

Efrapeptine und Adenopeptin

—

Peptide mit interessanten Eigenschaften als synthetische Herausforderung

Dissertation

Der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld vorgelegt von

Sven Weigelt

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Mattay

Eingereicht am 12. Januar 2007

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Sewald an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Norbert Sewald für die freundliche und hilfsbereite Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Jochen Mattay danke ich für die Übernahme der Zweitbegutachtung.

Mein uneingeschränkter Dank gilt weiterhin Anke Nieß für ihre sehr hilfreiche Unterstützung im Labor und die unproblematische, jederzeit verlässliche Zusammenarbeit. Des weiteren möchte ich für die hervorragende und kollegiale Zusammenarbeit im Isovalin-Projekt den Mitarbeitern der Firma DSM in den Niederlanden, insbesondere Dr. Bernard Kaptein und Dr. Rinus Broxterman danken. Auf dem Gebiet der Untersuchungen zur ATPase-Inhibierung danke ich Dr. Jörg Greie und Prof. Dr. Karlheinz Altendorf von der Universität Osnabrück für die entgegenkommende und jederzeit hilfsbereite Kooperation. Dr. Zsuzsa Majer und Dr. Elemer Vass danke ich für die beste Anleitung in CD-spektroskopischen Fragen die man sich denken kann und die messtechnische Unterstützung, sowie für die freundliche Betreuung während meines wissenschaftlichen Aufenthalts in Budapest.

Marlene Paletta gilt mein Dank für die Mitarbeit an Teilen dieser Arbeit im Rahmen eines Blockpraktikums sowie für die Gespräche im und außerhalb des Labors. Ebenso danke ich Kai Altenhöner, Sebastian Bringmann und Oliver Tomic für ihre engagierte Mitarbeit an Teilen dieser Arbeit im Rahmen von Blockpraktika.

Für die fachliche Unterstützung besonders zu Beginn dieser Arbeit und das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts gilt mein Dank Dr. Micha Jost. Für ein extrem ereignisreiches Arbeitsklima, viele, meist weniger fachliche Diskussionen und besonders geduldiges Korrekturlesen mit zusätzlicher T_EXnischer Unterstützung bedanke ich mich bei Dr. Eckhart Guthöhrlein. Einen ganz besonderen Dank möchte ich zudem Thomas Huber für die Messung zahlreicher NMR-Spektren, bei denen er auch noch das letzte aus minimalen Mengen herausholen konnte, für viele interessante fachliche und weniger fachliche Diskussionen mit seiner unvergleichlich zuvorkommenden, jederzeit offenen Art und für die T_EXnische Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit aussprechen.

Gerd Lipinski, Peter Mester und Carolin Heggemann danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren. Dr. Matthias Letzel, Eckhard Westermeier und Sandra Heitkamp danke ich für die Aufnahme der ESI- und ESI-FT-ICR-Massenspektren.

Mein Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe für das spezielle Arbeitsumfeld, die zahlreichen hilfreichen und weniger hilfreichen Diskussionen und die fachliche Unterstützung während dieser Arbeit. Hervorheben möchte ich Marco Wißbrock, auf den ich mich bei technischen Problemen immer verlassen konnte, Yi Yang für seine unvergleichlichen Weisheiten, die den Laboralltag immer ein wenig angenehmer machten, Katharina Gaus für ihre in jeder Hinsicht hilfsbereite Art und Sylwia Urman für die angenehme gemeinsame Praktikumsbetreuung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mich immer in meinen Vorhaben uneingeschränkt unterstützt und Verständnis für mich aufgebracht haben.

Einen herzlichen Dank möchte ich Inga aussprechen, die mich auch in schwierigen Zeiten immer unterstützt hat und mir hilfreich und liebevoll zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	3
2.1	Aminosäuren und Peptide	3
2.1.1	β -Aminosäuren und β -Peptide	4
2.1.2	Spezielle Aminosäuren und nichtribosomal produzierte Peptide	6
2.1.3	Peptidsynthese	10
2.1.4	Peptidsynthese mit α,α -dialkylierten Aminosäuren	15
2.2	Efrapeptine	21
2.2.1	Sequenzen der Efrapeptine	23
2.2.2	Studien an Efrapeptinen	25
2.2.3	Neofrapeptine	30
2.3	Adenopeptin	33
2.3.1	Isolierung und Strukturaufklärung von Adenopeptin	33
2.3.2	Apoptose	34
2.4	Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung	36
2.4.1	NMR-Spektroskopie	36
2.4.2	CD-Spektroskopie	38
3	Zielsetzung	43
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	Spezielle Aminosäurebausteine für die Peptidsynthese	47
4.1.1	Synthese des isotopenmarkierten Aib-Bausteins α -Azidoisobuttersäurechlorid-D ₆ 5	47
4.1.2	Synthese von <i>S</i> -2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid 25	50

4.1.3	Synthese von Fmoc- <i>cis</i> - β -Methyl-L-prolin 41 und Fmoc- <i>trans</i> - β -Methyl-L-prolin 35	54
4.2	Efrapeptine D–G 42–45	64
4.2.1	Synthese	65
4.2.2	CD-spektroskopische Untersuchungen	73
4.2.3	Untersuchungen zur ATPase-Inhibierung	75
4.3	Neofrapeptine A 60 und F 63 und das Neofrapeptin F-Analogon 66 . .	78
4.3.1	Synthese	78
4.3.2	CD-spektroskopische Untersuchungen	83
4.3.3	Untersuchungen zur ATPase-Inhibierung	86
4.4	Efrapeptin C-Analogon mit einer von DBU abgeleiteten Kopfgruppe 69 .	87
4.4.1	Synthese	88
4.4.2	CD-spektroskopische Untersuchungen	94
4.4.3	Untersuchungen zur ATPase-Inhibierung	95
4.5	Isotopenmarkierte Efrapeptin C-Analoga 79–82 als Hilfsmittel für die Konformationsanalyse	96
4.5.1	Überlegungen zum gezielten Einbau von ^D ₆ Aib-OH 6	96
4.5.2	Synthese	99
4.5.3	Untersuchungen zur Konformation mit Hilfe der CD- und der NMR-Spektroskopie	104
4.6	Adenopeptin 95 und das Adenopeptin-Analogon 101	108
4.6.1	Synthese	109
4.6.2	CD-spektroskopische Untersuchungen	115
4.6.3	Überlegungen zum Aufbau eines Apoptose-Assays	117
5	Zusammenfassung und Ausblick	119
6	Summary	127
7	Experimentelles	133
7.1	Allgemeine Arbeitsmethoden	133
7.2	Arbeitsvorschriften	138
7.2.1	Synthese von <i>S</i> -2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid 25	138
7.2.2	Synthese von Boc- <i>cis</i> - β -methyl-D-prolin 32	142
7.2.3	Synthese von Fmoc- <i>trans</i> - β -Methyl-L-prolin 35	147
7.2.4	Synthese von Fmoc- <i>cis</i> - β -Methyl-L-prolin 41	148
7.2.5	Festphasenpeptidsynthese	154

7.2.6	Fragmentkondensation	156
7.2.7	Synthese der Efrapeptide D–G 42–45	157
7.2.8	Synthese von Neofrapeptin A 60	164
7.2.9	Synthese von Neofrapeptin F 63	166
7.2.10	Synthese des Neofrapeptin F-Analogons 66	168
7.2.11	Synthese des Efrapeptin C Analogons 69 mit einer von DBU ab- geleiteten Kopfgruppe	170
7.2.12	Synthese der isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analoga 79–82 . .	174
7.2.13	Synthese von Adenopeptin 95	183
7.2.14	Synthese des Adenopeptin-Analogons 101	186

Literaturverzeichnis

189

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatsynthase
Äq	Äquivalent(e)
All	Allyl
Aib	α -Aminoisobuttersäure
Xaa	beliebige Aminosäure
Yaa	beliebige Aminosäure
LSI	<i>large scale integration</i>
AIBN	Azobisisobutyronitril
BBMV	<i>brush border membrane vesicles</i> (Bürstensaumvesikel)
Bzl	Benzyl
Z	Benzyloxycarbonyl
β Ala	β -Alanin
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
Bu	Butyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CD	<i>circular dichroism</i> (Zirkulardichroismus)
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>

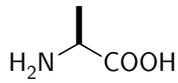
Cy	Cyclohexyl
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DBN	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIBALH	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMP	3,4-Dimethylphenol
DMPU	<i>N,N'</i> -Dimethylpropylenharnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
ESI	Elektrospray Ionisierung
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss)
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et	Ethyl
FFT	<i>fast Fourier transform</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigkeits-Chromatographie)
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
Fmoc	9-Fluorenyloxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
GC	Gaschromatographie
<i>N</i> -HATU	1-[Bis(dimethylamino)methyliumyl]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-oxid-hexafluorophosphat
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>

HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HOESY	<i>heteronuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HMWP	<i>high molecular weight protein</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (Menschliches Immunschwäche-Virus)
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (halbmaximale Inhibitorkonzentration)
IR	Infrarot
ICR	Ionenzyklotronresonanz
Iva	Isovalin, Ethylalanin
KOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol Kaliumsalz
LDA	Lithiumdiisopropylamid
MS	Massenspektrometrie
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i> (matrixunterstützte Laserdesorptionsionisierung)
Ms	Mesyl, Methansulfonyl
Me	Methyl
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
β ^{Me} Pro	β-Methylprolin
MRW	<i>mean residue weight</i> (mittlere Reste-gewichtete Molmasse)
m	Multipllett
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (kernmagnetische Resonanz)
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
ppm	<i>parts per million</i>

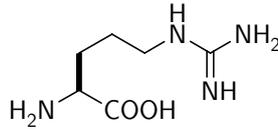
PhFl	9-Phenylfluoren-9-yl
Ph	Phenyl
P _i	anorganisches Phosphat
Pip	L-Pipecolinsäure
PEG	Polyethylenglycol
ⁱ Pr	<i>iso</i> -Propyl
PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
RT	Raumtemperatur
R _f	Retentionsfaktor
t _R	Retentionszeit
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROE	<i>rotating frame Overhauser effect</i>
ROESY	<i>rotating frame Overhauser effect spectroscopy</i>
SASRIN TM	<i>super acid sensitive resin</i>
VCD	<i>vibrational circular dichroism</i> schwingungszirkularer Dichroismus
s	Singulett
st	stark
SAR	<i>structure activity relationship</i> (Struktur-Aktivitäts-Beziehungen)
OSu	Succinimidoxy
N-TBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid-tetrafluoroborat
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilyl/Tetramethylsilan
Ts	Tosyl, 4-Toluolsulfonyl
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
Tf	Triflyl, Trifluormethansulfonyl
t	Triplett

UV	Ultraviolet
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphasen)
X	1-[(2 <i>S</i>)-2-Amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2- <i>a</i>]-pyrimidin-1-ium
Y	1-[(2 <i>S</i>)-2-Amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8,9,10-octahydropyrimido-[1,2- <i>a</i>]azepin-1-ium

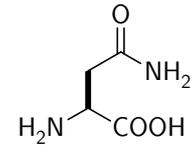
Proteinogene Aminosäuren



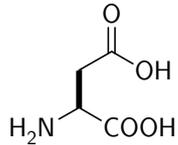
Alanin (Ala)



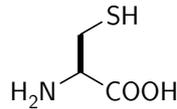
Arginin (Arg)



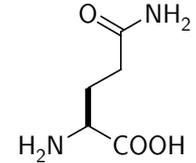
Asparagin (Asn)



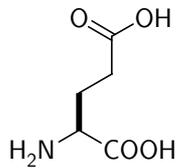
Asparaginsäure (Asp)



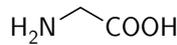
Cystein (Cys)



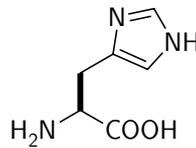
Glutamin (Gln)



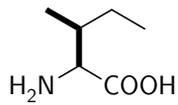
Glutaminsäure (Glu)



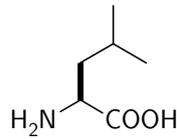
Glycin (Gly)



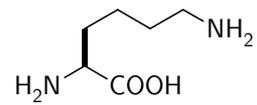
Histidin (His)



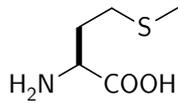
Isoleucin (Ile)



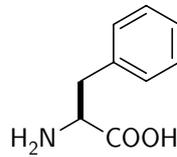
Leucin (Leu)



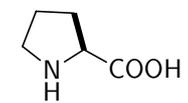
Lysin (Lys)



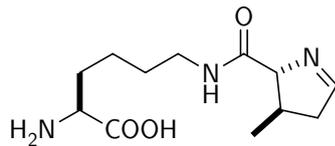
Methionin (Met)



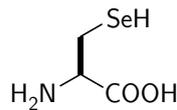
Phenylalanin (Phe)



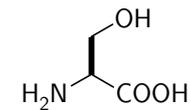
Prolin (Pro)



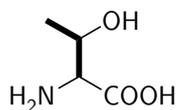
Pyrrolysin (Pyl)



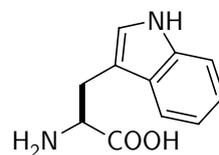
Selenocystein (Sec)



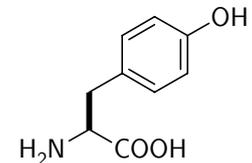
Serin (Ser)



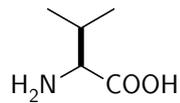
Threonin (Thr)



Tryptophan (Trp)



Tyrosin (Tyr)



Valin (Val)

1

Einleitung

Eine Reihe biochemisch und physiologisch interessanter, in verschiedenen Lebewesen ablaufender Prozesse wird von Peptiden beeinflusst. Diese greifen beispielsweise als Hormone in die Signaltransduktion ein und dienen als Neurotransmitter oder -modulator. Auch übernehmen sie Funktionen in Zellinteraktionen oder in anderen für das Überleben von Organismen essentiellen biochemischen Prozessen, wie der Immunantwort, dem Metabolismus oder der Zellreproduktion.^[1]

Oftmals können sie jedoch auch völlig andere Aufgaben übernehmen. So sind viele Mikroorganismen wie marine Schwämme, Manteltiere, Bakterien und Pilze reichhaltige Quellen für ungewöhnliche, biologisch oder medizinisch aktive Sekundärmetabolite.^[2,3] Diese in vielen Fällen nichtribosomal produzierten Peptide dienen dem produzierenden Organismus zumeist als Abwehrstoffe. Sie besitzen jedoch häufig für die Forschung interessante Eigenschaften, zu denen neben insektiziden, antimikrobiellen, antiviralen oder antikanzerogenen auch entzündungshemmende und immunsuppressive Aktivitäten zählen. Während einige solcher Peptide in Form von Medikamenten Verwendung finden oder als Leitstrukturen für solche dienen, haben sich andere als hilfreiche Werkzeuge in der biochemischen Forschung zur Aufklärung verschiedener natürlicher Prozesse etabliert.^[4] Diese weitreichende Verwendbarkeit nichtribosomal synthetisierter Peptide ist oftmals auf die ungewöhnlichen in ihnen enthaltenen Aminosäuren zurückzuführen, welche für Strukturgebung und konformationelle Eigenschaften ebenso wichtig sind, wie für ihre Funktion in biologischen Systemen.

Die sich schnell weiterentwickelnde interdisziplinäre Forschung an biologisch aktiven Peptiden führt zu immer neuen Anwendungsgebieten und Einsatzmöglichkeiten der-

artiger Naturstoffe. Insbesondere die Medizin verlangt nach immer neuen Wirkstoffen, um in komplizierte krankheitsbedingte Fehlfunktionen eingreifen zu können oder Krankheiten zu bekämpfen, für die entweder noch kein Therapeutikum existiert oder die bekannten auf Grund von Resistenzen nur eingeschränkt nutzbar sind. Um effiziente Wirkstoffe mit einer großen therapeutischen Breite für eine gezielte Therapie zu finden, ist eine ständige Suche nach neuen therapeutisch wirksamen Verbindungen notwendig.

Viele in der Natur auftretende Sekundärmetabolite können aus dem produzierenden Organismus isoliert werden, was sie zwar in einigen Fällen leicht zugänglich macht, jedoch die Variabilität stark einschränkt. Um eine möglichst große Zahl peptidischer Naturstoffe untersuchen zu können, ist es daher neben ihrer Isolierung Aufgabe der Forschung, chemische Synthesen zu entwickeln sowie Strukturen und Wirkmechanismen aufzuklären. Die Naturstoffsynthese dient dabei nicht nur als Beweis einer für einen isolierten Naturstoff vorgeschlagenen Primär- und Sekundärstruktur. Sie ist ebenso von Bedeutung für die gezielte Variation von Naturstoffen, um Strukturaufklärung voranzutreiben, Wirkmechanismen besser zu verstehen und gleichzeitig den Einfluss einzelner Bausteine grundlegend herausstellen zu können. Auf diese Weise lassen sich einerseits neue Leitstrukturen für Wirkstoffe finden, andererseits ist es jedoch auch möglich Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) abzuleiten und durch sie das Potenzial eines Naturstoffs abzuschätzen und gegebenenfalls zu optimieren.

Eine schon länger bekannte Klasse von peptidischen Naturstoffen sind die Efrapeptine. Sie werden von Pilzen der Gattung *Tolypocladium* als mikroheterogenes Gemisch strukturell ähnlicher Peptide produziert. Als ATPase-Inhibitoren mit antiproliferativen und antikanzerogenen Eigenschaften stehen sie im Fokus der aktuellen Forschung, weshalb ein synthetischer Zugang sowie die Aufklärung und Variation ihrer Struktur für ein weitgehendes Verständnis unerlässlich sind.

Ein ebenso interessantes, den Efrapeptinen strukturell sehr ähnliches Peptid, welches von Pilzen der Gattung *Chrysosporium* produziert wird, ist Adenopeptin. Dieser erst vor einigen Jahren entdeckte Naturstoff bewirkt *in vitro* Apoptose an Tumorzellen, was ihn zu einem guten Kandidaten für die gezielte Therapie macht. Da jedoch erst wenig über diesen Vertreter der nichtribosomal von Pilzen produzierten Peptide bekannt ist, besteht ein großes Interesse an einer eingehenderen Erforschung.

2.1 Aminosäuren und Peptide

Aminosäuren werden zurecht als elementare Bausteine vieler natürlicher Prozesse angesehen. Dabei können Aminosäuren einzeln regulatorisch eingreifen wie im Fall von Ornithin im Harnstoffzyklus oder γ -Aminobuttersäure als Neurotransmitter,^[5] oder auch in Form von Polykondensationsprodukten, den Peptiden und Proteinen. In Proteinen finden sich zumeist die klassischen 20 proteinogenen Aminosäuren, die auf Seite xiv abgebildet sind. In jüngerer Zeit wurden zudem zwei weitere DNA-kodierte Aminosäuren entdeckt, Selenocystein^[6,7] und Pyrrolysin.^[8–10] Mit Ausnahme der achiralen Aminosäure Glycin handelt es sich bei den proteinogenen Aminosäuren ausschließlich um L- α -Aminosäuren.

In der Natur finden sich Peptide und Proteine mit zwei bis mehrere Tausend Aminosäuren, wobei die Unterscheidung zwischen Peptiden und Proteinen fließend ist. Die Aminosäuren sind über Amidbindungen, die sogenannten Peptidbindungen, verknüpft, was zu einer definierten Sequenz, der Primärstruktur, führt. Sie ist maßgeblich für die Sekundärstruktur, welche die räumliche Anordnung benachbarter Aminosäurereste widerspiegelt. Wichtige Sekundärstrukturelemente, welche häufig durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden, sind Helices, Faltblätter und *turns* (Schleifen).

Ein wichtiges strukturbestimmendes Merkmal der Peptidbindungen ist der Doppelbindungscharakter der C–N-Bindung, welcher hauptsächlich durch die Delokalisierung

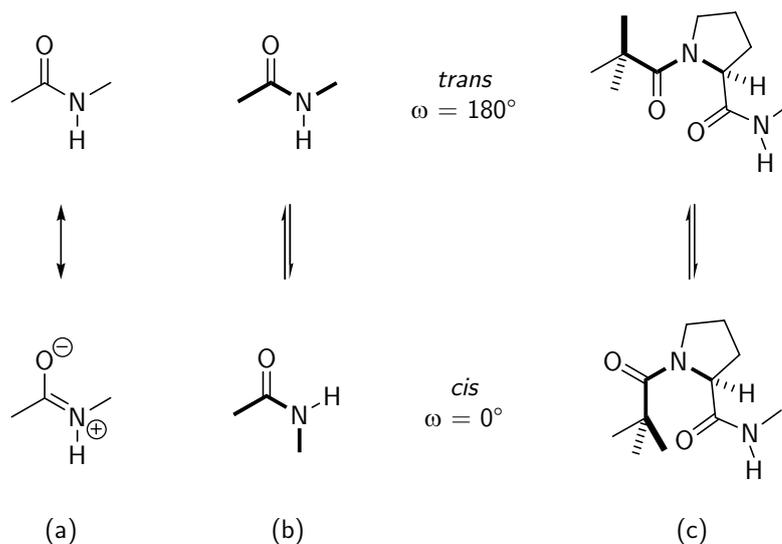


Abbildung 2.1: Resonanzstabilisierung (a) und *cis/trans*-Isomerisierung einer gewöhnlichen Peptidbindung (b) bzw. einer Xaa-Pro-Bindung (c)^[1]

des freien Elektronenpaares am Stickstoffatom bedingt ist (Abb. 2.1). Durch die Resonanzstruktur wird die Basizität des Stickstoffatoms gesenkt und die Rotation um die C–N-Achse erschwert, was zu einer erhöhten Rigidität und Planarität führt. Dies hat Auswirkungen auf die dreidimensionale Struktur der Peptide. Die Bindungslänge der Amidbindung ist mit 132 pm gegenüber einer Einfachbindung (149 pm) verkürzt, ist jedoch länger als eine Doppelbindung (127 pm).^[5] Die Rotationsbarriere der Amidbindung liegt bei $105 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, was die Ausbildung zweier Rotamere bedingt. Der Energieinhalt der *trans*-Konfiguration (Torsionswinkel ω der C–N-Bindung ist 180°) ist gegenüber der *cis*-Konfiguration ($\omega = 0^\circ$) um $8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ niedriger. Lediglich die Xaa-Pro-Peptidbindung stellt eine Ausnahme dar. Da hier die Energiedifferenz zwischen *cis*- und *trans*-Konfiguration geringer ausfällt, liegen Xaa-Pro-Bindungen bedeutend häufiger *cis*-konfiguriert vor.^[1]

2.1.1 β -Aminosäuren und β -Peptide

Bei β -Aminosäuren befindet sich gegenüber α -Aminosäuren ein zusätzliches Kohlenstoffatom zwischen der Amino- und der Carboxylgruppe. Seitenketten können sich sowohl an C^α als auch an C^β befinden, wobei nach einer von Seebach vorgeschlagenen Nomenklatur C^α -substituierte β -Aminosäuren als β^2 -Aminosäuren, C^β -substituierte β -Aminosäuren als β^3 -Aminosäuren und $C^{\alpha,\beta}$ -disubstituierte β -Aminosäuren als $\beta^{2,3}$ -

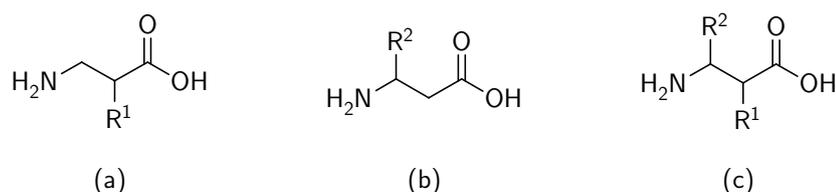


Abbildung 2.2: β -Aminosäuren: (a) β^2 -Aminosäuren, (b) β^3 -Aminosäuren und (c) $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren

Aminosäuren bezeichnet werden (Abb. 2.2). Ist der Rest R, den eine β -Aminosäure trägt, analog zu einer proteinogenen α -Aminosäure, wird sie als β -*homo*-Aminosäure bezeichnet.^[11]

In verschiedenen Übersichten wird ausführlich auf chemische, biologische und medizinische Aspekte von β -Aminosäuren und β -Peptiden eingegangen.^[12–15] Hervorgehoben werden sollen hier nur einige Bereiche dieses umfangreichen Gebiets.

Eine Vielzahl von Naturstoffen enthält neben α -Aminosäuren auch β -Aminosäuren. Dabei ist auffällig, dass diese Peptide häufig schon bei kurzen Kettenlängen klar definierte Sekundärstrukturen wie Helices und Faltblätter besitzen, die für ihre natürliche Funktion entscheidend sind. β -Aminosäuren enthaltende Peptide sind oftmals stabil gegenüber Peptidasen und Metabolisierung. Zudem stellen sie häufig Mimetika für α -Peptide dar.

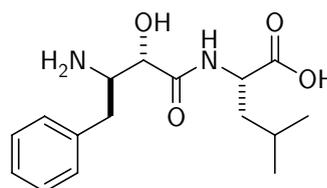


Abbildung 2.3: Das Dipeptid Bestatin

Das in Abbildung 2.3 gezeigte Bestatin beinhaltet α -Hydroxy- β^2 -*homo*-phenylalanin. Neben immunstimulatorischen Eigenschaften weist dieses schon in den 1970er

Jahren aus *Streptomyces olivoreticulithe* isolierte und charakterisierte Dipeptid auch antikarzinogene Eigenschaften auf. Es inhibiert selektiv Aminopeptidasen, während es keinerlei Wirkung auf Carboxyproteasen und Endoproteasen zeigt. Medizinische Anwendung findet Bestatin sowohl in der Diagnostik als auch in der Chemotherapie zur Unterbindung von Metastasierungen.^[16]

Weitere wichtige Vertreter von β -Peptiden sind die Cryptophycine, eine Klasse von makrozyklischen Depsipeptiden die als Sekundärmetaboliten von Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* produziert werden (Abb. 2.4). Die biologische Aktivität der Cryptophycine ist auf die Wechselwirkung mit Tubulin zurückzuführen. Sie haben starke anti-proliferative Wirkung, was sie zu aussichtsreichen Zytostatika sogar für multiresistente Tumorarten macht. Die derzeitige Forschung konzentriert sich intensiv auf das genaue

der Evolution als Abwehrstoffe für viele Organismen entwickelt haben, sind häufig viel versprechende Ausgangsverbindungen auf dem Weg zu neuen Wirkstoffen.

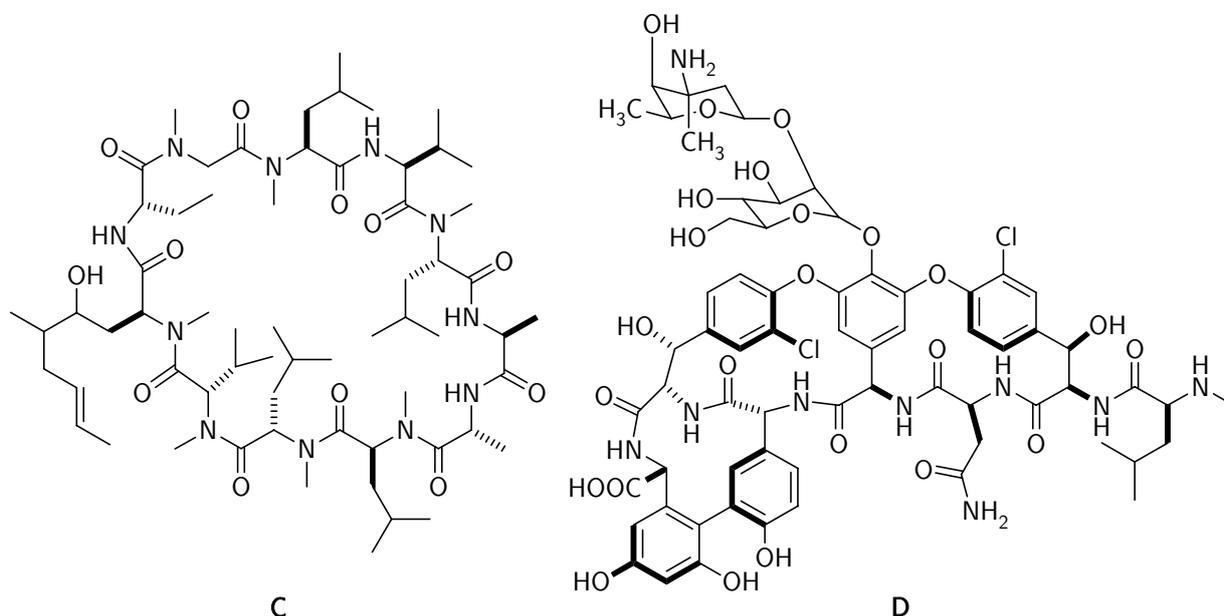


Abbildung 2.6: Beispiele nichtribosomal synthetisierter Peptide: das *N*-methylierte Aminosäuren enthaltende Cyclosporin **C** und das glykosylierte Reste enthaltende Vancomycin **D**

Wichtige Vertreter dieser Sekundärmetabolite sind kleine Peptide, die eine Vielzahl einzigartiger Strukturelemente enthalten. Zu ihnen gehören Fettsäurereste (Surfactin **A**, Abb. 2.5),^[19,20] nichtproteinogene Aminosäuren (Gramicidin S **B**, Abb. 2.5),^[21-23] *N*-methylierte Reste (Cyclosporin **C**, Abb. 2.6)^[24-26] oder auch glykosylierte Aminosäuren (Vancomycin **D**, Abb. 2.6).^[27-29] Ein Vorteil für die medizinische Verwendung derartiger Peptide ist das durch die hohe Bioverfügbarkeit, welche aus der erhöhten Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen resultiert, bedingte therapeutische Potential.

Die biologische Funktionalität dieser Moleküle hängt eng mit ihrer chemischen Struktur zusammen, welche die Moleküle in ihre biologisch aktive Konformation zwingt und dadurch eine spezifische Interaktion mit einer bestimmten Zielverbindung ermöglicht. Diese strukturelle Rigidität wird häufig durch Zyklisierung oder durch oxidative Vernetzung von Seitenketten erreicht. Viele Synthesemechanismen derartiger Verbindungen sind bislang noch unbekannt, jedoch schreitet die Aufklärung vieler Abläufe durch neue biochemische Methoden immer weiter voran.

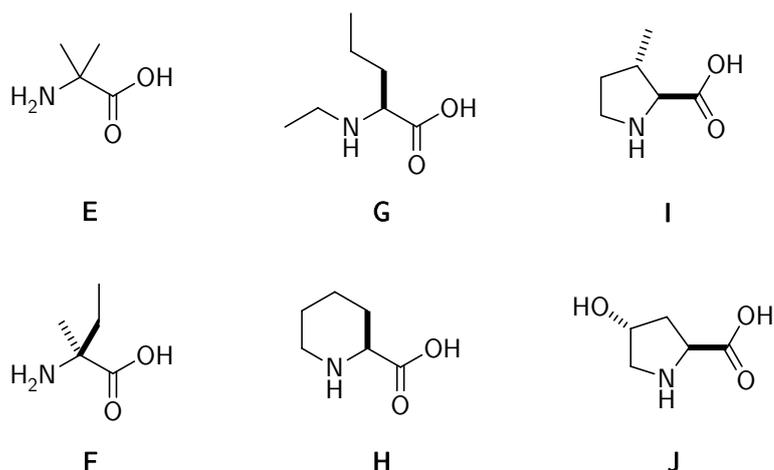


Abbildung 2.7: Nichtproteinogene Aminosäuren in Peptaibiotika: α -Aminoisobuttersäure **E**, L-Isovalin **F**, *N*-Ethyl-L-norvalin **G**, L-Pipecolinsäure **H**, *trans*- β -Methyl-L-prolin **I**, *trans*- γ -Hydroxy-L-prolin **J**

Neben den erwähnten, zumeist zyklischen Vertretern nichtribosomal synthetisierter Peptide existiert auch eine Reihe linearer Peptide, die durch Ausbildung starrer Sekundärstrukturen wie *turns* oder Helices eine feste Konformation erhalten. Eine wichtige Klasse derartiger Peptide sind die Peptaibiotika.^[30] Hierbei handelt es sich um Peptide, die reich an α,α -dialkylierten Aminosäuren wie α -Aminoisobuttersäure **E** oder D-Isovalin und L-Isovalin **F** sind und oftmals antibiotische Wirkung zeigen. Auch die Aminosäuren *N*-Ethyl-L-norvalin **G**,^[31] 1-Aminocyclopropan-carbonsäure und *trans*- β -Methyl-L-prolin **I**^[32–34] werden gefunden (Abb. 2.7). Die bekannteste Untergruppe der Peptaibiotika sind die aus fünf bis zwanzig Aminosäureresten aufgebauten Peptaibole.^[35] Ihr *N*-Terminus liegt zumeist in acetylierter Form vor, während der *C*-Terminus zum Aminoalkohol reduziert ist. In doppelschichtigen Membranen bilden Peptaibole häufig spannungsabhängige Ionenkanäle, die an solche in neuronalen Synapsen erinnern,^[36] wobei sie in hohen Konzentrationen Lysis der Zelle hervorrufen können.^[37] Neben dem bekanntesten, vom Pilz *Trichoderma viride* produzierten und von Meyer und Reusser erstmals isolierten Alamethicin existieren eine Reihe weiterer Vertreter der Peptaibole.^[38–40] Hervorgehoben werden soll hier das 15 Aminosäurereste enthaltende Ampullosporin A, welches Pigmentbildung des Pilzes *Phoma destructiva* induziert und spannungsabhängige Ionenkanäle in Membranen bildet (Abb. 2.8). In jüngerer Zeit wurden mehrere Studien an Ampullosporin und verschiedenen Analoga durchgeführt, wobei besonders die Strukturaufklärung durch Röntgenkristallographie und CD-Spektroskopie wichtige Ergebnisse liefern konnte. Neben α -helikalen Strukturen wurde mit Hilfe der

Röntgenkristallographie im *C*-terminalen Bereich eine β -turn-ähnliche Struktur gefunden und ein generelles Vorgehen zur Strukturanalyse von Peptaibolen entwickelt.^[41] Hierdurch können wertvolle Informationen über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gefunden und die Eigenschaften der Ampullosporine zur Ionenkanalbildung näher untersucht werden.

Ac-Trp-Ala-Aib-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Gln-Leu-Aib-Gln-Leu-OH

Abbildung 2.8: Aminosäuresequenz von Ampullosporin A

In einer zweiten Studie zur Strukturaufklärung von Ampullosporinen kommt die CD-Spektroskopie zum Einsatz.^[42] Hierbei stehen Strukturänderungen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel im Vordergrund, wobei durch Verwendung membranmimetischer Lösungsmittel eine Übertragung auf derartige Umgebungen ermöglicht werden soll. Ebenso wird ein Vergleich zur Kristallstruktur gezogen, welcher die so erhaltenen Ergebnisse bestätigt und ergänzt.

Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der nichtribosomal verlaufenden Biosynthese von Ampullosporinen durch den Pilz *Sepedonium ampullosporum* liefern die Untersuchungen von Reiber *et al.* Durch Verbesserung der Zellkulturbedingungen konnte die Wachstumsrate des Organismus stark erhöht und die für die Synthese von Ampullosporinen verantwortlichen Enzymkomplexe identifiziert werden. Dabei wurden zwei sehr große Enzymkomplexe gefunden (HMWP1 mit 1.5 MDa und HMWP2 mit 350 kDa), die in der Lage sind, α -Aminoisobuttersäure selektiv als Substrat zu binden. Ein wesentlicher Beitrag dieser Enzymkomplexe zur Biosynthese des Aib-reichen Ampullosporin ist daher nahe liegend. Ein ähnlicher Biosyntheseweg kann auch für andere Peptaibole und viele sonstige nichtribosomal produzierte Peptide angenommen werden.^[43]

Zwei weitere, erst kürzlich entdeckte, vom Pilz *Cordyceps heteropoda* produzierte Peptide, Cicadapeptin I und II, sind mit den klassischen Peptaibolen eng verwandt. Ihr *C*-Terminus liegt amidiert vor, während der *N*-Terminus mit *n*-Decansäure acetyliert ist. Die Aminosäuresequenz enthält neben zwei Aib-Resten auch zwei Hydroxyprolinreste und einen Leucin- oder Isoleucinrest. In ersten Aktivitätstests zeigten die beiden Peptide antibakterielle und pilzhemmende Eigenschaften.^[44]

Des Weiteren gibt es verschiedene Studien zu den Peptaibolen, die neben der Strukturanalyse häufig auch auf Wirkmechanismen,^[45] die chemische Synthese^[46–51] und die Biosynthese eingehen. Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, erfolgt auch die Biosynthese der Peptaibole nichtribosomal an großen, multifunktionalen Enzymen, die

als Peptidsynthetasen bezeichnet werden.^[52–56] Die Einzelkomponenten dieser Metabolite werden in Form ihrer Adenylat-, Acylphosphorylat- oder Coenzym-A-Derivate aktiviert und anschließend zu den Produkten zusammengefügt. Die nichtribosomale Peptidsynthese repräsentiert eine natürliche Alternative zur Synthese hoch spezialisierter Polypeptide gegenüber dem bekannten ribosomal gesteuerten Weg.

2.1.3 Peptidsynthese

Während die Biosynthese von Peptiden und Proteinen ein Vorgang von Sekunden oder Minuten ist, stellt die chemische Peptidsynthese eine recht zeitaufwendige Arbeit dar. Die Synthese von Peptiden, die ausschließlich aus Standardamino­säuren bestehen, läuft heute häufig automatisiert mit Hilfe von Syntheseautomaten ab, die entweder mehrere Peptide gleichzeitig synthetisieren können oder beispielsweise durch Mikrowellen­unterstützte Synthese recht kurze Reaktionszeiten ermöglichen. Werden jedoch Peptide mit speziellen Aminosäuren oder schlecht synthetisierbaren Sequenzen benötigt, muss oftmals noch auf die manuelle Peptidsynthese in Lösung oder an einem unlöslichen Trägermaterial zurückgegriffen werden. Pionier auf dem Gebiet der manuellen Festphasenpeptidsynthese war in den 1960er Jahren Merrifield, der für seine Arbeiten 1984 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.^[57]

Bildung der Peptidbindung

Die Bildung einer Peptidbindung ist formal betrachtet eine Kondensationsreaktion unter Eliminierung von Wasser (Abb. 2.9). Da jedoch die Bildung einer Peptidbindung

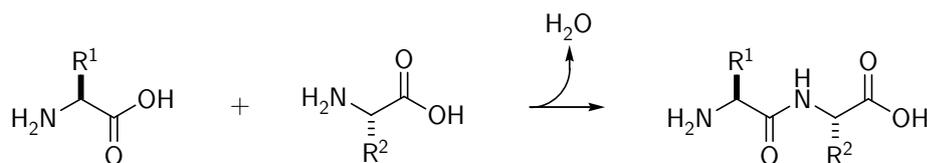


Abbildung 2.9: Vereinfachte Darstellung einer Peptidbindungsbildung

gegenüber der Säure-Base-Reaktion zweier Aminosäuremoleküle thermodynamisch benachteiligt ist, werden Hilfsmittel benötigt, die die Carboxylgruppe der einen Aminosäure aktivieren und so einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure ermöglichen. Des Weiteren müssen funktionelle Gruppen gezielt maskiert

werden, um eine Nebenreaktion untereinander zu verhindern und eine definierte Aminosäuresequenz zu erhalten.

Schutzgruppen

Neben der Aktivierung der Carboxylgruppe einer Aminosäure spielt für die Synthese einer definierten Sequenz die Verwendung verschiedener Schutzgruppen in der Peptidsynthese eine wesentliche Rolle. Diese müssen zum einen leicht an bestimmte funktionelle Gruppen angebracht werden können sowie unter den Bedingungen, die bei einer Kupp-

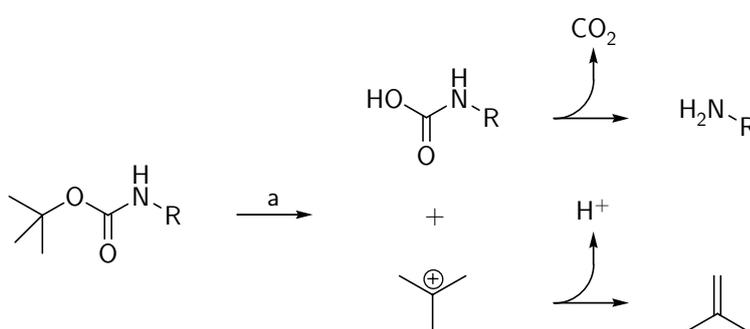


Abbildung 2.10: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe: (a) H⁺

lungsreaktion herrschen, stabil sein, zum anderen müssen sie jedoch auch unter milden Bedingungen und unabhängig voneinander abgespalten werden können. Man spricht in diesem Zusammenhang von Orthogonalität der verschiedenen Schutzgruppen. Neben temporären Schutzgruppen, die dem Schutz der α -Aminogruppe dienen, existieren eine Reihe permanenter Schutzgruppen, die je nach verwendeter Schutzgruppenstrategie variiert werden können.

Die wichtigsten Schutzgruppenstrategien sind die Boc/Bzl-Strategie, bei der die Boc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe und solche des Benzyltyps (Benzylester, Benzylether, Z) als permanente Schutzgruppen Verwendung finden (Abb. 2.10), und die Fmoc/^tBu-Strategie, die sich der Fmoc-Gruppe als temporärer und Vertretern des *tert*-Butyltyps (*tert*-Butylester, *tert*-Butylether, Boc) als permanenter Schutzgruppen bedient (Abb. 2.11). Während bei der Boc/Bzl-Strategie die Orthogonalität durch Abspaltung der Schutzgruppen unter unterschiedlich stark sauren Bedingungen (Boc mit TFA, Benzyl mit wasserfreier Flusssäure) gewährleistet wird, wird sie bei der Fmoc/^tBu-Strategie durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit sekundären Aminen wie Pipe-

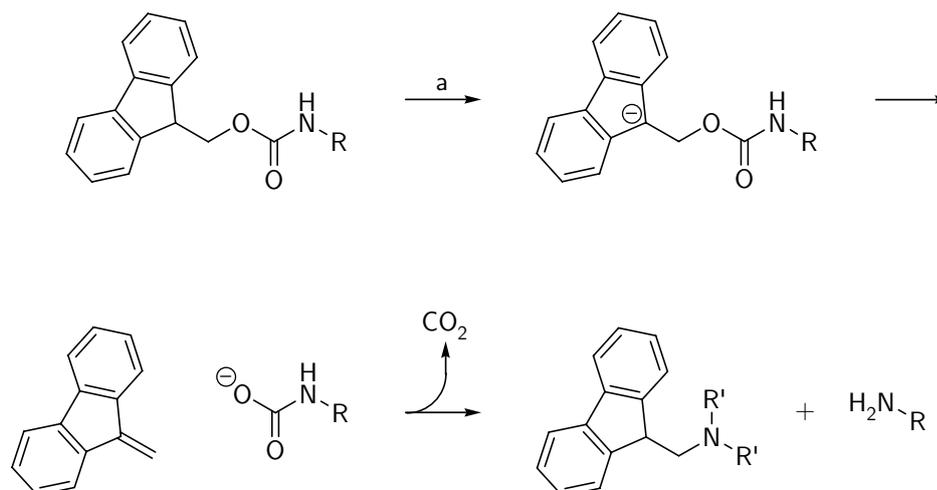


Abbildung 2.11: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe: (a) sekundäres Amin $\text{R}'_2-\text{NH}$ (z. B. Piperidin, Diethylamin)

ridin oder Diethylamin und Abspaltung der permanenten Schutzgruppen unter sauren Bedingungen erreicht.

Kupplungsreagenzien

Um die Carboxylgruppe einer *N*-terminal geschützten Aminosäure für eine Kupplung an die Aminogruppe einer zweiten *C*-terminal geschützten Aminosäure zu aktivieren, bieten sich eine große Zahl unterschiedlicher so genannter Kupplungsreagenzien an.

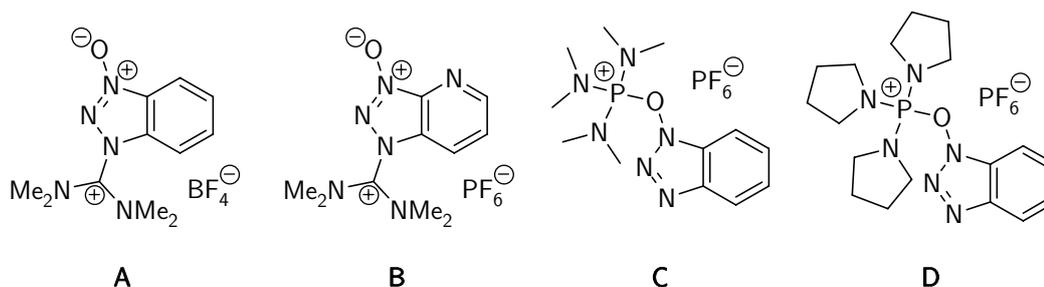


Abbildung 2.12: Kupplungsreagenzien vom Uroniumtyp (*N*-TBTU **A** und *N*-HATU **B**) und vom Phosphoniumtyp (BOP **C** und PyBOP **D**)

Diese haben zum einen die Aufgabe, die Elektrophilie des Carboxylkohlenstoffatoms zu erhöhen und als gute Abgangsgruppe zu dienen, zum anderen verhindern sie in vielen Fällen mögliche Racemisierungen der zu kuppelnden Aminosäure. Eine der wichtigsten

Klassen von Kupplungsreagenzien in der modernen Peptidsynthese stellen die Uronium- und Phosphoniumsalze dar (Abb. 2.12).^[58]

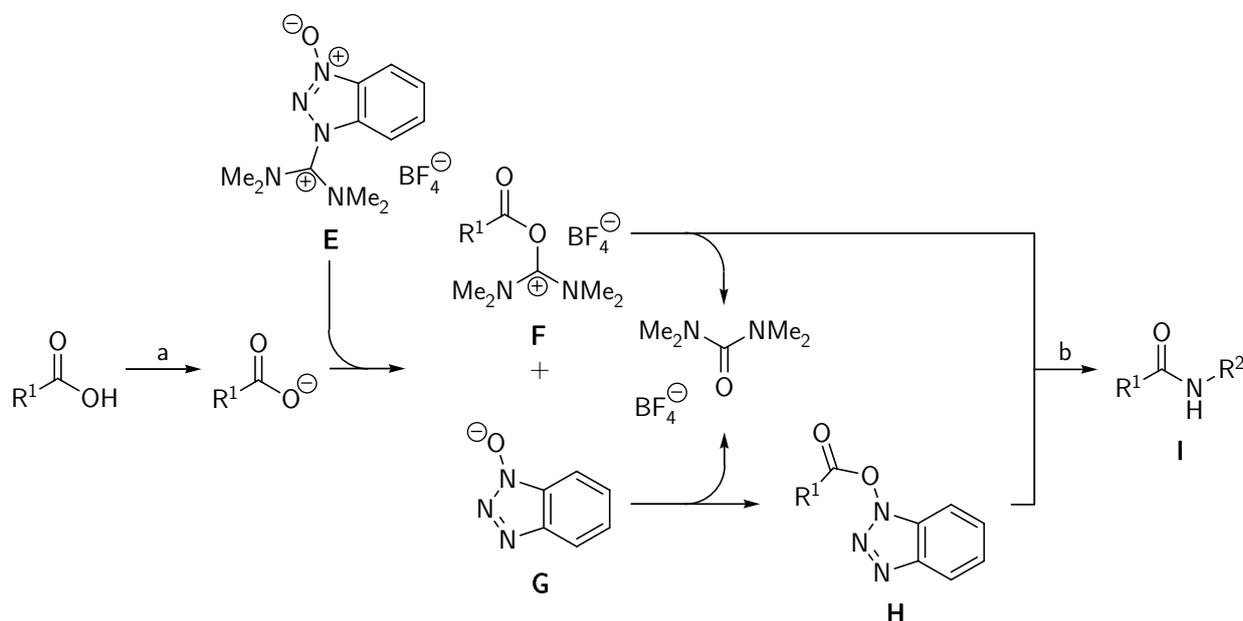


Abbildung 2.13: Mechanismus der Kupplungsreaktion mit dem Uroniumsalz *N*-TBTU: (a) R_3N , (b) R^2NH_2

Uronium- und Phosphoniumsalze dienen der *in-situ*-Generierung von Aktivestern, die unter weitgehend racemisierungsfreien Bedingungen die Kupplung einer Carboxylgruppe mit einer Aminogruppe ermöglichen. Während das Uroniumsalz *N*-TBTU inzwischen standardmäßig für Aminosäurekupplungen verwendet wird,^[59,60] finden leistungsfähigere Kupplungsreagenzien wie *N*-HATU,^[61,62] BOP^[63] oder Py-BOP^[64] ihren Einsatz bei Aminosäurekupplungen, die mit *N*-TBTU nicht oder nur unvollständig verlaufen oder Peptidfragmentkondensationen.

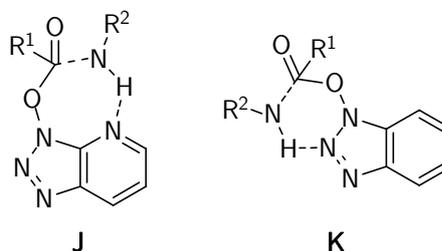


Abbildung 2.14: Vergleich der zyklischen Übergangszustände des HOAt-Esters **J** und des HOBT-Esters **K**

Der Reaktionsmechanismus ist bei allen genannten Kupplungsreagenzien im Prinzip derselbe. Nach Deprotonierung der Carboxylgruppe der zu kuppelnden Aminosäure mit Hilfe einer Stickstoffbase wie beispielsweise DIPEA, greift die entstandene Carboxylatgruppe am elektrophilen Zentrum des Kupplungsreagenzes **E** an, was zur Bildung des

stark aktivierten Carbonsäurederivats **F** führt. Dieses kann dann entweder direkt mit der freien Aminogruppe einer zweiten Aminosäure oder eines Peptids zu **I** reagieren oder zunächst mit der Abgangsgruppe **G** den Aktivester **H** bilden. Dieser kann anschließend ebenso mit einer freien Aminogruppe zum gewünschten Peptid **I** reagieren (Abb. 2.13).

Ein wichtiger Vorteil der Uronium- und Phosphoniumsalze gegenüber beispielsweise Carbodiimiden als Kupplungsreagenzien ist der racemisierungsärmere Reaktionsverlauf, welcher bei Carbodiimiden nicht immer gewährleistet ist. Wie bereits erwähnt, wird *N*-TBTU zumeist für Standardkupplungsreaktionen verwendet. Sollen Peptidfragmente verknüpft oder eine mögliche Racemisierung noch zuverlässiger unterdrückt werden, wird häufig auf *N*-HATU als Kupplungsreagenz zurückgegriffen.^[61] Ein wesentlicher Grund für die erhöhte Effizienz von *N*-HATU gegenüber *N*-TBTU ist im Nachbargruppeneffekt des Azastickstoffatoms zu sehen, der die Ausbildung des siebengliedrigen zyklischen Übergangszustands **J** im HOAt-Ester während der Kupplungsreaktion begünstigt.^[65] Im Gegensatz hierzu kann sich im HOBt-Ester während der Kupplungsreaktion nur der energetisch ungünstigere sechsgliedrige zyklische Übergangszustand **K** unter Einbeziehung des mittleren Stickstoffs der Triazolgruppe ausbilden (Abb. 2.14).^[66]

Festphasenpeptidsynthese (*Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS*)

Die Festphasenpeptidsynthese stellt heute eine der effektivsten Möglichkeiten zur Synthese auch längerer Aminosäuresequenzen dar. In Kombination mit Peptidfragmentkondensationen lassen sich mit ihr ohne weiteres Peptide mit 100 und mehr Aminosäuren synthetisieren.

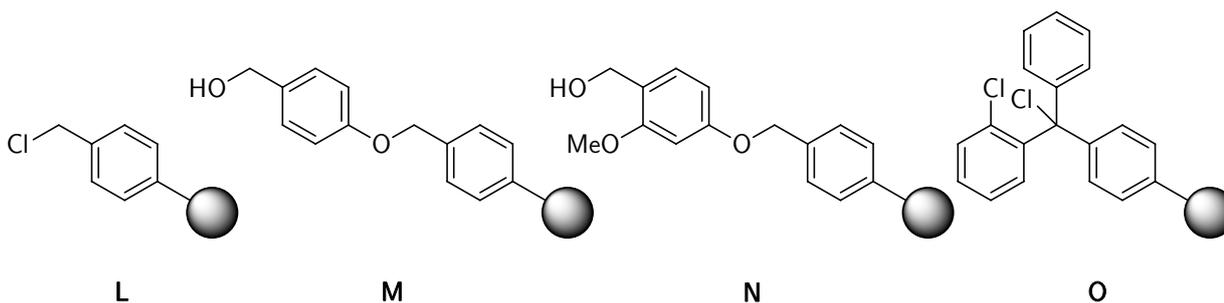


Abbildung 2.15: Verschiedene polymere Träger für die Festphasenpeptidsynthese: **L** Merrifieldharz, **M** Wangharz, **N** SASRIN™ und **O** *o*-Chlortritylchloridharz

Bei der Festphasenpeptidsynthese ist das Peptid während des gesamten Syntheseverlaufs an ein festes, unlösliches Trägermaterial gebunden, welches zumeist ein mit Divinylbenzol vernetztes Polystyrolharz ist. Das Hauptunterscheidungsmerkmal solcher polymerer Träger ist die Art des *linkers*, der die Verbindung zum Peptid herstellt (Abb. 2.15). Bei der von Merrifield entwickelten Boc/Bzl-Strategie findet das so genannte Merrifieldharz **L** Verwendung, welches auch unter den sauren zur Boc-Abspaltung verwendeten Bedingungen stabil ist. Erst bei der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mit wasserfreier Flusssäure wird auch die Bindung des Peptids an den Linker gespalten. Als Standardharz für die Fmoc/^tBu-Strategie dient das so genannte Wangharz, bei dem die Abspaltung des Peptids mit TFA erfolgt.^[67] Dieses ist jedoch nicht geeignet, wenn das zu synthetisierende Peptid recht säurelabil ist, wie dies häufig bei Aib-haltigen Peptiden der Fall ist. In solchen Fällen bieten sich sehr säurelabile Harze an, wie das *super acid sensitive resin* (SASRINTM),^[68] bei dem das Peptid mit 1 % TFA abgespalten wird oder das *o*-Chlortritylchloridharz, welches bereits bei einer TFA-Konzentration von 0.5 % das Peptid freisetzt und damit eine noch schonendere Handhabung des Peptids gewährleistet.^[69]

Die Festphasenpeptidsynthese läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst wird die erste, *N*-terminal und an den Seitenkettenfunktionalitäten geschützte Aminosäure unter häufig basischen Bedingungen mit der Carboxylgruppe zumeist unter Ausbildung eines Benzylesters an den Linker gekuppelt. Nach Abspaltung der *N*^α-Schutzgruppe (z. B. Fmoc- oder Boc-Gruppe, s. Kapitel 2.1.3 auf Seite 11) kann eine zweite geschützte Aminosäure durch Aktivierung ihrer freien Carboxylfunktion mit einem Kupplungsreagenz (z. B. *N*-TBTU oder *N*-HATU, s. Kapitel 2.1.3 auf Seite 12) an die harzgebundene Aminosäure gekuppelt werden. Durch Wiederholung der Entschützungs- und Kupplungsschritte entsteht die gewünschte Peptidsequenz, welche am Ende unter den oben genannten Bedingungen vom Harz abgespalten wird. Die Seitenkettenfunktionalitäten können je nach gewählter Strategie unter entsprechenden Bedingungen entschützt werden.

2.1.4 Peptidsynthese mit α,α -dialkylierten Aminosäuren

Sollen Peptide mit α,α -dialkylierten Aminosäuren wie α -Aminoisobuttersäure oder Isovalin synthetisiert werden, liefern die in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Standardmethoden meist nur unbefriedigende Ergebnisse. Dies ist auf die sterische Hinderung durch die zwei recht voluminösen α -Alkylreste zurückzuführen, welche gegenüber den einzelnen

Resten in monoalkylierten Aminosäuren einen erheblich größeren räumlichen Anspruch haben.

Standardschutzgruppen und Standardkupplungsmethoden unter Verwendung von α,α -dialkylierten Aminosäuren

Die Verwendung von Standardschutzgruppen und Standardkupplungsmethoden bei α,α -dialkylierten Aminosäuren liefert auch bei langen Reaktionszeiten und verschiedenen Kupplungsreagenzien nur mäßige Ausbeuten. So verläuft die Kupplung zweier Aib-Reste mit DCC als Kupplungsreagenz und HOBt als Additiv nach langer Reaktionsdauer nur mit geringen Ausbeuten.^[70–72] Die erst kürzlich publizierte Synthese glykosylierter Aib-haltiger Peptide benötigt ebenfalls lange Reaktionszeiten und ergibt nur mäßige Ausbeuten.^[73] Auch die Kupplung von Fmoc-Aib-F an H-Aib-OH verläuft unter für die Festphasensynthese ungeeigneten Bedingungen nach 4 h in einer mäßigen Ausbeute von 70 % (Abb. 2.16).^[74]

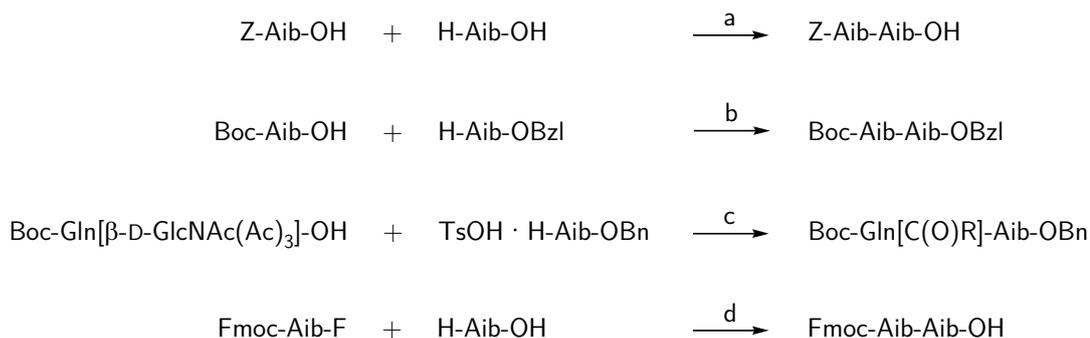


Abbildung 2.16: Darstellung Aib-haltiger Dipeptide mit Standardkupplungsverfahren: (a) DCC/HOBt, 38 %; (b) DCC/HOBt, RT, 70 h, 50 %; (c) DCC/HOBt/NMM, RT, 93 h, 62 %; (d) TMS-Cl, DIPEA, CH_2Cl_2 , Rückfluss 2 h, RT 2 h, 70 %

Auf Grund der schlechten Anwendbarkeit von Standardkupplungsmethoden insbesondere bei der Festphasensynthese von Peptiden, die α,α -dialkylierte Aminosäuren enthalten, wurden verschiedene alternative Methoden entwickelt.

Spezielle Kupplungsmethoden zur Einführung α,α -dialkylierter Aminosäuren

Die Verwendung neuartiger Kupplungsreagenzien oder völlig neuartiger Kupplungsmethoden liefert inzwischen gute Ergebnisse für Aib-haltige Peptide und sogar Aib-Oligosequenzen. So erzielten Kamiński *et al.* mit triazinbasierten Kupplungsreagenzien wie

dem Triazinylammoniumtetrafluorborat **P** gute bis sehr gute Ergebnisse, was Ausbeute und Reinheit anbelangt (Abb. 2.17). Verschiedene Aib-haltige Dipeptide können mit diesem neuartigen Kupplungsreagenz in Ausbeuten von 80 % und mehr erhalten werden.^[75]

Zwei verschiedene Methoden für die Kupplung von α -Aminoisobuttersäure oder Aib-haltigen Dipeptiden miteinander verwendet die Arbeitsgruppe von Heimgartner. Die Kupplung dreier Aib-haltiger Dipeptide, von denen eine in Abbildung 2.18 gezeigt ist, und die anschließende Zyklisierung zu einem 18-gliedrigen Zyklohexapeptid gelingt in guten Ausbeuten unter Verwendung von PyAOP für sämtliche Kupplungsschritte.^[76]

Für die Synthese eines Aib-haltigen Dipeptids verwendet dieselbe Arbeitsgruppe den Azirinbaustein **Q**, welcher die herkömmliche Aktivierung einer Aminosäure umkehrt.^[77] In diesem Fall wird anstelle der Carboxylgruppe die Aminogruppe für die Kupplung aktiviert, was bei der Syntheseplanung berücksichtigt werden muss und diese Art der Kupplung für die klassische Festphasensynthese ungeeignet macht. Dennoch können in Lösung gute Ergebnisse erzielt und in Verbindung mit der von Leplawy *et al.* entwickelten Oxazolomethode, bei der α,α -dialkylierte Aminosäuren in Form eines Oxazolons aktiviert werden, sogar einige Peptaibolfragmente synthetisiert werden.^[78] Die Synthese von Alamethicin und einiger Analoga gelang der Gruppe um Toniolo durch gezielte Verknüpfung dreier Peptidfragmente. Die Leistungsfähigkeit des Kupplungsreagenzes EDC in Verbindung mit HOBt oder HOAt wird dadurch unterstrichen, dass bei sämtlichen Kupplungsschritten die Carboxylgruppe eines Aib-Restes aktiviert wird und sogar eine Kupplung an die sterisch gehinderte, zyklische Aminosäure Prolin möglich ist.^[79]

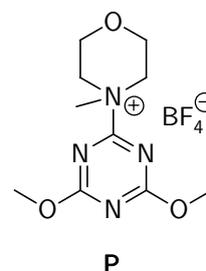


Abbildung 2.17: Neuartiges Kupplungsreagenz **P** auf Triazinbasis

Weiterhin findet die mikrowellenunterstützte Synthese auch in der Peptidchemie immer mehr Anwendung. So existieren bereits Syntheseautomaten, die eine Peptidsequenz Mikrowellen-unterstützt in kürzester Zeit synthetisieren können. Einzelne Kupplungs- und Entschützungs-schritte sind innerhalb von Sekunden oder weniger Minuten vollständig, so dass auch längere Peptide bis 20 Aminosäuren innerhalb eines Tages hergestellt werden können. Eine Übertragung auf Aib-haltige Peptide ist ebenso möglich wie die Anwendung in der organischen Synthese. Eine ausführliche Übersicht über den aktuellen Stand der Mikrowellensynthese gibt Kappe.^[80,81]

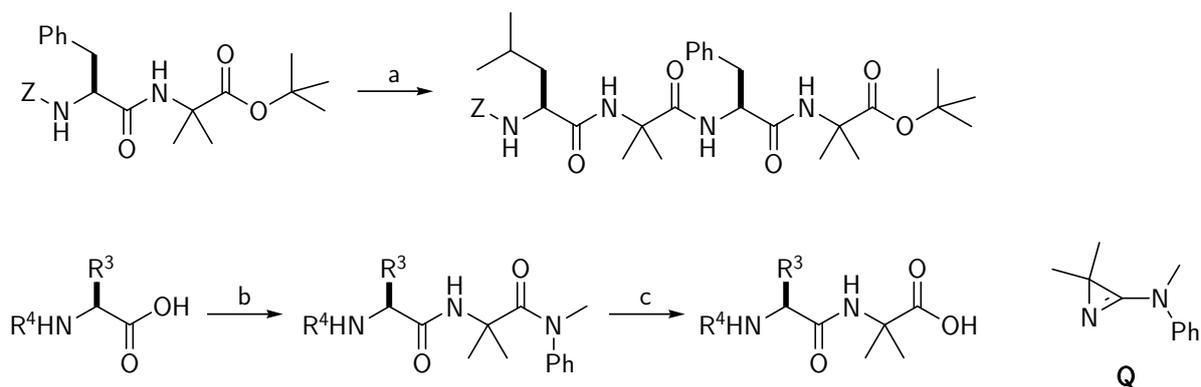


Abbildung 2.18: Verschiedene Kupplungsmethoden nach Heimgartner: 1. Verknüpfung zweier Aib-haltiger Dipeptide ((a) 1. H₂, Pd/C, MeOH, RT, über Nacht; 2. Z-Leu-Aib-OH, PyAOP, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 20 h, 81 %); 2. Einführung eines Aib-Restes nach der Azirin/Oxazolone-Methode ((b) **Q**, CH₂Cl₂; (c) 3 M HCl, THF/H₂O)

Verwendung von α -Azidocarbonsäuren und α -Azidocarbonsäurederivaten in der Peptidsynthese

Die zur Zeit wohl effektivste und für die Festphasensynthese am besten geeignete Methode zur Einführung α,α -dialkylierter Aminosäuren in Peptide ist die zunächst von der Gruppe um Meldal entwickelte und von Jost *et al.* optimierte Verwendung von α -Azidocarbonsäurederivaten.

Während in der Kohlenhydratchemie die Azidogruppe als Äquivalent von Aminogruppen schon lange verwendet wird,^[82–84] existieren in der Peptidchemie bisher erst wenige Anwendungsbeispiele. Meist wird in solchen Fällen, wenn es nicht auf eine definierte Stereochemie ankommt, die Azidogruppe durch Substitution eines Bromids eingeführt. Dies ist beispielsweise für die Darstellung von α -Azidoisobuttersäure eine sehr einfache

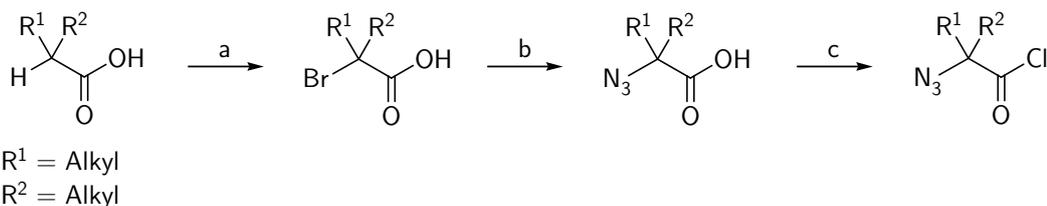


Abbildung 2.19: Darstellung eines beliebigen α,α -dialkylierten Azidosäurechlorids nach Meldal: (a) NBS, CCl₄, Rückfluss, über Nacht; (b) NaN₃, DMF, RT, 2 d; (c) SOCl₂, Rückfluss, 2 h

Möglichkeit. Die Gruppe von Meldal beschreibt die Vorgehensweise anhand verschiedener α,α -dialkylierter Azidosäuren, wobei die beiden α -Substituenten variiert werden

können.^[85,86] Zunächst erfolgt eine Bromierung der α -Position, welche von einer Substitution des Bromids mit Natriumazid gefolgt wird (Abb. 2.19). Zur Aktivierung von α,α -dialkylierten Aminosäuren kann auf das Säurehalogenid zurückgegriffen werden, da mit keinerlei Racemisierung durch Deprotonierung in α -Position gerechnet werden muss.

Ist die Stereochemie jedoch wie im Falle von D-Isovalin und L-Isovalin, oder D- α^{Me} Leucin und L- α^{Me} Leucin von Bedeutung muss auf andere Verfahren zur Darstellung der Azidosäure zurückgegriffen werden. Ein wichtiger Syntheseweg ist der Diazotransfer, bei dem aus einer Aminosäure direkt die Azidosäure dargestellt werden kann. Die Reaktion erfolgt kupferkatalysiert, indem zunächst aus Triflylanhydrid und Natriumazid das Triflylazid hergestellt wird, welches in der eigentlichen Reaktion als Diazotüberträger dient (Abb. 2.20).^[87-89] Da bei diesem Verfahren die Stereochemie nicht verändert wird, kann dieses Verfahren auch bei enantiomerenreinen Aminosäuren angewendet werden.

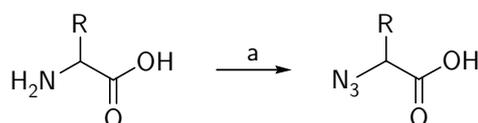


Abbildung 2.20: Darstellung von Azidosäuren aus der Aminosäure mit Hilfe eines Diazotransfers: (a) $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{N}_3$, CuSO_4 , K_2CO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, RT, über Nacht

Azidocarbonsäuren und ihre Derivate (z. B. Säurehalogenide) haben in der Peptidchemie ein breites Anwendungsgebiet. So verwenden Jost *et al.* α -Azidoisobuttersäurechlorid für die erste Totalsynthese von Efrapeptin C und einiger Efrapeptin-Analoga.^[46,47,90] Dabei wird zunächst α -Azidoisobuttersäurechlorid ausgehend von 2-Bromisobuttersäureethylester in einer dreistufigen Synthese hergestellt (vgl. Abb. 2.19). Dieses kann anschließend direkt für Kupplungsreaktionen in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden. Die Kupplungsreaktion läuft ohne zusätzliches Kupplungsreagenz unter basischen Bedingungen ab, wobei die Reaktionszeiten mit 30 min recht kurz gehalten werden können.

Um die Azidogruppe anschließend unter Freisetzung der Aminogruppe zu reduzieren, wenden Jost *et al.* eine von der Arbeitsgruppe von Vilarrasa entwickelte Methode an (Abb. 2.21).^[91,92] Da bei der Festphasensynthese nur auf lösliche Reagenzien zurückgegriffen werden kann, ist eine Reduktion durch katalytische Hydrierung nicht möglich, während diese bei Lösungssynthese das Mittel der Wahl darstellt. Das von Vilarrasa entwickelte Zn^{II} -haltige Reagenz $[\text{Et}_3\text{NH}]^+[\text{Sn}(\text{SPh})_3]^-$ bietet sich für die manuelle

Festphasenpeptidsynthese an, da es zum einen leicht herzustellen und sehr reaktiv ist und zum anderen in den entsprechenden Lösungsmitteln löslich ist und eine sehr hohe Chemo-selektivität besitzt. Während die Azidogruppe problemlos zur Aminogruppe reduziert wird, werden außer der Nitrogruppe keinerlei eventuell in den Seitenketten vorhandene funktionelle Gruppen angegriffen.

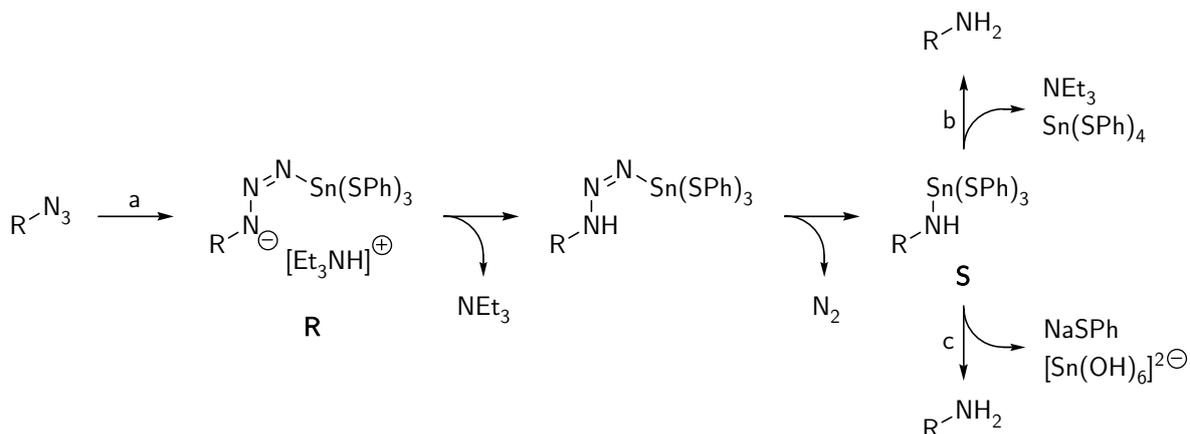


Abbildung 2.21: Reaktionsmechanismus der Reduktion einer Azidogruppe mit dem Vilarrasa-Reagenz: (a) $[Et_3NH]^+[Sn(SPh)_3]^-$; (b) $[Et_3NH]^+[PhS]^-$; (c) NaOH

Nach Bildung des Addukts **R** kommt es durch Protonentransfer und Eliminierung von N_2 zur Ausbildung von **S**. In Lösung wird anschließend meist durch Waschen mit Natronlauge das Amin freigesetzt. Es entsteht Stannat $[Sn(OH)_6]^{2-}$, wobei überschüssiges Sn^{II} als Stannit $[Sn(OH)_3]^-$ in der wässrigen Phase gelöst wird. Da bei der Festphasensynthese das Waschen mit Natronlauge nicht möglich ist, wird jeweils ein zusätzliches Äquivalent Thiophenol und Triethylamin zugesetzt, so dass direkt das freie Amin und $Sn(SPh)_4$ entstehen. Während das Amin an den festen Träger gebunden ist, können das Nebenprodukt und überschüssige Reagenzien durch Filtration entfernt werden.

Eine große Vielfalt enantiomerenreiner α,α -dialkylierter α -Azidosäuren ist durch eine Kombination der nichtstereoselektiven Synthese nach Meldal (vgl. Abb. 2.19) und einer enzymatischen Racematspaltung zugänglich. Erst kürzlich beschrieben Jost *et al.* eine allgemeine Vorgehensweise am Beispiel von D- und L- α^{Me} Leucin.^[93] Hierzu wird zunächst die gewünschte racemische Azidosäure synthetisiert, welche anschließend zum Amid umgesetzt werden kann. Durch Hydrolyse dieses Azidosäureamids mit der L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* wird stereoselektiv α -Azido-L- α^{Me} leucin mit einem Enantiomerenüberschuss von $> 98\%$ ee gebildet, während α -Azido-D- α^{Me} leucin als Azi-

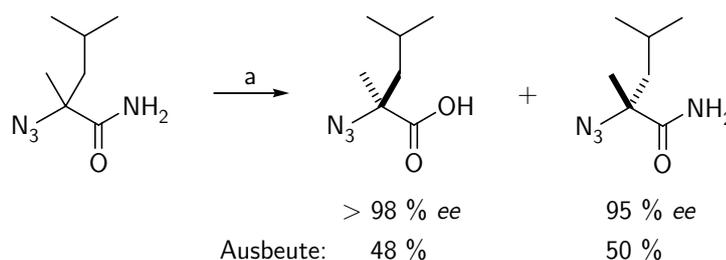


Abbildung 2.22: Enzymatische Racematspaltung eines α -Azidocarboxamids: (a) L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi*, pH 8, 55°C, 1 mM ZnSO₄, 7 d

dosäureamid mit einem Enantiomerenüberschuss von 95 % *ee* zurückbleibt (Abb. 2.22).

Dass Kupplungen mit Azidosäuren auch in Form von Klickchemie funktionieren, zeigten wiederum Mitarbeiter von Meldal. In einer Cu^I-katalysierten 1,3-dipolaren Zykladdition eines Alkins an ein Azid können Azidosäuren mit ihrem *N*-terminalen Ende in Form des Triazols nahezu beliebig in eine Peptidsequenz integriert werden, sofern in dieser ein endständiges Alkin vorhanden ist (Abb. 2.23).^[94] Die Möglichkeiten, die

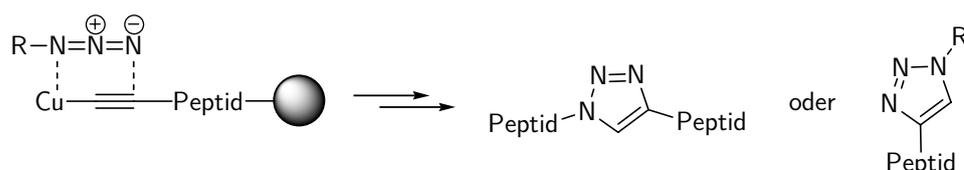


Abbildung 2.23: Cu^I-katalysierte 1,3-dipolare Zykladdition eines Alkins an ein Azid unter Ausbildung von Peptidotriazolen oder *N*-substituierten Histidin-Analoga

sich aus derartigen Verknüpfungen ergeben, sind zahlreich. So ist es einerseits möglich, am *N*-terminalen Ende eines Peptids eine zusätzliche Carboxylfunktion zu platzieren. Andererseits kann die Klickchemie auch auf Seitenketten angewendet werden, was beispielsweise zu Seitenkettenanaloga *N*-substituierter Histidine führen kann. Eine Anwendbarkeit dieser Methode auf die Festphasensynthese ist problemlos möglich, was die automatisierte Synthese derartiger Peptide begünstigt.

2.2 Efrapeptide

Efrapeptide sind eine Klasse sequenzhomologer Peptide, die von dem Pilz *Tolyocladium niveum* und ähnlichen Vertretern dieser Gattung wie beispielsweise *Tolyocladium parasiticum*, *Tolyocladium geodes* oder *Tolyocladium inflatum* produziert werden. Sie

zählen zwar formal nicht zu den Peptaibolen, sind mit ihnen allerdings eng verwandt. Die Efrapeptine sind seit den 1970er Jahren bekannt und insbesondere seit der massenspektrometrisch und chromatographisch gestützten Bestimmung der Sequenzen durch Gupta *et al.*^[95,96] und der Kristallstruktur von Efrapeptin C im Komplex mit mitochondrialer F₁-ATPase durch Abrahams *et al.*^[97] in den 1990er Jahren im Fokus der aktuellen Forschung.

Neben mehreren α -Aminoisobuttersäure- und Isovalinresten enthalten die Efrapeptine

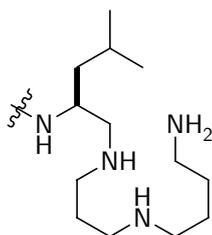


Abbildung 2.24: Kopfgruppe der Elvapeptine

Pipicolinsäure, β -Alanin, Glycin, Alanin und Leucin. Das *N*-terminale Ende liegt außerdem wie bei den Peptaibolen acetyliert vor. Das *C*-terminale Ende unterscheidet sich hingegen durch eine spezielle Kopfgruppe von den Peptaibolen. Die Kopfgruppe ist eine formal von Leucinol und DBN abgeleitete Amidiniumeinheit, die in dieser Form als erstes in den Efrapeptinen entdeckt wurde. Einen Zusammenhang mit den 1982 von Bullough *et al.*^[98] erstmals beschriebenen Elvapeptinen sehen Uma *et al.*^[99] Die Kopfgruppe der Elvapeptine ist ein Spermidin-Derivat, welches als biosynthetischer Vorläufer der Amidiniumeinheit der Efrapeptine angesehen werden kann (Abb. 2.24).

Gestützt wird diese Hypothese durch einige von Uma *et al.* durchgeführte Experimente.^[99] Sie isolierten die Elvapeptine aus denselben Fermentationsbrühen wie die Efrapeptine und konnten einen erhöhten Anteil der Elvapeptine ausmachen, wenn die Fermentation in einem recht frühen Stadium abgebrochen wurde und die Sauerstoffversorgung eingeschränkt war. Auch ist eine Überführung der Elvapeptine in die Efrapeptine durch *in vitro*-Behandlung mit Cu^I-Chlorid, Pyridin und Luft möglich. Diese Ergebnisse sprechen für einen engen Zusammenhang zwischen den *C*-terminalen Kopfgruppen dieser beiden Peptidklassen.

Efrapeptine inhibieren die Photophosphorylierung in Pflanzen und Bakterien^[100,101] und die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien^[102,103], in einigen, jedoch nicht sämtlichen Bakterienarten^[100,104,105] und in Parasiten wie *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der Chagas-Krankheit.^[106] Die Inhibierung erfolgt durch Bindung an die F₁-Untereinheit der F₁F₀-ATPase. Frühe Studien gingen von einer Bindung aus, die kompetitiv zur Phosphatbindung durch den ATPase-Komplex erfolgt, was für eine Überlappung der Efrapeptin-Bindungsstelle mit der Phosphat-Bindungsstelle spricht.^[107,108] In aktuellen Studien hingegen wird davon ausgegangen, dass die Bindung in einer zen-

tralen Kavität des Enzymkomplexes mit Kontakten zur zentralen γ -Untereinheit, zur β_E -Untereinheit und der angrenzenden α -Untereinheit erfolgt, was eine allosterische Reduktion der ADP- oder Phosphatbindungsaffinität wahrscheinlicher macht.^[109]

Vermutlich ebenfalls auf die ATPase-Inhibierung zurückzuführen sind die antiproliferativen Eigenschaften der Efrapeptine, was sie zu Kandidaten für die Tumorthherapie macht.^[110] Zudem sind sie aktiv gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, welcher gegenüber vielen bekannten Wirkstoffen Resistenzen aufweist.^[111]

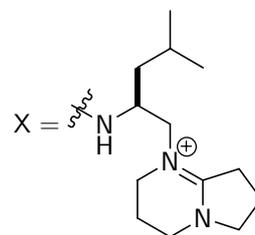
2.2.1 Sequenzen der Efrapeptine

Der am besten untersuchte und zuerst von Jost *et al.* synthetisierte Vertreter der Efrapeptine ist Efrapeptin C.^[46,47] Neben Efrapeptin C sind eine Reihe weiterer Efrapeptine bekannt (Efrapeptine A–I). Während bei den Efrapeptinen C–G bei sämtlichen Forschungsgruppen Einigkeit über die Zusammensetzung der Sequenzen herrscht, finden sich für Efrapeptin A zwei Sequenzvorschläge.^[110,111] Die Efrapeptine B,^[110] H und I^[111] wurden jeweils nur von einer Forschungsgruppe beschrieben.

Papathanassiou *et al.* bezeichnen die Sequenz Ac-Aib-Gly-Leu-Iva-X als Efrapeptin A und die Sequenz Ac-Leu-Iva-X als Efrapeptin B.^[110] Nagaraj *et al.* hingegen bezeichnen ein aus *Tolypocladium* neben den anderen Efrapeptinen isoliertes Peptid der Masse 1592 Da als Efrapeptin A, ohne jedoch eine genaue Sequenzanalyse vorgenommen zu haben.^[111] Dieselbe Gruppe konnte zudem auch die Efrapeptine H (1662 Da) und I (1676 Da) isolieren, gibt jedoch ebenfalls keine Sequenz an. Es wird lediglich darauf hingewiesen, dass die Efrapeptine sich dadurch unterscheiden, dass Gly gegen Ala und Aib gegen Iva ausgetauscht werden, wodurch die Massenunterschiede von 14 Da erklärt werden können.

Tabelle 2.1: Sequenzen der Efrapeptine C–G

Efrapeptin	Sequenz
C	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X
D	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
E	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
F	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-Iva-X
G	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-Iva-X



Da sich die Forschung an den Efrapeptinen zumeist auf die Efrapeptine C–G beschränkt, sollen im Folgenden nur diese behandelt werden.

Sie unterscheiden sich von Efrapeptin C und untereinander in nur drei Positionen der Aminosäuresequenz (Tab. 2.1). Der Einbau von Alanin anstelle von Glycin und von Isovalin anstelle von α -Aminoisobuttersäure kommt vermutlich durch Ungenauigkeiten während der nichtribosomal erfolgenden Synthese der Efrapeptine zustande. Bei der Isolierung wird auf Grund der ähnlichen Eigenschaften der sequenzhomologen Efrapeptine immer ein Gemisch erhalten, welches jedoch HPL-chromatographisch getrennt werden kann (Abb. 2.25).^[112]

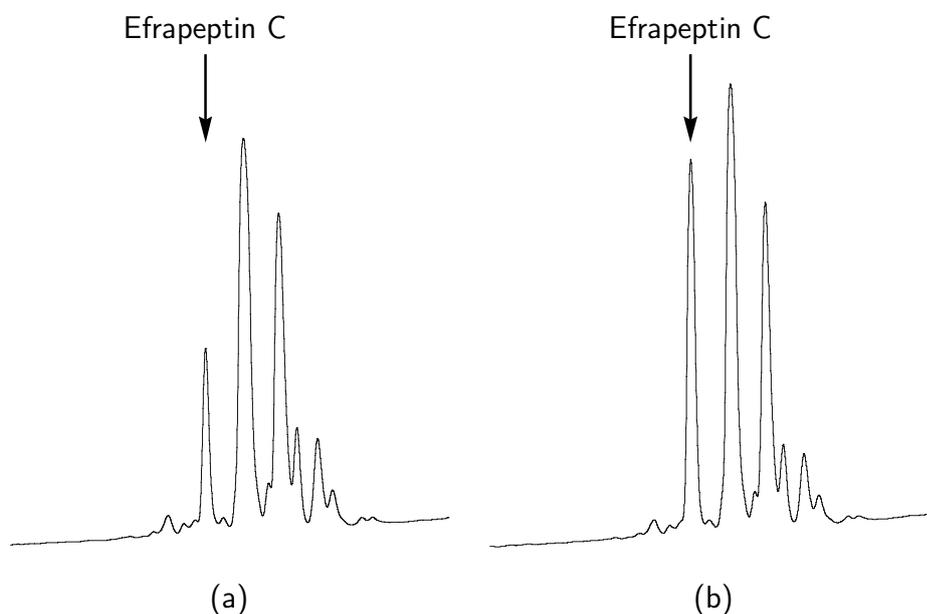


Abbildung 2.25: Vergleich des mikroheterogenen Gemisches von Efrapeptinen aus *Tolypocladium niveum* (a) und des mit synthetischem Efrapeptin C angereicherten Gemisches (b)

Interessant ist außerdem der Einbau der zyklischen Pipecolinsäure. Erst kürzlich wurde über die Biosynthese dieser seltenen Aminosäure durch RapL, einer Lysin-Zykloamidase, berichtet.^[113] Demnach wird Pipecolinsäure in einem NAD^+ -abhängigen Zyklus produziert, der dem von der Prolinsynthese bekannten Ornithinzyklus ähnlich ist. Durch massenspektrometrische Experimente, die teilweise durch gezielte Isotopenmarkierung unterstützt wurden, HPL-Chromatographie und spezielle Inhibierungsversuche konnten Gatto *et al.* die Biosynthese von Pipecolinsäure aus Lysin beweisen. Das gegenüber Prolin zusätzliche Ringatom hat seinen Ursprung in der um eine Methyleneinheit verlängerten Seitenkette von Lysin gegenüber Ornithin.

Während die Efraeptine gewöhnlich aus den oben genannten Organismen der Gattung *Tolypocladium* isoliert werden, berichten Boot *et al.* über die Isolierung von Efraeptin G aus Pilzen der Gattung *Acremonium*.^[114] Dies zeigt, dass die Efraeptine vermutlich stärker verbreitet auftreten und von deutlich mehr verschiedenen Organismen produziert werden als zunächst angenommen.

2.2.2 Studien an Efraeptinen

Die Efraeptine wurden auf Grund ihrer interessanten biologischen und medizinischen Eigenschaften bereits für verschiedene Studien eingesetzt. Zum einen stellt die Inhibierung von ATPasen eine Möglichkeit dar, sowohl mechanistische als auch strukturelle Untersuchungen an diesem für sämtliche Organismen essentiellen Enzymkomplex vorzunehmen. Zum anderen bieten die Efraeptine sich auf Grund ihrer antiproliferativen Eigenschaften für die Verwendung in der medizinischen Forschung als potentielle Wirkstoffe gegenüber hyperproliferativen Erkrankungen an, zu denen unter anderem Tumorerkrankungen zählen.

ATPase-Inhibierung

Für die Erforschung von Abläufen in Verbindung mit ATPasen stellt die Verwendung von Efraeptinen als Inhibitoren dieser Enzymkomplexe ein wichtiges Mittel dar. ATPasen dienen der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), welches einer der wichtigsten Energielieferanten in einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen ist, aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat und sind daher wichtiger Bestandteil der Atmungskette. Es existieren verschiedene Arten von ATPasen. Die wichtigsten sind die mitochondriale ATPase, die Chloroplasten-ATPasen und die bakteriellen ATPasen, die sich im Wesentlichen in Anzahl, Zusammensetzung und Struktur der Untereinheiten unterscheiden.^[115,116] Die mitochondriale ATPase befindet sich in der Mitochondrienmembran ist für die Bereitstellung von ATP in eukaryontischen Zellen verantwortlich. Die Chloroplasten-ATPase ist in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert, während die bakterielle ATPase

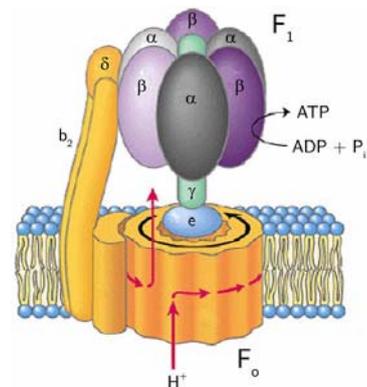


Abbildung 2.26: Schematischer Aufbau des ATPase-Komplexes^[5]

in der bakteriellen Membran zu finden ist. Sämtliche H^+ -ATPasen haben gemeinsam, dass sie einen transmembranen Protonengradienten zur ATP-Synthese nutzen.

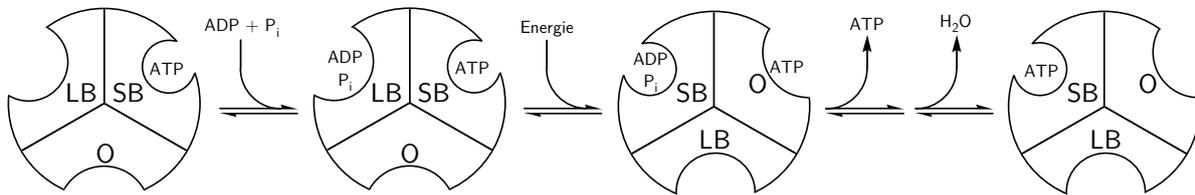


Abbildung 2.27: Mechanismus der ATP-Synthese: LB (*loose binding*, schwach bindend), SB (*strong binding*, stark bindend), O (*open*, offen)^[117,118]

Diese komplexen Enzyme bestehen im Wesentlichen aus zwei Domänen mit mehreren Untereinheiten (Abb. 2.26). Die F_o -Domäne befindet sich in der Membran und ist für den Protonentransport vom Intermembranraum durch die Membran in die umgebende Matrix zuständig. Die daraus resultierende protonenmotorische Kraft bewirkt eine

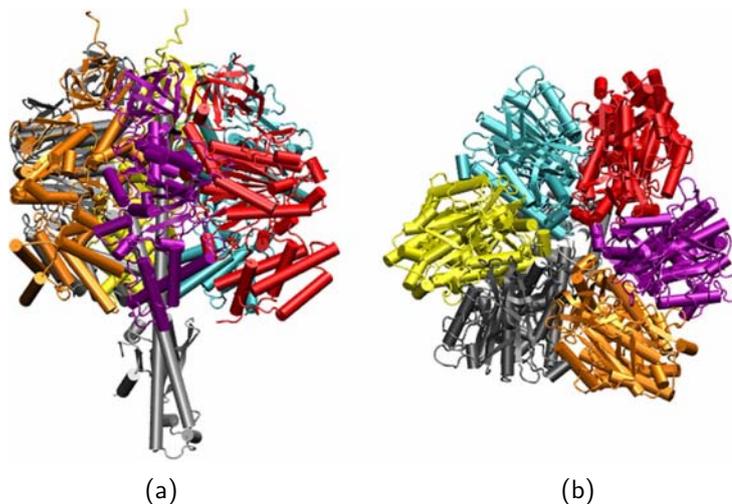


Abbildung 2.28: F_1 -ATPase: (a) von oben, (b) von der Seite (erstellt aus PDB-Daten mit Mol-Script)^[97,119]

Rotation der F_o -Domäne, welche an die γ -Untereinheit der F_1 -Domäne gebunden ist. Die F_1 -Domäne befindet sich außerhalb der Membran und besteht im Allgemeinen aus drei α -, drei β -, einer γ - und einer ϵ -Untereinheit. Durch die Rotation des F_o -Teils werden Veränderungen in den β -Untereinheiten des F_1 -Teils hervorgerufen, in dem die ATP-Synthese abläuft.

Die β -Untereinheiten können in drei unterschiedlichen Konformationen vorliegen, einer offenen, einer schwach bindenden und einer stark bindenden. Während der ATP-Synthese erfahren die β -Untereinheiten durch die Rotation des F_1 -Teils um die F_o -Domäne Konformationsänderungen, durch die die Affinität zu Substrat (ADP und P_i) und Produkt (ATP) verändert wird. Zunächst werden ADP und Phosphat schwach an eine β -Untereinheit gebunden. In einem zweiten, durch die protonenmotorische Kraft induzierten, energieabhängigen Schritt, werden beide Komponenten stark gebunden, und die ATP-Synthese läuft ab. Im dritten Schritt wird ATP als Energielieferant von dem Enzymkomplex abgegeben (Abb. 2.27). Diese Hypothese der Kopplung über Konformationsänderungen der ATPase für die oxidative Phosphorylierung stammt von Boyer, wofür er zusammen mit Walker 1997 den Nobelpreis für Chemie erhielt.^[117,118]

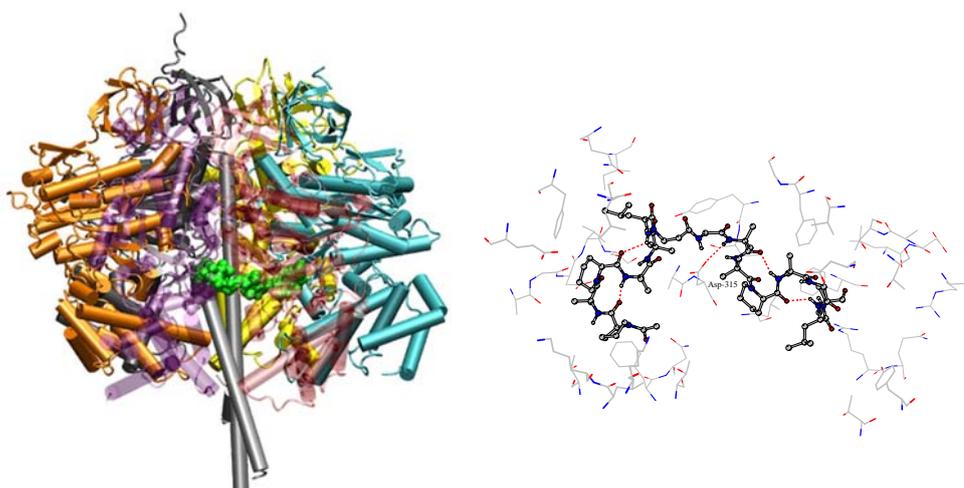


Abbildung 2.29: Efraeptin C im Komplex mit der F_1 -ATPase (erstellt aus PDB-Daten mit Mol-Script)^[97,119]

Die Gruppe um Walker konnte u. a. mit Hilfe der Efraeptine, insbesondere Efraeptin C röntgenkristallographisch die Struktur der F_1 -ATPase ermitteln, was zu einem weitreichenden Verständnis dieses Enzymkomplexes wesentlich beigetragen hat (Abb. 2.28). Danach besitzt der F_1 -ATPase-Komplex eine große zentrale Kavität zwischen den α - und β -Untereinheiten, die durch die γ -Untereinheit flankiert wird.^[120] In genau diesen Hohlraum kann sich ein Efraeptin-Molekül einlagern, wobei Walker *et al.* nur Efraeptin C beobachten konnten, was die übrigen Efraeptine jedoch nicht ausschließt. Bei den Wechselwirkungen des Efraeptin C mit den Untereinheiten α_E , α_{TP} , β_E und γ der F_1 -ATPase handelt es sich überwiegend um hydrophobe Interaktionen, die im Falle der Rindermitochondrien-ATPase durch zwei Wasserstoffbrücken

(Abb. 2.29: Efrapeptin-Aib⁹-β_E-Asp³¹⁵ und Efrapeptin-Aib²-α_E-Val³³⁴, nicht abgebildet) unterstützt werden. Die dadurch hervorgerufenen leichten Veränderungen sowohl in der γ-Untereinheit, als auch in den β-Untereinheiten führen zu einer Verringerung der Nukleotidbindungsaffinität, einer essentiellen Voraussetzung bei der ATP-Synthese. Diese Erkenntnis steht in Einklang mit dem von Boyer vorgeschlagenen Mechanismus, bei dem zunächst ADP und Phosphat gebunden werden müssen, um anschließend zu ATP umgesetzt werden zu können.^[97] Interessant ist zudem, dass sich die Inhibitorbindungsstelle gegenüber anderen Inhibitoren unterscheidet. Erst kürzlich konnten Walker *et al.* hierzu neue Ergebnisse liefern, die für unterschiedliche Inhibitoren insgesamt vier verschiedene Bindungsstellen im F₁-ATPase-Komplex aufzeigen, was für unterschiedliche Inhibierungsmechanismen je nach verwendetem Inhibitor spricht.^[109,121]

Untersuchungen zu antiproliferativen Eigenschaften der Efrapeptine

Zellwachstum ist ein normaler, für sämtliche Organismen lebensnotwendiger Prozess. Es besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen, der DNA-Replikation und der Zellteilung (Mitose). Die DNA-Replikation, auch als Interphase bezeichnet, wird wiederum in drei Phasen (G1-, S- und G2-Phase) unterteilt. Die G1-Phase wird auch als postmitotische oder Präsynthesephase bezeichnet und beinhaltet den Beginn des erneuten Zellwachstums und die Ergänzung von Zellbestandteilen wie Cytoplasma oder Organellen. Es liegt in dieser Phase ein vollständiger Satz von Ein-Chromatid-Chromosomen vor. Die S-Phase ist die Synthesephase, in der die DNA-Replikation abläuft und Histone produziert werden. Aus den Ein-Chromatid-Chromosomen entstehen Zwei-Chromatiden-Chromosome. In der G2-Phase, die auch als prämitotische oder Postsynthesephase bezeichnet wird, kommt es zur Vorbereitung auf die erneute Mitose. Kontakte zu Nachbarzellen werden gelöst, die Zelle vergrößert sich durch Flüssigkeitsaufnahme und bildet vornehmlich RNA-Moleküle und mitosespezifische Proteine. Die Mitose läuft ebenfalls in mehreren Phasen ab, in denen zum einen die Chromosomen und der Zellkern geteilt werden, zum anderen die Zelle selbst. Soll eine durch Mitose gebildete Zelle eine bestimmte Funktion im Organismus übernehmen, geht sie anschließend nicht in die G1-Phase über, sondern verbleibt in der so genannten G0-Phase, in der keine Teilung mehr stattfindet. Dies ist beispielsweise bei Nerven- oder Muskelzellen der Fall. Leberzellen oder Lymphocyten hingegen verbleiben über Wochen oder Monate in der G0-Phase, können jedoch in die G1-Phase zurückkehren und so eine erneute Zellteilung einleiten.^[122]

In gesunden Lebewesen sind sämtliche Abläufe der Zellproliferation durch intrinsische oder extrinsische Einflüsse geregelt. Extrinsische Faktoren können beispielsweise wachstumsstimulierende oder -hemmende Botenstoffe, die Anzahl vorheriger Zellteilungen oder einfach der verfügbare Raum sein. Intrinsische Faktoren sind so genannte *checkpoints*, an denen der Zellzyklus überwacht wird und gegebenenfalls unterbrochen (Arretierung) oder durch programmierten Zelltod (Apoptose) beendet werden kann. Verantwortlich für diese Überwachung sind Zellzyklusproteine und Cykline, die zu bestimmten Zeitpunkten der Zellreplikation vermehrt exprimiert werden und bei Erreichen eines Konzentrationsmaximums, welches einen *checkpoint* markiert, schnell wieder abgebaut werden.^[123]

Wird einer dieser komplex ineinander wirkenden Mechanismen gestört, kann es zu schwerwiegenden pathologischen Veränderungen in der Zellproliferation kommen. So kann neben Hyperproliferation auch Angiogenese oder Neovaskularisation auftreten, die charakteristisch sind für Tumorerkrankungen, Psoriasis (Schuppenflechte) oder Atherosklerose bis hin zu HIV-Erkrankungen. Um derartige Erkrankungen verstehen zu können, ist eine detaillierte Kenntnis der Abläufe des Zellzyklus erforderlich. Wichtige Arbeiten auf diesem Gebiet von Hartwell, Hunt und Nurse wurden 2001 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.^[124–126]

In einem 2003 erschienenen Patent werden die Efraeptine neben Oligomycinen, Mycotoxinen und Mycotoxinderivaten als mögliche Kandidaten für die medizinische Behandlung von hyperproliferativen Erkrankungen.^[110] Ein wichtiger Faktor bei der Entstehung derartiger Erkrankungen ist die als Angiogenese bezeichnete Ausbildung von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren), überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Durch sie werden neu entstehende, unkontrolliert wachsende Zellverbände mit Blut versorgt. Da angiogeneseabhängige Erkrankungen von der Proliferation endothelialer Zellen abhängig sind, sieht die Forschung hier einen möglichen Angriffspunkt für neue Wirkstoffe.^[127]

Gerade für die Metastasenbildung ist eine ausreichende Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff über neue Blutgefäße erforderlich. Eine Inhibierung der Proliferation von Endothelzellen behindert daher das Tumorwachstum und die Metastasenbildung.^[128] Da Efraeptine, Olygomycine, Mycotoxine und Mycotoxinderivate anscheinend derartige inhibitorische Eigenschaften aufweisen, ist eine genauere Untersuchung dieser Verbindungen im Zusammenhang mit hyperproliferativen Erkrankungen

sinnvoll und zeigt im Tierversuch bereits gute Erfolge.

Weitere von Papathanassiu *et al.* gerade veröffentlichte Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Efrapeptine in der medizinischen Forschung und die Tatsache, dass die Forschung auf diesem Gebiet erst am Beginn steht und noch viele interessante Ergebnisse erwarten lässt. Wiederum stehen die antiproliferativen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse und den sich daraus ergebenden Möglichkeiten im Fokus.^[129]

2.2.3 Neofrapeptine

Die Neofrapeptine sind eine spezielle Klasse von erst vor kurzem entdeckten Efrapeptinen. Sie enthalten neben den bereits erwähnten Aminosäuren auch 1-Aminocyclopropancarbonsäure und *trans*- β -Methyl-L-prolin. Zudem liegen die Neofrapeptine G und H ohne die charakteristische Kopfgruppe vor, wobei der C-Terminus auch nicht wie bei den Peptaibolen zum Alkohol reduziert ist (Tab. 2.2).

Die Aminosäuresequenzen konnten von Fredenhagen *et al.* weitgehend mit Hilfe verschiedener MS-Techniken, HPLC und GC/MS ermittelt werden.^[34] Unabhängig davon

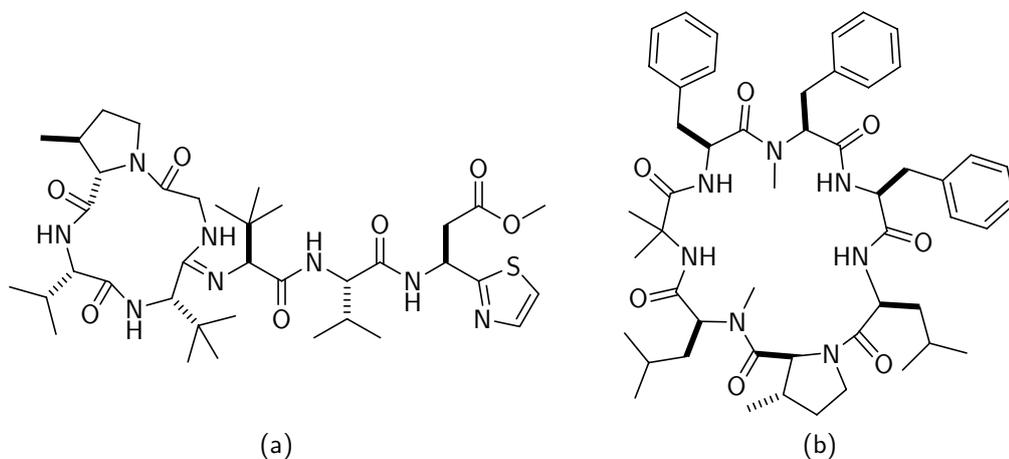


Abbildung 2.30: Die zyklischen Naturstoffe Botromycin A₂ (a) und Scytalidamid B (b)

wurden die Aminosäuresequenzen und die relativen Konfigurationen der Neofrapeptine A und F mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie durch Huber *et al.* bestimmt.^[32] Die Neofrapeptine wurden aus dem Pilz *Geotrichum candidum* isoliert und auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht.^[130] In sämtlichen Neofrapeptinen

Tabelle 2.2: Sequenzen der Neofrapeptine A–N

Neofrapeptin	Sequenz
A	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
B	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Iva-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
C	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Iva-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
D	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
E	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Iva-Leu- β Ala-Gly-Acc-Iva-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
F	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-Iva-X
G	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-OH
H	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Iva-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-OH
I	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Iva-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-Iva-X
L	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Iva-Leu- β Ala-Gly-Acc-Iva- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-Iva-X
M	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Iva- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-Iva-X
N	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X

wurde die ungewöhnliche und sehr seltene Aminosäure 1-Aminocyclopropancarbonsäure mit Hilfe von massenspektrometrischen Fragmentierungsexperimenten und acidolytischer Spaltung der Peptidbindungen mit anschließender Derivatisierung und Analyse durch GC/MS und LC/MS gefunden.

Die zweite sehr seltene und in linearen Peptiden bisher nicht bekannte Aminosäure ist *trans*- β -Methyl-L-prolin. Diese wurde bisher ausschließlich in zyklischen Naturstoffen gefunden, wie beispielsweise Bottromycin A₂ aus *Streptomyces bottropensis*,^[131] Scytalidamid B aus einem marinen Pilz der Gattung *Scytalidium*^[132] oder Roseocardin und Roseotoxin B aus *Trichothecium roseum* (Abb. 2.30 und 2.31).^[133,134] Dabei ist auffällig, dass diese zyklischen Naturstoffe, welche in Form sequenzhomologer Verbindungen isoliert werden, Methylprolin im Austausch für Prolin enthalten. In den Neofrapeptinen tritt Methylprolin dagegen im Austausch für Pipecolinsäure auf.

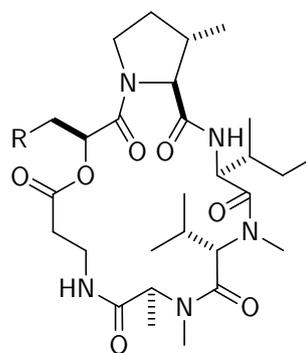


Abbildung 2.31: Die zyklischen Naturstoffe Roseocardin (R = CH(CH₃)₂) und Roseotoxin B (R = CH=CH₂)

Neben der Untersuchung der Aminosäuresequenzen wurden von den Neofrapeptinen A und F CD-Spektren gemessen, die Aussagen über die dreidimensionale Struktur

zulassen. So werden Vergleiche der Neofrapeptine mit den bekannten Efrapeptinen ermöglicht. Die von Fredenhagen *et al.* erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine 3_{10} -helikale Struktur der untersuchten Neofrapeptine hin, was sich gut mit den für Efrapeptin C und einige Efrapeptin-Analoga erhaltenen Ergebnissen von Jost *et al.* deckt.^[34,90]

Synthese von Efrapeptin C

Für die Synthese von Efrapeptin C wird das Gesamtmolekül in drei Fragmente aufgeteilt, welche zunächst einzeln synthetisiert und anschließend zusammengefügt werden. Während das *N*-terminale und das mittlere Fragment mit Hilfe der Festphasensynthese erhalten werden können, muss das *C*-terminale Fragment, welches sich aus dem *N*-terminal geschützten Dipeptid Boc-Leu-Aib-OH und der Kopfgruppe zusammensetzt, in Lösung synthetisiert werden (Abb. 2.32). Bei der Festphasensynthese kommt dabei das in Kapitel 2.1.4 beschriebene Verfahren zur Einführung von α,α -dialkylierten Aminosäuren zum Einsatz.

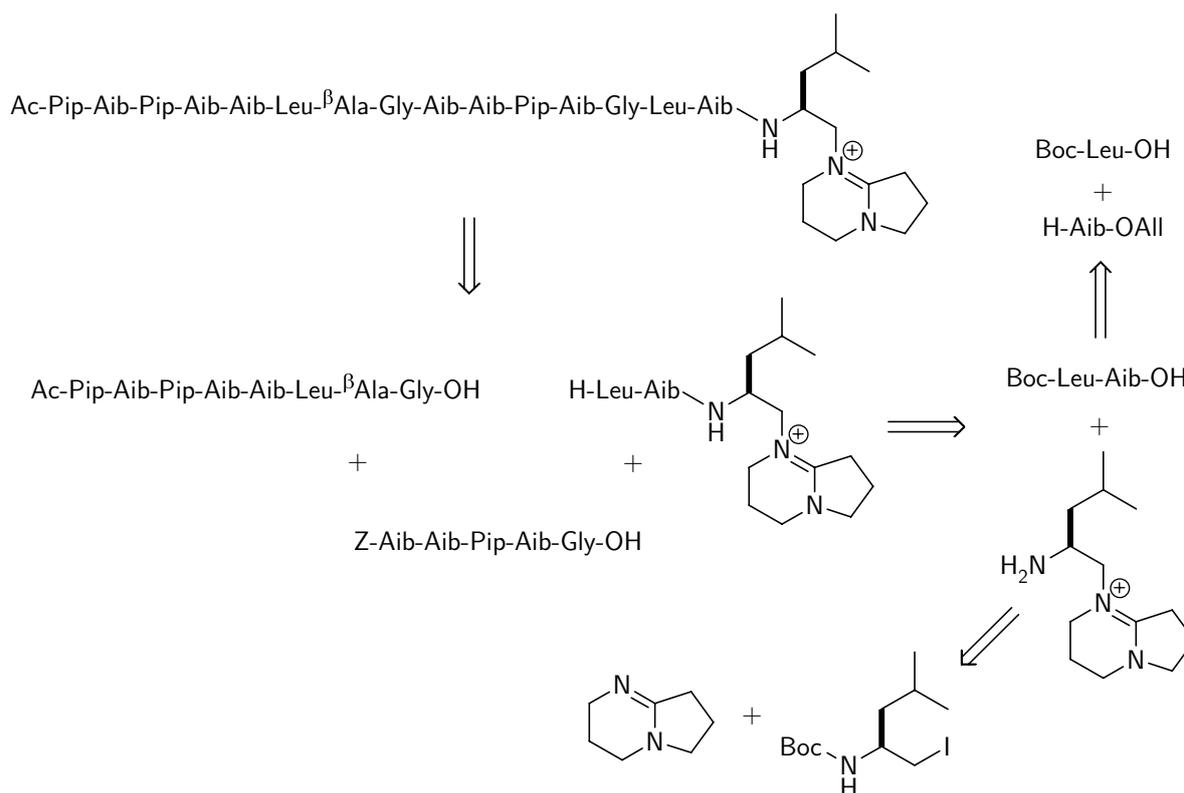


Abbildung 2.32: Retrosynthetische Betrachtung zu Efrapeptin C

Die einzeln synthetisierten Fragmente können anschließend problemlos in Lösung miteinander verknüpft werden. Zunächst wird dabei das mittlere an das *C*-terminale Fragment gekuppelt und der *N*-Terminus der resultierenden *C*-terminalen Hälfte durch Hydrierung entschützt. Es folgt die Verknüpfung dieser Hälfte mit dem *N*-terminalen Fragment ebenfalls in Lösung. Die einzelnen Zwischenprodukte und die Endverbindung können leicht durch präparative RP-HPLC gereinigt werden.^[46,47]

2.3 Adenopeptin

2.3.1 Isolierung und Strukturaufklärung von Adenopeptin

Adenopeptin ist ein den Efrapeptinen strukturell ähnliches Peptid, welches von Pilzen der Gattung *Chrysosporium* produziert wird und zahlreiche α -Aminoisobuttersäure- und Isovalinreste sowie Pipecolinsäure, Prolin, β -Alanin und Glycin enthält (Abb. 2.33). Es wurde von der Gruppe um Hayakawa isoliert, die Aminosäuresequenz bestimmt und auf zytotoxische Eigenschaften an mit Adenoviren onkogen transformierten Zellen untersucht.^[135]

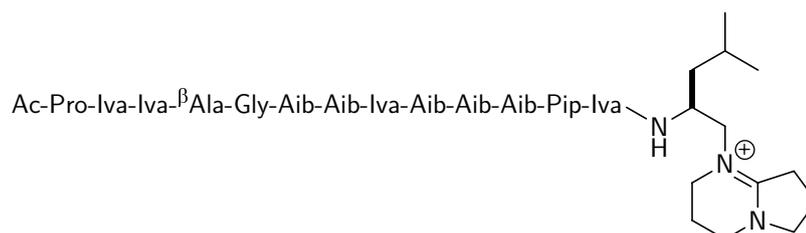


Abbildung 2.33: Adenopeptin

Pilze des Typs *Chrysosporium* sind in der Lage, verschiedene Sekundärmetabolite und Enzyme von therapeutischem Interesse zu produzieren. Zu ihnen zählen neben Adenopeptin das Lektin Anixiopsin,^[136,137] Semicochliodinol A und B^[138] und Sporangol (Abb. 2.34).^[139]

Bisher ist wenig über das aus dreizehn Aminosäureresten bestehende Adenopeptin bekannt, jedoch konnten die Arbeiten der Mitarbeiter von Hayakawa erste viel versprechende Ergebnisse liefern. Die Sequenz von Adenopeptin konnte mit Hilfe von massenspektrometrischen Analyseverfahren und ein- und mehrdimensionalen NMR-Experimenten ermittelt werden. Eine acidolytische Spaltung der Peptidbindungen zur Aminosäu-

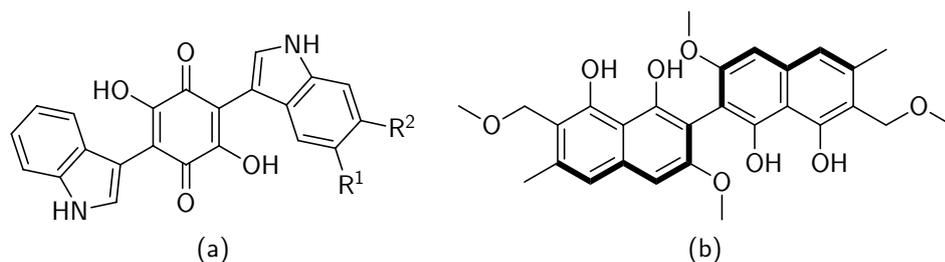


Abbildung 2.34: Die von Sekundärmetabolite (a) Semicochliodinol A ($R^1 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$; $R^2 = \text{H}$), Semicochliodinol B ($R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) und (b) Sporandol

reanalyse, wie sie bei den Efrapeptinen und Neofrapeptinen angewandt wurde, brachte bei Adenopeptin keinerlei Erfolge. Neben der Sequenzanalyse führten Hayakawa *et al.* auch biologische Studien durch. Dabei erwies sich Adenopeptin als zytotoxische Verbindung, die an mit Adenoviren onkogen transformierten Rattengliazellen Apoptose induziert, während nicht transformierte Zellen erst bei hohen Peptidkonzentrationen in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden.^[135] Da die Apoptose in diesem Zusammenhang wichtig für diese Arbeit ist, soll kurz auf diesen für das Überleben von Organismen essentiellen Vorgang eingegangen werden.

2.3.2 Apoptose

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, stellt einen sich im Laufe der Evolution entwickelten Prozess der Anpassung an bestimmte Gegebenheiten wie auch einen für das Überleben eines Organismus essentiellen Selbstschutzmechanismus dar, der bestimmte Zellen durch komplexe biochemisch ineinander wirkende Mechanismen in die Selbstvernichtung treibt.^[140]

Bezogen auf den menschlichen Körper bringen sich für den gesunden Organismus gefährliche oder nicht mehr benötigte Zellen selbst um. Apoptose ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert und unterscheidet sich in ihnen von der pathophysiologischen Form des Zelltods, der Nekrose. Störungen in Abläufen der Apoptose können schwerwiegende pathologische Folgen haben. So wird die unerwünschte Inhibierung der Apoptose mit Tumorentstehung, Autoimmunerkrankungen, zu denen beispielsweise Allergien zählen, und verschiedenen Virusinfektionen (darunter auch Infektionen durch Adenoviren) in Verbindung gebracht. Alzheimer, Parkinsonkrankheit, kardiologische Erkrankungen, Diabetes, Osteoporose oder auch HIV-Infektionen sind hingegen mit übermäßiger Apoptose assoziiert.^[141]

Die Apoptose besteht aus vielen komplex ineinander wirkenden biochemischen Prozessen. Das allgemein anerkannte Grundkonzept der molekularen Apoptosemaschinerie setzt sich jedoch im Wesentlichen aus drei funktionell unterschiedlichen Komponenten zusammen auf die sowohl intrinsische Faktoren einer Zelle, als auch extrinsische Faktoren wirken.^[142]

- Die regulatorisch wirkende Bcl-2-Familie

Die Bcl-2-Familie ist eine Proteinfamilie, die an der Regulation bestimmter Membrankanäle beteiligt ist. Zu ihr gehören sowohl antiapoptotische Faktoren, die die Funktionsfähigkeit bestimmter Membrankanäle aufrechterhalten, als auch proapoptotische Faktoren, die eine Deregulation der Membranfunktionen induzieren.^[143] Diese beiden Gruppen von Proteinen wirken entgegengesetzt auf die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch das für die ATP-Synthese notwendige mitochondriale Membranpotenzial aufrechterhalten wird. Dadurch ist ein regulatorischer Eingriff in die Apoptoseprozesse ausgehend von den Mitochondrien einer Zelle möglich.

- Die integrierend und initiiierend wirkenden aus Mitochondrien freigesetzten Enzyme

Die Mitochondrien können sowohl eigenständig, als auch durch proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie Apoptose induzieren.^[144] Werden die Mitochondrien einer Zelle geschädigt und damit der Energiehaushalt gestört, bricht die Membranregulation und damit verbunden das Membranpotenzial dieser Organellen zusammen. Durch den Ausfall der Kanalregulation strömen verschiedene proapoptotische Moleküle, darunter auch Cytochrom C, in das Cytoplasma der Zelle und bewirken weitere Apoptoseprozesse.

- Die exekutiv wirkenden Caspasen

Durch die oben beschriebenen apoptoseinduzierenden Schritte, wird eine Kaskade aktiviert, in deren Verlauf Cysteinproteasen, die Caspasen, mit der Zerlegung der zelleigenen Proteine beginnen. Die Caspasen liegen in einer nicht-apoptotischen Zelle als inaktive Procaspasen vor, die erst durch Proteolyse und Dimerisierung die exekutiven Caspasen bilden. Es existieren mehrere verschiedene Caspasen, die in Initiator- und Effektor-Caspasen unterteilt werden und sich gegenseitig und auch beispielsweise die für die Zerlegung der DNA verantwortlichen Endonukleasen in der Caspase-Kaskade aktivieren.^[145]

Auf Grund dieser komplexen Zusammenhänge kann im Rahmen dieser Arbeit selbstverständlich nicht auf Einzelheiten der beteiligten Prozesse eingegangen werden. Dennoch ist ein grundlegendes Verständnis gerade in Bezug auf die Caspasen für Überlegungen zum Aufbau eines Apoptose-Assays von Bedeutung (s. Kapitel 4.6.3).

2.4 Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung mit spektrometrischen und spektroskopischen Methoden hat seit der Mitte des 19. Jahrhunderts mit fortschreitender Technik stark an Bedeutung gewonnen. Zu den wichtigsten Methoden haben sich neben der Röntgenstrukturanalyse die NMR-Spektroskopie und die Massenspektrometrie etabliert. Interessante Informationen über Struktur motive liefert zudem die CD-Spektroskopie, wobei die Untersuchung hier nicht auf atomarer, sondern auf gesamt molekularer Ebene stattfindet. Auf die zwei für diese Arbeit wichtigen spektroskopischen Methoden, die NMR-Spektroskopie und die CD-Spektroskopie, soll hier näher eingegangen werden. Ein wesentlicher Unterschied beider Methoden gegenüber der Röntgenkristallographie ist die Tatsache, dass nicht ein starrer Kristall vermessen wird, sondern das Molekül in Lösung vorliegt und damit die erhaltenen Ergebnisse besser mit physiologischen Bedingungen verglichen werden können.

2.4.1 NMR-Spektroskopie

Seit der Entdeckung des NMR-Phänomens durch Bloch *et al.* und Purcell *et al.* (Nobelpreis für Physik, 1952)^[146,147] wurde in den frühen 1950er Jahren die chemische Verschiebung als Information über die chemische Umgebung eines Atomkerns genauer untersucht. Durch die von Ernst *et al.* (Nobelpreis für Chemie, 1991)^[148] entwickelte Puls-Fourier-Transformations-Technik, auf der sämtliche heute gebräuchliche Methoden basieren, konnten bald immer neue NMR-Experimente durchgeführt werden, die durch ein- und mehrdimensionale Verfahren und höhere Auflösungen die Analyse von größeren Verbindungen wie Proteinen mit bis zu 30 kDa zulassen. Inzwischen hat sich die NMR-Spektroskopie zu der wohl wichtigsten Analytikmethode in der Chemie entwickelt.

Einige mehrdimensionale NMR-Experimente, die insbesondere bei komplexeren Molekülen die Signalzuordnungen erleichtern, sollen hier neben der Isotopenmarkierung als

Hilfe für die NMR-basierte Strukturaufklärung kurz vorgestellt werden.

COSY (*correlated spectroscopy*)

Viele Zuordnungsprobleme lassen sich mit Hilfe der mehrdimensionalen verschiebungskorrelierten NMR-Spektroskopie lösen.^[149] Ein wichtiger Vorteil der COSY besteht darin, dass im Spektrum über Korrelationspeaks direkt die skalar koppelnden Atomkerne gefunden werden können. Über die Protonensignale aus einem $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY können mit Hilfe des entsprechenden $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -COSY leicht die zugehörigen Kohlenstoffatome zugeordnet werden. Die Gruppe um Bax zeigt in einer Reihe von Veröffentlichungen die Möglichkeiten der COSY, insbesondere bei der Strukturanalyse von Biomolekülen.^[150,151]

TOCSY (*total correlation spectroscopy*)

Das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY-Experiment liefert Informationen, welche Protonen zu welchem Spinsystem gehören.^[152] So können neben den skalar wechselwirkenden Kernen auch solche gefunden werden, die gemeinsame Kopplungspartner besitzen. Bei Peptiden können durch dieses Experiment sämtliche Protonenresonanzen den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden.

HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) und HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*)

Das $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Verfahren wird häufig verwendet, um Kopplungen über mehrere Bindungen sichtbar zu machen. Aus bekannten Protonensignalen liefert es Informationen über ^{13}C -Resonanzen von Spinsystemen.^[153] Das $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Experiment liefert Informationen, welches Proton direkt an welchen ^{13}C -Kern gebunden ist.^[154]

NOESY (*nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*) und ROESY (*rotating frame Overhauser effect spectroscopy*)

Die NOE-NMR-Spektroskopie (NOESY) ist eine weitere wichtige Methode zur Strukturaufklärung. Der ihr zugrunde liegende NOE basiert auf dipolaren Kopplungen und

stellt eine Spin-Spin-Wechselwirkung zwischen Protonen durch den Raum dar. Messbar ist der NOE, wenn der Kernabstand weniger als 500 pm beträgt. Auch das NOE-Experiment wird meist als zweidimensionales Experiment durchgeführt. Werden auf beiden Frequenzachsen ^1H -chemische Verschiebungen aufgetragen, resultieren Kreuzpeaks aus ^1H , ^1H -Wechselwirkungen, die durch dipolare Kopplungen vermittelt werden. Es handelt sich dabei um Kopplungen, deren Größe nur vom Abstand der miteinander koppelnden Spins, jedoch nicht von der Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen abhängt. Wichtige Arbeit auf dem Gebiet der NOE-Spektroskopie wurde von Wüthrich *et al.* geleistet (Nobelpreis für Chemie, 2002).^[155,156]

Isotopenmarkierung als Hilfe für die NMR-basierte Strukturaufklärung

Soll die Struktur komplexer Verbindungen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden, ergeben sich bei ähnlichen Molekülgruppen häufig Probleme bei der Zuordnung der einzelnen Signale, da es im NMR-Spektrum zu Überlagerungen und sehr ähnlichen Verschiebungen kommen kann. Ein häufig verwendetes Mittel zur Maskierung von bestimmten Molekülteilen für die NMR-Spektroskopie ist die selektive Isotopenmarkierung. Je nach Ziel der durchgeführten Studien kommen häufig ^{13}C , ^{15}N und ^2H zum Einsatz, die auf verschiedene Weise in das Molekül eingebaut werden.

Inzwischen existieren verschiedene Ansätze, die die Isotopenmarkierung als gutes Hilfsmittel zur NMR-basierten Strukturaufklärung etablieren. ^2H - und ^{13}C -Markierungen von RNA-Strängen lieferten bei Tolbert *et al.*^[157] stark vereinfachte HSQC- und NOE-Spektren, während Kim *et al.* einen Ansatz über den Vergleich von NOE-Spektren isotopenmarkierter und nicht markierter RNA wählten.^[158] Ebenso kann die Messung intermolekularer NOE-Signale zwischen Seitenketten in großen Proteinkomplexen durch gezielte Isotopenmarkierung der beteiligten Proteine realisiert werden. Ermöglicht wird dadurch eine verbesserte Strukturanalyse gelöster Protein/Protein-, Protein/Ligand- und Protein/Nukleinsäure-Komplexe.^[159] Neben diesen Beispielen existieren noch zahlreiche andere Möglichkeiten für die Anwendung der Isotopenmarkierung in der NMR-Spektroskopie, auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll.^[160–163]

2.4.2 CD-Spektroskopie

Peptide bilden wie in Kapitel 2.1 bereits beschrieben stabile und klar definierte Sekundärstrukturen aus. Dies ist zum einen auf die speziellen Eigenschaften der Peptidbin-

dung zurückzuführen, zum anderen auch auf die Chiralität der Aminosäurebausteine. Diese definierte Konformation bewirkt in der Natur die biologische Funktion dieser Moleküle.

Eine wichtige Methode zur Konformationsanalyse von Peptiden in Lösung ist heute die CD-Spektroskopie. Sie beruht auf dem Zirkulardichroismus (CD), einem Effekt, der bei optisch aktiven Verbindungen beobachtet werden kann. Planar polarisiertes Licht kann in zwei gleich große Komponenten zirkular polarisierten Lichts zerlegt werden, einer links rotierenden Komponente L und einer rechts rotierenden Komponente R . Zirkulardichroismus kommt durch unterschiedliche Absorption dieser Komponenten durch eine optisch aktive Verbindung zustande. Der Zirkulardichroismus und die damit verbundene anomale Rotationsdispersion werden oft auch als Cotton-Effekt bezeichnet.^[164–166]

Das Messgerät erzeugt beide Komponenten aus planar polarisiertem Licht mit Hilfe eines Modulators, der gewöhnlich aus einem piezoelektrischen Quarzkristall und einer eng mit diesem verbundenen, dünnschichtigen Platte aus isotropem Material wie Quarzglas besteht. Ein alternierendes elektrisches Feld induziert strukturelle Veränderungen in dem Kristall, woraufhin das Quarzglas zirkular polarisiertes Licht aussendet. Wird dieses Licht durch eine Lösung mit einer optisch aktiven Verbindung geleitet, werden die links und die rechts polarisierte Komponente des Lichts unterschiedlich stark absorbiert. Die in dieser Arbeit untersuchten Peptide absorbieren Licht der Wellenlängen 240–180 nm, was auf die Peptidbindungen zurückzuführen ist.

Da die drei π -Orbitale der Peptidbindung insgesamt vier Elektronen besitzen, sind zwei $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge möglich. Während die Promotion eines Elektrons bei 190 nm durch $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ bereits gefunden werden konnte, war ein experimenteller Nachweis der Promotion durch $\pi_+ \rightarrow \pi^*$ bisher nicht möglich.^[167] Bei etwa 220 nm absorbieren die freien Elektronenpaare im Orbital n , welches größtenteils am Carbonylsauerstoff lokalisiert ist, Licht für den $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang. Das Orbital n' mit einem freien Elektronenpaar liegt in der Ebene in Richtung der Carbonylbindung. Die $n' \rightarrow \pi^*$ -Übergänge konnten bisher ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Manning *et al.* stellten jedoch Rechnungen an, die zeigen, dass diese Übergänge energetisch im Bereich

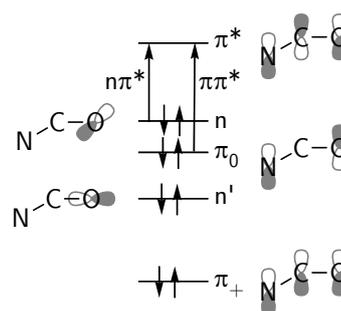


Abbildung 2.35: Mögliche Elektronenübergänge in einer Peptidbindung^[165]

der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge stattfinden sollten (Abb. 2.35).^[168]

Während der Messung wird die Differenz der Absorption ΔA zwischen der links A_L und der rechts A_R zirkular polarisierten Komponente des Lichts detektiert:

$$\Delta A = A_L - A_R = \varepsilon_L \cdot c \cdot l - \varepsilon_R \cdot c \cdot l \quad (2.1)$$

Dabei sind ε_L und ε_R die molaren Extinktionskoeffizienten der links bzw. rechts zirkular polarisierten Komponente des Lichts in $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, c die Konzentration der Probe in $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, und l die Weglänge der Messzelle in cm. Aus dem Wert ΔA kann anschließend die Elliptizität θ berechnet werden:

$$\theta = \tan^{-1} \left(\frac{b}{a} \right), \quad (2.2)$$

wobei b und a die kleinste und die größte Achse der resultierenden Ellipse darstellen. Der Zusammenhang zwischen ΔA und der Elliptizität ergibt sich folgendermaßen:

$$\theta = 180^\circ \cdot \ln 10 \cdot \frac{\Delta A}{4\pi} = 32.98^\circ \cdot \Delta A \quad (2.3)$$

Das CD-Spektrum wird dann durch Messen des Dichroismus als Funktion der Wellenlänge erhalten. Für die anschließende Darstellung der Ergebnisse werden die erhaltenen Werte bei Peptiden und Proteinen zumeist in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]_{\text{MRW}}$ bei der Wellenlänge λ umgerechnet:

$$[\theta]_{\text{MRW},\lambda} = \text{MRW} \cdot \frac{\theta_\lambda}{10} \cdot l \cdot c \quad (2.4)$$

MRW ist die mittlere molare Masse der Aminosäuren in $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, θ die gemessene Elliptizität in mdeg, l die Weglänge in cm und c die Konzentration der Probe in $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Anhand der mittleren molaren Elliptizitäten pro Aminosäurerest lassen sich unterschiedliche Peptide und Proteine gut vergleichen. So können anhand der erhaltenen Werte bei entsprechenden Wellenlängen Aussagen über die Konformation des jeweiligen Peptids gemacht werden.^[169]

Es gibt viele Beispiele für die Verwendung der CD-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von Peptiden. Bereits in den 1990er Jahren führte die Arbeitsgruppe von Toniolo mehrere Untersuchungen an 3_{10} -helikalen Peptiden durch, die in den meisten Fällen

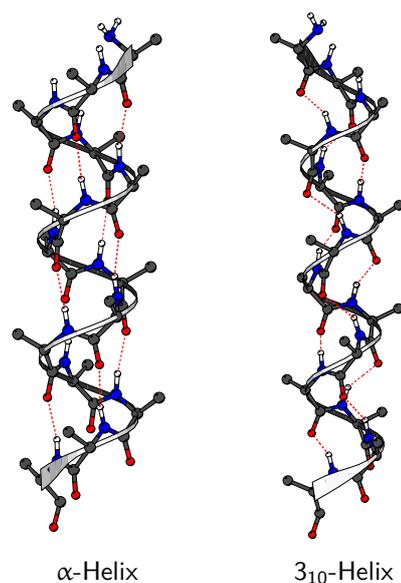


Abbildung 2.36: Vergleich der Strukturen einer α -Helix und einer 3_{10} -Helix (erstellt mit MolScript)^[119]

α,α -dialkylierte Aminosäuren wie α -Aminoisobuttersäure oder Isovalin enthalten. Interessant sind die Ergebnisse bezüglich D- oder L-Isovalin-haltiger Peptide. So konnte mit Hilfe der CD-Spektroskopie festgestellt werden, dass es bei den verwendeten Modellpeptiden keinen detektierbaren Einfluss auf die Händigkeit der gebildeten Helix gibt, wenn man die beiden Enantiomere dieser Aminosäure gegeneinander austauscht.^[170]

Weitere Untersuchungen von Toniolo an 3_{10} -helikalen Peptiden zeigten neben dem Helix-induzierenden Einfluss α,α -dialkylierter Aminosäuren wie Isovalin^[171] die CD-spektroskopische Unterscheidung einer 3_{10} -Helix von einer α -Helix.^[172] Einen umfassenden aktuellen Überblick über weitere vielfältige Möglichkeiten auf diesem Gebiet geben Formaggio *et al.* in einem Übersichtsartikel.^[173] Die Strukturen einer α -Helix und einer 3_{10} -Helix verdeutlicht Abbildung 2.36.

Ebenfalls sehr intensiv beschäftigen sich Majer *et al.* mit der Konformationsanalyse verschiedener Peptide anhand der CD-Spektroskopie. So wurde die Struktur von zyklischen Peptiden als Epitope des Glykoproteins D von *Herpes simplex*-Viren analysiert und die Rolle der Sekundärstruktur in der proteinspezifischen Antikörpererkennung untersucht.^[174] Des Weiteren wurde die Bindung von Ca^{2+} in zyklischen Modellpeptiden, die die Ca^{2+} Bindungsstelle von α -Lactalbumin simulieren, CD-spektroskopisch untersucht. Der Effekt von Ca^{2+} ist dabei abhängig von der Struktur und der Konzentration der Modellpeptide.^[175]

Die Efrapeptide sind natürlich vorkommende Peptidantibiotika, die von Pilzen der Gattung *Tolypocladium* als mikroheterogenes Gemisch produziert werden. Sie besitzen interessante biologische und medizinische Eigenschaften. Ziel dieser Arbeit ist daher, einen synthetischen Zugang zu verschiedenen Efrapeptinen zu ermöglichen und für die Konformationsanalyse interessante Analoga zu synthetisieren, mit deren Hilfe ein genaueres Verständnis über den Zusammenhang zwischen Struktur und biologischer Wirkung der Efrapeptide ermöglicht wird.

Vor Beginn dieser Arbeit war lediglich die Synthese von Efrapeptin C und einigen natürlich nicht vorkommenden Analoga bekannt.^[90] Da jedoch eine Reihe weiterer Efrapeptide (Efrapeptide A–I, Neofrapeptide A–N) existiert, sollen einige von Ihnen ebenfalls synthetisch zugänglich gemacht werden. Die Efrapeptide D–G enthalten neben der α,α -dialkylierten, achiralen α -Aminoisobuttersäure auch die chirale α,α -dialkylierte Aminosäure L-Isovalin, was die Synthese dieser Vertreter gegenüber Efrapeptin C erschwert. Bevor die Efrapeptide D–G synthetisiert werden können, ist daher die asymmetrische Synthese dieses Aminosäurebausteins erforderlich. In Kooperation mit Forschern der niederländischen Firma DSM soll ein enantiomerenreiner Baustein für die Aminosäure L-Isovalin synthetisiert werden.

Für die Einführung der α,α -dialkylierten Aminosäurebausteine in der Festphasenpeptidsynthese kommt die bereits bekannte Vorgehensweise mit Hilfe des entsprechenden Azidosäurechlorids zum Einsatz.^[46,47] Auf diese Weise sollen zunächst Peptidfragmente erhalten werden, die anschließend durch Segmentkondensationen in Lösung zusammengefügt werden können.

Neben den Efraeptinen D–G ist zudem die Synthese Efraeptin C-Analogons mit veränderter Kopfgruppe vorgesehen, um konformationelle und biologische Eigenschaften untersuchen zu können. Ebenso sollen selektiv isopenmarkierte Efraeptin C-Analoga hergestellt werden, die neue interessante Ergebnisse in der NMR-gestützten Konformationsanalyse erwarten lassen. Hierzu wurde in einer vorangehenden Diplomarbeit die Synthese des vollständig deuterierten Aib-Bausteins α -Azidoisobuttersäurechlorid-D₆ entwickelt.^[176]

Die Neofraeptine sind eine Unterklasse der Efraeptine und besitzen ebenso interessante biologische Eigenschaften. Eine von Huber durchgeführte Sequenzanalyse an den natürlich gewonnenen Neofraeptinen A und F lieferte die notwendigen Informationen für eine Synthese dieser beiden Peptide.^[32] Als zusätzliche seltene Aminosäurebausteine werden Fmoc-1-Aminocyclopropan-carbonsäure und Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin benötigt. Um weitergehende Untersuchungen zu dem in Neofraeptin F vorkommenden Methylprolin zu ermöglichen, ist zusätzlich zur Synthese von Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin die Synthese von Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin geplant. Letzterer Baustein soll anstelle von *trans*- β -Methyl-L-prolin in die Aminosäuresequenz von Neofraeptin F eingebaut und die Eigenschaften dieses Analogons mit denen von Neofraeptin F selbst verglichen werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit soll ein synthetischer Zugang zu Adenopeptin gefunden werden, einem den Efraeptinen ähnlichen Peptid, welches Apoptose an onkogen transfizierten Zellen induziert.^[135] Die Synthese dieses Peptids stellt eine besondere Herausforderung dar, da es eine zentrale Teilsequenz enthält, die aus sechs aufeinander folgenden α,α -dialkylierten Aminosäureresten besteht. Um die Auswirkungen von Änderungen in der Aminosäuresequenz auf strukturelle sowie biologische Eigenschaften von Adenopeptin untersuchen zu können, soll zudem ein Analogon synthetisiert werden, welches sich geringfügig von Adenopeptin selbst unterscheidet.

Sobald eine Synthese der genannten Verbindungen möglich ist, können diese auf konformationelle Eigenschaften und ihre biologische Aktivität untersucht werden. Von Efraeptin C ist bekannt, dass es zwei helikale Bereiche innerhalb der Aminosäuresequenz ausbildet, die durch eine flexible Region miteinander verbunden sind. Die CD-Spektroskopie bietet gute Möglichkeiten, einen ersten Eindruck auf gesamt-molekularer Ebene über Sekundärstruktur-motive zu erhalten. Sie soll daher einen strukturellen Vergleich der synthetischen Efraeptine ermöglichen. Ebenso kann ein Vergleich zu den synthetischen Adenopeptinen angestellt werden.

In einem zweiten Schritt sollen die synthetisierten Verbindungen auf ihre jeweilige biologische Aktivität untersucht werden. Dies ist bei den Efraeptinen in erster Linie die ATPase-Inhibierung, jedoch sollen sie wie auch Adenopeptin zytotoxisch wirken. Da allerdings ein genauer Mechanismus für die Art der Zytotoxizität bisher nicht bekannt ist, sollen zunächst nur Überlegungen zur Entwicklung eines selbst durchführbaren einfachen Apoptoseassays angestellt werden, auf die später aufgebaut werden kann.

4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Spezielle Aminosäurebausteine für die Peptidsynthese

4.1.1 Synthese des isotopenmarkierten Aib-Bausteins α -Azidoisobuttersäurechlorid-D₆ **5**

α -Aminoisobuttersäure **9** ist die häufigste in Efrapeptin C vorkommende Aminosäure. Die insgesamt sieben Aib-Reste können im NMR-Spektrum durch die sehr dicht beieinander liegenden Singulett-Signale um 1.45 ppm für die Methylgruppen charakterisiert werden. Eine genaue Zuordnung der Signale zu den einzelnen Resten ist jedoch auch mit hochauflösenden mehrdimensionalen Spektren nicht möglich.

Wie bereits in Kapitel 2.4.1 auf Seite 38 erwähnt, dient die gezielte Isotopenmarkierung bei der Strukturaufklärung häufig zur Vereinfachung von NMR-Spektren, was die Zuordnung der vorhandenen Signale erleichtert. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit wurde die Synthese des isotopenmarkierten Aib-Bausteins N₂-D₆-Aib-Cl **5** entwickelt und im Verlauf der vorliegenden Arbeit weiter optimiert.^[176] Abbildung 4.1 zeigt den Verlauf der optimierten Synthese des isotopenmarkierten Aib-Bausteins α -Azidoisobuttersäurechlorid-D₆ **5** (N₂-D₆-Aib-Cl) ausgehend von Acetoncyanhydrin-D₆ **1**, welches aus Aceton-D₆ mit Hilfe von Natriumcyanid unter stark sauren Bedingungen erhalten werden kann.

Zunächst wird die Hydroxygruppe durch den Tosylrest als gute Abgangsgruppe ersetzt. Dabei kommt die Base DABCO zum Einsatz, welche insbesondere auf Grund ihrer gerin-

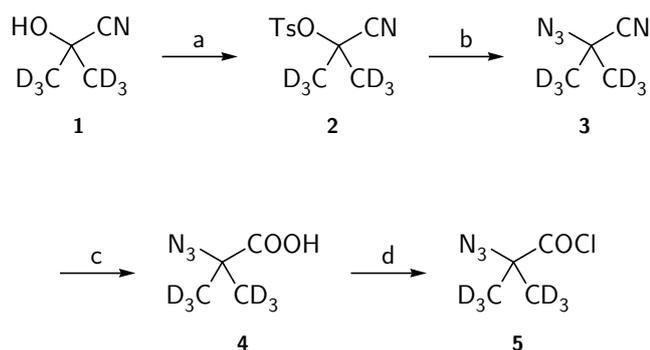


Abbildung 4.1: Synthese des isotopenmarkierten Aib-Bausteins α -Azidoisobuttersäurechlorid- D_6 ($N_2=^{D_6}$ Aib-Cl):^[176] (a) 4-TsCl, DABCO, CH_2Cl_2 , $0^\circ C \rightarrow RT$, 1.5 h, 84 %; (b) NaN_3 , DMSO, $40^\circ C$, über Nacht, 77 %; (c) 1. DIBALH, THF, $-15^\circ C \rightarrow RT$, 2.5 h; 2. $NaClO_2$, H_2NSO_2OH , $tBuOH$, H_2O , 1 h; 3. Cy_2NH , Et_2O , 15 min; 4. H_2O , HCl, pH 1–2, 38 %; (d) $SOCl_2$, CH_2Cl_2 , Rückfluss, 1 h, 75 %

geren Toxizität Vorteile gegenüber den gängigen Basen Pyridin oder DMAP bietet.^[177] Auf diesem Weg können auch sterisch gehinderte Alkohole mit guten Ausbeuten in die entsprechenden Tosylate überführt werden, wobei es nur bei Reaktionszeiten von mehreren Tagen zur Bildung des Sulfonamid-Nebenproduktes **B** kommt, welches über das Ammoniumsalz **A** gebildet wird (Abb. 4.2). Handelt es sich jedoch um Reaktionszeiten von einigen Stunden, wie es bei der Synthese von **2** der Fall ist, kann diese Nebenreaktion vollständig vermieden werden, da das Ammoniumsalz **A** bevorzugt zum gewünschten Produkt abreagiert.

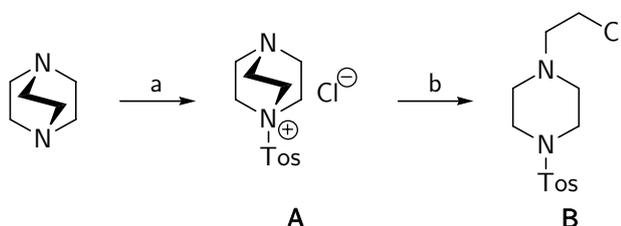


Abbildung 4.2: Bildung des Sulfonamid-Nebenprodukts bei Tosylierungen unter Verwendung der Base DABCO und bei langen Reaktionszeiten: (a) TsCl, $CHCl_3$; (b) 7 d, $25^\circ C$

Mit dem Tosylrest existiert eine gute Abgangsgruppe an Stelle der Hydroxyfunktion, welche in einer nukleophilen Reaktion durch eine Azidogruppe ersetzt werden kann. Aufgrund der starken Nukleophilie des Azidions, der Qualität der Abgangsgruppe und der polar aprotischen Eigenschaften des Lösungsmittels DMSO kann von einem konzentrierten Reaktionsverlauf ausgegangen werden. Lediglich die Stabilisierung einer Carbeniumionzwischenstufe durch die benachbarten Methylgruppen sprechen gegen einen

derartigen Mechanismus. Da hier jedoch die Stereochemie ohne Bedeutung ist, wird lediglich auf einen glatten Reaktionsverlauf mit guten Ausbeuten unabhängig vom genauen Mechanismus Wert gelegt. Das Azidonitril **3** entsteht über Nacht in guter Ausbeute von 77 % (Abb. 4.1).

Nitrile können unter stark sauren oder stark basischen Bedingungen in die entsprechenden Säuren überführt werden. Dabei muss jedoch auf derart drastische Reaktionsbedingungen mit starkem Erhitzen und langen Reaktionszeiten zurückgegriffen werden, dass sich das Molekül zersetzen würde. Insbesondere die Azidofunktion wird unter solchen Bedingungen angegriffen, so dass eine alternative Möglichkeit unerlässlich ist, um α -Azidoisobuttersäure-D₆ **4** zu erhalten.^[178]

Zunächst erfolgt daher eine Reduktion der Nitrilfunktion zur Aldehydfunktion, wobei der Hydridüberträger DIBALH als sehr mildes Reduktionsmittel zum Einsatz kommt. DIBALH hat gegenüber anderen Reduktionsmitteln den Vorteil, dass es auch in Gegenwart einer Azidogruppe selektiv die Nitrilfunktion in den entsprechenden Aldehyd überführt.^[179] Direkt im Anschluss an die Reduktion zum Aldehyd erfolgt eine Oxidation mit Hilfe von Natriumchlorit bei Anwesenheit von Amidoschwefelsäure, welche sowohl als Katalysator, als auch zum Abfangen der entstehenden hypochlorigen Säure dient. Der Mechanismus verläuft über eine Protonierung der Aldehydfunktion zu **C** und anschließende Reaktion mit dem Chlorit zu **D** unter Abspaltung von hypochloriger Säure (Abb. 4.3).^[180] Die entstehende α -Azidoisobuttersäure-D₆ **4** wird zunächst mit einigen Verunreinigungen erhalten, kann aber durch Umsetzung mit Dicyclohexylamin, anschließendem Umkristallisieren und Extraktion der freien Azidosäure aus saurer wässriger Lösung aufgereinigt werden (Abb. 4.1).

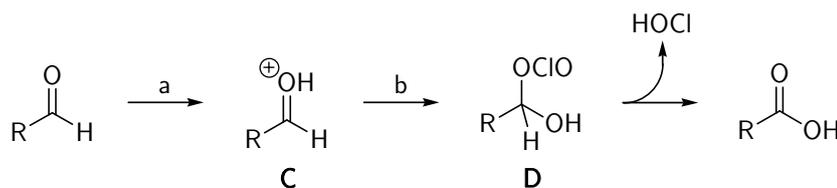


Abbildung 4.3: Mechanismus der Oxidation eines Aldehyds mit Natriumchlorit: (a) H^+ ; (b) ClO_2^-

Um eine Einführung des isotoopenmarkierten Aib-Bausteins in eine Peptidsequenz zu ermöglichen, wird die Azidosäure **4** wie bereits in Kapitel 2.1.4 (Abb. 2.19 auf Seite 18) beschrieben in das entsprechende Säurechlorid **5** überführt. Dies gelingt in guten Ausbeuten mit Hilfe von Thionylchlorid (Abb. 4.1).^[181]

Der isopenmarkierte Aib-Baustein α -Azidoisobuttersäurechlorid-D₆ **5** kann wie von Jost *et al.* für Efrapeptin C beschrieben in der Festphasenpeptidsynthese zur Darstellung selektiv deuterierter Efrapeptin-Analoga eingesetzt werden.^[46,47] Auf die Synthese der isopenmarkierten Efrapeptin-Analoga **79–82** wird in Kapitel 4.5 näher eingegangen.

4.1.2 Synthese von S-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **25**

In den Efrapeptinen D–G **42–45** kommt neben der α,α -dialkylierten achiralen α -Aminoisobuttersäure **9** auch die α,α -dialkylierte chirale Aminosäure L-Isovalin **21** vor. Anhand der von Meldal beschriebenen Synthese von α,α -dialkylierten α -Azidosäuren kann der Syntheseweg für *rac*-2-Azido-2-methylbuttersäure **14** und weiter zum Iva-Baustein *rac*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **15** entwickelt werden (Abb. 4.4).^[85,86]

Die zunächst erfolgende Bromierung in α -Position mit NBS in CCl₄ verläuft vermutlich nach einem radikalischen Mechanismus zu 2-Brom-2-methylbuttersäure **13**. Die anschließende nukleophile Substitution mit Natriumazid in DMF liefert die Azidosäure **14** in sehr guter Ausbeute. Um die für die Peptidsynthese erforderliche Aktivierung der Carboxylfunktion zu gewährleisten, wurde mit Thionylchlorid umgesetzt und das *rac*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **15** in einer Ausbeute von 77 % nach fraktionierter Destillation isoliert.

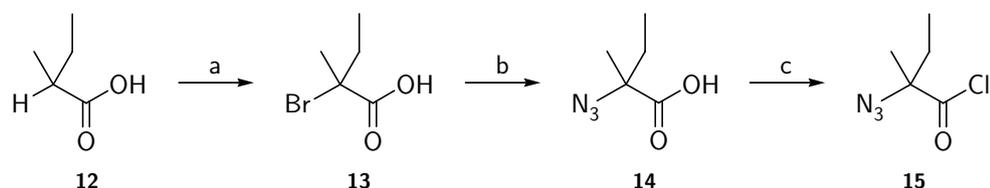


Abbildung 4.4: Synthese von *rac*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **15**:^[85,86] (a) NBS, CCl₄, Rückfluss, über Nacht, 78 %; (b) NaN₃, DMF, RT, 3 d, 91 %; (c) SOCl₂, Rückfluss, 1.5 h, 77 %

In den Efrapeptinen D–G **42–45** ist jedoch anstelle des Racemats die entsprechende L-Aminosäure **21** enthalten.^[96] Der von Meldal beschriebene Syntheseweg kann allerdings nicht für die Darstellung des gewünschten L-Iva-Bausteins *S*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **25** verwendet werden, da im Syntheseverlauf keinerlei chirale Information eingebracht wird. Daher war es unerlässlich, eine asymmetrische Synthese für L-Isovalin zu entwickeln.

Zur Darstellung von Aminosäuren wird häufig die Strecker-Synthese verwendet.^[182] Diese verläuft unter den gewöhnlich verwendeten Bedingungen (Behandlung mit Ammoniak und Blausäure mit anschließender saurer Hydrolyse) jedoch ebenfalls nicht enantioselektiv, so dass auch hier ein Racemat erhalten wird. Es sind jedoch auch Beispiele bekannt, in denen von einer asymmetrischen Strecker-Synthese berichtet wird.

So konnte im Falle der Synthese von α -trifluormethylierten α -Aminosäuren ausgehend von *R-N-tert*-Butylsulfinylketoimininen durch Verwendung eines sehr unpolaren Lösungsmittels wie *n*-Hexan eine entgegengesetzte Stereochemie gegenüber der Verwendung des polaren Lösungsmittels DMF erhalten werden. Der entgegengesetzte Reaktionsverlauf kann anhand unterschiedlicher Übergangszustände in beiden Lösungsmitteln mechanistisch begründet werden. Während in *n*-Hexan ein sechsgliedriger Übergangszustand postuliert wird, kann dieser auf Grund der polaren und gleichzeitig Lewis-basischen Eigenschaften von DMF nicht ohne weiteres entstehen.^[183]

In drei weiteren Beispielen wurde hingegen auf chirale Katalysatoren zur Steuerung der Enantioselektivität zurückgegriffen. Während mit Ti^{IV} - und V^{V} -haltigen Katalysatoren Enantiomerenüberschüsse von maximal 81 % erreicht wurden,^[184] konnten mit Hilfe von voluminösen Gd- oder La-haltigen Komplexen Enantiomerenüberschüsse bis 99 % erhalten und die Enantioselektivität bei der Synthese verschiedener Aminosäuren recht zuverlässig in die gewünschte Richtung gesteuert werden.^[185] Dass auch weniger komplexe Übergangsmetallfreie Katalysatoren hervorragende Ergebnisse liefern können, zeigte Jacobsen anhand der enantioselektiven Katalysator-unterstützten Strecker-Synthese verschiedener α -monoalkylierter und α,α -dialkylierter Aminosäuren.^[186] Umfangreiche Übersichten über die stereoselektive Synthese sowohl azyklischer als auch zyklischer α,α -dialkylierter Aminosäuren geben Cativiela und Díaz-de-Villegas.^[187,188]

Ein enzymkatalysierter Syntheseweg zur enantiomerenreinen Darstellung von L-Isovalin **21** wurde von Forschern der Firma DSM entwickelt. Hierbei wurde von *rac*-2-Amino-2-methylbuttersäureamid **19** ausgegangen. Dieses konnte unter Verwendung der Strecker-Synthese und anschließender Umsetzung mit Schwefelsäure ausgehend von 2-Butanon **17** synthetisiert werden. Die Strecker-Synthese lieferte unter nur schwach sauren Bedingungen das Aminonitril **18** in einer Ausbeute von 88 %. Als Reagenzien wurden Ammoniumhydroxid, Ammoniumacetat und Natriumcyanid in einer wässrigen Lösung eingesetzt, wobei Blausäure entsteht, die direkt in die Reaktion als Reaktionspartner eingeht. Folgt keine sofortige saure oder basische Hydrolyse zur entsprechenden Säure-

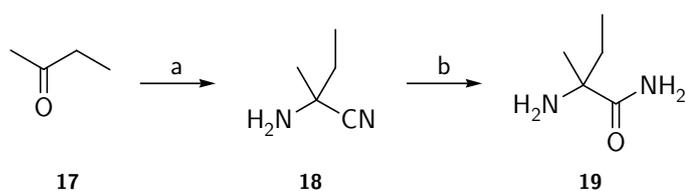


Abbildung 4.5: Synthese von *rac*-2-Amino-2-methylbuttersäureamid **19**:^[189] (a) NH_4OH , NH_4OAc , NaCN , H_2O , $25\text{--}35^\circ\text{C}$, 1 d; (b) 1. H_2SO_4 (96 %), RT, über Nacht; 2. NH_4OH , H_2O , $10\text{--}40^\circ\text{C}$, pH 1.6; 3. NH_4OH , H_2O , RT, pH 8.6, 70 %

re, so kann das jeweilige Aminonitril isoliert werden. Eine anschließende Umsetzung mit konzentrierter Schwefelsäure lieferte das Aminosäureamid **19**. Die Reaktion erfolgt unter Eiskühlung, wobei die Reaktionsmischung moderate Temperaturen zwischen 18 und 26°C erreicht. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in einer wässrigen Ammoniumhydroxidlösung aufgenommen und nach Extraktion mit Chloroform im sauren Bereich zur Entfernung von Nebenprodukten neutralisiert und erneut extrahiert, wobei das Produkt in reiner Form erhalten wurde (Abb. 4.5).^[189]

Das *rac*-2-Amino-2-methylbuttersäureamid **19** wurde anschließend einer enzymatischen Racematspaltung unterworfen, wie sie in ähnlicher Form von Jost zur Darstellung von enantiomerenreinem α -Azido- α -methyl-L-leucin beschrieben wurde.^[93] Im Gegensatz zu der von Jost verwendeten Methode wird im Fall von L-Isovalin **21** jedoch nicht auf *Ochrobactrum anthropi* als L-Amidase enthaltenden Organismus zurückgegriffen, sondern das hier effektivere *Mycobacterium neoaurum* verwendet. Die L-Amidase dieses Organismus setzt selektiv L-Isovalinamid zu L-Isovalin **21** um, während das D-Enantiomer **20** nicht umgesetzt wird (Abb. 4.6). Beide können anschließend durch Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden. Der mittels HPLC ermittelte Enantiomerenüberschuss des isolierten L-Isovalins **21** beträgt 98 %.

Anschließend an die enzymatische Racematspaltung folgten zwei weitere Reaktionen, die jedoch keinerlei Einfluss auf die Stereochemie mehr haben. Zunächst wurde ausge-

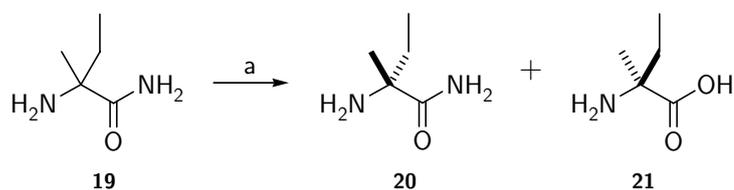


Abbildung 4.6: Synthese von L-Isovalin **21**: (a) *Mycobacterium neoaurum*

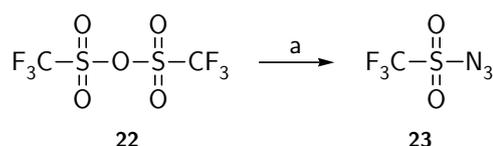


Abbildung 4.7: Darstellung von Triflylazid **23** aus Triflylanhydrid **22**: (a) NaN_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 0°C , 2 h

hend von L-Isovalin **21** mittels Diazotransfer die Azidogruppe als *N*-terminale Schutzgruppe in das Molekül eingebracht und *S*-2-Azido-2-methylbuttersäure **24** erhalten. Der Diazotransfer nach der von Wong entwickelten Vorgehensweise unter Verwendung von Triflylazid und Zn^{II} -Katalyse stellt hierfür eine geeignete Möglichkeit dar.^[190] Dieselbe Vorgehensweise wurde von Pelletier unter Cu^{II} -Katalyse auf zahlreiche Aminosäuren angewendet,^[87] was für eine problemlose Übertragbarkeit auf L-Isovalin **21** spricht.

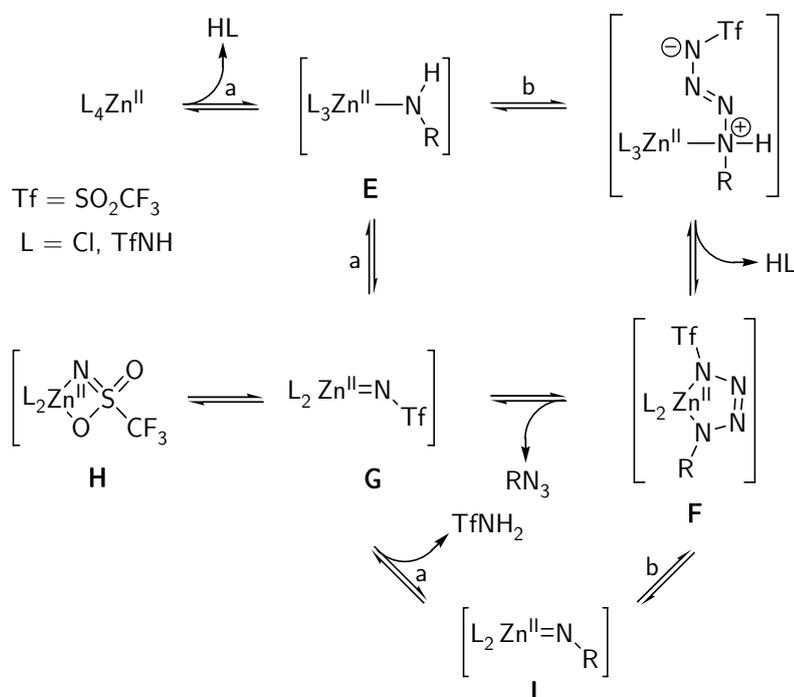


Abbildung 4.8: Vorgeschlagener Mechanismus für einen Zn^{II} -katalysierten Diazotransfer:^[88] (a) RNH_2 ; (b) TfN_3

Zunächst wurde Triflylazid **23** frisch aus Triflylanhydrid **22** und Natriumazid in einem $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Gemisch hergestellt (Abb. 4.7). In die eigentliche Reaktion geht anschließend Triflylazid als Diazotransferreagenz ein, während durch K_2CO_3 basische

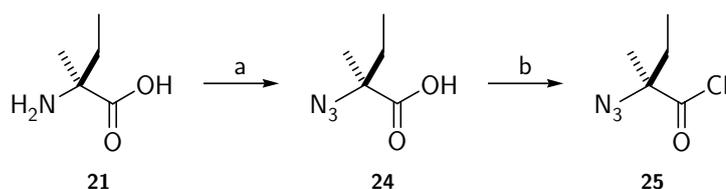


Abbildung 4.9: Synthese von *S*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **25**: (a) 1. Herstellung einer TfN₃-Lösung in CH₂Cl₂: NaN₃, Tf₂O, H₂O/CH₂Cl₂, 0°C, 2 h; 2. TfN₃, K₂CO₃, CuSO₄·5H₂O, CH₂Cl₂/H₂O/MeOH, RT, über Nacht, 85 %; (b) SOCl₂, Rückfluss, 1.5 h, 80 %

Bedingungen geschaffen werden und CuSO₄ als Katalysator dient (Abb. 4.9). Der von Wong vorgeschlagener Mechanismus für die entsprechende Zn^{II}-katalysierte Reaktion (Abb. 4.8) kann auf den Cu^{II}-katalysierten Diazotransfer übertragen werden.^[88]

Indem das Amin unter basischen Bedingungen an den Zn^{II}-Katalysator gebunden wird, ergibt sich **E**. Aufgrund der hohen Elektrophilie des Triflylazids wird dieses nukleophil von **E** angegriffen, was in Verbindung mit einer anschließenden Deprotonierung das Zink-stabilisierte gemischte Tetrazen **F** liefert. Dieses kann unter Freisetzung des gewünschten Azids in einer reversen [3 + 2] Zykoaddition den Zinktriflylimidokomplex **G** bilden. **G** steht im Gleichgewicht mit **H**, welches durch Transiminierung den Zinkimidokomplex **I** bilden kann, welcher jedoch ebenso direkt aus **G** entstehen kann. In einer [3 + 2] Zykoaddition mit Triflylazid kann aus **I** wiederum **F** entstehen, welches dann das gewünschte Azid liefert.

Nach Einführung der Azidogruppe als sterisch wenig anspruchsvolles Äquivalent einer geschützten Aminogruppe ist nur noch die Aktivierung der Carboxylfunktion als Säurechlorid erforderlich. Dies geschieht durch Erhitzen der Azidosäure **24** in Thionylchlorid zum Rückfluss und anschließende fraktionierte Destillation in einer Ausbeute von 80 % (Abb. 4.9). Das so erhaltene *S*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **25** kann anschließend in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden. Dadurch können gezielt die einzelnen Peptidfragmente synthetisiert werden, die für die Synthese der Efraeptine D–G **42–45** benötigt werden (s. Kapitel 4.2).

4.1.3 Synthese von Fmoc-*cis*-β-Methyl-L-prolin **41** und Fmoc-*trans*-β-Methyl-L-prolin **35**

In den Neofraeptinen kommt neben den nichtproteinogenen Aminosäuren β-Alanin, α-Aminoisobuttersäure, Pipecolinsäure und Isovalin auch 1-Aminocyclopropancarbon-

säure **26** als weitere nichtproteinogene Aminosäure vor (Abb. 4.10). Diese zyklische Aminosäure ist auf Grund des festen 60° -Winkels im Cyclopropylrest nicht so voluminös wie α -Aminoisobuttersäure und kann daher problemlos als Fmoc-Aminosäure mit Hilfe von geeigneten Kupplungsreagenzien eingeführt werden (s. Kapitel 4.3). In den Neofrapeptinen F, L und M findet sich zusätzlich noch *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** (Abb. 4.10). Diese sehr seltene und von Fredenhagen *et al.* zunächst anhand wenig stringenter massenspektrometrischer Messungen als zu ihr isobare Pipecolinsäure identifizierte Aminosäure^[34] wurde als erstes von Huber mit Hilfe aufwändiger NMR-Experimente in Neofrapeptin F **63** entdeckt.^[32] Während Fmoc-1-Aminocyclopropancarbonsäure für die Synthese käuflich erworben wurde, sollte für Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** ein effektiver Syntheseweg entwickelt werden.

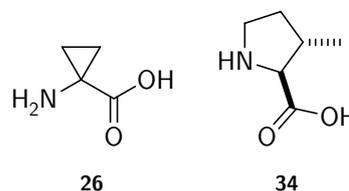


Abbildung 4.10: Die in den Neofrapeptinen enthaltenen seltenen Aminosäuren 1-Aminocyclopropancarbonsäure **26** und *trans*- β -Methyl-L-prolin **34**

Für die Synthese von *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** existieren bereits verschiedene, zum Teil recht aufwändige Synthesewege. Einige von ihnen sollen an dieser Stelle beispielhaft vorgestellt werden.

Synthese von *cis*- β -Methyl-L-prolin **40** aus Garners Aldehyd

Eine mehrfach beschriebene Vorgehensweise ist die Synthese verschiedener 3-Alkylprolinderivate ausgehend von *R*-konfiguriertem Garners Aldehyd **K**, welcher in einer dreistufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von etwas mehr als 50 % aus D-Serin **J** zugänglich ist (Abb. 4.11).^[191]

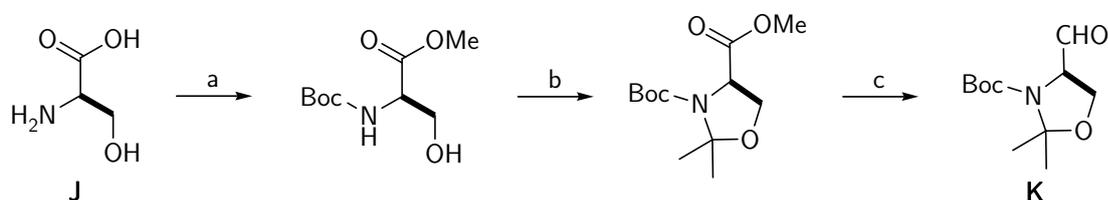


Abbildung 4.11: Synthese von *R*-konfiguriertem Garners Aldehyd **K** aus D-Serin **J**:^[191] (a) 1. Boc_2O , NaOH, Dioxan/ H_2O , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 4 h; 2. CH_2N_2 , Et_2O , 0°C , 30 min, 80 %; (b) DMP, $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Benzol, Rückfluss, 30 min, 2 \times , 80 %; (c) DIBALH, Toluol, -78°C , 3 h, 85 %

Von Garners Aldehyd **K** ausgehend erfolgt die Synthese von *cis*- β -Methyl-L-prolin **40** in sechs Schritten (Abb. 4.12). Als erstes wird die Aldehydfunktion mit Ethyl(triphenylphosphoranyliden)acetat zum vinylogenen Ethylester **L** umgesetzt. Der erhaltene α,β -ungesättigte Ester kann anschließend mit Methyllithium, Cu^I-Iodid und Trimethylsilylchlorid in einer substratkontrollierten 1,4-Addition stereoselektiv in **M** transformiert werden. Die so eingeführte Methylgruppe bleibt bis zum Ende der Synthese am *R*-konfigurierten Stereozentrum in dieser Form erhalten und bildet die Methylgruppe in β -Position von Methylprolin. Die weiteren Syntheseschritte sind eine durch LiAlH₄ erzielte Reduktion, ein anschließender Schutz der freien Alkoholfunktion zu **O** und eine Öffnung des Oxazolidinrings durch Jones Oxidation, wodurch **P** erhalten wird. **P** stellt nun die Vorstufe des *N*- und *C*-terminal geschützten Methylprolins **Q** dar, welches durch NaH-vermittelte Zyklisierung entsteht und im Anschluss zu *cis*- β -Methyl-L-prolin **40** entschützt werden kann.^[192]

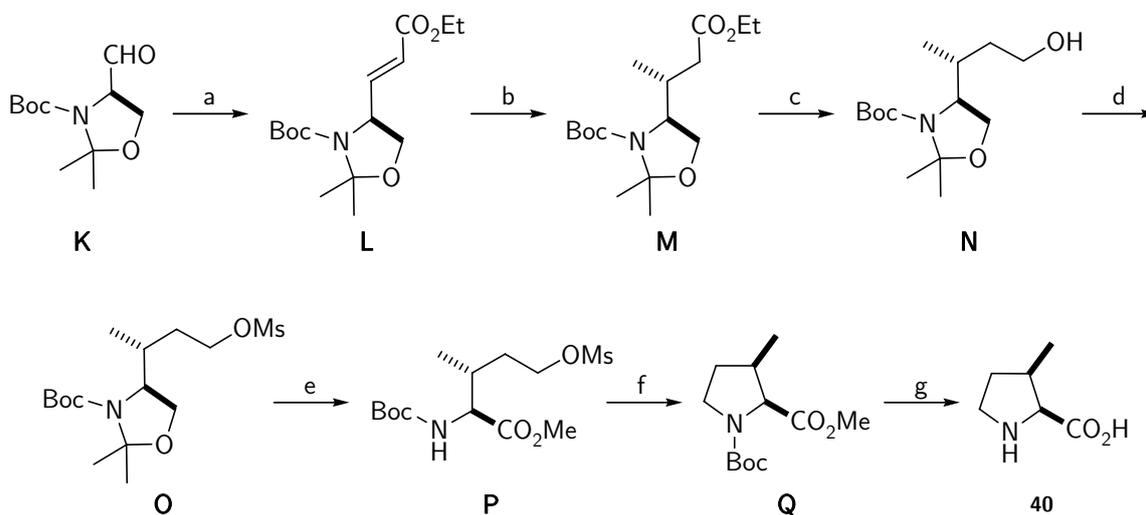


Abbildung 4.12: Synthese von *cis*- β -Methyl-L-prolin **40** ausgehend von *R*-konfiguriertem Garners Aldehyd **K**:^[192] (a) Ethyl(triphenylphosphoranyliden)acetat, Benzol, RT, 36 h, 85 %; (b) MeLi, CuI, Me₃SiCl, THF, $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1 h, 94 %; (c) LiAlH₄, THF, RT, 1.5 h, 98 %; (d) MsCl, NEt₃, CH₂Cl₂, $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1 h, 87 %; (e) 1. CrO₃/H₂SO₄, Aceton, 0°C , 4 h; 2. CH₂N₂, Et₂O, RT, 58 %; (f) NaH, DMF, -25°C , 1 h, 78 %; (g) 6 N HCl, AcOH, Rückfluss, 4 h, 98 %^[192]

Dieser Syntheseweg beinhaltet im wesentlichen zwei Nachteile. Zum einen liegt die Gesamtausbeute ausgehend von D-Serin **J** bei nur 16 % bei einer hohen Anzahl von Reaktionsschritten, zum anderen wird jedoch anstelle des *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** das *cis*- β -Methyl-L-prolin **40** erhalten. Die Probleme einer möglichen Epimerisierung am α -Kohlenstoffatom werden weiter unten in diesem Kapitel behandelt.

Synthese von β -*R*-Alkyl-L-prolinen nach anderen Methoden

Neben der Möglichkeit, β -Alkylproline ausgehend von Garners Aldehyd zu synthetisieren, existieren eine Reihe weiterer interessanter Vorgehensweisen, von denen hier nur einige Erwähnung finden sollen.

Die Synthese von *trans*- β -*n*-Propyl-L-prolin ausgehend von Boc- γ -Keto-L-prolinmethylester gelang Holladay *et al.* in einem *cis/trans*-Verhältnis von 1:9, wobei die Diastereomere gut voneinander getrennt werden konnten (Abb. 4.13). Der Reaktionsweg verläuft über eine nicht stereoselektive Alkylierung in β -Position, gefolgt von einer Reduktion der Ketofunktion zum Alkohol und weiter bei partieller Epimerisierung in β -Position unter Barton-ähnlichen Bedingungen zum geschützten β -substituierten Prolinderivat.^[193]

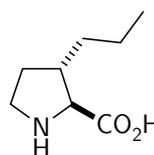


Abbildung 4.13: *trans*- β -*n*-Propyl-L-prolin

Die Möglichkeit, hierbei das *trans*-Isomer isolieren zu können, ist jedoch vermutlich auf die Größe des Alkylrestes in β -Position zurückzuführen.

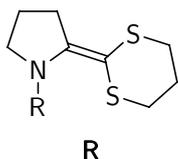


Abbildung 4.14: Das zyklische 2-Aminoketen-*S,S*-acetal **R** zur Synthese von β -Alkylprolinen

Ein weiterer Syntheseansatz geht von dem zyklischen 2-Aminoketen-*S,S*-acetal **R** aus (Abb. 4.14), welches mit LDA und einem entsprechenden Elektrophil am der Doppelbindung benachbarten Kohlenstoffatom nicht-stereoselektiv alkyliert werden kann. Erst bei der folgenden Hydrolyse wird selektiv das *trans*-Isomer erhalten, wobei jedoch ein racemisches Gemisch vorliegt.^[194,195]

Eine sehr effektive Möglichkeit, das isotopenmarkierte $[1-^{13}\text{C}]$ -*trans*- β -Methyl-L-prolin $[1-^{13}\text{C}]$ -**34** herzustellen, ist die von Williams vorgestellte Methode, die von dem entsprechenden $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Isoleucin **S** ausgeht (Abb. 4.15).^[196,197] Hierzu wird die Carboxylgruppe in **S** als Ethylester geschützt und das entstehende **T** mit *tert*-Butylhypochlorid zu **U** an der freien Aminogruppe chloriert. Durch Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe in Schwefelsäure lagert sich das Chlorid an die terminale Methylgruppe in der Seitenkette zum Intermediat **V** an, wodurch diese Position aktiviert wird. Die folgende basenvermittelte Zyklisierung mit anschließendem Schutz der dann sekundären Aminofunktion von **V** zu **W** verläuft zwar nur in mäßiger Ausbeute, jedoch bleiben sämtliche Stereozentren erhalten. Die zuletzt durchgeführte vollständige Entschützung

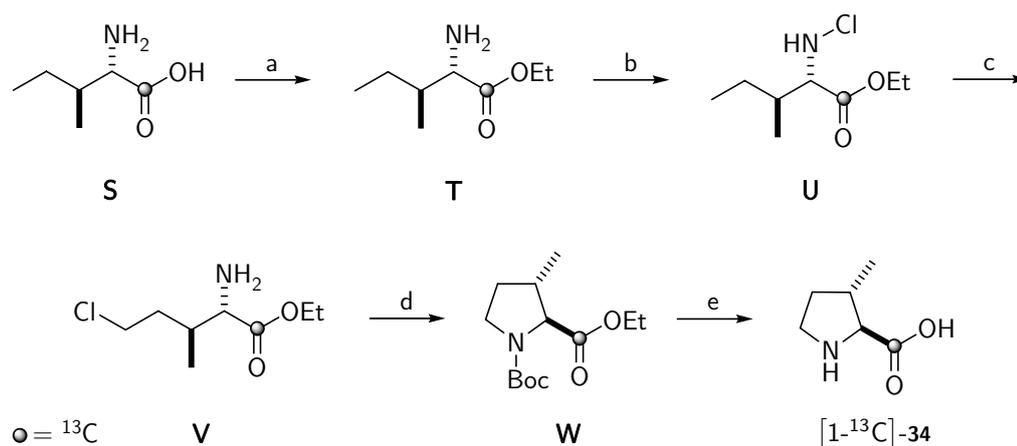


Abbildung 4.15: Synthese von $[1-{}^{13}\text{C}]$ -*trans*- β -Methyl-L-prolin $[1-{}^{13}\text{C}]$ -**34** aus $[1-{}^{13}\text{C}]$ -L-Isoleucin **R**:^[196,197] (a) SOCl_2 , EtOH, Rückfluss, 10 h, 90 %; (b) ${}^t\text{BuOCl}$, Benzol, Lichtausschluss, 0°C , 1.5 h, 97 %; (c) H_2SO_4 (85 %), $h\nu$ (Hg°), 0 – 5°C , 40 h; (d) 1. 10 M NaOH, 0°C ; 2. Boc_2O , K_2CO_3 , Dioxan/ H_2O , RT, 8 h, 45 %; (e) 1. NaOH, MeOH, Rückfluss, 2 h; 2. TFA, CH_2Cl_2 , RT, 3 h, 99 %

liefert $[1-{}^{13}\text{C}]$ -*trans*- β -Methyl-L-prolin $[1-{}^{13}\text{C}]$ -**34** in einer Gesamtausbeute von 36 %. Hervorzuheben sind bei diesem Syntheseweg einerseits die geringe Zahl von Synthesestufen, andererseits ist das erhaltene Produkt laut der angegebenen Analytik weitgehend enantiomeren- und diastereomerenrein, wobei jedoch kein exakter Wert angegeben wird.

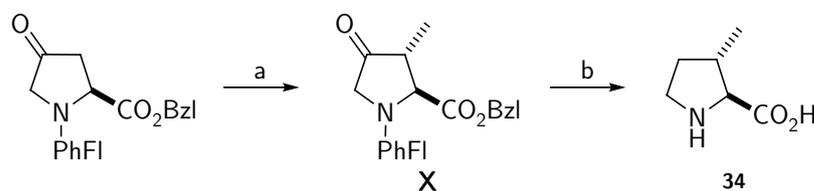


Abbildung 4.16: Synthese von *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** analog der Vorgehensweise von Lubell *et al.*:^[198] (a) $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$, MeI, THF/DMPU (3 : 1), -78°C , 65 %; (b) 1. NaBH_4 , MeOH/THF, 0°C , 99 %; 2. NaH, CS_2 , MeI, THF, 0°C , 100 %; 3. Bu_3SnH , AIBN, Xylol, Rückfluss, 91 %; 4. H_2 -Pd/C, THF, RT, 95 %

Lubell *et al.* beschrieben die Synthese von β -Alkylprolinen, darunter auch *trans*- β -Methyl-L-prolin **34**, ausgehend von γ -Oxoprolin, welches *N*- und *C*-terminal geschützt vorlag (Abb. 4.16).^[198] Sie erhielten neben zum Teil hervorragenden Ausbeuten eine akzeptable Diastereoselektivität von 3 : 1 des gewünschten Alkylierungsprodukts **X**. Dieses konnten sie anschließend problemlos säulenchromatographisch von dem unerwünschten

Diastereomer abtrennen. Auf Grund dieser Erfolge wurde im Rahmen dieser Arbeit der von Lubell verwendete Reaktionsverlauf übernommen. Es war jedoch trotz zahlreicher Variationen (Reagenzien, Lösungsmittel, Reaktionsbedingungen) weder möglich, die beschriebenen Ausbeuten zu erreichen, noch konnte die ebenfalls beschriebene Diastereoselektivität erhalten werden. Der Grund für das Scheitern der Synthese ist im Wesentlichen auf den Alkylierungsschritt zurückzuführen. Zum einen ist der Methylrest zum Erreichen einer guten Diastereoselektivität zu klein, zum anderen wurde die von Lubell *et al.* als Nebenreaktion beschriebene Doppelalkylierung zumeist zur Hauptreaktion.

Synthese von Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** und Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** zur Verwendung in der Peptidsynthese von Neofrapeptinen

Für die Synthese von Neofrapeptin F wird nach der NMR-gestützten Sequenzanalyse durch Huber neben L-Isovalin **21** und 1-Aminocyclopropan-carbonsäure **26** auch *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** benötigt.^[32] Da bei den oben beschriebenen Synthesemöglichkeiten jedoch zumeist Probleme mit der Stereoselektivität auftreten oder die Synthese sehr aufwändig ist, wurde ein alternativer Syntheseweg gewählt, der sich an die Synthese von β -Alkylprolinen ausgehend von *R*-Phenylethylamin **28** oder *S*-Phenylethylamin **36** anlehnt.^[199]

Zunächst wurde ausgehend von *R*-Phenylethylamin **28** in vier Schritten *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*cis*- β -methyl-D-prolin **32** synthetisiert, welches durch Epimerisierung am α -Kohlenstoffatom und Entschützen das gewünschte *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** ergeben sollte. Analog wurde anschließend *cis*- β -Methyl-L-prolin **40** ausgehend von *S*-Phenylethylamin **36** synthetisiert, welches jedoch keiner Epimerisierung unterworfen wurde, um einen Vergleich zwischen dem *trans*-Produkt und dem *cis*-Produkt zu ermöglichen.

An die Ausgangsverbindung **28** wurden jeweils durch nukleophile Substitution erst Bromessigsäurebenzylester und anschließend 4-Brom-1-buten gebunden und [*N*-But-3-enyl-*N*-(*R*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester **30** erhalten (Abb. 4.17). Die erste nukleophile Substitutionsreaktion zu **29** verläuft bei Raumtemperatur mit einer Ausbeute von 67 % zufriedenstellend. Durch eine Reaktionszeit von nur 10 min konnte eine zweifache Reaktion mit dem Elektrophil effektiv vermieden werden. Das so eingeführte Stereozentrum ist bei der späteren Zyklisierung für die Diastereoselektivität von großer Bedeutung. Bei der zweiten nukleophilen Substitutionsreaktion hingegen gibt es für **29** nur eine Möglichkeit, mit dem Elektrophil zu reagieren. Zudem ist die Nukleophilie des

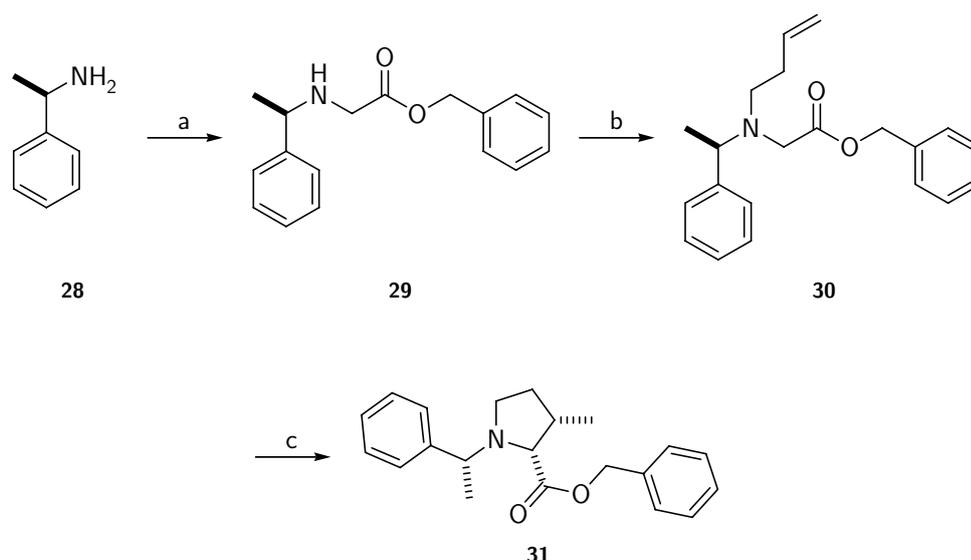


Abbildung 4.17: Synthese von **31**: (a) $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$, NEt_3 , DMSO, RT, 10 min, 67%; (b) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, NEt_3 , DMSO, 50°C , 48 h, 22%; (c) 1. LDA, Et_2O , -78°C , 5 min; 2. ZnBr_2 , Et_2O , $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 40 min, 63%

Stickstoffatoms durch den zusätzlichen Rest herabgesetzt und ein Angriff auf das Elektrophil sterisch ungünstiger. Daher wurde dieses im 2.5 fachen Überschuss eingesetzt, die Temperatur auf 50°C erhöht und die Reaktionszeit auf 48 h verlängert, um einen möglichst vollständigen Umsatz zu erreichen. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen guten Ausbeuten kann hier jedoch nur eine sehr mäßige Ausbeute von 22% realisiert werden.

Analog zu dem oben beschriebenen Reaktionsverlauf ist die Synthese von [*N*-But-3-enyl-*N*-(*S*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester **38** und weiter zu *N*-(*S*-Phenylethyl)- β -*R*-methyl-*S*-prolinbenzylester **39** (Abb. 4.18) mit vergleichbaren Ausbeuten

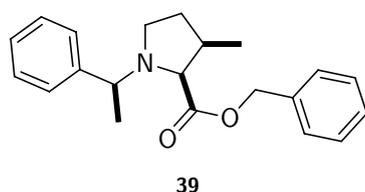


Abbildung 4.18: *N*-(*S*-Phenylethyl)- β -*R*-methyl-*S*-prolinbenzylester **39**

ausgehend von *S*-Phenylethylamin **36** möglich. Da der entscheidende Schritt in den hier vorgestellten Reaktionsfolgen die Zyklisierung von [*N*-But-3-enyl-*N*-(*R*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester **30** zu *N*-(*R*-Phenylethyl)- β -*S*-methyl-*R*-prolinbenzylester **31** und ebenso [*N*-But-3-enyl-*N*-(*S*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester **38** zu *N*-(*S*-Phenylethyl)- β -*R*-methyl-*S*-prolinbenzylester **39** ist, soll der Mechanismus an dieser Stelle detaillierter behandelt werden.

Die Zyklisierung sollte zum einen diastereoselektiv erfolgen, zum anderen sollten die Substituenten am entstehenden Fünfring *cis*-ständig zueinander ausgerichtet sein. Durch Variation des zuvor über *R*-Phenylethylamin **28** eingeführten Stereozentrums durch alternative Verwendung von *S*-Phenylethylamin **36** ist es möglich, die Substituenten am entstehenden Fünfring auf der einen oder der anderen Seite der Ringebene zu platzieren und so beide Enantiomere zu erzeugen.

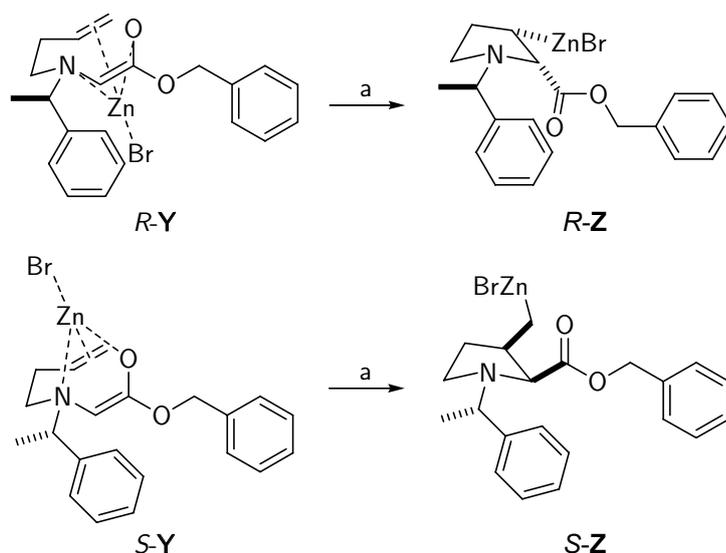


Abbildung 4.19: Vorgeschlagener Mechanismus für die Zn-gestützte Zyklisierung von **30** zu **31** und **38** zu **39**.^[200–202]

Zunächst wird mit Hilfe von LDA am α -Kohlenstoffatom deprotoniert, wodurch ein zwischen α -Kohlenstoffatom und Carbonylsauerstoffatom delokalisiertes freies Elektronenpaar entsteht. Karoyan *et al.* und Lorthiois *et al.* beschrieben im selben Jahr die Verwendung von ZnBr_2 zur Erzeugung eines intermediären Komplexes (hier übertragen auf *R*-**Y** und *S*-**Y** in Abbildung 4.19), bei dem das Zinkatom nur von oberhalb oder unterhalb der späteren Ringebene angreifen kann.^[200–202] Die Angriffsseite ist im Falle

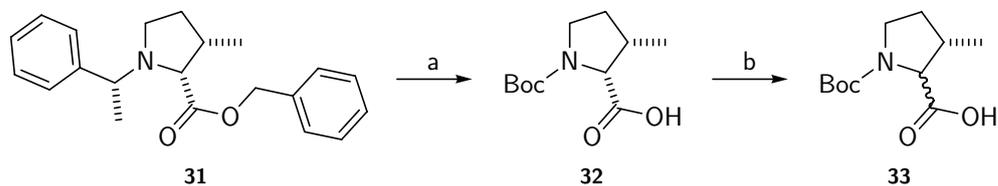


Abbildung 4.20: Synthese von Boc-*cis/trans*- β -methyl-DL-prolin **33**: (a) H_2 -Pd/C, Di-*tert*-butyldicarbonat, MeOH, RT, über Nacht, 73 %; (b) 1. LDA, Et_2O , $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 30 min; 2. NH_4Cl -Lösung

von **30** und **38** durch das zuvor eingeführte Stereozentrum vorgegeben, da eine der beiden Seiten durch den voluminösen Phenylrest effektiv gegen einen Angriff abgeschirmt wird. Das Zinkatom koordiniert an das freie Elektronenpaar des Aminostickstoffatoms, die Doppelbindung im Butensubstituenten und das freie Elektronenpaar am Carbonylsauerstoffatom. Die späteren Ringsubstituenten werden durch die Koordination an das Zinkatom auf die gewünschte Seite des Rings gezogen. Im Falle von *R*-**Y** entsteht der ZnBr-substituierte *N*-(*R*-Phenylethyl)- β -*S*-methyl-*R*-prolinbenzylester *R*-**Z**, im Falle von *S*-**Y** hingegen der enantiomere ZnBr-substituierte *N*-(*S*-Phenylethyl)- β -*R*-methyl-*S*-prolinbenzylester *S*-**Z**. Beide können anschließend durch Hydrolyse mit wässriger NH_4Cl -Lösung von dem ZnBr-Substituenten befreit werden und besitzen so eine zur geschützten Säurefunktionalität *cis*-ständige Methylgruppe in β -Position. Der Reaktionsverlauf erfolgt regio- und diastereoselektiv, was sowohl polarimetrisch, als auch NMR-spektroskopisch bestätigt wird.

Weitere Arbeiten, insbesondere der Gruppe um Karoyan, ermöglichen die Einführung sehr variabler Reste in β -Position des Pyrrolidinringes. So sind neben Einführung verschiedener azyklischer Alkylreste auch zyklische Alkylreste, Sulfonether und -ester, Nitrile und auch Carbonsäurereste möglich.^[203,204]

Nach der Zyklisierung steht die Konfiguration der am Ende vorhandenen Stereozentren fest. Durch Pd/C-katalysierte Hydrierung wurden die *N*- und die *C*-terminalen Schutzgruppen entfernt. Gleichzeitig wurde im Falle von *N*-(*R*-Phenylethyl)- β -*S*-methyl-*R*-prolinbenzylester **31** mit Hilfe von Boc_2O eine säurelabile Schutzgruppe an der Aminogruppe angebracht und *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*cis*- β -methyl-D-prolin **32** erhalten (Abb. 4.20).

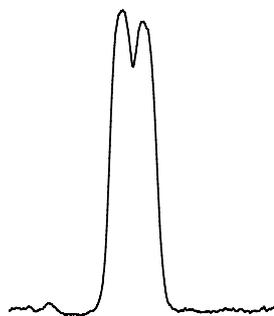


Abbildung 4.21: Analytisches HPL-Chromatogramm von **33**

Dieses besitzt jedoch noch nicht die gewünschte Konfiguration am α -Kohlenstoffatom. Daher wurde versucht, zunächst in dieser Position zu deprotonieren und anschließend durch eine geeignete Säure wieder zu protonieren. Da das α,β -*cis*-konfigurierte Molekül vermutlich thermodynamisch weniger stabil ist als das α,β -*trans*-konfigurierte, wurde zumindest eine überwiegende Epimerisierung am α -Kohlenstoffatom erwartet. Diese Vermutung wird durch Experimente von Chung *et al.* bestätigt.^[205]

Chung *et al.* verwendeten für ihre Epimerisierung Gleichgewichtsbedingungen, die bei erhöhten Temperaturen das thermodynamisch stabilere Produkt liefern sollten ($\text{NaOEt}/$

EtOH (4 Äq), CF_3COONa (3 Äq), Rückfluss, 2 h), was ein Diastereomerenverhältnis von 55:45 (*trans*:*cis*) lieferte.^[205] Dagegen versuchten Karoyan *et al.*, das thermodynamisch stabilere Produkt unter wesentlich milderen Bedingungen zu erhalten (LDA (1 Äq), $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, EtOH (10 Äq), RT), was jedoch ebenfalls nur zu einem Diastereomerenverhältnis von 77:23 (*trans*:*cis*) führte.^[200]

Bei sämtlichen Versuchen zur Epimerisierung am α -Kohlenstoffatom in **32** mit sowohl thermodynamischer als auch kinetischer Kontrolle der Reaktion wurde lediglich ein Isomerengemisch erhalten, welches etwa gleiche Teile beider Isomere enthält. Dies ist anhand des analytischen HPL-Chromatogramms in Abbildung 4.21 erkennbar. Eine präparative Trennung war jedoch nicht möglich, da sich die Retentionszeiten beider Isomere nur geringfügig unterscheiden und daher lediglich eine Anreicherung eines Isomers möglich wäre.

Um jedoch eine Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-*trans*- β -methyl-L-prolin **35** zu ermöglichen, wurde von käuflichem *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** ausgegangen, welches *N*-terminal mit einer Fmoc-Schutzgruppe versehen wurde. Die Reaktion verläuft in einem H_2O /Aceton-Gemisch mit NaHCO_3 als Base in erwartet hoher Ausbeute von 91 % (Abb. 4.22). Das erhaltene *N*-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-*trans*- β -methyl-L-prolin **35** kann nach HPL-chromatographischer Reinigung direkt unter Standardkupplungsbedingungen in der Peptidsynthese eingesetzt werden (s. Kapitel 4.3).

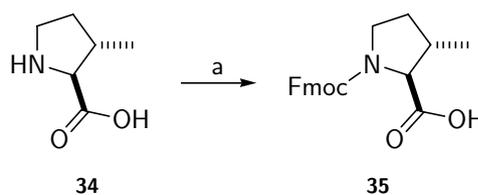


Abbildung 4.22: Synthese von Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35**: (a) Fmoc-OSu, NaHCO_3 , H_2O /Aceton, RT, 60 h, 91 %

Ein großer Vorteil des verwendeten auxiliargesteuerten Synthesewegs ist die leichte Variierbarkeit. Wird anstatt von *R*-Phenylethylamin **28** von *S*-Phenylethylamin **36** ausgegangen, ist die Synthese des anderen Enantiomers Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** problemlos möglich. Wird dieses keiner C^α -Epimerisierung unterworfen, ist ein Vergleich zwischen *cis*- und *trans*-Konfiguration der α - und β -Substituenten des Pyrrolidinrings möglich (Abb. 4.23). Durch Einbau von Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** in die Peptidsequenz anstelle von Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** ist es möglich, das Neofrapeptin F-Analogon **66** zu erhalten (s. Kapitel 4.3).

In Abbildung 4.24 ist ein Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der isomeren Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** und Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** zu sehen. Es wird deutlich,

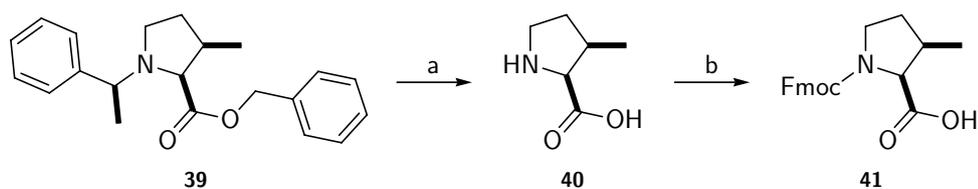


Abbildung 4.23: Synthese von Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41**: (a) H_2 -Pd/C, MeOH, RT, über Nacht, 87 %; (b) Fmoc-OSu, NaHCO_3 , H_2O /Aceton, RT, 60 h, 54 %

dass sich die Spektren gerade im Bereich der γ' -Methylprotonen und der benachbarten Gruppen (C^β , C^α , C^γ) durch recht deutliche Verschiebungen zueinander unterscheiden. Auch ist erkennbar, dass auf Grund der voluminösen Fmoc-Gruppe jeweils zwei Rotamere von Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** und Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** vorliegen. Zwischen 1.1 ppm und 1.2 ppm sind zwei Dubletts zu finden, deren Kopplungskonstanten einer 3J -Kopplung entsprechen. Die Dubletts können den β -Methylprotonen zugeordnet werden. Die Beobachtung, dass auf Grund der Fmoc-Gruppe zwei Rotamere vorhanden sein müssen, wird durch einen doppelten Signalsatz im ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt. Das Vorliegen von Diastereomeren kann anhand der NMR-Spektren der freien Aminosäuren **34** und **40** ausgeschlossen werden.

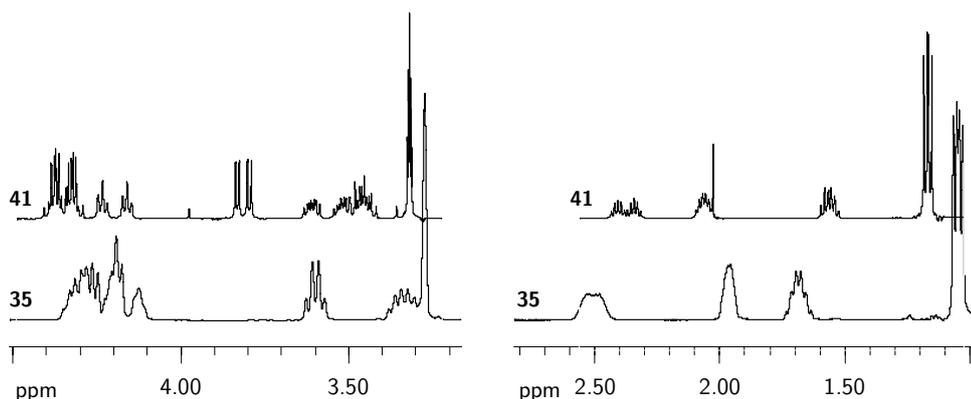


Abbildung 4.24: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** und Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41**

4.2 Efrapeptine D–G 42–45

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wird Efrapeptin C für die Synthese in drei Fragmente zerlegt, die zunächst einzeln synthetisiert und anschließend miteinander ver-

Tabelle 4.1: Sequenzen der synthetischen Efraeptine D–G 42–45

Efraeptin	Sequenzen
D 42	Ac-Pip-Aib-Pip- Aib -Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X
E 43	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X
F 44	Ac-Pip-Aib-Pip- Aib -Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-X
G 45	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-X

knüpft werden. Dabei kommen sowohl Methoden der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) als auch Syntheseschritte in Lösung zum Einsatz. Für die Synthese der Efraeptine D–G 42–45 ist ein vergleichbarer Ansatz denkbar, bei dem jedoch auf einige Besonderheiten dieser Efraeptine gegenüber Efraeptin C geachtet werden muss.

4.2.1 Synthese

Vor Beginn dieser Arbeit war zwar die Totalsynthese von Efraeptin C bekannt,^[46,47] jedoch nicht die der Efraeptine D–G (Tab. 4.1). Wie in der von Jost *et al.* beschriebenen Vorgehensweise wurde auch bei der Synthese der Efraeptine D–G das Gesamt-molekül in zwei Peptidfragmente und die Kopfgruppe zerlegt. Bei den Efraeptinen D–G ist jedoch Aib¹⁵ (Efraeptin C), welches in Form des Dipeptids Boc-Leu¹⁴-Aib¹⁵-OH an die Kopfgruppe in Lösung gekuppelt wird, gegen Iva¹⁵ (Efraeptine D–G) ausgetauscht. Hierin besteht der wichtigste bei der Syntheseplanung zu berücksichtigende Unterschied.

Auf Grund der gegenüber der achiralen α -Aminoisobuttersäure **9** erheblich schwierigeren Zugänglichkeit des chiralen und enantiomerein benötigten L-Isovalins **21** (vgl. Kapitel 4.1.2) erschien eine gesonderte Synthese und Einführung des Dipeptids Boc-Leu-L-Iva-OH in Lösung wenig sinnvoll, da vergleichsweise große Mengen des Aminosäurebausteins benötigt werden.

Daher wurden anstelle der Kupplung eines Dipeptids an die Kopfgruppe gefolgt von der Kupplung des mittleren Fragments wie im Falle von Efraeptin C direkt die entsprechenden mittleren Fragmente, welche die Aminosäuren Aib⁹ bis L-Iva¹⁵ enthalten, synthetisiert und an die Kopfgruppe gekuppelt. In den Efraeptinen D und E handelte es sich um das Peptidfragment N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **46**, während bei den Efraeptinen F und G das Peptid N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-OH **47** benötigt wurde.

Die Synthese beider Fragmente geht von mit H-L-Iva-OH beladenem *o*-Chlortritylharz aus. Für die spätere Fragmentkondensation wählte Jost die Schnittstelle zwischen Gly¹³ und Leu¹⁴, um einerseits eine einfache Kupplung zu ermöglichen, andererseits aber auch eine mögliche Epimerisierung zu vermeiden. Da im Falle von L-Isovalin jedoch auf Grund des fehlenden α -Protons nicht die Gefahr einer Epimerisierung besteht, kann ein L-Iva-Rest problemlos die carboxyterminale Komponente eines Peptidfragments darstellen. Zudem zeigten erste Versuche von Jost, dass eine Kupplung eines Peptidfragments mit einem Aib-Rest als Carboxykomponente an die Kopfgruppe problemlos möglich ist und somit auch auf einen L-Iva-Rest übertragen werden können sollte.^[90] Diese Ergebnisse konnten im Laufe der vorliegenden Arbeit in einigen Experimenten mit dem racemischen Iva-Baustein bestätigt werden.

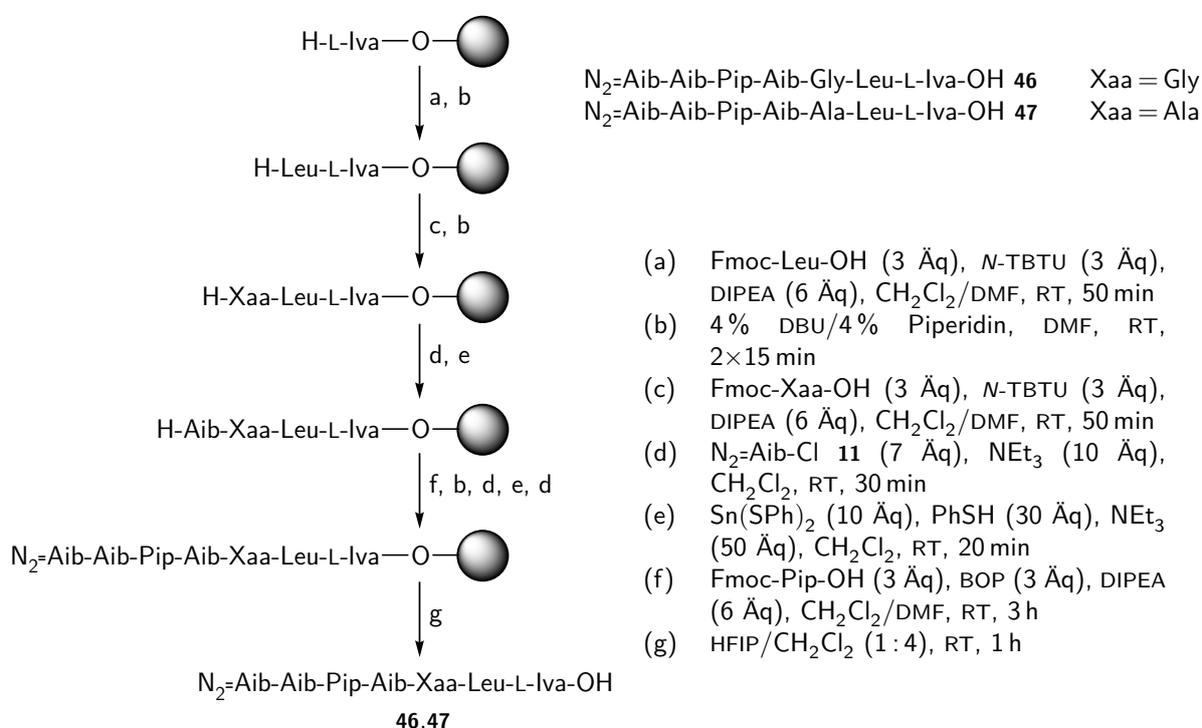


Abbildung 4.25: Synthese der mittleren Peptidfragmente **46** und **47**, Ausbeuten: 13% (**46**), 11% (**47**)

In Abbildung 4.25 ist die allgemeine Vorgehensweise zur Synthese der mittleren Fragmente **46** und **47** dargestellt. Das *o*-Chlortritylharz wurde mit *S*-2-Azido-2-methylbuttersäure **24** unter basischen Bedingungen beladen. Während bei Fmoc-geschützten Aminosäuren die Beladung UV-spektroskopisch durch Messung der Absorption der Fmoc-Abspaltprodukte bei 290 nm bestimmt werden kann, erfolgte dies im Falle von Azidosäuren auf Grund der fehlenden chromophoren Schutzgruppe gravimetrisch.

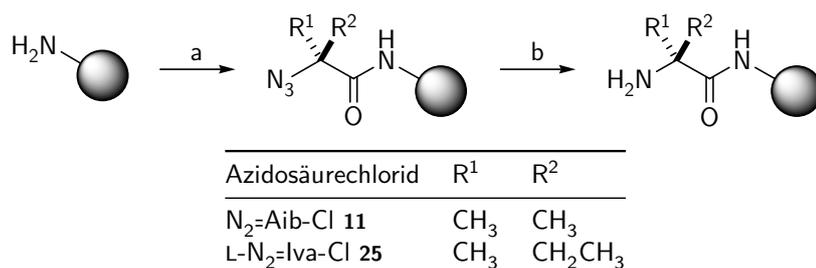


Abbildung 4.26: Kupplung der Azidosäurechloride **11** und **25** an ein harzgebundenes Amin und anschließende Reduktion mit dem Vilarrasa-Reagenz: (a) NEt₃, CH₂Cl₂, RT, 30 min; (b) Sn(SPh)₂, PhSH, NEt₃, CH₂Cl₂, RT, 20 min

Die Reduktion der Azidogruppe erfolgte nach der in Kapitel 2.1.3 auf Seite 20 beschriebenen Methode mit Hilfe des Vilarrasa-Reagenzes. Die Peptidsynthese startet mit dem so erhaltenen mit der ersten Aminosäure beladenen Harz. Während die Fmoc-geschützten Standardamino-säuren wie Glycin, Leucin oder Alanin mit *N*-TBTU als Kupplungsreagenz in die Peptidsequenz eingebaut wurden, wurde für Fmoc-Pipecolin-säure auf Grund einer erhöhten Effizienz bei schwierigen Kupplungen zyklischer Aminosäuren BOP verwendet.^[206] Die Einführung der α,α -dialkylierten Aminosäure Aib erfolgte über das Säurechlorid **11** und anschließende Reduktion des harzgebundenen Azids mit Hilfe des Vilarrasa-Reagenzes (Abb. 4.26).

Für die später erfolgenden Segmentkondensationen ist es wichtig, dass der *N*-Terminus der zu kuppelnden Heptapeptide geschützt vorliegt, um eine mögliche Oligomerisierung zu verhindern. Jost *et al.* setzten hierzu eine *Z*-Schutzgruppe ein, die einen zusätzlichen Entschützungs- und Kupplungsschritt erforderte.^[46,47] Die Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe kann zwar durch katalytische Hydrierung erfolgen, Reaktionszeiten über Nacht sind bei den vorliegenden Peptiden jedoch keine Seltenheit.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode kommt ohne einen zusätzlichen Entschützungs- und Kupplungsschritt aus. Anstatt die Azidogruppe des *N*-terminalen Aib-Rests mit Hilfe des Vilarrasa-Reagenzes zu reduzieren, um einen weiteren Kupplungsschritt zu ermöglichen, wurde diese einfach als Schutz des *N*-Terminus am Peptidfragment belassen. Auf diese Weise ist zum einen eine problemlose Segmentkondensation möglich, zum anderen kann die Azidogruppe weitaus schneller durch katalytische Hydrierung vom *N*-Terminus abgespalten werden, als dies bei der *Z*-Schutzgruppe der Fall ist.

Sämtliche Vorgehensweisen können auf die Synthese der *N*-terminalen Fragmente **48** und **49** übertragen werden, jedoch wurde von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz

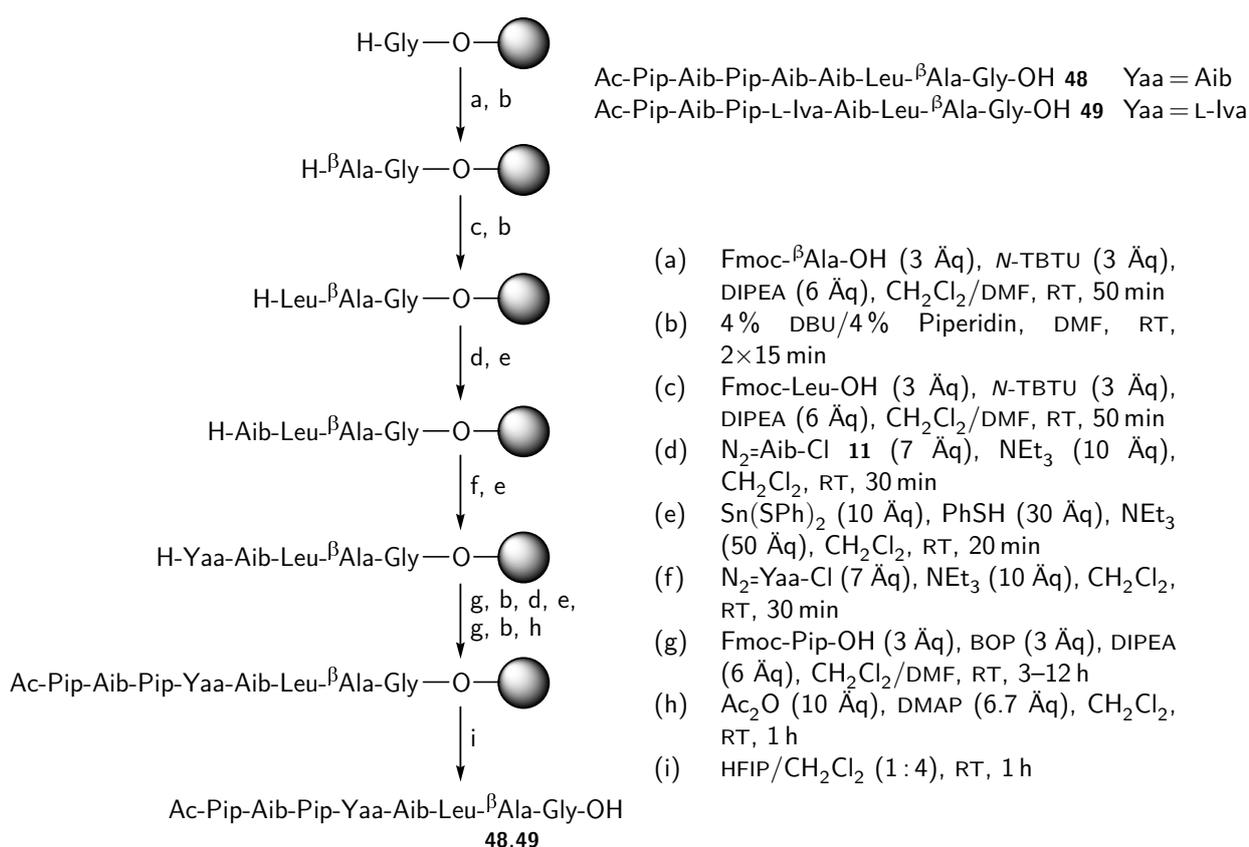


Abbildung 4.27: Synthese der *N*-terminalen Peptidfragmente **48** und **49**, Ausbeuten: 13 % (**48**), 6 % (**49**)

ausgegangen (Abb. 4.27). Die α,α -dialkylierte Aminosäure L-Iva wurde analog zu der Vorgehensweise bei Aib über das Säurechlorid **25** und anschließende Reduktion des harzgebundenen Azids mit Hilfe des Vilarrasa-Reagenzes in die Peptidsequenz eingefügt (Abb. 4.26). Da der *N*-Terminus der *N*-terminalen Fragmente **48** und **49** ohnehin acetyliert vorliegt, muss keine zusätzliche Schutzgruppe für die spätere Segmentkondensation angebracht werden.

Die Synthese der Kopfgruppe wurde bereits von Jost *et al.* [46,47,90] beschrieben (Abb. 4.28). Danach wird zunächst das für die Alkylierung von DBN benötigte Leucin-Derivat **54** ausgehend von L-Leucin **50** hergestellt. Als erstes wird die α -Aminogruppe mit Hilfe von Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) mit einer Boc-Schutzgruppe versehen und die Carboxylgruppe zum Alkohol reduziert, wodurch der urethangeschützte α -Aminoalkohol **52** entsteht. [207,208]

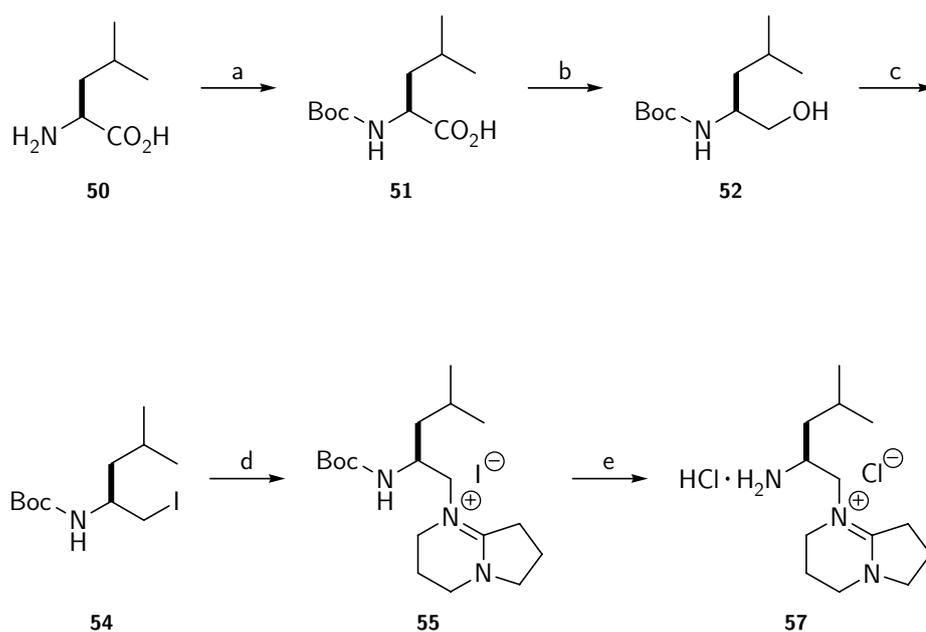


Abbildung 4.28: Synthese der Kopfgruppe **57**: (a) Di-*tert*-butyldicarbonat, NaOH, H₂O/Dioxan; (b) 1. ClCOOEt, DIPEA, THF, 0 °C; 2. NaBH₄, H₂O, –15 °C → RT, 2.5 h, 55 %; (c) PPh₃, I₂, Imidazol, CH₂Cl₂, RT, 1 h, 51 %; (d) DBN, Toluol, Rückfluss, 1.5 h, 75 %; (e) HCl (25 % in H₂O), 0 °C, 30 min, quantitativ

Als problematischer erwies sich nach Jost die Überführung der Alkoholfunktion in das Iodid, um eine gute Abgangsgruppe für die anschließende *N*-Alkylierung zu erhalten. So konnte unter Mitsunobu-Bedingungen lediglich ein nicht trennbares 2:1-Gemisch des gewünschten Iodids **54** und des Aziridins **53** erhalten werden (Abb. 4.29).^[209,210] Als Alternative kann auf eine von Caputo *et al.* vorgestellte Methode zurückgegriffen werden, die Iod, Triphenylphosphin und Imidazol unter Appel-Bedingungen verwendet.^[211–214] Auf diese Weise wird *S*-2-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylamino)-4-methyl-1-iodpentan **54** in akzeptabler Ausbeute erhalten.

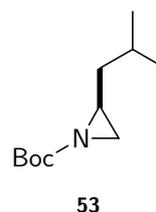


Abbildung 4.29: Das Aziridin **53**

Die folgende *N*-Alkylierung des Amidins DBN zu 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** erfolgt unter Rückfluss in Toluol nach einer von Reynolds *et al.* beschriebenen Vorgehensweise,^[215] wobei im Rohprodukt auch Verunreinigungen durch protoniertes DBN gefunden werden. Dies könnte ein Zeichen für eine Deprotonierung am α -Kohlenstoffatom

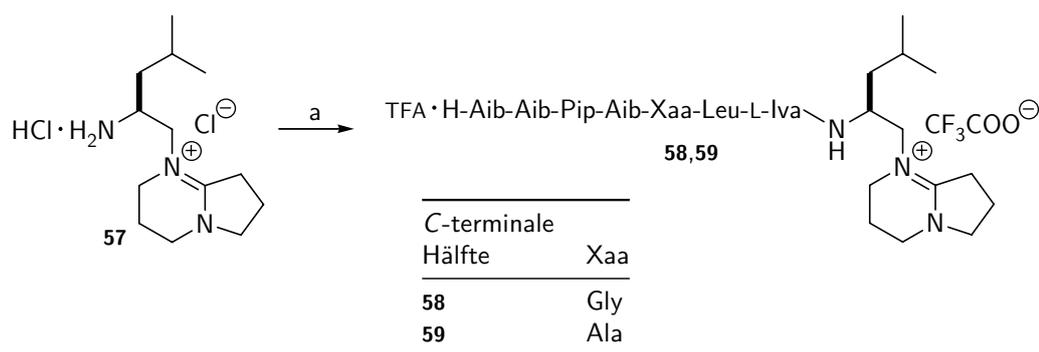


Abbildung 4.30: (a) 1. N_2 =Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH bzw. N_2 =Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-OH, *N*-HATU, HOAt, CH_2Cl_2 /DMF, $0^\circ C \rightarrow RT$; 2. H_2 -Pd/C, MeOH, RT; 3. RP-HPLC, 19 % (**58** und **59**)

während der Reaktion sein. Da es sich um eine zuvor nicht synthetisierte Verbindung handelt, kann anhand des Drehwertes nicht eindeutig bestimmt werden, ob **55** tatsächlich enantiomerenrein vorliegt. Jedoch weisen die NMR-Spektren des aus **55** synthetisierten TFA·H-Leu-Aib-X **91** keinen zweiten Signalsatz auf, der auf das Vorliegen eines zweiten Epimers schließen ließe.^[33]

Wie bereits von Jost beschrieben, kann es bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von der Kopfgruppe **55** und anschließender Kupplung einer Aminosäure oder eines Peptidfragments zu einer unerwünschten Nebenreaktion kommen.^[90] Anstelle einer gewünschten Acetylierung der dann freien Aminogruppe durch die Carboxylfunktion der Aminosäure oder des Peptidfragments kann wesentlich leichter die Carboxylgruppe des im Reaktionsgemisch und als Gegenion der positiv geladenen Kopfgruppe vorhandenen Trifluoracetats für eine Kupplung aktiviert werden. Dadurch kommt es überwiegend zu einer Trifluoracetylierung der freien Aminogruppe, welche dann für die eigentliche Kupplung nicht mehr zur Verfügung steht. Als Alternative zu der Carbonsäure TFA kann problemlos die Mineralsäure HCl (25 %) zur Boc-Entschützung verwendet werden, welche nicht für eine Acetylierung der Aminogruppe in Frage kommt. Auf diese Weise konnten die gewünschten C-terminalen Hälften **58** und **59** durch Fragmentkondensation erhalten werden (Abb. 4.30).

Die für die Synthese der Efrapeptine D–G **42–45** erforderlichen Segmentkondensationen stellen hohe Anforderungen an das verwendete Kupplungsreagenz, da bereits die Peptidfragmente eine recht starre Sekundärstruktur aufweisen. Als Kupplungsreagenz kommt daher *N*-HATU in Verbindung mit HOAt zum Einsatz. Dadurch soll eine möglichst effiziente und vollständige Kupplung ermöglicht werden.

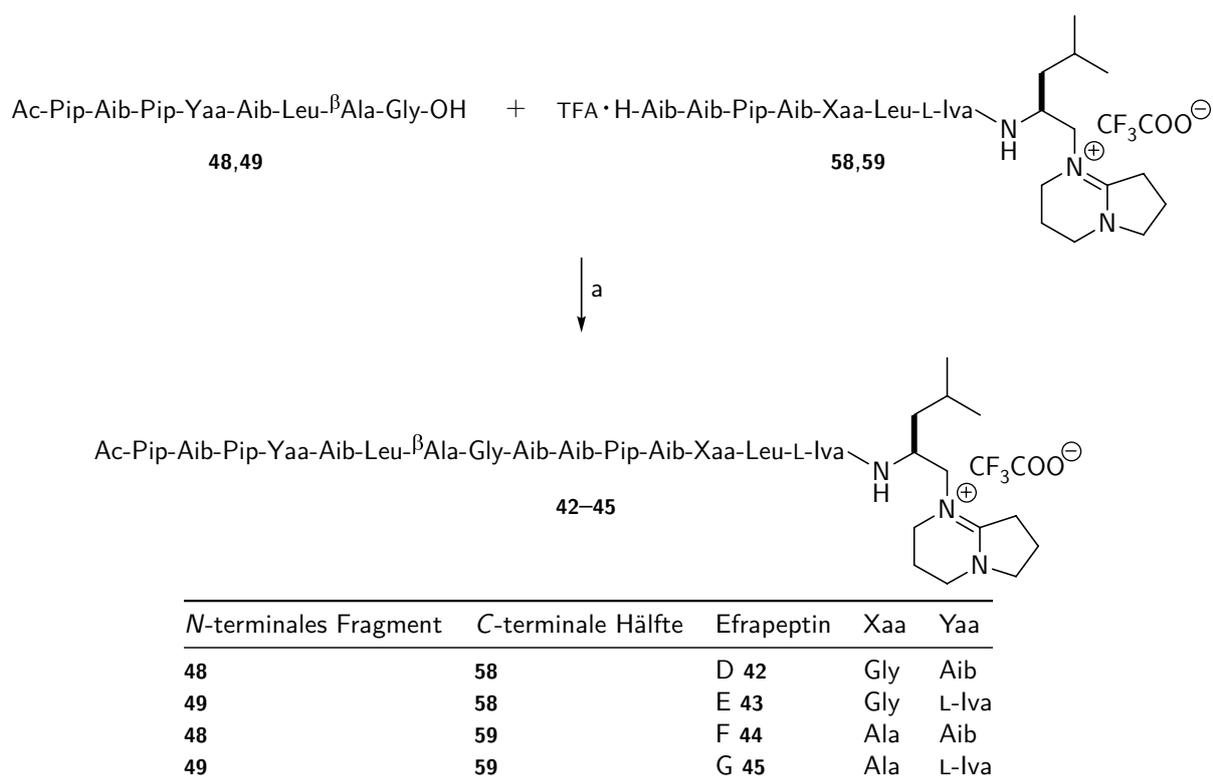


Abbildung 4.31: a) 1. *N*-HATU, HOAt, CH₂Cl₂/DMF, 0°C → RT; 2. RP-HPLC, 18% (**42**), 48% (**43**), 8% (**44**), 17% (**45**)

Bei der Synthese der Efrapeptine D–G **42–45** werden mit den gewählten Schnittstellen nur vier verschiedene Peptidfragmente und die Kopfgruppe benötigt, die miteinander kombiniert werden. So wurden zunächst die mittleren Fragmente N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **46** und N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-OH **47** an die von der Boc-Schutzgruppe befreite Kopfgruppe **57** gekuppelt (Abb. 4.30). Nach erfolgreicher Kupplung, welche MALDI-TOF-massenspektrometrisch am Verschwinden der kationischen Kopfgruppe verfolgt werden kann, wurde die *N*-terminale Azidoschutzgruppe durch katalytische Hydrierung zur Aminogruppe reduziert. Nach RP-HPLC wurden die *C*-terminalen Hälften TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **58** und TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-X **59** erhalten.

Für die abschließenden Fragmentkondensationen wurde wiederum *N*-HATU in Kombination mit HOAt als Kupplungsreagenz eingesetzt. Der Reaktionsverlauf konnte anhand der verschwindenden kationischen Aminokomponenten **58** und **59** durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgt werden. Die Efrapeptine D–G **42–45** wurden nach RP-

HPLC in Ausbeuten zwischen 8 % und 48 % isoliert (Abb. 4.31).

Um eine eindeutige Charakterisierung der Efraeptine D–G 42–45 zu erhalten, wurden eine Massenfeinbestimmung mit Hilfe der ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie durchgeführt sowie ^1H -NMR-Spektren von den einzelnen Produkten in DMSO-D_6 aufgenommen.

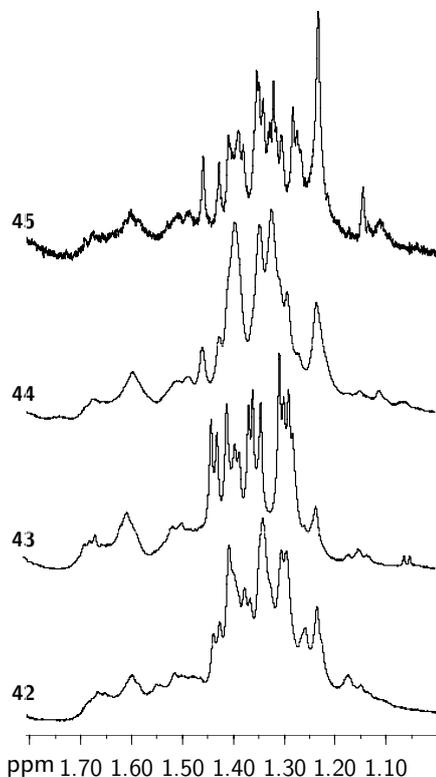


Abbildung 4.32: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der Efraeptine D–G 42–45 im Bereich zwischen 1.0 ppm und 1.8 ppm

Die Massenfeinbestimmung liefert die in Tabelle 4.2 aufgeführten Werte. Abweichungen von nur 0.2 ppm bis 1.5 ppm zu den berechneten Werten liegen in einem sehr guten Bereich, so dass die Verbindungen eindeutig identifiziert sind.

Die ^1H -NMR-Spektren zeigen die erwarteten Signale zwischen 0.8 und 1.0 ppm. In diesem Bereich treten sechs Dubletts der Methylprotonen in den *iso*-Butyl-Seitenketten der Leucin-Reste und der Kopfgruppe auf. Außerdem fallen die γ -Methylprotonen der L-Iva-Reste in diesen Bereich. Abbildung 4.32 zeigt den Bereich, in dem u. a. die Signale der Methylprotonen der Aib-Reste sowie der β -Methylprotonen der L-Iva-Reste zu finden sind. Eine exakte Zuordnung ist jedoch auf Grund zahlreicher Signalüberlagerungen und einer teilweise zu geringen Auflösung der Multiplettstruktur nicht möglich. Es ist allerdings erkennbar, dass es zu Signalverschiebungen bei den Spektren der unterschiedlichen Efraeptine kommt. Die Amidprotonen finden sich sämtlich im Bereich zwischen 6.4 und 8.5 ppm, wobei es hier zu einigen Unterschieden zwischen den einzelnen Efraeptinen kommt.

Tabelle 4.2: Vergleich der gemessenen mit den berechneten monoisotopischen Massen der Efrapeptine D–G 42–45

Efrapeptin	Monoisotopische Masse		für ein Ion der Zusammensetzung	Abweichung [ppm]
	gemessen	berechnet		
D 42	n. b.	810.53419	$[^{12}\text{C}_{81} \text{}^1\text{H}_{140} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^{2+}$	n. b.
	n. b.	821.52544	$[^{12}\text{C}_{81} \text{}^1\text{H}_{139} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16} \text{}^{23}\text{Na}]^{2+}$	n. b.
E 43	1634.07784	1634.07675	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{141} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^+$	0.67
F 44	817.54184	817.54201	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{142} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^{2+}$	0.21
	828.53271	828.53298	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{141} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16} \text{}^{23}\text{Na}]^{2+}$	0.33
G 45	824.54921	824.54984	$[^{12}\text{C}_{83} \text{}^1\text{H}_{144} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^{2+}$	0.76
	835.53960	835.54081	$[^{12}\text{C}_{83} \text{}^1\text{H}_{143} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16} \text{}^{23}\text{Na}]^{2+}$	1.45

4.2.2 CD-spektroskopische Untersuchungen

Bereits von Jost *et al.* wurden erste konformationelle Untersuchungen an Efrapeptin C und Efrapeptin-Analoga mit Hilfe der CD-Spektroskopie vorgenommen.^[216] Anhand dieser Studien wurde bei den untersuchten Verbindungen im Wesentlichen eine 3_{10} -helikale Struktur postuliert. Diese sollte insbesondere in den Bereichen Pip¹ bis Aib⁵ und Aib⁹ bis Aib¹⁵ vorhanden sein, während der flexible mittlere Bereich die Helizität unterbricht. Durch Variationen in dieser flexiblen Region, die bei Efrapeptin C aus den Aminosäuren Leu⁶-βAla⁷-Gly⁸ besteht, wurde der Einfluss auf konformationelle Eigenschaften untersucht.^[216]

Jost *et al.* schlossen aus den stärkeren CD-Effekten der Analoga gegenüber dem Naturstoff auf einen höheren helikalen Sekundärstrukturanteil. Durch den Vergleich des Verhältnisses R der molaren Elliptizitäten bei 230 nm und 205 nm kann auf die Art der Helizität geschlossen werden. Liegt das Verhältnis um 0.5 oder niedriger handelt es sich überwiegend um eine 3_{10} -Helix. Nähert sich das Verhältnis jedoch 1, ist das Vorliegen einer α -Helix wahrscheinlicher. Da der Übergang jedoch nicht scharf abgegrenzt ist, ist die Interpretation in einigen Fällen nur schwierig möglich. Zudem sollte immer eine Kombination mit anderen Methoden zur Strukturanalyse stattfinden.^[217–219]

Nachdem bereits Efrapeptin C sowohl CD- und VCD-spektroskopisch, als auch NMR-spektroskopisch eingehend untersucht wurde, sollen in der vorliegenden Arbeit die syn-

Tabelle 4.3: Vergleich des Verhältnisses R der Elliptizitäten bei 230 nm und 205 nm und der CD-Effekte der Efrapeptine C–G ($[\theta]_{\text{MRW}}$ in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)

Efrapeptin	$[\theta]_{205} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{230} \cdot 10^{-3}$	$R_{\frac{\theta_{230}}{\theta_{205}}}$
C	–12.1	–4.2	0.35
D 42	–14.0	–4.1	0.29
E 43	–10.7	–4.0	0.37
F 44	–9.9	–3.3	0.33
G 45	–10.7	–3.6	0.33

thetisch hergestellten Efrapeptine D–G **42–45** CD-spektroskopisch auf ihre konformationellen Eigenschaften untersucht werden. Die Efrapeptine D–G **42–45** unterscheiden sich von Efrapeptin C nur in drei Positionen und untereinander sogar nur in zwei Positionen der Aminosäuresequenz. Zudem handelt es sich nicht um gravierende Veränderungen in den Sequenzen. So wird Aib⁴ in den Efrapeptinen C, D und F gegen L-Iva⁴ in den Efrapeptinen E und G ausgetauscht. Ebenso wird Gly¹³ in den Efrapeptinen C–E durch Ala¹³ in den Efrapeptinen F und G ersetzt. In Efrapeptin C befindet sich zudem Aib¹⁵ anstelle von L-Iva¹⁵, wie es in den Efrapeptinen D–G vorhanden ist. Erwartungsgemäß sollten die Ergebnisse aus den CD-Spektren daher keine größeren Abweichungen untereinander zeigen.

Um eine Helixbildung zu begünstigen, wurden die Peptide in Trifluorethanol gelöst untersucht. Besonderes Augenmerk sollte neben der Intensität des CD-Effekts auf das Verhältnis R der Banden um 230 nm und 205 nm gelegt werden. Während bei den CD-Effekten durchaus Unterschiede in den Intensitäten festzustellen sind, ist R nur sehr geringen Veränderungen unterworfen. Die Werte variieren von 0.29 für Efrapeptin D **42** bis 0.37 für Efrapeptin E **43** (Tab. 4.3).

Diese Ergebnisse ermöglichen es einerseits, eine α -helikale Sekundärstruktur vollständig auszuschließen, andererseits zeigen sie auch, dass sich die Unterschiede in der Aminosäuresequenz nur marginal auf die vorhandenen Sekundärstruktur motive auswirken. Dies ist ein Zeichen für die hohe konformationelle Stabilität der 3_{10} -helikalen Bereiche, was im Kontrast zu der Stabilität gegenüber Variationen im flexiblen mittleren Bereich steht, der sehr empfindlich auf Veränderungen reagiert.^[216]

Interessant erscheint neben der Betrachtung von R auch die Stärke der CD-Effekte. Sämtliche CD-Effekte fallen ähnlich aus, wie dies bei Efrapeptin C der Fall ist (Abb. 4.33 und Tab. 4.3). Dies deutet auf einen recht ähnlichen helikalen Sekundärstrukturanteil der Efrapeptine D–G **42–45** und Efrapeptin C hin. Insbesondere deuten die Ergebnis-

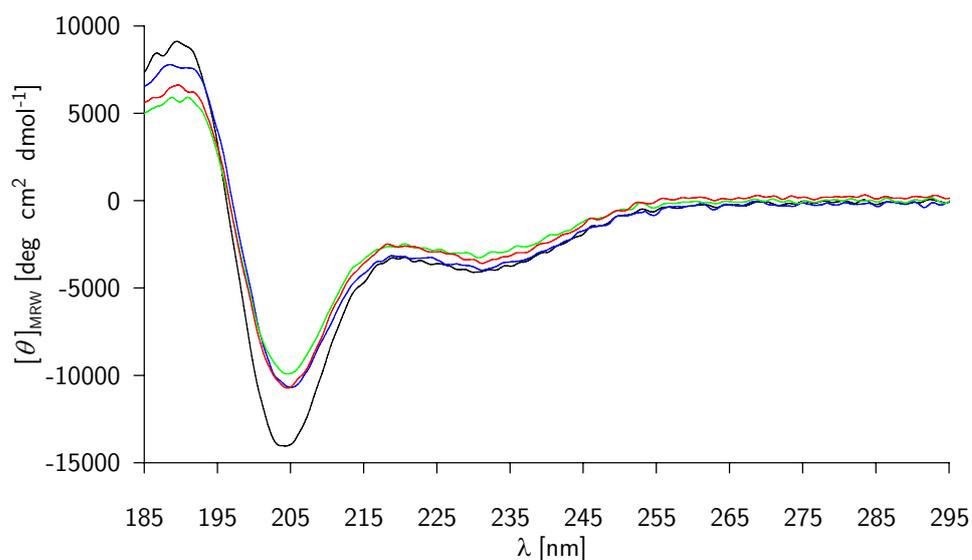


Abbildung 4.33: Vergleich der CD-Spektren der Efrapeptine D 42 (schwarz), E 43 (blau), F 44 (grün) und G 45 (rot)

se darauf hin, dass L-Iva¹⁵ keinen größeren Einfluss als Aib¹⁵ auf den 3_{10} -helikalen Bereich zwischen Aib⁹ und L-Iva¹⁵ hat, da dies die einzige Aminosäure ist, die gegenüber Efrapeptin C bei den Efrapeptinen D–G 42–45 immer Aib¹⁵ ersetzt. Die übrigen Variationen in der Aminosäuresequenz sind bei den Efrapeptinen D–G 42–45 jedoch auch untereinander verschieden und es kann keine klare Tendenz festgestellt werden, ob L-Iva⁴ und Ala¹³ eine ausgeprägtere helikogene Wirkung zeigen als Aib⁴ und Gly¹³.

Für eingehendere konformationelle Studien, insbesondere an Efrapeptin C, sei auf die von Huber durchgeführten Experimente hingewiesen. Neben der CD- und VCD-Spektroskopie kamen zum Teil sehr aufwändige NMR-spektroskopische Experimente zum Einsatz, die insgesamt ein sehr detailliertes Bild über die Struktur von Efrapeptin C in diversen Lösungsmitteln ergeben.^[33]

4.2.3 Untersuchungen zur ATPase-Inhibierung

Um einen Vergleich der Efrapeptine D–G 42–45 untereinander und im Speziellen auch mit dem bereits genauer untersuchten Efrapeptin C zu ermöglichen, wurden biologische Studien an den synthetisierten Verbindungen durchgeführt.

Wie bereits in Kapitel 2.2 ausführlich behandelt, sind die Efrapeptine Inhibitoren der mitochondrialen F_1 -ATPase. Um zu zeigen, dass die synthetischen Efrapeptine D–G 42–45 biologisch aktiv sind, wurde die Inhibierung der F_1 -ATPase aus *E. coli* untersucht. Die Hemmtests wurden von Dr. Jörg Greie in der Arbeitsgruppe von Prof. Karlheinz Altendorf durchgeführt. Als Vergleich zu den erhaltenen Ergebnissen dienten die zuvor bereits ermittelten K_i -Werte von synthetischem Efrapeptin C und einem Gemisch der natürlichen Efrapeptine, sowie der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte IC_{50} -Wert von synthetischem Efrapeptin C und der IC_{50} -Wert von natürlichem Efrapeptin F. Der K_i -Wert stellt eine Gleichgewichtskonstante dar, die die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor widerspiegelt. Der IC_{50} -Wert gibt die InhibitorKonzentration an, die eine halbmaximale Inhibierung verursacht. Da der IC_{50} -Wert neben dem K_i -Wert zusätzliche Faktoren berücksichtigt und eine höhere Aussagekraft besitzt, ist er dem K_i -Wert vorzuziehen.

Der von Wise *et al.* ermittelte K_i -Wert für ein Gemisch der natürlichen Efrapeptine beträgt $21.5 \mu\text{M}$.^[104] Der von Jost *et al.* für synthetisches Efrapeptin C ermittelte K_i -Wert liegt bei $10 \mu\text{M}$,^[46,47] der im Rahmen dieser Arbeit für synthetisches Efrapeptin C ermittelt IC_{50} -Wert beträgt $19.9 \mu\text{M}$. Der von Bandani *et al.* für natürliches Efrapeptin F an Bürstensaumvesikeln (BBMV) aus *Galleria mellonella* ermittelte IC_{50} -Wert liegt bei $0.125 \mu\text{M}$.^[220]

Für die Bestimmung des K_i -Werts von synthetischem Efrapeptin C wurde die gereinigte, wasserlösliche F_1 -ATPase aus *E. coli* mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors versetzt.^[221] Die ATPase-Aktivität wurde bestimmt, indem zu der gelösten ATPase ATP zugefügt wurde und kontinuierlich Proben aus dem Gemisch genommen wurden, um die Menge des entstandenen anorganischen Phosphats zu bestimmen. Dies geschieht durch Reaktion mit Molybdat zu Molybdophosphorsäure und anschließende Reduktion mit Ascorbat zu Phosphomolybdänblau, dessen Absorption bei 578 nm gemessen werden kann. Dies wurde jeweils für die nicht inhibierte Reaktion wie auch für verschiedene InhibitorKonzentrationen durchgeführt. Die InhibitorKonzentration, die zu einer halbmaximalen Inhibierung führt, gibt den K_i -Wert an.^[222,223]

Da inzwischen ein neues Verfahren für die Ermittlung der ATPase-Aktivität entwickelt wurde, das anstelle von K_i -Werten aussagekräftigere IC_{50} -Werte liefert, ist ein direkter Vergleich der Werte nur eingeschränkt möglich. Das neue Verfahren bedient sich wiederum gereinigter, wasserlöslicher F_1 -ATPase aus *E. coli*, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors versetzt wurde. Die ATPase-Aktivität wurde mit Hilfe

Tabelle 4.4: Vergleich der IC_{50} -Werte von natürlichem und synthetischem Efraeptine C und den synthetisierten Efraeptinen D–G 42–45 (F_1 -ATPase aus *E. coli*)

Efraeptin	IC_{50} [μ M]
C	19.9
D 42	24.9
E 43	17.3
F 44	18.8
G 45	17.7

eines Mikrotiterplattenassays nach Henkel *et al.*^[224] mit einigen Modifikationen durch Altendorf *et al.*^[225] bestimmt. Die Entstehung von anorganischem Phosphat wurde bei diesem Test photometrisch über einen Phosphomolybdat/Malachitgrün-Komplex bestimmt. Dieser Versuchsaufbau lässt durch viele Einzelmessungen auf einer Mikrotiterplatte ein aussagekräftigeres Ergebnis zu als der zuvor verwendete Testaufbau.

Die Ergebnisse der ATPase-Inhibierungstests liegen im erwarteten Rahmen. Zwar wurden kleinere Unterschiede erhalten, jedoch stimmt die Größenordnung der erhaltenen IC_{50} -Werte gut mit denen des natürlichen und synthetischen Efraeptin C überein (Tab. 4.4). Dagegen liegt der IC_{50} -Wert, der von Bandani *et al.* für natürliches Efraeptin F an Bürstensaumvesikeln aus *Galleria mellonella* ermittelt wurde, deutlich niedriger.^[220] Ein direkter Vergleich ist jedoch nicht möglich, da Unterschiede im Aufbau des ATPase-Komplexes sich leicht auf die für eine halbmaximale Inhibierung benötigten Inhibitorkonzentrationen auswirken können.

Interessant erscheint eine Korrelation der biologischen Daten mit den konformationellen Daten aus den CD-Spektren. Efraeptin D 42 zeigt die stärkste 3_{10} -helikale Ausprägung ($R = 0.29$) und gleichzeitig den niedrigsten IC_{50} -Wert (17.3μ M) der Efraeptine D–G 42–45. Dagegen besitzt Efraeptin E 43 die geringste Tendenz, eine 3_{10} -Helix auszubilden ($R = 0.37$), was gut mit dem höchsten IC_{50} -Wert (24.9μ M) der Efraeptine D–G 42–45 korreliert. Da die Unterschiede in beiden Fällen jedoch nicht signifikant sind, ist es nicht möglich eine eindeutige Tendenz abzuleiten.

Die Ergebnisse deuten lediglich auf einen Zusammenhang zwischen dem Grad der 3_{10} -helikalen Sekundärstruktur und der biologischen Wirkung der Efraeptine D–G 42–45 hin. Eine abschließende Aussage über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ist anhand dieser Daten zwar nicht möglich, jedoch scheint es sinnvoll, die Experimente auszudehnen und beispielsweise durch NMR-Messungen zu ergänzen, welche ein detaillierteres Bild über konformationelle Eigenschaften zulassen.

4.3 Neofrapeptine A 60 und F 63 und das Neofrapeptin F-Analogon 66

Wie bereits in Kapitel 2.2.3 erläutert, bilden die Neofrapeptine eine erst kürzlich entdeckte Unterklasse der Efrapeptine, die neben den aus den Efrapeptinen bekannten Aminosäuren auch 1-Aminocyclopropancarbonsäure **26** und *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** enthalten. Die Neofrapeptine sind auf Grund ihrer biologischen und medizinischen Eigenschaften interessante natürlich vorkommende Verbindungen. Für eine weitergehende Erforschung ist die Entwicklung einer Synthesestrategie von Interesse, die sich an die bereits von den Efrapeptinen bekannten Vorgehensweisen anlehnt (s. Kapitel 4.2.1).

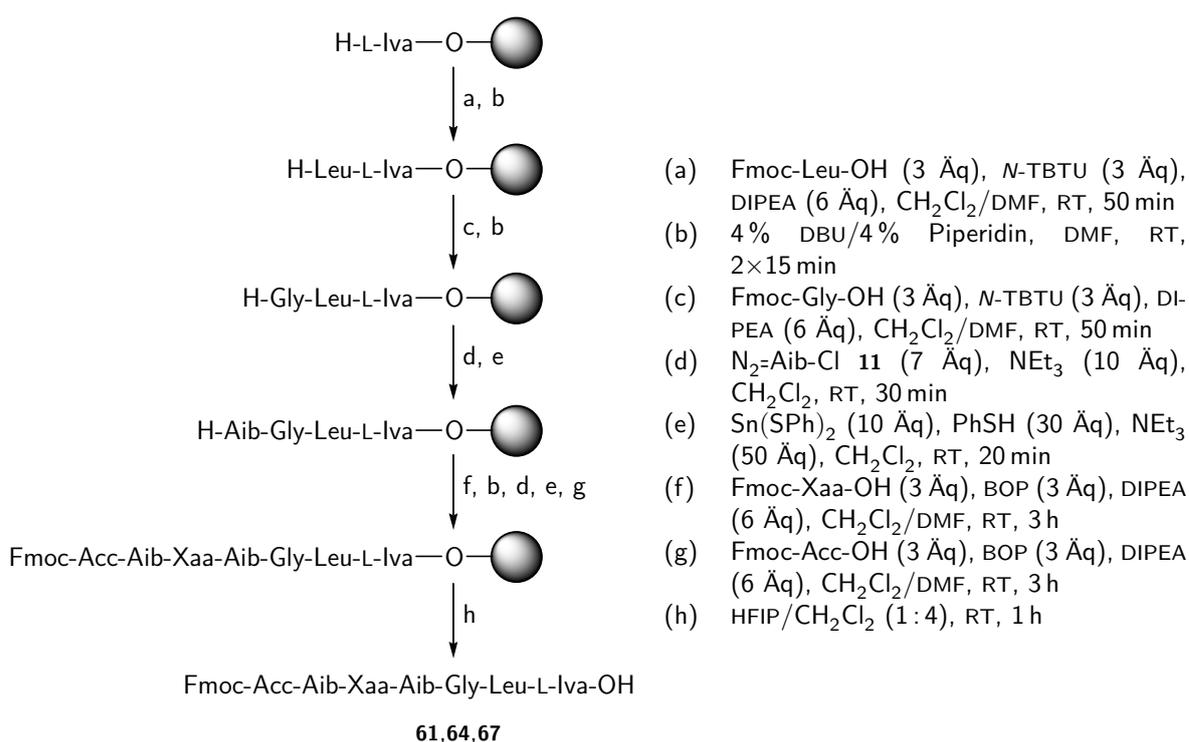
Untersucht wurden die natürlich aus dem Pilz *Geotrichum candidum* gewonnenen Neofrapeptine sowohl von Fredenhagen *et al.*,^[34] als auch von Huber *et al.*, denen es gelang, durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie die Sequenz zu bestimmen.^[32] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein synthetischer Zugang zu den Neofrapeptinen A **60** und F **63** sowie dem Neofrapeptin F-Analogon **66** entwickelt (Tab. 4.5).

Tabelle 4.5: Sequenzen der synthetischen Neofrapeptine A **60** und F **63** und des Neofrapeptin F-Analogons **66**

Neofrapeptin	Sequenzen
A 60	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib- Pip -Aib-Gly-Leu-L-Iva-X
F 63	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib- <i>trans</i> -L- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X
F-Analogon 66	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-Acc-Aib- <i>cis</i> -L- β^{Me} Pro -Aib-Gly-Leu-L-Iva-X

4.3.1 Synthese

Für die Synthese von Neofrapeptin A **60** wird neben den bei der Synthese der Efrapeptine D–G **42–45** benötigten Aminosäuren auch 1-Aminocyclopropancarbonsäure benötigt. Da diese käuflich in Fmoc-geschützter Form erhältlich ist, musste kein gesonderter Syntheseweg entwickelt werden. Für die Synthese von Neofrapeptin F **63** und des Neofrapeptin F-Analogons **66** werden zusätzlich die Fmoc-geschützten Aminosäuren Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** und Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** benötigt, deren Synthese in Kapitel 4.1.3 ab Seite 54 beschrieben ist.



mittleres Fragment	Xaa
Fmoc-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH 61	Pip
Fmoc-Acc-Aib- <i>trans</i> -L- ^β MePro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH 64	<i>trans</i> -L- ^β MePro
Fmoc-Acc-Aib- <i>cis</i> -L- ^β MePro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH 67	<i>cis</i> -L- ^β MePro

Abbildung 4.34: Synthese der mittleren Peptidfragmente **61**, **64** und **67**, Ausbeuten: 11% (**61**), 16% (**64**), 30% (**67**)

Die Gesamtmoleküle wurden jeweils in drei Fragmente zerlegt, welche zunächst einzeln in Lösung oder mit Hilfe von Festphasenmethoden synthetisiert und anschließend durch Segmentkondensationen zusammengefügt wurden. Als *C*-terminales Fragment diente in sämtlichen Fällen die Kopfgruppe **57**. Als mittlere Fragmente kamen die Peptide **61**, **64** und **67** zum Einsatz. Als *N*-terminales Fragment diente für sämtliche Sequenzen Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu-^βAla-Gly-OH **49**. Die Synthesen der Kopfgruppe **57** und des *N*-terminalen Fragments **49** sind bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, so dass an dieser Stelle lediglich auf die Synthese der mittleren Fragmente und die Segmentkondensationen eingegangen werden soll.

Die mittleren Fragmente **61**, **64** und **67** wurden ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz synthetisiert (Abb. 4.34). Die Aminosäuren Leucin und Glycin wur-

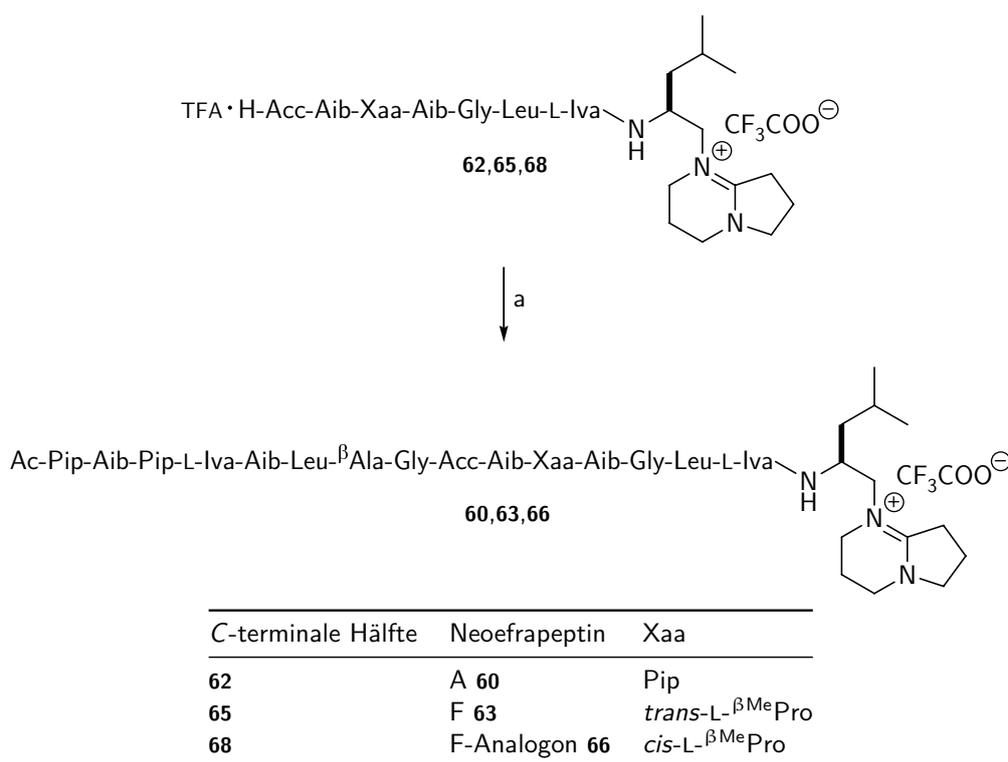


Abbildung 4.36: Synthese von Neofrapeptin A **60**, Neofrapeptin F **63** und dem Neofrapeptin F-Analogon **66**: (a) 1. Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- $^{\beta}\text{Ala-Gly-OH}$ **49**, *N*-HATU, HOAt, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$; 2. RP-HPLC, 24 % (**60**), 44 % (**63**), 27 % (**66**)

Für die abschließenden Fragmentkondensationen zu Neofrapeptin A **60**, Neofrapeptin F **63** und dem Neofrapeptin F-Analogon **66** werden die zuvor erhaltenen *C*-terminalen Hälften TFA·H-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **62**, TFA·H-Acc-Aib-*trans*-L- $^{\beta}\text{MePro}$ -Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **65** und TFA·H-Acc-Aib-*cis*-L- $^{\beta}\text{MePro}$ -Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **68** sowie das *N*-terminale Fragment Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- $^{\beta}\text{Ala-Gly-OH}$ **49** benötigt. Die Kondensation des *N*-terminalen Fragments an die drei verschiedenen *C*-terminalen Hälften gelingt erneut mit *N*-HATU als Kupplungsreagenz in Kombination mit HOAt. Nach präparativer RP-HPLC können die gewünschten Neofrapeptide in Ausbeuten von 24 % (**60**), 44 % (**63**) und 27 % (**66**) isoliert werden (Abb. 4.36).

Eine Charakterisierung der Verbindungen erfolgte anhand von NMR-Spektren, die mit denen der Naturstoffe verglichen werden können. Insbesondere ist aber auch ein Vergleich der chemischen Verschiebungen von Interesse, die jeweils Xaa¹¹ zugeordnet werden können, da hier die einzige Veränderung der Sequenzen untereinander vorgenom-

men wurde. Während in Neofrapeptin A **60** Pip¹¹ eingebaut ist, sind es in Neofrapeptin F **63** *trans*-L- β MePro¹¹ und im Neofrapeptin F-Analogon **66** *cis*-L- β MePro¹¹.

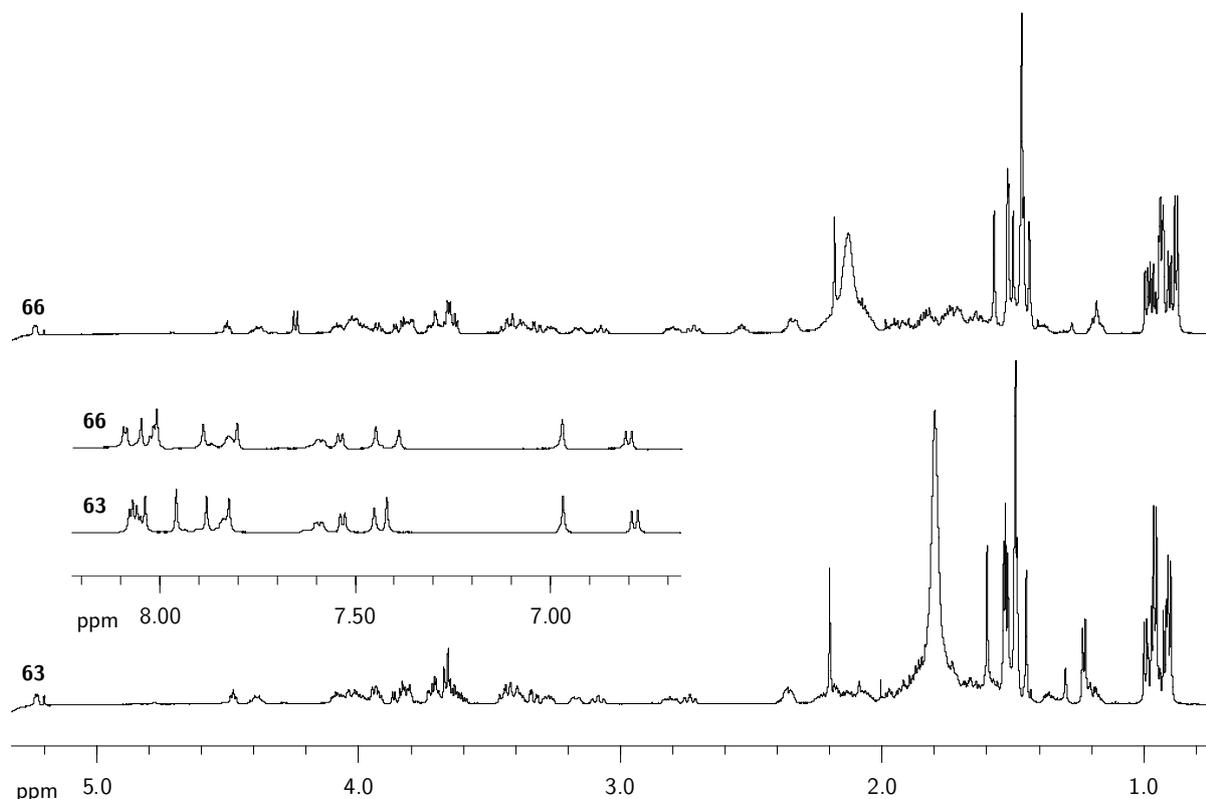


Abbildung 4.37: Vergleich der NMR-Spektren von Neofrapeptin F **63** und dem Neofrapeptin F-Analogon **66**

Anhand der ¹H-NMR-Spektren von **63** und **66** ist erkennbar, dass diese sich nur geringfügig voneinander unterscheiden (Abb. 4.37). Auf diese Weise ist insbesondere anhand der 2D-NMR-Spektren eine Unterscheidung der beiden Verbindungen möglich. Gerade im Bereich um 1.0–1.3 ppm sind Unterschiede erkennbar, die auf *cis*-L- β MePro und *trans*-L- β MePro zurückzuführen sind. Die von Huber durchgeführte Sequenzanalyse, bei der *trans*-L- β MePro gefunden wurde, kann daher mit Hilfe der synthetischen Verbindungen bewiesen und das Vorhandensein von *cis*-L- β MePro im Naturstoff ausgeschlossen werden. Die NMR-Spektren von **63** zeigen gute Übereinstimmung zu denen des Naturstoffs.^[32,33]

Als weitere Methode zur Charakterisierung der synthetisierten Neofrapeptine kommt die ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie zum Einsatz. Die erhaltenen Massen sind gemeinsam mit den berechneten Werten in Tabelle 4.6 aufgeführt. Die Abweichungen zwischen

experimentellen und theoretischen Werten sind mit 0.07–2.19 ppm sehr gering und bestätigen den Syntheserfolg.

Table 4.6: Vergleich der gemessenen mit den berechneten monoisotopischen Massen der synthetisierten Neofrapeptine **60**, **63** und **66**

Neofrapeptin	Monoisotopische Masse		für ein Ion der Zusammensetzung	Abweichung [ppm]
	gemessen	berechnet		
A 60	816.53240	816.53419	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{140} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^{2+}$	2.19
	825.04615	825.04746	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{143} \text{}^{14}\text{N}_{19} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^{2+}$	1.59
	827.52388	827.52516	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{139} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16} \text{}^{23}\text{Na}]^{2+}$	1.55
	1632.06194	1632.06110	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{139} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^+$	0.51
F 63	827.52510	827.52516	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{139} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16} \text{}^{23}\text{Na}]^{2+}$	0.07
	1632.06070	1632.06110	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{139} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^+$	0.25
F-Analogon 66	816.53470	816.53419	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{140} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^{2+}$	0.62
	827.52510	827.52516	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{139} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16} \text{}^{23}\text{Na}]^{2+}$	0.07
	1632.06133	1632.06110	$[^{12}\text{C}_{82} \text{}^1\text{H}_{139} \text{}^{14}\text{N}_{18} \text{}^{16}\text{O}_{16}]^+$	0.14

4.3.2 CD-spektroskopische Untersuchungen

Besondere Beachtung soll der CD-spektroskopischen Untersuchung der synthetisierten Neofrapeptine **60**, **63** und **66** geschenkt werden. Die CD-Spektren der natürlichen Neofrapeptine A und F wurden bereits beschrieben und können als Vergleich herangezogen werden.^[34] Jedoch wurden die CD-Spektren der Naturstoffe nicht in TFE, sondern in H₂O/MeOH (95:5) aufgenommen. Zudem wurde mit einer recht hohen Konzentration (0.2 mM) und einer großen Schichtdicke (0.1 cm) gearbeitet, was bei den untersuchten Peptiden auf Grund der Absorption des Lösungsmittels eher mäßige Ergebnisse erwarten lässt. Um einen Vergleich mit den CD-Spektren der übrigen synthetischen Efrapeptine zu ermöglichen, wurden die synthetischen Neofrapeptine in TFE gelöst gemessen.

Zwar fanden Fredenhagen *et al.* eine 3₁₀-helikale Struktur, welche auf den hohen Aib-Anteil zurückgeführt wurde, jedoch ging ihre Analyse nicht wesentlich darüber hinaus.

Lediglich aus der geringeren Stärke der CD-Effekte von Neofrapeptin F gegenüber Neofrapeptin A wurde auf eine β -turn-induzierende Wirkung durch *trans*- β -Methyl-L-prolin geschlossen. Da dieser Schluss nur anhand von CD-Spektren recht gewagt erscheint, soll für ein besseres Verständnis der Problematik kurz auf den Einfluss von Prolin und Prolinderivaten auf die Sekundärstruktur von Peptiden eingegangen werden.

Der Einfluss von Prolin und Prolinderivaten innerhalb einer Peptidsequenz auf die CD-Spektren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Vom *N*-Terminus von Ubiquitin abgeleitete, Prolin-haltige Peptide wurden von Jourdan *et al.* NMR- und CD-spektroskopisch untersucht und β -*hairpin*-Strukturen im Bereich um den Prolin-Rest festgestellt.^[226] Brett *et al.* griffen bei ihren Studien an C Hordein und daraus abgeleiteten Prolin-haltigen Peptiden neben der CD-Spektroskopie auf die FT-IR-Spektroskopie zurück. Sie fanden außer Strukturen des Poly-L-prolin II-Typs auch β -*turn*-Motive.^[227] Halab *et al.* beschäftigten sich mit der Synthese von Peptiden, die Prolinderivate enthalten und β -*turn*-Mimetika darstellen sollen. Sie untersuchten diese NMR- und CD-spektroskopisch sowie mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse und fanden auch bei kurzen Sequenzen β -*turn*-ähnliche Strukturen.^[228] Malešević *et al.* wiederum bauten gezielt Prolin und β -Homoprolin in zyklische Peptide ein. Diese wurden anschließend umfangreichen Studien unterzogen. CD-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie und FT-IR-Spektroskopie gaben gemeinsam ein sehr aussagekräftiges und detailliertes Gesamtbild der synthetisierten Peptide insbesondere im Hinblick auf den Austausch von Prolin gegen β -Homoprolin und die damit einhergehende Erhöhung der Flexibilität des Peptidrückgrats.^[229] All diese Publikationen zeigen einerseits die Möglichkeiten der CD-Spektroskopie bei der Strukturanalyse in Verbindung mit anderen Methoden, andererseits jedoch auch ihre Grenzen, wenn sie als ausschließliches Werkzeug eingesetzt wird.

Im Folgenden sollen die CD-Spektren der Naturstoffe von Fredenhagen *et al.* mit denen der synthetischen Neofrapeptine A **60** und F **63** verglichen und dabei der Einfluss von *trans*- β -Methyl-L-prolin genauer untersucht werden. Hinzu kommt die Analyse des CD-Spektrums des Neofrapeptin F-Analogons **66**, welches jedoch keine wesentlichen Unterschiede zum Spektrum von **63** erwarten lässt, da die Peptide sich ausschließlich in einem Stereozentrum unterscheiden. Da die für endgültige Aussagen erforderlichen NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Huber im Rahmen seines Dissertationsvorhabens durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle nur auf die CD-spektroskopischen Daten zurückgegriffen werden, wobei diese Ergebnisse durch NMR-Daten gestützt werden.^[33]

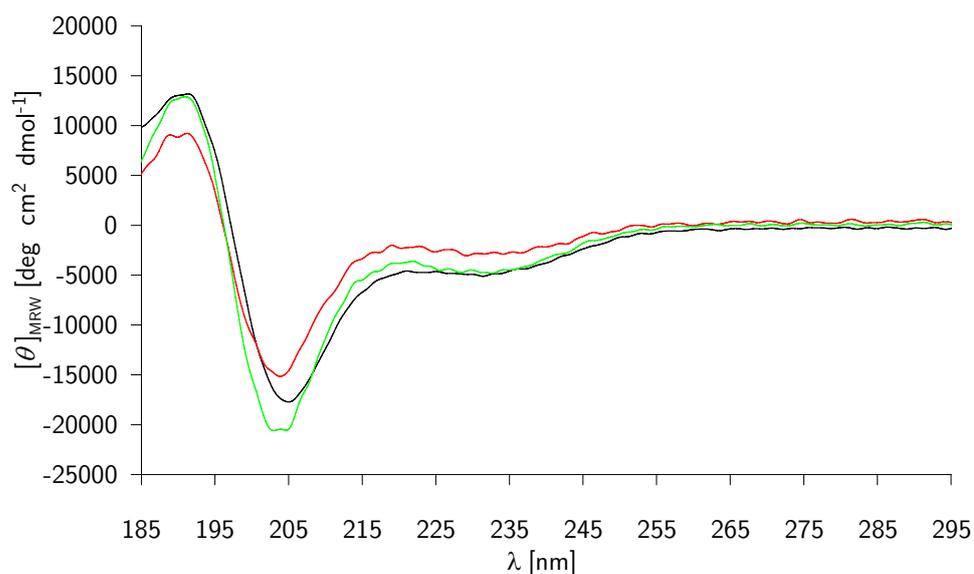


Abbildung 4.38: Vergleich der CD-Spektren der Neofrapeptine A **60** (schwarz) und F **63** (rot) und des Neofrapeptin F-Analogons **66** (grün)

Die synthetischen Neofrapeptine wurden in TFE gelöst CD-spektroskopisch untersucht (Abb. 4.38). Die CD-Effekte der vermessenen synthetischen Neofrapeptine in TFE sind deutlich stärker ausgeprägt, als die der Efrapeptine D–G **42–45** im selben Lösungsmittel. Insbesondere das Neofrapeptin F-Analogon **66** zeigt verhältnismäßig stark negative Banden bei 230 nm und 205 nm, was auf recht stabile Sekundärstrukturmotive hindeutet, während die CD-Effekte von Neofrapeptin A **60** und Neofrapeptin F **63** etwas geringer ausfallen (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: Vergleich des Verhältnisses R der Elliptizitäten bei 230 nm und 205 nm und der CD-Effekte der natürlichen und der synthetischen Neofrapeptine ($[\theta]_{\text{MRW}}$ in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)

Neofrapeptin	Lösungsmittel	$[\theta]_{205} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{230} \cdot 10^{-3}$	$R_{\frac{\theta_{230}}{\theta_{205}}}$
A (natürlich)	H ₂ O/MeOH (95 : 5)	≈ -8.0	≈ -2.5	≈ 0.31
A (synthetisch) 60	TFE	-17.7	-5.1	0.29
F (natürlich)	H ₂ O/MeOH (95 : 5)	≈ -7.0	≈ -1.5	≈ 0.21
F (synthetisch) 63	TFE	-15.2	-3.0	0.20
F-Analogon 66	TFE	-20.5	-4.5	0.22

Auch eine Betrachtung des Verhältnisses R der negativen CD-Banden bei 230 nm und 205 nm liefert interessante Ergebnisse. Bei den untersuchten Neofrapeptinen liegen die Werte unter 0.3, was auf einen großen 3_{10} -helikalen Sekundärstrukturanteil hindeutet.

Besonders ausgeprägt scheint dieser bei Neofrapeptin F **63** und dem Neofrapeptin F-Analogon **66** zu sein, da die Werte mit 0.20 und 0.22 besonders niedrig liegen. Eine α -helikale Sekundärstruktur ist anhand dieser Ergebnisse zwar vollständig auszuschließen, jedoch können beispielsweise β -turn-Motive ohne weitergehende Konformationsanalysen nicht bestätigt oder ausgeschlossen werden. An dieser Stelle besteht daher noch Forschungsbedarf gerade auch in Hinblick auf die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

Fredenhagen *et al.* verwendeten mit H₂O/MeOH (95:5) ein Lösungsmittelgemisch, welches sehr nahe an physiologische Bedingungen heranreicht. Die Ergebnisse weichen jedoch nicht erheblich von den in dieser Arbeit erhaltenen ab.^[34] Die CD-Effekte von natürlichem Neofrapeptin F fallen gegenüber dem synthetischen **63** zwar geringer aus, jedoch ändern sich anscheinend die vorhandenen Sekundärstruktur motive nicht durch Erhöhung des Wasseranteils.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Neofrapeptine eine ausgeprägtere Tendenz zur Bildung von stabilen 3_{10} -helikalen Sekundärstrukturen zeigen als die Efrapeptine, diese unter physiologischen Bedingungen zwar geschwächt werden, aber dennoch weitgehend erhalten bleiben. Zwar können mit Hilfe der CD-Spektroskopie nicht sämtliche in den untersuchten Neofrapeptinen vorhandene Sekundärstruktur motive detailliert beschrieben werden, jedoch ist es anhand der erhaltenen CD-Spektren möglich, eine Abgrenzung zu den Efrapeptinen auf gesamt molekularer Ebene zu erhalten. Weitere ergänzende Konformationsstudien mit Hilfe der NMR-Spektroskopie sollten Aufschluss über einzelne Sekundärstruktur motive auf molekularer Ebene geben. Die mit Hilfe der CD-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse liefern daher gute Hinweise, die weitere Untersuchungen besonders interessant erscheinen lassen.

4.3.3 Untersuchungen zur ATPase-Inhibierung

Wie die Efrapeptine D–G **42–45** wurden auch die synthetisierten Neofrapeptine A **60** und F **63** und das Neofrapeptin F-Analogon **66** auf ihre biologische Aktivität untersucht.

Beim Vergleich der erhaltenen Werte fällt deutlich auf, dass sie um etwa 10 μ M niedriger als die Werte der Efrapeptine D–G **42–45** liegen (Tab. 4.8). Während die Werte der Efrapeptine D–G **42–45** untereinander nur recht geringen Abweichungen unterworfen

sind, zeigen die untersuchten Neofrapeptide eine deutlich höhere Aktivität gegenüber der F_1 -ATPase aus *E. coli*.

Diese Beobachtung korreliert wiederum recht gut mit den Daten aus den gemessenen CD-Spektren. Da der 3_{10} -helikale Anteil an der Sekundärstruktur der synthetischen Neofrapeptide hoch ausfällt, ist eine hohe biologische Aktivität zu erwarten. Dies wird im Experiment bestätigt. Interessant ist zudem die Beobachtung, dass gerade das Analogon **66** eine höhere biologische Aktivität aufweist als die natürlich vorkommenden Vertreter **60** und **63**. Vermutlich ist dies auf den Einbau der natürlich nicht vorkommenden Aminosäure *cis*- β -Methyl-L-prolin zurückzuführen.

Tabelle 4.8: Vergleich der IC_{50} -Werte der synthetisierten Neofrapeptide A **60** und F **63** und dem Neofrapeptin F-Analogon **66** (F_1 -ATPase aus *E. coli*)

Neofrapeptin	IC_{50} [μ M]
A 60	11.4
F 63	12.1
F-Analogon 66	8.8

Mit den synthetischen Neofrapeptinen A **60** und F **63** und dem Neofrapeptin F-Analogon **66** stehen drei interessante Vertreter der Efrapeptide zur Verfügung, deren weitere Untersuchung viel versprechende Ergebnisse erwarten lässt. Insbesondere weitere Konformationsstudien, sowie biologische Untersuchungen an weiteren Testsystemen lassen wichtige Beiträge zu Abschätzung des Potenzials dieser Peptaibiotika erhoffen.

4.4 Efrapeptin C-Analogon mit einer von DBU abgeleiteten Kopfgruppe 69

Efrapeptin C ist ein potenter Inhibitor der mitochondrialen ATPase. Wie in Kapitel 2.2.2 ausführlich beschrieben, lagert sich Efrapeptin C in eine zentrale Kavität zwischen den α - und β -Untereinheiten ein, die durch die γ -Untereinheit flankiert wird (Abb. 4.39).^[120] Dadurch wird die Rotation der γ -Einheit und damit die für die ATP-Synthese notwendige Konformationsänderung der α - und β -Untereinheiten gestört, was die Umsetzung von ADP und anorganischem Phosphat zu ATP unmöglich macht.

Die überwiegende Zahl der Wechselwirkungen zwischen Efrapeptin C und der F_1 -ATPase ist hydrophober Natur, verteilt über das gesamte Efrapeptin-Molekül.^[33] Nachdem von Jost *et al.* bereits der Einfluss von Veränderungen in der zentralen Teilsequenz

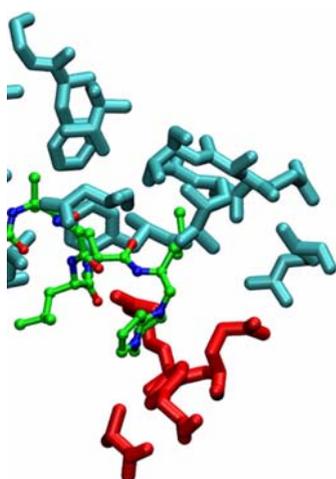


Abbildung 4.39: Kristallstruktur des Bereichs um die Kopfgruppe von Efrapeptin C zusammen mit der F_1 -ATPase (erstellt aus PDB-Daten mit MolScript)^[97,119]

räumliche Anspruch der Kopfgruppe größer, so dass der Einfluss auf konformationelle sowie inhibitorische Eigenschaften untersucht werden kann.

Leu⁶- β Ala⁷-Gly⁸ auf die inhibitorischen Fähigkeiten von Efrapeptin C untersucht wurde,^[216] ist nun von Interesse, welchen Einfluss die Kopfgruppe auf die inhibitorischen Eigenschaften hat. Obwohl die Kopfgruppe eine positive Ladung trägt, geht aus der Röntgenstruktur von Efrapeptin C zusammen mit dem ATPase-Komplex an dieser Stelle keinerlei ionische Wechselwirkung mit einer negativ geladenen Gruppe (z. B. einem Aspartat-Rest) im Enzym hervor. Dennoch ist es interessant, ob die Größe der Kopfgruppe bei der Bindung eine Rolle spielt. Daher wurde ein Efrapeptin C-Analogon synthetisiert, welches eine von DBU abgeleitete Kopfgruppe trägt. Die zwei zusätzlichen Ringatome vergrößern den Fünfring in DBN zum Siebenring in DBU. Dadurch wird der

4.4.1 Synthese

Die Synthese des Efrapeptin C-Analogons mit einer von DBU abgeleiteten Kopfgruppe 69 verläuft analog zu den bereits in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Methoden. Das Gesamtmolekül wurde in drei Fragmente zerlegt, welche zunächst einzeln synthetisiert und anschließend durch Fragmentkondensationen zusammengefügt wurden. Anders als bei den Efrapeptinen D–G 42–45 und den Neofrapeptinen 60, 63 und 66 enthält das Analogon 69 kein L-Isovalin, weshalb dieselben Schnittstellen verwendet werden konnten wie von Jost *et al.* für Efrapeptin C.^[46,47]

Als *N*-terminales Fragment diente das in Kapitel 4.2.1 bereits beschriebene Peptid Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH 48. Die Synthese erfolgte wie in Abbildung 4.27 auf Seite 68 dargestellt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz.

Das mittlere Fragment ist gegenüber den bei den Efrapeptinen D–G 42–45 verwendeten um die beiden *C*-terminalen Aminosäuren verkürzt und unterscheidet sich kaum von dem Peptid, welches bereits für die Synthese von Efrapeptin C verwendet wurde.^[46,47] Lediglich die *N*-terminale Z-Schutzgruppe wurde aus den in Kapitel 4.2.1 ge-

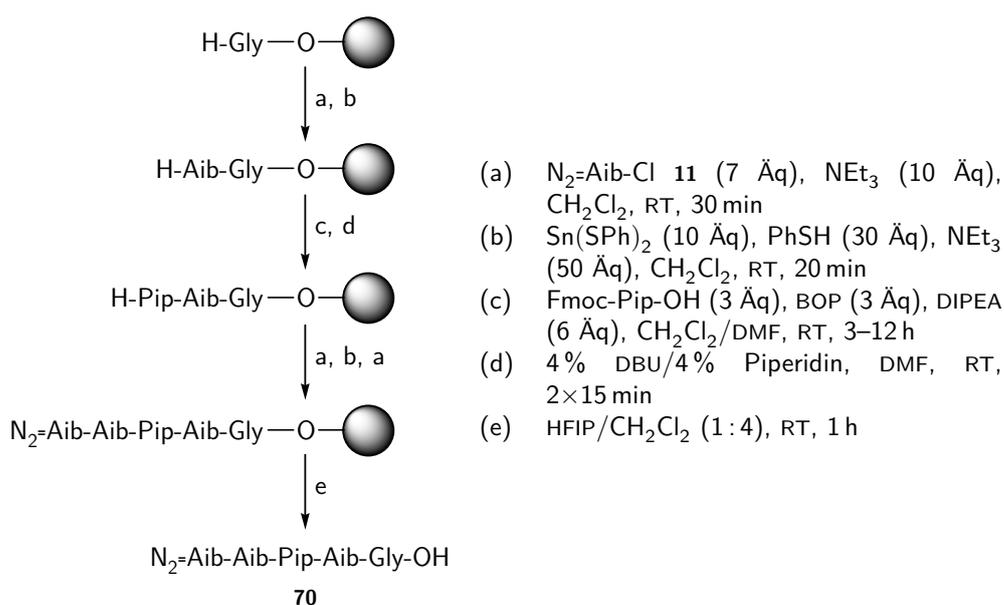


Abbildung 4.40: Synthese des mittleren Fragments **70**, Ausbeute: 33 %

nannten Gründen gegen eine Azidogruppe ausgetauscht. Während Fmoc-Pipecolinsäure mit Hilfe von BOP als Kupplungsreagenz eingeführt wurde, kam bei den Aib-Resten die Azidosäurechloridmethode unter Verwendung von α -Azidoisobuttersäurechlorid **11** mit anschließender Reduktion der Azidogruppe durch das Vilarrasa-Reagenz zum Einsatz. Auf diese Weise konnte das mittlere Fragment nach RP-HPLC in einer Ausbeute von 33 % isoliert werden, was eine Verdreifachung der von Jost^[90] für das Z-geschützte Fragment erreichten Ausbeute bedeutet (Abb. 4.40).

Der wesentliche Unterschied zu den bereits für die Efrapeptine D–G **42–45** und die Neofrapeptine **60**, **63** und **66** vorgestellten Vorgehensweisen ist die Synthese der von DBU anstelle von DBN abgeleiteten Kopfgruppe. Teile der Synthese waren bereits von Jost begonnen worden.^[90]

Wie bei der in Efrapeptin C vorkommenden Kopfgruppe wurde zunächst die Aminogruppe in L-Leucin **50** mit einer Boc-Schutzgruppe versehen und die Carboxylfunktion zum Alkohol reduziert. Ebenso wurde anschließend die Hydroxyfunktion in das entsprechende Iodid überführt, um eine geeignete Abgangsgruppe für die folgende *N*-Alkylierung in das Molekül einzubringen.

Im nächsten Schritt wurde anstelle von DBN das zwei Ringatome mehr umfassende DBU mit dem Iodid **54** alkyliert und das Amidiniumsalz **71** erhalten. Nach Abspalten

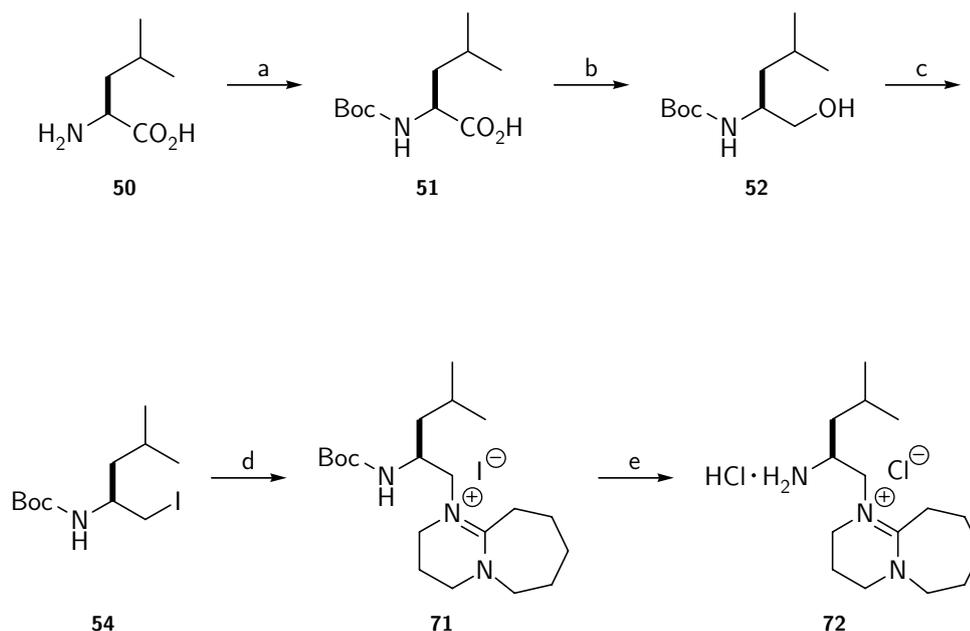


Abbildung 4.41: Synthese der Kopfgruppe 72: (a) Di-*tert*-butyldicarbonat, NaOH, H₂O/Dioxan, 0 °C → RT, über Nacht, 97 %; (b) 1. ClCOOEt, DIPEA, THF, 0 °C; 2. NaBH₄, H₂O, -15 °C → RT, 2.5 h, 55 %; (c) PPh₃, Imidazol, I₂, CH₂Cl₂, RT, 1.5 h, 51 %; (d) DBU, Toluol, Rückfluss, 1 h, 77 %; (e) HCl, H₂O, 0 °C, 30 min, quantitativ

der Boc-Schutzgruppe mit Hilfe von HCl (25 %) ist die Aminogruppe frei, so dass eine Kupplung mit einer Carboxylfunktion erfolgen kann (Abb. 4.41).

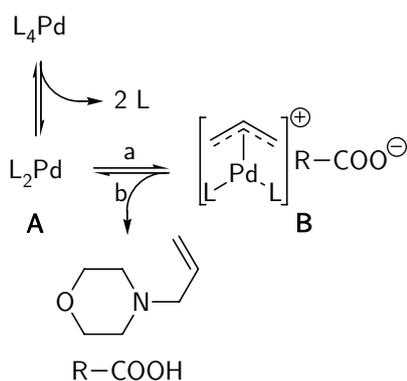


Abbildung 4.42: Mechanismus der Pd⁰-katalysierten Allylesterspaltung: (a) R-CO₂All (R = C(CH₃)₂-NH₂); (b) Morpholin

Die Synthese des Dipeptids Boc-Leu-Aib-OH **75** wurde von Jost *et al.* beschrieben und soll an dieser Stelle kurz vorgestellt werden (Abb. 4.43).^[46,47] Demnach wird von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-leucin **51** und α -Aminoisobuttersäure **9** ausgegangen. Letztere wird durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas und Erhitzen in Allylalkohol in α -Aminoisobuttersäureallylester **73** überführt und damit *C*-terminal geschützt. Die Kupplung der beiden Aminosäuren erfolgt glatt innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur unter Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz.

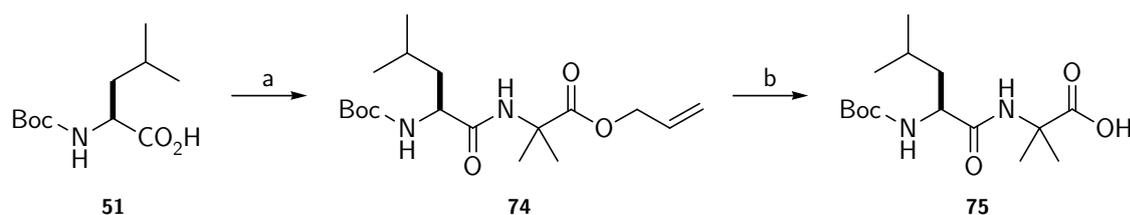


Abbildung 4.43: Synthese des Dipeptids Boc-Leu-Aib-OH **75**:^[90] (a) H-Aib-OAll **73**, PyBOP, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 1 h, 80 %; (b) Pd(PPh₃)₄, Morpholin, THF, 40 °C, 2 h, 53 %

Als letzter Schritt erfolgt die Entschützung der Carboxylfunktion. Dabei wird der Allylrest Palladium-katalysiert auf Morpholin übertragen, indem zunächst in einer oxidativen Addition des Allylesters an ein koordinativ ungesättigtes Pd⁰-Zentrum der kationische Palladium-Allylkomplex **B** gebildet wird, welcher anschließend den Allylrest auf das Nukleophil Morpholin überträgt und dabei selbst zu **A** regeneriert wird (Abb. 4.42).^[230]

Die Kupplung des Dipeptids Boc-Leu-Aib-OH **75** an die freie Aminogruppe des Amidiniumsalzes **72** erfolgt mit Hilfe von *N*-HATU, da sich am *C*-terminalen Ende der Carboxykomponente ein Aib-Rest befindet. Die Carboxykomponente wurde in geringem Überschuss eingesetzt, damit die Reaktion problemlos über das Verschwinden des im MALDI-TOF-Massenspektrum gut nachweisbaren Amidiniumsalzes **72** verfolgt werden kann. Nach erfolgreicher Reaktion kann das Boc-geschützte Kondensationsprodukt direkt mit TFA behandelt und das *C*-terminale Fragment **77** des Efrapeptin *C*-Analogons **69** nach RP-HPLC in einer Ausbeute von 10 % isoliert werden (Abb. 4.44).

Das vollständige Peptid konnte durch Segmentkondensationen aus den Peptidfragmenten TFA·H-Leu-Aib-Y **77**, N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH **70** und Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-

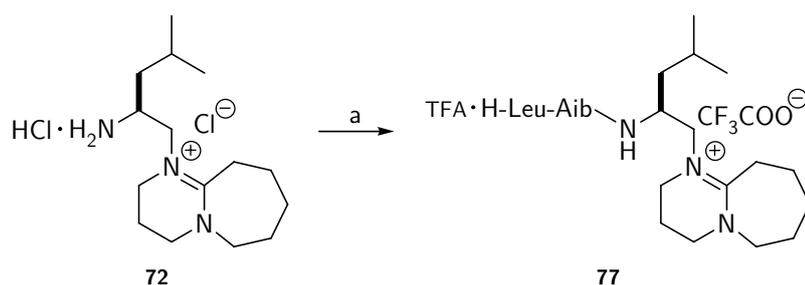


Abbildung 4.44: Synthese des *C*-terminalen Fragments **77**: (a) 1. Boc-Leu-Aib-OH **75**, *N*-HATU, DIPEA, DMF/CH₂Cl₂, 0 °C → RT, über Nacht; 2. TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 30 min; 3. RP-HPLC, 10 %

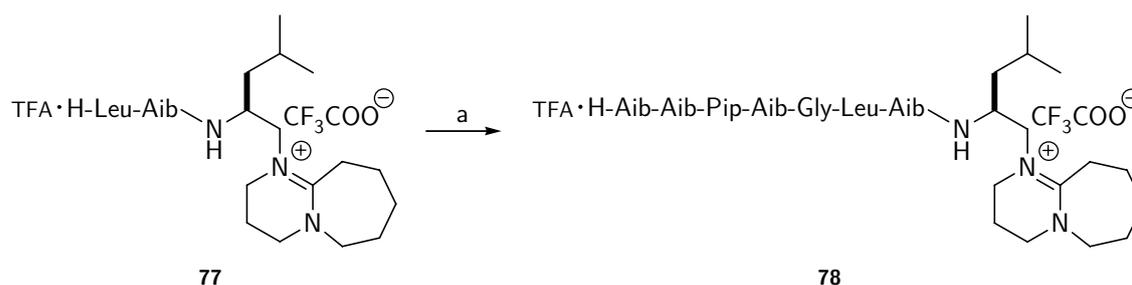


Abbildung 4.45: Synthese der C-terminalen Hälfte **78**: (a) 1. $\text{N}_2\text{-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH}$ **70**, *N*-HATU, HOAt, DIPEA, DMF/ CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, über Nacht; 2. $\text{H}_2\text{-Pd/C}$, MeOH, RT, 1 h; 3. RP-HPLC, 22 %

Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **48** erhalten werden. Zunächst wurden das mittlere Fragment **70** und das die von DBU abgeleitete Kopfgruppe enthaltende C-terminale Fragment **77** mit Hilfe von *N*-HATU und HOAt kondensiert. Der Reaktionsverlauf kann wiederum gut durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie am Verschwinden der Aminokomponente, dem Amidiniumsalz **77**, verfolgt werden. Um das N-terminale Ende des Kupplungsprodukts in die freie Aminogruppe zu überführen, wurde die Azidogruppe Palladium-katalysiert hydriert und die C-terminale Hälfte **78** nach kurzer Reaktionszeit erhalten (Abb. 4.45). Das Produkt konnte anschließend HPL-chromatographisch in 22 % Ausbeute isoliert werden.

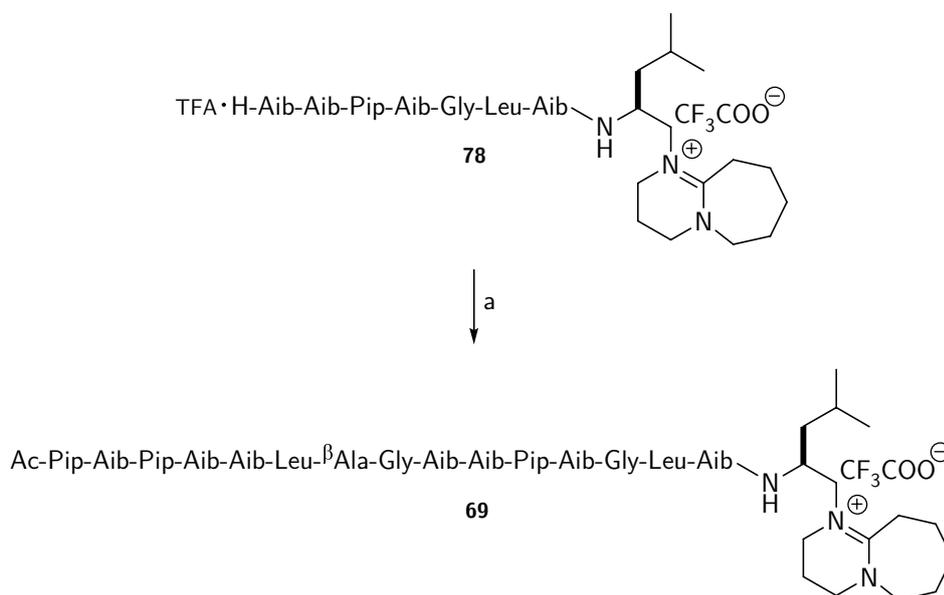


Abbildung 4.46: Synthese des Efrapeptin C-Analogs **69**: (a) 1. Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **48**, *N*-HATU, HOAt, DMF/ CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$; 2. RP-HPLC, 55 %

Die Kupplung der *C*-terminalen Hälfte **78** mit dem *N*-terminalen Fragment **48** erfolgte erneut mit *N*-HATU und HOAt als Kupplungsreagenzien und ergab nach RP-HPLC das Efrapeptin C-Analogon **69** in einer Ausbeute von 55 % (Abb. 4.46).

Das ^1H -NMR-Spektrum von **69**, welches in Abbildung 4.47 gezeigt ist, enthält nahezu dieselben Signale, wie sie bei Efrapeptin C zu finden sind. Lediglich im Bereich zwischen 2.0 ppm und 3.5 ppm, in welchem u. a. die Siebenring-Methylenprotonen resonieren, können anhand der Integrale vier zusätzliche Protonen gegenüber dem Naturstoff ausgemacht werden. Die in Tabelle 4.9 dargestellten mittels ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie ermittelten Massen belegen den Syntheserfolg zusätzlich.

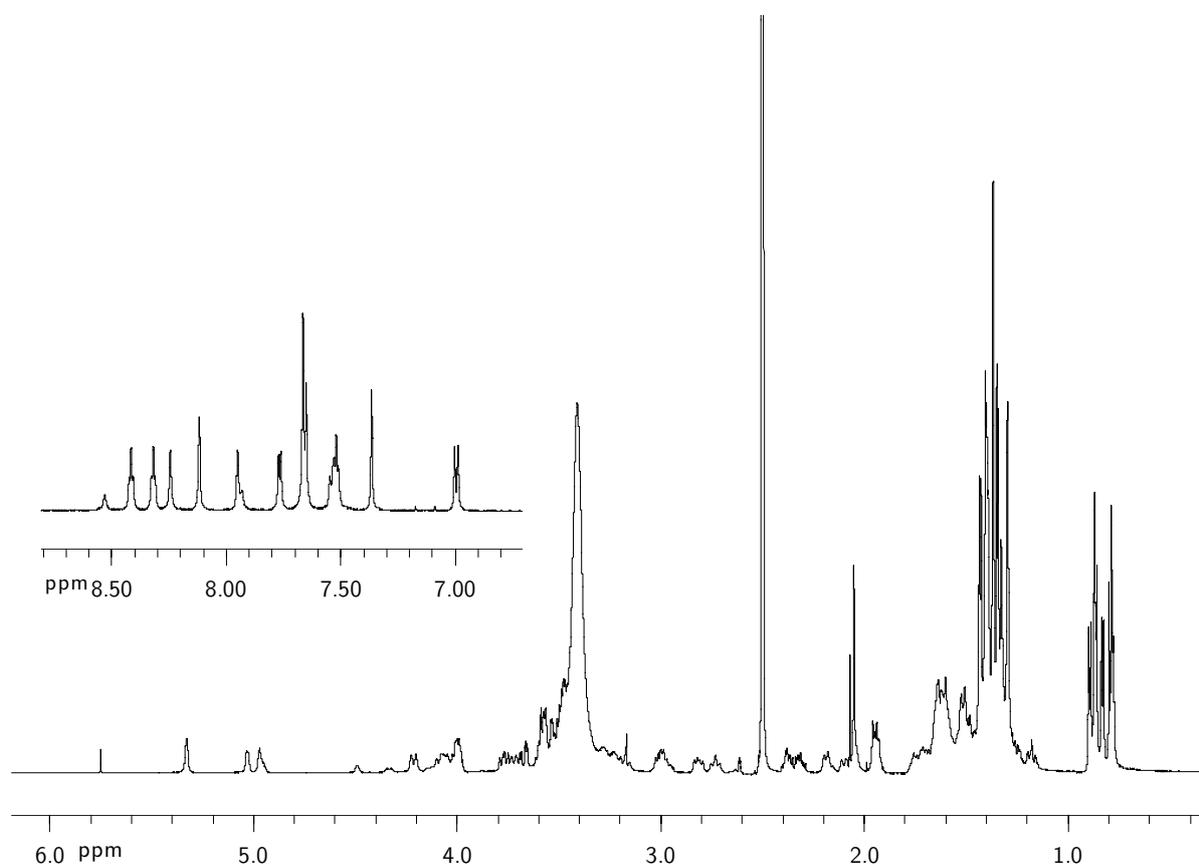


Abbildung 4.47: ^1H -NMR-Spektrum des Efrapeptin C-Analogons **69**

Mit dem Efrapeptin C-Analogon **69** steht eine interessante Variation des Naturstoffs zur Verfügung, die Untersuchungen zum Einfluss der *C*-terminalen kationischen Kopfgruppe auf konformationelle und biologische Eigenschaften erlaubt.

Tabelle 4.9: Vergleich der gemessenen mit den berechneten monoisotopischen Massen des Efrapeptin C-Analogons 69

Efrapeptin	Monoisotopische Masse		für ein Ion der Zusammensetzung	Abweichung [ppm]
	gemessen	berechnet		
C-Analogon 69	828.53249	828.53298	$[^{12}\text{C}_{82} \ ^1\text{H}_{141} \ ^{14}\text{N}_{18} \ ^{16}\text{O}_{16} \ ^{23}\text{Na}]^{2+}$	0.59

4.4.2 CD-spektroskopische Untersuchungen

Wie bereits bei den Efrapeptinen D–G 42–45 wurde die Konformation auch bei dem Efrapeptin C-Analogon 69 mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht.

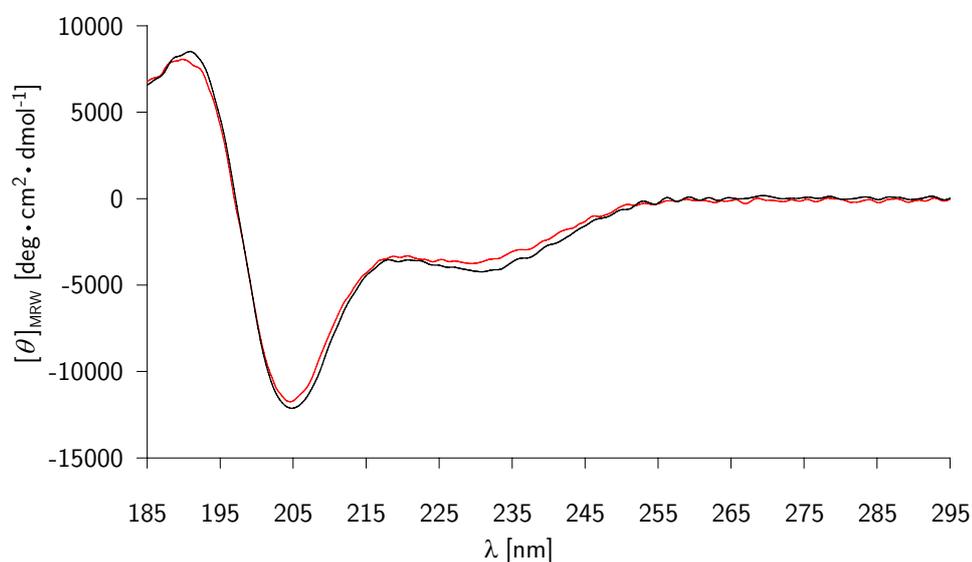


Abbildung 4.48: CD-Spektrum des Efrapeptin C-Analogons mit einer von DBU abgeleiteten Kopfgruppe 69 (schwarz) im Vergleich mit dem CD-Spektrum von Efrapeptin C (rot)

Es ist von Interesse, welchen Einfluss der gegenüber dem Naturstoff vergrößerte Ring in der Kopfgruppe auf die vorhandenen Sekundärstrukturmotive hat. Durch zwei zusätzliche Ringatome wird die Größe der Kopfgruppe erhöht, jedoch kann sich ein Siebenring auch flexibler an vorhandene stabile Strukturen anpassen und diesen gegebenenfalls ausweichen, als dies bei einem Fünfring der Fall ist. Auch ist es denkbar, dass durch einen voluminöseren Rest vorhandene Sekundärstrukturen stabilisiert werden. In Lösung sind geringe konformationelle Änderungen zu erwarten. Zum einen verleiht Gly¹³ dem ₃₁₀-helikalen Bereich zwischen Aib⁹ und Aib¹⁵ zwar eine gewisse Flexibili-

tät, zum anderen kann sich die Kopfgruppe jedoch auch dem helikalen Bereich nähern und dadurch die vorhandene Struktur beeinflussen. Diese Hypothesen werden durch die von Huber durchgeführten NMR-Experimente mit anschließenden moleküldynamischen Rechnungen gestützt.^[33]

Tabelle 4.10: Vergleich des Verhältnisses R der Elliptizitäten bei 230 nm und 205 nm und der CD-Effekte des Efraeptin C-Analogons **69** und Efraeptin C ($[\theta]_{\text{MRW}}$ in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)

Efraeptin	$[\theta]_{205} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{230} \cdot 10^{-3}$	$R \frac{\theta_{230}}{\theta_{205}}$
C	-12.1	-4.2	0.35
Analogon 69	-11.7	-3.8	0.32

In Abbildung 4.48 ist das CD-Spektrum des Efraeptin C-Analogons **69** im Vergleich zum CD-Spektrum des synthetischen Efraeptin C dargestellt. Es ist leicht erkennbar, dass sich die CD-Spektren weder in der Intensität der CD-Effekte, noch im Verhältnis R der Banden bei 230 nm und 205 nm, welches Aussagen über die Art der vorhandenen Helix zulässt, wesentlich voneinander unterscheiden (Tab. 4.10). Die größere Kopfgruppe in **69** führt wie zu erwarten demnach nicht zu einer wesentlichen Veränderung der helikalen Struktur, die CD-spektroskopisch detektierbar wäre. Es findet weder eine nennenswerte Stabilisierung noch eine Destabilisierung im 3_{10} -helikalen Bereich zwischen Aib⁹ und Aib¹⁵ statt. Auf die 3_{10} -Helix zwischen Pip¹ und Aib⁵ sollte die Kopfgruppe ebenfalls keinerlei Einfluss haben.

4.4.3 Untersuchungen zur ATPase-Inhibierung

Zwar sind die strukturgebenden Eigenschaften der Kopfgruppe auf die Gesamtstruktur ohne größere Bedeutung, jedoch beziehen sich diese Ergebnisse nur auf das in TFE gelöste Efraeptin-Molekül. Eine andere Frage ist der Einfluss der Kopfgruppe auf die biologische Aktivität. Diese hängt zwar wesentlich mit der Sekundärstruktur im Bereich der helikalen Bereiche und der flexiblen mittleren Region zusammen, wird jedoch auch von anderen Faktoren beeinflusst.

Diese können beispielsweise das Vorhandensein von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptid und Enzymkomplex, die Lage und Stabilität von Sekundärstrukturmotiven oder die Größe bestimmter Gruppen im Peptid sein. Aus der Kristallstruktur von Efraeptin C im Komplex mit der F₁-ATPase geht hervor, dass im Bereich der Kopfgruppe ausreichend Raum für zwei weitere Methylengruppen innerhalb der DBU-Einheit

vorhanden sein sollte (vgl. Abb. 4.39 auf Seite 88). Dennoch ist mit einer geringen Abnahme der biologischen Aktivität zu rechnen, da die Vergrößerung der Kopfgruppe eine Einlagerung in den ATPase-Komplex zumindest erschweren sollte.

Tabelle 4.11: Vergleich der IC_{50} -Werte von natürlichem und synthetischem Efrapeptin C und dem synthetisierten Efrapeptin C-Analagon **69** (F_1 -ATPase aus *E. coli*)

Efrapeptin	IC_{50} [μ M]
C (synthetisch)	19.9
Analagon 69	25.5

Tabelle 4.11 zeigt die IC_{50} -Werte von synthetischem Efrapeptin C und dem Efrapeptin C-Analagon **69**. Die Größenordnung der Werte stimmt gut überein, dennoch sind leichte Unterschiede auszumachen. Es ist anzunehmen, dass nicht nur die Art und die Stabilität der helikalen Bereiche in der Peptidsequenz eine Rolle bei der inhibitorischen Wirkung der Efrapeptide auf die F_1 -ATPase spielt. Zusätzlich beeinflusst auch die Größe der Kopfgruppe die für eine Inhibierung benötigte Peptidkonzentration, wenn auch nur mit weniger signifikanter Ausprägung.

4.5 Isotopenmarkierte Efrapeptin C-Analoga 79–82 als Hilfsmittel für die Konformationsanalyse

In Kapitel 2.4.1 wurden Möglichkeiten der Konformationsanalyse in Verbindung mit gezielter Isotopenmarkierung von Peptiden und Proteinen aufgeführt. Die Idee, bestimmte NMR-Signale durch Verwendung eines isotopenmarkierten Aminosäurebausteins zu unterdrücken, scheint ein viel versprechender Weg zur Strukturaufklärung von Efrapeptin C. Wichtig für den Erfolg dieser Methode sind Überlegungen, welche Signale gezielt unterdrückt werden sollen und an welchen Stellen daher der isotopenmarkierte Baustein in die Aminosäuresequenz eingebaut werden soll.

4.5.1 Überlegungen zum gezielten Einbau von D_6 Aib-OH **6**

Efrapeptin C enthält insgesamt fünfzehn Aminosäuren, eine Acetylfunktion am *N*-Terminus und eine von Leucinol und DBN abgeleitete kationische Kopfgruppe. Sieben der fünfzehn Aminosäuren sind Aib-Reste, hinzu kommen außerdem drei Pip-Reste.

Die übrigen fünf Aminosäuren sind die proteinogenen Aminosäuren Glycin und Leucin und die β -Aminosäure β -Alanin.^[95,96]

Bei der NMR-gestützten Konformationsanalyse von Efrapeptin C existieren einige grundlegende Probleme, die in der Art der Aminosäuren, dem hohen Aib-Anteil und der Sequenz der Aminosäuren begründet sind. Um die Probleme zu verstehen, ist es sinnvoll die allgemeine Vorgehensweise bei der NMR-gestützten Konformationsanalyse und der Zuordnung der einzelnen Resonanzsignale genauer zu betrachten.

Da keine NMR-Pulssequenz existiert, mit der sich gleichzeitig sämtliche Kerndipole zuordnen lassen, wird eine Reihe von NMR-Experimenten durchgeführt (vgl. Kapitel 2.4.1), die durch Kombination sehr detaillierte Einblicke auf molekularer Ebene des Peptids zulässt. Auf diese Weise können die Aminosäuresequenz eines Peptids oder auch Proteins bestimmt und Sekundärstrukturen identifiziert werden.^[231]

Die Analyse beginnt zumeist anhand von COSY- und TOCSY-Spektren, mit deren Hilfe eine Zuordnung der ^1H -Spinsysteme ermöglicht wird. Anhand der COSY können Korrelationen skalar koppelter Atomkerne an benachbarten Kohlenstoffatomen gefunden werden. Dies können beispielsweise ein α -Proton im Peptidrückgrat und β -Protonen in den Seitenketten sein. Die TOCSY wiederum kann zusätzliche Informationen liefern, die Fernkopplungen innerhalb desselben Spinsystems einschließen (nJ mit $n \geq 3$). In Verbindung mit HSQC- und HMQC-Experimenten können zudem heteronukleare Korrelationen (z. B. $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$, $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ oder auch $^{31}\text{P}, ^1\text{H}$) erhalten werden. Dies können beispielsweise Korrelationen zwischen H^{N} und ^{15}N oder H^{α} und C^{α} sein. Auf diese Weise können gewöhnlich die einzelnen im Peptid enthaltenen Aminosäuren bestimmt und sämtliche Resonanzfrequenzen mit Ausnahme der Carbonylfunktionen zugeordnet werden.

Ist es möglich, die einzelnen Aminosäuren zu identifizieren, fehlen jedoch noch Informationen über die exakte Sequenz. Die einfache Sequenzanalyse bedient sich auch des HMBC-Experiments, über welches heteronukleare Korrelationen detektiert werden können (nJ mit $n > 0$, wobei 1J -Kopplungen durch einen *low pass*-Filter unterdrückt werden).

Neben den oben erwähnten Experimenten, die lediglich skalare Kopplungen detektieren, sind für die Sequenzanalyse außerdem Experimente hilfreich, die die Detektion dipolarer Kopplungen zulassen. Hierbei werden mit Hilfe von NOESY-, ROESY- und HOESY-Spektren wertvolle Informationen über räumlich benachbarte, jedoch nicht direkt über Bindungen verbrückte Gruppen, erhalten.

Die Zuordnung beginnt gewöhnlich am *C*-Terminus und arbeitet sich zum *N*-Terminus entlang der Aminosäuresequenz vor. Eine Analyse ausgehend von den Signalen der Amidprotonen bietet sich bei einem Peptid wie Efrapeptin C besonders an. Von den fünfzehn Aminosäuren besitzen nur zwölf ein Amidproton, da die zyklische Pipecolinsäure bereits zwei Alkylreste am Stickstoffatom trägt. Die Signale der Amidprotonen sind gut von anderen Signalen separiert, so dass hier ein Einstieg in die Zuordnung leicht erscheint. Fehlen jedoch abwechselnd wie bei Aib¹⁰-Pip¹¹-Aib¹² die α - und Amidprotonen, wird eine exakte Zuordnung über Korrelationssignale schwierig, da keine Kopplungen und damit Magnetisierungstransfers mehr auftreten können. Sollen zusätzlich durch NOE-Spektren auch noch Abstände zwischen Aib-Methylprotonen und anderen im Peptid vorhandenen Kerndipolen bestimmt werden, scheitert dieses Vorhaben an der unbestimmten Zuordnung. Eine exakte Konformationsanalyse ist daher gerade bei Aib-reichen Peptiden, wie es die Efrapeptine sind, extrem schwierig.

Eine Hilfe kann daher der gezielte Austausch bestimmter Aib-Methylprotonen gegen Deuterium sein, wodurch in sämtlichen ¹H-NMR-Spektren die entsprechenden Signale entfallen und ausschließlich die nicht-deutertierten vorliegenden Aib-Methylgruppen resonieren. Eine exakte Zuordnung der verbleibenden Signale sollte auf diese Weise gut möglich sein.

Insgesamt wurden vier verschiedene isotopenmarkierte Sequenzen synthetisiert. Die Sequenz **79** enthält zwei nicht-deutertierte vorliegende Aib-Reste, die Sequenzen **80**, **81** und **82** enthalten jeweils nur einen nicht-deutertierten Aib-Rest (Tab. 4.12).

Die nicht-deutertierten Aib-Reste treten im ¹H-NMR-Spektrum jeweils als zwei Singuletts im Bereich zwischen 1.4 ppm und 1.6 ppm in Resonanz, während die übrigen entsprechend ihrem Deuterierungsgrad keine oder nur geringe Resonanzen in diesem Bereich zeigen. Durch die Platzierung dieser Reste ist es möglich genauere Informationen über bestimmte Bereiche des Peptids zu erhalten.

Tabelle 4.12: Vergleich der Aminosäuresequenzen der isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analoga **79**, **80**, **81** und **82**

Ac-Pip- Aib -Pip- ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Leu- β Ala-Gly- ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib-Gly-Leu- Aib -X	79
Ac-Pip- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib- Aib -Leu- β Ala-Gly- ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib-Gly-Leu- ^D ₆ Aib-X	80
Ac-Pip- ^D ₆ Aib-Pip- Aib - ^D ₆ Aib-Leu- β Ala-Gly- ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib-Gly-Leu- ^D ₆ Aib-X	81
Ac-Pip- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Leu- β Ala-Gly- ^D ₆ Aib- Aib -Pip- ^D ₆ Aib-Gly-Leu- ^D ₆ Aib-X	82

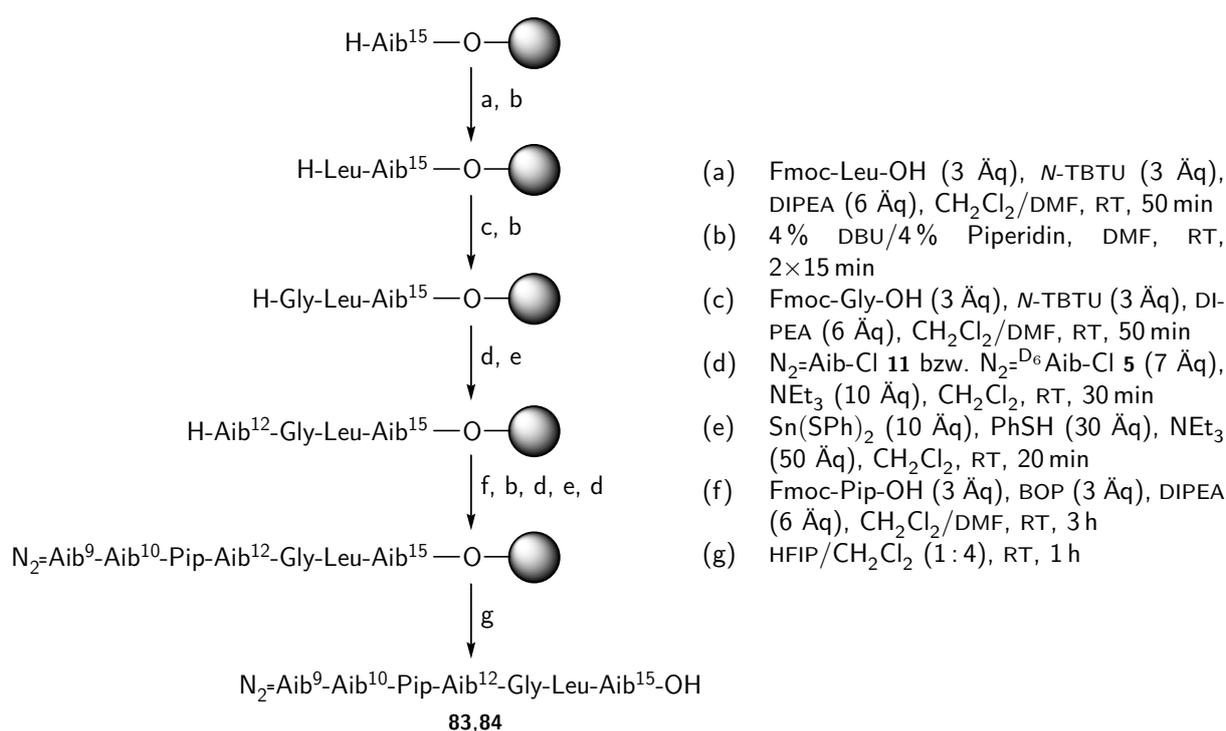
- Sequenz **79** liefert Informationen über den Beginn des *N*-terminalen 3_{10} -helikalen Bereichs zwischen Pip¹ und Aib⁵ und das Ende des *C*-terminalen 3_{10} -helikalen Bereichs zwischen Aib⁹ und Aib¹⁵.
- Sequenz **80** lässt Aussagen über das Ende des *N*-terminalen 3_{10} -helikalen Bereichs zwischen Pip¹ und Aib⁵ und den flexiblen mittleren Bereich zwischen Leu⁶ und Gly⁸ zu.
- Sequenz **81** ermöglicht eine genauere Bestimmung der 3_{10} helikalen Struktur zwischen Pip¹ und Aib⁵.
- Sequenz **82** wiederum ermöglicht eine exaktere Analyse der 3_{10} helikalen Struktur zwischen Aib⁹ und Aib¹⁵.

Insgesamt sollte sich auf diese Weise ein detaillierter Einblick in die gesamte Aminosäuresequenz von Efraeptin C ergeben, welcher es ermöglicht, die Signale in den NMR-Spektren den einzelnen Aminosäureresten zuzuordnen, die vorhandenen Sekundärstrukturelemente genauer zu analysieren und mit Hilfe der Konformationsanalyse die dreidimensionale Gesamtstruktur von Efraeptin C zu berechnen.

4.5.2 Synthese

Die Synthese der isotopenmarkierten Efraeptin C-Analoga **79–82** erfolgte analog zu der Synthese von Efraeptin C^[46,47] und der Efraeptine D–G **42–45** (vgl. Kapitel 4.2.1). Als zusätzlicher Aminosäurebaustein wurde α -Azidoisobuttersäurechlorid-D₆ **5** benötigt (Synthese s. Kapitel 4.1.1), um gezielt an den Methylgruppen deuterierte Aib-Reste in die Aminosäuresequenzen einzuführen.

Die Aminosäuresequenzen wurden erneut in drei Fragmente zerlegt. Dabei wurden drei verschiedene mittlere Fragmente benötigt, wobei die Fragmente N₂=D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-OH **83** und N₂=D₆Aib-Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-OH **84** ausgehend von mit α -Aminoisobuttersäure-D₆ **6** beladenem *o*-Chlortritylharz synthetisiert wurden (Abb. 4.49), während die Synthese des Fragments N₂=D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-OH **85** von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz ausging (Abb. 4.50). Ähnlich wie bei den Efraeptinen D–G **42–45** wurden die mittleren Fragmente **83** und **84** aus den Aminosäuren 9–15 gebildet. Dies ist wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben durch die schwierige Zugänglichkeit von L-Isovalin **21** im Falle der Efraeptine D–G **42–45** bzw.



mittleres Fragment	Aib ⁹	Aib ¹⁰	Aib ¹²	Aib ¹⁵
N ₂ = ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib-Gly-Leu- ^D ₆ Aib-OH 83	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib
N ₂ = ^D ₆ Aib-Aib-Pip- ^D ₆ Aib-Gly-Leu- ^D ₆ Aib-OH 84	^D ₆ Aib	Aib	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib

Abbildung 4.49: Synthese der mittleren Fragmente **83** und **84**, Ausbeuten: 25 % (**83**), 8 % (**84**)

α -Aminoisobuttersäure-D₆ **6** im Falle der isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analoga **79–82** begründet.

Die Festphasensynthese unter Einbeziehung von ^D₆Aib¹⁵ ist im Falle der Fragmente **83** und **84** wesentlich effektiver als eine Kombination von Lösungssynthese und Festphasensynthese, wie sie von Jost *et al.* für Efrapeptin C beschrieben wurde.^[46,47]

Im Falle des isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analogons **79** liegt Aib¹⁵ jedoch nicht-deutertiert vor, so dass hier das mittlere Fragment nur die Aminosäuren Aib⁹–Gly¹³ enthält, was bei der Synthese berücksichtigt werden muss (Abb. 4.50).

Während Fmoc-Glycin und Fmoc-Pipecolinsäure mit Hilfe von *N*-TBTU bzw. BOP eingeführt wurden, kam bei den ^D₆Aib-Resten die Azidosäurechloridmethode mit α -Azidoisobuttersäurechlorid-D₆ **5** unter basischen Bedingungen zum Einsatz. Die Fmoc-Gruppe wurde durch 4% DBU/4% Piperidin abgespalten, die Azidogruppen wurden

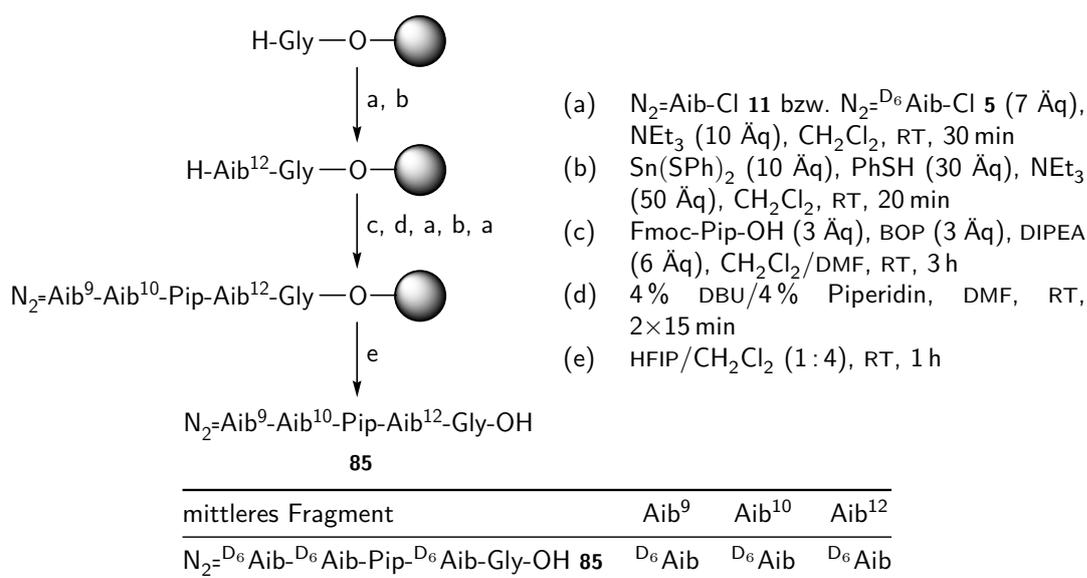
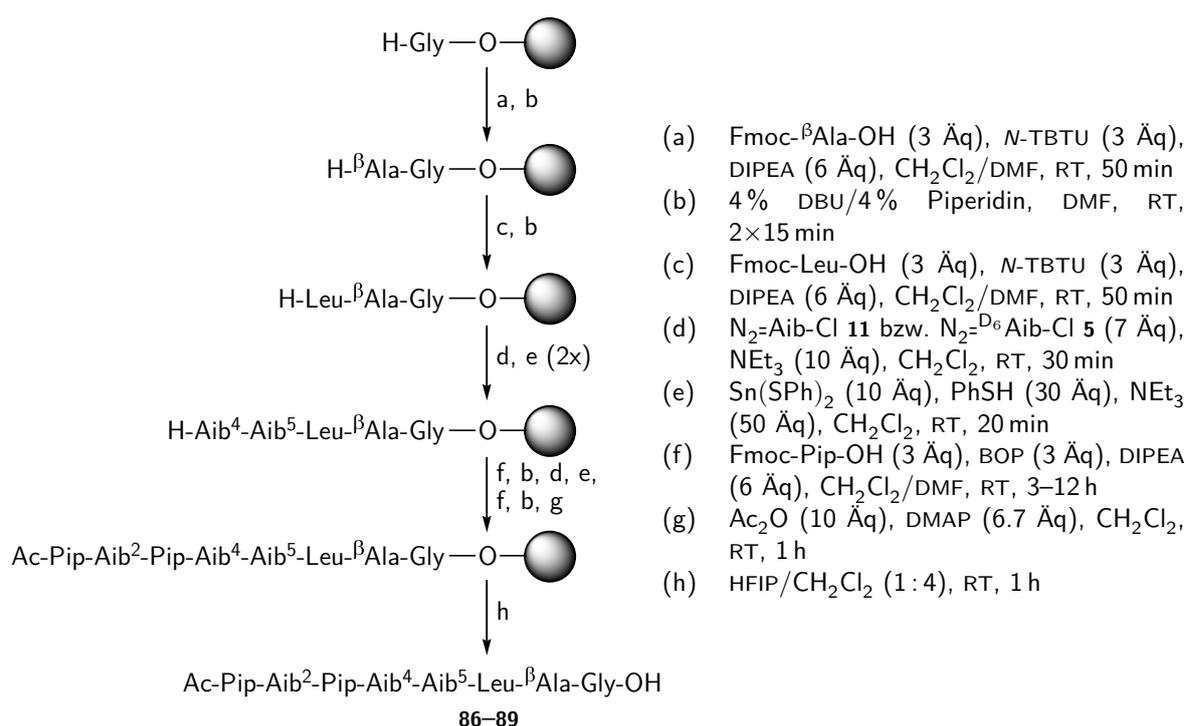


Abbildung 4.50: Synthese des isotopenmarkierten mittleren Fragments **85**, Ausbeute: 10 %

mit dem Vilarrasa-Reagenz zur Aminogruppe reduziert. Die Abspaltung der Peptidsequenzen vom polymeren Träger erfolgte mit HFIP. Die mittleren Fragmente konnten nach RP-HPLC in Ausbeuten von 10 % (**85**), 25 % (**83**) und 8 % (**84**) isoliert werden.

Die vier benötigten *N*-terminalen Fragmente $\text{Ac-Pip-Aib-Pip-}^{D_6}\text{Aib-}^{D_6}\text{Aib-Leu-}\beta\text{Ala-Gly-OH}$ **86**, $\text{Ac-Pip-}^{D_6}\text{Aib-Pip-}^{D_6}\text{Aib-Aib-Leu-}\beta\text{Ala-Gly-OH}$ **87**, $\text{Ac-Pip-}^{D_6}\text{Aib-Pip-Aib-}^{D_6}\text{Aib-Leu-}\beta\text{Ala-Gly-OH}$ **88** und $\text{Ac-Pip-}^{D_6}\text{Aib-Pip-}^{D_6}\text{Aib-}^{D_6}\text{Aib-Leu-}\beta\text{Ala-Gly-OH}$ **89** bestehen aus den Aminosäuren Pip^1 bis Gly^8 und der *N*-terminalen Acetylgruppe. Die Synthese geht von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz aus. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren β -Alanin und Leucin wurden mit *N*-TBTU als Kupplungsreagenz eingeführt, Fmoc-Pipicolinsäure mit Hilfe von BOP. Die Aib- und ^{D₆}Aib-Reste wurden über die entsprechenden Säurechloride α -Azidoisobuttersäurechlorid **11** und α -Azidoisobuttersäurechlorid-^{D₆} **5** eingebracht. Am Ende der Synthese erfolgte eine *N*-Acetylierung und die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger mit Hilfe von HFIP. Nach HPL-chromatographischer Aufreinigung wurden die *N*-terminalen Fragmente in Ausbeuten von 17 % (**86**), 7 % (**87**), 4 % (**88**) und 6 % (**89**) isoliert (Abb. 4.51).

Als *C*-terminales Fragment kam bei der Synthese der isotopenmarkierten Efrapeptin *C*-Analoga **80–82** die durch HCl (25 %) Boc-entschützte Kopfgruppe 1-[(2*S*)-2-Amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-chlorid **57** zum Einsatz. Im Falle des Analogons **79** jedoch wurde zunächst die Kopfgruppe wie



<i>N</i> -terminales Fragment	Aib ²	Aib ⁴	Aib ⁵
Ac-Pip-Aib-Pip- ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Leu-βAla-Gly-OH 86	Aib	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib
Ac-Pip- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib-Aib-Leu-βAla-Gly-OH 87	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib	Aib
Ac-Pip- ^D ₆ Aib-Pip-Aib- ^D ₆ Aib-Leu-βAla-Gly-OH 88	^D ₆ Aib	Aib	^D ₆ Aib
Ac-Pip- ^D ₆ Aib-Pip- ^D ₆ Aib- ^D ₆ Aib-Leu-βAla-Gly-OH 89	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib	^D ₆ Aib

Abbildung 4.51: Synthese der isotopenmarkierten *N*-terminalen Fragmente **86**, **87**, **88** und **89**, Ausbeuten: 17% (**86**), 7% (**87**), 4% (**88**), 6% (**89**)

bei der Synthese von Efrapeptin C selbst mit dem Dipeptid Boc-Leu-Aib-OH **75** *N*-acyliert (Abb. 4.52). Das Kupplungsprodukt **91** bildete in diesem Fall anschließend das *C*-terminale Fragment.

Die Synthese der *C*-terminalen Hälften TFA·H-^D₆Aib-^D₆Aib-Pip-^D₆Aib-Gly-Leu-Aib-X **92**, TFA·H-^D₆Aib-^D₆Aib-Pip-^D₆Aib-Gly-Leu-^D₆Aib-X **93** und TFA·H-^D₆Aib-Aib-Pip-^D₆Aib-Gly-Leu-^D₆Aib-X **94** erfolgte in Lösung mit DMF/CH₂Cl₂ als Lösungsmittel und *N*-HATU und HOAt als Kupplungsreagenzien. Die Kupplungsreaktionen können durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie am Verschwinden der Aminokomponente verfolgt werden. Der zunächst als Azid geschützte *N*-Terminus wurde durch katalytische Hydrierung in das freie Amin überführt. Nach RP-HPLC konnten die *C*-terminalen Hälften in Ausbeuten von 44% (**92**), 24% (**93**) und 49% (**94**) isoliert werden (Abb. 4.53).

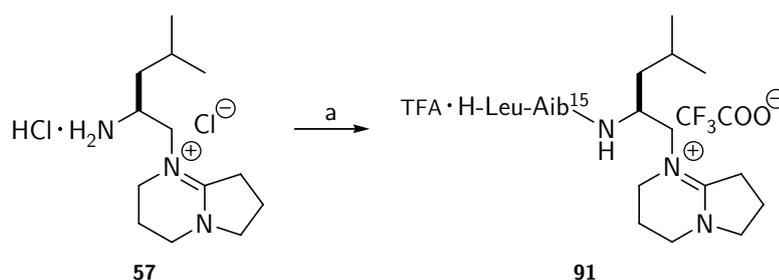
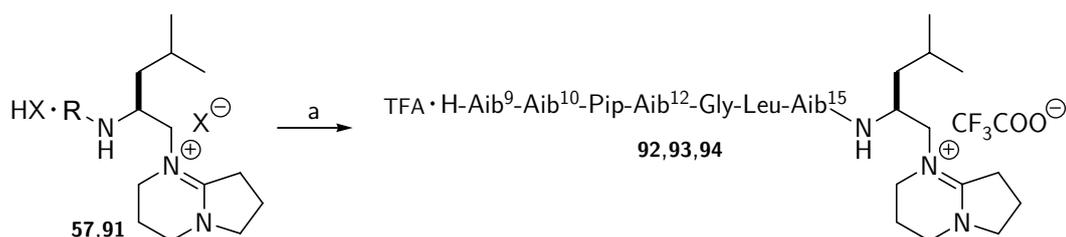


Abbildung 4.52: Synthese des C-terminalen Fragments **91**: (a) 1. Boc-Leu-Aib¹⁵-OH **75**, *N*-HATU, DIPEA, DMF/CH₂Cl₂, 0°C → RT, über Nacht; 2. TFA, CH₂Cl₂, 0°C, 30 min; 3. RP-HPLC, 47 %; (Aib¹⁵ = Aib)



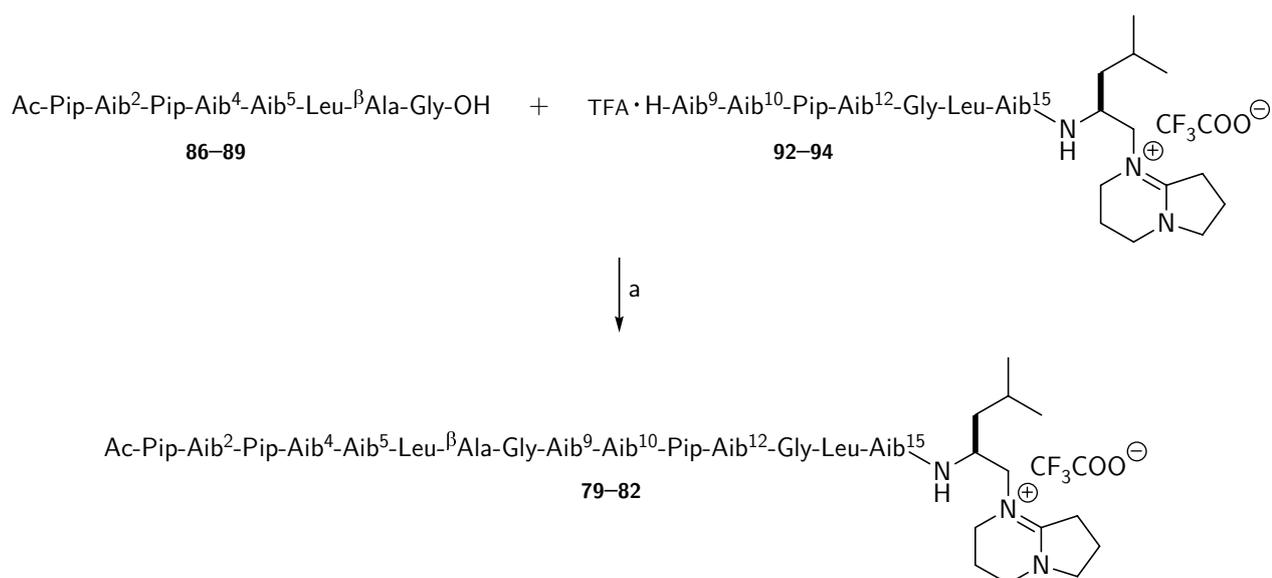
C-terminale Hälfte	mittleres Fragment	C-terminales Fragment	R	X	Aib ⁹	Aib ¹⁰	Aib ¹²	Aib ¹⁵
92	85	91	H-Leu-Aib ¹⁵	CF ₃ COO	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	Aib
93	83	57	H	Cl	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib
94	84	57	H	Cl	D ₆ Aib	Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib

Abbildung 4.53: Synthese der C-terminalen Hälften **92**, **93** und **94**: (a) 1. N₂=^D₆Aib-^D₆Aib-Pip-^D₆Aib-Gly-OH **85**, N₂=^D₆Aib-^D₆Aib-Pip-^D₆Aib-Gly-Leu-^D₆Aib-OH **83** bzw. N₂=^D₆Aib-Aib-Pip-^D₆Aib-Gly-Leu-^D₆Aib-OH **84**, *N*-HATU, HOAt, CH₂Cl₂/DMF, 0°C → RT; 2. H₂-Pd/C, MeOH, RT; 3. RP-HPLC, 44 % (**92**), 24 % (**93**), 49 % (**94**)

Für die abschließende Segmentkondensation standen die *N*-terminalen Fragmente **86**–**89** sowie die *C*-terminalen Hälften **92**–**94** zur Verfügung. Die *C*-terminale Hälfte **92** wurde durch das *N*-terminale Fragment **86** acyliert, die *C*-terminale Hälfte **93** durch **87** und **88** und die *C*-terminale Hälfte **94** durch das *N*-terminale Fragment **89**. Die Kupplungsreaktion erfolgte mit Hilfe von *N*-HATU und HOAt in DMF/CH₂Cl₂. Die Reaktion ist zumeist über Nacht vollständig und kann MALDI-TOF-massenspektrometrisch problemlos verfolgt werden (Abb. 4.54).

Mit den Efrapeptin C-Analoga **79**–**82** stehen vier Sequenzen für die Konformationsanalyse zur Verfügung. Zum einen wurden für eine Untersuchung der Sekundärstruktur CD-Spektren gemessen, zum anderen wurden die Sequenzen bei der von Huber durchgeführten NMR-gestützten Konformationsanalyse eingesetzt.

4.5 Isotopenmarkierte Efrapeptin C-Analoga 79–82 als Hilfsmittel für die Konformationsanalyse



N-terminales Fragment	C-terminale Hälfte	isotopenmarkiertes Efrapeptin C-Analogon	Aib ²	Aib ⁴	Aib ⁵	Aib ⁹	Aib ¹⁰	Aib ¹²	Aib ¹⁵
86	92	79	Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	Aib
87	93	80	D ₆ Aib	D ₆ Aib	Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib
88	93	81	D ₆ Aib	Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib
89	94	82	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib	Aib	D ₆ Aib	D ₆ Aib

Abbildung 4.54: Synthese der isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analoga 79, 80, 81 und 82: (a) 1. N-HATU, HOAt, CH₂Cl₂/DMF, 0°C → RT; 2. RP-HPLC, 34 % (79), 21 % (80), 83 % (81), 34 % (82)

4.5.3 Untersuchungen zur Konformation mit Hilfe der CD- und der NMR-Spektroskopie

Die Konformationsanalyse erfolgte anhand zweier Methoden, der CD-Spektroskopie und der NMR-Spektroskopie.

CD-spektroskopische Untersuchungen

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen erfolgten wie bei den bisher beschriebenen Efrapeptinen in TFE als Lösungsmittel. Da TFE helikale Sekundärstrukturen stabilisiert, wurden außerdem Messungen in einem TFE/H₂O-Gemisch (1:1) durchgeführt. Hierdurch wurden zusätzliche Informationen über die Stabilität der helikalen Strukturen unter quasi physiologischen Bedingungen erhalten (Abb. 4.55).

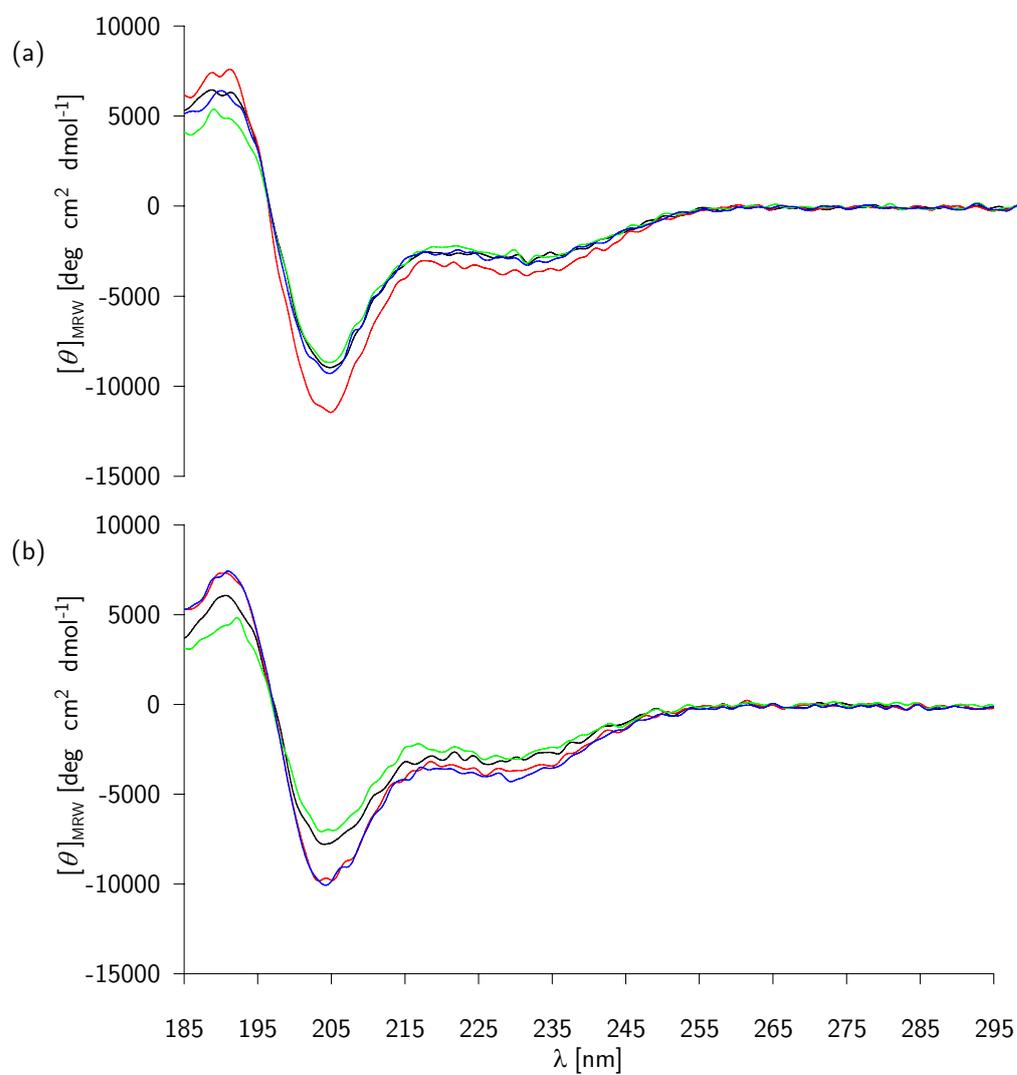


Abbildung 4.55: Vergleich der CD-Spektren der isotopenmarkierten Efrapeptine C-Analoga **79** (schwarz), **80** (rot), **81** (grün) und **82** (blau): (a) in TFE; (b) in TFE/H₂O (1:1)

Die CD-Spektren der isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analoga **79–82** ähneln denen von Efrapeptin C. In TFE werden sehr ähnliche Werte für das Verhältnis zwischen den negativen Banden bei 230 nm und 205 nm gefunden, so dass nur geringfügige Abweichungen von bis zu 0.02 beobachtet werden. Auch die Stärke der CD-Effekte ist mit denen von Efrapeptin C vergleichbar, wobei mit Ausnahme des beuterierten Analogons **80** die CD-Effekte etwas geringer ausfallen als bei Efrapeptin C. Interessant ist der Vergleich der in TFE erhaltenen CD-Spektren mit denen, die in einem TFE/H₂O-Gemisch (1:1) gemessen wurden. Hier ist bei sämtlichen Analoga ein Anstieg von R zu beobachten, der auf einen weniger ausgeprägten 3_{10} -helikalen Charakter hindeutet. Mit Ausnahme des Analogons **82** ist zudem eine Verringerung in der Intensität der CD-Effekte zu beobachten, was auf eine leichte Destabilisierung der Helixstruktur schließen lässt (Tab.. 4.13).

Tabelle 4.13: Vergleich des Verhältnisses R der Elliptizitäten bei 230 nm und 205 nm und der CD-Effekte der isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analoga ($[\theta]_{\text{MRW}}$ in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)

Efrapeptin	Lösungsmittel	$[\theta]_{205} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{230} \cdot 10^{-3}$	$R_{\frac{\theta_{230}}{\theta_{205}}}$
C	TFE	-12.1	-4.2	0.35
79	TFE	-9.0	-3.2	0.36
	TFE/H ₂ O (1:1)	-7.8	-2.9	0.37
80	TFE	-11.4	-3.9	0.34
	TFE/H ₂ O (1:1)	-9.8	-3.7	0.38
81	TFE	-8.7	-3.2	0.37
	TFE/H ₂ O (1:1)	-7.0	-3.0	0.43
82	TFE	-9.3	-3.3	0.35
	TFE/H ₂ O (1:1)	-10.1	-4.2	0.42

Ein Einfluss durch die Deuterierung ist anhand der CD-Spektren nicht erkennbar. Hiernach scheint es, dass sich eine Verdopplung der Masse der Aib-Methylprotonen nicht maßgeblich auf die Struktur des Peptids auswirkt. Interessant erschien daher inwiefern ein Effekt in den NMR-Spektren gefunden werden kann.

NMR-Spektroskopische Untersuchungen

Die NMR-spektroskopischen Experimente wurden von Huber im Rahmen seines Dissertationsvorhabens durchgeführt. Sämtliche Messungen stellen nur einen Teil im gesamten Verfahren der Konformationsanalyse von Efrapeptin C dar. Sie liefern jedoch wertvolle Informationen über die sieben in Efrapeptin C enthaltenen Aib-Reste.

Insbesondere der Bereich um 1.5 ppm in den ^1H -NMR-Spektren kann durch die gezielte Deuterierung von Aib-Methylprotonen vereinfacht werden. In Abbildung 4.56 ist der für die vereinfachte Auswertung der ^1H -NMR-Spektren interessante Bereich gezeigt. Es ist deutlich das Verschwinden vieler Signale erkennbar, die von Aib-Methylprotonen stammen und durch die Deuterierung unterdrückt werden. Die verbliebenen Signale können auf diese Weise den entsprechenden nicht-deuterierten Aib-Methylgruppen zugeordnet werden.

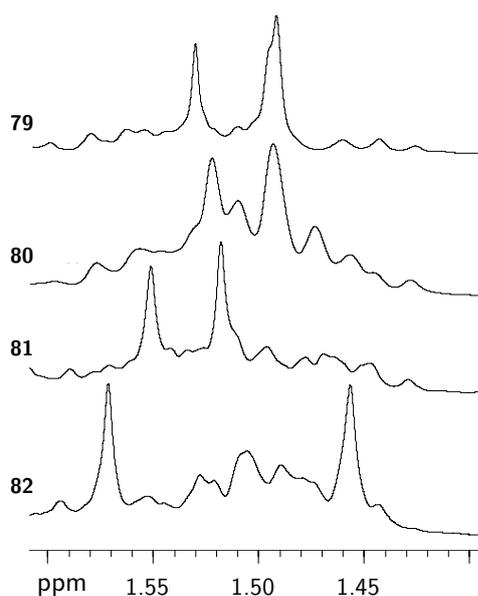


Abbildung 4.56: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren zwischen 1.4 ppm und 1.6 ppm der isotonenmarkierten Efrapeptin C-Analoga **79–82**

Das Analogon **79** enthält zwei nicht-deuterierte Aib-Reste. Im ^1H -NMR-Spektrum überlagern sich die Signale dieser Reste teilweise, so dass hier eine Zuordnung trotz der wenigen verbliebenen Signale schwierig ist. Anders verhält es sich bei den Analoga **80**, **81** und **82**. Hier sind die verbliebenen Signale sehr gut separiert, so dass eine Zuordnung anhand von mehrdimensionalen NMR-Spektren gut möglich ist.

Ein Problem, welches bei der Auswertung der Spektren jedoch ebenfalls schnell deutlich wird, ist die Signalverbreiterung und die Abweichung der vorhandenen Signale in den Spektren der isotonenmarkierten Analoga. Dieser Isotopieeffekt ist gerade beim Austausch von ^1H gegen ^2H besonders groß, da sich die Masse des Atomkerns etwa verdoppelt und sich die Polarität einer C–D-Bindung gegenüber einer C–H-Bindung ändert. Dadurch kommt es zu Verschiebungen von bis zu 0.25 ppm gegenüber dem nicht-isotonenmarkierten Efrapeptin C. Eine Erklärung könnte die höhere Abschirmung sein, die durch die Substitution des leichteren Isotops ^1H durch das schwerere Isotop ^2H auftritt und eine Tieffeldverschiebung einiger Signale verursacht.^[232]

Erst kürzlich wurde über ähnliche Isotopieeffekte bei ^2H -substituierten Verbindungen berichtet. Demnach sind neben den Verschiebungen der Signale von bis zu 0.8 ppm,^[233] wie sie abgeschwächt auch bei den isotonenmarkierten Efrapeptin C-Analoga **79–82** auftreten, auch Änderungen der Kopplungskonstanten^[234] oder kinetische Effekte zu beobachten.^[235] Dies kann in bestimmten Fällen durchaus erwünscht sein, führt jedoch

im Falle der untersuchten Peptide zu Problemen bei der Signalzuordnung. Dennoch ist eine Zuordnung der Signale der Aib-Methylprotonen mit Hilfe der gezielten Isotopenmarkierung möglich, so dass die Vorteile trotz gewisser Schwierigkeiten überwiegen. Jedoch ist der Aufwand relativ groß, um verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

4.6 Adenopeptin 95 und das Adenopeptin-Analogon 101

Auf Grund der interessanten biologischen und medizinischen Eigenschaften von Adenopeptin **95** wurden der Naturstoff selbst und zusätzlich das Analogon **101**, bei dem Aib¹⁰ und Pip¹² gegeneinander getauscht sind, synthetisiert. Der Syntheseverlauf orientierte sich an den bereits für die Efrapeptine erfolgreichen Vorgehensweisen. Die größte Herausforderung war die Synthese der zentralen Teilsequenz Aib⁶-Aib⁷-L-Iva⁸-Aib⁹-Aib¹⁰-Aib¹¹-Pip¹²-L-Iva¹³ in Adenopeptin **95** bzw. Aib⁶-Aib⁷-L-Iva⁸-Aib⁹-Pip¹⁰-Aib¹¹-Aib¹²-L-Iva¹³ im Analogon **101**, da sie ausschließlich aus den sterisch besonders anspruchsvollen α,α -dialkylierten Aminosäuren Aib und L-Iva sowie der zyklischen Aminosäure Pip besteht. Gerade die Kupplung dieser drei Aminosäuren stellte eine besondere Herausforderung da.

Es sind einige Beispiele für aus α,α -dialkylierten Aminosäuren bestehende Oligopeptide bekannt. Jost *et al.* gelang mit Hilfe der auch in dieser Arbeit verwendeten, festphasengestützten Methode der Aib-Kupplung die Synthese von Peptiden mit bis zu vier aufeinander folgenden Aib-Resten.^[236] Toniolo *et al.* hingegen konnten in Lösung vier Aib-Reste in die Sequenzen Z-Aib-Aib-Aib-L-Trp-Aib-O^tBu und Boc-Aib-Aib-Aib-L-Trp-Aib-OMe integrieren, davon drei unmittelbar aufeinander folgende.^[237] Wesentlich anspruchsvoller war hingegen die in guten Ausbeuten mögliche Synthese von Peptiden mit bis zu acht aufeinander folgenden Aib-Resten, die ebenfalls Toniolo *et al.* gelang.^[238,239]

Diese Ergebnisse ließen einen Erfolg der Synthese von Adenopeptin **95** und des Adenopeptin-Analogons **101** möglich erscheinen. Da jedoch der Einfluss einer zyklischen Aminosäure wie Pipecolinsäure auf eine mögliche Synthese innerhalb einer längeren, aus α,α -dialkylierten Aminosäuren bestehenden Peptidsequenz bisher nicht untersucht wurde, wurde die Position des Pip-Restes variiert. Bei Adenopeptin **95** befindet er sich in Position 12 der Aminosäuresequenz, beim Analogon **101** hingegen in Position 10.

4.6.1 Synthese

Der Syntheseplan sah zunächst die Einteilung der beiden Gesamtsequenzen in jeweils drei Fragmente vor, die einzeln synthetisiert und anschließend durch Segmentkondensationen zusammengefügt wurden (Tab. 4.14).

Tabelle 4.14: Schnittstellen der Gesamtsequenzen von Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101**

Adenopeptin 95	Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib Pip-L-Iva X
Adenopeptin Analogon 101	Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva X

Die in Tabelle 4.14 gezeigte Schnittstelle zwischen β Ala⁴ und Gly⁵ erwies sich bei der Synthese als besonders günstig. Die Verwendung einer Carboxykomponente mit β -Alanin am *C*-Terminus ist insofern hilfreich, als dass diese Aminosäure auf Grund ihres verlängerten Rückgrats recht flexibel ist und wegen eines fehlenden Stereozentrums nicht die Gefahr der Epimerisierung besteht. Eine Aminokomponente mit Glycin am *N*-Terminus ist auf Grund der geringen sterischen Hinderung eine gute Wahl. Die Schnittstelle zwischen L-Iva¹³ und der Kopfgruppe war von den Efrapeptinen bekannt und sollte auch bei den Adenopeptinen zu keinen Problemen führen.

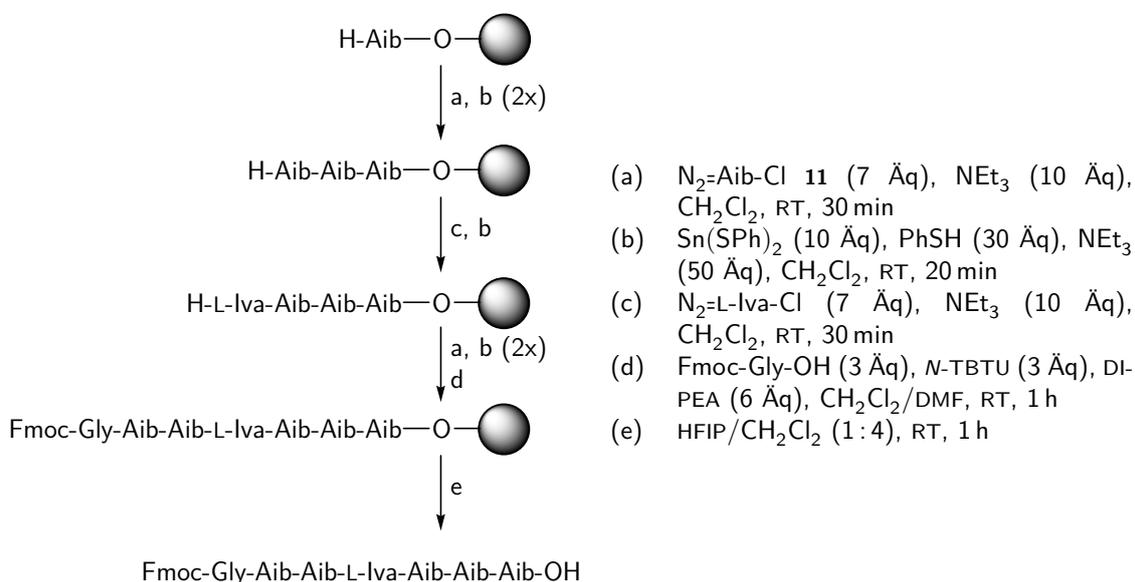


Abbildung 4.57: Synthese des mittleren Fragments **96**, Ausbeute: 45 %

Allerdings war es nicht möglich, für die Synthese von Adenopeptin **95** ein Fragment bestehend aus den Aminosäuren Gly⁵-L-Iva¹³ herzustellen, was vermutlich auf die Position des Pip-Restes zurückzuführen ist. Für die Synthese des Analogons **101** war es auf Grund der Verschiebung des Pip-Restes innerhalb des mittleren Fragments möglich, ein Fragment bestehend aus den Aminosäuren Gly⁵-L-Iva¹³ herzustellen. Während das Adenopeptin-Analogon **101** daher über die Schnittstellen zwischen β Ala⁴ und Gly⁵ und L-Iva¹³ und der Kopfgruppe zugänglich war, musste für Adenopeptin **95** eine zusätzliche Schnittstelle zwischen Aib¹¹ und Pip¹² eingefügt werden.

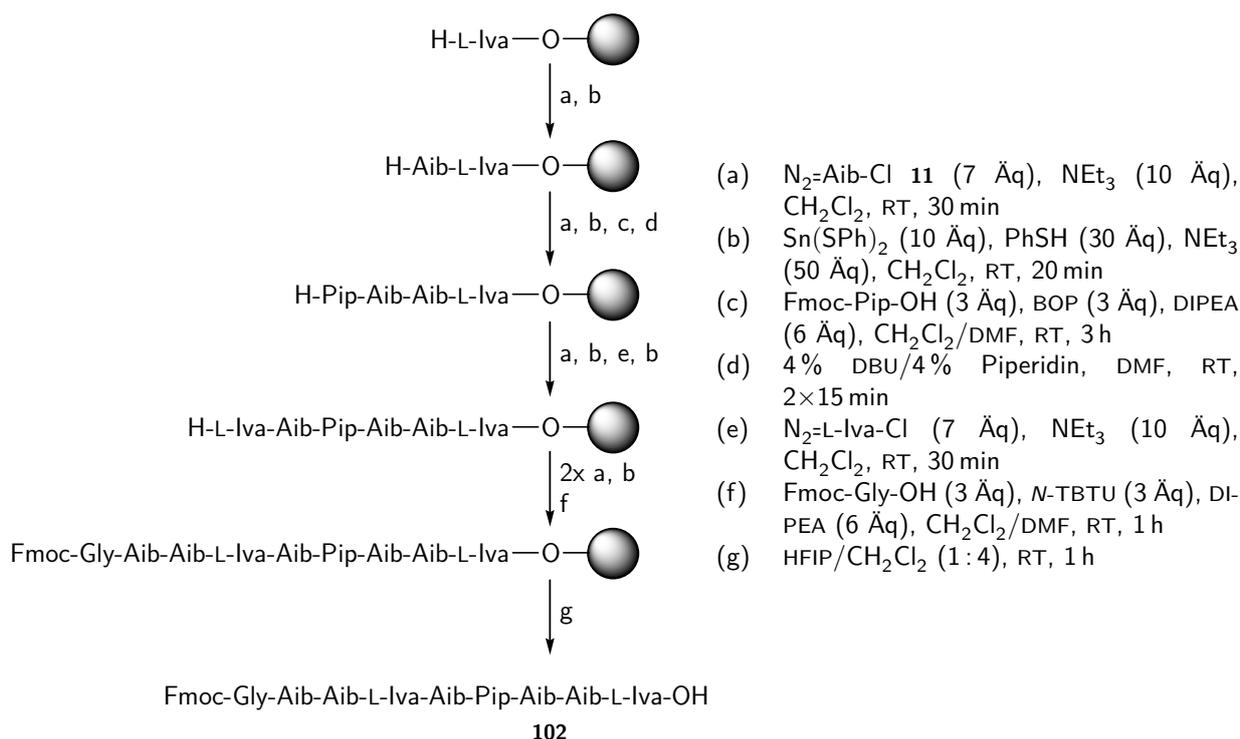


Abbildung 4.58: Synthese des mittleren Fragments **102**, Ausbeute: 17 %

Die mittleren Fragmente Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-OH **96** (Abb. 4.57) und Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-OH **102** (Abb. 4.58) wurden an einem mit der jeweils *C*-terminalen Aminosäure beladenen *o*-Chlortritylharz synthetisiert. Während das Fragment **96** mit Aib beginnt und für die Synthese insgesamt sechs weitere Aminosäuren gekuppelt werden mussten, trägt das Fragment **102** am *C*-terminalen Ende einen L-Iva-Rest und es wurden acht weitere Aminosäurereste gekuppelt.

Die Fmoc-geschützten Aminosäuren Pip und Gly wurden mit Hilfe von BOP bzw. *N*-TBTU unter basischen Bedingungen eingeführt. Die α,α -dialkylierten Aminosäuren Aib

und L-Iva wurden hingegen nach der Azidosäurechloridmethode eingeführt und die Azidogruppe anschließend mit dem Vilarrasa-Reagenz zum Amin reduziert. Für einige Aminosäuren musste die Kupplungsreaktion wiederholt werden, da die Kupplung zunächst laut MALDI-TOF-MS-Analyse nicht vollständig war. Die Fragmente sind in Ausbeuten von 45 % (**96**) und 17 % (**102**) zugänglich.

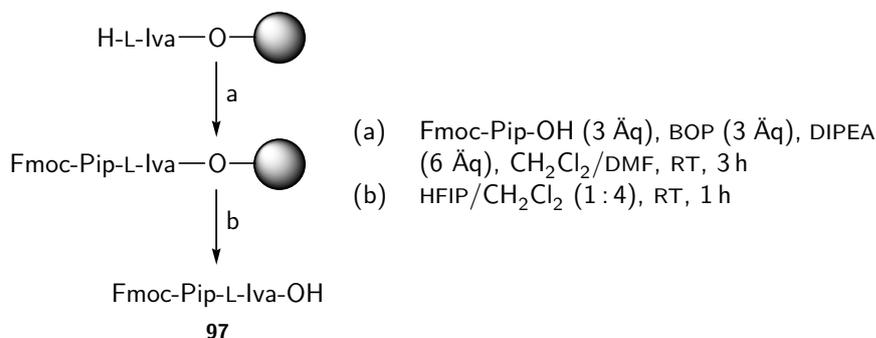


Abbildung 4.59: Synthese des Dipeptids Fmoc-Pip-L-Iva-OH **97**, Ausbeute: 11 %

Für die Synthese von Adenopeptin **95** musste zusätzlich das Dipeptid Fmoc-Pip-L-Iva-OH **97** synthetisiert werden (Abb. 4.59). Dies erfolgte am polymeren Träger. Der Grund für diese Vorgehensweise ist die schwierigere Zugänglichkeit von L-Isovalin **21** gegenüber α -Aminoisobuttersäure **9**. Für die Festphasenpeptidsynthese bei nur einer Kupplungsreaktion reichen einige hundert Milligramm der jeweiligen Aminosäure aus. Fmoc-Pip-OH wird mit Hilfe von BOP an das harzgebundene L-Isovalin gekuppelt. Das Dipeptid **97** wurde nach Abspaltung vom Harz mit HFIP und anschließender RP-HPLC in einer Ausbeute von 11 % isoliert.

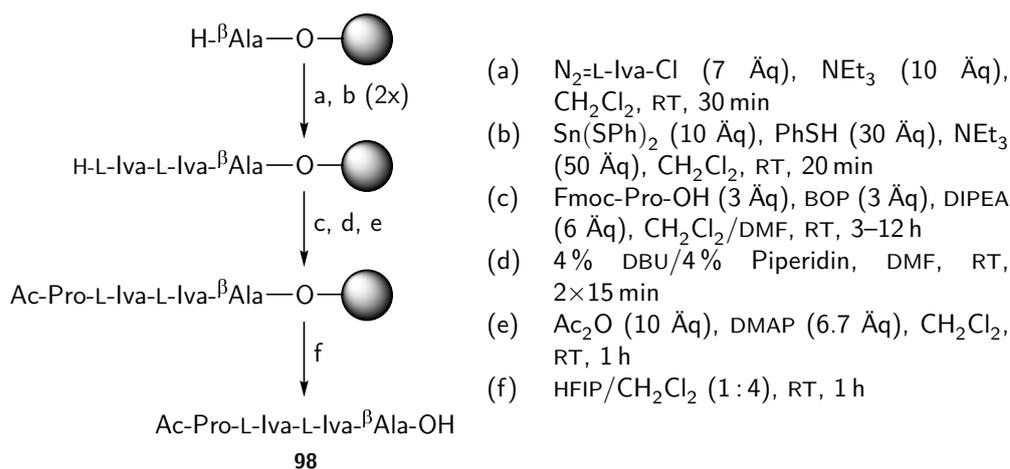


Abbildung 4.60: Synthese des N-terminalen Fragments **98**, Ausbeute: 90 %

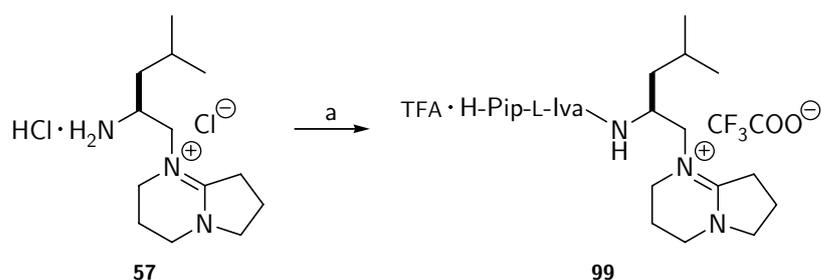


Abbildung 4.61: Synthese des C-terminalen Fragments **99**: (a) 1. Fmoc-Pip-L-Iva-OH **97**, *N*-HATU, HOAt, DIPEA, DMF/CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 5 d; 2. HNEt₂ (20 % in DMF), RT, 30 min; 3. RP-HPLC, 46 %

Als *N*-terminales Fragment diente sowohl für Adenopeptin **95**, als auch für das Adenopeptin-Analogon **101** das Peptidfragment Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98**. Die beiden L-Iva-Reste wurden erneut nach der Azidosäurechloridmethode mit anschließender Reduktion der Azidogruppe in die Peptidsequenz eingebracht, Pro in Form der Fmoc-geschützten Aminosäure mit Hilfe von BOP analog zu der Vorgehensweise bei Pip und der Acetylrest mit Hilfe von Essigsäureanhydrid unter basischen Bedingungen. Die Abspaltung des Peptids **98** vom Harz erfolgte unter milden Bedingungen mit Hilfe von HFIP und die Isolierung HPL-chromatographisch in einer sehr guten Ausbeute von 90 % (Abb. 4.60).

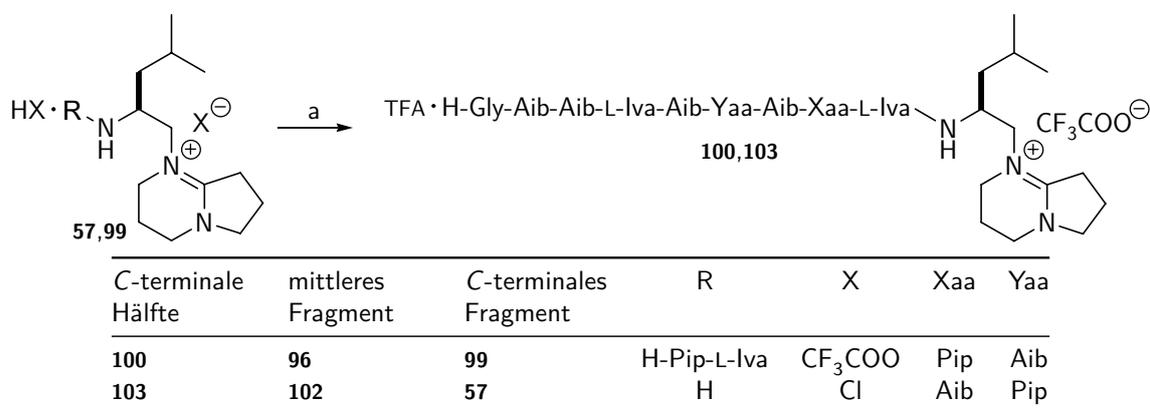


Abbildung 4.62: Synthese der C-terminalen Hälften **100** und **103**: (a) 1. Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-OH **96** bzw. Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-OH **102**, *N*-HATU, HOAt, CH₂Cl₂/DMF, 0 °C → RT; 2. HNEt₂ (20 % in DMF), RT. 3. RP-HPLC, 56 % (**100**), 22 % (**103**)

Für die Totalsynthese von Adenopeptin **95** wurde zunächst das Dipeptid Fmoc-Pip-L-Iva-OH **97** an die Kopfgruppe **57** gekuppelt (Abb. 4.61). Diese Reaktion erforderte einen recht großen Aufwand, da ein vollständiges Verschwinden des Amidiniumsalzes **57** erst nach mehreren Tagen MALDI-TOF-massenspektrometrisch beobachtet werden konnte.

te. Anscheinend stellt die Kombination von Pipecolinsäure und L-Isovalin bereits eine sehr rigide Struktur dar, was für ein Dipeptid recht ungewöhnlich erscheint. Ein derart schwieriger Reaktionsverlauf konnte weder bei den Efraeptinen D–G **42–45** (s. Kapitel 4.2.1), noch bei den Neoefraeptinen **60**, **63** und **66** festgestellt werden (s. Kapitel 4.3.1), bei denen sich ebenfalls L-Isovalin am *C*-terminalen Ende der Carboxykomponente befindet. Dennoch war ein synthetischer Zugang des *C*-terminalen Fragments **99** in einer Ausbeute von 46 % möglich. Um ein möglichst reines Rohprodukt zu erhalten, erfolgte dabei die Abspaltung der Fmoc-Gruppe nach erfolgreicher Kupplung mit Hilfe des flüchtigen Diethylamin anstelle von Piperidin oder DBU/Piperidin.

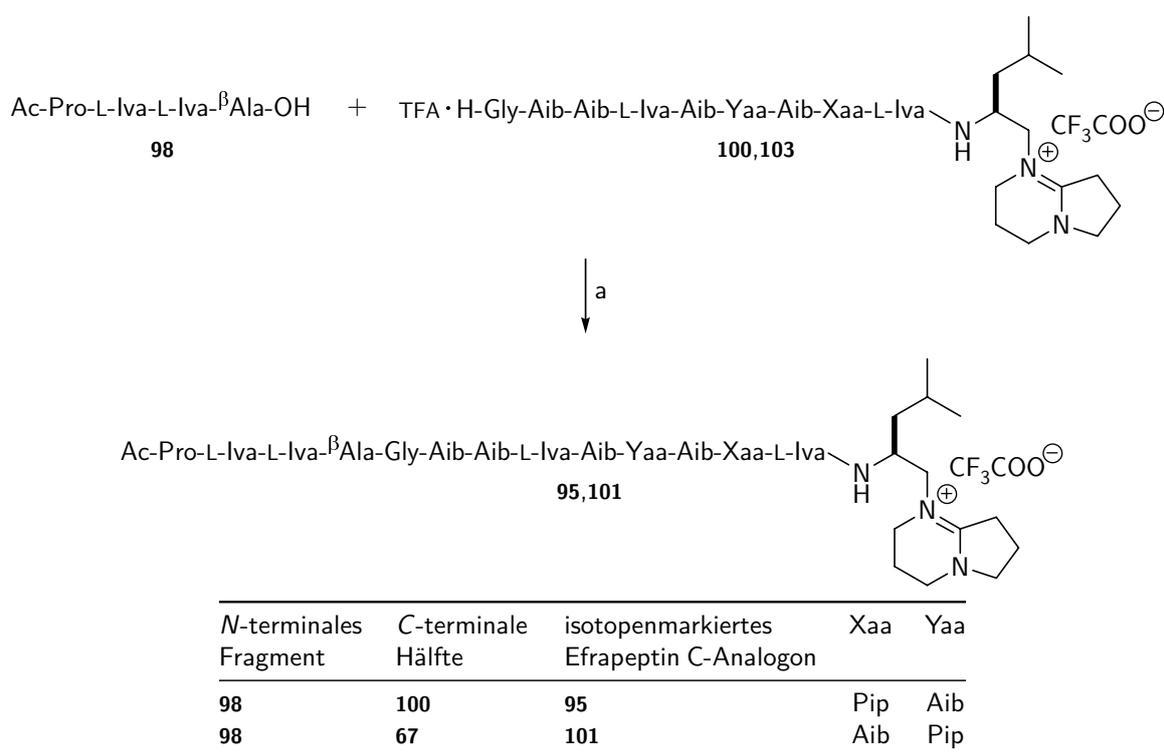


Abbildung 4.63: Synthese von Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101**: (a) 1. *N*-HATU, HOAt, CH₂Cl₂/DMF, 0 °C → RT; 2. RP-HPLC, 2 % (**95**), 81 % (**101**)

Die Synthese der *C*-terminalen Hälften TFA·H-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Pip-L-Iva-X **100** und TFA·H-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-X **103** erfolgte mit Hilfe von *N*-HATU und HOAt als Kupplungsreagenzien in DMF/CH₂Cl₂ (Abb. 4.62). Für die Synthese von **100** wurden Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-OH **96** als Carboxykomponente und TFA·H-Pip-L-Iva-X **99** als Aminokomponente verwendet. Bei der Synthese von **103** kamen Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-OH **102** als

Carboxykomponente und die Kopfgruppe **57** als Aminokomponente zum Einsatz. Es zeigte sich, dass die Kupplungen recht problematisch sind, was vermutlich auf die Rigidität und den sterischen Anspruch der Reaktionspartner zurückzuführen ist. Während die Reaktion zu **100** laut MALDI-TOF-MS erst nach mehreren Tagen vollständig war, war dies bei der Reaktion zu **103** bereits über Nacht der Fall. Die anschließende Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe verlief in beiden Fällen glatt und die Produkte konnten durch RP-HPLC in Ausbeuten von 56 % (**100**) und 22 % (**103**) isoliert werden.

Anscheinend wirkt sich die verlängerte Reaktionszeit im Falle von **100** sehr positiv auf die mögliche Ausbeute aus, die hier bei 56 % lag. Schließlich ist es wahrscheinlich, dass die Kupplung über α -Aminoisobuttersäure am *C*-Terminus der Carboxykomponente **96** und Pipecolinsäure am *N*-Terminus der Aminokomponente **99** auf Grund des sterischen Anspruchs beider Reaktionspartner deutlich schlechter verläuft, als die Kupplung über L-Isovalin am *C*-Terminus der Carboxykomponente **102** und die freie Aminogruppe am *N*-Terminus der Kopfgruppe **57**. Letztere Reaktion verlief bei den in Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Efrapeptinen, Neofrapeptinen und deren Analoga in ähnlicher Form teilweise erheblich besser mit Ausbeuten bis zu 55 % (vgl. Kapitel 4.2–4.5)

Tabelle 4.15: Vergleich der gemessenen mit den berechneten monoisotopischen Massen von Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101**

Peptid	Monoisotopische Masse		für ein Ion der Zusammensetzung	Abweichung [ppm]
	gemessen	berechnet		
Adenopeptin 95	723.46600	723.46457	$[^{12}\text{C}_{71} \text{}^1\text{H}_{123}^{14}\text{N}_{16} \text{}^{16}\text{O}_{14}^{23}\text{Na}]^{2+}$	1.98
Adenopeptin-Analogon 101	712.47325	712.47360	$[^{12}\text{C}_{71} \text{}^1\text{H}_{124} \text{}^{14}\text{N}_{16} \text{}^{16}\text{O}_{14}]^{2+}$	0.49
	720.98621	720.98687	$[^{12}\text{C}_{71} \text{}^1\text{H}_{127} \text{}^{14}\text{N}_{17} \text{}^{16}\text{O}_{14}]^{2+}$	0.92
	723.46393	723.46457	$[^{12}\text{C}_{71} \text{}^1\text{H}_{123} \text{}^{14}\text{N}_{16} \text{}^{16}\text{O}_{14} \text{}^{23}\text{Na}]^{2+}$	0.88
	1423.94293	1423.93992	$[^{12}\text{C}_{71} \text{}^1\text{H}_{123} \text{}^{14}\text{N}_{16} \text{}^{16}\text{O}_{14}]^+$	2.11

Für die abschließende Segmentkondensation wurde neben den *C*-terminalen Hälften **100** und **103** nur das *N*-terminale Fragment Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98** benötigt. Dieses wurde jeweils mit *N*-HATU und HOAt als Kupplungsreagenzien an die *C*-terminalen Hälften gekuppelt, wobei als Produkte Adenopeptin **95** und das Adenopeptin-Analogon **101** in Reaktionszeiten unter 24 h und anschließender HPL-chromatographischer Reinigung erhalten werden konnten (Abb. 4.63). Um das synthetische Adenopeptin **95** und das Adenopeptin-Analogon **101** zu charakterisieren und den Syntheseerfolg zu dokumentieren, wurden eine Massenfeinbestimmung mittels ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie her-

angezogen. Auf Grund der geringen Abweichungen zwischen gemessenen und berechneten monoisotopischen Massen von 0.49–2.11 ppm kann die Identität beider Verbindungen bestätigt werden (Tab. 4.15).

4.6.2 CD-spektroskopische Untersuchungen

Um einen ersten strukturellen Vergleich von Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101** mit den Efrapeptinen und Neofrapeptinen zu ermöglichen, wurden CD-Spektren aufgenommen und sollen hier diskutiert werden. Hieraus können Aussagen beispielsweise über helikale Anteile in den synthetisierten Adenopeptinen angestellt werden.

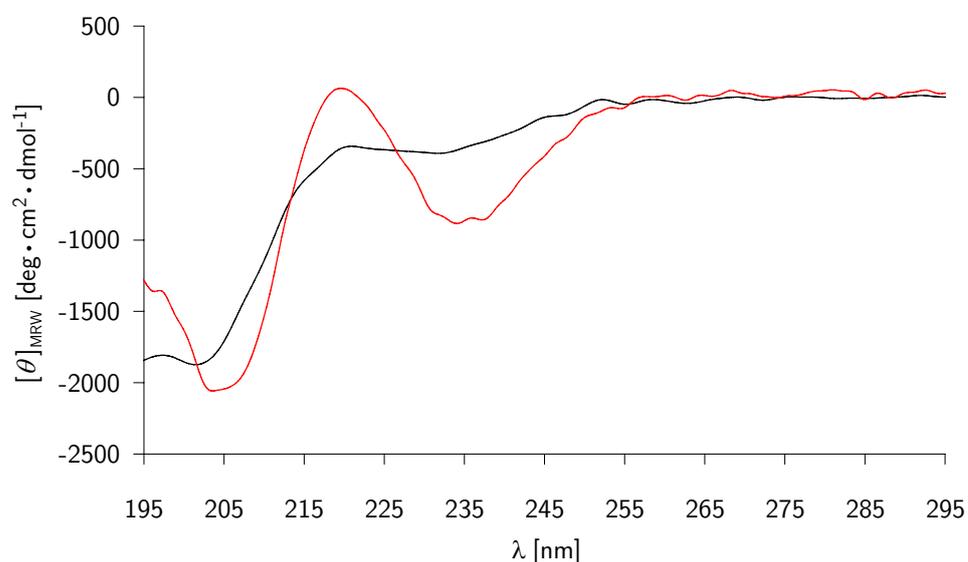


Abbildung 4.64: Vergleich der CD-Spektren von Adenopeptin **95** (schwarz) und dem Adenopeptin-Analogon **101** (rot)

Adenopeptin **95** und das Adenopeptin-Analogon **101** wurden wie die bisher untersuchten Peptide in TFE gelöst vermessen. Bei einer Peptidkonzentration von $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ konnten für die Adenopeptide jedoch keine CD-Spektren mit scharfen Banden und einem akzeptablen Signal-Rausch-Verhältnis erhalten werden. Erst ab einer Konzentration von $1.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ war eine Messung der CD-Effekte mit scharf abgegrenzten Banden möglich, was auf weniger stark ausgeprägte Sekundärstrukturmotive wie beispielsweise einer 3_{10} -Helix hindeutet. Durch die hohe Peptidkonzentration steigt die Absorption

unterhalb 195 nm so stark an, dass die Spektren nur oberhalb dieser Wellenlänge aussagekräftige Ergebnisse liefern, was jedoch für die vorliegenden Peptide ausreichend ist (Abb. 4.64).

Bei der Auswertung der CD-Spektren fällt zunächst die geringe Intensität der CD-Effekte auf, was die Vermutung unterstützt, dass die vorhandenen Sekundärstruktur motive wenig ausgeprägt sind. Dies ist für Peptide mit einem derart hohen Anteil an α, α -dialkylierten Aminosäuren wie den Adenopeptinen recht ungewöhnlich und nicht den Erwartungen entsprechend (Tab. 4.16).

Tabelle 4.16: Vergleich des Verhältnisses R der Elliptizitäten bei 230 nm und 205 nm und der CD-Effekte der Efrapeptide C-G ($[\theta]_{\text{MRW}}$ in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)

Peptid	$[\theta]_{205} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{230} \cdot 10^{-3}$	$R_{\frac{\theta_{230}}{\theta_{205}}}$
Adenopeptin 95	-1.9	-0.4	0.21
Adenopeptin-Analogon 101	-2.1	-0.9	0.43

Auffällig ist außerdem die Lage der negativen CD-Banden. Die Bande, die bei den Efrapeptinen und Neofrapeptinen gewöhnlich um 205 nm zu finden ist, ist bei den Adenopeptinen um etwa 4 nm blau verschoben, während die Bande, die bei den Efrapeptinen gewöhnlich um 230 nm zu finden ist, um etwa 2–3 nm rot verschoben ist. Diese Beobachtung spricht dafür, dass neben 3_{10} -helikalen Sekundärstrukturelementen auch noch andere Motive, wie beispielsweise *turn*- oder *random coil*-Strukturen vorhanden sein könnten (Abb. 4.64).

Beim Betrachten des Verhältnisses R der Elliptizitäten bei den beiden negativen Banden fällt weiterhin auf, dass es hier deutliche Unterschiede zwischen Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101** gibt (Tab. 4.16). Hieraus nun auf den Anteil an 3_{10} -helikalen Struktur motiven schließen zu wollen, scheint auf Grund der Verschiebung der CD-Banden eher gewagt. Festzuhalten ist jedoch, dass der einfache Austausch von Aib¹⁰ und Pip¹² in Adenopeptin **95** gegen Pip¹⁰ und Aib¹² im Adenopeptin-Analogon **101** zu recht deutlichen Unterschieden in den vorhandenen Sekundärstrukturelementen zu führen scheint. Dies könnte ein möglicher Grund für die relativ verschiedenen Syntheserfolge der beiden Peptide sein. Schließlich wird der Schwierigkeitsgrad einer Kupplung zweier Aminosäuren oder zweier Peptidfragmente wesentlich durch die Rigidität und den sterischen Anspruch der beiden Reaktionspartner bestimmt.

Für eine definitive Aussage über die Sekundärstrukturen von Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101** sind die durchgeführten CD-Messungen selbstverständlich

nicht ausreichend, jedoch zeigen sie erste Tendenzen auf und lassen eine eingehendere Untersuchung dieser interessanten Peptide sehr wertvoll erscheinen. Über aufwändigere Analyseverfahren wie VCD- oder NMR-Spektroskopie können dann die Sekundärstrukturen bestimmt und eventuell sogar Aussagen über Wirkungsmechanismen in biologisch interessanten Systemen gemacht werden.

4.6.3 Überlegungen zum Aufbau eines Apoptose-Assays

Wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, wurde Adenopeptin 1998 erstmals von Hayakawa *et al.* aus Pilzen der Gattung *Chrysosporium* isoliert und unter anderem auf seine apoptotische Wirkung gegenüber mit Adenoviren transfizierten Zellen untersucht.^[135] Aufbauend auf den im selben Kapitel beschriebenen Apoptosemechanismen sollen an dieser Stelle einige Überlegungen zum Aufbau eines einfachen Apoptose-Assays angestellt werden. Dieser kann allein aus technischen Gründen nicht den Umfang der von Hayakawa *et al.* durchgeführten Testreihe haben, jedoch soll er erste Anhaltspunkte für die apoptoseinduzierende Wirkung von Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogen **101** liefern.

Wie bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben, stellen die Caspasen im Verlauf der Apoptose die Exekutive der gesamten Kaskade dar. Sie bilden daher eine zentrale und nur während der Apoptose in dieser Form auftretende Proteasefamilie. Ist es möglich, die Aktivität bestimmter Caspasen nach Zugabe einer zu untersuchenden Substanz zu einem Zellmedium zu ermitteln, kann eine Aussage über die apoptoseinduzierenden Eigenschaften dieser Substanz gemacht werden.

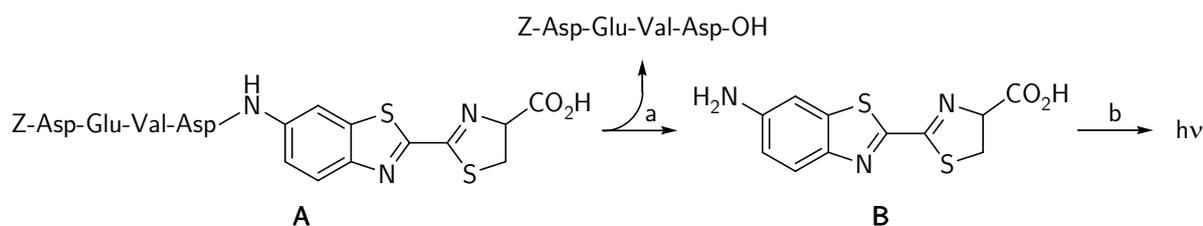


Abbildung 4.65: Spaltung des luminogenen Substrats **A** durch Caspase 3/7 und anschließende Umsetzung von **B** durch Luziferase unter Lumineszenz: (a) Caspase 3/7, ATP, O₂; (b) UltraGlo™ Luciferase, Mg²⁺

Käuflich sind Apoptose-Assays erhältlich, mit denen sich die Aktivität verschiedener Caspasen detektieren lässt. Da die Caspasen 3 und 7 eine zentrale Stellung innerhalb der Caspase-Kaskade einnehmen,^[240–242] soll ein Assay verwendet werden, mit dem es möglich ist, spezifisch die Aktivität dieser Caspasen zu untersuchen. Der Caspase-Glo®

3/7 Assay der Firma Promega Corporation enthält in einem für die Caspase-Aktivität, Luziferase-Aktivität und Zellysis optimierten Reagenz das luminogene Caspase 3/7-Substrat **A**, welches das Tetrapeptid Z-Asp-Glu-Val-Asp-R enthält (Abb. 4.65).

Das Substrat **A** wird durch Caspase 3/7 am Aspartatrest gespalten und es entsteht das Spaltprodukt **B**. Durch die direkte Umsetzung von **B** mit Luziferase wird Lumineszenz erzeugt, deren Intensität proportional zur Caspase-Aktivität ist. Durch Lumineszenzmessung kann daher eine Aussage darüber getroffen werden, ob die untersuchten Zellen apoptotisch sind oder nicht.

Der Caspase-Glo® 3/7 Assay wurde bereits an verschiedenen Zelllinien, wie beispielsweise Jurkat, L929, HeLa, HL-60, SH-SY5Y oder HepG2, und mit verschiedenen apoptoseinduzierenden Verbindungen, wie beispielsweise anti-Fas, Staurosporin, Clozapin, Vinblastin oder Tamoxifen, getestet, jedoch soll getestet werden, ob auch K562- und WM115-Zellen auf diese Weise untersucht werden können. Als Einstieg erscheint ein Test dieser Zelllinien in Verbindung mit Staurosporin, Cryptophycinen oder auch den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Efraeptinen sinnvoll, bevor er auf die synthetischen Adenopeptine **95** und **101** übertragen wird.

Zwar ist der Test äußerst sensitiv, die Bestimmung eines IC_{50} -Werts scheint jedoch mit diesem Versuchsaufbau schwierig. Dennoch sollte dieser Apoptose-Assay als Einstieg geeignet sein, um Erfahrung zu sammeln und später noch aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten.

5

Zusammenfassung und Ausblick

Peptaibiotika sind Aib-reiche Peptide, die von Pilzen produziert werden und interessante biologische und medizinische Eigenschaften besitzen. Zu diesen gehören neben antibiotischer und antimikrobieller Aktivität häufig auch entzündungshemmende, antikanzerogene oder immunsuppressive Wirkung. Neben den am häufigsten vertretenen Peptaibolen zählen jedoch auch seltener vorkommende Vertreter zu den Peptaibiotika. Einige von ihnen wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und eingehend untersucht.

Efrapeptide sind von Pilzen der Gattung *Tolypocladium* als mikroheterogenes Gemisch produzierte Peptaibiotika, die als ATPase-Inhibitoren eingesetzt werden, antiproliferative Eigenschaften besitzen und gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* aktiv sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Efrapeptide D–G 42–45 (Tab. 5.1) erstmals

Tabelle 5.1: Sequenzen der Efrapeptide D–G 42–45 (einzeln synthetisierte Fragmente sind markiert)

Efrapeptin D 42	Ac-Pip-Aib-Pip- Aib -Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva X
	48 46
Efrapeptin E 43	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva X
	49 46
Efrapeptin F 44	Ac-Pip-Aib-Pip- Aib -Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva X
	48 47
Efrapeptin G 45	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva X
	49 47

synthetisiert werden. Hierbei wurde auf Kenntnisse zurückgegriffen, die sich aus der Synthese von Efrapeptin C durch Jost *et al.* ergeben.

Das Gesamtmolekül wurde aus drei, zunächst einzeln synthetisierten Fragmenten zusammengefügt, einem *N*-terminalen Fragment, einem mittleren Fragment und einem

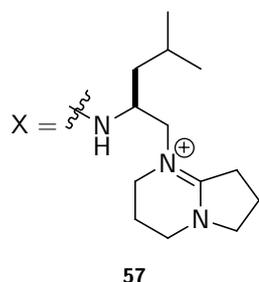


Abbildung 5.1: Kopfgruppe 57

C-terminalen Fragment. Als *N*-terminale Fragmente bei der Synthese der Efrapeptide D–G **42–45** dienten die Peptide Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **48** und Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **49**. Die mittleren Fragmente waren N₂-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **46** und N₂-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-OH **47**, während das *C*-terminale Fragment lediglich aus der Kopfgruppe **57** (Abb. 5.1) bestand.

Die Fragmente **48**, **49**, **46** und **47** wurden durch Festphasensynthese am sehr säurelabilen *o*-Chlortritylharz erhalten. Dabei kam neben Standardkupplungsmethoden für die Fmoc-geschützten Aminosäuren auch die von Jost *et al.*

entwickelte Azidosäurechloridkupplung für die Einführung der Aib- und L-Iva-Reste zum Einsatz. Bei dieser Methode erfolgt die Acylierung der harzgebundenen Aminosäurekomponente mit den äußerst reaktiven Azidosäurechloriden α -Azidoisobuttersäurechlorid **11** (N₂-Aib-Cl, Abb. 5.2)

oder *S*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **25** (L-N₂-Iva-Cl, Abb. 5.2) unter basischen Bedingungen (NEt₃). Das entstehende Azidopeptidylharz wird anschließend mit dem

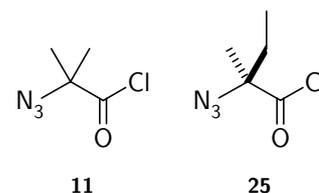


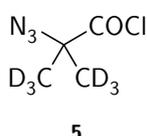
Abbildung 5.2: Die Azidosäurechloride **11** und **25**

Vilarrasa-Reagenz [Et₃NH]⁺[Sn(SPh)₃]⁻ zum Amino-peptidylharz reduziert. Der neue enantiomerenreine L-Iva-Baustein L-N₂-Iva-Cl **25** konnte in Kooperation mit Forschern der Firma DSM über einen Syntheseweg erhalten werden, der zunächst eine enzymatische Umsetzung von *rac*-2-Amino-2-methylbuttersäureamid **19** durch die L-Amidase aus *Mycobacterium neoaurum* zu L-Isovalin **21** vorsieht. Durch anschließenden Cu^{II}-katalysierten Diazotransfer und Umsetzung mit Thionylchlorid wurde der Aminosäurebaustein *S*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **25** erhalten. Die Kopfgruppe **57** kann in Lösung aus DBN und L-Leucinol synthetisiert werden. Die Verknüpfung der einzelnen Fragmente erfolgte mit dem reaktiven Kupplungsreagenz *N*-HATU unter Zugabe von HOAt. Auf diese Weise wurden die Efrapeptide D–G **42–45** erhalten und konnten sowohl auf konformationelle, als auch biologische Eigenschaften untersucht werden.

Weise wurde das *C*-terminale Fragment TFA·H-Leu-Aib-Y **77** erhalten. Die Verknüpfung der einzelnen Fragmente erfolgte mit dem reaktiven Kupplungsreagenz *N*-HATU unter Zugabe von HOAt.

CD-spektroskopische Untersuchungen weisen auf eine überwiegend 3_{10} -helikale Struktur des Efrapeptin C-Analogons **69** hin. Der Einfluss der vergrößerten Kopfgruppe ist marginal, was durch Vergleich des CD-Spektrums des Analogons **69** mit dem von Efrapeptin C deutlich wird. Auch bei der F_1 -ATPase-Aktivität kommt es nur zu einer geringen Abnahme, was durch den erhöhten Raumbedarf der Kopfgruppe beim Einlagern in die Efrapeptin-Bindungsstelle erklärt werden kann.

Die Synthese des isotoopenmarkierten Aib-Bausteins α -Azidoisobuttersäurechlorid- D_6 **5**



($N_2=D_6$ Aib-Cl, Abb. 5.4) erfolgte anhand einer Vorschrift, die im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit entwickelt und während der vorliegenden Arbeit optimiert wurde, ausgehend von Acetoncyanhydrin- D_6 **1**.

Abbildung 5.4: α -Azidoisobuttersäurechlorid- D_6 **5** ($N_2=D_6$ Aib-Cl)

Der Einbau dieses Bausteins gelingt mit Hilfe der Azidosäurechloridmethode. Es wurden insgesamt vier selektiv isotoopenmarkierte Sequenzen synthetisiert, die gemeinsam wertvolle Hilfsmittel bei der NMR-gestützten Konformationsanalyse darstellen. Auf diese Weise ist eine Zuordnung der verbleibenden 1H -Signale der Aib-Methylprotonen vereinfacht. Es wird jedoch ebenfalls deutlich, dass der Austausch von 1H gegen 2H einen starken Isotopieeffekt mit sich bringt, der zu Verschiebungen der Resonanzen sorgt und dadurch die Auswertung der erhaltenen NMR-Spektren wiederum erschwert.

Dieser Isotopieeffekt kann bei CD-spektroskopischen Untersuchungen nicht festgestellt werden, in denen die überwiegend 3_{10} -helikale Struktur der partiell deuterierten Efrapeptine bestätigt werden kann. Untersuchungen in einem TFE/ H_2O -Gemisch geben Auskunft über die Stabilität der 3_{10} -helikalen Sekundärstruktur motive unter physiologischen Bedingungen. Zwar ist ihre Stabilität verringert, jedoch sind sie weiterhin gut ausgeprägt vorhanden.

Neben den bereits länger bekannten Efrapeptinen wurde kürzlich eine neue Klasse dieser interessanten Vertreter der Peptaibiotika entdeckt, die Neofrapeptine. Sie besitzen ähnliche biologische und medizinische Eigenschaften wie die Efrapeptine, enthalten

jedoch neben den von den Efraeptinen bekannten Aminosäurebausteinen zusätzlich 1-Aminocyclopropan-carbonsäure **26** und *trans*- β -Methyl-L-prolin **34**. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Neofraeptine A **60** und F **63**, sowie das Neofraeptin F-Analogon **66** synthetisch zugänglich gemacht werden (Tab. 5.3).

Tabelle 5.3: Sequenzen der Neofraeptine A **60** und F **63** und des Neofraeptin F-Analogons **66** (einzeln synthetisierte Fragmente sind markiert)

Neofraeptin A 60	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly Acc-Aib- 49	Pip 61	-Aib-Gly-Leu-L-Iva X
Neofraeptin F 63	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly Acc-Aib- <i>trans</i> -L- β MePro-Aib-Gly-Leu-L-Iva X 49	64	
Neofraeptin F-Analogon 66	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly Acc-Aib- <i>cis</i> -L- β MePro 49	67	-Aib-Gly-Leu-L-Iva X

Die Synthese erfordert neben dem Aib-Baustein N₂=Aib-Cl **11** und dem L-Iva-Baustein L-N₂=Iva-Cl **25** auch den Acc-Baustein Fmoc-1-Aminocyclopropan-carbonsäure **27** (Abb. 5.5). Für Neofraeptin F **63** und das Neofraeptin F-Analogon **66** werden zusätzlich der *trans*-L- β MePro-Baustein Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** und der *cis*-L- β MePro-Baustein Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** benötigt (Abb. 5.5). Während Fmoc-1-Aminocyclopropan-carbonsäure **27** käuflich erworben wurde, wurde für die Synthese von Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** und Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41** ein von Karoyan *et al.* für β -Alkylproline entwickelter Syntheseweg im Rahmen dieser Arbeit optimiert.

Wie bereits von den Efraeptinen D–G **42–45** bekannt erfolgte die Synthese der Gesamtsequenzen durch Zusammenfügen dreier einzeln synthetisierter Fragmente mit Hilfe des Kupplungsreagenzes *N*-HATU in Verbindung mit HOAt.

Der Syntheserfolg erlaubt eine eingehende Untersuchung dieser Vertreter der Efraeptine. Die CD-spektroskopischen Untersuchungen ergeben eine ausgeprägtere 3₁₀-helikale Struktur, als es bei den Efraeptinen der Fall ist, was auf die ungewöhnlichen Amino-

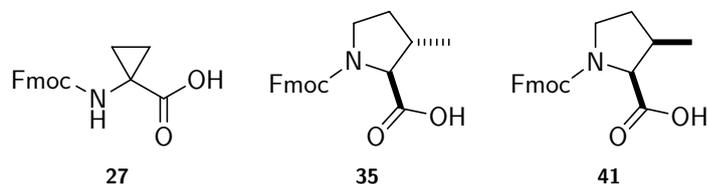


Abbildung 5.5: Die Aminosäuren Fmoc-1-Aminocyclopropan-carbonsäure **27**, Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35** und Fmoc-*cis*- β -Methyl-L-prolin **41**

säuren Acc und $\beta^{\text{Me}}\text{Pro}$ zurückzuführen ist. Die Bestimmung der biologischen Aktivität gegenüber der $F_1\text{-ATPase}$ aus *E. coli* lässt einen Vergleich der synthetischen Neofrapeptine mit den Efrapeptinen zu. Es zeigt sich, dass die Aktivität der Neofrapeptine höher ist als die der Efrapeptine, was wiederum in den strukturenbenden Eigenschaften der Aminosäuren Acc und $\beta^{\text{Me}}\text{Pro}$ begründet liegt. Insbesondere das Analogon **66** weist ein ungewöhnlich hohes Inhibierungspotenzial auf.

Adenopeptin ist ein den Efrapeptinen strukturell ähnliches Peptid, welches von Pilzen der Gattung *Chrysosporium* produziert wird und wie die Efrapeptine zu den Peptantibiotika zählt. Es wurde von der Gruppe um Hayakawa isoliert, die Aminosäuresequenz bestimmt und auf zytotoxische Eigenschaften an mit Adenoviren onkogen transformierten Zellen untersucht.

Table 5.4: Sequenzen von Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101** (einzeln synthetisierte Fragmente sind markiert)

Adenopeptin 95	Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib Pip-L-Iva-X
	98 96 99
Adenopeptin-Analogon 101	Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva X
	98 102

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Adenopeptin **95** sowie das Adenopeptin-Analogon **101** erstmals synthetisiert werden. Die Gesamtmoleküle wurden jeweils wie die Efrapeptine aus drei, zunächst einzeln synthetisierten Fragmenten zusammengesetzt, einem *N*-terminalen Fragment, einem mittleren Fragment und einem *C*-terminalen Fragment. Als *N*-terminales Fragment bei der Synthese von Adenopeptin **95** diente Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98**. Als mittleres Fragment diente Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-OH **96**, während das *C*-terminale Fragment TFA·H-Pip-L-Iva-X **99** sich aus dem Dipeptid Fmoc-Pip-L-Iva-OH **97** und der von den Efrapeptinen bekannten Kopfgruppe **57** zusammensetzt (Tab. 5.4). Im Falle des Analogons **101** wurden die Fragmente Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98**, Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-OH **102** und die Kopfgruppe **57** verwendet.

Das synthetische Adenopeptin **95** und das Adenopeptin-Analogon **101** zeigen von den untersuchten Efrapeptinen verschiedene Sekundärstruktur motive, was CD-spektroskopisch festgestellt werden kann. Zum einen sind die CD-Effekte weniger stark ausgeprägt, zum anderen jedoch auch gegenüber den bei den Efrapeptinen gefundenen Banden verschoben. 3_{10} -helikale Sekundärstruktur motive scheinen zwar vorhanden zu sein, allerdings werden sie durch andere Strukturen ergänzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Syntheserfolge und konformationellen sowie biologischen Ergebnisse lassen ein detailliertes Bild über eine interessante Klasse von Peptidantibiotika zu. Um dieses Bild jedoch noch weiter zu verfeinern und noch genauere Einblicke in strukturelle Eigenschaften sowie die damit verbundene biologische Funktionalität zu erhalten, sind weitere Synthesen und Studien nötig. Zum einen ist es interessant, ob sich ein Austausch bestimmter Aminosäurebausteine auf die Struktur oder die biologische Aktivität auswirkt. Zum anderen ist es ebenfalls sinnvoll, das bereits sehr gut untersuchte Efrapeptin C beispielsweise im Komplex mit der F_1 -ATPase aus *E. coli* mit Hilfe der CD- und der VCD-Spektroskopie zu studieren. Auf diese Weise können strukturelle Veränderungen sowohl im Enzymkomplex, als auch im Efrapeptin C-Molekül unter physiologischen Bedingungen detektiert werden. Ein Vergleich mit NMR-Daten und der Röntgenstruktur des Efrapeptin C-ATPase-Komplexes könnte neue Erkenntnisse über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen liefern.

Ebenso ist es von Interesse, Adenopeptin detaillierter zu untersuchen. Gerade in Hinblick auf die biologische Aktivität besteht noch Forschungsbedarf, um klarere Aussagen über die zytotoxischen Eigenschaften dieses Peptaibiotikums treffen zu können. Auch die Efrapeptine sollten in dieser Hinsicht untersucht werden, da gerade die biologischen und medizinischen Ergebnisse von Papathanassiou *et al.* viel versprechend sind.

6

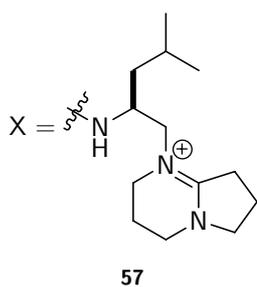
Summary

Peptaibiotics are Aib-rich peptides, which are produced by fungi and possess interesting biological and medicinal properties. Besides antibiotic and antimicrobial activity antiinflammatory, anticancerogenic or immunosuppressive effects have to be mentioned. The most important class of peptaibiotics are the peptaibols. However, more unusual species also belong to the class of peptaibiotics, of which some were synthesised and investigated in this thesis.

Efraeptins are peptaibiotics, which are produced by fungi of the *Tolypocladium* species as a microheterogenic mixture. They display activity as ATPase inhibitors, have anti-proliferative properties and are also active against the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*. Within the scope of this thesis efraeptins D–G 42–45 could be synthesised for the first time (Table 6.1). For this purpose it was reverted to the knowledge from the first total synthesis of efraeptin C by Jost *et al.*

Table 6.1: Sequences of efraeptins D–G 42–45 (separately synthesised segments are marked)

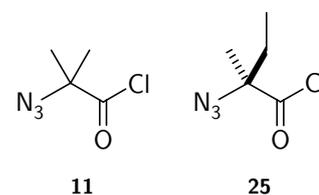
efraeptin D 42	Ac-Pip-Aib-Pip- Aib -Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva X
	48 46
efraeptin E 43	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva X
	49 46
efraeptin F 44	Ac-Pip-Aib-Pip- Aib -Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva X
	48 47
efraeptin G 45	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva X
	49 47



Scheme 6.1: Head group **57**

The complete molecule was assembled from three separately synthesised segments, an *N*-terminal, a central and a *C*-terminal one. The peptides Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **48** and Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **49** served as *N*-terminal segments during the synthesis of efrapeptins D–G **42–45**, while N_2 =Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **46** and N_2 =Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-OH **47** built the central part and the head group **57** (Scheme 6.1) represented the *C*-terminal ending.

Segments **48**, **49**, **46** and **47** were obtained by solid phase peptide synthesis using the extremely acid sensitive *o*-chlorotrityl resin. Besides standard coupling methods for the introduction of Fmoc-amino acids the azidoacid chloride method developed by Jost *et al.* was applied for the coupling of Aib- and L-Iva residues. The acylation of the resin bound amino component was carried out with highly reactive azidoacid chlorides α -azidoisobutyric acid chloride **11** (N_2 =Aib-Cl, Scheme 6.2) or *S*-2-azido-2-methylbutyric acid chloride **25** (L- N_2 =Iva-Cl, Scheme 6.2) under basic conditions (NEt_3). The resulting azidopeptidyl resin was subsequently reduced to the aminopeptidyl resin by the Vilarrasa reagent $[Et_3NH]^+[Sn(SPh)_3]^-$. The new enantiomerically pure L-isovaline building block L- N_2 =Iva-Cl **25** could be obtained in collaboration with scientists from DSM company via an enzymatic pathway transforming *rac*-2-amino-2-methylbutyric amide to L-isovaline by the L-amidase from *Mycobacterium neoaurum*. The amino acid building block *S*-2-azido-2-methylbutyric acid chloride was subsequently obtained by Cu^{II} -catalysed diazotransfer and conversion with thionyl chloride.



Scheme 6.2: The azidoacid chlorides **11** and **25**

The head group **57** was available by solution phase synthesis from DBN and L-leucinol. The coupling of the single segments was achieved with the reactive coupling reagent *N*-HATU in combination with HOAt. Thus, efrapeptins D–G **42–45** could be obtained and investigated with respect to conformational and biological properties.

CD-spectroscopic studies suggest a mostly 3_{10} -helical secondary structure of the efrapeptins D–G **42–45** with slight differences. Helical characteristics correlate well with biological activity towards the F_1 -ATPase from *E. coli*.

The well investigated efrapeptin C was chosen for a series of variations to allow more detailed conformational studies on the efrapeptins. On the one hand the head group modified analogue **69** served as auxiliary for conformational and biological tests (Scheme 6.3). On the other hand isotopically labelled efrapeptin C analogues were synthesised to facilitate NMR-spectroscopic studies (Table 6.2).

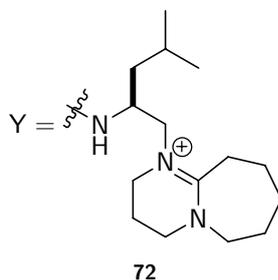
The synthesis of analogue **69** was carried out by further elaborating the approach of Jost *et al.* starting with the DBU derived head group **72**. Thus, the C-terminal segment TFA·H-Leu-Aib-Y **77** was obtained. The solution phase segment condensations again succeeded using *N*-HATU as reactive coupling reagent and additional HOAt.

Table 6.2: Amino acid sequences of isotopically labelled efrapeptin C analogues **79**, **80**, **81** and **82** (separately synthesised segments are marked)

Ac-Pip- Aib -Pip- ^{D₆} Aib- ^{D₆} Aib-Leu- ^β Ala-Gly ^{D₆} Aib- ^{D₆} Aib-Pip- ^{D₆} Aib-Gly Leu- Aib X	79
86	85
Ac-Pip- ^{D₆} Aib-Pip- ^{D₆} Aib- Aib -Leu- ^β Ala-Gly ^{D₆} Aib- ^{D₆} Aib-Pip- ^{D₆} Aib-Gly - Leu- ^{D₆} Aib X	80
87	83
Ac-Pip- ^{D₆} Aib-Pip- Aib - ^{D₆} Aib-Leu- ^β Ala-Gly ^{D₆} Aib- ^{D₆} Aib-Pip- ^{D₆} Aib-Gly - Leu- ^{D₆} Aib X	81
88	83
Ac-Pip- ^{D₆} Aib-Pip- ^{D₆} Aib- ^{D₆} Aib-Leu- ^β Ala-Gly ^{D₆} Aib- Aib -Pip- ^{D₆} Aib-Gly - Leu- ^{D₆} Aib X	82
89	84

CD-spectroscopic investigations reveal a mostly 3_{10} -helical structure for analogue **69**. The influence of the enlarged head group is only marginal, which is confirmed by comparison of the CD-spectra of analogue **69** and efrapeptin C. A small decrease in F₁-ATPase activity indicates that somewhat more space is required for the enlarged head group

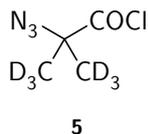
efrapeptin C analogue **69** Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-^βAla-Gly | Aib-Aib-Pip-Aib-Gly | Leu-Aib-Y **48** **70** **77**



Scheme 6.3: Efrapeptin C analogue **69** with a DBU derived head group (separately synthesised segments are marked)

when binding to the efrapeptin binding site.

The synthesis of the isotopically labelled Aib building block α -azidoisobutyric acid chloride-D₆ **5** (N₂=D₆Aib-Cl, Scheme 6.4) was carried out using a procedure starting from acetone cyanohydrin-D₆ **1** as developed in a preceding diploma thesis. It was optimised during the present thesis.



Scheme 6.4: α -Azidoisobutyric acid chloride-D₆ **5** (N₂=D₆Aib-Cl)

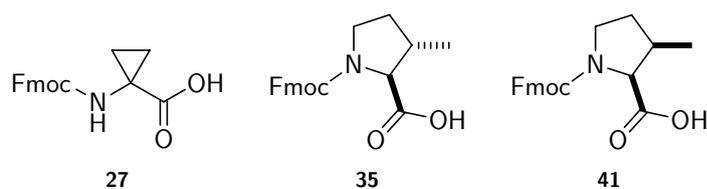
The introduction of this building block succeeded via the azidoacid chloride method. A total of four selectively isotopically labelled sequences were synthesised, which are a valuable support for NMR based conformational studies as the assignment of the remaining ¹H-NMR signals is simplified. However, it also turned out that the exchange of ¹H by ²H implicates a strong isotopic effect, which influences the analysis of the NMR spectra by resonance shifting.

This isotopic effect cannot be observed in CD-spectroscopic studies, in which the mostly ₃₁₀-helical secondary structure of the partially deuterated efrapeptins is confirmed. Investigations in a TFE/H₂O mixture provide additional information about the stability of the ₃₁₀-helical motifs under more physiological conditions. The stability decreases indeed, but the secondary structure is not destroyed.

Recently a new class of interesting peptaibiotics called neofrapeptins was discovered in addition to the well known efrapeptins. They feature similar biological and medicinal properties as the efrapeptins, but contain in addition to the amino acids known from the efrapeptins 1-aminocyclopropane carboxylic acid **26** and *trans*- β -methyl-L-proline **34**. Within the scope of this thesis neofrapeptins A **60** and F **63** as well as neofrapeptin F analogue **66** could be synthesised, which provides structural evidence of the natural product (Table 6.3).

Table 6.3: Sequences of neofrapeptins A **60** and F **63** and of neofrapeptin F analogue **66** (separately synthesised segments are marked)

neofrapeptin A 60	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- ^{β} Ala-Gly Acc-Aib- Pip -Aib-Gly-Leu-L-Iva X
	49 61
neofrapeptin F 63	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- ^{β} Ala-Gly Acc-Aib- <i>trans</i> -L- ^{β} MePro-Aib-Gly-Leu-L-Iva X
	49 64
neofrapeptin F analogue 66	Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- ^{β} Ala-Gly Acc-Aib- <i>cis</i> -L- ^{β} MePro -Aib-Gly-Leu-L-Iva X
	49 67



Scheme 6.5: The amino acids Fmoc-1-aminocyclopropane carboxylic acid **27**, Fmoc-*trans*- β -methyl-L-proline **35** and Fmoc-*cis*- β -methyl-L-proline **41**

Besides the Aib building block N_2 -Aib-Cl **11** and the L-Iva building block L- N_2 -Iva-Cl **25** the synthetic approach also required the Acc building block Fmoc-1-aminocyclopropane carboxylic acid **27** (Scheme 6.5). Additionally for neofrapeptin F **63** and neofrapeptin F analogue **66** the *trans*-L- β^{Me} Pro building block Fmoc-*trans*- β -methyl-L-proline **35** and the *cis*-L- β^{Me} Pro building block Fmoc-*cis*- β -methyl-L-proline **41** were needed (Scheme 6.5). While Fmoc-1-aminocyclopropane carboxylic acid **27** is commercially available the synthesis of Fmoc-*trans*- β -methyl-L-proline **35** and Fmoc-*cis*- β -methyl-L-proline **41** followed a synthetic route developed by Karoyan *et al.* for β -alkyl prolines, which was optimised during this thesis. As already known from efrapeptins D–G **42–45** the complete sequences were assembled from three separately synthesised segments using *N*-HATU and HOAt.

The synthetic success afforded detailed studies of this special kind of efrapeptins. The CD-spectroscopic analysis shows a more pronounced 3_{10} -helical structure than in the case of the efrapeptins. However, turn motifs, which might be due to the special amino acids Acc and β^{Me} Pro, cannot be excluded. The determination of the biological activity towards the F_1 -ATPase from *E. coli* allows a comparison of the synthetic neofrapeptins with the efrapeptins. It turns out that the activity of the neofrapeptins is higher than of the efrapeptins which again is due to the special structure designating amino acids Acc and β^{Me} Pro. Especially analogue **66** features an exceptionally high inhibition potential.

Adenopectin is a peptaibiotic, which is structurally related to the efrapeptins and is produced by fungi of the *Chrysosporium* species. It was isolated for the first time by the group of Hayakawa. They determined the amino acid sequence and tested the peptide for cytotoxicity towards cells, which were oncogenically transformed by adenoviruses.

In the scope of this thesis adenopectin **95** as well as adenopectin analogue **101** could be synthesised for the first time. Each of the complete molecules was assembled from three separately synthesised segments. In the case of adenopectin **95** Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98** served as *N*-terminal segment, Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-OH **96** as

central segment, while the *C*-terminal segment TFA·H-Pip-L-Iva-X **99** was build up from the dipeptide Fmoc-Pip-L-Iva-OH **97** and the head group **57** known from the efrapeptins (Table 6.4). In the case of analogue **101** the segments Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98**, Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-OH **102** and the head group **57** were used.

Table 6.4: Sequences of adenopeptin **95** and adenopeptin analogue **101** (separately synthesised segments are marked)

adenopeptin 95	Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib Pip-L-Iva-X
	98 96 99
adenopeptin analogue 101	Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva X
	98 102

The secondary structure motifs of synthetic adenopeptin **95** and adenopeptin analogue **101** differ from those found in efrapeptins, which was determined by CD-spectroscopy. On the one hand the CD-effects are less pronounced, on the other hand the bands are shifted compared to the spectra of the efrapeptins. Although there seem to be 3_{10} -helical motifs, different structural features are also observed.

The synthetic results as well as the conformational and biological data obtained within the scope of the present thesis provide a detailed insight into an outstandingly interesting class of peptaibiotics. To refine and to improve this insight into structural properties associated with biological functionality more synthetic, biological and analytical work is necessary. On the one hand it is of interest to discover the relationship between special amino acid building blocks, structure and function of new compounds. On the other hand it also makes sense to investigate well known efrapeptins, e. g. efrapeptin C, in the complex of F₁-ATPase from *E. coli* using CD- and VCD-spectroscopy. Thus, structural changes in both, the efrapeptin molecule and the enzymatic complex, can be detected. Comparison with NMR-data and the X-ray diffraction structure can provide new insight into structure activity relationship (SAR).

It is also of special interest to study adenopeptin in a more detailed way. Especially in terms of biological activity there is an urgent need to study cytotoxic properties of this peptaibiotic. The efrapeptins should be studied in this respect as well, especially since the biological and medicinal results of Papathanassiu *et al.* are quite promising.

7

Experimentelles

7.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

Schmelzpunkte

B-540 Schmelzpunktapparatur (Fa. Büchi), unkorrigiert.

Flashchromatographie

Kieselgel 60 (40–63 μm), Fa. Merck.

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F254), Fa. Merck; Detektion: UV (254 nm, MinUVIS, Fa. Desaga), Ninhydrin (Besprühen mit $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -Lösung in EtOH/AcOH 100:3 und anschließendes Erhitzen).

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 K_2CO_3 abdestilliert und über CaH_2 getrocknet. DMF wurde über Ninhydrin ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) unter Rückfluss erhitzt und im Vakuum destilliert. THF und Et_2O wurden über KOH vorgetrocknet und über Na/Benzophenon absolutiert. Toluol wurde von Na abdestilliert.

NMR-Spektroskopie

AC-250-P (Fa. Bruker), Messfrequenzen: ^1H -NMR: 250.13 MHz, ^{13}C -NMR: 62.9 MHz; DRX-500 (Fa. Bruker), Messfrequenzen: ^1H -NMR: 500.13 MHz, ^{13}C -NMR: 125.8 MHz; DRX-600 (Fa. Bruker), Messfrequenzen: ^1H -NMR: 600.13 MHz, ^{13}C -NMR: 150.9 MHz; Als interner Standard wurde TMS verwendet, oder es wurde auf das Solvenssignal referenziert. ^{13}C -NMR-Spektren wurden sowohl mit ^1H -Breitbandentkopplung als auch mit Hilfe der DEPT-Methode aufgenommen. In einigen Fällen wurden auch 2D-NMR-Spektren (^1H , ^1H -COSY, ^{13}C , ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC) aufgenommen.

IR-Spektroskopie

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

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 ($\lambda = 337 \text{ nm}$, Pulsbreite: 3 ns, Wiederholungsrate: 3 Hz). Beschleunigungsspannung: 20 kV, *Grid voltage*: 94 %, *Guide wire*: 0.05 %. In den meisten Fällen wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix verwendet. Es wurden jeweils dreißig bis vierzig Einzelspektren aufgenommen und gemittelt. Die Kalibrierung erfolgte mit Polyethylenglykol (PEG) als externem Standard auf demselben Target. Bei quartären Amidiniumsalzen wird das quartäre Amidiniumion als $[\text{M}]^+$ bezeichnet.

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 MeOH oder CH₂Cl₂ 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, Argon als Kühlgas. Bei quartären Amidiniumsalzen wird das quartäre Amidiniumion als [M]⁺ bezeichnet.

Analytische RP-HPLC

Pumpe: Thermo Separation Products P4000

Autosampler: Thermo Separation Products AS100

Detektor: Thermo Separation Products UV6000 LP, Detektion bei $\lambda = 220$ nm und $\lambda = 254$ nm

Controller: Thermo Separation Products SN4000

Vorsäule: Phenomenex® Vydac™ High Performance Guard Column, Protein and Peptide C18

Säule: Phenomenex® Jupiter Proteo C12 (4 μ m, 250×4.6 mm)

Eluenten A = H₂O/CH₃CN/TFA 95/5/0.1

B = H₂O/CH₃CN/TFA 5/95/0.1

Methode A Flussrate 1 ml·min⁻¹

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
3	100	0
30	0	100
40	100	0

Präparative RP-HPLC

Pumpe: Thermo Separation Products P4000

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

Controller: Thermo Separation Products SN4000

Vorsäule: Phenomenex® Vydac™ High Performance Guard Column, Protein and Peptide C18

Säule: Phenomenex® Jupiter Proteo C12 (10 μ m, 250×21.2 mm)

Eluenten A = H₂O/CH₃CN/TFA 95/5/0.1

B = H₂O/CH₃CN/TFA 5/95/0.1

Methode A Flussrate 10 ml·min⁻¹

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
5	100	0
40	0	100
50	100	0

Methode B Flussrate 10 ml·min⁻¹

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
5	100	0
40	0	100
50		100
60	100	0

Chirale analytische HPLC

Säule: Sumichiral OA 5000 (150 mm×4.6 mm ID) mit zusätzlicher Vorsäule

Eluent: 2 mM CuSO₄ in H₂O/MeOH (92.5 : 7.5)

Temperatur: 40 °C

Injektionsmenge: 5 μ l

Detektion: Reaktion mit *o*-Phtalaldehyd und 2-Mercaptoethanol unter Zugabe von EDTA in 0.4 M Boratpuffer und anschließende Fluoreszenzmessung bei $\lambda > 420$ nm.

Detektor: Hitachi F1000 CRO-Nr.: 049520

Methode A: Flussrate 1.0 ml·min⁻¹

Gaschromatographie

Shimadzu GC 17A Gaschromatograph

Säule: HP 5 MS (0.33 μm , 0.20 mm \times 25 m)

Methode A	Injektortemperatur	270 °C
	Starttemperatur	60 °C
	Heizrate	15 °C \cdot min ⁻¹
	Endtemperatur	270 °C
	Endzeit	21 min
Methode B	Injektortemperatur	280 °C
	Starttemperatur	75 °C
	Heizrate	10 °C \cdot min ⁻¹
	Endtemperatur	280 °C
	Endzeit	43.5 min

Polarimetrie

DIP-360 (Fa. Jasco).

CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden auf einem J-810 CD-Spektrometer (Fa. Jasco) von 185–300 nm bei RT mit folgenden Geräteeinstellungen aufgenommen: *band width*: 1 nm, *response*: 1 s, *sensitivity*: low, *datapitch*: 0.1 nm, *scanning speed*: 50 nm \cdot min⁻¹, *accumulation*: 5. Die Peptidkonzentrationen betragen 0.5 mg \cdot ml⁻¹ (1.5 mg \cdot ml⁻¹ bei Adenopeptin **95** und dem Adenopeptin-Analogon **101** und die Weglänge 0.2 mm.

Die gemessenen CD-Spektren wurden jeweils nach der Savatzky-Golay-Methode geglättet (im Falle von Adenopeptin **95** kam ein FFT-Filter zum Einsatz) und in die molare Eliptizität pro Aminosäurerest ($[\theta]_{\text{MRW}}$) transformiert.

ATPase-Aktivitätsassay

Der F₁-ATPase-Komplex wurde aus *E. coli*-Zellen nach literaturbekanntem Vorgehen isoliert.^[221] Die ATPase-Aktivität wurde nach Henkel *et al.* in einer Mikrotiterplatte mit Modifikationen nach Altendorf *et al.* bestimmt.^[224,225] Das Entstehen von

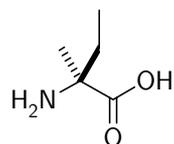
anorganischem Phosphat während der ATP-Hydrolyse wird photometrisch anhand eines Phosphomolybdat/Malachitgrün-Komplexes bestimmt.

Für die Inhibitionsassays wurden 0.5 µg gereinigte F₁-ATPase für 10 min bei 37°C in 50 µl Tris/MgCl₂-Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Peptide inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zugegeben.

7.2 Arbeitsvorschriften

7.2.1 Synthese von S-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid 25

L-Isovalin 21



Die Synthese wurde von Forschern der Firma DSM durchgeführt.

152.4 g (1.00 mol) *rac*-2-Amino-2-methylbuttersäureamid **19** werden in 900 ml H₂O gelöst und der pH-Wert durch Zugabe von 4 M NaOH auf 8.3 eingestellt. Die Lösung wird 1.5 h bei 38°C geschüttelt. Anschließend werden 4.70 g zuvor lyophilisiertes *Mycobacterium neoaurum* zugegeben und die Mischung 22 h bei 38°C geschüttelt. Dann werden weitere 2.56 g des Organismus zugefügt und die Mischung weitere 23 h bei 38°C geschüttelt, bis ein Umsatz von 30% bezogen auf die Menge des entstanden Ammoniaks erreicht wird. Die Zellmasse wird durch Zentrifugation entfernt.

Um das nicht umgesetzte Amid zurückzugewinnen, werden zunächst 2 ml Benzaldehyd zugefügt und die Reaktionsmischung 30 min gerührt. Anschließend werden unter Trübung der Mischung weitere 77 ml Benzaldehyd zugegeben und übers Wochenende gerührt. Die entstehenden hellgelben Kristalle werden filtriert und bei 50°C getrocknet.

Die so entstandene Schiff Base wird in 400 ml Aceton gelöst und 30.6 ml (365 mmol) HCl (37%) werden zugetropft. Der Reaktionsverlauf wird durch DC-Kontrolle (*i*BuOH, HCO₂H, H₂O 75:15:10) verfolgt und der entstandene Feststoff nach 5 h filtriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum bei 35°C getrocknet.

Die Aminosäure wird aus der wässrigen Phase durch Ionenaustauschchromatographie (Amberlyst A-26, stark basisch, 2 M HOAc) vom noch in Lösung befindlichen Amid getrennt. Die Aminosäurefraktion wird mit 4 M HCl auf pH 8 gebracht und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Für eine vollständige Trennung wird die Chromatographie wiederholt. Analyse mittels chiraler analytischer HPLC (Methode A) ergibt einen Enantiomerenüberschuss von 28 % für das D-Aminosäureamid und 81 % für die L-Aminosäure.

Eine zweite enzymatische Racematspaltung von *rac*-2-Amino-2-methylbuttersäureamid **19** wird nach Entfernung der HCl vom Amid durch Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Reaktionszeit beträgt 2.5 h, der Umsatz liegt bei 45 % bezogen auf den entstehenden Ammoniak, der Enantiomerenüberschuss der L-Aminosäure beträgt 71 %, während der des D-Aminosäureamids bei 53 % liegt.

82.9 g (708 mmol) der erhaltenen L-Aminosäure werden umkristallisiert, indem zunächst in 460 ml H₂O/ⁱPrOH 1:2 auf 80 °C erhitzt wird und anschließend 60 ml H₂O zugegeben werden und auf RT abgekühlt wird. Die Lösung wird über Nacht gerührt, wobei farblose Kristalle ausfallen. Danach wird die Mischung 1 h auf 0 °C gekühlt, filtriert und der Feststoff mit kaltem ⁱPrNH₂ gewaschen und bei 35 °C im Vakuum getrocknet. Der durch chirale analytische HPLC (Methode A) ermittelte Enantiomerenüberschuss beträgt 98 %.

Ausbeute: 51.9 g (443 mmol, 44 %)

Summenformel: C₅H₁₁NO₂

Molmasse: 117.15 g·mol⁻¹

¹H-NMR (500.13 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 0.99 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.71 (dq, ³J = 7.3 Hz, ³J = 7.3 Hz, ²J = 14.8 Hz, 1H, CH^aH^bCH₃), 1.92 (dq, ³J = 7.5 Hz, ³J = 7.5 Hz, ²J = 14.9 Hz, 1H, CH^aH^bCH₃), 4.91 (s, 3H, NH₃⁺).

¹³C{¹H}-NMR (125.8 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 8.7 (CH₂CH₃), 23.4 (CH₃), 31.9 (CH₂CH₃), 62.9 (C^α), 176.6 (COOH).

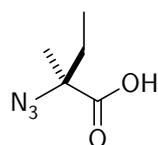
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3436.5, 3202.2, 3064.3, 2974.7, 2745.2, 2697.9, 2555.2, 2360.4, 2341.2, 2027.8, 1643.1, 1586.2 (st), 1553.4, 1462.7, 1406.8, 1376.0, 1338.4, 1294.0, 1225.5, 1183.1, 1037.5, 1006.7, 893.8, 804.2, 765.6, 618.1.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 117.9 [M + H]^+$, $139.8 [M + Na]^+$, $155.8 [M + K]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_5H_{12}NO_2]^+ = 118.1$, $[C_5H_{11}NO_2Na]^+ = 140.1$, $[C_5H_{11}NO_2K]^+ = 156.0$.

chirale analytische HPLC: $t_R = 7.80$ min (Methode A)

$[\alpha]_D^{25} = 9.95$ ($c = 1.0$, H_2O)

S-2-Azido-2-methylbuttersäure **24**



Eine Lösung von 14.2 g (219 mmol) NaN_3 in H_2O (30 ml) und CH_2Cl_2 (50 ml) wird innerhalb von 5 min bei $0^\circ C$ mit 12.4 g (44.0 mmol) Triflylanhydrid versetzt und 2 h bei $0^\circ C$ gerührt. Die CH_2Cl_2 -Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (2×25 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint und anschließend mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung gewaschen.

Die Triflylazid-Lösung in CH_2Cl_2 wird zu einer Lösung von 2.58 g (22.0 mmol) L-Isovalin **21**, 4.56 g (33.0 mmol) K_2CO_3 und $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in H_2O (60 ml) und MeOH (120 ml) gegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt.

Die organischen Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt, der Rückstand in 300 ml H_2O aufgenommen und mit konzentrierter HCl auf pH 6 angesäuert. Anschließend wird eine Phosphatpuffer-Lösung (300 ml, 0.25 M, pH 6.2) hinzugegeben und mit Ethylacetat (4×250 ml) extrahiert, um das Sulfonamid-Nebenprodukt zu entfernen. Die wässrige Phase wird dann mit konzentrierter HCl auf pH 2 gebracht und erneut mit Ethylacetat (3×300 ml) extrahiert. Anschließend wird über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einengen wird S-2-Azido-2-methylbuttersäure **24** als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 2.67 g (18.7 mmol, 85 %)

Summenformel: $C_5H_9N_3O_2$

Molmasse: $143.14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.99 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.52 (s, 3H, CH_3), 1.76 (dq, $^3J = 7.2$ Hz, $^2J = 14.2$ Hz, 1H, $\text{CH}^a\text{H}^b\text{CH}_3$), 1.89 (dq, $^3J = 7.4$ Hz, $^2J = 14.2$ Hz, 1H, $\text{CH}^a\text{H}^b\text{CH}_3$), 10.75 (s, 1H, COOH).

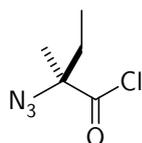
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.4 (CH_2CH_3), 21.9 (CH_3), 31.1 (CH_2CH_3), 66.8 (C^α), 178.9 (COOH).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3083.6, 2980.5, 2942.8, 2885.0, 2107.8 (st), 1714.4 (st), 1461.8, 1410.7, 1384.6, 1256.4, 1158.0, 1137.8, 1052.0, 1002.8, 928.6, 900.6, 779.1, 656.6.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 165.9$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, monoisotopische Masse berechnet für [$\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$] $^+$ = 166.1.

$[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -38.1$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2)

S-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid 25



Zu 4.95 g (34.6 mmol) *S*-2-Azido-2-methylbuttersäure **24** werden unter Erwärmen auf 30°C 3.91 ml (6.38 g, 53.6 mmol) Thionylchlorid innerhalb von 45 min getropft. Anschließend wird 1.5 h unter Rückfluss erhitzt und überschüssiges Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Destillation des Produkts im Wasserstrahlvakuum liefert eine hellgelbe Flüssigkeit.

Ausbeute: 4.46 g (27.6 mmol, 80 %)

Summenformel: $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$

Molmasse: $161.59 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Siedepunkt: 76–77°C, 50 mbar

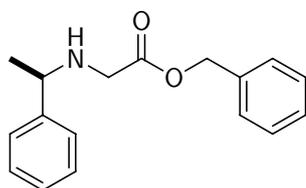
$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.00 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 1.85 (dq, $^3J = 7.2$ Hz, $^2J = 14.5$ Hz, 1H, $\text{CH}^a\text{H}^b\text{CH}_3$), 1.95 (dq, $^3J = 7.3$ Hz, $^2J = 14.4$ Hz, 1H, $\text{CH}^a\text{H}^b\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.2 (CH_2CH_3), 21.8 (CH_3), 31.1 (CH_2CH_3), 74.4 (C^α), 175.4 (COCl).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2981.4, 2942.8, 2885.0, 2109.7 (st), 1787.7 (st), 1716.3, 1458.9, 1383.7, 1294.0, 1250.6, 1160.9, 1127.2, 1056.8, 1003.8, 916.0, 837.0, 812.8, 781.0, 633.5.

7.2.2 Synthese von Boc-*cis*- β -methyl-D-prolin 32

(*R*-Phenylethylamino)essigsäurebenzylester 29



1.83 g (8.00 mmol) Bromessigsäurebenzylester werden bei 0°C unter Argon tropfenweise zu einer Lösung von 0.97 g (8.00 mmol) *R*-Phenylethylamin **28** in 5 ml trockenem DMSO gegeben. Nach 5 min Rühren bei RT werden 0.81 g (8.00 mmol) NEt_3 zugesetzt. Die Lösung wird weitere 10 min bei RT gerührt und anschließend mit 10 ml Ethylacetat versetzt und mit ges. NH_4Cl -Lösung (2×5 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (1×10 ml) extrahiert und die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Einengen ergibt einen gelben Rückstand, der durch Flashchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 12:1) gereinigt wird und eine hellgelbes Öl liefert.

Ausbeute: 1.43 g (5.32 mmol, 67 %)

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2$

Molmasse: $269.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

^1H -NMR (600.13 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.37 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.93 (s, 1H, NH), 3.31 (d, $^2J = 17.6$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^a\text{H}^b$), 3.34 (d, $^2J = 17.6$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^a\text{H}^b$), 3.79 (q, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, CHCH_3), 5.12 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 5.14 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 7.22–7.36 (m, 10H, H^{aryl}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150.9 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 24.2 (CHCH_3), 48.8 ($\text{C}^\alpha\text{H}_2$), 57.7 (CHCH_3), 66.5 (CH_2Ph), 126.8, 127.2, 128.29, 128.33, 128.51, 128.56 ($\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 135.6, 144.5 (C^{aryl}), 172.5 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3337.2, 3063.4, 3030.6, 2964.1, 2926.5, 1738.5 (st), 1603.5, 1494.6, 1453.1, 1372.1, 1348.7, 1255.4, 1187.0 (st), 1147.4, 1081.9, 993.2, 961.3, 913.1, 753.1, 700.0.

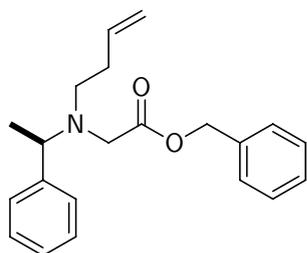
MS (ESI): $m \cdot z^{-1}$ = 270.1 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 292.1 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, monoisotopische Masse berechnet für [$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_2$] $^+$ = 270.2, [$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{Na}$] $^+$ = 292.1.

HPLC: t_{R} = 17.71 min (Methode A)

DC: R_{f} = 0.29 (Petrolether/Ethylacetat 5:1)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = 64.2 (c = 1.0, CHCl_3)

[*N*-But-3-enyl-*N*-(*R*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester 30



10.0 g (74.1 mmol) 4-Brom-1-buten und 7.50 g (74.1 mmol) NEt_3 werden unter Rühren zu einer Lösung von 8.32 g (30.9 mmol) (*R*-Phenylethylamino)essigsäurebenzylester **29** in 20 ml trockenem DMSO unter Argon gegeben und das Reaktionsgemisch 48 h auf 50 °C erwärmt. Anschließend wird mit 30 ml CH_2Cl_2 versetzt und die organische Phase mit ges. NH_4Cl -Lösung (2×30 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit CH_2Cl_2 (1×30 ml) extrahiert und die organischen Phasen vereinigt, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der braune Rückstand wird durch Flashchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 12:1) gereinigt und ergibt ein gelbes Öl.

Ausbeute: 2.16 g (6.68 mmol, 22 %)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_2$

Molmasse: 323.43 g·mol⁻¹

¹H-NMR (600.13 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.34 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, CHCH₃), 2.18–2.20 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2.65–2.71 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.34 (d, ²J = 17.3 Hz, 1H, C^αH^aH^b), 3.49 (d, ²J = 17.3 Hz, 1H, C^αH^aH^b), 4.05 (q, ³J = 6.7 Hz, 1H, CHCH₃), 4.92–5.00 (m, 2H, CH=CH₂), 5.04–5.18 (m, 2H, Benzyl-CH₂), 5.73 (m, 1H, CH=CH₂), 7.20–7.37 (m, 10H, H^{aryl}).

¹³C{¹H}-NMR (150.9 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 19.3 (CHCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 50.8 (NCH₂CH₂), 51.5 (C^αH₂), 60.4 (CHCH₃), 66.0 (CH₂Ph), 115.5 (CH=CH₂), 126.9, 127.5, 128.2, 128.5 (C^{aryl}H), 135.9 (CH=CH₂), 136.7, 144.5 (C^{aryl}), 172.0 (C=O).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3064.3, 3030.6, 2973.7, 2935.1, 2849.3, 1738.5 (st), 1640.2, 1601.6, 1493.6, 1454.1, 1419.4, 1372.1, 1212.0, 1163.8 (st), 1027.9, 994.1, 913.1, 844.7, 737.6, 700.0.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 324.2$ [M + H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₂₁H₂₆NO₂]⁺ = 324.2.

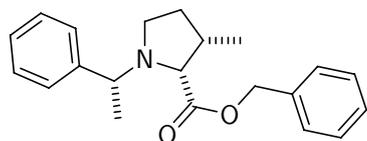
HPLC: $t_R = 20.16$ min (Methode A)

GC (Methode A): $t_R = 25.25$ min (90 %)

DC: $R_f = 0.82$ (Petrolether/Ethylacetat 5:1)

$[\alpha]_D^{26} = 24.9$ ($c = 1.0$, CHCl₃)

***N*-(*R*-Phenylethyl)-β-*S*-methyl-*R*-prolinbenzylester 31**



Zu einer Lösung von 269 μl (3.71 mmol) HN(^{*i*}Pr)₂ in 8 ml Et₂O werden bei –78 °C 2.32 ml (3.71 mmol) *n*-BuLi (1.6 M in *n*-Hexan) getropft. Die Reaktionsmischung wird 20 min bei –78 °C und 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird erneut auf –78 °C gekühlt und 1.00 g (3.09 mmol) [*N*-But-3-enyl-*N*-(*R*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester **30** zugegeben. Nach 5 min werden 9.27 ml (9.27 mmol) ZnBr₂ (1 M in Et₂O)

zugefügt und die Reaktionsmischung langsam auf RT erwärmt. Nach 40 min wird mit 25 ml ges. NH_4Cl -Lösung versetzt, die wässrige Phase mit Et_2O (3×25 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NH_4Cl -Lösung (2×50 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 12:1) gereinigt und liefert ein gelbes Öl.

Ausbeute: 628 mg (1.94 mmol, 63 %)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_2$

Molmasse: $323.43 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

^1H -NMR (600.13 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{C}^\gamma\text{H}_3$), 1.33 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.63 (m, 1H, $\text{C}^\gamma\text{H}^a\text{H}^b$), 1.97 (m, 1H, $\text{C}^\gamma\text{H}^a\text{H}^b$), 2.43 (m, 1H, $\text{C}^\delta\text{H}^a\text{H}^b$), 2.89 (m, 1H, $\text{C}^\delta\text{H}^a\text{H}^b$), 3.04 (m, 1H, C^βH), 3.38 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, C^αH), 3.70 (m, 1H, CHCH_3), 5.06 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 5.09 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 7.19–7.36 (m, 10H, H^{aryl}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150.9 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 15.7 ($\text{C}^\gamma\text{H}_3$), 22.8 (CHCH_3), 31.9 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 36.6 (C^βH), 50.5 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$), 61.7 (CHCH_3), 65.7 (C^αH), 67.4 (CH_2Ph), 127.0, 127.4, 128.1, 128.2, 128.4, 128.6 ($\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 136.0, 144.6 (C^{aryl}), 173.3 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3063.4, 3030.6, 2966.0, 2932.2, 2874.4, 1728.9 (st), 1604.5, 1492.6, 1454.1, 1372.1, 1355.7, 1306.5, 1211.1, 1150.3 (st), 1089.6, 1029.8, 979.7, 914.1, 842.7, 765.6, 700.0.

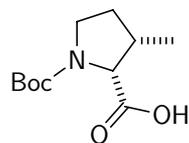
MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 324.2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_2]^+ = 324.2$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 19.40$ min (Methode A)

GC (Methode A): $t_{\text{R}} = 23.88$ min (97 %)

DC: $R_{\text{f}} = 0.46$ (Petrolether/Ethylacetat 5:1)

$[\alpha]_{\text{D}}^{27} = 53.3$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*cis*- β -methyl-D-prolin 32**

Zu einer Lösung von 1.17 g (3.62 mmol) *N*-(*R*-Phenylethyl)- β -*S*-methyl-*R*-prolinbenzylester **31** in 25 ml Methanol werden bei RT 790 mg (3.62 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat und 500 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT unter einer H₂-Atmosphäre gerührt. Anschließend wird filtriert, der Katalysator gründlich mit Methanol gewaschen und eingeengt. Der Rückstand wird durch RP-HPLC (Methode A) gereinigt. Lyophilisation ergibt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 611 mg (2.66 mmol, 73 %)

Summenformel: C₁₁H₁₉NO₄

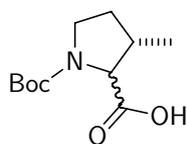
Molmasse: 229.27 g·mol⁻¹

¹H-NMR (250.13 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.09 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 3H, C ^{γ} H₃), 1.42, 1.45 (2×s, 9H, Boc-CH₃), 1.75 (m, 1H, C ^{γ} H^aH^b), 1.96 (m, 1H, C ^{γ} H^aH^b), 2.53 (m, 1H, C ^{β} H), 3.33 (m, 1H, C ^{δ} H^aH^b), 3.65 (m, 1H, C ^{δ} H^aH^b), 4.20 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, C ^{α} H), 8.09 (s, 1H, COOH).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3436.5, 2976.6 (st), 2934.2, 2864.7, 1745.3, 1706.7, 1445.4, 1382.7, 1350.9, 1151.3, 1121.4 (st), 1076.1, 1043.3, 934.3, 844.7, 792.6.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1}$ = 229.9 [M + H]⁺, 251.9 [M + Na]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₁₁H₂₀NO₄]⁺ = 230.1, [C₁₁H₁₉NO₄Na]⁺ = 252.1.

HPLC: t_R = 18.76 min (Methode A)

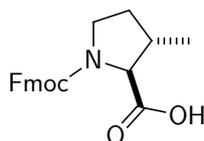
N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*cis*/*trans*- β -methyl-DL-prolin **33*

Zu einer Lösung von 138 μl (1.91 mmol) $\text{HN}(i\text{Pr})_2$ in 8 ml Et_2O werden bei -78°C 1.19 ml (1.91 mmol) *n*-BuLi (1.6 M in *n*-Hexan) getropft. Die Reaktionsmischung wird 20 min bei -78°C und 1 h bei 0°C gerührt. Anschließend wird erneut auf -78°C gekühlt und 200 mg (0.87 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*cis*- β -methyl-D-prolin **32** zugegeben. Innerhalb von 30 min wird auf RT erwärmt und mit 15 ml ges. NH_4Cl -Lösung versetzt. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand in Methanol aufgenommen. Das erhaltene Diastereomerengemisch wird HPL-chromatographisch analysiert.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

Molmasse: $229.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HPLC: $t_R = 18.86/19.01 \text{ min}$ (Methode A), 1 : 1-Diastereomerengemisch

7.2.3 Synthese von Fmoc-*trans*- β -Methyl-L-prolin **35**

Zu einer Lösung von 250 mg (1.94 mmol) *trans*- β -Methyl-L-prolin **34** in 28 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$ (1 : 1) werden bei RT 718 mg (2.13 mmol) 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-succinimid und 179 mg (2.13 mmol) NaHCO_3 gegeben und die Reaktionsmischung übers Wochenende gerührt. Zugabe von Wasser und anschließende Lyophilisation ergibt einen farblosen Feststoff, der durch präparative RP-HPLC (Methode A) gereinigt wird.

Ausbeute: 623 mg (1.77 mmol, 91 %)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$

Molmasse: 351.40 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 57–59 °C

¹H-NMR (500.13 MHz, MeOH): δ [ppm] = 1.15, 1.17 (2×d, ³J = 6.9 Hz, 3H, CHCH₃), 1.58 (m, 1H, C^γH^aH^b), 2.09 (m, 1H, C^γH^aH^b), 2.40 (m, 1H, C^βH), 3.47 (m, 1H, C^δH^aH^b), 3.59 (m, 1H, C^δH^aH^b), 4.17–4.27 (m, 2H, C^αH, Fmoc-CH), 4.32–4.44 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 7.31–7.42 (m, 4H, H^{aryl}), 7.62–7.82 (m, 4H, H^{aryl}).

¹³C{¹H}-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 18.7, 19.0 (C^γH₃), 32.4 (*cis*-C^γH₂), 33.4 (*trans*-C^γH₂), 40.0 (*trans*-C^βH), 41.0 (*cis*-C^βH), 46.9, 47.3 (C^δH₂), 48.4, 48.5 (Fmoc-CH), 67.1, 67.4 (Fmoc-CH₂), 68.6, 69.0 (C^αH), 120.9, 126.2, 128.2, 128.8 (C^{aryl}H), 142.6, 145.0, 145.1, 145.4 (C^{aryl}), 156.5, 156.6 (Fmoc-C=O), 175.7, 175.9 (C=O).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3481.9, 3065.3, 2966.0, 2361.4, 1701.9 (st), 1540.9, 1432.9 (st), 1356.7, 1288.2, 1176.4 (st), 1118.5, 1032.7, 971.0, 910.2, 758.9, 739.6 (st), 689.4, 620.0.

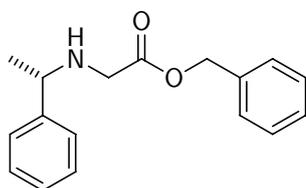
MS (ESI): $m \cdot z^{-1}$ = 352.2 [M + H]⁺, 374.2 [M + Na]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₂₁H₂₂NO₄]⁺ = 352.2, [C₂₁H₂₁NO₄Na]⁺ = 374.1.

HPLC: t_R = 24.90 min (Methode A)

$[\alpha]_D^{25}$ = -54.9 (c = 1.0, CH₂Cl₂)

7.2.4 Synthese von Fmoc-*cis*-β-Methyl-L-prolin 41

(*S*-Phenylethylamino)essigsäurebenzylester 37



17.3 g (76.0 mmol) Bromessigsäurebenzylester werden bei 0 °C unter Argon tropfenweise zu einer Lösung von 9.21 g (76.0 mmol) *S*-Phenylethylamin **36** in 25 ml trockenem DMSO gegeben. Nach 5 min Rühren bei RT werden 7.69 g (76.0 mmol) NEt₃ zugesetzt.

Die Lösung wird weitere 10 min bei RT gerührt und anschließend mit 10 ml Ethylacetat versetzt und mit ges. NH_4Cl -Lösung (2×25 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (1×50 ml) extrahiert und die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Einengen ergibt einen gelben Rückstand, der durch Flashchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 12:1) gereinigt wird und ein gelbes Öl liefert.

Ausbeute: 13.3 g (49.4 mmol, 65 %)

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2$

Molmasse: $269.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

^1H -NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.38 (d, $^3J = 6.6$ Hz 3H, CHCH_3), 1.88 (s, 1H, NH), 3.27 (d, $^2J = 17.6$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^a\text{H}^b$), 3.34 (d, $^2J = 17.6$ Hz, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^a\text{H}^b$), 3.79 (q, $^3J = 6.6$ Hz 1H, CHCH_3), 5.12 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 5.15 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 7.22–7.37 (m, 10H, H^{aryl}).

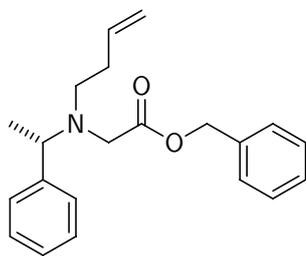
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 24.2 (CHCH_3), 48.8 ($\text{C}^\alpha\text{H}_2$), 57.7 (CHCH_3), 66.5 (CH_2Ph), 126.8, 127.2, 128.29, 128.34, 128.51, 128.56 ($\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 135.6, 144.5 (C^{aryl}), 172.5 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3337.2, 3063.4, 3030.6, 2964.1, 1738.5 (st), 1494.6, 1453.1, 1372.1, 1348.9, 1255.4, 1187.0 (st), 1147.4, 962.3, 753.1, 700.0.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 270.1$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 292.1 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_2]^+ = 270.2$, $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{Na}]^+ = 292.1$.

DC: $R_f = 0.22$ (Petrolether/Ethylacetat 5:1)

$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -62.3$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

[*N*-But-3-enyl-*N*-(*S*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester 38

16.1 g (119 mmol) 4-Brom-1-buten und 12.0 g (119 mmol) NEt_3 werden unter Rühren zu einer Lösung von 13.3 g (49.4 mmol) (*S*-Phenylethylamino)essigsäurebenzylester **37** in 25 ml trockenem DMSO unter Argon gegeben und das Reaktionsgemisch 48 h auf 50 °C erwärmt. Anschließend wird mit 30 ml Dichlormethan versetzt und die organische Phase mit ges. NH_4Cl -Lösung (2×30 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit CH_2Cl_2 (1×30 ml) extrahiert und die organischen Phasen vereinigt, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der braune Rückstand wird durch Flashchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 12:1) gereinigt und ergibt ein gelbes Öl.

Ausbeute: 4.28 g (13.2 mmol, 27 %)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_2$

Molmasse: $323.43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

^1H -NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.34 (d, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$ 3H, CHCH_3), 2.15–2.23 (m, 2H, NCH_2CH_2), 2.61–2.77 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.34 (d, $^2J = 17.6 \text{ Hz}$, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^a\text{H}^b$), 3.49 (d, $^2J = 17.6 \text{ Hz}$, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H}^a\text{H}^b$), 4.04 (q, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$ 1H, CHCH_3), 4.93–5.01 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.07–5.15 (m, 2H, Benzyl- CH_2), 5.73 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.20–7.37 (m, 10H, H^{aryl}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 19.3 (CHCH_3), 32.5 (NCH_2CH_2), 50.8 (NCH_2CH_2), 51.5 ($\text{C}^\alpha\text{H}_2$), 60.4 (CHCH_3), 66.0 (CH_2Ph), 115.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 126.9, 127.5, 128.2, 128.5 ($\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 135.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 136.7, 144.5 (C^{aryl}), 172.0 ($\text{C}=\text{O}$).

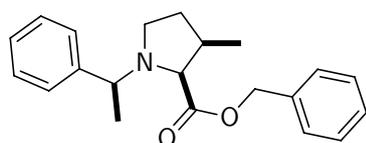
IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3064.3, 3031.6, 2973.7, 1737.6 (st), 1639.2, 1493.6, 1454.1, 1371.1, 1163.8 (st), 994.1, 913.1, 736.7, 699.1.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 324.3 [M + H]^+$, $346.2 [M + Na]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{21}H_{26}NO_2]^+ = 324.2$, $[C_{21}H_{25}NO_2Na]^+ = 346.2$.

DC: $R_f = 0.39$ (Petrolether/Ethylacetat 12:1)

$[\alpha]_D^{28} = -28.2$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$)

***N*-(*S*-Phenylethyl)- β -*R*-methyl-*S*-prolinbenzylester 39**



Zu einer Lösung von 629 μ l (8.68 mmol) $HN(^iPr)_2$ in 20 ml Et_2O werden bei $-78^\circ C$ 5.43 ml (8.68 mmol) n -BuLi (1.6 M in n -Hexan) getropft. Die Reaktionsmischung wird 20 min bei $-78^\circ C$ und 1 h bei $0^\circ C$ gerührt. Anschließend wird erneut auf $-78^\circ C$ gekühlt und 2.34 g (7.23 mmol) [*N*-But-3-enyl-*N*-(*S*-phenylethyl)amino]-essigsäurebenzylester **38** zugegeben. Nach 5 min werden 21.7 ml (21.7 mmol) $ZnBr_2$ (1 M in Et_2O) zugefügt und die Reaktionsmischung langsam auf RT erwärmt. Nach 40 min wird mit 60 ml ges. NH_4Cl -Lösung versetzt, die wässrige Phase mit Et_2O (3×50 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NH_4Cl -Lösung (2×50 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 12:1) gereinigt und liefert ein hellgelbes Öl.

Ausbeute: 438 g (1.35 mmol, 19 %)

Summenformel: $C_{21}H_{25}NO_2$

Molmasse: $323.43 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1H -NMR (500.13 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 0.88 (d, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$ 3H, $C^{\gamma}H_3$), 1.33 (d, $^3J = 6.4 \text{ Hz}$ 3H, $CHCH_3$), 1.63 (m, 1H, $C^{\gamma}H^aH^b$), 1.97 (m, 1H, $C^{\gamma}H^aH^b$), 2.43 (m, 1H, $C^{\delta}H^aH^b$), 2.89 (m, 1H, $C^{\delta}H^aH^b$), 3.05 (m, 1H, $C^{\beta}H$), 3.38 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$ 1H, $C^{\alpha}H$), 3.70 (m, 1H, $CHCH_3$), 5.02 (d, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 5.09 (d, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, 1H, Benzyl- CH^aH^b), 7.20–7.37 (m, 10H, H^{aryl}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 15.7 ($\text{C}^\gamma\text{H}_3$), 22.8 (CHCH_3), 31.9 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 36.6 (C^βH), 50.5 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$), 61.7 (CHCH_3), 65.7 (C^αH), 67.4 (CH_2Ph), 127.0, 127.4, 128.1, 128.2, 128.4, 128.6 ($\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 136.0, 144.5 (C^{aryl}), 173.3 ($\text{C}=\text{O}$).

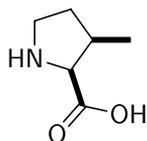
IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2967.0, 1728.9 (st), 1492.6, 1454.1, 1371.1, 1150.3 (st), 979.7, 914.1, 765.6, 700.0.

MS (ESI): $m\cdot z^{-1}$ = 324.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 346.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_2]^+ = 324.2$, $[\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_2\text{Na}]^+ = 346.2$.

DC: $R_f = 0.44$ (Petrolether/Ethylacetat 5:1)

$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -105.2$ ($c = 0.16$, CHCl_3)

cis- β -Methyl-L-prolin 40



Zu einer Lösung von 438 mg (1.35 mmol) *N*-(*S*-Phenylethyl)- β -*R*-methyl-*S*-prolinbenzylester **39** in 20 ml Methanol werden bei RT 500 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT unter einer H_2 -Atmosphäre gerührt. Anschließend wird filtriert, der Katalysator gründlich mit Methanol gewaschen und eingengt. Lyophilisation ergibt einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 152 mg (1.18 mmol, 87%)

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$

Molmasse: $129.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: Zersetzung bei 175°C

^1H -NMR (500.13 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 1.06 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 3H, $\text{C}^\gamma\text{H}_3$), 1.74 (m, 1H, $\text{C}^\gamma\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 2.18 (m, 1H, $\text{C}^\gamma\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 2.66 (m, 1H, C^βH), 3.22 (m, 1H, $\text{C}^\delta\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 3.45 (m, 1H, $\text{C}^\delta\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 3.94 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, C^αH), 4.86 (s, 2H, NH_2^+).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 15.3 ($\text{C}^{\gamma'}\text{H}_3$), 33.0 ($\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$), 36.1 (C^{β}H), 45.1 ($\text{C}^{\delta}\text{H}_2$), 66.8 ($\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 172.1 ($\text{C}=\text{O}$).

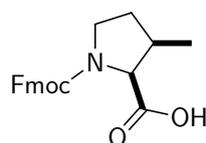
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3446.2, 2970.8, 2360.4, 1619.9, 1403.0, 1214.9, 758.9 (st), 668.2, 626.8, 615.2.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1}$ = 130.0 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 151.9 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2]^+$ = 130.1, $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Na}]^+$ = 152.1.

HPLC: t_{R} = 16.99 min (Methode A)

$[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ = -52.6 (c = 0.5, Methanol)

***N*-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-*cis*- β -methyl-L-prolin 41**



Zu einer Lösung von 135 mg (1.05 mmol) *cis*- β -Methyl-L-prolin **40** in 15 ml H_2O /Aceton (1:1) werden bei RT 391 mg (1.16 mmol) 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-succinimid und 97.5 mg (1.16 mmol) NaHCO_3 gegeben und die Reaktionsmischung übers Wochenende gerührt. Zugabe von Wasser und anschließende Lyophilisation ergibt einen farblosen Feststoff, der durch RP-HPLC (Methode A) gereinigt wird.

Ausbeute: 198 mg (0.563 mmol, 54 %)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$

Molmasse: $351.40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 75°C

^1H -NMR (500.13 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 1.10, 1.11 ($2 \times \text{d}$, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, CHCH_3), 1.75 (m, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 2.03 (m, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 2.57 (m, 1H, C^{β}H), 3.40 (m, 1H, $\text{C}^{\delta}\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 3.67 (m, 1H, $\text{C}^{\delta}\text{H}^{\text{a}}\text{H}^{\text{b}}$), 4.16–4.30 (m, 2H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$, Fmoc-CH), 4.31–4.43 (m, 2H, Fmoc- CH_2), 7.30–7.45 (m, 4H, H^{aryl}), 7.61–7.85 (m, 4H, H^{aryl}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 15.2, 15.3 ($\text{C}^\gamma\text{H}_3$), 32.0 (*cis*- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 32.9 (*trans*- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$), 37.1 (*trans*- C^βH), 38.1 (*cis*- C^βH), 47.2, 47.6 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$), 48.3, 48.4 (Fmoc-CH), 64.3, 64.6 (Fmoc- CH_2), 68.7, 69.2 (C^αH), 120.9, 126.2, 128.2, 128.8 ($\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 142.6, 145.0, 145.2, 145.3 (C^{aryl}), 156.4, 156.6 (Fmoc-C=O), 174.7, 174.8 (C=O).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3467.4, 2926.5, 1703.8 (st), 1430.0 (st), 1357.6, 1153.2, 1119.5, 758.9, 739.6.

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1}$ = 353.29 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 375.36 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 391.34 $[\text{M} + \text{K}]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4]^+ = 352.15$, $[\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Na}]^+ = 374.14$, $[\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{K}]^+ = 390.11$.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1}$ = 351.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 373.9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4]^+ = 352.2$, $[\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Na}]^+ = 374.1$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 24.72$ min (Methode A)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6.2$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2)

7.2.5 Festphasenpeptidsynthese

Beladung des *o*-Chlortritylchloridharzes

Das *o*-Chlortritylchloridharz (1 Äq) wird in trockenem CH_2Cl_2 (ca. 1 ml/100 mg Harz) gequollen und mit einer Lösung der Fmoc-Aminosäure bzw. der Azidosäure (2 Äq) und DIPEA (6 Äq) in wenig DMF (ca. 1 $\mu\text{l} \cdot \text{mg}^{-1}$) versetzt. Die Mischung wird 1.5 h bei RT geschüttelt, anschließend mit Methanol (ca. 100 $\mu\text{l}/100$ mg Harz) versetzt, nach weiteren 5 min abgesaugt und mit CH_2Cl_2 (4 \times) und Methanol (4 \times) gewaschen. Über Nacht wird im Vakuum getrocknet. Die Beladung wird im Falle einer Azidosäure anhand der Gewichtszunahme des Harzes bestimmt. Im Falle einer Fmoc-Aminosäure wird die Beladung anhand der UV-Absorption der Abspaltprodukte der Fmoc-Gruppe (Piperidin-Dibenzofulven-Addukt) bei 290 nm bestimmt. Hierzu wird 1.0 mg des beladenen Harzes in einer Küvette mit 3 ml einer Abspallösung (20 % Piperidin in DMF) versetzt und so lange bei RT belassen, bis die Absorption der Lösung konstant ist. Die Beladung kann mit Hilfe der gemessenen Absorption anhand der von Müller beschriebenen Methode ermittelt werden.^[243]

Einführung einer Aminosäure nach der Fmoc-Methode

Die Fmoc-Aminosäure (3 Äq) wird gemeinsam mit dem Kupplungsreagenz (*N*-TBTU für lineare Aminosäuren oder BOP für cyclische Aminosäuren, 3 Äq) in einer möglichst kleinen Menge DMF gelöst und mit DIPEA (6 Äq) versetzt. Die Lösung wird gut durchmischt und nach 30 s zum Peptidylharz (1 Äq) gegeben. Die Reaktionsmischung wird unter gelegentlichem Schütteln 45–60 min bei RT belassen. Anschließend wird der Erfolg der Kupplung kontrolliert, indem eine kleine Menge Harz entnommen und mit CH₂Cl₂ gewaschen wird und das Peptid mit HFIP (20 % in CH₂Cl₂) vom Harz abgespalten und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert wird. Ist die Reaktion nicht vollständig, wird die Reaktionszeit verlängert oder die Kupplung der Fmoc-Aminosäure erneut durchgeführt. Nach beendeter Reaktion wird das Harz abgesaugt und mit CH₂Cl₂ (3×), DMF (3×), erneut CH₂Cl₂ (3×) und 2-Propanol (2×) gewaschen.

Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird eine Lösung von 4 % DBU und 4 % Piperidin in DMF (ca. 3 ml/100 mg Harz) zum Harz gegeben und die Mischung 15 min unter gelegentlichem Schütteln bei RT belassen. Nach Waschen mit DMF (1×) wird die Prozedur wiederholt. Anschließend wird das Harz abgesaugt und mit CH₂Cl₂ (3×), DMF (3×), erneut CH₂Cl₂ (3×) und 2-Propanol (2×) gewaschen.

Einführung von α -Aminoisobuttersäure, L-Isovalin und α -Aminoisobuttersäure-D₆ nach der Azidosäurechloridmethode

Das Peptidylharz (1.0 Äq) wird in einer Lösung von NEt₃ (10 Äq) in trockenem CH₂Cl₂ (ca. 3 ml/100 mg Harz) gequollen und langsam mit dem entsprechenden Azidosäurechlorid (N₂=Aib-Cl **11**, *S*-2-Azido-2-methylbuttersäurechlorid **25** oder N₂=^D₆ Aib-Cl **5**, 7 Äq) versetzt. Die Reaktionsmischung wird unter gelegentlichem Schütteln 30–45 min bei RT belassen. Anschließend wird der Erfolg der Kupplung kontrolliert, indem eine kleine Menge Harz entnommen, mit CH₂Cl₂ gewaschen, das Peptid mit HFIP (20 % in CH₂Cl₂) vom Harz abgespalten und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert wird. Ist die Reaktion nicht vollständig, wird die Reaktionszeit verlängert oder die Kupplung des Azidosäurechlorids erneut durchgeführt. Nach beendeter Reaktion wird das Harz abgesaugt und mit CH₂Cl₂ (3×), DMF (3×), erneut CH₂Cl₂ (3×) und 2-Propanol (2×) gewaschen.

Zur Reduktion wird eine Suspension von Sn(SPh)₂ (10 Äq) in trockenem CH₂Cl₂ mit Thiophenol (30 Äq) und NEt₃ (50 Äq) versetzt und gut durchmischt. Nach 5 min wird

filtriert und das Filtrat zum Harz-gebundenen Azid gegeben. Die Reaktionsmischung wird unter gelegentlichem Schütteln 20 min bei RT belassen, wobei eine N₂-Entwicklung zu beobachten ist. Nach beendeter Reaktion wird das Harz abgesaugt und mit CH₂Cl₂ (3×), DMF (3×), erneut CH₂Cl₂ (3×) und 2-Propanol (2×) gewaschen.

Acetylierung des *N*-Terminus

DMAP (6.7 Äq) wird in trockenem CH₂Cl₂ (ca. 2 ml/100 mg Harz) gelöst, mit Essigsäureanhydrid (10 Äq) versetzt und gut durchmischt. Die Lösung wird zum Peptidylharz (1.0 Äq) gegeben und unter gelegentlichem Schütteln 40 min bei RT belassen. Anschließend wird der Erfolg der Kupplung kontrolliert, indem eine kleine Menge Harz entnommen und mit CH₂Cl₂ gewaschen wird und das Peptid mit HFIP (20% in CH₂Cl₂) vom Harz abgespalten und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert wird. Ist die Reaktion nicht vollständig, wird die Reaktionszeit verlängert. Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionsmischung vom Harz abgesaugt und mit CH₂Cl₂ (3×), DMF (3×), erneut CH₂Cl₂ (3×) und 2-Propanol (2×) gewaschen.

Abspaltung des Peptids vom *o*-Chlortritylharz mit HFIP

Das Peptidylharz (1.0 Äq) wird in CH₂Cl₂ (ca. 2 ml/100 mg Harz) gequollen und mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (ca. 0.5 ml/100 mg Harz) versetzt. Die Reaktionsmischung wird unter gelegentlichem Rühren 1 h bei RT belassen und das Harz anschließend abgesaugt. Das Harz wird gründlich mit CH₂Cl₂ und Methanol gewaschen, das Filtrat im Vakuum eingengt und der Rückstand lyophilisiert.

7.2.6 Fragmentkondensation

Falls nicht anders angegeben, erfolgen sämtliche Fragmentkondensationen nach dem folgenden einheitlichen Ablauf.

Zu einer gerührten Lösung der Carboxykomponente (1.1–1.3 Äq), *N*-HATU (1.2–1.3 Äq) und HOAt (1.0 Äq) in DMF (ca. 500 µl/10 mg Carboxykomponente) wird bei 0 °C unter Argon DIPEA (3.3–4.2 Äq) gegeben. Nach 5–10 min wird die Aminokomponente (1.0 Äq)

in trockenem CH_2Cl_2 (ca. 1 ml/10 mg Aminokomponente) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei RT gerührt, bis der Erfolg der Reaktion durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann (einige Stunden bis mehrere Tage). Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt.

Sollen **57** oder **72** als Aminokomponente eingesetzt werden, wird von **55** bzw. **71** ausgegangen und zunächst die Boc-Schutzgruppe mit HCl (25 % in H_2O) entfernt und anschließend das Produkt lyophilisiert.

Eine am *N*-Terminus des Peptids befindliche Schutzgruppe wird vor der Isolierung des Produktes abgespalten.

- Fmoc-Schutzgruppe

Der Rückstand wird in eine Lösung von HNEt_2 (20 %) in DMF (ca. 1 ml/10 mg Carboxykomponente) aufgenommen und gerührt, bis der Erfolg der Reaktion durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann (30–60 min). Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt.

- Azidogruppe

Der Rückstand wird in Methanol (ca. 1 ml/10 mg Carboxykomponente) und Essigsäure (ca. 0.1 ml/10 mg Carboxykomponente) aufgenommen, mit Palladium (10%) auf Aktivkohle versetzt und in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt, bis der Erfolg der Reaktion durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann (über Nacht). Der Katalysator wird abfiltriert, gründlich mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Produkt wird durch präparative RP-HPLC isoliert.

7.2.7 Synthese der Efrapeptine D–G 42–45

Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH 48

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.11 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 30.0 mg (38.5 μmol , 13 %)

Summenformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_8\text{O}_{10}$

Molmasse: 778.94 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 801.68 [M + Na]^+$, 817.70 [M + K]⁺, 823.75 [M + 2Na - H]⁺, 839.71 [M + Na + K - H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₃₇H₆₂N₈O₁₀Na]⁺ = 801.45, [C₃₇H₆₂N₈O₁₀K]⁺ = 817.42, [C₃₇H₆₁N₈O₁₀Na₂]⁺ = 823.43, [C₃₇H₆₁N₈O₁₀NaK]⁺ = 839.40.

HPLC: $t_R = 18.99$ min (Methode A)

Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu-^βAla-Gly-OH 49

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.26 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 15.0 mg (18.9 μmol, 6 %)

Summenformel: C₃₈H₆₄N₈O₁₀

Molmasse: 792.96 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 815.34 [M + Na]^+$, 831.35 [M + K]⁺, 837.38 [M + 2Na - H]⁺, 853.36 [M + Na + K - H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₃₈H₆₄N₈O₁₀Na]⁺ = 815.46, [C₃₈H₆₄N₈O₁₀K]⁺ = 831.44, [C₃₈H₆₃N₈O₁₀Na₂]⁺ = 837.45, [C₃₇H₆₁N₈O₁₀NaK]⁺ = 853.42.

HPLC: $t_R = 19.97$ min (Methode A)

N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH 46

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.14 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 27.3 mg (40.2 μmol, 13 %)

Summenformel: C₃₁H₅₃N₉O₈

Molmasse: 679.81 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 702.61 [M + Na]^+$, $718.62 [M + K]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{31}H_{53}N_9O_8Na]^+ = 702.39$, $[C_{31}H_{53}N_9O_8K]^+ = 718.36$.

HPLC: $t_R = 25.05$ min (Methode A)

N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-OH 47

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.14 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 23.1 mg (33.3 μmol, 11 %)

Summenformel: C₃₂H₅₅N₉O₈

Molmasse: 693.83 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 717.45 [M + Na]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{32}H_{55}N_9O_8Na]^+ = 716.41$.

HPLC: $t_R = 26.47$ min (Methode A)

TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X 58

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 8.9 mg (19.7 μmol, 1.0 Äq) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Amino-komponente und 14.7 mg (21.6 μmol, 1.1 Äq) N₂=Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **46** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 4.0 mg (3.68 μmol, 19 %)

Summenformel: C₄₈H₈₀F₆N₁₀O₁₁

Molmasse: 1087.20 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 859.96 [M]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{44}H_{79}N_{10}O_7]^+ = 859.61$.

HPLC: $t_R = 28.03$ min (Methode A)

TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-X 59

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 13.6 mg (30.2 μmol , 1.0 $\text{\AA}\text{q}$) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Aminokomponente und 23.1 mg (33.3 μmol , 1.1 $\text{\AA}\text{q}$) N_2 -Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **46** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 6.2 mg (5.64 μmol , 19 %)

Summenformel: $\text{C}_{49}\text{H}_{82}\text{F}_6\text{N}_{10}\text{O}_{11}$

Molmasse: 1101.23 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 873.97$ $[\text{M}]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{45}\text{H}_{81}\text{N}_{10}\text{O}_7]^+ = 873.63$.

HPLC: $t_R = 19.56$ min (Methode A)

Efrapeptin D 42

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 4.2 mg (3.90 μmol , 1.0 $\text{\AA}\text{q}$) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **58** als Aminokomponente und 3.9 mg (5.07 μmol , 1.3 $\text{\AA}\text{q}$) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **48** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 1.2 mg (0.692 μmol , 18 %)

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

Molmasse: 1734.10 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.74–0.92 (m, 21H, Iva- H^γ , X- H^δ , Leu- H^δ), 1.09–2.19 (m, 72H), 2.05 (s, 3H, Ac- CH_3), 2.15–2.40 (m, 2H), 2.71 (m, 1H), 2.87–3.18 (m, 2H), 3.20–3.38 (m, 7H), 3.50–3.63 (m, 5H), 3.64–3.74 (m, 3H), 3.83–3.95

(m, 1H), 3.97–4.05 (m, 2H), 4.06–4.29 (m, 3H), 4.97 (m, 1H, X-**H α**), 5.03 (m, 1H, Pip-**H α**), 5.16 (m, 1H, Pip-**H α**), 5.34 (m, 1H, Pip-**H α**), 6.95 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, X-NH), 7.12 (s, 1H, Iva-NH), 7.52 (m, 1H, $^{\beta}$ Ala-NH), 7.57 (s, 1H, Aib-NH), 7.65 (s, 1H, Aib-NH), 7.66 (s, 1H, Aib-NH), 7.73 (m, 1H, Leu-NH), 7.96 (m, 1H, Leu-NH), 8.09 (s, 1H, Aib-NH), 8.12 (s, 1H, Aib-NH), 8.25 (s, 1H, Aib-NH), 8.32 (m, 1H, Gly-NH), 8.45 (m, 1H, Gly-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1621.78$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₁H₁₃₉N₁₈O₁₆]⁺ = 1621.11.

HPLC: $t_R = 23.90$ min (Methode A)

Efrapeptin E 43

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 4.0 mg (3.68 μ mol, 1.0 \AA q) TFA-H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **58** als Aminokomponente und 3.8 mg (4.79 μ mol, 1.3 \AA q) Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- $^{\beta}$ Ala-Gly-OH **49** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 3.1 mg (1.77 μ mol, 48 %)

Summenformel: C₈₄H₁₄₁F₃N₁₈O₁₈

Molmasse: 1748.12 g·mol⁻¹

¹H-NMR (600.13 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 0.77 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 3H, Leu-**H δ**), 0.78 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, X-**H δ**), 0.79 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, Leu-**H δ**), 0.80 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 3H, Iva-**H γ**), 0.82 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, Iva-**H γ**), 0.86 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 3H, X-**H δ**), 0.87 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, Leu-**H δ**), 0.89 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, Leu-**H δ**), 1.15 (m, 1H, X-**H β**), 1.23–2.21 (m, 33H), 1.28 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 2.08 (s, 3H, Ac-**CH₃**), 2.28–2.34 (m, 1H), 2.35–2.41 (m, 1H), 2.72 (m, 1H), 2.88–3.00 (m, 1H), 3.15–3.22 (m, 1H), 3.51–3.62 (m, 8H), 3.65–3.73 (m, 8H), 3.92 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 4.07–4.24 (m, 2H), 4.21 (m, 1H, X-**H α**), 4.33 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 5.00 (m, 1H, Pip-**H α**), 5.01 (m, 1H, Pip-**H α**), 5.34 (m, 1H, Pip-**H α**), 6.95 (d, $^3J = 9.2$ Hz, 1H, X-NH), 7.12 (s, 1H, Iva-NH), 7.52 (m, 1H, $^{\beta}$ Ala-NH), 7.53 (s, 1H, Aib-NH), 7.57 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, Leu-NH), 7.66 (s, 1H, Aib-NH), 7.69 (s, 1H, Iva-NH), 7.87 (d,

$^3J = 5.6$ Hz, 1H, Leu-NH), 7.99 (s, 1H, Aib-NH), 8.15 (s, 1H, Aib-NH), 8.24 (s, 1H, Aib-NH), 8.34 (m, 1H, Gly-NH), 8.45 (m, 1H, Gly-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1635.52$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₂H₁₄₁N₁₈O₁₆]⁺ = 1635.13.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 1634.07784$, monoisotopische Masse berechnet für [C₈₂H₁₄₁N₁₈O₁₆]⁺ = 1634.07675.

HPLC: $t_R = 27.12$ min (Methode A)

Efrapeptin F 44

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 4.0 mg (3.64 μ mol, 1.0 \AA q) TFA-H-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-X **59** als Aminokomponente und 3.1 mg (3.98 μ mol, 1.1 \AA q) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **48** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 0.5 mg (0.286 μ mol, 8 %)

Summenformel: C₈₄H₁₄₁F₃N₁₈O₁₈

Molmasse: 1748.12 g·mol⁻¹

¹H-NMR (600.13 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 0.75–0.92 (m, 21H, Iva-H γ , X-H δ , Leu-H δ), 1.15 (m, 1H, X-H β), 1.19–2.18 (m, 72H), 2.05 (s, 3H, Ac-CH₃), 2.27–2.44 (m, 2H), 2.61 (m, 1H), 2.75–3.03 (m, 2H), 3.13–3.26 (m, 7H), 3.53–3.75 (m, 8H), 3.84 (m, 1H), 3.94–4.24 (m, 4H), 3.96 (m, 1H, Ala-H α), 4.19 (m, 1H, X-H α), 4.33 (m, 1H) 4.49 (m, 1H), 4.97 (m, 1H, Pip-H α), 5.03 (m, 1H, Pip-H α), 5.22 (m, 1H, Pip-H α), 6.89 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, X-NH), 7.06 (s, 1H, Iva-NH), 7.52 (m, 1H, β Ala-NH), 7.55 (s, 1H, Aib-NH), 7.60 (s, 1H, Aib-NH), 7.62 (m, 1H, Ala-NH), 7.67 (s, 1H, Aib-NH), 7.71 (s, 1H, Aib-NH), 7.81 (m, 1H, Leu-NH), 7.95 (m, 1H, Leu-NH), 8.15 (s, 1H, Aib-NH), 8.23 (s, 1H, Aib-NH), 8.33 (m, 1H, Gly-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1634.21$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₂H₁₄₁N₁₈O₁₆]⁺ = 1635.13.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 817.54184$, monoisotopische Masse berechnet für
 $[\text{C}_{82}\text{H}_{142}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^{2+} = 817.54201$; 828.53271 , monoisotopische Masse berechnet für
 $[\text{C}_{82}\text{H}_{141}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^{2+} = 828.53298$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 27.61$ min (Methode A)

Efrapeptin G 45

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 4.0 mg (3.64 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-L-Iva-X **59** als Aminokomponente und 3.2 mg (4.04 μmol , 1.1 $\text{\AA}q$) Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **49** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 1.1 mg (0.625 μmol , 17 %)

Summenformel: $\text{C}_{85}\text{H}_{143}\text{F}_3\text{N}_{18}\text{O}_{18}$

Molmasse: $1762.15 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0.76–0.90 (m, 24H, Iva- H^γ , X- H^δ , Leu- H^δ), 1.15 (m, 1H, X- H^β), 1.20–2.19 (m, 34H), 1.23 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 2.05 (s, 3H, Ac- CH_3), 2.38 (m, 2H), 2.61 (m, 1H), 2.75–2.99 (m, 2H), 3.13–3.25 (m, 7H), 3.49–3.60 (m, 7H), 3.84 (m, 1H), 3.94–4.29 (m, 4H), 4.19 (m, 1H, X- H^α), 4.24 (m, 1H, Ala- H^α) 4.33 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 5.01 (m, 1H, Pip- H^α), 5.12 (m, 1H), 5.22 (m, 1H, Pip- H^α), 5.32 (m, 1H, Pip- H^α), 6.89 (m, 1H, X-NH), 7.05 (s, 1H, Iva-NH), 7.08 (s, 1H, Aib-NH), 7.35 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, Leu-NH), 7.53 (m, 2H, β Ala-NH, Aib-NH), 7.57 (m, 1H, Leu-NH), 7.60 (s, 1H, Aib-NH), 7.68 (s, 1H, Iva-NH), 8.01 (s, 1H, Aib-NH), 8.15 (s, 1H, Aib-NH), 8.24 (m, 1H, Ala-NH), 8.34 (m, 1H, Gly-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1650.01$ [M] $^+$, isotopengemittelte Masse berechnet für
 $[\text{C}_{82}\text{H}_{141}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+ = 1649.16$.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 824.54921$, monoisotopische Masse berechnet für
 $[\text{C}_{83}\text{H}_{144}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^{2+} = 824.54984$; 835.53960 , monoisotopische Masse berechnet für
 $[\text{C}_{83}\text{H}_{143}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^{2+} = 835.54081$.

HPLC: $t_R = 28.11$ min (Methode A)

7.2.8 Synthese von Neofrapeptin A 60

Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH 49

Synthese und analytische Daten s. Kapitel 7.2.7 auf Seite 158.

Fmoc-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH 61

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.1 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 28.7 mg (32.8 μ mol, 11 %)

Summenformel: C₄₆H₆₃N₇O₁₀

Molmasse: 874.03 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 896.54$ [M + Na]⁺, 912.60 [M + K]⁺, 934.66 [M + Na + K - H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₄₆H₆₃N₇O₁₀Na]⁺ = 896.45, [C₄₆H₆₃N₇O₁₀K]⁺ = 912.43, [C₄₆H₆₂N₇O₁₀NaK]⁺ = 934.41.

HPLC: $t_R = 28.91$ min (Methode A)

TFA·H-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X 62

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 10.3 mg (22.8 μ mol, 1.0 \AA q) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Aminokomponente und 21.9 mg (25.1 μ mol, 1.1 \AA q) Fmoc-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **61** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 7.2 mg (6.63 μ mol, 29 %)

Summenformel: C₄₈H₇₈F₆N₁₀O₁₁

Molmasse: $1085.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 857.96 \text{ [M]}^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{44}\text{H}_{77}\text{N}_{10}\text{O}_7]^+ = 857.60$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 19.07 \text{ min}$ (Methode A)

Neofrapeptin A 60

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 7.2 mg (6.63 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) TFA-H-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **62** als Aminokomponente und 6.8 mg (8.58 μmol , 1.1 $\text{\AA}q$) Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **49** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 2.8 mg (1.60 μmol , 24 %)

Summenformel: $\text{C}_{84}\text{H}_{139}\text{F}_3\text{N}_{18}\text{O}_{18}$

Molmasse: $1746.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 0.80 (m, 3H, Iva- H^γ), 0.82 (m, 3H, Iva- H^γ), 0.83 (d, $^3J = 7.3 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 0.85 (d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 3H, X- H^δ), 0.87 (d, $^3J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 0.88 (d, $^3J = 5.9 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 0.95 (d, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 1.15 (m, 1H, X- H^γ), 1.26 (m, 4H, Acc- H^β), 1.27–1.71 (m, 46H), 1.28 (s, 3H, Aib- H^β), 1.30 (s, 3H, Iva- H^β), 1.35 (s, 3H, Aib- H^β), 1.36 (s, 3H, Aib- H^β), 1.40 (s, 3H, Aib- H^β), 1.76 (s, 3H, Iva- H^β), 2.05 (s, 3H, Ac- CH_3), 2.39–2.43 (m, 2H), 2.92–3.19 (m, 4H), 3.30–3.67 (m, 14H), 3.92–4.48 (m, 10H), 5.01 (m, 1H, Pip- H^α), 5.02 (m, 1H, Pip- H^α), 5.27 (m, 1H, Pip- H^α), 6.96 (d, $^3J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, X-NH), 7.12 (s, 1H, Iva-NH), 7.53 (s, 1H, Aib-NH), 7.57 (m, 1H, β Ala-NH), 7.58 (m, 1H, Leu-NH), 7.64 (s, 1H, Aib-NH), 7.83 (d, $^3J = 5.7 \text{ Hz}$, 1H, Leu-NH), 7.93 (s, 1H, Aib-NH), 8.00 (s, 1H, Iva-NH), 8.23 (s, 1H, Aib-NH), 8.39 (m, 1H, Gly-NH), 8.55 (m, 1H, Gly-NH), 8.64 (s, 1H, Acc-NH).

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 1632.88 \text{ [M]}^+$, isotopengemittelte Masse berechnet für $[\text{C}_{82}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+ = 1633.12$.

MS (ESI-FT-ICR): $m\cdot z^{-1} = 816.53240$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{82}\text{H}_{140}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^{2+} = 816.53419$; 825.04615, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{82}\text{H}_{143}\text{N}_{19}\text{O}_{16}]^{2+} = 825.04746$; 827.52388, monoisotopische Masse berechnet für

$[\text{C}_{82}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^{2+} = 827.52516; 1632.06194$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{82}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^{+} = 1632.06110$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 27.23$ min (Methode A)

7.2.9 Synthese von Neofrapeptin F 63

Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH 49

Synthese und analytische Daten s. Kapitel 7.2.7 auf Seite 158.

Fmoc-Acc-Aib-*trans*-L- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH 64

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.91 mmol·g⁻¹, 0.2 mmol).

Ausbeute: 28.1 mg (32.1 μ mol, 16 %)

Summenformel: $\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{10}$

Molmasse: 874.03 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 896.10$ [M + Na]⁺, 912.12 [M + K]⁺, 918.19 [M + 2Na - H]⁺, 934.21 [M + Na + K - H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{Na}]^{+} = 896.45$, $[\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{K}]^{+} = 912.43$, $[\text{C}_{46}\text{H}_{62}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{Na}_2]^{+} = 919.44$, $[\text{C}_{46}\text{H}_{62}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{NaK}]^{+} = 934.41$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 26.93$ min (Methode A)

TFA·H-Acc-Aib-*trans*-L- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X 65

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 13.2 mg (29.2 μ mol, 1.0 \AA q) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Amino-komponente und 28.1 mg (32.1 μ mol, 1.1 \AA q) Fmoc-Acc-Aib-*trans*-L- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **64** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 17.2 mg (16.1 μmol , 55 %)

Summenformel: $\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{F}_6\text{N}_{10}\text{O}_{10}$

Molmasse: $1068.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 856.28 [\text{M}]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{44}\text{H}_{77}\text{N}_{10}\text{O}_7]^+ = 857.60$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 17.75 \text{ min}$ (Methode A)

Neofrapeptin F 63

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 17.0 mg (15.9 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) TFA \cdot H-Acc-Aib-*trans*-L- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **65** als Aminokomponente und 16.4 mg (20.7 μmol , 1.3 $\text{\AA}q$) Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **49** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 12.2 mg (6.99 μmol , 44 %)

Summenformel: $\text{C}_{84}\text{H}_{139}\text{F}_3\text{N}_{18}\text{O}_{18}$

Molmasse: $1746.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 0.88–1.01 (m, 11H, Iva- H^γ , X- H^δ , *trans*- β^{Me} Pro- H^γ , Acc- H^β), 0.90 (d, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 0.92 (d, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, X- H^δ), 0.94 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 0.96 (d, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 0.97 (t, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 3H, Iva- H^γ), 0.99 (d, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, Leu- H^δ), 1.19 (m, 2H), 1.30–2.25 (m, 29H), 1.43 (s, 3H, Aib- H^β), 1.45 (s, 3H, Aib- H^β), 1.48 (s, 3H, Aib- H^β), 1.49 (s, 9H, Aib- H^β , 2 \times Iva- H^β), 1.52 (s, 3H, Aib- H^β), 1.53 (s, 3H, Aib- H^β), 1.54 (s, 3H, Aib- H^β), 1.60 (s, 3H, Aib- H^β), 2.20 (s, 3H, Ac- CH_3), 2.36 (m, 2H), 2.74 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 3.08 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.31–3.46 (m, 6H), 3.59–3.74 (m, 7H), 3.80–3.87 (m, 3H), 3.91–4.11 (m, 7H), 4.39 (m, 1H, X- H^α), 4.48 (m, 1H, Pip- H^α), 5.23 (m, 1H, Pip- H^α), 6.78 (d, $^3J = 9.3 \text{ Hz}$, 1H, X-NH), 6.97 (s, 1H, Iva-NH), 7.42 (s, 1H, Aib-NH), 7.45 (s, 1H, Aib-NH), 7.53 (d, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 1H, Leu-NH), 7.59 (m, 1H, β Ala-NH), 7.82 (s, 1H, Iva-NH), 7.84 (m, 1H, Gly-NH), 7.88 (s, 1H, Aib-NH), 7.96 (s, 1H, Aib-NH), 8.04 (m, 1H, Gly-NH), 8.06 (s, 1H, Acc-NH), 8.07 (d, $^3J = 5.0 \text{ Hz}$, 1H, Leu-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1631.19$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₂H₁₃₉N₁₈O₁₆]⁺ = 1633.12.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 1632.06070$, monoisotopische Masse berechnet für [C₈₂H₁₃₉N₁₈O₁₆]⁺ = 1632.06110; 827.52510, monoisotopische Masse berechnet für [C₈₂H₁₃₉N₁₈O₁₆Na]²⁺ = 827.52516.

HPLC: $t_R = 25.83$ min (Methode A)

7.2.10 Synthese des Neofrapeptin F-Analogons 66

Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu-^βAla-Gly-OH 49

Synthese und analytische Daten s. Kapitel 7.2.7 auf Seite 158.

Fmoc-Acc-Aib-*cis*-L-^βMePro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH 67

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.91 mmol·g⁻¹, 0.2 mmol).

Ausbeute: 51.8 mg (59.3 μmol, 30 %)

Summenformel: C₄₆H₆₃N₇O₁₀

Molmasse: 874.03 g·mol⁻¹

HPLC: $t_R = 26.57$ min (Methode A)

TFA·H-Acc-Aib-*cis*-L-^βMePro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X 68

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 24.3 mg (53.8 μmol, 1.0 Äq) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Amino-komponente und 51.7 mg (59.2 μmol, 1.1 Äq) Fmoc-Acc-Aib-*cis*-L-^βMePro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-OH **67** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 26.6 mg (24.9 μmol, 46 %)

Summenformel: $C_{48}H_{77}F_6N_{10}O_{10}$

Molmasse: $1068.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 857.72 [M]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{44}H_{77}N_{10}O_7]^+ = 857.60$.

HPLC: $t_R = 17.50 \text{ min}$ (Methode A)

Neofrapeptin F-Analagon 66

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 25.6 mg (24.0 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) TFA·H-Acc-Aib-*cis*-L- β^{Me} Pro-Aib-Gly-Leu-L-Iva-X **68** als Aminokomponente und 24.7 mg (31.2 μmol , 1.3 $\text{\AA}q$) Ac-Pip-Aib-Pip-L-Iva-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **49** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 11.3 mg (6.47 μmol , 27 %)

Summenformel: $C_{84}H_{139}F_3N_{18}O_{18}$

Molmasse: $1746.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 0.88–1.03 (m, 11H, Iva- \mathbf{H}^γ , X- \mathbf{H}^δ , *cis*- β^{Me} Pro- \mathbf{H}^γ , Acc- \mathbf{H}^β), 0.90 (d, $^3J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 0.93 (d, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, X- \mathbf{H}^δ), 0.96 (d, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 0.97 (t, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 3H, Iva- \mathbf{H}^γ), 0.99 (d, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 1.01 (d, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 1.20 (m, 2H), 1.38–2.25 (m, 32H), 1.46 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.48 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.49 (s, 9H, Aib- \mathbf{H}^β , 2×Iva- \mathbf{H}^β), 1.52 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.53 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.54 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.59 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 2.20 (s, 3H, Ac- \mathbf{CH}_3), 2.36 (m, 2H), 2.55 (m, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 3.09 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 3.25–3.47 (m, 6H), 3.62–3.75 (m, 7H), 3.79–3.88 (m, 3H), 3.91–4.11 (m, 6H), 4.25 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H), 4.39 (m, 1H, X- \mathbf{H}^α), 4.51 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^α), 5.23 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^α), 6.79 (d, $^3J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, X-NH), 6.96 (s, 1H, Iva-NH), 7.39 (s, 1H, Aib-NH), 7.45 (s, 1H, Aib-NH), 7.54 (d, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H, Leu-NH), 7.59 (m, 1H, β Ala-NH), 7.81 (s, 1H, Iva-NH), 7.83 (m, 1H, Gly-NH), 7.90 (s, 1H, Aib-NH), 8.03 (s, 1H, Acc-NH), 8.04 (m, 1H, Gly-NH), 8.07 (s, 1H, Aib-NH), 8.11 (d, $^3J = 4.8 \text{ Hz}$, 1H, Leu-NH).

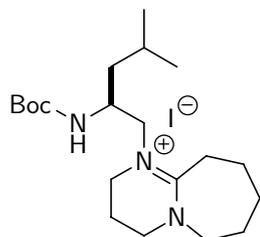
MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1630.58 [M]^+$, isotopengemittelte Masse berechnet für $[C_{82}H_{139}N_{18}O_{16}]^+ = 1633.12$.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 1632.06133$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{82}H_{139}N_{18}O_{16}]^+ = 1632.06110$; 816.53470, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{82}H_{140}N_{18}O_{16}]^{2+} = 816.53419$; 827.52510, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{82}H_{139}N_{18}O_{16}Na]^{2+} = 827.52516$.

HPLC: $t_R = 25.97$ min (Methode A)

7.2.11 Synthese des Efrapeptin C Analogons 69 mit einer von DBU abgeleiteten Kopfgruppe

1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8,9,10-octahydropyrimido[1,2-*a*]azepin-1-ium-iodid 71



Eine Lösung von 252 mg (770 μ mol, 1.0 \AA q) *S*-2-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylamino)-4-methyl-1-iodpentan **54** und 128 μ l (858 μ mol, 1.1 \AA q) DBU in 6 ml Toluol wird 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT fällt über Nacht ein farbloser Niederschlag aus. Die überstehende Lösung wird entfernt, der Niederschlag mit Et_2O gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 295 mg (616 μ mol, 79 %)

Summenformel: $C_{20}H_{38}IN_3O_2$

Molmasse: 479.44 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 0.89 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 0.93 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, $\text{C}^\delta\text{H}_3$), 1.19 (ddd, $^3J = 4.4$ Hz, $^3J = 9.3$ Hz, $^2J = 13.8$ Hz, 1H, $\text{C}^\beta\text{H}^a\text{H}^b$), 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.47 (m, 1H, C^γH), 1.64–1.85 (m, 7H, $\text{C}^\beta\text{H}^a\text{H}^b$,

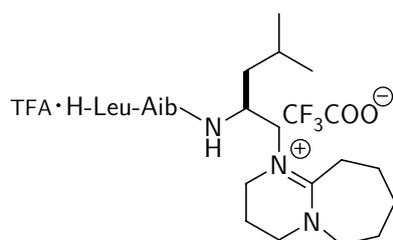
$3 \times \text{CH}_2$), 2.03–2.20 (m, 2H, CH_2), 2.83 (m, 1H, $\text{C}^{\varepsilon 2'} \text{H}^{\text{a}} \text{H}^{\text{b}}$), 2.96 (m, 1H, $\text{C}^{\varepsilon 2'} \text{H}^{\text{a}} \text{H}^{\text{b}}$), 3.37 (dd, $^3J = 3.8 \text{ Hz}$, $^2J = 15.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{C}^{\beta'} \text{H}^{\text{a}} \text{H}^{\text{b}}$), 3.44–3.50 (m, 3H, $1.5 \times \text{CH}_2$), 3.52–3.70 (m, 3H, $1.5 \times \text{CH}_2$), 3.66 (dd, $^3J = 10.7 \text{ Hz}$, $^2J = 15.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{C}^{\beta'} \text{H}^{\text{a}} \text{H}^{\text{b}}$), 3.90 (m, 1H, $\text{C}^{\alpha} \text{H}$), 5.38 (d, $^3J = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 20.2 (CH_2), 21.7 ($\text{C}^{\delta} \text{H}_3$), 23.2 ($\text{C}^{\delta} \text{H}_3$), 23.5 (CH_2), 25.2 ($\text{C}^{\gamma} \text{H}$), 26.3 (CH_2), 28.4 (Boc- CH_3), 28.8 (CH_2), 28.9 (CH_2), 40.9 (CH_2), 48.0 ($\text{C}^{\alpha} \text{H}$), 48.5 (CH_2), 50.0 (CH_2), 55.9 (CH_2), 59.0 (CH_2), 79.9 ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 156.5 (Boc- $\text{C}=\text{O}$), 167.9 ($\text{N}-\text{C}=\text{N}$).

MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 296.20$ [$\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8$] $^+$, 352.31 [M] $^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2]^+ = 296.23$, $[\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_2]^+ = 352.30$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 18.41 \text{ min}$ (Methode A)

L-Leucyl- α -aminoisobutyryl-1-[(2S)-2-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8,9,10-octahydropyrimido[1,2-*a*]azepin-1-ium-trifluoracetat 77



Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 150 mg (313 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) 1-[(2S)-2-N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8,9,10-octahydropyrimido[1,2-*a*]azepin-1-ium-iodid **71** als Aminokomponente und 120 mg (379 μmol , 1.2 $\text{\AA}q$) Boc-Leu-Aib-OH **75** als Carboxykomponente.

Nach erfolgreicher Kupplung werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand in 2 ml CH_2Cl_2 gelöst und bei 0°C mit 4 ml TFA versetzt. Nach 0.5 h wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in wenig H_2O aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt wird durch präparative RP-HPLC als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 21.7 mg (32.0 μmol , 10 %)

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{F}_6\text{N}_5\text{O}_6$

Molmasse: 677.72 g·mol⁻¹

¹H-NMR (500.13 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 0.85 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, Y-H^δ), 0.89 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, Y-H^δ), 0.92 (d, ³J = 5.7 Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.94 (d, ³J = 5.7 Hz, 3H, Leu-H^δ), 1.11 (ddd, ³J = 4.2 Hz, ³J = 9.4 Hz, ²J = 13.7 Hz, 1H, Y-H^β), 1.41 (s, 3H, Aib-H^β), 1.47 (s, 3H, Aib-H^β), 1.50–1.66 (m, 2H), 1.61 (m, 1H, Y-H^γ), 1.66–1.76 (m, 5H, Leu-H^β, Leu-H^γ, Y-H^β), 1.86 (m, 2H), 2.00 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 3.25 (dd, ³J = 3.1 Hz, ²J = 14.4 Hz, 1H, Y-H^{β'}), 3.37–3.55 (m, 5H), 3.66 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 4.14 (m, 1H, Y-H^α), 7.53 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, Y-NH), 8.29 (s, 1H, Aib-NH), 8.80 (s, 3H, Leu-NH₃).

¹³C{¹H}-NMR (125.8 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 20.2 (Y-C^{β1'}), 21.6 (Leu-C^γ), 22.1 (Leu-C^δ), 22.5 (Leu-C^δ), 23.28 (Y-C^γ), 23.34 (Y-C^δ), 24.7 (C-C^δ), 25.0 (3C, Y-C^{δ2'}, 2×Aib-C^β), 25.7 (Y-C^{γ2'}), 26.3 (Y-C^{ε2'}), 28.7 (Y-C^{β2'}), 40.1 (Y-C^β), 40.6 (Leu-C^β), 46.8 (Y-C^{α1'}), 47.5 (Y-C^{γ1'}), 49.5 (Y-C^α), 54.2 (Leu-C^α), 55.6 (Y-C^{α2'}), 57.1 (Y-C^{β'}), 57.8 (Aib-C^α), 168.0 (Y-C^{ε2'}), 169.1 (Leu-C=O), 175.3 (Aib-C=O).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 450.48$ [M]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₂₅H₄₈N₅O₂]⁺ = 450.38.

HPLC: $t_R = 16.13$ min (Methode A)

Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu-^βAla-Gly-OH 48

Synthese und analytische Daten s. Kapitel 7.2.7 auf Seite 157.

N₂-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH 70

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.11 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 46.9 mg (100 μmol, 33 %)

Summenformel: C₂₀H₃₃N₇O₆

Molmasse: 467.52 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 490.39 [M + Na]^+$, $506.34 [M + K]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{20}H_{33}N_7O_6Na]^+ = 490.24$, $[C_{20}H_{33}N_7O_6K]^+ = 506.21$.

HPLC: $t_R = 19.16$ min (Methode A)

TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-Y 78

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 20.0 mg (29.5 μ mol, 1.0 \AA q) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-leucyl- α -aminoisobutyryl-1-[(2*S*)-2-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8,9,10-octahydropyrimido[1,2-*a*]azepin-1-ium-trifluoracetat **76** als Aminokomponente und 15.0 mg (32.1 μ mol, 1.1 \AA q) N_2 -Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-OH **70** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 7.0 mg (6.36 μ mol, 22 %)

Summenformel: $C_{49}H_{82}F_6N_{10}O_{11}$

Molmasse: 1101.23 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 874.43 [M]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{45}H_{81}N_{10}O_7]^+ = 873.63$.

HPLC: $t_R = 18.55$ min (Methode A)

Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-Y 69

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 7.0 mg (6.36 μ mol, 1.0 \AA q) TFA·H-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-Y **78** als Aminokomponente und 6.4 mg (8.27 μ mol, 1.3 \AA q) Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-OH **48** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 6.1 mg (3.49 μ mol, 55 %)

Summenformel: $C_{84}H_{141}F_3N_{18}O_{18}$

Molmasse: 1748.12 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 0.78 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 0.79 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 0.83 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 0.86 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, Leu- \mathbf{H}^δ), 0.87 (d, $^3J = 5.4$ Hz, 3H, Y- \mathbf{H}^δ), 0.89 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, Y- \mathbf{H}^δ), 1.18 (m, 1H, Y- \mathbf{H}^β), 1.23–1.78 (m, 33H), 1.30 (s, 6H, $2 \times \text{Aib-}\mathbf{H}^\beta$), 1.33 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.34 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.35 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.37 (s, 9H, $3 \times \text{Aib-}\mathbf{H}^\beta$), 1.39 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.40 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.41 (s, 6H, $2 \times \text{Aib-}\mathbf{H}^\beta$), 1.43 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 1.44 (s, 3H, Aib- \mathbf{H}^β), 2.05 (s, 3H, Ac- \mathbf{CH}_3), 2.07 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^β), 2.10 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^β), 2.19 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^β), 2.31 (m, 1H, $^\beta\text{Ala-}\mathbf{H}^\alpha$), 2.38 (m, 1H, $^\beta\text{Ala-}\mathbf{H}^\alpha$), 2.73 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 3.14–3.32 (m, 8H), 3.47–3.61 (m, 4H, Gly- \mathbf{H}^α), 4.00 (m, 1H, Leu- \mathbf{H}^α), 4.00 (m, 1H, Leu- \mathbf{H}^α), 4.06 (m, 1H, Y- \mathbf{H}^α), 4.96 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^α), 5.03 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^α), 5.33 (m, 1H, Pip- \mathbf{H}^α), 7.00 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, Y- \mathbf{NH}), 7.37 (s, 1H, Aib- \mathbf{NH}), 7.52 (m, 1H, Leu- \mathbf{NH}), 7.54 (m, 1H, $^\beta\text{Ala-}\mathbf{NH}$), 7.65 (s, 1H, Aib- \mathbf{NH}), 7.67 (s, 2H, $2 \times \text{Aib-}\mathbf{NH}$), 7.77 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, Leu- \mathbf{NH}), 7.95 (s, 1H, Aib- \mathbf{NH}), 8.12 (s, 1H, Aib- \mathbf{NH}), 8.24 (s, 1H, Aib- \mathbf{NH}), 8.32 (t, $^3J = 5.1$ Hz, 1H, Gly- \mathbf{NH}), 8.42 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, Gly- \mathbf{NH}).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1635.17$ [M] $^+$, isotopengemittelte Masse berechnet für $[\text{C}_{82}\text{H}_{141}\text{N}_{18}\text{O}_{16}]^+ = 1635.13$.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 828.53249$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{82}\text{H}_{141}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{Na}]^{2+} = 828.53298$.

HPLC: $t_R = 26.41$ min (Methode A)

7.2.12 Synthese der isotopenmarkierten Efrapeptin C-Analoga 79–82

Ac-Pip-Aib-Pip- D_6 Aib- D_6 Aib-Leu- $^\beta$ Ala-Gly-OH 86

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.11 mmol·g $^{-1}$, 0.3 mmol).

Ausbeute: 40.0 mg (50.6 μmol , 17 %)

Summenformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{D}_{12}\text{N}_8\text{O}_{10}$

Molmasse: 791.01 g·mol $^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 813.16 [M + Na]^+$, $829.13 [M + K]^+$, $835.15 [M + 2Na - H]^+$, $851.14 [M + Na + K - H]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{37}H_{50}D_{12}N_8O_{10}Na]^+ = 813.52$, $[C_{37}H_{50}D_{12}N_8O_{10}K]^+ = 829.50$, $[C_{37}H_{49}D_{12}N_8O_{10}Na_2]^+ = 835.51$, $[C_{37}H_{49}D_{12}N_8O_{10}NaK]^+ = 851.48$.

HPLC: $t_R = 20.41$ min (Methode A)

Ac-Pip-^{D6}Aib-Pip-^{D6}Aib-Aib-Leu-^βAla-Gly-OH 87

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.11 mmol·g⁻¹, 0.14 mmol).

Ausbeute: 7.8 mg (9.86 μmol, 7%)

Summenformel: C₃₇H₅₀D₁₂N₈O₁₀

Molmasse: 791.01 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 809.37 [M + Na]^+$, $825.45 [M + K]^+$, $832.56 [M + 2Na - H]^+$, $847.54 [M + Na + K - H]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{37}H_{50}D_{12}N_8O_{10}Na]^+ = 813.52$, $[C_{37}H_{50}D_{12}N_8O_{10}K]^+ = 829.50$, $[C_{37}H_{49}D_{12}N_8O_{10}Na_2]^+ = 835.51$, $[C_{37}H_{49}D_{12}N_8O_{10}NaK]^+ = 851.48$.

HPLC: $t_R = 18.94$ min (Methode A)

Ac-Pip-^{D6}Aib-Pip-Aib-^{D6}Aib-Leu-^βAla-Gly-OH 88

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.11 mmol·g⁻¹, 0.14 mmol).

Ausbeute: 3.8 mg (4,80 μmol, 4%)

Summenformel: C₃₇H₅₀D₁₂N₈O₁₀

Molmasse: 791.01 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 808.77 [M + Na]^+$, $824.82 [M + K]^+$, $831.91 [M + 2Na - H]^+$, $846.86 [M + Na + K - H]^+$, monoisotopische Masse berechnet für

$$[\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{D}_{12}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{Na}]^+ = 813.52, [\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{D}_{12}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{K}]^+ = 829.50,$$
$$[\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{D}_{12}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{Na}_2]^+ = 835.51, [\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{D}_{12}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{NaK}]^+ = 851.48.$$

HPLC: $t_R = 19.25$ min (Methode A)

Ac-Pip-^D₆Aib-Pip-^D₆Aib-^D₆Aib-Leu-^βAla-Gly-OH 89

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.11 mmol·g⁻¹, 0.1 mmol).

Ausbeute: 5.0 mg (6.27 μmol, 6 %)

Summenformel: C₃₇H₄₄D₁₈N₈O₁₀

Molmasse: 797.05 g·mol⁻¹

HPLC: $t_R = 17.35$ min (Methode A)

N₂-^D₆Aib-^D₆Aib-Pip-^D₆Aib-Gly-OH 85

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit Glycin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.86 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 15.0 mg (30.9 μmol, 10 %)

Summenformel: C₂₀H₁₅D₁₈N₇O₆

Molmasse: 485.63 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 500.77$ [M + Na]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₂₀H₁₅D₁₈N₇O₆Na]⁺ = 508.35.

HPLC: $t_R = 16.40$ min (Methode A)

$N_2=^{D_6}$ Aib- D_6 Aib-Pip- D_6 Aib-Gly-Leu- D_6 Aib-OH 83

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit α -Aminoisobuttersäure- D_6 beladenem *o*-Chlortritylharz ($0.7 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.26 mmol).

Ausbeute: 45.3 mg ($65.7 \text{ }\mu\text{mol}$, 25%)

Summenformel: $C_{30}H_{27}D_{24}N_9O_8$

Molmasse: $689.93 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 680.75 [M + H]^+$, $703.81 [M + Na]^+$, $720.90 [M + K]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{30}H_{28}D_{24}N_9O_8]^+ = 690.54$, $[C_{30}H_{27}D_{24}N_9O_8Na]^+ = 712.53$, $[C_{30}H_{27}D_{24}N_9O_8K]^+ = 728.50$.

HPLC: $t_R = 23.69 \text{ min}$ (Methode A)

 $N_2=^{D_6}$ Aib-Aib-Pip- D_6 Aib-Gly-Leu- D_6 Aib-OH 84

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit α -Aminoisobuttersäure- D_6 beladenem *o*-Chlortritylharz ($1.0 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.3 mmol).

Ausbeute: 16.1 mg ($23.5 \text{ }\mu\text{mol}$, 8%)

Summenformel: $C_{30}H_{33}D_{18}N_9O_8$

Molmasse: $683.89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 674.29 [M + H]^+$, $701.33 [M + Na]^+$, $717.39 [M + K]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[C_{30}H_{34}D_{18}N_9O_8]^+ = 684.51$, $[C_{30}H_{33}D_{18}N_9O_8Na]^+ = 706.49$, $[C_{30}H_{33}D_{18}N_9O_8K]^+ = 722.46$.

HPLC: $t_R = 21.66 \text{ min}$ (Methode A)

TFA·H-D₆ Aib-D₆ Aib-Pip-D₆ Aib-Gly-Leu-Aib-X 92

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 17.7 mg (28.0 µmol, 1.0 Äq) L-Leucyl- α -aminoisobutyryl-1-[(2*S*)-2-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-trifluoracetat **91** als Aminokomponente und 15.1 mg (31.0 µmol, 1.1 Äq) N₂=D₆ Aib-D₆ Aib-Pip-D₆ Aib-Gly-OH **85** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 13.2 mg (12.3 µmol, 44 %)

Summenformel: C₄₇H₅₉D₁₈F₆N₁₀O₁₀

Molmasse: 1074.28 g·mol⁻¹

HPLC: $t_R = 15.41$ min (Methode A)

TFA·H-D₆ Aib-D₆ Aib-Pip-D₆ Aib-Gly-Leu-D₆ Aib-X 93

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 29.3 mg (65.0 µmol, 1.0 Äq) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Aminokomponente und 49.3 mg (71.5 µmol, 1.1 Äq) N₂=D₆ Aib-D₆ Aib-Pip-D₆ Aib-Gly-Leu-D₆ Aib-OH **83** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 17.0 mg (15.7 µmol, 24 %)

Summenformel: C₄₇H₅₃D₂₄F₆N₁₀O₁₀

Molmasse: 1080.31 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 862.37$ [M]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₄₃H₅₃D₂₄N₁₀O₇]⁺ = 869.75.

HPLC: $t_R = 18.00$ min (Methode A)

TFA·H-D₆Aib-Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-X 94

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 9.7 mg (21.4 μmol, 1.0 Äq) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Amino-komponente und 16.1 mg (23.5 μmol, 1.1 Äq) N₂=D₆Aib-Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-OH **84** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 11.3 mg (10.5 μmol, 49 %)

Summenformel: C₄₇H₅₉D₁₈F₆N₁₀O₁₀

Molmasse: 1074.28 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 858.14$ [M]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₄₃H₅₉D₁₈N₁₀O₇]⁺ = 863.71.

HPLC: $t_R = 16.74$ min (Methode A)

Ac-Pip-Aib-Pip-D₆Aib-D₆Aib-Leu-βAla-Gly-D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-Aib-X 79

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 12.8 mg (11.9 μmol, 1.0 Äq) TFA·H-D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-Aib-X **92** als Aminokomponente und 12.3 mg (15.5 μmol, 1.3 Äq) Ac-Pip-Aib-Pip-D₆Aib-D₆Aib-Leu-βAla-Gly-OH **86** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 7.1 mg (4.06 μmol, 34 %)

Summenformel: C₈₂H₁₀₇D₃₀F₃N₁₈O₁₈

Molmasse: 1750.26 g·mol⁻¹

¹H-NMR (600.13 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 0.89 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, Leu-**H**^δ), 0.91 (d, ³J = 7.9 Hz, 3H, X-**H**^δ), 0.92 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, Leu-**H**^δ), 0.96 (d, ³J = 7.2 Hz, 3H, X-**H**^δ), 0.97 (d, ³J = 8.6 Hz, 3H, Leu-**H**^δ), 0.98 (d, ³J = 6.6 Hz, 3H, Leu-**H**^δ), 1.22 (m, 1H, X-**H**^β), 1.30 (m, 1H), 1.44-1.60 (m, 10H), 1.48 (s, 3H, Aib-**H**^β), 1.50 (s, 3H, Aib-**H**^β), 1.52 (s, 3H, Aib-**H**^β), 1.53 (s, 3H, Aib-**H**^β), 1.62-1.92 (m, 16H), 2.04-2.40

(m, 6H), 2.20 (s, 3H, Ac-CH₃), 2.76 (m, 1H), 2.83 (m, 1H), 3.10 (m, 2H), 3.23–3.46 (m, 7H), 3.59–3.74 (m, 5H), 3.79–3.88 (m, 3H), 3.95 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 4.15 (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.39 (m, 1H, X-H^α), 4.49 (m, 1H, Pip-H^α), 4.82 (m, 1H, Pip-H^α), 5.22 (m, 1H, Pip-H^α), 6.80 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, X-NH), 7.17 (s, 1H, Aib-NH), 7.21 (s, 1H, Aib-NH), 7.36 (s, 1H, Aib-NH), 7.43 (m, 1H, ^βAla-NH), 7.52 (s, 1H, Aib-NH), 7.55 (d, ³J = 7.3 Hz, 1H, Leu-NH), 7.61 (s, 1H, Aib-NH), 7.64 (m, 1H, Gly-NH), 7.69 (s, 1H, Aib-NH), 7.81 (m, 1H, Gly-NH), 8.03 (s, 1H, Aib-NH), 8.07 (d, ³J = 5.0 Hz, 1H, Leu-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1626.72$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₀H₁₀₇D₃₀N₁₈O₁₆]⁺ = 1637.24.

HPLC: $t_R = 22.08$ min (Methode A)

Ac-Pip-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Aib-Leu-^βAla-Gly-D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-X 80

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 8.2 mg (7.60 μmol, 1.0 Äq) TFA-H-D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-X 93 als Aminokomponente und 7.8 mg (9.88 μmol, 1.3 Äq) Ac-Pip-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Aib-Leu-^βAla-Gly-OH 87 als Carboxykomponente.

Ausbeute: 2.8 mg (1.59 μmol, 21 %)

Summenformel: C₈₂H₁₀₁D₃₆F₃N₁₈O₁₈

Molmasse: 1756.29 g·mol⁻¹

¹H-NMR (600.13 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 0.89 (d, ³J = 7.3 Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.90 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, X-H^δ), 0.92 (d, ³J = 6.7 Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.95 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, X-H^δ), 0.97 (d, ³J = 7.3 Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.98 (d, ³J = 6.7 Hz, 3H, Leu-H^δ), 1.19–1.24 (m, 1H, X-H^β), 1.29 (m, 1H), 1.43–1.59 (m, 10H), 1.50 (s, 3H, Aib-H^β), 1.54 (s, 3H, Aib-H^β), 1.60–1.92 (m, 16H), 2.04–2.40 (m, 6H), 2.20 (s, 3H, Ac-CH₃), 2.76 (m, 1H), 2.83 (m, 1H), 3.06–3.13 (m, 2H), 3.18 (m, 1H), 3.24–3.47 (m, 6H), 3.58–3.74 (m, 5H), 3.79–3.89 (m, 3H), 3.95 (m, 2H), 4.03–4.18 (m, 3H), 4.38 (m, 2H, X-H^α), 4.68 (m, 1H, Pip-H^α), 5.00 (m, 1H, Pip-H^α), 5.23 (m, 1H, Pip-H^α), 6.84 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, X-NH), 7.25 (s, 1H, Aib-NH), 7.44 (s, 1H, Aib-NH), 7.45 (m, 1H, ^βAla-NH), 7.55 (d,

$^3J = 7.5$ Hz, 1H, Leu-NH), 7.66 (s, 1H, Aib-NH), 7.72 (m, 2H, Aib-NH, Gly-NH), 7.83 (s, 1H, Aib-NH), 8.02 (s, 1H, Aib-NH), 8.05 (d, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, Leu-NH), 8.09 (s, 1H, Aib-NH), 8.28 (m, 1H, Gly-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1627.88$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₀H₁₀₁D₃₆N₁₈O₁₆]⁺ = 1643.28.

HPLC: $t_R = 25.65$ min (Methode A)

Ac-Pip-D₆Aib-Pip-Aib-D₆Aib-Leu-βAla-Gly-D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-X 81

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 3.9 mg (3.65 μmol, 1.0 Äq) TFA·H-D₆Aib-D₆Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-X 93 als Aminokomponente und 3.8 mg (4.75 μmol, 1.3 Äq) Ac-Pip-D₆Aib-Pip-Aib-D₆Aib-Leu-βAla-Gly-OH 88 als Carboxykomponente.

Ausbeute: 5.3 mg (3.02 μmol, 83 %)

Summenformel: C₈₂H₁₀₁D₃₆F₃N₁₈O₁₈

Molmasse: 1756.29 g·mol⁻¹

¹H-NMR (600.13 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 0.90 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.91 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, X-H^δ), 0.92 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.96 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, X-H^δ), 0.97 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.98 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, Leu-H^δ), 1.23 (m, 1H, X-H^β), 1.30 (m, 1H), 1.43-1.68 (m, 10H), 1.53 (s, 3H, Aib-H^β), 1.56 (s, 3H, Aib-H^β), 1.71-1.95 (m, 16H), 2.00-2.40 (m, 6H), 2.23 (s, 3H, Ac-CH₃), 2.76-2.86 (m, 2H), 3.03-3.14 (m, 2H), 3.27-3.47 (m, 7H), 3.59-3.79 (m, 5H), 3.81-3.88 (m, 3H), 3.91-4.01 (m, 2H), 4.10 (m, 2H), 4.16 (m, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.38 (m, 1H, X-H^α), 4.45 (m, 1H, Pip-H^α), 4.80 (m, 1H, Pip-H^α), 5.23 (m, 1H, Pip-H^α), 6.80 (d, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, X-NH), 6.98 (s, 1H, Aib-NH), 7.16 (s, 1H, Aib-NH), 7.42 (s, 1H, Aib-NH), 7.50 (m, 1H, βAla-NH), 7.54 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, Leu-NH), 7.64 (m, 1H, Gly-NH), 7.74 (s, 1H, Aib-NH), 7.81 (m, 2H, Gly-NH, Aib-NH), 7.99 (s, 1H, Aib-NH), 8.03 (s, 1H, Aib-NH), 8.12 (d, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, Leu-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1628.50$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₀H₁₀₁D₃₆N₁₈O₁₆]⁺ = 1643.28.

HPLC: $t_R = 24.38$ min (Methode A)

Ac-Pip-D₆Aib-Pip-D₆Aib-D₆Aib-Leu-βAla-Gly-D₆Aib-Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-X 82

Die Synthese erfolgt nach der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 5.2 mg (4.80 μmol, 1.0 Äq) TFA·H-D₆Aib-Aib-Pip-D₆Aib-Gly-Leu-D₆Aib-X **94** als Aminokomponente und 5.0 mg (6.24 μmol, 1.3 Äq) Ac-Pip-D₆Aib-Pip-D₆Aib-D₆Aib-Leu-βAla-Gly-OH **89** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 2.9 mg (1.65 μmol, 34 %)

Summenformel: C₈₂H₁₀₁D₃₆F₃N₁₈O₁₈

Molmasse: 1756.29 g·mol⁻¹

¹H-NMR (600.13 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 0.89 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.90 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, X-H^δ), 0.92 (d, ³J = 6.6 Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.95 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, X-H^δ), 0.96 (d, ³J = 7.2 Hz, 3H, Leu-H^δ), 0.98 (d, ³J = 6.6 Hz, 3H, Leu-H^δ), 1.22 (m, 1H, X-H^β), 1.29 (m, 1H), 1.44–1.64 (m, 10H), 1.47 (s, 3H, Aib-H^β), 1.58 (s, 3H, Aib-H^β), 1.66–1.94 (m, 16H), 2.03–2.39 (m, 6H), 2.20 (s, 3H, Ac-CH₃), 2.72–2.84 (m, 2H), 3.04 (m, 1H), 3.10 (m, 1H), 3.24–3.46 (m, 7H), 3.57–3.74 (m, 5H), 3.79–3.85 (m, 3H), 3.92–4.11 (m, 4H), 4.15 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.39 (m, 1H, X-H^α), 4.51 (m, 1H, Pip-H^α), 4.83 (m, 1H, Pip-H^α), 5.23 (m, 1H, Pip-H^α), 6.77 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, X-NH), 7.18 (s, 2H, Aib-NH), 7.40 (m, 1H, βAla-NH), 7.48 (s, 1H, Aib-NH), 7.55 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, Leu-NH), 7.63 (s, 1H, Aib-NH), 7.68 (m, 1H, Gly-NH), 7.79 (s, 1H, Aib-NH), 7.83 (m, 1H, Gly-NH), 8.03 (s, 1H, Aib-NH), 8.07 (s, 1H, Aib-NH), 8.11 (d, ³J = 5.0 Hz, 1H, Leu-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1629.48$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₈₀H₁₀₁D₃₆N₁₈O₁₆]⁺ = 1643.28.

HPLC: $t_R = 23.05$ min (Methode A)

7.2.13 Synthese von Adenozeptin 95

Fmoc-Pip-L-Iva-OH 97

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.1 mmol·g⁻¹, 0.3 mmol).

Ausbeute: 28.7 mg (32.8 μmol, 11 %)

Summenformel: C₄₆H₆₃N₇O₁₀

Molmasse: 874.03 g·mol⁻¹

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3382.5, 2942.8, 1673.9 (st), 1520.6, 1451.2 (st), 1342.2, 1317.1, 1261.2, 1170.6 (st), 1085.7, 1037.5, 945.9, 867.8, 758.9, 741.5.

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1}$ = 471.62 [M + Na]⁺, 488.12 [M + K]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₂₆H₃₀N₂O₅Na]⁺ = 473.20, [C₂₆H₃₀N₂O₅K]⁺ = 489.18.

HPLC: t_R = 29.76 min (Methode A)

TFA·H-Pip-L-Iva-X 99

Die Synthese erfolgt analog der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 25.0 mg (55.4 μmol, 1.0 Äq) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Aminokomponente und 27.4 mg (60.9 μmol, 1.1 Äq) Fmoc-Pip-L-Iva-OH **97** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 16.8 mg (25.4 μmol, 46 %)

Summenformel: C₂₈H₄₄F₆N₅O₆

Molmasse: 660.67 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1}$ = 435.17 [M]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₂₄H₄₃N₅O₂]⁺ = 434.35.

HPLC: t_R = 13.34 min (Methode A)

Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH 98

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit β -Alanin beladenem *o*-Chlortritylharz (0.94 mmol·g⁻¹, 0.2 mmol).

Ausbeute: 76.5 mg (179 μ mol, 90 %)

Summenformel: C₂₀H₃₄N₄O₆

Molmasse: 426.51 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 427.68$ [M + H]⁺, 449.71 [M + Na]⁺, 465.72 [M + K]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₂₀H₃₅N₄O₆]⁺ = 427.26, [C₂₀H₃₄N₄O₆Na]⁺ = 449.24, [C₂₀H₃₄N₄O₆K]⁺ = 465.21.

HPLC: $t_R = 15.40$ min (Methode A)

Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-OH 96

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit α -Aminoisobuttersäure beladenem *o*-Chlortritylharz (1.25 mmol·g⁻¹, 0.6 mmol).

Ausbeute: 221 mg (269 μ mol, 45 %)

Summenformel: C₄₂H₅₉N₇O₁₀

Molmasse: 821.96 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 845.31$ [M + Na]⁺, 861.33 [M + K]⁺, 867.33 [M + 2Na - H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₄₂H₅₉N₇O₁₀Na]⁺ = 844.42, [C₄₂H₅₉N₇O₁₀K]⁺ = 860.40, [C₄₂H₅₈N₇O₁₀Na₂]⁺ = 866.41.

MS (ESI): $m \cdot z^{-1} = 822.5$ [M + H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₄₂H₆₀N₇O₁₀]⁺ = 822.4

HPLC: $t_R = 25.32$ min (Methode A)

TFA·H-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-Pip-L-Iva-X 100

Die Synthese erfolgt analog der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 16.8 mg (25.4 μmol , 1.0 $\text{\AA}\text{q}$) TFA·H-Pip-L-Iva-X **99** als Aminokomponente, 62.7 mg (76.2 μmol , 3.0 $\text{\AA}\text{q}$) Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-OH **96** als Carboxykomponente, 33.8 mg (88.9 μmol , 3.5 $\text{\AA}\text{q}$) *N*-HATU, 7.0 mg (50.8 μmol , 2.0 $\text{\AA}\text{q}$) HOAt und 54.4 μl (320 μmol , 12.6 $\text{\AA}\text{q}$) DIPEA.

Ausbeute: 17.6 mg (14.2 μmol , 56 %)

Summenformel: $\text{C}_{55}\text{H}_{92}\text{F}_6\text{N}_{12}\text{O}_{13}$

Molmasse: 1243.38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 1016.68 [\text{M}]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{51}\text{H}_{91}\text{N}_{12}\text{O}_9]^+ = 1015.68$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 27.41 \text{ min}$ (Methode A)

Adenopeptin 95

Die Synthese erfolgt analog der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 14.5 mg (11.7 μmol , 1.0 $\text{\AA}\text{q}$) TFA·H-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Aib-Aib-Pip-L-Iva-X **100** als Aminokomponente und 6.5 mg (15.2 μmol , 1.3 $\text{\AA}\text{q}$) Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 0.3 mg (0.195 μmol , 2 %)

Summenformel: $\text{C}_{73}\text{H}_{123}\text{F}_3\text{N}_{16}\text{O}_{16}$

Molmasse: 1537.85 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.67–0.90 (m, 18H, Iva- H^γ , X- H^δ), 1.16 (m, 1H, X- H^β), 1.20–2.18 (m, 69H), 2.92 (m, 3H), 3.11–3.24 (m, 4H), 3.48–3.78 (m, 9H), 4.01–4.37 (m, 4H), 4.52 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 5.40 (m, 1H), 7.085 (m, 1H, X-NH), 7.15 (s, 1H, Iva-NH), 7.34 (m, 1H, β Ala-NH), 7.40 (s, 1H, Aib-NH), 7.56 (s, 1H, Iva-NH), 7.73 (s, 1H, Aib-NH), 7.78 (s, 1H, Iva-NH), 8.27 (m, 1H, Gly-NH), 8.31 (s, 1H, Aib-NH), 8.40 (s, 1H, Aib-NH), 8.51 (s, 1H, Aib-NH), 8.61 (s, 1H, Iva-NH).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1425.28$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₇₁H₁₂₃N₁₆O₁₄]⁺ = 1424.86.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 723.46600$, monoisotopische Masse berechnet für [C₇₁H₁₂₃N₁₆O₁₄Na]²⁺ = 723.46457.

HPLC: $t_R = 23.61$ min (Methode A)

7.2.14 Synthese des Adenopeptin-Analogons 101

Ac-Pro-L-Iva-L-Iva-^βAla-OH 98

Synthese und Analytik s. Kapitel 7.2.13 auf Seite 184.

Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-OH 102

Die Synthese erfolgt ausgehend von mit L-Isovalin beladenem *o*-Chlortritylharz (1.3 mmol·g⁻¹, 0.2 mmol).

Ausbeute: 34.1 mg (33.0 μmol, 17 %)

Summenformel: C₅₃H₇₇N₉O₁₂

Molmasse: 1032.23 g·mol⁻¹

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1054.83$ [M + Na]⁺, 1070.55 [M + K]⁺, 1076.61 [M + 2Na - H]⁺, monoisotopische Masse berechnet für [C₅₃H₇₇N₉O₁₂Na]⁺ = 1054.56, [C₅₃H₇₇N₉O₁₂K]⁺ = 1070.53, [C₅₃H₇₆N₉O₁₂Na₂]⁺ = 1076.54.

HPLC: $t_R = 29.82$ min (Methode A)

TFA·H-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-X 103

Die Synthese erfolgt analog der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 13.5 mg (29.9 μmol , 1.0 $\text{\AA}\text{q}$) 1-[(2*S*)-2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylpentyl]-2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrimidin-1-ium-iodid **55** als Aminokomponente und 34.0 mg (32.9 μmol , 1.1 $\text{\AA}\text{q}$) Fmoc-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-OH **102** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 8.3 mg (6.68 μmol , 22 %)

Summenformel: $\text{C}_{55}\text{H}_{92}\text{F}_6\text{N}_{12}\text{O}_{13}$

Molmasse: 1243.38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MS (MALDI-TOF): $m\cdot z^{-1} = 1015.49 [\text{M}]^+$, monoisotopische Masse berechnet für $[\text{C}_{51}\text{H}_{91}\text{N}_{12}\text{O}_9]^+ = 1015.69$.

HPLC: $t_{\text{R}} = 19.47 \text{ min}$ (Methode A)

Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-X 101

Die Synthese erfolgt analog der in Kapitel 7.2.6 beschriebenen allgemeinen Vorschrift ausgehend von 8.3 mg (6.68 μmol , 1.0 $\text{\AA}\text{q}$) TFA·H-Gly-Aib-Aib-L-Iva-Aib-Pip-Aib-Aib-L-Iva-X **103** als Aminokomponente und 3.7 mg (8.68 μmol , 1.3 $\text{\AA}\text{q}$) Ac-Pro-L-Iva-L-Iva- β Ala-OH **98** als Carboxykomponente.

Ausbeute: 8.3 mg (5.40 μmol , 81 %)

Summenformel: $\text{C}_{73}\text{H}_{123}\text{F}_3\text{N}_{16}\text{O}_{16}$

Molmasse: 1537.85 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.62–0.86 (m, 18H, Iva- H^γ , X- H^δ), 1.16 (m, 1H, X- H^β), 1.21–2.36 (m, 66H), 1.96 (s, 3H, Ac- CH_3), 2.82–3.36 (m, 7H), 3.49–3.75 (m, 9H), 4.15–4.31 (m, 5H), 5.07–5.22 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.17 (d, $^3J = 10.1 \text{ Hz}$, 1H, X- NH), 7.20 (s, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.21 (m, 1H, Gly- NH), 8.36 (s, 1H), 8.50 (s, 1H).

MS (MALDI-TOF): $m \cdot z^{-1} = 1425.84$ [M]⁺, isotopengemittelte Masse berechnet für [C₇₁H₁₂₃N₁₆O₁₄]⁺ = 1424.86.

MS (ESI-FT-ICR): $m \cdot z^{-1} = 712.47325$, monoisotopische Masse berechnet für [C₇₁H₁₂₄N₁₆O₁₄]²⁺ = 712.47360; 720.98621, monoisotopische Masse berechnet für [C₇₁H₁₂₇N₁₇O₁₄]²⁺ = 720.98687; 723.46393, monoisotopische Masse berechnet für [C₇₁H₁₂₃N₁₆O₁₄Na]²⁺ = 723.46457; 1423.94293, monoisotopische Masse berechnet für [C₇₁H₁₂₃N₁₆O₁₄]²⁺ = 1423.93992.

HPLC: $t_R = 25.07$ min (Methode A)

Literaturverzeichnis

- [1] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: chemistry and biology*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [2] B. S. Davidson, Ascidiaceae: producers of amino acid-derived metabolites, *Chem. Rev.* **1993**, *93*(5), 1771–1791.
- [3] N. Fusetani, S. Matsunaga, Bioactive sponge peptides, *Chem. Rev.* **1993**, *93*(5), 1793–1806.
- [4] P. Wipf, Synthetic studies of biologically active marine cyclopeptides, *Chem. Rev.* **1995**, *95*(6), 2115–2134.
- [5] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 5. Auflage **2003**.
- [6] I. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain, P. R. Harrison, The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA, *EMBO J.* **1986**, *5*(6), 1221–1227.
- [7] F. Zinoni, A. Birkmann, W. Leinfelder, A. Böck, Cotranslational insertion into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*(10), 3156–3160.
- [8] J. F. Atkins, R. Gesteland, The 22nd amino acid, *Science* **2002**, *296*(5572), 1409–1410.
- [9] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, Pyrrolysine encoded by UAG in archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA, *Science* **2002**, *296*(5572), 1459–1462.

- [10] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase, *Science* **2002**, *296*(5572), 1462–1466.
- [11] T. Hintermann, D. Seebach, Synthesis of a β -hexapeptide from (*R*)-2-aminomethyl-alkanoic acids and structural investigations, *Synlett* **1997**, S. 437–438.
- [12] G. Lelais, D. Seebach, β^2 -Amino acids – syntheses, occurrence in natural products, and components of β -peptides, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2004**, *76*, 206–243.
- [13] D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, The world of β - and γ -peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components, *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 1111–1239.
- [14] M. Liu, M. P. Sibi, Recent advances in the stereoselective synthesis of β -amino acids, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7991–8035.
- [15] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, β -Peptides: from structure to function, *Chem. Rev.* **2001**, *101*(10), 3219–3232.
- [16] I. Kudyba, J. Raczko, J. Jurczak, Asymmetric nitroaldol reaction. Synthesis of taxotere side chain and (–)-bestatin using (1*R*)-8-phenylmenthyl glyoxylate, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*(8), 2844–2850.
- [17] S. Eißler, A. Stončius, M. Nahrwold, N. Sewald, The synthesis of cryptophycins, *Synthesis* **2006**, p. angenommen.
- [18] A. Fleming, The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *Br. J. Exp. Path.* **1929**, *10*, 226.
- [19] R. Maget-Dana, L. Thimon, F. Peypoux, Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A, *Biochimie* **1992**, *74*, 1047–1051.
- [20] F. Peypoux, J. M. Bonmatin, J. Wallach, Recent trends in the biochemistry of surfactin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 553–563.
- [21] T. Katsu, H. Kobayashi, Y. Fujita, Mode of action of gramicidin S on *Escherichia coli* membrane, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *860*, 608–619.

- [22] K. Hori, Y. Yamamoto, T. Minetoki, T. Kurotsu, M. Kanda, S. Miura, K. Okamura, J. Furuyama, Y. Saito, Molecular cloning and nucleotide sequence of the gramicidin S synthetase 1 gene, *J. Biochem.* **1989**, *106*(4), 639–645.
- [23] D. Konz, A. Klens, K. Schorgendorfer, M. A. Marahiel, The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases, *Chem. Biol.* **1997**, *4*(12), 927–937.
- [24] J. Liu, J. D. Farmer, Jr. , W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell* **1991**, *66*(4), 807–815.
- [25] G. Weber, K. Schörgendorfer, E. Schneider-Scherzer, E. Leitner, The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame, *Curr. Genet.* **1994**, *26*(2), 120–125.
- [26] P. J. Belshaw, S. L. Schreiber, Cell-specific calcineurin inhibition by a modified cyclosporin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*(7), 1805–1806.
- [27] C. T. Walsh, *Antibiotics: actions, origins, resistance*, ASM Press: Washington, DC **2003**.
- [28] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, Der Aufbau von Vancomycin: so macht es die Natur, *Angew. Chem.* **2003**, *115*(7), 752–789.
- [29] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, Vancomycin assembly: nature’s way, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*(7), 730–765.
- [30] V. Matha, A. Jegorov, M. Kiess, H. Brückner, Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, α -aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae, *Tissue and Cell* **1992**, *24*(4), 559–564.
- [31] Y. S. Tsantrizos, S. Pischos, F. Sauriol, P. Widden, Peptaibol metabolites of *Tolypocladium geodes*, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*(2), 165–172.
- [32] T. Huber, N. Sewald, Sequence-specific resonance assignment in neo-efrapeptin A and neo-efrapeptin F **2004**, interne Kommunikation.
- [33] T. Huber, *Molekularmechanische Rechnungen und NMR-basierende Konformationsstudien an Peptaibiotika und zyklischen Peptiden*, Dissertation, Universität Bielefeld **2007**.

- [34] A. Fredenhagen, L.-P. Molleyres, B. Böhlendorf, G. Laue, Structure determination of neofrapeptins A to N: peptides with insecticidal activity produced by the fungus *Geotrichum candidum*, *J. Antibiot.* **2006**, *59*(5), 267–280.
- [35] J. K. Chugh, B. A. Wallace, Peptaibols: models for ion channels, *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*(4), 565–570.
- [36] P. Müller, D. O. Rudin, Action potentials induced in biomolecular lipid membranes, *Nature* **1968**, *217*(5130), 713–719.
- [37] H. Wenschuh, M. Beyermann, H. Haber, J. K. Seydel, E. Krause, M. Bienert, L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, Stepwise automated solid phase synthesis of naturally occurring peptaibols using Fmoc amino acid fluorides, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*(2), 405–410.
- [38] C. E. Meyer, F. Reusser, A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*, *Experientia* **1967**, *23*(2), 85–86.
- [39] R. O. Fox Jr., F. M. Richards, A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5 Å resolution, *Nature* **1982**, *300*, 325–330.
- [40] K. He, S. J. Ludtke, W. T. Heller, H. W. Huang, Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers, *Biophys. J.* **1996**, *71*(5), 2669–2679.
- [41] M. Kronen, H. Görls, H.-H. Nguyen, S. Reißmann, M. Bohl, J. Sühnel, U. Gräfe, Crystal structure and conformational analysis of ampullosporin A, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 729–744.
- [42] H.-H. Nguyen, D. Imhof, M. Kronen, U. Gräfe, S. Reißmann, Circular dichroism studies of ampullosporin-A analogues, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 714–728.
- [43] K. Reiber, T. Neuhof, J. H. Ozegowski, H. von Döhren, T. Schwecke, A non-ribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*(11–12), 701–713.
- [44] S. B. Krasnoff, R. F. Reátegui, M. M. Wagenaar, J. B. Gloer, D. M. Gibson, Cicadapeptins I and II: new Aib-containing peptides from the entomopathogenic fungus *Cordyceps heteropoda*, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*(1), 50–55.

- [45] L. Béven, D. Duval, S. Rebuffat, F. G. Riddell, B. Bodo, H. Wróblewski, Membrane permeabilization and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1998**, *1372*(1), 78–90.
- [46] M. Jost, J.-C. Greie, N. Stemmer, S. D. Wilking, K. Altendorf, N. Sewald, Die erste Totalsynthese von Efrapeptin C, *Angew. Chem.* **2002**, *114*(22), 4438–4440.
- [47] M. Jost, J.-C. Greie, N. Stemmer, S. D. Wilking, K. Altendorf, N. Sewald, The first total synthesis of efrapeptin C, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*(22), 4267–4269.
- [48] T. M. Balasubramanian, N. C. E. Kendrick, M. Taylor, G. R. Marshal, J. E. Hall, I. Vodyanoy, F. Reusser, Synthesis and characterization of the major component of alamethicin, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*(20), 6127–6132.
- [49] B. F. Gisin, D. G. Davis, Z. K. Borowska, J. E. Hall, S. Kobayashi, Synthesis of the major component of alamethicin, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*(21), 6373–6377.
- [50] R. Nagaraj, P. Balaram, Solution phase synthesis of alamethicin I, *Tetrahedron* **1981**, *37*(6), 1263–1270.
- [51] N. Pradeille, O. Zerbe, K. Möhle, A. Linden, H. Heimgartner, The first total synthesis of the peptaibol hypomurocin A1 and its conformation analysis: an application of the 'azirine/oxazolone method', *Chem. Biodiv.* **2005**, *2*(9), 1127–1152.
- [52] M. A. Marahiel, Multidomain enzymes involved in peptide synthesis, *FEBS Lett.* **1992**, *307*(1), 40–43.
- [53] T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *125*(1), 3–14.
- [54] H. Kleinkauf, H. von Döhren, A nonribosomal system of peptide biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*(2), 335–351.
- [55] T. Stachelhaus, A. Schneider, M. A. Marahiel, Engineered biosynthesis of peptide antibiotics, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*(2), 177–186.
- [56] R. Zocher, U. Keller, Thiol template peptide synthesis systems in bacteria and fungi, *Adv. Microbiol. Physiol.* **1997**, *38*, 85–131.

- [57] R. B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*(14), 2149–2154.
- [58] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*(26), 9678–9683.
- [59] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, L'hexafluorophosphate de *O*-benzotriazolyl-*N,N*-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*(15), 1269–1272.
- [60] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, New coupling reagents in peptide chemistry, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*(15), 1927–1930.
- [61] L. A. Carpino, 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*(10), 4397–4398.
- [62] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(15), 2279–2282.
- [63] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl *N*-oxytrisdimethylamino phosphonium (BOP), *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*(14), 1219–1222.
- [64] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*(2), 205–208.
- [65] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, M. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, Comparison of the effects of 5- and 6-HOAt on model peptide coupling reactions relative to the cases for the 4- and 7-isomers, *Org. Lett.* **2000**, *2*(15), 2253–2256.
- [66] R. D. Gandour, Structural requirements for intramolecular proton transfers, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*(3), 295–298.
- [67] S.-S. Wang, *p*-Alkoxybenzyl alcohol resin and *p*-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*(4), 1328–1333.
- [68] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods I: a new very acid-labile anchor group for

- the solid phase synthesis of fully protected fragments, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29(32), 4005–4008.
- [69] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, Darstellung geschützter Peptid-Fragmente unter Einsatz substituierter Triphenylmethyl-Harze, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30(30), 3943–3946.
- [70] W. König, R. Greiner, Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen, *Chem. Ber.* **1970**, 103(3), 788–798.
- [71] D. Obrecht, H. Heimgartner, 3-(Dimethylamino)-2,2-dimethyl-2*H*-azirin als Aib-Äquivalent: Synthese von Aib-Oligopeptiden, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70(1), 102–115.
- [72] K. Ananda, H. N. Gopi, V. V. S. Babu, Rapid and efficient synthesis of peptides containing α,α -dialkylamino acids employing KOBt, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, 5(4), 277–283.
- [73] A. Takasu, S. Horikoshi, T. Hirabayashi, Three-dimensional arrangement of sugar residues along helical polypeptide backbone. 2. Synthesis of periodic *N*-glycosylated peptides by polymerization of tripeptide active esters containing α,α -disubstituted amino acid, *Biomacromolecules* **2005**, 6(4), 2334–2342.
- [74] S. R. Haynes, S. D. Hagius, M. M. Juban, P. H. Elzer, R. P. Hammer, Improved solid-phase synthesis of α,α -dialkylated amino acid-rich peptides with antimicrobial activity, *J. Pept. Res.* **2005**, 66(6), 333–347.
- [75] Z. J. Kamiński, B. Kolesińska, J. Kolesińska, G. Sabatino, M. Chelli, P. Rovero, M. Błaszczuk, M. L. Główka, A. M. Papini, *N*-Triazinylammonium tetrafluoroborates. A new generation of efficient coupling reagents useful for peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(48), 16912–16920.
- [76] T. Jeremic, A. Linden, K. Moehle, H. Heimgartner, Synthesis and conformational analysis of 18-membered Aib-containing cyclohexapeptides, *Tetrahedron* **2005**, 61(7), 1871–1883.
- [77] S. Stamm, H. Heimgartner, The "azirine/oxazolone method" under solid-phase conditions, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, (18), 3820–3827.
- [78] M. T. Leplawy, D. S. Jones, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, Peptides-XI: synthesis of peptides derived from alpha-methylalanine, *Tetrahedron* **1960**, 11(1–2), 39–51.

- [79] C. Peggion, I. Coin, C. Toniolo, Total synthesis in solution of alamethicin F50/5 by an easily tunable segment condensation approach, *Biopolymers* **2004**, *76*(6), 485–493.
- [80] C. O. Kappe, Kontrolliertes Erhitzen mit Mikrowellen in der modernen organischen Synthese, *Angew. Chem.* **2004**, *116*(46), 6408–6443.
- [81] C. O. Kappe, Controlled microwave heating in modern organic synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*(46), 6250–6284.
- [82] I. F. Pelyvás, M. Mádi-Puskás, Z. G. Tóth, Z. Varga, M. Hornyák, G. Batta, F. Sztaricskai, Synthesis of new pseudo-disaccharide amino glycoside antibiotics from carbohydrates, *J. Antibiot.* **1995**, *48*(7), 683–695.
- [83] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, Vom Labor zur Klinik: vollsynthetische Antitumor-Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis, *Angew. Chem.* **2000**, *112*(5), 882–912.
- [84] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, From the laboratory to the clinic: a retrospective on fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*(5), 836–863.
- [85] C. W. Tornøe, H. Sengeløv, M. Meldal, Solid-phase synthesis of chemotactic peptides using α -azido acids, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*(7), 314–320.
- [86] C. W. Tornøe, P. Davis, F. Porreca, M. Meldal, α -Azido acids for direct use in solid-phase peptide synthesis, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*(12), 594–602.
- [87] J. T. Lundquist, J. C. Pelletier, Improved solid-phase peptide synthesis method utilizing α -azide-protected amino acids, *Org. Lett.* **2001**, *3*(5), 781–783.
- [88] P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, C.-H. Wong, The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(36), 10773–10778.
- [89] A. B. Charette, R. P. Wurz, T. Ollevier, Synthesis of α -nitro- α -diazocarbonyl derivatives and their applications in the cyclopropanation of alkenes and in O–H insertion reactions, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*(12), 4468–4484.
- [90] M. Jost, *Synthese von Efrapeptin C und Efrapeptin-Analoga*, Dissertation, Universität Bielefeld **2003**.

- [91] M. Bartra, F. Urpí, J. Vilarrasa, New synthetic "tricks". $[\text{Et}_3\text{NH}][\text{Sn}(\text{SPh}_3)]$ and Bu_2SnH_2 , two useful reagents for the reduction of azides to amines, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28(47), 5941–5944.
- [92] M. Bartra, P. Romea, F. Urpí, J. Vilarrasa, A fast procedure for the reduction of azides and nitro compounds based on the reducing ability of $\text{Sn}(\text{SR})_3$ -species, *Tetrahedron* **1990**, 46(2), 587–594.
- [93] M. Jost, T. Sonke, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, N. Sewald, Synthesis and enzymatic resolution of C^α -dialkylated α -azido carboxamides: new enantiopure α -azido acids as building blocks in peptide synthesis, *Synthesis* **2005**, (2), 272–278.
- [94] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides, *J. Org. Chem.* **2002**, 67(9), 3057–3064.
- [95] S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, Structures of the efraeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolyocladium niveum*, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113(2), 707–709.
- [96] S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, Structure of efraeptins from the fungus *Tolyocladium niveum*: peptide inhibitors of mitochondrial ATPase, *J. Org. Chem.* **1992**, 57(8), 2306–2313.
- [97] J. P. Abrahams, S. K. Buchanan, M. J. van Raau, I. M. Fearnley, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, The structure of bovine F_1 -ATPase complexed with the peptide antibiotic efraeptin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93(18), 9420–9424.
- [98] D. A. Bullough, C. G. Jackson, P. J. F. Henderson, R. B. Beechey, P. E. Linnett, The isolation and purification of the elvapeptins: a family of peptide inhibitors of mitochondrial ATPase activity, *FEBS Lett.* **1982**, 145(2), 258–262.
- [99] M. V. Uma, R. Sudha, P. Balaram, Spermidine as a potential biosynthetic precursor to the 1,5-diazabicyclo[4.3.0]nonene residue in the efraeptins, *J. Pept. Res.* **2001**, 58(5), 375–379.
- [100] H. A. Lucero, R. A. Ravizzini, R. H. Vallejos, Inhibition of spinach chloroplasts photophosphorylation by the antibiotics leucinostatin and efraeptin, *FEBS Lett.* **1976**, 68(1), 141–144.

- [101] H. Lucero, W. I. M. Lescano, R. H. Vallejos, Inhibition of energy conservation reactions in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* by antibiotics, *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *186*(1), 9–14.
- [102] H. Lardy, P. Reed, C.-H. C. Lin, Antibiotic inhibitors of mitochondrial ATP synthesis, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1975**, *34*(8), 1707–1710.
- [103] P. E. Linnett, R. B. Beechey, Inhibitors of the ATP synthetase systems, *Methods Enzymol.* **1979**, *55*, 472–518.
- [104] J. G. Wise, T. M. Duncan, L. Richardson, D. N. Cox, A. E. Senior, Properties of F₁-ATPase from the uncD412 mutant of *Escherichia coli*, *Biochem. J.* **1983**, *215*(2), 343–350.
- [105] T. Saishu, Y. Kagawa, R. Shimizu, Resistance of thermophilic ATPase (TF1) to specific F₁-ATPase inhibitors including local anesthetics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*(3), 822–826.
- [106] C. M. A. de Flombaum, A. O. Stoppani, Influence of efrapeptin, aurovertin and citreoviridin on the mitochondrial adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**, *3*(3), 143–145.
- [107] R. L. Cross, W. E. Kohlbrenner, The mode of inhibition of oxidative phosphorylation by efrapeptin (A23871). Evidence for an alternating site mechanism for ATP synthesis, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*(14), 4865–4873.
- [108] W. E. Kohlbrenner, R. L. Cross, The mode of inhibition of oxidative phosphorylation by efrapeptin (A23871): measurement of substrate effects on rates of inactivation by a tight-binding inhibitor, *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *198*(2), 598–607.
- [109] J. R. Gledhill, J. E. Walker, Inhibition sites in F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Biochem. J.* **2005**, *386*(3), 591–598.
- [110] A. E. Papathanassiou (Ergon Pharmaceuticals LLC), Mycotoxin derivatives as antimitotic agents, U. S. Patent **2003**, 6,528,489.
- [111] G. Nagaraj, M. V. Uma, M. S. Shivayogi, H. Balaram, Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*(1), 145–149.

- [112] M. Jost, A. Papathanassiou, Koinjektion des aus *Tolypocladium niveum* isolierten mikroheterogenen Gemisches von Efraeptinen mit synthetischem Efraeptin C **2004**, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [113] G. J. Gatto, Jr., M. T. Boyne, II, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, Biosynthesis of pipercolic acid by RapL, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(11), 3838–3847.
- [114] C. M. Boot, K. Tenney, F. A. Valeriote, P. Crews, Highly *N*-methylated linear peptides produced by an atypical sponge-derived *Acremonium* sp., *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*(1), 83–92.
- [115] J. E. Walker, ATP-Synthese durch Rotations-Katalyse (Nobel-Vortrag), *Angew. Chem.* **1998**, *110*(17), 2438–2450.
- [116] J. E. Walker, ATP synthesis by rotary catalysis (Nobel lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*(17), 2308–2319.
- [117] P. D. Boyer, The binding change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1140*(3), 215–250.
- [118] R. L. Cross, The rotary binding change mechanism of ATP synthases, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1458*(2–3), 270–275.
- [119] P. J. Kraulis, Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Cryst.* **1991**, *24*(5), 946–950.
- [120] J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter, J. E. Walker, Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature* **1994**, *370*(6491), 621–628.
- [121] J. R. Gledhill, J. E. Walker, Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase, *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*(5), 989–992.
- [122] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, New York, 3. Auflage **1994**, S. 223 ff.
- [123] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, New York, 3. Auflage **1994**, S. 401 ff.
- [124] L. H. Hartwell, Nobel lecture: yeast and cancer, *Biosci. Rep.* **2002**, *22*(3–4), 373–394.

- [125] T. Hunt, Nobel lecture: protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions, *Biosci. Rep.* **2002**, *22*(5–6), 465–486.
- [126] P. M. Nurse, Nobel lecture: cyclin dependent kinases and cell cycle control, *Biosci. Rep.* **2002**, *22*(5–6), 487–499.
- [127] J. Folkman, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J. Natl. Canc. Inst.* **1990**, *82*, 4–6.
- [128] M. M. Eatock, A. Schätzlein, S. B. Kaye, Tumor vasculature as a target for anticancer therapy, *Cancer Treat Rev.* **2000**, *26*(3), 191–204.
- [129] A. E. Papathanassiou, N. J. MacDonald, A. Bencsura, H. A. Vu, F₁F₀-ATP synthase functions as a co-chaperone of Hsp90-substrate protein complexes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *345*(1), 419–429.
- [130] L.-P. Molleyres, A. Fredenhagen, T. Schütz, B. Böhlendorf, S. Neff, Y. Huang, Production of neofrapeptins for use as insecticides (Syngenta) **2004**, DE 10361201 A1.
- [131] M. Kaneda, Studies on bottromycins I. ¹H and ¹³C NMR assignments of bottromycin A₂, the main component of the complex, *J. Antibiot.* **1992**, *45*(5), 792–796.
- [132] L. T. Tan, X. C. Cheng, P. R. Jensen, W. Fenical, Scytalidamides A and B, new cytotoxic cyclic heptapeptides from a marine fungus of the genus *Scytalidium*, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*(23), 8767–8773.
- [133] A. Tsunoo, M. Kamijo, N. Taketomo, Y. Sato, K. Ajisaka, Roseocardin, a novel cardiogenic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* TT103, *J. Antibiot.* **1997**, *50*(12), 1007–1013.
- [134] J. P. Springer, R. J. Cole, J. W. Dorner, R. H. Cox, J. L. Richard, C. L. Barnes, D. van der Helm, Structure and conformation of roseotoxin B, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*(8), 2388–2392.
- [135] Y. Hayakawa, H. Adachi, J. W. Kim, K. Shin-ya, H. Seto, Adenopeptin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Chrysosporium* sp, *Tetrahedron* **1998**, *54*(52), 15871–15878.
- [136] D. Chabasse, R. Robert, Detection of lectin from *Chrysosporium keratinophilum* (Frey) Carmichael and *Anixiopsis stercoraria* (Hansen) Hansen by inhibition of haemagglutination, *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **1986**, *137*(2), 187–193.

- [137] D. Chabasse, R. Robert, G. Tronchin, J. P. Bouchara, Ultrastructural localization of 'anixiopsin': a lectin of the fungus *Anixiopsis stercoraria* (Hansen) Hansen, *Mycopathologia* **1988**, 103(2), 81–85.
- [138] A. Fredenhagen, F. Petersen, M. Tintelnot-Blomley, J. Rosel, H. Mett, P. Hug, Semicochliodinol A and B: inhibitors of HIV-1 protease and EGF-R protein tyrosine kinase related to asterriquinones produced by the fungus *Chrysosporium merdarium*, *J. Antibiot.* **1997**, 50(5), 395–401.
- [139] A. Tsipouras, M. A. Goetz, O. D. Hensens, J. M. Liesch, D. A. Ostlind, J. M. Williamson, A. W. Dombrowski, R. G. Ball, S. B. Singh, Sporandol: a novel antiparasitic binaphthalene from *Chrysosporium meridarium*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7(10), 1279–1282.
- [140] H. Hug, Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz, *Biol. in uns. Zeit* **2000**, 30(3), 128–135.
- [141] S. Grimm, Die Apoptose: Programmierter Zelltod, *Chem. in uns. Zeit* **2003**, 37(3), 172–178.
- [142] F. Höffeler, Die Maschinerie der Apoptose: Chronik eines angekündigten Todes, *Biol. in uns. Zeit* **2004**, 34(1), 16–23.
- [143] M. H. Harris, C. B. Thompson, The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability, *Cell Death and Diff.* **2000**, 7(12), 1182–1191.
- [144] C. Brenner, G. Kroemer, Mitochondria – the death signal integrators, *Science* **2000**, 289(5482), 1150–1151.
- [145] G. Nuñez, M. A. Benedict, Y. Hu, N. Inohara, Caspases: the proteases of the apoptotic pathway, *Oncogene* **1998**, 17(25), 3237–3245.
- [146] F. Bloch, W. Hansen, M. E. Packard, Nuclear induction, *Phys. Rev.* **1946**, 69(3–4), 127.
- [147] E. M. Purcell, H. G. Torrey, R. V. Pound, Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid, *Phys. Rev.* **1946**, 69(1–2), 37–38.
- [148] R. R. Ernst, W. A. Anderson, Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, 37(1), 93–102.

- [149] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*(5), 2229–2246.
- [150] F. Delaglio, Z. Wu, A. Bax, Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2DCOSY spectra, *J. Magn. Res.* **2001**, *149*(2), 276–281.
- [151] Z. Wu, A. Bax, Measurement of homonuclear proton couplings based on cross-peak nulling in CT-COSY, *J. Magn. Res.* **2001**, *151*(2), 242.
- [152] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Res.* **1983**, *53*(3), 521–528.
- [153] A. Bax, M. F. Summers, Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*(8), 2093–2094.
- [154] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*(1), 185–189.
- [155] G. Wagner, A. Kumar, K. Wüthrich, Systematic application of two-dimensional ^1H nuclear magnetic resonance techniques for studies of proteins 2: combined use of correlated spectroscopy and nuclear Overhauser spectroscopy for sequential assignments of backbone resonances and elucidation of polypeptide secondary structures, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *114*(2), 375–384.
- [156] W. Braun, C. Bösch, L. R. Brown, N. Go, K. Wüthrich, Combined use of proton-proton Overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations: application to micelle-bound glucagon, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *667*, 377–396.
- [157] T. J. Tolbert, J. R. Williamson, Preparation of specifically deuterated and ^{13}C -labeled RNA for NMR studies using enzymatic synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*(50), 12100–12108.
- [158] I. Kim, S. Watanabe, Y. Muto, K. Hosono, K. Takai, H. Takaku, G. Kawai, K. Watanabe, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Symposium Series* **1995**, *34*, 123.
- [159] J. D. Gross, V. M. Gelev, G. Wagner, A sensitive and robust method for obtaining intermolecular NOEs between side chains in large protein complexes, *J. Biomol. NMR* **2003**, *25*(3), 235–242.

- [160] C. Eichmüller, W. Schüler, R. Konrat, B. Krautler, Simultaneous measurement of intra- and intermolecular NOEs in differentially labeled protein-ligand complexes, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*(2), 107–116.
- [161] B. Reif, R. G. Griffin, ^1H detected ^1H , ^{15}N correlation spectroscopy in rotating solids, *J. Magn. Res.* **2003**, *160*(1), 78–83.
- [162] B. Meyer, T. Peters, NMR-Techniken zum Screening und zur Identifizierung der Bindung von Liganden an Proteinrezeptoren, *Angew. Chem.* **2003**, *115*(8), 890–918.
- [163] B. Meyer, T. Peters, NMR-Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*(8), 864–890.
- [164] G. Snatzke, Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I, *Chem. in uns. Zeit* **1981**, *15*(3), 78–87.
- [165] G. D. Fasman (Herausgeber), *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Plenum Press, New York **1996**.
- [166] S. M. Kelly, N. C. Price, The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function, *Curr. Prot. Pept. Sci.* **2000**, *1*(4), 349–384.
- [167] M. B. Robin, *Higher excited states of polyatomic molecules*, Band 2, Academic Press, New York **1975**, S. 122–160.
- [168] M. C. Manning, R. W. Woody, Theoretical CD studies of polypeptide helices: examination of important electronic and geometric factors, *Biopolymers* **1991**, *31*(5), 569–586.
- [169] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119–139.
- [170] C. Toniolo, E. Benedetti, The polypeptide 3_{10} -helix, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*(9), 350–353.
- [171] M. Gobbo, L. Biondi, F. Filira, F. Formaggio, M. Crisma, R. Rocchi, C. Toniolo, Q. B. Broxterman, J. Kamphuis, Helix induction potential of *N*-terminal α -methyl α -amino acids, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, *5*(2–3), 105–107.

- [172] R. A. G. D. Silva, S. C. Yasui, J. Kubelka, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, T. A. Keiderling, Discriminating 3_{10} - from α -helices: vibrational and electronic CD and IR absorption study of related Aib-containing oligopeptides, *Biopolymers* **2002**, *65*(4), 229–243.
- [173] F. Formaggio, C. Peggion, M. Crisma, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, J.-P. Mazauleyrat, M. Wakselman, C. Toniolo, Recent contributions of electronic circular dichroism to the investigation of oligopeptide conformations, *Chirality* **2004**, *16*(6), 388–397.
- [174] G. Schlosser, G. Mező, R. Kiss, E. Vass, Z. Majer, M. Fejlbrieff, A. Perczel, S. Bősze, S. Welling-Wester, F. Hudecz, Synthesis, solution structure analysis and antibody binding of cyclic epitope peptides from glycoprotein D of *Herpes simplex* virus type I, *Biophys. Chem.* **2003**, *106*(2), 155–171.
- [175] V. Farkas, E. Vass, I. Hanssens, Z. Majer, M. Hollósi, Cyclic peptide models of the Ca^{2+} -binding loop of α -lactalbumin, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*(17), 5310–5320.
- [176] S. Weigelt, N. Sewald, Synthesis of ^2H -labelled α -azidoisobutyryl chloride (D_6 -Azib-Cl) as $^2\text{H}_6$ -Aib equivalent building block in peptide synthesis, *Synlett* **2004**, (4), 726–728.
- [177] J. Hartung, S. Hünig, R. Kneuer, M. Schwarz, H. Wenner, 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) – an efficient reagent in the synthesis of alkyl tosylates or sulfenates, *Synthesis* **1997**, (12), 1433–1438.
- [178] J. Zaloom, D. C. Roberts, Preparation of azido derivatives from amino acids and peptides by diazo transfer, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*(25), 5173–5176.
- [179] C. Dehoux, E. Fontaine, J.-M. Escudier, M. Baltas, L. Gorrichon, Total synthesis of a thymidine 2-deoxypolyoxin C analogue, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*(8), 2601–2608.
- [180] B. O. Lindgren, T. Nilsson, Preparation of carboxylic acids from aldehydes (including hydroxylated benzaldehydes) by oxidation with chlorite, *Acta Chem. Scand.* **1973**, *27*, 888–890.
- [181] M. Meldal, M. A. Juliano, A. M. Jansson, Azido acids in a novel method of solid-phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(14), 2531–2534.

- [182] A. Strecker, Über die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, 75(1), 27–45.
- [183] H. Wang, X. Zhao, Y. Li, L. Lu, Solvent-controlled asymmetric Strecker reaction: stereoselective synthesis of α -trifluoromethylated α -amino acids, *Org. Lett.* **2006**, 8(7), 1379–1381.
- [184] J. Blacker, L. A. Clutterbuck, M. R. Crampton, C. Grosjean, M. North, Catalytic, asymmetric Strecker reactions catalysed by titanium^{IV} and vanadium^V(salen) complexes, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17(9), 1449–1456.
- [185] N. Kato, T. Mita, M. Kanai, B. Therrien, M. Kawano, K. Yamaguchi, H. Danjo, Y. Sei, A. Sato, S. Furusho, M. Shibasaki, Assembly state of catalytic modules as chiral switches in asymmetric Strecker amino acid synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(21), 6768–6769.
- [186] P. Vachal, E. N. Jacobsen, Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the Strecker reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(34), 10012–10014.
- [187] C. Cativiela, M. D. Díaz-de-Villegas, Stereoselective synthesis of quaternary α -amino acids. Part 1: acyclic compounds, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9(20), 3517–3599.
- [188] C. Cativiela, M. D. Díaz-de-Villegas, Stereoselective synthesis of quaternary α -amino acids. Part 2: cyclic compounds, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11(3), 645–732.
- [189] B. Kaptein, Enzymatic resolution of H-DL-Iva-NH₂ **2006**, Experimental data.
- [190] P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(34), 6029–6032.
- [191] P. Garner, J. M. Park, The synthesis and configurational stability of differentially protected β -hydroxy- α -amino aldehydes, *J. Org. Chem.* **1987**, 52(12), 2361–2364.
- [192] C. Flamant-Robin, Q. Wang, A. Chiaroni, N. A. Sasaki, An efficient method for the stereoselective synthesis of *cis*-3-substituted prolines: conformationally constrained α -amino acids, *Tetrahedron* **2002**, 58(52), 10475–10484.

- [193] M. W. Holladay, C. W. Lin, C. S. May, D. S. Garvey, D. G. Witte, T. R. Miller, C. A. W. Wolfram, A. M. Nadzan, *trans*-3-*n*-Propyl-L-proline is a highly favorable, conformationally restricted replacement for methionine in the C-terminal tetrapeptide of cholecystokinin. Stereoselective synthesis of 3-allyl- and 3-*n*-propyl-L-proline derivatives from 4-hydroxy-L-proline, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*(1), 455–457.
- [194] W. O. Moss, R. H. Bradbury, N. J. Hales, T. Gallagher, Generation of α -amino acid homoenolate equivalents. Synthesis of 3-substituted prolines, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*(39), 5653–5656.
- [195] W. O. Moss, A. C. Jones, R. Wisedale, M. F. Mahon, K. C. Molloy, R. H. Bradbury, N. J. Hales, T. Gallagher, 2-Amino ketene *S,S*-acetals as α -amino acid homoenolate equivalents. Synthesis of 3-substituted prolines and molecular structure of 2-(*N*-pivaloylpyrrolidin-2-ylidene)-1,3-dithiane, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, *20*, 2615–2624.
- [196] S. L. Titouani, J.-P. Lavergne, P. Viallefont, R. Jacquier, Nouvelles synthèses de L-amino-acids I: Synthèse stéréospécifique de L-proline, *cis*(*trans*) méthyl-3(4) L-prolines, *Tetrahedron* **1980**, *36*(20–21), 2961–2965.
- [197] E. M. Stocking, J. F. Sanz-Cervera, C. J. Unkefer, R. M. Williams, Studies on the biosynthesis of paraherquamide. Construction of the amino acid framework, *Tetrahedron* **2001**, *57*(25), 5303–5320.
- [198] R. Sharma, W. D. Lubell, Regioselective enolization and alkylation of 4-oxo-*N*-(9-phenylfluoren-9-yl)proline: synthesis of enantiopure proline-valine and hydroxyproline-valine chimeras, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*(1), 202–209.
- [199] P. Karoyan, J. Quancard, J. Vaissermann, G. Chassaing, Amino-zinc-enolate carbometalation reactions: application to ring closure of terminally substituted olefin for the asymmetric synthesis of *cis*- and *trans*-3-prolinoleucine, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*(6), 2256–2265.
- [200] P. Karoyan, G. Chassaing, New strategy for the synthesis of 3-substituted prolines, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(1), 85–88.
- [201] P. Karoyan, G. Chassaing, Asymmetric synthesis of (2*S*,3*S*)- and (2*S*,3*R*)-3-prolinomethionines: 3-methylsulfanylmethyl-pyrrolidine-2-carboxylic acids, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*(12), 2025–2032.

- [202] E. Lorthiois, I. Marek, J.-F. Normant, Zinca-ene-allene and zinc-enolate cyclization. Towards the synthesis of polysubstituted pyrrolidines, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(1), 89–92.
- [203] P. Karoyan, G. Chassaing, Asymmetric synthesis of 3-alkyl substituted prolines by alkylation of a chiral sulfone, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*(7), 1221–1223.
- [204] P. Karoyan, G. Chassaing, Short asymmetric synthesis of (2*S*,3*S*)- and (2*S*,3*R*)-3-prolinoglutamic acids: 2-carboxy-3-pyrrolidine-acetic acids (CPAA), *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*(2), 253–255.
- [205] J. Y. L. Chung, J. T. Wasicak, W. A. Arnold, C. S. May, A. M. Nadzan, M. W. Holladay, Conformationally constrained amino acids. Synthesis and optical resolution of 3-substituted proline derivatives, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*(1), 270–275.
- [206] A. Fournier, C. T. Wang, A. M. Felix, Applications of BOP reagent in solid phase synthesis. Advantages of BOP reagent for difficult couplings exemplified by a synthesis of [Ala¹⁵]-GRF(1-29)-NH₂, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *31*(1), 86–97.
- [207] O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *tert*-Butoxycarbonylation of amino acids and their derivatives: *N-tert*-butoxycarbonyl-L-phenylalanine, *Org. Synth.* **1985**, *63*, 160–170.
- [208] A. Sutherland, C. L. Willis, Chemoenzymatic synthesis of 4-amino-2-hydroxy acids: a comparison of mutant and wild-type oxidoreductases, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*(22), 7764–7769.
- [209] H. Loibner, E. Zbiral, Reaktionen mit phosphororganischen Verbindungen. XLI[1]. Neuartige synthetische Aspekte des Systems Triphenylphosphin-Azodicarbonsäureester-Hydroxyverbindung, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*(6), 2100–2113.
- [210] O. Mitsunobu, The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products, *Synthesis* **1981**, (1), 1–28.
- [211] R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, G. Palumbo, Synthesis of enantiopure *N*- and *C*-protected *homo*-β-amino acids by direct homologation of α-amino acids, *Tetrahedron* **1995**, *51*(45), 12337–12350.

- [212] R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, G. Palumbo, Chiral *N*-protected β -iodoamines from α -aminoacids: a general synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36(1), 167–168.
- [213] R. Appel, Tertiäres Phosphan/Tetrachlormethan, ein vielseitiges Reagens zur Chlorierung, Dehydratisierung und P–N-Verknüpfung, *Angew. Chem.* **1975**, 87(24), 863–874.
- [214] R. Appel, Tertiary phosphane/tetrachloromethane, a versatile reagent for chlorination, dehydration, and P–N linkage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, 14(12), 801–811.
- [215] G. A. Reynolds, F. D. Saeva, J. J. Doney, C. H. Chen, Redox behavior of some new bipyran and bithiopyran derivatives. One- vs. two-electron oxidations, *J. Org. Chem.* **1984**, 49(25), 4843–4848.
- [216] M. Jost, S. Weigelt, T. Huber, Z. Majer, J.-C. Greie, K. Altendorf, N. Sewald, Synthesis, structural, and biological studies of efrapeptin C analogues, *Chem. Biodiv.* **2007**, angenommen zur Publikation.
- [217] C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, Circular dichroism spectrum of a peptide 3_{10} -helix, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(11), 2744–2745.
- [218] G. Yoder, A. Polese, R. A. G. D. Silva, F. Formaggio, M. Crisma, Q. B. Broxterman, J. Kamphuis, C. Toniolo, T. A. Keiderling, Conformational characterization of terminally blocked L-(α Me)Val homopeptides using vibrational and electronic circular dichroism. 3_{10} -Helical stabilization by peptide-peptide interaction, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119(43), 10278–10285.
- [219] F. Formaggio, M. Crisma, P. Rossi, P. Scrimin, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, J. Kamphuis, C. Toniolo, The first water-soluble 3_{10} -helical peptides, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6(24), 4498–4504.
- [220] A. R. Bandani, B. Amiri, T. M. Butt, R. Gordon-Weeks, Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1510(1–2), 367–377.

- [221] K. Steffens, E. Schneider, G. Deckers-Hebestreit, K. Altendorf, F_o portion of *Escherichia coli* ATP synthase. Further resolution of trypsin-generated fragments from subunit B, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*(12), 5866–5869.
- [222] A. Arnold, H. U. Wolf, B. P. Ackermann, H. Bader, An automated continuous assay of membrane-bound and soluble ATPases and related enzymes, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*(1), 209–213.
- [223] K. Steffens, E. Schneider, B. Herkenhoff, R. Schmid, K. Altendorf, Chemical modification of the F_o part of the ATP synthase (F₁F_o) from *Escherichia coli*. Effects on proton conduction and F₁ binding, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*(3), 617–622.
- [224] R. D. Henkel, J. L. VandeBerg, R. A. Walsh, A microassay for ATPase, *Anal. Biochem.* **1988**, *169*(2), 312–318.
- [225] K. Altendorf, M. Gassel, W. Puppe, T. Mollenkamp, A. Zeeck, C. Boddien, K. Fendler, E. Bamberg, S. Drose, Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*, *Acta Physiol. Scand.* **1998**, *163*(2), 137–146.
- [226] M. Jourdan, S. R. Griffiths-Jones, M. S. Searle, Folding of a β -hairpin peptide derived from the N-terminus of ubiquitin. Conformational preferences of β -turn residues dictate non-native β -strand interactions, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*(12), 3539–3548.
- [227] G. M. Brett, E. N. C. Mills, J. Bacon, N. Wellner, R. D. Husain, A. S. Tatham, P. R. Shewry, M. R. A. Morgan, Temperature-dependent binding of monoclonal antibodies to C hordein, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1594*(1), 17–26.
- [228] L. Halab, W. D. Lubell, Effect of sequence on peptide geometry in 5-*tert*-butylprolyl type VI β -turn mimics, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(11), 2474–2484.
- [229] M. Malešević, Z. Majer, E. Vass, T. Huber, U. Strijowski, M. Hollósi, N. Sewald, Spectroscopic detection of pseudo-turns in homodetic cyclic penta- and hexapeptides comprising β -homoproline, *Int. J. Pept. Res. Therap.* **2006**, *12*(2), 165–177.
- [230] C. Elschenbroich, A. Salzer, *Organometallicchemie*, Teubner, Stuttgart **1988**, S. 430 ff.
- [231] K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, Wiley-Interscience, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore **1986**.

- [232] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH, Weinheim, 4. Auflage **2006**.
- [233] A. Meddour, J. Uziel, J. Courtieu, S. Jugé, Enantiodifferentiation of acyclic phosphonium salts in chiral liquid crystalline solutions, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*(9), 1424–1429.
- [234] E. de Alba, N. Tjandra, On the accurate measurement of amide one-bond ^{15}N - ^1H couplings in proteins: effects of cross-correlated relaxation, selective pulses and dynamic frequency shifts, *J. Magn. Reson.* **2006**, *183*(1), 160–165.
- [235] M. Z. Kassaei, A. R. Bekhradnia, S. Talebzadeh, Isotope effects by comparing ^1H - and ^2D -NMR spectra of 9,9'-bisbicyclo[4.3.0]cyclonona-2,4,7-triene, *Spectrosc. Lett.* **2005**, *38*(4–5), 487–496.
- [236] M. Jost, *Azidocarbonsäuren als Bausteine für die Peptidsynthese*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2000**.
- [237] C. George, J. L. Flippen-Anderson, A. Bianco, M. Crisma, F. Formaggio, C. Toniolo, Crystallographic characterization of tryptophan-containing peptide 3_{10} -helices, *Pept. Res.* **1996**, *9*(6), 315–321.
- [238] M. Gobbo, A. Nicotra, R. Rocchi, M. Crisma, C. Toniolo, Influence of glycosylation on the conformational preferences of folded oligopeptides, *Tetrahedron* **2001**, *57*(12), 2433–2443.
- [239] F. Polo, S. Antonello, F. Formaggio, C. Toniolo, F. Maran, Evidence against the hopping mechanism as an important electron transfer pathway for conformationally constrained oligopeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(2), 492–493.
- [240] N. A. Thornberry, Y. Lazebnik, Caspases: enemies within, *Science* **1998**, *281*(5381), 1312–1316.
- [241] J. R. Bayascas, V. J. Yuste, E. Benito, J. Garcia-Fernández, J. X. Comella, Isolation of AmphiCASP-3/7, an ancestral caspase from amphioxus (*Branchiostoma floridae*). Evolutionary considerations for vertebrate caspases, *Cell Death and Diff.* **2002**, *9*(10), 1078–1089.
- [242] D. A. Le, Y. Wu, Z. Huang, K. Matsushita, N. Plesnila, J. C. Augustinack, B. T. Hyman, J. Yuan, K. Kuida, R. A. Flavell, M. A. Moskowitz, Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after *in vivo* cerebral ischemia

and *in vitro* oxygen glucose deprivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(23), 15188–15193.

- [243] A. Müller, *Modifizierung cyclischer RGD-Peptide durch β -Aminosäuren: Synthese und biologische Aktivität*, Dissertation, Universität Leipzig **1999**.