

**SYNTHESE VON EFRAPEPTIN C**  
**UND**  
**EFRAPEPTIN-ANALOGA**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Doctor rerum naturalium)

der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

**vorgelegt von**

**Micha Jost**

**aus Usingen im Taunus**

**Bielefeld**

**Oktober 2003**

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Mattay

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2003

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von  
**Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald**  
in der Zeit von Juni 2000 bis September 2003 an der Fakultät für Chemie der  
Universität Bielefeld.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald für die interessante Aufgabenstellung, ständige Diskussionsbereitschaft, das stete Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat, sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Jochen Mattay danke ich für die Übernahme des Koreferates. Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe OC III möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie für fachliche Diskussionen und Anregungen danken. Bei Sven Weigelt bedanke ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts.

Bei Herrn Prof. Dr. Karlheinz Altendorf, Dr. Jörg-Christian Greie und Gerlinde Schmitz von der Universität Osnabrück bedanke ich mich für die Durchführung der biologischen Tests.

Bei Dr. Zsuzsa Majer (Eötvös Lorand-Universität, Budapest) bedanke ich mich für die Aufnahme zahlreicher CD-Spektren, Hilfe bei der Interpretation der CD-Spektren und die Anleitung zur Durchführung eigener CD-spektroskopischer Experimente. Bei Herrn Prof. Dr. Peter Welzel (Universität Leipzig) bedanke ich mich für die Möglichkeit, ein CD-Spektrometer zu nutzen.

Bei den Mitarbeitern der Firma DSM Math Boesten, Dr. Rinus Broxterman, Dr. Lucien Duchateau, Dr. Bernard Kaptein, Ilse Maes, Prof. Dr. Hans Schoemaker, Dr. Theo Sonke und Eric van der Vegte bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes „Enzymatische Racematspaltung von  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten  $\alpha$ -Azidocarboxamiden“. Von ihnen wurden bei der Firma DSM (Geleen) die Versuche zur

enzymatischen Racematspaltung, die Bestimmungen der Enantiomerenüberschüsse sowie die DDK-Messungen durchgeführt.

Bei Stefan Eißler, Christian Schäffer, Tobias Schulz, Nina Stemmer, Denis Strauß und Sven David Wilking bedanke ich mich für die während sechswöchiger Blockpraktika geleistete Arbeit.

Bei Thomas Huber bedanke ich mich für die Hilfe in Fragen der NMR-Spektroskopie.

Bei Dr. Jörg Schröder bedanke ich mich für die Mitteilung der Ergebnisse seiner Docking Studien.

Gerd Lipinski und Peter Mester danke ich für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren. Dr. Matthias Letzel, Eckhard Westermeier und Sandra Heitkamp danke ich für die Aufnahme der CI-, EI-, ESI- und FT-ICR-Massenspektren. Bei Frau Michel möchte ich mich für die Durchführung der Elementaranalysen bedanken.

Bei Larisa bedanke ich mich für die mir entgegengebrachte Zuneigung und die aufmunternden Worte.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

M. Jost, J.-C. Greie, N. Stemmer, S. D. Wilking, K. Altendorf, N. Sewald, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4438-4440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4267-4269.

**Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706**

## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Aib	$\alpha$ -Aminoisobuttersäure, Dimethylglycin
Al	Allyl, bei Verwendung des Dreibuchstaben-Codes
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Azib	$\alpha$ -Azidoisobutyryl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BTC	Bis(trichlormethyl)carbonat, Triphosgen
Bzl	Benzyl
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
CI	Chemische Ionsation
Cys	Cystein
d	Dublett (NMR)
DBN	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-D,L-threit
e.e.	Enantiomerenüberschuss
EE	Essigester, Ethylacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transform
Gln	Glutamin

Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HATU	s. N-HATU
HBTU	s. N-HBTU
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol
His	Histidin
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ile	Isoleucin
Iva	Isovalin, Ethylalanin
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Multipllett (NMR)
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization (matrixunterstützte Laser-Desorptionsionisation)
Met	Methionin
MS	Massenspektrometrie
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid
NEM	<i>N</i> -Ethylmorpholin
N-HATU	1-[Bis-(dimethylamino)methyliumyl]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridin-3-oxid hexafluorophosphat
N-HBTU	1-[Bis(dimethylamino)methyliumyl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid-hexafluorophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (magnetische Kernresonanz)
N-TBTU	1-[Bis(dimethylamino)methyliumyl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid-tetrafluoroborat
PE	Petrolether
Pfp	Pentafluorphenyl
Phe	Phenylalanin
Pip	L-Pipecolinsäure

ppm	parts per million
Pro	Prolin
PyBOP	Benzotriazol-1- yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
PyBroP	Bromotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett (NMR)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie)
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
Ser	Ser
SG	Schutzgruppe
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (Festphasenpeptidsynthese)
sst	sehr stark (IR-Spektroskopie)
t	Triplett
TBTU	s. N-TBTU
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TMS	Tetramethylsilan
TOF	Time of Flight (Flugzeit)
t <sub>R</sub>	Retentionszeit (HPLC)
Trp	Tryptophan
Trt	Trityl
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
X	Isobutyl[2,3,4,6,7,8-hexahydro-1-pyrrolo]1,2- α[pyrimidinyl]ethylamin
Xaa	beliebige Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl
Z-OSu	N-(Benzyloxycarbonyl)succinimid
β-Ala	β-Alanin



<b>1</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL .....</b>	<b>1</b>
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Peptide.....	2
1.3	Peptidsynthese.....	4
1.4	Synthese Aib-haltiger Peptide.....	11
1.5	Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese.....	14
1.6	Peptaibiotika.....	18
1.7	Efrapeptide .....	19
1.8	Adenopeptin .....	22
1.9	Aufgabenstellung .....	23
<b>2</b>	<b>SPEZIELLER TEIL .....</b>	<b>25</b>
2.1	Synthese von Efrapeptin C.....	25
2.1.1	Syntheseplanung .....	25
2.1.2	Synthese des C-terminalen Fragmentes.....	28
2.1.3	Synthese des mittleren und des N-terminalen Fragmentes.....	40
2.1.4	Kondensation der Fragmente .....	48
2.1.5	Charakterisierung des synthetischen Efrapeptin C .....	52
2.1.6	Inhibierung von F <sub>1</sub> -ATPase aus <i>E. coli</i> durch synthetisches Efrapeptin C.....	60
2.2	Synthese und Untersuchung von Efrapeptin-Analoga .....	65
2.2.1	Überlegungen zum Moleküldesign von Efrapeptin-Analoga .....	65
2.2.2	Synthese von Efrapeptin-Analoga .....	69
2.2.3	CD-spektroskopische Untersuchung von Efrapeptin-Analoga.....	75

2.2.4	Biologische Aktivität von Efrapeptin-Analoga und Efrapeptin-Fragmenten – Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen .....	78
2.2.5	Synthese eines von DBU abgeleiteten Analogons der Kopfgruppe der Efrapeptine .....	81
<b>2.3</b>	<b>Massenspektrometrische Eigenschaften von quartären Amidinium- salzen.....</b>	<b>82</b>
<b>2.4</b>	<b>Synthese und enzymatische Racematspaltung neuer <math>\alpha,\alpha</math>-dialkylierter <math>\alpha</math>-Azidocarboxamide .....</b>	<b>91</b>
2.4.1	Synthese neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide .....	92
2.4.2	Enzymatische Racematspaltung neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide.....	103
<b>2.5</b>	<b>Chirale <math>\alpha,\alpha</math>-dialkylierte <math>\alpha</math>-Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese.....</b>	<b>106</b>
<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>110</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>115</b>
4.1	Allgemeine Arbeitsmethoden .....	115
4.2	Synthese von Efrapeptin C .....	119
4.2.1	Synthese des C-terminalen Fragmentes .....	119
4.2.2	Synthese des mittleren und des N-terminalen Fragmentes .....	132
4.2.3	Kondensation der Fragmente .....	137
4.2.4	Charakterisierung des synthetischen Efrapeptin C.....	140
4.2.5	Inhibierung der $F_1$ -ATPase aus <i>E. coli</i> durch synthetisches Efrapeptin C .....	141
<b>4.3</b>	<b>Synthese und Untersuchung von Efrapeptin-Analoga .....</b>	<b>143</b>
<b>4.4</b>	<b>Massenspektrometrische Eigenschaften von quartären Amidinium- salzen.....</b>	<b>155</b>

<b>4.5</b>	<b>Synthese und enzymatische Racematspaltung neuer <math>\alpha,\alpha</math>-dialkylierter <math>\alpha</math>-Azidocarboxamide.....</b>	<b>159</b>
4.5.1	Synthese neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide.....	159
4.5.2	Enzymatische Racematspaltung neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide .....	177
<b>4.6</b>	<b>Chirale <math>\alpha,\alpha</math>-dialkylierte <math>\alpha</math>-Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese .....</b>	<b>179</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>187</b>

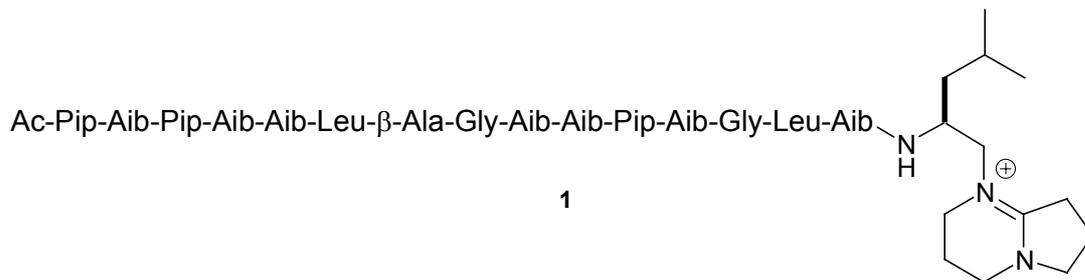


# 1 Allgemeiner Teil

## 1.1 Einleitung

Ein wichtiger Bereich der Chemie beschäftigt sich mit Naturstoffen.<sup>[1]</sup> Darunter werden neben Primärmetaboliten Produkte des Sekundärstoffwechsels von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren verstanden. Im Gegensatz zum Primärstoffwechsel, der in allen Organismen ähnlich verläuft (z. B. die Biosynthese der Proteine), unterscheidet sich der Sekundärstoffwechsel von Organismus zu Organismus und führt zu Verbindungen, welche charakteristisch für bestimmte Spezies sind. Sekundärmetabolite dienen dem produzierenden Organismus häufig als Waffe gegen äußere Feinde und besitzen oft interessante biologische Eigenschaften. Es kann sich z. B. um Antitumorwirkstoffe, entzündungshemmende Stoffe oder antibiotisch wirkende Verbindungen handeln. Aufgabe der chemischen Forschung ist zum einen die Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen aus den natürlichen Quellen und zum andern deren chemische Synthese.<sup>[2]</sup> Die Naturstoffsynthese kann zum Beweis einer vorgeschlagenen Struktur oder der Bereitstellung größerer Mengen eines aus den natürlichen Quellen nur schwer zugänglichen Naturstoffes dienen. Häufig wird ein synthetischer Zugang zu einem Naturstoff auch dazu genutzt, Verbindungen herzustellen, die dem natürlichen „Original“ ähneln, selber aber nicht natürlich vorkommen. Solch eine Verbindung wird ein Naturstoff-Analogon genannt. Durch die Bestimmung der biologischen Wirkung unterschiedlicher Naturstoff-Analoga lassen sich oft sogenannte Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ableiten. Diese können für die Wirkstoffforschung von großem Interesse sein.

Viele Pilze produzieren Sekundärmetabolite, die als Kondensationsprodukte von Aminosäuren aufzufassen sind und daher zu den Peptiden zählen. Ein bekanntes Beispiel für solch eine Familie pilzlicher Naturstoffe sind die Cyclosporine. Dabei handelt es sich um zyklische Undecapeptide mit immunsuppressiver Wirkung, die in der Medizin eingesetzt werden, um die Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen zu unterdrücken. Eine weniger bekannte Gruppe von pilzlichen Peptiden sind die Efrapeptide.

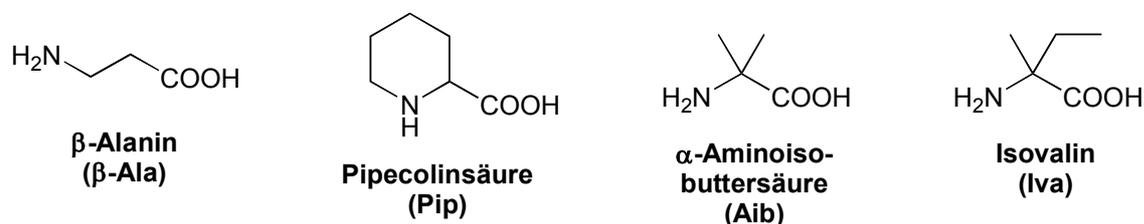


Schema 1.1: Struktur von Efrapeptin C (1)

Diese werden von dem Pilz *Tolypocladium niveum* produziert und zeigen interessante biologische Eigenschaften z. B. als ATPase-Inhibitoren. Neben der biologischen Aktivität ist auch die Sekundärstruktur der Efrapeptine von Interesse. Die Struktur von Efrapeptin C (1) ist in Schema 1.1 dargestellt.

## 1.2 Peptide

Peptide, Polyamide aus Aminosäuren, kommen in jeder lebenden Zelle vor.<sup>[3]</sup> Im engeren Sinne bezeichnet man solche Moleküle, die aus weniger als etwa einhundert Aminosäuren aufgebaut sind, als Peptide und größere Moleküle als Proteine. Proteine und viele Peptide enthalten normalerweise 22 unterschiedliche  $\alpha$ -Aminosäuren, deren Sequenz im Protein durch die Sequenz der Nucleobasen in der DNA des zugehörigen Gens bestimmt wird. Daher bezeichnet man diese 22 Aminosäuren als genetisch codierte Aminosäuren. Neben diesen 22 Aminosäuren findet man in der Natur aber auch Peptide, die andere Aminosäuren enthalten. Dabei kann es sich z. B. um D-Aminosäuren (anstelle der sonst vorkommenden L-Aminosäuren) oder  $\beta$ -Aminosäuren (v.a.  $\beta$ -Alanin) handeln.



Schema 1.2: Natürlich vorkommende nichtproteinogene Aminosäuren

Eine Klasse von natürlich vorkommenden, nicht genetisch codierten Aminosäuren sind  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte Aminosäuren. Diese tragen anstelle einer Seitenkette und eines H-

Atoms am zur Carboxylgruppe benachbarten  $\alpha$ -C-Atom zwei Alkylreste. In den Peptaibolen (s. Kapitel 1.6) kommen  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte Aminosäuren (v.a. Isovalin und  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure) vermehrt vor. Bei der Untersuchung von Peptiden, die  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte Aminosäuren enthalten, sind besonders die auftretenden Sekundärstrukturen von Interesse.<sup>[4]</sup> Der Einbau von  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten Aminosäuren begünstigt die Ausbildung helikaler Strukturen. Deshalb wird auch von „helikogenen“ Aminosäuren gesprochen. Sind in einem linearen Peptid einige wenige Aib-Reste enthalten, so bildet sich in der Regel eine  $\alpha$ -Helix. Das Pentadecapeptid Boc-Val-Ala-Leu-Aib-Val-Ala-Leu-(Val-Ala-Leu-Aib)<sub>2</sub>-OMe (20% Aib-Anteil) liegt im Kristall z. B. als nahezu ideale  $\alpha$ -Helix vor.<sup>[5]</sup> Peptide mit einem besonders hohen Aib-Anteil bilden in der Regel  $3_{10}$ -helikale Strukturen aus. Eine  $3_{10}$ -Helix weist drei Aminosäuren pro Windung auf, wobei durch die intramolekulare Wasserstoffbrücke ein zehngliedriger Ring entsteht (Bild 1.1). Die Werte der Torsionswinkel um die Bindung N-C $^{\alpha}$  ( $\phi$ ) und die Bindung C $^{\alpha}$ -C=O ( $\psi$ ) betragen bei einer rechtsgängigen  $3_{10}$ -Helix  $-60^{\circ}$  ( $= \phi$ ) und  $-30^{\circ}$  ( $= \psi$ ). Das Nonapeptid Boc-D-Phe-(Aib)<sub>4</sub>-Gly-Leu-(Aib)<sub>2</sub>-OMe (70% Aib-Anteil) liegt im Kristall als nahezu ideale  $3_{10}$ -Helix vor.<sup>[6]</sup> Die  $3_{10}$ -Helix kann auch als eine Folge von  $\beta$ III-Schleifen angesehen werden. Die  $\alpha$ -Helix besitzt 3.6 Aminosäuren pro Windung und durch die intramolekularen Wasserstoffbrücken entstehen 13-gliedrige Ringe ( $3.6_{13}$ -Helix). Die Werte der Torsionswinkel betragen hier  $-57^{\circ}$  ( $= \phi$ ) und  $-47^{\circ}$  ( $= \psi$ ).

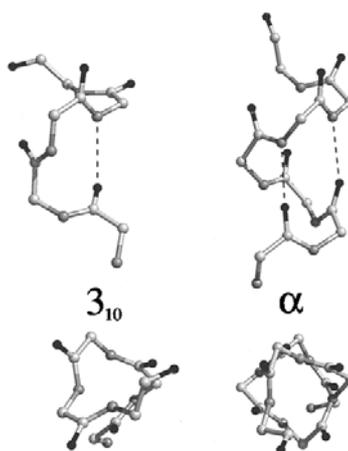


Bild 1.1: Darstellung einer  $3_{10}$ -Helix (links) und einer  $\alpha$ -Helix (rechts)

Eine wichtige Methode zur Untersuchung der Sekundärstrukturen von Peptiden in Lösung ist die CD-Spektroskopie. Bei der CD-Spektroskopie wird die ungleiche

Absorption von links- und rechtscircular polarisiertem Licht optisch aktiver Substanzen ausgenutzt. Toniolo et al. berichten über die CD-spektroskopischen Eigenschaften des  $3_{10}$ -helikalen Oktapeptids Ac-[L-( $\alpha$ -Me)Val] $_8$ -OtBu (Bild 1.2).<sup>[7]</sup>

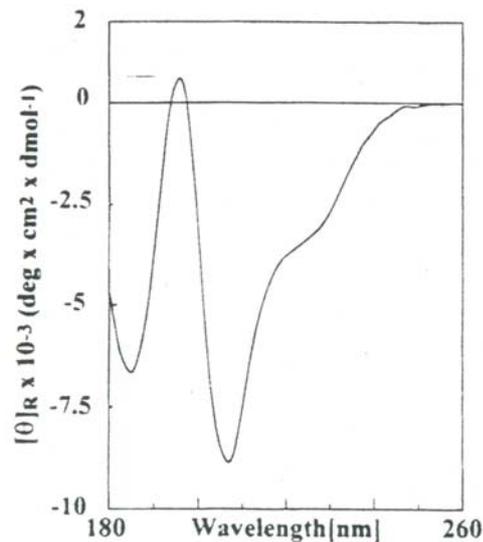


Bild 1.2: CD-Spektrum des  $3_{10}$ -helikalen Peptids Ac-[L-( $\alpha$ -Me)Val] $_8$ -OtBu in TFE<sup>[7]</sup>

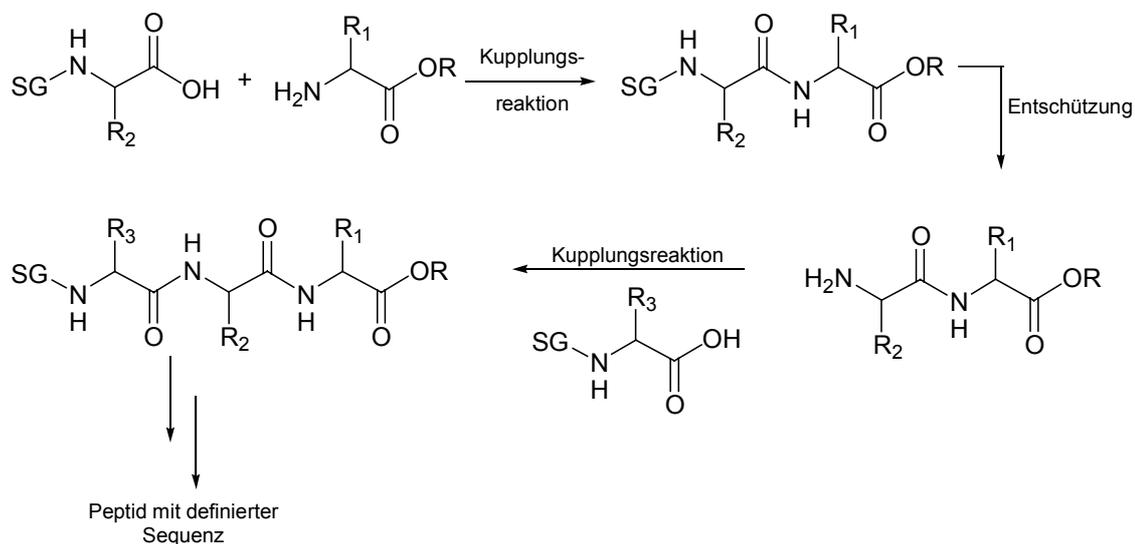
Das Peptid liegt als rechtsgängige  $3_{10}$ -Helix vor und zeigt eine negative CD-Bande bei 207 nm und eine Schulter bei 222 nm.

Peptide, die aus  $\beta$ -Aminosäuren aufgebaut sind, werden  $\beta$ -Peptide genannt. Auch  $\beta$ -Peptide können stabile Sekundärstrukturen (z. B. Helices und Faltblätter) ausbilden.<sup>[8]</sup> Hierbei ist besonders überraschend, dass bereits relativ kleine Oligomere erstaunlich stabile helikale Strukturen sowohl in Lösung als auch im Kristall bilden.

### 1.3 Peptidsynthese

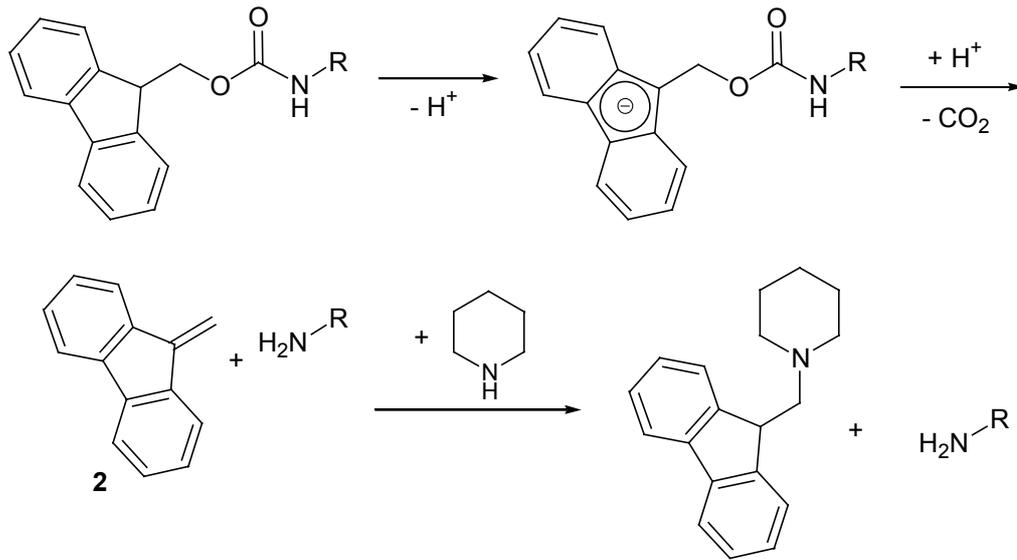
Soll zwischen zwei unterschiedlichen Aminosäuren oder Peptid-Fragmenten in definierter Weise eine Amidbindung geknüpft werden, so muss dafür gesorgt werden, dass eine Komponente eine freie Carboxylgruppe und die andere Komponente eine freie Aminogruppe besitzt. Die Bildung der Peptidbindung erfolgt dann durch Aktivierung der Carboxylgruppe, wofür eine Reihe von Methoden zur Verfügung steht, und anschließende Reaktion des aktivierten Carbonsäure-Derivats mit der freien Aminogruppe. Zur Maskierung der Carboxylgruppe und Aminogruppe steht eine Vielzahl von Schutzgruppen zur Verfügung: Säurefunktionen werden in der Regel als Ester geschützt und Aminogruppen werden in der Peptidchemie meist als Urethane

geschützt. Die Aminoschutzgruppe wird nach der Bildung der Peptidbindung entfernt, sodass die nächste Aminosäure mit geschützter Aminogruppe angefügt werden kann. Auf diese Weise kann ein Peptid mit definierter Aminosäuresequenz synthetisiert werden.



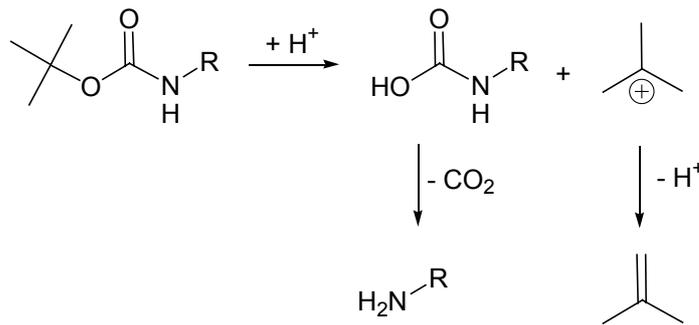
Schema 1.3: Schrittweise Peptidsynthese

Wichtig für den Erfolg der Peptidsynthese ist die Verwendung geeigneter Schutzgruppen. Man unterscheidet temporäre Schutzgruppen und permanente Schutzgruppen. Temporäre Schutzgruppen werden für den Schutz der  $\alpha$ -Aminogruppen der monomeren Bausteine verwendet und nach jedem Kupplungsschritt abgespalten. Die permanenten Schutzgruppen dienen zum Schutz der Drittfunktionen in den Seitenketten sowie des C-Terminus. Es werden hauptsächlich zwei Schutzgruppen-Taktiken angewendet. Bei der Boc/Benzyl-Taktik wird die Boc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe verwendet und als permanente Schutzgruppen dienen solche vom Benzyl-Typ (Z, Benzylester, Benzylether). Die Boc-Gruppe wird unter sauren Bedingungen mit TFA abgespalten und die Benzyl-Schutzgruppen werden am Ende der Synthese mit wasserfreier Fluorwasserstoffsäure abgespalten. Bei der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik dient die von Carpino et al.<sup>[9]</sup> entwickelte Fmoc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe und als permanente Schutzgruppen fungieren solche vom *tert*-Butyl-Typ (Boc, *tert*-Butylester, *tert*-Butylether). Die Fmoc-Gruppe wird unter basischen Bedingungen mit Piperidin oder DBU abgespalten (Schema 1.4).



Schema 1.4: Baseninduzierte Abspaltung der Fmoc-Gruppe

Die *tert*-Butyl-Schutzgruppen werden am Ende der Synthese mit TFA abgespalten (Schema 1.5).

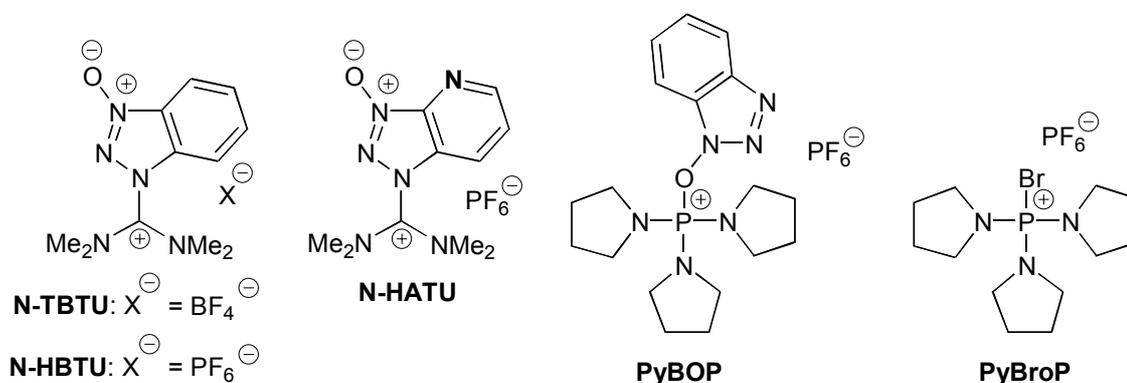


Schema 1.5: Säureinduzierte Abspaltung der Boc-Gruppe

Die Verwendung der im Vergleich zu Piperidin stärkeren Base DBU zur Entfernung der Fmoc-Gruppe ist zuverlässiger. Zum Abfangen des intermediären Dibenzofulvens **2** ist aber dennoch zusätzlich die Anwesenheit von Piperidin notwendig.

Bei der von Merrifield eingeführten Festphasenpeptidsynthese (Solid Phase Peptide Synthesis = SPPS) wird die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure über eine Esterbindung an einen unlöslichen polymeren Träger (Harz) gebunden.<sup>[10]</sup> Bei diesem Verfahren werden die Reagenzien in relativ hohem Überschuss zugegeben und die Aufarbeitung, d. h. Entfernung der Nebenprodukte und der überschüssigen Reagenzien erfolgt sehr einfach durch Abfiltrieren und Waschen des Harzes. Außerdem lässt sich die Festphasenpeptidsynthese leicht automatisieren. Nach dem Aufbau der Peptidkette

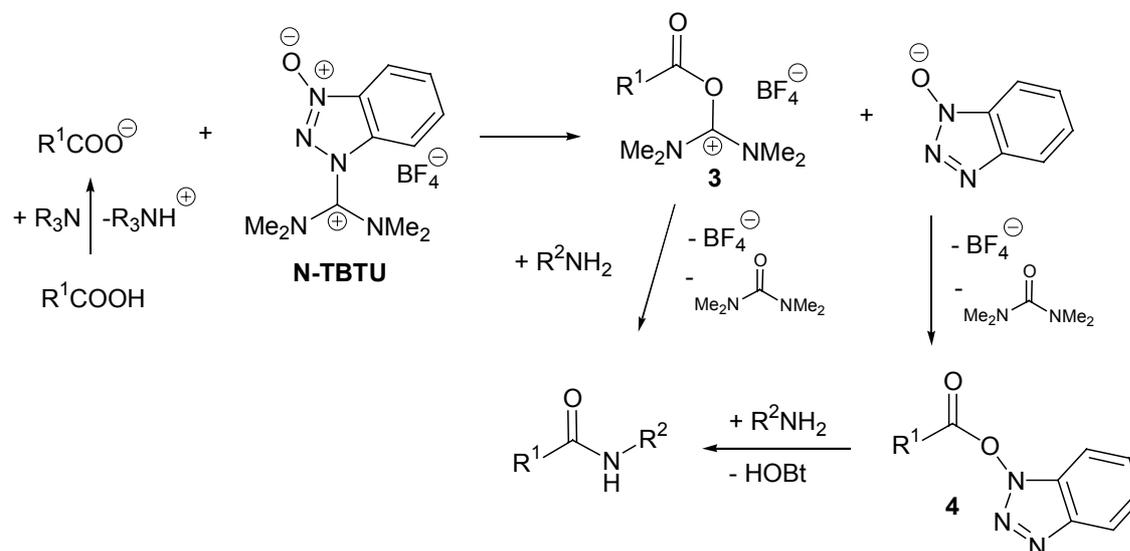
am polymeren Träger wird das Produkt vom Harz abgespalten, wobei meist auch die permanenten Schutzgruppen entfernt werden und es schließt sich die Reinigung des erhaltenen Rohproduktes an, die in der Regel chromatographisch durch HPLC erfolgt. Für die Durchführung der Kupplungsreaktionen wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Die heute gebräuchlichste Methode ist die Verwendung der monomeren nicht-aktivierten Bausteine (Urethan-geschützte Aminosäuren) und eines Kupplungsreagenzes. Die wichtigsten Klassen von Kupplungsreagenzien, welche auch in dieser Arbeit verwendet werden, sind Uroniumsalze und Phosphoniumsalze (Schema 1.6).<sup>[11]</sup> Die Kupplungsreagenzien vom Uroniumsalz-Typ tragen an einem durch zwei Dimethylamino-Substituenten stabilisierten kationischen C-Atom eine gute Abgangsgruppe und die Kupplungsreagenzien vom Phosphoniumsalz-Typ tragen an einem kationischen Phosphor-Atom eine gute Abgangsgruppe. Eigentlich handelt es sich bei den kommerziell erhältlichen Reagenzien N-TBTU, N-HBTU und N-HATU im Festkörper um Guanidinium-Salze, die aber in Lösung wahrscheinlich mit den Uronium-Formen im Gleichgewicht stehen. Diese werden als O-TBTU, O-HBTU und O-HATU bezeichnet und können unter bestimmten Bedingungen auch als kristalline Feststoffe isoliert werden.<sup>[12]</sup>



Schema 1.6: Kupplungsreagenzien vom Uronium- und Phosphoniumsalz-Typ

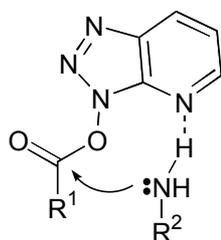
Die o. g. Kupplungsreagenzien werden in Kombination mit einem tertiären Amin (z. B. DIPEA) verwendet. Die Base deprotoniert zunächst die Carboxykomponente zum Carboxylat, welches vom elektrophilen Zentrum des Kupplungsreagenzes die Abgangsgruppe verdrängt. Dadurch entsteht ein stark aktiviertes Carbonsäure-Derivat **3**, welches dann entweder direkt mit der Aminokomponente zum Amid reagiert oder

von der vorher verdrängten Abgangsgruppe nucleophil angegriffen wird. Dadurch entsteht ein Aktivester **3**, der dann mit der Aminokomponente reagiert.



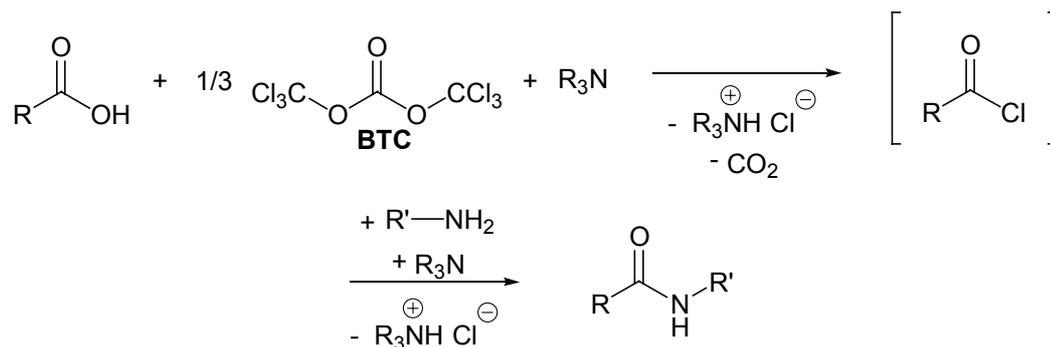
Schema 1.7: Mechanismus der Kupplungsreaktion mit N-TBTU

Die erhöhte Effizienz von N-HATU im Vergleich zum N-HBTU beruht wahrscheinlich auf einer intramolekularen Basenkatalyse bei der Aminolyse des intermediären Aktivesters durch das zusätzliche Stickstoff-Atom (Schema 1.8).<sup>[13]</sup>



Schema 1.8: Intramolekulare Basenkatalyse bei der Reaktion eines Amins mit einem HOAt-Ester

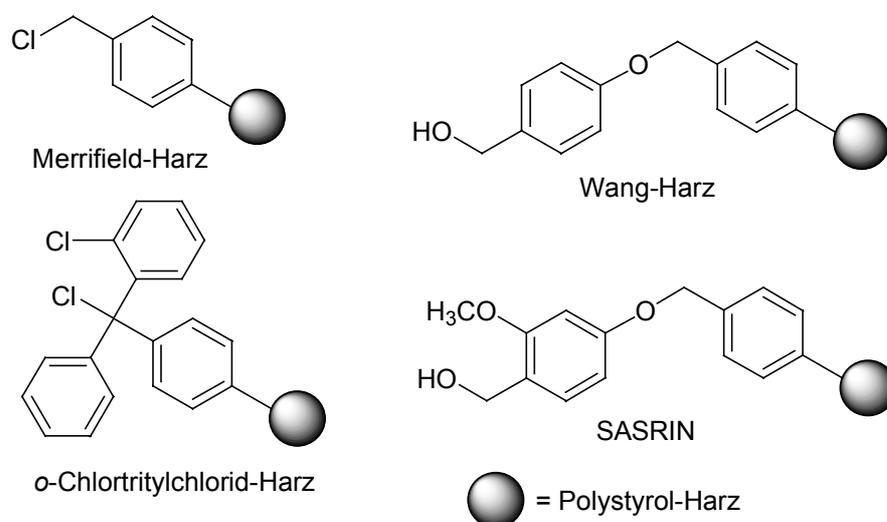
Eine ebenfalls sehr effektive Methode zur Knüpfung von Peptidbindungen ist die von Gilon et al.<sup>[14]</sup> eingeführte Verwendung von Triphosgen (Bis(trichlormethyl)carbonat, BTC) als Kupplungsreagenz. Die Reaktion verläuft wahrscheinlich über die Bildung eines Säurechlorides oder eines gemischten Anhydrides (Schema 1.9).



Schema 1.9: Peptidkupplung mit Triphosgen nach Gilon et al.<sup>[14]</sup>

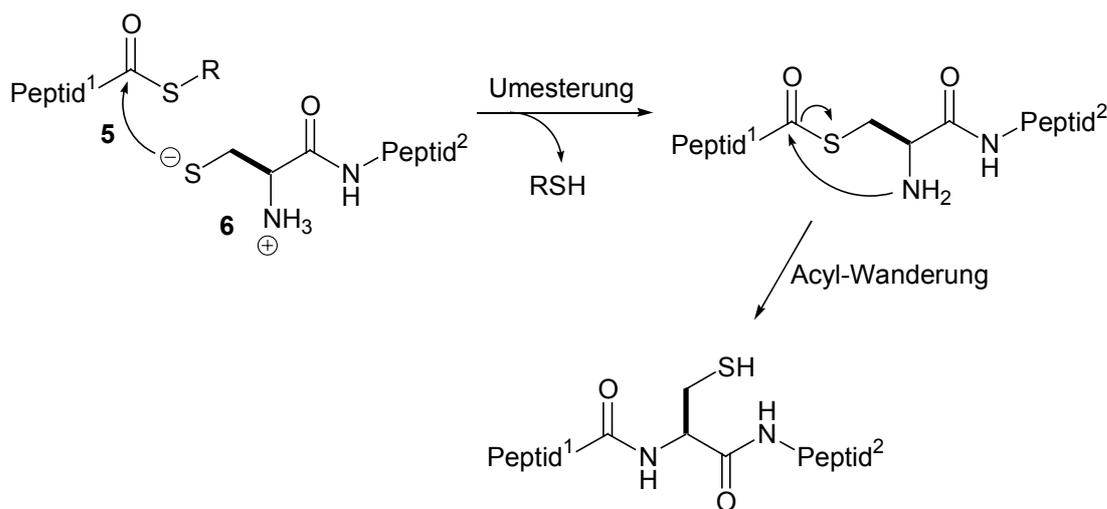
Jung et al. berichten über Totalsynthesen von Cyclosporin O und Omphalotin A unter Verwendung der Triphosgen-Methode.<sup>[15]</sup>

Als unlöslicher, polymerer Träger dient bei der Festphasenpeptidsynthese meistens mit Divinylbenzol vernetztes Polystyrol-Harz. Die verschiedenen Harze unterscheiden sich durch die Art des Linkers, über den die Verankerung der C-terminalen Aminosäure erfolgt. Das Standard-Harz für die Synthese nach der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik ist das Wang-Harz, bei dem die Abspaltung des Produktes mit TFA erfolgt.<sup>[16]</sup> Bei der Synthese nach der Boc/Benzyl-Taktik wird meistens das Merrifield-Harz verwendet, bei dem die Abspaltung des Produktes mit wasserfreier Flusssäure erfolgt. Zur Herstellung geschützter Peptide oder Peptidfragmente, wie sie z. B. für Segmentkondensationen oder bei der Synthese cyclischer Peptide nach dem Fmoc/*tert*-Butyl-Schema benötigt werden, dienen sehr säurelabile Harze wie das *o*-Chlortrityl-Harz<sup>[17]</sup> oder SASRIN (= Super Acid Sensitive Resin)<sup>[18]</sup> als polymere Träger.



Schema 1.10: Beispiele für polymere Träger für die Festphasensynthese

Die Festphasensynthese von Peptiden gelingt heute in den meisten Fällen für Sequenzen aus bis zu etwa zwanzig Resten mit hoher Zuverlässigkeit. Auch die Synthese von Peptiden aus bis zu fünfzig Aminosäuren ist auf diese Weise in einigen Fällen erfolgreich. Bei der Synthese noch größerer Peptide bis hin zu Proteinen wird häufig das Prinzip der Fragmentkondensation (auch Segmentkondensation genannt) angewandt. Hierbei wird eine lange Sequenz in mehrere Fragmente aufgeteilt, die zunächst einzeln synthetisiert und schließlich zur vollständigen Sequenz kondensiert werden. Für Fragmentkondensationen steht wiederum eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. Die Fragmentkondensation kann z. B. chemisch durchgeführt werden, indem eine Kupplungsreaktion mit zwei Fragmenten durchgeführt wird, wobei eines eine freie N-terminale Aminogruppe trägt und das andere eine freie C-terminale Carboxylgruppe trägt. Sämtliche anderen reaktiven Gruppen müssen geschützt vorliegen. Entscheidend für den Erfolg dieses Verfahrens ist die Wahl der Schnittstelle, da bei der Aktivierung des Carboxyterminus eines Peptids in erheblichem Umfang Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure beobachtet wird. Daher muss die Fragmentkondensation so durchgeführt werden, dass hierbei entweder ein Glycin- oder ein Prolin-Rest aktiviert wird. Neben der chemischen Fragmentkondensation wurden auch enzymatische Methoden entwickelt.<sup>[19]</sup> Ein heutzutage sehr beliebtes Verfahren ist die von Wieland<sup>[20]</sup> in den fünfziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts erfundene und von Kent<sup>[21]</sup> in den neunziger Jahren wieder aufgegriffene „native chemische Ligation“ (Schema 1.11).



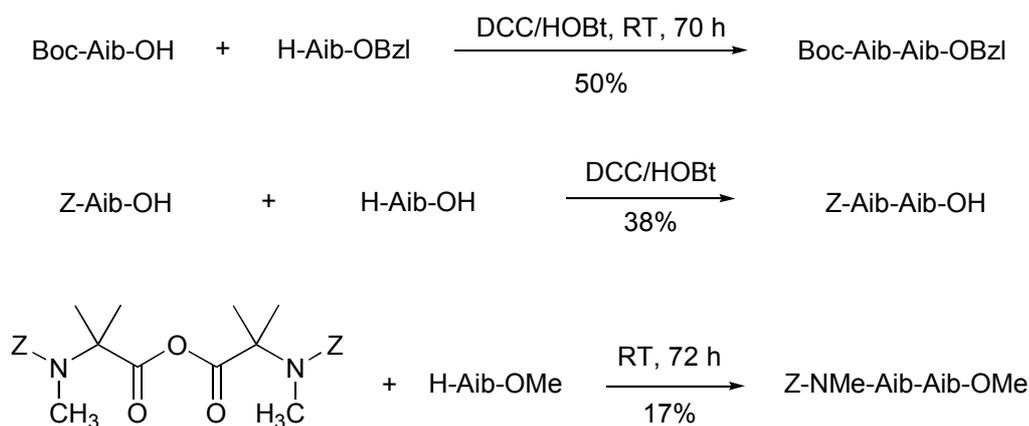
Schema 1.11: Mechanismus der nativen chemischen Ligation

Hierbei reagiert ein Fragment mit C-terminalem Thioester **5** (= Carboxykomponente) mit einem Fragment mit N-terminalem Cystein **6** (= Aminokomponente). Nach einer Umesterung kommt es zu einer S-N-Acyl-Wanderung.

Ein wichtiger Vorteil dieser Methode ist, dass die funktionellen Gruppen in den Aminosäureseitenketten der Fragmente keinerlei Schutzgruppen tragen müssen. Allerdings kann die Schnittstelle nicht frei gewählt werden, sondern muss neben einem in der Zielsequenz vorkommenden Cystein liegen.

### 1.4 Synthese Aib-haltiger Peptide

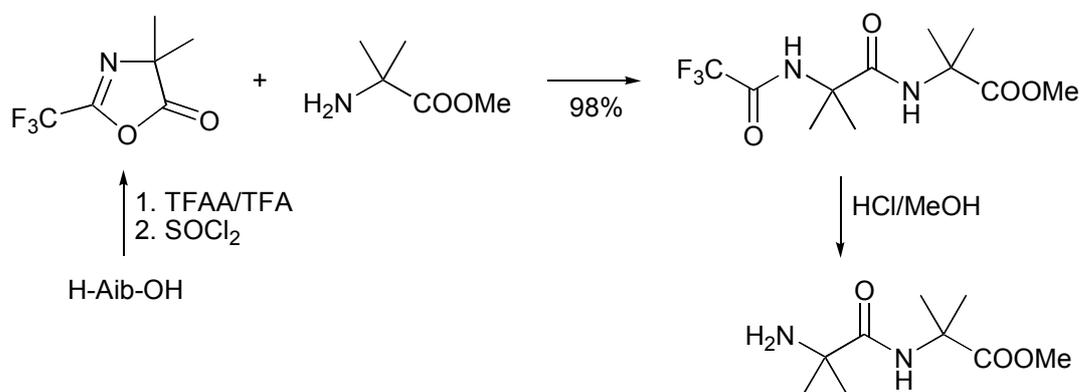
Die Synthese Aib-haltiger Peptide wird durch die sterische Hinderung aufgrund der beiden Substituenten am  $\alpha$ -C-Atom erschwert. Die meisten Standardmethoden der Peptidchemie liefern nur geringe Ausbeuten, selbst nach langen Reaktionszeiten (Schema 1.12). Insbesondere die Bildung einer Peptidbindung zwischen zwei Aib-Resten ist schwierig zu erreichen. Außerdem sind z. B. Aib-Pro-Bindungen labil und werden bereits unter schwach sauren Bedingungen hydrolysiert.<sup>[22]</sup> Nach der klassischen DCC/HOBt-Methode<sup>[23]</sup> lassen sich Aib-Dipeptide nur in geringen Ausbeuten erhalten.<sup>[24,25]</sup> Auch die Verwendung von symmetrischen Anhydriden erbringt keine besseren Ergebnisse.<sup>[26]</sup>



Schema 1.12: Synthese Aib-haltiger Peptide nach Standardmethoden

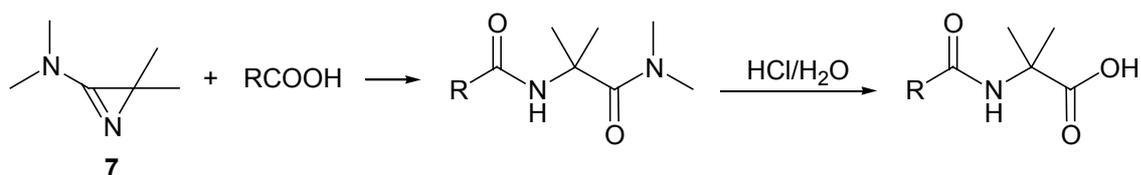
Bereits die Einführung der Boc-Aminoschutzgruppe ist schwierig. Reaktionsbedingungen, die bei anderen Aminosäuren zu sehr guten Ausbeuten führen, liefern im Falle von Aib nur 9%.<sup>[27]</sup>

Dennoch wurden Methoden entwickelt, mit denen sich Aib-haltige Peptide und vor allem solche mit Aib-Oligosequenzen effektiv synthetisieren lassen. Jones et al.<sup>[28]</sup> berichten über die Verwendung von 5-(4*H*)-Oxazolonen der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure als aktivierte Derivate, mit denen sich gute Ausbeuten erzielen lassen (Schema 1.13).



Schema 1.13: Synthese Aib-haltiger Peptide nach der Oxazolone-Methode

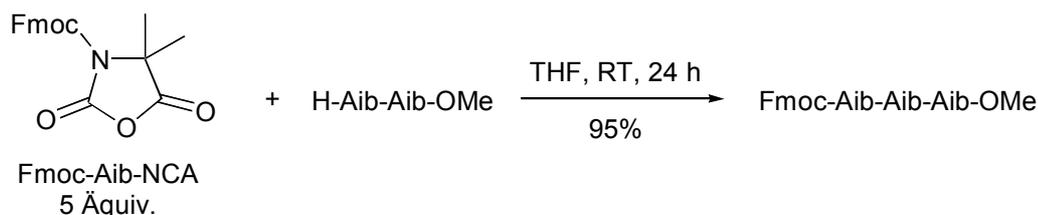
Die Bildung von Oxazolonen ist bei chiralen  $\alpha$ -Aminosäuren unerwünscht, da diese leicht zu Epimerisierungen führen können. Diese Gefahr besteht bei  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten Aminosäuren (auch beim chiralen Isovalin) wegen des fehlenden  $\alpha$ -H-Atoms nicht. Heimgartner et al.<sup>[25, 29]</sup> beschreiben die Verwendung von 3-(Dimethylamino)-2,2-dimethyl-2*H*-azirin (**7**) als Aib-Äquivalent (Schema 1.14).



Schema 1.14: Die Azirin-Methode nach Heimgartner<sup>[29]</sup>

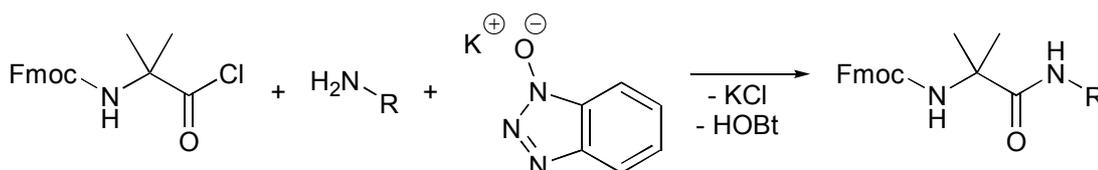
Unter Verwendung dieser Methode in Verbindung mit der Oxazolone-Methode können einige Peptaibol-Fragmente synthetisiert werden. Dieses Verfahren ist zwar effizient, aber die Synthese des Bausteins ist relativ aufwendig. Außerdem wird hier die übliche Vorgehensweise, nämlich Aktivierung der Carboxykomponente umgekehrt, da hier der heterocyclische Baustein als aktivierte Aminokomponente dient, die mit der unaktivierten Carboxykomponente reagiert. Dies hat Auswirkungen auf die Synthesestrategie und -planung.

Frérot et al. berichteten 1991 über die erfolgreiche Synthese von Aib-haltigen Dipeptiden unter Verwendung der Phosphoniumsalze PyBOP und PyBroP als Kupplungsreagenzien.<sup>[30]</sup> Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete 1993, dass sich diese Methode zur Synthese von Peptiden mit drei unmittelbar aufeinanderfolgenden Aib-Resten als ungeeignet erwies und stattdessen die Verwendung des Fmoc-geschützten *N*-Carboxyanhydrides (Fmoc-Aib-NCA) zum Erfolg führt (Schema 1.15).<sup>[31]</sup>



Schema 1.15: Verwendung des Fmoc-geschützten *N*-Carboxyanhydrides zur Synthese eines Tripeptids

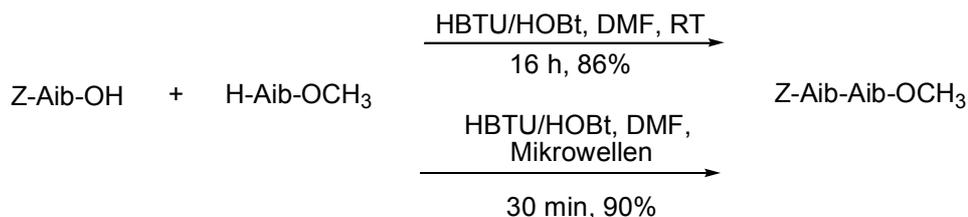
Schließlich konnten Babu et al.<sup>[32]</sup> 1998, aufbauend auf den Ergebnissen von Carpino et al.<sup>[33]</sup> zur Verwendung von Fmoc-geschützten Aminosäurechloriden, über den erfolgreichen Einsatz von Fmoc-Aib-Cl in Verbindung mit KOBt (Kalium-Salz von HOBt) berichten (Schema 1.16). Sie können das Tetrapeptid Fmoc-Aib-Aib-Aib-Aib-OBzl und weitere sterisch anspruchsvolle Peptide durch wiederholte Einwirkung von Fmoc-Aib-Cl/KOBt und anschließende Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 4-Aminomethylpiperidin in hohen Ausbeuten und Reinheiten herstellen.



Schema 1.16 Synthese Aib-haltiger Peptide nach Babu et al.<sup>[32]</sup>

Ein in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit besonders wichtiges Verfahren zur Einführung des Aib-Restes in Festphasensynthesen wurde 1997 von Meldal et al.<sup>[34]</sup> beschrieben. Sie verwenden  $\alpha$ -Azidoisobuttersäurechlorid (Azib-Cl) in Kombination mit *N*-Ethylmorpholin als Baustein zur Einführung des Aib-Restes in Festphasensynthesen und können auf diese Weise das Peptid H-Thr-Aib-Aib-Aib-Aib-Lys-Ser-Ser-Tyr-Lys-NH<sub>2</sub> mit vier unmittelbar aufeinander folgenden Aib-Resten synthetisieren. Diese Methode wird weiter unten (Kapitel 1.5) detaillierter beschrieben.

Im Jahre 2001 fanden Santagada et al.<sup>[35]</sup> heraus, dass Kupplungsreaktionen mit Aib-Derivaten unter Mikrowellenbestrahlung besonders effizient verlaufen (Schema 1.17). So wird z. B. bei der Synthese des Dipeptids Z-Aib-Aib-OCH<sub>3</sub> nach dem HBTU/HOBt-Verfahren bei Raumtemperatur erst nach 16 h 86% Ausbeute erhalten, während bei Anwendung von Mikrowellen unter ansonsten identischen Bedingungen bereits nach 30 min eine Ausbeute von 90% erhalten wird.

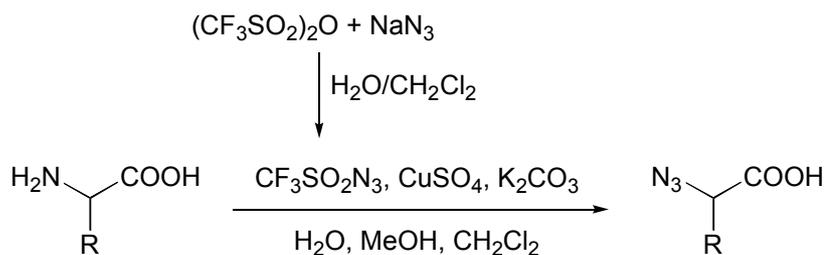


Schema 1.17: Synthese von Aib-Dipeptiden mit Hilfe von Mikrowellen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der zu geringen Effizienz der Standardmethoden für die Anwendung auf Aib-haltige Peptide eine Reihe Alternativen entwickelt wurden, diese aber auch einige Nachteile haben, wie z. B. hohe Kosten und schwierige Handhabung im Falle der Urethan-geschützten N-Carboxyanhydride oder die bereits erwähnten Probleme bei der Azirin/Oxazolone-Methode.

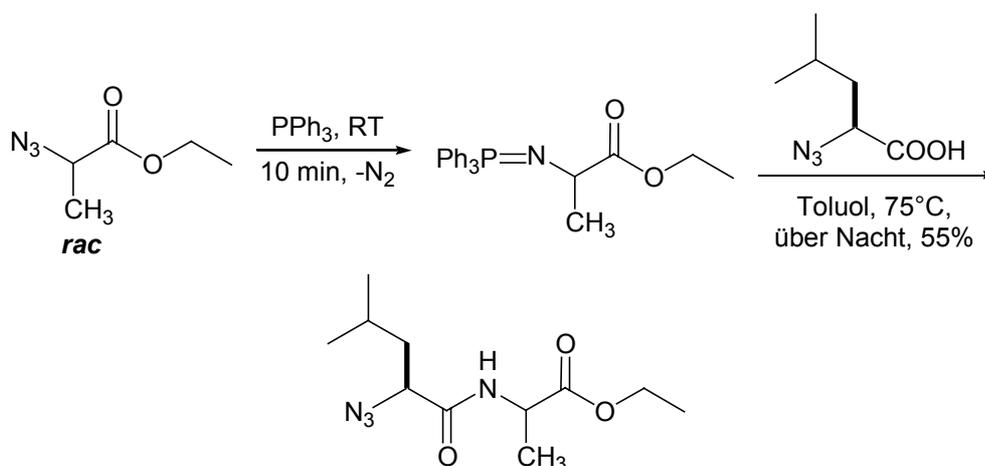
## 1.5 Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese

In der Kohlenhydrat-Chemie ist die Verwendung der Azidogruppe als „geschützte“ Aminogruppe bei der Synthese von Aminozuckern relativ beliebt.<sup>[36]</sup> In der Peptidchemie wird die Azidogruppe jedoch bislang kaum verwendet. Grundlage für die meisten Arbeiten auf diesem Gebiet ist die Überführung von Aminosäuren durch Diazo-Übertragung in die entsprechenden Azidosäuren. Das ursprüngliche Verfahren von Roberts et al.<sup>[37]</sup> bei dem ein Aminosäurederivat mit Trifluormethansulfonylazid bei Anwesenheit einer milden Base in das entsprechende Azidosäurederivat überführt wird, konnte basierend auf den Ergebnissen von Wong et al.<sup>[38]</sup> von Pelletier et al.<sup>[39]</sup> verbessert werden. Bei deren mittlerweile weit verbreiteten Verfahren wird die Reaktion kupferkatalysiert durchgeführt (Schema 1.18).



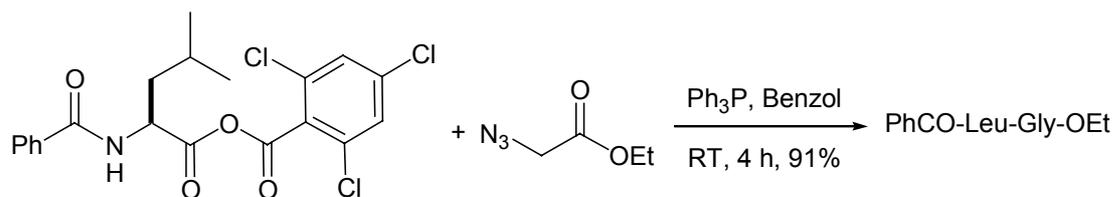
Schema 1.18: Synthese von  $\alpha$ -Azidosäuren durch Cu(II)-katalysierte Diazo-Übertragung

Mitte der achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts entdeckten Wilt und Tufano, dass Azidoverbindungen direkt mit Carbonsäuren unter Stickstoff-Abspaltung zu Amiden reagieren können (Schema 1.19).<sup>[40]</sup> Diese Reaktion wird als „reduktive Acylierung“ bezeichnet. Sie können mit dieser Methode einige Di- und Tripeptide herstellen, allerdings sind für die über ein Iminophosphoran verlaufenden Reaktionen lange Reaktionszeiten bei erhöhter Temperatur nötig. Die Autoren weisen bereits darauf hin, dass sich dieses Reaktionsprinzip als Basis für ein neues, repetitives Verfahren zur Peptidsynthese eignet. Hierbei reagiert zunächst ein Azidopeptid mit einem Phosphin zum Iminophosphoran, welches dann wiederum mit einer Azidosäure acyliert werden kann.



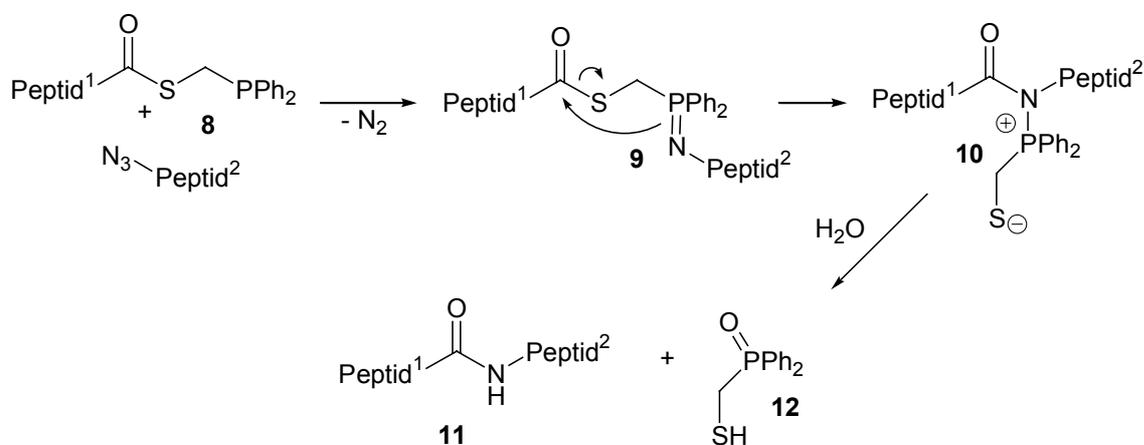
Schema 1.19: Reduktive Acylierung eines Iminophosphorans mit einer Azidosäure

Später fanden Vilarrasa et al.<sup>[41]</sup> heraus, dass die reduktive Acylierung bei Verwendung von aktivierten Carbonsäurederivaten bereits bei Raumtemperatur abläuft (Schema 1.20). Dieses Verfahren findet bei der Synthese von Peptiden und für Macrolactamierungen Anwendung.



Schema 1.20: Reduktive Acylierung mit einem gemischten Anhydrid

Aufbauend auf den Arbeiten von Vilarrasa entwickelten kürzlich die Arbeitsgruppen von Bertozzi<sup>[42]</sup> und Raines<sup>[43]</sup> ein Verfahren, das sie, in Anlehnung an die native chemische Ligation „Staudinger-Ligation“ nennen (Schema 1.21). Unter der Staudinger-Reaktion versteht man die Reaktion eines organischen Azides mit einem Phosphin und Wasser zu einem Amin, Stickstoff und einem Phosphinoxid.<sup>[44]</sup> Bei der Staudinger-Ligation wird ein Peptidfragment mit C-terminalem Phosphinothioester **8** mit einem Peptidfragment mit N-terminaler Azidogruppe ligiert. Bei der Reaktion entsteht zunächst ein Iminophosphoran **9**, aus dem durch S→N-Acylwanderung ein Amidophosphoniumsalz **10** entsteht und nach dessen Hydrolyse werden das Produkt **11** und ein Phosphinoxid **12** erhalten.



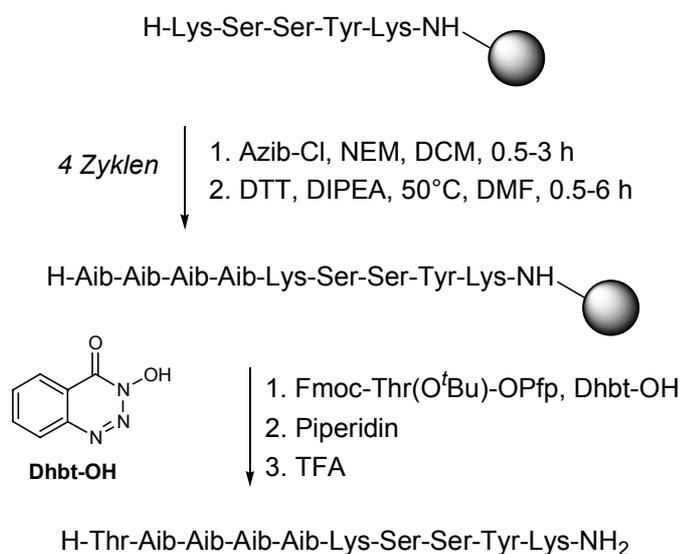
Schema 1.21: Die Staudinger-Ligation

Die Arbeitsgruppe von Raines wendet die Staudinger-Ligation bei der Synthese isotopenmarkierter Ribonuclease A an, wobei eine interessante Kombination von Festphasenpeptidsynthese, nativer chemischer Ligation und Staudinger-Ligation sowie Biosynthese in *E. coli* zur Anwendung kommt.<sup>[45]</sup>

Liskamp et al.<sup>[46]</sup> gelangen durch Diazo-Übertragung zu Harz-gebundenen Peptid-Fragmenten mit modifiziertem N-Terminus und erzeugen dadurch die für die Staudinger Ligation nötigen Derivate.

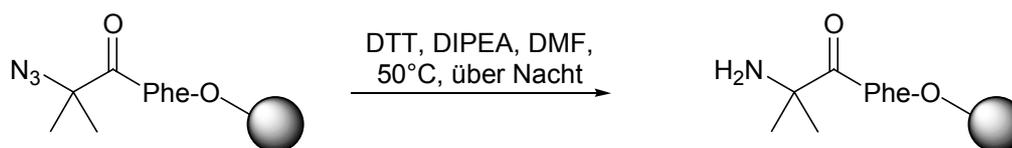
Pelletier et al.<sup>[47]</sup> haben einige kleinere Peptide durch Festphasensynthese unter Verwendung von Azidosäuren als monomere Bausteine synthetisiert. Die Azidosäuren wurden nach dem DCC/HOBt-Verfahren gekuppelt und die Azidogruppe mit Trimethylphosphin in wässrigem Dioxan zur Aminogruppe reduziert.

Für die vorliegende Arbeit besonders relevant sind die Publikationen von Meldal et al.<sup>[34, 48]</sup>, die über die Festphasensynthese von Aib-haltigen Peptiden unter Verwendung von  $\alpha$ -Azidoisobuttersäurechlorid als Baustein zur Einführung des Aib-Restes berichten (Schema 1.22). Die Acylierung der Aminokomponente mit  $\alpha$ -Azidoisobuttersäurechlorid wird hierbei mit *N*-Ethylmorpholin als Base in Dichlormethan bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Reduktion der Azidogruppe zur Aminogruppe wird DTT (DTT = 1,4-Dithio-D,L-threit) in Verbindung mit DIPEA verwendet. Allerdings werden für die Reduktion selbst bei erhöhter Temperatur (50°C) Reaktionszeiten bis zu 6 h benötigt. Dennoch gelingt auf diese Weise die Synthese des Peptids H-Thr-Aib-Aib-Aib-Aib-Lys-Ser-Ser-Tyr-Lys-NH<sub>2</sub> mit vier unmittelbar aufeinander folgenden Aib-Resten.



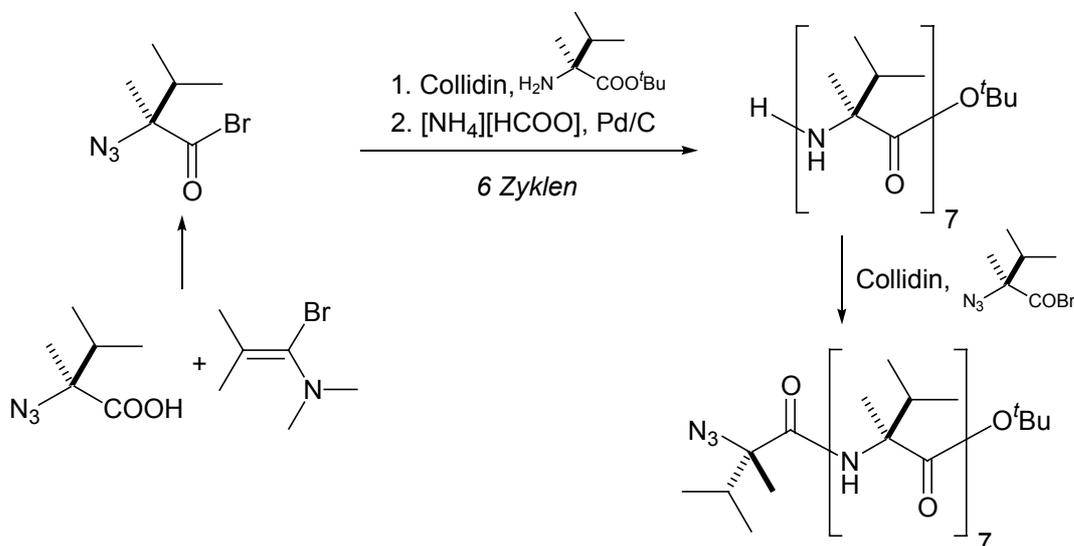
Schema 1.22: Festphasensynthese Aib-haltiger Peptide nach Meldal et al.<sup>[34]</sup>

In einigen Fällen wird die Reduktion sogar über Nacht durchgeführt (Schema 1.23).



Schema 1.23: Reduktion eines Azidopeptidyl-Harzes mit DTT nach Meldal et al.<sup>[48]</sup>

DalPozzo et al.<sup>[49]</sup> berichten über die Lösungssynthese eines Azido-geschützten Octapeptidesters unter Verwendung einer  $\alpha$ -Azidosäure (Schema 1.24).



Schema 1.24: Verwendung eines Azidosäurebromids zur Einführung sterisch gehinderter Reste in Lösungssynthesen<sup>[49]</sup>

Die Azidosäure wird mit Hilfe von 1-Bromo-*N,N*-2-trimethyl-1-propenylamin in situ in das Säurebromid überführt, welches dann bei Anwesenheit von Collidin als Base mit der Aminokomponente reagiert. Die Reduktion der Azidogruppe wird mit Hilfe der katalytischen Transferhydrierung durchgeführt.

## 1.6 Peptaibiotika

Bei den Peptaibiotika<sup>[50]</sup> handelt es sich um Aib-reiche Peptide, die von Pilzen produziert werden und antibiotische Aktivität aufweisen. Die bekannteste Untergruppe der Peptaibiotika sind die aus fünf bis zwanzig Aminosäureresten aufgebauten Peptaibole. Hierunter versteht man Aib-reiche Peptide mit antibiotischer Wirkung, die einen zum Aminoalkohol reduzierten C-Terminus besitzen. Der N-Terminus der Peptaibole ist meist acetyliert. Neben Aib werden in einigen Peptaibolen auch die nichtproteinogenen Aminosäuren Isovalin (Iva), Ethylnorvalin und Hydroxyprolin gefunden. Der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter der Peptaibole ist das zuerst von Meyer und Reusser aus dem Pilz *Trichoderma viride* isolierte Alamethicin.<sup>[51]</sup> Weitere wichtige Beispiele sind Ampullosporin,<sup>[52]</sup> Antiamoebin,<sup>[53]</sup> Chrysospermin,<sup>[54]</sup> Emerimicin,<sup>[55]</sup> Trichotoxin<sup>[22, 56]</sup> und Zervamicin.<sup>[57]</sup>

**Alamethicin F30:**

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gly-Gln-Pheol

**Antiamoebin I:**

Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pro-Pheol

**Zervamicin IIB:**

Ac-Trp-Ile-Gln-Aib-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol

Pheol = Phenylalaninol

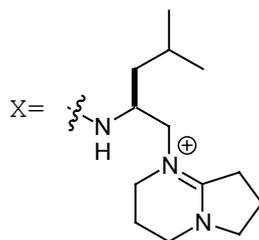
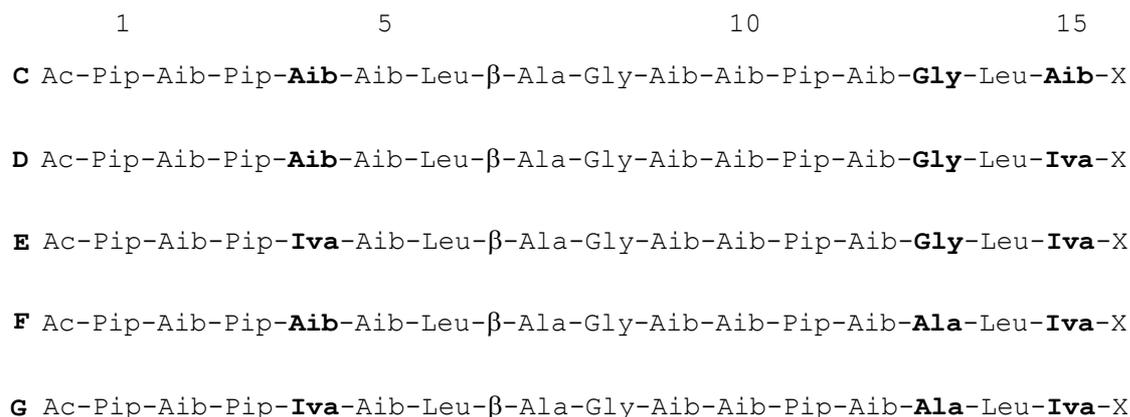
*Schema 1.25: Aminosäuresequenzen einiger Peptaibole*

Die Biosynthese der Peptaibole findet an sehr großen (z. B. 1.5 MDa), aus mehreren Modulen aufgebauten Proteinen statt, die man nicht-ribosomale Peptidsynthetasen nennt.<sup>[58]</sup> Aus den Fermentationsbrühen der Pilze werden die Peptaibole in der Regel als Gemische nahe verwandter Sequenz-Analoga isoliert, bei denen zum Beispiel Aib gegen Isovalin ausgetauscht ist. Dieses Phänomen wird als „Mikroheterogenität“ bezeichnet und ist wahrscheinlich eine Folge der Ungenauigkeit der nicht-ribosomalen Biosynthese. Die antibiotische Wirkung der Peptaibole wird auf ihre membranmodifizierenden Eigenschaften zurückgeführt. Die Bildung von spannungsabhängig ionenleitenden Membranporen wurde besonders intensiv bei Alamethicin untersucht.<sup>[59]</sup> Spannungsabhängigkeit bedeutet hier, dass die durch die Anwesenheit des Alamethicins hervorgerufene Ionenleitfähigkeit stark vom Transmembranpotenzial abhängig ist. Außerdem ist die Leitfähigkeit  $G$  sehr stark von der Alamethicin-Konzentration  $C$  abhängig (es gilt angenähert:  $G \sim C^{10}$ ). Über den genauen Entstehungsmechanismus und die Gestalt der von Peptaibolen gebildeten Membranporen existieren bisher nur Modelle.<sup>[60]</sup> Im Jahr 1981 sind drei Totalsynthesen von Alamethicin beschrieben worden,<sup>[61]</sup> Jung und Schmitt publizierten ihre Totalsynthese 1985.<sup>[62]</sup>

## 1.7 Efrapeptide

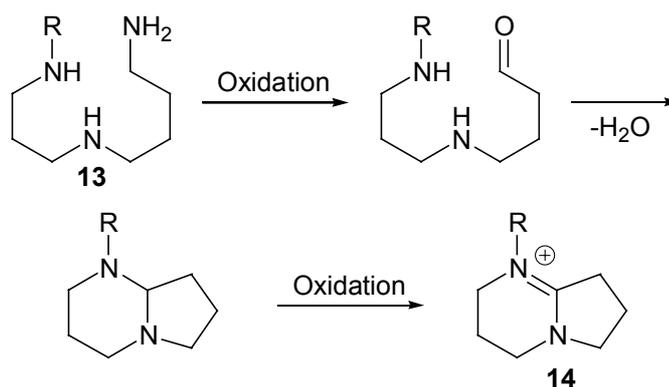
Die Efrapeptide sind zwar Peptaibiotika, gehören aber nicht zu den Peptaibolen. Sie sind seit den 70er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts bekannt und die genauen Sequenzen und die Struktur der C-terminalen Kopfgruppe wurden Anfang der 90er Jahre von Gupta et al.<sup>[63]</sup> aufgeklärt. Die Efrapeptide enthalten einen hohen Anteil an Aib,

drei Pipecolinsäuren sowie Leucin und Glycin. Außerdem ist eine  $\beta$ -Aminosäure,  $\beta$ -Alanin, enthalten. Die Efrapeptide werden von dem Pilz *Tolypocladium niveum* und weiteren Vertretern dieser Spezies (z. B. *Tolypocladium geodes* und *Tolypocladium parasiticum*) als mikroheterogenes Gemisch eng verwandter Sequenzanaloga produziert (Efrapeptide C bis G, Schema 1.26).<sup>[64]</sup> In einigen Sequenzen sind Aib-Reste gegen L-Isovalin oder ein Glycin-Rest gegen Alanin ausgetauscht.



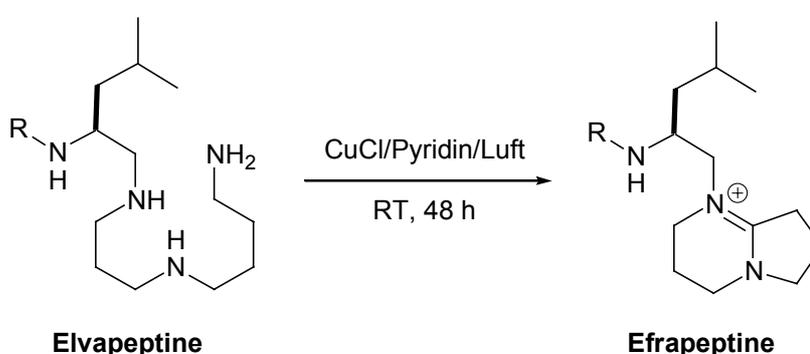
Schema 1.26: Aminosäuresequenzen der Efrapeptide

Die C-terminale Kopfgruppe der Efrapeptide leitet sich strukturell vom 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]nonen (DBN) ab. Sie lässt sich formal als das Produkt der Alkylierung bzw. Quarternisierung von DBN mit einem Leucinol-Derivat ansehen. Efrapeptin war der erste Naturstoff, in dem ein derartiges quartäres Amidiniumion gefunden wurde. Balaram et al.<sup>[65]</sup> vermuten, dass der biosynthetische Vorläufer dieser Einheit ein entsprechendes Spermidin-Derivat **13** ist. Diese Verbindung kann in drei Schritten durch Oxidation, Kondensation und erneute Oxidation in ein Amidinium-Ion **14** überführt werden (Schema 1.27).



Schema 1.27: Umwandlung eines Spermidins in ein Amidinium-Ion

Gestützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung der Elvapeptine, deren Peptidketten mit denen der Efrapeptine übereinstimmen, die aber C-terminal einen Spermidin-Substituenten tragen.<sup>[66]</sup> Die Elvapeptine können wie die Efrapeptine aus den Fermentationsbrühen von *Tolypocladium niveum* isoliert werden. Der Anteil an Elvapeptinen ist besonders hoch, wenn die Fermentation in einem frühen Stadium abgebrochen und die Luftzufuhr begrenzt wird. Balaram et al.<sup>[67]</sup> konnten zeigen, dass Elvapeptine in vitro durch Behandlung mit Kupfer(I)chlorid, Pyridin und Luft in Efrapeptine überführt werden können (Schema 1.28)



Schema 1.28: In vitro-Umwandlung der Elvapeptine in Efrapeptine<sup>[67]</sup>

Die Efrapeptine inhibieren die Photophosphorylierung in Pflanzen und Bakterien<sup>[68]</sup> und die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien<sup>[69]</sup> und einigen Bakterien.<sup>[70]</sup> Dies geschieht durch Hemmung der  $F_1F_0$ -ATPase (auch  $F_1F_0$ -ATP-Synthase genannt). Die insektizide Wirkung der Efrapeptine wurde eingehend untersucht<sup>[71]</sup> und auch über die Aktivität gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* wurde berichtet.<sup>[72]</sup> Kürzlich wurde in einem Patent über anti-proliferative Eigenschaften der Efrapeptine berichtet.<sup>[73]</sup> Die Kristallstruktur des Komplexes aus Efrapeptin C (**1**) und mitochon-

drialer  $F_1$ -ATPase wurde von Walker et al. bestimmt.<sup>[74]</sup> In diesem Komplex liegt das Efraeptin C-Molekül im N-terminalen (Pip1-Leu6) und C-terminalen (Aib9-Aib15) Bereich in einer  $3_{10}$ -helikalen Konformation vor. Die beiden  $3_{10}$ -helikalen Bereiche sind durch eine flexible Region miteinander verbunden, die ein  $\beta$ -Alanin und ein Glycin enthält. Die Wechselwirkungen mit der  $F_1$ -ATPase sind überwiegend hydrophober Natur. Durch die Bindung des Efraeptin C-Moleküls wird die Zugänglichkeit eines essentiellen Argininrestes an der Adeninnucleotid-Bindungsstelle blockiert.

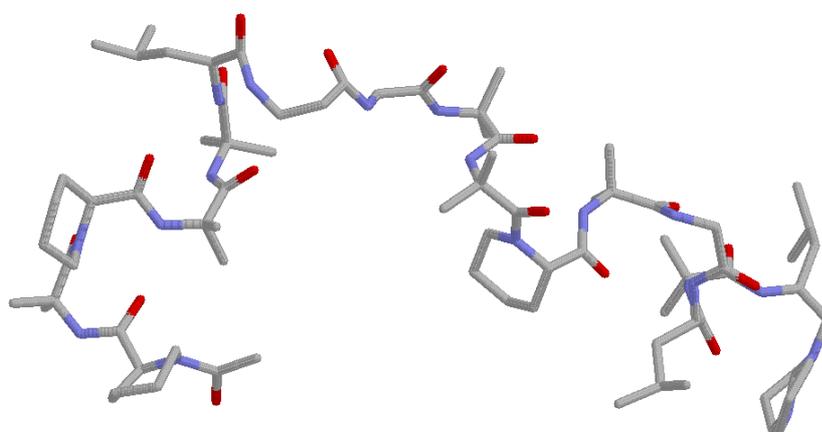
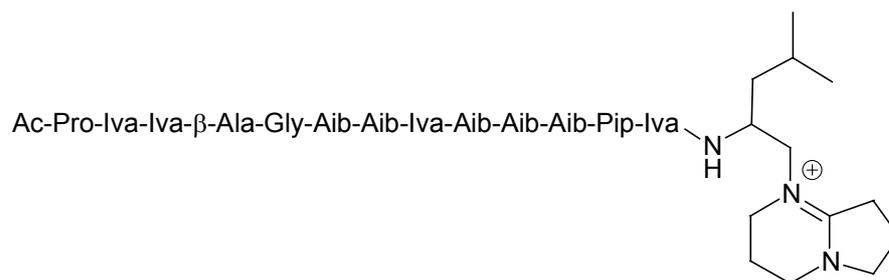


Bild 1.3: Struktur von Efraeptin C (**1**) im Komplex mit  $F_1$ -ATPase

Vor Beginn dieser Arbeit war noch keine Totalsynthese eines Vertreters der Efraeptine beschrieben. Benedetti et al.<sup>[75]</sup> hatten lediglich über die Synthese und Kristallstruktur des geschützten Pentapeptids Z-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-NHMe, dessen Sequenz den Aminosäuren Pip11-Aib15 von Efraeptin C (**1**) entspricht, berichtet.

## 1.8 Adenopeptin

Im Jahre 1998 berichtete eine japanische Arbeitsgruppe über die Isolierung und Strukturaufklärung von Adenopeptin **15** (Schema 1.29).<sup>[76]</sup> Dieses Peptid wird von *Chryso-sporium* sp. produziert und induziert Apoptose (= programmierter Zelltod) in Zellen, die mit dem Adenovirus Onkogen transformiert wurden.



Schema 1.29: Struktur von Adenopeptin (15)<sup>[76]</sup>

Strukturell ähnelt Adenopeptin den Efraeptinen. Es ist ein lineares Peptid aus dreizehn Aminosäureresten und enthält neben einem hohen Anteil an  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure und Isovalin einen  $\beta$ -Alanin-, einen Prolin- und einen Pipecolinsäurerest. Der N-Terminus ist acetyliert und am C-Terminus befindet sich die gleiche Kopfgruppe wie bei den Efraeptinen. Die absoluten Konfigurationen der chiralen Bausteine wurden nicht bestimmt.

## 1.9 Aufgabenstellung

Bei den Efraeptinen handelt es sich um eine Klasse pilzlicher Peptide mit interessanten biologischen und strukturellen Eigenschaften. Vor Beginn dieser Arbeit war noch keine chemische Totalsynthese eines Vertreters der Efraeptine bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll erstmals ein synthetischer Zugang zu den Efraeptinen erschlossen werden. Dabei sollen sowohl Methoden der Festphasenpeptidsynthese als auch Methoden der klassischen Lösungssynthese zur Anwendung kommen. Die Efraeptine werden vom produzierenden Pilz als mikroheterogenes Gemisch eng verwandter Sequenzanaloga produziert (Efraeptine C bis G, Schema 1.26). Während im Efraeptin C (**1**) neben  $\beta$ -Alanin und  $\alpha$ -H- $\alpha$ -Aminosäuren die  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte, achirale  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure vorkommt, enthalten die Efraeptine D bis G auch den chiralen Baustein Isovalin. Dies erschwert deren Synthese, da die benötigten Synthesebausteine erheblich schwerer zugänglich sind. Daher soll zunächst nur der strukturell weniger komplexe Vertreter Efraeptin C (**1**) synthetisiert werden. Zur Einführung der Aib-Reste in Festphasensynthesen soll eine im Rahmen einer dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit entwickelte Methode eingesetzt werden. Hierbei erfolgt die Acylierung der Harz-gebundenen Aminokomponente mit dem hochreaktiven  $\alpha$ -Azidoisobuttersäurechlorid (Azib-Cl) und das resultierende Azidopeptidyl-Harz wird anschließend zum Amino-

peptidyl-Harz reduziert. Ziel ist es, einen Syntheseweg zu erschließen, der die Erzeugung genügend großer Mengen (10-20 mg) Efrapeptin C (**1**) ermöglicht, um detaillierte NMR-spektroskopische Experimente durchzuführen. Diese sollen es ermöglichen, in Kombination mit Molecular Modelling die in Lösung vorliegende Sekundärstruktur von **1** zu bestimmen. Hierbei ist insbesondere der Einfluss der in Position 7 der Aminosäuresequenz der Efrapeptine vorliegenden  $\beta$ -Aminosäure  $\beta$ -Alanin von Interesse. Erste Hinweise auf das konformative Verhalten von **1** in Lösung sollen durch CD-spektroskopische Untersuchungen erhalten werden. Auch die biologische Aktivität des synthetischen Efrapeptins soll in einem Bioassay, bei dem die inhibitorische Wirkung auf  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* bestimmt wird, untersucht werden.

Steht ein effizienter Syntheseweg zu den Efrapeptinen zur Verfügung, soll eine Reihe von Analoga synthetisiert werden, bei denen Veränderungen hauptsächlich in der mittleren Teilsequenz  $-\text{Leu}^6\text{-}\beta\text{-Ala}^7\text{-Gly}^8\text{-}$  vorgenommen werden. Dieser Bereich bildet in der Kristallstruktur des Komplexes aus Efrapeptin C (**1**) und mitochondrialer  $F_1$ -ATPase keine definierte Sekundärstruktur aus und verbindet zwei  $3_{10}$ -helikale Segmente. Erste Hinweise auf die Sekundärstrukturen dieser Analoga sollen CD-spektroskopische Untersuchungen liefern. Hierbei sollen Erkenntnisse über den Einfluss der  $\beta$ -Aminosäure auf die Sekundärstruktur gewonnen werden. Auch die Efrapeptin-Analoga sollen auf ihre biologische Aktivität untersucht werden. Korrelationen zwischen der Struktur der Analoga und deren biologischer Aktivität sollen zur Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen führen.

In einem weiteren Teil dieser Dissertation soll in Kooperation mit Forschern des niederländischen Unternehmens DSM ein neuer Zugang zu enantiomerenreinen  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten  $\alpha$ -Azidosäuren erschlossen werden. Hierbei sollen die entsprechenden Azidosäuren durch enzymatische Racematspaltung von Carboxamiden erhalten werden. Zur Entwicklung dieser Methode müssen zunächst die racemischen Substrate synthetisiert werden. Stehen die  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten  $\alpha$ -Azidosäuren in enantiomerenreiner Form zur Verfügung, soll deren Verwendung als Bausteine für die Peptidsynthese untersucht werden. Auch der Einbau der erhaltenen Azidosäuren in neue Efrapeptin-Analoga ist geplant.

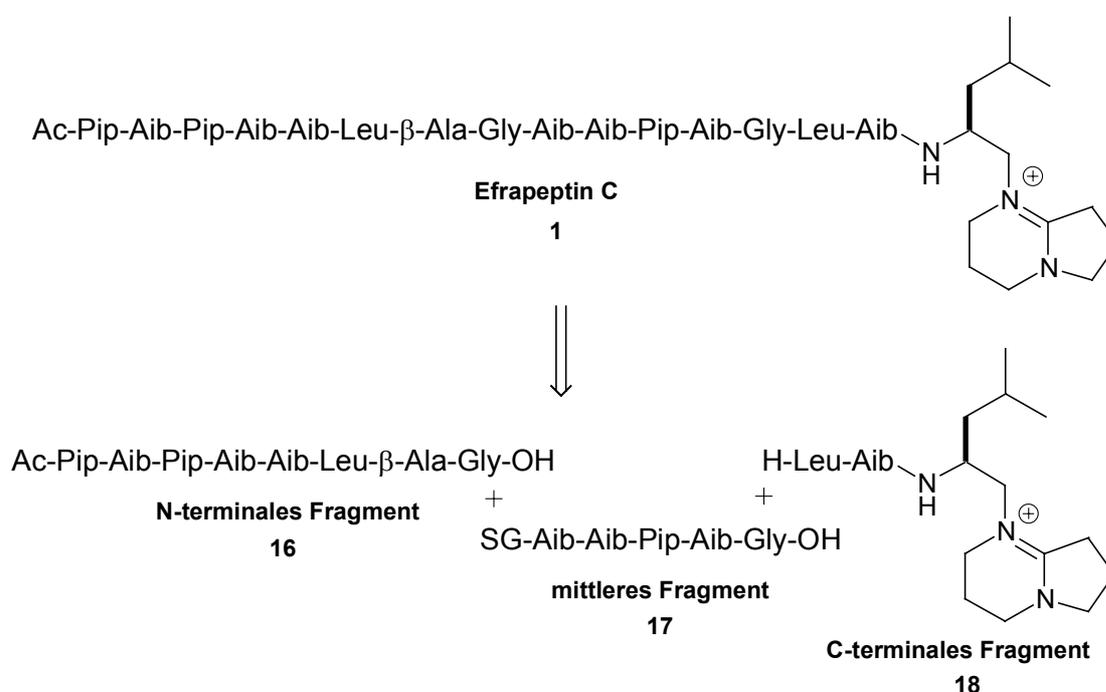
## 2 Spezieller Teil

### 2.1 Synthese von Efrapeptin C

#### 2.1.1 Syntheseplanung

Wie bereits erwähnt, war vor Beginn dieser Arbeit keine Totalsynthese von Efrapeptin C bekannt. Die Synthese des geschützten Pentapeptids Z-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-NH-Me, dessen Sequenz den Aminosäuren Pip11-Aib15 von Efrapeptin C (**1**) entspricht, erfolgte durch schrittweise Synthese in Lösung.<sup>[75]</sup> Die Autoren weisen zwar darauf hin, dass ihre Arbeiten die Totalsynthese des Naturstoffs zum Ziel haben, seither erschienen hierüber jedoch keinerlei Berichte. Um die Synthese einer größeren Zahl von Efrapeptin-Analoga zu erleichtern, sollten in dieser Arbeit Festphasenmethoden angewandt werden. Für den Einbau der Aib-Reste sollte eine Methode verwendet werden, die dem Verfahren von Meldal et al.<sup>[34, 48]</sup> ähnelt und im Rahmen einer dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit entwickelt wurde.<sup>[77]</sup> Da die gesamte Sequenz des Efrapeptin C-Moleküls relativ lang ist, und die Häufung der sterisch anspruchsvollen Aib-Reste sehr groß ist, erscheint es sinnvoll, die Gesamtsequenz in mindestens zwei Fragmente zu zerlegen, die schließlich zur Gesamtsequenz kondensiert werden können. Eine Synthese der C-terminalen Kopfgruppe war ebenfalls nicht bekannt. Da keine Möglichkeit besteht, die Kopfgruppe über eine funktionelle Gruppe an einen polymeren Träger zu fixieren, muss die Anbindung dieser Gruppe an den Rest der Sequenz in Lösung vorgenommen werden. Dies ist ein generelles Problem C-terminal modifizierter Peptide. N-terminale Modifizierungen können leicht nach dem Aufbau der Peptidkette am polymeren Träger vorgenommen werden. Würde als letzter Syntheseschritt die Anbindung der Kopfgruppe an ein Peptid, das den Resten Pip1 bis Aib15 von Efrapeptin C entspricht, erfolgen, so müsste hierbei der C-terminale Aib-Rest aktiviert werden, was aufgrund der oben geschilderten Schwierigkeiten ungünstig erscheint. Daher soll die Anbindung der Kopfgruppe an den Rest Aib15 in einem frühen Stadium der Synthese erfolgen und zwar durch Kondensation mit einer N-terminal geschützten Dipeptidsäure, welche die Reste Leu14 und Aib15 enthält. Die weiteren Schnittstellen müssen so ge-

wählt werden, dass bei den Segmentkondensationen keine Epimerisierungen auftreten können und die Kupplungsreaktion nicht durch sterische Hinderung beeinträchtigt wird. Daher sollten die zu kondensierenden Fragmente C-terminal ein Glycin tragen. Somit werden durch diese retrosynthetischen Überlegungen drei Fragmente erhalten, nämlich ein N-terminales Fragment (Pip1–Gly8), ein mittleres Fragment (Aib9–Gly13) und ein C-terminales Fragment, das aus den Resten Leu14–Aib15 und der Kopfgruppe besteht (Schema 2.1). Diese drei Fragmente können dann vom C-Terminus zum N-Terminus zur Zielverbindung kondensiert werden. Das mittlere Fragment muss am N-Terminus mit einer temporären Schutzgruppe versehen werden, während der C-Terminus durch die Kopfgruppe „geschützt“ ist und das N-terminale Fragment ohnehin acetyliert ist.

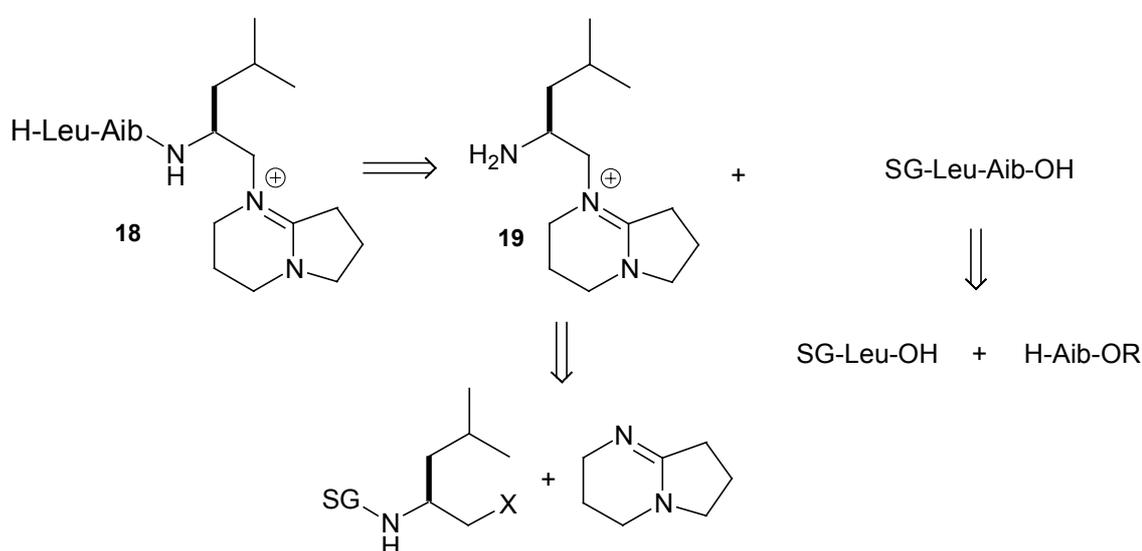


Schema 2.1: Retrosynthetische Zerlegung von Efrapeptin C (1) in drei Fragmente

Das N-terminale und das mittlere Fragment sollen durch Festphasensynthese hergestellt werden und das C-terminale Fragment durch Lösungssynthese. Hierfür ergibt die retrosynthetische Überlegung zunächst die Zerlegung (Schema 2.2) in eine geschützte Dipeptidsäure und die reine Kopfgruppe. Diese kann durch Alkylierung von DBN mit einem geschützten Leucinol-Derivat erhalten werden, bei dem die OH-Gruppe in eine gute Abgangsgruppe überführt wurde. Die Dipeptidsäure kann durch Kupplung eines

geschützten Leucin-Derivates mit einem Ester der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure und anschließender Esterspaltung synthetisiert werden.

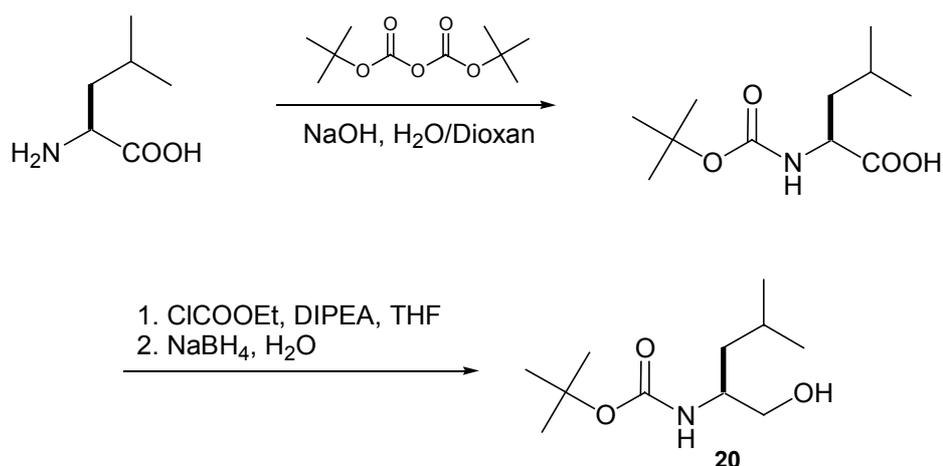
Der Aufbau des Zielmoleküls aus mehreren Fragmenten erschwert zwar die Synthese einer sehr großen Zahl von Efraeptin-Analoga z. B. durch automatisierte Festphasensynthese, andererseits ist es bei der Synthese eines langen Peptids aus mehreren Fragmenten leichter, das Zielmolekül in hoher Reinheit zu erhalten, da die Zwischenprodukte der Synthese gereinigt werden können. Indem zunächst Analoga der einzelnen Fragmente synthetisiert werden, die dann zu unterschiedlichen Gesamtsequenzen kombiniert werden, lässt sich auch nach der oben beschriebenen Strategie eine große Anzahl von Efraeptin-Analoga herstellen.



Schema 2.2: Retrosynthese des C-terminalen Fragmentes **18**

### 2.1.2 Synthese des C-terminalen Fragmentes

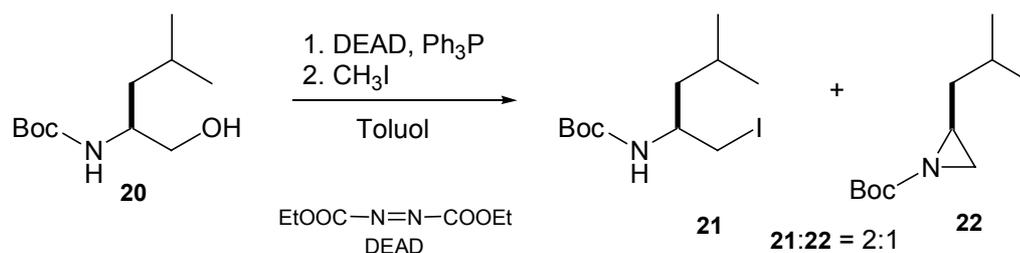
Die Synthese des C-terminalen Fragmentes **18** beginnt mit der Herstellung des für die Alkylierung von DBN benötigten vom Leucin abgeleiteten Derivates. Dazu wird die Aminosäure Leucin nach bekannten Vorschriften zunächst mit Hilfe von Di-*tert*-butyldicarbonat in Boc-Leucin überführt und dieses zu Boc-Leucinol (**20**) reduziert (Schema 2.3).<sup>[78, 79]</sup>



Schema 2.3: Synthese von Boc-Leucinol (**20**)

Dieses weit verbreitete Verfahren zur Herstellung Urethan-geschützter  $\alpha$ -Aminoalkohole, die sich von hydrophoben  $\alpha$ -Aminosäuren ableiten, ist effektiver als die umgekehrte Sequenz bestehend aus der Reduktion der freien Aminosäure zum Aminoalkohol und nachfolgendem Schutz der Aminogruppe.<sup>[79]</sup>

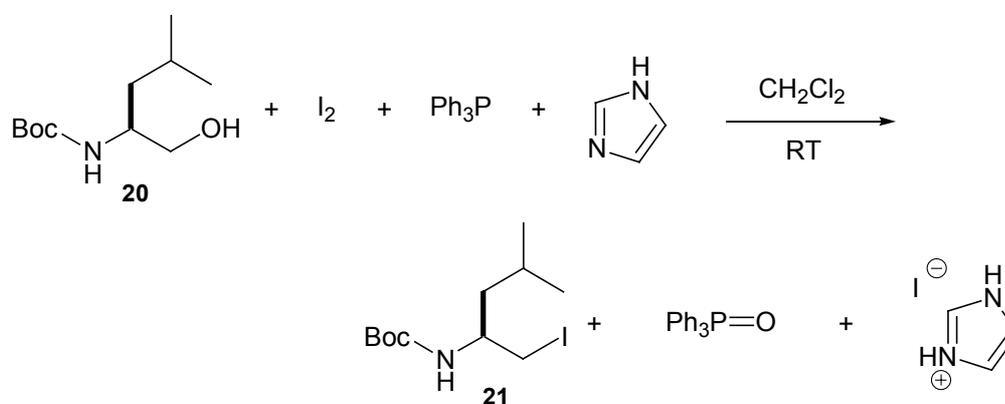
Für die Durchführung der Alkylierungsreaktion muss die OH-Funktion in eine gute Abgangsgruppe überführt werden. Es ist bekannt, dass sich Halogenide und hier insbesondere Iodide gut für N-Alkylierungen eignen. Beim Versuch Boc-Leucinol unter Mitsunobu-Bedingungen<sup>[80]</sup> in das entsprechende Iodid zu überführen, wird ein Gemisch aus dem gewünschten Produkt und einem Aziridin im Verhältnis 2:1 erhalten (Schema 2.4). Die beiden Reaktionsprodukte lassen sich nicht durch Kieselgel-Chromatographie voneinander trennen.



Schema 2.4: Umsetzung von Boc-Leucinol (**20**) unter Mitsunobu-Bedingungen

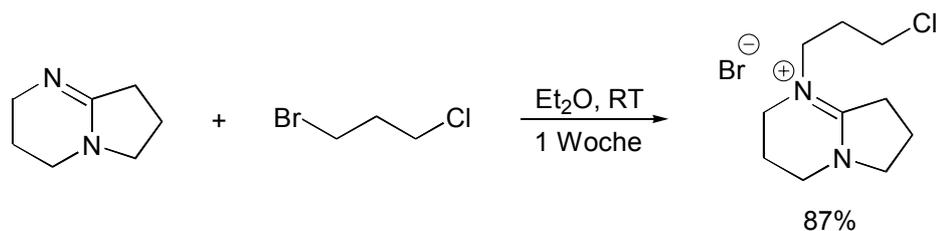
Das intensive Singulett der Boc-CH<sub>3</sub>-Protonen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum fällt bei beiden Verbindungen zwar zusammen, doch lässt sich das Vorliegen eines Gemisches leicht daran ablesen, dass im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum vier Dubletts für jeweils zwei Methylgruppen der Isobutyl-Seitenketten gefunden werden. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum erhält man zwei Signalsätze unterschiedlicher Intensität, wobei sich der zum Iodid **21** gehörende Signalsatz leicht an der Lage des Signals der CH<sub>2</sub>I-Einheit bei 15.8 ppm identifizieren lässt, was für ein Methylen-Kohlenstoffatom ungewöhnlich ist.

Da die Synthese des Iodids unter Mitsunobu-Bedingungen nicht gelingt, wird auf eine von Longobardo et al.<sup>[81]</sup> beschriebene Methode unter Verwendung von Iod, Triphenylphosphin und Imidazol (Appel-Bedingungen<sup>[82]</sup>) zurückgegriffen (Schema 2.5).



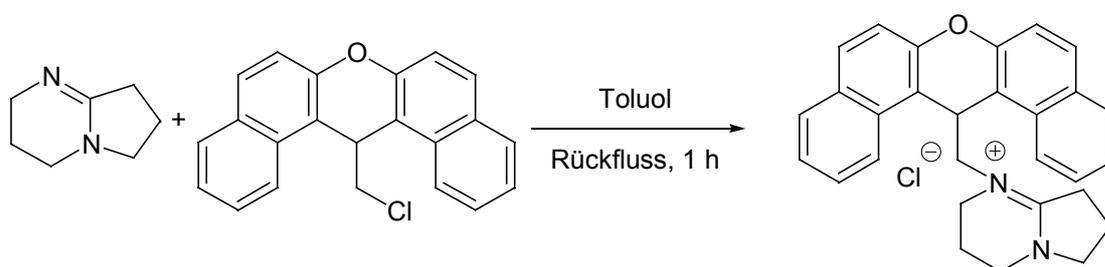
Schema 2.5: Synthese von **21** aus Boc-Leucinol

Über die Alkylierung von Amidinen ist bisher erst zweimal berichtet worden. Alder und Sessions berichten über die Alkylierung von DBN und DBU mit 1-Brom-2-chlorethan und 1-Brom-3-chlorpropan.<sup>[83]</sup> Sie führen diese Reaktionen in Diethylether bei Raumtemperatur innerhalb einer Woche durch, wobei chemoselektiv die Brom-Funktion reagiert (Schema 2.6).



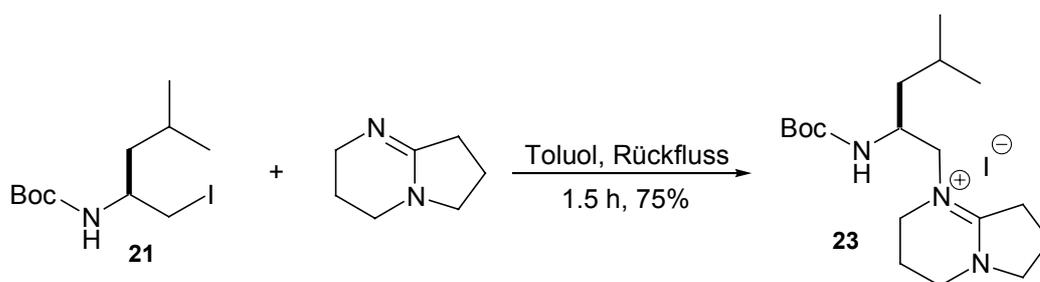
Schema 2.6: Alkylierung von DBN mit einem Alkylbromid<sup>[83]</sup>

Reynolds et al.<sup>[84]</sup> berichten über die Alkylierung von DBN durch ein primäres Chlorid. Sie führen die Reaktion in siedendem Toluol innerhalb einer Stunde durch (Schema 2.7).



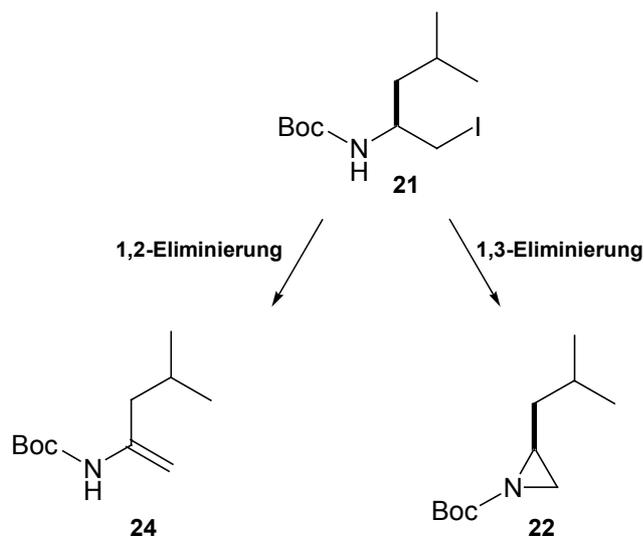
Schema 2.7: Alkylierung von DBN mit einem Alkylchlorid<sup>[84]</sup>

Die Reaktion des Iodids **21** mit DBN in siedendem Toluol ergibt das gewünschte Amminiumsalz **23**, welches als farbloses Öl aus dem Reaktionsgemisch ausfällt (Schema 2.8).



Schema 2.8: Alkylierung von DBN mit **21**

Die Reaktion verläuft erstaunlich glatt, was nicht selbstverständlich ist, da Amidine wie DBN und DBU normalerweise als starke, **nicht** nukleophile Basen z. B. für Dehydrohalogenierungen eingesetzt werden.<sup>[85]</sup> Als mögliche Nebenreaktionen können eine 1,2- und eine 1,3-Eliminierung von HI auftreten (Schema 2.9).



Schema 2.9: Mögliche Nebenreaktionen bei der Reaktion von DBN mit **21**

Zwar konnten die entsprechenden Nebenprodukte im Reaktionsgemisch NMR-spektroskopisch nicht eindeutig nachgewiesen werden, doch ist das ausfallende Rohprodukt laut NMR-Spektrum mit protoniertem DBN verunreinigt. Bei den bisherigen in der Literatur beschriebenen Beispielen für Alkylierungen von Amidinen sind ausschließlich achirale Verbindungen beteiligt. An dieser Stelle ist nicht klar, ob es unter den Reaktionsbedingungen zu Epimerisierungen am C<sup>α</sup> von **23** kommt. Zumindest wird ein optisch aktives Produkt erhalten ( $[\alpha]_D^{25} = 14.0$ ;  $c = 1.07$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Da es sich bei **23** um eine in der Literatur noch nicht beschriebene Verbindung handelt, kann der ermittelte spezifische Drehwert jedoch nicht mit einem Literaturwert verglichen werden.

Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **23** wird das für die Amidinium-Einheit typische Signal in der Nähe von 165 ppm (hier: 165.6 ppm) gefunden. Für die Zuordnung der NMR-Signale der Kopfgruppe **X** wird im Folgenden das von Huber<sup>[86]</sup> eingeführte System verwendet (Bild 2.1).

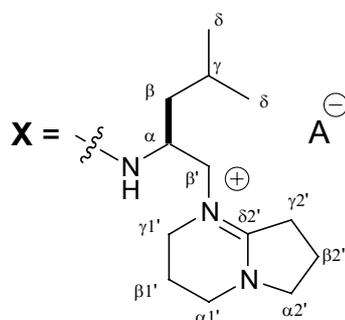


Bild 2.1: Von Huber<sup>[86]</sup> eingeführtes Nummerierungssystem für die Kopfgruppe **X** ( $A = \text{Anion}$ )

Das Amidiniumsalz **23** ist sehr gut löslich in polaren organischen Lösungsmitteln wie z. B. Methanol, Chloroform und Dichlormethan. Da in dem Salz in Form des quartären Amidiniumions bereits ein geladenes Teilchen vorliegt, eignen sich diese Verbindungen hervorragend für MALDI-TOF- und ESI-massenspektrometrische Untersuchungen. Im MALDI-TOF-Massenspektrum des Amidiniumsalzes **23** (Bild 2.2) tritt schon bei geringen Laserintensitäten ein sehr intensives Signal bei  $m/z = 324.40$  auf (berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ : 324.26). Selbst die, durch die in großem Überschuss anwesende Matrix hervorgerufenen, für gewöhnlich sehr intensiven Signale werden unterdrückt. Dieses Verhalten wird im weiteren Verlauf der Synthese eine wichtige Rolle spielen, da sämtliche Reaktionen, bei denen ein quartäres Amidinium-Ion beteiligt ist, durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt werden können. Dabei handelt es sich um eine sehr schnelle Methode (Zeitaufwand: 10-15 min), mit der man sehr aussagekräftige Informationen über die zu einem bestimmten Zeitpunkt im Reaktionsgemisch vorhandenen Spezies treffen kann. Außerdem kommt die MALDI-TOF-Massenspektrometrie mit minimalen Probenmengen aus und es lassen sich zumindest halbquantitative Aussagen über die Zusammensetzung eines Reaktionsgemisches machen.

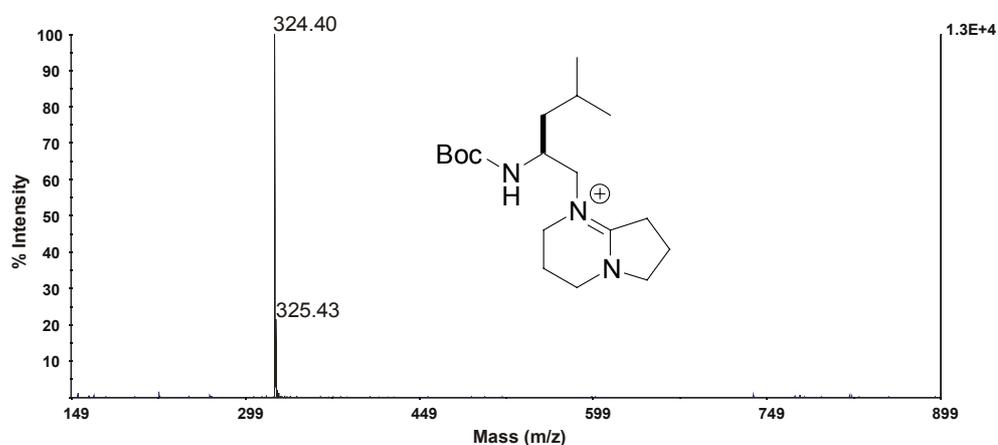
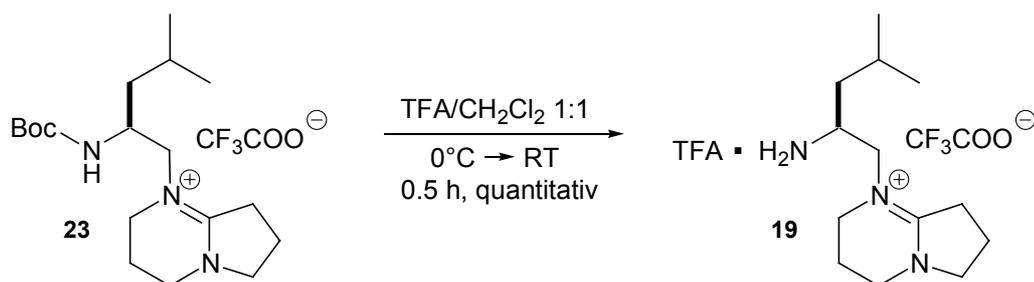


Bild 2.2: MALDI-TOF-Massenspektrum des Amidiniumsalzes **23**

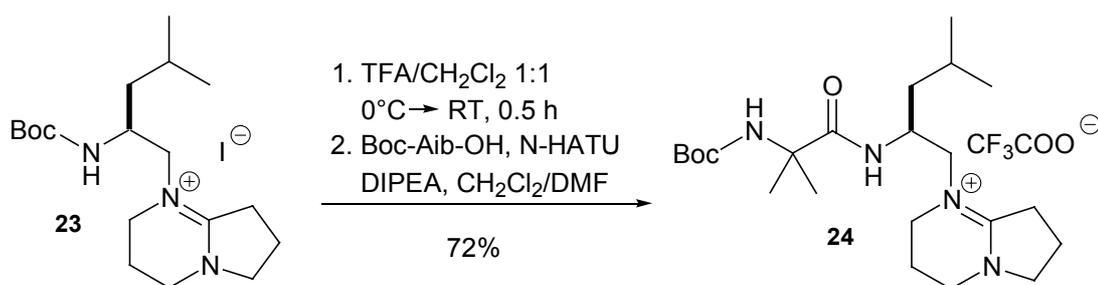
Als nächstes wird die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe aus dem Amidiniumsalz **23** untersucht. Hierzu wird eine chromatographisch reine Probe von **23** mit TFA in Dichlormethan behandelt (Schema 2.10). Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wird die entschützte, „reine“ Kopfgruppe **19** der Efraeptine erhalten.



Schema 2.10: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in **23**

Die Reaktion verläuft glatt und es lassen sich durch RP-HPLC keine Nebenprodukte nachweisen. Das Produkt **19** wird durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, Massenspektrometrie und RP-HPLC charakterisiert.

Da eine Kupplungsreaktion eines quartären Amidiniumsalzes wie **19** mit einer  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten Carboxykomponente noch nicht beschrieben wurde, wird zunächst eine Modellreaktion durchgeführt (Schema 2.11). Hierfür wird nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in **23** mit TFA eine Kupplungsreaktion mit Boc-Aib-OH durchgeführt. Da hierbei ein Aib-Rest aktiviert wird, kommt als Kupplungsreagenz das besonders effiziente N-HATU zum Einsatz. Die Carboxykomponente Boc-Aib-OH wird einige Minuten in DMF voraktiviert und anschließend wird die Aminokomponente gelöst in Dichlormethan zugegeben. Die Reaktion ist nach einigen Stunden beendet und nach präparativer HPLC wird das Kupplungsprodukt in Ausbeuten bis zu 72% isoliert.

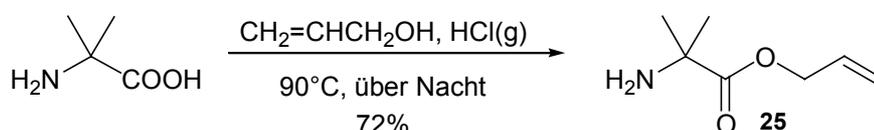


Schema 2.11: Modellreaktion für die Kupplungsreaktion einer Peptidsäure mit dem Amidiniumsalz **19**

Verbindung **24** ist relativ unpolar, was zu langen Retentionszeiten bei der RP-HPLC führt. Dadurch kann das Produkt durch präparative RP-HPLC leicht von den bei der Kupplungsreaktion anfallenden Nebenprodukten (Tetramethylharnstoff, HOAt,  $[(i\text{Pr})_2\text{EtNH}][\text{PF}_6]$ ), die sehr kleine Retentionszeiten haben, abgetrennt und in hoher Reinheit isoliert werden. Da die Modellreaktion zufriedenstellend verläuft und die quartäre Amidinium-Einheit keinen Einfluss auf die Kupplungsreaktion auszuüben scheint,

wird nun die für das C-terminale Fragment **18** von Efrapeptin C (**1**) benötigte Peptidsäure synthetisiert. Das C-terminale Fragment **18** von Efrapeptin C (**1**) könnte zwar auch durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in **24** und anschließende Kupplung mit Boc-Leucin hergestellt werden, doch würde hierdurch ein zusätzlicher Reinigungsschritt durch RP-HPLC nötig. Stattdessen ist es sinnvoller, ein Dipeptid, dessen Aminosäuren den Resten Leu14 und Aib15 von Efrapeptin C (**1**) entsprechen und das durch Lösungssynthese in größeren Mengen synthetisiert werden kann, mit der Kopfgruppe **19** zu koppeln. Dadurch wird auch der Grad der Konvergenz der Synthese erhöht.

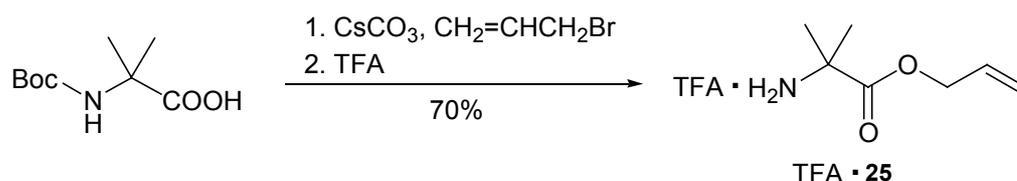
Die Synthese des Dipeptids, dessen Aminosäuren den Resten Leu14 und Aib15 von Efrapeptin C (**1**) entsprechen, beginnt mit der Veresterung der freien  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure mit Allylalkohol. Die Reaktion der Aminosäure mit Allylalkohol unter Katalyse durch konz. Schwefelsäure, wie sie von Hiroi et al.<sup>[87]</sup> für eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren beschrieben wurde, führt zu keinerlei Produktbildung. Stattdessen gelingt die Veresterung durch Einleiten von HCl-Gas in eine Suspension von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure in Allylalkohol und anschließendes mehrstündiges Erhitzen. Nach Neutralisation wird H-Aib-OAl (**25**) als destillierbare Flüssigkeit erhalten (Schema 2.12).



Schema 2.12: Säurekatalysierte Veresterung von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure

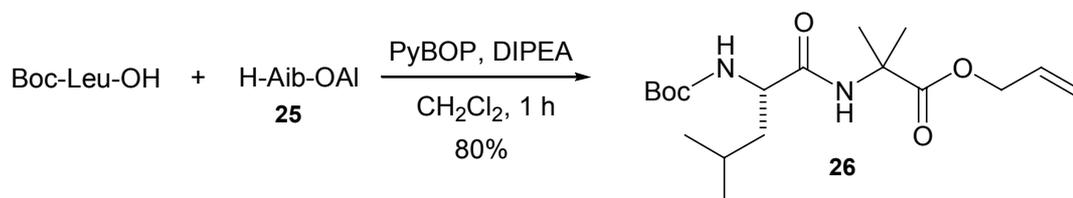
Es wird keine Diketopiperazin-Bildung beobachtet. Über die Bildung von Aminosäureallylestern unter diesen Bedingungen wurde noch nicht berichtet.

Frérot et al.<sup>[30]</sup> berichten über eine zweistufige, aufwendigere Synthese von TFA•**25** ausgehend von Boc-Aib-OH, dessen Cäsium-Salz zunächst mit Allylbromid alkyliert wird (Schema 2.13). Entfernung der Boc-Gruppe mit TFA liefert  $\alpha$ -Aminoisobuttersäureallylester als Trifluoressigsäure-Salz.



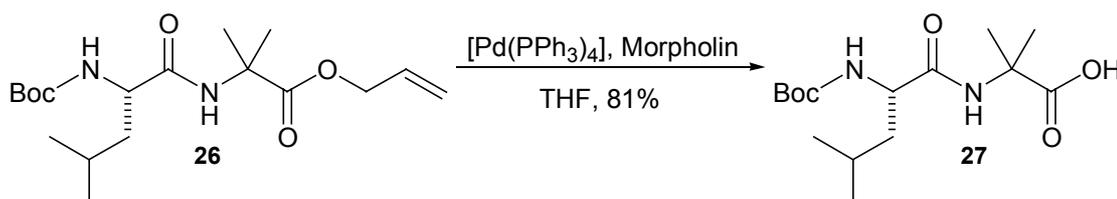
Schema 2.13: Alternative Synthese von H-Aib-OAl nach Frérot et al.<sup>[30]</sup>

Die Synthese des Dipeptids Boc-Leu-Aib-OAl **26** aus Boc-Leucin und  $\alpha$ -Aminoisobuttersäureallylester (**25**) mit PyBOP als Kupplungsreagenz verläuft problemlos und das Produkt wird nach Flashchromatographie in 80% Ausbeute in analysenreiner Form erhalten.



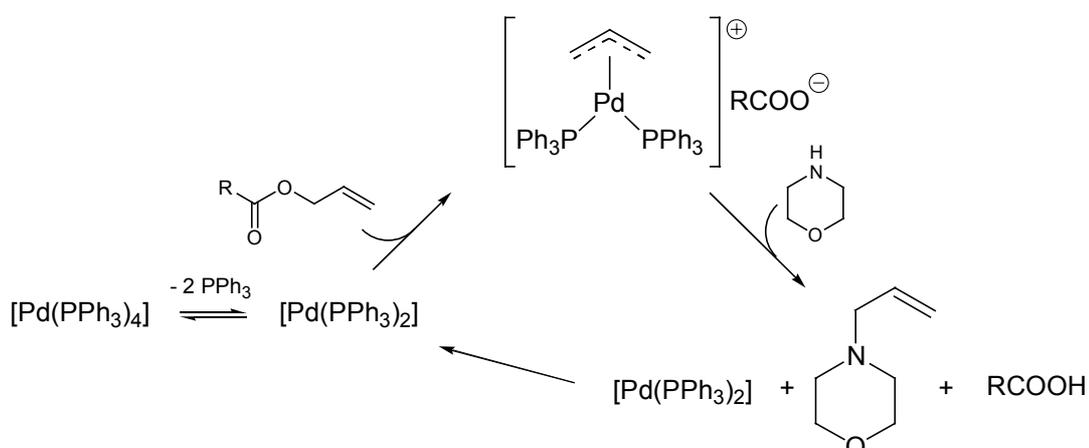
Schema 2.14: Synthese des Dipeptids Boc-Leu-Aib-OAl **26**

Die für die Kondensation mit der Kopfgruppe benötigte Dipeptidsäure wird aus Boc-Leu-Aib-OAl (**26**) durch palladiumkatalysierte Übertragung des Allylrestes auf Morpholin erhalten. Nach Kristallisation aus MTBE und Acetonitril wird die analysenreine Säure **27** erhalten (Schema 2.15).



Schema 2.15: Pd-katalysierte Spaltung des Allylesters **26**

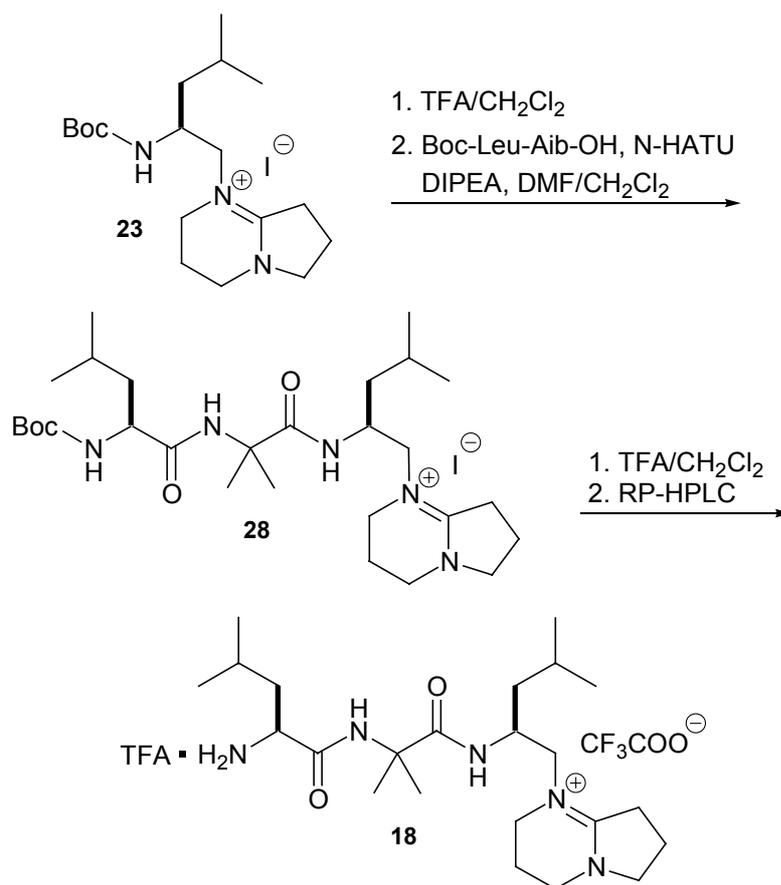
Diese Reaktion beginnt mit einer oxidativen Addition des Allylesters an ein koordinativ ungesättigtes Pd(0)-Zentrum unter Bildung eines kationischen Pd-Allylkomplexes.



Schema 2.16: Mechanismus der Pd-katalysierten Spaltung von Allylestern

Der Katalysator wird regeneriert, indem der Allylrest auf ein Nukleophil (hier Morpholin) übertragen wird (Schema 2.16).<sup>[88]</sup>

Für die Kondensation der Dipeptidsäure Boc-Leu-Aib-OH (**27**) mit der Kopfgruppe **19** muss zunächst die Boc-Gruppe in **23** durch Behandlung mit TFA abgespalten werden (Schema 2.17).

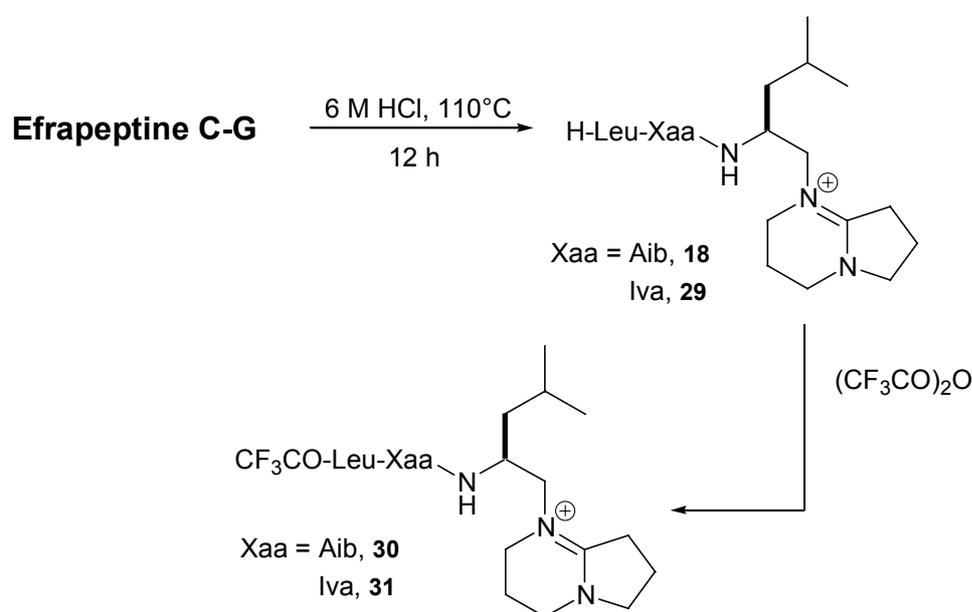


Schema 2.17: Synthese des C-terminalen Fragmentes **18**

Der Verlauf dieser Reaktion lässt sich wegen der Anwesenheit der quartären Amidinium-Einheit bequem durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgen. Sie verläuft sehr glatt und es können keinerlei Nebenreaktionen beobachtet werden. Da bei der Kupplungsreaktion von **27** mit **19** ein Aib-Rest aktiviert wird, kommt für diese Reaktion N-HATU zum Einsatz. Die Carboxykomponente wird in leichtem Überschuss eingesetzt und die Reaktion ist beendet, wenn durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie keine Aminokomponente mehr nachgewiesen werden kann. Nach Entfernung der flüchtigen Bestandteile im Vakuum kann der Rückstand direkt erneut mit TFA behandelt werden, wodurch die N-terminale Boc-Gruppe entfernt wird. Die Isolierung des C-termin-

alen Fragmentes **18** erfolgt dann durch präparative RP-HPLC. Da das für die RP-HPLC verwendete Laufmittelsystem TFA enthält, liegt das isolierte Produkt als Trifluoracetat vor.

Das C-terminale Fragment **18** von Efrapeptin C (**1**) wurde bereits von Gupta et al.<sup>[63]</sup> beschrieben. Sie erhalten **18** durch partielle Hydrolyse des Naturstoffs. Die Behandlung der Mischung der Efrapeptine mit 6 M HCl bei 110°C für 12 h liefert ein partielles Hydrolysat, aus dem die Fragmente **18** und **29** isoliert werden können. Durch Behandlung von **29** mit Trifluoressigsäureanhydrid wird die trifluoracetylierte Verbindung **31** erhalten, deren Kristallstruktur durch Röntgenkristallographie bestimmt wurde (Schema 2.18).



Schema 2.18: Partielle Hydrolyse der Efrapeptine<sup>[63]</sup>

Dadurch konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich die Struktur der Kopfgruppe von DBN ableitet. Außerdem konnte die Konfiguration am C<sup>α</sup> der Kopfgruppe relativ zum Leucin-Rest in **31** bestimmt werden. Da bereits zuvor nachgewiesen wurde, dass alle Aminosäuren in den Efrapeptinen als L-Aminosäuren vorliegen, ergibt sich für die absolute Stereochemie am C<sup>α</sup> der Kopfgruppe die S-Konfiguration, d. h. sie leitet sich von L-Leucinol ab. Gupta et al.<sup>[63]</sup> geben auch NMR-spektroskopische Daten von **18** an. Der Vergleich mit den Daten des synthetischen Materials zeigt innerhalb der Fehlergrenzen eine vollständige Übereinstimmung (Tabelle 1 und Tabelle 2).

**Tabelle 1:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen (in ppm) des synthetischen C-terminalen Fragmentes **18** mit den Literaturwerten<sup>[63]</sup> für das durch partielle Hydrolyse des Naturstoffs erhaltene Material. (125.8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

	Naturstoff	Synthetisches 18		Naturstoff	Synthetisches 18
$\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$	19.08	19.08	$\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$	43.49	43.48
$\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$	19.86	19.86	$\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_2$	45.93	45.91
$\text{C}^{\delta}\text{H}_3$	21.62, 23.65	21.64, 23.64	$\text{C}^{\alpha}\text{H}$	46.72	46.71
$\text{Leu-C}^{\delta}\text{H}_3$	22.37, 22.90	22.39, 22.90	$\text{Leu-C}^{\alpha}$	53.02	53.00
$\text{Aib-CH}_3$	23.75, 27.42	23.76, 27.43	$\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_2$	55.55	55.56
$\text{Leu-C}^{\gamma}\text{H}$	25.54	25.53	$\text{C}^{\beta'}\text{H}_2$	58.08	58.08
$\text{C}^{\gamma}\text{H}$	25.95	25.93	$\text{Aib-C}^{\alpha}$	58.11	58.12
$\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_2$	31.98	31.97	$\text{C}^{\delta 2'}$	165.97	165.97
$\text{C}^{\beta}\text{H}_2$	41.04	41.03	$\text{Leu-C=O}$	170.12	170.06
$\text{Leu-C}^{\beta}$	41.66	41.59	$\text{Aib-C=O}$	176.78	178.82

**Tabelle 2:** Vergleich  $^1\text{H}$ -chemischer Verschiebungen (in ppm) des synthetischen C-terminalen Fragmentes **18** mit den Literaturwerten<sup>[63]</sup> für das durch partielle Hydrolyse des Naturstoffs erhaltene Material. (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

	Naturstoff	synthetisches 18		Naturstoff	synthetisches 18
$\text{C}^{\delta}\text{H}_3$	0.90, d	0.90, d	$\text{C}^{\beta}\text{H}_b$	1.60, m	1.59, m
$\text{C}^{\delta}\text{H}_3$	0.95, d	0.95, d	$\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$	2.05, m	2.05, m
$\text{Leu-C}^{\delta}\text{H}_3$	0.99, d	0.99, d	$\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$	2.16, m	2.15, m
$\text{Leu-C}^{\delta}\text{H}_3$	1.01, d	1.01, d	$\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_2$	3.06, m	3.05, m
$\text{C}^{\beta}\text{H}_a$	1.23, m	1.22, ddd	$\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_b$	3.62, m	3.62, m
$\text{Aib-CH}_3$	1.42, s	1.42, s	$\text{C}^{\alpha}\text{H}$	4.40, m	4.39, m
$\text{Aib-CH}_3$	1.55, s	1.55, s			

Damit ist auch gezeigt, dass es bei der Alkylierung von DBN mit dem Iodid **21** nicht zu einer Epimerisierung kommt, da in diesem Falle das C-terminale Fragment **18** als Diastereomerenmisch erhalten würde. Sowohl die NMR-spektroskopischen als auch die HPL-chromatographischen Daten von **18** geben hierfür jedoch keinerlei Hinweise. Ausserdem wird durch die hervorragende Übereinstimmung der NMR-spektroskopischen Daten des synthetischen **18** mit denen des aus natürlichen Quellen erhaltenen Materials die röntgenographisch bestimmte absolute Konfiguration am  $\text{C}^{\alpha}$  der Kopfgruppe der Efrapeptine durch die chemische Synthese ausgehend von *S*-Leucinol bestätigt.

Bei der Analyse der in  $\text{CD}_3\text{OD}$  aufgenommenen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des C-terminalen Fragmentes **18** fällt auf, dass es am  $\text{C}^{\gamma 2'}$  zu einem H/D-Austausch kommt, da diese Position aufgrund des starken Elektronenzugs der Amidinium-Einheit CH-acide ist. Dies führt im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **18** dazu, dass die Integration des Signals der  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_2$ -Einheit bei einer Probe, die über Nacht in  $\text{CD}_3\text{OD}$  aufbewahrt wurde, nur ungefähr 0.75 H-Atome anstelle von zwei H-Atomen ergibt. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Bild 2.3) ist die Intensität des Signals von  $\text{C}^{\gamma 2'}$  bei 31.97 ppm im Vergleich zum entsprechenden Signal im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, welches in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen wird, stark reduziert. Es wird von einem schlecht aufgelösten, wenig intensiven Multiplett bei 31.4-32.0 ppm begleitet, das von dem deuterierten Anteil der Probe erzeugt wird. Das Signal des zum  $\text{C}^{\gamma 2'}$  benachbarten  $\text{C}^{\beta 2'}$  bei 19.08 ppm ist ebenfalls in seiner Intensität stark reduziert, wird aber von zwei zusätzlichen, intensiven Signalen bei 18.87 und 18.98 ppm begleitet. Die zwei zusätzlichen Signale werden von den beiden diastereomeren  $\text{C}^{\gamma 2'}$ -Atomen der einfach deuterierten Verbindungen erzeugt. Die Deuterierung an  $\text{C}^{\gamma 2'}$  ruft einen Isotopeneffekt auf die chemische Verschiebung des benachbarten  $\text{C}^{\beta 2'}$  hervor, der sich bei den beiden Diastereomeren unterschiedlich stark auswirkt.

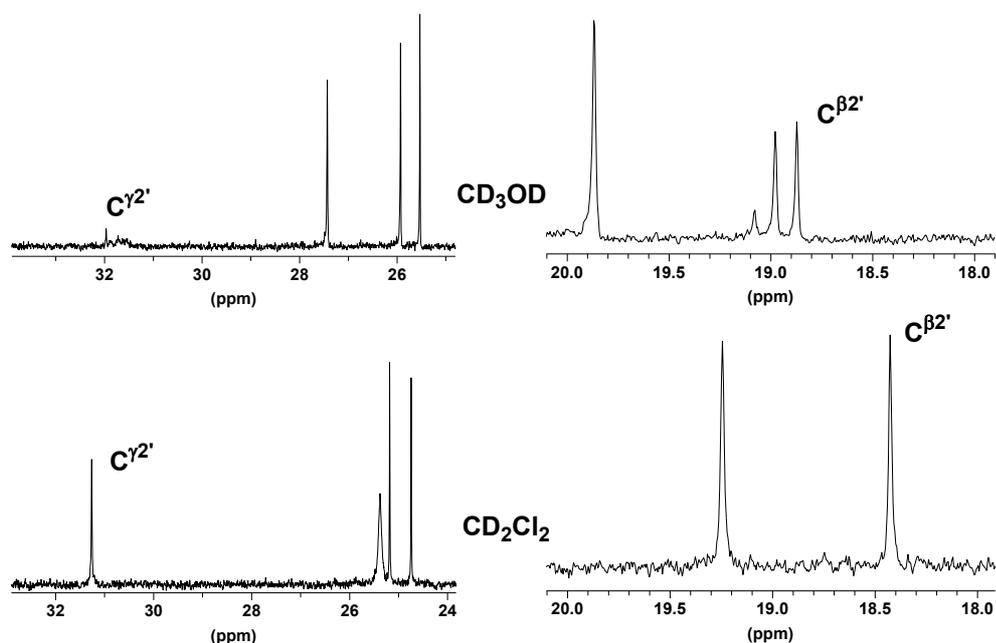
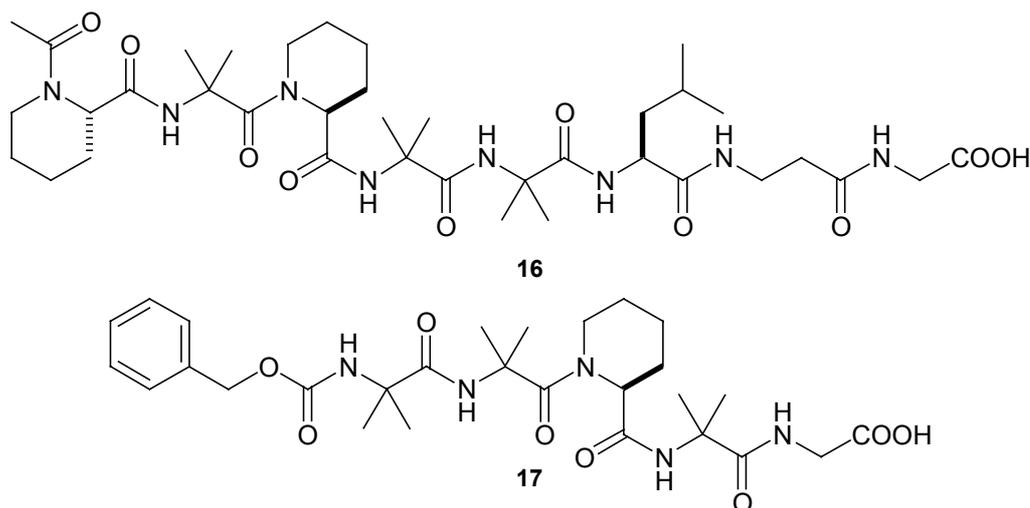


Bild 2.3: Ausschnitte aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (125.8 MHz) von **18** aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$  und  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$

### 2.1.3 Synthese des mittleren und des N-terminalen Fragmentes

Die Synthese des N-terminalen Fragmentes **16**, das den Resten Pip1 bis Gly8 entspricht, und des Z-geschützten mittleren Fragmentes **17**, das den Resten Aib9 bis Gly13 entspricht, erfolgt durch Festphasensynthese.

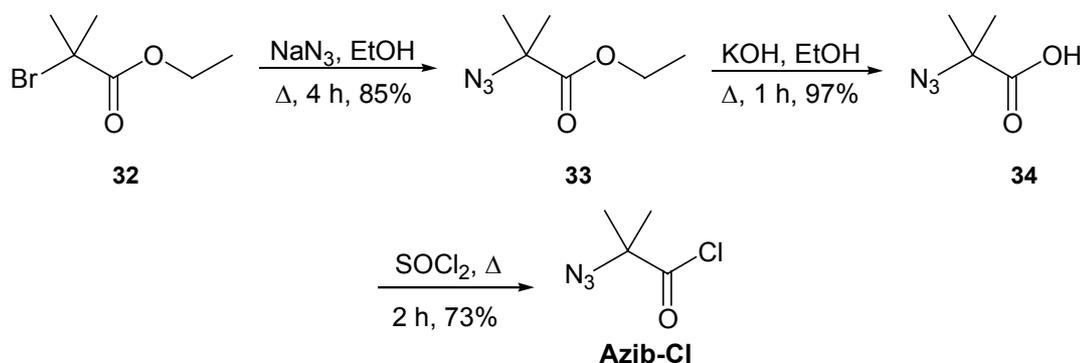


Schema 2.19: Struktur des N-terminalen Fragmentes **16** und des Z-geschützten mittleren Fragmentes **17**

Für die in Lösung durchzuführenden Segmentkondensationen müssen die N-Termini blockiert sein. Beim mittleren Fragment wird daher nach dem Aufbau des Pentapeptids am N-Terminus eine Z-Schutzgruppe angebracht. Der N-Terminus des N-terminalen Fragmentes ist ohnehin acetyliert.

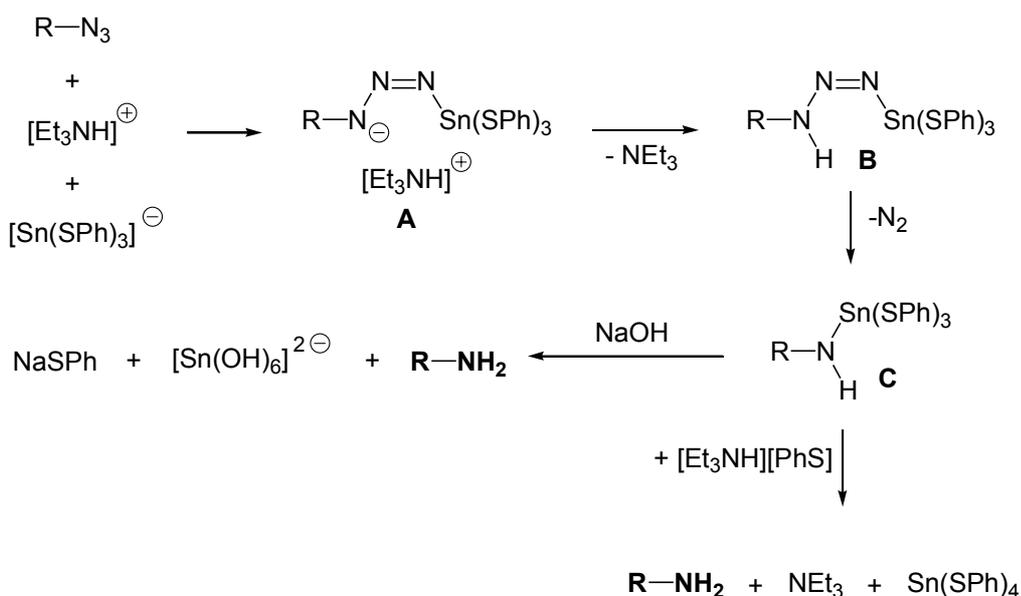
Bei der Festphasensynthese soll nach der von Meldal et al.<sup>[34, 48]</sup> beschriebenen Strategie vorgegangen werden. Im Rahmen einer dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit wurde bereits ein im Vergleich zur ursprünglichen Methode von Meldal et al. leicht verändertes Verfahren entwickelt.<sup>[77]</sup> Hierbei werden Aib-Reste durch Acylierung der Aminokomponente mit  $\alpha$ -Azidoisobuttersäurechlorid (Azib-Cl) und anschließende Reduktion der Azidogruppe eingeführt. Andere Aminosäuren werden nach der Fmoc-Taktik in die Peptidkette eingebaut. Die Synthese von  $\alpha$ -Azidoisobuttersäurechlorid erfolgt ausgehend von 2-Bromisobuttersäureethylester **32** (Schema 2.20), indem zunächst Bromid gegen Azid durch Reaktion mit Natriumazid in wässrigem Ethanol ausgetauscht wird. Der entstehende Azidoester **33** wird zur  $\alpha$ -Azidoisobuttersäure (Azib-OH, **34**) verseift. Durch Reaktion mit Thionylchlorid wird die Azidosäure **34** in  $\alpha$ -Azidoisobuttersäu-

rechlorid (Azib-Cl) überführt. Nach diesem Verfahren lässt sich im Forschungslabor der benötigte Baustein Azib-Cl innerhalb weniger Tage im 100 g-Maßstab herstellen.



Schema 2.20: Synthese von Azib-Cl

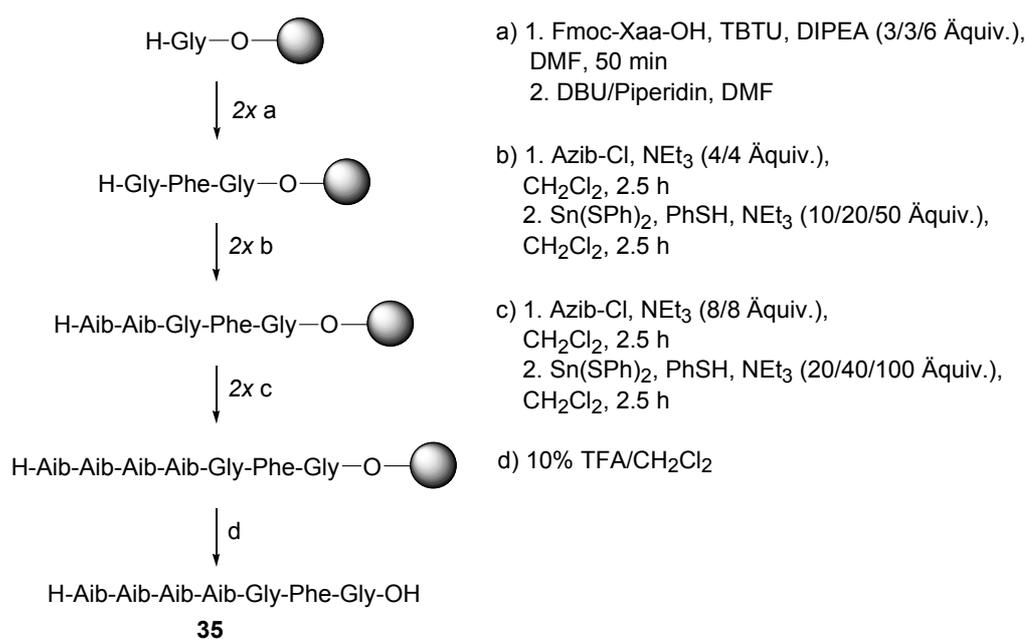
In Festphasensynthesen können nur gelöste Reagenzien mit festphasengebundenen Verbindungen reagieren. Daher ist bei der Reduktion der Azidogruppe zur Aminogruppe der Einsatz eines löslichen Reagenzes erforderlich. Das von Vilarrasa entwickelte Zinn(II)-haltige Reagenz  $[\text{Et}_3\text{NH}][\text{Sn}(\text{SPh})_3]$ <sup>[89]</sup> erfüllt diese Bedingung und ist, wie durch systematische Untersuchungen der Autoren gezeigt wird, eines der reaktivsten Reagenzien zur Reduktion von Azidogruppen. Gleichzeitig zeigt es auch eine sehr hohe Chemo-selektivität. Bis auf Nitro-Gruppen, die zu Oximen reduziert werden, werden keine anderen funktionellen Gruppen angegriffen.



Schema 2.21: Mechanismus der Azidgruppen-Reduktion mit dem Vilarrasa-Reagenz

Nach Bildung des Addukts **A** wird dieses zu **B** protoniert und durch  $N_2$ -Abspaltung bildet sich **C**. Aus **C** entsteht während der Aufarbeitung durch Waschen mit Natronlauge das Amin und Stannat  $[Sn(OH)_6]^{2-}$ , überschüssiges Sn(II) geht als Stannit  $[Sn(OH)_3]^-$  in die wässrige Phase. Ist im Reaktionsgemisch jeweils ein zusätzliches Äquivalent Thiofenol und Triethylamin vorhanden, so entstehen freies Amin und  $Sn(SPh)_4$ , d. h. das freie Amin liegt bereits im organischen Medium vor und muss nicht erst bei der Aufarbeitung durch Waschen mit Natronlauge freigesetzt werden. Diese Bedingungen müssen bei Festphasensynthesen angewandt werden, da ein Waschen des Harzes mit wässriger Natronlauge nicht möglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass sich auf die oben beschriebene Weise das Heptapeptid H-Aib-Aib-Aib-Aib-Gly-Phe-Gly-OH (**35**) am Wang-Harz synthetisieren lässt (Schema 2.22).<sup>[77]</sup>



Schema 2.22: Synthese von H-Aib-Aib-Aib-Aib-Gly-Phe-Gly-OH **35** am Wang-Harz<sup>[77]</sup>

Zunächst wird versucht, auch das N-terminale Fragment **16** von Efrapeptin C (**1**) am säurelabilen Wang-Harz aufzubauen, bei dem die Abspaltung des Produktes mit 10%iger Trifluoressigsäure in Dichlormethan erfolgt. Der Aufbau der Peptidkette am polymeren Träger scheint zwar erfolgreich zu sein, doch lassen sich nach Abspaltung des Produktes vom Harz durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie nur geringe Mengen

des N-terminalen Fragmentes **16** nachweisen. Stattdessen werden mehrere hydrolytische Fragmente von **16** gefunden (Bild 2.4).

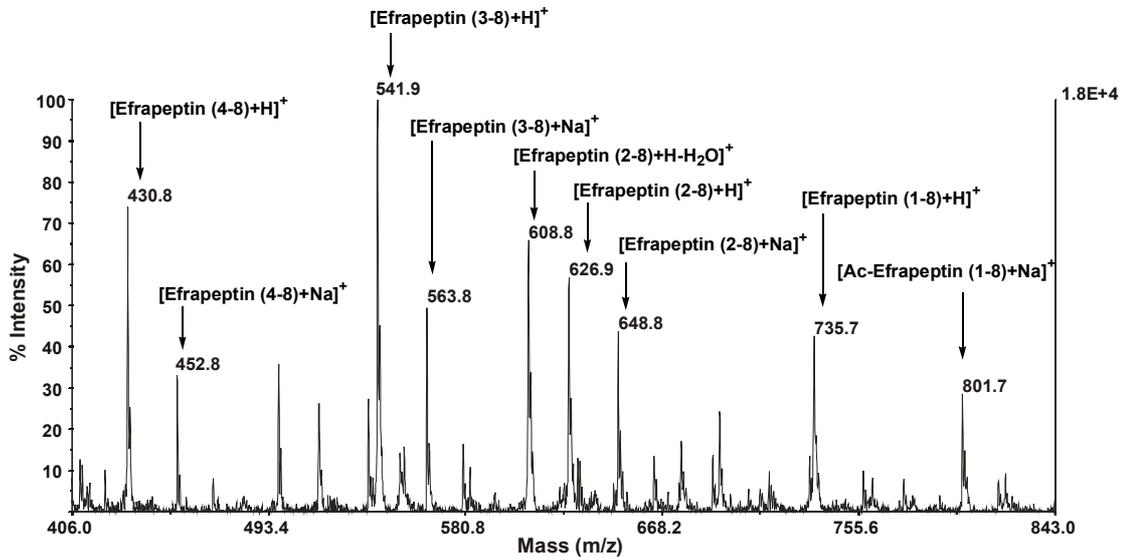
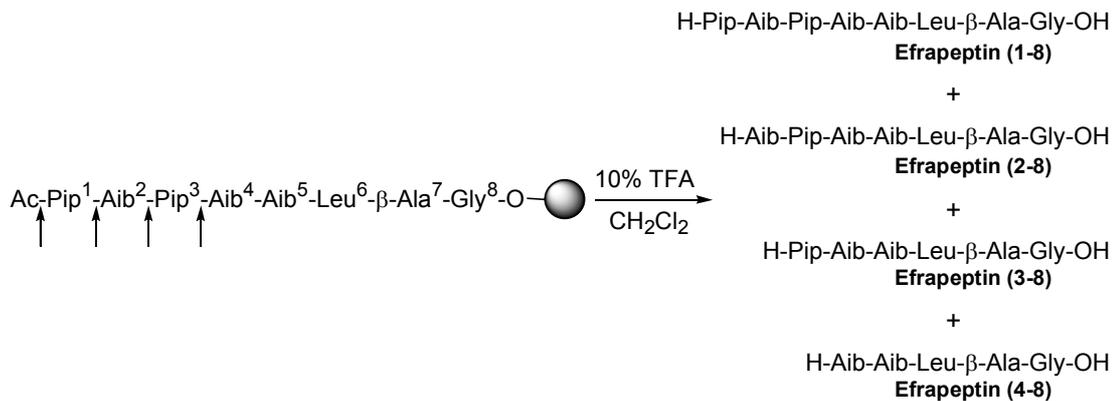


Bild 2.4: MALDI-TOF-Massenspektrum des nach Abspaltung des N-terminalen Fragmentes **16** vom Wang-Harz erhaltenen Gemisches

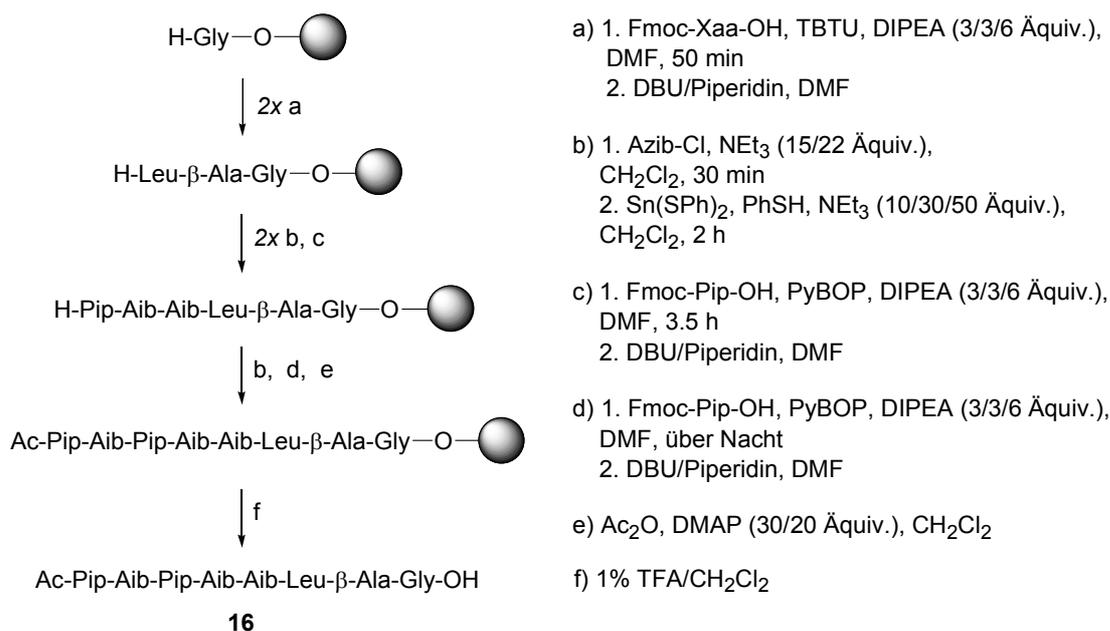
Die Analyse des MALDI-TOF-Massenspektrums zeigt, dass die Peptidbindungen vor und nach den Pípecolinsäureresten teilweise hydrolytisch gespalten werden (Schema 2.23).



Schema 2.23: Partielle Hydrolyse des N-terminalen Fragmentes bei der Abspaltung vom Wang-Harz

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Jung et al.,<sup>[22]</sup> die beschreiben, dass die Peptidbindung in Ac-Aib-Pro-OH bei Behandlung mit TFA nach 15 min zu 50% hydrolysiert wird. Auch andere Aib-Xaa-Peptidbindungen sind säurelabiler als Peptidbindungen, bei denen nur proteinogene Aminosäuren beteiligt sind. Bei den Dipeptiden Ac-Aib-Gly-OH und Ac-Aib-Ala-OH wird durch 3 h Behandlung mit

TFA etwa die Hälfte des Peptids gespalten. Aufgrund dieser Beobachtungen werden die folgenden Festphasensynthesen am hoch säurelabilen *o*-Chlortrityl-Harz durchgeführt, bei dem die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger mit 1% TFA in Dichlormethan oder mit einem 1:4-Gemisch von Hexafluorisopropanol und Dichlormethan erfolgt. Durch Verwendung dieses Harzes kann das N-terminale Fragment **16** von Efrapeptin C (**1**) wie in Schema 2.24 gezeigt synthetisiert werden.



Schema 2.24: Synthese des N-terminalen Fragmentes **16** am *o*-Chlortrityl-Harz

Die Beladung des Harzes mit der C-terminalen Aminosäure Glycin erfolgt durch Reaktion von Fmoc-Gly-OH mit dem *o*-Chlortritylchlorid-Harz bei Anwesenheit von DIPEA und anschließende Fmoc-Abspaltung. Die beiden Pipecolinsäurereste werden als Fmoc-Pipecolinsäure (Fmoc-Pip-OH) mit dem Phosphoniumsalz PyBOP als Kupplungsreagenz eingeführt. Bei der ersten Kupplung von Fmoc-Pip-OH ist eine Reaktionszeit von 3.5 h für eine vollständige Umsetzung ausreichend, während die Kupplung des zweiten Pipecolinsäurerestes über Nacht durchgeführt werden muss. Das Rohprodukt wird durch präparative RP-HPLC gereinigt und das homogene Produkt **16** durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie (Bild 2.5) sowie MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **16** werden im Bereich der NH-Protonen drei Singulets der Aib-Reste, zwei Triplets des Gly- und des  $\beta$ -Ala-Restes sowie ein Doublet des Leu-Restes gefunden. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **16** treten im Bereich der

Carbonyl-C-Atome neun Signale auf, wobei bei 173.2 ppm zwei Signale zusammenfallen.

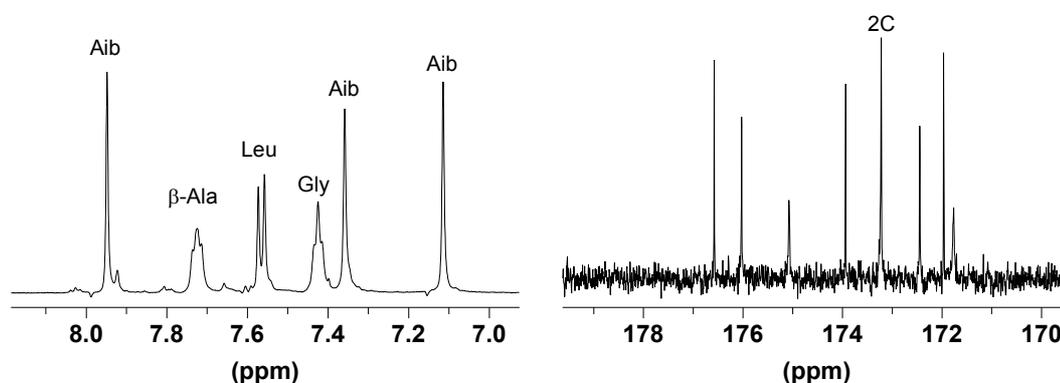


Bild 2.5: Ausschnitte aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von **16** (500 MHz bzw. 125.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )

Eine weitere Verbesserung der Synthesebedingungen kann durch das Verfolgen der Reduktion der Azidogruppe zur Aminogruppe erreicht werden. Azidogruppen führen im IR-Spektrum zu einer intensiven Absorptionsbande, die zwischen  $2160$  und  $2090\text{ cm}^{-1}$  liegt. Dabei handelt es sich um die Frequenz der asymmetrischen Streckschwingung der Azidogruppe.<sup>[90]</sup> Wird das in Chloroform gequollene Harz zwischen zwei Natriumchlorid-Platten gegeben, so lassen sich gut aufgelöste FT-IR-Spektren aufnehmen (Bild 2.6). Bei Anwesenheit von Azidogruppen lässt sich deren Absorptionsbande gut erkennen. Die Reaktionskontrolle der Reduktion ergibt, dass diese bei Verwendung von 10 Äquivalenten Sn(II) bereits nach wenigen Minuten vollständig ist, so dass die anfangs verwendeten Reaktionszeiten von 2 h nicht nötig sind.

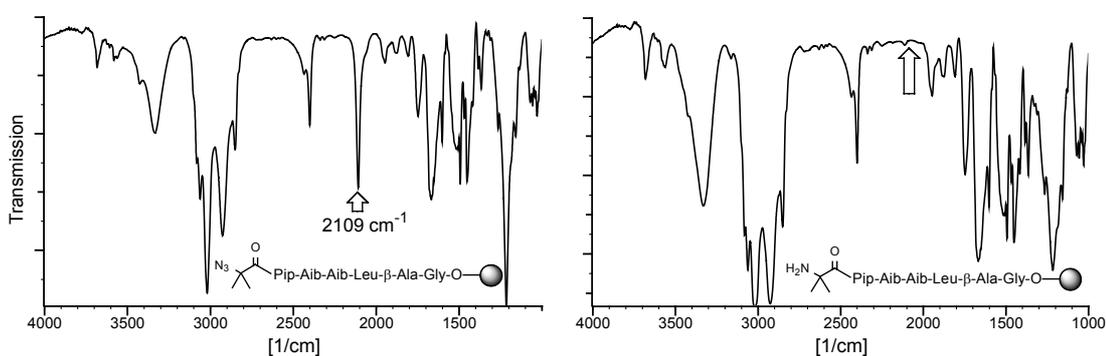
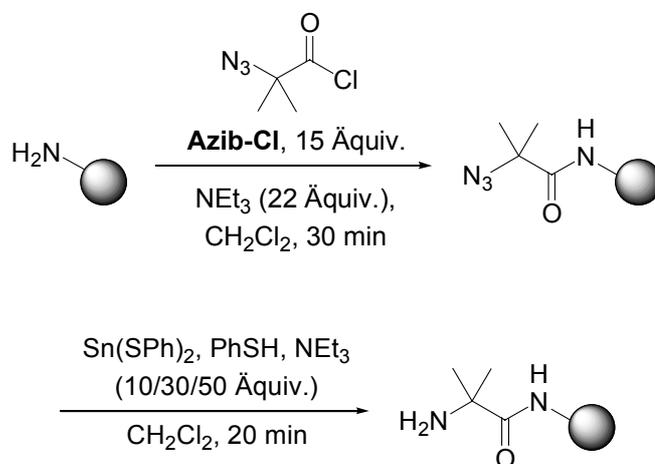


Bild 2.6: FT-IR-Spektrum eines Peptidylharzes mit N-terminaler Azidogruppe (links) und nach vollständiger Reduktion der Azidogruppe (rechts)

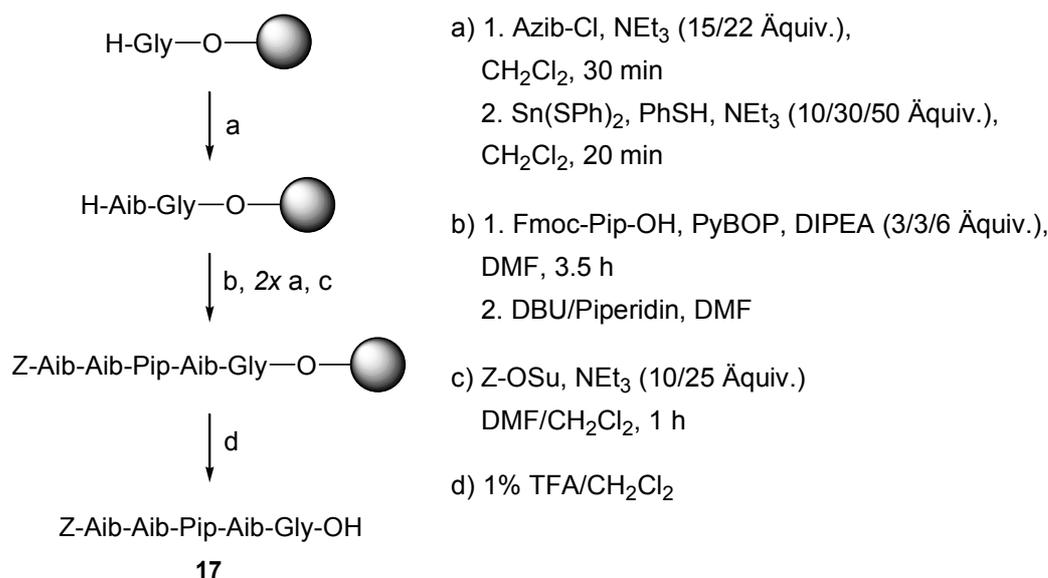
Aufgrund dieser Ergebnisse kann für die Einführung des Aib-Restes in Festphasensynthesen nach der in Schema 2.25 dargestellten Standardvorschrift verfahren werden.



Schema 2.25: Optimierte Standardvorschrift zur Einführung von Aib-Resten in Festphasensynthesen

Nach dieser optimierten Vorschrift wird auch die Synthese des oben erwähnten Modellpeptids H-Aib-Aib-Aib-Aib-Gly-Phe-Gly-OH (**35**) erneut erfolgreich durchgeführt.

Die Synthese des am N-Terminus mit einer Z-Schutzgruppe versehenen mittleren Fragmentes **17** erfolgt nach dem gleichen Verfahren wie die Synthese von **16**. Nach dem Aufbau des Pentapeptids am Polymer wird am N-Terminus durch Reaktion mit *N*-(Benzylcarbonyloxy)succinimid (Z-OSu) eine Z-Gruppe angebracht.



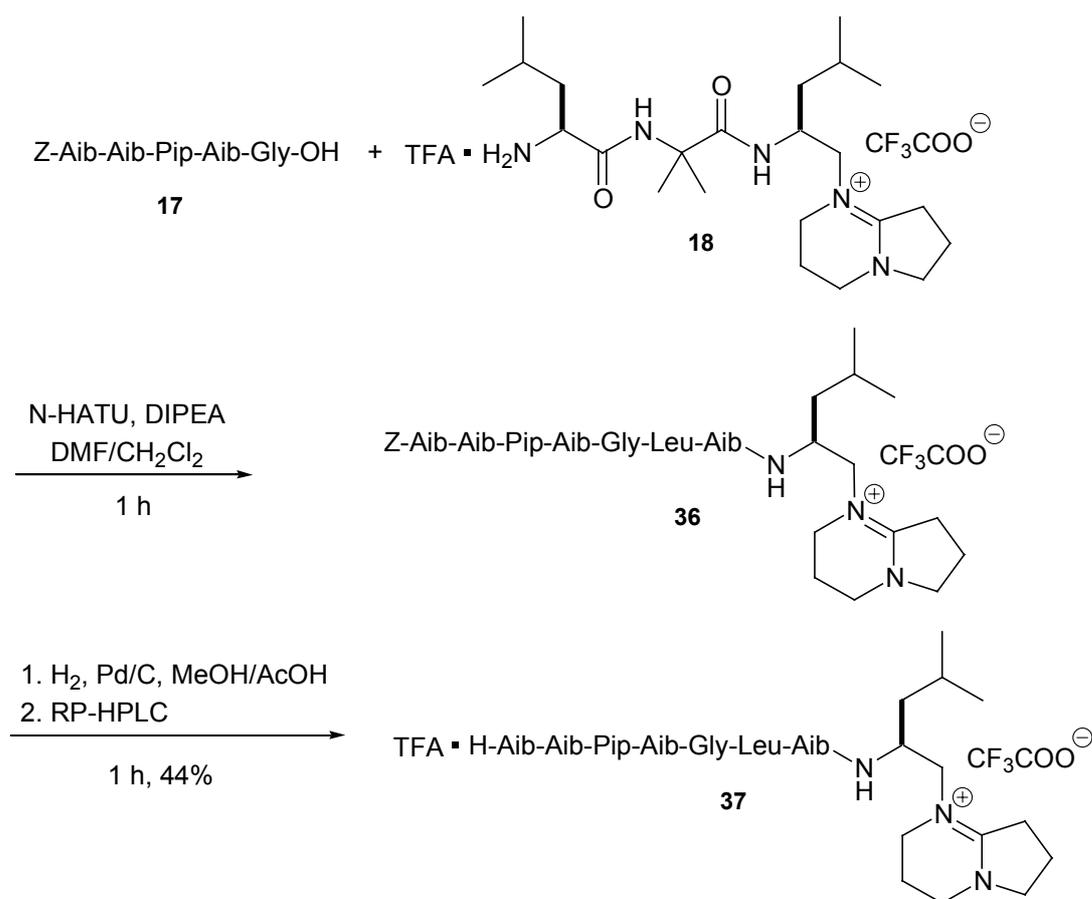
Schema 2.26: Synthese des Z-geschützten mittleren Fragmentes **17** am *o*-Chlortrityl-Harz

---

Das Rohprodukt wird durch präparative RP-HPLC gereinigt und das gereinigte Produkt **17** durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie sowie MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert.

### 2.1.4 Kondensation der Fragmente

Für die Synthese der Gesamtsequenz von Efrapeptin C (**1**) müssen nun die drei Fragmente kondensiert werden. Zunächst wird das C-terminale Fragment **18** als Aminokomponente mit dem N-terminal durch eine Z-Gruppe geschützten mittleren Fragment **17** als Carboxykomponente kondensiert (Schema 2.27).



Schema 2.27: Kondensation des C-terminalen und des mittleren Fragmentes

Da die Carboxykomponente C-terminal ein Glycin trägt, können keine Epimerisierungen auftreten. Die Reaktion wird mit N-HATU als Kupplungsreagenz in DMF und Dichlormethan durchgeführt. Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann das Verschwinden der kationischen Aminokomponente bequem verfolgt werden und die Reaktion ist innerhalb von einer Stunde beendet. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wird der Rückstand in Methanol und Essigsäure aufgenommen und wird unter einer Wasserstoff-Atmosphäre mit Palladium auf Aktivkohle behandelt. Auch diese Reaktion ist nach kurzer Reaktionszeit beendet und das entschützte Molekül, welches

quasi der C-terminalen Hälfte von Efrapeptin C (**1**) entspricht, kann durch präparative RP-HPLC in einer Gesamtausbeute von 44% isoliert werden.

Das Produkt wird in hoher Reinheit erhalten und wird massenspektrometrisch sowie durch  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie charakterisiert. Im MALDI-TOF-Massenspektrum (Bild 2.7) tritt wiederum nur der Peak des quartären Amidiniumions auf.

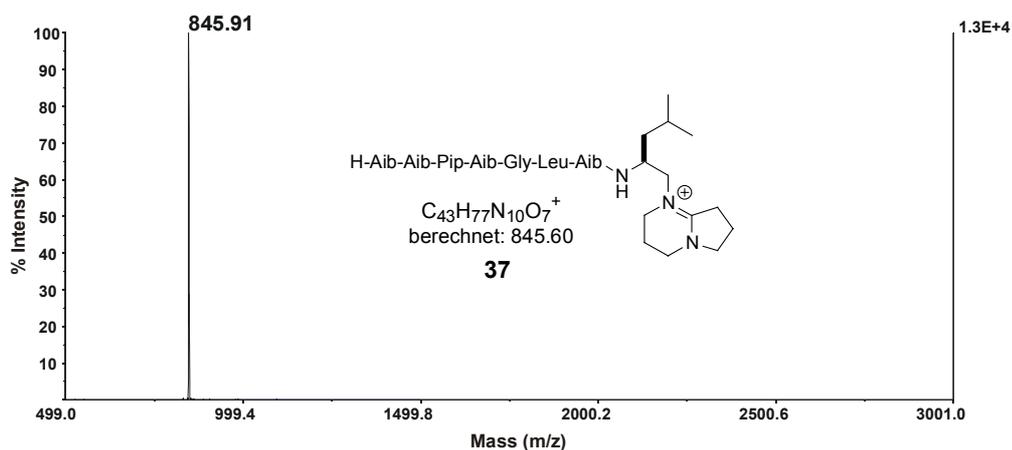


Bild 2.7: MALDI-TOF-Massenspektrum von **37**

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **37** (Bild 2.8) treten im Bereich der NH-Protonen neben einem breiten Singulett für den protonierten N-Terminus zwei Dubletts, drei Singulett und ein schlecht aufgelöstes Triplet auf.

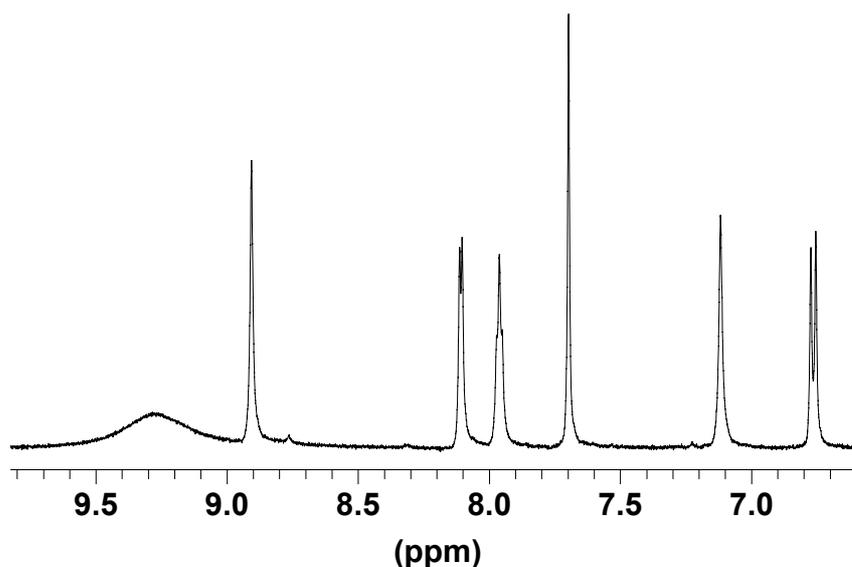


Bild 2.8: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **37** (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Bild 2.9) weist ein für die Amidinium-Einheit charakteristisches Signal bei 166.1 ppm sowie im Bereich von 170 bis 180 ppm sechs Signale auf, wobei die hohe Intensität des Signals bei 173.2 ppm darauf schließen lässt, dass es durch zwei zufällig isochrone Carbonyl-C-Atome erzeugt wird.

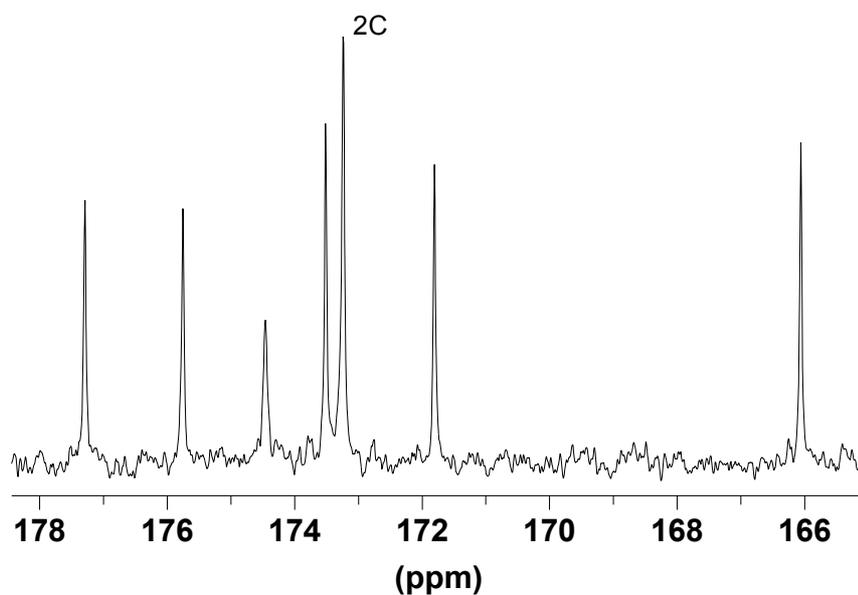
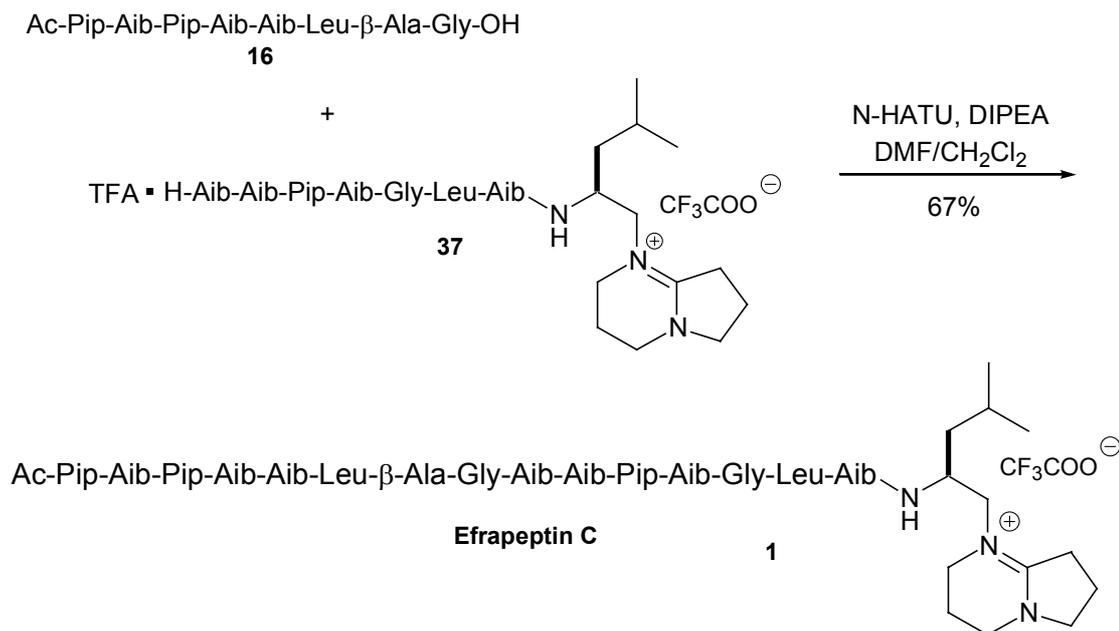


Bild 2.9: Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **37** (125.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )

Die abschließende Kondensation des N-terminalen Fragmentes **16** als Carboxykomponente mit der C-terminalen Hälfte **37** (Schema 2.28) erfolgt wiederum mit N-HATU als Kupplungsreagenz in Dichlormethan und DMF.



Schema 2.28: Abschließende Segmentkondensation von **16** und **37** zu Efrapeptin C (**1**)

Da die Carboxykomponente C-terminal ein Glycin trägt, besteht keine Gefahr der Epimerisierung. Nach beendeter Reaktion werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Produkt **1** wird durch präparative RP-HPLC in 67% Ausbeute isoliert.

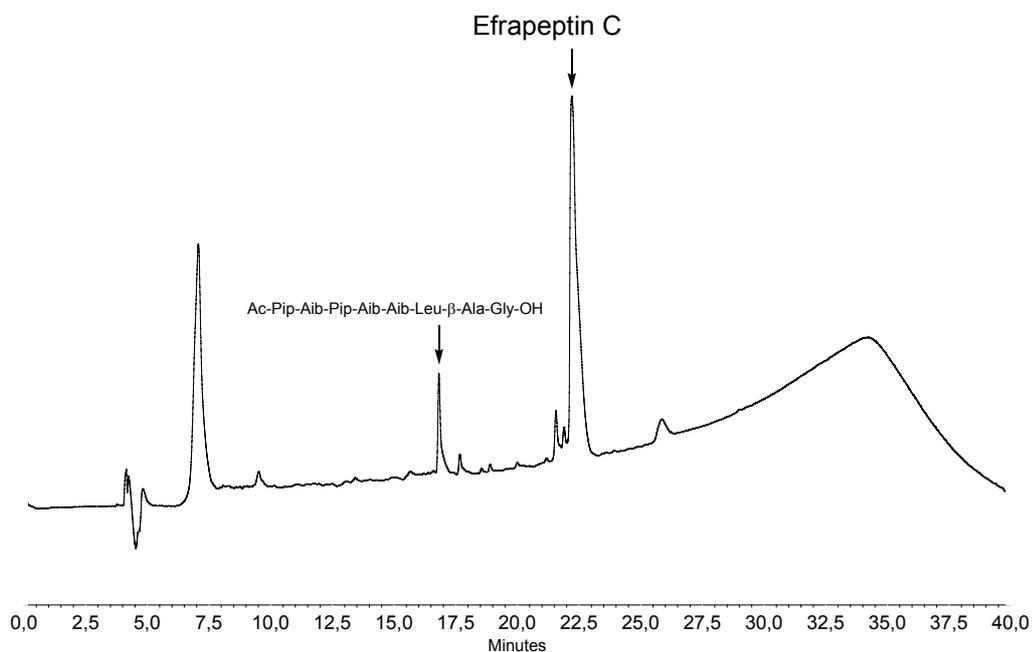


Bild 2.10: Analytisches HPL-Chromatogramm des Reaktionsgemisches der abschließenden Segmentkondensation

Die Reaktion verläuft glatt, wird durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt und die HPL-chromatographische Analyse des Reaktionsgemisches zeigt, dass hierin neben den aus dem Kupplungsreagenz stammenden sehr polaren Nebenprodukten und Efrapeptin C (**1**) praktisch nur noch die im Überschuss eingesetzte Carboxykomponente **16** vorliegt (Bild 2.10).

Durch einmalige präparative RP-HPLC wird Efrapeptin C in guter Ausbeute und hoher Reinheit isoliert.

### 2.1.5 Charakterisierung des synthetischen Efrapeptin C

Die Reinheit des synthetischen Efrapeptin C (**1**) wird durch analytische RP-HPLC gezeigt (Bild 2.11).

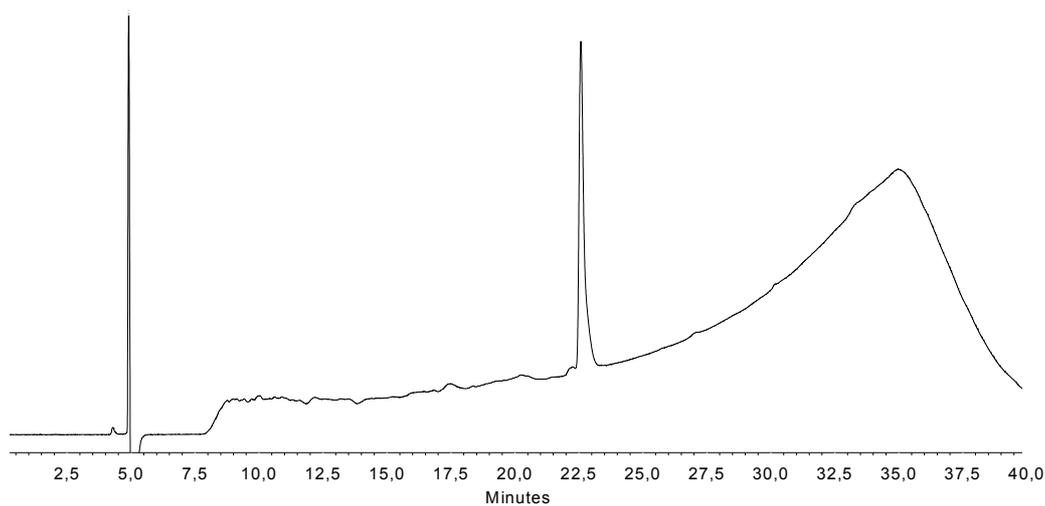


Bild 2.11: Analytisches HPL-Chromatogramm von synthetischem Efrapeptin C (**1**)

In  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  wird ein gut aufgelöstes  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erhalten (Bild 2.12).

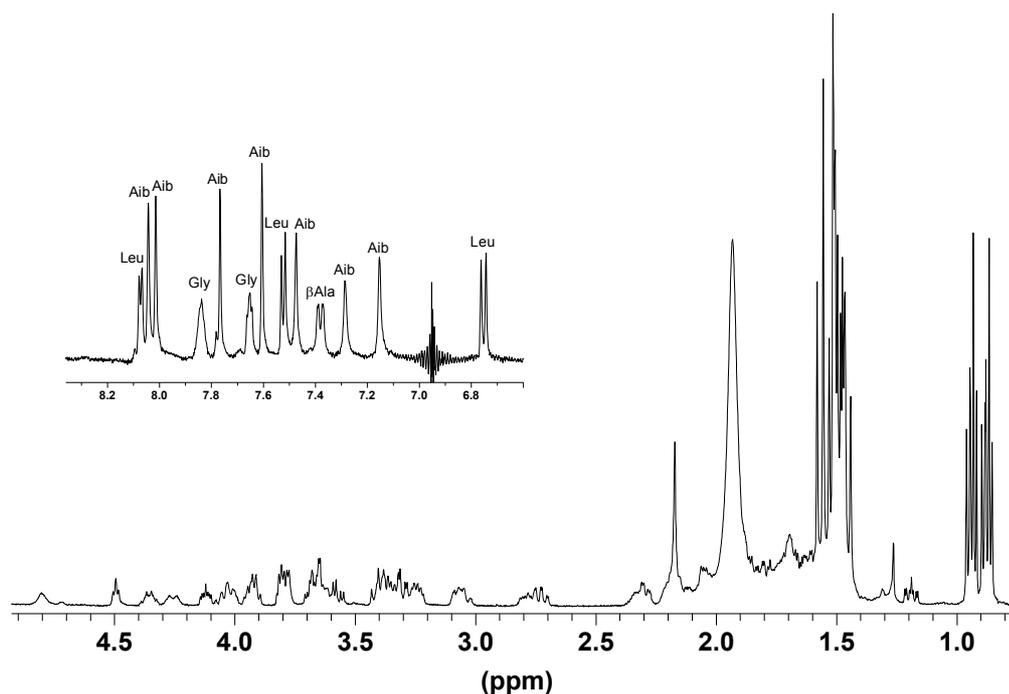


Bild 2.12:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von synthetischem Efrapeptin C (1) (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )

Zwischen 0.8 und 1.0 ppm treten sechs Dubletts der Methylgruppen in den *iso*-Butyl-Seitenketten der zwei Leucine und der Kopfgruppe auf. Die vierzehn Singulets der Aib-Methylgruppen treten zwischen 1.40 und 1.60 ppm auf, überlappen jedoch teilweise. Gut erkennbar ist ein scharfes Singulett bei 2.17 ppm, das von der Methylgruppe der N-terminalen Acetylgruppe erzeugt wird. Zwischen 6.6 und 8.2 ppm erscheinen drei Dubletts der NH-Protonen der zwei Leucine und der Kopfgruppe, zwei schlecht aufgelöste Triplets der Glycin-NH-Protonen, ein Multiplett des  $\beta$ -Alanin-NH-Protons sowie sieben Singulets der NH-Protonen der Aib-Reste.

Die Massenfeinbestimmung durch ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie (Bild 2.13) ergibt eine relative Masse des monoisotopischen Peaks von 1606.0444. Diese weicht nur um 0.7 ppm vom für ein Ion der Zusammensetzung  $[\text{}^{12}\text{C}_{80}\text{}^1\text{H}_{137}\text{}^{14}\text{N}_{18}\text{}^{16}\text{O}_{16}]^+$  berechneten Wert von 1606.0454 ab.

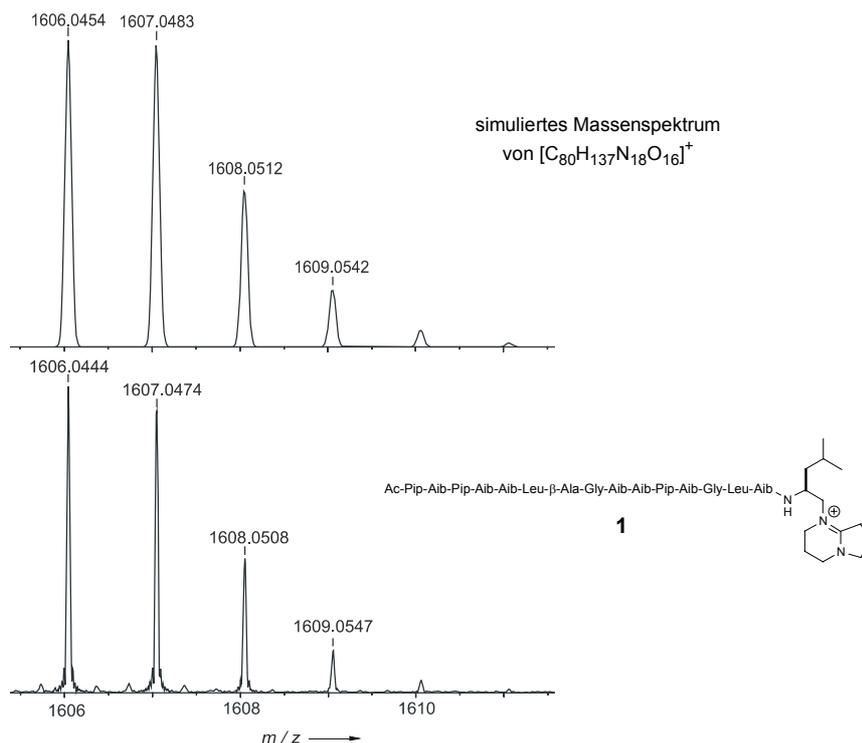


Bild 2.13: Simuliertes Massenspektrum des Ions  $[C_{80}H_{137}N_{18}O_{16}]^+$  (oben) und experimentelles (unten) ESI-FT-ICR-Massenspektrum von synthetischem Efrapeptin C (1)

Im MALDI-TOF-Massenspektrum (Bild 2.14) von Efrapeptin C lässt sich bei dem hier verwendeten Gerät (Voyager-DE, Fa. Applied Biosystems) kein isotopenaufgelöster Peak detektieren. Die durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmte Masse von 1607.11 korreliert aber gut mit der isotopengemittelten Masse von 1607.08 für ein Ion der Zusammensetzung  $[C_{80}H_{137}N_{18}O_{16}]^+$ .

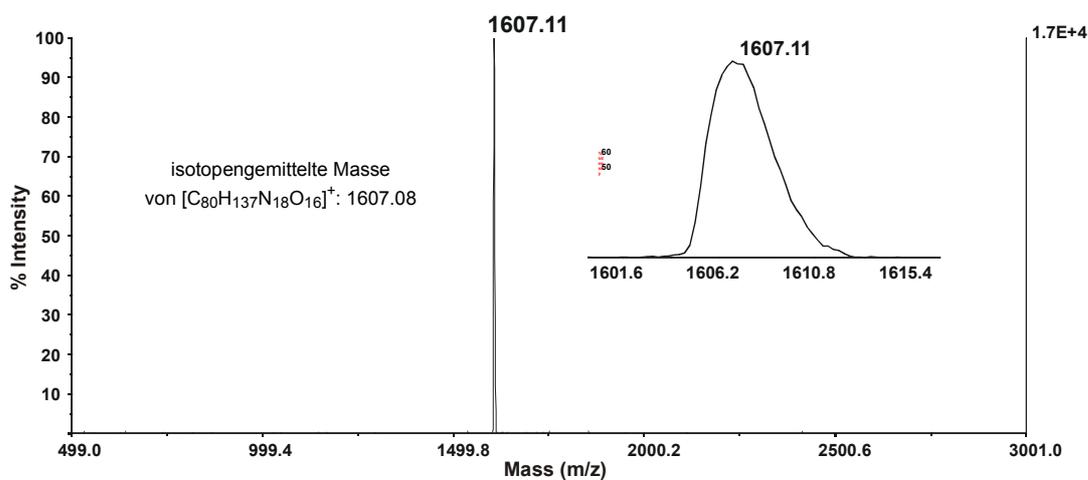


Bild 2.14: MALDI-TOF-Massenspektrum von synthetischem Efrapeptin C (1)

Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) eignet sich besonders zur Untersuchung von Konformationen von Proteinen und Peptiden.<sup>[91]</sup> Bei dieser Methode wird die ungleiche Absorption von links- und rechtscircular polarisiertem Licht optisch aktiver Substanzen ausgenutzt. In der Nähe einer Absorptionsbande werden die circular polarisierten Komponenten des einfallenden linear polarisierten Lichtes unterschiedlich stark absorbiert, was zu elliptisch polarisiertem Licht führt. In der Regel wird der CD-Effekt als „molare Elliptizität“ angegeben, welche die Elliptizität einer Lösung der Konzentration  $1 \text{ dmol}\cdot\text{cm}^{-3}$  bei einer Schichtdicke von 1 cm in Grad beschreibt. Um den Vergleich von CD-Spektren von Proteinen oder Peptiden unterschiedlicher Größe zu erleichtern, wird häufig die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta]_R$  angegeben. Es gilt folgende Gleichung:

$$[\Theta]_R = \frac{[\Theta]_{obs} \cdot MRW}{c \cdot d} = \frac{[\Theta]_{obs} \cdot MW}{c \cdot d \cdot MW}$$

$[\Theta]_R$  : mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest [ $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ]

$[\Theta]_{obs}$  : gemessene Elliptizität [mdeg]

$MRW$  : mittlere Molmasse der Aminosäuren [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

$c$  : Konzentration [ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]

$d$  : Schichtdicke

$MW$  : Molmasse des Peptids oder Proteins [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

$N_A$  : Anzahl der Aminosäuren

Um Hinweise auf die Sekundärstruktur des synthetischen Efrapeptin C (**1**) zu erhalten, wird ein CD-Spektrum in Trifluorethanol (TFE) aufgenommen (Bild 2.15). Das Lösungsmittel TFE besitzt die Fähigkeit, helikale Strukturen zu stabilisieren. Besitzt ein Peptid die Neigung zur Ausbildung helikaler Strukturen, so sollte in diesem Lösungsmittel der Anteil an Molekülen, die eine Helix ausbilden, besonders hoch sein.<sup>[92]</sup>

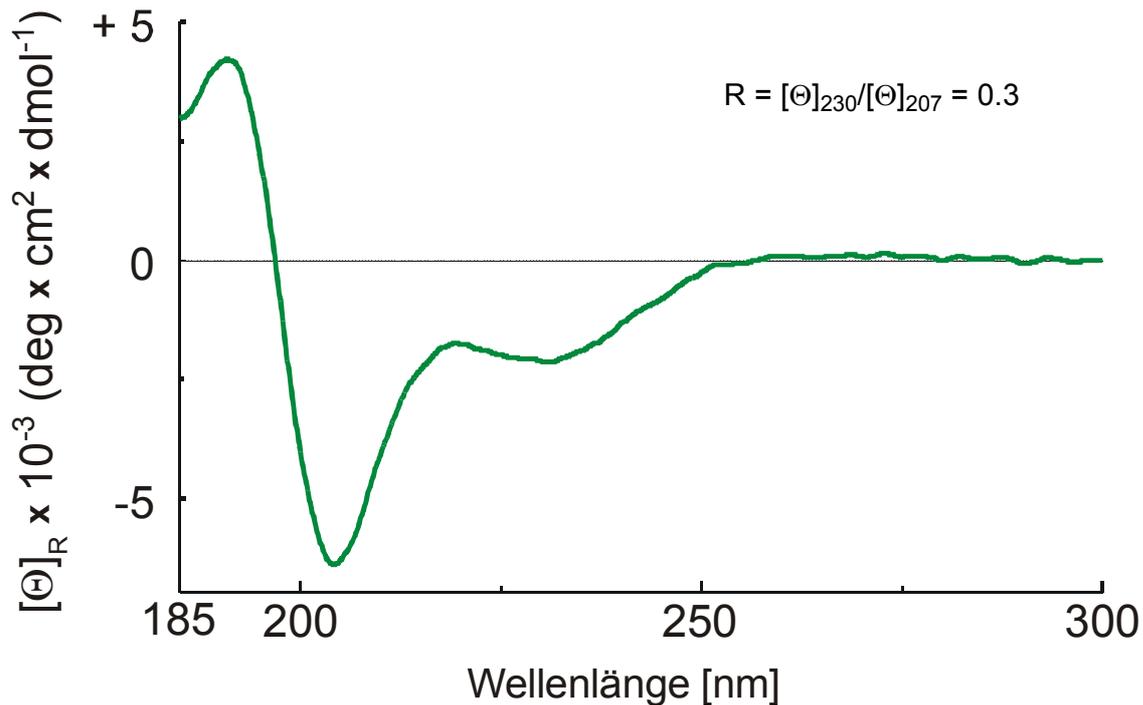
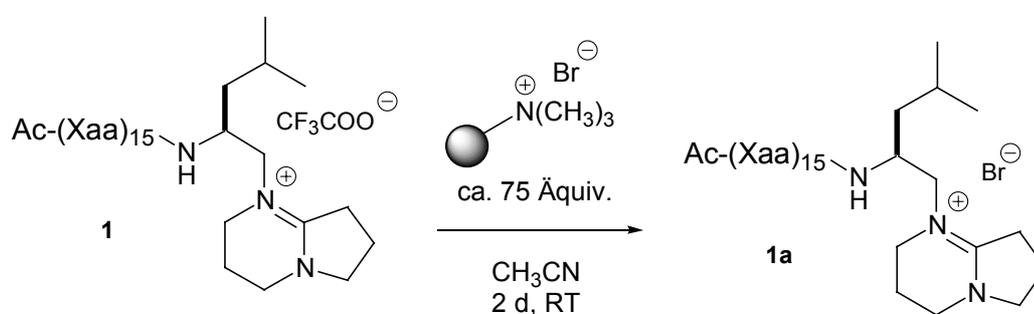


Bild 2.15: CD-Spektrum von Efrapeptin C (1) in Trifluorethanol

Das CD-Spektrum von Efrapeptin C (1) zeigt bei 205 nm eine stark negative CD-Bande und um 230 nm eine Schulter. Bei 190 nm wird eine positive CD-Bande beobachtet. Toniolo et al.<sup>[7]</sup> beschreiben das für eine rechtsgängige  $3_{10}$ -Helix charakteristische CD-Spektrum des Octamers Ac-[L-( $\alpha$ -Me)Val]<sub>8</sub>-O<sup>t</sup>Bu mit einer negativen CD-Bande bei 207 nm und einer Schulter um 222 nm. Das Verhältnis R der Elliptizitäten bei 222 nm und 207 nm beträgt 0.4. Bei  $\alpha$ -helikalen Peptiden sind die negativen Banden bei 207 und 222 nm etwa gleich intensiv ( $R \approx 1$ ). Mit Hilfe des Verhältnisses R lässt sich daher gut zwischen  $\alpha$ -Helix und  $3_{10}$ -Helix unterscheiden. Im CD-Spektrum von Efrapeptin C (1) wird ebenfalls eine negative Bande um 207 nm gefunden, allerdings ist die Schulter der zweiten negativen Bande bei einer etwas größeren Wellenlänge von 230 nm zu finden. Das Verhältnis der Elliptizitäten bei 230 nm und 207 nm beträgt 0.3. Aufgrund dieses niedrigen Wertes kann das Vorliegen einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur ausgeschlossen werden. Stattdessen spricht das CD-Spektrum von 1 in TFE für das Vorliegen eines hohen Anteils an  $3_{10}$ -helikalen Sekundärstruktur-Elementen. Im Komplex mit der mitochondrialen F<sub>1</sub>-ATPase liegt das Efrapeptin C-Molekül im N-terminalen (Pip1-Leu6) und C-terminalen (Aib9-Aib15) Bereich in einer  $3_{10}$ -helikalen Konformation vor. Die beiden  $3_{10}$ -helikalen Bereiche sind durch eine flexible Region

miteinander verbunden, die ein  $\beta$ -Alanin und ein Glycin enthält. Liegt **1** in TFE-Lösung in einer ähnlichen Konformation vor, so können die geringen Abweichungen des CD-Spektrums von **1** von dem einer idealen  $3_{10}$ -Helix durch den Beitrag des flexiblen Bereiches (-Leu<sup>6</sup>- $\beta$ -Ala<sup>7</sup>-Gly<sup>8</sup>-) zum CD-Spektrum erklärt werden.

Für die Durchführung einiger Experimente (z. B. Kristallisationsversuche) ist es von Vorteil, das aufgrund der Reinigung durch RP-HPLC mit einer TFA-haltigen mobilen Phase (Acetonitril/Wasser/0.1% TFA) als Gegenion zur Amidiniumgruppe vorhandene Trifluoracetat gegen ein Halogenid-Ion auszutauschen. Durch Behandlung von Efrapeptin C als Trifluoracetat mit einem großen Überschuss an Bromid auf polymerem Träger in Acetonitril wird das Gegenion ausgetauscht.



Schema 2.29: Austausch des Anions von Efrapeptin C (**1**)

Die Abwesenheit von Trifluoracetat in dem so erhaltenen Material lässt sich durch <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie mit Trifluorethanol als internem Standard nachweisen.

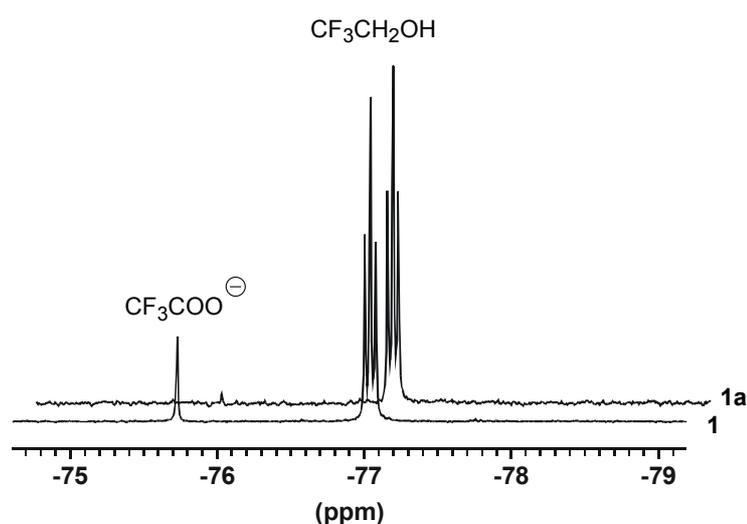


Bild 2.16: <sup>19</sup>F-NMR-Spektrum (235.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) von Efrapeptin C als Trifluoracetat (**1**, vordere Spur) und nach Anionenaustausch (**1a**, hintere Spur) mit Trifluorethanol (0.5  $\mu$ L TFE/mg Probe) als internem Standard

Das erhaltene Efrapeptin C als Bromid (**1a**) kann für Versuche zur Kristallisation eingesetzt werden, da Trifluoracetate häufig nur eine geringe Neigung zur Kristallisation haben. Bisher sind jedoch sämtliche Versuche, auf diese Weise Einkristalle von Efrapeptin C zu erhalten, um die Kristallstruktur durch Röntgenbeugung zu bestimmen, erfolglos geblieben.<sup>[93]</sup>

Wie bereits weiter oben beschrieben, weisen einige Aib-Xaa-Peptidbindungen eine stark erhöhte Säureempfindlichkeit auf. Wird synthetisches Efrapeptin C mehrere Tage in Dichlormethan aufbewahrt, so erhält man ein Gemisch, in dem laut MALDI-TOF-Massenspektrum neben Efrapeptin C (**1**) fünf weitere Komponenten enthalten sind, die durch säurekatalysierte Hydrolyse aufgrund der in chlorierten Kohlenwasserstoffen enthaltenen HCl-Spuren entstanden sind (Bild 2.17).

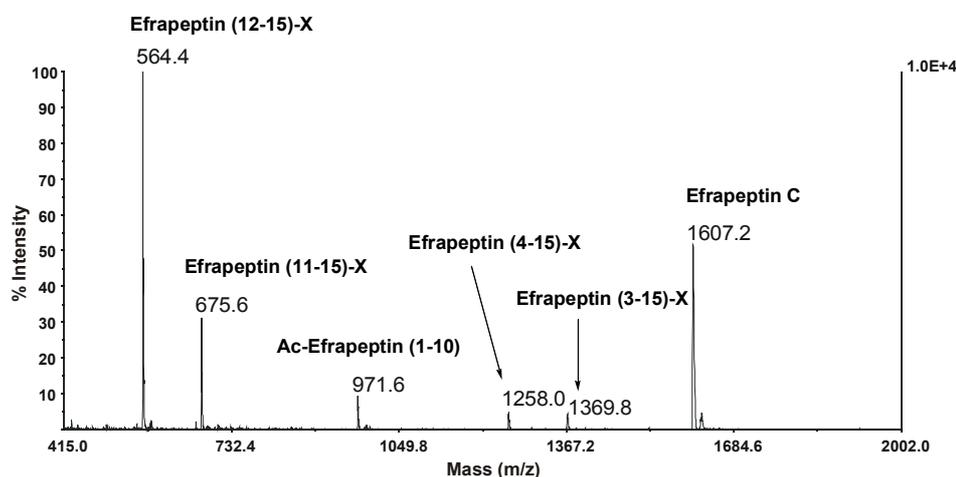


Bild 2.17: MALDI-TOF-Massenspektrum des durch partielle Hydrolyse von Efrapeptin C (**1**) in Dichlormethan erhaltenen Gemisches

Im HPL-Chromatogramm der Mischung werden ebenfalls neben Efrapeptin C fünf weitere Komponenten gefunden (Bild 2.18) und durch ein manuelles HPLC-MALDI-TOF-MS-Experiment lassen sich den einzelnen Peaks im HPL-Chromatogramm definierte Hydrolyse-Fragmente zuordnen.

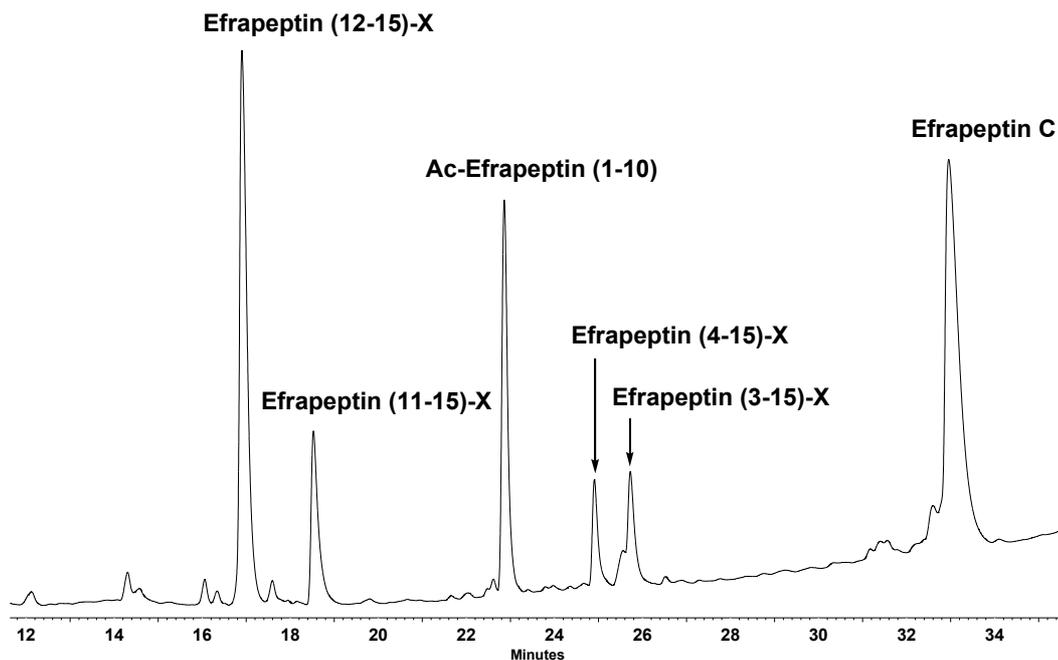
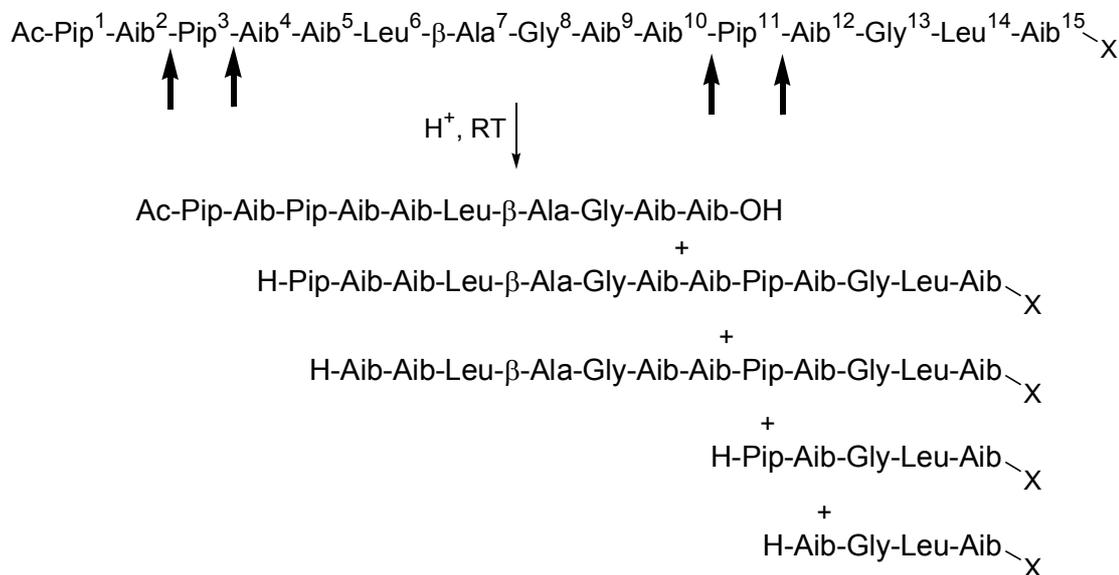


Bild 2.18: Analytisches HPL-Chromatogramm (Methode B) des durch partielle Hydrolyse von Efrapeptin C (1) in Dichlormethan erhaltenen Gemisches

Diese Ergebnisse bestätigen erneut, dass Aib-Pip- und Pip-Aib-Peptidbindungen besonders säurelabil sind (Schema 2.30).



Schema 2.30: Partielle Hydrolyse von Efrapeptin C (1) unter sauren Bedingungen bei Raumtemperatur

Beim Vergleich des MALDI-TOF-Massenspektrums und des HPL-Chromatogramms des partiellen Hydrolysates fällt auf, dass die relativen Intensitäten der Peaks im MALDI-TOF-Massenspektrum der Komponenten, die C-terminal ein quartäres Amidin-

iumion tragen, gut mit den Verhältnissen der HPLC-Peakflächen der jeweiligen Komponenten korrelieren. Der Peak des  $[M+Na]^+$ -Ions des Fragmentes Ac-Pip<sup>1</sup>-Aib<sup>10</sup> ist jedoch im Vergleich zu dessen hohen Peakflächenanteil im HPL-Chromatogramm deutlich unterrepräsentiert. Dies zeigt, dass bei Anwesenheit von quartären Amidiniumsalzen andere Signale teilweise unterdrückt werden.

Die Behandlung von Efrapeptin C mit TFA bei Raumtemperatur führt bereits nach 2 h zu einer partiellen Hydrolyse der Aib-Pip- und Pip-Aib-Peptidbindungen. Im MALDI-TOF-Massenspektrum werden der Peak des Fragmentes H-Aib-Gly-Leu-Aib-X und mit geringerer Intensität der Peak des Fragmentes H-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X gefunden.

Gupta et al.<sup>[63]</sup> beschreiben, dass die Behandlung von Efrapeptin C (**1**) mit 6 M HCl bei 110°C das C-terminale Fragment H-Leu-Aib-X (**18**) liefert. Die Behandlung von synthetischem Efrapeptin C (**1**) mit 6 M HCl bei 90°C führt bereits nach etwa 2 h zur Bildung des C-terminalen Fragmentes **18**, das durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie und RP-HPLC identifiziert wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits unter schwach sauren Bedingungen und bei Raumtemperatur die Pip-Aib- und die Aib-Pip-Peptidbindungen in Efrapeptin C (**1**) hydrolytisch gespalten werden und erst bei höheren Temperaturen selektiv die Peptidbindung zwischen Gly13 und Leu14 gespalten wird.

### 2.1.6 Inhibierung von F<sub>1</sub>-ATPase aus *E. coli* durch synthetisches Efrapeptin C (**1**)

Zur weiteren Charakterisierung des synthetisierten Efrapeptin C (**1**) wird das erhaltene Material auf seine biologische Aktivität untersucht. Efrapeptine sind ATPase-Inhibitoren. Es gibt mehrere Arten von ATPasen, von denen die wichtigsten die mitochondrialen ATPasen, die Chloroplasten-ATPasen und die bakteriellen ATPasen sind.<sup>[94]</sup> Die mitochondriale ATPase ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und dient unter physiologischen Bedingungen der ATP-Synthese aus ADP und Phosphat (daher auch ATP-Synthase genannt). Dabei wird die protonenmotorische Kraft aufgrund des Protonengradienten entlang der inneren Mitochondrienmembran ausgenutzt. Die Chloroplasten-ATPase befindet sich in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten, wo ebenfalls ein transmembraner Protonengradient zur ATP-Synthese genutzt wird. Bakterielle ATPasen befinden sich in der bakteriellen Membran. Strukturell ähneln sich die

oben erwähnten ATPasen und bestehen aus einer protonenleitenden membranständigen  $F_o$ -Domäne und einer ATP-synthetisierenden  $F_1$ -Domäne (Bild 2.19).

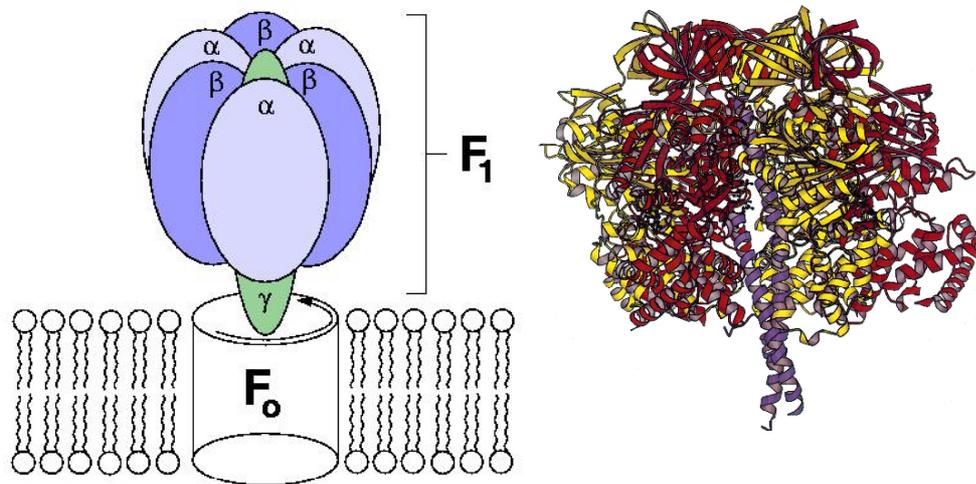


Bild 2.19: Schematische Darstellung der membrangebundenen  $F_1F_0$ -ATPase (links) und Bändermodell der Kristallstruktur der bovinen  $F_1$ -ATPase<sup>[95]</sup>

Die  $F_o$ - und die  $F_1$ -Domäne sind durch nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden. Die  $F_1$ -Domäne besteht aus fünf unterschiedlichen Polypeptidketten mit der Zusammensetzung  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  und kann von der  $F_o$ -Domäne abgelöst und von dieser getrennt in wässriger Lösung untersucht werden. Gibt man zu solch einer Präparation ATP, so katalysiert die  $F_1$ -ATPase dessen Hydrolyse zu ADP und Phosphat. Walker et al. haben die Kristallstruktur der 372 kDa großen  $F_1$ -ATPase aus Rinderherz-Mitochondrien ohne Inhibitor und im Komplex mit Efrapeptin und Aurovertin bestimmt.<sup>[74, 95, 96]</sup> Diese Arbeiten führten zu einem detaillierten Verständnis der wesentlichen Schritte des Mechanismus der ATP-Synthese und wurden durch die Vergabe des Chemie-Nobelpreises 1997 an John E. Walker zusammen mit Paul D. Boyer gewürdigt. Die ATP-Synthese wird heute durch einen sogenannten „Bindungswechsel-Mechanismus“ beschrieben (Bild 2.20).

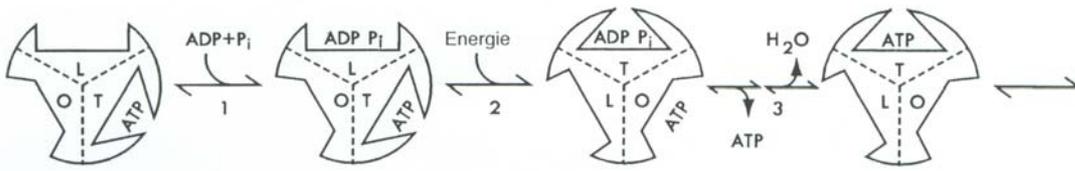


Bild 2.20: Der Bindungswechsel-Mechanismus der ATP-Synthase (Erläuterungen s. Text)

Die katalytischen Zentren der  $\beta$ -Untereinheiten treten miteinander in Wechselwirkung und nehmen dabei abwechselnd eine von drei Konformationen ein. In der einen Konformation (**O** = open) hat die Bindungsstelle eine sehr geringe Affinität zu den Substraten ADP und  $P_i$  und ist katalytisch inaktiv. In der zweiten Konformation (**L** = loose binding) bindet die Bindungsstelle die Substrate locker, ist aber katalytisch inaktiv. In der dritten Konformation (**T** = tight binding) bindet die Bindungsstelle die Substrate fest und ist katalytisch aktiv. Durch eine protoneninduzierte Konformationsänderung geht die Bindungsstelle mit **T**-Konformation, die gebundenes ATP enthält, in die **O**-Form über und setzt das ATP frei. Gleichzeitig wird die Bindungsstelle mit **L**-Konformation, die locker gebundenes ADP und Phosphat enthält, in die **T**-Form umgewandelt und katalysiert die Bildung von ATP. Neues ADP und  $P_i$  binden an die Bindungsstelle mit **O**-Konformation, die daraufhin in die **L**-Form übergeht und so weiter.

Die kontinuierliche Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit relativ zum umgebenden  $\alpha_3\beta_3$ -Unterkomplex wurde von Yoshida et al. nachgewiesen (Bild 2.21).<sup>[97]</sup>

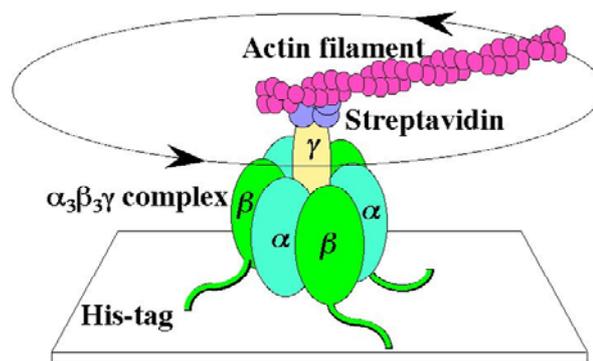


Bild 2.21: Experimenteller Nachweis der ATP-abhängigen Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit der  $F_1$ -ATPase relativ zum umgebenden  $\alpha_3\beta_3$ -Unterkomplex von Yoshida et al.<sup>[97]</sup>

Sie fixierten den  $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Unterkomplex über die nickelbindende Sequenz His<sub>10</sub> in einer einheitlichen Orientierung auf einer Nickel-beschichteten Glasoberfläche. Fluoreszenzmarkierte 1-3  $\mu\text{m}$  lange Actinfilamente wurden über die Biotin-Streptavidin-Wechsel-

wirkung an die  $\gamma$ -Untereinheit fixiert und deren ATP-abhängige Rotation gegen den Uhrzeigersinn konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop direkt beobachtet werden. Um zu zeigen, dass das hier synthetisierte Efrapeptin C biologisch aktiv ist, wird die Inhibierung der  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* untersucht. Die Hemmtests wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Altendorf an der Universität Osnabrück von Dr. Jörg Greie durchgeführt. Die Efrapeptine sind potente Inhibitoren der mitochondrialen ATPase und der ATPase aus Chloroplasten, während die bakterielle ATPase nur im mikromolaren Konzentrationsbereich gehemmt wird. Wise et al.<sup>[70a)]</sup> beschreiben die Eigenschaften einer  $F_1$ -ATPase aus einer *E. coli*-Mutante und geben auch den  $K_i$ -Wert für die Hemmung der  $F_1$ -ATPase des *E. coli*-Wildtyps durch Efrapeptin an. Der  $K_i$ -Wert gibt die Inhibitor-Konzentration an, die zu einer halbmaximalen Inhibierung führt. Der von ihnen ermittelte  $K_i$ -Wert beträgt  $21.5 \mu\text{M}$ . In der hier durchgeführten Inhibierungs-Studie wird die gereinigte, lösliche  $F_1$ -ATPase<sup>[98]</sup> aus *E. coli* mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert und anschließend wird die  $F_1$ -ATPase-Aktivität nach einer von Arnold et al. beschriebenen Methode bestimmt.<sup>[99, 100]</sup>

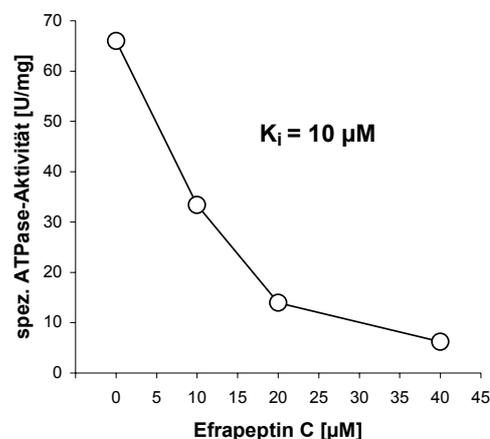


Bild 2.22: Inhibierung der  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* durch synthetisches Efrapeptin C (1)

Nach Zugabe von ATP werden kontinuierlich Proben aus dem Gemisch entnommen und die Menge an gebildetem anorganischem Phosphat wird durch Reaktion mit Molybdat zu Molybdophosphorsäure und anschließende Reduktion mit Ascorbat zu Phosphomolybdänblau, dessen Absorption bei 578 nm gemessen wird, bestimmt. So wird für die nicht inhibierte Reaktion und für jede Inhibitor-Konzentration ein Wert für die spezifische Aktivität der  $F_1$ -ATPase erhalten. Die Inhibitor-Konzentration, die zu einer

halbmaximalen Inhibierung führt, gibt den  $K_i$ -Wert an. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Bild 2.22 dargestellt. Der ermittelte  $K_i$ -Wert beträgt  $10 \mu\text{M}$ . Dieser stimmt gut mit dem von Wise et al. bestimmten Wert überein, zumal sich dieser Literaturwert auf die Mischung der Efraeptine, wie sie aus den Fermentationsbrühen des produzierenden Pilzes isoliert wird, bezieht.

## 2.2 Synthese und Untersuchung von Efrapeptin-Analoga

### 2.2.1 Überlegungen zum Moleküldesign von Efrapeptin-Analoga

Es ist bekannt, dass Peptide, die ausschließlich aus  $\beta$ -Aminosäuren aufgebaut sind ( $\beta$ -Peptide), häufig eine ausgeprägte Neigung zur Bildung stabiler, definierter Sekundärstrukturen haben.<sup>[8]</sup> Für die in Proteinen vorkommenden Poly( $\alpha$ -aminosäure)ketten werden zwei stabile helikale Sekundärstrukturen gefunden ( $3_{10}$ - und  $\alpha$ -Helix), die durch Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonyl-O-Atomen und den NH-Protonen der Amidbindungen des Peptidrückgrats stabilisiert werden (Bild 2.23). Hierbei gehört das beteiligte NH-Proton immer zu einer Aminosäure, die sich weiter in Richtung des C-Terminus befindet.

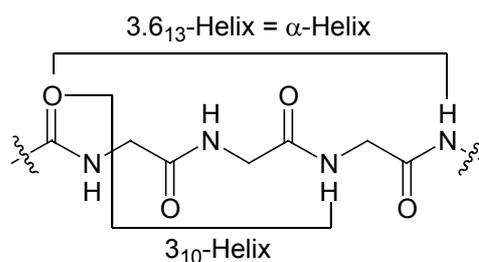


Bild 2.23: Wasserstoffbrückenmuster der beiden in Proteinen vorkommenden helikalen Sekundärstrukturmotive

In  $\beta$ -Peptiden wird im Vergleich hierzu eine wesentlich größere Vielfalt an helikalen Sekundärstrukturen gefunden (Bild 2.24).

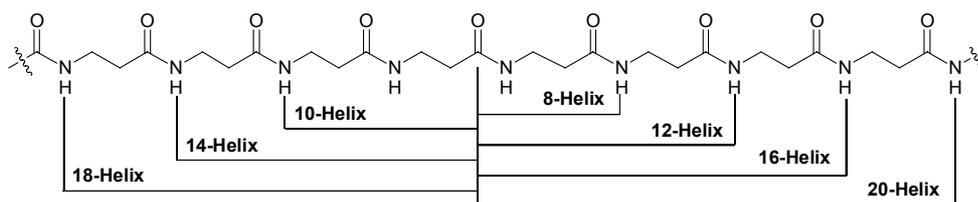
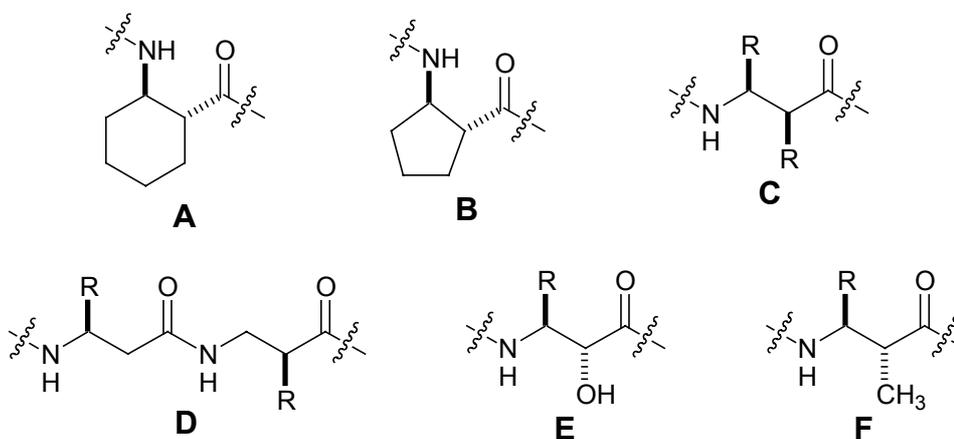


Bild 2.24: Wasserstoffbrückenmuster von helikalen Sekundärstrukturen in  $\beta$ -Peptiden

Für Poly( $\alpha$ -isobutyl-L-aspartat) werden zwei kristalline Polymorphe gefunden, die wahrscheinlich einer 14- und einer 18-Helix entsprechen. Für die Polymere von *trans*-Aminocyclohexancarbonsäure (**A**, Schema 2.31) sagen Gellman et al. aufgrund einer theoretischen Untersuchung eine 14-Helix als stabile Sekundärstruktur voraus und

können deren Vorliegen für Oligomere aus vier bis acht Monomeren Einheiten sowohl für den kristallinen Zustand als auch in Lösung experimentell nachweisen.<sup>[101]</sup> Die analoge Vorgehensweise liefert für Peptide, die aus Einheiten der *trans*-Aminocyclopentancarbonsäure (**B**) aufgebaut sind, eine 12-Helix.<sup>[102]</sup> Oligomere aus Bausteinen des Typs **C** bilden ebenfalls eine 14-Helix.<sup>[103]</sup>  $\beta$ -Peptide aus Bausteinen des Typs **D** bilden eine bei  $\alpha$ -Peptiden völlig unbekannte Art von Helix aus sich abwechselnden zeh- und zwölfgliedrigen H-verbrückten Ringen.<sup>[104]</sup> Neuste Ergebnisse zeigen, dass Oligomere aus  $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -aminosäuren des Typs **E** eine  $2_8$ -Helix bilden.<sup>[105]</sup> Neben helikalen werden aber auch Faltblattstrukturen gefunden, z. B. bei  $\beta$ -Peptiden aus Bausteinen des Typs **F**.<sup>[106]</sup>

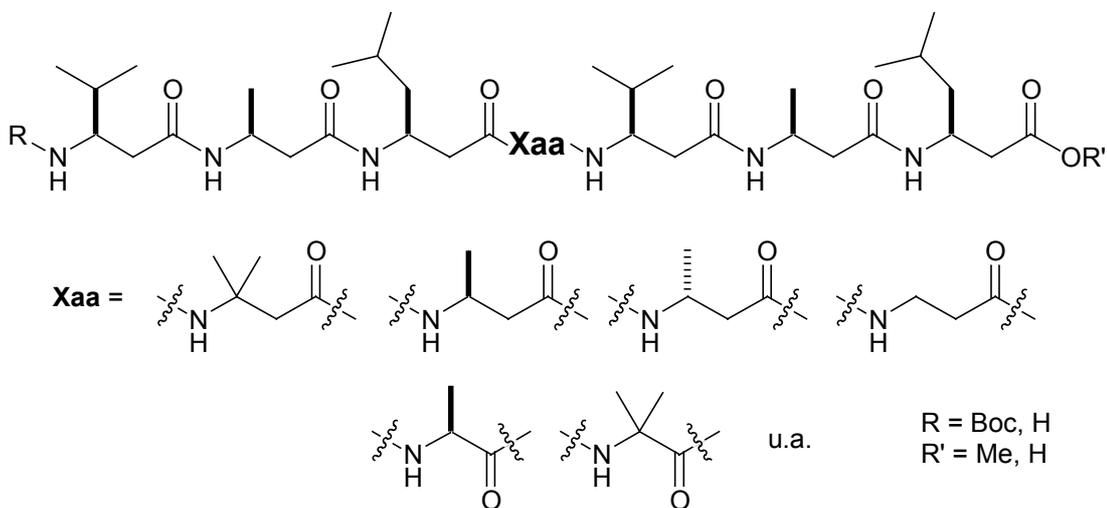


Schema 2.31: Bausteine **A** bis **F** zum Aufbau von  $\beta$ -Peptiden

Die helikalen Sekundärstrukturen von  $\beta$ -Peptiden sind sehr empfindlich gegenüber dem Austausch einzelner  $\beta$ -Aminosäuren. Dies zeigen Seebach et al., indem sie Analoga des 14-helicalen  $\beta$ -Hexapeptids H- $\beta$ -HVal<sup>1</sup>- $\beta$ -HAla<sup>2</sup>- $\beta$ -HLeu<sup>3</sup>- $\beta$ -HVal<sup>4</sup>- $\beta$ -HAla<sup>5</sup>- $\beta$ -HLeu<sup>6</sup>-OH untersuchen, die nach dem dritten Rest einen zusätzlichen Baustein enthalten (Schema 2.32).<sup>[107]</sup>

Beim Einbau einer D- $\beta$ -Aminosäure oder einer  $\beta,\beta$ -dialkylierten Aminosäure ( $\beta$ -HAib) wird bereits keine Helix mehr ausgebildet. Auch beim Einbau von  $\beta$ -Alanin bleibt die Helixbildung aus. Diese Aminosäure scheint daher dem Glycin zu ähneln, welches bei  $\alpha$ -Peptiden als Helixbrecher bezeichnet wird, da es helikale Strukturen destabilisiert und *turn*-Strukturen stabilisiert. Aufgrund der Störung des Skelettatomusters durch den

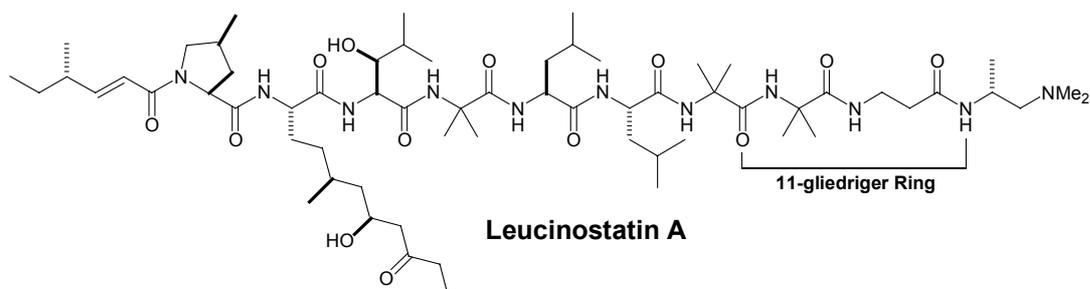
Einbau einer  $\alpha$ -Aminosäure bleibt bei den Analoga, die Alanin oder Aib enthalten, ebenfalls die Helixbildung aus.



Schema 2.32: Von Seebach et al.<sup>[107]</sup> auf Helizität untersuchte  $\beta$ - und gemischte  $\alpha,\beta$ -Peptide

Eine interessante Fragestellung ist nun, inwieweit umgekehrt  $\beta$ -Aminosäuren kompatibel mit helikalen Sekundärstrukturmotiven von  $\alpha$ -Peptiden sind. Hierüber ist bisher wenig bekannt. Benedetti et al. beschreiben die Synthese und Eigenschaften von H- $\beta$ -HAsp-Phe-OMe, H-Asp- $\beta$ -HPhe-OMe und H-Asp- $\beta$ -HPhg-OMe als Analoga des Süßstoffes H-Asp-Phe-OMe (Aspartam).<sup>[108]</sup> Hierbei handelt es sich jedoch um geschmacklose oder nur schwach süß schmeckende Verbindungen, die in DMSO und Methanol fast keine Neigung zur Ausbildung bevorzugter Konformationen zeigen. Auch die Peptide Boc- $\beta$ -HLeu-Leu- $\beta$ -HLeu-Leu-OMe und Boc-Leu- $\beta$ -HLeu-Leu- $\beta$ -HLeu-Leu-OMe wurden von Benedetti et al. untersucht.<sup>[109]</sup> Sie zeigen in Lösung ein hohes Maß an konformativer Flexibilität. Das Tripeptid Boc-Leu- $\beta$ -HLeu-Leu-OMe liegt im Kristall in einer gestreckten Konformation ohne intramolekulare Wasserstoffbrücke vor. Selbst der Einbau von  $\beta$ -Aminosäuren in Peptide aus  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten  $\alpha$ -Aminosäuren, die eine besonders ausgeprägte Neigung zur Bildung helikaler Strukturen besitzen, führt nicht zu helikalen Peptiden.<sup>[110]</sup> In dem aus *Paecilomyces* sp. isolierten Peptidantibiotikum Leucinostatin A (Schema 2.33) befindet sich ein  $\beta$ -Alanin am C-terminalen Ende eines  $\alpha$ -helikalen Bereichs.<sup>[111]</sup> Die Helix setzt sich im Kristall zwar auch im Bereich des  $\beta$ -Alanins fort, doch ändert sich aufgrund der zusätzlichen Methyleneinheit das Muster der Wasserstoffbrücken. Durch eine intramolekulare Wasser-

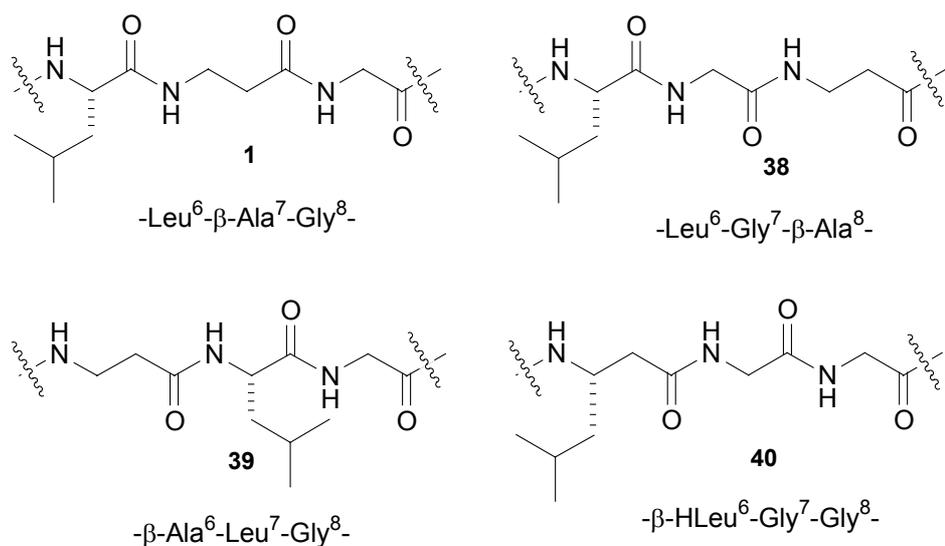
stoffbrücke vom NH-Proton des auf das  $\beta$ -Alanin folgenden Restes zum Carbonyl-O-Atom des Restes Aib7 ( $C=O^i \leftarrow HN^{i+3}$ ) entsteht ein 11-gliedriger Ring (Schema 2.33). Dies kann als eine durch die zusätzliche Methyleneneinheit des  $\beta$ -Alanins aufgeweitete  $3_{10}$ -Helix aufgefasst werden.



Schema 2.33: Struktur von Leucinoctatin A

Das Beispiel Leucinoctatin A zeigt somit, dass  $\beta$ -Aminosäuren kompatibel mit helikalen Strukturen von  $\alpha$ -Peptiden sein können.

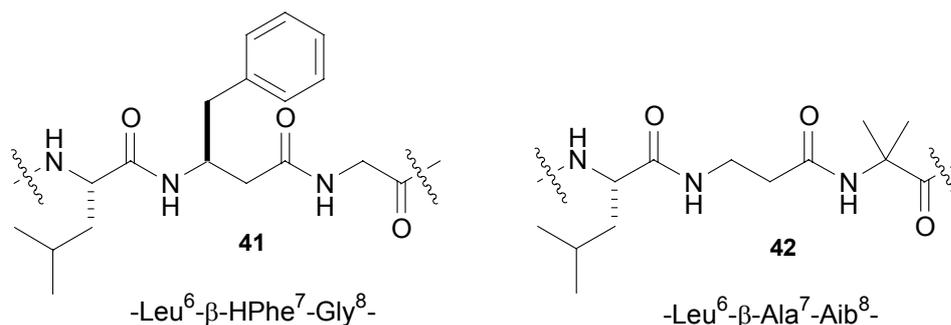
Um neue Erkenntnisse über den Einfluss von  $\beta$ -Aminosäuren auf die Sekundärstruktur helikaler  $\alpha$ -Peptide zu gewinnen, sollen Efraeptin-Analoga synthetisiert und auf ihre konformativen Eigenschaften hin untersucht werden. Hierfür werden Veränderungen in dem flexiblen Bereich ( $-\text{Leu}^6-\beta\text{-Ala}^7-\text{Gly}^8-$ ), der in der Struktur des Efraeptin C-F<sub>1</sub>-ATPase-Komplexes (**Bild 1.3**) die beiden  $3_{10}$ -helikalen Bereiche miteinander verbindet, vorgenommen. Man kann zwischen drei Arten der Modifizierung unterscheiden.



Schema 2.34: Efraeptin-Analoga, bei denen sich die Positionen der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren ändern.

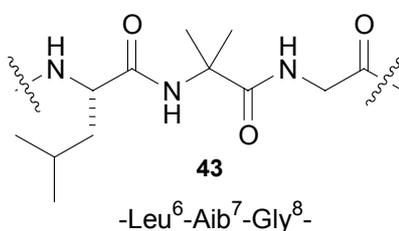
Bei der ersten Gruppe von Analoga bleibt die Zahl der Atome des Peptidrückgrats und die Art der Seitenketten konstant, aber die Positionen der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren ändern sich (Schema 2.34).

Bei der zweiten Gruppe werden in den Seitenketten Veränderungen vorgenommen während die Zahl der Atome des Peptidrückgrats und die Positionen der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren gleich bleibt (Schema 2.35).



Schema 2.35: Efrapeptin-Analoga, bei denen in den Seitenketten Veränderungen vorgenommen werden.

Durch den Aufbau der Sequenz ausschließlich aus  $\alpha$ -Aminosäuren ändert sich die Zahl der Atome des Peptidrückgrats und somit auch die Positionen der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren (Schema 2.36).

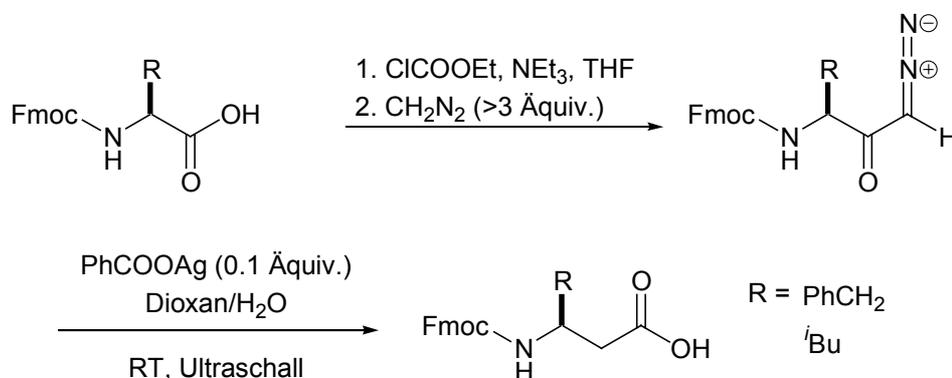


Schema 2.36: Efrapeptin-Analogen, bei dem  $\beta$ -Alanin gegen die helikogene  $\alpha$ -Aminosäure Aib ausgetauscht wird.

### 2.2.2 Synthese von Efrapeptin-Analoga

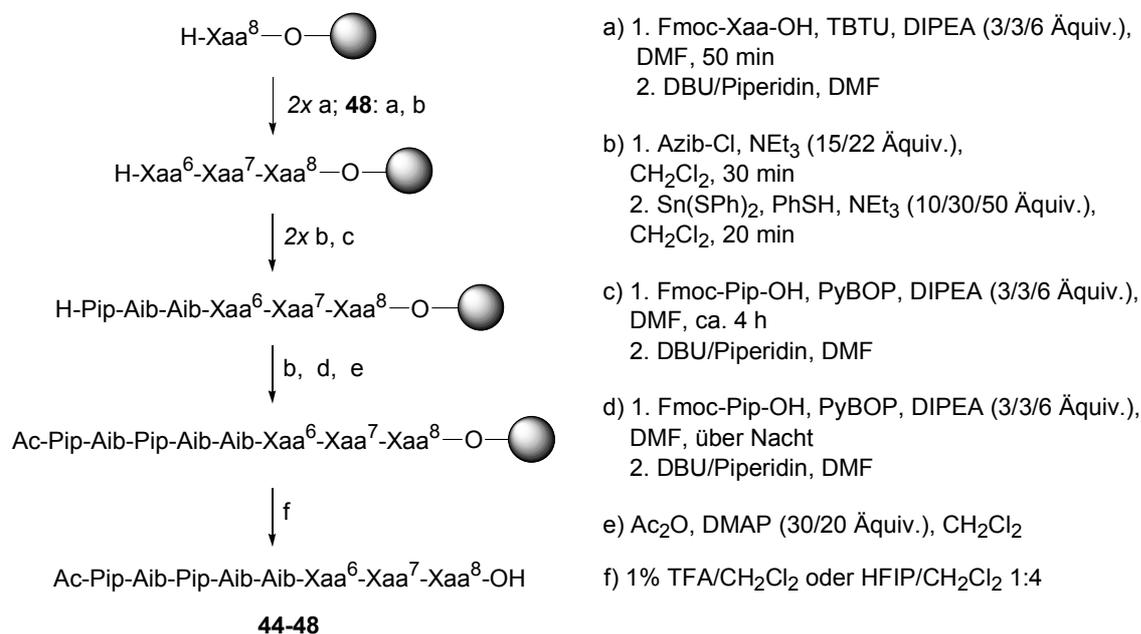
Da sich die oben beschriebenen Modifizierungen der Efrapeptin C-Sequenz auf die zentrale Teilsequenz  $-\text{Leu}^6\text{-}\beta\text{-Ala}^7\text{-Gly}^8\text{-}$  im N-terminalen Fragment beschränken, erfolgt deren Herstellung zunächst durch Festphasensynthese des benötigten modifizierten N-terminalen Fragmentes und anschließende Segmentkondensation mit der C-terminalen Hälfte **37** von Efrapeptin C (**1**). Die für die Synthese von **40** und **41** benötigten Fmoc-geschützten  $\beta$ -Homoaminosäuren (Fmoc- $\beta$ -HLeu-OH und Fmoc- $\beta$ -HPhe-OH)

werden durch Homologisierung der entsprechenden Fmoc-geschützten  $\alpha$ -Aminosäuren nach einem von Sewald et al. entwickelten Verfahren dargestellt (Schema 2.37).<sup>[112, 113]</sup>



Schema 2.37: Homologisierung Fmoc-geschützter  $\alpha$ -Aminosäuren durch Ultraschall-unterstützte Wolff-Umlagerung<sup>[112]</sup>

Da bei den Analoga **39**, **40**, **41** und **43** in Position 8 ein Glycin vorliegt, erfolgt die Synthese wie beim Naturstoff ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortrityl-Harz wie in Schema 2.24 und Schema 2.25 beschrieben (Schema 2.38).



a) 1. Fmoc-Xaa-OH, TBTU, DIPEA (3/3/6 Äquiv.), DMF, 50 min  
2. DBU/Piperidin, DMF

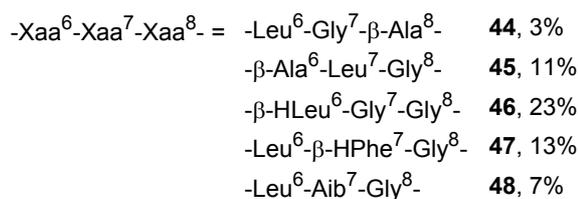
b) 1. Azib-Cl, NEt<sub>3</sub> (15/22 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30 min  
2. Sn(SPh)<sub>2</sub>, PhSH, NEt<sub>3</sub> (10/30/50 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 min

c) 1. Fmoc-Pip-OH, PyBOP, DIPEA (3/3/6 Äquiv.), DMF, ca. 4 h  
2. DBU/Piperidin, DMF

d) 1. Fmoc-Pip-OH, PyBOP, DIPEA (3/3/6 Äquiv.), DMF, über Nacht  
2. DBU/Piperidin, DMF

e) Ac<sub>2</sub>O, DMAP (30/20 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

f) 1% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder HFIP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:4



Schema 2.38: Synthese der modifizierten N-terminalen Fragmente **44-48**

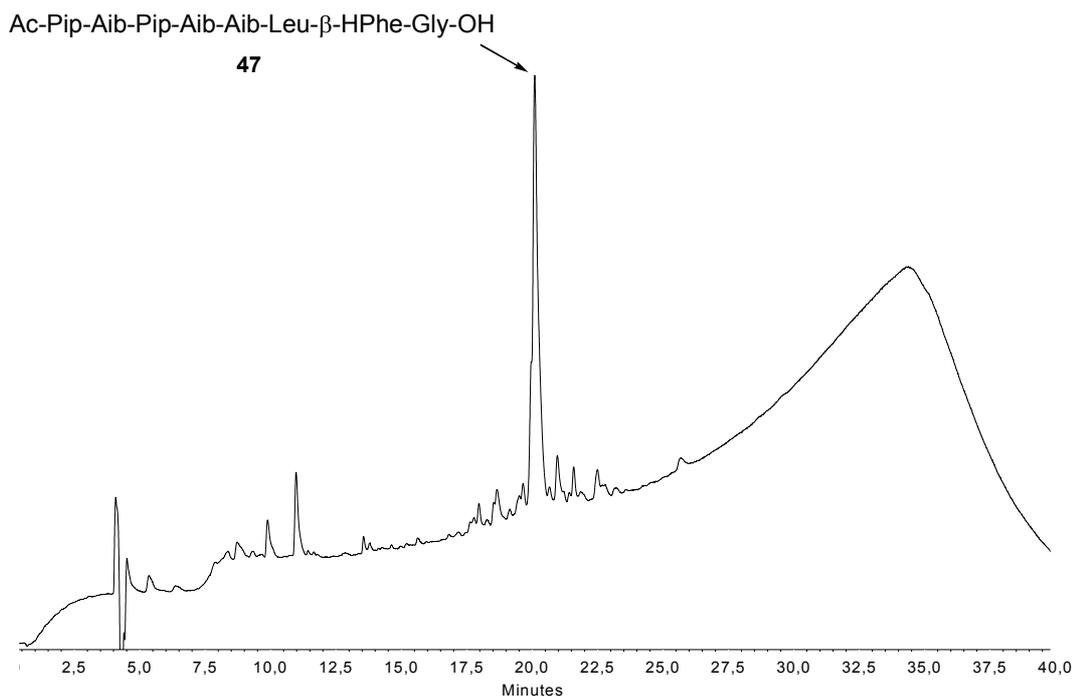
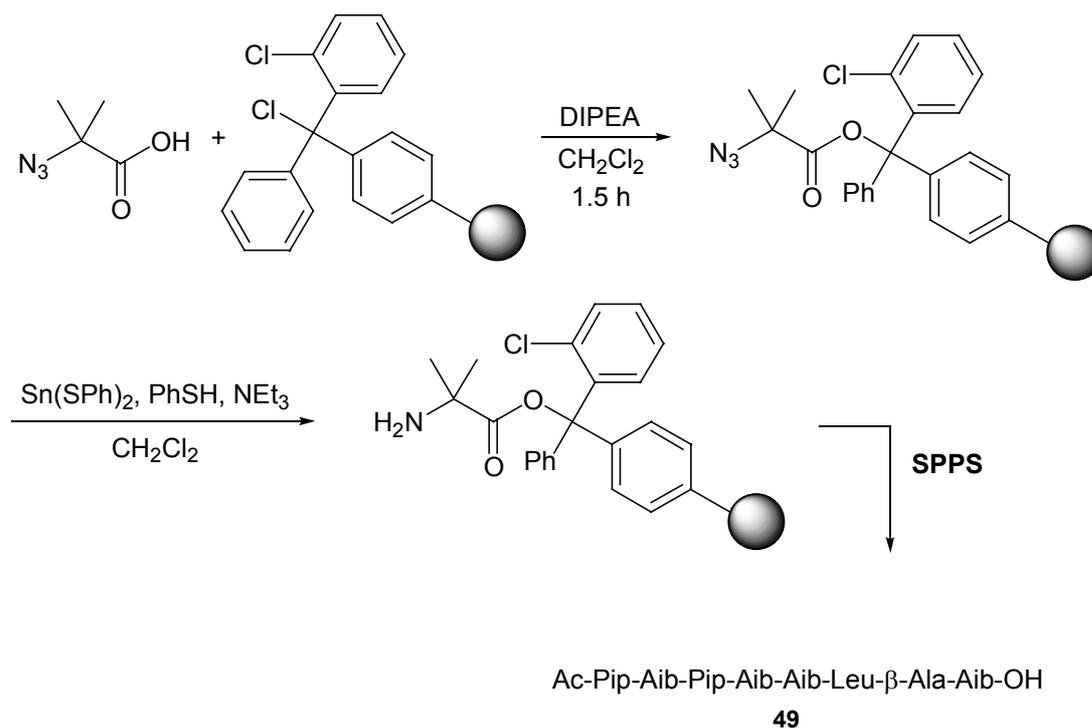


Bild 2.25: Analytisches HPL-Chromatogramm des Analogons **47** des N-terminalen Fragmentes von Efrapeptin C (**1**) nach Abspaltung vom Harz (=Rohprodukt)

Die Synthese der modifizierten N-terminalen Fragmente gelingt in einigen Fällen (**44** und **48**) mit relativ geringen Ausbeuten. Die Reinheiten der Rohprodukte sind jedoch teilweise recht hoch, wie z. B. das HPL-Chromatogramm des Rohproduktes der Synthese von **47** zeigt (Bild 2.25).

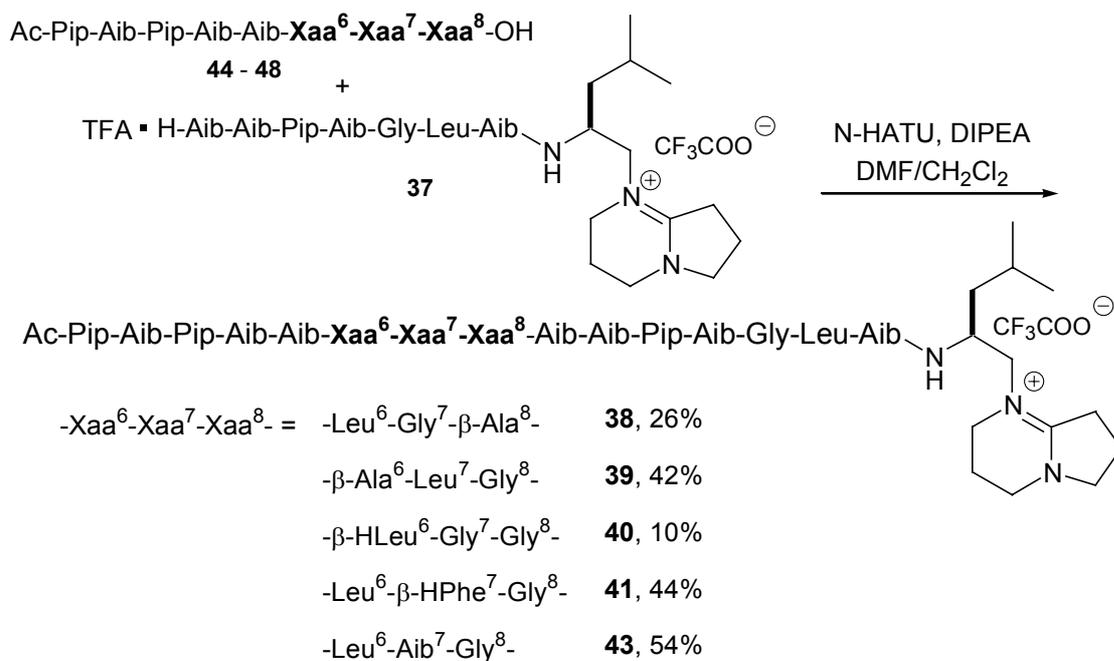
Beim N-terminalen Fragment des Analogons **42** befindet sich am C-Terminus ein Aib-Rest. Daher wird das *o*-Chlortritylchlorid-Harz mit dem Anion der  $\alpha$ -Azidoisobuttersäure umgesetzt und die Azidogruppe wie in Schema 2.25 mit dem Vilarrasa-Reagenz reduziert (Schema 2.39).



Schema 2.39: Immobilisierung von Aib als C-terminalen Rest an *o*-Chlortrityl-Harz zur Synthese des Analogons **49** des N-terminalen Fragmentes von Efrapeptin C (**1**)

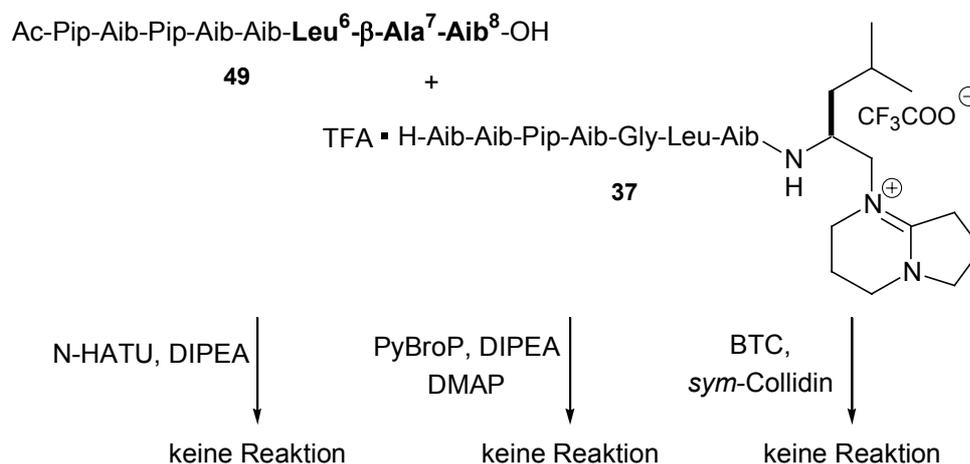
Die weitere Synthese erfolgt wiederum wie in Schema 2.38 beschrieben.

Abschließend werden die Analoga des N-terminalen Fragmentes von Efrapeptin C (**1**) mit der C-terminalen Hälfte **37** kondensiert (Schema 2.40).



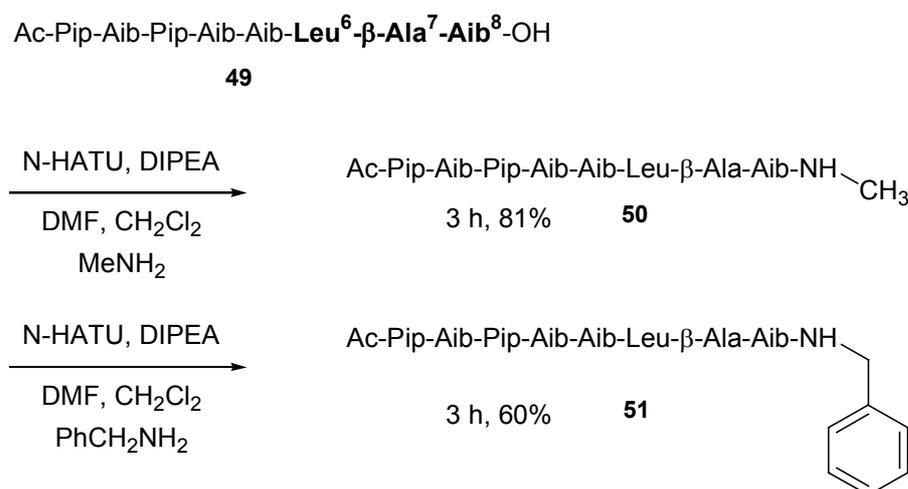
Schema 2.40: Abschließende Segmentkondensationen zur Synthese von Efrapeptin-Analoga

Bei dem Fragment **49** mit C-terminalem Aib werden für die abschließende Segmentkondensation mehrere Kupplungsmethoden angewendet, doch in allen Fällen wird laut MALDI-TOF-Massenspektrometrie keinerlei Produktbildung beobachtet (Schema 2.41).



Schema 2.41: Versuche zur Segmentkondensation von **49** und **37**

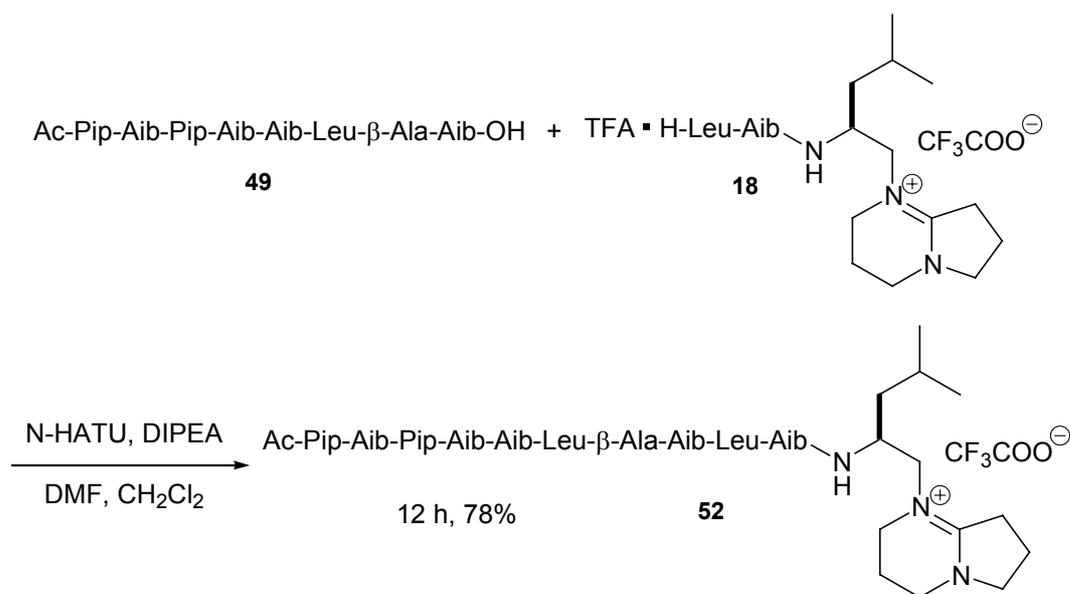
Wird das Peptid **49** mit N-HATU aktiviert, reagiert es jedoch problemlos mit Methylamin und Benzylamin (Schema 2.42).



Schema 2.42: Reaktion von **49** mit Methylamin und Benzylamin nach Aktivierung mit N-HATU

Dies zeigt, dass die Aktivierung der C-terminalen Carboxylgruppe zwar erfolgt, eine Reaktion mit der N-terminalen Aminogruppe von **37** jedoch vermutlich aus sterischen Gründen nicht stattfindet. Würde die Reaktion ablaufen, so würde dadurch eine Sequenz mit drei unmittelbar aufeinander folgenden Aib-Resten entstehen. Es ist bekannt, dass

solche Kupplungsreaktionen oft erfolglos verlaufen.<sup>[31]</sup> Es handelt sich hierbei daher um ein sequenzspezifisches Problem. Um zu zeigen, dass das Peptid **49** in Fällen mit geringerer sterischer Überfrachtung auch mit Peptidfragmenten gekuppelt werden kann, wird eine Segmentkondensation von **49** mit dem C-terminalen Fragment H-Leu-Aib-X (**18**) von Efrapeptin C (**1**) durchgeführt (Schema 2.43).



Schema 2.43: Darstellung des zentral trunkierten Efrapeptin-Analogons **52**

Auch diese Reaktion verläuft erfolgreich und das Produkt lässt sich als ein zentral trunkiertes Efrapeptin-Analogon auffassen.

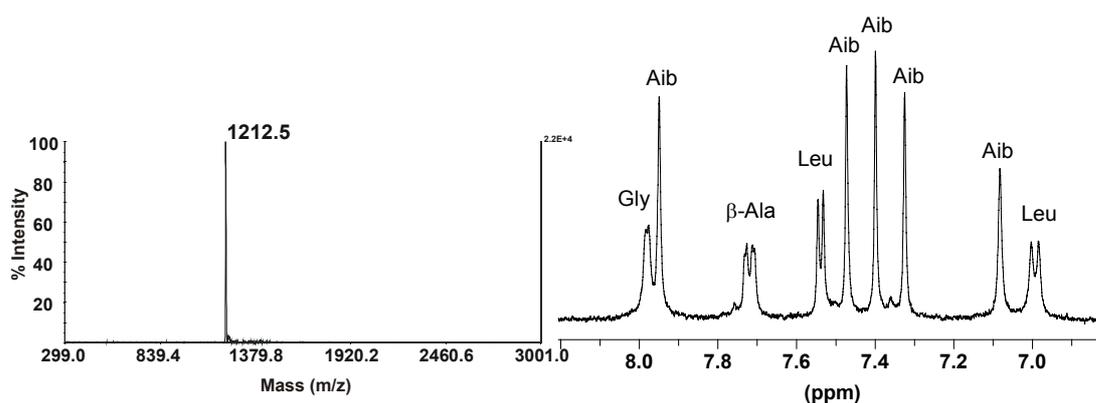


Bild 2.26: MALDI-TOF-Massenspektrum und ein Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) von **52**

Dieses ist zwar in Bezug auf den Einfluss von  $\beta$ -Aminosäuren auf die Sekundärstrukturen helikaler  $\alpha$ -Peptide weniger von Interesse, doch lassen sich durch derartige Verbindungen dennoch interessante Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten. Ein Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und das MALDI-TOF-Massenspektrum von **52** sind in Bild 2.26 gezeigt.

### 2.2.3 CD-spektroskopische Untersuchung von Efrapeptin-Analoga

Um erste Hinweise auf konformative Eigenschaften der synthetisierten Efrapeptin-Analoga zu erhalten, werden diese CD-spektroskopisch untersucht. Für die Anwendung dieser Methode werden nur sehr geringe Substanzmengen ( $< 1$  mg) benötigt und es lassen sich recht aussagekräftige Informationen über vorliegende Sekundärstrukturen erhalten. Insbesondere lässt sich durch den Vergleich der CD-Spektren von Efrapeptin-Analoga sowohl untereinander als auch mit dem CD-Spektrum des Naturstoffs schnell erkennen, in welchen Fällen größere Veränderungen in der Konformation vorliegen.

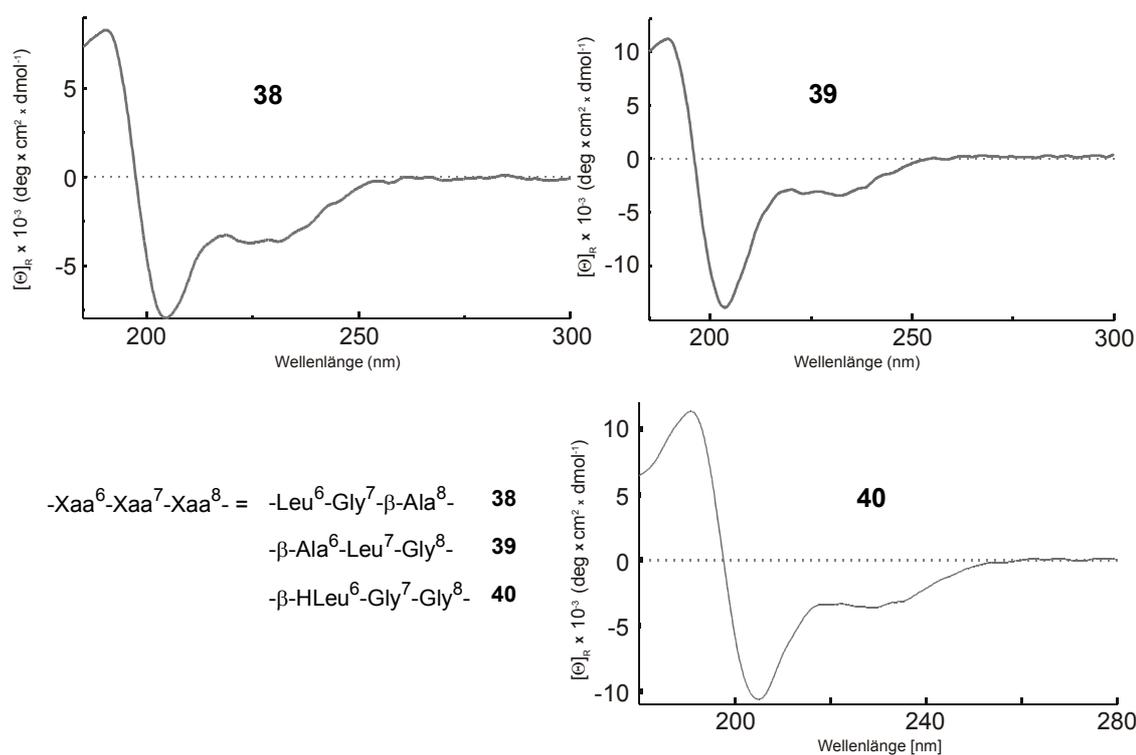


Bild 2.27: CD-Spektren der Efrapeptin-Analoga **38**, **39** und **40**, bei denen sich die Positionen der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren im Vergleich zum Naturstoff ändern (Lösungsmittel: TFE).

Die CD-Spektren der Efrapeptin-Analoga **38**, **39** und **40**, bei denen sich die Positionen der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren im Vergleich zum Naturstoff ändern, sind in Bild 2.27 dargestellt. Die CD-Spektren von **38**, **39** und **40** ähneln dem des Naturstoffs **1** mit einer negativen CD-Bande bei einer Wellenlänge von etwa 207 nm, einer Schulter um 230 nm sowie einer positiven CD-Bande um 190 nm.

Die CD-Spektren des Efrapeptin-Analogons **41**, bei dem in den Seitenketten Veränderungen vorgenommen werden, sowie des Analogons **43**, bei dem  $\beta$ -Alanin gegen die helikogene  $\alpha$ -Aminosäure Aib ausgetauscht wird, sind in Bild 2.28 dargestellt.

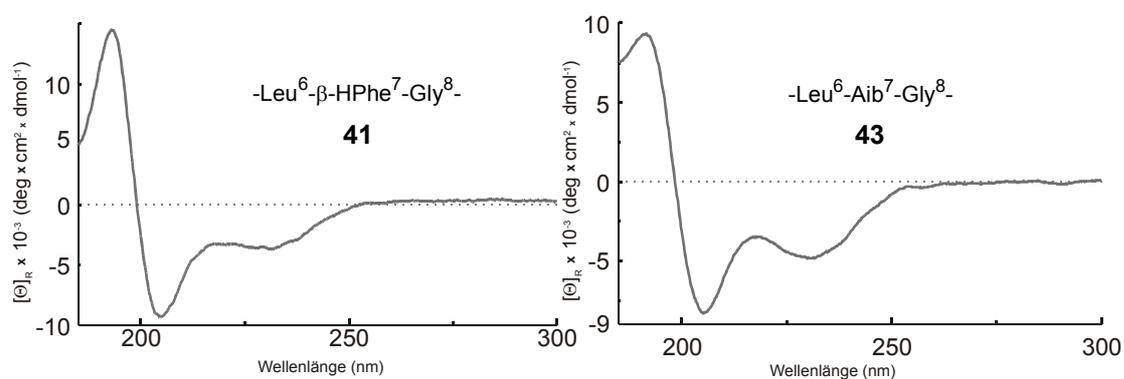


Bild 2.28: CD-Spektrum des Efrapeptin-Analogons **41**, bei dem in den Seitenketten Veränderungen vorgenommen werden, sowie des Analogons **43**, bei dem  $\beta$ -Alanin gegen die helikogene  $\alpha$ -Aminosäure Aib ausgetauscht wird (Lösungsmittel: TFE).

Auch im Falle von **41** und **43** sind die Lagen und Vorzeichen der CD-Banden identisch mit denen im CD-Spektrum von **1**, aber die CD-Effekte sind deutlicher ausgeprägt als bei Efrapeptin C (**1**).

Um den Vergleich der CD-Spektren zu erleichtern, sind in Bild 2.29 und Bild 2.30 die CD-Spektren von **1**, **38** und **40** sowie von **1**, **39**, **41** und **43** übereinandergelegt abgebildet. In allen Fällen sind die CD-Effekte der Analoga stärker als beim Naturstoff **1**. Dies spricht für einen größeren helikalen Sekundärstruktur-Anteil. Das Verhältnis R der Elliptizitäten bei 230 nm und 207 nm liegt bei den Analoga **38**, **39**, **40** und **41**, zwischen 0.2 und 0.5. Daher kann das Vorliegen einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur ausgeschlossen werden. Stattdessen liegen die Moleküle wahrscheinlich hauptsächlich als  $3_{10}$ -Helix vor. Beim Analogon **43**, das keine  $\beta$ -Aminosäure enthält, beträgt das Verhältnis R 0.6, das heißt der Unterschied der Intensitäten der Banden bei 207 und 230 nm wird geringer, sodass nicht mehr eindeutig zwischen einer  $3_{10}$ -Helix und einer  $\alpha$ -Helix unterschieden werden kann.

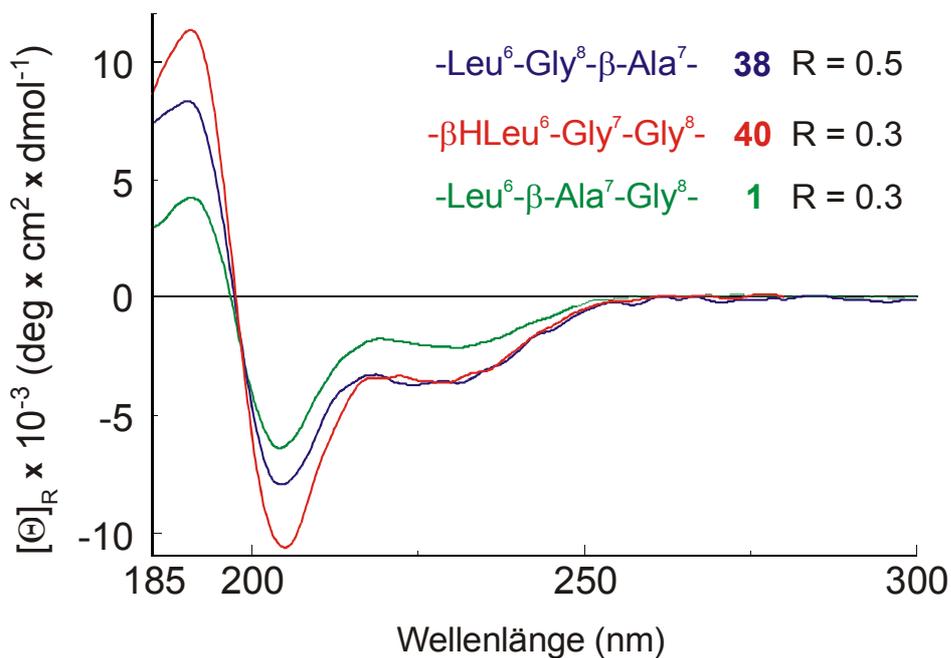


Bild 2.29: Vergleich der CD-Spektren von Efrapeptin C (**1**) und der Efrapeptin-Analoga **38** und **40** (Lösungsmittel: TFE,  $R = [\Theta]_{230}/[\Theta]_{207}$ ).

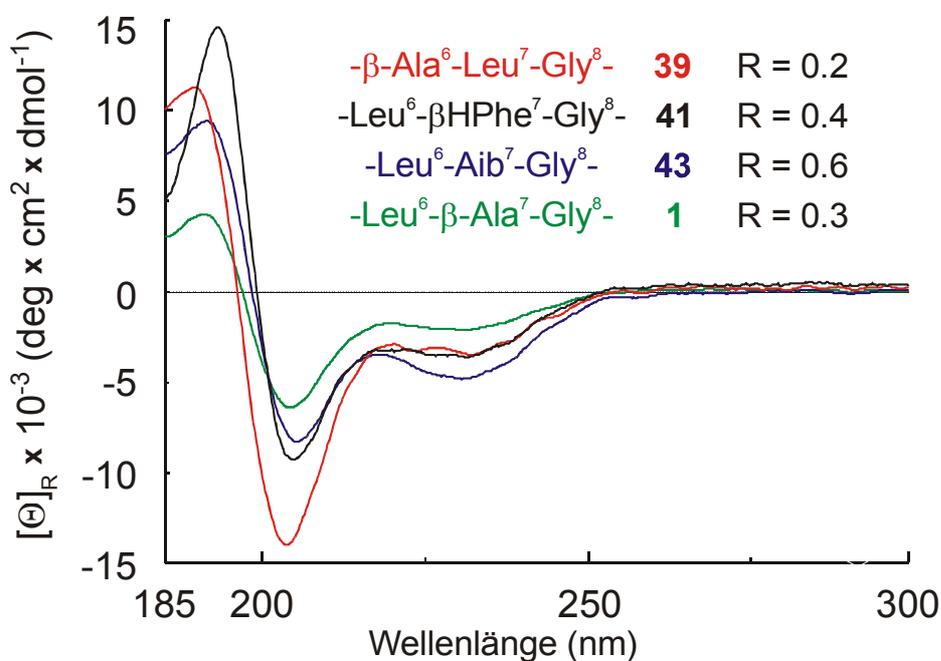


Bild 2.30: Vergleich der CD-Spektren von Efrapeptin C (**1**) und der Efrapeptin-Analoga **39**, **41**, und **43** (Lösungsmittel: TFE,  $R = [\Theta]_{230}/[\Theta]_{207}$ ).

### 2.2.4 Biologische Aktivität von Efrapeptin-Analoga und Efrapeptin-Fragmenten – Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Zur Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden die synthetisierten Efrapeptin-Analoga auf ihre Wirkung als Inhibitoren der  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* untersucht. Die Hemmtests wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Altendorf an der Universität Osnabrück von Dr. Jörg Greie durchgeführt. Das Testsystem ist das gleiche wie in Kapitel 2.1.5 für den biologischen Test des Naturstoffs **1** beschrieben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Bild 2.31 dargestellt.

$-\beta\text{-Ala}^6\text{-Leu}^7\text{-Gly}^8-$ : $K_i = \text{ca. } 0.1 \text{ mM}$ <b>39</b>	$-\text{Leu}^6\text{-}\beta\text{-HPhe}^7\text{-Gly}^8-$ : $K_i = \text{ca. } 0.1 \text{ mM}$ <b>41</b>
$-\beta\text{-HLeu}^6\text{-Gly}^7\text{-Gly}^8-$ : $K_i = \text{ca. } 0.1 \text{ mM}$ <b>40</b>	$-\text{Leu}^6\text{-Aib}^7\text{-Gly}^8-$ : keine Hemmung <b>43</b>
Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Aib-Leu-Aib- $\chi$ : keine Hemmung <b>52</b>	

Bild 2.31: Inhibitorische Wirkung der Efrapeptin-Analoga **39**, **40**, **41**, **42**, **43** und **52** auf  $F_1$ -ATPase aus *E. coli*

Es zeigt sich, dass sich bereits geringe Änderungen in der Teilsequenz  $-\text{Leu}^6\text{-}\beta\text{-Ala}^7\text{-Gly}^8-$  deutlich auf die biologische Aktivität auswirken. Die Analoga **39**, **40** und **41** zeigen zwar noch inhibitorische Wirkung allerdings liegt der  $K_i$ -Wert eine Größenordnung über dem von Efrapeptin C (**1**). Der Ersatz von  $\beta\text{-Ala}^7$  gegen Aib (Analogon **43**) führt zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität. Auch das zentral trankierte Efrapeptin-Analogon **52** zeigt keine inhibitorische Wirkung.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Naturstoff **1** in Bezug auf die inhibitorische Wirkung gegen  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* sehr empfindlich auf Veränderungen in der zentralen Teilsequenz  $-\text{Leu}^6\text{-}\beta\text{-Ala}^7\text{-Gly}^8-$  reagiert. Die Anwesenheit einer  $\beta$ -Aminosäure scheint für die Erhaltung zumindest einer geringen Aktivität unbedingt notwendig zu sein. Auch die Entfernung einer zentralen Teilsequenz (Analogon **52**) führt zum Verlust der biologischen Aktivität.

Im Rahmen des Struktur-basierten Wirkstoffdesigns wurden Methoden entwickelt, um die Stärke und die Art von Protein-Ligand-Wechselwirkungen theoretisch vorherzusagen.<sup>[114]</sup> Als Input für derartige Docking-Studien werden neben der dreidimensionalen

Struktur des Proteins, die meist als rigide betrachtet wird, die Struktur des Liganden, die relative Lage des Liganden zum Protein und die Konformation des Liganden benötigt. Als Output werden Vorschläge für die Struktur des Protein-Ligand-Komplexes sowie Abschätzungen über die Wechselwirkungsenergie und somit den  $K_i$ -Wert eines Enzym-Inhibitors erhalten. Docking Studien der Wechselwirkung von Efrapeptin-Analoga und  $F_1$ -ATPase wurden von Jörg Schröder durchgeführt.<sup>[115]</sup> Hierfür wurde das Programm AutoDock 3.0.5 verwendet.<sup>[116]</sup> Die Koordinaten der mitochondrialen  $F_1$ -ATPase aus Rinderherz wurden aus der von Walker et al.<sup>[74]</sup> publizierten Kristallstruktur des Efrapeptin C- $F_1$ -ATPase-Komplexes entnommen. Zur Vorbereitung der Liganden für das Docking wurde für die Efrapeptin-Analoga zunächst eine Energieminimierung mit dem Tripos-Kraftfeld durchgeführt. Während der Docking-Berechnungen wurden nur die Bindungen der Aminosäuren der zentralen Teilsequenz  $-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-$  als frei drehbar definiert, während die restlichen Molekülteile als rigide vorgegeben wurden. Die Ergebnisse dieser Berechnungen für die hier untersuchten Efrapeptin-Analoga sind in Tabelle 3 zusammen mit den experimentellen Werten für die Inhibierung der  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* dargestellt.

**Tabelle 3:** Vergleich der experimentellen  $K_i$ -Werte von Efrapeptin-Analoga für die Inhibierung der  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* mit  $K_i$ -Werten, die für die Inhibierung der mitochondrialen  $F_1$ -ATPase aus Rinderherz berechnet wurden. Die berechneten Werte wurden Lit<sup>[115]</sup> entnommen.

		berechneter $K_i$ -Wert [M]	experimenteller $K_i$ -Wert [M]
<b>1</b>	$-\text{Leu}^6\text{-}\beta\text{-Ala}^7\text{-Gly}^8-$	$4.1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5}$
<b>38</b>	$-\text{Leu}^6\text{-Gly}^7\text{-}\beta\text{-Ala}^8-$	$1.3 \cdot 10^{-7}$	n. b.
<b>39</b>	$-\beta\text{-Ala}^6\text{-Leu}^7\text{-Gly}^8-$	$2.1 \cdot 10^{-9}$	$\sim 1 \cdot 10^{-4}$
<b>40</b>	$-\beta\text{-HLeu}^6\text{-Gly}^7\text{-Gly}^8-$	$1.1 \cdot 10^{-9}$	$\sim 1 \cdot 10^{-4}$
<b>41</b>	$-\text{Leu}^6\text{-}\beta\text{-HPhe}^7\text{-Gly}^8-$	n. b.	$\sim 1 \cdot 10^{-4}$
<b>43</b>	$-\text{Leu}^6\text{-Aib}^7\text{-Gly}^8-$	$6.8 \cdot 10^{-8}$	keine Hemmung

Durch das Docking kann die sehr hohe Affinität des natürlichen Efrapeptin C (**1**) gegenüber dem mitochondrialen Enzym reproduziert werden. Für die Analoga **39** und **40** werden bei den Berechnungen ähnlich niedrige  $K_i$ -Werte wie für **1** erhalten, für das Analogon **43**, das keine  $\beta$ -Aminosäure enthält, wird eine nur leicht niedrigere Affinität

berechnet. Für das Analogon **38** ergibt die Rechnung einen im Vergleich zu **1** um zwei Zehnerpotenzen niedrigeren  $K_i$ -Wert.

Die Korrelation dieser berechneten Werte mit den experimentell für das Enzym aus *E. coli* bestimmten Werten ist relativ gering. Es war bereits bekannt, dass Efrapeptin gegenüber dem *E. coli*-Enzym im Vergleich zur mitochondrialen  $F_1$ -ATPase ein wesentlich schlechterer Inhibitor ist.<sup>[70 a)]</sup> Die Abweichungen der Hemmwirkungen der Analoga vom Naturstoff werden aber auch relativ gesehen nicht korrekt wiedergegeben. Die Rechnung ergibt, dass die Analoga **39** und **40** geringfügig bessere Inhibitoren als **1** sind. Der Hemmtest mit dem *E. coli*-Enzym ergibt jedoch für **39** und **40** einen etwa zehnfach höheren  $K_i$ -Wert und damit deutlich geringere Hemmwirkung als bei **1**. Beim Analogon **43** wurde experimentell keine Hemmwirkung festgestellt und auch die Rechnung ergibt zumindest einen im Vergleich zu **1** um eine Zehnerpotenz größeren  $K_i$ -Wert. Die relativ großen Abweichungen zwischen Rechnung und Experiment lassen sich vermutlich hauptsächlich auf die bei beiden Studien unterschiedliche Herkunft der Enzyme (*E. coli* bzw. Rinderherz-Mitochondrien) zurückführen.

Auch das N-terminale Fragment **16** und die C-terminale Hälfte **37** von Efrapeptin C (**1**) werden auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht (Bild 2.32).

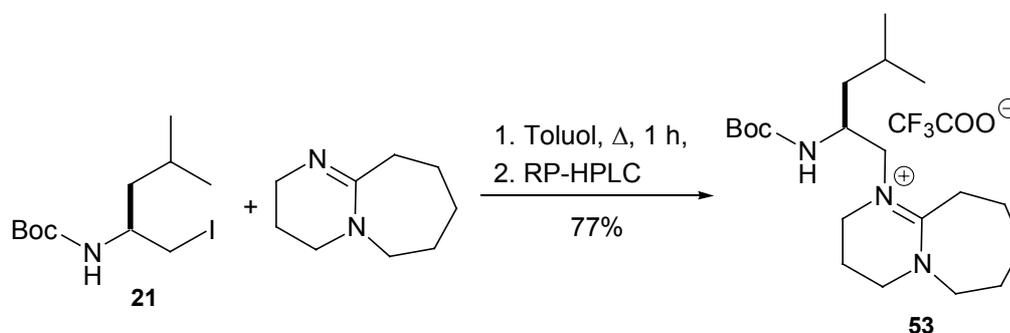
Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Gly-OH :	keine Hemmung
<b>N-terminales Fragment 16</b>	
H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X :	keine Hemmung
<b>C-terminale Hälfte 37</b>	
<b>N-terminales Fragment 16</b> + <b>C-terminale Hälfte 37</b> :	keine Hemmung
<b>1</b> : <b>1</b>	

Bild 2.32: Inhibitorische Wirkung des N-terminalen Fragmentes **16** und der C-terminalen Hälfte **37** von Efrapeptin C (**1**) auf  $F_1$ -ATPase aus *E. coli*

Sie sind jedoch nicht biologisch aktiv. Die gleichzeitige Inkubation des Enzyms mit **16** und **37** führt ebenfalls zu keiner Inhibierung der  $F_1$ -ATPase.

### 2.2.5 Synthese eines von DBU abgeleiteten Analogons der Kopfgruppe der Efrapeptine

Neben den strukturellen Eigenschaften der zentralen Teilsequenz -Leu<sup>6</sup>-β-Ala<sup>7</sup>-Gly<sup>8</sup>- ist auch die Frage von Interesse, welche Bedeutung die von DBN und Leucinol abgeleitete kationische Kopfgruppe insbesondere in Hinblick auf die biologische Aktivität besitzt. Daher sind auch Derivate von Efrapeptin C interessant, bei denen die Kopfgruppe modifiziert wird. Hierfür wird versucht, die Kopfgruppe anstelle von DBN, von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) abzuleiten. Die Synthese des Boc-geschützten Bausteins **53** zum Einbau in das C-terminale Fragment erfolgt analog zur Synthese der natürlich vorkommenden Struktur (Schema 2.44).



Schema 2.44: Synthese des von DBU abgeleiteten Analogons **53** der Kopfgruppe der Efrapeptine

Mit dem Amidiniumsalz **53** steht somit ein Baustein zur Verfügung, der die Synthese von Efrapeptin-Analoga mit modifizierter Kopfgruppe ermöglicht.

### 2.3 Massenspektrometrische Eigenschaften von quartären Amidiniumsalzen

Der genaue Bildungsmechanismus der Ionen beim MALDI-Prozess wird noch nicht vollständig verstanden und es wird eine Vielzahl von Ionisierungsmechanismen diskutiert.<sup>[117, 118]</sup> In den MALDI-TOF-Massenspektren von Verbindungen, die eine quartäre Amidiniumeinheit, wie sie in der Kopfgruppe der Efrapeptide vorkommt, enthalten, werden intensive Signale der Kationen gefunden. Dies bedeutet, dass bereits bei geringen Laserintensitäten und geringen Probenkonzentrationen ein intensives Signal detektiert wird und die in den Spektren von neutralen Verbindungen gewöhnlich immer vorhandenen Signale bei geringen Massen, die von der Matrix erzeugt werden, nicht auftreten. Ein ähnliches Verhalten wird für quartäre Ammonium- und Phosphoniumionen beschrieben. Dieses Verhalten kann ausgenutzt werden, um Peptide, die am N-Terminus durch Einbau eines quartären Phosphoniumions mit einem „charge label“ versehen werden, mit Hilfe der MALDI-PSD-Massenspektrometrie (PSD = post source decay) zu sequenzieren.<sup>[119]</sup>

Beim Vergleich von MALDI-TOF- und ESI-Massenspektren der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen fällt auf, dass in den ESI-Massenspektren in einigen Fällen neben den einfach geladenen Amidiniumionen auch zweifach positiv geladene Alkalimetalladdukte gefunden werden. So enthält z. B. das ESI-Massenspektrum des Efrapeptin-Analogons **43** neben dem Peak des Amidiniumions  $[\text{C}_{81}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+$  bei  $m/z = 1620$  den Peak des „kationisierten Kations“  $[\text{C}_{81}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^{2+}$  bei  $m/z = 822$  (Bild 2.33).

Die Neigung zur Bildung mehrfach geladener Ionen ist bei der Elektrospray-Ionisation relativ stark ausgeprägt. Die MALDI-Methode hingegen erzeugt fast ausschließlich einfach geladene Ionen. Karas et al.<sup>[118]</sup> betiteln ihren Übersichtsartikel aus dem Jahr 2000: „Ionization in MALDI: singly charged molecular ions are the lucky survivors“. Mehrfach geladene Ionen werden beim MALDI-Prozess nur bei sehr großen Analyten, also sehr geringen Ladungsdichten, erzeugt. Außerdem wird hierbei eine deutliche Abhängigkeit von der verwendeten Matrix gefunden. Im MALDI-TOF-Massenspektrum von bovinem Transferrin (78000 Da) ergeben bei Verwendung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) als Matrix die zweifach, dreifach und vierfach protonierten

Pseudomolekülonen die intensivsten Peaks. Bei Verwendung von 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) als Matrix bildet das einfach protonierte Ion den Basispeak und die zwei- und dreifach protonierten Ionen erscheinen nur mit geringer Häufigkeit.<sup>[120]</sup> Bei einigen Anwendungen ist die ausschließliche Bildung einfach geladener Spezies ein deutlicher Vorteil der MALDI-Methode gegenüber der ESI-Methode, da einfacher zu interpretierende Spektren erhalten werden.

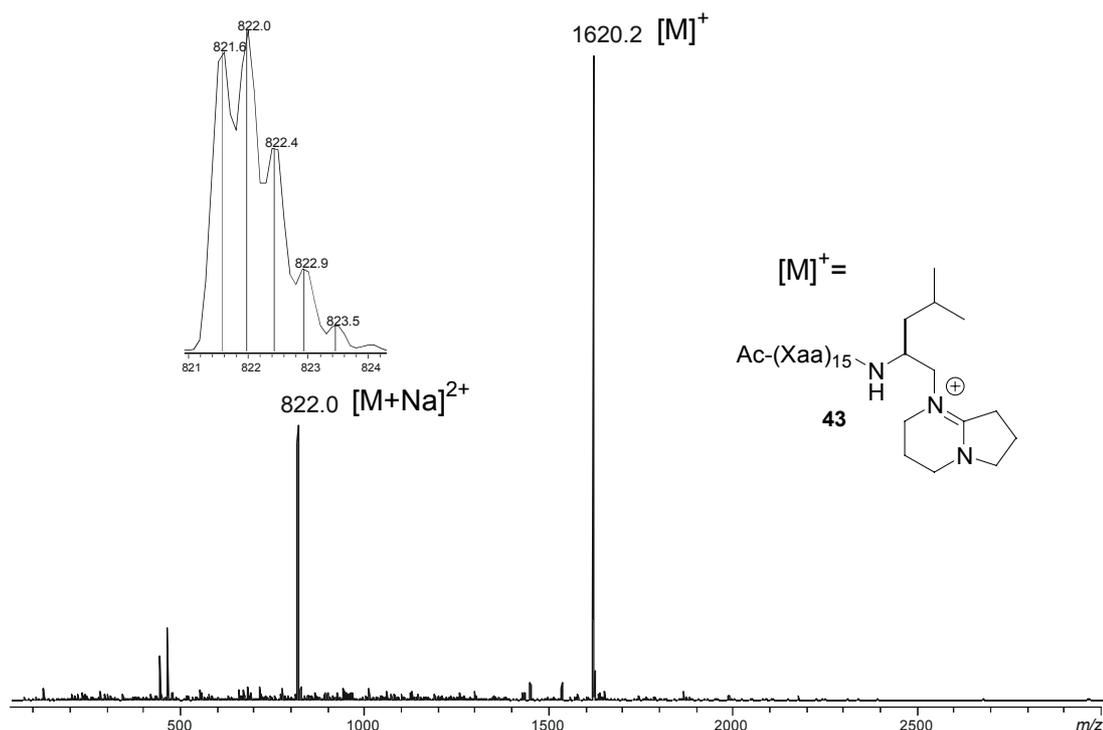
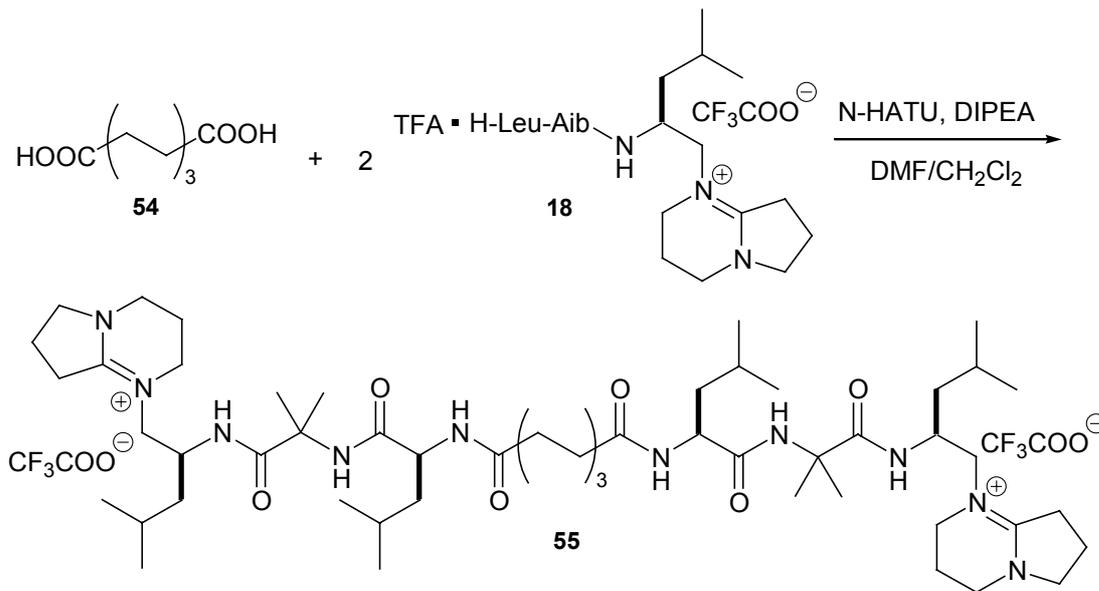


Bild 2.33: ESI-Massenspektrum des Efraeptin-Analogons **43**

Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten quartären Amidiniumsalze stellt sich die Frage, was geschieht, wenn ein Molekül mit zwei oder mehreren kationischen Einheiten dem MALDI- und dem ESI-Prozess unterworfen wird. Um dies zu untersuchen, wird Oktandisäure (**54**, Korksäure) mit dem C-terminalen Fragment **18** von Efraeptin C (**1**) kondensiert. Die Reaktionsbedingungen sind ähnlich wie bei den oben beschriebenen Segmentkondensationen (Schema 2.45).



Schema 2.45: Synthese des Diamidiniumsalzes **55**

Bereits bei der Analyse des Reaktionsgemisches zeigt sich, dass im MALDI-TOF-Massenspektrum auch hier nur einfach geladene Ionen detektiert werden (Bild 2.34).

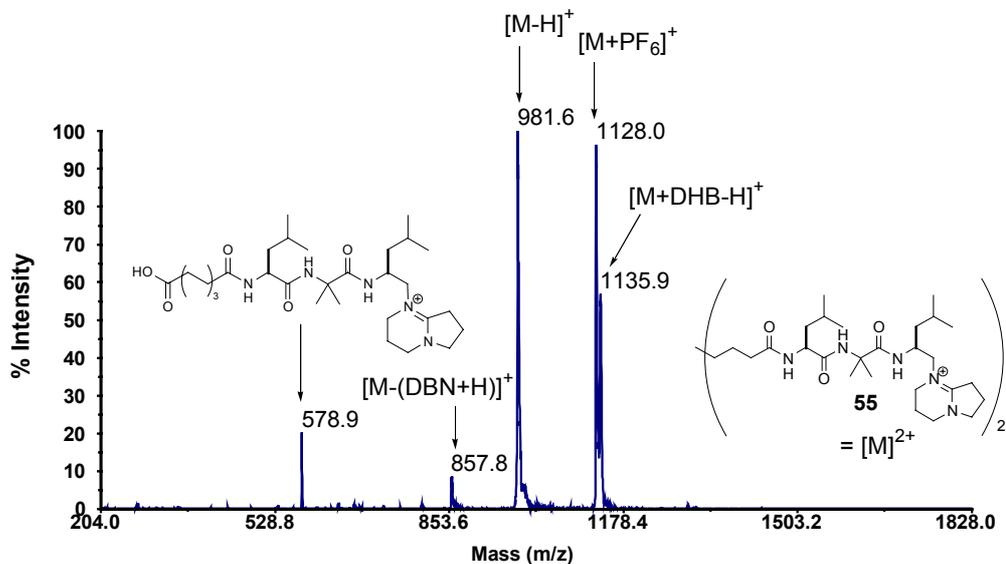
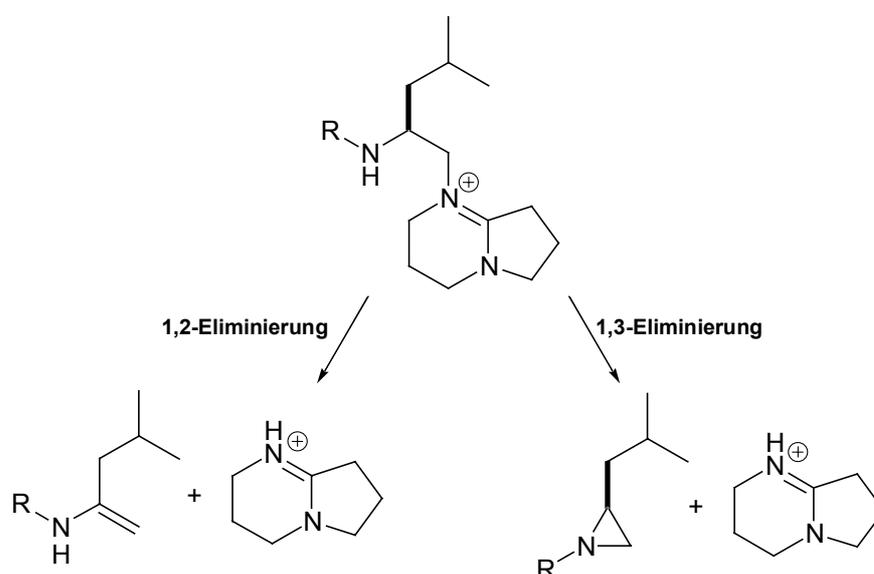


Bild 2.34: MALDI-TOF-Massenspektrum des Reaktionsgemisches der Synthese von **55**

Der einfachste Prozess, der ein Monokation aus einem zweifach geladenen Teilchen liefert, ist die Deprotonierung und so erzeugt das deprotonierte Dikation  $[\text{M}-\text{H}]^+$  den Basispeak. Ein weiterer Prozess, der einfach geladene Ionen erzeugt, ist die Anlagerung eines Gegenions. Auch dies wird im MALDI-TOF-Massenspektrum beobachtet und zwar führt die Anlagerung eines Hexafluorophosphat-Ions zu dem Ion  $[\text{M}+\text{PF}_6]^+$  und

die Anlagerung des Anions der verwendeten sauren Matrix DHB zum Ion  $[M+DHB-H]^+$ . Das  $PF_6^-$ -Ion stammt aus dem verwendeten Kupplungsreagenz N-HATU. Schließlich besteht noch die Möglichkeit der Eliminierung einer kationischen Spezies aus dem Dikation. Im MALDI-TOF-Massenspektrum des Reaktionsgemisches wird dies in Form der Abspaltung von protoniertem DBN beobachtet, was zu dem einfach geladenen Ion  $[M-(DBN+H)]^+$  führt. Hierbei kann es sich entweder um eine 1,2-Eliminierung, die ein Enamin-artiges Produkt liefert oder um eine 1,3-Eliminierung, die ein Aziridin liefert, handeln (Schema 2.46).



Schema 2.46: 1,2- und 1,3-Eliminierung von  $[DBN+H]^+$  aus quartären Amidiniumionen

Im MALDI-TOF-Massenspektrum des Reaktionsgemisches der Synthese von **55** wird außerdem noch mit geringer Häufigkeit das monokationische Nebenprodukt beobachtet, bei dem nur eine Amidiniumeinheit mit Oktandisäure kondensiert wurde.

Bei der Untersuchung des gereinigten Diamidiniumsalzes **55** werden ähnliche Ergebnisse erhalten (Bild 2.35). Allerdings wird der Peak eines  $PF_6^-$ -Adduktes im MALDI-TOF-Massenspektrum nicht mehr gefunden, da diese Anionen bei der Reinigung entfernt werden. Das Signal des Adduktes mit dem DHB-Anion wird zum Basispeak, was darauf hindeutet, dass dessen Bildung stark begünstigt ist.

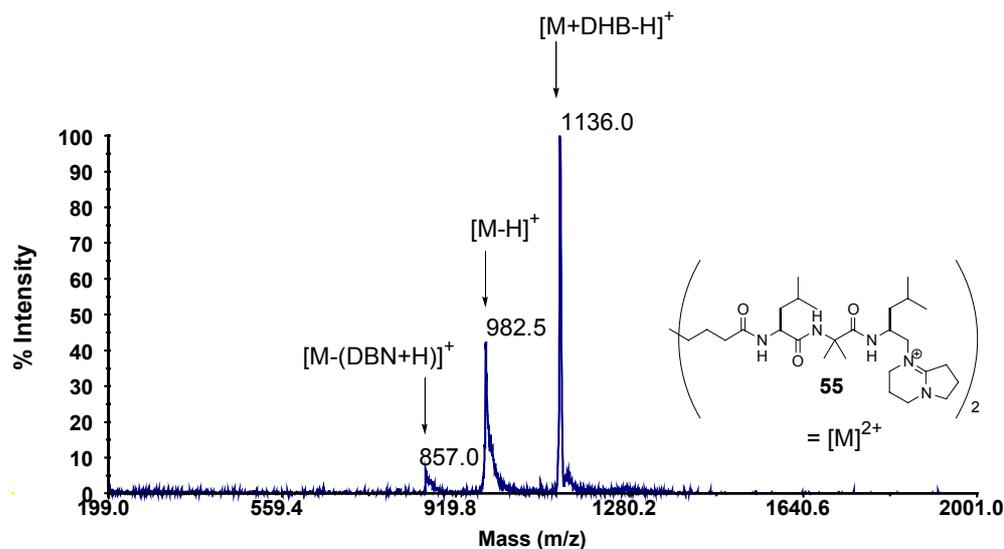


Bild 2.35: MALDI-TOF-Massenspektrum von gereinigtem **55**

Bei Verwendung von CHCA oder 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA) als Matrix wird kein Addukt mit dem Matrix-Anion im MALDI-TOF-Massenspektrum gefunden (Bild 2.36).

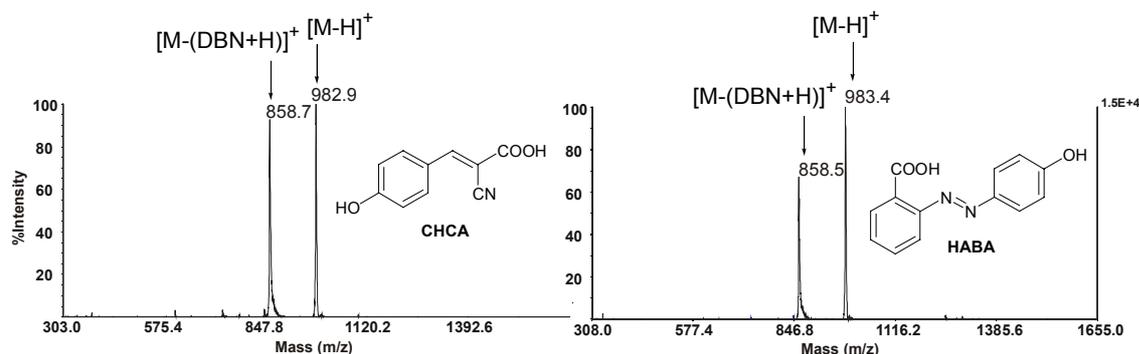


Bild 2.36: MALDI-TOF-Massenspektrum des gereinigten Diamidiniumions **55** unter Verwendung von CHCA und HABA als Matrix

Stattdessen stellt das Signal des deprotonierten Dikations den Basispeak dar und das Signal des Produktes der Eliminierung von  $[\text{DBN}+\text{H}]^+$  wird mit nur wenig geringerer Häufigkeit detektiert. Die Abwesenheit des Adduktes mit dem Matrix-Anion im Falle von CHCA und HABA deutet darauf hin, dass es sich bei der Wechselwirkung mit dem Anion von DHB um eine besonders günstige, spezifische Wechselwirkung handelt. Im ESI-Massenspektrum von gereinigtem **55** ergibt sich ein anderes Bild (Bild 2.37).

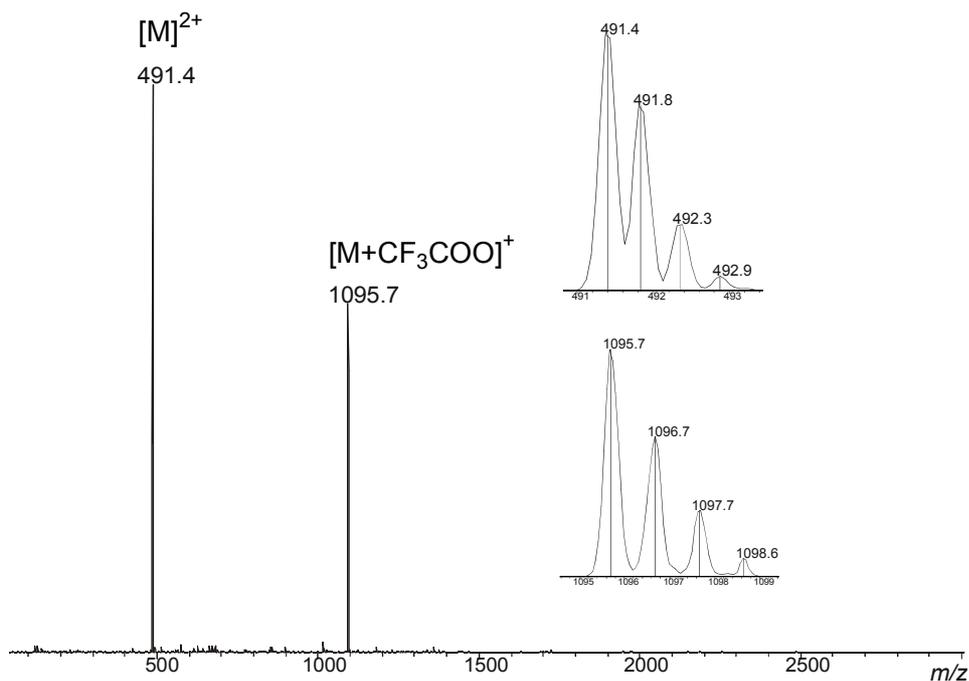
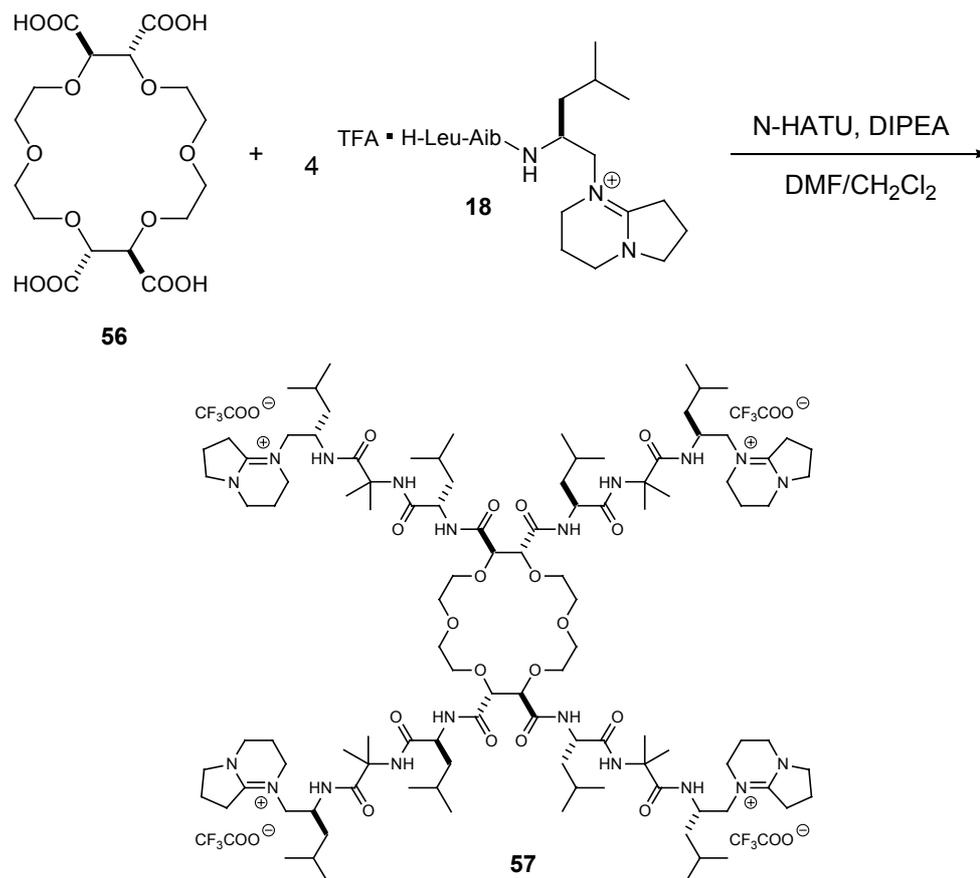


Bild 2.37: ESI-Massenspektrum von gereinigtem **55**

Hier erscheint das Signal des Diamidiniumions als Basispeak. Dass es sich hierbei um ein zweifach geladenes Ion handelt, lässt sich daran erkennen, dass die Isotopenpeaks jeweils eine halbe Masseneinheit voneinander getrennt sind. Daneben wird das Signal des einfach geladenen Adduktes mit Trifluoracetat gefunden.

Um das Verhalten eines Moleküls mit mehreren quartären Amidinium-Einheiten zu untersuchen, wird der von L-(+)-Weinsäure abgeleitete Kronenether **56** mit dem C-terminalen Fragment **18** von Efrapetin C (**1**) unter Bildung des Tetraamidiniumsalzes **57** kondensiert (Schema 2.47).



Schema 2.47: Synthese des Tetraamidiniumsalzes **57**

Bei der Analyse des Reaktionsgemisches durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie werden wiederum nur einfach geladene Spezies detektiert (Bild 2.38). Neben nicht umgesetzteter Aminokomponente wird das dreifach deprotonierte Tetrakation  $[M-3H]^+$  sowie Ionen, bei denen die vierfache Ladung sowohl durch Deprotonierung als auch durch Anlagerung von  $PF_6^-$ -Ionen abgebaut wird. Addukte mit dem Matrix-Anion spielen hier keine Rolle.

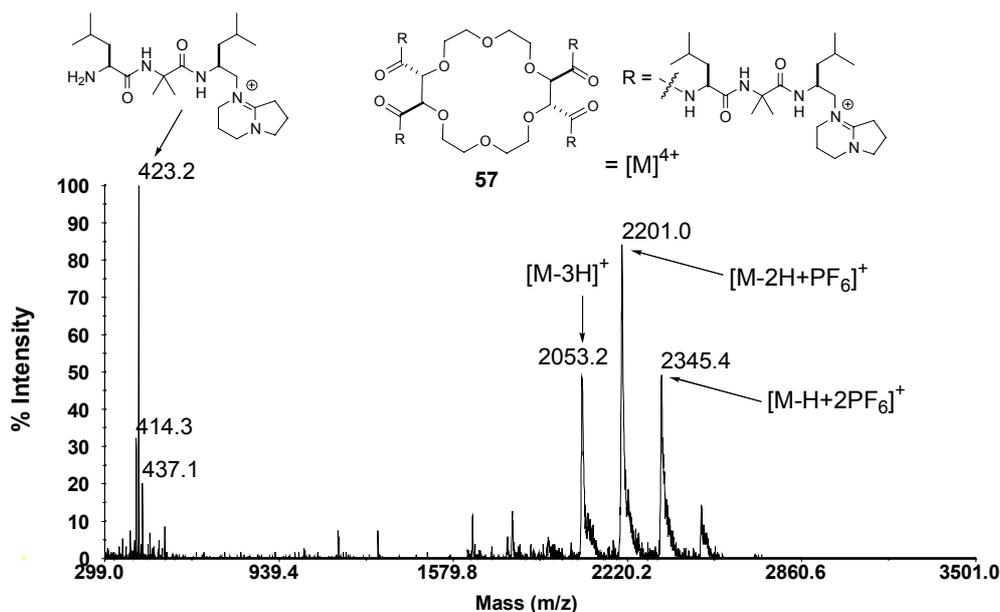


Bild 2.38: MALDI-TOF-Massenspektrum des Reaktionsgemisches der Synthese des Tetraamidiniumsalzes **57**

Wiederum unterscheidet sich das MALDI-TOF-Massenspektrum von gereinigtem **57** (Bild 2.39) aufgrund der Entfernung der  $\text{PF}_6^-$ -Ionen von dem des Reaktionsgemisches. Das dreifach deprotonierte Tetrakation  $[\text{M}-3\text{H}]^+$  erzeugt den Basispeak. Daneben werden Ionen gefunden, bei denen die Ladung sowohl durch Deprotonierung als auch durch Eliminierung von protoniertem DBN oder Anlagerung von Matrix-Anionen abgebaut wird ( $[\text{M}-\text{H}-2(\text{DBN}+\text{H})]^+$ ,  $[\text{M}-2\text{H}-(\text{DBN}+\text{H})]^+$ ,  $[\text{M}-2\text{H}+(\text{DHB}-\text{H})]^+$ ).

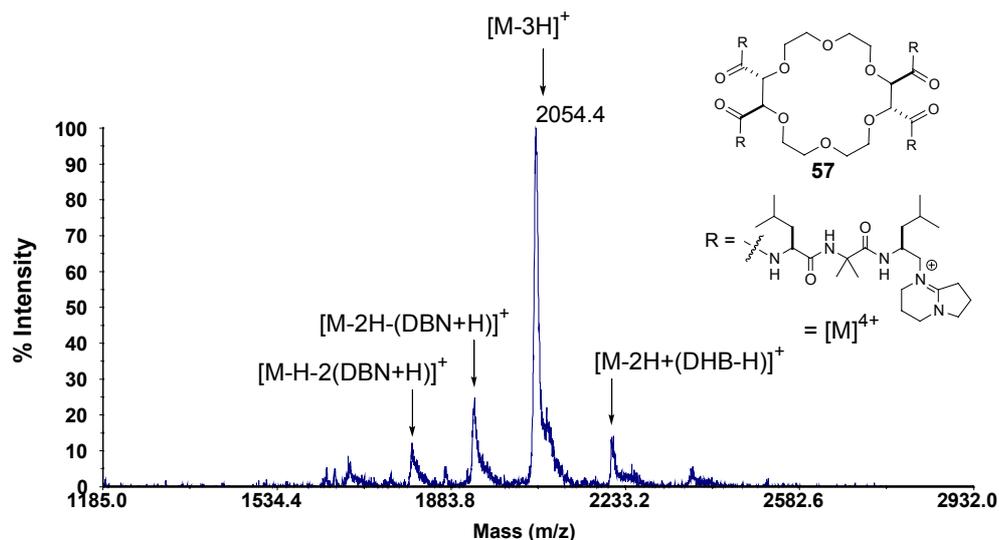


Bild 2.39: MALDI-TOF-Massenspektrum des gereinigten Tetraamidiniumsalzes **57**

Im ESI-Massenspektrum von **57** erscheint das Signal des Tetrakations  $[M]^{4+}$  als Basispeak (Bild 2.40). Daneben wird mit geringer Häufigkeit ein Addukt mit Chlorid-Ionen  $[M+Cl]^{3+}$  und ein Addukt mit Trifluoracetat  $[M+CF_3COO]^{3+}$  gefunden.

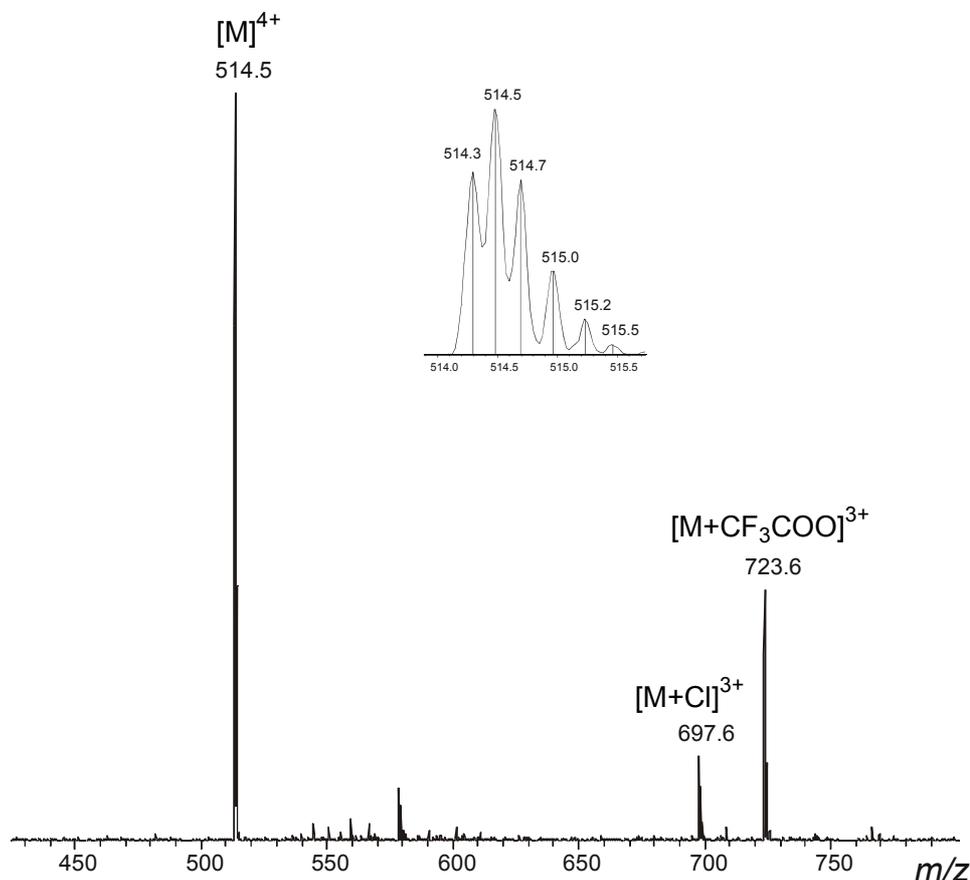
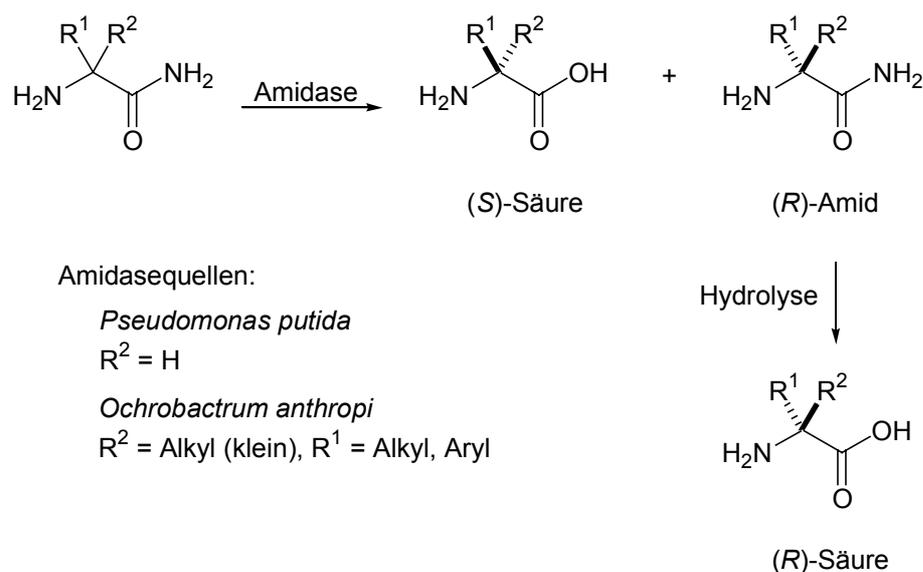


Bild 2.40: ESI-Massenspektrum des Tetraamidiniumsalzes **57**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den MALDI-TOF-Massenspektren der hier untersuchten quartären Amidiniumsalze nur einfach geladene Ionen auftreten. Der Ladungsabbau der Verbindungen, in denen im Molekül mehr als eine quartäre Amidiniumeinheit vorkommt, erfolgt durch Deprotonierung, Anlagerung nichtnukleophiler Anionen (z. B.  $PF_6^-$ ), Anlagerung von Anionen der verwendeten Matrix oder durch Eliminierung von protoniertem DBN. In den ESI-Massenspektren von quartären Amidiniumsalzen hingegen ist das Auftreten mehrfach geladener Ionen weit verbreitet. Sogar in den ESI-Massenspektren von Monoamidiniumionen treten Dikationen auf, die durch Anlagerung von Alkalimetallionen entstehen. Liegen mehrere kationische Einheiten in einem Molekül vor, so wird auch das entsprechende mehrfach geladene Pseudomolekülion  $[M]^{n+}$  im ESI-Massenspektrum gefunden.

## 2.4 Synthese und enzymatische Racematspaltung neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide

Da Peptide, die  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte Aminosäuren enthalten, interessante konformative Eigenschaften besitzen, wurde deren Synthese intensiv untersucht. Unterscheiden sich die beiden Alkylreste am  $\alpha$ -C-Atom, so liegt ein asymmetrisches C-Atom vor und die für die Peptidsynthese benötigten Bausteine sollten in enantiomerenreiner Form zur Verfügung stehen. Eine Übersicht über die stereoselektive Synthese von  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten Aminosäuren geben Cativiela und Diaz-de-Villegas.<sup>[121]</sup> Eine von der Firma DSM entwickelte Methode zur Herstellung enantiomerenreiner  $\alpha,\alpha$ -dialkylierter Aminosäuren ist die enzymatische Racematspaltung von Aminosäureamiden mit Amidasen. Mit dieser Methode lässt sich eine große Anzahl von  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten aber auch  $\alpha$ -monoalkylierten Substraten stereoselektiv hydrolysieren (Schema 2.48).<sup>[122]</sup>

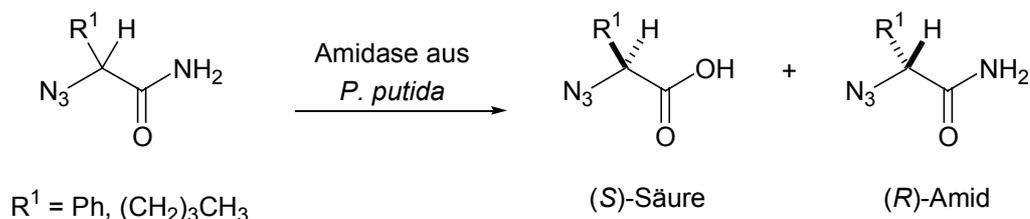


Schema 2.48: Von der Firma DSM entwickelte Enzymatische Racematspaltung von Aminocarboxamiden

Die erhaltene (S)-Säure und das (R)-Amid lassen sich voneinander trennen und anschließend kann das (R)-Amid mit Hilfe einer unspezifischen Amidase hydrolysiert werden, sodass beide Enantiomere der Aminosäuren in reiner Form gewonnen werden. Im Falle von  $\alpha$ -H-Aminosäureamiden wird eine Aminosäureamidase aus *Pseudomonas putida* verwendet, während für  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte Substrate ein Amidase-Enzym aus *Ochrobactrum anthropi* verwendet wird. Eine Isolierung und Reinigung der Amidasen

ist nicht nötig, sondern es werden ganze Zellen der Mikroorganismen eingesetzt. Beide Enzyme werden für industrielle Synthesen von enantiomerenreinen  $\alpha$ -H- und  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten Aminosäuren verwendet.

Kürzlich hat die Arbeitsgruppe von Meldal zusammen mit Forschern der Firma DSM gezeigt, dass sich mit der Amidase aus *Pseudomonas putida* auch  $\alpha$ -H-Azidocarboxamide stereoselektiv hydrolysieren lassen (Schema 2.49).<sup>[123]</sup>

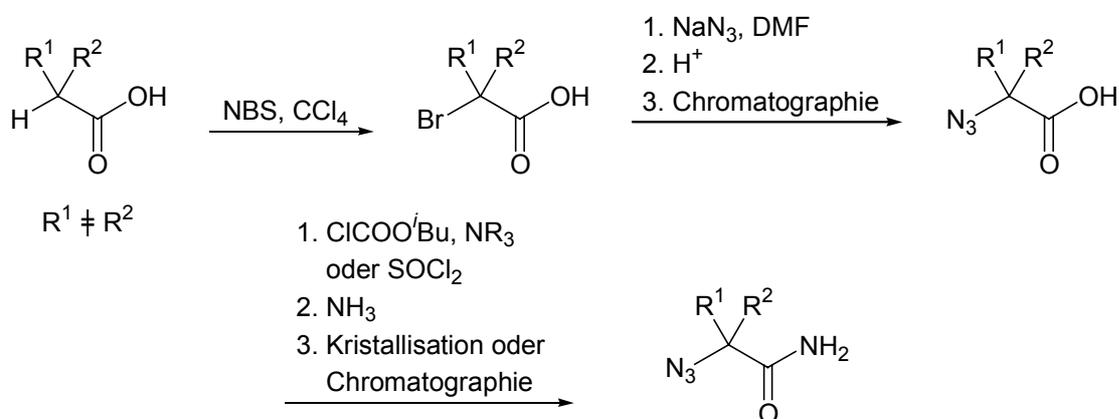


Schema 2.49: Enzymatische Racematspaltung von  $\alpha$ -H-Azidocarboxamiden<sup>[123]</sup>

Die Racematspaltung der Azidocarboxamide wird nicht mit ganzen Zellen von *P. putida* durchgeführt. Stattdessen wird ein genetisch veränderter *Escherichia coli*-Stamm verwendet, der das Gen der Amidase aus *P. putida* überexprimiert.<sup>[124]</sup> Die Amidase-Aktivität dieser *E. coli*-Zellen ist mehr als 25 mal größer als die des *P. putida* Wildtyps.

### 2.4.1 Synthese neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide

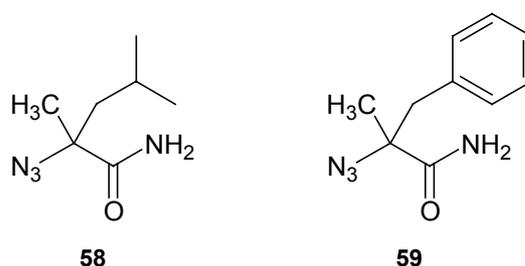
Meldal et al.<sup>[48, 123]</sup> synthetisieren  $\alpha$ -Azidocarboxamide ausgehend von den entsprechenden monofunktionalisierten Carbonsäuren durch Bromierung in  $\alpha$ -Stellung zur Carboxylfunktion, nukleophile Substitution mit Natriumazid und Überführung der Carboxylgruppe in eine Carboxamidgruppe.



Schema 2.50: Synthese von  $\alpha$ -Azidocarboxamiden nach Meldal et al.<sup>[48, 123]</sup>

Dieser Syntheseweg beinhaltet mehrere chromatographische Schritte und in einigen Fällen werden Reaktionszeiten von mehreren Tagen benötigt. Bei der Einführung der Azidofunktion durch nukleophile Substitution an der freien  $\alpha$ -Bromosäure muss vor der Extraktion des Produktes aus dem Reaktionsgemisch angesäuert werden, wobei überschüssige Azidionen protoniert werden und dadurch die explosive und hochgiftige Stickstoffwasserstoffsäure frei wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wird in Kooperation mit Forschern der Firma DSM zum ersten Mal die enzymatische Racematspaltung von  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten  $\alpha$ -Azidocarboxamiden untersucht. Da die oben beschriebene Synthese der benötigten Substrate nach Meldal et al. einige Nachteile aufweist, soll hier ein effizienteres Verfahren entwickelt werden, das sich auch für eine Synthese in größerem Maßstab eignet. Es werden zunächst zwei Substrate synthetisiert und getestet (Schema 2.51), nämlich die Verbindung mit einer Methyl- und einer *iso*-Butyl-Gruppe am  $\alpha$ -C-Atom (2-Azido-2,4-dimethylpentansäurecarboxamid **58**) und die Verbindung mit einer Methyl- und einer Benzyl-Gruppe am  $\alpha$ -C-Atom (2-Azido-2-benzylpropionsäurecarboxamid **59**).



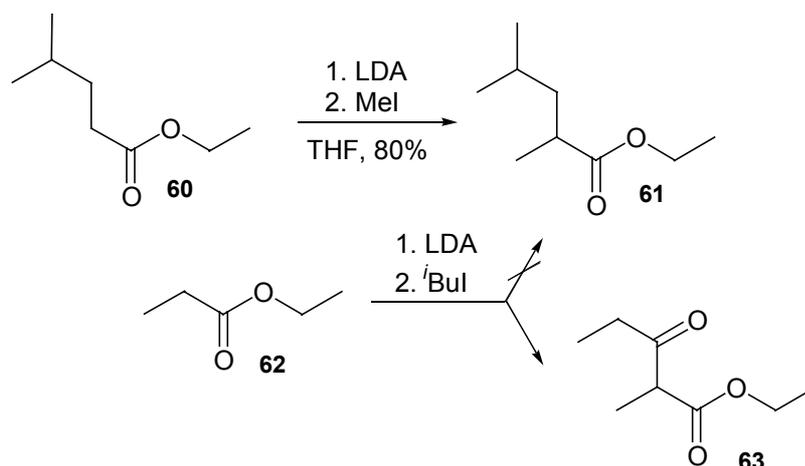
Schema 2.51: Substrate **58** und **59** für die enzymatische Racematspaltung

Als Enzym wird eine Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* verwendet, die auch bei den entsprechenden Aminosäurecarboxamiden zum Einsatz kommt.

Die Synthese der als Substrate für die enzymatische Racematspaltung benötigten Bausteine **58** und **59** erfolgt ausgehend von Carbonsäureethylestern, die am  $\alpha$ -C-Atom nur einen Substituenten tragen. Zunächst wird durch  $\alpha$ -Alkylierung ein zweiter Substituent am  $\alpha$ -C-Atom eingeführt und anschließend wird in der  $\alpha$ -Position ein Bromo-Rest eingeführt, der dann durch nukleophile Substitution gegen einen Azido-Rest ausgetauscht wird.

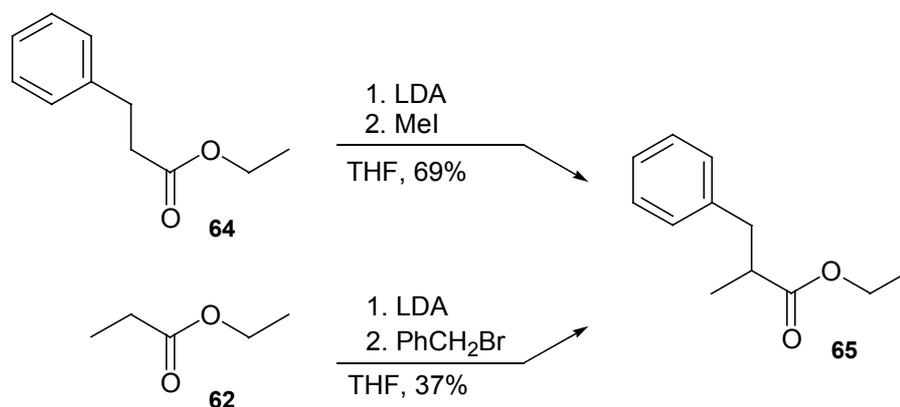
Für die Synthese des  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -<sup>i</sup>Bu-Substrates **58** wird zunächst das Enolat von 4-Methylpentansäureethylester (**60**) mit Iodmethan alkyliert und das Produkt wird in

80% Ausbeute isoliert (Schema 2.52). Beim Versuch, das Lithium-Enolat von Propionsäureethylester mit Iodisobutan zu alkylieren wird hingegen nur das Produkt der Esterkondensation isoliert. Wahrscheinlich gelingt diese Reaktion nur bei Anwesenheit von Additiven wie Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPTA) oder Dimethyltetrahydro-pyrimidinon (DMPU).



Schema 2.52: Synthese von 2,4-Dimethylpentansäureethylester (**61**)

Für die Synthese des  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -benzyl-Substrates kann zunächst entweder das Enolat von Propionsäureethylester (**62**) mit Benzylbromid alkyliert werden oder das Enolat von 3-Phenylpropionsäureethylester (**60**) wird mit Iodmethan alkyliert. Marschall et al.<sup>[125]</sup> beschreiben die Alkylierung von Propionsäureethylester mit Benzylchlorid und Natriumhydrid als Base in Dioxan mit 46% Ausbeute.



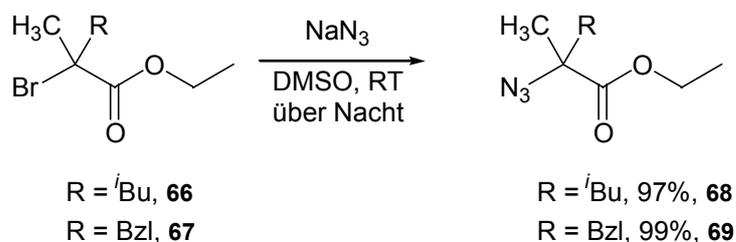
Schema 2.53: Synthese von 2-Benzylpropionsäureethylester (**65**)



olats zur Iodquelle getropft werden, da bei gleichzeitigem Vorliegen des Iodids und des Enolats diese miteinander reagieren können.

Die erfolgreiche Substitution des C $^{\alpha}$ -H-Atoms lässt sich im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **66** und **67** daran erkennen, dass die Signale der an das  $\alpha$ -C-Atom gebundenen Methylgruppen als Singulets bei 1.93 ppm (Verbindung **66**) bzw. 1.82 ppm (Verbindung **67**) erscheinen. Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum führt die Reaktion dazu, dass im Vergleich zu **61** und **65** aus einem Methin-C-Atom ein quartäres C-Atom bei 61.1 ppm (Verbindung **66**) bzw. 60.2 ppm (Verbindung **67**) wird, was mit Hilfe des DEPT-Experimentes nachgewiesen werden kann.

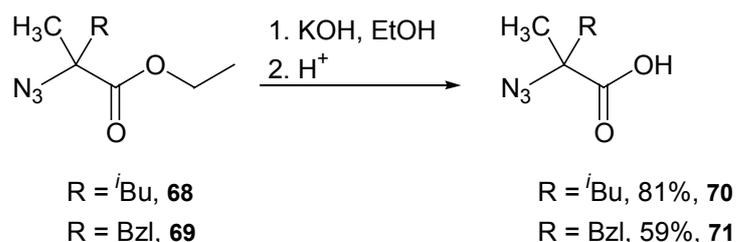
Die Reaktion der Bromide **66** und **67** mit Natriumazid in DMSO liefert die entsprechenden  $\alpha$ -Azidoester **68** und **69** (Schema 2.56).



Schema 2.56: Überführung der Bromoester in Azidoester durch nukleophile Substitution

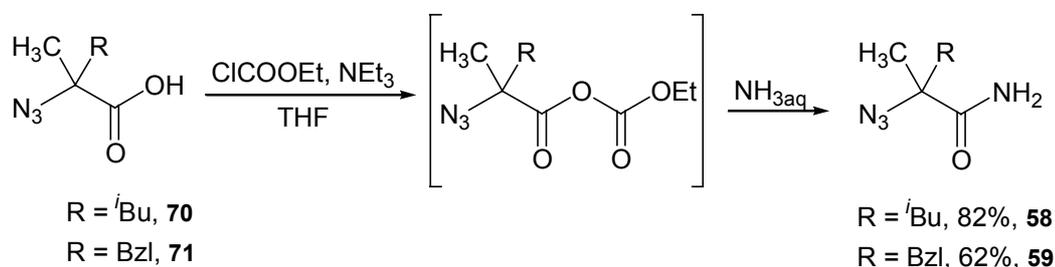
Die Produkte lassen sich nach Zugabe von Wasser durch einfache Extraktion mit Ether isolieren. Die Rohprodukte liegen in hoher Reinheit vor und werden ohne Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt. Die Einführung der Azidogruppe führt im FT-IR-Spektrum von **68** und **69** zu einer intensiven Absorptionsbande bei 2116 bzw. 2114  $\text{cm}^{-1}$ .

Auch die Esterspaltung von **68** und **69** gelingt problemlos unter Standardbedingungen, wie sie bereits 1955 von Huber für die Überführung von Ethyl- $\alpha$ -azidoalkanoaten in  $\alpha$ -Azidoalkansäuren beschrieben wurden (Schema 2.57).<sup>[128]</sup>



Schema 2.57: Überführung der  $\alpha$ -Azidoester **68** und **69** in die entsprechenden  $\alpha$ -Azidosäuren **70** und **71**

Für die Synthese der Azidocarboxamide aus den Azidosäuren werden diese zunächst mit Chlorkohlensäureethylester zu gemischten Anhydriden umgesetzt, welche dann mit Ammoniak zu den Carboxamiden reagieren (Schema 2.58).



Schema 2.58: Synthese der Azidocarboxamide **58** und **59** aus den Azidocarbonsäuren **70** und **71**

Die Azidocarboxamide **58** und **59** sind kristalline Verbindungen, die durch einfaches Umkristallisieren in analytisch reiner Form erhalten werden. In den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren treten jeweils zwei breite Singulets bei tiefem Feld auf, die den Amid-Protonen zugeordnet werden können. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **58** (Bild 2.42) liegen die Signale der drei Methylgruppen und des Methin-C-Atoms sehr dicht beieinander (23.3, 23.6, 24.5, 24.9 ppm), können aber mit Hilfe des C,H-COSY-Experimentes leicht zugeordnet werden.

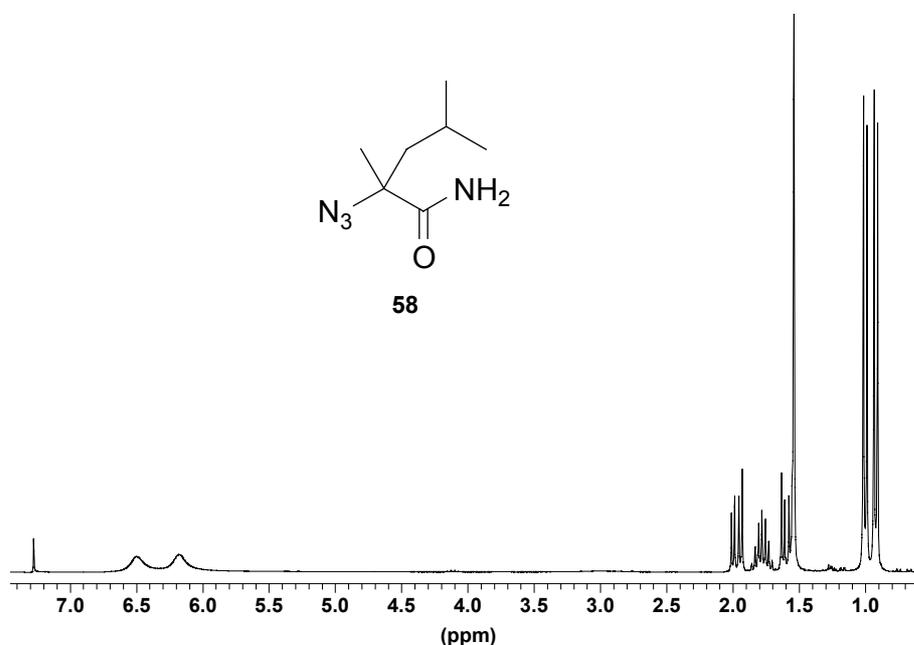


Bild 2.41:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **58** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

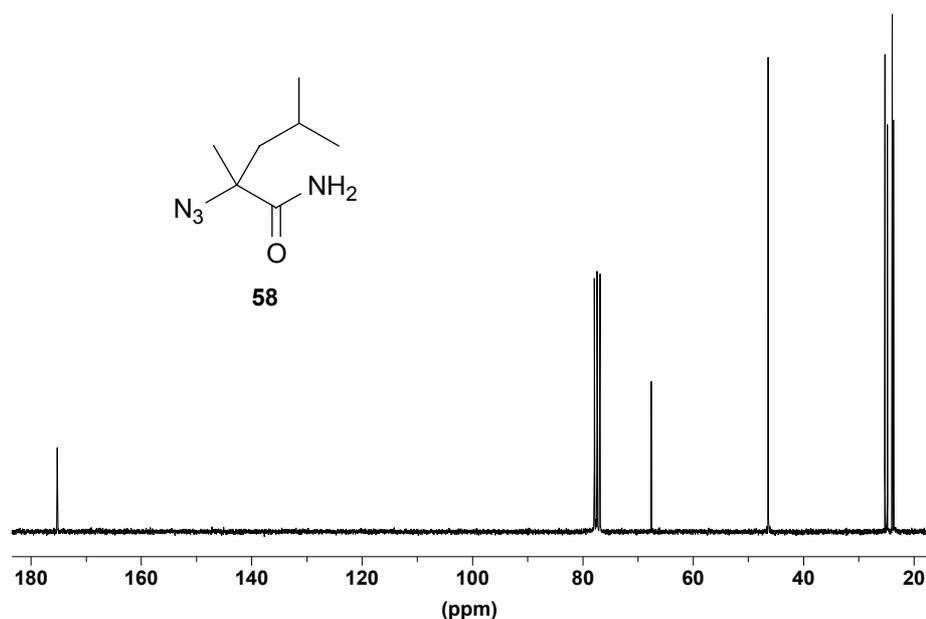
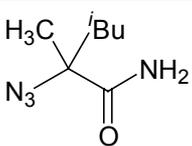
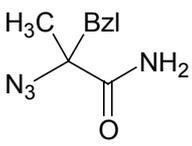
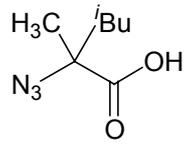
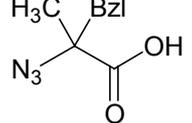


Bild 2.42:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **58** (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Nach dem oben beschriebenen Verfahren lassen sich innerhalb weniger Tage im Forschungslabor Grammengen der als Substrate für die enzymatische Racematspaltung benötigten  $\alpha$ -Azidocarboxamide in racemischer Form herstellen.

Einige organische Azidoverbindungen, besonders niedermolekulare Azide, sind explosiv.<sup>[129]</sup> Allerdings besagt die sogenannte „Sechserregel“, dass sechs Kohlenstoffatome pro energiereicher funktioneller Gruppe (wie Azido, Diazo oder Nitro) die Zersetzungseigung soweit abmildern, dass die Verbindung relativ gefahrlos gehandhabt werden kann.<sup>[130]</sup> Diese Regel trifft auf die  $\alpha$ -Azidocarboxamide **58** und **59** sowie die  $\alpha$ -Azidocarbonsäuren **70** und **71** zu. Um zu ermitteln, ob diese Verbindungen auch in größeren Mengen sicher gehandhabt werden können, wurden von Eric van der Vegte bei der Firma DSM DDK-Messungen (DDK = Dynamische Differentialkalorimetrie, engl.: DSC = Differential Scanning Calorimetry) durchgeführt. Bei der Dynamischen Differentialkalorimetrie werden die zu untersuchende Probe (mit Substanz befüllter Tiegel) und eine Referenz (leerer Tiegel) nach einem vorgegebenen Temperaturprogramm aufgeheizt. Die Heizleistungen zur Referenz und zur Probe werden so geregelt, dass beide immer die gleiche, durch das Temperaturprogramm vorgegebene Temperatur besitzen.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der DDK-Messungen der Firma DSM von **58**, **59**, **70** und **71**. Die Messungen wurden in Hochdruck-Stahlriegeln in einer Luftatmosphäre durchgeführt.

	Smp. [°C]	T <sub>Zers</sub> [°C]	ΔH <sub>Zers</sub> [J·g <sup>-1</sup> ]
<b>58</b> 	69	90	-1110
<b>59</b> 	100	117	-2370
<b>70</b> 	—	85	-1140
<b>71</b> 	—	121	-1510

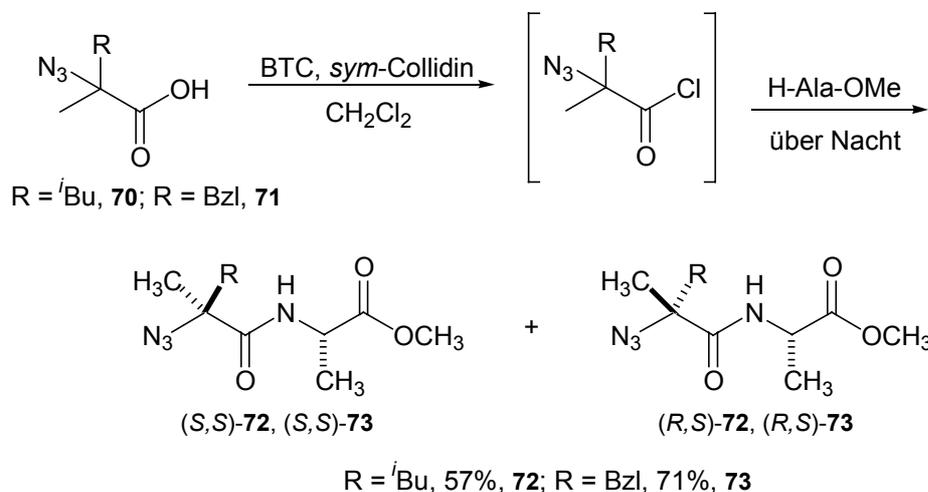
Smp.: Schmelzpunkt; T<sub>Zers</sub>: Zersetzungstemperatur; ΔH<sub>Zers</sub>: Zersetzungsenthalpie

Finden in der Probe mit Enthalpieänderungen verbundene Prozesse statt (z. B. Phasenübergänge), so werden unterschiedliche Heizleistungen zur Probe und zur Referenz gemessen. Die Differenz der Heizleistungen zur Probe und zur Referenz wird in einem sogenannten „Thermogramm“ gegen die Temperatur aufgetragen. Mit Enthalpieänderungen verbundene Prozesse können anhand eines Peaks im Thermogramm identifiziert werden. Aus der Lage des Peaks auf der Abszisse kann die Temperatur bestimmt werden, bei der der Phasenübergang stattfindet und aus der Fläche unter der Kurve kann die Übergangsenthalpie bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Die α-Azidocarboxamide **58** und **59** beginnen sich jeweils etwa 20°C oberhalb des Schmelzpunktes zu zersetzen und auch die beiden α-Azidocarbonsäuren **70** und **71** zersetzen sich in einem Temperaturbereich um 100°C. Die bei der Zersetzung freigesetzten Wärmemengen sind sehr groß. Geht man von einem für organische Verbindungen typischen Wert für die Wärmekapazität von 2 J·g<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> aus, so beträgt die mit der Zersetzung einhergehende Temperaturerhöhung unter adiabatischen Bedingungen 500-1000°C. Dies bedeutet bei gleichzeitiger Stickstoff-Entwicklung eine Explosion. Die Zersetzung der α-Azidocarbonsäuren **70** und **71** findet sehr plötzlich statt, was für einen



Bessere Ausbeuten lassen sich durch Anwendung der Triphosgen-Methode erzielen (Schema 2.60).



Schema 2.60: Synthese der diastereomeren Dipeptide (S,S)-**72**, (S,S)-**73** und (R,S)-**72**, (R,S)-**73** nach der Triphosgen-Methode

In den NMR-Spektren der Diastereomerengemische treten jeweils doppelte Signalsätze auf. In den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von **72** (Bild 2.43 und Bild 2.44) fallen lediglich die Signale der C<sup>α</sup>-CH<sub>3</sub>-Gruppen bei 1.53 ppm bzw. die Signale der Methylen-C-Atome bei 46.14 ppm zusammen. Bei **73** fallen nur die Signale eines der aromatischen Methin-C-Atome im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zusammen.

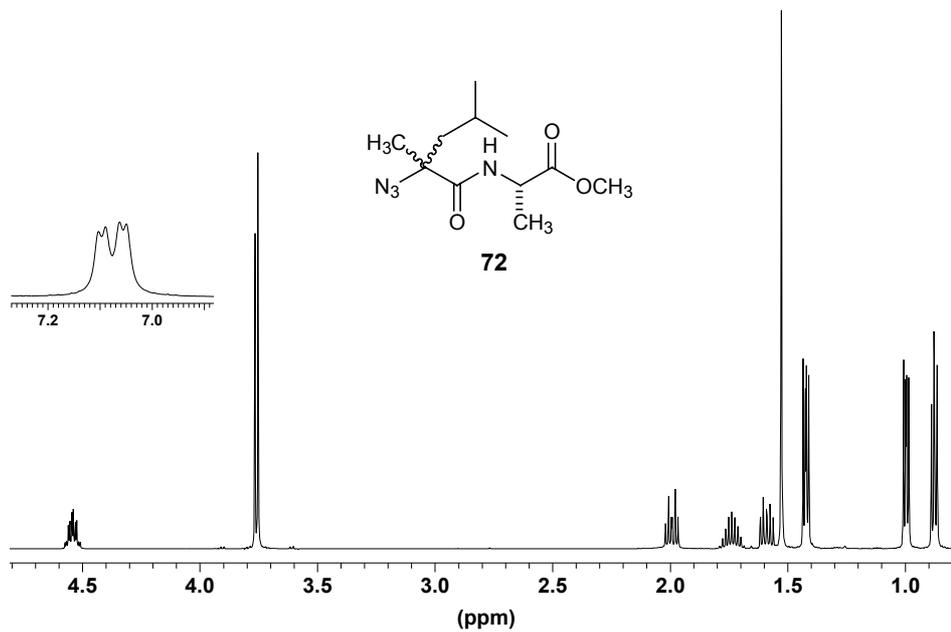


Bild 2.43:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Diastereomergemisches (*S,S*)-**72** und (*R,S*)-**72** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

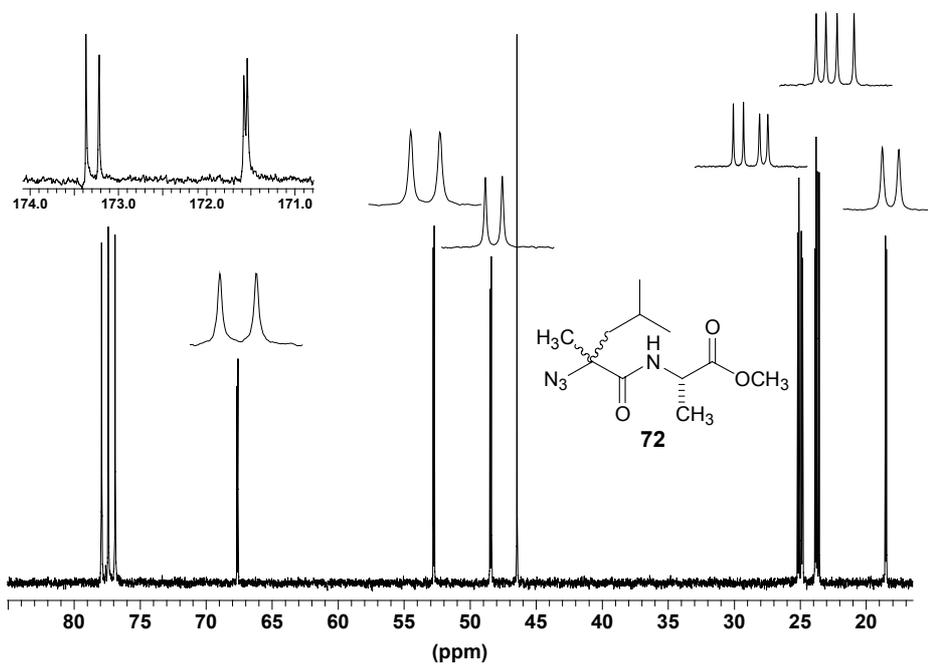
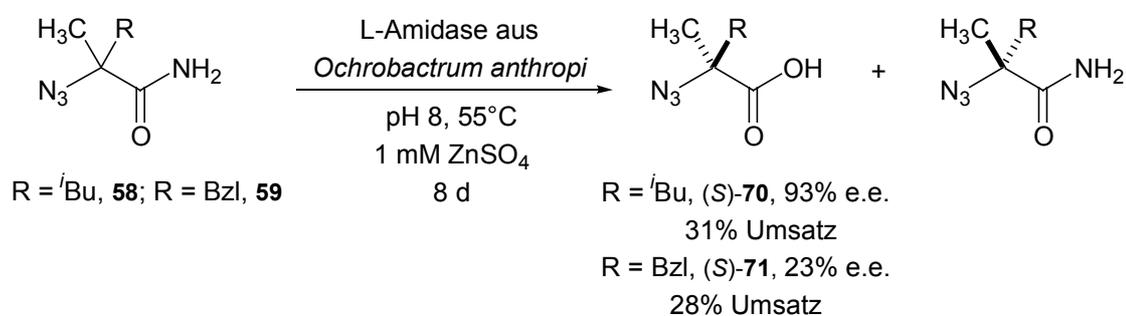


Bild 2.44:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Diastereomergemisches (*S,S*)-**72** und (*R,S*)-**72** (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

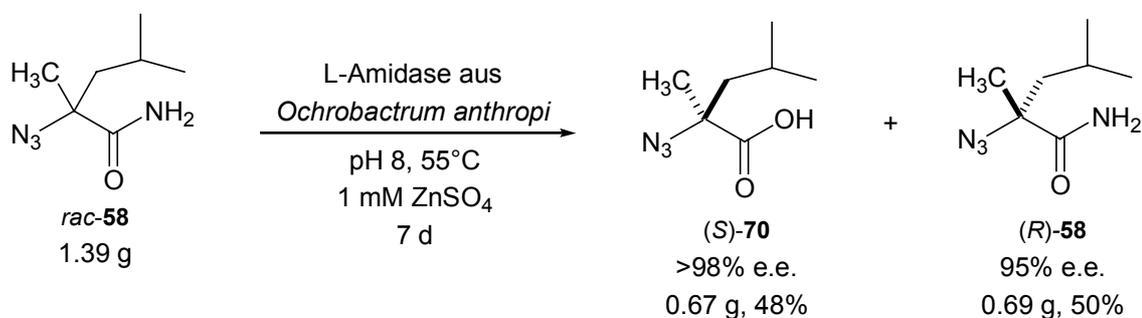
### 2.4.2 Enzymatische Racematspaltung neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide

Die enzymatischen Racematspaltungen und die in diesem Kapitel beschriebenen HPL-chromatografischen Analysen wurden bei der Firma DSM von Dr. Theo Sonke, Math Boesten, Dr. Bernard Kaptein und Ilse Maes durchgeführt. Um die enzymatische Racematspaltung der neuen  $\alpha$ -Azidocarboxamide **58** und **59** zu untersuchen, werden zunächst Experimente im analytischen Maßstab durchgeführt. Der Reaktionsverlauf und die stereochemische Zusammensetzung der Produkte werden durch HPLC an chiraler stationärer Phase untersucht (Schema 2.61).



Schema 2.61: Enzymatische Racematspaltung von **58** und **59** im analytischen Maßstab

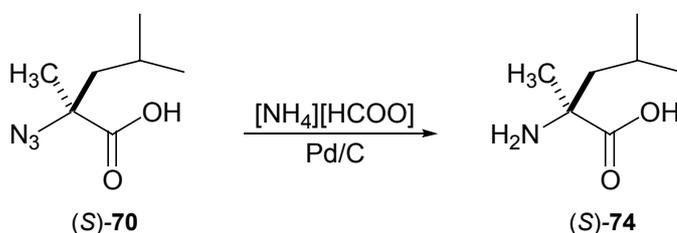
Die Substrate werden bei 55°C und pH 8 mit einer L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 inkubiert. Da sich die Azidosäureamide relativ stark von den natürlichen Substraten des Enzyms unterscheiden, ist die enzymatische Aktivität sehr gering. Auch die geringe Löslichkeit der Substrate wirkt sich nachteilig auf die Reaktion aus. Im Falle des Substrates **59** mit Benzyl-Seitenkette ist die Stereoselektivität recht niedrig.



Schema 2.62: Enzymatische Racematspaltung von **58** im präparativen Maßstab

Beim Substrat mit *iso*-Butyl-Seitenkette **58** ist die Enzymaktivität zwar auch gering, aber die Stereoselektivität ist vielversprechend.

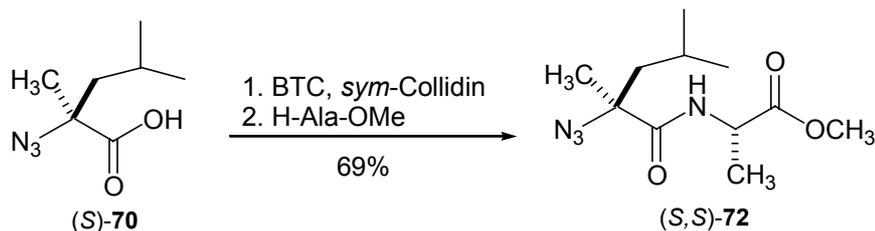
Die enzymatische Racematspaltung des Methyl-*iso*-butyl-azidosäureamides **58** gelingt auch im präparativen Maßstab. Die enzymatische Aktivität ist so gering, dass für das Erreichen eines Umsatzes nahe 50% eine Reaktionszeit von sieben Tagen notwendig ist. Hierbei wird im Vergleich zur Racematspaltung des entsprechenden Aminocarboxamides etwa die zweitausendfache Menge an Enzym eingesetzt. Der Enantiomerenüberschuss der Azidosäure (*S*)-**70** wird durch HPLC an chiraler stationärer Phase nach katalytischer Transferhydrierung zur Aminosäure **74** (Schema 2.63) bestimmt.<sup>[131]</sup>



Schema 2.63: Katalytische Transferhydrierung von (*S*)-**70**<sup>[131]</sup>

Durch Vergleich der chromatographischen Eigenschaften von (*S*)-**74** mit authentischen Proben wird auch die absolute Konfiguration von (*S*)-**70** bewiesen.

Durch Kupplung der enantiomerenreinen Azidosäure (*S*)-**70** mit L-Alaninmethylester nach der oben für das Racemat beschriebenen Methode liefert das Dipeptid (*S,S*)-**72** in diastereomerenreiner Form.



Schema 2.64: Synthese des diastereomerenreinen Dipeptids (*S,S*)-**72**

In den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von (*S,S*)-**72** (Bild 2.45 und Bild 2.46) lassen sich keine Hinweise auf das Vorliegen von Resten des *R,S*-Diastereomers finden, was die Enantiomerenreinheit von (*S*)-**70** bestätigt.

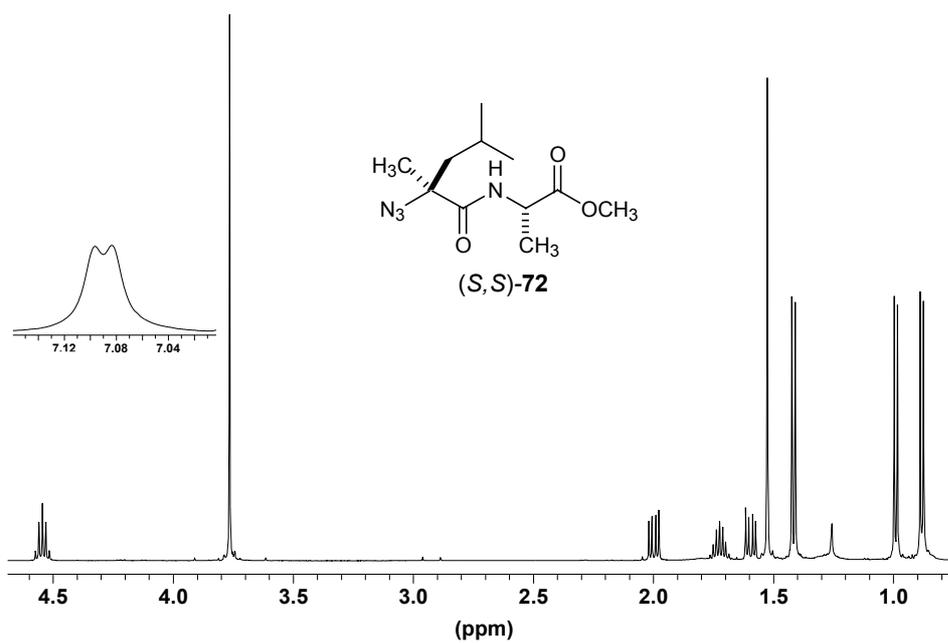


Bild 2.45:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $(S,S)$ -72 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

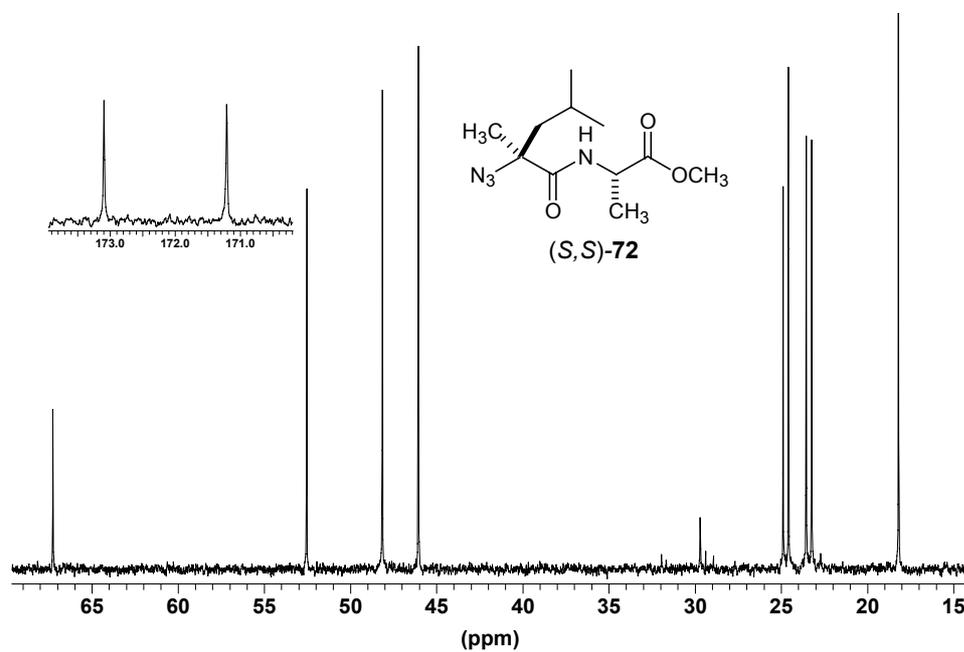
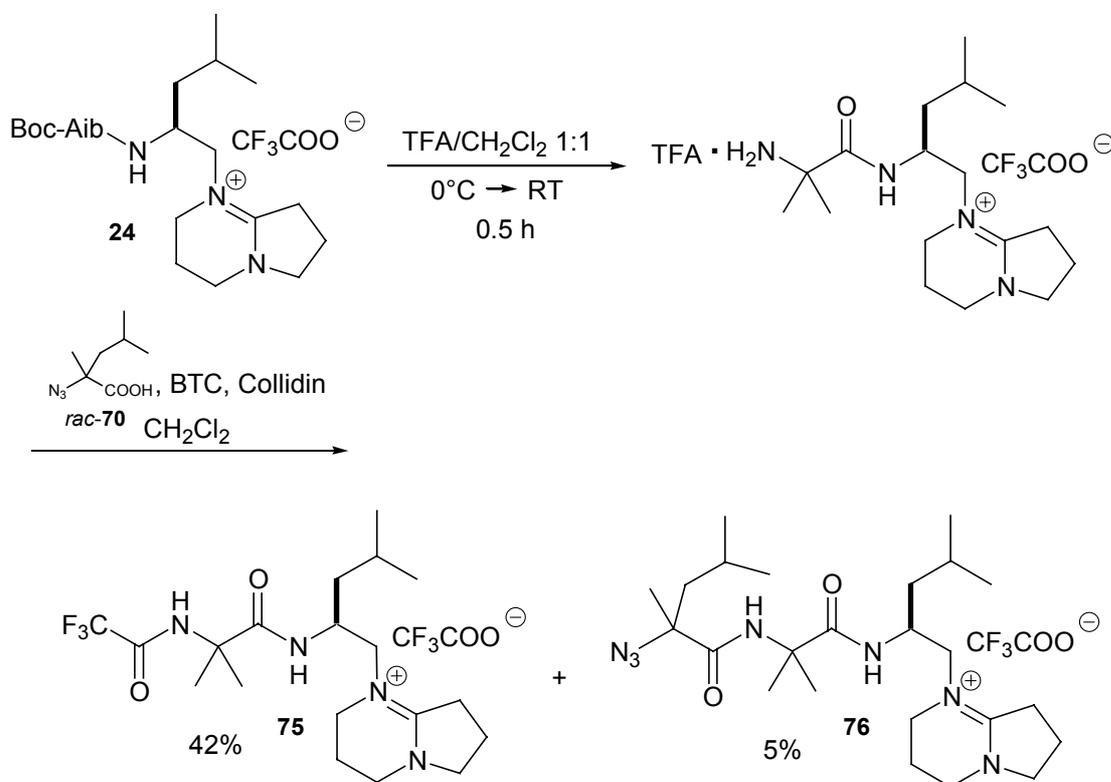


Bild 2.46:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von  $(S,S)$ -72 (125.8 MHz)

## 2.5 Chirale $\alpha,\alpha$ -dialkylierte $\alpha$ -Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese

Nachdem mit (*S*)-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (*S*)-**70** eine chirale, enantiomerenreine  $\alpha$ -Azidosäure als Baustein für die Synthese neuer Peptide zur Verfügung steht, soll nun versucht werden, anstelle eines Leucin-Restes in Efrapeptin einen  $\alpha$ -Methylleucin-Rest einzubauen. Efrapeptin C enthält zwei Leucin-Reste, wobei bei der oben beschriebenen Totalsynthese ein Leucin (Leu6) durch Festphasensynthese unter Verwendung von Fmoc-Leucin eingeführt wird, während der Rest Leu14 durch Lösungssynthese eingeführt wird, wobei Boc-Leucin als Baustein dient. Zunächst wird der Rest Leu14 gegen  $\alpha$ -Methylleucin ausgetauscht.

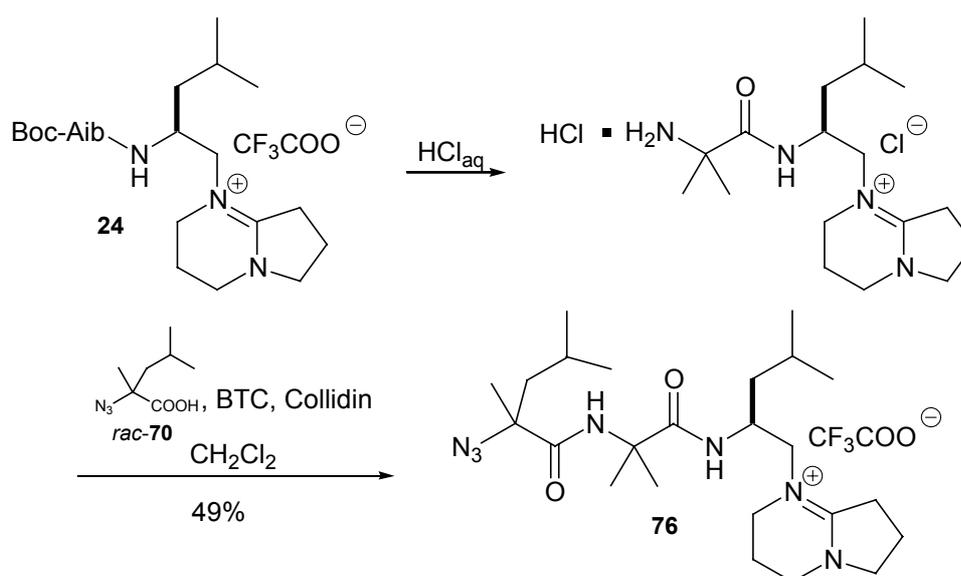
Aufbauend auf den oben beschriebenen Ergebnissen beginnt die Synthese durch Verlängerung des Bausteins Boc-Aib-X **24**, der zunächst nur im Rahmen einer Modellreaktion hergestellt wurde. Nach Entfernen der Boc-Gruppe durch Acidolyse kann die Azidosäure nach dem gleichen Verfahren wie bei der Synthese des Azido-geschützten Dipeptids **72** mit Triphosgen an die freie Aminogruppe gekuppelt werden.



Schema 2.65: Entstehung der trifluoracetylierten Verbindung **75**

Die Reaktion wird zuerst mit der racemischen 2-Azido-2,4-dimethylpentansäure *rac*-**70** durchgeführt. Durch Behandlung von **24** mit TFA wird die Boc-Gruppe entfernt. Anschließend wird (*rac*)-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (*rac*-**70**) nach der Triphosgen-Methode aktiviert und zur Aminokomponente gegeben (Schema 2.65).

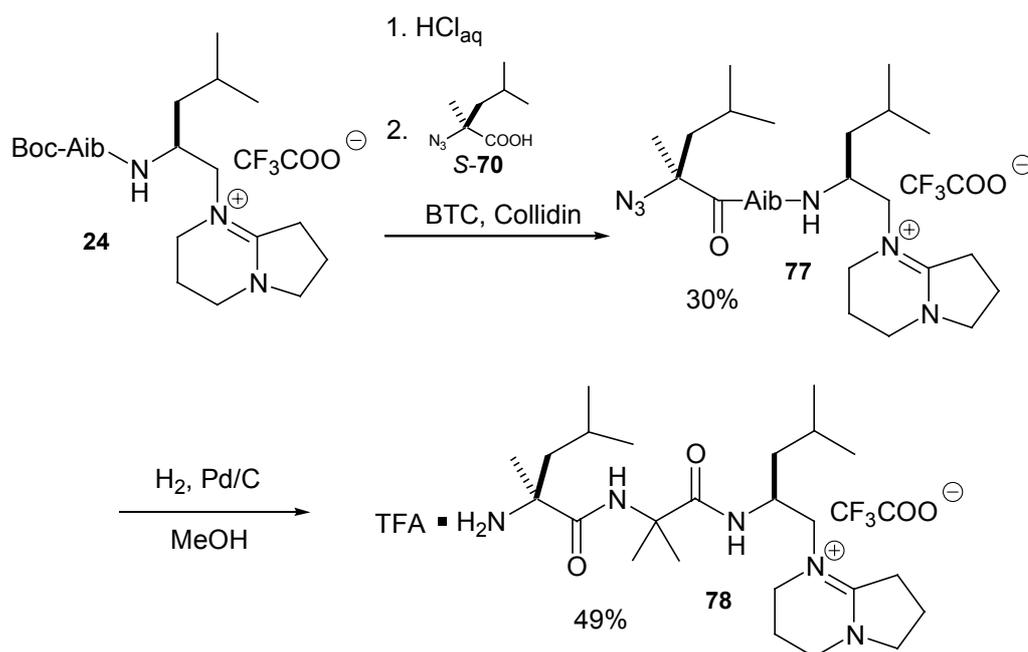
Wie bereits die MALDI-TOF-massenspektrometrische Analyse während der Reaktion zeigt, entsteht jedoch nur in geringem Umfang das gewünschte Produkt **76** ( $m/z = 462$ ). Stattdessen entsteht als Hauptprodukt eine Verbindung mit einer Masse von  $m/z = 405$ . Im analytischen HPL-Chromatogramm ergibt diese Verbindung einen einzelnen, scharfen Peak, sodass es sich wahrscheinlich nicht um ein Diastereomergemisch handelt. Diese Daten lassen darauf schließen, dass es sich hierbei um die trifluoracetylierte Verbindung **75** handelt. Auch die NMR-spektroskopische Untersuchung bestätigt dies. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **75** wird im Bereich der NH-Protonen ein Dublett und ein Singulett gefunden und im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **75** treten neben den zwei Quartetts bei 116.5 und 160.9 ppm des freien  $\text{CF}_3\text{COO}^-$ , welches als Gegenion zur quartären Amidinium-Einheit vorhanden ist, zwei weitere Quartetts bei 116.0 und 157.1 ppm auf. Offensichtlich kommt es im Laufe der Reaktion zu einer Aktivierung und Kupplung des vorhandenen Trifluoracetats und diese Reaktion ist wesentlich schneller als die Kupplungsreaktion mit der  $\alpha,\alpha$ -dialkylierten Azidosäure *rac*-**70**. Eine derartige Nebenreaktion wird bei Kupplungsreaktionen unter ähnlichen Bedingungen normalerweise nicht beobachtet.



Schema 2.66: Synthese des Azido-geschützten Analogons des C-terminalen Fragmentes **76**

Um die Trifluoracetylierung zu vermeiden, wird die Boc-Gruppe in **24** mit Salzsäure anstelle von TFA abgespalten. Die Behandlung von **24** mit konz. Salzsäure führt ebenfalls zur Acidolyse der Boc-Gruppe. Nach Gefriertrocknung wird die zuvor nach der Triphosgen-Methode in Dichlormethan aktivierte Azidosäure *rac*-**70** zugegeben. Die Reaktion verläuft glatt und das Produkt **76** wird nach präparativer RP-HPLC in 49% Ausbeute als 1:1 Diastereomergemisch isoliert (Schema 2.66).

Nachdem geeignete Synthesebedingungen für **76** unter Verwendung der racemischen 2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (*rac*-**70**) gefunden wurden, wird die entsprechende Reaktion mit der enantiomerenreinen (*S*)-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (*S*-**70**) durchgeführt (Schema 2.67). Hierbei ist das nach präparativer RP-HPLC erhaltene (*S,S*)-**77** allerdings laut NMR-Spektren noch mit der Azidosäure (*S*-**70**) verunreinigt, die eine identische Retentionszeit im HPL-Chromatogramm besitzt. Nach katalytischer Hydrierung von **77** wird das  $\alpha$ -Methylleucin-haltige Analogon **78** des C-terminalen Fragmentes von Efrapeptin C (**1**) in sehr reiner Form erhalten.

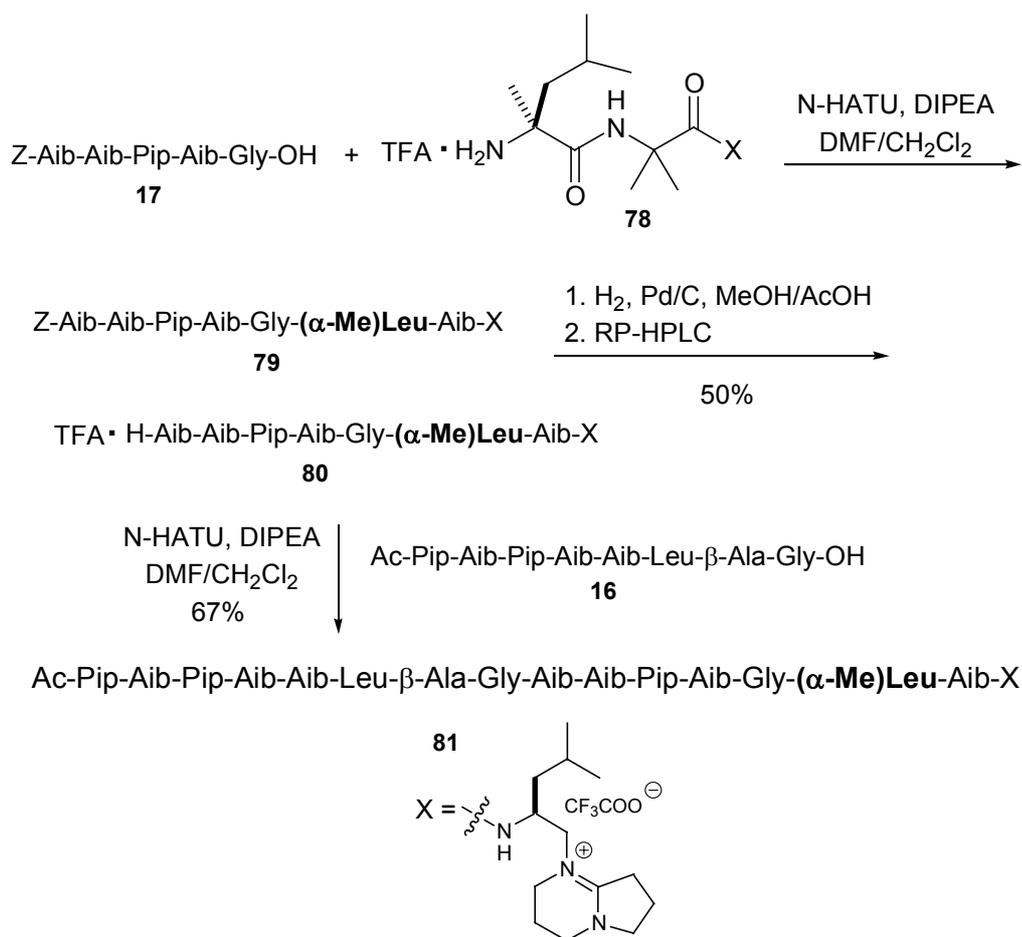


Schema 2.67: Synthese des diastereomerenreinen Analogons **78** des C-terminalen Fragmentes von Efrapeptin C (**1**)

Die spektroskopischen Eigenschaften von **78** ähneln denen des C-terminalen Fragmentes **18** des Naturstoffs **1**. Die Anwesenheit des  $\alpha$ -Methylleucin-Restes führt im <sup>1</sup>H-

NMR-Spektrum jedoch dazu, dass ein zusätzliches Singulett einer Methylgruppe auftritt, während das Signal des Leucin- $C^\alpha$ -H-Atoms verschwindet.

Die Fragmentkondensationen zur Gesamtsequenz **81** erfolgen wie bei der Synthese von Efrapeptin C (**1**) (Schema 2.68).

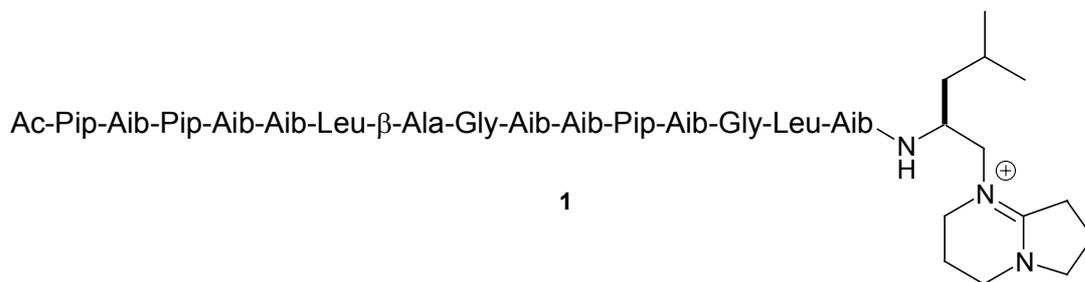


Schema 2.68: Segmentkondensationen bei der Synthese des *α*-Methylleucin-haltigen Efrapeptin-Analogons **81**

Die Kupplungsreaktion mit dem mittleren Fragment Z-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH (**17**) verläuft hier zwar deutlich langsamer, da die Aminokomponente **78** N-terminal eine *α*,*α*-dialkylierte Aminosäure trägt, doch ist die Aminokomponente nach mehreren Stunden vollständig verbraucht und nach hydrogenolytischer Abspaltung der Z-Gruppe kann die C-terminale Hälfte **80** des Zielmoleküls in zufrieden stellender Ausbeute durch präparative RP-HPLC in reiner Form isoliert werden. Abschließend wird die C-terminale Hälfte **80** mit dem N-terminalen Fragment **16** zum gewünschten Efrapeptin-Analogon kondensiert.

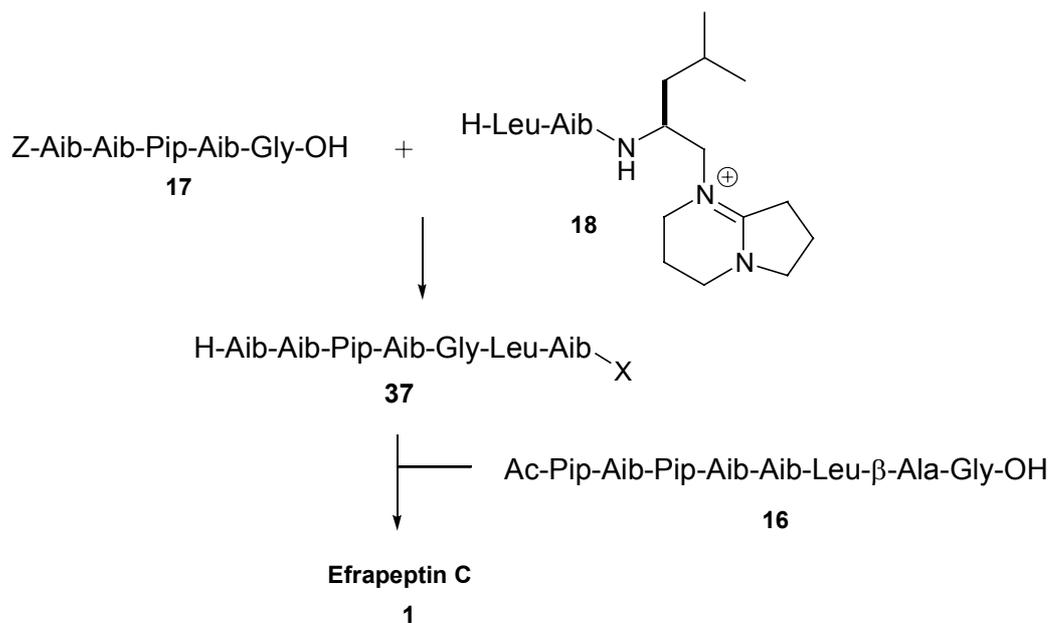
### 3 Zusammenfassung und Ausblick

Efrapeptine sind eine Klasse von Peptiden, die von dem Pilz *Tolypocladium niveum* und weiteren Vertretern dieser Spezies als mikroheterogenes Gemisch eng verwandter Sequenzanaloga (Efrapeptine C bis G) produziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Efrapeptin C (**1**, Schema 3.1) zum ersten Mal ein Vertreter der Efrapeptine synthetisiert werden.



Schema 3.1: Struktur von Efrapeptin C (**1**)

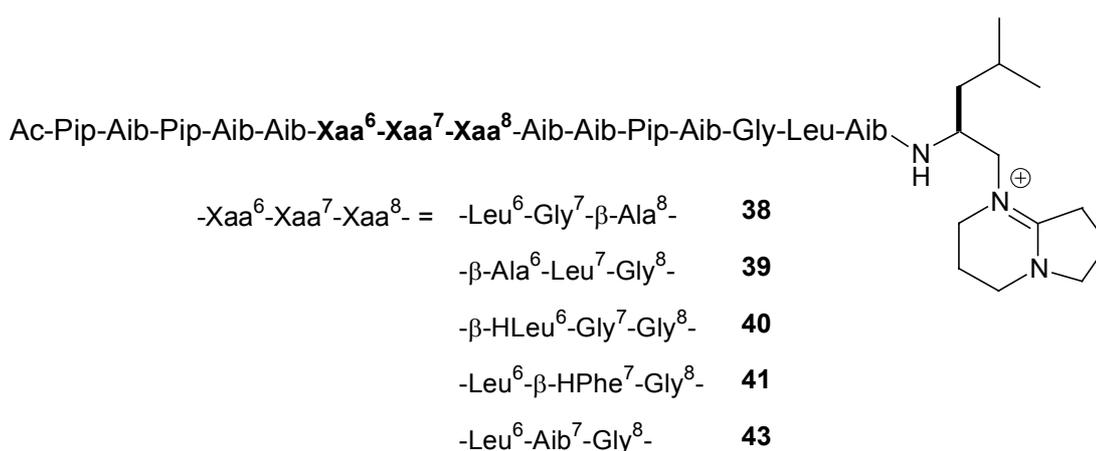
Bei der hier entwickelten Synthese werden zunächst drei Fragmente synthetisiert: das N-terminale Fragment **16**, das Z-geschützte mittlere Fragment **17** und das C-terminale Fragment **18** (Schema 3.2).



Schema 3.2: Synthese von Efrapeptin C (**1**) aus den drei Fragmenten **16**, **17** und **18**.

Die beiden Fragmente **16** und **17** werden durch Festphasensynthese am sehr säurelabilen *o*-Chlortritylharz hergestellt. Die Acylierung der Harz-gebundenen Aminokomponente erfolgt mit dem hochreaktiven  $\alpha$ -Azidoisobuttersäurechlorid (Azib-Cl) bei Anwesenheit von Triethylamin und das resultierende Azidopeptidyl-Harz wird anschließend mit dem Vilarrasa-Reagenz<sup>[89]</sup>  $[\text{Et}_3\text{NH}][\text{Sn}(\text{SPh})_3]$  zum Aminopeptidyl-Harz reduziert. Das C-terminale Fragment **18** wird in Lösung synthetisiert. Dabei wurde zum ersten Mal die von DBN und L-Leucinol abgeleitete Kopfgruppe X synthetisch zugänglich gemacht. Mit Hilfe des neuen Syntheseweges zu Efrapeptin C (**1**) können im Forschungslabor die für detaillierte NMR-spektroskopische Untersuchungen nötigen Substanzmengen (10-20 mg) leicht hergestellt werden. Erste Ergebnisse derartiger Experimente wurden bereits im Rahmen einer Diplomarbeit erzielt.<sup>[86]</sup>

Das synthetische **1** zeigt die gleiche biologische Aktivität gegenüber der  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* wie der Naturstoff. Unter schwach sauren Bedingungen können die Aib-Pip- und Pip-Aib-Peptidbindungen selektiv hydrolysiert werden und auch das für den Naturstoff beschriebene Verhalten gegenüber konzentrierter Salzsäure kann mit dem synthetischen Material reproduziert werden. Das aufgrund der Reinigung durch präparative RP-HPLC als Trifluoracetat vorliegende **1** kann durch Behandlung mit Anionenaustauscher-Harz in das Bromid **1a** überführt werden. Leider sind bisher alle Versuche, das synthetische Efrapeptin C (**1**) zu kristallisieren, um eine hochaufgelöste Kristallstruktur zu erhalten, fehlgeschlagen.



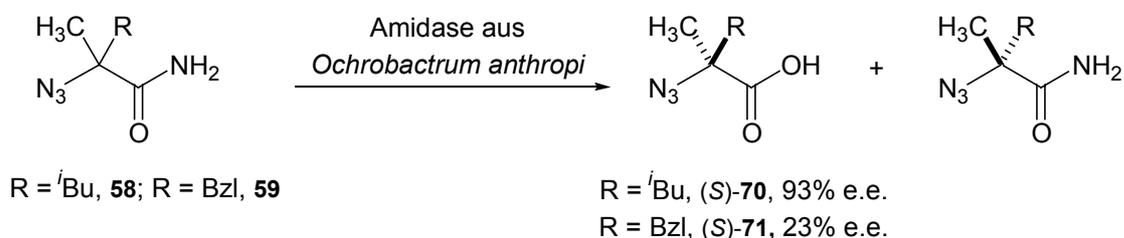
Schema 3.3: Synthetisierte Efrapeptin-Analoga **38-43**

Mit Hilfe des neuen Syntheseweges für Efrapeptine wurde eine Reihe von Efrapeptin-Analoga synthetisiert, wobei Veränderungen in der zentralen Teilsequenz -Leu<sup>6</sup>-β-Ala<sup>7</sup>-Gly<sup>8</sup>- vorgenommen wurden (Schema 3.3).

Die Efrapeptin-Analoga **38-43** wurden CD-spektroskopisch untersucht und ihre inhibitorische Wirkung auf F<sub>1</sub>-ATPase aus *E. coli* wurde bestimmt. Dabei stellt sich heraus, dass Efrapeptin C (**1**) in Bezug auf seine Bioaktivität sehr empfindlich auf Änderungen in der zentralen Teilsequenz reagiert. Die Verbindungen **39**, **40**, und **41** zeigen nur noch geringe inhibitorische Wirkung. Die Anwesenheit einer β-Aminosäure scheint aber auf jeden Fall notwendig zu sein, da das Analogon **43** keine inhibitorische Aktivität zeigt. Das zentral trunkierte Efrapeptin-Analogon Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Aib-Leu-Aib-X (**52**) sowie das N-terminale Fragment **16** und die C-terminale Hälfte **37** sind ebenfalls inaktiv.

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung quartärer Amidiniumionen stellt sich heraus, dass in den MALDI-TOF-Massenspektren der untersuchten Verbindungen keine mehrfach geladenen Ionen detektiert werden. Selbst bei Anwesenheit mehrerer quartärer Amidinium-Einheiten werden beim MALDI-Prozess nur einfach geladene Ionen erzeugt. Der Ladungsabbau erfolgt entweder durch Deprotonierung, durch Anlagerung von Anionen oder durch Eliminierung von protoniertem DBN. In den ESI-Massenspektren der untersuchten quartären Amidiniumsalze werden hingegen die erwarteten mehrfach geladenen Molekülonen [M]<sup>n+</sup> gefunden.

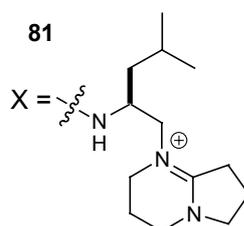
In Zusammenarbeit mit Forschern der Firma DSM wurde die enzymatische Racematspaltung chiraler α,α-dialkylierter α-Azidocarboxamide untersucht. Dazu wurde zunächst eine effiziente Synthesemethode für die notwendigen Substrate **58** und **59** entwickelt. Die enzymatische Racematspaltung wurde bei DSM untersucht (Schema 3.4).



Schema 3.4: Enzymatische Racematspaltung von **58** und **59**

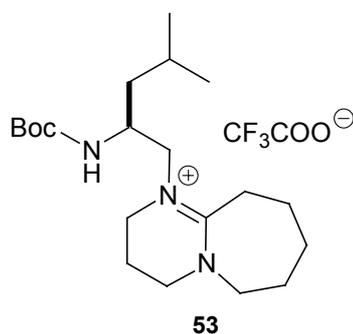
Bei beiden Substraten ist die enzymatische Aktivität sehr gering, bei **58** wird jedoch eine vielversprechende Stereoselektivität erreicht, während diese bei **59** nur mäßig ist. Im Falle von **58** wurde die Reaktion auch im präparativen Maßstab durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Azidosäure **70** mit Hilfe der BTC-Methode effizient in Peptide eingebaut werden kann und die durch die enzymatische Reaktion erhaltene, praktisch enantiomerenreine Azidosäure (*S*)-**70** wurde in das Efrapeptin-Analogon **81** in Position 14 an Stelle des natürlich vorkommenden Leucins eingebaut (Schema 3.5).

Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-( $\alpha$ -Me)Leu-Aib-X



Schema 3.5: Struktur des Efrapeptin-Analogons **81**

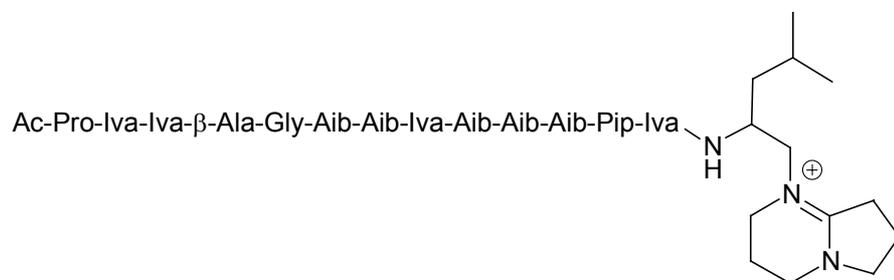
Die Synthese weiterer Analoga ist nach dem hier entwickelten Syntheseweg leicht möglich und sollte es erlauben, detailliertere Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten. Hierbei können Veränderungen wiederum in der zentralen Teilsequenz -Leu<sup>6</sup>- $\beta$ -Ala<sup>7</sup>-Gly<sup>8</sup>- vorgenommen werden. Mit dem hier zum ersten Mal synthetisierten, von DBU abgeleiteten Amidiniumsalz **53** steht aber auch ein Baustein zur Verfügung, der Änderungen im C-terminalen Bereich der Efrapeptine ermöglicht und Licht auf die Funktion der in Naturstoffen sehr seltenen Amidiniumeinheit werfen könnte.



Schema 3.6: Struktur des von DBU abgeleiteten Analogons **53** der Kopfgruppe der Efrapeptine

Die Synthese weiterer Vertreter der Efrapeptine ist ebenfalls möglich. Da in den Efrapeptinen D bis G neben Aib auch Isovalin vorkommt, muss die Synthese leicht

verändert werden. Auch die Synthese des erst kürzlich entdeckten, mit den Efraeptinen strukturell verwandten Adenopeptins sollte nach einem ähnlichen Verfahren wie das hier auf Efraeptin C (**1**) angewandte möglich sein.



Schema 3.7: Struktur von Adenopeptin (**15**)<sup>[76]</sup>

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

**Schmelzpunkte:** B-540 Schmelzpunktapparatur (Fa. Büchi), unkorrigiert.

**Mikroanalysen:** CHNS-932 (Fa. Leco).

**Flashchromatographie:** Kieselgel 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ), Fa. Merck.

**Dünnschichtchromatographie:** DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>), Fa. Merck; Detektion: UV (254 nm, MinUVIS, Fa. Desaga), Ninhydrin (Besprühen mit 1 mg·mL<sup>-1</sup>-Lösung in EtOH/AcOH 100:3 und anschließendes Erhitzen).

**NMR-Spektroskopie:** AC-250-P (Fa. Bruker), Messfrequenzen: <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 62.9 MHz, <sup>19</sup>F-NMR: 235.4 MHz; DRX-500 (Fa. Bruker), Messfrequenzen: <sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 125.8 MHz; TMS als interner Standard; DRX-600 (Fa. Bruker), Messfrequenz: <sup>1</sup>H-NMR: 600 MHz, TMS als interner Standard; <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden i. d. Regel sowohl mit <sup>1</sup>H-Breitbandentkopplung als auch mit Hilfe der aDEPT-Methode<sup>[132]</sup> (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) aufgenommen. In einigen Fällen wurden auch 2D-NMR-Spektren (C,H-COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC) aufgenommen. <sup>19</sup>F-NMR-Spektren wurden *ohne* <sup>1</sup>H-Breitbandentkopplung aufgenommen.

**IR-Spektroskopie:** FT/IR-410 (Fa. Jasco), mit Basislinienkorrektur.

**Polarimetrie:** DIP-360 (Fa. Jasco).

**CD-Spektroskopie:** CD-Spektren wurden auf einem J-810 CD-Spektrometer (Fa. Jasco) von 300 – 185 nm bei Raumtemperatur mit folgenden Geräteeinstellungen aufgenommen: band width: 1 nm, response: 1 s, sensitivity: low, datapitch: 0.1 nm, scanning speed: 50 nm/min, accumulation: 5. Die Peptidkonzentrationen betragen ca. 0.5 mg/mL und die Weglänge 0.2 mm.

Das CD-Spektrum von **40** wurde auf einem J-720 CD-Spektrometer (Fa. Jasco) von 280 – 180 nm bei Raumtemperatur mit folgenden Geräteeinstellungen aufgenommen: band width: 1 nm, response: 0.5 s, sensitivity: 20 mdeg, datapitch: 0.2 nm, scanning speed: 100 nm/min, accumulation: 5. Die Peptidkonzentration betrug ca. 0.5 mg/mL und die Weglänge 0.2 mm.

**EI- und CI-Massenspektrometrie:** EI- und CI-Massenspektren wurden mit einem Autospec X Magnet-Sektorfeldmassenspektrometer mit EBE-Geometrie (Fa. Vacuum Generators), das mit einer Standard-EI oder CI-Quelle ausgestattet ist, aufgenommen. Die Ionen wurden im EI-Modus mit 8 kV und im CI-Modus mit 6 kV beschleunigt.

**ESI-Massenspektrometrie:** ESI-Massenspektren wurden auf einem Esquire 3000 Ionenfallen-Massenspektrometer (Fa. Bruker Daltonik), das mit einer Standard ESI-Ionenquelle ausgestattet ist, im Positivionen-Modus aufgenommen. Proben wurden durch direkte Infusion einer Lösung in Methanol/Chloroform mit Hilfe einer Spritzenpumpe eingeführt. Stickstoff diente als Nebulations- und Trocknungs-Gas und Helium diente als Kühlgas für die Ionenfalle. Bei quartären Amidiniumsalzen wird das quartäre Amidiniumion als  $[M]^+$  bezeichnet.

**ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie:** ESI-FT-ICR-massenspektrometrische Experimente wurden mit einem Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer APEX III (Fa. Bruker Daltonik) mit einem supraleitenden 7.0 T-Magneten durchgeführt. Stickstoff diente als Nebulations- und Trocknungs-Gas und Argon diente als Kühlgas. Bei quartären Amidiniumsalzen wird das quartäre Amidiniumion als  $[M]^+$  bezeichnet.

**MALDI-TOF-Massenspektrometrie:** MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einer Voyager-DE™ BioSpectrometry™ Workstation (Fa. Applied Biosystems) mit einem 1.20 m-Flugrohr im Positivionen-Modus aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte mit einem LSI-Stickstoff-Laser (Wellenlänge: 337 nm, Pulsbreite: 3 ns, Wiederholungsrate: 3 Hz). Beschleunigungsspannung: 20 kV, Grid voltage: 94%, Guide wire 0.05%. Wenn keine anderen Angaben gemacht werden, wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix verwendet. Es wurden jeweils zehn bis zwanzig Einzelspektren aufgenommen und gemittelt. Die Kalibrierung erfolgte mit Polyethylenglykol (PEG) als externem

Standard auf dem gleichen Target. Bei quartären Amidiniumsalzen wird das quartäre Amidiniumion als  $[M]^+$  bezeichnet.

**Lösungsmittel:** Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und falls nötig absolutiert. Acetonitril für die HPL-Chromatographie wurde von der Firma Merck in Lichrosolv-Qualität bezogen. Wasser für die HPL-Chromatographie wurde einer MilliQ Reinstwasseranlage (Fa. Millipore,  $>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ) entnommen. Dichlormethan wurde von  $\text{CaCl}_2$  abdestilliert und über  $\text{CaH}_2$  getrocknet. DMF wurde 2 h über Ninhydrin ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) unter Rückfluss erhitzt und im Vakuum destilliert. THF und Diethylether wurden über KOH vorgetrocknet und über Na/Benzophenon absolutiert. Toluol wurde von Na abdestilliert.

#### **Analytische RP-HPLC:**

Pumpe: Thermo Separation Products P4000

Autosampler: Thermo Separation Products AS100

Detektor: Thermo Separation Products UV6000 LP, Detektion bei  $\lambda = 220 \text{ nm}$

Controller: Thermo Separation Products SN4000

Säule: Vydac high performance protein and peptide C18 Vorsäule und Phenomenex, Jupiter C18,  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6 \text{ mm}$  oder Vydac 218TP54 efficiency protein and peptide C18-Säule,  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6 \text{ mm}$ .

Flussrate:  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Eluent A:  $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}/\text{TFA}$  (95:5:0.1)

Eluent B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}/\text{TFA}$  (5:95:0.1)

Methode A:

0 min→3 min	100% A, 0% B
3 min→30 min	100% A, 0% B→0% A, 100% B
30 min→40 min	0% A, 100% B→100% A, 0% B

Methode B:

0 min→5 min	100% A, 0% B
5 min→30 min	100% A, 0% B→70% A, 30% B
30 min→40 min	70% A, 30% B→0% A, 100% B
40 min→50 min	0% A, 100% B→100% A, 0% B

**Methode C:**

0 min→5 min	100% A, 0% B
5 min→30 min	100% A, 0% B→40% A, 60% B
30 min→40 min	40% A, 60% B→0% A, 100% B
40 min→50 min	0% A, 100% B→100% A, 0% B

**Präparative RP-HPLC:**

Pumpe: Thermo Separation Products P4000

Detektor: Thermo Separation Products UV1000, Detektion bei  $\lambda = 220$  nm

Controller: Thermo Separation Products SN4000

Säule: Vydac high performance protein and peptide C18-Vorsäule und Vydac 218TP102 efficiency protein and peptide C18-Säule, 10  $\mu$ m, 250 x 22 mm.

Eluent A: H<sub>2</sub>O/Acetonitril/TFA (95:5:0.1)

Eluent B: H<sub>2</sub>O/Acetonitril/TFA (5:95:0.1)

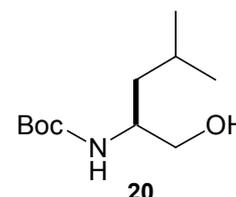
In der Regel wird folgende Methode verwendet:

Flussrate: 15 mL·min<sup>-1</sup>

0 min→5 min	100% A, 0% B
5 min→40 min	100% A, 0% B→0% A, 100% B
40 min→50 min	0% A, 100% B→100% A, 0% B

## 4.2 Synthese von Efrapeptin C

### 4.2.1 Synthese des C-terminalen Fragmentes



#### **(S)-2-(N-*tert*-Butyloxycarbonylamino)-4-methylpentan-1-ol**

Zu einer Lösung von 27.62 g (119 mmol) Boc-Leucin und 18.30 mL (132 mmol) Triethylamin in 100 mL absolutem THF werden bei 0°C 12.57 mL (132 mmol) Chlorameisensäureethylester (frisch destilliert) gegeben, wobei es zur Bildung eines farblosen Niederschlages kommt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit THF gewaschen. Das Filtrat wird bei ca. -15°C (Eis/CaCl<sub>2</sub>-Mischung) zu einer Lösung von 6.81 g (180 mmol) Natriumborhydrid in 60 mL Wasser getropft. Nach beendeter Zugabe wird 0.5 h bei -15°C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingengt, mit verd. HCl bei 0°C auf pH 2 angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert (4 x 80 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer liefert ein farbloses Öl, welches durch Kugelrohrdestillation bei 0.7 mbar und 200°C Luftbadtemperatur gereinigt wird.

Ausbeute: 14.40 g (66 mmol, 55%), farbloses Öl

Summenformel: C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>

Molmasse: 217.31 g·mol<sup>-1</sup>

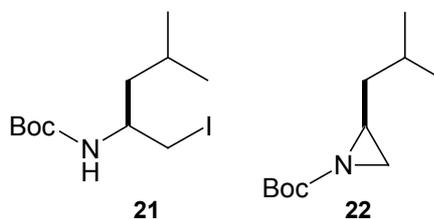
<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.93 (d, 6H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.28-1.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH), 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.67 (sep, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.49 (dd, <sup>2</sup>J = 10.9 Hz, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>OH), 3.63 (dd, <sup>2</sup>J = 10.9 Hz, <sup>3</sup>J = 3.7 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>OH), 3.69 (m, 1H, N-CH), 4.98 (d, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 22.2 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.1 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 40.7 ( $\text{CHCH}_2$ ), 51.2 ( $\text{CH-NH}$ ), 66.3 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 79.7 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 156.6 ( $\text{C=O}$ ).

**IR** (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3340 (br, OH), 2958 (CH), 2935 (CH), 2871 (CH), 1689 (C=O), 1519, 1469, 1392, 1367, 1253, 1172, 1076, 1052, 1029, 912, 869, 781, 734  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 218 (27)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 118 (14)  $[\text{M}+\text{H-Boc}]^+$ , 162 (100)  $[\text{M-C}_4\text{H}_8]^+$ .

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -28.0$  ( $c = 2.77$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit:<sup>[79]</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -26.8$  ( $c = 0.8$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).



**(S)-2-(N-tert-Butyloxycarbonylamino)-4-methyl-1-iodopentan (21) und (S)-2-Isobutyl-aziridin-1-carbonsäure-tert-butylester (22)**

Zu einer gerührten Lösung von 1.05 g (4.83 mmol, 1 Äquiv.) (S)-2-(N-tert-Butyloxycarbonylamino)-4-methylpentan-1-ol (**20**) und 1.44 g (5.48 mmol, 1.1 Äquiv.) Triphenylphosphin in 20 mL getrocknetem Toluol werden unter einer Schutzgasatmosphäre bei Raumtemperatur 852  $\mu\text{L}$  (5.48 mmol, 1.1 Äquiv.) DEAD gegeben. Es tritt eine leichte Wärmeentwicklung auf und die gelbe Farbe des DEADs verschwindet. Nach 5 min werden 341  $\mu\text{L}$  (5.48 mmol, 1.1 Äquiv.) Iodmethan zugegeben. Die Mischung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das nicht trennbare Gemisch beider Produkte wird durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 10:1) isoliert. Das  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch bestimmte Stoffmengenverhältnis der beiden Produkte **21:22** beträgt ca. 2:1.

Ausbeute: 1.02 g, farbloser Feststoff (**21**: ca. 2.4 mmol, 50%; **22**: ca. 1.2 mmol, 25%)

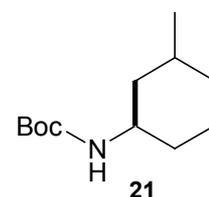
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) **22**:  $\delta$  [ppm] = 0.98 (d, 3H,  $^3J = 6.7$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.99 (d,  $^3J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.30-1.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.45 (s, 9H,

$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , 1.65 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.89 (m, 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{N}$ ), 2.26 (m, 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{N}$ ), 2.39 (m, 1H,  $\text{CH-N}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) **22**:  $\delta$  [ppm] = 22.1 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.0 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.9 ( $\text{CHCH}_2$ ), 36.9 ( $\text{CH-N}$ ), 41.3 ( $\text{N-CH}_2$ ), 80.8 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_2$ ), 162.7 ( $\text{C=O}$ ).

**DC**:  $R_f$ : 0.71 (PE/EE 1:1), 0.45 (PE/EE 10:1).

Analytische Daten für **21**: s. u.



#### **(S)-2-(N-tert-Butyloxycarbonylamino)-4-methyl-1-iodopentan**

Zu einer Lösung von 3.41 g (13.0 mmol) Triphenylphosphin in 120 mL getrocknetem Dichlormethan werden bei Raumtemperatur unter Rühren 3.30 g (13.0 mmol) Iod gegeben. Nach 15 min werden 1.01 g (14.8 mmol) Imidazol zugegeben. Es bildet sich ein Niederschlag und nach weiteren 5 min wird eine Lösung von 2.17 g (10.0 mmol) Boc-Leucinol in 20 mL Dichlormethan zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat mit Natriumthiosulfat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 10:1) isoliert.

Ausbeute: 1.67 g (5.1 mmol, 51%), farbloser Feststoff

Summenformel:  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NO}_2\text{I}$

Molmasse:  $327.20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt:  $57\text{-}58^\circ\text{C}$  (Lit.<sup>[81]</sup>  $55\text{-}57^\circ\text{C}$ )

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.93 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 0.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1.30 - 1.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.65 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.27 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>I), 3.35-3.50 (m, 2H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>I, CHNH), 4.57 (d, br, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, NH).

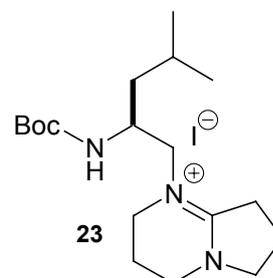
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 15.8 (CH<sub>2</sub>I), 22.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.7 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 44.3 (CHCH<sub>2</sub>), 47.9 (CH-NH), 79.6 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 155.0 (C=O).

**IR** (KBr-Pressling):  $\tilde{\nu}$  = 3327 (N-H), 2956 (C-H), 2869 (C-H), 1713 (C=O), 1679, 1536, 1469, 1421, 1390, 1366, 1331, 1168, 1121, 1021, 950, 876, 751 cm<sup>-1</sup>.

**MS** (CI, NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 345 (8) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 328 (11) [M+H]<sup>+</sup>, 289 (100) [M+NH<sub>4</sub>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 272 (16), 228 (35) [M+H-Boc]<sup>+</sup>, 186 (19), 170 (18), 161 (21), 144 (29).

**DC**: R<sub>f</sub>(Ninhydrin): 0.71 (PE/EE 1:1), 0.45 (PE/EE 10:1).

$[\alpha]_D^{24} = -30.9$  (c = 1.72, CHCl<sub>3</sub>), Lit:<sup>[81]</sup>  $[\alpha]_D^{25} = -29.9$  (c = 1.54, CHCl<sub>3</sub>).



**(S)-N-(tert-Butyloxycarbonyl)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-iodid**

Eine Mischung aus 1.280 g (3.91 mmol) (S)-2-(N-tert-Butyloxycarbonylamino)-4-methyl-1-iodpentan (**21**) und 0.546 mL (4.40 mmol, 1.1 Äquiv.) DBN in 30 mL Toluol wird 1.5 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion kann dünnschichtchromatographisch anhand des Verschwindens des Eduktes verfolgt werden. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der ölige Niederschlag durch Entfernen der überstehenden Toluol-Phase isoliert und im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Öl erstarrt nach einigen Tagen zu einem wachsartigen farblosen Feststoff. Dieser wird ohne weitere Reinigung für die folgenden

Umsetzungen eingesetzt. Eine sehr reine Probe kann durch präparative RP-HPLC in Form des Trifluoracetats gewonnen werden.

Ausbeute: 1.322 g (2.93 mmol, 75%)

Summenformel: C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>I

Molmasse: 451.39 g·mol<sup>-1</sup>

Schmelzpunkt: 121°C

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS, Trifluoracetat): δ [ppm] = 0.90 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 0.93 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 1.18 (ddd, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, <sup>2</sup>J = 13.9 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.39 (s, 9H, Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49 (ddd, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, <sup>2</sup>J = 13.9 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.70 (m, 1H, C<sup>γ</sup>H), 2.04-2.27 (m, 4H, C<sup>β1'</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>β2'</sup>H<sub>2</sub>), 3.07 (m, 1H, C<sup>γ2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.21 (m, 1H, C<sup>γ2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.27 (dd, <sup>3</sup>J = 3.3 Hz, <sup>2</sup>J = 14.4 Hz, 1H, C<sup>β1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.36 (m, 3H, C<sup>α1'</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.51 (dd, <sup>3</sup>J = 10.7 Hz, <sup>2</sup>J = 14.4 Hz, 1H, C<sup>β1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.66 (m, 1H, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.69-3.80 (m, 2H, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.94 (m, 1H, C<sup>α</sup>H), 5.67 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, NH).

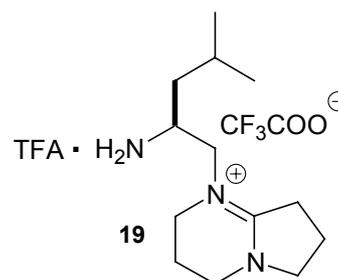
<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS, Trifluoracetat): δ [ppm] = 18.9 (C<sup>β1'</sup>H<sub>2</sub>), 19.2 (C<sup>β2'</sup>H<sub>2</sub>), 21.8 (C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 23.1 (C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 25.2 (C<sup>γ</sup>H), 28.4 (Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.4 (C<sup>γ2'</sup>H<sub>2</sub>), 40.7 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 42.9 (C<sup>α1'</sup>H<sub>2</sub>), 45.9 (C<sup>γ1'</sup>H<sub>2</sub>), 47.1 (C<sup>α</sup>H), 54.9 (C<sup>α2'</sup>H<sub>2</sub>), 58.9 (C<sup>β1'</sup>H<sub>2</sub>), 79.6 (Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.6 (C=O), 165.6 (C<sup>δ2'</sup>).

IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3445, 3259, 2956, 2871, 1699, 1664, 1516, 1454, 1389, 1365, 1310, 1279, 1252, 1166 cm<sup>-1</sup>.

MS (MALDI-TOF):  $m/z$  = 324.40 [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 324.26.

$[\alpha]_D^{25}$  = 14.0 (c = 1.07, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

HPLC:  $t_R$  = 19.02 min (Methode A)



**(S)-Isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat**

Zu einer Lösung von 34 mg (7.8  $\mu\text{mol}$ ) (*S*)-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-iodid (**23**) in 1 mL Dichlormethan wird bei 0°C 1 mL TFA zugegeben. Die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und nach 0.5 h werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: quantitativ (laut HPLC-Analyse), farbloses Öl

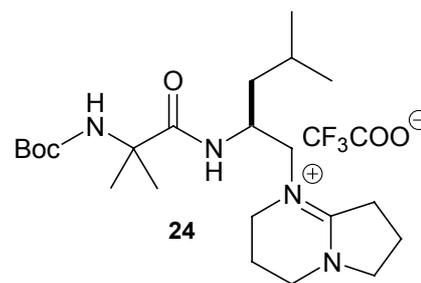
Summenformel:  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{F}_6\text{O}_4$

Molmasse:  $451.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.94 (d,  $^3J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 0.95 (d,  $^3J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 1.49 (m, 1H,  $\text{C}^\gamma\text{H}$ ), 1.60-1.78 (m, 2H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.03-2.18 (m, 3H,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.25 (m, 1H,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.99 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.21 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.30-3.47 (m, 3H,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ,  $\text{C}_{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.50 (dd,  $^3J = 2.2 \text{ Hz}$ ,  $^2J = 15.4 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.57-3.74 (m, 4H,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^\alpha\text{H}$ ,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.93 (dd,  $^3J = 11.0 \text{ Hz}$ ,  $^2J = 15.4 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 8.84 (s, br, 3H,  $\text{NH}_3$ ).

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 225.10$   $[\text{M}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_3]^+$ : 224.21.

**HPLC**:  $t_R = 9.59 \text{ min}$  (Methode A)



***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(*S*)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat**

Zu einer Lösung von 600 mg (1.33 mmol, 1.0 Äquiv.) (*S*)-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-iodid (**23**) in 3 mL Dichlormethan werden bei 0°C 5 mL TFA gegeben. Das Gemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt, nach 0.5 h werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus Wasser lyophilisiert.

Zu einer gerührten Lösung von 352 mg (1.73 mmol, 1.3 Äquiv.) Boc-Aib-OH und 657 mg N-HATU in 5 mL DMF werden bei 0°C 1.358 mL (7.98 mmol, 6.0 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min wird die zuvor hergestellte Aminokomponente in 6 mL Dichlormethan zugegeben und die Mischung wird so lange bei Raumtemperatur belassen, bis keine Aminokomponente mehr durch MALDI-TOF-MS nachweisbar ist (einige Stunden). Die flüchtigen Bestandteile werden im Hochvakuum entfernt und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 504 mg (0.96 mmol, 72%), farbloser Feststoff

Summenformel: C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

Molmasse: 522.60 g·mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.86 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, C<sub>8</sub>H<sub>3</sub>), 0.89 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 1.13 (m, 1H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.39 (s, 9H, Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.40 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.52 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.61-1.72 (m, 2H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\gamma$</sup> H), 2.03-2.29 (m, 4H, C <sup>$\beta 1'$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\beta 2'$</sup> H<sub>2</sub>), 3.02 (m, 1H, C <sup>$\gamma 2'$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.26 (m, 1H, C <sup>$\gamma 2'$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.31-3.46 (m, 4H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\alpha 1'$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\gamma 1'$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.66-3.84 (m, 4H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\alpha 2'$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\gamma 1'$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.31 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 5.41 (s, 1H, Aib-NH), 7.67 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> -NH).

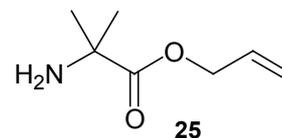
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.2 ( $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$ ), 18.8 ( $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$ ), 21.3 ( $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ ), 23.2 ( $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ ), 24.6 ( $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ ), 24.9 (Aib- $\text{CH}_3$ ), 26.3 (Aib- $\text{CH}_3$ ), 28.3 (Boc- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.9 ( $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_2$ ), 40.2 ( $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ ), 42.4 ( $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ), 44.8 ( $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_2$ ), 45.2 ( $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ ), 54.5 ( $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_2$ ), 56.5 (Aib- $\text{C}^{\alpha}$ ), 57.3 ( $\text{C}^{\beta'}\text{H}_2$ ), 79.1 (Boc- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 154.8 (Boc- $\text{C}=\text{O}$ ), 165.3 ( $\text{C}^{\delta 2'}$ ), 176.1 (Aib- $\text{C}=\text{O}$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.93 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ ), 0.95 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ ), 1.19 (m, 1H,  $\text{C}^{\beta}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.50 (s, 9H, Boc- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.72 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.90 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.87-2.11 (m, 6H,  $\text{C}^{\beta}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ ,  $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$ ,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$ ), 3.11 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.27 (m, 2H,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ), 3.38 (ddd,  $^3J = 4.6$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^2J = 12.6$  Hz, 1H,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.44 (dd,  $^3J = 3.5$  Hz,  $^2J = 14.0$  Hz,  $\text{C}^{\beta'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.49-3.61 (m, 2H,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_2$ ), 3.78 (ddd,  $^3J = 5.8$  Hz,  $^3J = 10.7$  Hz,  $^2J = 17.1$  Hz, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.85 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.95 (dd,  $^3J = 11.0$  Hz,  $^2J = 14.0$  Hz,  $\text{C}^{\beta'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 4.64 (m, 1H,  $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ ), 7.96 (s, 1H, Aib-NH), 9.03 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H,  $\text{C}_{\alpha}$ -NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.8 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.3 ( $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$ ), 19.1 ( $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$ ), 21.5 ( $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ ), 23.6 ( $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ ), 24.8 ( $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ ), 25.2 (Aib- $\text{CH}_3$ ), 26.9 (Aib- $\text{CH}_3$ ), 28.5 (Boc- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.1 ( $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_2$ ), 40.5 ( $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ ), 42.5 ( $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ), 44.7 ( $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_2$ ), 45.4 ( $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ ), 54.5 ( $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_2$ ), 56.8 (Aib- $\text{C}^{\alpha}$ ), 56.9 ( $\text{C}^{\beta'}\text{H}_2$ ), 57.4 ( $\text{C}^{\beta'}\text{H}_2$ ), 78.2 (Boc- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.7 (Boc- $\text{C}=\text{O}$ ), 165.3 ( $\text{C}^{\delta 2'}$ ), 176.4 (Aib- $\text{C}=\text{O}$ ).

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 409.29$   $[\text{M}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_3]^+$ : 409.32.

**HPLC**:  $t_R = 17.71$  min (Methode A)



### $\alpha$ -Aminoisobuttersäureallylester

In eine Suspension von 10.0 g (97.0 mmol)  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure in 200 mL Allylalkohol wird 30 min HCl eingeleitet, wobei sich das Gemisch erwärmt. Anschließend wird über Nacht bei 90°C gerührt.

Überschüssiger Allylalkohol wird abdestilliert, der Rückstand wird mit 100 mL 30%iger Natriumcarbonat-Lösung und 100 mL Dichlormethan versetzt und 30 min kräftig gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Rohprodukt im Wasserstrahlvakuum destilliert.

Ausbeute: 9.94 g (69.4 mmol, 72%), farblose Flüssigkeit

Summenformel: C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>

Molmasse: 143.18 g·mol<sup>-1</sup>

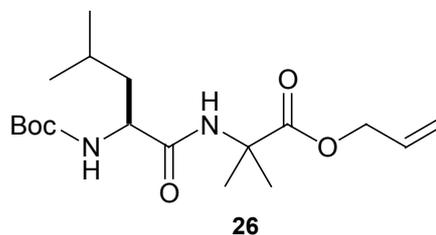
Siedepunkt: 67°C/50 mbar

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 1.37 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.95 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.61 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5.21 – 5.38 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5.93 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 27.7 (CH<sub>3</sub>), 54.8 (C-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 65.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 118.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 132.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 177.7 (C=O).

IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3363, 2975, 2935, 2875, 1729 (sst, C=O), 1648, 1465, 1259, 1145, 931 cm<sup>-1</sup>.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 144 (100, [M+H]<sup>+</sup>).



#### ***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)leucyl- $\alpha$ -aminoisobuttersäure-allylester**

In eine Lösung von 1.143 g (4.94 mmol) *N*-*tert*-(Butyloxycarbonyl)leucin, 2.570 g (4.94 mmol) PyBOP und 1.650 mL (9.45 mmol) DIPEA in 6 mL Dichlormethan (getrocknet über CaH<sub>2</sub>) werden unter Rühren bei 0°C unter einer Schutzgasatmosphäre

0.644 g (4.50 mmol)  $\alpha$ -Aminoisobuttersäureallylester (**25**) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 5 min bei 0°C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, PE/EE 1:1, Ninhydrin) verfolgt.

Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand in 70 mL Ethylacetat aufgenommen. Es wird mit 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Produkt durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 7:3) isoliert.

Ausbeute: 1.277 g (3.58 mmol, 80%), farbloser Feststoff

Summenformel: C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molmasse: 356.46 g·mol<sup>-1</sup>

Schmelzpunkt: 105-106°C

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.93 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 1.54 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.55 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.57-1.77 (m, 3H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.09 (m, 1H, Leu-C <sup>$\alpha$</sup> H), 4.62 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 5.00 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 1H, Leu-NH), 5.23 (dd, <sup>3</sup>J = 1.3 Hz, <sup>2</sup>J = 10.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 5.32 (dd, <sup>3</sup>J = 1.3 Hz, <sup>2</sup>J = 17.1 Hz, 1H, CH=CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 5.90 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 6.88 (s, 1H, Aib-NH).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 22.1 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.9 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.6 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.8 (2C, Aib-CH<sub>3</sub>), 28.3 (Boc-CH<sub>3</sub>), 41.0 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 52.9 (Leu-C <sup>$\alpha$</sup> ), 56.3 (Aib-C <sup>$\alpha$</sup> ), 66.0 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 80.0 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 118.3 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 131.9 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 155.9 (Boc-C=O), 171.8 (C=O), 173.9 (C=O).

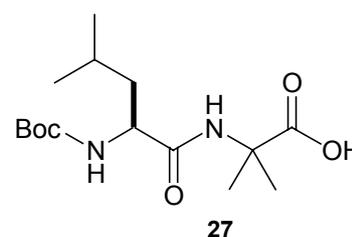
IR (KBr-Pressling):  $\tilde{\nu}$  = 3334, 3291, 2954, 2940, 1749, 1685, 1654, 1546, 1523, 1471, 1365, 1274, 1151, 1049 cm<sup>-1</sup>.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): *m/z* (%): 357 (63) [M+H]<sup>+</sup>, 301 (100) [M+H-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 257 (41) [M+H-Boc]<sup>+</sup>.

DC: R<sub>f</sub>(Ninhydrin): 0.59 (PE/EE 1:1), 0.32 (PE/EE 7:3).

$[\alpha]_D^{27} = -37.2$  (c = 1.6, THF).

Elementaranalyse (%):	C	H	N
berechnet:	60.65	9.05	7.86
gefunden:	60.65	8.91	7.82



### ***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)leucyl- $\alpha$ -aminoisobuttersäure**

Zu einer Lösung von 400 mg (1.12 mmol) Boc-Leu-Aib-OAl (**26**) in 20 mL wasserfreiem THF werden unter einer Argonatmosphäre bei etwa 40°C 127 mg (0.11 mmol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) und 628  $\mu$ L (7.21 mmol, 6.4 Äquiv.) Morpholin gegeben. Das Gemisch wird bei dieser Temperatur gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Allylester mehr nachweisbar ist (ca. 2 h).

Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, mit 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen und es wird mit 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert (2 x 20 mL). Die wäßrige Phase wird mit verd. HCl auf pH 2 angesäuert und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Entfernung des Lösungsmittels liefert einen farblosen Feststoff (286 mg, 0.90 mmol, 80%), der ohne weitere Reinigung für die folgende Reaktion eingesetzt wird. Umkristallisation aus MTBE/ACN liefert eine analysenreine Probe.

Ausbeute: 186 mg (0.59 mmol, 53%), farbloser Feststoff

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molmasse: 316.39 g·mol<sup>-1</sup>

Schmelzpunkt: 155°C (Lit.<sup>[62]</sup> 142-145°C)

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.95 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.38-1.80 (m, 3H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.44 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 1.57 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.58 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 4.26 (m, 1H, Leu-C<sup>α</sup>H), 5.36 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 1H, Leu-NH), 7.25 (s, 1H, Aib-NH), 10.02 (s, br, 1H, COOH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 22.1 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.8 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.4 (2C, Aib-CH<sub>3</sub>), 24.7 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.3 (Boc-CH<sub>3</sub>), 41.1 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 52.9 (Leu-C<sup>α</sup>), 56.7 (Aib-C<sup>α</sup>), 80.5 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.3 (Boc-C=O), 172.8 (Leu-C=O), 177.2 (Aib-C=O).

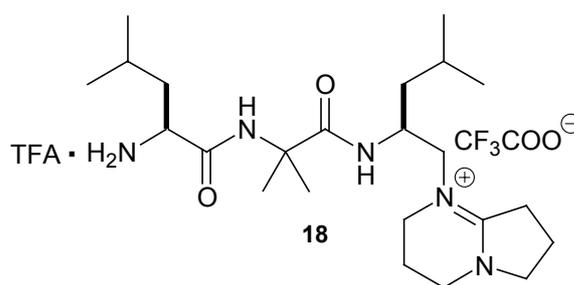
**IR** (KBr-Pressling):  $\tilde{\nu}$  = 3306, 3074, 2961, 2935, 2872, 1720, 1659, 1536, 1472, 1458, 1392, 1367, 1250, 1172, 1120, 1047, 1023, 950, 922, 874, 852, 797 cm<sup>-1</sup>.

**MS** (CI, NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 317 (38) [M+H]<sup>+</sup>, 261 (93) [M+H-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 217 (100) [M+H-Boc]<sup>+</sup>.

**HRMS** (EI, 70 eV): *m/z* = 317.2059, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>): 317.2076.

$[\alpha]_D^{25}$  = -32.0 (c = 1.0, Methanol), Lit:<sup>[62]</sup>  $[\alpha]_D^{25}$  = -30.4 (c = 1, Methanol).

Elementaranalyse (%):	C	H	N
berechnet:	56.94	8.92	8.85
gefunden:	56.91	8.65	8.82



### Leucyl- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(*S*)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat

Zu einer Lösung von 212 mg (470  $\mu$ mol, 1 Äquiv.) (*S*)-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-iodid (**23**) in 5 mL Dichlorme-

than werden bei 0°C 10 mL TFA gegeben. Die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h gerührt. Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Zu einer Lösung von 178 mg (564  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) Boc-Leu-Aib-OH (**27**) und 268 mg (705  $\mu\text{mol}$ , 1.5 Äquiv.) N-HATU in 2 mL DMF werden bei 0°C 480  $\mu\text{L}$  (2.82 mmol, 6 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach etwa 10 min wird das oben erhaltene Lyophilisat in 1 mL Dichlormethan zugegeben. Der Fortgang der Reaktion wird durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt. Wenn keine Aminokomponente mehr nachweisbar ist (1 d), werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in 2 mL Dichlormethan gelöst und mit 4 mL TFA versetzt. Nach 0.5 h wird am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 144 mg (222  $\mu\text{mol}$ , 47%), graues Pulver

Summenformel:  $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_6\text{F}_6$

Molmasse: 649.67  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.86 (d,  $^3J = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{C}_8\text{H}_3$ ), 0.88 (d,  $^3J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{C}_8\text{H}_3$ ), 0.91 (d,  $^3J = 5.8$  Hz, 3H, Leu- $\text{CH}_3$ ), 0.93 (d,  $^3J = 5.9$  Hz, 3H, Leu- $\text{CH}_3$ ), 1.13 (ddd,  $^3J = 4.2$  Hz,  $^3J = 9.4$  Hz,  $^2J = 13.7$  Hz, 1H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.40 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.61 (m, 1H,  $\text{C}^\gamma\text{H}$ ), 1.66-1.77 (m, 4H, Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.98 (m, 1H,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.09 (m, 1H,  $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.13 (m, 1H,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.23 (m, 1H,  $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.82 (ddd,  $^3J = 5.9$  Hz,  $^3J = 10.6$  Hz,  $^2J = 17.0$  Hz, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.16 (dd,  $^3J = 3.3$  Hz,  $^2J = 14.0$  Hz, 1H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.20 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.26-3.35 (m, 2H,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.47 (m, 1H,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.63 (ddd,  $^3J = 5.0$  Hz,  $^3J = 9.6$  Hz,  $^2J = 9.6$  Hz, 1H,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.74-3.81 (m, 2H,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ , Leu- $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 3.81-3.91 (m, 2H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 4.20 (m, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 7.52 (d,  $^3J = 8.5$  Hz,  $\text{C}^\alpha\text{-NH}$ ), 8.34 (s, 1H, Aib- $\text{NH}$ ), 8.89 (s, br, 3H, Leu- $\text{NH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.4 ( $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$ ), 19.2 ( $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$ ), 21.7 ( $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 22.1 (Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.6 (Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.3 ( $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 24.7 (Leu-

CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.2 (C<sup>γ</sup>H), 25.4 (2C, Aib-CH<sub>3</sub>), 31.3 (C<sup>γ2'</sup>H<sub>2</sub>), 40.1 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 40.7 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 42.8 (C<sup>α1'</sup>H<sub>2</sub>), 44.5 (C<sup>γ1'</sup>H<sub>2</sub>), 45.5 (Leu-C<sup>α</sup>), 53.9 (C<sup>α</sup>H), 55.0 (C<sup>α2'</sup>H<sub>2</sub>), 56.5 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 57.7 (Aib-C<sup>α</sup>), 165.7 (C<sup>δ2'</sup>), 169.3 (Leu-C=O), 175.2 (Aib-C=O).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS): δ [ppm] = 0.90 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 0.95 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 0.99 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.01 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.22 (ddd, <sup>3</sup>J = 4.9 Hz, <sup>3</sup>J = 10.0 Hz, <sup>2</sup>J = 13.9 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.42 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.55 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.59 (m, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.62-1.74 (m, 4H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C<sup>γ</sup>H), 2.05 (m, 2H, C<sup>β1'</sup>H<sub>2</sub>), 2.15 (m, 2H, C<sup>β2'</sup>H<sub>2</sub>), 3.05 (m, 2H, langsamer H→D-Austausch, C<sup>γ2'</sup>H<sub>2</sub>), 3.35-3.54 (m, 5H, C<sup>β'</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sub>α1'</sub>H<sub>2</sub>), 3.62 (m, 1H, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.72 (m, 1H, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.81-3.88 (m, 2H, Leu-C<sup>α</sup>H, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.39 (m, 1H, C<sup>α</sup>H).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS): δ [ppm] = 19.08 (C<sup>β2'</sup>H<sub>2</sub>), 19.86 (C<sup>β1'</sup>H<sub>2</sub>), 21.64 (C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 22.39 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.90 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.64 (C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 23.76 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.53 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.93 (C<sup>γ</sup>H), 27.43 (Aib-CH<sub>3</sub>), 31.97 (C<sup>γ2'</sup>H<sub>2</sub>), 41.03 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 41.59 (Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.48 (C<sup>α1'</sup>H<sub>2</sub>), 45.91 (C<sup>γ1'</sup>H<sub>2</sub>), 46.71 (C<sup>α</sup>H), 53.00 (Leu-C<sup>α</sup>), 55.56 (C<sup>α2'</sup>H<sub>2</sub>), 58.08 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 58.12 (Aib-C<sup>α</sup>), 165.97 (C<sup>δ2'</sup>), 170.06 (Leu-C=O), 178.82 (Aib-C=O).

MS (ESI): *m/z* = 422.3 [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 422.35.

HPLC: *t<sub>R</sub>* = 14.47 min (Methode A)

## 4.2.2 Synthese des mittleren und des N-terminalen Fragmentes

### Festphasenpeptidsynthese

Festphasenpeptidsynthesen werden manuell in einer mit Kunststoff-Fritte versehenen Spritze durchgeführt. Ausgegangen wird entweder von käuflich erworbenen bereits mit der C-terminalen Aminosäure beladenen Harzen oder von zuvor nach der unten beschriebenen Methode mit der C-terminalen Aminosäure beladenen *o*-Chlortritylchlorid-Harzen.

Synthesen am Wang-Harz werden ausgehend von käuflichem mit Fmoc-Glycin beladenem Harz (Novabiochem,  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) durchgeführt.

### **Beladung von *o*-Chlortritylchlorid-Harz**

Zur Fmoc-Aminosäure (1.5 Äquiv.) wird wenig DMF (ca.  $1 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) gegeben und die Mischung wird einige Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend werden getrocknetes Dichlormethan (ca.  $1 \text{ mL}/100 \text{ mg Harz}$ ) und DIPEA (6 Äquiv.) zugegeben. Die Lösung wird zum Harz (1 Äquiv.) gegeben und die entstehende Mischung wird 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Mischung wird mit Methanol versetzt (ca.  $100 \mu\text{L}/100 \text{ mg Harz}$ ) und nach 5 min wird das Harz abgesaugt, mit Dichlormethan (4x) und Methanol (4x) gewaschen und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Die Beladung wird aufgrund der Gewichtszunahme des Harzes bestimmt.

### **Einführung einer Aminosäure nach der Fmoc-Methode**

Zu einer Lösung der Fmoc-Aminosäure (3 Äquiv.) und des Kupplungsreagenzes (3 Äquiv., TBTU oder PyBOP) in einer möglichst geringen Menge DMF wird DIPEA (3 Äquiv.) gegeben. Die Lösung wird kräftig geschüttelt und nach etwa 30 s zum Peptidylharz gegeben. Die Mischung wird 50 min bei Raumtemperatur belassen und gelegentlich geschüttelt. Die Reaktion kann durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt werden, indem eine kleine Menge Harz entnommen, mit DMF und Dichlormethan gewaschen und mit 1% TFA in Dichlormethan das Peptid vom Harz abgespalten wird. Ist die Reaktion nicht vollständig, wird die Reaktionszeit verlängert. Nach beendeter Reaktion wird das Harz abgesaugt und mit DMF (3x), Dichlormethan (3x) und *iso*-Propanol (3x) gewaschen.

Zum Harz wird eine Lösung von 4% DBU und 4% Piperidin (ca.  $5 \text{ mL}/100 \text{ mg Harz}$ ) in DMF gegeben. Die Mischung wird 15 min bei Raumtemperatur belassen und gelegentlich geschüttelt. Das Harz wird abgesaugt und 1x mit DMF gewaschen und anschließend erneut mit einer Lösung von 4% DBU und 4% Piperidin (ca.  $5 \text{ mL}/100 \text{ mg Harz}$ ) in DMF behandelt. Die Mischung wird 15 min bei Raumtemperatur belassen und gelegentlich geschüttelt. Das Harz wird abgesaugt und mit DMF (3x), Dichlormethan (3x) und *iso*-Propanol (3x) gewaschen.

### **Einführung von $\alpha$ -Aminoisobuttersäure nach der Azidosäurechlorid-Methode**

Das Peptidylharz (1 Äquiv.) wird in einer Lösung von Triethylamin (22 Äquiv., ca. 0.7 M) in trockenem Dichlormethan gequollen und Azib-Cl (15 Äquiv.) wird langsam zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur belassen und gelegentlich geschüttelt. Das Harz wird abgesaugt und mit Dichlormethan (4x), DMF (4x) und erneut mit Dichlormethan (4x) gewaschen.

Thiophenol (30 Äquiv.) und Triethylamin (50 Äquiv.) werden zu einer Suspension von  $\text{Sn(SPh)}_2$  (10 Äquiv., ca. 0.3 M) in Dichlormethan gegeben. Nach 5 min wird die entstehende Mischung filtriert, um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Das Filtrat wird zum Harz-gebundenen Azid gegeben. Die Mischung wird 20 min bei RT belassen und gelegentlich geschüttelt. Das Harz wird abgesaugt und mit Dichlormethan (4x), DMF (4x), erneut mit Dichlormethan (4x) und *iso*-Propanol (2x) gewaschen.

### **Acetylierung des N-Terminus**

Zu einer Lösung von DMAP (20 Äquiv.) in trockenem Dichlormethan (ca. 2 mL/100 mg Harz) wird Essigsäureanhydrid (30 Äquiv.) gegeben und die Lösung wird zum Harz gegeben, 40 min bei Raumtemperatur belassen und gelegentlich geschüttelt. Das Harz wird abgesaugt und mit Dichlormethan (4x), DMF (4x), erneut mit Dichlormethan (4x) und *iso*-Propanol (2x) gewaschen.

### **Einführung der Z-Schutzgruppe in Z-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH (17)**

Zu einer Lösung von *N*-(Benzylcarbonyloxy)succinimid (Z-OSu, 10 Äquiv.) in einer 1:1-Mischung aus Dichlormethan und DMF (ca. 2 mL/100 mg Harz) wird Triethylamin (30 Äquiv.) gegeben und die Lösung wird zum Harz gegeben, 40 min bei Raumtemperatur belassen und gelegentlich geschüttelt. Das Harz wird abgesaugt und mit Dichlormethan (4x), DMF (4x), erneut mit Dichlormethan (4x) und *iso*-Propanol gewaschen.

### **Abspaltung des Rohproduktes vom *o*-Chlortritylharz mit HFIP**

Das Harz wird in Dichlormethan (ca. 2 mL/100 mg Harz) suspendiert und unter Rühren wird bei Raumtemperatur 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (ca. 0.5 mL/100 mg Harz)

zugegeben. Nach 1 h wird das Harz abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand lyophilisiert.

### Abspaltung des Rohproduktes vom *o*-Chlortritylharz mit TFA

Das Harz wird in Dichlormethan (ca. 2 mL/100 mg Harz) suspendiert und unter Rühren wird bei Raumtemperatur Trifluoressigsäure (ca. 20  $\mu$ L/100 mg Harz) zugegeben. Nach 1 h wird das Harz abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand lyophilisiert.

### Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Gly-OH (16)

Die Synthese erfolgt ausgehend von 300 mg mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.6 mmol $\cdot$ g<sup>-1</sup>, 0.18 mmol).

Ausbeute: 18.5 mg (24  $\mu$ mol, 13%)

Summenformel: C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>

Molmasse: 778.94 g $\cdot$ mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (d, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.30-1.82 (m, 13H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2xPip-C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>, 2xPip-C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>, 2xPip-C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.43 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.47 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 2.07-2.18 (m, 2H, 2xPip-C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.18 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.49 (m, 1H,  $\beta$ -Ala-C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.58 (m, 1H,  $\beta$ -Ala-C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.05 (m, 1H, Pip-C <sup>$\epsilon$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.20 (m, 1H, Pip-C <sup>$\epsilon$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.29 (m, 1H, Pip-C <sup>$\epsilon$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.71 (m, 1H, Pip-C <sup>$\epsilon$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.79 (m, 1H,  $\beta$ -Ala-C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.97 (m, 2H, Gly-C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>2</sub>), 4.05 (m, 1H,  $\beta$ -Ala-C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.19 (m, 1H, Leu-C <sup>$\alpha$</sup> H), 4.66 (m, 1H, Pip-C <sup>$\alpha$</sup> H), 5.20 (m, 1H, Pip-C <sup>$\alpha$</sup> H), 7.11 (s, 1H, Aib-NH), 7.36 (s, 1H, Aib-NH), 7.42 (t, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 1H, Gly-NH), 7.57 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, Leu-NH), 7.72 (t, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 1H,  $\beta$ -Ala-NH), 7.95 (s, 1H, Aib-NH).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 19.7 (Leu-CH<sub>3</sub>), 20.5 (Leu-CH<sub>3</sub>), 20.8 (Pip-C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>), 21.9 (Pip-C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>), 23.0 (Pip-C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>), 23.4 (Pip-C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>), 23.5 (Ac-CH<sub>3</sub>)

24.4 (Leu-C<sup>γ</sup>H), 25.40 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.45 (2C, 2x Aib-CH<sub>3</sub>), 25.5 (3C, Aib-CH<sub>3</sub>), 26.8 (Pip-C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 27.8 (Pip-C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 27.9 (β-Ala-C<sup>α</sup>H<sub>2</sub>), 36.8 (2C, β-Ala-C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, Leu-C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 40.0 (Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub>), 42.7 (Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub>), 43.0 (Gly-C<sup>α</sup>), 45.1 (Leu-C<sup>α</sup>), 52.1 (Aib-C<sup>α</sup>), 57.3 (2C, Aib-C<sup>α</sup>), 57.6 (Pip-C<sup>α</sup>), 57.8 (Pip-C<sup>α</sup>), 171.8 (C=O), 172.0 (C=O), 172.5 (C=O), 173.2 (2C, C=O), 173.9 (C=O), 175.1 (C=O), 176.0 (C=O), 176.6 (C=O).

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 779.51 [M+H]^+$ ,  $801.60 [M+Na]^+$ ,  $823.63 [M-H+2Na]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[C_{37}H_{63}N_8O_{10}]^+$ : 779.47,  $[C_{37}H_{61}N_8O_{10}Na]^+$ : 801.45,  $[C_{37}H_{62}N_8O_{10}Na_2]^+$ : 823.43.

**HPLC**:  $t_R = 17.84$  min (Methode A)

### Z-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH (17)

Die Synthese erfolgt ausgehend von 500 mg mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.6 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.30 mmol).

Ausbeute: 19 mg (33 μmol, 11%)

Summenformel: C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>

Molmasse: 575.65 g·mol<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 1.37-1.65 (m, 5H, Pip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, Pip-C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Pip-C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>), 1.39 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.40 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 6H, 2x Aib-CH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 2.19 (m, 1H, Pip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.10 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.87 (dd, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, <sup>2</sup>J = 17.5 Hz, 1H, Gly-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.98 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.05 (m, 1H, Gly-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.89 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 5.06 (d, <sup>2</sup>J = 12.1 Hz, 1H, OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 5.11 (d, <sup>2</sup>J = 12.1 Hz, 1H, OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 5.53 (s, 1H, OC=O-NH), 6.84 (s, 1H, Aib-NH), 7.26 (t, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, 1H, Gly-NH), 7.31-7.40 (m, 5H, ArH), 7.79 (s, 1H, Aib-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 20.6 (Pip-C<sup>γ</sup>), 24.8 (Pip-C<sup>δ</sup>), 24.9 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.3 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.5 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.6 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.8 (Aib-CH<sub>3</sub>), 26.3 (Aib-CH<sub>3</sub>), 27.4 (Pip-C<sup>β</sup>), 42.6 (Pip-C<sup>ε</sup>), 44.5 (Gly-C<sup>α</sup>), 56.1 (Pip-C<sup>α</sup>), 57.3 (Aib-C<sup>α</sup>),

57.5 (Aib-C<sup>α</sup>), 57.6 (Aib-C<sup>α</sup>), 67.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 128.4 (CH<sub>Ar</sub>), 128.7 (CH<sub>Ar</sub>), 129.0 (CH<sub>Ar</sub>), 136.8 (C<sub>Ar</sub>), 155.6 (NH-C=O-O), 171.8 (C=O), 172.7 (C=O), 173.7 (C=O), 175.3 (C=O), 176.3 (Gly-C=O).

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 598.38 [M+Na]^+$ ,  $620.42 [M-H+2Na]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[C_{28}H_{41}N_5O_8Na]^+$ : 598.29,  $[C_{28}H_{40}N_5O_8Na_2]^+$ : 620.27.

**HPLC**:  $t_R = 17.32$  min (Methode A)

### 4.2.3 Kondensation der Fragmente

#### TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (37)

Zu einer gerührten Lösung von 30 mg (52 μmol, 1.1 Äquiv.) Z-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH (17) und 22 mg (58 μmol, 1.2 Äquiv.) N-HATU in 0.4 mL DMF werden bei 0°C unter einer Schutzgasatmosphäre 35 μL (203 μmol, 4.2 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 5 min wird eine Lösung von 31 mg (48 μmol, 1.0 Äquiv.) TFA·H-Leu-Aib-X (18) in 1.5 mL trockenem Dichlormethan zugegeben. Der Fortgang der Reaktion wird durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt.

Nach beendeter Reaktion (1 h) werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 2 mL Methanol und 0.3 mL Essigsäure aufgenommen, mit 30 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Wird der Fortgang der Reaktion durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt, kann die Reaktion gewöhnlich nach 1-2 h abgebrochen werden.

Der Katalysator wird abfiltriert und sorgfältig mit Methanol (ca. 10-15 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 22 mg (21 μmol, 44%), farbloser Feststoff

Summenformel: C<sub>47</sub>H<sub>78</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>F<sub>6</sub>

Molmasse: 1073.17 g·mol<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.86 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 0.88 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 0.91 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.18 (ddd, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, <sup>2</sup>J = 13.5 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.31-1.82 (m, 9H, Pip-C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, Pip-C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Pip-C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>, Leu-C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, Leu-C<sup>γ</sup>H), 1.45 (s, 6H, 2x Aib-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.65 (s, 6H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.88 (ddd, <sup>3</sup>J = 4.1 Hz, <sup>3</sup>J = 10.8 Hz, <sup>2</sup>J = 13.5 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.04 (m, 1H, C<sup>β2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.08-2.23 (m, 3H, C<sup>β1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>β2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>γ</sup>H), 2.32 (m, 1H, C<sup>β1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.81 (ddd, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, <sup>3</sup>J = 10.6 Hz, <sup>2</sup>J = 16.9 Hz, 1H, C<sup>γ2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.23-3.47 (m, 6H, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>α1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>γ2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>α1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>β'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.29 (dd, <sup>3</sup>J = 3.9 Hz, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, 1H, C<sup>β'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.60 (m, 1H, C<sup>α1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.67 (ddd, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J = 9.6 Hz, <sup>2</sup>J = 9.6 Hz, 1H, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.71-3.76 (m, 2H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub>), 3.80 (m, 1H, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.86-3.95 (m, 2H, Gly-C<sup>α</sup>H<sub>2</sub>), 4.09 (m, 1H, Leu-C<sup>α</sup>H), 4.34 (m, 1H, C<sup>α</sup>H), 4.57 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 6.76 (d, <sup>3</sup>J = 9.3 Hz, 1H, C<sup>α</sup>-NH), 7.12 (s, 1H, Aib-NH), 7.70 (s, 1H, Aib-NH), 8.11 (d, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H, Leu-NH), 8.91 (s, 1H, Aib-NH), 9.28 (s, br, 3H, Aib-NH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 18.4 (C<sup>β1'</sup>H<sub>2</sub>), 19.3 (C<sup>β2'</sup>H<sub>2</sub>), 21.3 (Pip-C<sup>γ</sup>), 21.5 (2C, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.3 (C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 23.5 (3C, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>, 2x Aib-CH<sub>3</sub>), 24.3 (2C, Aib-CH<sub>3</sub>), 24.5 (Aib-CH<sub>3</sub>), 24.6 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.0 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.1 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.3 (Pip-C<sup>δ</sup>), 26.5 (Leu-C<sup>γ</sup>H), 26.8 (C<sup>γ</sup>H), 28.2 (Pip-C<sup>β</sup>), 31.3 (C<sup>γ2'</sup>H<sub>2</sub>), 39.9 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 41.6 (Leu-C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 42.8 (2C, C<sup>α1'</sup>H<sub>2</sub>, Pip-C<sup>ε</sup>), 44.4 (Gly-C<sup>α</sup>), 44.5 (C<sup>γ1'</sup>H<sub>2</sub>), 45.0 (Leu-C<sup>α</sup>), 55.2 (C<sup>α</sup>H), 55.6 (C<sup>α2'</sup>H<sub>2</sub>), 57.2 (C<sup>β'</sup>H<sub>2</sub>), 57.3 (Aib-C<sup>α</sup>), 57.5 (Aib-C<sup>α</sup>), 57.7 (Aib-C<sup>α</sup>), 57.8 (Aib-C<sup>α</sup>), 58.6 (Pip-C<sup>α</sup>), 166.1 (C<sup>δ2'</sup>), 171.8 (C=O), 173.2 (2C, C=O), 173.5 (C=O), 174.5 (C=O), 175.8 (C=O), 177.3 (C=O).

**MS** (ESI): *m/z* = 845.8 [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>43</sub>H<sub>77</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 845.60.

**HPLC**: *t<sub>R</sub>* = 18.49 min (Methode A)

**Efrapeptin C (1)**

Zu einer gerührten Lösung von 10.3 mg (13.2  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Gly-OH (**16**) und 5.0 mg (13.2  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äquiv.) N-HATU in 600  $\mu\text{L}$  DMF werden bei 0°C unter einer Schutzgasatmosphäre 5.8  $\mu\text{L}$  (33.2  $\mu\text{mol}$ , 3.3 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min werden 11.1 mg (10.3  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) TFA-H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (**37**) in 1.2 mL trockenem Dichlormethan zugegeben. Die Mischung wird über Nacht bei 0°C belassen, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 11.9 mg (6.9  $\mu\text{mol}$ , 67%), farbloser Feststoff

Summenformel:  $\text{C}_{82}\text{H}_{137}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{F}_3$

Molmasse: 1720.07  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.86 (d,  $^3J = 6.2$  Hz, 3H, CH- $\text{CH}_3$ ), 0.87 (d,  $^3J = 6.7$  Hz, 3H, CH- $\text{CH}_3$ ), 0.89 (d,  $^3J = 6.7$  Hz, 3H, CH- $\text{CH}_3$ ), 0.92 (d,  $^3J = 6.5$  Hz, 3H, CH- $\text{CH}_3$ ), 0.94 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 3H, CH- $\text{CH}_3$ ), 0.95 (d,  $^3J = 7.0$  Hz, 3H, CH- $\text{CH}_3$ ), 1.19 (ddd,  $^3J = 3.6$  Hz,  $^3J = 10.0$  Hz,  $^2J = 13.6$  Hz, 1H,  $\text{C}_\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.25-2.14 (m, 29H), 1.44 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.46 (s, 6H, 2xAib- $\text{CH}_3$ ), 1.47 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.48 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.50 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.50 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.51 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.51 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.52 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.53 (s, 3H), 1.55 (s, 6H, 2x Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.58 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 2.17 (s, 3H, Ac- $\text{CH}_3$ ), 2.26-2.38 (m, 2H), 2.73 (m, 1H), 2.79 (m, 1H), 3.01-3.11 (m, 2H), 3.20-3.44 (m, 7H), 3.54-3.72 (m, 5H), 3.76-3.83 (m, 3H), 3.89-3.97 (m, 2H), 3.98-4.08 (m, 2H), 4.12 (ddd,  $^3J = 3.8$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz,  $^2J = 11.1$  Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.36 (m, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 4.49 (m, 1H, Pip- $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 4.80 (m, 1H, Pip- $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 5.20 (m, 1H, Pip- $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 6.75 (d,  $^3J = 9.4$  Hz, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{-NH}$ ), 7.29 (s, 1H, Aib-NH), 7.15 (s, 1H, Aib-NH), 7.38 (m, 1H,  $\beta$ -Ala-NH), 7.47 (s, 1H, Aib-NH), 7.52 (d,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H, Leu-NH), 7.61 (s, 1H, Aib-NH), 7.65 (t,  $^3J = 4.5$  Hz, 1H, Gly-NH), 7.77 (s, 1H, Aib-NH), 7.84 (s, 1H, Aib-NH), 8.01 (s, 1H, Aib-NH), 8.04 (s, 1H, Aib-NH), 8.07 (d,  $^3J = 5.1$  Hz, 1H, Leu-NH).

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 1607.11$   $[\text{M}]^+$ , isotopengemittelte Masse berechnet für  $[\text{C}_{80}\text{H}_{137}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+$ : 1607.08.

**MS** (ESI-FT-ICR):  $m/z = 1606.0444$   $[M]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[C_{80}H_{137}N_{18}O_{16}]^+$ : 1606.0454.

**HPLC**:  $t_R = 22.57$  min (Methode A)

#### 4.2.4 Charakterisierung des synthetischen Efrapeptin C

##### Austausch von Trifluoracetat gegen Bromid (1a)

340 mg Bromid auf polymerem Träger ( $3.5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , 1.2 mmol, 75 Äquiv.) werden mit 100 mL Acetonitril gewaschen, abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das gewaschene Harz wird zu einer Lösung von 27.6 mg (16.0  $\mu\text{mol}$ , 1 Äquiv.) Efrapeptin C als Trifluoracetat (**1**) in 1 mL Acetonitril gegeben und 2 d bei Raumtemperatur geschüttelt.

Das Harz wird abfiltriert und mehrmals mit Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand aus Wasser lyophilisiert.

Um die Abwesenheit von Trifluoracetat im Produkt nachzuweisen, wird ein 235.4 MHz- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum bei einer Probenkonzentration von  $1.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  mit Trifluorethanol (0.5  $\mu\text{L}$  TFE/mg Probe) aufgenommen. Es lässt sich kein Trifluoracetat nachweisen. Im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum des Eduktes, das unter identischen Bedingungen ( $1.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 0.5  $\mu\text{L}$  TFE/mg Probe) aufgenommen wird, erscheint ein Singulett des Trifluoracetats bei -75.7 ppm und ein Triplett des Trifluorethanol bei -77.0 ppm im Verhältnis 1:7.

Ausbeute: 21.7 mg (12.9  $\mu\text{mol}$ , 81%)

Summenformel:  $C_{80}H_{137}N_{18}O_{16}Br$

Molmasse:  $1686.96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

##### Partielle Hydrolyse von Efrapeptin C (1) in Dichlormethan

Eine Probe von synthetischem Efrapeptin C (**1**) (ca. 10 mg) wird drei Wochen bei Raumtemperatur in 1 mL Dichlormethan aufbewahrt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand wird durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie und analytische RP-HPLC untersucht und durch präparative RP-HPLC fraktioniert.

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 564.4$  [H-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>, 675.6 [H-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>, 971.6 [Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-OH+Na]<sup>+</sup>, 1258.0 [H-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>, 1369.8 [H-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>, 1607.2 [Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>.

**HPLC** (Methode B, Peakfläche):  $t_R = 16.90$  min (28%), 18.53 min (8%), 22.86 min (16%), 24.91 min (4%), 25.72 min (7%), 32.96 min (37%).

### Partielle Hydrolyse von Efrapeptin C (1) in TFA

Eine kleine Probe von synthetischem Efrapeptin C (1) wird 10 min mit 50% TFA in Dichlormethan behandelt und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht.

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 564.9$  [H-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>, 676.1 [H-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>, 1256.5 [H-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>, 1606.7 [Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>.

### Partielle Hydrolyse von Efrapeptin C (1) in Salzsäure

Eine kleine Probe von synthetischem Efrapeptin C (1) wird 2 h mit 6 M HCl bei 90°C behandelt und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht.

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 422.8$  [H-Leu-Aib-X]<sup>+</sup>.

**HPLC**:  $t_R = 24.07$  min (Methode B)

### 4.2.5 Inhibierung der F<sub>1</sub>-ATPase aus *E. coli* durch synthetisches Efrapeptin C (1)

F<sub>1</sub>-ATPase-Komplexe aus *Escherichia coli* wurden wie in Lit<sup>[133]</sup> beschrieben hergestellt. ATPase-Aktivitäten wurden mit Hilfe eines automatisierten Assays bestimmt, bei dem die Bildung eines Molybdänblau-Komplexes photometrisch bei 578 nm detektiert wird.<sup>[99, 100]</sup> Der lineare Substratumsatz, d. h. die Bildung von anorganischem Phosphat, wurde über einen Zeitraum von 7 min bei 37°C verfolgt. Zur Kalibrierung des Systems wurde eine KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (50 μM) als Standard verwendet. Gereinigte F<sub>1</sub>-ATPase (1.2 μM in 1 mL 50 mM Tris/HCl pH 8.0) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Efrapeptin C (1) für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden

9 mL 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM ATP zugegeben und die Bildung von anorganischem Phosphat wurde wie beschrieben beobachtet.

### 4.3 Synthese und Untersuchung von Efrapeptin-Analoga

#### Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-Gly- $\beta$ -Ala-OH (44)

Die Synthese erfolgt ausgehend von 477 mg mit Fmoc- $\beta$ -Alanin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.6 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.29 mmol).

Ausbeute: 6.2 mg (8  $\mu$ mol, 3%)

Summenformel: C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>

Molmasse: 778.94 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 803.46 [M+Na]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 801.45.

**HPLC**:  $t_R = 23.50$  min (Methode C)

#### Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib- $\beta$ -Ala-Leu-Gly-OH (45)

Die Synthese erfolgt ausgehend von 150 mg mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.6 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.09 mmol).

Ausbeute: 8.1 mg (0.01 mmol, 11%)

Summenformel: C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>

Molmasse: 778.94 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 801.86 [M+Na]^+$ , 817.86 [M+K]<sup>+</sup>, 823.84 [M-H+2Na]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 801.45, [C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>K]<sup>+</sup>: 817.42, [C<sub>37</sub>H<sub>61</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 823.43.

**MS** (ESI):  $m/z = 801.3 [M+Na]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 801.45.

**HPLC**:  $t_R = 21.43$  min (Methode C)

**Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-β-HLeu-Gly-Gly-OH (46)**

Die Synthese erfolgt ausgehend von 400 mg mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.6 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.24 mmol).

Ausbeute: 40 mg (0.05 mmol, 21%)

Summenformel: C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>

Molmasse: 778.94 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 801.9$  [M+Na]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 801.45.

**HPLC**:  $t_R = 22.56$  min (Methode C)

**Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-HPhe-Gly-OH (47)**

Die Synthese erfolgt ausgehend von 162 mg mit Fmoc-Gly-OH beladenem *o*-Chlortritylharz (1.2 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.19 mmol).

Ausbeute: 21 mg (0.024 mmol, 13%)

Summenformel: C<sub>44</sub>H<sub>68</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>

Molmasse: 869.06 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (ESI):  $m/z = 869.3$  [M+H]<sup>+</sup>, 891.4 [M+Na]<sup>+</sup>, 907.3 [M+K]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>44</sub>H<sub>69</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>]<sup>+</sup>: 869.51, [C<sub>44</sub>H<sub>68</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 891.50, [C<sub>44</sub>H<sub>68</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>K]<sup>+</sup>: 907.47.

**HPLC**:  $t_R = 19.74$  min (Methode A)

**Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-Aib-Gly-OH (48)**

Die Synthese erfolgt ausgehend von 110 mg mit Fmoc-Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.6 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.07 mmol).

Ausbeute: 4.2 mg (5 μmol, 7%)

Summenformel: C<sub>38</sub>H<sub>64</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>

Molmasse: 792.96 g·mol<sup>-1</sup>

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 25.81 min (Methode C)

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.89 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.96 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.26-1.85 (m, 13H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.44 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.49 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.52 (s, 6H, 2xAib-CH<sub>3</sub>), 2.06-2.18 (m, 2H, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.20 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 3.04 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.24 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.80 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.82 (dd, <sup>2</sup>J = 17.4 Hz, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz, 1H, Gly-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.99-4.08 (m, 2H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, Leu-C<sup>α</sup>H), 4.08 (dd, <sup>2</sup>J = 17.4 Hz, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 1H, Gly-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.63 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 5.20 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 6.91 (s, 1H, Aib-NH), 7.16 (s, 1H, Aib-NH), 7.78 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 1H, Leu-NH), 7.61 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 1H, Gly-NH), 7.87 (s, 1H, Aib-NH), 7.90 (s, 1H, Aib-NH).

**MS** (ESI): *m/z* = 815.4 [M+Na]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>38</sub>H<sub>64</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 815.46.

**MS** (MALDI-TOF): *m/z* = 815.61 [M+Na]<sup>+</sup>, 831.59 [M+K]<sup>+</sup>, 837.60 [M-H+2Na]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>38</sub>H<sub>64</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 815.46, [C<sub>38</sub>H<sub>64</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>K]<sup>+</sup>: 831.44, [C<sub>38</sub>H<sub>63</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 837.45.

#### **Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Aib-OH (49)**

Die Synthese erfolgt ausgehend von 100 mg unbeladenem *o*-Chlortritylchlorid-Harz (1.9 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.19 mmol).

Zur Beladung des Harzes werden 100 mg *o*-Chlortritylchlorid-Harz (1.9 mmol·g<sup>-1</sup>, 0.19 mmol, 1 Äquiv.) in 1 mL trockenem Dichlormethan gequollen und dann werden 194 μL (1.14 mmol, 6 Äquiv.) DIPEA und 49 mg (0.38 mmol, 2 Äquiv.) α-Azidoisobuttersäure (**34**) zugegeben. Die Mischung wird 1.5 h geschüttelt und dann mit ca. 0.5 mL Methanol versetzt. Nach wenigen Minuten wird das Harz mit Dichlormethan und Methanol gewaschen.

Ausbeute: 17.9 mg (0.022 mmol, 12%)

Summenformel: C<sub>39</sub>H<sub>66</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>

Molmasse: 806.99 g·mol<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.87 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.25-1.84 (m, 13H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.44 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.47 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 6H, 2xAib-CH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 2.05-2.18 (m, 2H, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.19 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.43 (ddd, <sup>2</sup>J = 14.6 Hz, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz, 1H, β-Ala-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.51 (ddd, <sup>2</sup>J = 14.6 Hz, <sup>3</sup>J = 10.3 Hz, <sup>3</sup>J = 3.7 Hz, 1H, β-Ala-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.03 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.20-3.29 (m, 2H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.74-3.82 (m, 2H, β-Ala-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.02 (m, 1H, β-Ala-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.16 (m, 1H, Leu-C<sup>α</sup>H), 4.62 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 5.19 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 6.97 (s, 1H, Aib-NH), 7.26 (s, 1H, Aib-NH), 7.29 (s, 1H, Aib-NH), 7.60 (d, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 1H, Leu-NH), 7.90 (m, 1H, β-Ala-NH), 7.96 (s, 1H, Aib-NH).

**MS** (MALDI-TOF): *m/z* = 829.46 [M+Na]<sup>+</sup>, 851.45 [M-H+2Na]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>39</sub>H<sub>66</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup>: 829.48, [C<sub>39</sub>H<sub>65</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 851.46.

**HPLC**: *t<sub>R</sub>* = 18.20 min (Methode A)

#### **Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-Gly-β-Ala-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (38)**

Zu einer gerührten Lösung von 2.6 mg (3.3 μmol, 1.3 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-Gly-β-Ala-OH (**44**) und 1.2 mg (3.3 μmol, 1.1 Äquiv.) N-HATU in 100 μL DMF werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 1.4 μL (8.2 μmol, 3.3 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 15 min werden 2.7 mg (2.5 μmol, 1.0 Äquiv.) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (**37**) in 200 μL trockenem Dichlormethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 0°C belassen, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 1.1 mg (0.64 μmol, 26%)

Summenformel: C<sub>82</sub>H<sub>137</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub>F<sub>3</sub>

Molmasse: 1720.07 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (ESI):  $m/z = 814.6 [M+Na]^{2+}$ , 1606.2  $[M]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>80</sub>H<sub>137</sub>N<sub>18</sub>O<sub>16</sub>Na]<sup>2+</sup>: 814.52, [C<sub>80</sub>H<sub>137</sub>N<sub>18</sub>O<sub>16</sub>]<sup>+</sup>: 1606.05.

**HPLC**:  $t_R = 33.59$  min (Methode C)

#### **Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-β-Ala-Leu-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (39)**

Zu einer gerührten Lösung von 5.2 mg (6.7 μmol, 1.3 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-β-Ala-Leu-Gly-OH (**45**) und 2.5 mg (6.7 μmol, 1.3 Äquiv.) N-HATU in 400 μL DMF werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 2.9 μL (17.1 μmol, 3.3 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 15 min werden 5.6 mg (5.2 μmol, 1.0 Äquiv.) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (**37**) in 600 μL trockenem Dichlormethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 0°C belassen, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 3.7 mg (2.2 μmol, 42%)

Summenformel: C<sub>82</sub>H<sub>137</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub>F<sub>3</sub>

Molmasse: 1720.07 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 1606.81 [M]^+$ , isotopengemittelte Masse berechnet für [C<sub>80</sub>H<sub>137</sub>N<sub>18</sub>O<sub>16</sub>]<sup>+</sup>: 1607.06.

**HPLC**:  $t_R = 32.12$  min (Methode C)

#### **Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-β-HLeu-Gly-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (40)**

Zu einer gerührten Lösung von 11.1 mg (14.3 μmol, 1.3 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-β-HLeu-Gly-Gly-OH (**46**) und 5.4 mg (14.3 μmol, 1.3 Äquiv.) N-HATU in 1 mL DMF werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 6.2 μL (36.3 μmol, 3.3 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min werden 11.8 mg (11.0 μmol, 1.0 Äquiv.) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (**37**) in 1 mL trockenem Dichlormethan zugegeben. Das

Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 0°C belassen, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 1.9 mg (1.1  $\mu\text{mol}$ , 10%)

Summenformel:  $\text{C}_{82}\text{H}_{137}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{F}_3$

Molmasse:  $1720.07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**MS** (ESI):  $m/z = 815.1 [\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ ,  $1606.0 [\text{M}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{80}\text{H}_{137}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^+$ : 814.52,  $[\text{C}_{80}\text{H}_{137}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+$ : 1606.05.

**HPLC**:  $t_{\text{R}} = 36.47 \text{ min}$  (Methode C)

#### **Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -HPhe-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (41)**

Zu einer gerührten Lösung von 5.6 mg (6.4  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -HPhe-Gly-OH (**47**) und 2.4 mg (6.4  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äquiv.) N-HATU in 400  $\mu\text{L}$  DMF werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 2.8  $\mu\text{L}$  (16.2  $\mu\text{mol}$ , 3.3 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min werden 5.3 mg (4.8  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (**37**) in 1 mL trockenem Dichlormethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 0°C belassen, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 3.8 mg (2.1  $\mu\text{mol}$ , 44%)

Summenformel:  $\text{C}_{89}\text{H}_{143}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{F}_3$

Molmasse:  $1810.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**MS** (ESI):  $m/z = 859.9 [\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ ,  $1696.0 [\text{M}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{87}\text{H}_{143}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^{2+}$ : 859.54,  $[\text{C}_{87}\text{H}_{143}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+$ : 1696.09.

**HPLC**:  $t_{\text{R}} = 26.49 \text{ min}$  (Methode A)

**Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (43)**

Zu einer gerührten Lösung von 4.2 mg (5.3  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-Aib-Gly-OH (**48**) und 2.0 mg (5.3  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äquiv.) N-HATU in 400  $\mu\text{L}$  DMF werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 2.3  $\mu\text{L}$  (13.5  $\mu\text{mol}$ , 3.3 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 15 min werden 4.4 mg (4.1  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X (**37**) in 600  $\mu\text{L}$  trockenem Dichlormethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 0°C belassen und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 3.9 mg (2.2  $\mu\text{mol}$ , 54%)

Summenformel:  $\text{C}_{83}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{F}_3$

Molmasse: 1734.12  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**MS** (ESI):  $m/z = 822.0$   $[\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ , 1620.2  $[\text{M}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{81}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^{2+}$ : 821.53,  $[\text{C}_{81}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+$ : 1620.06.

**HPLC**:  $t_{\text{R}} = 36.87$  min (Methode C)

**Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Aib-NHMe (50)**

Zu einer gerührten Lösung von 8.0 mg (10  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Aib-OH (**49**) und 4.2 mg (11  $\mu\text{mol}$ , 3.3 Äquiv.) N-HATU in 900  $\mu\text{L}$  DMF werden bei 0°C 5.6  $\mu\text{L}$  (33  $\mu\text{mol}$ , 9.9 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min wird ein Drittel (300  $\mu\text{L}$ ) der Lösung der voraktivierten Carboxykomponente zu einer Mischung von 2.0 mg (30  $\mu\text{mol}$ , 9.0 Äquiv.) Methylaminhydrochlorid und 5.1  $\mu\text{L}$  (30  $\mu\text{mol}$ , 9.0 Äquiv.) DIPEA in 500  $\mu\text{L}$  getrocknetem Dichlormethan gegeben. Nach 3 h bei RT ist die Reaktion beendet, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 2.2 mg (2.7  $\mu\text{mol}$ , 81%)

Summenformel:  $\text{C}_{40}\text{H}_{69}\text{N}_9\text{O}_9$

Molmasse: 820.03  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.88 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.25-1.83 (m, 13H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.44 (s, 6H, 2xAib-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 6H, 2xAib-CH<sub>3</sub>), 1.47 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.52 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 2.05-2.20 (m, 2H, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.17 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.32 (ddd, <sup>2</sup>J = 14.2 Hz, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, <sup>3</sup>J = 2.0 Hz, 1H, β-Ala-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.47 (ddd, <sup>2</sup>J = 14.2 Hz, <sup>3</sup>J = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz, 1H, β-Ala-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.74 (d, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, 3H, NH-CH<sub>3</sub>), 3.00 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.10 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.25 (ddd, <sup>2</sup>J = 13.7 Hz, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, <sup>3</sup>J = 3.8 Hz, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.78 (m, 1H, β-Ala-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.89 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.02 (m, 1H, β-Ala-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.11 (m, 1H, Leu-C<sup>α</sup>H), 4.59 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 5.18 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 6.97 (s, 2H, 2xAib-NH), 7.23 (s, 2H, 2xAib-NH), 7.52 (d, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 1H, Leu-NH), 7.63 (m, 1H, β-Ala-NH), 7.94 (s, 1H, NH-CH<sub>3</sub>).

**MS** (ESI): *m/z* = 820.5 [M+H]<sup>+</sup>, 842.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 858.5 [M+K]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>40</sub>H<sub>70</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>: 820.53, [C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>Na]<sup>+</sup>: 842.51, [C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>K]<sup>+</sup>: 858.49.

**HPLC**: *t<sub>R</sub>* = 17.92 min (Methode A)

#### **Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Aib-NHCH<sub>2</sub>Ph (51)**

Zu einer gerührten Lösung von 8.0 mg (10 μmol, 3.0 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Aib-OH (**49**) und 4.2 mg (11 μmol, 3.3 Äquiv.) N-HATU in 900 μL DMF werden bei 0°C 5.6 μL (33 μmol, 9.9 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min wird ein Drittel (300 μL) der Lösung der voraktivierten Carboxykomponente zu einer Lösung von 3.3 μL (30 μmol, 9.0 Äquiv.) Benzylamin in 500 μL getrocknetem Dichlormethan gegeben. Nach 3 h bei Raumtemperatur ist die Reaktion beendet, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 1.8 mg (2.0 μmol, 60%)

Summenformel: C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>

Molmasse: 896.13 g·mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.83 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 0.91 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.25-1.80 (m, 13H, Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.42 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.47 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 6H, 2xAib-CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 2.05-2.23 (m, 2H, 2xPip-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.17 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.36 (ddd, <sup>2</sup>J = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J = 1.7 Hz, 1H, β-Ala-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.47 (ddd, <sup>2</sup>J = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J = 2.7 Hz, 1H, β-Ala-C<sup>α</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.99 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.12 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.24 (ddd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.78 (m, 1H, β-Ala-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.85 (m, 1H, Pip-C<sup>ε</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.97-4.08 (m, 2H, β-Ala-C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, Leu-C<sup>α</sup>H), 4.37 (dd, <sup>2</sup>J = 15.2 Hz, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 1H, NH-CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>Ph), 4.46 (dd, <sup>2</sup>J = 15.2 Hz, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 1H, NH-CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>Ph), 4.58 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 5.18 (m, 1H, Pip-C<sup>α</sup>H), 6.94 (s, 1H, Aib-NH), 7.10 (s, 1H, Aib-NH), 7.17 (s, 1H, Aib-NH), 7.19 (m, 1H, ArH), 7.25-7.34 (m, 4H, ArH), 7.51 (d, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 1H, Leu-NH), 7.65 (m, 1H, NH-CH<sub>2</sub>Ph), 7.79 (m, 1H, β-Ala-NH), 7.92 (s, 1H, Aib-NH).

MS (ESI): *m/z* = 896.5 [M+H]<sup>+</sup>, 918.6 [M+Na]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>: 896.56, [C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>Na]<sup>+</sup>: 918.54.

HPLC: *t<sub>R</sub>* = 20.76 min (Methode A)

#### Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Aib-Leu-Aib-X (52)

Zu einer gerührten Lösung von 8.0 mg (10 μmol, 3.0 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Aib-OH (**49**) und 4.2 mg (11 μmol, 3.3 Äquiv.) N-HATU in 900 μL DMF werden bei 0°C 5.6 μL (33 μmol, 9.9 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min wird ein Drittel (300 μL) der Lösung der voraktivierten Carboxykomponente zu einer Lösung von 6.5 mg (10 μmol, 3.0 Äquiv.) des C-terminalen Fragmentes (**18**) von Efrapeptin C und 1.7 μL (10 μmol, 3.0 Äquiv.) DIPEA in 500 μL getrocknetem Dichlormethan gegeben. Nach 12 h bei Raumtemperatur ist die Reaktion beendet, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 3.4 mg (2.6  $\mu\text{mol}$ , 78%)

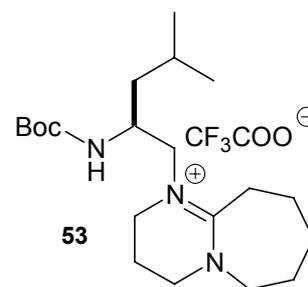
Summenformel:  $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{F}_3$

Molmasse:  $1324.62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (d,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.86 (d,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.87 (d,  $^3J = 6.4 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.90 (d,  $^3J = 6.4 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.95 (d,  $^3J = 6.4 \text{ Hz}$ , 6H,  $2 \times \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.13 (ddd,  $^2J = 13.7 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 10.0 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 3.5 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.25-2.25 (m, 24H,  $\text{C}^\gamma\text{H}$ ,  $2 \times \text{Leu-CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2 \times \text{Pip-C}^\gamma\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2 \times \text{Pip-C}^\delta\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2 \times \text{Pip-C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.43 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.46 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.47 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.48 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.49 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.50 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.51 (s, 6H,  $2 \times \text{Aib-CH}_3$ ), 1.52 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 2.17 (s, 3H, Ac- $\text{CH}_3$ ), 2.35 (m, 1H,  $\beta\text{-Ala-C}^\alpha\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.47 (m, 1H,  $\beta\text{-Ala-C}^\alpha\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.76 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.96 (m, 1H,  $\text{Pip-C}^\epsilon\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.02 (m, 1H,  $\text{Pip-C}^\epsilon\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.19-3.50 (m, 6H,  $\text{Pip-C}^\epsilon\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\beta'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.68 (m, 1H,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.72-3.83 (m, 3H,  $\beta\text{-Ala-C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{Pip-C}^\epsilon\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.90-4.09 (m, 5H,  $\beta\text{-Ala-C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2 \times \text{Leu-C}^\alpha\text{H}$ ,  $\text{C}^{\beta'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 4.36 (m, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 4.52 (m, 1H,  $\text{Pip-C}^\alpha\text{H}$ ), 5.20 (m, 1H,  $\text{Pip-C}^\alpha\text{H}$ ), 6.99 (d,  $^3J = 6.9 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{C}^\alpha\text{-NH}$ ), 7.08 (s, 1H, Aib- $\text{NH}$ ), 7.33 (s, 1H, Aib- $\text{NH}$ ), 7.40 (s, 1H, Aib- $\text{NH}$ ), 7.47 (s, 1H, Aib- $\text{NH}$ ), 7.54 (d,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ , 1H, Leu- $\text{NH}$ ), 7.72 (m, 1H,  $\beta\text{-Ala-NH}$ ), 7.95 (s, 1H, Aib- $\text{NH}$ ), 7.98 (d, 1H, Leu- $\text{NH}$ ).

**MS** (ESI):  $m/z = 617.0 [\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ , 1211.1  $[\text{M}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{62}\text{H}_{108}\text{N}_{13}\text{O}_{11}\text{Na}]^{2+}$ : 616.91,  $[\text{C}_{62}\text{H}_{108}\text{N}_{13}\text{O}_{11}]^+$ : 1210.83.

**HPLC**:  $t_R = 24.80 \text{ min}$  (Methode A)



**(*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-1-(1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en-8-yl)-4-methylpentan-trifluoroacetat**

Zu einer gerührten Lösung von 126 mg (0.39 mmol, 1.0 Äquiv.) (*S*)-2-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylamino)-4-methyl-1-iodpentan (**21**) in 3 mL Toluol werden unter einer Argonatmosphäre bei Raumtemperatur 64  $\mu$ L (0.43 mmol, 1.1 Äquiv.) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en gegeben. Die Mischung wird 1 h unter Rückfluss erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur belassen, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildet. Die überstehende Lösung wird entfernt und der Rückstand mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird durch präparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 140 mg (0.30 mmol, 77%)

Summenformel: C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>F<sub>3</sub>

Molmasse: 465.55 g·mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.89 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz, 3H, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 0.93 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 3H, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 1.19 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 9.3 Hz, <sup>2</sup>*J* = 13.8 Hz, 1H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (m, 1H, C <sup>$\gamma$</sup> H), 1.64-1.85 (m, 7H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, 3xCH<sub>2</sub>), 2.03-2.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.83 (m, 1H, C <sup>$\epsilon$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.96 (m, 1H, C <sup>$\epsilon$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.37 (dd, <sup>3</sup>*J* = 3.8 Hz, <sup>2</sup>*J* = 15.0 Hz, 1H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.44-3.50 (m, 3H, 1.5xCH<sub>2</sub>), 3.52-3.70 (m, 3H, 1.5xCH<sub>2</sub>), 3.66 (dd, <sup>3</sup>*J* = 10.7 Hz, <sup>2</sup>*J* = 15.0 Hz, 1H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.90 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 5.38 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, 1H, NH).

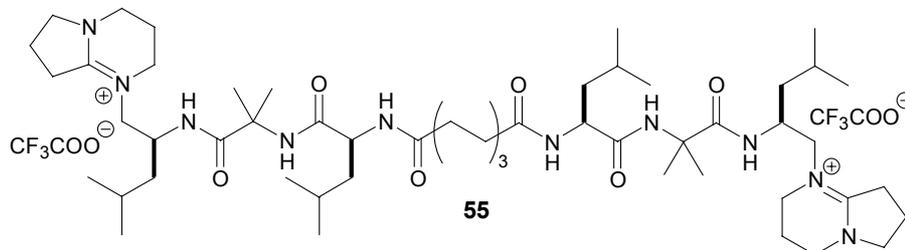
<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 20.2 (CH<sub>2</sub>), 21.7 (C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 23.2 (C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 23.5 (CH<sub>2</sub>), 25.2 (C <sup>$\gamma$</sup> H), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (Boc-CH<sub>3</sub>), 28.8 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>),

40.9 (CH<sub>2</sub>), 48.0 (C<sup>α</sup>H), 48.5 (CH<sub>2</sub>), 50.0 (CH<sub>2</sub>), 55.9 (CH<sub>2</sub>), 59.0 (CH<sub>2</sub>), 79.9 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.5 (Boc-C=O), 167.9 (N-C=N).

**MS** (ESI):  $m/z = 296.2$  [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 352.3 [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 296.23, [C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 352.30.

**HPLC**:  $t_R = 18.41$  min (Methode A)

#### 4.4 Massenspektrometrische Eigenschaften von quartären Amidiniumsalzen



##### *N,N'*-Di-[2-(*S*)-4-methylpentanoyl- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(*S*)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat]-octan-1,8-dicarboxamid

Zu einer gerührten Lösung von 5.1 mg (29  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Korksäure (**54**) und 24.3 mg (64  $\mu\text{mol}$ , 2.2 Äquiv.) N-HATU in 1 mL DMF werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 30  $\mu\text{L}$  (174  $\mu\text{mol}$ , 6.0 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min werden 38.0 mg (58  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) TFA·H-Leu-Aib-X (**18**) in 0.5 mL DMF zugegeben. Nach 1 h Reaktionszeit ist laut MALDI-TOF-MS keine Aminokomponente mehr vorhanden, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 17.7 mg (14.6  $\mu\text{mol}$ , 50%)

Summenformel:  $\text{C}_{58}\text{H}_{98}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{F}_6$

Molmasse: 1209.45  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 6H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 0.89 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 6H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 0.90 (d,  $^3J = 6.0$  Hz, 6H, Leu- $\text{CH}_3$ ), 0.94 (d,  $^3J = 6.6$  Hz, 6H, Leu- $\text{CH}_3$ ), 1.16 (ddd,  $^3J = 3.7$  Hz,  $^3J = 10.6$  Hz,  $^2J = 14.4$  Hz, 2H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.29-1.80 (m, 18H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^\gamma\text{H}$ , Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 1.34 (s, 6H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 6H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.97-2.33 (m, 12H,  $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$ ,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 2.76 (ddd,  $^3J = 5.3$  Hz,  $^3J = 10.8$  Hz,  $^2J = 17.0$  Hz, 2H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.20 (m, 2H,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.27 (dd,  $^3J = 3.9$  Hz,  $^2J = 13.9$  Hz, 2H,  $\text{C}^{\beta'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.30-3.42 (m, 4H,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ), 3.49 (dd,  $^3J$

=11.3 Hz,  $^2J=13.9$  Hz, 2H,  $C_{\beta}\text{-H}_a\mathbf{H}_b$ ), 3.67 (ddd,  $J=4.7$  Hz,  $J=9.6$  Hz,  $J=9.6$  Hz, 2H,  $C^{\alpha 2'}\text{H}_a\mathbf{H}_b$ ), 3.70-3.78 (m, 4H, Leu- $C^{\alpha}\mathbf{H}$ ,  $C^{\gamma 2'}\text{H}_a\mathbf{H}_b$ ), 3.85-3.92 (m, 4H,  $C^{\gamma 1'}\text{H}_a\mathbf{H}_b$ ,  $C^{\alpha 2'}\text{H}_a\mathbf{H}_b$ ), 4.37 (m, 2H,  $C^{\alpha}\mathbf{H}$ ), 7.00 (d,  $^3J=9.7$  Hz, 2H,  $C^{\alpha}\text{-NH}$ ), 7.62 (s, 2H, Aib- $\mathbf{NH}$ ), 8.92 (d,  $^3J=4.7$  Hz, 2H,  $C^{\alpha}\text{-NH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.4 ( $C^{\beta 1'}\text{H}_2$ ), 19.2 ( $C^{\beta 2'}\text{H}_2$ ), 21.4 ( $C^{\delta}\text{H}_3$ ), 21.8 (Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.0 (Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.5 (2C,  $C^{\delta}\text{H}_3$ , Aib- $\text{CH}_3$ ), 25.1 ( $C^{\gamma}\text{H}$ ), 25.2 (Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C=O}$ ), 28.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C=O}$ ), 28.7 (Aib- $\text{CH}_3$ ), 31.3 ( $C^{\gamma 2'}\text{H}_2$ ), 35.9 ( $\text{CH}_2\text{-C=O}$ ), 39.9 (Leu- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 41.6 ( $C^{\beta}\text{H}_2$ ), 42.8 ( $C^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ), 44.0 ( $C^{\gamma 1'}\text{H}_2$ ), 44.1 ( $C^{\alpha}\text{H}$ ), 55.2 ( $C^{\alpha 2'}\text{H}_2$ ), 56.1 (Leu- $C^{\alpha}$ ), 56.9 (Aib- $C^{\alpha}$ ), 57.0 ( $C^{\beta'}\text{H}_2$ ), 166.2 ( $C^{\delta 2'}$ ), 173.9 (NH- $\text{C=O}$ ), 175.6 (NH- $\text{C=O}$ ), 176.9 (NH- $\text{C=O}$ ).

**MS** (MALDI-TOF, DHB, Reaktionsgemisch):  $m/z = 858$   $[\text{M-C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$ , 982  $[\text{M-H}]^+$ , 1128  $[\text{M+PF}_6]^+$ , 1136  $[\text{M+C}_7\text{H}_5\text{O}_4]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{47}\text{H}_{85}\text{N}_8\text{O}_6]^+$ : 857.7,  $[\text{C}_{54}\text{H}_{97}\text{N}_{10}\text{O}_6]^+$ : 981.8,  $[\text{C}_{54}\text{H}_{98}\text{N}_{10}\text{O}_6\text{F}_6\text{P}]^+$ : 1127.7,  $[\text{C}_{61}\text{H}_{103}\text{N}_{10}\text{O}_{10}]^+$ : 1135.8.

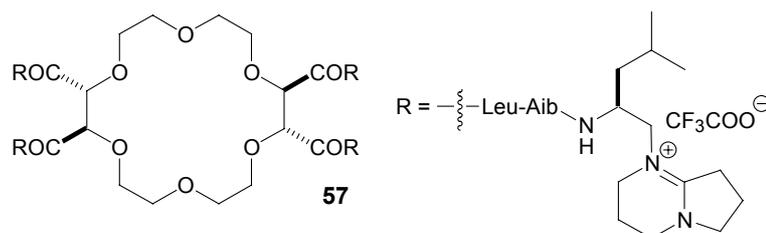
**MS** (MALDI-TOF, DHB, nach präparativer HPLC):  $m/z = 857$   $[\text{M-C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$ , 982  $[\text{M-H}]^+$ , 1136  $[\text{M+C}_7\text{H}_5\text{O}_4]^+$ .

**MS** (MALDI-TOF, CHCA, nach präparativer HPLC):  $m/z = 859$   $[\text{M-C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$ , 983  $[\text{M-H}]^+$ .

**MS** (MALDI-TOF, HABA, nach präparativer HPLC):  $m/z = 859$   $[\text{M-C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2]^+$ , 983  $[\text{M-H}]^+$ .

**MS** (ESI):  $m/z = 491.4$   $[\text{M}]^{2+}$ , 1095.7  $[\text{M+CF}_3\text{COO}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{54}\text{H}_{98}\text{N}_{10}\text{O}_6]^{2+}$ : 491.39,  $[\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{F}_3]^+$ : 1095.75.

**HPLC**:  $t_R = 19.26$  min (Methode A)



**(2*R*,3*R*,11*R*,12*R*)-*N,N',N'',N'''*,*N''''*-Tetra-[2-(*S*)-4-methylpentanoyl- $\alpha$ -amino-isobutyryl-(*S*)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat]-1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecan-2,3,11,12-tetracarboxamid**

Zu einer gerührten Lösung von 1.7 mg (3.8  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) (2*R*,3*R*,11*R*,12*R*)-1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan-2,3,11,12-tetracarbonsäure (**56**) und 6.3 mg (16.7  $\mu\text{mol}$ , 4.4 Äquiv.) N-HATU in 1 mL DMF werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 7.8  $\mu\text{L}$  (45.6  $\mu\text{mol}$ , 12 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min werden 10.0 mg (15.4  $\mu\text{mol}$ , 4.0 Äquiv.) TFA·H-Leu-Aib-X (**18**) in 1 mL Dichlormethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 0°C belassen, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 5.2 mg (2.1  $\mu\text{mol}$ , 55%)

Summenformel:  $\text{C}_{116}\text{H}_{192}\text{N}_{20}\text{O}_{26}\text{F}_{12}$

Molmasse: 2510.87  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.81 (d,  $^3J = 4.7$  Hz, 3H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 0.82 (d,  $^3J = 4.1$  Hz, 3H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 0.85 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 3H, Leu- $\text{CH}_3$ ), 0.88 (d,  $^3J = 5.9$  Hz, 3H, Leu- $\text{CH}_3$ ), 1.10 (m, 1H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.29 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.35 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.42-1.53 (m, 2H), 1.23 (m, 1H), 1.53-1.63 (m, 3H), 1.96-2.04 (m, 2H), 1.96-1.88 (m, 2H), 2.89 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.03 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.21-3.41 (m, 5H), 3.52 (m, 1H,  $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{CH}_a\text{H}_b\text{O}$ ), 3.59-3.75 (m, 5H,  $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{CH}_a\text{H}_b\text{O}$ ), 4.14 (m, 1H, O- $\text{CH-C=O}$ ), 4.22 (m, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 7.27 (d,  $^3J = 9.1$  Hz, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{-NH}$ ), 7.83 (s, 1H, 1H, Aib- $\text{NH}$ ), 8.37 (d, 1H, Leu- $\text{NH}$ ).

**MS** (ESI):  $m/z = 514.5$   $[M]^{4+}$ ,  $723.6$   $[M+CF_3COO]^{3+}$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[^{13}C_1C_{107}H_{192}N_{20}O_{18}]^{4+}$ : 514.6,  $[^{13}C_1C_{109}H_{192}N_{20}O_{20}F_3]^{3+}$ : 723.8.

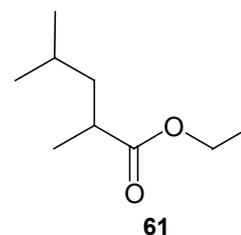
**MS** (MALDI-TOF, DHB, Reaktionsgemisch):  $m/z = 2053$   $[M-3H]^+$ ,  $2201$   $[M-2H+PF_6]^+$ ,  $2346$   $[M-H+2PF_6]^+$ ,  $2491$   $[M+3PF_6]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[^{13}C_1C_{107}H_{189}N_{20}O_{18}]^+$ : 2055.5,  $[^{13}C_1C_{107}H_{190}N_{20}O_{18}F_6P]^+$ : 2201.4,  $[^{13}C_1C_{107}H_{191}N_{20}O_{18}F_{12}P_2]^+$ : 2347.4,  $[^{13}C_1C_{107}H_{192}N_{20}O_{18}F_{18}P_3]^+$ : 2493.4.

**MS** (MALDI-TOF, DHB, nach präparativer HPLC):  $m/z = 1804$   $[M-H-2(DBN+H)]^+$ ,  $1931$   $[M-2H-(DBN+H)]^+$ ,  $2054$   $[M-3H]^+$ ,  $2209$   $[M-2H+(DHB-H)]^+$ .

**HPLC**:  $t_R = 20.56$  min (Methode A)

## 4.5 Synthese und enzymatische Racematspaltung neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide

### 4.5.1 Synthese neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide



#### 2,4-Dimethylpentansäureethylester

Zu einer Lösung von 20.2 mL (144 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylamin (von  $\text{CaH}_2$  abdestilliert) in 200 mL absolutem THF werden unter einer Schutzgasatmosphäre bei  $0^\circ\text{C}$  unter Rühren 82.5 mL (132 mmol, 1.1 Äquiv.) einer Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (1.6 M) getropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden bei  $-78^\circ\text{C}$  19.9 mL (120 mmol, 1 Äquiv.) 4-Methylpentansäureethylester (**60**) langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden 12.0 mL (192 mmol, 1.6 Äquiv.) Iodmethan langsam zugegetropft. Nach beendeter Zugabe wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird mit 100 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung, 100 mL Wasser und 150 mL Petrolether versetzt. Die Phasen werden getrennt, die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird eine farblose Flüssigkeit erhalten, die durch Destillation im Vakuum gereinigt wird.

Ausbeute: 15.13 g (96 mmol, 80%), farblose Flüssigkeit

Summenformel:  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2$

Molmasse:  $158.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

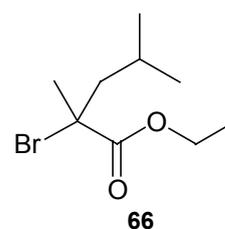
Siedepunkt:  $99^\circ\text{C}/150 \text{ mbar}$ , (Lit:<sup>[134]</sup> $105^\circ\text{C}/175 \text{ mbar}$ )

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.91 (d,  $^3J = 6.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.13 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}-\text{CH}_3$ ), 1.20 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.25 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.50-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.49 (m, 1H,  $\text{CH}-\text{C}=\text{O}$ ), 4.12 (q,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 14.3 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 17.5 ( $\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3$ ), 22.5 (2C,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 26.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 37.7 ( $\text{C}-\text{C}=\text{O}$ ), 43.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 60.1 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 177.2 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**IR** (Film):  $\tilde{\nu} = 2959, 2873, 1736$  (sst,  $\text{C}=\text{O}$ ), 1467, 1376, 1336, 1279, 1256, 1222, 1181, 1152, 1090, 1047, 1027  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 176 (100)  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 159 (45)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



### 2-Brom-2,4-dimethylpentansäureethylester

Zu einer Lösung von 16.9 mL (120 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylamin (von  $\text{CaH}_2$  abdestilliert) in 200 mL absolutem THF werden unter einer Schutzgasatmosphäre bei  $0^\circ\text{C}$  unter Rühren 68.8 mL (110 mmol, 1.1 Äquiv.) einer Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (1.6 M) getropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden bei  $-78^\circ\text{C}$  15.82 g (100 mmol, 1 Äquiv.) 2,4-Dimethylpentansäureethylester (**61**) langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend wird eine Lösung von 33.16 g (100 mmol, 1 Äquiv.) Tetra-bromkohlenstoff in 20 mL absolutem THF zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

Das Reaktionsgemisch wird mit 200 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung und 200 mL Diethylether versetzt. Die Phasen werden getrennt, die organische Phase wird mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird eine schwarze Flüssigkeit erhalten, die durch Destillation im Vakuum gereinigt wird.

Ausbeute: 20.63 g (87 mmol, 87%), farblose Flüssigkeit

Summenformel: C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>Br

Molmasse: 237.13 g·mol<sup>-1</sup>

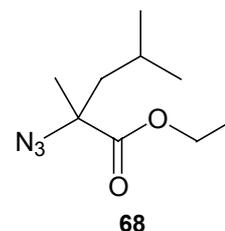
Siedepunkt: 57-60°C/1.5·10<sup>-1</sup> mbar

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.88 (d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.97 (d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.31 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.76 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.93 (s, 3H, Br-CCH<sub>3</sub>), 2.09 (dd, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, <sup>2</sup>J = 14.1 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.25 (dd, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, <sup>2</sup>J = 14.1 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.23 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 13.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.0 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.7 (Br-C-CH<sub>3</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 50.9 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 61.1 (C-Br), 62.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 171.7 (C=O).

IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 2961, 2935, 2906, 2872, 1735 (sst, C=O), 1467, 1381, 1368, 1305, 1228, 1154, 1125, 1067, 1040, 1021, 866, 669 cm<sup>-1</sup>.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): m/z (%) = 254/256 (100) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 237/239 (4) [M+H]<sup>+</sup>.



### 2-Azido-2,4-dimethylpentansäureethylester

Eine Mischung aus 6.34 g (98 mmol, 1.5 Äquiv.) Natriumazid und 15.41 g (65 mmol, 1 Äquiv.) 2-Brom-2,4-dimethylpentansäureethylester (**66**) in 100 mL DMSO wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird vorsichtig in 400 mL Wasser gegossen und mit 200 mL Diethylether versetzt. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase wird mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert.

Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird eine leicht gelbe Flüssigkeit erhalten, die ohne weitere Reinigung in der folgenden Stufe eingesetzt wird.

Ausbeute: 12.52 g (63 mmol, 97%), farblose Flüssigkeit

Summenformel: C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

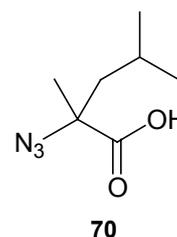
Molmasse: 199.25 g·mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.90 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 3H, N<sub>3</sub>-CCH<sub>3</sub>), 1.57-1.85 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.23 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 14.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.8 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.6 (N<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 46.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 61.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 66.2 (C-N<sub>3</sub>), 172.9 (C=O).

IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 2960, 2872, 2116 (sst, N<sub>3</sub>), 1737 (sst, C=O), 1465, 1388, 1378, 1367, 1258, 1227, 1152, 1091, 1075, 1020 cm<sup>-1</sup>.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 217 (100, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 200 (5, [M+H]<sup>+</sup>), 172 (68, [M+H-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).



### 2-Azido-2,4-dimethylpentansäure

Eine Mischung aus 9.27 g (125 mmol, 2 Äquiv.) KOH und 12.50 g (63 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2,4-dimethylpentansäureethylester (**68**) in 150 mL Ethanol und 15 mL Wasser wird 40 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird durch vorsichtige Zugabe von konz. Salzsäure bei 0°C auf pH 2 angesäuert. Die ausgefallenen organischen Salze werden durch Zugabe von Wasser gelöst und es wird mit Diethylether (3 x 60 mL)

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein zähes Öl erhalten, das ohne weitere Reinigung in der folgenden Stufe eingesetzt wird.

Ausbeute: 8.74 g (51 mmol, 81%), farbloses Öl

Summenformel: C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

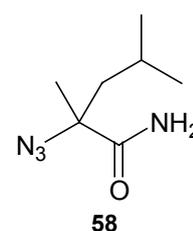
Molmasse: 171.20 g·mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.97 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.54 (s, 3H, N<sub>3</sub>-CCH<sub>3</sub>), 1.61-1.90 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 10.1 (s, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 23.0 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.4 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.8 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.7 (N<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 46.2 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 66.0 (C-N<sub>3</sub>), 179.2 (C=O).

IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 2960, 2873, 2119 (sst, N<sub>3</sub>), 1713 (sst, C=O), 1463, 1256, 1156, 1050, 920, 781 cm<sup>-1</sup>.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): m/z (%) = 189 (47) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 100 (100).



### 2-Azido-2,4-dimethylpentansäurecarboxamid

Zu einer Lösung von 7.29 g (42.6 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (**70**) in 100 mL absolutem THF werden bei -10°C unter einer Argonatmosphäre 5.91 mL (42.6 mmol, 1 Äquiv.) Triethylamin und 5.06 mL (42.6 mmol, 1 Äquiv.) Chlorkohlensäureethylester gegeben. Die entstehende Suspension wird 10 min gerührt und anschließend unter Eiskühlung in 70 mL 25%iges Ammoniakwasser gegossen. Das

Reaktionsgemisch wird unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt und nach 1 h mit 200 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein Öl erhalten, das zu einem wachsartigen Feststoff erstarrt, der aus Hexan umkristallisiert wird.

Ausbeute: 5.93 g (34.8 mmol, 82%), farbloser kristalliner Feststoff

Summenformel: C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O

Molmasse: 170.21 g·mol<sup>-1</sup>

Schmelzpunkt: 66°C

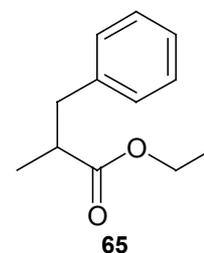
<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.92 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.00 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.54 (s, 3H, N<sub>3</sub>-CCH<sub>3</sub>), 1.59 (dd, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, <sup>2</sup>J = 14.1 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.97 (dd, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, <sup>2</sup>J = 14.1 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6.18 (s, 1H, NH), 6.50 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 23.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.5 (N<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 24.9 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 46.1 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 67.2 (C-N<sub>3</sub>), 174.9 (C=O).

IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3518, 3474, 3402, 2964, 2936, 2873, 2119 (sst, N<sub>3</sub>), 1688 (sst, C=O), 1570, 1523, 1388, 1159, 1046, 929 cm<sup>-1</sup>.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): m/z (%) = 188 (49) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 171 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

Elementaranalyse (%):	C	H	N
berechnet:	49.39	8.29	32.92
gefunden:	49.60	8.01	32.64



### 2-Benzylpropionsäureethylester

**A)** Zu einer Lösung von 33.7 mL (240 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylamin (von  $\text{CaH}_2$  abdestilliert) in 120 mL absolutem THF werden unter einer Schutzgasatmosphäre bei  $0^\circ\text{C}$  unter Rühren 138 mL (220 mmol, 1.1 Äquiv.) einer Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (1.6 M) getropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden bei  $-78^\circ\text{C}$  23.0 mL (200 mmol, 1 Äquiv.) Propionsäureethylester (**62**) langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden 23.8 mL (200 mmol, 1 Äquiv.) Benzylbromid langsam zugetropft. Es wird 1 h bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt und danach langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

Das Gemisch wird mit 150 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung versetzt, mit 250 mL MTBE extrahiert und die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein farbloses Öl erhalten, das im Vakuum destilliert wird.

Ausbeute: 14.20 g (74 mmol, 37%), farblose Flüssigkeit

**B)** Zu einer Lösung von 16.9 mL (120 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylamin (von  $\text{CaH}_2$  abdestilliert) in 150 mL absolutem THF werden unter einer Schutzgasatmosphäre bei  $0^\circ\text{C}$  unter Rühren 68.8 mL (110 mmol, 1.1 Äquiv.) einer Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (1.6 M) getropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden bei  $-78^\circ\text{C}$  17.6 mL (100 mmol, 1 Äquiv.) 3-Phenylpropionsäureethylester (**64**) langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden 9.3 mL (150 mmol, 1.5 Äquiv.) Iodmethan zugetropft.

Nach beendeter Zugabe wird 1 h bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt und anschließend langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

Das Reaktionsgemisch wird mit 200 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und mit 200 mL MTBE extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein farbloses Öl erhalten, das durch Destillation im Vakuum gereinigt wird.

Ausbeute: 13.3 g (69 mmol, 69%), farblose Flüssigkeit

Summenformel:  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$

Molmasse:  $192.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Siedepunkt:  $57\text{-}60^{\circ}\text{C}/1\cdot 10^{-1} \text{ mbar}$  (Lit:<sup>[135]</sup>  $68^{\circ}\text{C}/8\cdot 10^{-1} \text{ mbar}$ )

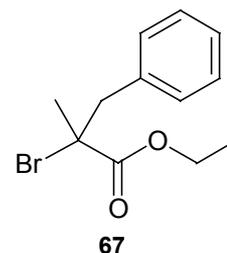
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.15 (d,  $^3J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.18 (t,  $^3J = 7.1 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.60-2.80 (m, 2H,  $\text{PhCH}_2$ ), 3.02 (m, 1H,  $\text{CH-COOEt}$ ), 4.08 (q,  $^3J = 7.1 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.10-7.32 (m, 5H,  $\text{ArH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 14.1 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 16.8 ( $\text{CHCH}_3$ ), 39.8 ( $\text{PhCH}_2$ ), 41.5 ( $\text{CHCH}_3$ ), 60.3 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 126.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 129.0 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 139.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 176.1 ( $\text{C=O}$ ).

**IR** (Film):  $\tilde{\nu} = 3086, 3063, 3029, 2978, 2936, 2876, 1733$  (sst,  $\text{C=O}$ ), 1605, 1496, 1454, 1376, 1350, 1284, 1252, 1174, 1117, 1028, 745,  $700 \text{ cm}^{-1}$ .

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 210 (100)  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 193 (50)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**DC**:  $R_f(\text{UV})$ : 0.64 (PE/EE 10:1).



### 2-Benzyl-2-bromopropionsäureethylester

Zu einer Lösung von 8.8 mL (62.4 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylamin (von  $\text{CaH}_2$  abdestilliert) in 90 mL absolutem THF werden unter einer Schutzgasatmosphäre bei  $0^\circ\text{C}$  unter Rühren 35.8 mL (57.2 mmol, 1.1 Äquiv.) einer Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (1.6 M) getropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend werden bei  $-78^\circ\text{C}$  10.0 g (52.0 mmol, 1 Äquiv.) 2-Benzylpropionsäureethylester (**65**) langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend wird eine Lösung von 17.2 g (52.0 mmol, 1 Äquiv.) Tetrabromkohlenstoff in 10 mL absolutem THF zugetropft. Es wird 30 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt und danach langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

Das Gemisch wird mit 100 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung versetzt, mit 100 mL MTBE extrahiert und die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird eine schwarze Flüssigkeit erhalten. Das Produkt wird durch Destillation im Vakuum als nahezu farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 14.31 g (quantitativ), farblose Flüssigkeit

Summenformel:  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{BrO}_2$

Molmasse:  $271.15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

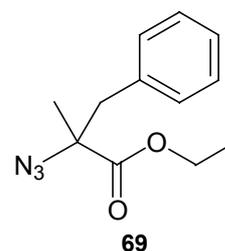
Siedepunkt:  $115^\circ\text{C}/1.6\cdot 10^{-1} \text{ mbar}$  (Lit.<sup>[136]</sup>  $85^\circ\text{C}/2\cdot 10^{-2} \text{ Torr}$ )

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.31 (t,  $^3J = 7.1 \text{ Hz}$ , 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $\text{Br-CCH}_3$ ), 3.36 (d,  $^2J = 13.8 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{PhCH}_a\text{H}_b$ ), 3.62 (d,  $^2J = 13.8 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{PhCH}_a\text{H}_b$ ), 4.24 (q,  $^3J = 7.1 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.18-7.32 (m, 5H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 13.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 27.4 ( $\text{Br-CCH}_3$ ), 48.0 ( $\text{PhCH}_2$ ), 60.2 ( $\text{C-Br}$ ), 62.1 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 127.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 130.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 135.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 171.0 ( $\text{C=O}$ ).

**IR** (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3987, 3063, 3031, 2980, 2935, 2872, 1735 (sst,  $\text{C=O}$ ), 1496, 1453, 1380, 1299, 1279, 1254, 1223, 1195, 1166, 1101, 1055, 1022, 744, 702  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 288/290 (100),  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ .



### 2-Azido-2-benzylpropionsäureethylester

Eine Mischung aus 5.15 g (79.2 mmol, 1.5 Äquiv.) Natriumazid und 14.31 g (52.8 mmol, 1 Äquiv.) 2-Brom-2-benzylpropionsäureethylester (**67**) in 150 mL DMF wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird vorsichtig in 500 mL Wasser gegossen und mit 500 mL MTBE versetzt. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase wird mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird eine leicht gelbe Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 12.23 g (52.4 mmol, 99%), leicht gelbe Flüssigkeit

Summenformel:  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$

Molmasse: 233.27  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

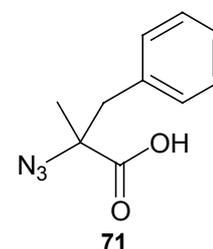
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.27 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 3H,  $\text{N}_3\text{-CCH}_3$ ), 2.98 (d,  $^2J = 13.7$  Hz, 1H,  $\text{PhCH}_a\text{H}_b$ ), 3.09 (d,  $^2J = 13.7$  Hz, 1H,  $\text{PhCH}_a\text{H}_b$ ), 4.21 (q,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.17-7.32 (m, 5H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 14.1 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.3 ( $\text{N}_3\text{-CCH}_3$ ), 43.8 ( $\text{PhCH}_2$ ), 62.0 ( $\text{C-N}_3$ ), 66.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 127.2 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 130.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 135.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 172.1 ( $\text{C=O}$ ).

**IR** (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3088, 3064, 3032, 2983, 2937, 2874, 2114 (sst,  $\text{N}_3$ ), 1739 (sst,  $\text{C=O}$ ), 1497, 1454, 1378, 1254, 1195, 1109, 1019, 860, 767, 743, 702  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 91 (100),  $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ .

**DC**:  $R_f(\text{UV})$ : 0.56 (PE/EE 10:1), 0.20 (PE/EE 30:1).



### 2-Azido-2-benzylpropionsäure

Eine Mischung aus 6.49 g (87.6 mmol, 2 Äquiv.) KOH und 10.23 g (43.8 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2-benzylpropionsäureethylester (**69**) in 120 mL Ethanol und 20 mL Wasser wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und 10 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird durch vorsichtige Zugabe von konz. Salzsäure bei  $0^\circ\text{C}$  auf pH 2 angesäuert. Die ausgefallenen organischen Salze werden durch Zugabe von Wasser gelöst und es wird mit 200 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein zähes Öl erhalten, das zu einem farblosen Feststoff erstarrt.

Ausbeute: 5.27 g (25.7 mmol, 59%), farbloser Feststoff

Summenformel:  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$

Molmasse: 205.21  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt:  $51^\circ\text{C}$

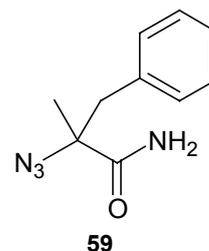
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.51 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.01 (d,  $^2J = 13.7$  Hz, 1H,  $\text{PhCH}_a\text{H}_b$ ), 3.15 (d,  $^2J = 13.7$  Hz, 1H,  $\text{PhCH}_a\text{H}_b$ ), 7.20-7.35 (m, 5H, ArH), 9.55 (s, br, 1H, COOH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 22.1 ( $\text{CH}_3$ ), 43.5 ( $\text{PhCH}_2$ ), 66.7 ( $\text{C-N}_3$ ), 127.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 130.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 134.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 178.0 ( $\text{C=O}$ ).

**IR** (Film):  $\tilde{\nu} = 3032, 2110$  (sst,  $\text{N}_3$ ), 1711 (sst,  $\text{C=O}$ ), 1497, 1454, 1413, 1257, 1120,  $700\text{ cm}^{-1}$ .

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 223 (1) [ $\text{M}+\text{NH}_4$ ] $^+$ , 134 (100).

**DC**:  $R_f(\text{UV})$ : 0.48 (PE/EE 8:1+2% AcOH).



### 2-Azido-2-benzylpropionsäurecarboxamid

Zu einer Lösung von 4.52 g (22.0 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2-benzylpropionsäure (**71**) in 60 mL absolutem THF werden bei  $-10^\circ\text{C}$  unter einer Argonatmosphäre 3.66 mL (26.4 mmol, 1.2 Äquiv.) Triethylamin und 2.51 mL (26.4 mmol, 1.2 Äquiv.) Chlorkohlensäureethylester gegeben. Die entstehende Suspension wird 10 min gerührt und anschließend unter Eiskühlung in 25 mL 25%iges Ammoniakwasser gegossen. Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt und nach 1 h mit 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein farbloser Feststoff erhalten, der aus Hexan/Chloroform umkristallisiert wird.

Ausbeute: 2.78 g (13.6 mmol, 62%), farbloser Feststoff

Summenformel:  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$

Molmasse: 204.23 g·mol<sup>-1</sup>

Schmelzpunkt: 97°C

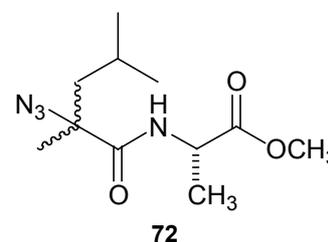
<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 1.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.95 (d, <sup>2</sup>J = 13.7 Hz, 1H, PhCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.24 (d, <sup>2</sup>J = 13.7 Hz, 1H, PhCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 5.77 (s, br, 1H, NH), 6.24 (s, br, 1H, NH), 7.20–7.35 (m, 5H, ArH).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 22.4 (CH<sub>3</sub>), 44.2 (PhCH<sub>2</sub>), 68.0 (C-N<sub>3</sub>), 127.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (CH<sub>Ar</sub>), 130.2 (CH<sub>Ar</sub>), 135.2 (C<sub>Ar</sub>), 174.1 (C=O).

IR (KBr-Pressling):  $\tilde{\nu}$  = 3473, 3416, 3294, 3220, 2120 (sst, N<sub>3</sub>), 1687, 1627, 1495, 1455, 1217, 1099, 909, 757, 737, 704 cm<sup>-1</sup>.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 222 (96) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 205 (89) [M+H]<sup>+</sup>.

Elementaranalyse (%):	C	H	N
berechnet:	58.81	5.92	27.43
gefunden:	58.83	5.89	27.35



### **(R)-2-Azido-2,4-dimethylpentanoyl-L-alaninmethylester und (S)-2-Azido-2,4-dimethylpentanoyl-L-alaninmethylester**

**A)** Zu einer Lösung von 200 mg (1.17 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (**70**) in 4 mL absolutem Dichlormethan werden unter einer Argonatmosphäre bei -10°C 162 µL (1.17 mmol, 1 Äquiv.) Triethylamin und 111 µL (1.17 mmol, 1 Äquiv.) Chlorkohlensäureethylester gegeben. Die entstehende Suspension wird 10 min gerührt und anschließend werden 181 mg (1.76 mmol, 1.5 Äquiv.) L-Alaninmethylesterhydrochlorid und 244 µL (1.76 mmol, 1.5 Äquiv.) Triethylamin zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Nach beendeter Reaktion wird mit 20 mL Dichlormethan versetzt und mit 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein Öl erhalten, das durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 10:1) gereinigt wird.

Ausbeute: 85 mg (0.33 mmol, 28%), farbloses Öl

**B)** Zu einer Lösung von 200 mg (1.17 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (**70**) und 139 mg (0.47 mmol, 0.4 Äquiv.) BTC (Bis(trichlormethyl)carbonat, Triphosgen) in 4 mL absolutem Dichlormethan werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 616 µL (4.68 mmol, 4 Äquiv.) *sym*-Collidin gegeben. Die entstehende Suspension wird 10 min gerührt und anschließend werden 181 mg (1.76 mmol, 1.5 Äquiv.) L-Alaninmethylesterhydrochlorid in 1 mL DMF zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Es wird mit 40 mL Diethylether versetzt und mit Wasser gewaschen (2x). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein Öl erhalten, das durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 10:1) gereinigt wird.

Ausbeute: 172 mg (0.67 mmol, 57%), farbloses Öl

Summenformel: C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molmasse: 256.30 g·mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.87 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *S,S*), 0.88 (d, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *R,S*), 0.99 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *S,S*), 1.00 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *R,S*), 1.42 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 3H, Ala-C<sup>α</sup>-CH<sub>3</sub>, *S,S*), 1.43 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 3H, Ala-C<sup>α</sup>-CH<sub>3</sub>, *R,S*), 1.53 (s, 6H, N<sub>3</sub>-CCH<sub>3</sub>, beide Diastereomere), 1.58 (dd, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, <sup>2</sup>J = 14.3 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *R,S*), 1.59 (dd, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, <sup>2</sup>J = 14.4 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *S,S*), 1.73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *S,S*), 1.75 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *R,S*), 1.98 (dd, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, <sup>2</sup>J = 14.3 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *R,S*), 2.00 (dd, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, <sup>2</sup>J = 14.4 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *S,S*), 3.75 (s, 3H, Ala-OCH<sub>3</sub>, *R,S*), 3.76 (s, 3H, Ala-OCH<sub>3</sub>, *S,S*), 4.53

(dq,  $^3J = 7.3$  Hz,  $^3J = 7.3$  Hz, 1H, Ala-C $^\alpha$ H, *R,S*), 4.54 (dq,  $^3J = 7.2$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, Ala-C $^\alpha$ H, *S,S*), 7.06 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, 1H, NH, *R,S*), 7.10 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, 1H, NH, *S,S*).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.16 (Ala-C $^\alpha$ -CH $_3$ , *R,S*), 18.25 (Ala-C $^\alpha$ -CH $_3$ , *S,S*), 23.26 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , *S,S*), 23.40 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , *R,S*), 23.49 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , *R,S*), 23.57 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , *S,S*), 24.51 ( $\text{N}_3\text{-C-CH}_3$ , *S,S*), 24.60 ( $\text{N}_3\text{-C-CH}_3$ , *R,S*), 24.78 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , *R,S*), 24.88 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , *S,S*), 46.14 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , beide Diastereomere), 48.10 (Ala-C $^\alpha$ , *R,S*), 48.19 (Ala-C $^\alpha$ , *S,S*), 52.42 ( $\text{OCH}_3$ , *R,S*), 52.49 ( $\text{OCH}_3$ , *S,S*), 67.29 ( $\text{N}_3\text{-C}$ , *S,S*), 67.37 ( $\text{N}_3\text{-C}$ , *R,S*), 171.24 (NH-C=O, *S,S*), 171.28 (NH-C=O, *R,S*), 172.92 ( $\text{COOCH}_3$ , *R,S*), 173.07 ( $\text{COOCH}_3$ , *S,S*).

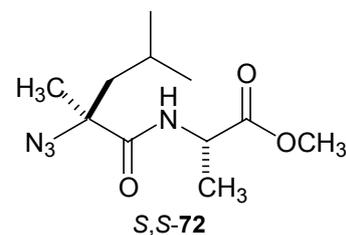
**IR** (Film):  $\tilde{\nu} = 3348, 2957, 2873, 2116$  (sst,  $\text{N}_3$ ), 1746 (sst, C=O), 1670, 1517, 1454, 1275, 1215, 1151, 1058  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 274 (5)  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 257 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**DC**:  $R_f$ (Ninhydrin): 0.29 (PE/EE 10:1).

**HPLC**:  $t_R = 21.83, 22.13$  min (Methode A)

Elementaranalyse (%):	C	H	N
berechnet:	51.55	7.87	21.86
gefunden:	51.60	7.60	21.47



### (*S*)-2-Azido-2,4-dimethylpentanoyl-L-alaninmethylester

Zu einer Lösung von 50 mg (0.29 mmol, 1 Äquiv.) (*S*)-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (*S*-70) und 35 mg (0.12 mmol, 0.4 Äquiv.) BTC in 1.5 mL absolutem Dichlormethan werden bei 0°C unter einer Argonatmosphäre 155  $\mu\text{L}$  (1.16 mmol, 4 Äquiv.) *sym*-Collidin gegeben. Die entstehende Suspension wird 10 min gerührt und anschließend werden 46 mg (0.44 mmol, 1.5 Äquiv.) L-Alaninmethylesterhydrochlorid in

1 mL DMF zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es werden erneut 10 mg (0.03 mmol, 0.1 Äquiv) BTC zugegeben und nach 15 min werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt wird durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 10:1) isoliert.

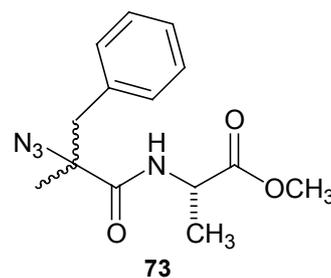
Ausbeute: 50 mg (0.20 mmol, 69%), farbloses Öl

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (d,  $^3J = 6.6$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.99 (d,  $^3J = 6.6$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.42 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 3H, Ala-C $_{\alpha}$ -CH<sub>3</sub>), 1.53 (s, 3H, N<sub>3</sub>-CCH<sub>3</sub>), 1.59 (dd,  $^3J = 6.3$  Hz,  $^2J = 14.4$  Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.72 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.00 (dd,  $^3J = 6.3$  Hz,  $^2J = 14.4$  Hz, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.76 (s, 3H, Ala-OCH<sub>3</sub>), 4.54 (dq,  $^3J = 7.2$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, Ala-C $^{\alpha}$ H), 7.10 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.20 (Ala-C $^{\alpha}$ -CH<sub>3</sub>), 23.27 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.58 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.53 (N<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 24.89 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 46.15 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 48.19 (Ala-C $^{\alpha}$ ), 52.50 (OCH<sub>3</sub>), 67.30 (N<sub>3</sub>-C), 171.24 (NH-C=O), 173.09 (COOCH<sub>3</sub>).

**HPLC:**  $t_R = 20.92$  min (Methode A)

Sonstige analytische Daten sind identisch mit denen des Diastereomerengemisches.



**(R)-2-Azido-2-benzylpropionyl-L-alaninmethylester** und **(S)-2-Azido-2-benzylpropionyl-L-alaninmethylester**

**A)** Zu einer Lösung von 513 mg (2.50 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2-benzylpropionsäure (**71**) in 4 mL absolutem Dichlormethan werden unter einer Argonatmosphäre bei -10°C 347  $\mu$ L (2.50 mmol, 1 Äquiv.) Triethylamin und 238  $\mu$ L (2.50 mmol, 1 Äquiv.) Chlorkohlensäureethylester gegeben. Die entstehende Suspension wird 20 min gerührt und

anschließend werden 523 mg (3.75 mmol, 1.5 Äquiv.) L-Alaninmethylesterhydrochlorid und 520  $\mu\text{L}$  (3.75 mmol, 1.5 Äquiv.) Triethylamin in 6 mL DMF zugegeben. Das Gemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach beendeter Reaktion wird mit 30 mL Ethylacetat versetzt und mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lösung, ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein Öl erhalten, das durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 3:1) gereinigt wird.

Ausbeute: 401 mg (1.38 mmol, 55%), farbloses Öl

**B)** Zu einer Lösung von 205 mg (1.00 mmol, 1 Äquiv.) 2-Azido-2-benzylpropionsäure (**71**) und 119 mg (0.40 mmol, 0.4 Äquiv.) BTC (Bis(trichlormethyl)carbonat, Triphosgen) in 5 mL absolutem Dichlormethan werden bei  $0^\circ\text{C}$  unter einer Argonatmosphäre 527  $\mu\text{L}$  (4.00 mmol, 4 Äquiv.) *sym*-Collidin gegeben. Die entstehende Suspension wird 10 min gerührt und anschließend werden 209 mg (1.50 mmol, 1.5 Äquiv.) L-Alaninmethylesterhydrochlorid in 1 mL DMF zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Es wird mit 50 mL Diethylether versetzt und mit Wasser gewaschen (2x). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird ein Öl erhalten, das durch Flashchromatographie (Kieselgel, PE/EE 4:1) gereinigt wird.

Ausbeute: 207 mg (0.71 mmol, 71%), farbloses Öl

Summenformel:  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$

Molmasse:  $290.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.15 (d,  $^3J = 7.2 \text{ Hz}$ , 3H, Ala- $\text{C}^\alpha$ - $\text{CH}_3$ ), 1.37 (d,  $^3J = 7.2 \text{ Hz}$ , 3H, Ala- $\text{C}^\alpha$ - $\text{CH}_3$ ), 1.58 (s, 3H,  $\text{N}_3$ -C- $\text{CH}_3$ ), 1.63 (s, 3H,  $\text{N}_3$ -C- $\text{CH}_3$ ), 2.94 (d,  $^2J = 13.8 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b$ ), 2.97 (d,  $^2J = 13.8 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b$ ), 3.20 (d,  $^2J = 13.8 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b$ ), 3.23 (d,  $^2J = 13.8 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b$ ), 3.67 (s, 3H, Ala-O $\text{CH}_3$ ), 3.70 (s, 3H, Ala-O $\text{CH}_3$ ), 4.44 (dq,  $^3J = 7.2 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 7.2 \text{ Hz}$ , 1H, Ala- $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 4.45 (dq,  $^3J$

= 7.3 Hz,  $^3J = 7.3$  Hz, 1H, Ala-C $^{\alpha}$ H), 6.77 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H, NH), 6.86 (d,  $^3J = 7.1$  Hz, 1H, NH), 7.16-7.32 (m, 10H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 17.99 (Ala-C $^{\alpha}$ -CH $_3$ ), 18.27 (Ala-C $^{\alpha}$ -CH $_3$ ), 22.12 (N $_3$ -C-CH $_3$ ), 22.58 (N $_3$ -C-CH $_3$ ), 44.21 (Ph-CH $_2$ ), 44.26 (Ph-CH $_2$ ), 48.00 (Ala-C $^{\alpha}$ ), 48.19 (Ala-C $^{\alpha}$ ), 52.39 (Ala-OCH $_3$ ), 52.43 (Ala-OCH $_3$ ), 67.85 (N $_3$ -C), 68.12 (N $_3$ -C), 127.14 (CH $_{\text{Ar}}$ ), 127.16 (CH $_{\text{Ar}}$ ), 128.24 (CH $_{\text{Ar}}$ , beide Diastereomere), 130.19 (CH $_{\text{Ar}}$ ), 130.25 (CH $_{\text{Ar}}$ ), 135.18 (C $_{\text{Ar}}$ ), 135.33 (C $_{\text{Ar}}$ ), 170.36 (NH-C=O), 170.89 (NH-C=O), 172.55 (COOCH $_3$ ), 172.89 (COOCH $_3$ ).

**IR** (Film):  $\tilde{\nu} = 3406, 3354, 3062, 3030, 2989, 2953, 2879, 2848, 2116$  (sst, N $_3$ ), 1745 (sst, C=O), 1674, 1518, 1454, 1377, 1271, 1213, 1167, 1090, 1061, 743, 702  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS** (CI, NH $_3$ ):  $m/z$  (%) = 308 (22) [M+NH $_4$ ] $^+$ , 291 (100) [M+H] $^+$ .

**DC**:  $R_f$ (UV): 0.77 (PE/EE 1:1), 0.49 (PE/EE 3:1).

**HPLC**:  $t_R = 21.01, 22.10$  min (Methode A)

Elementaranalyse (%):	C	H	N
berechnet:	57.92	6.25	19.30
gefunden:	57.90	5.95	19.06

#### 4.5.2 Enzymatische Racematspaltung neuer $\alpha,\alpha$ -dialkylierter $\alpha$ -Azidocarboxamide

##### Enzymatische Racematspaltung von 2-Azido-2,4-dimethylpentansäurecarboxamid (58) und 2-Azido-2-benzylpropionsäurecarboxamid (59) im analytischen Maßstab

(Diese Experimente wurden von den Forschern der Firma DSM in Geleen (Niederlande) durchgeführt.) Zu einer 30 mM Lösung des Substrats in einer Pufferlösung (pH 8) bestehend aus 0.1 M HEPES/NaOH und 1.0 mM ZnSO<sub>4</sub> wird das gleiche Volumen einer Lösung von *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 L-Amidase gegeben und 198 h bei 55°C gerührt. Die HPLC-Analyse ergibt:

2-Azido-2,4-dimethylpentansäurecarboxamid (58): 31% Umsatz, 93% e.e. für (*S*)-70

2-Azido-2-benzylpropionsäurecarboxamid (59): 28% Umsatz, 23% e.e. für (*S*)-71

##### Enzymatische Racematspaltung von 2-Azido-2,4-dimethylpentansäurecarboxamid (58) im präparativen Maßstab

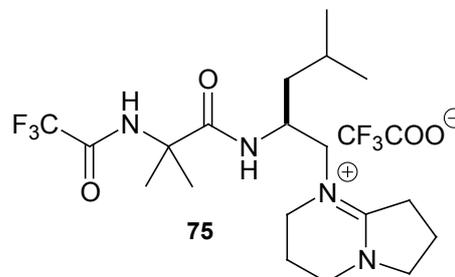
Zu einer Mischung aus 1.39 g (8.17 mmol) *rac*-2-Azido-2,4-dimethylpentansäurecarboxamid *rac*-58 und 520 mL Pufferlösung (pH 8) bestehend aus 0.1 M HEPES/NaOH und 1.0 mM ZnSO<sub>4</sub> werden 27 mL (entspricht ca. 55 mg Enzym) einer Lösung von *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 L-Amidase gegeben. Nach 2 d Rühren bei 55°C wird eine Probe von 2 mL entnommen und zum Anhalten der Reaktion mit 2 mL Methanol versetzt. Die HPLC-Analyse ergibt 25% Umsatz. Daraufhin werden erneut 27 mL Enzym-Lösung (entspricht ca. 55 mg Enzym) zugegeben. Nach weiteren 5 d Rühren bei 55°C ergibt die HPLC-Analyse einen Umsatz von 45%. Trotz Zugabe von weiteren 20 mL Enzym-Lösung wird kein weiterer Fortgang der Reaktion beobachtet und der Reaktionsansatz wird aufgearbeitet.

Ausgefallenes Protein wird abfiltriert und das Filtrat wird mit Chloroform extrahiert (3x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels werden 690 mg (4.05 mmol, 50%) cremefarbenes (*R*)-2-Azido-2,4-dimethylpentansäurecarbox-

amid (*R*)-**58** erhalten, dessen HPLC-Analyse einen Enantiomerenüberschuss von 95% ergibt.

Das oben erhaltene Filtrat wird mit konz. Salzsäure auf pH 1 angesäuert und mit Chloroform extrahiert (3x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels werden 670 mg (3.91 mmol, 48%) *S*-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure *S*-**70** erhalten, deren HPLC-Analyse einen Enantiomerenüberschuss von >96% ergibt. Eine kleine Probe wird in Methanol gelöst und mit Ammoniumformiat und Palladium auf Aktivkohle (5%ig) behandelt. Die HPLC-Analyse des erhaltenen  $\alpha$ -Methy lleucins (**74**) ergibt einen Enantiomerenüberschuss von >98%. Der Vergleich mit authentischen Proben von racemischem  $\alpha$ -Methy lleucin (*rac*-**74**) und (*S*)- $\alpha$ -Methy lleucin ((*S*)-**74**) bestätigt die *S*-Konfiguration der erhaltenen Aminosäure und damit auch der zuvor erhaltenen Azidosäure ((*S*)-**70**).

#### 4.6 Chirale $\alpha,\alpha$ -dialkylierte $\alpha$ -Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese



##### Trifluoracetyl- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(*S*)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat

Zu einer Lösung von 68 mg (130  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Boc-Aib-X (**24**) in 1 mL Dichlormethan wird bei 0°C 1 mL TFA gegeben. Nach 0.5 h wird am Rotationsverdampfer eingengt, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Zu einer gerührten Lösung von 32 mg (156  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) *rac*-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (*rac*-**70**) und 19 mg (65  $\mu\text{mol}$ , 0.5 Äquiv.) BTC (Bis(trichlormethyl)carbonat, Triphosgen) in 1 mL Dichlormethan werden unter einer Argonatmosphäre bei 0°C 55  $\mu\text{L}$  (416  $\mu\text{mol}$ , 3.2 Äquiv.) *sym*-Collidin gegeben. Nach 5 min wird das oben erhaltene Lyophilisat gelöst in 2 mL Dichlormethan zugegeben. Die Mischung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Da die Analyse des Reaktionsgemisches durch MALDI-TOF-MS ergibt, dass noch Aminosäurekomponente vorhanden ist, werden nochmals 19 mg (65  $\mu\text{mol}$ , 0.5 Äquiv.) BTC sowie 71  $\mu\text{L}$  (416  $\mu\text{mol}$ , 3.2 Äquiv.) DIPEA zugegeben. Nach 0.5 h werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert. Neben der trifluoracetylierten Verbindung **75** werden 3.5 mg (6  $\mu\text{mol}$ , 5%) **76** isoliert.

Ausbeute: 28 mg (54  $\mu\text{mol}$ , 42%)

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_4$

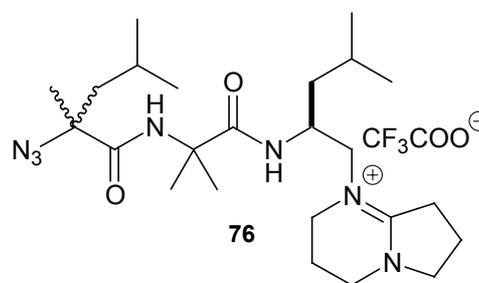
Molmasse: 518.49  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.86 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 0.90 (d,  $^3J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 1.11 (ddd,  $^2J = 14.7$  Hz,  $^3J = 10.8$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.51 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.54 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.56-1.57 (m, 2H,  $\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^\gamma\text{H}$ ), 1.96-2.25 (m, 4H,  $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$ ,  $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$ ), 2.87 (m, 1H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.16-3.25 (m, 3H,  $\text{C}^{\beta'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.29-3.42 (m, 2H,  $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ), 3.59-3.67 (m, 2H,  $\text{C}^{\beta'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.77-3.86 (m, 2H,  $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ) 4.35 (m, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 8.02 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H,  $\text{C}^\alpha\text{-NH}$ ), 8.37 (s, 1H, Aib-NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.1 ( $\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_2$ ), 19.1 ( $\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_2$ ), 21.5 ( $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 23.3 ( $\text{C}^\delta\text{H}_3$ ), 24.2 (Aib- $\text{CH}_3$ ), 25.1 ( $\text{C}^\gamma\text{H}$ ), 25.4 (Aib- $\text{CH}_3$ ), 31.2 ( $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_2$ ), 40.6 ( $\text{C}^\beta\text{H}_2$ ), 42.7 ( $\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_2$ ), 44.3 ( $\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_2$ ), 45.0 ( $\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 55.0 ( $\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_2$ ), 56.9 ( $\text{C}^{\beta'}\text{H}_2$ ), 58.3 (Aib- $\text{C}^\alpha$ ), 116.0 (q,  $^1J = 287$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 157.1 (q,  $^2J = 36.8$  Hz,  $\text{CF}_3\text{-C=O}$ ), 165.5 ( $\text{C}^{\delta 2'}$ ), 174.2 (Aib- $\text{C=O}$ ).

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 405.24$  [ $\text{M}$ ] $^+$ , monoisotopische Masse berechnet für [ $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}_3$ ] $^+$ : 405.25.

**HPLC**:  $t_R = 16.04$  min (Methode A)



**(R)-2-Azido-2,4-dimethylpentanoyl- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(S)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat und (S)-2-Azido-2,4-dimethylpentanoyl- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(S)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat**

Zu einer Suspension von 11.3 mg (21.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Boc-Aib-X (**24**) in 5 mL Wasser werden bei  $0^\circ\text{C}$  2 mL konz. Salzsäure gegeben. Der Fortgang der Reaktion wird durch MALDI-TOF-MS verfolgt. Nach beendeter Reaktion wird mit Wasser verdünnt und der Rückstand lyophilisiert.

Zu einer gerührten Lösung von 4.4 mg (25.9  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) *rac*-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure (*rac*-**70**) und 3.2 mg (10.8  $\mu\text{mol}$ , 0.5 Äquiv.) BTC (Bis(trichlormethyl)carbonat, Triphosgen) in 1 mL Dichlormethan werden unter einer Argonatmosphäre bei 0°C 18.2  $\mu\text{L}$  (138.2  $\mu\text{mol}$ , 6.4 Äquiv.) *sym*-Collidin gegeben. Nach 10 min wird das oben erhaltene Lyophilisat gelöst in 1 mL Dichlormethan zugegeben. Die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und es wird erneut 1 mg (3.4  $\mu\text{mol}$ , ca. 0.2 Äquiv.) BTC zugegeben. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 6.1 mg (10.6  $\mu\text{mol}$ , 49%)

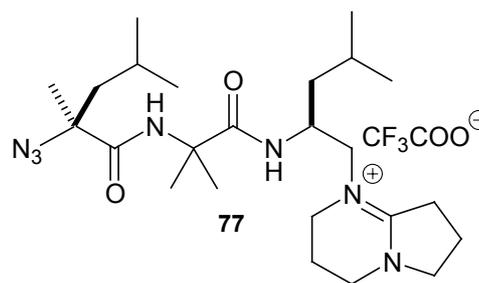
Summenformel:  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_4\text{F}_3$

Molmasse: 575.67  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**MS** (ESI):  $m/z = 462.4$   $[\text{M}]^+$ , monoisotopische Masse berechnet für  $[\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_2]^+$ : 462.36.

**HPLC**:  $t_{\text{R}} = 21.58, 21.71$  min (Methode A)

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (d,  $^3J = 5.7$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.86 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.89 (d,  $^3J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.91 (d,  $^3J = 5.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.93 (d,  $^3J = 6.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.96 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.98 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.00 (d,  $^3J = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.14 (m, 2H,  $2\times\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.42 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.44 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 3H, ( $\alpha$ -Me)Leu- $\text{C}^\alpha$ - $\text{CH}_3$ ), 1.46 (s, 3H, ( $\alpha$ -Me)Leu- $\text{C}^\alpha$ - $\text{CH}_3$ ), 1.52 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.55 (s, 3H, Aib- $\text{CH}_3$ ), 1.58-1.68 (m, 4H,  $2\times\text{C}^\gamma\text{H}$ ,  $2\times\text{C}^\beta\text{H}_a\text{H}_b$ ), 1.75-1.84 (m, 6H,  $2\times(\alpha\text{-Me)Leu-CH}_a\text{H}_b\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.97-2.06 (m, 2H,  $2\times\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.07-2.17 (m, 4H,  $2\times\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2\times\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.17-2.25 (m, 2H,  $2\times\text{C}^{\beta 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 2.98-3.07 (m, 2H,  $\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.21 (m, 2H,  $2\times\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.25-3.40 (m, 8H,  $2\times\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2\times\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2\times\text{C}^{\gamma 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2\times\text{C}^{\alpha 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.66 (m, 2H,  $2\times\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.70-3.80 (m, 6H,  $2\times\text{C}^{\gamma 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2\times\text{C}^{\alpha 2'}\text{H}_a\text{H}_b$ ,  $2\times\text{C}^{\beta 1'}\text{H}_a\text{H}_b$ ), 4.30-4.40 (m, 2H,  $2\times\text{C}^\alpha\text{H}$ ), 6.95 (s, 1H, Aib-NH), 7.01 (s, 1H, Aib-NH), 7.38 (d,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H,  $\text{C}^\alpha$ -NH), 7.44 (d,  $^3J = 9.1$  Hz, 1H,  $\text{C}^\alpha$ -NH).



**(S)-2-Azido-2,4-dimethylpentanoyl- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(S)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat**

Zu einer Suspension von 120 mg (230  $\mu\text{mol}$ ) Boc-Aib-X (**24**) in 0.5 mL Wasser werden bei 0°C 3 mL konz. Salzsäure gegeben. Der Fortgang der Reaktion wird durch MALDI-TOF-MS verfolgt. Nach beendeter Reaktion (1 h) wird mit Wasser verdünnt und der Rückstand lyophilisiert. Masse des Rückstandes: 55 mg (entspricht 143  $\mu\text{mol}$ , 62%, 1 Äquiv. des Hydrochlorides).

Zu einer gerührten Lösung von 30 mg (172  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) S-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure ((S)-**70**) und 21 mg (72  $\mu\text{mol}$ , 0.5 Äquiv.) BTC (Bis(trichlormethyl)carbonat, Triphosgen) in 1 mL Dichlormethan werden unter einer Argonatmosphäre bei 0°C 121  $\mu\text{L}$  (915  $\mu\text{mol}$ , 6.4 Äquiv.) *sym*-Collidin gegeben. Nach 5 min wird das oben erhaltene Lyophilisat gelöst in 1 mL Dichlormethan und 1 mL DMF zugegeben. Die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und nach 2 h werden erneut 11 mg (36  $\mu\text{mol}$ , 0.25 Äquiv.) BTC zugegeben und es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ist die Reaktion laut MALDI-TOF-MS-Analyse noch nicht vollständig, werden nochmals 15 mg (86  $\mu\text{mol}$ , 0.6 Äquiv.) S-2-Azido-2,4-dimethylpentansäure ((S)-**70**) wie oben beschrieben mit 11 mg (36  $\mu\text{mol}$ , 0.25 Äquiv.) BTC und 60  $\mu\text{L}$  (458  $\mu\text{mol}$ , 3.2 Äquiv.) *sym*-Collidin in Dichlormethan aktiviert und zum Reaktionsgemisch gegeben. Es wird übers Wochenende bei Raumtemperatur gerührt, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 39 mg (68  $\mu\text{mol}$ , 30%)

Summenformel:  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_4\text{F}_3$

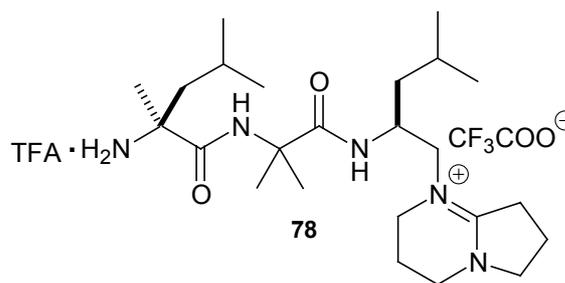
Molmasse: 575.67  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 0.85 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 0.89 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 0.90 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, (α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.00 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, (α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.13 (ddd, <sup>2</sup>J = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J = 3.9 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 3H, (α-Me)Leu-C<sup>α</sup>-CH<sub>3</sub>), 1.55 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.58-1.72 (m, 2H, C<sup>γ</sup>H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.75-1.86 (m, 3H, (α-Me)Leu-CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.98-2.25 (m, 4H, C<sup>β1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>β2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.13 (ddd, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J = 9.9 Hz, <sup>2</sup>J = 17.4 Hz, 1H, C<sup>γ2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.23 (dd, <sup>3</sup>J = 3.3 Hz, <sup>2</sup>J = 14.3 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.27-3.40 (m, 4H, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>α1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>γ2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>α1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.67 (m, 1H, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.73-3.81 (m, 2H, C<sup>γ1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C<sup>α2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.86 (dd, <sup>3</sup>J = 11.2 Hz, <sup>2</sup>J = 14.3 Hz, 1H, C<sup>β</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.37 (m, 1H, C<sup>α</sup>H), 7.17 (s, 1H, Aib-NH), 7.75 (d, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, 1H, C<sup>α</sup>-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS): δ [ppm] = 18.6 (C<sup>β2'</sup>H<sub>2</sub>), 19.2 (C<sup>β1'</sup>H<sub>2</sub>), 21.5 (C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 23.4 ((α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.5 ((α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.0 (C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 24.2 (Aib-CH<sub>3</sub>), 24.5 (Aib-CH<sub>3</sub>), 25.0 ((α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.1 ((α-Me)Leu-C<sup>α</sup>-CH<sub>3</sub>), 25.7 (C<sup>γ</sup>H), 31.3 (C<sup>γ2'</sup>H<sub>2</sub>), 40.4 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 42.8 ((α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.0 (C<sup>α1'</sup>H<sub>2</sub>), 45.6 (C<sup>α</sup>H), 55.0 (C<sup>α2'</sup>H<sub>2</sub>), 57.2 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 57.6 (Aib-C<sup>α</sup>), 67.4 ((α-Me)Leu-C<sup>α</sup>), 165.7 (C<sup>δ2'</sup>), 171.5 ((α-Me)Leu-C=O), 175.4 (Aib-C=O).

**MS** (ESI): *m/z* = 462.3 [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 462.35

**HPLC**: *t<sub>R</sub>* = 21.26 min (Methode A)



**$\alpha$ -Methyleucyl- $\alpha$ -aminoisobutyryl-(*S*)-isobutyl-(1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en-5-yl)-ethylamin-trifluoracetat**

Eine Lösung von 10 mg (17  $\mu$ mol) **77** in 4 mL Methanol wird mit 10 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt und unter einer Argonatmosphäre 2 h kräftig gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird durch MALDI-TOF-MS verfolgt. Der Katalysator wird abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand durch präparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 6.0 mg (8.3  $\mu$ mol, 49%)

Summenformel: C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>F<sub>6</sub>

Molmasse: 662.69 g·mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.84 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 0.88 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 0.91 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H, ( $\alpha$ -Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, ( $\alpha$ -Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.13 (m, 1H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.44 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, Aib-CH<sub>3</sub>), 1.53 (s, 3H, ( $\alpha$ -Me)Leu-C <sup>$\alpha$</sup> -CH<sub>3</sub>), 1.53-1.64, m, 2H, C <sup>$\gamma$</sup> H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.71-1.81 (m, 2H, ( $\alpha$ -Me)Leu-CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 1.85 (dd, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, 1H, ( $\alpha$ -Me)Leu-CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.02 (m, 1H, C <sup>$\beta$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.08-2.20 (m, 2H, C <sup>$\beta$ 1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\beta$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.26 (m, 1H, C <sup>$\beta$ 1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.83 (ddd, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J = 10.4 Hz, <sup>2</sup>J = 17.0 Hz, 1H, C <sup>$\gamma$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.19-3.30 (m, 3H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\gamma$ 1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\alpha$ 1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.31-3.45 (m, 2H, C <sup>$\gamma$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\alpha$ 1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.61-3.70 (m, 2H, C <sup>$\alpha$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\gamma$ 1'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.79-3.89 (m, 2H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, C <sup>$\alpha$ 2'</sup>H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.32 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 7.07 (d, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> -NH), 7.74 (s, 1H, Aib-NH), 8.96 (s, br, 3H, ( $\alpha$ -Me)Leu-NH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS):  $\delta$  [ppm] = 18.6 (C <sup>$\beta$ 2'</sup>H<sub>2</sub>), 19.3 (C <sup>$\beta$ 1'</sup>H<sub>2</sub>), 21.5 (C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>), 21.7 (( $\alpha$ -Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.2 (( $\alpha$ -Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.0

(C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub>), 24.1 (2C, Aib-CH<sub>3</sub>), 24.3 ((α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.1 ((α-Me)Leu-C<sup>α</sup>-CH<sub>3</sub>), 26.8 (C<sup>γ</sup>H), 31.2 (C<sup>γ2</sup>H<sub>2</sub>), 40.4 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 42.8 ((α-Me)Leu-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 44.8 (C<sup>α1</sup>H<sub>2</sub>), 45.4 (C<sup>α</sup>H), 46.9 (C<sup>γ1</sup>H<sub>2</sub>), 55.0 (C<sup>α2</sup>H<sub>2</sub>), 57.0 (C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>), 58.2 (Aib-C<sup>α</sup>), 60.9 ((α-Me)Leu-C<sup>α</sup>), 165.7 (C<sup>δ2</sup>), 170.5 ((α-Me)Leu-C=O), 175.1 (Aib-C=O).

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = 436.3 [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 435.36.

**HPLC**:  $t_R$  = 13.49 min (Methode A)

#### **TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-(α-Me)Leu-Aib-X (80)**

Zu einer gerührten Lösung von 14.2 mg (24.7 μmol, 1.1 Äquiv.) Z-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH (**17**) und 10.3 mg (27.0 μmol, 1.2 Äquiv.) N-HATU in 1.5 mL DMF werden bei 0°C unter einer Schutzgasatmosphäre 16.1 μL (94.5 μmol, 4.2 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min wird eine Lösung von 14.9 mg (22.5 μmol, 1.0 Äquiv.) TFA·H-(α-Me)Leu-Aib-K (**78**) in 1.5 mL trockenem Dichlormethan zugegeben. Die Mischung wird über Nacht bei 0°C belassen.

Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in 3 mL Methanol und 0.3 mL Essigsäure aufgenommen, mit 10 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre 1 h kräftig gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt.

Der Katalysator wird abfiltriert und sorgfältig mit Methanol (ca. 10-15 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 12.3 mg (11.3 μmol, 50%)

Summenformel: C<sub>48</sub>H<sub>80</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>F<sub>6</sub>

Molmasse: 1087.20 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (ESI):  $m/z$  = 859.7 [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>44</sub>H<sub>79</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 859.61.

**HPLC**:  $t_R$  = 17.17 min (Methode A)

**Ac-(Pip-Aib-)<sub>2</sub>Aib-Leu-β-Ala-Gly-Aib<sub>2</sub>-Pip-Aib-Gly-(α-Me)Leu-Aib-X (81)**

Zu einer gerührten Lösung von 3.1 mg (4.0 μmol, 1.3 Äquiv.) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-β-Ala-Gly-OH (**16**) und 1.5 mg (4.0 μmol, 1.3 Äquiv.) N-HATU in 500 μL DMF werden bei 0°C unter einer Schutzgasatmosphäre 1.7 μL (10.2 μmol, 3.3 Äquiv.) DIPEA gegeben. Nach 10 min werden 3.4 mg (3.1 μmol, 1.0 Äquiv.) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-(α-Me)Leu-Aib-X (**80**) in 500 μL trockenem Dichlormethan zugegeben. Die Mischung wird über Nacht bei 0°C belassen, die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative RP-HPLC isoliert.

Ausbeute: 3.6 mg (2.1 mmol, 67%)

Summenformel: C<sub>83</sub>H<sub>139</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub>F<sub>3</sub>

Molmasse: 1734.10 g·mol<sup>-1</sup>

**MS** (ESI):  $m/z = 1620.4$  [M]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse berechnet für [C<sub>81</sub>H<sub>139</sub>N<sub>18</sub>O<sub>16</sub>]<sup>+</sup>: 1620.06.

**HPLC**:  $t_R = 23.25$  min (Methode A)

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] P. Nuhn, *Naturstoffchemie: mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*, Hirzel, Stuttgart, **1997**.
- [2] a) K. C. Nicolaou, E. J. Sorensen, *Classics in Total Synthesis*, VCH, Weinheim **1996**; b) K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger, P. S. Baran, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 46-126; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 44-122.
- [3] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [4] I. L. Karle, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 693-701.
- [5] I. L. Karle, J. L. Flippen-Anderson, K. Uma, M. Sukumar, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9350-9356.
- [6] I. L. Karle, J. L. Flippen-Anderson, K. Uma, P. Balaram, *Biopolymers* **1993**, *33*, 401-407.
- [7] C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2744-2745.
- [8] Übersichten: a) D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 2015-2022; b) S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180; c) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. de Grado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232 d) D. J. Hill, M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes, J. S. Moore, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893-4011.
- [9] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [10] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [11] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [12] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457-461; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441-445.
- [13] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [14] E. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, *J. Peptide Res.* **1999**, *53*, 507-517.

- [15] a) B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5013-5016; b) B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2401-2403; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2307-2309; c) N. Sewald, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4855-4857; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4661-4663.
- [16] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [17] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, Y. Wenquing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [18] M. Mergler, R. Tamer, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 4005-4008.
- [19] a) D. Y. Jackson, J. Vurnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243-247 ; b) V. Cerovsky, F. Bordusa, *J. Peptide Res.* **2000**, *55*, 325.
- [20] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-149.
- [21] P.E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [22] H. Brückner, W. A. König, M. Greiner, G. Jung, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 508-509; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 476-477.
- [23] W. König, R. Greiner, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [24] K. Ananda, H. N. Gopi, V. V. S. Babu, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, *5*, 277-283.
- [25] D. Obrecht, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 102-115.
- [26] V. Moretto, G. Valle, M. Crisma, G. M. Bonora, C. Toniolo, *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, *14*, 178-184.
- [27] K. Inouye, K. Watanabe, H. Otsuka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*, 3873-3882.
- [28] M.T. Leplawy, D. S. Jones, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, *Tetrahedron* **1960**, *11*, 39-51.
- [29] a) P. Wipf, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 13-23; b) H. Heimgartner, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 271-297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 238-265.
- [30] E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M.-N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.

- [31] C. Auvin-Guette, E. Frérot, J. Coste, S. Rebuffat, P. Jouin, B. Bodo, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2481-2482.
- [32] a) V. V. S. Babu, H. N. Gopi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1049-1050; b) K. Ananda, H. N. Gopi, V. V. S. Babu, *Lett. Pept. Sc.* **1998**, *5*, 277-283.
- [33] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuch, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.
- [34] M. Meldal, M. A. Juliano, A. M. Jansson, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2531-2534.
- [35] V. Santagada, F. Fiorino, E. Perissutti, B. Severino, V. de Filippis, B. Vivencio, G. Caliendo, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5171-5173.
- [36] a) A. C. Richardson, *Methods Carbohydr. Chem.* **1972**, *6*, 218-224; b) S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836-863.
- [37] J. Zaloom, D. C. Roberts, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5173-5176.
- [38] P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6029-6032.
- [39] J. T. Lundquist, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 781-783.
- [40] J. W. Wilt, M. D. Tufano, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2601-2603.
- [41] a) I. Bosch, P. Romea, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4671; b) I. Bosch, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Chem. Comm.* **1995**, 91-92.
- [42] a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010; b) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [43] a) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941; b) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9-12; c) M. B. Soellner, B. L. Nilson, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993-4996.
- [44] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [45] B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268-5269.
- [46] D. T. S. Rijkers, H. H. R. van Vugt, H. J. F. Jacobs, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3657-3660.
- [47] J. T. Lundquist, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 781-783.
- [48] C. W. Tornøe, P. Davis, F. Porreca, M. Meldal, *J. Peptide Sc.* **2000**, *6*, 549-602.

- [49] A. DalPozzo, M. Ni, L. Muzi, A. Caporale, R. de Castiglione, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, F. Formaggio, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6372-6375.
- [50] V. Matha, A. Jegorov, M. Kiess, H. Brückner, *Tissue and Cell* **1992**, *24*, 559-564.
- [51] a) C. E. Meyer, F. Reusser, *Experientia* **1967**, *23*, 85-86; b) R. C. Pandey, J. C. Cook, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8469-8483; c) R. O. Fox, F. M. Richards, *Nature* **1982**, *300*, 325-330.
- [52] M. Ritzau, S. Heinze, K. Dornberger, A. Berg, N. Fleck, B. Schlegel, A. Hartl, U. Gräfe, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 722-728.
- [53] R. C. Pandey, H. Meng, J. C. Cook, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5203-5205.
- [54] K. Dornberger, W. Ihm, M. Ritzau, U. Gräfe, B. Schlegel, W. F. Fleck, J. W. Metzger, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 977-989.
- [55] K. L. Rinehart, L. A. Gaudioso, M. L. Moore, R. C. Pandey, J. C. Cook, M. Barber, R. D. Segwick, R. S. Bordoli, A. N. Tyler, B. N. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6517-6520.
- [56] J. K. Chugh, H. Brückner, B. A. Wallace, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12934-12941.
- [57] K. L. Rinehart, L. A. Gaudioso, M. L. Moore, R. C. Pandey, J. C. Cook, M. Barber, R. D. Segwick, R. S. Bordoli, A. N. Tyler, B. N. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6517-6520.
- [58] a) A. Wiest, D. Grzegorski, B. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D. J. Ebbola, B. Bodos, C. Kenerley, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20862-20868; b) M. A. Marahiel, T. Stachelhaus, H. D. Mootz, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2651-2673.
- [59] D. S. Cafiso, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 141-165.
- [60] z. B. a) A. D. Milov, Y. D. Tsvetkov, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, J. Raap, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3843-3848; b) J. K. Chugh, H. Brückner, B. A. Wallace, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12934-12941.
- [61] a) T. M. Balasubramanian, N. C. E. Kendrick, M. Taylor, G. R. Marshall, J. E. Hall, I. Vodyanoy, F. Reusser, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6127-6132; b) B. F. Gisin, D. G. Davis, Z. K. Borowska, J. E. Hall, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*

- 1981**, *103*, 6373-6377; c) R. Nagaraj, P. Balaram, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 1263-1270.
- [62] H. Schmitt, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 321-344.
- [63] a) S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 707-709; b) S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2306-23013.
- [64] a) S. B. Krasnoff, S. Gupta, *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*, 1953-1962; b) S. B. Krasnoff, S. Gupta, *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1727-1741.
- [65] M. V. Uma, R. Sudha, P. Balaram, *J. Peptide Res.* **2001**, *58*, 375-379.
- [66] D. A. Bullough, G. G. Jackson, P. J. F. Henderson, R. B. Beechey, E. Linnett, *FEBS Lett.* **1982**, *145*, 258-262.
- [67] M. V. Uma, R. Sudha, P. Balaram, *J. Peptide Res.* **2001**, *58*, 375-379.
- [68] a) H. Lucero, W. I. M. Lescano, R. H. Vallejos, *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *186*, 9-14; b) H. Lucero, R. A. Ravizzini, R. H. Vallejos, *FEBS Lett.* **1976**, *68*, 141-144.
- [69] a) P. E. Linnett, R. B. Beechey, *Methods Enzymol.* **1979**, *55*, 472-518; b) H. Lardy, P. Reed, C.-H. C. Lin, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1975**, *34*, 1707-1710.
- [70] a) J. G. Wise, T. M. Duncan, L. Richardson, D. N. Cox, A. E. Cox, *Biochem. J.* **1983**, *215*, 343-350; b) T. Saishu, Y. Kagawa, R. Shimizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*, 822-826.
- [71] a) V. Matha, J. Weiser, J. Olejnicek, *Folia Parasitol.* **1988**, *35*, 379-381; A. R. Bandani, B. P. S. Khambay, J. L. Faull, R. Newton, M. Deadman, T. M. Butt, *Mycol. Res.* **2000**, *104*, 537-544.
- [72] G. Nagaraj, M. V. Uma, M. S. Shivayogi, H. Balaram, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 145-149.
- [73] A. E. Papathanassiou (Ergon Pharmaceuticals LLC), U. S. Patent **2003**, 6528489.
- [74] J. P. Abrahams, S. K. Buchanan, M. J. van Raau, I. M. Fearnley, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9420-9424.

- [75] E. Benedetti, R. Iacovino, M. Saviano, J. Kamphuis, M. Crisma, F. Formaggio, V. Moretto, C. Toniolo, *Protein Pept. Lett.* **1996**, 3, 283-288.
- [76] Y. Hayakawa, H. Adachi, J. W. Kim, K. Shin-ya, H. Seto, *Tetrahedron* **1998**, 54, 15871-15878.
- [77] M. Jost, *Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2000**.
- [78] O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org. Synth.* **1985**, 63, 160-170.
- [79] A. Sutherland, C. L. Willis, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7764-7769.
- [80] a) H. Loibner, E. Zbiral, *Helv. Chim. Acta* **1976**, 59, 2100-2113; b) O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28.
- [81] a) R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, G. Palumbo, *Tetrahedron* **1995**, 51, 12337-12350; b) R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, G. Palumbo, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 167-168.
- [82] R. Appel, *Angew. Chem.* **1975**, 87, 863-874; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14, 801-812.
- [83] R. W. Alder, R. B. Sessions, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 1121-1124.
- [84] G. A. Reynolds, F. D. Saeva, J. J. Doney, C. H. Chen, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4843-4848.
- [85] H. Oediger, F. Möller, K. Eiter, *Synthesis* **1972**, 591-596.
- [86] T. Huber, *Konformationsanalyse von Efrapeptin C mit NMR und molekulardynamischen Rechnungen*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2002**.
- [87] K. Hiroi, J. Abe, K. Suya, S. Sato, T. Koyama, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 203-213.
- [88] C. Elschenbroich, A. Salzer, *Organometallchemie*, Teubner, Stuttgart **1988**, S. 430 ff.
- [89] a) M. Bartra, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5941-5944; b) M. Bartra, P. Romea, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron* **1990**, 46, 587-594.
- [90] J. E. Gurst in *The chemistry of the azido group*, S. Patai Hg., Wiley Interscience, London, New York, Sydney, Toronto, **1971**, 191-202.
- [91] N. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody, *Circular Dichroism – Principles and Applications*, VCH, Weinheim **1994**.

- [92] a) S. Thennarasu, R. Nagaraj, *Biopolymers* **1997**, *41*, 635-645; b) A. Jasanoff, A. R. Fersht, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2129-2135.
- [93] F. Formaggio, Universität Padua, persönliche Mitteilung.
- [94] J. E. Walker, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2438-2450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2308-2319.
- [95] J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter, *Nature* **1994**, *370*, 621-628.
- [96] M. J. van Raaij, J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6913-6917.
- [97] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita, *Nature* **1997**, *386*, 299-302.
- [98] K. Steffens, E. Schneider, G. Deckers-Hebestreit, K. Altendorf, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5866-5969.
- [99] A. Arnold, H. U. Wolf, B. P. Ackermann, H. Bader, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 209-213.
- [100] K. Steffens, E. Schneider, B. Herkenhoff, R. Schmid, K. Altendorf, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 617-622.
- [101] D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.
- [102] D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, D. R. Powell, X. Huang, J. J. Barchi, S. H. Gellman, *Nature* **1997**, *387*, 381-384.
- [103] D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.
- [104] a) D. Seebach, K. Gademann, J. V. Schreiber, J. L. Matthews, T. Hintermann, B. Jaun, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033-2039; b) D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J. L. Matthews, J. V. Schreiber, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932-982.
- [105] Karl Gademann, Andreas Häne, Magnus Rueping, B. Jaun, D. Seebach, *Angew. Chem* **2003**, *115*, 1573-1575; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1534-1537.
- [106] D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, B. Jaun, *Angew. Chem* **1999**, *111*, 1700-1703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1595-1597.
- [107] D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043-2066.

- [108] C. Isernia, E. Bucci, L. de Napoli, P. di Lello, R. Iacovino, D. Montesarchio, G. Piccialli, F. Rossi, M. Saviano, E. Benedetti, *J. Phys. Org. Chem* **1999**, *12*, 577-587.
- [109] F. Rossi, E. Bucci, C. Isernia, M. Saviano, R. Iacovino, A. Romanelli, P. di Lello, M. Grimaldi, D. Montesarchio, L. de Napoli, G. Piccialli, E. Benedetti, *Biopolymers* **2000**, *53*, 140-149.
- [110] A. Romanelli, I. Garella, V. Menchise, R. Iacovino, M. Saviano, D. Montesarchio, C. Didierjean, P. di Lello, F. Rossi, E. Benedetti, *J. Peptide Sc.* **2001**, *7*, 15-26.
- [111] a) A. Isogai, A. Suzuki, S. Tamura, S. Higashikawa, S. Kuyama, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1984**, 1405-1411; b) S. Cerrini, D. Lamba, A. Scatturin, C. Rossi, G. Ughetto, *Biopolymers* **1989**, *28*, 409-420 c) G. Vertuani, C. Falcomer, M. Boggian, G. Pochetti, S. Cerrini, M. Ricci, C. Rossi, A. Scatturin, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, *33*, 162-170; d) P. Csermely, L. Radics, C. Rossi, M. Szamel, M. Ricci, K. Mihaly, J. Smogyi, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1221*, 125-132.
- [112] A. Müller, C. Vogt, N. Sewald, *Synthesis* **1998**, 837-841.
- [113] Übersichtsartikel zur stereoselektiven Synthese von  $\beta$ -Aminosäuren: M. Liu, M. P. Sibi, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7991-8035.
- [114] a) R. E. Babine, S. L. Bender, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1359-1472; b) A. R. Leach, *Molecular Modelling – Principles and Applications*, Pearson Education, Harlow, **2001**.
- [115] J. Schröder, *Protein/Ligand Docking-Algorithmen zur Vorhersage von Struktur-Wirkungs-Beziehungen einiger Efrapeptin C-Analoga*, Graduiertenkolleg Bioinformatik, Universität Bielefeld, **2001**.
- [116] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.
- [117] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 337-366.
- [118] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer, *J. Mass. Spectrom.* **2000**, *35*, 1-12.
- [119] a) Z.-H. Huang, J. Wu, K. W. Roth, Y. Yang, D. A. Gage, J. T. Watson, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 137-144; b) Z.-H. Huang, T. Shen, J. Wu, D. A. Gage, J. T.

- Watson, *Anal. Biochemistry* **1999**, *268*, 305-317; c) T. L. Shen, J. Allison, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 145-152.
- [120] R. C. Beavis, T. Chaudhary, B. T. Chait, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 156-158.
- [121] a) C. Cativiela, M. D. Diaz-de-Villegas, *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9*, 3517-3599; b) C. Cativiela, M. D. Diaz-de-Villegas, *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 645-732.
- [122] T. Sonke, B. Kaptein, W. H. J. Boesten, Q. B. Broxterman, H. E. Schoemaker, E. Hans, J. Kamphuis, F. Formaggio, C. Toniolo, F. Rutjes, in R. N. Patel (Hrg.), *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker, New York, 23-58.
- [123] C. W. Tornøe, T. Sonke, I. Maes, H. E. Schoemaker, M. Meldal, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1239-1248.
- [124] W. J. J. van den Tweel, T. J. G. M. van Dooren, P. H. de Jonge, B. Kaptein, A. L. L. Duchateau, J. Kamphuis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *39*, 296-300.
- [125] H.-R. Krüger, H. Marschall, V. Sander, P. Weyerstahl, *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 3864-3876.
- [126] R. W. Spencer, T. F. Tam, E. Thomas, V. J. Robinson, A. Krantz, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5589-5597.
- [127] R. T. Arnold, S. T. Kulenovic, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3687-3689.
- [128] W. F. Huber, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 112-116.
- [129] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [130] M. Peer, *Spec. Chem.* **1998**, *18*, 256-263.
- [131] B. Kaptein, persönliche Mitteilung.
- [132] D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 323-327.
- [133] K. Steffens, E. Schneider, G. Deckers-Hebestreit, K. Altendorf, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5866-5969.
- [134] R. Göttlich, U. Schopfer, M. Stahl, R. W. Hoffmann, *Liebigs Ann.* **1997**, 1757-1764.
- [135] A. I. Meyers, D. L. Tempel, R. L. Nolen, E. D. Mihelich, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 2778-2783.

- [136] A. Roberts, S. Jaguelin, J. L. Guinamant, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2275-2282.