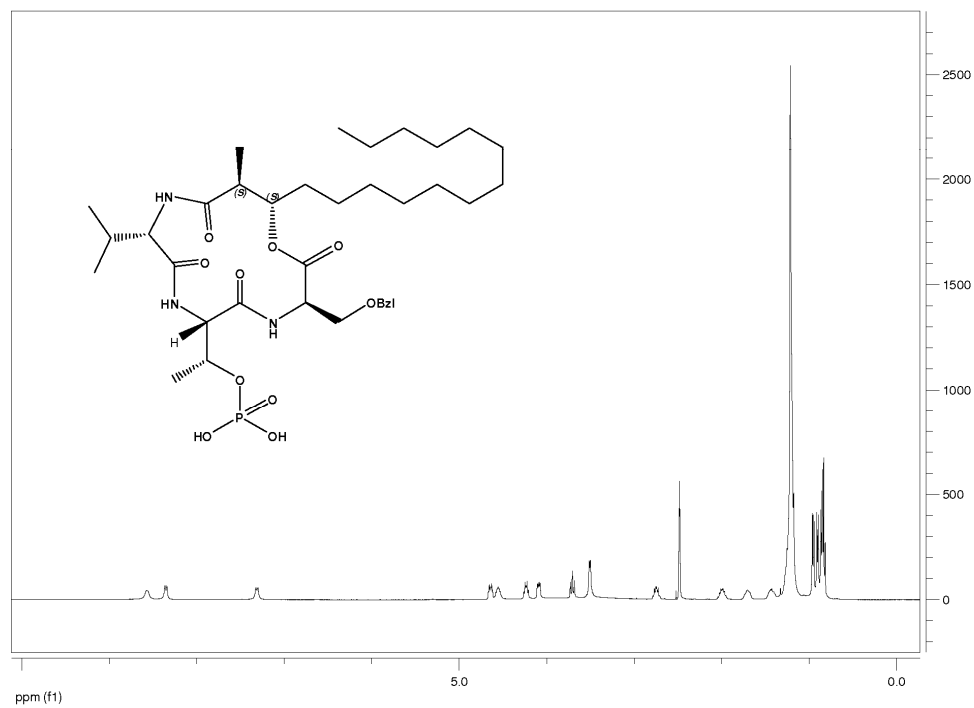
^{31}P (162 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);
TOCSY (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);



9. Anhang

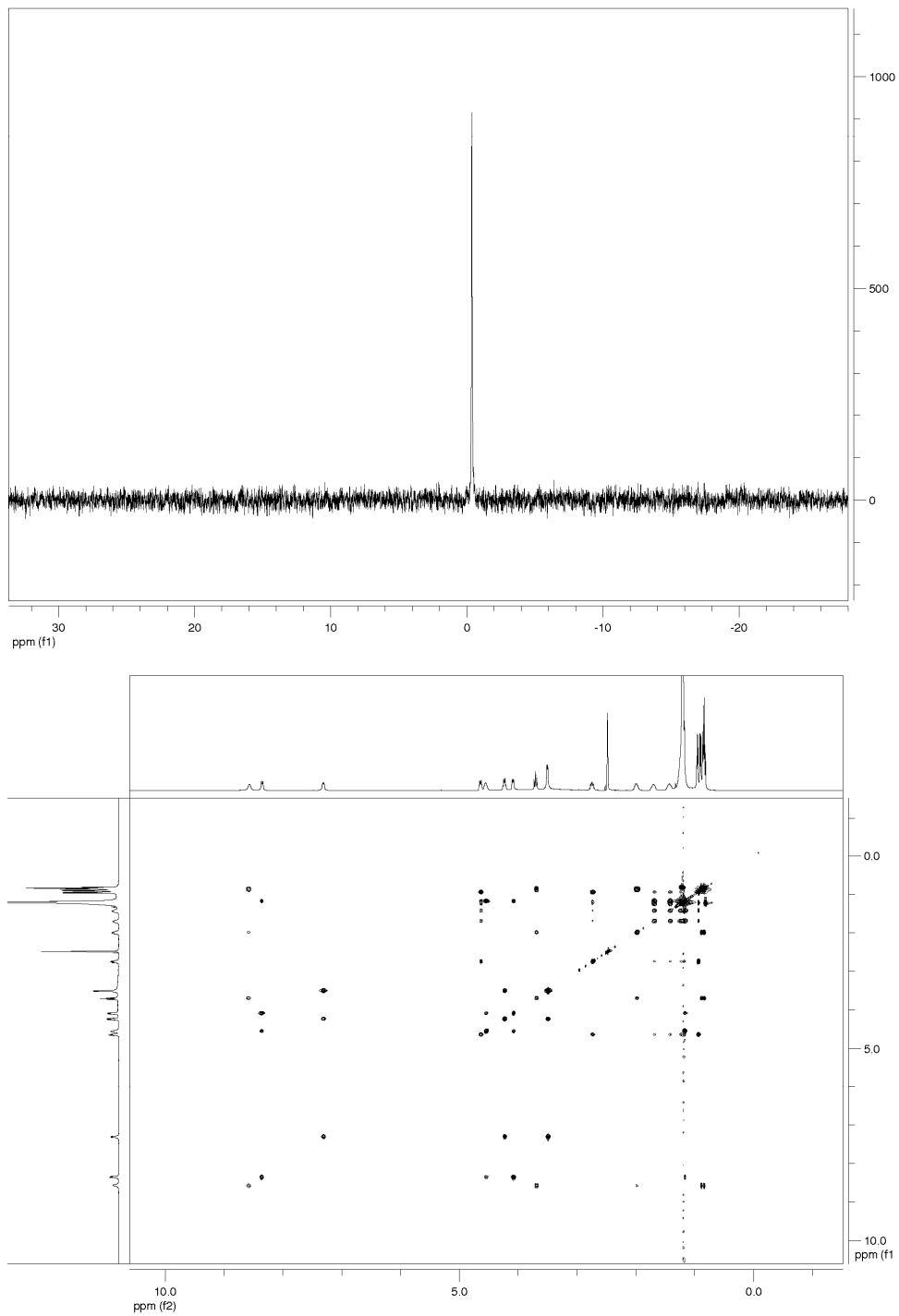
gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

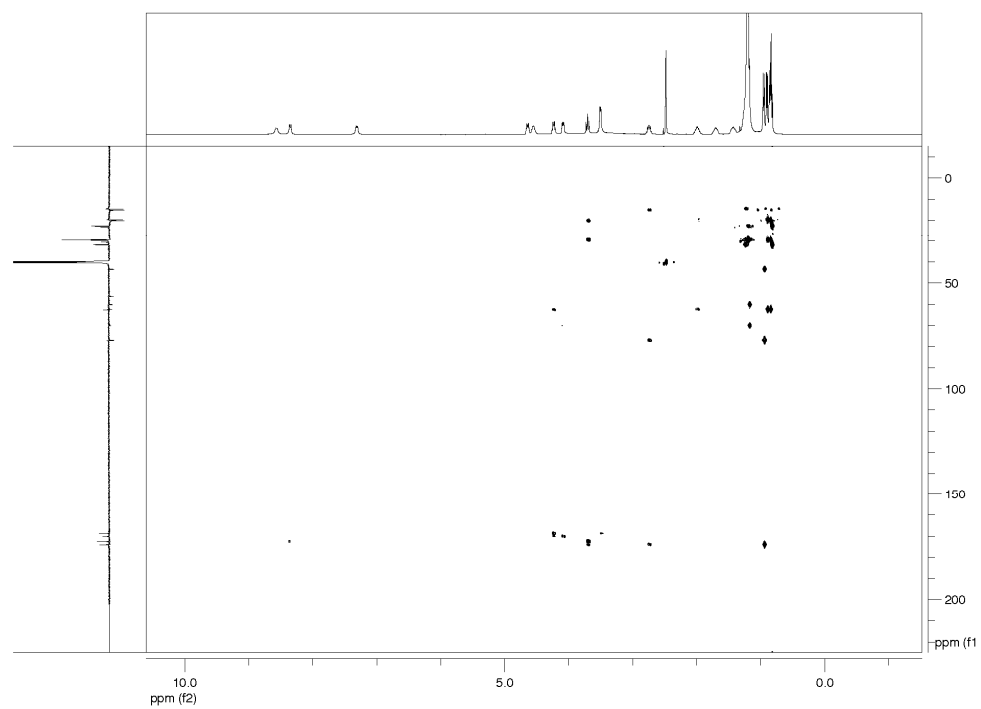
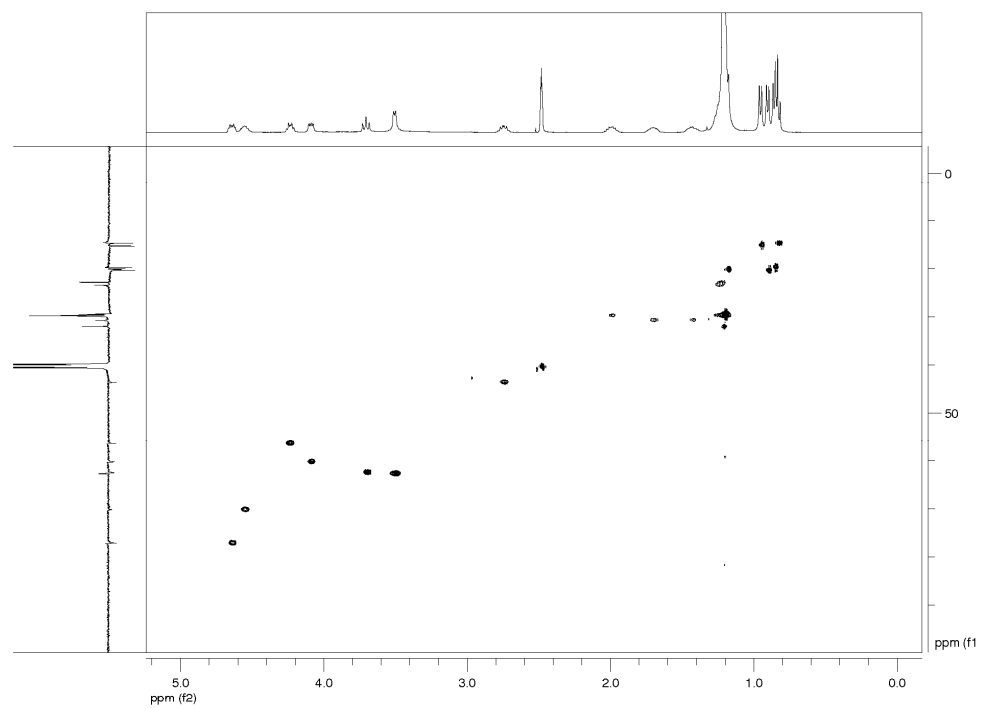


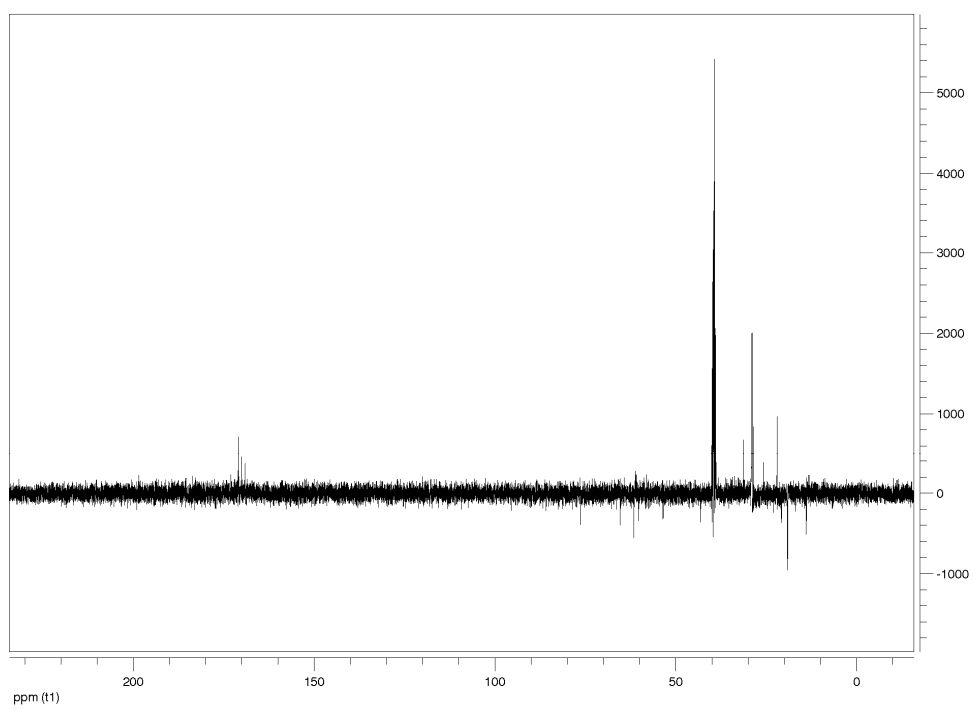
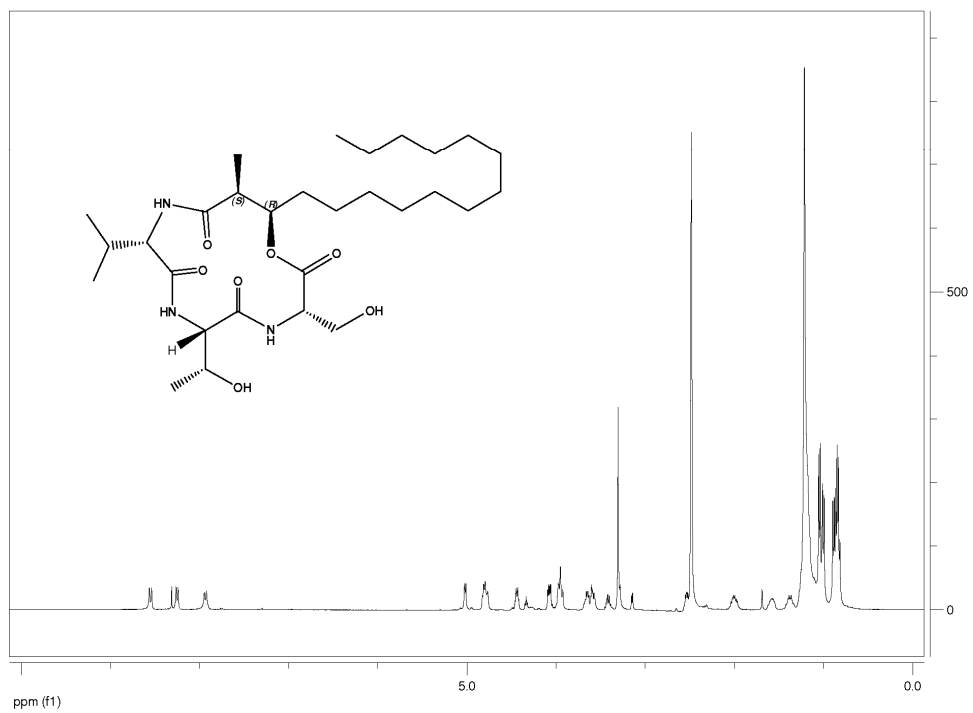
(2S,3S)-41:¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO); APT-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO);

9. Anhang

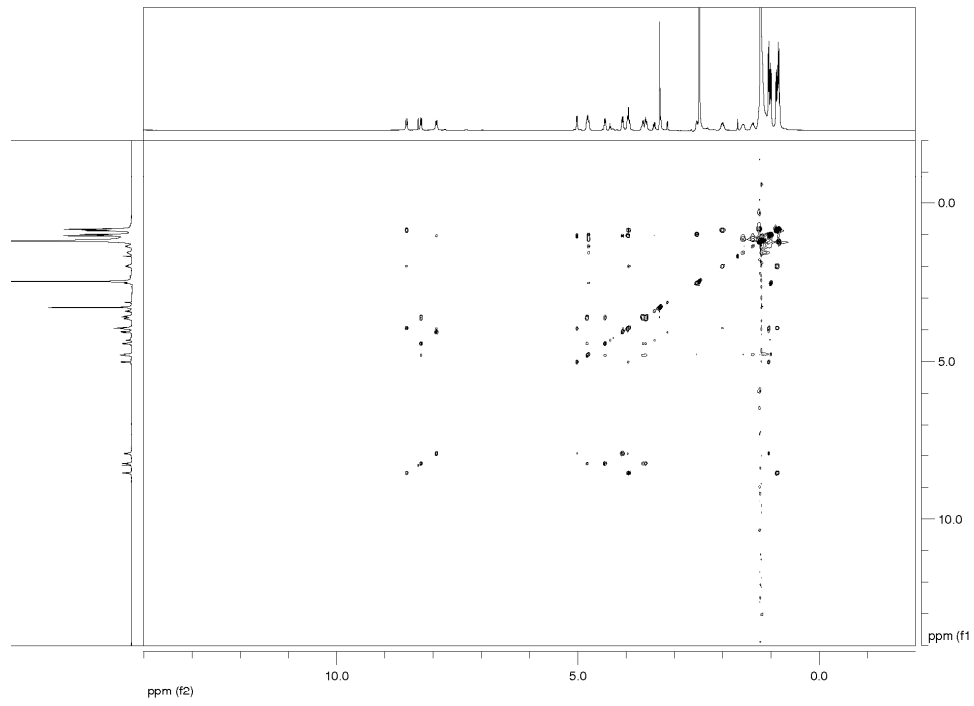
^{31}P (162 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);
TOCSY (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);



gHSQC (600 MHz, [D₆]DMSO); gHMBC (600 MHz, [D₆]DMSO)

(2S,3R)-118: ^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$); APT-NMR (151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$);

TOCSY (600 MHz, [D₆]DMSO);



9.2 Randbedingungen für die Molekülrechnungen

Klassifizierung der ROESY Kreuzsignale

Sequenz:

intraresidual (i), sequentiell (s), mittlere Reichweite (m)

Abstand:

schwach/weak (w): 1.8-5 Å, mittel/medium (m): 1.8-3.5 Å, stark/strong (s) 1.8-2.3 Å

Randbed.:

als Randbedingung in Konformationssuchen verwendet: ja (j); nein (n)

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3S)-40):

Proton	Proton	Sequenz	Abstand	Randbed.
Val-NH	BHA2'-H ₃	s	m	n
Val-NH	Ser-NH	m	m	j
Val-NH	Val-H γ a	i	m	n
Val-NH	Val-H β	i	m	j
Val-NH	Thr-NH	s	m	j
Val-NH	BHA2-H	s	s	j
Val-NH	Val-H γ b	i	m	n
Thr-NH	Val-H γ a	s	m	n
Thr-NH	Val-H γ b	s	m	n
Thr-NH	Thr-OH	i	m	j
Thr-NH	Thr-H γ	i	m	n
Thr-NH	Val-H β	s	m	j
Thr-NH	Ser-NH	s	s	j
Ser-NH	Ser-H β a	i	m	j
Ser-NH	Ser-CH ₂ Ph	i	m	j
Ser-NH	Thr-OH	s	w	j
Ser-NH	Ser-H β b	i	m	j
Thr-OH	Thr-H γ	i	m	n
BHA3-H	BHA2-H	i	m	j
BHA3-H	BHA4-Hb	i	m	j
BHA3-H	BHA4-Ha	i	m	j
BHA3-H	BHA2'-H ₃	i	m	n
Ser-CH ₂ Ph	Ser-H β b	i	m	j
Ser-CH ₂ Ph	Ser-H β a	i	m	j
Ser-H α	Ser-H β b	i	m	j
Ser-H α	Ser-H β a	i	m	j
Ser-H β a	Ser-H β b	i	s	j

BHA2-H	BHA2'-H ₃	i	s	n
BHA2-H	BHA4-Hb	i	m	j
Val-H β	Val-H γ a	i	s	n
BHA4-Ha	BHA4-Hb	i	s	j
BHA4-Ha	BHA2'-H ₃	i	m	n
BHA4-Hb	BHA2'-H ₃	i	m	n
BHA2'-H ₃	Val-H α	s	w	n

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2R,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3R)-40):

Proton	Proton	Sequenz	Abstand	Randbed.
Thr-NH	Thr-H α	i	m	j
Thr-NH	Ser-NH	s	s	j
Thr-NH	Val-H β	s	s	j
Thr-NH	Thr-H γ	i	m	n
Thr-NH	Thr-OH	i	m	j
Ser-NH	Thr-H γ	s	m	n
Ser-NH	BHA2'-H ₃	s	m	n
Ser-NH	Ser-H β b	i	m	j
Ser-NH	Thr-H α	s	m	j
Ser-NH	Thr-H β	s	m	j
Ser-NH	Ser-H β a	i	m	j
Ser-NH	Thr-OH	s	m	j
Val-NH	BHA2'-H ₃	s	m	n
Val-NH	Val-H β	i	m	j
Val-NH	Val-H γ b	i	m	n
Thr-OH	Thr-H β	i	s	j
Thr-OH	Thr-H γ	i	m	n
Thr-OH	Thr-H α	i	m	j
Ser-H α	Ser-H β a	i	m	j
Ser-H α	Ser-H β b	i	m	j
BHA3-H	BHA2-H	i	s	j
BHA3-H	BHA4-Hb	i	m	j
BHA3-H	BHA4-Ha	i	m	j
Ser-CH ₂ Ph-Ha	Ser-H β b	i	m	j
Ser-CH ₂ Ph-Ha	Ser-H β a	i	m	j
Ser-CH ₂ Ph-Hb	Ser-H β a	i	m	j
Ser-CH ₂ Ph-Hb	Ser-H β b	i	m	j
Thr-H α	Val-H γ a	s	m	n

Val-H α	Val-H γ a	i	m	n
Val-H α	Val-H γ b	i	m	n
Ser-H β a	Ser-H β b	i	s	j
BHA2-H	BHA2'-H ₃	i	s	n
BHA2-H	BHA4-Ha	i	m	j
BHA2-H	BHA4-Hb	i	m	j
Val-H β	Val-H γ b	i	s	n
Val-H β	Val-H γ a	i	s	n
BHA4-Ha	BHA4-Hb	i	s	j
Thr-H γ	Val-H γ a	s	m	n
Val-H γ a	Thr-OH	s	w	n

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3R)-40):

Proton	Proton	Sequenz	Abstand	Randbed.
Val-NH	Val-H α	i	m	j
Val-NH	Ser-NH	m	m	j
Val-NH	Val-H γ b	i	m	n
Val-NH	BHA2-H	s	s	j
Val-NH	Thr-NH	s	m	j
Val-NH	Val-H β	i	m	j
Ser-NH	Ser-H α	i	m	j
Ser-NH	Thr-NH	s	s	j
Ser-NH	Thr-H β	s	m	j
Ser-NH	Ser-H β a	i	m	j
Ser-NH	Thr-H α	s	m	j
Ser-NH	Ser-H β b	i	m	j
Ser-NH	Thr-OH	s	m	j
Ser-NH	Thr-H γ	s	w	n
Ser-NH	BHA2-H	s	w	j
Thr-NH	Val-H γ b	s	w	n
Thr-NH	Val-H β	s	m	j
Thr-NH	Thr-OH	i	m	j
Thr-NH	Thr-H β	i	m	j
Thr-NH	Thr-H γ	i	m	n
Thr-NH	Val-H γ a	s	m	n
Thr-OH	Thr-H β	i	s	j
Thr-OH	Thr-H γ	i	m	n
Thr-OH	Val-H γ a	s	w	n

BHA3-H	BHA4-Hb	i	m	j
BHA3-H	BHA2-H	i	s	j
BHA3-H	BHA4-Ha	i	m	j
Ser-H α	Ser-H β a	i	m	j
Ser-H α	Ser-H β b	i	m	j
Thr-H α	Thr-H β	i	m	j
Thr-H β	Thr-H γ	i	s	n
Val-H α	Val-H β	i	m	j
Ser-H β a	Ser-H β b	i	s	j
BHA2-H	BHA2'-H ₃	i	s	n
BHA2-H	Val-H γ b	s	w	n
Val-H β	Val-H γ a	i	s	n
Val-H β	Val-H γ b	i	s	n
BHA4-Ha	BHA4-Hb	i	s	j
BHA4-Ha	BHA2'-H ₃	i	s	n
BHA4-Hb	BHA2'-H ₃	i	m	n

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-D-seryl-(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2S,3R)-96):

Proton	Proton	Sequenz	Abstand	Randbed.
Val-NH	Val-H α	i	m	j
Val-NH	BHA2-H	s	s	j
Val-NH	Thr-NH	s	s	j
Val-NH	Val-H β	i	m	j
Val-NH	Ser-NH	m	m	j
Thr-NH	Thr-H α	i	m	j
Thr-NH	Thr-H β	i	m	j
Thr-NH	Ser-NH	s	m	j
Thr-NH	Val-H β	s	m	j
Thr-NH	Thr-OH	i	m	j
Thr-NH	Val-H α	s	m	j
Ser-NH	Thr-H α	s	m	j
Ser-NH	Ser-H α	i	m	j
Ser-NH	Ser-H β b	i	m	j
Ser-NH	Ser-H β a	i	m	j
BHA3-H	BHA2-H	i	s	j
Thr-OH	Thr-H β	i	s	j
Thr-OH	Thr-H α	i	m	j
Val-H α	Val-H β	i	m	j

Ser-H β a	Ser-HBn	i	m	j
Ser-H β a	Ser-H α	i	m	j
Ser-H β a	Ser-H β b	i	s	j
Ser-H β b	Ser-CH ₂ Ph	i	m	n
Ser-H β b	Ser-H α	i	m	j
BHA2-H	Ser-NH	s	w	j
BHA4-Ha	BHA4-Hb	i	s	j

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-L-seryl-(2R,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3S)-40):

Proton	Proton	Sequenz	Abstand	Randbed.
Val-NH	Ser-NH	m	m	j
Val-NH	Val-H β	i	m	j
Val-NH	Val-H γ a	i	m	n
Val-NH	BHA3-H	s	w	j
Thr-NH	Thr-H α	i	m	j
Thr-NH	Val-NH	s	m	j
Thr-NH	Ser-NH	s	s	j
Thr-NH	Thr-OH	i	m	j
Thr-NH	Val-H β	s	m	j
Thr-NH	Thr-H γ	i	m	n
Thr-NH	Val-H γ a	s	w	n
Thr-NH	Val-H γ b	s	m	n
Thr-NH	Thr-H β	i	m	j
Thr-H γ	Thr-OH	i	m	j
Ser-NH	BHA3-H	s	w	j
Ser-NH	Ser-H β a	s	m	j
Ser-NH	Thr-OH	s	m	j
Ser-NH	Thr-H β	s	w	j
Ser-NH	Thr-H α	s	m	j
Ser-NH	Ser-H β b	i	m	j
Ser-NH	Thr-H γ	s	w	n
Ser-CH ₂ Ph-Ha	Ser-H β b	i	m	j
Ser-CH ₂ Ph-Ha	Ser-H β a	i	m	j
BHA2'-H ₃	BHA4-Hb	i	s	n
BHA2'-H ₃	Ser-H β b	s	m	n
BHA2'-H ₃	Val-NH	s	s	n
BHA2'-H ₃	Ser-NH	s	m	n
BHA4-Ha	BHA4-Hb	i	s	j

BHA4-Ha	BHA2-H	i	w	j
BHA3-H	BHA2-H	i	s	j
BHA3-H	BHA4-Ha	i	m	j
BHA2-H	Val-NH	s	m	j
BHA2-H	BHA4-Hb	i	m	j

1,3,4-Anhydro(L-valyl-L-threonyl-3-O-benzyl-D-seryl-(2R,3S)-2-methyl-3-hydroxyhexadecansäure) ((2R,3S)-96):

Proton	Proton	Sequenz	Abstand	Randbed.
Ser-NH	Val-H α	m	w	j
Ser-NH	Thr-NH	s	m	j
Thr-NH	Val-H α	s	m	j
Thr-NH	Val-H γ a	s	m	n
Thr-NH	Thr-OH	i	m	j
Thr-NH	Val-H β	s	m	j
Thr-NH	Val-NH	s	m	j
BHA3-H	Ser-H α	s	w	j
BHA3-H	Val-NH	s	w	j
BHA3-H	Ser-NH	s	w	j
BHA3-H	BHA4-Hb	i	m	j
BHA3-H	BHA4-Ha	i	m	j
Ser-H α	BHA4-Ha	s	w	j
Ser-H α	Thr-NH	s	w	j
Ser-H α	Ser-H β a	i	m	j
Ser-H α	Ser-H β b	i	m	j
Ser-H α	Ser-NH	i	m	j
Val-H α	Val-H β	i	m	j
Val-H α	Val-H γ a	i	s	n
Val-H α	Val-NH	i	m	j
Ser-H β a	Ser-NH	i	m	j
Ser-H β a	Ser-H β b	i	s	j
Ser-H β b	Ser-CH ₂ Ph	i	m	n
Ser-H β b	Ser-NH	i	m	j
BHA2-H	Ser-NH	s	w	j
BHA2-H	BHA4-H α	i	w	j
BHA2-H	Val-NH	s	m	j
BHA2-H	BHA4-Hb	i	m	j
BHA2-H	BHA3-H	i	m	j
BHA2-H	BHA2'-H ₃	i	s	n

9. Anhang

BHA2-H	Val-Hα	s	w	j
Val-Hβ	Val-NH	i	m	j
Val-Hβ	Val-Hγ	i	s	n
BHA4-Ha	BHA4-Hb	i	s	j
BHA2'-H₃	Thr-Hα	m	w	n
BHA2'-H₃	Thr-Hβ	m	w	n
BHA2'-H₃	Ser-Hα	s	m	n
BHA2'-H₃	Thr-NH	m	m	n
BHA2'-H₃	Val-NH	s	s	n
Thr-Hγ	Ser-NH	s	w	n
Thr-Hγ	Val-Hβ	s	m	n
Thr-Hγ	Thr-NH	i	m	n
Thr-Hγ	Thr-OH	i	m	n
Thr-Hγ	Thr-Hα	i	s	n
Thr-Hγ	Thr-Hβ	i	s	n
Val-Hγ	Val-NH	i	m	n

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich für die interessante Themenstellung und die Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen. Herrn Dr. Hans-Dieter Arndt danke ich für die Betreuung in der Endphase und die Korrektur der Arbeit.

Für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die behandelten biologischen Themen danke ich Dr. Frank Dekker, Bernhard Ellinger, Karin Warburg und Heike Rimpel sowie Dr. Kirill Alexandrov für die Bereitstellung der Phosphatase VHR. Herrn Bernhard Griewel und Dr. Matthias Geyer möchte ich für die freundliche Hilfe bei zahlreichen NMR-Experimente danken und Stefan Wetzel für seine Hilfe bei den computerunterstützten Konformationssuchen. Bei Dr. Petra Janning bedanke ich mich für die Hilfe in allen analytischen Fragestellungen und bei Sandra Hippler, Christiane Heitbrink und Andreas Brockmeyer für die Aufnahme von Massenspektren.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und an der Technischen Universität Dortmund, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Arbeitskollegen möchte ich für eine gute Atmosphäre und den täglichen Wahnsinn danken. Insbesondere habe ich die Arbeit im ehemaligen Mädels-Labor mit Sasikala Thavam, Anja Watzke, Maja Köhn, Sandra Hippler sowie meinen Auszubildenden Julia Kessler und Claudia Seifert genossen.

Im großen Kommen und Gehen waren mir außerdem besonders Catherine Katzka, Torben Leßmann, Matthias Riedrich, Tanja Knoth, Ester Guiu, Gemma Triola und Sascha Menninger wichtige Freunde, denen ich für viele schöne Augenblicke und gemeinsame Unternehmungen dankbar bin.

Für das zügige Korrigieren dieser Arbeit danke ich Matthias Riedrich und Tanja Knoth. Auch meinen Freunden außerhalb des Arbeitskreises und dabei besonders Klasi, Meike, Julia, Chris, Basti, Grutz, Vio, Sisa und Stefan danke ich. Wie hätte ich diesen Wahnsinn nur ohne euch durchgestanden?!

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern und der restlichen Familie für die herzliche und bedingungslose Unterstützung während der Promotion und des Studiums.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nicola Bisek
Geburtsdatum und -ort	30. Januar 1979, Velbert
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1985 – 07/1989	Gerhard-Tersteegen-Grundschule, Heiligenhaus
08/1989 – 06/1998	Immanuel-Kant-Gymnasium, Heiligenhaus
06/1998	Abitur

Universitätsausbildung

10/1998 – 03/2003	Studiengang Chemie/Diplom, Universität Dortmund
09/2000	Vordiplom
04/2002 – 09/2002	Forschungsaufenthalt, University of Edinburgh, Schottland, Arbeitskreis Prof. S. Flitsch: <i>“Enzymatic optical resolution via acylation–hydrolysis on a solid support”</i>
10/2002 – 03/2003	Diplomarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Universität Dortmund, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Waldmann: <i>“Synthese offenkettiger Stevastelin Analoga als Protein-Phosphatase-Inhibitoren”</i>
03/2003	Diplom
07/2003 – 10/2008	Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Universität Dortmund, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Waldmann: <i>“Synthese und Konformationsanalyse von Stevastelin C3 Analoga als Phosphatase Inhibitoren”</i>

Dortmund, Oktober 2008.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, 27.10.2008

Nicola Bisek